

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



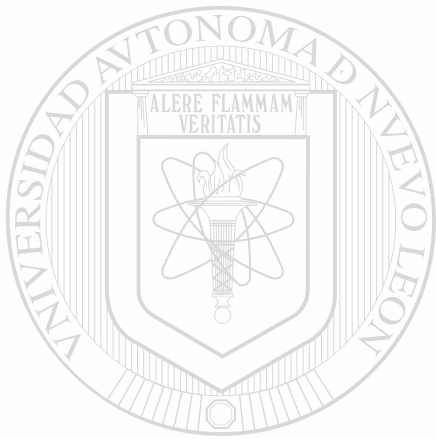
EFFECTO DE LA PEROXISOMICINA A1 SOBRE
LA AUTOFAGIA DE PEROXISOMAS EN EL
HIGADO DE *MACACA FASCICULARIS* EN UN
MODELO *IN VITRO*

Por:

QFB MARIA LETICIA MORENO MARTINEZ

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

Agosto, 2000



MARIA LETICIA MORENO MARTINEZ

U
ANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

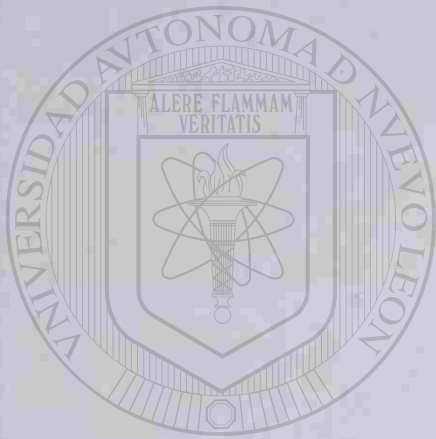
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

, 2000

TD
QH603
.P47
M6
c.1



1080095049



UANL

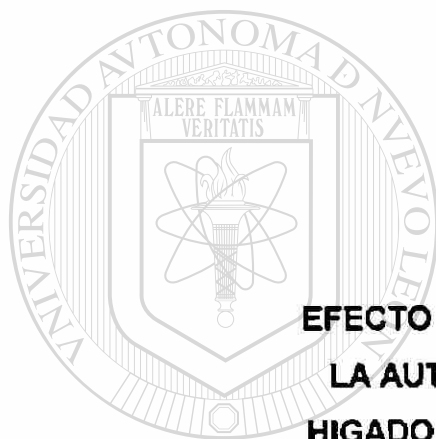
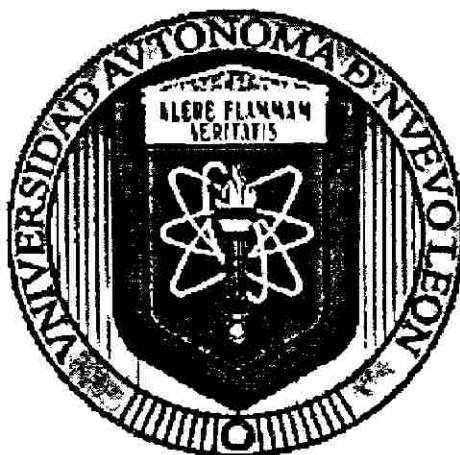
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**EFFECTO DE LA PEROXISOMICINA A1 SOBRE
LA AUTOFAGIA DE PEROXISOMAS EN EL
HIGADO DE *MACACA FASCICULARIS* EN UN**

MODELO *IN VITRO*

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Por:

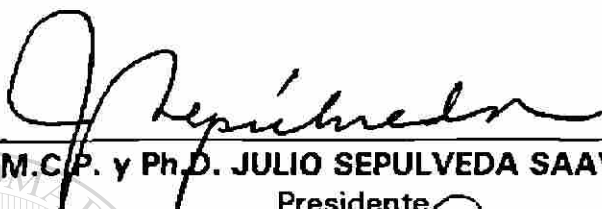
QFB MARIA LETICIA MORENO MARTINEZ

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

Agosto, 2000

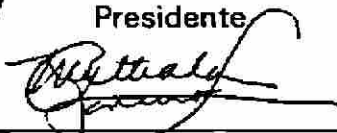
**EFFECTO DE LA PEROXISOMICINA A1 SOBRE LA AUTOFAGIA DE
PEROXISOMAS EN EL HIGADO DE *Macaca fascicularis*
EN UN MODELO *In Vitro***

Aprobación de la Tesis:



M.C.P. y Ph.D. JULIO SEPULVEDA SAAVEDRA

Presidente



Dr. ren. nat. MYRTHALA MORENO SEPULVEDA

Secretario



Dr. med. ALFREDO PIÑEYRO LOPEZ

1er. Vocal



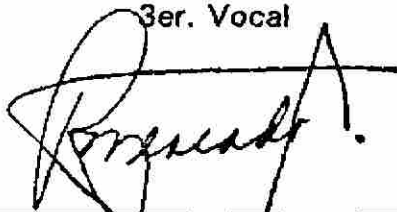
DRA. NOEMI WAKSMAN DE TORRES

2do. Vocal



Dr. med. LOURDES GARZA OCAÑAS

3er. Vocal



DR. ROBERTO MERCADO LONGORIA

Subdirector

de Investigación y Estudios de Posgrado

**"EFECTO DE LA PEROXISOMICINA A1 SOBRE LA AUTOFAGIA
DE PEROXISOMAS EN EL HIGADO DE MACACA
FASCICULARIS EN UN MODELO *IN VITRO*".**

Presentado por:

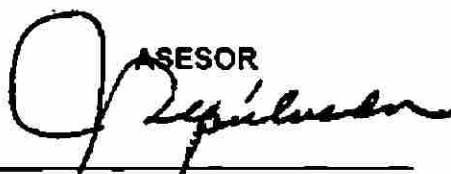
QFB MARIA LETICIA MORENO MARTINEZ

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 asesoría del Dr. Julio Sepúlveda Saavedra y la coasesoría de la Dra. Myrthala Moreno Sepúlveda.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

FIRMAS

ASESOR



M.C.P. Y Ph. D. JULIO SEPULVEDA
SAAVEDRA

COASESORA

DRA. REN. NAT. MYRTHALA MORENO
SEPULVEDA

DEDICATORIA

Con plétórico amor a mi familia que me ha tenido siempre paciencia y comprensión en mi decisión de realizar estudios de posgrado

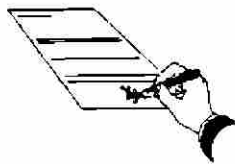
**Para mi esposo Jesús Manuel Rodríguez Medina
Mi hija linda Leticia María Rodríguez Moreno
Mi pequeña Gloria Lisset Rodríguez Moreno**

A ellos les debo gran parte del estímulo para continuar en la vida superándome

Con sincera gratitud

María Leticia Moreno Martínez.

"Mi alma al estar en busca de la



verdad siente placer al encontrarla"

AGRADECIMIENTOS

Para mí la gratitud es un sentimiento muy fuerte y poderoso que me permite corresponder por los beneficios recibidos y debido a ello siempre me es grato expresarla. Las palabras escritas aquí, quizá no sean las más elegantes y adecuadas para reflejar el impacto que ha tenido para mí los siguientes, en la realización de mis estudios de posgrado.

Agradezco a Dios por darme la fortaleza necesaria para llegar hasta este punto de mi vida.

Agradezco a esos seres maravillosos, mis padres **Gabriel y Celina**, por todo lo que me han brindado desinteresadamente y que me ha permitido desarrollarme personal y profesionalmente; mi respeto, admiración y amor a ellos.

Agradezco a mis hermanos y sus familias su cariño y "las porras" que para mí tienen un significado especial. Sencillamente gracias a Armando, Mercedes, Gabriela y Celina.

Agradezco a los miembros del Posgrado de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) el haberme aceptado como estudiante de su Programa Doctoral. En general a todo su personal de los distintos Departamentos, gracias por su hospitalidad y ayuda cuando así la requerí.

Agradezco al **Dr. Jesús Zacarías Villarreal Pérez**, Director de la Facultad de Medicina, UANL y al **Dr. Ramón Guajardo Quiroga**, Secretario Académico de la UANL, su intervención y apoyo para la obtención del premio monetario al mejor proyecto de Tesis de posgrado en el área morfológica, en el año de 1995. Una parte del trabajo experimental de esta Tesis se efectuó gracias al soporte financiero del mencionado premio.

Agradezco sinceramente al **Dr. Julio Sepúlveda Saavedra** por aceptarme en su grupo de trabajo y por su asesoría indudablemente tan profesional y científica, lo que motivo en mí seguir su ejemplo. El haber sido estudiante del Doctorado con especialidad en Morfología bajo su dirección fue particularmente formativo.

Agradezco a la Coasesora **Dra. Myrthala Moreno Sepúlveda** sus comentarios y enseñanzas siempre precisos y objetivos, sin ello no hubiera sido posible la terminación de mis estudios de posgrado y de la presente Tesis. Es digno de resaltarse la responsabilidad con la que la Coasesora y el Asesor trabajaron para la edición y terminación de la presente Tesis.

Agradezco al **Dr. Alfredo Piñeyro López** su experiencia profesional y sus acertados comentarios para mejorar esta Tesis. La donación de la toxina (peroxisomicina A1) y de los monos *Macaca fascicularis* estuvo bajo su cargo y fue *fundamental* en la elaboración de mi trabajo experimental.

Agradezco a la **Dra. Noemí Waksman de Torres** sus valiosas observaciones y correcciones que fueron decisivas en la elaboración del escrito de Tesis. Su visión científica es ejemplar.

Agradezco a la **Dra. Lourdes Garza Ocañas** su paciencia y profesionalismo con la que revisó mi manuscrito de Tesis y su amable intervención respecto a ello. Siempre me alentó a seguir adelante.

Agradezco al **Dr. Jesús Manuel Rodríguez Medina** el haberme iniciado e inculcado el amor por la carrera científica. Sin su apoyo y sus primeras enseñanzas no hubiera sido posible la culminación de mis estudios de Doctorado.

Agradezco a todos mis maestros la huella imborrable que dejaron en mi con sus enseñanzas, profesionalismo y orientaciones.

Agradezco al **QCB Victor A. Támez Rodríguez** por su ayuda tan importante en el manejo valiente y experimentado de los monos *Macaca fascicularis*. Por su tiempo gracias.

Agradezco a todos mis compañeros del Doctorado su calidez y el haberme permitido compartir con ellos nuestros ideales. El conocerlos fue muy placentero y me dio la oportunidad de aprender de mis errores para así crecer juntos.

Agradezco a mi amiga **Raquel G. Ballesteros Elizondo** por haberme escuchado y confortado cuando así lo necesite. Sus conocimientos en el área histológica que compartió conmigo fueron de trascendencia para mi preparación académica.

Agradezco a todo el personal del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León a cargo del **Dr. J. Sepúlveda** por su colaboración siempre profesional y generosa, en especial a la **QCB Rosa María Leal González** y a la **Sra. Nora Frías Trejo** por su ayuda en la preparación de los cortes finos y a los **Sres. Victor H. Juárez Morin y Lorenzo A. Rada Castañeda** por la impresión del material fotográfico, todo parte del trabajo técnico de microscopía electrónica. Al **Dr. Fidencio Gutiérrez** por su interés y cooperación en la toma de algunas micrografías electrónicas.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la Beca de manutención con registro 89884, otorgada para la realización del Doctorado en Ciencias con especialidad en Morfología.

Agradezco a las autoridades de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP) su apoyo y facilidades al permitirme formar parte del programa de mejoramiento de profesores y así poder realizar mis estudios de posgrado, muy especialmente a la **Dra. Beatriz J. Velásquez Castillo** directora de la Facultad de Medicina de esta Universidad por su intervención para que lo anterior se pudiera consolidar y además así obtener una Beca del sistema PROMEP, la cual fue un estímulo económico muy importante y necesario para así poder concluir la última parte del trabajo experimental de la Tesis.

Agradezco al **Dr. Jesús M. Rodríguez Medina** jefe del Laboratorio de Proteínas, Peptidos y Regulación de la Facultad de Medicina, UASLP, por las facilidades concedidas para la elaboración de algunas técnicas bioquímicas y a la **QFB Lidia Margarita Barrios Compean**, por su ayuda técnica en la determinación bioquímica de algunas de las enzimas presentadas en este trabajo. De ella también valoro profundamente su compañerismo y amistad.

Agradezco a **Mario A. Valdez** sus acertados comentarios y conocimientos en el área de computación, me fueron muy útiles.

Agradezco a mi hermano **Ing. Armando Moreno M.** su paciencia, tiempo y colaboración en la impresión de esta Tesis. Sus conocimientos en computación han sido muy provechosos para mi actualización en esta área de vital importancia.

*Para todos con sinceridad
María Leticia Moreno Martínez.*

Capítulo	Pág.
2.4 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL _____	25
2.4.1 Estandarización del cultivo de órgano y estudio piloto _____	26
2.4.2 Preparación del animal y obtención del hígado _____	27
2.4.3 Cultivo de órgano de <i>Macaca fascicularis</i> _____	27
2.4.3.1 Integridad morfológica y funcional del hígado _____	28
2.4.3.1-1 Tinción de Hematoxilina y Eosina (HE) _____	29
2.4.3.1-2 Detección de grasa por técnica histoquímica del rojo oleoso _____	29
2.4.3.1-3 Detección de glucógeno por técnica histoquímica de la reacción del ácido peryódico de Schiff (PAS) _____	29
2.4.3.1-4 Ensayo de la actividad de tirosina aminotransferasa (TAT) _____	30
2.4.3.2 Preparación de los platos de cultivo con Gelfoam _____	31
2.4.3.3 Obtención de explantes de hígado de 1 mm de grosor, incubación y recolección _____	31
2.4.4 Viabilidad del hígado en el cultivo de órgano _____	34
2.4.4.1 Indicadores bioquímicos _____	34
2.4.4.1.-1 Inducción de tirosina aminotransferasa (TAT) por glucagon _____	34
2.4.4.1-2 Ensayo de la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) _____	35
2.4.4.2 Indicadores morfológicos para determinar la viabilidad del hígado en el cultivo de órgano _____	36
2.4.5 Estudios morfológicos en los explantes de hígado cultivados _____	36
2.4.5.1 Técnica citoquímica para la detección de la actividad de catalasa peroxisomal _____	38
2.4.5.2 Técnica citoquímica para la detección de la actividad de fosfatasa ácida lisosomal _____	37
2.4.5.3 Análisis morfométrico con microscopía de luz _____	37
2.4.5.4 Análisis morfométrico con microscopía electrónica _____	38
2.4.5.4.1 Determinación de la fracción de volumen del organelo por el Método de Weibel _____	38
2.4.6 Estudios bioquímicos en los explantes de hígado cultivados _____	39
2.4.6.1 Ensayo de la actividad de catalasa peroxisomal _____	39
2.4.6.2 Ensayo de la actividad de tiolasa peroxisomal _____	40
2.4.6.3 Ensayo de la actividad de fosfatasa ácida lisosomal (FAC) _____	40
2.4.6.4 Ensayo de la actividad de catepsina D lisosomal (Catep D) _____	41
2.4.6.5 Determinación de la concentración de proteína _____	42
2.5 ANALISIS ESTADISTICO _____	43
3. RESULTADOS _____	44
3.1 ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES OPTIMAS DEL CULTIVO DE ORGANO _____	44

Capítulo	Pág.
3.2 INTEGRIDAD MORFOLOGICA Y FUNCIONAL DEL HIGADO -----	45
3.3 EVALUACION DE LA VIABILIDAD DE LOS EXPLANTES DE HIGADO -----	46
3.3.1 Análisis morfológico con microscopía de luz -----	46
3.3.2 Análisis bioquímico -----	46
3.3.2.1 Inducción de la actividad de tirosina aminotransferasa (TAT) -----	46
3.3.2.2 Liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) -----	48
3.4 FRACCION DE VOLUMEN PEROXISOMAL EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE PA1 -----	49
3.5 ACTIVIDAD ESPECIFICA DE DOS ENZIMAS PEROXISOMALES EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE PA1 -----	50
3.6 ESTUDIO DE LA VIA AUTOFAGICA LISOSOMAL -----	52
3.6.1 Ultraestructura de los autolisosomas positivos para la reacción citoquímica de fosfatasa ácida (fosfatasa ácida +) -----	52
3.6.2 Fracción de volumen de autolisosomas en presencia y ausencia de PA1 -----	53
3.6.3 Actividad específica de dos enzimas lisosomales en presencia y ausencia de PA1 -----	53
3.7 CONTENIDO DE PEROXISOMAS Y DE MATERIAL CATALASA POSITIVO, DENTRO DE AUTOFAGOSOMAS Y AUTOLISOSOMAS RESPECTIVAMENTE, EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE PA1 -----	55
3.7.1 Ultraestructura de los autofagosomas y autolisosomas -----	55
3.7.2 Fracción de volumen de los autofagosomas y autolisosomas -----	57
3.8 ESTUDIO MORFOMETRICO EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE PA1 Y DE INHIBIDORES DE LA VIA AUTOFAGICA LISOSOMAL -----	59
3.8.1 Ultraestructura del hepatocito en presencia y ausencia de PA1 y de inhibidores de la vía autofágica lisosomal -----	59
3.8.2 Fracción de volumen peroxisomal en presencia y ausencia de PA1 y de inhibidores de la vía autofágica lisosomal -----	62
3.8.3 Fracción de volumen de los autofagosomas en presencia y ausencia de PA1 y de inhibidores de la vía autofágica lisosomal -----	62
3.8.4 Fracción de volumen de los autolisosomas en presencia y ausencia de PA1 y de inhibidores de la vía autofágica lisosomal -----	64
3.9 ESTUDIO BIOQUIMICO EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE PA1 Y DE INHIBIDORES DE LA VIA AUTOFAGICA LISOSOMAL -----	68
3.9.1 Actividad específica de dos enzimas peroxisomales en presencia y ausencia de PA1 y de inhibidores de la vía autofágica lisosomal -----	68

Capítulo	Pág.
3.9.2 Actividad específica de dos enzimas lisosomales en presencia y ausencia de PA1 y de inhibidores de la vía autofágica lisosomal	66
4. DISCUSION	71
5. CONCLUSIONES, PERSPECTIVAS Y CONTRIBUCIONES	80
5.1 CONCLUSIONES	80
5.2 PERSPECTIVAS	81
5.3 CONTRIBUCIONES	81
APENDICES	
APENDICE A.. ESTUDIO PILOTO	82
A.1 OBJETIVO DEL ESTUDIO PILOTO	82
A.2 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	82
A.2.1 Estandarización del cultivo de órgano	84
A.3. RESULTADOS	85
A.3.1 Integridad morfológica y funcional del hígado	86
A.3.1.1 Análisis morfológico con microscopía de luz (ML)	86
A.3.1.2 Análisis bioquímico	86
A.3.2 Viabilidad de los explantes de hígado de los cultivos de órgano, del estudio piloto	88
A.3.2.1 Análisis morfológico con microscopía de luz (ML)	88
A.3.2.2 Análisis bioquímico	88
A.3.2.2.1 Inducción de la actividad de tirosina aminotransferasa (TAT)	88
A.3.2.2.2 Liberación de lactato deshidrogenasa (LDH)	89
A.3.3 Evaluación morfológica del efecto de PA1 sobre los peroxisomas hepáticos de <i>Macaca fascicularis</i> por medio de ML	90
A.3.4 Evaluación morfológica del efecto de PA1 sobre los lisosomas hepáticos de <i>Macaca fascicularis</i> con ML	91
A.3.5 Análisis morfométrico por ML, del efecto de PA1 sobre los peroxisomas hepáticos de <i>Macaca fascicularis</i>	91
A.3.6 Ultraestructura de los "peroxisomas hepáticos aislados y agrupados" de <i>Macaca fascicularis</i>	94

APENDICE B. TABLA 1. Tinción con hematoxilina y eosina	95
TABLA 2. Técnica para la detección de grasa por la tinción del rojo oleoso O	95
TABLA 3. Técnica para la detección de glucogeno por la tinción del ácido periódico de Sciff (PAS)	96
TABLA 4. Método para determinar la actividad de tirosina aminotransferasa	96
TABLA 5. Método para determinar la actividad de lactato deshidrogenasa	97
TABLA 6. Técnica citoquímica para la detección de la actividad de catalasa peroxisomal	98
TABLA 7. Técnica citoquímica para la detección de la actividad de fosfatasa ácida lisosomal	99
TABLA 8. Ensayo bioquímico para determinar la actividad de catalasa peroxisomal	100
TABLA 9. Ensayo bioquímico para determinar la actividad de tiolasa peroxisomal	100
TABLA 10. Ensayo bioquímico para determinar la actividad de fosfatasa ácida lisosomal	101
TABLA 11. Técnica de Fiske-Subbarow para la determinación de fosfato inorgánico	102
Figura 35. Curva patrón de fosfato Fiske-Subbarow	102
TABLA 12. Ensayo bioquímico para determinar la actividad de catepsina D lisosomal	103
Figura 36. Curva patrón de L-tirosina	103
TABLA 13. Método de Bradford para determinar la concentración de proteína	104
Figura 37. Curva patrón de proteínas Bradford	104

APENDICE C. Cálculo de la actividad enzimática	105
--	-----

REFERENCIAS	110
-------------	-----

LISTA DE TABLAS

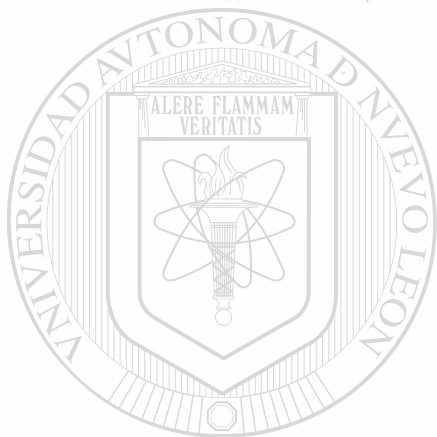
TABLA		Página
I	CULTIVO DE ORGANO: CARACTERISTICAS Y CONDICIONES ESPECIFICAS EMPLEADAS PARA EL HIGADO DEL MONO <i>MACACA FASCICULARIS</i>	33
II	CULTIVO DE ORGANO PARA HIGADO DE <i>MACACA FASCICULARIS</i>	44
III	CULTIVO DE ORGANO EN EL ESTUDIO PILOTO: CARACTERISTICAS Y CONDICIONES ESPECIFICAS EMPLEADAS PARA EL HIGADO DEL MONO <i>MACACA FASCICULARIS</i>	85
IV	ACTIVIDAD ESPECIFICA (U/mg PROTEINA) DE TAT EN EL HIGADO DE <i>MACACA FASCICULARIS</i> PREVIO AL CULTIVO DE ORGANO	86
V	VIABILIDAD DEL HIGADO EN EL CULTIVO DE ORGANO. EFECTO DE GLUCAGON Y DE PA1 SOBRE LA ACTIVIDAD ESPECIFICA DE TIROSINA AMINOTRANSFERASA (TAT) A DIFERENTES TIEMPOS DE CULTIVO	89
VI	VIABILIDAD DEL HIGADO EN EL CULTIVO DE ORGANO. LIBERACION DE LDH EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE PA1 A LOS DIFERENTES TIEMPOS DE CULTIVO	90

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura química de la toxina T 514 o PA1	2
2. Diagrama de la vía autofágica lisosomal en donde se señalan los sitios de bloqueo de algunos inhibidores específicos	14
3. Diagrama del marcaje con técnicas citoquímicas para el estudio de la autofagia peroxisomal	18
4. Resumen de la estrategia experimental, puntos más relevantes (no se incluye el estudio piloto y la estandarización de las técnicas)	25
5. Análisis morfométrico por microscopía electrónica de transmisión (MET) como parte fundamental de la estrategia experimental. Fracción de volumen (Vvi)	26
6. Fundamento de las reacciones del método de Moreno de la Garza M. y cols. derivado de Middleton B. para la determinación de la actividad de tiolasa peroxisomal	41
7. Efecto de glucagon (0.1 μ M) y de PA1 (10 μ g/ml) sobre la actividad específica de tirosina aminotransferasa (TAT) a 30, 60, 90 y 120 minutos de cultivo	47
8. Efecto de glucagon (0.1 μ M), de PA1 (10 μ g/ml), de tres inhibidores de la vía autofágica lisosomal y de cada uno de los inhibidores combinado con PA1 sobre la actividad específica de TAT, a 120 minutos de cultivo	47
9. Liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) al medio de cultivo en presencia y ausencia de PA1 (10 μ g/ml) a 30, 60, 90 y 120 minutos de cultivo	48
10 Liberación de LDH al medio de cultivo, en presencia y ausencia de PA1 (10 μ g/ml), de tres inhibidores de la vía autofágica lisosomal y de cada uno de los inhibidores combinado con PA1, a 120 minutos de cultivo	49
11. Efecto de PA1 (10 μ g/ml) a 30, 60, 90 y 120 minutos de cultivo sobre la fracción de volumen peroxisomal	50
12. Efecto de PA1 (10 μ g/ml) a 30, 60, 90 y 120 minutos de cultivo sobre la actividad específica (U/mg proteína, %) de dos enzimas peroxisomales: Catalasa y 3-oxoacil-CoA tiolasa	51
13. Explante de hígado de <i>Macaca fascicularis</i> , incubado por 60 minutos, con 10 μ g/ml de PA1. Microscopía electrónica de transmisión. Reacción citoquímica de fosfatasa ácida	52
14. Efecto de PA1 (10 μ g/ml) a 30, 60, 90 y 120 minutos de cultivo sobre la fracción de volumen lisosomal	53
15. Efecto de PA1 (10 μ g/ml) a 30, 60, 90 y 120 minutos de cultivo sobre la actividad específica de dos enzimas lisosomales: Catepsina D (U/mg Proteína) y fosfatasa ácida (U/mg Proteína, %)	54

Figura	Pág.
16. Explantes de hígado de <i>Macaca fascicularis</i> , incubados con 10 µg/ml de PA1 a 30, 60, 90 y 120 minutos. Microscopía electrónica de transmisión. Reacción citoquímica de catalasa	56
17. Explantes de hígado de <i>Macaca fascicularis</i> . Autolisosomas fosfatasa ácida positivo y autolisosomas catalasa positivo. Microscopía electrónica de transmisión. Reacciones citoquímicas fosfatasa ácida y catalasa	57
18. Efecto de PA1 (10 µg/ml) a 30, 60, 90 y 120 minutos de cultivo sobre la fracción de volumen de: Autofagosomas catalasa positivo y autolisosomas catalasa positivo	58
19. Explantes de hígado de <i>Macaca fascicularis</i> . Tiempo cero, e incubado 120 minutos en un cultivo de órgano sin peroxisomicina A1. Microscopía electrónica de transmisión. Reacción citoquímica de catalasa	60
20. Explantes de hígado de <i>Macaca fascicularis</i> , incubados 120 minutos con 10 µg/ml de PA1, y con 10 µg/ml de PA1 y 5 mM de 3-metiladenina. Microscopía electrónica de transmisión. Reacción citoquímica de catalasa	61
21. Explantes de hígado de <i>Macaca fascicularis</i> , incubados 120 minutos con 5 mM de 3-metiladenina, con 10 mM de DL-asparagina, y con 10 mM de metilamina. Microscopía electrónica de transmisión. Reacción citoquímica de catalasa	63
22. Efecto de PA1 (10 µg/ml) y de 3-metiladenina (5 mM) a 120 minutos de cultivo sobre la fracción de volumen de: Autolisosomas fosfatasa ácida positivo, y peroxisomas, autofagosomas y autolisosomas catalasa positivo	65
23. Efecto de PA1 (10 µg/ml) y de DL-asparagina (10 mM) a 120 minutos de cultivo sobre la fracción de volumen de: Autolisosomas fosfatasa ácida positivo, y peroxisomas, autofagosomas y autolisosomas catalasa positivo	66
24. Efecto de PA1 (10 µg/ml) y de metilamina (10 mM) a 120 minutos de cultivo sobre la fracción de volumen de: Autolisosomas fosfatasa ácida positivo, y peroxisomas, autofagosomas y autolisosomas catalasa positivo	67
25. Efecto de PA1 (10 µg/ml) y de tres inhibidores de la vía autofágica lisosomal a 120 minutos de cultivo, sobre la actividad específica (U/mg proteína, %) de dos enzimas peroxisomales: Catalasa y 3-oxoacil-CoA tiasa	69
26. Efecto de PA1 (10 µg/ml) y de tres inhibidores de la vía autofágica lisosomal a 120 minutos de cultivo, sobre la actividad específica (U/mg proteína, %) de dos enzimas lisosomales: Catepsina D y fosfatasa ácida	70
27. Esquema del mecanismo propuesto, mediante el cual peroxisomicina A1 (PA1) disminuye el número de peroxisomas en el hepatocito de <i>Macaca fascicularis</i> , en un modelo <i>in vitro</i>	78
28. Resumen de la estrategia experimental del estudio piloto; puntos más relevantes	83
29. Análisis morfométrico por microscopía de luz (ML) como parte fundamental de la estrategia experimental del estudio piloto	84
30. Hígado de <i>Macaca fascicularis</i> , en el tiempo cero. Tinción de hematoxilina y eosina (HE). Tinción del rojo oleoso O. Reacción del ácido peryodico de Schiff (PAS). Microscopía de luz, campo claro	87

Figura	Pág.
31. Explantes de hígado de <i>Macaca fascicularis</i> , incubados por 2 horas. Control sin peroxisomicina A1 y 10 $\mu\text{g/ml}$ de peroxisomicina A1. Microscopía de contraste de fases. Reacción citoquímica de catalasa	92
32. Efecto de varias concentraciones de peroxisomicina A1 (2.5, 5, 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$) sobre el número de <i>peroxisomas aislados</i> a 0.5, 1, 2 y 3 horas de cultivo de los explantes del hígado de <i>Macaca fascicularis</i>	93
33. Efecto de varias concentraciones de peroxisomicina A1 (2.5, 5, 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$) sobre el número de <i>peroxisomas agrupados en racimos</i> , a 0.5, 1, 2 y 3 horas de cultivo de los explantes del hígado de <i>Macaca fascicularis</i>	93
34. Explantes de hígado de <i>Macaca fascicularis</i> , incubados por 2 horas. Control e incubado con 10 $\mu\text{g/ml}$ de peroxisomicina A1. Microscopía electrónica de transmisión. Reacción citoquímica de catalasa	94
35. Curva patrón de fosfato inorgánico, método Fiske & Subbarow	102
36. Curva patrón de L-tirosina	103
37. Curva patrón de proteína, método de Bradford	104



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

%	Por ciento
ϵ	Absortividad molar
\pm	Más menos
λ	Longitud de onda
\geq	Mayor o igual que
ΔA	Cambio de absorbancia
$^{\circ}C$	Grados Celsius
ΔC	Cambio de concentración
μg	Microgramo
μl	Microlitro
μm	Micrómetro
μM	Micromolar
μmol	Micromol
*	Diferencia estadística significativa con respecto al control
-	Menos
3-Mad.	3-metiladenina
Abs.	Absorbancia
ag	Autofagosoma
AGCML	Ácido graso de cadena muy larga
al	Autolisosoma
ALD	Adrenoleucodistrofia
Asn	DL-asparagina
ATP	Adenosin trifosfato
BSA	Albúmina sérica bovina
c.v.	Coefficiente de variación
C/	Con
Catep D	Catepsina D
cb	Canalículo biliar
cm^2	Centímetro cuadrado
cm^3	Centímetro cúbico
CO_2	Bióxido de carbono
CoA-SH	Coenzima A
cols.	Colaboradores
con/sin	Con o sin
Conc.	Concentración
d	Espesor de la cubeta (distancia que recorre el haz de luz)
d/cultivo	De cultivo
DAB	Diaminobenzidina
DMSO	Dimetilsulfóxido
FAc	Fosfatasa ácida

g	Gramo
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
Hank's	Solución fisiológica de sales, de Hanks
HCl	Ácido clorhídrico
HE	Hematoxilina y eosina
K.	<i>Karwinskia</i>
KCl	Cloruro de potasio
Kg	Kilogramo
L-15	Medio nutriente de Leibovitz
LDH	Lactato deshidrogenasa
m	Mitocondria
Mam.	Metilamina
MEM	Medio nutriente Esencial Mínimo de Eagle
mesh	Divisiones
MET	Microscopio Electrónico de Transmisión
mg	Miligramo
min	Minuto
ml	Mililitro
ML	Microscopía de luz
mM	Milimolar
N	Normal
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidado
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
nm	Nanómetro
p	Peroxisoma
p/v	Peso/volumen
PA1	Peroxisomicina A1
PAS	Ácido periódico de Schiff (reacción)
pH	Logaritmo negativo de la concentración de iones hidrógeno
r	Coefficiente de correlación
RCDP	Forma rizomérica de condrodiasplasia punctata
RE	Retículo endoplásmico
rpm	Revoluciones por minuto
S/	Sin
SKL	Serina, lisina, leucina
t	Tiempo
T 496, T 514 y T 544	Toxinas 496, 514 y 544 respectivamente
TAT	Tirosina aminotransferasa
Tris	Tris (hidroximetil) aminoetano
U	Unidades internacionales de actividad enzimática
v/v	Volumen/volumen
VVl	Fracción de volumen

RESUMEN

María Leticia Moreno Martínez

Fecha de graduación: Agosto del 2000

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Título del Estudio:

EFFECTO DE LA PEROXISOMICINA A1 (PA1) SOBRE LA AUTOFAGIA DE PEROXISOMAS EN EL HIGADO DE MACACA FASCICULARIS EN UN MODELO IN VITRO

Número de páginas: 120

Candidata para el grado de Doctor en Ciencias con especialidad en Morfología

Area de Estudio: Morfología

Propósito y Método del Estudio: A la T514 extraída de plantas del género *karwinskia*, por su efecto selectivo sobre los peroxisomas se le ha denominado peroxisomicina A1 (PA1). La PA1 es una antracenona dimérica, considerada como un potencial medicamento antineoplásico. En estudios previos se ha demostrado una disminución del número de peroxisomas en el hígado de ratas, ratones y monos, que recibieron una dosis letal de PA1. En levaduras metilotróficas, por efecto de PA1, se demostró un daño selectivo e irreversible en la membrana peroxisomal y la degradación de los peroxisomas dañados en la vacuola autofágica de estas células. En los mamíferos, la vía autofágica lisosomal incluye una serie de pasos para la formación de vesículas: prelisosomas, autofagosomas y autolisosomas. Es posible detener experimentalmente este proceso en distintos puntos, ya que se conocen inhibidores específicos con diferentes mecanismos de acción. El propósito del presente trabajo fue evaluar si la PA1 estimula la vía autofágica- lisosomal e induce la degradación de peroxisomas y analizar qué sucede cuando esta estimulación ocasionada por la PA1, es bloqueada por inhibidores específicos de la vía. Se utilizaron explantes hepáticos de *Macaca fascicularis* en cultivo de órgano, y en ellos se efectuaron análisis morfológicos (morfométricos) y bioquímicos del peroxisoma y de la vía autofágica-lisosomal.

Conclusiones y Contribuciones: En los explantes hepáticos incubados con PA1 se demostró que el número de peroxisomas disminuyó, debido a que se degradaron estos organelos por la vía autofágica-lisosomal. Como consecuencia de la degradación peroxisomal se encontró disminuída la actividad de las enzimas peroxisomales catalasa y 3-oxo-acil-CoA tiolasa. La actividad de las enzimas lisosomales catepsina D y fosfatasa ácida aumentó por efecto de PA1 debido a la estimulación de la vía autofágica-lisosomal. Dicha estimulación fue inhibida por 3-metiladenina, DL-asparagina y metilamina, inhibidores de la vía. Con esta evidencia se acepta la hipótesis de trabajo propuesta. El presente estudio contribuye a esclarecer el mecanismo de acción de PA1 y sugiere la posibilidad de utilizar a estos inhibidores de la vía autofágica lisosomal en el animal completo para bloquear el efecto de PA1.

FIRMA DEL ASESOR



M.C.P. Y Ph. D. Julio Sepúlveda Saavedra

CAPITULO 1

INTRODUCCION

1.1 PEROXISOMICINA A1.

El género *Karwinskia* pertenece a la familia Rhamnaceae y está constituido por arbustos y árboles pequeños que crecen en zonas tropicales y en áreas desérticas. Se han descrito 15 especies diferentes del género *Karwinskia*, de las cuales 12 especies distintas se encuentran en México¹, siendo la más común por su extensión territorial la *Karwinskia humboldtiana*. Según reportes médicos²⁻⁷, aproximadamente a los 15 días posteriores a la ingestión del fruto de estas plantas del género *Karwinskia*, se presentan manifestaciones clínicas como polineuropatía progresiva, caracterizada por parálisis simétrica ascendente, la cual puede terminar en muerte por paro respiratorio.

Algunos de los síndromes paralíticos, como el de Guillian-Barre, la poliomielitis y otras neuropatías periféricas presentan un cuadro clínico similar al causado por estas plantas. Francisco Xavier Clavijero en su obra "Historia de la Antigua o Baja California"⁸, describió por primera vez a la *K. humboldtiana* dentro de las plantas nocivas y extravagantes encontradas por los jesuitas en Baja California a finales del siglo XVIII. Esta planta se encuentra distribuida prácticamente en todo el territorio mexicano, en el Suroeste de los Estados Unidos de Norteamérica y en parte de Centro América. Su fruto es del tamaño de un garbanzo, verde en sus inicios y de un color negro en la madurez, cuyo mesocarpio dulce e inocuo protege a una semilla de alta capacidad tóxica para mamíferos, incluido al humano^{1,5,9,10}.

En 1975 Dreyer y Col.¹¹ aislaron del endocarpio de la *Karwinskia humboldtiana*, cuatro compuestos responsables de las propiedades tóxicas de dicha planta, los cuales fueron identificados como antracenosas diméricas. Estas toxinas

fueron denominadas de acuerdo a su peso molecular como: T 496, T 514, T 516 y T 544. En la figura 1 se muestra la estructura química de la T 514.

En 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, dirigida tanto al estudio de la *actividad biológica* de los compuestos antracénicos aislados de diferentes especies del género *Karwinskia*, así como también a la caracterización morfológica y funcional de la planta mantenida tanto en condiciones de invernadero como en cultivo *in vitro*¹². Los compuestos antracénicos antes mencionados, se han aislado y purificado de acuerdo al método descrito por Guerrero y col.¹³, el cual es una modificación del método utilizado por Dreyer y col.¹¹.

Waksman y col. estudiaron 10 especies de plantas del género *Karwinskia*. Estas son tóxicas, se caracterizan por poseer compuestos antracénicos y su toxicidad se asemeja cualitativamente a la intoxicación aguda por *Karwinskia humboldtiana*¹⁴. Además, aislaron de la planta *Karwinskia parvifolia* un compuesto de estructura química planar idéntica a la T 514¹⁵, pero con diferente configuración espacial, por lo que fue identificado como un diastereoisómero de la T 514, y otro isómero de posición (T iso514) de la *Karwinskia humboldtiana*¹⁶. Finalmente, de la *Karwinskia affinis humboldtiana* se aisló la T 510¹⁷.

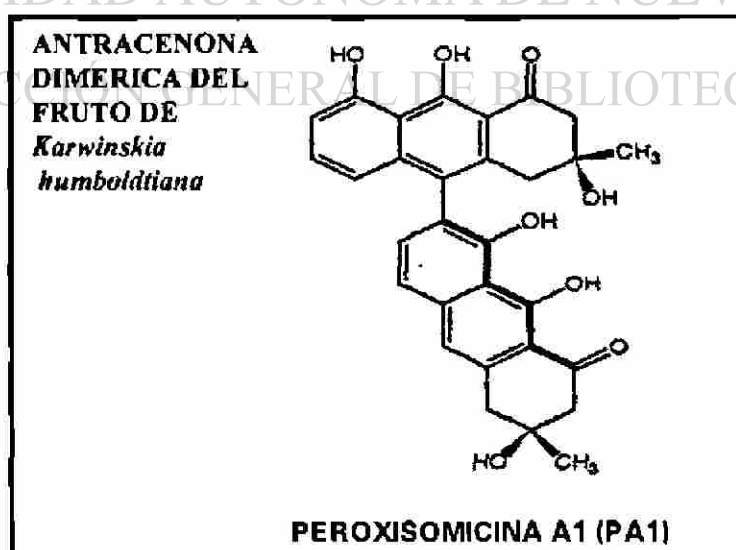


Figura 1. Estructura química de la toxina T 514 o PA1.

En los estudios de Bermúdez y cols.¹⁸ con animales intoxicados con T 514 se estableció que los órganos blanco de esta toxina son: **hígado, riñón y pulmón**. La evidencia de la mayoría de los daños causados a estos órganos, tanto clínica como histopatológicamente, fue demostrada en varias especies de animales de experimentación como en algunos roedores^{18,19}, y en primates como el Macaco^{20,21}. Por otro lado, en el humano²² sólo se obtuvo evidencia clínica del daño causado a estos tres órganos. Con respecto a la actividad biológica de otras toxinas de *K. humboldtiana* se comprobó que: la T 544 es responsable del efecto neurológico periférico y por lo tanto de la parálisis y la T 496 produce diarrea cuando se administra por vía oral^{5,18,19}.

De acuerdo a los autores mencionados en el párrafo anterior, la T 514 produce en el hígado, dependiendo de la dosis, necrosis centrolobulillar y esteatosis, que es una infiltración grasa en los hepatocitos^{17,18}. La lesión más notable encontrada en hepatocitos en etapas tardías de animales intoxicados experimentalmente con T 514, es la *excesiva acumulación de lípidos intracelulares*^{18,23}. Las causas probables que explican la excesiva acumulación de lípidos y que se han sugerido para algunas otras drogas hepatotóxicas son: *daño en membranas y/o daño a las proteínas intracelulares transportadoras de lípido*²⁴. Sin embargo, también se ha indicado, que puede ser causado por el daño a los peroxisomas, lo cual produce trastornos en el metabolismo de los lípidos, ya que la degradación de ácidos grasos de cadena larga ocurre en estos organelos^{25,26}. Por lo que, una o varias de estas posibilidades que explican la acumulación de lípidos intracelulares en el hepatocito y que como ya se mencionó, se han demostrado para otras drogas hepatotóxicas, pudieran ser también aplicadas para el caso de la T 514.

Con el propósito de comparar la citotoxicidad de las toxinas T 514 y T 544 de *K. humboldtiana* bajo condiciones *in vivo* e *in vitro*, Garza y cols. efectuaron estudios en cultivos de células de piel y de hepatocitos. Los efectos de la T 514, en general, coincidieron con lo descrito *in vivo*; la T 514 causa mayor citotoxicidad hepática *in vitro* que la T 544²⁷. Por otra parte, también se analizaron los efectos del diastereoisómero de la T-514, demostrándose que en hepatocitos, *in vitro*, la toxicidad de este compuesto es muy similar a la de T 514²⁸. En contraste, Martínez F.J. y cols.²⁹,

demonstraron que en condiciones *in vivo*, la toxicidad hepática causada por la T 514 es mucho mayor que la producida por su diastereoisómero.

Se han realizado diversos estudios para conocer los efectos *in vitro* de la T 514. Se demostró que la T 514 ejerce un efecto inhibitorio sobre la lipídoperoxidación microsomal hepática estimulada por Fe^{2+} -ADP y NADPH³⁰, por lo que se sugirió una posible capacidad de esta droga para formar quelatos con el hierro y por lo tanto, una actividad antioxidante *in vitro*. La T 514 fue identificada como un inhibidor no competitivo de la catalasa *in vitro*³¹. En otros estudios se demostró, daño mitocondrial en las células epiteliales de los tubulos contorneados proximales del riñón causado por la T 514³². A nivel ultraestructural, en mitocondrias se demostró: aumento de volumen, pérdida de la matriz y destrucción del organelo por la vía autofágica lisosomal.

Piñeyro, en su Tesis Doctoral¹⁷, describió por primera vez la toxicidad selectiva de la T 514 sobre algunas líneas celulares tumorales humanas de hígado, pulmón y colon, ya que su curva de letalidad dosis-respuesta presentó una forma particularmente empinada, significando esto último una variación biológica estrecha³³⁻³⁵. Este hallazgo ha sido confirmado por investigadores de las Universidades de Berlín y Freiburg (Alemania) y recientemente en el Instituto Nacional de Cáncer (EUA). Lo anterior ha motivado que en los últimos años se intensifiquen los estudios encaminados a establecer a la T 514 como un posible agente antineoplásico, y se ha obtenido una patente para su utilización, la cual fue otorgada primero por la Comunidad Económica Europea³⁶, y posteriormente por los EUA³⁷, y Japón³⁸.

Estudios bioquímicos realizados por Moreno y cols.³¹, demostraron que la T 514 es un inhibidor no competitivo de la catalasa hepática de tres fuentes animales (ratón, res y perro), bajo condiciones *in vitro*. Se analizó el efecto tanto de T 514 como de otros compuestos antracénónicos aislados y purificados de especies del género *Karwinskia*. En este estudio se encontró una relación estrecha entre la estructura de estos compuestos antracénónicos y el grado de inhibición de la catalasa, demostrándose además que todos los compuestos analizados fueron más potentes inhibidores de la catalasa *in vitro* que el aminotriazol, el cual es un inhibidor de la actividad de catalasa *in vivo*. Posteriormente, estudios llevados a cabo por Moreno y cols.³⁹, demostraron, tanto por métodos bioquímicos como histoquímicos, que la T 514

no es capaz de inhibir a la catalasa hepática. Estos estudios fueron efectuados, tanto en cortes de tejido hepático incubados con toxina (*in situ*) como en cortes de tejido y en fracciones hepáticas provenientes de ratones intoxicados con T 514 (*in vivo*). Por lo tanto, se concluyó que la T 514 inhibe la actividad de catalasa *in vitro* (cuando se encuentra la enzima purificada) y no bajo condiciones *in vivo*, cuando la catalasa se encuentra dentro del peroxisoma.

Con todos los antecedentes ya descritos, se desprende la importancia y la necesidad de conocer el mecanismo de acción de T 514. Específicamente, a partir de las observaciones de la infiltración grasa del hígado producida por la T 514, en los últimos años se han realizado diversos estudios morfológicos como bioquímicos encaminados a obtener información acerca de su mecanismo de acción. El presente trabajo forma parte de ellos. Estudios morfológicos realizados por Sepúlveda y cols., establecieron que la T 514 causa una disminución marcada del número de peroxisomas en hepatocitos, de ratas Wistar⁴⁰ y de monos *Macaca fascicularis*²¹ intoxicados experimentalmente con la toxina. Además, en esta última especie, a nivel ultraestructural se encontraron imágenes sugestivas de autofagia peroxisomal. A raíz de estos estudios, se sugirió la relación que pudiera existir entre la función peroxisomal y la T 514.

Las levaduras metilotróficas pueden utilizar el metanol como única fuente de carbono y en ellas se induce la proliferación peroxisomal debido a que la matriz peroxisomal contiene las enzimas que catalizan las reacciones iniciales del catabolismo del metanol. Estas enzimas son: la alcohol oxidasa, la dihidroxiacetona sintasa y la catalasa⁴¹⁻⁴³. Estudios realizados por Sepúlveda y cols.⁴⁴, en *Candida boidinii* y *Hansenula polymorpha*, demostraron que la T 514 causa, a dosis no letales, un daño selectivo e irreversible sobre los peroxisomas. Este daño se observa a nivel ultraestructural, como una interrupción de la continuidad de la membrana peroxisomal. Ellos observaron también la presencia de la alcohol oxidasa peroxisomal dentro de la vacuola autofágica, por medio de anticuerpos anti-alcohol oxidasa conjugados con oro coloidal. Lo anterior sugiere la degradación de los peroxisomas dañados por medio de autofagia. En este mismo estudio se encontró que, la actividad de la alcohol oxidasa y de la catalasa, no fue modificada por la T 514.

El efecto selectivo sobre la membrana peroxisomal de levaduras metilotróficas, sugirió que el peroxisoma fuera el organelo blanco. Debido a esto se renombró a la toxina T 514 como peroxisomicina A1 (PA1). Igualmente, se renombraron sus isómeros espaciales con números progresivos. En el caso de los isómeros de posición se antepone el prefijo iso-, al nombre de peroxisomicina A1.

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

1.2 PEROXISOMAS

1.2.1 Generalidades.

En 1954 Rhodin describió por primera vez en las células renales (túbulo contorneado proximal) del ratón, un organelo de aproximadamente 0.2 a 1 μm de diámetro. Este organelo fue denominado como microcuerpo, debido a que no se conocía su actividad bioquímica⁴⁵⁻⁴⁷. Posteriormente se le dió el nombre de peroxisoma por de Duve y Baudhuin para definirlo como un organelo subcelular que contenía al menos una *oxidasa para formar peróxido de hidrógeno y catalasa para degradarlo*⁴⁸. En este mecanismo de formación de peróxido de hidrógeno que sucede en el peroxisoma, están involucradas un grupo de oxidasas que *utilizan el oxígeno molecular* y que actúan sobre diversos sustratos. A este sistema se le conoce como "vía respiratoria peroxisomal"^{25,46,48,49}.

Existen organelos semejantes a los peroxisomas, que en forma general se denominan *microcuerpos*, pero de acuerdo a sus características metabólicas y morfológicas reciben un nombre distintivo y se han encontrado filogenéticamente en diferentes organismos^{45,50,51}: *microperoxisomas en células de mamífero* (de formas esférica o elongada con diámetros de 0.15 a 0.25 μm), probablemente encargados del metabolismo de grasas y esteroides, y también han sido considerados como segmentos de conexión tubular de un retículo peroxisomal^{26,52,53}; *peroxisomas de*

levaduras, son organelos que se adaptan a los requerimientos metabólicos por la *inducibilidad de sus enzimas* involucradas en diversos procesos metabólicos. El cultivo de estas células en hidrocarburos de cadena larga, en metanol, o en una variedad de sustratos nitrogenados, da por resultado o produce una *proliferación peroxisomal*⁵⁴; *glioxisomas en semillas germinativas y peroxisomas de hojas verdes* involucrados en la fotorespiración y metabolismo energético de la planta, aunque el *ciclo del glioxalato* es la característica bioquímica del glioxisoma^{50,55}; *glicosomas en algunos parásitos protozoarios* contienen la mayoría de las *enzimas glucolíticas*⁵⁶; *hidrogenosomas en algunos protozoarios parásitos carentes de mitocondrias*, poseen la capacidad de *oxidar el piruvato a bióxido de carbono y acetato*, lo cual es acoplado a la producción de ATP⁵⁷.

En síntesis, el contenido enzimático de los peroxisomas puede variar de especie a especie y dentro de una misma especie, de tejido a tejido, en donde se realizan tanto procesos *oxidativos como biosintéticos*^{58,59}.

1.2.2 Morfología peroxisomal.

Los *peroxisomas de mamíferos* son abundantes principalmente en los *hepatocitos y en las células del túbulo proximal del riñón*, pero también se han descrito prácticamente en todas las células y tejidos de animales vertebrados, con excepción de los eritrocitos maduros^{46,47,50}. La mayoría de los hepatocitos, dependiendo de la especie, contienen entre 400 a 1000 peroxisomas, que ocupan cerca de un 2% del volumen celular^{39,50}. Estos organelos, son esféricos o ligeramente elipsoides de 0.3 a 0.9 μm de diámetro^{46,47,50,51}, siendo este tamaño el reportado para las células de hígado y riñón, y similar para algunos otros tejidos. Sin embargo como su tamaño exhibe un amplio rango, se ha reportado en general que los peroxisomas tienen un diámetro de 0.1 a 1.5 μm ⁵¹. Están rodeados por una membrana (4.5 a 8 nm de grosor) que es más delgada que las membranas lisosomal y plasmática^{46,47,50,51,60,61}. La membrana peroxisomal es altamente permeable a moléculas pequeñas tales como sacarosa, sustratos enzimáticos e iones orgánicos, además es más resistente a la ruptura por digitonina, en comparación con otras membranas intracelulares^{48,47,60}.

La matriz peroxisomal se describe con una ultraestructura moderadamente electrodensa, finamente granular y posee un cierto grado de organización estructural debido a que sus enzimas no se distribuyen uniformemente. Esta organización estructural depende de la especie, y en algunas especies, por lo tanto, permite la identificación más fácil del peroxisoma por parámetros morfológicos (MET), ya que pueden contener un "núcleo cristaloides o nucleoides"^{46,47,50,51,60}. Por ejemplo, la composición del cristaloides de los peroxisomas de hígado de rata es de urato oxidasa⁶³⁻⁶⁵, y el de algunas levaduras metilotóficas de alcohol oxidasa^{51,68}. El *mono* y el *humano* no poseen en el hígado estos cristaloides, ya que carecen de esas enzimas peroxisomales^{51,58,67}. Sin embargo excepciones a lo anterior son: los peroxisomas de riñón en la rata y en el humano, que contienen estructuras nucleoides sin poseer actividad de urato oxidasa, y en algunos vertebrados no mamíferos tienen altos niveles de esta enzima en el hígado pero sus peroxisomas no muestran un alto número de núcleos cristaloides. La actividad de urato oxidasa, se encuentra tanto en la matriz peroxisomal como en el nucleoides. También se ha reportado xantina oxidasa en algunos nucleoides peroxisomales⁵¹.

Por otra parte, en células renales del *conejo*, *del perro*, y *de especies de bovinos* y *de primates incluyendo al humano*, existe "la placa marginal", que es una estructura electrodensa, aplanada, localizada en la periferia del peroxisoma adyacente a su membrana y compuesta de L- α -hidroxiácido oxidasa B^{51,68,69}. Esta estructura también se ha descrito en los *peroxisomas* del epitelio sintetizante de lípidos del *perro* y en los hepatocitos del humano⁶⁸.

1.2.3 Función peroxisomal.

El estudio de la función peroxisomal se ha intensificado en los últimos años. Esto se debe a que normalmente más de 60 reacciones enzimáticas distintas se llevan a cabo en los peroxisomas, por lo que en el humano, las alteraciones de la función peroxisomal se manifiestan en efectos clínicos profundos que involucran a casi todos

los órganos y siempre al sistema nervioso^{48,49,69-71}. Por otro lado, se ha descrito que *células de algunos tumores malignos poseen un número escaso de peroxisomas*^{25,72}.

Debido a que los peroxisomas se encuentran ampliamente distribuidos en células eucariotes, sus funciones son muy diversas. Estas incluyen, entre otras, procesos de *fotorespiración en plantas, biosíntesis de penicilina en hongos filamentosos, metabolismo de compuestos de un átomo de carbono en levaduras y metabolismo del colesterol en mamíferos*^{46,59,73,74}.

Las funciones principales del peroxisoma en células de mamífero son^{46,49,56,69,75}:

1. Metabolismo del peróxido de hidrógeno
2. β -oxidación de ácidos grasos de cadena larga y cadena muy larga (AGCML), de ácidos dicarboxílicos, de ácidos grasos de cadena ramificada, de ácidos grasos insaturados, de metabolitos del ácido araquidónico y de algunos compuestos xenobióticos
3. α -oxidación de ácido fitánico y de algunos compuestos xenobióticos
4. Biosíntesis de éteres lipídicos como los plasmalógenos
5. Algunas reacciones del metabolismo del colesterol y el dolicol
6. Biosíntesis de ácidos biliares
7. Algunas reacciones de la gluconeogénesis, catabolismo de bases púricas y catabolismo de las poliaminas
8. Metabolismo del glioxalato
9. Destoxificación del etanol, en exceso de éste.

Al igual que en las levaduras, en los mamíferos se ha descrito la capacidad que tienen los **peroxisomas de proliferar y de modificar su composición enzimática en respuesta a diferentes factores ambientales**^{51,59}. Por ejemplo, en hepatocitos de ratas tratadas con clofibrato (etil-*p*-paraclorofenoxy-isobutirato, droga hipolipidémica), se ha observado que los peroxisomas ocupan hasta un 10% del volumen celular y en el homogenizado del hígado de estos animales, se encontró un aumento aproximado de 2 veces la actividad de catalasa peroxisomal, mientras que la actividad enzimática de la β -oxidación incrementó en aproximadamente 10 a 20 veces⁷⁶. Algunos ejemplos de *otros factores que estimulan la proliferación peroxisomal*, además del clofibrato y

compuestos análogos, son: drogas no relacionadas estructuralmente con el clofibrato, pero que poseen un residuo hidrofóbico y una función ácida, como son aspirina, clorpromazina, gemfibrozil, entre otros compuestos, condiciones fisiológicas como una dieta alta en grasa y alta en fitol, ayuno, deficiencia de vitamina E, hipertiroidismo, adaptación al frío, y por último, algunos contaminantes ambientales, como plasticidas, herbicidas, insecticidas, entre otros^{51,77,78}. Se ha propuesto un mecanismo de un "receptor de la superfamilia de ligandos esteroideos" para mediar la respuesta de los proliferadores peroxisomales. La exposición prolongada a los proliferadores peroxisomales en roedores, promueve la formación de carcinomas hepatocelulares, aparentemente debido al "estrés oxidativo" causado por la producción elevada de peróxido de hidrógeno, y el daño al DNA por este agente tóxico^{79,78}.

1.2.3.1 Catalasa y tiolasa peroxisomales.

A pesar de la diversidad metabólica que muestran los peroxisomas, ciertas reacciones enzimáticas (rutas metabólicas) son una característica que permite su identificación: oxidasas productoras de peróxido de hidrógeno y catalasa, β -oxidación de ácidos grasos de cadena larga y compuestos relacionados, algunas reacciones de la biosíntesis de éteres lipídicos y gluconeogénesis⁵¹.

Catalasa es una enzima que ocupa más del 40% de la proteína total del peroxisoma⁷⁵, consiste de 4 subunidades (60 kDa cada una) y se han descrito múltiples formas de la enzima en mamíferos⁵¹. El estado activo de la catalasa es en forma de un tetrámero glucosilado^{80,80}, y tiene como grupo prostético al hemo^{51,81}. Dependiendo de las condiciones del medio, la catalasa lleva a cabo las siguientes reacciones:

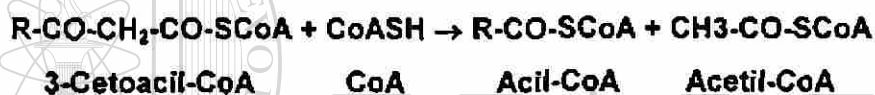


Ambas reacciones se inician con la formación de un complejo primario entre el peróxido de hidrógeno y el hierro del hemo, éste reacciona con otra molécula, ya sea

de peróxido de hidrógeno para la reacción catalítica, o con un donador de hidrógeno para la reacción peroxidativa. El donador de hidrógeno (R) para la reacción puede variar ampliamente e incluye compuestos tales como fenoles, alcoholes, formato, nitritos y algunas aminas primarias^{51,58,69,82,83}.

La 3-Cetoacil-CoA tiolasa peroxisomal, en su forma activa, es un dímero de subunidades idénticas, con un peso molecular aproximado de 80-90 kDa. Participa en la última reacción del ciclo de la *β-oxidación peroxisomal*, la cual tiene varias diferencias con la mitocondrial^{46,58,70,84}. Existen diferencias en estructura y propiedades cinéticas, entre las tiolasas mitocondrial y peroxisomal^{51,70,84}. La enzima peroxisomal es activa hacia sustratos con 6-12 átomos de carbono⁷⁰.

La reacción catalizada por la 3-Cetoacil-CoA tiolasa peroxisomal es la siguiente:



Donde R = 6-12 átomos de carbono, que provienen de un ácido graso de 18-22 átomos de carbono.

1.2.3.2 Enfermedades peroxisomales.

Se han descrito por lo menos 16 diferentes enfermedades peroxisomales, la mayoría de ellas hereditarias y letales^{49,51,71,85}. Estos padecimientos involucran ya sea un defecto en la biogénesis del peroxisoma con disminución o ausencia total de peroxisomas, o la deficiencia (la mayoría por mutación) de una o más enzimas peroxisomales, aunque los peroxisomas se encuentren presentes e intactos^{46,51,71,86,87}. Como ejemplos representativos de estos dos grupos de padecimientos, se incluyen: el síndrome de Zellweger o síndrome cerebrohepatorenal, la enfermedad infantil de Refsum, Acatalasemia, la forma rizomélica de condrodiasplasia punctata, la Adrenoleucodistrofia neonatal y la ligada a X.

Algunos de estos padecimientos también se han clasificado como desórdenes peroxisomales generalizados, por ejemplo el síndrome de Zellweger, que es el desorden peroxisomal más caracterizado^{51,71,86,88}, en donde se presentan anomalías bioquímicas predominantes como son *defectos en la biosíntesis de plasmalógenos, metabolismo del ácido piperólico, biosíntesis de ácidos biliares y oxidación de ácidos grasos de cadena muy larga.*

1.2.3.2.1 Recambio de peroxisomas en las enfermedades peroxisomales.

Aunque la mayoría de los datos bioquímicos y morfológicos apoyan la hipótesis de que los defectos observados en los padecimientos peroxisomales generalizados, se deben a fallas en el importe de proteínas al peroxisoma, hay estudios en donde se sugiere la posibilidad de que estén involucradas *anormalidades tanto en el mantenimiento como en la degradación peroxisomal*; esto último, debido al hallazgo, entre otros, de que en los fibroblastos de algunos pacientes existen peroxisomas morfológicamente normales, pero casi vacíos⁵¹. Estos constituyen a los “*fantasmas peroxisomales*” descritos en los fibroblastos de pacientes con el síndrome de Zellweger. Santos M.J. y col.⁸⁹, en 1988 establecieron que éstos se deben a una falla en el ensamblaje del peroxisoma. Por otro lado Heikoop y col.⁹⁰ en 1992, describen a estas estructuras como peroxisomas degradándose por la vía autofágica lisosomal.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.2.4 Biogénesis peroxisomal.

Los peroxisomas en la célula son originados por **fisión de estos organelos preexistentes**^{51,54,91}, aunque algunos autores⁹², recientemente han descrito la síntesis de peroxisomas en la ausencia de peroxisomas preexistentes. Las proteínas de la membrana peroxisomal son sintetizadas en el retículo endoplásmico (RE)⁹³ y las de matriz en ribosomas libres del citoplasma e incorporadas (post traduccionalmente) en vesículas precursoras que posteriormente se funden con los peroxisomas

existentes^{91,93}. Las proteínas de membrana se sintetizan antes que las de matriz en condiciones proliferativas del peroxisoma⁵¹, esto es, como por ejemplo, después de una hepatectomía parcial, o posterior al tratamiento con proliferadores, o por dietas altas en grasa.

Las proteínas peroxisomales poseen una *señal topogénica necesaria para el importe de ellas hacia el peroxisoma*. La secuencia SKL (serina, lisina, leucina) en el carboxilo terminal, es capaz de dirigir a las proteínas peroxisomales sin que se efectue proteólisis. Esta señal se ha identificado en alrededor de 30 proteínas peroxisomales de diversos organismos, desde levaduras hasta el humano, por ejemplo: luciferasa en la luciérnaga, urato oxidasa, acil-CoA oxidasa y proteína bifuncional en la rata. Una señal amino terminal, que se acompaña generalmente de proteólisis, se ha identificado en la tiolasa peroxisomal de *S. cerevisiae*, rata y humano^{46,51,94}. Otras enzimas peroxisomales requieren señales internas para su importe que son diferentes a las de las proteínas de membrana^{51,94}. En general, el importe de proteínas peroxisomales, requiere de ATP y de algunas proteínas accesorias como receptores y chaperonas⁹⁴⁻⁹⁶.

1.3 PROCESO AUTOFAGICO LISOSOMAL

La autofagia es un proceso intracelular, hidrolítico para distintos organelos y macromoléculas; se considera como adaptativa, por lo que responde a cualquier "agresión" a la integridad celular^{97,98}.

La autofagia de un organelo y en general de cualquier área del citoplasma como parte fundamental del recambio normal de la célula, involucra el secuestro por una membrana que proviene del RE denominada pre-autofágica (pre-autofagosoma o fagoforo)⁹⁷⁻¹⁰⁰. Posteriormente se forma la vesícula denominada autofagosoma (vesícula autofágica), que ya contiene al organelo a degradarse, pero aún no se encuentran las enzimas hidrolíticas necesarias para su degradación. Por otro lado, el prelisosoma, es una vesícula que contiene las enzimas hidrolíticas que provienen del aparato de Golgi en período de latencia es decir inactivas. En la membrana del prelisosoma, existe una bomba de protones con actividad de ATPasa, que proviene a

su vez de la membrana del **endosoma**. La función de la ATPasa es mantener el pH intralisosomal ácido, necesario para la actividad óptima de las enzimas hidrolíticas^{47,98,99,101}.

El autofagosoma y el prelisosoma se fusionan para dar origen a los **autolisosomas**, que son vesículas que contienen las enzimas hidrolíticas activas. La ultraestructura de los autolisosomas es heterogénea, tanto en tamaño, forma, como en electrodensidad, dependiendo del distinto contenido de material (organelos) a degradarse, y la fase degradativa en que se encuentren. De esta forma, se pueden distinguir 2 poblaciones de autolisosomas dependiendo del estadio de degradación en que se encuentren: autolisosomas tempranos y tardíos^{47,102,103}.

A todo este conjunto de eventos y formación de vesículas, se le conoce como **vía autofágica lisosomal**, la cual es dependiente de ATP¹⁰⁴. Experimentalmente es posible detener la vía en distintos puntos, ya que se conocen *inhibidores selectivos y específicos*, con diferentes mecanismos de acción, los cuales permiten por lo tanto, *enriquecer una determinada población de estas vesículas*^{99,105}. Véase la sección de inhibidores de la vía autofágica lisosomal y la figura 2.

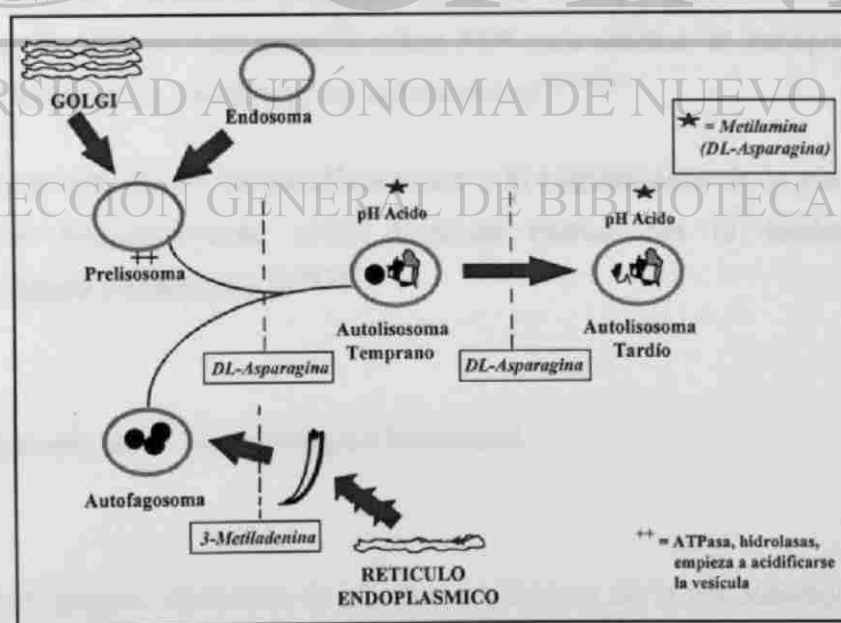


Figura 2. Diagrama de la vía autofágica lisosomal en donde se señalan los sitios de bloqueo de algunos inhibidores específicos.

1.3.1 Autolisosomas: Morfología y función.

Los autolisosomas son organelos o vesículas rodeadas de membrana que aparecen granulosas durante la inactividad¹⁰¹. Como ya se indicó, los lisosomas presentan una gran variedad de aspectos morfológicos, por lo que son **organelos heterogéneos que difieren en tamaño, forma y electrodensidad**. Existen autolisosomas con un contenido finamente granular o casi homogéneo y de forma esférica, aunque algunos son elipsoides, con un diámetro aproximado de 25 a 50 nm. En forma comparativa, se han descrito autolisosomas que varían en promedio entre 0.2 a 0.4 μm de diámetro^{47,101}, con formas muy diversas e irregulares¹⁰⁸.

Los autolisosomas se definen como vesículas que participan en la **degradación intracelular de macromoléculas y organelos** para de esta manera contribuir a la homeostasis intracelular y preservar la concentración adecuada de estos componentes. Estos organelos contienen aproximadamente *40 clases de enzimas hidrolíticas diferentes*, activas a un pH ácido. Entre ellas se incluyen: **proteasas, nucleasas, glucosidasas, lipasas, fosfolipasas, sulfatasas y fosfatasa**¹⁰¹. Con el propósito de mantener un pH alrededor de 5, la bomba de protones en la membrana del autolisosoma, transporta protones hacia la luz del autolisosoma. Como se mencionó anteriormente esta proteína utiliza ATP para efectuar el transporte activo de protones a través de la membrana del autolisosoma^{47,101,104}.

Para el marcaje de los autolisosomas y el seguimiento de la vía autofágica, se emplean frecuentemente como enzimas marcadoras la **fosfatasa ácida, β -glucuronidasa y catepsina D**¹⁰⁶⁻¹⁰⁹.

1.3.2 Inhibidores de la vía autofágica lisosomal.

El mecanismo de acción de algunos inhibidores de la vía autofágica lisosomal es el siguiente: 3-metiladenina bloquea el secuestro autofágico no formándose por lo tanto el autofagosoma, la vinblastina que altera la estructura normal del citoesqueleto,

no permite la fusión del autofagosoma con el prelisosoma, por lo que no se forma el autolisosoma, la DL-asparagina puede bloquear igualmente la formación del autolisosoma; por otro lado, las aminas metilamina y propilamina como también DL-asparagina en menor grado, inhiben en general la actividad de las enzimas lisosomales por aumentar el pH intralisosomal^{105,110,111} (figura 2).

1.3.3 Degradación peroxisomal.

En 1974 Reddy y col. demostraron en cuerpos grasos de la larva de la mariposa nocturna (*Calpodex ethlius*), que dentro del recambio de los peroxisomas, su degradación, se efectúa por autólisis o por autofagia. Estos dos mecanismos también suceden en las células de mamífero. Los peroxisomas son disueltos por autólisis después de 4 días de continuo crecimiento²⁵.

La autofagia de peroxisomas consiste en el secuestro de este organelo y su degradación por la vía lisosomal^{46,101}. En 1972, Arstila y col. y Novikoff y col., demostraron que la actividad de algunas enzimas peroxisomales (como por ejemplo catalasa) aún se detecta en la vesícula autofágica con peroxisomas después de un cierto período de tiempo, fenómeno también observado en la autofagia de mitocondrias. La degradación de peroxisomas por la vía autofágica procede muy rápidamente. Los peroxisomas de hepatocitos periportales tienen una vida media de aproximadamente 4 días (Poole y col. en 1969) y un tiempo de degradación de cerca de 4 minutos. En contraste la velocidad de degradación mitocondrial es de 16 días. Además, la autofagia de peroxisomas tiene un ritmo circadiano^{25,112}.

La autofagia como una forma de degradación y recambio de componentes intracelulares, sucede en la célula en condiciones fisiológicas normales, aunque también es un proceso muy importante en condiciones de estrés¹¹³. El proceso de degradación peroxisomal es muy activo en la autofagia inducida por glucagon^{51,114}, y después del tratamiento con proliferadores peroxisomales¹¹⁵⁻¹¹⁹. En la literatura existen pocos trabajos que documentan en mamíferos, la degradación de peroxisomas como parte del recambio normal de este organelo. Sin embargo, por microscopía electrónica

con técnicas citoquímicas e inmunocitoquímicas, sí ha sido posible demostrar la presencia de peroxisomas dentro de autofagosomas en hepatocitos de algunos mamíferos, como el mono²¹ y la rata^{25,116-119}. El proceso de degradación peroxisomal en levaduras ha sido más estudiado¹²⁰; específicamente en *Hansenula polymorpha*, *Yarrowia lipolytica* y *Candida boidinii* se han observado peroxisomas dentro de vacuolas autofágicas por las técnicas ya mencionadas^{44,121-123}.

Por último, se ha establecido que los peroxisomas como organelo completo tienen una vida media mucho más larga que la mayoría de sus componentes de matriz. Las proteínas de matriz, tienen características de degradación distintivas, por lo que se ha descrito al citoplasma como un importante compartimento para la actividad y degradación de algunas proteínas peroxisomales. Con respecto a esto, se ha demostrado que catalasa después de un tiempo de permanecer dentro del peroxisoma, puede ser liberada hacia el citoplasma, donde permanece activa por un corto tiempo antes de ser inactivada por proteólisis, aparentemente con el propósito de destoxificar a la célula del peróxido de hidrógeno y por lo tanto proteger a las membranas celulares^{25,51}.

Es necesario enfatizar la importancia de examinar este proceso del recambio peroxisomal tanto en condiciones normales como en situaciones de estrés para la célula, ya que es poco lo que se conoce de la degradación peroxisomal, en comparación con la biogénesis peroxisomal.

1.4 ANALISIS DE LA DEGRADACION PEROXISOMAL.

La actividad de fosfatasa ácida, determinada por técnicas citoquímicas, se puede emplear como marcadora de la vía autofágica lisosomal. En la figura 3 se muestra el diagrama de un autofagosoma, que es fosfatasa ácida (FAC) negativo debido a que, como ya se indicó, no posee enzimas hidrolíticas; por el contrario se observa un autolisosoma, que es FAC positivo, lo que permite su identificación por la presencia de la actividad de FAC, que a nivel ultraestructural por microscopía electrónica de transmisión se observa con una electrodensidad intensa. Por otro lado, para el marcaje de peroxisomas se utiliza la detección de la actividad de catalasa por

la técnica citoquímica de la diaminobenzidina (DAB) alcalina. En consecuencia, por medio de este marcaje, con las dos técnicas citoquímicas, se pueden detectar respectivamente autofagosomas y autolisosomas con peroxisomas dentro y peroxisomas en vía de degradación, pero que son catalasa +. Esto es posible, debido a que, la actividad de catalasa aún se detecta en la vesícula autofágica que contiene peroxisomas, según se ha descrito^{21,25}.

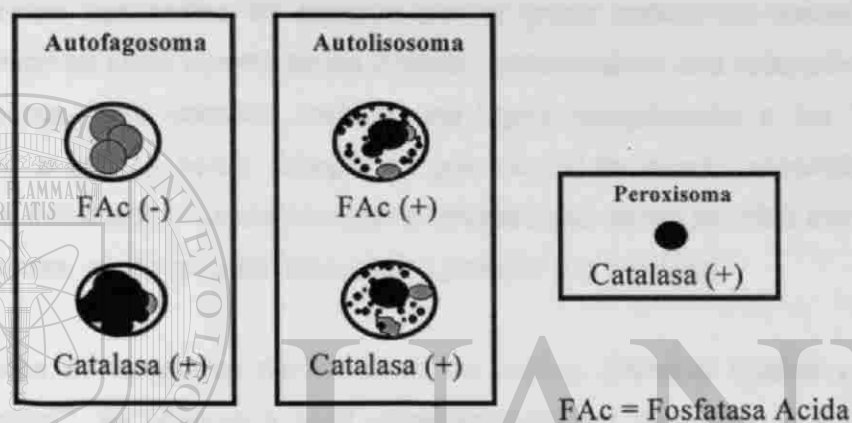


Figura 3. Diagrama del marcaje con técnicas citoquímicas para el estudio de la autofagia peroxisomal.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

1.5 ANTECEDENTES EXPERIMENTALES DIRECTOS

Originalmente, Piñeyro planteó la hipótesis de que la PA1 afecta a los peroxisomas¹²⁴, motivo por el que se diseñaron varios experimentos para probar esta hipótesis, los cuales se han realizado en colaboración con los grupos de trabajo de Sepúlveda y col.^{20,21,23,40,44} y Moreno y col.^{31,39,40}. Como resultado de estas investigaciones se obtuvieron los siguientes hallazgos:

1. En los monos cynomolgus (*Macaca fascicularis*) que recibieron una dosis letal única de PA1, ya sea 6, 7 o 10 mg/Kg²¹, se observó en el hígado de los animales

intoxicados que llegaron a morir, un proceso de autofagia de los peroxisomas dañados y por análisis morfométrico se demostró una disminución en el número de peroxisomas. Con el marcaje por la técnica citoquímica para la catalasa peroxisomal, fue posible detectar a los peroxisomas secuestrados en vesículas autofágicas lisosomales. Es importante destacar que aún en las fases terminales se pudo detectar actividad de catalasa en cuerpos autofágicos.

2. En el estudio de ratas Wistar intoxicadas con una dosis letal única de PA1, 25 mg/Kg⁴⁰, se demostró en los hepatocitos una disminución en el número de peroxisomas por campo en relación con el grupo control sin tratamiento. Esta disminución se inició a partir de las 2 horas, obteniéndose una reducción del 27% a las 8 horas, para después mostrar una ligera recuperación a las 12 horas y disminuir a las 24 horas, tiempo en que ocurre la muerte espontánea de los animales intoxicados. La observación al microscopio de luz permitió identificar a los peroxisomas, por la reacción citoquímica positiva a la catalasa.

3. En células de levaduras metilotróficas en cultivo, *Candida boidinii* y *Hansenula polymorpha*⁴⁴, se observó a nivel ultraestructural por efecto de la PA1, un daño peroxisomal selectivo e irreversible, consistente en la fragmentación de la membrana peroxisomal y la degradación de los peroxisomas afectados en la vacuola digestiva. Con técnicas inmunohistoquímicas se identificó la presencia de la alcohol oxidasa peroxisomal, dentro de la vacuola autofágica. Además se observaron agregados citosólicos de las dos enzimas tanto alcohol oxidasa como dihidroxiacetona sintasa. La lesión en la membrana del peroxisoma se relacionó con la participación del proceso autofágico. Las concentraciones de PA1 empleadas en este estudio fueron 0.5, 2, 10, 20 y 50 µg/ml. A una dosis baja, no letal (2 µg/ml), se demostró un efecto específico sobre la integridad peroxisomal⁴⁴.

1.6 HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

1.6.1 Hipótesis de trabajo.

La disminución en el número de peroxisomas observada en el hígado de animales intoxicados con PA1, se debe a la degradación proteolítica de estos organelos dañados, por medio de la vía autofágica.

1.6.2 Objetivo general.

Evaluar si, en nuestras condiciones experimentales *in vitro*, la peroxisomicina A1 (PA1) estimula la vía autofágica lisosomal e induce la degradación de peroxisomas.

1.6.3 Objetivos específicos.

1. Establecer las condiciones del sistema de cultivo de órgano para el hígado de *Macaca fascicularis*.
2. Realizar un estudio piloto para definir las concentraciones y los tiempos de incubación con peroxisomicina A1 (PA1),
3. Determinar la fracción de volumen peroxisomal por medio de un análisis morfométrico y la actividad de enzimas peroxisomales, en presencia y ausencia de PA1.
4. Evaluar la vía autofágica lisosomal por medio de estudios histoquímicos y bioquímicos, en presencia y ausencia de PA1.

5. Analizar la presencia de peroxisomas dentro de autofagosomas y autolisosomas, en presencia y ausencia de PA1.
6. Evaluar los objetivos 3, 4 y 5, en presencia de los inhibidores de la vía autofágica lisosomal, DL-asparagina, metilamina y 3-metiladenina.

1.7 IMPORTANCIA

La importancia del presente trabajo de investigación se debe a que:

Contribuye al conocimiento del proceso de la autofagia y específicamente al entendimiento de la degradación selectiva de organelos como los peroxisomas, como un mecanismo elemental en respuesta a agentes tóxicos como la PA1.

Como ha sido reportado en la literatura, varias drogas inducen la proliferación de los peroxisomas (drogas hipolipídicas como el clofibrato)^{25,51}; sin embargo, hasta la fecha no existen reportes de drogas o agentes tóxicos que induzcan una disminución en el número de peroxisomas, con excepción única del factor de necrosis tumoral¹²⁵. Por esta razón, la PA1 representa una buena herramienta para el estudio de condiciones similares, como trastornos patológicos en el humano que se caracterizan, entre otras manifestaciones, por la disminución o ausencia de los peroxisomas en el hígado^{86,97}.

Por último, este trabajo contribuye al conocimiento del mecanismo de acción de la PA1, ya que es fundamental que se profundice sobre de ello, dada la posible utilidad y aplicabilidad que este compuesto tiene para el humano como "droga antineoplásica" y además, como ya se mencionó, la PA1 es una sustancia que a dosis tóxicas puede tener acciones importantes sobre la ultraestructura de algunos organelos, como el peroxisoma en el hígado, con la posible alteración en la función de este órgano y su repercusión a nivel clínico.

CAPITULO 2

MATERIALES Y METODOS

2.1 ORIGEN DE LOS REACTIVOS Y EL MATERIAL.

Todos los reactivos utilizados fueron de la más alta calidad analítica y especiales para una aplicación en particular. En todos los casos se utilizó agua desionizada y ultrapura (sistema Milli-Q de Millipore).

Los reactivos empleados en el cultivo de órgano: solución de Hanks, heparina, fructosa, suero fetal bovino, dimetilsulfóxido, medios nutrientes MEM, Dulbecco y L-15, glutamina, insulina, glucagon, piruvato, metilamina, 3-metiladenina y DL- asparagina, se obtuvieron de Sigma Chemical Company (Saint Louis, MO., EUA). Los platos de cultivo (plástico, 30 mm de diámetro) se adquirieron de Costar (Cambridge, MASS., EUA). Los cartuchos y filtros (membrana de 0.22 μm) para esterilizar soluciones fueron de Millipore Corporation (Bedford, MA, EUA). El Gelfoam se compró de Upjohn Company (Kalamazoo, Michigan, EUA).

Los reactivos y material utilizados en la técnica de *microscopía electrónica y de luz*: glutaraldehído (25%), tetraóxido de osmio, juego de resinas epóxicas de baja hidratación, cacodilato de sodio, acetato de uranio, citrato de plomo, azul de toluidina, colodion, rejillas de cobre (200 "mesh"), moldes para inclusión y material quirúrgico fino con puntas de teflón, se obtuvieron de Electron Microscopy Sciences (Fort Washington, PA, EUA). La cuchilla de diamante, el vidrio para preparar cuchillas y la película positiva directa se obtuvieron de Pelco International (Redding CA., EUA). Los rollos de película para el microscopio electrónico de transmisión utilizados fueron de la casa Agfa -Gevaert AG (Leverkusen, Alemania). El papel para la impresión de

micrografías en blanco y negro fue de la marca Eastman Kodak Company (Rochester, N.Y., EUA). Los substratos y demás reactivos para la detección de fosfatasa ácida y catalasa por técnicas citoquímicas: β -glicerofosfato de sodio, Tris maleato, nitrato de plomo, sacarosa, diaminobenzidina y cloruro de calcio, se adquirieron de Sigma Chemical Company (Saint Louis, MO., EUA). El peróxido de hidrógeno (Perhydroil, 30%) se obtuvo de Merck (Alemania).

Los substratos y demás reactivos para los ensayos enzimáticos por técnicas bioquímicas de lactato deshidrogenasa, tirosina aminotransferasa, catalasa, catepsina D y fosfatasa ácida, se obtuvieron igualmente de Sigma Chemical Company (Saint Louis, MO., EUA): β -NADH, Tris, L-tirosina, α -cetoglutarato, fosfato-6-piridoxal, hemoglobina bovina, Tritón X-100, reactivo reductor de Fiske & Subbarow (ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico, sulfito de sodio y bisulfito de sodio), catalasa purificada (hígado de ratón, 10 mg/ml proteína) y peróxido de hidrógeno (30%). El dimetilsulfóxido (DMSO) se adquirió de Merck (Alemania).

Los substratos, enzimas y demás reactivos para el ensayo de 3-cetoacil-CoA tiolasa peroxisomal se adquirieron, algunos de Sigma Chemical Company (Saint Louis, MO., EUA), coenzima A y NAD y otros de Boehringer Mannheim GmbH (Alemania), 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa (corazón de cerdo) y lactato deshidrogenasa (corazón de cerdo). El DL-3-hidroxidecanoil-CoA éster fue sintetizado y purificado en el Laboratorio del Prof. Dr. W.-Kunau, Universidad Ruhr, Alemania.

Para la determinación de la concentración de proteína se empleó el reactivo de Bio-Rad Protein assay (ensayo estándar con azul brillante de Coomassie G-250, ácido fosfórico, metanol y albúmina sérica bovina para las curvas patrón) (Hercules, CA, EUA).

La peroxisomicina A1 (PA1), lote No. 73, fue aislada y purificada en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León. Se almacenó siempre a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, protegida de la luz y la humedad.

El resto de los reactivos (sales y solventes) utilizados, fueron adquiridos de otros proveedores.

2.2 MATERIAL BIOLÓGICO

Monos *Macaca fascicularis* * (machos, adultos, 4 - 5 Kg) fueron proporcionados por el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León. Se utilizaron cuatro monos: el primero para la estandarización del cultivo de órgano, enzimas y algunas técnicas citoquímicas, el segundo para el estudio piloto y los otros dos monos para la realización de los experimentos de acuerdo a los objetivos y la hipótesis de trabajo.

2.3 EQUIPO

Microscopio electrónico de transmisión, Carl Zeiss modelo EM109, con aceleración de voltaje de 80 Kv

Fotomicroscopio Carl Zeiss modelo I

Microscopios estereoscópicos Carl Zeiss modelo 475002 y American Optical modelo 569

Sistema computarizado analizador de imágenes MORPHON

Campana de flujo laminar vertical LabCONCO de seguridad clase II modelo 36204-00

Incubadora de CO₂ HotPack Modelo 351820

Criostato DAMON/IEC Division

Ultramicrotomo LKB BROMMA ULTROME®V modelo 2088

Preparador de cuchillas de vidrio LKB BROMMA modelo 7800 KnifeMaker

Espectrofotómetro digitalizado Milton Roy Spectronic modelo 601, $\lambda = 190 - 950 \text{ nm}$

Centrifuga Eppendorf BECKMAN

Homogenizador de tejidos BELLCO, 30 - 1100 rpm de velocidad, 110 volt y 60 Hz, con vaso de vidrio Potter-Elvehjem y émbolo de teflon

Centrifuga de mesa SOL-BAT modelo J-12, 500 -5000 rpm de velocidad

Autoclave Market Forge Sterilmatic Modelo STM-E

Sistema Millipore desionizador y purificador de agua Milli-Q, con cartuchos de intercambio iónico, de carbón y filtros de ésteres de celulosa (poro 0.22 μm) biológicamente inertes.

* Ninguno de los animales fue sacrificado exclusivamente para preparar los cultivos de órgano sino que fueron empleados en otros estudios.

2.4 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para la estrategia de trabajo se utilizó el modelo experimental del cultivo de órgano de hígado de *Macaca fascicularis*, incubado en presencia y ausencia de peroxisomicina A1. Cuando se efectuaron los experimentos del análisis de la vía autofágica, el hígado en cultivo se agregó al medio de cultivo con cada uno de los siguientes inhibidores, por separado, metilamina, 3-metiladenina y DL-asparagina, como igualmente la combinación con peroxisomicina A1.

La disolución de la toxina peroxisomicina A1 (PA1), se efectuó inmediatamente antes de su utilización, con *etanol absoluto*; la concentración final del etanol en el medio nutriente fue de 0.1% (v/v).

En las figuras 4 y 5 se muestran los diagramas que representan la estrategia experimental del presente trabajo.

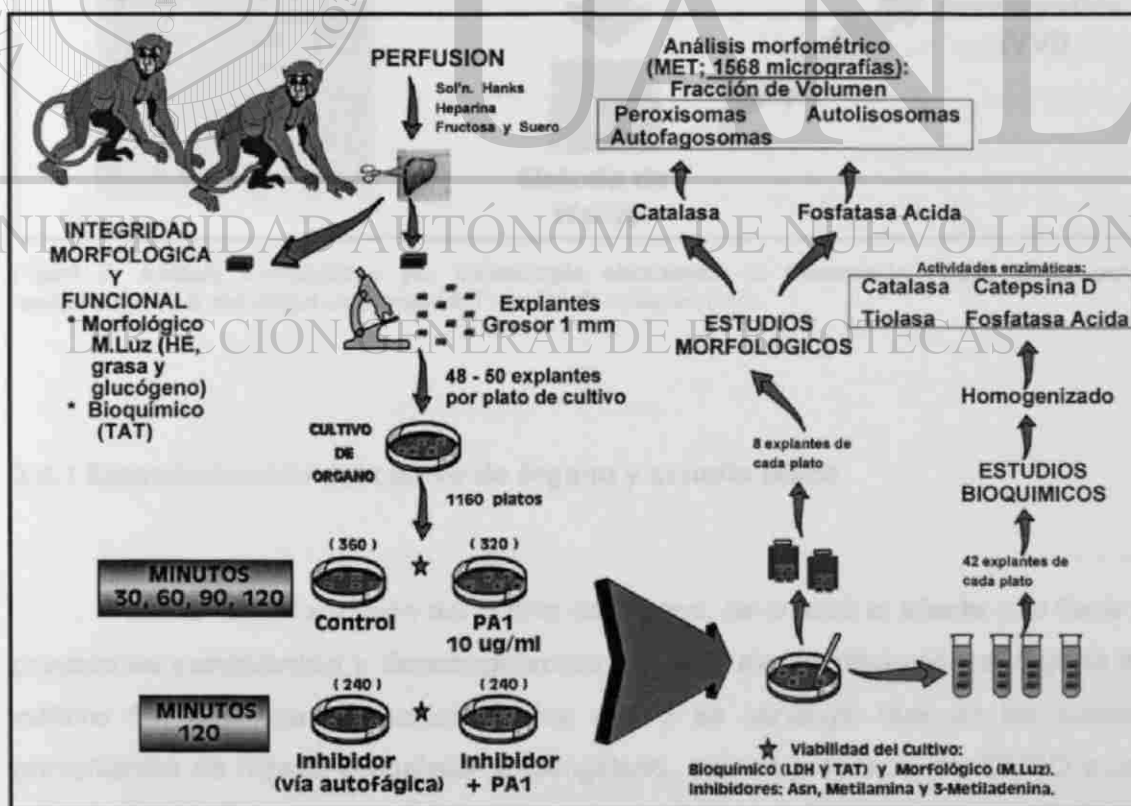


Figura 4. Resumen de la estrategia experimental, puntos más relevantes (no se incluye el estudio piloto y la estandarización de las técnicas).

En la figura 5, se presenta el análisis morfométrico por microscopía electrónica de transmisión, el cual se describe en la sección 2.4.5.4, y en la sección 2.4.5.4.1 se encuentra la determinación de la fracción de volumen (Vvi) por el método de Weibel.

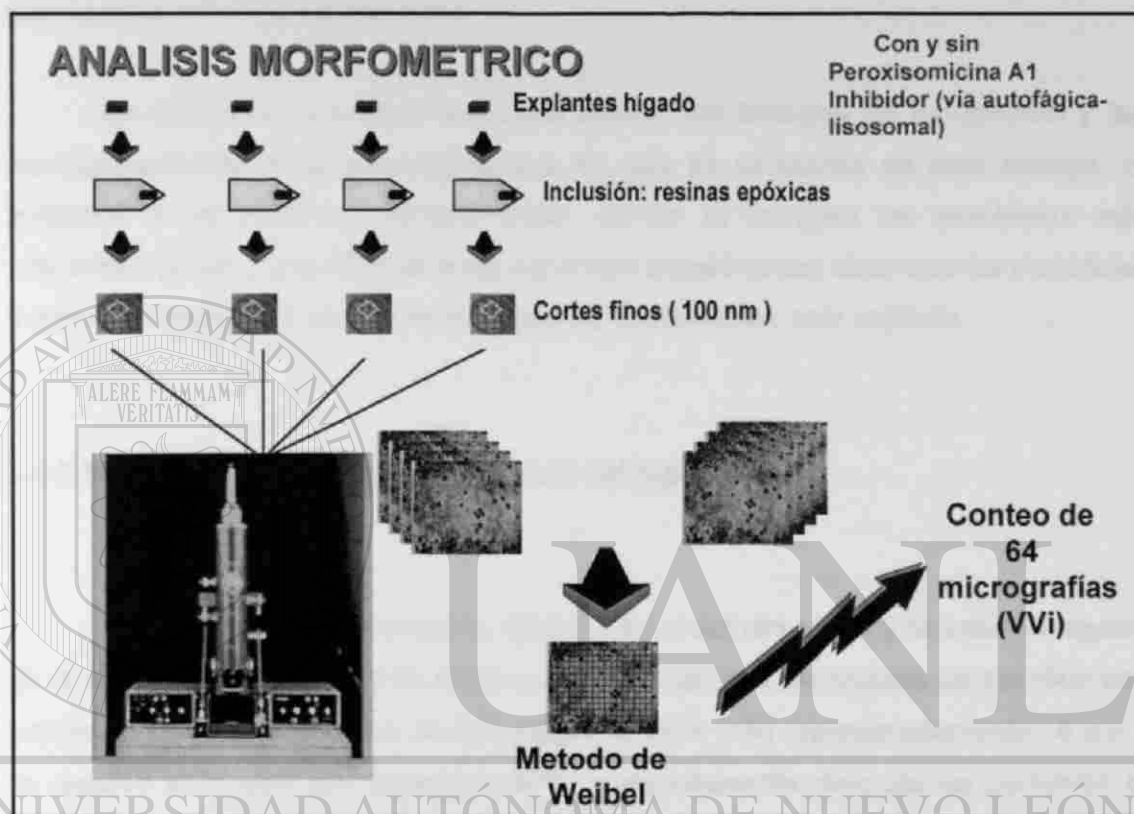


Figura 5. Análisis morfométrico por microscopía electrónica de transmisión (MET) como parte fundamental de la estrategia experimental. Fracción de volumen (Vvi).

2.4.1 Estandarización del cultivo de órgano y estudio piloto.

Para la estandarización del cultivo de órgano, se analizó el efecto que tiene el proceso de **congelación y descongelación sobre el mantenimiento del hígado en cultivo** (en ausencia de peroxisomicina A1) y se concluyó que en los cultivos provenientes de hígado congelado-descongelado, aún en presencia del DMSO como crioprotector, la histología **del hígado de *Macaca fascicularis* no se conserva**, por lo que en el estudio piloto y en los experimentos posteriores se efectuaron los cultivos de

órgano con el hígado sin congelar. Además, se prepararon *cultivos de órgano control carentes de peroxisomicina A1 pero con etanol al 0.1 % (v/v)*, que fue la concentración de disolución para la toxina. Se probaron varios medios nutrientes (MEM, Dulbecco y L-15), suplementos y cantidad de explantes de hígado por placa de cultivo. Después de analizar los parámetros anteriores, se estableció la técnica para el cultivo de órgano que se describe en la sección 2.4.3.

Se realizó un estudio piloto para definir los tiempos de incubación y las concentraciones de la peroxisomicina A1 que se utilizaron en este trabajo. El apéndice A se refiere al estudio piloto, donde se incluyen los resultados más relevantes de ello y una síntesis de la estrategia experimental, dado que los materiales y métodos empleados son los mismos que se describen en este capítulo.

2.4.2 Preparación del animal y obtención del hígado.

Para todos los experimentos, incluyendo el estudio piloto y la estandarización de la técnica para el cultivo de órgano, el mono *Macaca fascicularis* se sacrificó con una inyección intracardiaca de KCl estéril al 30% (p/v) (aproximadamente 10 ml) y se expuso el hígado por laparotomía¹²⁶. Inmediatamente después se perfundió el hígado como se describe en la siguiente sección.

2.4.3 Cultivo de órgano de *Macaca fascicularis* .

La técnica del cultivo de órgano, fue adaptada y estandarizada para nuestras condiciones experimentales, y específicamente para el hígado del mono *Macaca fascicularis*, por lo que esto es una aportación técnica del trabajo, y fue basada en los métodos descritos por Sepúlveda Saavedra J. y cols.¹²⁷, Ulrich R.G. y cols.¹²⁸ y Seglen P.O y cols.¹²⁹.

Una vez estandarizada la técnica del cultivo de órgano para el hígado sin

congelar todos los procedimientos experimentales que a continuación se describen, fueron los mismos para cada experimento, a excepción de las concentraciones de peroxisomicina A1 e inhibidores de la vía autofágica-lisosomal y de los tiempos de cultivo y de recolecta de los explantes. Todo el material empleado para el cultivo de órgano se esterilizó por calor húmedo en el autoclave (121°C por 45 minutos) y por gas (2 horas). Medios nutrientes y suplementos se esterilizaron por filtración con membrana de 0.22 µm de poro (sistema Millipore). Los procedimientos posteriores a la perfusión del hígado se realizaron en una campana de flujo laminar horizontal en condiciones estériles y a 2 - 4 °C.

El hígado del mono *Macaca fascicularis* se perfundió *In situ* vía la vena porta, con heparina (10 U/ml), fructosa (16.65 mM), suero fetal bovino (5% v/v) y antibióticos (penicilina G sódica 100 U/ml y sulfato de estreptomycin 10 mg%) en el medio de perfusión (solución de Hanks). Una vez terminada la perfusión, el hígado se lavó dos veces con el medio de perfusión sin heparina y suero, pero adicionado con insulina (1 µM) e hidrocortisona (10 µM). Se colocó en hielo y se procedió a la fragmentación del órgano, con la ayuda de un pequeño bisturí, cortando el hígado en porciones de 1 a 2 g cada uno. De aquí en adelante, todas las soluciones, medios de cultivo y el hígado mantenido en la solución de Hanks con insulina, hidrocortisona, fructosa y antibióticos, se colocaron sobre hielo y se mantuvo siempre la temperatura entre 2 - 4°C. Posteriormente se efectuó la incubación del hígado en la Incubadora de CO₂ (vease sección 2.4.3.2).

De los *fragmentos de hígado (1 a 2 g) obtenidos, algunos se emplearon para el análisis de la integridad morfológica y funcional del hígado (descrito en la siguiente sección), y otros para realizar el cultivo de órgano.*

2.4.3.1 Integridad morfológica y funcional del hígado.

En cada experimento se realizaron estudios para la evaluación de la integridad morfológica y funcional de los *fragmentos de hígado perfundido (no cultivado)*, los cuales consistieron en análisis: *morfológico con microscopía de luz y bioquímico*. Para

el estudio morfológico, la fijación inmediata se llevó a cabo por congelación, con nitrógeno líquido-isopentano, para el análisis posterior del hígado con la técnica histológica de Hematoxilina y Eosina, y la detección de grasa y glucógeno por técnica histoquímica (ver secciones 2.4.3.1-1 a 2.4.3.1-3). En el estudio bioquímico se determinó la actividad de tirosina aminotransferasa (TAT) en los fragmentos de hígado no congelado ni cultivado, pero que se encontraban a 4°C (ver sección 2.4.3.1-4).

2.4.3.1-1 Tinción de Hematoxilina y Eosina (HE).

En este estudio, se empleó la tinción habitual clásica de HE con la hematoxilina de Harris. En esta técnica, la hematoxilina tiñe a los núcleos celulares y la eosina (débilmente ácido) al citoplasma¹³⁰. El procedimiento se muestra en la tabla 1 del apéndice B.

2.4.3.1-2 Detección de grasa por técnica histoquímica del rojo oleoso.

La detección de grasa en el hígado, se realizó por medio de la tinción del rojo oleoso O, la cual se basa en la propiedad que tiene este colorante en solución alcohólica (liposoluble y poco soluble en alcohol) de difundir, por difusión simple del alcohol, a los lípidos de los tejidos, quedando éstos coloreados de naranja a rojo brillante¹³⁰. El procedimiento se muestra en la tabla 2 del apéndice B.

2.4.3.1-3 Detección de glucógeno por técnica histoquímica de la reacción del ácido peryódico de Schiff (PAS).

En la evaluación morfológica del hígado fresco, sin cultivar, también se empleó la detección de glucógeno por la técnica de PAS. El fundamento de esta técnica se

basa en la oxidación de los grupos 1,2 glicol de los carbohidratos por medio del ácido peryódico, formandose dialdehídos, los cuales al reaccionar con la pararosanilina de la fuchsina-ácido sulfurosa (solución de Schiff), forma un complejo estable coloreado de color rosa magenta¹³⁰. El procedimiento que se efectuó para esta técnica se muestra en la tabla 3 del apéndice B.

2.4.3.1-4 Ensayo de la actividad de tirosina aminotransferasa (TAT).

La determinación de la actividad de tirosina aminotransferasa (L-tirosina: 2-oxoglutarato aminotransferasa; EC 2.6.1.5) se llevó a cabo por el método espectrofotométrico de Diamondstone modificado por Granner y Tomkins^{131,132}, que utiliza L-tirosina y α -cetoglutarato como sustratos. Se determinó la actividad enzimática midiendo el producto p-hidroxifenilpiruvato a una longitud de onda de 331 nm. *La actividad de todas las enzimas analizadas por métodos bioquímicos se expresó en Unidades Internacionales (U), para lo cual una Unidad es definida como la transformación de 1 μ mol de sustrato o la formación de 1 μ mol de producto por minuto durante la reacción enzimática.* Una unidad de TAT se define^{131,132} como la cantidad necesaria de enzima para la producción de 1 μ mol de producto, por 1 minuto, a 37°C.

El cálculo matemático fue el siguiente:

$$U / ml = \frac{\text{Abs. (Abs.Problema - Abs.Control, 331 nm)}}{(19.9 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}) (1 \text{ cm}) (1 \text{ min})} \times \frac{1 \text{ min}}{10 \text{ min}} \times \frac{1 \text{ ml}}{0.1 \text{ ml}} \times \text{dilución}^*$$

* Abs. = Absorbancia

Dilución de la fuente de enzima (homogenizado).

Los cálculos necesarios para la obtención de U / ml están incluidos en el apéndice C. El procedimiento que se efectuó para el ensayo de la actividad de TAT se muestra en la tabla 4 del apéndice B.

2.4.3.2 Preparación de los platos de cultivo con Gelfoam.

Previo a la incubación de los explantes de hígado (ver en la siguiente sección), cada plato de cultivo (30 mm de diámetro) fue cubierto con una esponja de colagena (Gelfoam) y esterilizados todos los platos por gas. En el momento del experimento, el Gelfoam se impregnó completamente con 3 ml del medio de cultivo* adicionado con insulina (0.1 μ M) para el cultivo control. Dependiendo de la condición experimental, el medio de cultivo, que se le añadió al Gelfoam, además fue adicionado con peroxisomicina A1, o con cualquiera de los inhibidores de la vía autofágica-lisosomal (metilamina, 3-metiladenina, DL-asparagina), o con la combinación de peroxisomicina A1 e inhibidor, a las concentraciones indicadas en la tabla I.

Los explantes de hígado para el cultivo de órgano fueron colocados en los platos, sobre el Gelfoam (siguiente sección).

2.4.3.3 Obtención de explantes de hígado de 1 mm de grosor, incubación y recolección.

Cada fragmento de hígado (1 a 2 g) mantenido en la solución de Hanks con insulina, hidrocortisona, fructosa y antibióticos, fue finamente cortado con un bisturí y con la ayuda del microscopio estereoscópico se prepararon explantes de 1 mm de grosor. *Estos pequeños explantes de hígado, son nuestras unidades muestrales que sirvieron para el cultivo de órgano, los cuales se colocaron sobre el Gelfoam.*

Posteriormente, los explantes (1 mm) se lavaron tres veces en el mismo medio de cultivo con insulina citado arriba. Después de los lavados, 48 - 50 explantes se utilizaron por plato de cultivo, y la incubación se llevó a cabo a 37°C en una incubadora de CO₂, con 86 - 96% de humedad. Por otra parte, durante la

* Medio de cultivo = L-15 suplementado con piruvato (2.27 mM), glutamina (1.99 mM) y antibióticos (penicilina G sódica 100 U/ml y sulfato de estreptomycinina 10 mg%).

estandarización del cultivo de órgano, cuando se efectuaron experimentos con los medios de MEM y de Dulbecco, durante la incubación, además se añadió CO₂ a una saturación del 5% y 10% respectivamente.

Las características y condiciones del cultivo de órgano del estudio piloto y de los experimentos de acuerdo a los objetivos y la hipótesis de trabajo, se muestran en la tabla I.

Una vez **recolectados los cincuenta explantes** de cada plato de cultivo, según los tiempos indicados en la tabla I, se efectuaron en **ocho de ellos, estudios morfológicos y en los otros cuarenta y dos, estudios bioquímicos**, ver secciones 2.4.5 y 2.4.6 respectivamente. La determinación de *la actividad de las diversas enzimas se efectuó por métodos espectrofotométricos.*

Además, tanto a los explantes hepáticos del cultivo de órgano control (sin peroxisomicina A1), como a los incubados con peroxisomicina A1 o a los incubados con los inhibidores de la vía autofágica lisosomal (metilamina, 3-metiladenina y DL-asparagina), se les determinó a cada tiempo indicado en la tabla I, **la viabilidad del hígado por medio de indicadores bioquímicos e indicadores morfológicos (descritos en la siguiente sección).**

TABLA I.

**CULTIVO DE ORGANO: CARACTERISTICAS Y CONDICIONES ESPECIFICAS
EMPLEADAS PARA EL HIGADO DEL MONO *MACACA FASCICULARIS*.**

	Monos M.fasc.	Incubación a 37°C (48 - 50 explantes de higado de 1mm de grosor, por plato, con medio L-15 y adiciones)	Concentración ^a	Total platos d/cultivo	Tiempos de incubación ^b
Estudio piloto	1	S/ peroxisomicina A1 (PA1) C/ peroxisomicina A1	0.0 µg/ml 2.5 µg/ml 5.0 µg/ml 10.0 µg/ml 20.0 µg/ml	280 280 280 280 280	0.5, 1 - 8, 12, 16, 24, 48, y 72 horas (para todas las concs. de PA1, el control y el incubado con glucagon)
		C/ glucagon (ver viabilidad del cultivo en sección 2.4.4)	0.1 µM	140	
Experimento según objetivos e hipótesis de trabajo	2	S/ peroxisomicina A1 (PA1) C/ peroxisomicina A1	0.0 µg/ml 10.0 µg/ml	360 320	30, 60, 90, y 120 minutos (para PA1 y el control) 120 minutos (para los tres inhibidores, y los inhibs. con PA1)
		C/ metilamina C/ 3-metiladenina C/ DL-asparagina	10.0 mM 5.0 mM 10.0 mM	80 80 80	
		C/ metilamina + PA1 C/ 3-metiladenina + PA1 C/ DL-asparagina + PA1	10.0 mM + 10.0 µg/ml 5.0 mM + 10.0 µg/ml 10.0 mM + 10.0 µg/ml	80 80 80	
		C/ glucagon (ver viabilidad del cultivo en sección 2.4.4)	0.1 µM	160	30, 60, 90, y 120 minutos

^a Como ya se indicó, la peroxisomicina A1 se disolvió en etanol absoluto, los inhibidores de la vía autofágica-lisosomal (metilamina, 3-metiladenina y DL-asparagina) se disolvieron en solución de Hanks, y se tomaron los volúmenes adecuados de estas soluciones para obtener las concentraciones finales requeridas en el medio de cultivo (L-15 con adiciones).

^b La recolecta de los explantes se efectuó "al azar" después de los tiempos indicados en la tabla, con la ayuda de unas pinzas finas para no dañar al tejido, e inmediatamente se colocaron algunos en el fijador, (glutaraldehído a la concentración indicada más adelante) para los análisis morfométricos y de viabilidad. Otros explantes para los estudios bioquímicos y de viabilidad, se recolectaron y se lavaron 3 veces con solución salina estéril (cloruro de sodio al 0.9% (p/v)). En el último lavado se suplementó la solución salina con dimetilsulfóxido al 10% (v/v), e inmediatamente fueron congelados los explantes a -20°C, y descongelados hasta el momento que se requirieron.

2.4.4 Viabilidad del hígado en el cultivo de órgano.

2.4.4.1 Indicadores bioquímicos.

En cada experimento se efectuaron estudios para determinar la *viabilidad del hígado en cultivo de órgano, con indicadores bioquímicos: 1) liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) al medio de cultivo (ver sección 2.4.4.1-2), y 2) determinación de la actividad de TAT en respuesta a la inducción por glucagon en los explantes de hígado cultivados (ver sección 2.4.4.1-1).*

2.4.4.1-1 Inducción de tirosina aminotransferasa (TAT) por glucagon.

TAT es una enzima marcadora del hígado, cuya actividad se induce por hormonas como hidrocortisona, insulina y glucagon^{128,133}, por esta razón se utilizó el *aumento en su actividad en respuesta a glucagon, como un índice del estado metabólico y funcional de los hepatocitos en cultivo.*

Para lo anterior, se incubaron explantes de hígado (1mm de grosor) con el *medio de cultivo adicionado con glucagon (0.1 μ M).* En el cultivo control, el medio no contenía glucagon. El gelfoam de los platos de cultivo fue humedecido igualmente con el medio correspondiente según sea el cultivo con hormona o el control. Las demás condiciones para el cultivo de órgano fueron las mismas que para los cultivos con peroxisomicina A1, o los incubados con cualquiera de los inhibidores de la vía autofágica lisosomal. Ver secciones 2.4.3.2, 2.4.3.3 y tabla I.

Posterior al cultivo de órgano, los explantes se colectaron de acuerdo a los tiempos de incubación que se señalan en la tabla I, se lavaron con solución salina estéril (cloruro de sodio al 0.9% (p/v)) y se congelaron a -20°C con solución salina adicionada con dimetilsulfóxido (DMSO) al 1% (v/v). Para analizar la actividad de TAT, los explantes se descongelaron a temperatura ambiente, se lavaron cuatro veces, y se

prepararon los homogenizados con el amortiguador fosfato de potasio 50 mM pH 7.6, a 4°C.

2.4.4.1-2 Ensayo de la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH).

La cuantificación de la actividad de LDH (L-lactato: NAD oxidoreductasa; EC 1.1.1.27) en el medio de cultivo, se utilizó como otro índice de viabilidad del hígado en cultivo de órgano, dado que la liberación de LDH ocurre después de daño a la membrana celular^{134,135}. Se consideró un *cultivo viable*, aquel en el que se obtuvo una liberación de LDH al medio de cultivo menor del 20%.

Para lo anterior, se colectaron los medios de los platos de cultivo, se centrifugaron (14000 rpm, 4°C, 5 a 10 minutos) y en los sobrenadantes se determinó la actividad de LDH. Además, se determinó la actividad total de LDH en los sobrenadantes de los homogenizados provenientes de los explantes de hígado de los platos de cultivo. Para calcular el porcentaje de liberación de LDH, se relacionó la actividad de los medios de cultivo con la actividad total de los explantes de hígado.

La actividad de LDH se determinó según el método espectrofotométrico de Vassault¹³⁶, el cual se basa en la medición de la oxidación de NADH a NAD⁺, a una longitud de onda de 340 nm. Una unidad de LDH se define¹³⁶ como la cantidad necesaria de enzima para producir la disminución de 1 μmol de NADH, por minuto, a 25°C. El cálculo matemático fue el siguiente:

$$U / ml = \frac{\Delta \text{Abs. (340 nm)}}{(6.22 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}) (1 \text{ cm}) (\text{min})} \times \frac{1 \text{ min}}{10 \text{ min}} \times \frac{1.07 \text{ ml}}{0.07 \text{ ml}} \times \text{dilución}^*$$

* Δ Abs. = Cambio de absorbancia

Dilución de la fuente de enzima (sobrenadante del medio de cultivo u homogenizado).

El procedimiento que se efectuó para el ensayo de la actividad de LDH se muestra en la tabla 5 del apéndice B.

2.4.4.2 Indicadores morfológicos para determinar la viabilidad del hígado en el cultivo de órgano.

El *análisis morfológico* para determinar la viabilidad del hígado en el cultivo de órgano, se efectuó de la forma siguiente: los explantes de hígado de *Macaca fascicularis* recolectados se fijaron *inmediatamente con glutaraldehído al 1.5% en amortiguador de cacodilatos 0.1 M pH 7.2 - 7.4*, se procesaron para la *reacción citoquímica de catalasa* (tabla 6 apéndice B), se prepararon en el ultramicrotomo *cortes semifinos (1 μm)*, los cuales se montaron en una laminilla de vidrio y se tiñeron con azul de toluidina (al 1% p/v más borax al 5%), para posteriormente observarse al *microscopio de luz*.

2.4.5 Estudios morfológicos en los explantes de hígado cultivados.

Para los estudios morfológicos, **ocho de los explantes** recolectados "al azar", según los tiempos indicados en la tabla I, se fijaron inmediatamente en **glutaraldehído** a la **concentración** indicada en las **tablas 6 y 7 del apéndice B**. Cuatro de ellos fueron sometidos a la **reacción citoquímica para la demostración de catalasa** (sección 2.4.5.1) y los otros cuatro a la **reacción citoquímica para la demostración de fosfatasa ácida** (sección 2.4.5.2) para la morfometría con **microscopía de luz** (en el estudio piloto; sección 2.4.5.3) y para el **análisis morfométrico con microscopía electrónica** (en los experimentos posteriores; sección 2.4.5.4).

2.4.5.1 Técnica citoquímica para la detección de la actividad de catalasa peroxisomal.

La actividad de catalasa peroxisomal (peróxido de hidrógeno: peróxido de hidrógeno oxidoreductasa; EC 1.11.1.6), se detectó por el método de Angermüller y Fahimi, Beier y Fahimi^{137,138}, el cual se basa en la formación de un precipitado

electrodenso como resultado de la reacción entre el tetraóxido de osmio y el indicador diaminobenzidina. El procedimiento que se efectuó para esta técnica citoquímica se muestra en la tabla 6 del apéndice B.

2.4.5.2 Técnica citoquímica para la detección de la actividad de fosfatasa ácida lisosomal.

La actividad de fosfatasa ácida lisosomal (hidrolasa de monoéster fosfórico; EC 3.1.3.2), se detectó por el método de Kuhn y Callaway y Hugon J.S. con medio de Gomori^{139,140}, el cual se basa en la formación de un precipitado electrodenso de fosfato de plomo obtenido de la reacción entre el plomo y el producto de la reacción enzimática. Los pasos que se efectuaron para esta técnica citoquímica se muestran en la tabla 7 del apéndice B.

2.4.5.3 Análisis morfométrico con microscopía de luz.

El análisis morfométrico por microscopía de luz, consistió en lo siguiente: cuatro explantes de hígado diferentes para cada enzima marcadora, esto es cuatro para catalasa y cuatro para fosfatasa ácida, de cada una de las condiciones, con/sin peroxisomicina A1 y con/sin inhibidores de la vía autofágica lisosomal, se procesaron hasta su inclusión en resinas epóxicas (ver tablas 6 y 7 del apéndice B); posteriormente, de cada uno de estos bloques que contenían los explantes de hígado, se prepararon en el *ultramicrotomo cortes semifinos de 1 μ m*, los cuales se montaron en una laminilla de vidrio para su observación al microscopio de contraste de fases.

Después, de cada uno de los cortes semifinos, se seleccionaron al azar diez campos diferentes en el microscopio, en donde se realizó el conteo de los peroxisomas, con la ayuda de un analizador de imágenes computarizado, MORPHON. De esta forma, se tuvieron un total de cuarenta campos contados correspondientes a los 4 explantes de hígado originales por cada enzima marcadora.

2.4.5.4 Análisis morfométrico con microscopía electrónica.

El análisis morfométrico por microscopía electrónica consistió en lo siguiente: cuatro explantes de hígado diferentes para cada enzima marcadora, esto es cuatro para catalasa y cuatro para fosfatasa ácida, de cada una de las condiciones, con/sin peroxisomicina A1 y con/sin inhibidores de la vía autofágica lisosomal, se procesaron hasta su inclusión en resinas epóxicas; posteriormente de cada uno de estos bloques que contenían los explantes de hígado, se prepararon en el *ultramicrotomo cortes finos de 100 nm*, los cuales se montaron en una rejilla de cobre para su observación al microscopio electrónico de transmisión.

De cada uno de los cortes finos, se tomaron al azar ocho micrografías. Después, en cada micrografía se determinó la fracción de volumen del organelo en análisis por el método de Weibel¹⁴¹. La fracción de volumen es la relación del volumen ocupado por un organelo con respecto al volumen del citoplasma. Así se obtuvieron un total de treinta y dos micrografías contadas a las que se les determinó fracción de volumen y que corresponden a los cuatro explantes de hígado originales por cada enzima marcadora.

2.4.5.4.1 Determinación de la fracción de volumen del organelo por el método de Weibel.

El método de Weibel para calcular la fracción de volumen se realizó como sigue:

1. Una rejilla cuadrículada se sobrepuso en cada micrografía electrónica.
2. Posteriormente se realizó el conteo de puntos que coinciden con las estructuras en análisis, en este caso fueron el conteo de, peroxisomas, autofagosomas y autolisomas que contienen material de origen peroxisomal.
3. Se determinó la fracción de volumen aplicando la fórmula:

$$Vvi = Pi / Pc$$

Donde Vvi = es la fracción de volumen del organelo en análisis
 Pi = puntos que coinciden del organelo en análisis
 Pc = puntos totales del citoplasma (esto es puntos totales de la plantilla)

2.4.6 Estudios bioquímicos en los explantes de hígado cultivados.

Para los estudios bioquímicos, los explantes congelados (-20 °C, con solución salina estéril de cloruro de sodio al 0.9% (p/v) adicionada con DMSO al 1% (v/v) como crioprotector), se descongelaron a temperatura ambiente, se lavaron cuatro veces, a 4°C, con el amortiguador específico de homogenización para cada enzima en particular. Con el propósito de obtener una cantidad de proteína adecuada para los ensayos, se utilizaron explantes de nueve experimentos y se procesaron en tres ocasiones. Todos los métodos enzimáticos empleados fueron espectrofotométricos, para los cuales se utilizó una cubeta de cuarzo para las determinaciones en el espectro ultravioleta y una cubeta de vidrio para el rango visible, ambas cubetas de 1 cm de trayecto óptico.

2.4.6.1 Ensayo de la actividad de catalasa peroxisomal.

El ensayo bioquímico de la actividad de catalasa peroxisomal (peróxido de hidrógeno: peróxido de hidrógeno oxidoreductasa; EC 1.11.1.6), se efectuó por el método de Aebi H.B.¹⁴², el cual se basa en la medición de la disminución del sustrato peróxido de hidrógeno a una longitud de onda de 240 nm. Una unidad de catalasa se define¹⁴² como la cantidad necesaria de enzima para la transformación de 1 μmol de peróxido de hidrógeno, por minuto, a 25°C. El cálculo matemático para obtener la actividad de catalasa fue el siguiente:

$$U / ml = \frac{\Delta \text{Abs. (240 nm)}}{(0.036 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}) (1 \text{ cm})} \times \frac{1 \text{ min}}{6 \text{ min}} \times \frac{1.00 \text{ ml}}{0.04 \text{ ml}} \times \text{dilución}^*$$

* Δ Abs.= Cambio de absorbancia
Dilución de la fuente de enzima (homogenizado).

El procedimiento que se llevó a cabo para el ensayo enzimático de catalasa se muestra en la tabla 8 del apéndice B.

2.4.6.2 Ensayo de la actividad de tiolasa peroxisomal.

La determinación de la actividad de 3-cetoacil-CoA tiolasa peroxisomal (acetil-CoA: acetil-CoA acetiltransferasa; EC 2.3.1.9) se realizó por el método de Moreno de la Garza M. y cols. derivado de Middleton B.¹⁴³. Este método se basa en la medición de la disminución del sustrato, (complejo de 3-cetoacildecanoil-CoA con Mg) a una longitud de onda de 303 nm. El *fundamento de las reacciones de este método compuesto* se muestra en la figura 6. El cálculo matemático para obtener la actividad de tiolasa peroxisomal fue el siguiente:

$$U / ml = \frac{\Delta \text{ Abs. (303 nm)}}{(13.4 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}) (1 \text{ cm}) (\text{min})} \times \frac{1 \text{ min}}{10 \text{ min}} \times \frac{1.00 \text{ ml}}{0.035 \text{ ml}} \times \text{dilución}^*$$

* Δ Abs. = Cambio de absorbancia
Dilución de la fuente de enzima (homogenizado).

El procedimiento que se efectuó para el ensayo enzimático de la tiolasa peroxisomal se muestra en la tabla 9 del apéndice B.

2.4.6.3 Ensayo de la actividad de fosfatasa ácida lisosomal (FAC).

La actividad de fosfatasa ácida (hidrolasa de monoéster fosfórico; EC 3.1.3.2) se determinó por el método de Goldstone y cols.¹⁴⁴, basado en la medición del fosfato liberado por la técnica de Fiske-SubbaRow a una longitud de onda de 660 nm¹⁴⁵. En esta reacción el β -glicerofosfato de sodio es el sustrato. Una unidad de FAC lisosomal se define¹⁴⁴ como la cantidad necesaria de enzima para la formación de 1 μ mol de fosfato, por minuto, a 37°C. El cálculo matemático para obtener su actividad fue el siguiente:

$$U / ml = \frac{\text{Abs. Problema (660 nm)}}{\text{Abs. Estándar}} \times \text{Conc. Estándar} \times \frac{1 \text{ min}}{15 \text{ min}} \times \frac{5.0 \text{ ml}}{0.1 \text{ ml}} \times \text{dilución}^*$$

* Abs. = Absorbancia Conc. = Concentración
Dilución de la fuente de enzima (homogenizado).

En el apéndice B, tabla 10 se muestra el procedimiento que se efectuó para el

ensayo de la actividad de fosfatasa ácida. En la tabla 11 se describe la técnica de Fiske-SubbaRow para determinar fosfato inorgánico y la curva patrón promedio respectiva se encuentra en la figura 35 del mismo apéndice.

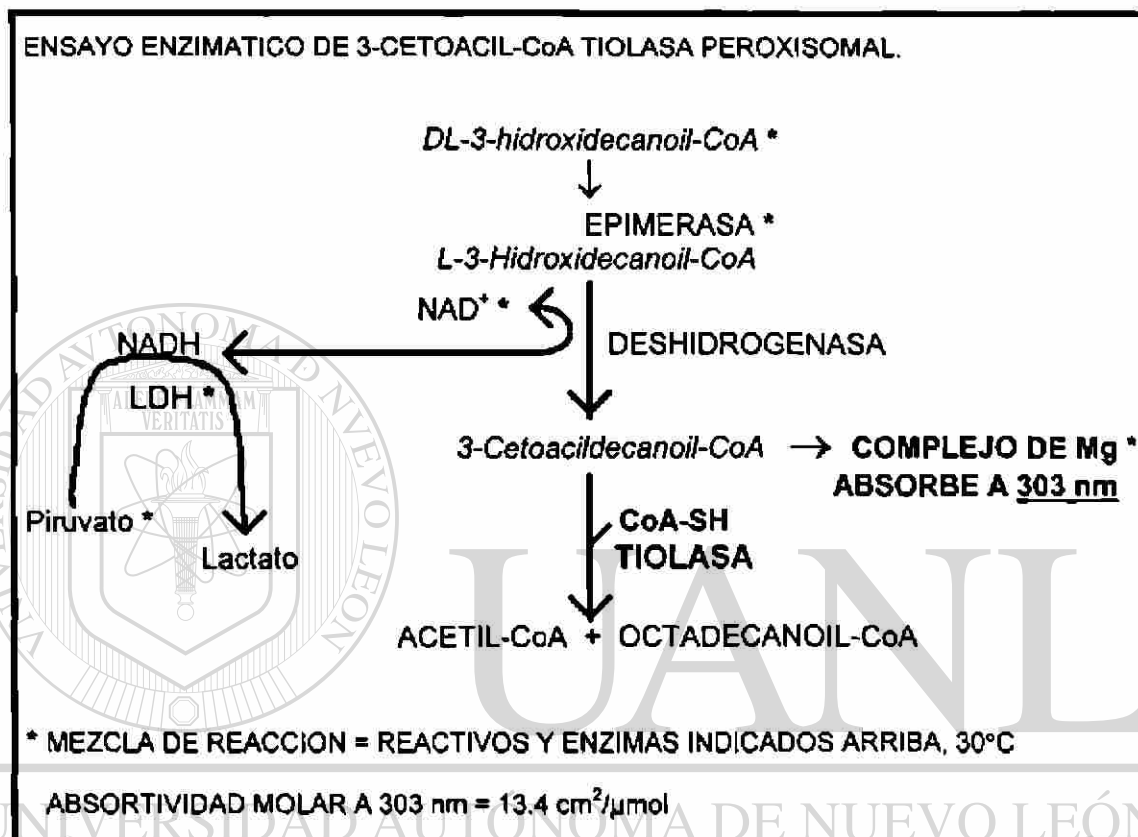


Figura 6. Fundamento de las reacciones del método de Moreno de la Garza M. y cols. derivado de Middleton B.¹⁴⁵ para la determinación de la actividad de tiolasa peroxisomal.

2.4.6.4 Ensayo de la actividad de catepsina D lisosomal (Catep D).

Se analizó la actividad de catepsina D (hidrolasa de α -aminoacilpeptido; EC 3.4.23.5) por el método descrito por Anson¹⁴⁶ modificado por Yamamoto y cols.¹⁴⁷. En este método la hemoglobina fue utilizada como sustrato, y se determinó la liberación de L-tirosina en medio ácido, como producto de la reacción, a una longitud de onda de 280 nm. Una unidad de Catep D lisosomal se define^{146,147} como la cantidad necesaria de enzima para la hidrólisis de 1 μ mol de hemoglobina, por 1 minuto, a 37°C. El cálculo

matemático para la obtención de la actividad de catep D fue el siguiente:

$$U / ml = \frac{\text{Abs. Problema (280 nm)}}{\text{Abs. Estándar}} \times \text{Conc. Estándar} \times \frac{1 \text{ min}}{40 \text{ min}} \times \frac{4.0 \text{ ml}}{0.1 \text{ ml}} \times \text{dilución}^*$$

* Abs. = Absorbancia Conc. = Concentración
Dilución de la fuente de enzima (homogenizado).

El procedimiento que se efectuó para este ensayo enzimático se muestra en la tabla 12 del apéndice B y la curva patrón promedio de L-tirosina se encuentra en la figura 36 del mismo apéndice.

2.4.6.5 Determinación de la concentración de proteína.

La determinación de la concentración de proteína fue llevada a cabo por el método de Bradford¹⁴⁸ (ensayo estándar de Bio-RAD), para lo cual se prepararon curvas patrón con estándares de albúmina sérica bovina (BSA). Este método se basa en la medición del complejo coloreado que se obtiene al reaccionar el azul brillante de Coomassie G-250 con los residuos de aminoácidos básicos (especialmente arginina) y aromáticos de las proteínas. El cálculo matemático, el cual se derivó de la ecuación de la recta (ver apéndice C), para obtener la concentración de proteína de una muestra fue el siguiente:

$$\text{Conc. Problema} = \frac{\text{Abs. Problema (595 nm)}}{\text{Abs. Estándar}} \times \text{Conc. Estándar} \times \text{dilución}^*$$

* Abs. = Absorbancia Conc. = Concentración
Dilución de la muestra.

El procedimiento que se efectuó para el método de Bradford se muestra en la tabla 13 del apéndice B y la curva patrón promedio de proteína se encuentra en la figura 37 del mismo apéndice.

2.5 ANALISIS ESTADISTICO

En los experimentos del presente trabajo, cada una de las determinaciones analíticas bioquímicas (ensayos de la actividad de enzimas y la determinación de la concentración de proteína) se efectuaron por quintuplicado. Los análisis morfométricos fueron descritos anteriormente en la sección correspondiente. **En ambos casos, análisis morfológicos como bioquímicos, para cada tiempo y tratamiento se obtuvo un valor promedio con su desviación estándar, y estos fueron sometidos a una contrastación estadística con la prueba t-student pareada, comparándose siempre el grupo experimental contra su control. La significancia estadística se representa en todas las gráficas con una estrella o asterisco.**



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPITULO 3

RESULTADOS

3.1 ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES OPTIMAS DEL CULTIVO DE ORGANO.

Se estandarizaron tanto las condiciones del cultivo de órgano como las técnicas morfológicas y bioquímicas, con el hígado de un primer mono. Para lo anterior, se realizaron por lo menos cuatro a seis repeticiones de cada técnica, obteniéndose generalmente un coeficiente de variación (c.v.) de menos del 5% para los ensayos cuantitativos (análisis morfométrico, ensayos de la actividad de enzimas y determinación de la concentración de proteínas). Las curvas patrón se obtuvieron con un coeficiente de correlación (r) muy cercano a 1 (0.9989 a 0.9999).

La tabla II muestra un resumen de las condiciones óptimas del sistema de cultivo de órgano para el hígado de *Macaca fascicularis*.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TABLA II.

CULTIVO DE ORGANO PARA HIGADO DE MACACA FASCICULARIS.

Material biológico	Hígado de <i>Macaca fascicularis</i> y peroxisomicina A1 (PA1).
Perfusión del hígado	"In situ" vía vena porta (Hank's con heparina, fructosa y suero)
Explantos del hígado	1 mm grosor, 48 a 50 por plato
Medio nutriente	L15 suplementado con insulina y piruvato
Sistema de cultivo	Soporte de esponja de colágena (gelfoam) en plato de cultivo

Como ya se señaló previo a los experimentos diseñados para probar la hipótesis de trabajo y de acuerdo a los objetivos, se efectuó un estudio piloto para poder definir las concentraciones y los tiempos de incubación con PA1 en nuestro sistema de cultivo de órgano. Los resultados del estudio piloto se describen en el apéndice A.

En el estudio piloto, de acuerdo al análisis morfométrico con microscopía de luz (ML), a las 2 horas de incubación con 10 $\mu\text{g/ml}$ de PA1, se observó el mayor efecto de PA1 sobre los peroxisomas hepáticos tanto aislados como agrupados, razón por la cual, se decidió *emplear únicamente* esta dosis de 10 $\mu\text{g/ml}$ de PA1 y cuatro tiempos de incubación y recolecta: 30, 60, 90 y 120 minutos, para los siguientes experimentos diseñados para probar la hipótesis de trabajo y de acuerdo a los objetivos ya planteados en la introducción. El cultivo de órgano para todos los experimentos fue preparado según las condiciones que se muestran en la tabla I del capítulo de materiales y métodos.

3.2 INTEGRIDAD MORFOLOGICA Y FUNCIONAL DEL HIGADO.

Como ya se indicó, previo al cultivo de órgano, en cada experimento se analizó la integridad morfológica y funcional del *hígado que se utilizó para preparar los cultivos. Los resultados del análisis morfológico con ML* (HE, grasa y glucógeno) y *del bioquímico* (actividad de TAT) *fueron similares a los del estudio piloto* (véase apéndice A).

3.3 EVALUACION DE LA VIABILIDAD DE LOS EXPLANTES DE HIGADO.

3.3.1 Análisis morfológico con microscopía de luz.

Los hallazgos del *análisis morfológico con microscopía de luz*, para evaluar la viabilidad de los explantes de hígado en el cultivo de órgano, mostraron al hígado con características normales, tanto para los cultivos control como para los tratados con 10 µg/ml de PA1 a los cuatro tiempos de incubación descritos.

3.3.2 Análisis bioquímico.

3.3.2.1 Inducción de la actividad de tirosina aminotransferasa (TAT).

La actividad de TAT fue inducida por la acción de glucagon en los explantes de hígado, desde los 30 minutos hasta los 120 minutos de cultivo. Además, en estos tiempos de incubación, no se observó ningún efecto de la PA1 sobre la actividad de TAT (figura 7). Cuando las muestras fueron incubadas durante 120 minutos con los inhibidores de la vía autofágica lisosomal y con el inhibidor combinado con PA1, no se detectó ningún cambio significativo en la actividad de TAT (figura 8).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

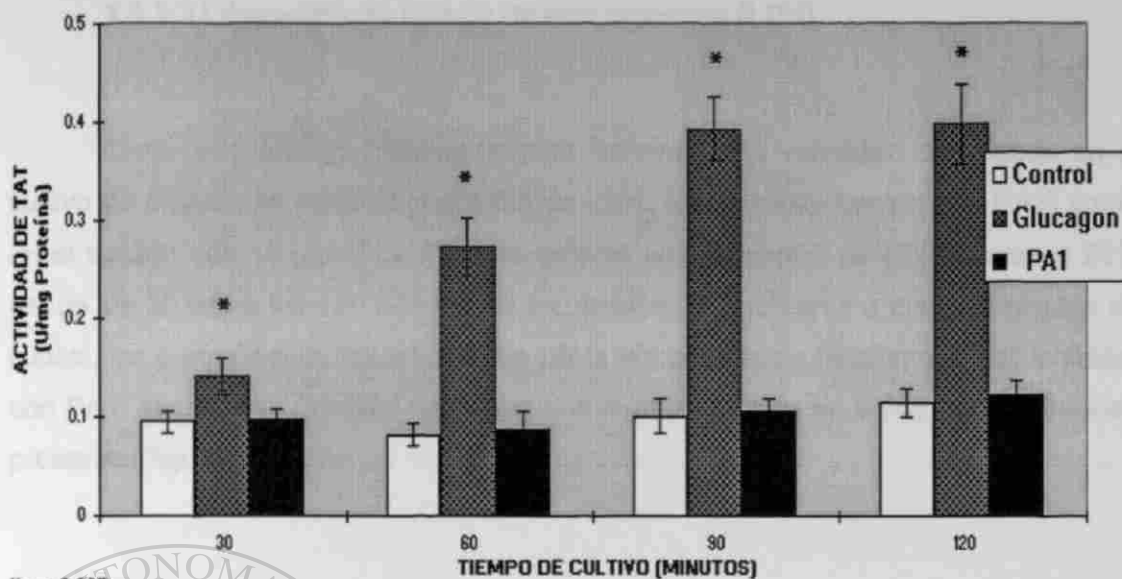
* $p < 0.005$

Figura 7. Efecto de glucagon ($0.1 \mu\text{M}$) y de PA1 ($10 \mu\text{g/ml}$) sobre la actividad específica de tirosina aminotransferasa (TAT) a diferentes tiempos de cultivo. La actividad de TAT se determinó por quintuplicado, en el homogenizado proveniente de los explantes de hígado de 2 platos de cultivo, a cada uno de los tiempos de incubación indicados. Los valores de cada barra representan la media de 80 platos de cultivo \pm desviación estándar. PA1 = peroxisomicina A1.

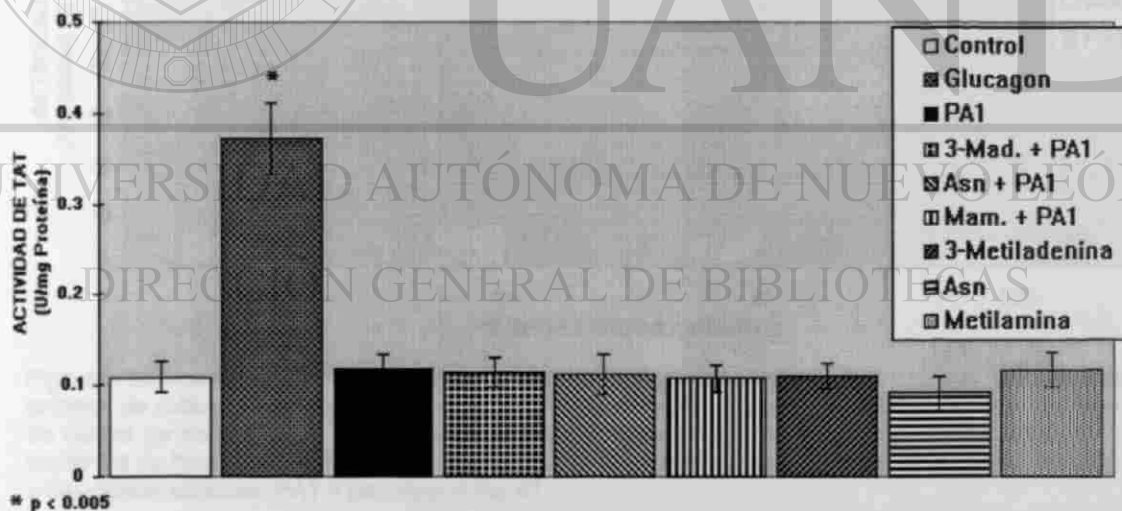
* $p < 0.005$

Figura 8. Efecto de glucagon ($0.1 \mu\text{M}$), de PA1 ($10 \mu\text{g/ml}$), de tres inhibidores de la vía autofágica lisosomal y de cada uno de los inhibidores combinado con PA1 sobre la actividad específica de tirosina aminotransferasa (TAT), a 120 minutos de cultivo. La actividad de TAT se determinó por quintuplicado, en el homogenizado proveniente de los explantes de hígado de 2 platos de cultivo. Los valores de cada barra representan la media del total de platos de cultivo \pm desviación estándar: para los controles son de 40 platos de cultivo y para el resto de las condiciones experimentales son de 80. La concentración de cada inhibidor, sólo o combinado con PA1, fue de 5 mM para 3-metiladenina y de 10 mM para Asn y metilamina. PA1 = peroxisomicina A1, 3-Mad. = 3-metiladenina, Asn = DL-asparagina y Mam. = metilamina.

3.3.2.2 Liberación de lactato deshidrogenasa (LDH).

Como otro ensayo bioquímico para determinar la viabilidad del hígado en el cultivo de órgano, se midió la liberación de LDH. En el cultivo control (sin PA1) como en el tratado con 10 $\mu\text{g/ml}$ de PA1, se detectó una liberación de LDH menor al 20% desde los 30 hasta los 120 minutos de incubación. Al analizarse a los 120 minutos de cultivo, en presencia de los inhibidores de la vía autofágica lisosomal y del inhibidor con PA1, se observó también una liberación menor del 20% en todas las condiciones probadas (figuras 9 y 10).

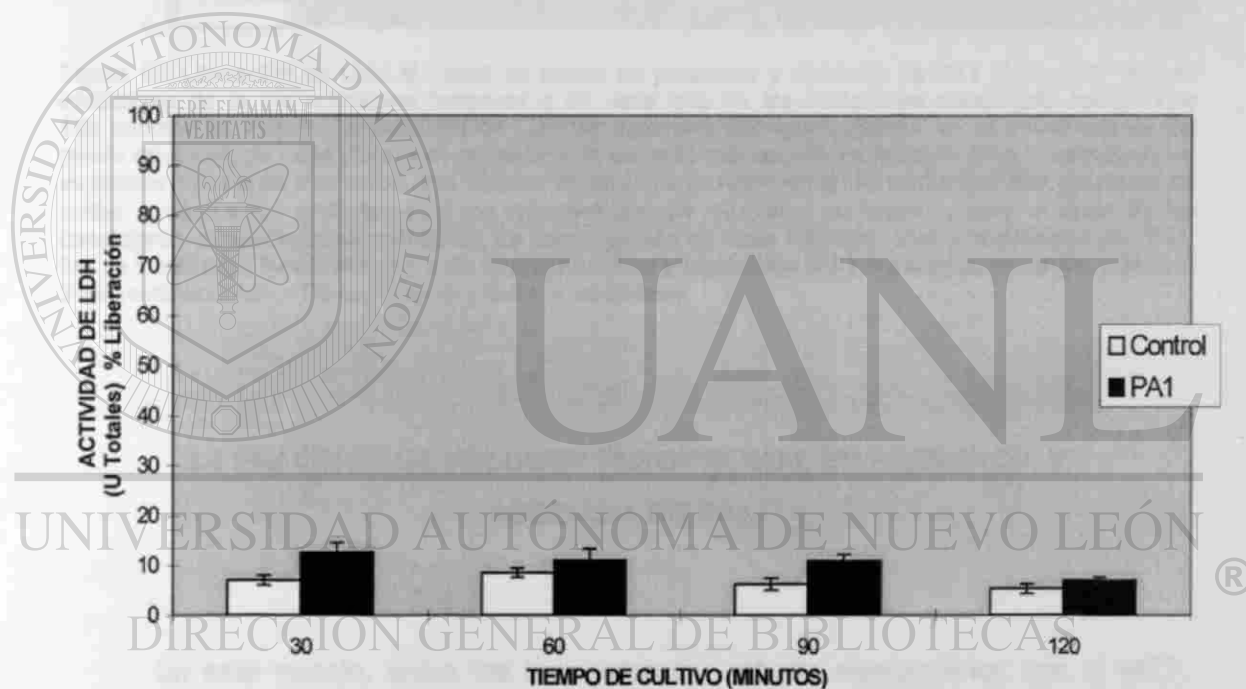


Figura 9. Liberación de LDH al medio de cultivo en presencia y ausencia de PA1 (10 $\mu\text{g/ml}$) a diferentes tiempos de cultivo. La actividad de LDH se determinó por quintuplicado, en el sobrenadante del medio de cultivo de cada plato, y el porcentaje de liberación se calculó en relación a las U totales de los explantes de hígado incubados. Los valores de cada barra representan la media de 80 platos de cultivo \pm desviación estándar. PA1 = peroxisomicina A1.

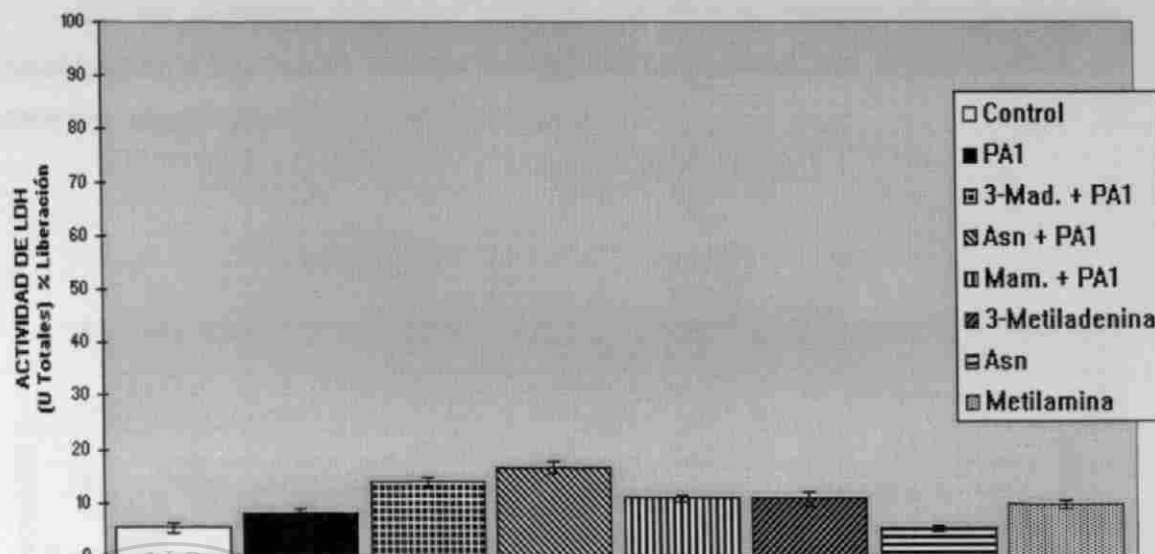


Figura 10. Liberación de LDH al medio de cultivo en presencia y ausencia de PA1 (10 $\mu\text{g/ml}$), de tres inhibidores de la vía autofágica lisosomal y de cada uno de los inhibidores combinado con PA1, a 120 minutos de cultivo. La actividad de LDH se determinó por quintuplicado, en el sobrenadante del medio de cultivo de cada plato, y el porcentaje de liberación se calculó en relación a las U totales de los explantes de hígado incubados. Los valores de cada barra representan la media del total de platos de cultivo \pm desviación estándar: para los controles son de 40 platos de cultivo y para el resto de las condiciones experimentales son de 80. La concentración de cada inhibidor, sólo o combinado con PA1, fue de 5 mM para 3-metiladenina y de 10 mM para Asn y metilamina. PA1 = peroxisomicina A1, 3-Mad. = 3-metiladenina, Asn = DL-asparagina y Mam. = metilamina.

3.4 FRACCIÓN DE VOLUMEN PEROXISOMAL EN PRESENCIA Y

AUSENCIA DE PA1.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

En este trabajo, todos los resultados del estudio morfométrico con el MET, para calcular ya sea la fracción de volumen peroxisomal o lisosomal, provienen del análisis realizado sobre micrografías electrónicas tomadas a una misma amplificación, esto es a 4 400 X. Sin embargo, previo al análisis cuantitativo, se realizó una valoración cualitativa de las distintas condiciones experimentales, para conocer la ultraestructura general del hepatocito con sus distintos organelos, de los peroxisomas y de los diversos cuerpos autofágicos, estos dos últimos motivo del estudio morfométrico. Para este análisis morfológico cualitativo, se tomaron micrografías electrónicas a otras amplificaciones.

En los explantes hepáticos tratados con PA1 se detectó una disminución importante de la fracción de volumen peroxisomal, en relación a su control sin PA1, en todos los tiempos de cultivo analizados (figura 11).

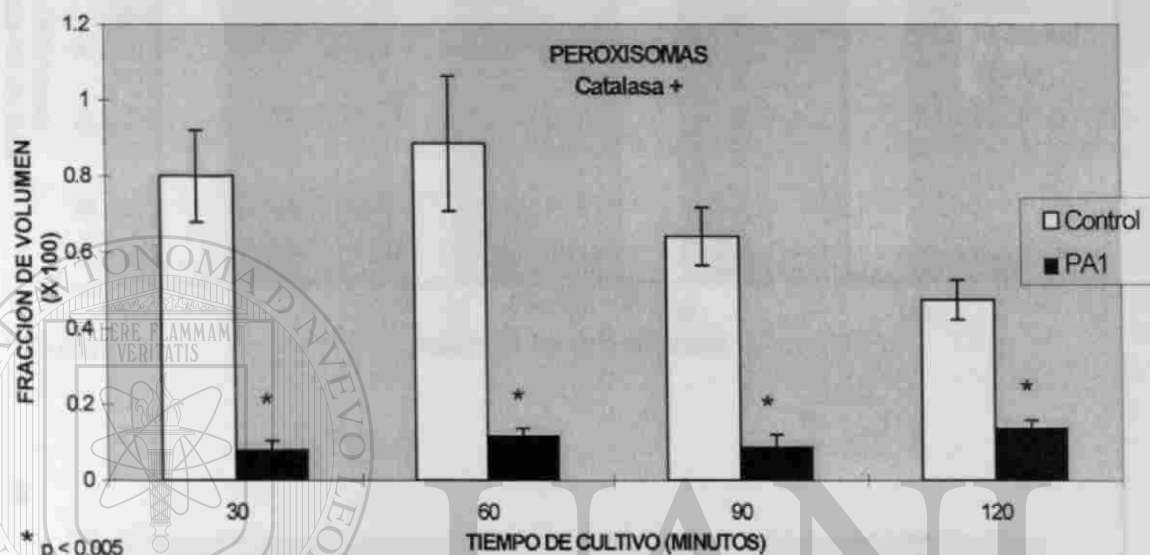


Figura 11. Efecto de PA1 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a diferentes tiempos de cultivo sobre la fracción de volumen peroxisomal. Los valores de cada barra representan la media \pm desviación estándar de 64 micrografías electrónicas, correspondientes a 80 platos de cultivo. PA1 = peroxisomicina A1.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

3.5 ACTIVIDAD ESPECIFICA DE DOS ENZIMAS PEROXISOMALES EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE PA1

En los explantes hepáticos tratados con PA1, se detectó una disminución de la actividad enzimática de catalasa y de 3-oxoacil-CoA tiolasa, en relación a la muestra control sin PA1, a todos los tiempos de cultivo analizados (figura 12).

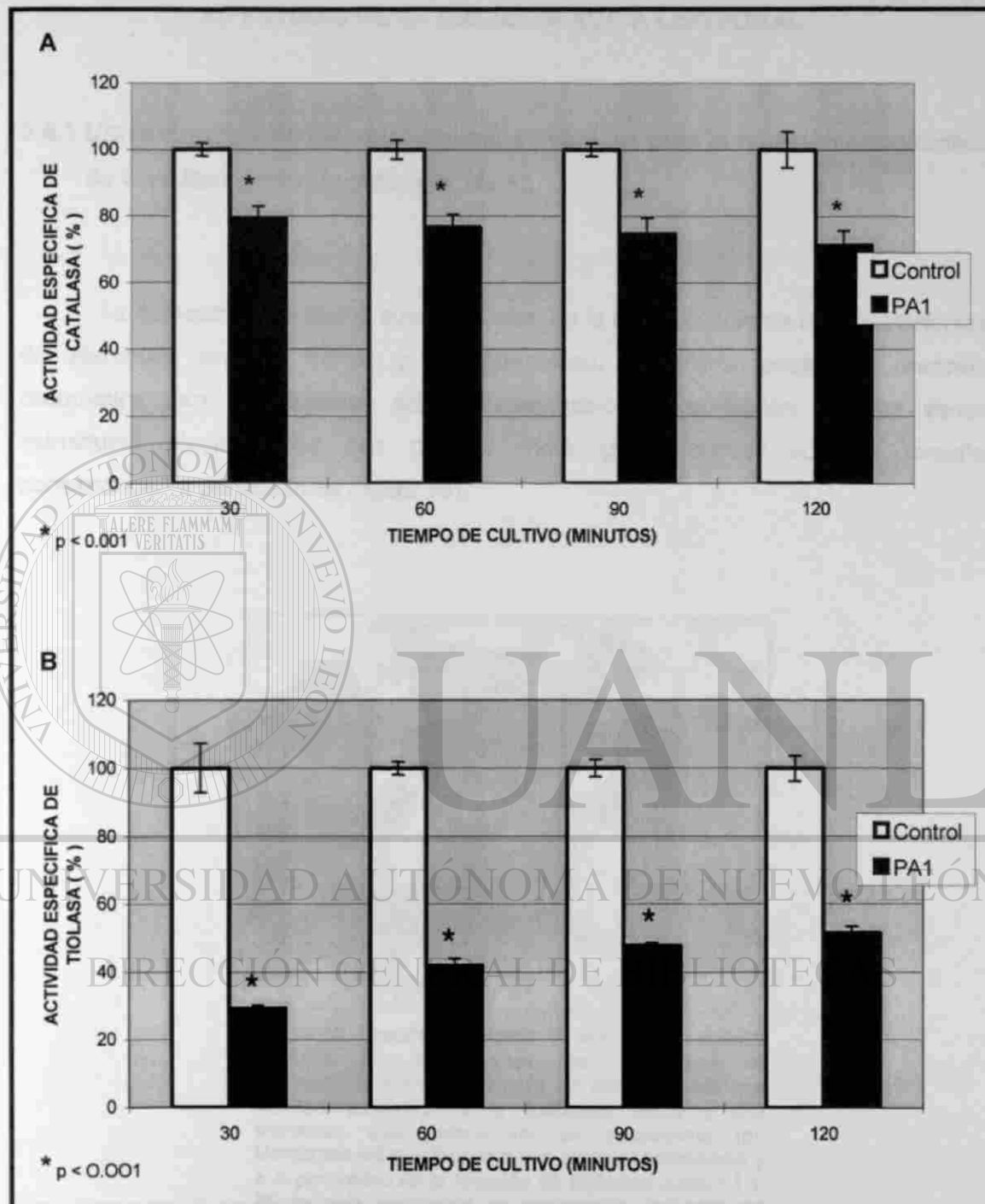


Figura 12. Efecto de PA1 (10 µg/ml) a diferentes tiempos de cultivo sobre la actividad específica (U/mg proteína, %) de dos enzimas peroxisomales. A. Catalasa, y B. 3-oxoacil-CoA tiolasa. La actividad de las enzimas se determinó por quintuplicado, en el homogenizado proveniente de los explantes de hígado de 2 platos de cultivo, a cada uno de los tiempos de incubación indicados. Los valores de cada barra representan la media de 80 platos de cultivo ± desviación estándar. PA1 = peroxisomicina A1.

3.6 ESTUDIO DE LA VIA AUTOFAGICA LISOSOMAL.

3.6.1 Ultraestructura de los autolisosomas positivos para la reacción citoquímica de fosfatasa ácida (fosfatasa ácida +).

La ultraestructura de los autolisosomas, es la correspondiente a la de *vesículas* de diferentes tamaños, formas y electrodensidad, que dieron positiva la reacción citoquímica para la fosfatasa ácida. Estas vesículas, contenían algunas veces estructuras electrodensas que por su morfología, electrodensidad y tamaño corresponden a peroxisomas (figura 13).

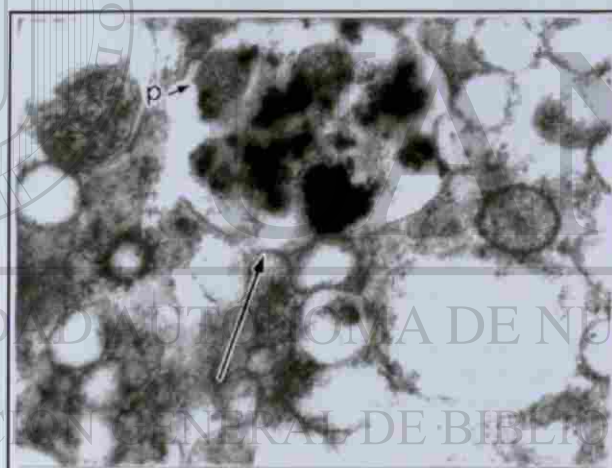
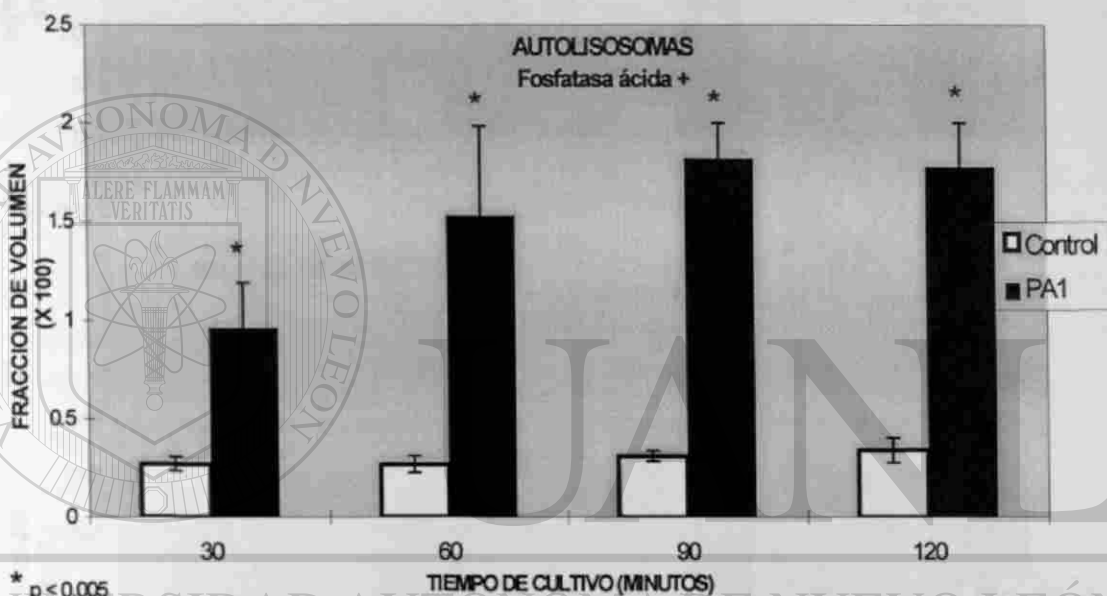


Figura 13. Explante de hígado de *Macaca fascicularis*, incubado por 60 minutos, con 10 $\mu\text{g/ml}$ de peroxisomicina A1. Se observa un autolisosoma que muestra positividad a la fosfatasa ácida y una estructura que parece ser un peroxisoma (p). Membrana del autolisosoma que rodea al peroxisoma y a la positividad de la reacción de fosfatasa ácida (\uparrow). Microscopía electrónica de transmisión. Inclusión en resinas epóxicas. Reacción citoquímica de fosfatasa ácida. 4 400 X.

3.6.2. Fracción de volumen de autolisosomas en presencia y ausencia de PA1.

La fracción de volumen de autolisosomas fosfatasa ácida +, en los explantes hepáticos tratados con PA1 (10 $\mu\text{g/ml}$) aumentó significativamente en relación a la muestra control sin PA1, en todos los tiempos de cultivo experimentales analizados (figura 14).



* $p < 0.005$

Figura 14. Efecto de PA1 (10 $\mu\text{g/ml}$) a diferentes tiempos de cultivo sobre la fracción de volumen lisosomal. Los valores de cada barra representan la media \pm desviación estándar de 64 micrografías electrónicas, correspondientes a 80 platos de cultivo. PA1 = peroxisomicina A1.

3.6.3 Actividad específica de dos enzimas lisosomales en presencia y ausencia de PA1.

Se analizó el efecto de la PA1 sobre la vía autofágica lisosomal a nivel bioquímico, por lo que se determinó la actividad de dos enzimas lisosomales: catepsina D y fosfatasa ácida. Ambas enzimas mostraron aumento de su actividad, en los explantes hepáticos incubados con PA1, con respecto a la muestra control sin PA1, en todos los tiempos de cultivo analizados (figura 15).

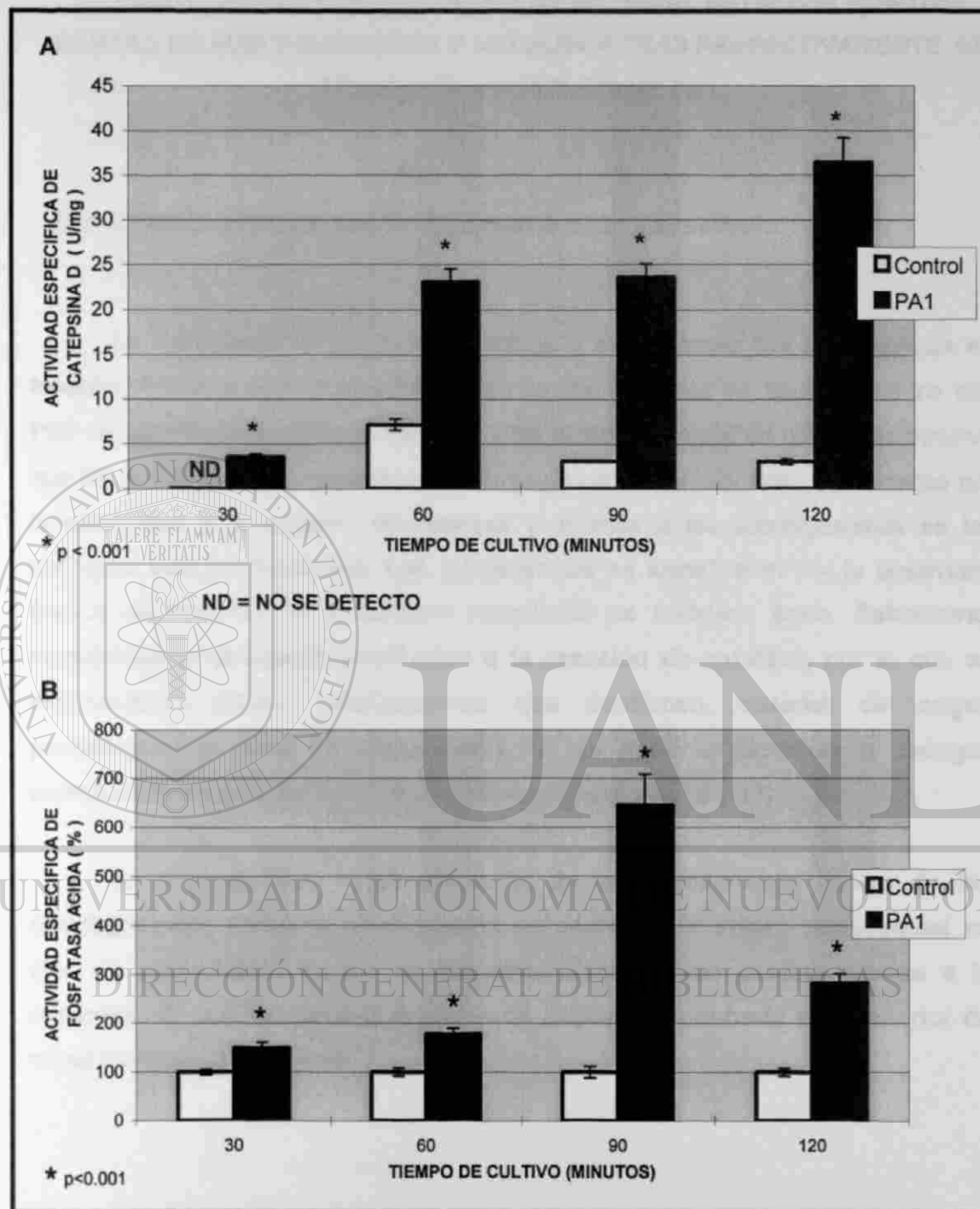


Figura 15. Efecto de PA1 (10 μ g/ml) a diferentes tiempos de cultivo sobre la actividad específica de dos enzimas lisosomales. A. Cathepsina D (U/mg Proteína), y B. fosfatasa ácida (U/mg Proteína, %). La actividad de las enzimas se determinó por quintuplicado, en el homogenizado proveniente de los explantes de hígado de 2 platos de cultivo, a cada uno de los tiempos de incubación indicados. Los valores de cada barra representan la media de 80 platos de cultivo \pm desviación estándar. PA1 = peroxisomicina A1.

3.7 CONTENIDO DE PEROXISOMAS Y DE MATERIAL CATALASA POSITIVO, DENTRO DE AUTOFAGOSOMAS Y AUTOLISOSOMAS RESPECTIVAMENTE, EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE PA1.

3.7.1 Ultraestructura de los autofagosomas y autolisosomas.

La morfología de los autofagosomas y autolisosomas fue muy variada en tamaño, forma y electrodensidad, tanto en los explantes de hígado tratados con PA1 (10 µg/ml) como en los no tratados, a los distintos tiempos de cultivo. Se observó que los autofagosomas pueden contener uno o varios peroxisomas, identificados por la positividad a la reacción de catalasa y además a los autofagosomas se les distinguió bien su membrana. Los autolisosomas se identificaron por la positividad (marca electrodensa) a la reacción citoquímica de fosfatasa ácida. Estructuras semejantes presentaron positividad a la reacción de catalasa, por lo que se reconocieron como autolisosomas que contienen material de origen peroxisomal en vías de degradación. No se pudieron identificar o distinguir peroxisomas integros dentro de los autolisosomas (figuras 16 y 17).

En síntesis, tanto la identificación de los peroxisomas dentro de los autofagosomas como la identificación del material de origen peroxisomal en vías de degradación dentro de los autolisosomas, fue posible gracias a la presencia de positividad a la reacción de catalasa encontrada en el interior de estos cuerpos autofágicos.

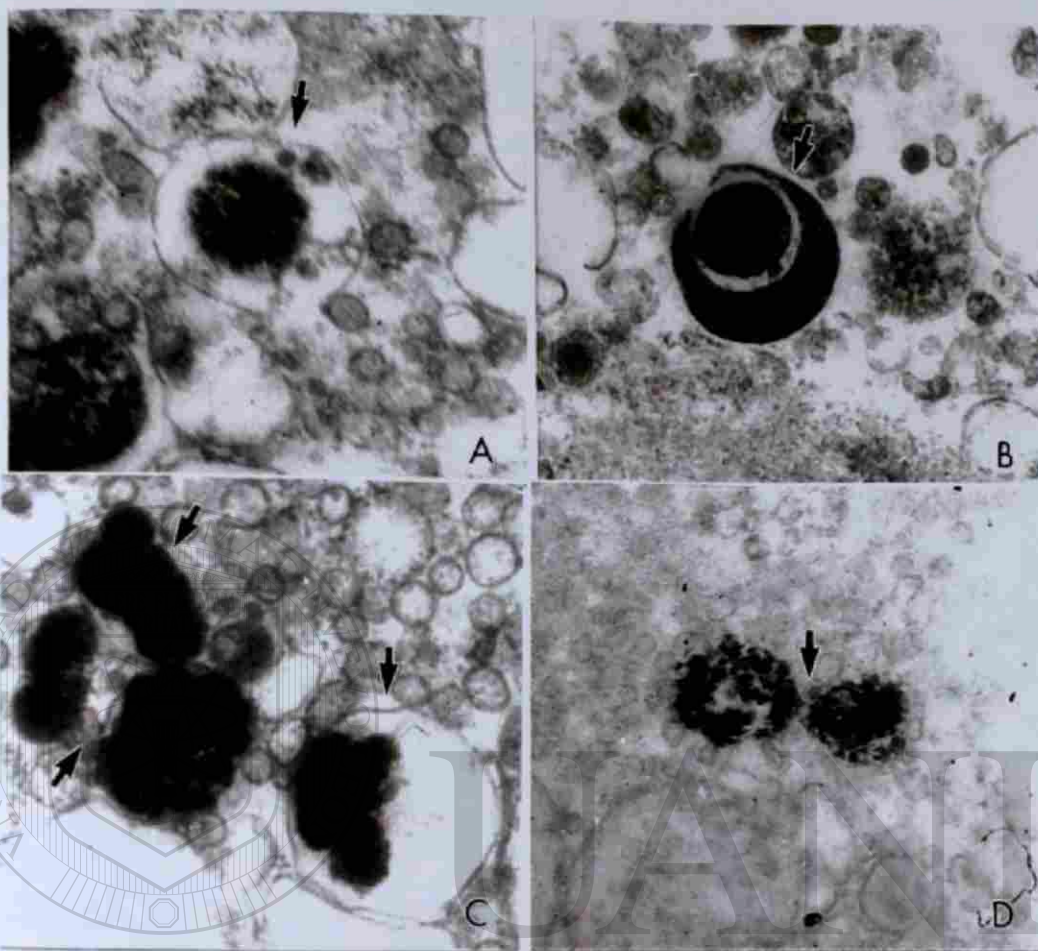


Figura 16. Explantes de hígado de *Macaca fascicularis*, incubados con 10 $\mu\text{g/ml}$ de peroxisomicina A1. A. 30 minutos, B. 60 minutos, C. 90 minutos y D. 120 minutos. Se observan varios autofagosomas catalasa positivo (A-C) y dos autolisomas catalasa positivo (D). Microscopía electrónica de transmisión. Inclusión en resinas epóxicas. Reacción citoquímica de catalasa. 4 400 X.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

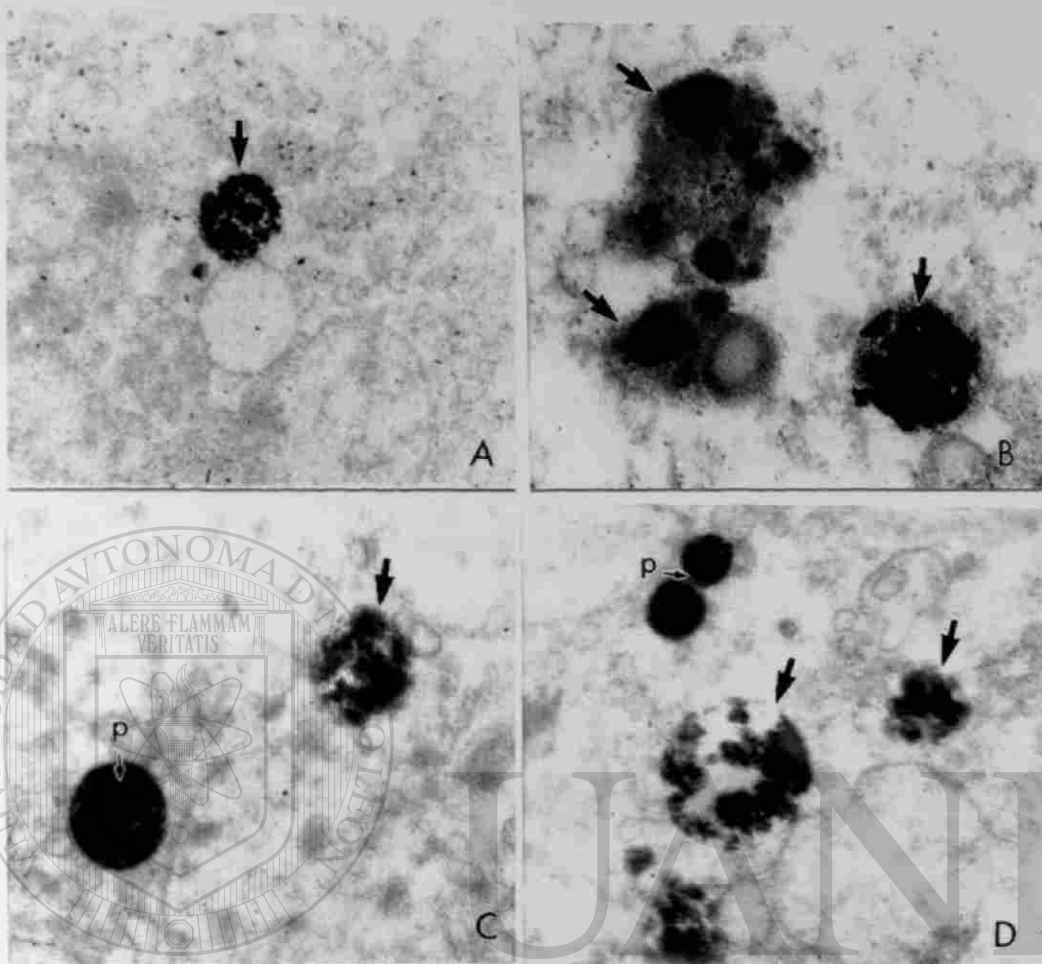


Figura 17. Explantes de hígado de *Macaca fascicularis*. A. y B. Autolisosomas fosfatasa ácida positivo. C. y D. autolisosomas catalasa positivo. Compárese en C. y D., la imagen de los peroxisomas (p) con la de los autolisosomas, ambos catalasa positivo. Microscopía electrónica de transmisión. Inclusión en resinas epóxicas. A. y B. Reacción citoquímica de fosfatasa ácida y C. y D. reacción citoquímica de catalasa. 4 400 X.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.7.2 Fracción de volumen de los autofagosomas y autolisosomas.

El estudio morfométrico con MET, indicó que tanto los autofagosomas como los autolisosomas, ambos catalasa +, observados en los explantes hepáticos de *Macaca fascicularis* tratados con PA1 (10 µg/ml), presentaron un *aumento significativo de su fracción de volumen*, en relación a las muestras control sin PA1, en todos los tiempos de cultivo analizados (figura 18).

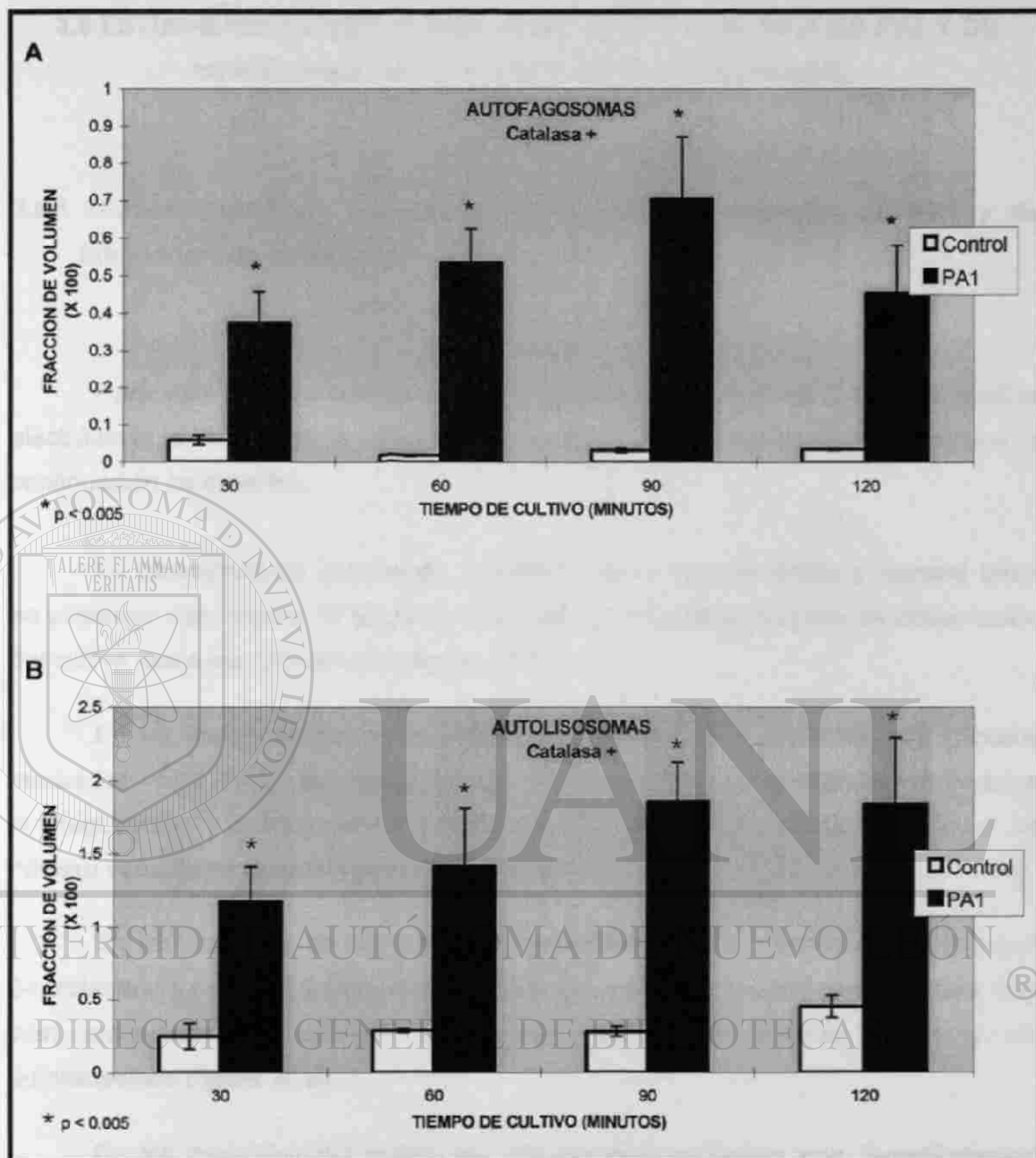


Figura 18. Efecto de PA1 (10 $\mu\text{g/ml}$) a diferentes tiempos de cultivo sobre la fracción de volumen de: A. autofagosomas catalasa positivo y B. autolisosomas catalasa positivo. Los valores de cada barra representan la media \pm desviación estándar de 64 micrografías electrónicas, correspondientes a 80 platos de cultivo. PA1 = peroxisomicina A1.

3.8 ESTUDIO MORFOMETRICO EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE PA1 Y DE INHIBIDORES DE LA VIA AUTOFAGICA LISOSOMAL.

3.8.1 Ultraestructura del hepatocito en presencia y ausencia de PA1 y de Inhibidores de la vía autofágica lisosomal.

Para este estudio morfométrico se analizaron un total de 544 micrografías electrónicas a 4 400 X, y además se efectuó una valoración cualitativa que a continuación se describe.

La ultraestructura general del hepatocito es la característica y normal tanto en el tiempo cero (figura 19 A) como en el control, durante el período de observación del cultivo hasta los 120 minutos (figura 19 B).

En las imágenes de los explantes provenientes de cultivos de 120 minutos incubados con PA1, se observan en el hepatocito la presencia de varios autofagosomas y autolisosomas catalasa +, con una diversidad de tamaño, y un número variable de peroxisomas (figura 20 A).

En las muestras de los explantes del cultivo de 120 minutos incubados con 3-metiladenina (3-Mad.) y PA1, el citoplasma del hepatocito mostró peroxisomas muy bien preservados, y además un número variable de autofagosomas y de autolisosomas (figura 20 B).

En los explantes del cultivo de 120 minutos incubados con 3-metiladenina (3-Mad.) sin PA1, fue posible identificar en el citoplasma del hepatocito, la presencia de abundantes peroxisomas alrededor del núcleo, en contraste con pocos y pequeños autofagosomas catalasa + (figura 21 A).

En las muestras de los explantes del cultivo de 120 minutos incubados con DL-asparagina, se observaron varios autofagosomas grandes, y de entre éstos, se identificaron algunos con un espacio entre la membrana de la vesícula y los peroxisomas que están dentro (figura 21 B). Por otro lado, también se encontraron un

gran número de autolisomas catalasa +, significando esto último que es material de origen peroxisomal.

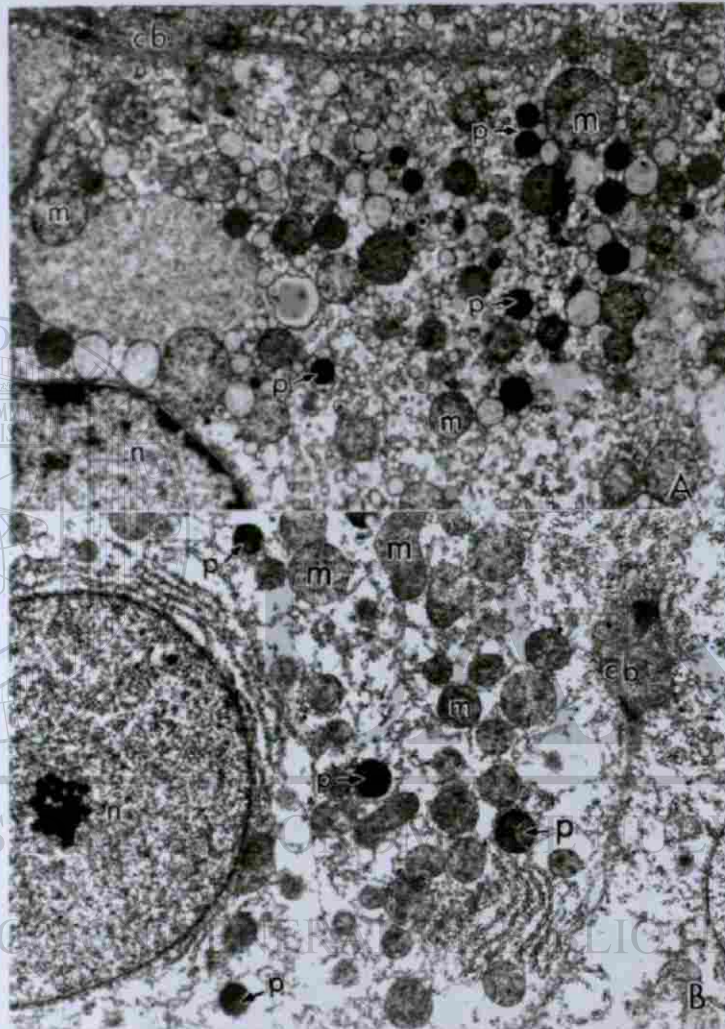


Figura 19. Explantes de hígado de *Macaca fascicularis*. A. Tiempo cero, B. incubado 120 minutos en un cultivo de órgano sin peroxisomicina A1. Se observan el núcleo (n), mitocondria (m), canaliculo biliar (cb) y peroxisoma (p) **bien conservados**. Estos últimos organelos, con una marcada electrodensidad, debido a la positividad de la reacción de catalasa. Microscopía electrónica de transmisión. Inclusión en resinas epóxicas. Reacción citoquímica de catalasa. 4 400 X.

Como parte del análisis cualitativo, en la ultraestructura de los explantes incubados tanto con PA1 como para los incubados con los inhibidores de la vía autofágica lisosomal, se observó un deterioro de la ultraestructura del hepatocito cuando se comparó con sus respectivos controles. A pesar de ello, la viabilidad del hígado evaluada bioquímicamente a este tiempo de incubación con cada uno de los inhibidores y con PA1, fue aceptable (figura 10).

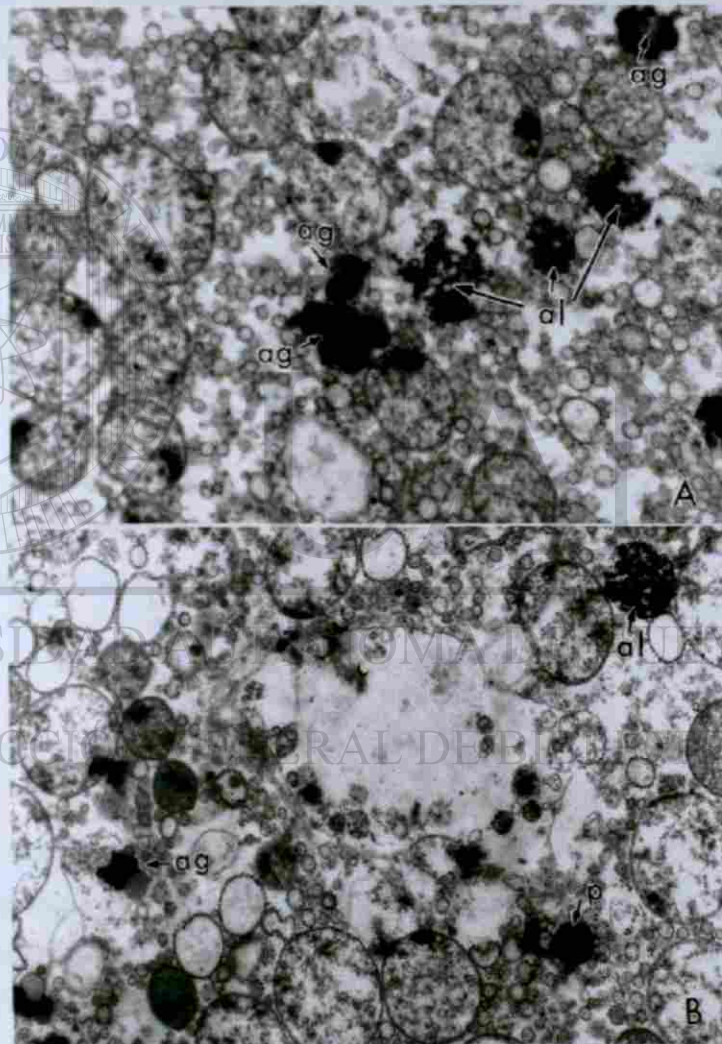


Figura 20. Explantes de hígado de *Macaca fascicularis*, incubados 120 minutos. A. 10 µg/ml de peroxisomicina A1, B. 10 µg/ml de peroxisomicina A1 y 5 mM de 3-metiladenina. Se observan organelos con positividad a la reacción de catalasa: peroxisomas (p), autofagosomas (ag) y autolisomas (al). Microscopía electrónica de transmisión. Inclusión en resinas epóxicas. Reacción citoquímica de catalasa. 4 400 X.

En el caso de los explantes de hígado incubados con metilamina, por ejemplo, además de este deterioro general de la ultraestructura del hepatocito, se observaron autolisosomas fosfatasa ácida + de muy variados diámetros, pero con predominio de los de diámetro mayor. Al llevarse a cabo el marcaje con catalasa, se observaron estructuras muy semejantes en diámetro y morfología a los autolisosomas fosfatasa +, con positividad a esta enzima (figura 21 C).

3.8.2 Fracción de volumen peroxisomal en presencia y ausencia de PA1 y de inhibidores de la vía autofágica lisosomal.

La fracción de volumen peroxisomal en presencia de PA1, como ya se mencionó, disminuyó importantemente, pero en presencia de cualquiera de los tres inhibidores de la vía autofágica lisosomal (esto es inhibidor + PA1) se detectaron valores cercanos al control (sin PA1) (figuras 22 a la 24).

3.8.3 Fracción de volumen de los autofagosomas en presencia y ausencia de PA1 y de inhibidores de la vía autofágica lisosomal.

Cuando los explantes de hígado se incubaron con PA1, se observó un aumento de la fracción de volumen de los autofagosomas catalasa +, sin embargo se obtuvieron valores similares o cercanos al control en presencia de 3-metiladenina (figura 22). En el caso de la DL-asparagina y metilamina se encontró un aumento significativo de la fracción de volumen de los autofagosomas catalasa +, en relación al control sin PA1 (figuras 23 y 24).

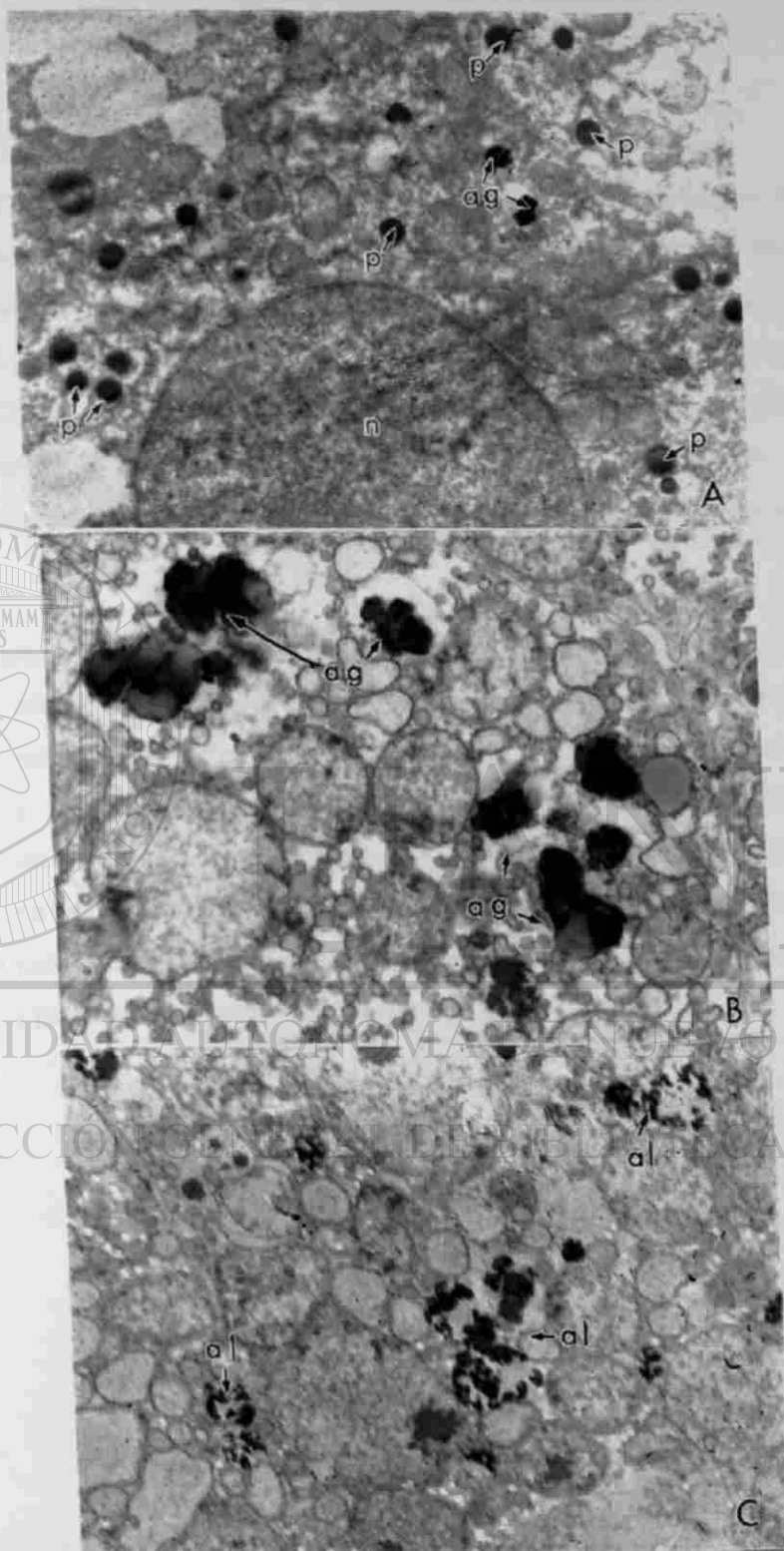


Figura 21. Explantes de hígado de *Macaca fascicularis*, incubados 120 minutos. A. 5 mM de 3-metiladenina, B. 10 mM de DL-asparagina, y C. 10 mM de metilamina. Se observan organelos con positividad a la reacción de catalasa: peroxisomas (p), autofagosomas (ag) y autolisosomas (al). Microscopía electrónica de transmisión. Inclusión en resinas epóxicas. Reacción citoquímica de catalasa. 4 400 X.

3.8.4 Fracción de volumen de los autolisosomas en presencia y ausencia de PA1 y de Inhibidores de la vía autofágica lisosomal.

En los explantes de hígado de *Macaca fascicularis* incubados con PA1 se detectó un aumento significativo de la fracción de volumen tanto de los autolisosomas fosfatasa ácida +, como de los que contienen material de origen peroxisomal (catalasa +), sin embargo en presencia de 3-metiladenina (inhibidor + PA1, figura 22) se observaron valores muy similares o cercanos al control (sin PA1). Con DL-asparagina y metilamina sí existió aumento de la fracción de volumen lisosomal aunque no tan marcado como en el caso de PA1 (inhibidor + PA1, figuras 23 y 24).

En resumen, en presencia de los tres inhibidores de la vía autofágica lisosomal, el efecto mostrado por la PA1 sobre la fracción de volumen peroxisomal y de los autolisosomas (fosfatasa ácida y catalasa positivos) no se detectó. En presencia de 3-metiladenina, el aumento de la fracción de volumen de los autofagosomas catalasa + ocasionado por la PA1, no se observó, ya que su valor se encontró cerca del control. La fracción de volumen de los autofagosomas catalasa +, obtenida en presencia de los otros dos inhibidores (DL-asparagina y metilamina), fue muy similar a la encontrada con PA1 (figuras 22 a la 24).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



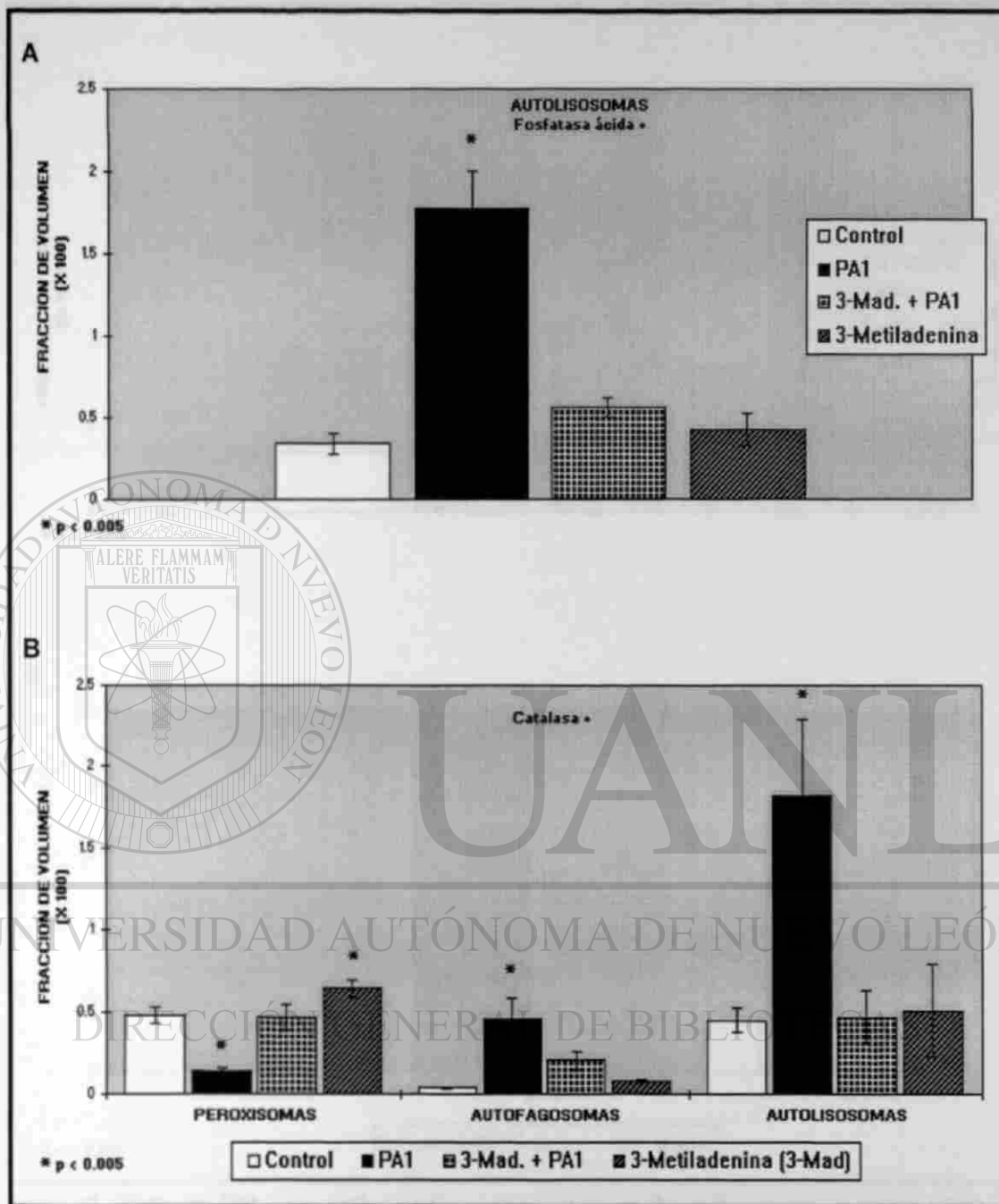


Figura 22. Efecto de PA1 (10 $\mu\text{g/ml}$) y de 3-metiladenina (5 mM) a 120 minutos de cultivo sobre la fracción de volumen de: A. autolisosomas fosfatasa ácida positivo, y B. peroxisomas, autofagosomas y autolisosomas catalasa positivo. Los valores de cada barra representan la media \pm desviación estándar de 64 micrografías electrónicas, correspondientes a 80 platos de cultivo. PA1 = peroxisomicina A1 y 3-Mad. =3-metiladenina.

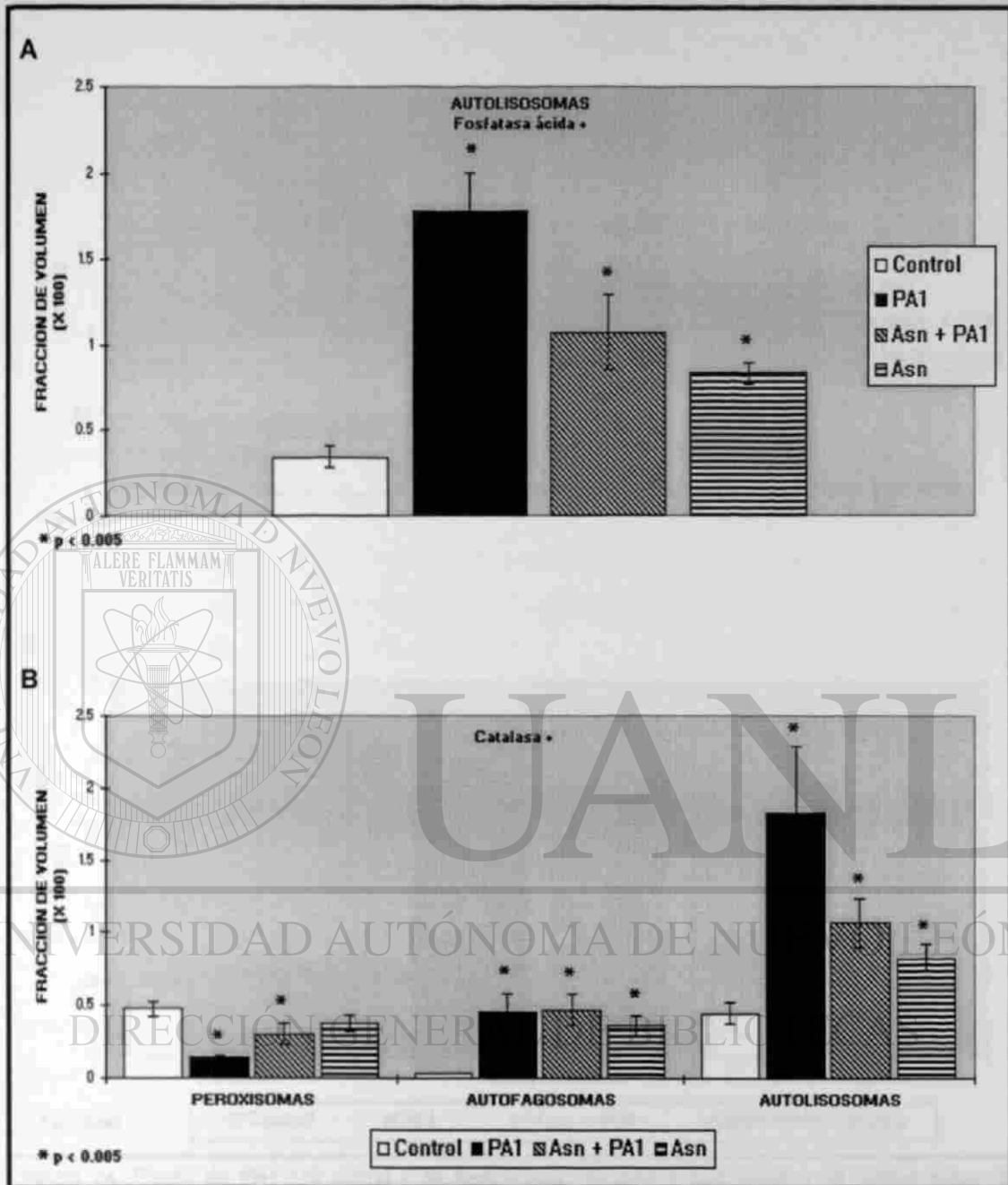


Figura 23. Efecto de PA1 (10 µg/ml) y de DL-asparagina (10 mM) a 120 minutos de cultivo sobre la fracción de volumen de: A. autolisosomas fosfatasa ácida positivo, y B. peroxisomas, autofagosomas y autolisosomas catalasa positivo. Los valores de cada barra representan la media ± desviación estándar de 64 micrografías electrónicas, correspondientes a 80 platos de cultivo. PA1 = peroxisomicina A1 y Asn =DL-asparagina.

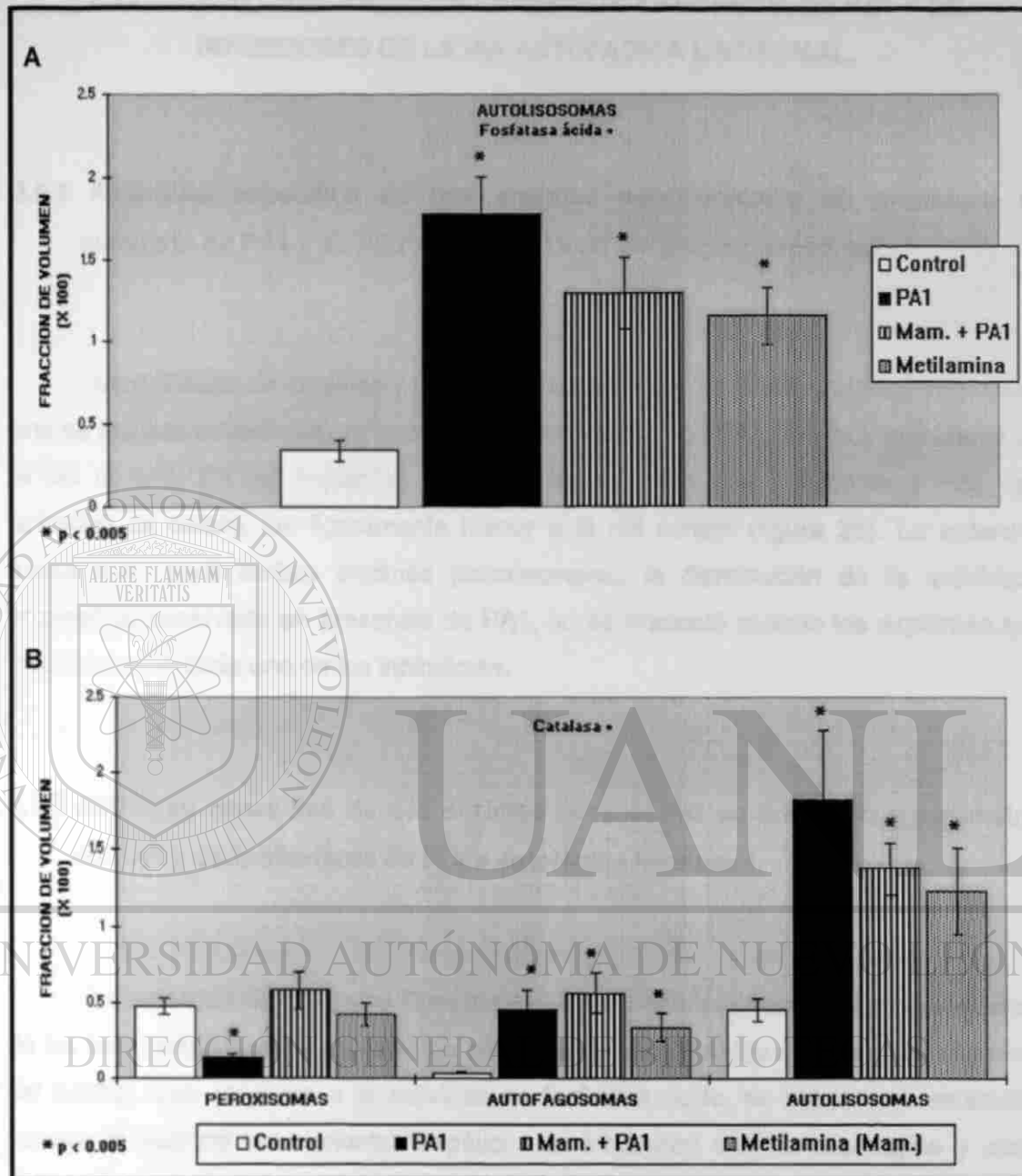


Figura 24. Efecto de PA1 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y de metilamina (10 mM) a 120 minutos de cultivo sobre la fracción de volumen de: A. autolisosomas fosfatasa ácida positivo, y B. peroxisomas, autofagosomas y autolisosomas catalasa positivo. Los valores de cada barra representan la media \pm desviación estándar de 64 micrografías electrónicas, correspondientes a 80 platos de cultivo. PA1 = peroxisomicina A1 y Mam. = metilamina.

3.9 ESTUDIO BIOQUIMICO EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE PA1 Y DE INHIBIDORES DE LA VIA AUTOFAGICA LISOSOMAL.

3.9.1 Actividad específica de dos enzimas peroxisomales en presencia y ausencia de PA1 y de Inhibidores de la vía autofágica lisosomal.

La actividad de catalasa y tiolasa de los explantes hepáticos tratados con cada uno de los tres inhibidores, ya sea solos o combinados con PA1, fue muy semejante a la del control. En los explantes hepáticos tratados con los inhibidores y PA1, la actividad de tiolasa fue ligeramente menor a la del control (figura 25). Lo anterior indica que, para ambas enzimas peroxisomales, la disminución de la actividad enzimática observada en presencia de PA1, no se presentó cuando los explantes se incubaron con cada uno de los inhibidores.

3.9.2 Actividad específica de dos enzimas lisosomales en presencia y ausencia de PA1 y de Inhibidores de la vía autofágica lisosomal.

La actividad de catepsina D en los explantes hepáticos tratados con cualquiera de los tres inhibidores, ya sea solos o combinados con PA1, fue muy cercana al valor del control. Con respecto a la actividad de fosfatasa ácida, se obtuvo un resultado semejante cuando los explantes hepáticos se incubaron con DL-asparagina y con metilamina, pero en presencia de 3-metiladenina la actividad de esta enzima fue menor a la del control (figura 26). En síntesis, para ambas enzimas lisosomales, el aumento de la actividad enzimática observado en presencia de PA1, no se presentó cuando los explantes se incubaron con cada uno de los inhibidores.

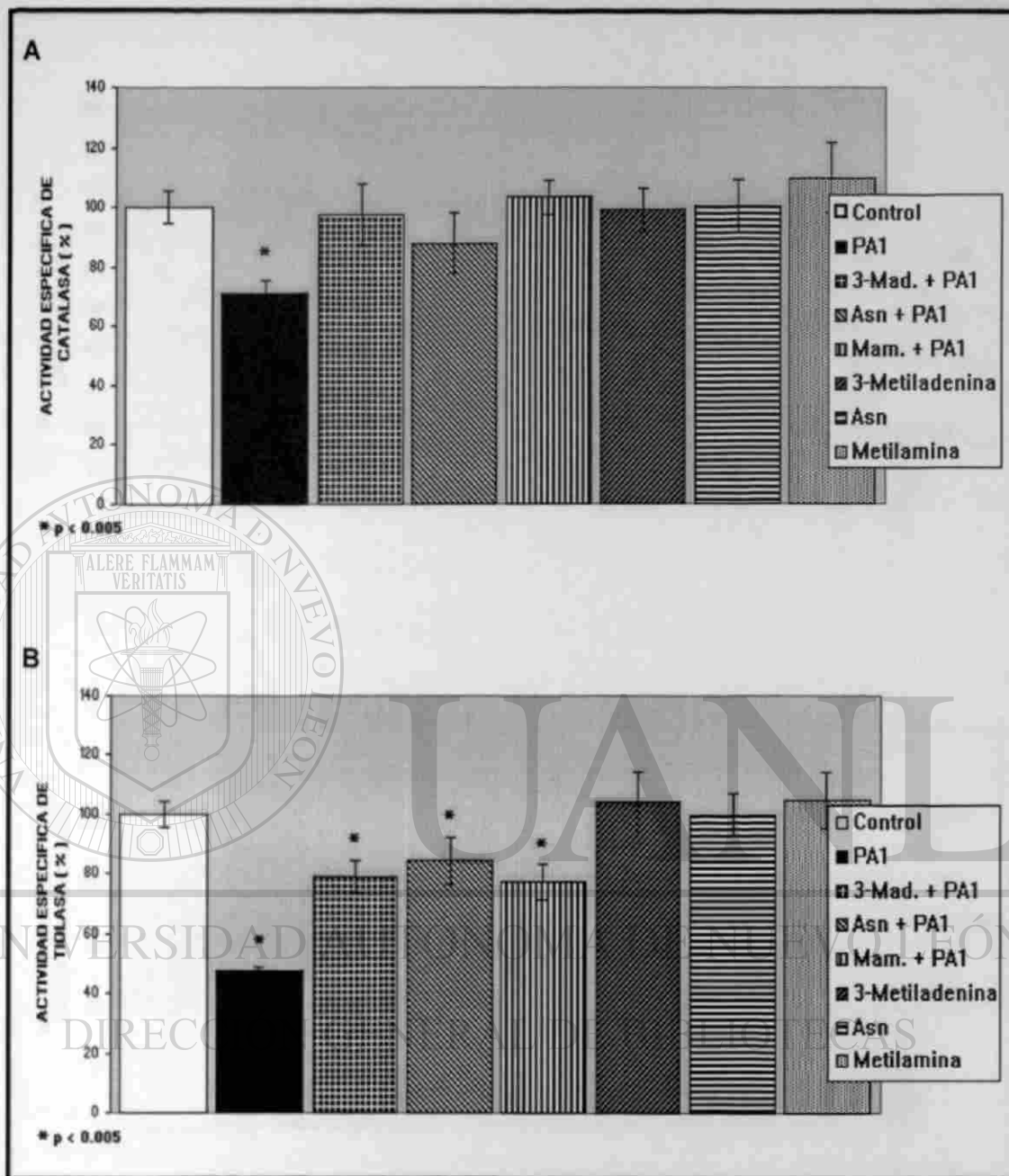


Figura 25. Efecto de PA1 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y de tres inhibidores de la vía autofágica lisosomal a 120 minutos de cultivo, sobre la actividad específica (U/mg proteína, %) de dos enzimas peroxisomales. A. Catalasa, y B. 3-oxoacil-CoA tiolasa. La actividad de las enzimas se determinó por quintuplicado, en el homogenizado proveniente de los explantes de hígado de 2 platos de cultivo. Los valores de cada barra representan la media de 80 platos de cultivo \pm desviación estándar. La concentración de cada inhibidor, sólo o combinado con PA1, fue de 5 mM para 3-metiladenina y de 10 mM para Asn y metilamina. PA1 = peroxisomicina A1, 3-Mad. = 3-metiladenina, Asn = DL-asparagina y Mam. = metilamina.

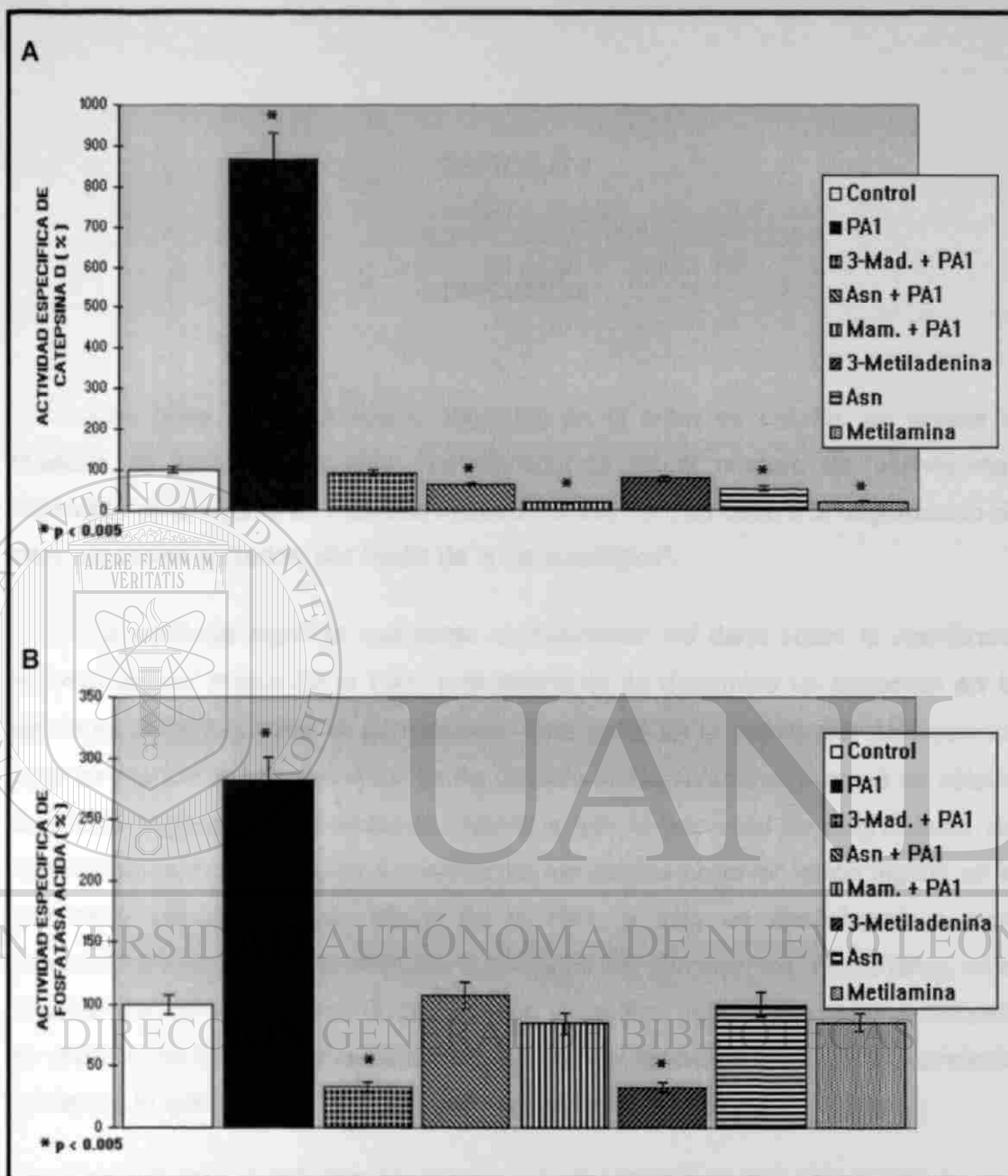


Figura 26. Efecto de PA1 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y de tres inhibidores de la vía autofágica lisosomal a 120 minutos de cultivo, sobre la actividad específica (U/mg proteína, %) de dos enzimas lisosomales. A. Catepsina D, y B. fosfatasa ácida. La actividad de las enzimas se determinó por quintuplicado, en el homogenizado proveniente de los explantes de hígado de 2 platos de cultivo. Los valores de cada barra representan la media de 80 platos de cultivo \pm desviación estándar. La concentración de cada inhibidor, sólo o combinado con PA1, fue de 5 mM para 3-metiladenina y de 10 mM para Asn y metilamina. PA1 = peroxisomicina A1, 3-Mad. = 3-metiladenina, Asn = DL-asparagina y Mam. = metilamina.

CAPITULO 4

DISCUSION

Con base a los resultados obtenidos en el presente estudio, se acepta la hipótesis de trabajo propuesta: "La disminución en el número de peroxisomas observada en el hígado de animales intoxicados con PA1, se debe a la degradación de estos organelos dañados, por medio de la vía autofágica".

La hipótesis significa que como consecuencia del daño sobre la membrana peroxisomal por efecto de la PA1, probablemente se determine un aumento en la autofagia selectiva para el peroxisoma. Este daño en la membrana peroxisomal, como se mencionó anteriormente, se ha descrito en las levaduras pero no en células eucariotes superiores. Sin embargo, debido a que la velocidad de degradación del peroxisoma es muy rápida, de 4 minutos, no fue posible observar lesión alguna en la membrana peroxisomal por efecto de la PA1, y sólo se encontraron a nivel ultraestructural imágenes de vesículas autofágicas con peroxisomas. Por lo tanto, en el presente trabajo se investigó la degradación específica para el peroxisoma inducida por el efecto de la PA1, por la vía lisosomal, como un fenómeno no terminal, condición contraria a lo que sucede durante el daño generalizado a la célula.

El estudio se efectuó en un modelo *in vitro*, encontrándose una buena viabilidad del hígado en el sistema de cultivo de órgano utilizado, lo cual nos permite sugerir que, el efecto de PA1 sobre la degradación de peroxisomas por el sistema autofágico lisosomal observado en este sistema, se puede extrapolar a lo que sucede *in vivo*. Además, previamente Sepúlveda y cols.²¹, habían observado imágenes sugestivas de un proceso autofágico-lisosomal, en monos *Macaca fascicularis*, que llegaron a morir y que recibieron una dosis letal única de PA1. Con la evidencia que aquí se aporta al fenómeno, se plantea la posibilidad de que PA1 actúe de forma

selectiva sobre los peroxisomas, y estimule la degradación de ellos por la vía autofágica lisosomal.

Como ya se mencionó, la viabilidad del hígado en cultivo fue buena de acuerdo a los parámetros de evaluación empleados. En la ausencia de PA1 o de cualquiera de los tres inhibidores de la vía autofágica lisosomal, la ultraestructura del hepatocito, en todos los tiempos de cultivo analizados (30, 60, 90 y 120 minutos) no cambió significativamente en relación a la muestra control (tiempo cero). Para estos cuatro tiempos de cultivo, la imagen general de la ultraestructura del hepatocito fue muy similar. Sin embargo se observaron cambios en la ultraestructura del hepatocito debidos al efecto de PA1 y al de los tres inhibidores de la vía autofágica lisosomal. Algunos de estos cambios pueden estar relacionados con el mecanismo de acción del inhibidor, como fue por ejemplo, con metilamina, en donde fue posible apreciar un aumento de volumen de autolisosomas y de algunas mitocondrias. Con la DL-asparagina además se observaron autofagosomas de gran tamaño. Algunos autores^{100,110,149} mencionan que lo anterior puede deberse a la acumulación de agua y a la formación de amonio dentro de los organelos, por efecto de estas aminas. A los 120 minutos de cultivo, se observaron algunos cambios indicativos de deterioro en la ultraestructura del hepatocito, en presencia de cualquiera de los tres inhibidores y, en menor grado con la PA1. No obstante, la viabilidad del hígado en cultivo analizada por *parametros bioquímicos* fue aceptable. En todos los tiempos de cultivo analizados, cuando se incubó en ausencia de PA1, se demostró inducción de la actividad de TAT por efecto de glucagon y una liberación de LDH menor del 20%, datos que correlacionan con la buena preservación morfológica, y que apoyan el hecho, de que el sistema de cultivo de órgano utilizado mantuvo viables a los explantes de hígado.

Se ha demostrado que la actividad de algunas enzimas peroxisomales, como la catalasa, aún se detecta en la vesícula autofágica con peroxisomas^{21,26}; además, el tratamiento con PA1 no interfiere con la actividad de esta enzima según fue demostrado por Sepúlveda y cols.⁴⁴ y Moreno y cols.³⁹. Lo anterior, nos permitió detectar la actividad de catalasa aún en etapas tardías de la autofagia. En varios estudios^{115-116,160} se ha utilizado a la catalasa como marcador peroxisomal, para analizar la degradación de este organelo bajo distintas condiciones.

El estudio piloto nos permitió seleccionar los tiempos de cultivo y las concentraciones de PA1 de interés para el estudio. En el análisis morfológico con microscopía de luz se observaron **peroxisomas aislados y peroxisomas agrupados rodeados por un halo claro**, ambos positivos a la reacción de catalasa. Los peroxisomas agrupados al analizarse al microscopio electrónico de transmisión, mostraron la ultraestructura de vesículas con un contenido electrodensó catalasa +. Las características ultraestructurales de dichas vesículas cumplen con los criterios morfológicos para ser consideradas como autofagosomas^{103,106,107,108}.

Por las observaciones obtenidas a partir del estudio piloto, para los experimentos posteriores se utilizó PA1 a una concentración de 10 µg/ml, y en base al mantenimiento morfológico del hígado en cultivo (ya discutido anteriormente), se emplearon tiempos de incubación cortos de, 30, 60, 90 y 120 minutos.

El análisis morfométrico por microscopía electrónica de transmisión, demostró que por efecto de PA1, existe un aumento tanto de la fracción de volumen de autofagosomas que contienen peroxisomas, como de la fracción de volumen de autolisosomas que contienen material catalasa +, de origen peroxisomal. Dicho incremento en la fracción de volumen de los autofagosomas no se observó en la presencia de 3-metiladenina, DL-asparagina o metilamina, inhibidores específicos de la vía autofágica lisosomal. Para esta condición experimental, se escogieron 120 minutos de incubación, porque ha sido reportado¹⁵¹ que es el tiempo óptimo para detectar la actividad de estos inhibidores.

En el análisis bioquímico se demostró, por efecto de PA1, un aumento en la actividad de las dos enzimas marcadoras lisosomales, catepsina D y fosfatasa ácida, lo cual se interpretó como una estimulación de la vía autofágica lisosomal, ya que cuando se analizaron las actividades enzimáticas en presencia de los inhibidores de la vía autofágica lisosomal, se observó que los valores obtenidos fueron muy cercanos al control (sin PA1), e inclusive con el efecto de 3 metiladenina, se obtuvo una actividad de fosfatasa ácida mucho menor que en el control. La actividad de fosfatasa ácida, como marcador lisosomal, ha sido empleada por otros investigadores como un indicador de que a mayor fracción de volumen de autolisosomas se detecta mayor actividad de esta enzima^{106,107,160}.

Las observaciones anteriores son similares a las obtenidas por otros investigadores y, aunque en la literatura existen pocos trabajos documentando la degradación de peroxisomas, como parte del recambio normal de este organelo, el papel del proceso autofágico lisosomal en la degradación peroxisomal de mamífero es evidenciado en los trabajos de Yokota y col. en 1995, Kondo y col. en 1997, y Serafini y col. en 1998^{117,118,150}. Ellos observaron que posterior a la proliferación de los peroxisomas (por efecto de proliferadores peroxisomales, como el clofibrato), el exceso de este organelo es removido por la vía autofágica-lisosomal. Esto último se corroboró porque, la reducción del número de peroxisomas por autofagia fue inhibida por la 3-metiladenina, que como ya se mencionó es un inhibidor de la vía autofágica-lisosomal. Es importante destacar que en esta situación los peroxisomas son normales pero se encuentran en exceso, ya que uno de los mecanismos que poseen las células para mantener su homeostasis, es la eliminación de organelos o macromoléculas que están en exceso, vía la autofagia lisosomal. En el estudio de Serafini y col.¹⁵⁰, se emplearon las mismas técnicas citoquímicas y bioquímicas utilizadas en el presente estudio.

Por otro lado, aunque en el presente trabajo no se reporta un análisis morfométrico de autofagosomas que contienen otros organelos subcelulares, ya que no se emplearon marcadores para ello, es muy probable que el efecto de PA1 observado, sea sobre la degradación específica de peroxisomas. Además, hay que tomar en consideración que, para el estudio morfométrico, se analizaron 1568 micrografías electrónicas (sin incluir el estudio piloto), las cuales fueron tomadas en campos al azar, no encontrándose en ellas, imágenes de autofagosomas conteniendo otros organelos. En el análisis cualitativo que se realizó con el MET, no se observaron indicios de autofagia lisosomal para otros organelos.

La ultraestructura de los autolisosomas, tanto fosfatasa ácida + como catalasa +, provenientes de explantes de hígado de *Macaca fascicularis* incubados con PA1 e incubados con metilamina, presentó diversas formas y tamaños. Lo anterior puede deberse a que existen dos poblaciones de autolisosomas, dependiendo de la actividad de degradación que presentan, clasificándose en tempranos y tardíos^{107,109}. Referente a esto, PA1 y metilamina pueden actuar a distintos niveles del proceso

autofágico lisosomal y ocasionar la acumulación variable y distintiva de estos dos tipos de autolisosomas, situación que aunque en grado variable, también puede ser atribuible a los otros dos inhibidores.

La actividad específica de las dos enzimas marcadoras peroxisomales, catalasa y tiolasa, disminuyó por efecto de PA1, probablemente indicando que menor número de moléculas de enzima se encuentran activas, debido a que los peroxisomas están disminuyendo porque se degradan a mayor velocidad por efecto de PA1. Estos hallazgos apoyan a los encontrados con el análisis morfométrico, ya que por efecto de PA1, como ya se mencionó, se encontró un aumento en la fracción de volumen de autofagosomas y autolisosomas catalasa +, a todos los tiempos de cultivo analizados. Sin embargo hay que tomar en consideración, que estos ensayos bioquímicos se llevan a cabo en el homogenizado, por lo que se está detectando tanto la actividad de catalasa del peroxisoma como igualmente la actividad de catalasa de los autofagosomas y de los autolisosomas⁴⁰. Esto puede ser la causa de que la disminución de la actividad de catalasa no se correlacionó con el hallazgo morfométrico en cuanto a la magnitud del descenso.

No obstante, si es posible que ambas enzimas peroxisomales disminuyan en su actividad, por el aumento de la degradación peroxisomal, en este momento no es posible explicar la diferencia existente entre la actividad de catalasa y la de tiolasa, ya que según se describió en los resultados, por efecto de PA1 fue mayor la disminución de la actividad de tiolasa que la de catalasa.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Moreno y cols., en 1995, demostraron el efecto inhibitorio *in vitro* de antracenas dimericas estructuralmente semejantes (PA1, PA2 y T 544), sobre la actividad de catalasa hepática bovina³¹. Posteriormente, Moreno y cols., en 1997 demostraron que la PA1 no es capaz de inhibir la actividad de catalasa hepática, *in vivo*³⁹. Esto último, coincide con lo descrito por Sepúlveda y cols., donde se demostró que la actividad de catalasa no se modifica en levaduras metilotróficas con daño peroxisomal inducido por PA1, *in vivo*⁴⁴. En base a los hallazgos antes mencionados, y a los resultados del presente estudio sobre el análisis histoquímico de la actividad de catalasa, podemos concluir que la catalasa no está involucrada directamente en el daño peroxisomal causado por PA1.

La actividad de catalasa en presencia de los tres inhibidores de la vía autofágica lisosomal (3-metiladenina, DL-asparagina y metilamina), no mostró cambio significativo respecto al control. En contraste, en presencia de PA1, sí ocurrió disminución de su actividad. Los resultados de este trabajo sugieren que la causa de la disminución de la actividad de catalasa es la degradación peroxisomal inducida por PA1, vía vesículas autofágicas.

Por otra parte, en levaduras, como *Hansenula polymorpha*, se ha sugerido que las señales que inician el proceso de recambio de peroxisomas, no están dirigidas contra las proteínas de matriz, sino hacia la membrana peroxisomal^{54,121}, y además se ha indicado, que la degradación de peroxisomas requiere de un control muy preciso¹⁵²; situación, que en el mamífero, por ser un organismo más complejo se vuelve transcendental el que la degradación peroxisomal, cuente con señales muy precisas, que le permitan a las células identificar cuales o cuantos, son los peroxisomas que deban ser degradados. Entre los factores que podrían desencadenar el proceso autofágico lisosomal, se encuentra cualquier agresión sobre el organelo en cuestión. Por ello, es importante que para el conocimiento del mecanismo molecular de la PA1 sobre los peroxisomas hepáticos, en este modelo *in vitro*, se pueda identificar la señal que desencadena la estimulación de la degradación peroxisomal por la vía autofágica lisosomal. Probablemente, en analogía a lo reportado por Sepúlveda y cols. en levaduras metilotróficas⁴⁴, esa señal pudiera ser la fragmentación de la membrana peroxisomal ocasionada por PA1.

Es importante indicar que, tanto los cambios observados en la fracción de volumen peroxisomal y de los cuerpos autofágicos como los cambios en la actividad enzimática, originados por PA1, se observaron desde los 30 minutos de cultivo, por lo que es posible que la "señal" necesaria para estimular la degradación peroxisomal, se presente en tiempos más breves. Lo anterior, por lo tanto, será motivo del estudio a tiempos más cortos y probablemente reforzándose además, con otras estrategias experimentales, como sería el análisis inmunocitoquímico de las mismas enzimas marcadoras aquí empleadas.

Por la acción de PA1 se estimula la vía autofágica lisosomal, ya que al

analizarse tanto la fracción de volumen peroxisomal y la de los cuerpos autofágicos como la actividad de las enzimas marcadoras lisosomales, en presencia de cualquiera de los tres inhibidores de la vía autofágica lisosomal se encontró una respuesta que fue dirigida a anular el efecto de PA1. Los inhibidores bloquean el proceso autofágico lisosomal en diferentes pasos, por ejemplo, para el caso de 3-metiladenina, que se conoce inhibe la formación de autofagosomas porque bloquea el secuestro autofágico^{109,110,116,161}, se encontró el nivel de autofagosomas catalasa + muy cercano al control, y se obtuvo un aumento con una diferencia significativa, en los peroxisomas en relación al control (basal). Este último hallazgo, probablemente es el resultado de que se acumularon peroxisomas en el citoplasma, por el bloqueo autofágico ocasionado por la 3-metiladenina. Los resultados observados tanto morfológicos como bioquímicos, en los controles internos de cada uno de los tres inhibidores (esto es cuando el inhibidor se encuentra sólo), coinciden con los reportes de otros autores^{106,107,110,118,153}.

Considerando los objetivos del presente trabajo, no se estableció el tipo de daño que pudieran haber sufrido los peroxisomas por la acción de PA1, pero aún así, los hallazgos de la presente investigación, nos permiten proponer un mecanismo probable mediante el cual PA1 disminuye el número de peroxisomas (figura 27). La PA1, puede estar actuando sobre los peroxisomas provocándoles una lesión en su membrana (esto en analogía con lo que sucede en las levaduras). Estos peroxisomas dañados son rápidamente secuestrados por una membrana pre-autofágica, formándose autofagosomas que contienen peroxisomas, que son degradados por la vía autofágica lisosomal, por lo que se encuentran abundantes autolisosomas con material catalasa +, esto es de origen peroxisomal. Estos autofagosomas que contienen peroxisomas dañados coexisten con peroxisomas no dañados, que están en menor número, pudiéndose explicar así, la disminución del número de peroxisomas observada por efecto de PA1.

La cinética del estudio morfométrico obtenida en la presente investigación, permite corroborar el mecanismo propuesto. En función del tiempo, conforme los peroxisomas disminuyen por efecto de PA1, los autofagosomas con peroxisomas y los autolisosomas con material de origen peroxisomal aumentan, en relación a sus respectivos controles (figuras 11 y 18).

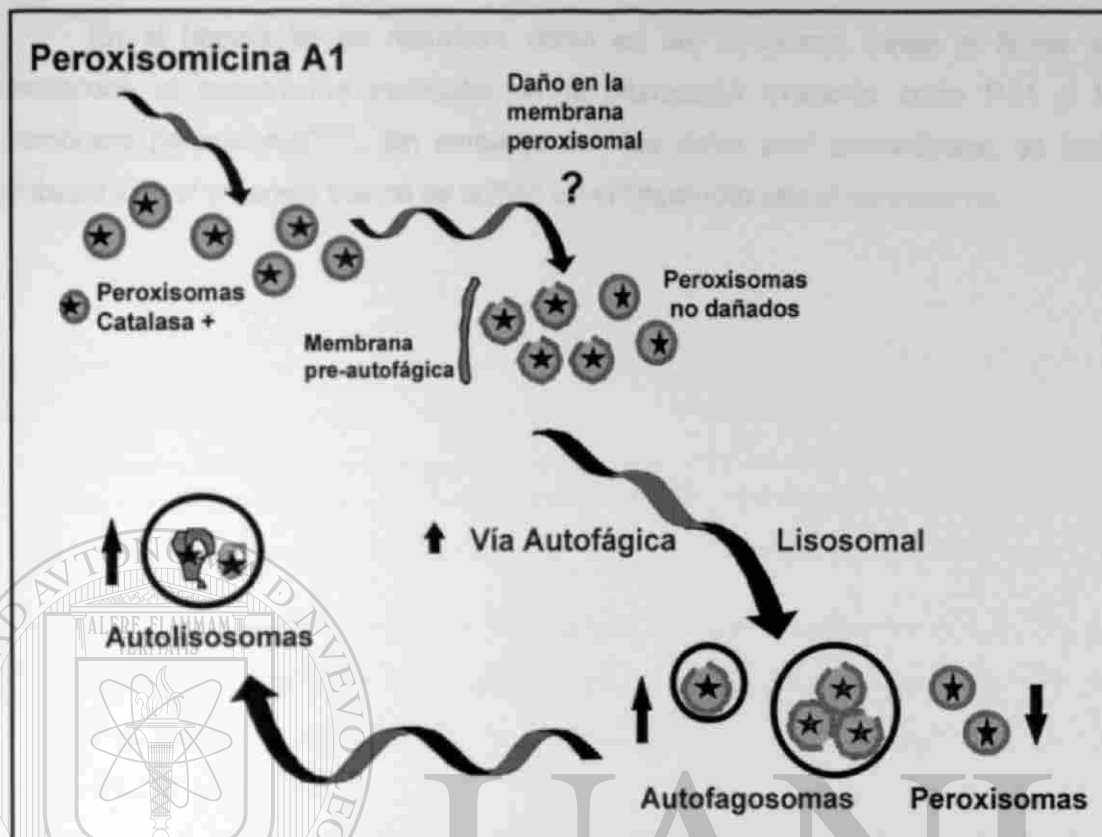
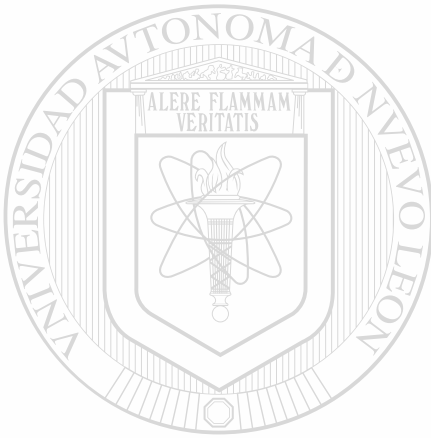


Figura 27. Esquema del mecanismo propuesto, mediante el cual peroxisomicina A1 (PA1) disminuye el número de peroxisomas en el hepatocito de *Macaca fascicularis*, en un modelo *in vitro*.

Yasmineh y cols.¹²⁵ en un estudio efectuado con ratas inyectadas por vía intraperitoneal con el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) recombinante humano, observaron una disminución en el número y el tamaño de los peroxisomas hepáticos, y en la actividad de catalasa. Estos autores postularon que, el TNF- α moviliza la subunidades de catalasa del hígado hacia sitios de inflamación en donde se forman los radicales libres. Como puede apreciarse, este mecanismo difiere del que proponemos nosotros para explicar la disminución de peroxisomas por efecto de PA1 en nuestro modelo experimental *in vitro*.

Como ya se mencionó, en el presente trabajo no se identificó la lesión de la membrana peroxisomal que pudiera representar la "señal" necesaria para la estimulación de la degradación peroxisomal desencadenada por PA1; no obstante la evidencia que aquí se presenta, sugiere de manera importante la participación del proceso autofágico lisosomal.

En el hepatocito de mamífero como en las levaduras, hasta la fecha se desconoce el mecanismo molecular de la interacción existente entre PA1 y la membrana peroxisomal^{40,44}. Sin embargo con los datos aquí presentados, es muy probable que el organelo blanco de la PA1 en el hepatocito sea el peroxisoma.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN®
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPITULO 5

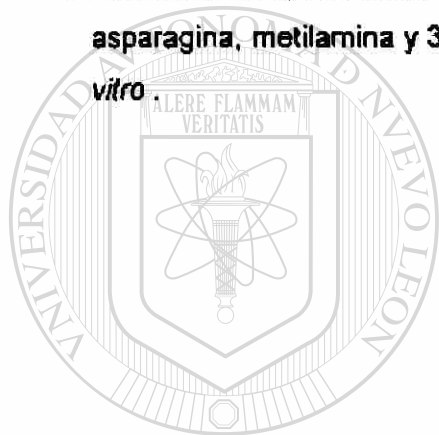
CONCLUSIONES, PERSPECTIVAS Y CONTRIBUCIONES.

5.1 CONCLUSIONES

1. Se acepta la hipótesis de trabajo planteada: "La disminución en el número de peroxisomas observada en el hígado de animales intoxicados con PA1, se debe a la degradación de estos organelos dañados, por medio de la vía autofágica lisosomal".
2. La peroxisomicina A1 (PA1) causa una disminución en el número de peroxisomas en este modelo *in vitro* de la misma forma que en el animal completo.
3. Esta disminución en el número de peroxisomas se debe a la estimulación de la vía autofágica lisosomal y por lo tanto al incremento en la degradación de estos organelos.
4. Por efecto de PA1, la actividad de las dos enzimas marcadoras del peroxisoma se encuentra disminuída como consecuencia de la degradación de peroxisomas.
5. Por efecto de PA1, aumenta la actividad de las dos enzimas marcadoras lisosomales debido a la estimulación de la vía autofágica lisosomal.
6. La estimulación, de la degradación de peroxisomas vía autofágica lisosomal causada por PA1, es inhibida por DL-asparagina, metilamina y 3-metiladenina (inhibidores de dicha vía).

5.2 PERSPECTIVAS

1. Investigar si en los peroxisomas de mamífero se presenta el daño en la membrana peroxisomal, observado en las células de levadura.
2. Evaluar la degradación de otros organelos en este mismo sistema, para definir la especificidad del fenómeno en relación a la degradación peroxisomal.
3. Evaluar *in vivo*, el efecto de estos inhibidores de la vía autofágica lisosomal (DL-asparagina, metilamina y 3-metiladenina) y comparar con el fenómeno observado *in vitro*.



5.3 CONTRIBUCIONES

El presente estudio contribuye a esclarecer el mecanismo de acción de PA1 y sugiere la posibilidad de utilizar a estos inhibidores de la vía autofágica lisosomal en el animal completo para bloquear el efecto de PA1.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

APENDICE A

ESTUDIO PILOTO

A.1 OBJETIVO DEL ESTUDIO PILOTO.

Definir los tiempos de incubación y las concentraciones de la peroxisomicina A1 (PA1) utilizadas en el cultivo de órgano del trabajo de investigación denominado "Efecto de la Peroxisomicina A1 sobre la autofagia de peroxisomas en el hígado de *Macaca fascicularis* en un modelo *in vitro*".

A.2 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

Para la estrategia de trabajo en el estudio piloto se utilizó el modelo experimental del cultivo de órgano de hígado de *Macaca fascicularis*, incubado en presencia y ausencia de peroxisomicina A1.

La disolución de la toxina peroxisomicina A1 (PA1), se efectuó inmediatamente antes de su utilización, con *etanol absoluto*; la concentración final del etanol en el medio nutriente fue de 0.1% (v/v). PA1 se almacenó siempre a -20 °C, protegida de la luz y la humedad.

En las figuras 28 y 29 se muestran los diagramas que representan la estrategia experimental del estudio piloto.



Figura 28. Resumen de la estrategia experimental del estudio piloto; puntos más relevantes. Microscopía electrónica de transmisión (MET) y microscopía de luz (ML).

En la figura 29, se presenta el análisis morfométrico por microscopía de luz; detalles de estas técnicas se encuentran en el capítulo de materiales y métodos.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

El presente documento es una compilación de los recursos de información que se encuentran en las bibliotecas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. El objetivo principal de este documento es proporcionar a los usuarios un acceso fácil y rápido a la información que se encuentra en las bibliotecas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Este documento es una compilación de los recursos de información que se encuentran en las bibliotecas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. El objetivo principal de este documento es proporcionar a los usuarios un acceso fácil y rápido a la información que se encuentra en las bibliotecas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Este documento es una compilación de los recursos de información que se encuentran en las bibliotecas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. El objetivo principal de este documento es proporcionar a los usuarios un acceso fácil y rápido a la información que se encuentra en las bibliotecas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

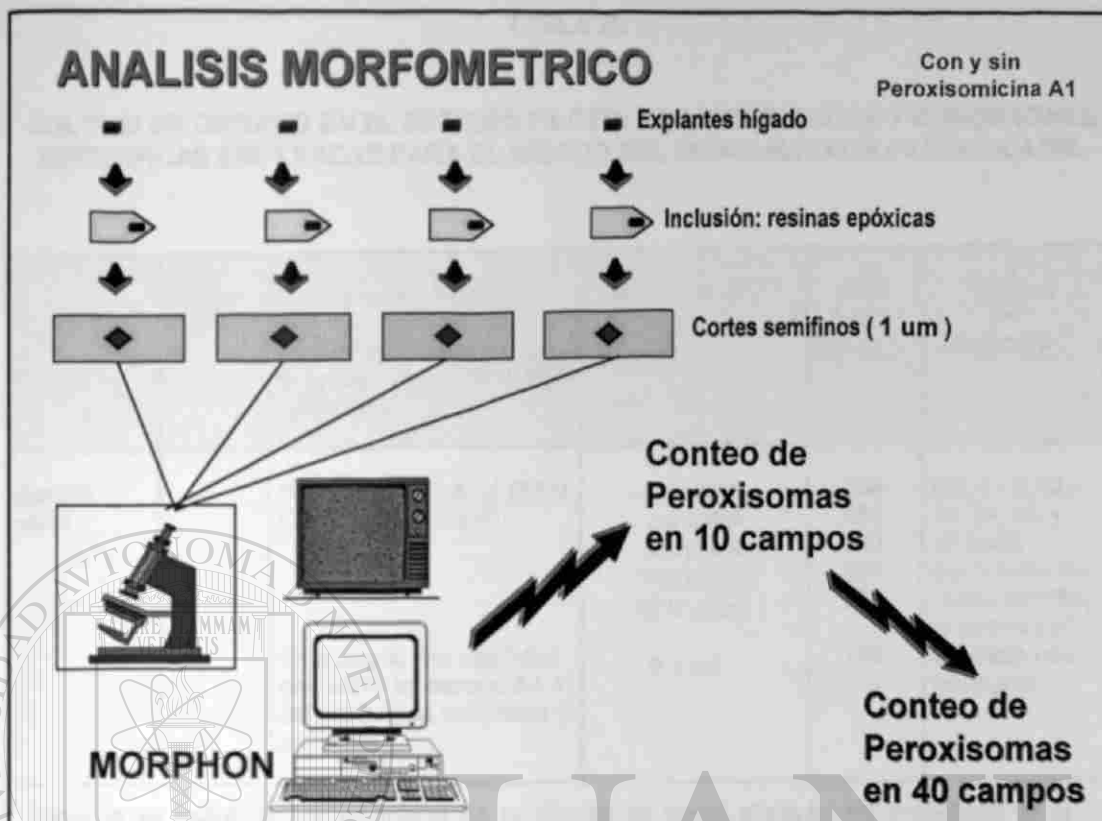


Figura 29. Análisis morfométrico por microscopía de luz (ML) como parte fundamental de la estrategia experimental del estudio piloto.

A.2.1 Estandarización del cultivo de órgano.

Para la estandarización del cultivo de órgano, se analizó el efecto que tiene el proceso de **congelación y descongelación sobre el mantenimiento del hígado en cultivo** (en ausencia de peroxisomicina A1) y se concluyó que en los cultivos provenientes de hígado congelado-descongelado, aún en presencia del DMSO como crioprotector, la **histología del hígado de *Macaca fascicularis* no se conserva**, por lo que en el estudio piloto y en los experimentos posteriores se efectuaron los cultivos de órgano con el hígado sin congelar. Además, se prepararon *cultivos de órgano control carentes de peroxisomicina A1 pero con etanol al 0.1 % (v/v)*, que fue la concentración de disolución para la toxina. Se probaron varios medios nutrientes (MEM, Dulbecco y L-15), suplementos y cantidad de explantes de hígado por placa de cultivo. Después de analizar los parámetros anteriores, se estableció la técnica para el cultivo de órgano que se describe en la sección 2.4.3 del capítulo de materiales y métodos.

Las características y condiciones del cultivo de órgano del estudio piloto se muestran en la tabla III.

TABLA III.

CULTIVO DE ORGANOS EN EL ESTUDIO PILOTO: CARACTERISTICAS Y CONDICIONES ESPECIFICAS EMPLEADAS PARA EL HIGADO DEL MONO *MACACA FASCICULARIS*.

	Monos M.fasc.	Incubación a 37°C (48 - 50 explantes de hígado de 1mm de grosor, por plato, con medio L-15 y adiciones)	Concentración ^a	Total platos d/cultivo	Tiempos de incubación ^b
Estudio piloto	1	S/ peroxisomicina A1 (PA1) C/ peroxisomicina A1 C/ glucagon (ver viabilidad del cultivo en sección 2.4.4 del capítulo de materiales y metodos)	0.0 µg/ml 2.5 µg/ml 5.0 µg/ml 10.0 µg/ml 20.0 µg/ml 0.1 µM	280 280 280 280 280 140	0.5, 1 - 8, 12, 16, 24, 48, y 72 horas (para todas las concs. de PA1, el control y el incubado con glucagon)

^a Como ya se indicó, la peroxisomicina A1 se disolvió en etanol absoluto, los inhibidores de la vía autofágica-lisosomal (metilamina, 3-metiladenina y DL-asparagina) se disolvieron en solución de Hanks, y se tomaron los volúmenes adecuados de las soluciones de la toxina para obtener las concentraciones finales requeridas en el medio de cultivo (L-15 con adiciones).

^b La recolección de los explantes se efectuó "al azar" después de los tiempos indicados en la tabla, con la ayuda de unas pinzas finas para no dañar al tejido, e inmediatamente se colocaron algunos en el fijador, (glutaraldehído a la concentración indicada más adelante) para los análisis morfológicos y de viabilidad. Otros explantes para los estudios bioquímicos y de viabilidad, se recolectaron y se lavaron 3 veces con solución salina estéril (cloruro de sodio al 0.9% (p/v)). En el último lavado se suplementó la solución salina con dimetilsulfóxido al 10% (v/v), e inmediatamente fueron congelados los explantes a -20°C, y descongelados hasta el momento que se requirieron.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

A.3 RESULTADOS

Previo a los experimentos diseñados para probar la hipótesis de trabajo y de acuerdo a los objetivos, como ya se indicó se efectuó un estudio piloto para poder definir las concentraciones y los tiempos de incubación con PA1 en nuestro sistema de cultivo de órgano. Los tiempos de recolección del estudio piloto fueron: 0.5, 1 a 8, 12, 16, 24 y 72 horas. Tanto para el estudio piloto como para todos los experimentos subsiguientes se analizó la integridad morfológica y funcional del hígado y la viabilidad de los explantes de hígado en el cultivo de órgano.

A.3.1 Integridad morfológica y funcional del hígado.

Con el fin de evaluar la integridad morfológica y funcional del hígado, del número total de monos *Macaca fascicularis* que se procesaron para cada uno de los cultivos de órgano, se realizaron análisis morfológico con microscopía de luz (ML), y análisis bioquímico.

A.3.1.1 Análisis morfológico con microscopía de luz (ML).

Los cortes histológicos del hígado teñidos con HE (figura 30 A), mostraron la histología normal del órgano, en donde se apreció la arquitectura poliédrica de los hepatocitos con sus núcleos bien definidos, la formación de los tabiques hepáticos y la presencia de sinusoides. El citoplasma de los hepatocitos presentó escasos depósitos de grasa, los cuales se observan como pequeñas gotas de lípidos teñidas con el colorante rojo oleoso (figura 30 B) y además sin contenido de glucógeno (figura 30 C), ya que la presencia de este carbohidrato con la reacción de PAS, se manifiesta como un depósito color magenta.

A.3.1.2 Análisis bioquímico.

En la tabla IV se muestra la actividad específica de TAT en el hígado previo al cultivo, valor que se tomó como referencia para la actividad de la enzima en el cultivo de órgano y la respuesta a glucagon (ver más adelante en viabilidad del cultivo de órgano).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TABLA IV.

ACTIVIDAD ESPECIFICA (U/mg PROTEINA) DE TAT EN EL HIGADO DE *MACACA FASCICULARIS*^a PREVIO AL CULTIVO DE ORGANO.

Horas Cultivo	U/mg Prot ± Desviación estándar
0	0.109 ± 0.013

^a Actividad específica de TAT en el homogenizado hepático. El valor representa la media de la actividad de los cuatro monos totales empleados.

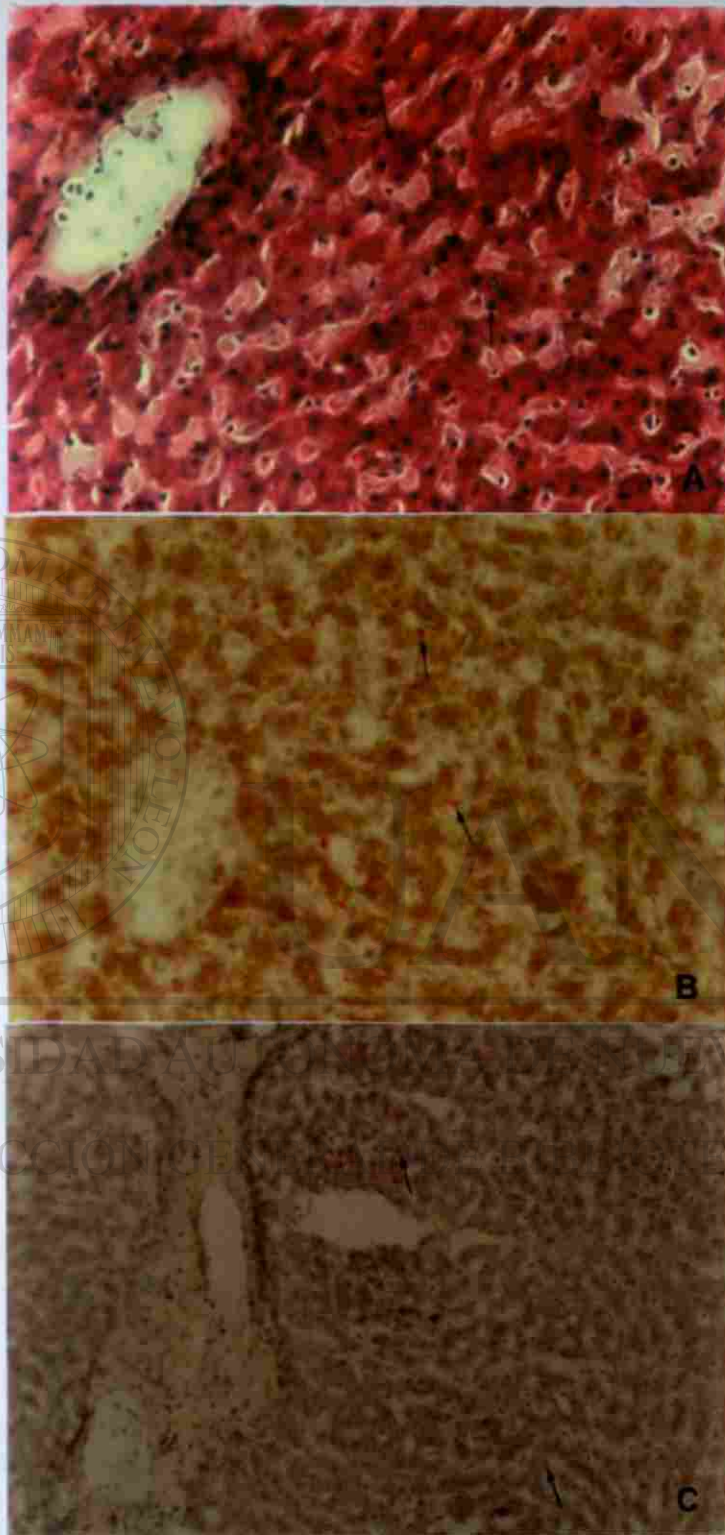


Figura 30. Hígado de *Macaca fascicularis*, en el tiempo cero.
 A: Tinción de hematoxilina y eosina (HE). Núcleo del hepatocito (↑). 50 X. B: Tinción del rojo oleoso O. Depósito de grasa (↑). 50 X. C: Reacción del ácido peryódico de Schiff (PAS). Núcleo del hepatocito (↑). 31 X. Microscopía de luz, campo claro.

A.3.2 Viabilidad de los explantes de hígado de los cultivo de órgano, del estudio piloto.

Para evaluar la viabilidad de los explantes del hígado en el cultivo de órgano, se realizaron *análisis morfológico con microscopía de luz, y análisis bioquímico: inducción de la actividad de la enzima tirosina aminotransferasa (TAT) y liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) al medio de cultivo.* El cultivo de órgano fue preparado según las condiciones que se muestran en la tabla III.

A.3.2.1 Análisis morfológico con microscopía de luz (ML).

Cuando se analizaron al microscopio de luz, cortes semifinos de explantes de hígado de *Macaca fascicularis* incubados hasta las 24 horas sin PA1, procesados para la reacción citoquímica de catalasa, se observó que la mayoría de los hepatocitos carecían de núcleo, con el citoplasma un poco extraído y en algunas de las células no se les distinguió bien el límite celular, por lo que la histología normal del hígado se perdió. La positividad a la reacción de catalasa, se encontró distribuida uniformemente, en todo el citoplasma de los hepatocitos. Estos cambios se presentaron gradualmente con el tiempo, iniciándose ellos aproximadamente a partir de las 5 horas de cultivo, de forma tal que, para las 72 horas, el deterioro morfológico fue aún mayor que para las 24 horas. Lo anterior se demostró tanto para los explantes incubados en L-15 como en los medios Dulbecco y MEM.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

A.3.2.2 Análisis bioquímico.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

A.3.2.2.1 Inducción de la actividad de tirosina aminotransferasa (TAT).

La actividad de TAT fue inducida por acción de glucagon en los explantes de hígado incubados hasta las 8 horas de cultivo, aunque el máximo efecto inductivo fue a las 6 horas. En los tiempos posteriores de cultivo analizados, no se encontró inducción de la actividad de TAT, en relación a su control (sin glucagon). Por otro lado, no se presentó ningún efecto de la PA1 sobre la actividad de TAT, a cualquier concentración de PA1 y tiempos de cultivo (tabla V).

TABLA V.

VIABILIDAD DEL HIGADO EN EL CULTIVO DE ORGANO. EFECTO DE GLUCAGON Y DE PA1 SOBRE LA ACTIVIDAD ESPECIFICA DE TIROSINA AMINOTRANSFERASA (TAT) A DIFERENTES TIEMPOS DE CULTIVO ^a.

ACTIVIDAD ESPECIFICA DE TAT (U/mg Proteína.) ± DESVIACION ESTANDAR						
Horas Cultivo			Concentración de Peroxisomicina A1 (PA1)			
	S/Glucagon S/PA1	C/Glucagon S/PA1	2.5 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml
0.5	0.093 ± 0.021	0.154 ± 0.017	0.088 ± 0.021	0.095 ± 0.013	0.115 ± 0.020	0.101 ± 0.015
1	0.089 ± 0.015	0.285 ± 0.058	0.091 ± 0.013	0.090 ± 0.012	0.092 ± 0.010	0.091 ± 0.016
2	0.127 ± 0.014	0.353 ± 0.039	0.123 ± 0.015	0.118 ± 0.010	0.125 ± 0.012	0.126 ± 0.018
3	0.136 ± 0.022	0.415 ± 0.063	0.118 ± 0.024	0.130 ± 0.022	0.133 ± 0.018	0.137 ± 0.025
4	0.130 ± 0.018	0.515 ± 0.049	0.127 ± 0.016	0.125 ± 0.027	0.119 ± 0.023	0.118 ± 0.019
5	0.124 ± 0.011	0.545 ± 0.037	0.122 ± 0.019	0.118 ± 0.016	0.125 ± 0.014	0.121 ± 0.020
6	0.128 ± 0.018	0.673 ± 0.058	0.115 ± 0.011	0.124 ± 0.018	0.120 ± 0.011	0.098 ± 0.017
7	0.117 ± 0.026	0.573 ± 0.060	0.121 ± 0.018	0.119 ± 0.014	0.117 ± 0.013	0.120 ± 0.013
8	0.125 ± 0.014	0.201 ± 0.031	0.099 ± 0.023	0.127 ± 0.013	0.118 ± 0.016	0.124 ± 0.014
12	0.119 ± 0.012	0.146 ± 0.022	0.089 ± 0.019	0.099 ± 0.015	0.120 ± 0.027	0.113 ± 0.016
16	0.102 ± 0.013	0.130 ± 0.019	0.098 ± 0.017	0.088 ± 0.021	0.105 ± 0.019	0.111 ± 0.012
24	0.112 ± 0.017	0.187 ± 0.021	0.106 ± 0.020	0.107 ± 0.011	0.095 ± 0.018	0.099 ± 0.011
48	0.097 ± 0.019	0.109 ± 0.015	0.099 ± 0.013	0.105 ± 0.016	0.121 ± 0.020	0.100 ± 0.019
72	0.096 ± 0.025	0.112 ± 0.011	0.101 ± 0.021	0.096 ± 0.018	0.098 ± 0.014	0.102 ± 0.010

^a La actividad de TAT se ensayó por quintuplicado, en el homogenizado proveniente de los explantes de 2 platos de cultivo, a cada uno de los tiempos de incubación indicados. Los valores de cada columna representan la media del total de platos de cultivo ± desviación estándar: para los controles y tratados con PA1 (2.5, 5, 10 y 20 µg/ml) son 20 platos de cultivo, y para el incubado con glucagon (0.1 µM) son 10. S/ = sin, C/ = con.

A.3.2.2.2 Liberación de lactato deshidrogenasa (LDH).

La tabla VI muestra la liberación de LDH al medio de cultivo a diferentes concentraciones y tiempos de incubación con PA1. En el cultivo control (sin PA1) se detectó una liberación de LDH menor del 20% hasta las 7 horas de cultivo, pero en tiempos posteriores a éste, se observó un incremento en este porcentaje. Además, por efecto de PA1, la liberación de LDH aumentó por arriba del 20%, lo cual fue dependiente del tiempo de incubación y la concentración de PA1.

TABLA VI.

VIABILIDAD DEL HIGADO EN EL CULTIVO DE ORGANO. LIBERACION DE LDH AL MEDIO DE CULTIVO EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE PA1 A LOS DIFERENTES TIEMPOS DE CULTIVO ¹.

ACTIVIDAD DE LDH (U totales), % DE LIBERACIÓN ± DESVIACION ESTANDAR					
Horas Cultivo	Concentración de Peroxisomicina A1 (PA1)				
	Control Sin PA1	2.5 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml
0.5	8.28 ± 1.04	10.36 ± 1.28	9.38 ± 0.89	11.71 ± 2.11	12.34 ± 1.29
1	8.44 ± 0.89	11.87 ± 0.99	12.46 ± 1.01	12.20 ± 3.06	10.37 ± 1.35
2	5.85 ± 1.06	7.82 ± 0.85	8.46 ± 1.07	10.56 ± 0.73	8.94 ± 1.99
3	8.00 ± 0.92	10.80 ± 0.97	9.03 ± 0.59	7.57 ± 0.38	8.58 ± 1.63
4	7.93 ± 1.82	9.36 ± 1.88	4.97 ± 0.80	5.63 ± 0.31	8.11 ± 0.67
5	8.51 ± 1.22	4.96 ± 0.52	8.88 ± 0.93	17.35 ± 1.50	15.36 ± 1.12
6	16.06 ± 2.05	12.99 ± 2.02	14.53 ± 1.54	19.12 ± 1.88	29.96 ± 1.34
7	18.11 ± 2.83	27.15 ± 2.01	33.15 ± 2.97	37.66 ± 3.45	29.45 ± 3.08
8	26.96 ± 1.74	32.05 ± 2.93	19.89 ± 2.56	34.54 ± 2.56	33.19 ± 4.05
12	29.91 ± 3.70	28.97 ± 2.65	27.23 ± 3.05	36.98 ± 3.11	41.33 ± 5.09
16	31.87 ± 3.28	30.54 ± 3.04	59.22 ± 4.82	55.36 ± 4.44	70.86 ± 8.30
24	32.33 ± 2.97	32.61 ± 3.36	67.89 ± 5.17	68.29 ± 6.53	71.23 ± 6.79
48	30.07 ± 3.19	39.46 ± 2.69	70.56 ± 8.13	71.23 ± 8.12	78.45 ± 7.93
72	33.59 ± 4.33	38.16 ± 3.90	69.51 ± 7.76	65.25 ± 4.87	75.45 ± 6.76

¹ La actividad de LDH se ensayó en el sobrenadante del medio de cultivo, y el porcentaje de liberación se calculó en relación a las U totales de los explantes de hígado incubados, como fue indicado en materiales y métodos. Los valores de cada columna representan la media de 20 platos de cultivo ± desviación estándar, donde el ensayo de la actividad enzimática se realizó por quintuplicado.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

A.3.3 Evaluación morfológica del efecto de PA1 sobre los peroxisomas hepáticos de *Macaca fascicularis* por medio de ML.

En síntesis la viabilidad del hígado por parámetros bioquímicos fue adecuada hasta las 6 - 8 horas (tablas V y VI), pero la histología normal de los explantes hepáticos no se conservó hasta este tiempo. Las células (hepatocitos) se encontraron bien preservadas sólo hasta aproximadamente las 4 horas en cultivo. Lo anterior se observó tanto en los explantes incubados en medio nutriente L-15 como en los incubados con los medios nutrientes Dulbecco y MEM. En base a estos hallazgos, los explantes de hígado se incubaron por 0.5, 1, 2 y 3 horas, y se analizaron por ML para evaluar el efecto de PA1 sobre los peroxisomas. Las concentraciones empleadas de PA1 fueron: 2.5, 5, 10 y 20 µg/ml.

En los explantes de hígado de los cultivos control se identificaron peroxisomas aislados por la positividad para la actividad de catalasa, con una distribución al azar. Por el contrario en el cultivo con PA1 se observaron además de los peroxisomas aislados, peroxisomas "agrupados en estructuras que asemejan racimos" y que están rodeados por un *halo claro* (figura 31). Debido a estos hallazgos, se llevó a cabo el análisis morfométrico por ML de estas dos clases de estructuras con positividad para la reacción citoquímica de catalasa (catalasa +), y posteriormente se analizaron las muestras con el microscopio electrónico de transmisión (MET) para conocer su ultraestructura (sección A.3.6).

La imagen de la distribución y morfología de los peroxisomas, vista bajo el microscopio de contraste de fases, y que fue descrita en el párrafo anterior tanto para el cultivo control como para el tratado con 10 µg/ml de PA1, fue *muy similar* para las otras condiciones experimentales del estudio piloto, esto es, a diferentes concentraciones y tiempos de incubación con PA1.

A.3.4 Evaluación morfológica del efecto de PA1 sobre los lisosomas hepáticos de *Macaca fascicularis* con ML.

Cuando se utilizó la técnica citoquímica de fosfatasa ácida, en general la marca de positividad para esta enzima fue más débil que la de catalasa, observándose más escasa, tanto para la muestra control como para las tratadas con PA1, a las diferentes condiciones experimentales del estudio piloto. Lo anterior significa que al observarse con el microscopio de luz, el citoplasma del hepatocito presentó poca marca de lisosomas, sobre todo el control, dificultándose por lo tanto su cuantificación exacta.

A.3.5 Análisis morfométrico por ML, del efecto de PA1 sobre los peroxisomas hepáticos de *Macaca fascicularis*.

Los resultados del estudio morfométrico con ML, por medio de la reacción citoquímica de catalasa, demostraron que en relación a su muestra control, el número de *peroxisomas aislados disminuyó* mientras que el de *peroxisomas agrupados aumentó* en cada tiempo de cultivo, a todas las concentraciones de PA1 probadas, observándose la respuesta máxima a las 2 horas de cultivo y a la concentración de 10 µg/ml (figuras 32 y 33).

Debido a estos hallazgos del análisis morfométrico con ML, en donde a las 2 horas de incubación con 10 µg/ml de PA1, se observó el mayor efecto de PA1 sobre los peroxisomas tanto aislados como agrupados, se decidió emplear únicamente esta dosis de 10 µg/ml de PA1 y cuatro tiempos de incubación y recolecta: 30, 60, 90 y 120 minutos, para los siguientes experimentos cuyos resultados se describen en el capítulo 3.

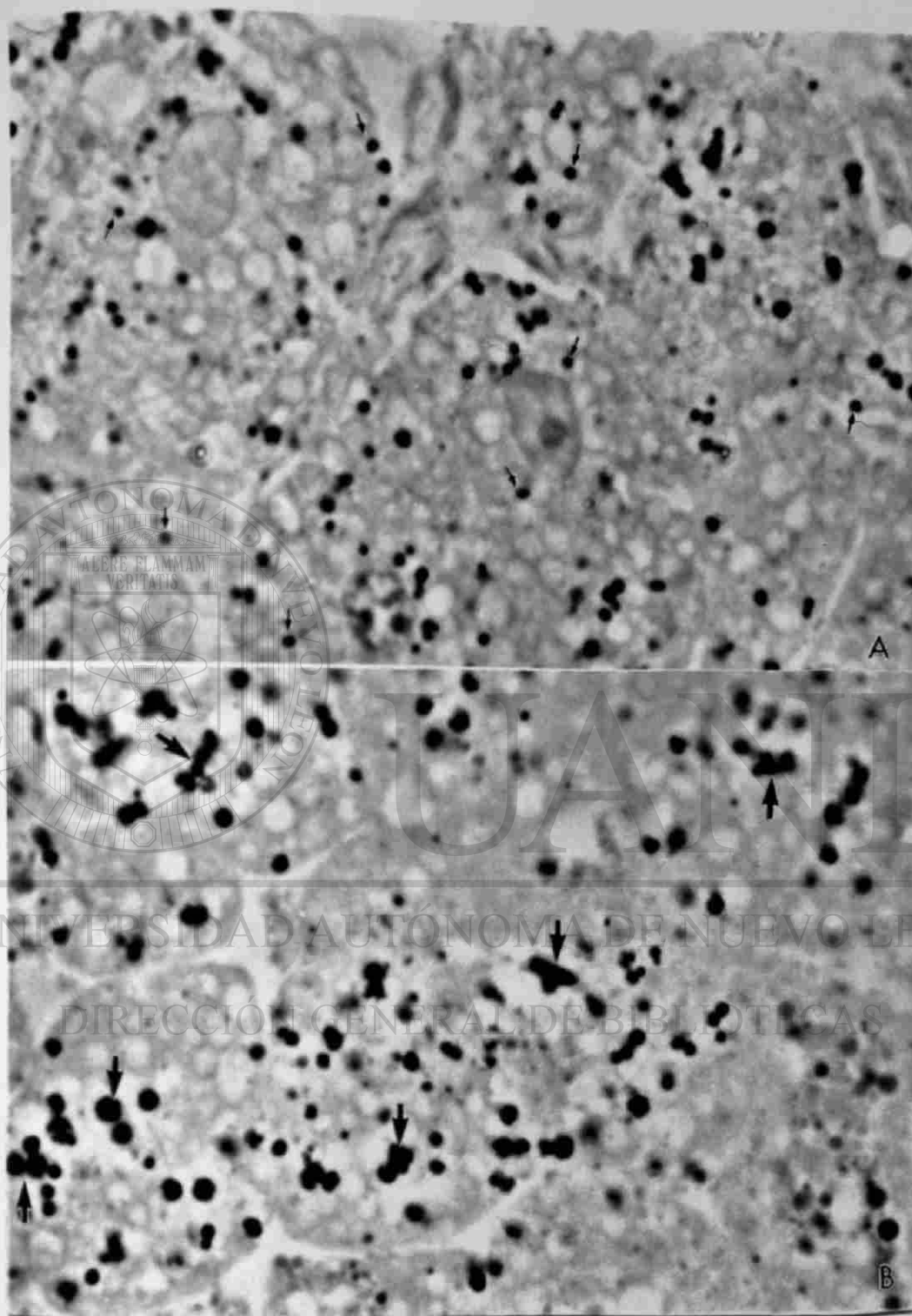


Figura 31. Explantes de hígado de *Macaca fascicularis*, incubados por 2 horas. A. Control sin peroxisomicina A1, y B. 10 µg/ml de peroxisomicina A1. Se observan en las micrografías, peroxisomas positivos a la reacción de catalasa, *aislados* (↑) y *agrupados* (↓). Microscopía de contraste de fases. Inclusión en resinas epóxicas. Reacción citoquímica de catalasa. 200 X.

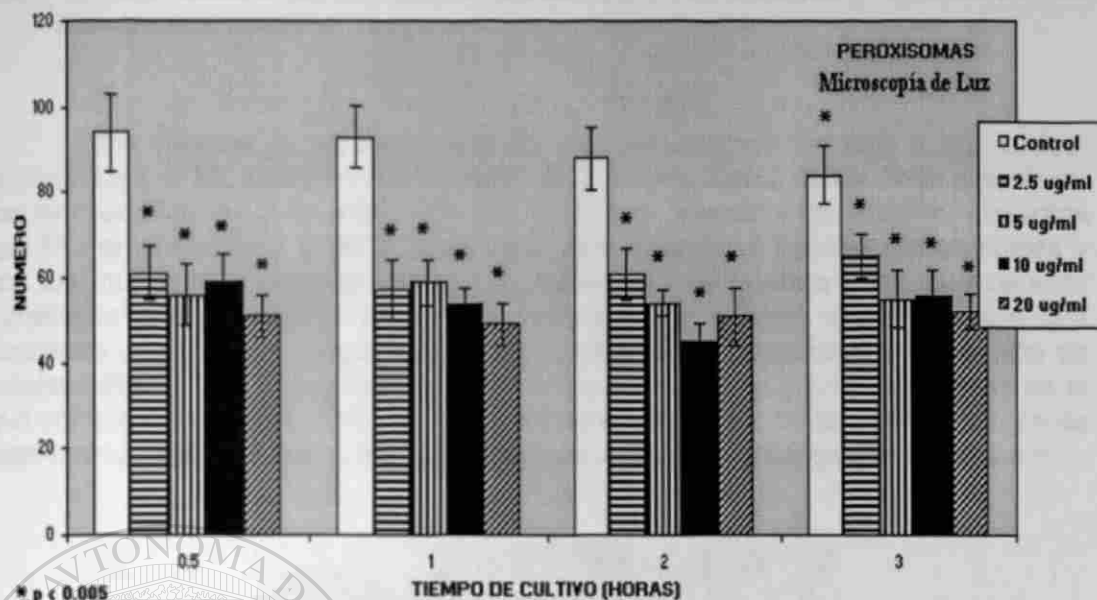


Figura 32. Efecto de varias concentraciones de peroxisomicina A1 (2.5, 5, 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$) sobre el número de *peroxisomas aislados* a diferentes tiempos de cultivo de los explantes del hígado de *Macaca fascicularis*. Los valores de cada barra representan la media \pm desviación estándar de 80 campos microscópicos contados, correspondientes a 20 platos de cultivo.

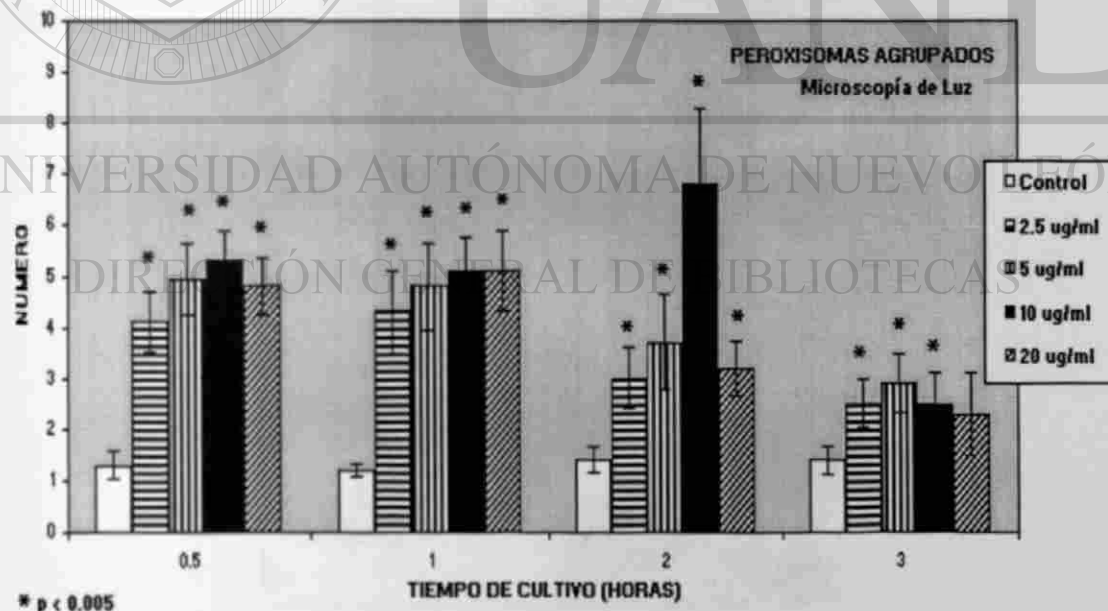


Figura 33. Efecto de varias concentraciones de peroxisomicina A1 (2.5, 5, 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$) sobre el número de *peroxisomas agrupados en racimos* a diferentes tiempos de cultivo de los explantes del hígado de *Macaca fascicularis*. Los valores de cada barra representan la media \pm desviación estándar de 80 campos microscópicos contados, correspondientes a 20 platos de cultivo.

A.3.6 Ultraestructura de los "peroxisomas hepáticos aislados y agrupados" de *Macaca fascicularis*.

Para conocer la ultraestructura de los "peroxisomas aislados y agrupados" observados por ML (sección A.3.3 y figura 31), se prepararon cortes finos a partir de los mismos bloques y se analizaron por MET. Los "peroxisomas aislados" descritos con ML, se observaron al MET como organelos esféricos o ligeramente elipsoides y con una matriz muy electrodensa por la positividad a la catalasa y los "peroxisomas agrupados", mostraron la imagen de vesículas que poseen una membrana que contienen uno o varios peroxisomas, identificados por la positividad a la reacción de catalasa (figura 34). El espacio existente entre la membrana y los peroxisomas es lo que corresponde al *halo claro* que se describió en la imagen de ML. La morfología de esta vesícula descrita con el MET, corresponde a la de un autofagosoma catalasa +.

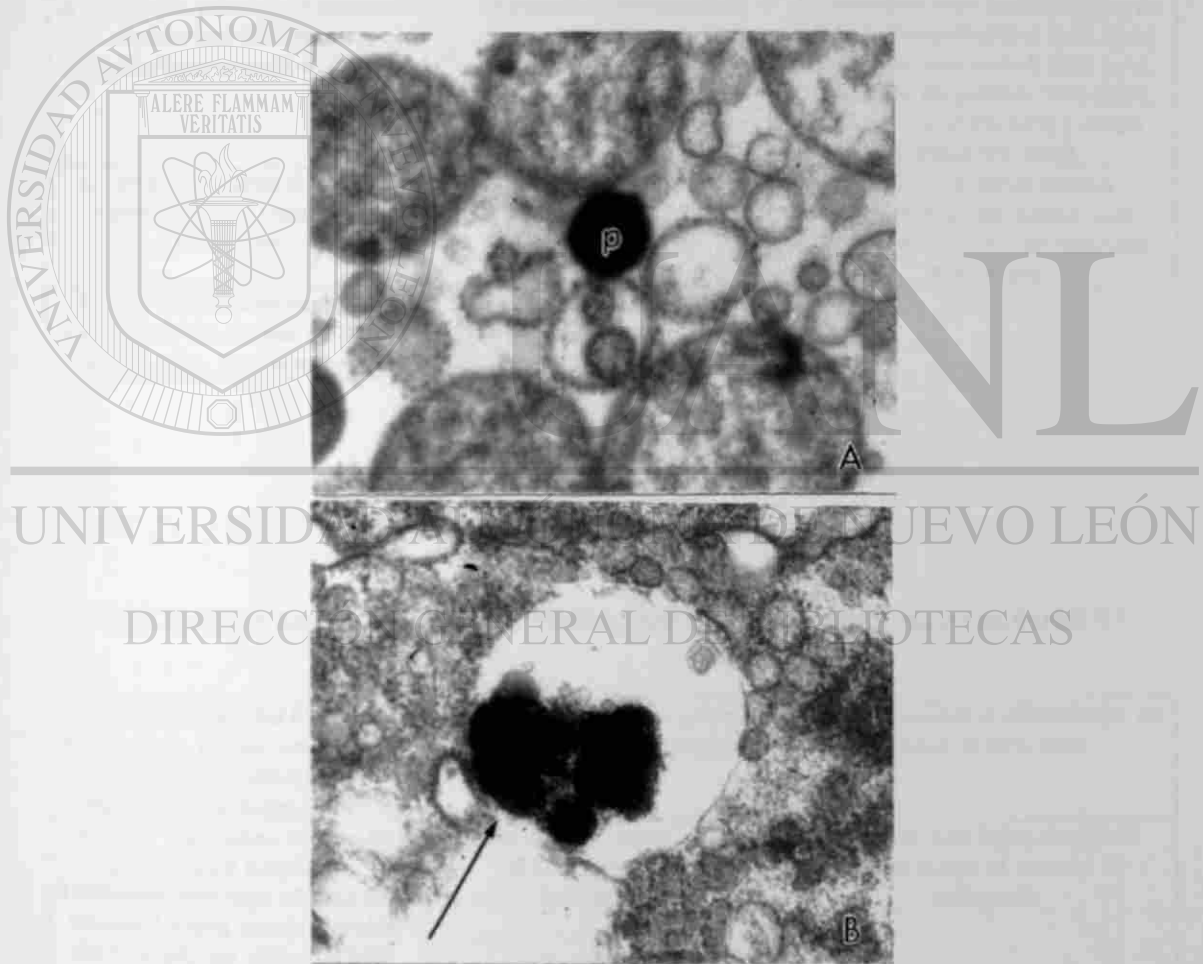


Figura 34. Explantes de hígado de *Macaca fascicularis*, incubados por 2 horas. A. Control. Se observa un peroxisoma (p). B. Incubado con 10 µg/ml de peroxisomicina A1. Se observa un autofagosoma. Membrana del autofagosoma que rodea a varios peroxisomas catalasa positivo (↑). Microscopía electrónica de transmisión. Inclusión en resinas epóxicas. Reacción citoquímica de catalasa. 4 400 X.

APÉNDICE B

TABLA 1

TINCIÓN CON HEMATOXILINA Y EOSINA.

1. Cortes (5 μm) del hígado en el Criostato, previa congelación rápida con nitrógeno líquido/isopentano a -70°C .	2. Enjuagar una vez con agua destilada, a temperatura ambiente.	3. Teñir los cortes por 3 minutos, con hematoxilina de Harris (hematoxilina 0.5% (p/v), óxido de mercurio 0.25% (p/v), alumbre de potasio 10% (p/v), en etanol al 5% (v/v) y ácido acético 4% (v/v)).
4. Lavar con agua destilada hasta quitar el exceso de colorante.	5. Por inmersión deshidratar en etanol al 70% (v/v).	4. Con 10 inmersiones contrateñir los cortes con eosina al 1% (p/v) en solución alcohólica.
7. Con 10 inmersiones cada uno, pasar los cortes en etanol al 70% (v/v), acetona y xilol.	8. Montar los cortes en resina (Entelan).	

TABLA 2

TECNICA PARA LA DETECCION DE GRASA POR LA TINCIÓN DEL ROJO OLEOSO 0^a.

1. Cortes (5 μm) del hígado en el Criostato, previa congelación rápida con nitrógeno líquido/isopentano a -70°C .	2. Enjuagar una vez con agua destilada, a temperatura ambiente.	3. Por inmersión deshidratar en etanol al 70% (v/v).
4. Teñir los cortes dentro de una jarra de Koplín por 5 minutos, con rojo oleoso (rojo oleoso 0 a una concentración de 1 - 2 g%, en etanol al 35% (v/v) y acetona 50% (v/v)).	5. Colocar los cortes en etanol al 70% (v/v) durante 3 - 4 minutos.	6. Lavar con agua destilada hasta quitar el exceso de colorante.
7. Contrateñir con hematoxilina de Harris por 3 minutos.	8. Lavar con agua destilada hasta quitar colorante.	9. Montar los cortes en glicerol gelatina.

^a Para los controles negativos, se siguió el mismo procedimiento pero se omitió el rojo oleoso.

TABLA 3

TECNICA PARA LA DETECCIÓN DE GLUCOGENO POR LA TINCIÓN DE LA REACCION DEL ACIDO PERYODICO DE SCHIFF (PAS) ^a.

1. Cortes (5 μ m) del hígado en el Criostatato, previa congelación rápida con nitrógeno líquido / isopentano a -70°C.	2. Enjuagar una vez con agua destilada, a temperatura ambiente.	3. Tratar durante 5 minutos, con ácido peryódico al 0.5% (p/v).	4. Lavar con varios cambios de agua destilada.
5. Tefir los cortes dentro de una jarra de Koplín por 5 - 15 minutos, con el reactivo de Schiff.	6. Lavar al chorro de agua durante 10 minutos.	7. Contrateñir con hematoxilina de Harris por 1 - 3 minutos.	8. Lavar al chorro de agua durante 2 minutos.
9. Deshidratar dos veces en etanol al 96% (v/v), durante 3 minutos cada uno, y en acetona por 3 minutos.	10. Aclarar, colocando en xilol dos veces, por 5 minutos cada uno.	11. Montar los cortes en resina (Entelan).	

^a Para los controles negativos, se trató previo al paso con ácido peryódico (0.5%), con saliva por 20 minutos. Posteriormente se lavó con agua destilada por 10 minutos y se continuó en paralelo desde el paso 3 hasta que finalizó, igual que sus respectivos problemas.

TABLA 4

METODO PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD DE TIROSINA AMINOTRANSFERASA ^a.

1. Preparar a 4°C, homogenizados de los fragmentos o explantes de hígado, con 3 o 4 volúmenes por g de tejido del amortiguador fosfato de potasio 50 mM pH 7.6.	2. Incubar a 37°C durante 10 minutos, 100 μ l del homogenizado (fuente de enzima) con 830 μ l de la mezcla de reacción (L-tirosina 4.217 mM, α -cetoglutarato 12 mM, fosfato de piridoxal 0.06 mM, en amortiguador de fosfato de potasio 0.12 M pH 7.8).	3. Añadir 70 μ l de hidróxido de potasio 10 N con inmediata agitación.
4. Después de 30 minutos a temperatura ambiente, determinar la absorbancia en el espectrofotómetro a 331 nm.	5. Para los cálculos de la actividad enzimática, se utiliza la absortividad molar del p-hidroxifenilpiruvato (19.9 cm ² / μ mol) y se aplica la fórmula correspondiente.	

^a Para los controles, en la incubación a 37°C, se les agregó primero el hidróxido de potasio y después la fuente de enzima, e inmediatamente se prosiguió igual que los problemas.

TABLA 5

METODO PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD DE LACTATO DESHIDROGENASA ^a.

<p>1. Preparar a 4°C, sobrenadantes (14 000 rpm, 5 - 10 minutos) de los medios de cultivo. Además obtener homogenizados de los fragmentos o explantes de hígado, con 3 o 4 volúmenes por g de tejido del amortiguador Tris-HCl 81.3 mM, pH 7.2 que contiene NaCl 203.3 mM, y centrifugar en las mismas condiciones señaladas arriba para obtener sobrenadantes de los homogenizados. Estos últimos sobrenadantes, se diluyeron para el ensayo de la actividad enzimática.</p>	<p>2. Sucesivamente pipetear en la cubeta espectrofotométrica 833 μl de la solución de β-NADH (0.113 mg/ml disuelto en el amortiguador de Tris-HCl, libre de inhibidores) y agregar 70 μl de sobrenadante del medio de cultivo o de sobrenadante del homogenizado, tapar la cubeta y agitar dos veces por inversión. Anotar el valor de la absorbancia de "fondo" (background) a 340 nm cada minuto hasta que la lectura se estabilice. Normalmente se determinó la absorbancia durante 3 a 4 minutos.</p>
<p>3. Iniciar la reacción enzimática por añadir 167 μl de piruvato de sodio (9.76 mM disuelto en el amortiguador de Tris-HCl), y de nueva cuenta tapar la cubeta y agitar dos veces por inversión. Anotar la <u>disminución en la absorbancia</u> a 340 nm cada minuto y monitorear hasta por 10 minutos, o hasta que ocurra un cambio lineal de la absorbancia de ≥ 0.2.</p>	<p>4. Para los cálculos de la actividad enzimática, se determina el cambio negativo en la absorbancia a partir de la adición del piruvato, se utiliza la absortividad molar del NADH (6.22 $\text{cm}^2/\mu\text{mol}$) y se aplica la fórmula correspondiente.</p>

^a Para los controles negativos, la reacción se llevo a cabo en ausencia de NADH.

TABLA 6

**TECNICA CITOQUIMICA PARA LA DETECCION DE LA ACTIVIDAD DE CATALASA
PEROXISOMAL ¹.**

1. Fijar las muestras a 4°C durante 60 - 90 minutos, con glutaraldehído 1.5% (v/v) en amortiguador de cacodilatos 0.1 M pH 7.2 - 7.4 adicionado con cloruro de calcio 0.05% (p/v).	2. Lavar 3 veces por 5 minutos cada uno y a 4°C, con amortiguador de cacodilatos 0.1 M pH 7.2 - 7.4 adicionado con sacarosa 7.5% (p/v).	3. Fragmentar las muestras hasta un grosor de 1 mm.	4. Incubar a 37 °C por 45 minutos, en medio DAB (diaminobenzidina 5 mM con peróxido de hidrógeno 0.15%) en amortiguador de glicina salina 0.1 M pH 10.5
5. Lavar 3 veces por 5 minutos cada uno, con amortiguador de cacodilatos 0.1 M pH 7.2 - 7.4 adicionado con sacarosa 7.5% (p/v).	6. Post fijar las muestras a 4°C durante 90 minutos, con tetraóxido de osmio al 2% (p/v) en amortiguador de cacodilatos 0.1 M pH 7.2 - 7.4.	7. Deshidratar las muestras durante 5 minutos cada uno, con etanol al 60%, 70%, 80% y 90% (v/v), y tres veces con etanol al 100%, por 10 minutos cada uno.	8. Colocar dos veces en el aclarante (óxido de propileno al 100%) durante 20 minutos cada uno.
9. Colocar durante toda la noche, en una mezcla 1:1 de epon (resinas epóxicas) - óxido de propileno.	10. Pre inclusión a temperatura ambiente durante 60 minutos, colocando las muestras en moldes para inclusión con epon al 100%.	11. Inclusión y polimerización a 60°C durante 24 - 48 horas.	

¹ Para los controles negativos, se incubaron a 37°C las muestras en el medio de DAB, en ausencia del sustrato (peróxido de hidrógeno).

TABLA 7

TECNICA CITOQUIMICA PARA LA DETECCION DE LA ACTIVIDAD DE FOSFATASA ACIDA LISOSOMAL ^a.

<p>1. Fijar las muestras a 4°C durante 120 minutos, con glutaraldehído 3% (v/v) en amortiguador de cacodilatos 0.1 M pH 7.2 - 7.4.</p>	<p>2. Lavar 3 veces por 5 minutos cada uno y a 4°C, con amortiguador de cacodilatos 0.1 M pH 7.2 - 7.4 adicionado con sacarosa 7.5% (p/v). Colocar después las muestras en el refrigerador por 12 - 24 horas, en el mismo amortiguador.</p>	<p>3. Fragmentar las muestras hasta un grosor de 1 mm.</p>	<p>4. Incubar a 37 °C por 60 minutos, en medio Gomori (β-glicerofosfato de sodio 8 mM, en amortiguador de tris maleato 0.04 M pH 5.4 adicionado con sacarosa 7.5% (p/v) y nitrato de plomo 0.13% (p/v)).</p>
<p>5. Lavar 2 veces por 2 minutos cada uno, con amortiguador de acetato de sodio 0.1 M pH 5.4.</p>	<p>6. Post fijar las muestras a 4°C durante 30 minutos, con tetraóxido de osmio al 2% (p/v) en amortiguador de cacodilatos 0.1 M pH 7.2 - 7.4.</p>	<p>7. Deshidratar las muestras durante 2 minutos cada uno, con acetona al 30%, 50%, y 70% (v/v), con acetona al 90% (v/v) por 5 minutos, y tres veces con acetona al 100%, por 5 minutos cada uno.</p>	<p>8. Colocar las muestras durante toda la noche, en una mezcla 1:1 de epon (resinas epóxicas) - acetona.</p>
<p>9. Pre inclusión a temperatura ambiente durante 60 minutos, colocando las muestras en moldes para inclusión con epon al 100%.</p>	<p>10. Inclusión y polimerización a 60°C durante 24 - 48 horas.</p>		

^a Para los controles negativos (identificación del depósito inespecífico de fosfato de plomo), se siguió el mismo procedimiento, pero en la incubación a 37°C, al medio Gomori no se le añadió sustrato (β-glicerofosfato de sodio).

TABLA 8

ENSAYO BIOQUIMICO PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD DE CATALASA PEROXISOMAL ^a.

<p>1. Preparar a 4°C, homogenizados de los explantes de hígado con 6 o 7 volúmenes por g de tejido del amortiguador fosfato de potasio 50 mM pH 7.4. Algunos homogenizados se diluyeron con el mismo amortiguador para el ensayo de la actividad enzimática.</p>	<p>2. Sucesivamente pipetear en la cubeta espectrofotométrica 950 µl del amortiguador fosfato de potasio 50 mM pH 7.4. y agregarle 40 µl del homogenizado, tapar la cubeta y agitar dos veces por inversión. Anotar el valor de la absorbancia a 240 nm el cual corresponde al blanco de reactivos.</p>
<p>3. Iniciar la reacción enzimática al añadir 10 µl de peróxido de hidrógeno (6% v/v en amortiguador fosfato de potasio 50 mM pH 7.4), de nueva cuenta tapar la cubeta y agitar dos veces por inversión. Anotar la <u>disminución en la absorbancia</u> a 240 nm cada minuto y monitorear la cinética enzimática hasta por 6 minutos.</p>	<p>4. Para los cálculos de la actividad enzimática se determina la disminución de la absorbancia del peróxido de hidrógeno, se utiliza su absorptividad molar (0.036 cm²/µmol) y se aplica la fórmula correspondiente.</p>

^a Para los controles negativos, la reacción se efectuó en ausencia de peróxido de hidrógeno. Además, también se prepararon controles positivos con catalasa purificada de hígado de ratón.

TABLA 9

ENSAYO BIOQUIMICO PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD DE TIOLASA PEROXISOMAL ^a.

<p>1. Preparar a 4°C, homogenizados de los explantes de hígado con 6 o 7 volúmenes por g de tejido del amortiguador Tris-HCl 10 mM, pH 7.4. Algunos homogenizados se diluyeron con el mismo amortiguador para el ensayo de la actividad enzimática.</p>	<p>2. Sucesivamente pipetear en la cubeta espectrofotométrica 950 µl de la mezcla de reacción ^b (MgCl₂ 26.18 mM, piruvato de sodio 10.47 mM, NAD⁺ 1.047 mM, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa 10.47 µg/ml, lactato deshidrogenasa 20.95 mM, en 900 µl de amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 9.0 con 50 µg/ml BSA y 50 mM KCl), agregar 35 µl del homogenizado y 5 µl del sustrato DL-3-hidroxi-decanoil-CoA éster (10 mM), tapar la cubeta y agitar dos veces por inversión. Anotar el valor de la absorbancia a 303 nm hasta un aumento máximo a los 3 o 4 minutos. Este aumento corresponde a la actividad de epimerasa.</p>
<p>3. Iniciar la reacción enzimática de tiolasa al añadir 10 µl de CoA-SH (14.98 mM), de nueva cuenta tapar la cubeta y agitar dos veces por inversión. Anotar la <u>disminución en la absorbancia</u> a 303 nm cada minuto y monitorear la cinética enzimática hasta por 10 minutos.</p>	<p>4. Para los cálculos de la actividad enzimática se determina la disminución de la absorbancia del complejo de 3-cetooacil-decanoil-CoA con Mg a partir de la adición de la CoA-SH, se utiliza la absorptividad molar del complejo (13.4 cm²/µmol) y se aplica la fórmula correspondiente.</p>

^a Para los controles negativos, la reacción se llevo a cabo en ausencia de sustrato y de CoA-SH.

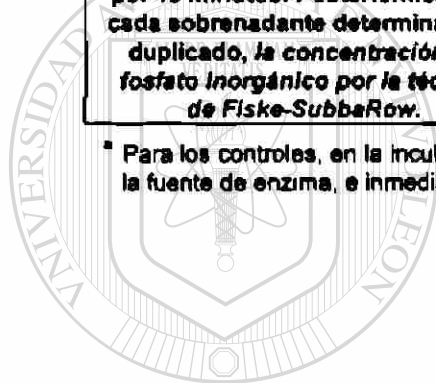
^b En la mezcla de reacción se utilizaron las dos enzimas diluidas en el amortiguador Tris-HCl 10 mM pH 7.4.

TABLA 10

**ENSAYO BIOQUIMICO PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD DE FOSFATASA
ACIDA LISOSOMAL ^a.**

<p>1. Preparar a 4°C, homogenizados de los fragmentos o explantes de hígado, con 6 o 7 volúmenes por g de tejido del amortiguador acetato de sodio 0.1 M pH 5.0.</p>	<p>2. Incubar a 37°C durante 15 minutos, 0.1 ml del homogenizado (fuente de enzima) con 1.9 ml de la mezcla de reacción (β-glicerofosfato de sodio 52.632 mM, Tritón X-100 0.211% v/v, en amortiguador acetato de sodio 26.32 mM pH 5.0).</p>	<p>3. Añadir 0.5 ml de ácido tricloroacético 30% (p/v) con inmediata agitación.</p>
<p>4. Centrifugar los tubos a 3000 rpm por 15 minutos. Posteriormente, a cada sobrenadante determinar por duplicado, la concentración de fosfato inorgánico por la técnica de Fiske-SubbaRow.</p>	<p>5. Para los cálculos de la actividad enzimática, se utilizan los valores de la curva patrón de fosfato inorgánico y se aplica la fórmula correspondiente.</p>	

^a Para los controles, en la incubación a 37°C, se les agregó primero el ácido tricloroacético y después la fuente de enzima, e inmediatamente se procedió igual que los problemas.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TABLA 11

TECNICA DE FISKE-SUBBAROW PARA LA DETERMINACION DE FOSFATO INORGANICO ^a.

1. A 1 ml de sobrenadante (post centrifugación a 2500 rpm) agregar 1 ml de H ₂ SO ₄ 5N con agitación vigorosa.	2. Después, añadir 1 ml de molibdato de amonio 2.5% (p/v), 0.4 ml de la solución reductante * y llevar con agua destilada hasta un volumen de 5 ml, e inmediatamente agitar.	3. Mantener los tubos 10 minutos a temperatura ambiente y determinar la absorbancia a 660 nm.
--	--	---

^a Simultáneamente con los sobrenadantes control y problema, se preparó para cada experimento una curva patrón de fosfato inorgánico, para lo cual se empleó una solución de trabajo de KH₂PO₄ 1mM. De esta solución se tomaron los volúmenes adecuados para obtener los estándares de fosfato, que fueron desde 0.1 hasta 1 μmol y se diluyó hasta 1 ml con el amortiguador de homogenización a la misma concentración final que tienen las muestras. Después se procedió igual que para los sobrenadantes de las muestras.

* Reactivo reductor de Fiske & Subbarow (ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico, sulfito de sodio y bisulfito de sodio) de Sigma: 0.25 g del reactivo se disolvió en agua desionizada hasta un volumen de 10 ml (solución reductante).

CURVA PATRON DE FOSFATO FISKE & SUBBAROW

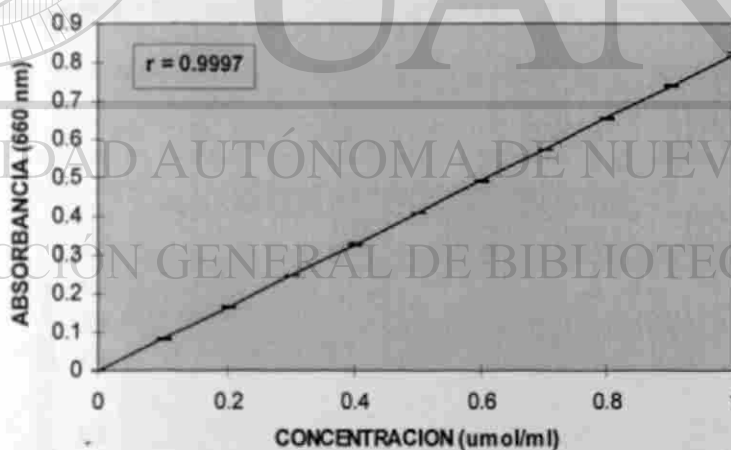


Figura 35. Curva patrón de fosfato inorgánico, cada punto representa el promedio de 15 curvas patrón con su desviación estándar, y los puntos de cada curva resultaron del análisis de cuatro determinaciones.

TABLA 12

ENSAYO BIOQUIMICO PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD DE CATEPSINA D LISOSOMAL *.

<p>1. Preparar a 4°C, homogenizados de los fragmentos o explantes de hígado, con 6 o 7 volúmenes por g de tejido del amortiguador acetato de sodio 0.1 M pH 3.8.</p>	<p>2. Incubar a 37°C durante 40 minutos, 0.1 ml del homogenizado (fuente de enzima) con 1.9 ml de la mezcla de reacción (1.0 ml solución acuosa de hemoglobina dializada 2% p/v, 0.4 ml agua desionizada, y 0.5 ml de amortiguador acetato de sodio 0.1 M pH 3.8).</p>	<p>3. Añadir 2.0 ml de ácido tricloroacético 5% (p/v) con inmediata agitación.</p>
<p>4. Colocar los tubos en hielo por 15 minutos y centrifugar a 3000 rpm por 15 minutos. Posteriormente, filtrar los sobrenadantes y a cada uno, medirles la concentración de L-tirosina, por determinar la absorbancia a 280 nm.</p>	<p>5. Para los cálculos de la actividad enzimática, se utilizan los valores de la curva patrón de L-tirosina * y se aplica la fórmula correspondiente.</p>	

* Para los controles, en la incubación a 37°C, se les agregó primero el ácido tricloroacético y después la fuente de enzima, e inmediatamente se prosiguió igual que los problemas.

* Simultáneamente con los sobrenadantes control y problema, se preparó para cada experimento una curva patrón de L-tirosina, para lo cual se empleó una solución de trabajo de L-tirosina 250 µg/ml. De esta solución se tomaron los volúmenes adecuados para obtener los estándares de tirosina, que fueron desde 12.5 hasta 250 µg/ml y se diluyó hasta 1 ml con el amortiguador de homogenización a la misma concentración final que tienen las muestras. Después se procedió igual que para los sobrenadantes de las muestras.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
CURVA PATRON DE L-TIROSINA

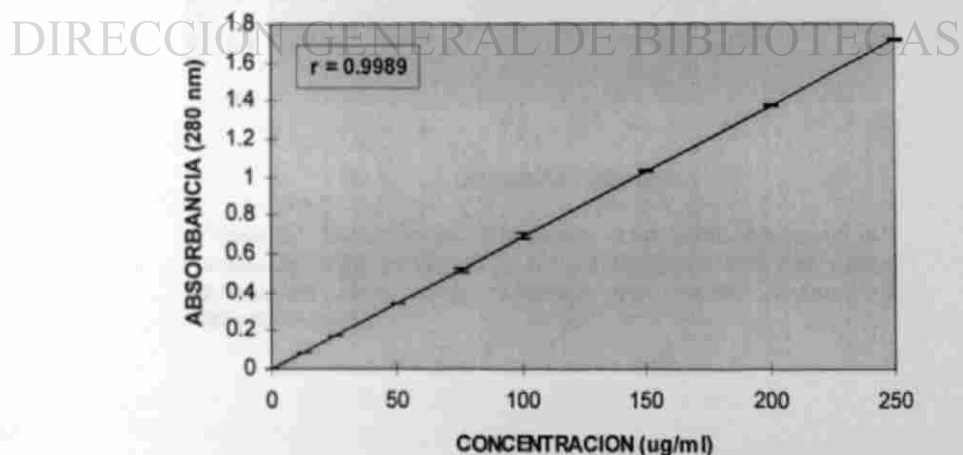


Figura 36. Curva patrón de L-tirosina, cada punto representa el promedio de 15 curvas patrón con su desviación estándar, y los puntos de cada curva resultaron del análisis de cuatro determinaciones.

TABLA 13

METODO DE BRADFORD PARA DETERMINAR LA CONCENTRACION DE PROTEINA ^a.

1. Pipetar 0.2 ml de cada muestra (con dilución adecuada) y añadir 1 ml del colorante de Bio-Rad (diluido 1:5 con agua desionizada: azul brillante de Coomassie G-250, ácido fosfórico y metanol; ensayo estándar). Filtrar el colorante diluido inmediatamente antes de utilizarse.	2. Mantener las soluciones 30 minutos a temperatura ambiente y determinar su absorbancia a 595 nm.	3. Para los cálculos de la concentración de proteína, se utilizan los valores de la curva patrón de BSA y se aplica la fórmula correspondiente.
--	--	---

^a Simultáneamente con las muestras, se preparó para cada experimento curvas patrón de proteína, ya sea con el amortiguador de homogenización de pH 7.4 o con el de pH 5.0, para lo cual se empleó una solución de trabajo (Bio-Rad) con albúmina sérica bovina (BSA) de 1 mg/ml. De esta solución se tomaron los volúmenes adecuados para obtener los estándares de proteína, que fueron desde 2.5 hasta 20 µg/ml y se diluyó hasta 0.2 ml con el amortiguador de homogenización a la misma concentración final que tienen las muestras. Después se procedió igual que para las muestras.

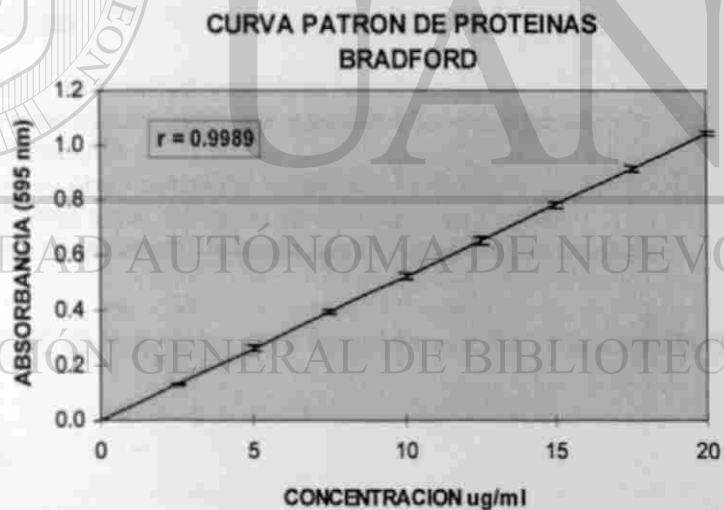


Figura 37. Curva patrón de proteína, cada punto representa el promedio de 20 curvas patrón con su desviación estándar, y los puntos de cada curva resultaron del análisis de cuatro determinaciones.

APENDICE C

CALCULO DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA.

Los ensayos bioquímicos para determinar la actividad de todas las enzimas fueron por métodos espectrofotométricos. En las determinaciones espectrofotométricas se emplearon cubetas de vidrio, en el espectro visible, y cubetas de cuarzo para el ultravioleta, ambas con 1 cm de trayecto óptico.

La deducción de la ecuación general para la obtención de la actividad enzimática, por métodos espectrofotométricos, se basa en dos principios fundamentales: la definición internacional de unidad de actividad enzimática y la ley de Lambert-Beer, ley que establece que el cambio de absorbancia es directamente proporcional tanto a la absorptividad molar y al cambio de concentración del compuesto en análisis, como al trayecto óptico del haz. Lo anterior se expresa matemática y respectivamente como:

$$U = \Delta C / t$$

Ecuación (1)

$$\Delta A = (\epsilon) (\Delta C) (d)$$

Ecuación (2)

Donde: U = Unidades de actividad enzimática ($\mu\text{mol}/\text{minuto}$)

ΔC = Cambio de concentración del sustrato o producto (μmol)

t = Tiempo (minuto)

ΔA = Cambio de absorbancia del sustrato o producto

ϵ = Absorptividad molar del sustrato o producto ($\text{cm}^2/\mu\text{mol}$)

d = Espesor de la cubeta (distancia que recorre el haz de luz) (cm)

Al despejar ΔC en la ecuación (1) y después sustituirla en la ecuación (2) se obtiene la ecuación (3):

$$\Delta C = (U) (t)$$

$$\Delta A = (\epsilon) (U) (t) (d)$$

Ecuación (3)

Si se despeja U de la ecuación (3) resulta:

$$U = \Delta A / (\epsilon) (t) (d)$$

Dado que U/ml proviene de las dimensiones de ϵ t d ya que:

$$U = \mu\text{mol}/\text{min}$$

$$U/\text{ml} = \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$$

$$U = \frac{\Delta A}{(\text{cm}^2/\mu\text{mol}) (\text{min}) (\text{cm})} = \frac{\Delta A}{(\text{min}/\mu\text{mol}) (\text{cm}^3)} = \Delta A (\mu\text{mol}/\text{min}) (\text{ml})$$

Por lo tanto la ecuación (3) se puede expresar

por unidad de volumen (U/ml) de la siguiente forma:

$$U/ml = \Delta A / (\epsilon) (l) (d)$$

Ecuación general para el cálculo de la actividad enzimática.

Esta ecuación general, fue la que se empleó para el cálculo de las actividades de lactato deshidrogenasa, catalasa y tiolasa peroxisomal; para la actividad de tirosina aminotransferasa se utilizó la misma ecuación pero en lugar de utilizar ΔA fue A (absorbancia neta, porque se le restó la absorbancia del control a la del problema). Además para el cálculo de las actividades enzimáticas se consideraron otros parámetros tales como: el volumen total del ensayo en la mezcla de reacción (ya sea en el tubo de ensayo o en la cubeta del espectrofotómetro) y la dilución de la enzima, tanto en la mezcla de reacción como en la muestra biológica, ésta última normalmente fue un homogenizado.

Si por definición una unidad (U) es la transformación o la destrucción de 1 μmol de sustrato o la formación de 1 μmol de producto *por minuto* durante la reacción enzimática, se efectuaron para todas las enzimas, las correcciones necesarias para expresar la actividad enzimática por minuto, esto es, se tomaron en cuenta los tiempos reales del ensayo para cada enzima en particular, como lo indica la fórmula respectiva en el capítulo de materiales y métodos.

Por ejemplo para obtener la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) se utilizó la siguiente fórmula:

$$U/ml = \frac{\Delta \text{Abs. (340 nm)}}{(6.22 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}) (1 \text{ cm}) (\text{min})} \times \frac{1 \text{ min}}{10 \text{ min}} \times \frac{1.07 \text{ ml}}{0.07 \text{ ml}} \times \text{dilución}^*$$

* $\epsilon = 6.22 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$ del NADH

10 min = Tiempo del ensayo

1.07 ml = Volumen total del ensayo en la cubeta

0.07 ml = Volumen de la fuente de enzima en la cubeta

Dilución de la fuente de enzima (sobrenadante del medio de cultivo u homogenizado).

De forma tal que:

$$U/ml = \frac{\Delta \text{Abs. (340 nm)}}{(6.22 \text{ cm}^2 \text{ min}/\mu\text{mol})} \times \frac{1 \text{ min}}{10 \text{ min}} \times \frac{1.07 \text{ ml}}{0.07 \text{ ml}} \times \text{dilución}$$

$$U/ml = (\Delta \text{Abs.}) (1/6.22 \mu\text{mol}/\text{min ml}) \times 0.1 \times 15.286 \times \text{dilución}$$

$$U/ml = (\Delta \text{Abs.}) (0.161 \mu\text{mol}/\text{min ml}) \times 0.1 \times 15.286 \times \text{dilución}$$

$$U/ml = (\Delta \text{Abs.}) (0.161 \text{ U/ml}) \times 0.1 \times 15.286 \times \text{dilución}$$

$$U/ml = (\Delta \text{Abs.}) (0.246 \text{ U/ml}) \times \text{dilución}$$

Esto es, al multiplicar el cambio de absorbancia del NADH por el factor 0.246, se obtuvo la actividad en U/ml de LDH en la cubeta, y su actividad en la muestra biológica se calculó tomando en cuenta la dilución previa de la enzima, ya sea en el sobrenadante del medio de cultivo u homogenizado. Normalmente en el sobrenadante no se diluyó y en el homogenizado la dilución fue de 1:50 o de 1:100.

Al igual que para este ejemplo, en el que se obtuvo un factor para el cálculo de la actividad enzimática, se procedió para las otras enzimas.

En el ensayo bioquímico de la actividad de las dos enzimas lisosomales, fosfatasa ácida y catepsina D, el cálculo de su actividad, se basó en los mismos principios de lo que es la unidad enzimática y la ley de Lambert-Beer, sin embargo en esta ocasión en lugar de utilizar absorbancia molar (ϵ), se emplearon estándares de concentración conocida a los que se les determinó su absorbancia y se prepararon las curvas patrón respectivas, para posteriormente calcular la concentración de los problemas aplicando la ecuación de la recta:

$$Y = mX + b \quad \text{Ecuación (4)}$$

Donde: Y = Absorbancia del problema
X = Concentración del problema
m = pendiente de la recta
b = intercepto con el eje Y

Por lo tanto al despejar X en la ecuación (4) tenemos:

$$X = \frac{Y - b}{m}$$

Si el intercepto es cero se obtiene:

$$X = \frac{Y}{m}$$

Ecuación general para el cálculo de la actividad enzimática, para los ensayos de fosfatasa ácida y catepsina D, esto es para determinar la concentración del sustrato o el producto de la reacción enzimática en curvas patrón preparadas para tal fin.

Para calcular la pendiente de la recta se utilizó la ecuación (5) con los datos de los estándares de concentración conocida, de forma tal que:

$$m = \frac{Y_2 - Y_1}{X_2 - X_1} \quad \text{Ecuación (5)}$$

Donde: $Y_2 - Y_1$ = Absorbancias del estándar
 $X_2 - X_1$ = Concentraciones conocidas del estándar

Al sustituir m en la ecuación general (ecuación 4 despejada) se obtiene:

$$X = Y / \frac{Y_2 - Y_1}{X_2 - X_1}$$

Esto es:

$$X = Y \left[\frac{X_2 - X_1}{Y_2 - Y_1} \right]$$

$$X = \frac{Y}{(Y_2 - Y_1)} (X_2 - X_1)$$

Por razones de simplicidad la fórmula anterior se puede expresar:

$$\text{Conc. Problema} = \frac{\text{Abs. Problema}}{\text{Abs. Estándar}} \times \text{Conc. Estándar} \quad \text{Ecuación (6)}$$

Por lo anterior, en el capítulo de materiales y métodos en la sección correspondiente al cálculo de la actividad de fosfatasa ácida y catepsina D, la fórmula matemática se describió como se muestra arriba, aunque como ya se indicó para su obtención de la actividad enzimática, primero se determinó la pendiente de cada recta para poderse aplicar la ecuación general y posteriormente se corrigió en base a parámetros como son el tiempo y el volumen específicos del ensayo para cada enzima.

Por ejemplo para obtener la actividad de fosfatasa ácida lisosomal se utilizó la siguiente fórmula, que es la ecuación (7):

$$U/ml = \frac{\text{Abs. Problema (660 nm)}}{\text{Abs. Estándar}} \times \text{Conc. Estándar} \times \frac{1 \text{ min}}{15 \text{ min}} \times \frac{5.0 \text{ ml}}{0.1 \text{ ml}} \times \text{dilución}^*$$

* 0.1 = Abs del problema = Y

0.329 y 0.657 = Abs. de los estándares

0.4 y 0.8 $\mu\text{mol/ml}$ = Concentración de los estándares (ver curva patrón de fosfato inorgánico en el apéndice A)

15 min = Tiempo del ensayo

5.0 ml = Volumen total para la determinación de fosfato inorgánico (Fiske-SubbaRow)

0.1 ml = Volumen de la fuente de enzima

Dilución de la fuente de enzima (homogenizado).

De forma tal que:

Primero se calculó la pendiente (ecuación 5) de la recta correspondiente, esto es:

$$\frac{0.657 - 0.329}{0.8 - 0.4 \mu\text{mol/ml}} = 0.82 \text{ ml/} \mu\text{mol}$$

Después, de acuerdo a la ecuación 4 se calculó la concentración de fosfato en el problema

$X = \frac{Y}{m}$ Ecuación general para el cálculo de la actividad enzimática, en curvas patrón con intercepto cero

$$X = \text{Conc. de fosfato en el problema} = \frac{0.1}{0.82 \text{ ml/} \mu\text{mol}} = 0.122 \mu\text{mol/ml}$$

Por último, como la ecuación 6 se substituye en la ecuación 7, obtenemos:

$$U/ml = \text{Concentración de fosfato en el problema} \times \frac{1 \text{ min}}{15 \text{ min}} \times \frac{5.0 \text{ ml}}{0.1 \text{ ml}} \times \text{dilución}$$

$$U/ml = 0.122 \mu\text{mol/ml} \times \frac{1 \text{ min}}{15 \text{ min}} \times \frac{5.0 \text{ ml}}{0.1 \text{ ml}} \times \text{dilución}$$

$$U/ml = 0.122 \mu\text{mol/ml} \times 0.06666 \times 50 \times \text{dilución}$$

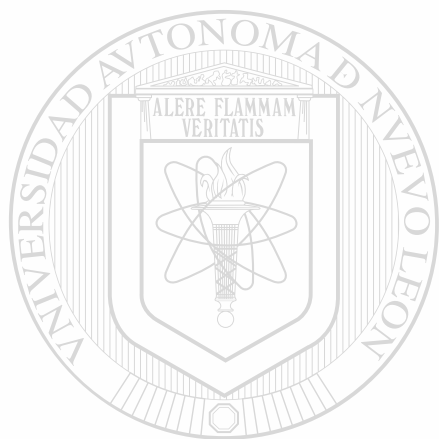
$$U/ml = 0.4066 \mu\text{mol/ml} \times \text{dilución}$$

Si una unidad de FAc lisosomal se definió como la producción de $1\mu\text{mol}$ de fosfato, por 1 minuto, a 37°C , y además no se diluyo el homogenizado, entonces tenemos que:

$$U/ml = 0.4066$$

Actividad de FAc

Para determinar la *actividad específica* de cualquiera de las enzimas descritas, la actividad en U/ ml se dividió entre la concentración de proteína (mg/ml), lo cual refleja de una manera más adecuada algún cambio que pudiese tener la actividad enzimática, dado que se esta conociendo la proporción de la enzima en cuestión con respecto a la concentración de proteínas.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

REFERENCIAS

1. Fernández, Nava R. (1992). Nombres comunes, usos y distribución geográfica del género *Karwinskia* (Rhamnaceae) en México. *Anales Inst. Biol. UNAM, Ser.Bot.* **63**: 1-23.
2. Segovia A. y Zermeno F. (1972). Poliradiculitis tóxica por *Karwinskia humboldtiana*. A propósito de un caso. *Med. Hosp. Infant. Méx.* **29**: 87.
3. Montoya M., López G., y Hernández A. (1982). Intoxicación por *Karwinskia humboldtiana*. Conceptos actuales. *Rev. Med. IMSS (Méx.)* **6**: 707-709.
4. Padrón-Puyou F. (1951). Estudio clínico experimental de la parálisis por *Karwinskia humboldtiana* (tullidora) en niños. *Gac. Méd. Méx.* **81**: 299-311.
5. Bermúdez de Rocha M.V., Lozano Meléndez F.E., Salazar Leal M.E., Waksman de Torres N. y Piñeyro López A. (1995). Intoxicación de una familia por *Karwinskia humboldtiana* (tullidora). *Gac. Méd. Méx. (Casos Clínicos)* **131**: 100-106.
6. Bermúdez-de Rocha M.V., Lozano-Meléndez F.E., Tamez-Rodríguez V.A., Díaz-Cuello G. y Piñeyro-López A. (1995). Frecuencia de intoxicación con *Karwinskia humboldtiana* en México. *Salud Pública Méx.* **37**: 57-62.
7. Puertolas M., Nava O., Medina H., López F., Oyervides J. (1984). Poliradiculoneuritis por *Karwinskia humboldtiana*. *Rev. Med. IMSS (Méx.)* **22**: 22-27.
8. Clavijero F.X. (1982). Plantas nocivas y extravagantes. En: Manuel León Portilla (Editor), "Historia de la Antigua o Baja California", Editorial Porrúa 3era. edición, pp 31-33. Citado en: Piñeyro L.A. (1990) Toxicidad selectiva *in vitro* de la toxina T 514 de la *Karwinskia humboldtiana*. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N.L., México.
9. Ruiz-Ordoñez J., Torres C.T. y Piñeyro López A. (1991). Aspectos morfológicos relevantes en el fruto de *Karwinskia humboldtiana* Zucc. (Coyotillo). Memorias del IX Encuentro de Investigación Biomédica (Trabajo mural). Facultad de Medicina, UANL.
10. Padrón Francisco. (1956). El Médico y el Folklore. Talleres Gráficos de la Editorial Universitaria, San Luis Potosí, S.L.P., Méx. pp 140-141.
11. Dreyer D.L., Arai I., Bachman C.D., Anderson W.R., Jr., Smith R.G., and Daves G.D., Jr. (1975) Toxins causing noninflammatory paralytic neuropathy. Isolation and structure elucidation. *J. Am. Chem. Soc.* **97**: 4895-4890.
12. Lisková D., Ruiz O.J., Lux A., and Piñeyro I.A. (1994). Tissue culture of *Karwinskia humboldtiana* -a plant producing toxins with antitumoural effects. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* **36**: 339-343.
13. Guerrero M., Piñeyro A. and Waksman N. (1987). Extraction and quantification of toxins from *Karwinskia humboldtiana* (tullidora). *Toxicon.* **25**: 565-568.

14. Waksman N. and Martínez L. (1989). Chemical and toxicological screening in genus *Karwinskia* (México). *Rev. Latinoamer. Quim.* 20/1: 27-29.
15. Waksman de Torres N. and Ramírez Durón R. (1992). Isolation of a new dimeric anthracenone from *Karwinskia parvifolia*. *Rev. Latinoamer. Quim.* 23/1 and 22/4: 25-27.
16. Rivas V., Torres R., and Waksman N. (1990). Dimeric anthracenones from *Karwinskia* species. *Planta Médica* 56: 562-563.
17. Piñeyro L.A. (1990) Toxicidad selectiva *in vitro* de la toxina T 514 de la *Karwinskia humboldtiana*. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N.L., México.
18. 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.
19. Bermúdez M.V., Martínez F.J., Salazar M.E., Waksman N. and Piñeyro A. (1992). Experimental acute intoxication with ripe fruit of *Karwinskia humboldtiana* (tullidora) in rat, guinea-pig, hamster, and dog. *Toxicon*. 30: 1493-1496.
20. Sepúlveda-Saavedra J., González-Corona B., Támez-Rodríguez V.A., Bermúdez de Rocha M.V., y Piñeyro-López A. (1992). Ultrastructure of the lesion induced by toxin T-514 isolated from *K. humboldtiana* in the alveolar region of the lung. Proc. 50th Ann. Meet. EMSA. Bailey G.W., Bentley J., Small J.A. (Editors). Published by San Francisco Press, Inc. pp.640-641.
21. Támez Rodríguez V.A., Sepúlveda Saavedra J., Bermúdez de Rocha M.V., y Piñeyro López, A. (1991). Autofagia de peroxisomas en el hígado del macaco *Fascicularis* intoxicado con peroxisomicina A1 (T-514). Memorias del IX Encuentro de Investigación Biomédica (Trabajo mural). Facultad de Medicina, UANL.
22. Piñeyro López A., González Guerrero J.F., Vidal Gutiérrez O., Lozano Meléndez F., Ancer Rodríguez J., Marfil Rivero J., González Alanís R., y Piñeyro Garza E. (1992). Estudio Fase I de la T-514 (peroxisomicina): Resultados clínicos. Memorias del IX Encuentro de Investigación Biomédica. Facultad de Medicina, UANL. pp 159.
23. Támez Rodríguez V.A., Ancer-Rodríguez J., Sepúlveda Saavedra J., Bermúdez de Rocha M.V., y Piñeyro López, A. (1989). Cambios histopatológicos y ultraestructurales en riñón e hígado de *Macacus rhesus* producidos por la T-514 aislada de la *Karwinskia humboldtiana* (tullidora). Memorias del VII Encuentro Regional de Investigación Biomédica. Facultad de Medicina, UANL. pp 18.
24. French S.W. Biochemical basis for alcohol-induced liver injury. (1989). *Clin. Biochem.* 22: 41-49.
25. Riede U. N., Fringes B., and Moore G.W. (1983). Peroxisomes in cellular injury and disease. In *Cellular Pathobiology of Human Disease*. Gustav Fisher New York, Inc. pp 139-170.
26. Bosch H. van den, Schutgens R.B.H., Wanders R.J.A., and Tager J.M. (1992). Biochemistry of peroxisomes. *Ann. Rev. Biochem.* 61: 157-197.

27. Garza-Ocañas L., Hsieh G.C., Acosta D., Torres-Alanis O., and Piñeyro-López A. (1992). Toxicity assesment of toxins T-514 and T-544 of buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*) in primary skin and liver cell cultures. *Toxicology* 73: 191-201.
28. Garza-Ocañas L., Jiang T., Acosta D., Torres-Alanis O., Waksman de Torres N., and Piñeyro-López A. (1994). Comparison of the hepatotoxicity of toxin T-514 of *Karwinskia humboldtiana* and its diastereoisomer in primary liver cell cultures. *Toxicol.* 32: 1287-1291.
29. Martínez F.J., Ramírez R., Waksman N., and Piñeyro A. (1996). Experimental evidence for toxic damage induced by a dimeric anthracenone: diast. T-514 (peroxisomicine A2). *Toxicol. Lett.* 90: 155-162.
30. Garza-Ocañas L., Torres-Alanis O., and Piñeyro-López A. (1990). Effect of toxin 514 of *Karwinskia humboldtiana* on liver microsomal lipid peroxidation stimulated by Fe²⁺-ADP complexes and NADPH *in vitro*. *Eur. J. Pharm.* 183: 1550-1551.
31. Moreno-Sepúlveda M., Vargas-Zapata R., Esquivel-Escobedo D., Waksman de Torres N., and Piñeyro-López A. (1995). Effect of Peroxisomicine and related anthracenones on catalase activity. *Planta Med.* 61: 337-340.
32. Acosta García Ricardo L. (1995). Efecto de la T-514 del género *Karwinskia* sobre la ultraestructura de los tubulos contorneados proximales del riñón *in vitro*. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, N.L., México.
33. Piñeyro A., Martínez de Villarreal L., and González 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.
34. Piñeyro López A., González Alanis R., y Martínez de Villarreal L.E. (1993). Potencial efecto antineoplásico de las toxinas extraídas del género *Karwinskia*. En: *La Investigación Científica de la Herbolaria Medicinal Mexicana*. Secretaría de Salud, México. Edición conmemorativa. pp 209- 232.
35. Loomis T. (1978). Numbers in Toxicology. In: T. Loomis (Ed.), *Essentials of Toxicology*, Lea and Febiger, Philadelphia, 2: 13-28.
36. Piñeyro A. (1995). *Europaishen Patentblatt* 95/48 (29.11.95) Patent nummer: 0467407.
37. Piñeyro A. (1996). Bioscience patent "Pharmaceutically acceptable anthracene compounds" number 5578646.
38. Patente Japonesa número 2651758.
39. Moreno-Sepúlveda M., Vargas-Zapata R., Ballesteros-Elizondo R., Piñeyro-López A., and Sepúlveda -Saavedra J. (1997). Studies on the effect of peroxisomicine on catalase activity in albino mice. *Toxicol.* 35: 777-783.
40. Sepúlveda-Saavedra J., Bermúdez de Rocha M.V., Tamez-Rodríguez V.A., Ballesteros-Elizondo R.G., Moreno-Sepúlveda M., and Piñeyro-López A. (1998). Quantitative analysis of liver peroxisomes in rats intoxicated with peroxisomicine-A₁. *Toxicol. Lett.* 98: 71-75.

41. Goodman J.M., Trapp S., and Hwang H. (1990). Peroxisomes induced in *Candida boidinii* by methanol, oleic acid and D-alanine vary in metabolic function but share common integral membrane proteins. *J. Cell Sci.* 97: 193-204.
42. Sahm, H., Roggenkamp R., Wagner F., and Hinkelman W. (1975). Microbodies in methanol grown *Candida boidinii*. *J. Gen. Microbiol.* 88: 218-222.
43. Goodman J.M. (1985). Dihydroxyacetone synthase is an abundant constituent of the methanol-induced peroxisome of *Candida boidinii*. *J. Biol. Chem.* 260: 7108-7113.
44. Sepúlveda-Saavedra J., van der Klei I.J., Keizer I., Pifeyro-López A., Harder W., and Veenhuis M. (1992). Studies on the effect of toxin T-514 on the integrity of peroxisomes in methylotrophic yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* 91: 207-212.
45. Rhodin J. (1954). Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed convoluted tubule cells of the mouse kidney. Ph. D. Thesis, Karolinska Institutet. Aktiebolaget Godvil, Stockholm. Citado en: Masters C., and Crane D. The peroxisome: a vital organelle. Cambridge University Press 1995. First published. pp 2.
46. Van den Bosch H., Schutgens R.B.H., Wanders R.J.A., and Tager J.M. (1992). Biochemistry of peroxisomes. *Ann. Rev. Biochem.* 61: 157-197.
47. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Watson J.D. Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing, Inc., New York & London. Second Edition. 1989. pp 16 F, 406, 406 FF, 431-433, 459, 460 y 461 F.
48. De Duve C., and Baudhuin P. (1966). Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol. Rev.* 46: 323-357.
49. Singh I. (1996). Mammalian Peroxisomes: Metabolism of oxygen and reactive oxygen species. 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: 612-627.
50. Holtzman E., and Novikoff A. B.. Peroxisomas (microcuerpos, glioxisomas). En: Estructura y dinámica celular. Nueva Editorial Interamericana. México, D.F. 3a. Edición en español. 1987. pp 244-252.
51. Masters C., and Crane D. The peroxisome: a vital organelle. Cambridge University Press, First published. 1995. pp 1-27, 37-38, 174-203, y 225-245.
52. Masters C.J., and Holmes R. (1977). Peroxisomes: new aspects of cell physiology and biochemistry. *Physiol. Rev.* 57: 816-882.
53. Roels F., Espeel M., Pauwels M., De Craemer D., Egberts H.J.A., and van der Spek P. (1991). Different types of peroxisomes in human duodenal epithelium. *Gut* 32: 858-865.
54. Van der Klei I.J., and Veenhuis M. (1996). Peroxisome biogenesis in the yeast *Hansenula polymorpha*: A structural and functional analysis. 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: 47-59.
55. Tolbert N.E. (1981). Metabolic pathways in peroxisomes and glyoxysomes. *Annu. Rev. Biochem.* 50: 133-157.

56. Opperdoes F.R. (1987). Topogenesis of glycolytic enzymes in *Trypanosoma brucei*. *Biochem. Soc. Symp.* 53: 123-129.
57. Müller M. (1973). Peroxisomes and hydrogenosomes in protozoa. *J. Histochem. Cytochem.* 21: 955-957.
58. Mannaerts G.P., and Van Veldhoven P.P. (1993). Metabolic role of mammalian peroxisomes. In: *Peroxisomes: Biology and importance in toxicology and medicine*. Gordon Gibson, and Brian Lake (Editors). Taylor & Francis Ltd. London, Washington, D. C. pp 19-62.
59. Fahimi H.D., Baumgart E., Beier K., Pill J., Hartig F., and Völkl A. (1993). Ultrastructural and biochemical aspects of peroxisome proliferation and biogenesis in different mammalian species. In: *Peroxisomes: Biology and importance in toxicology and medicine*. Gordon Gibson, and Brian Lake (Editors). Taylor & Francis Ltd. London, Washington, D. C. pp 395-424.
60. Lazarow P.B. (1984). The peroxisomal membrane. In: *Membrane structure and function*. Bittar E.E. (Editor). John Wiley and Sons Inc. 5: 1-31.
61. Beard M.E., and Allen J.M. (1968). A study of the properties of renal microbodies. *J. Exptl. Zool.* 168: 477-490.
62. Usuda N., Yokota S., Ichikawa R., Hashimoto T., and Nogata T. (1991). Immunoelectron microscopic study of a new D-amino acid oxidase-immunoreactive subcompartment in rat liver peroxisomes. *J. Histochem Cytochem.* 39: 95-102.
63. Baudhuin P., Beaufay H., and de Duve C. (1965). Combined biochemical and morphological study at particulate fractions from rat liver. *J. Cell Biol.* 26: 219-243.
64. Völkl A., Baumgart E., and Fahimi H.D. (1988). Localization of urate oxidase in the crystalline cores of rat liver peroxisomes by immunocytochemistry and immunoblotting. *J. Histochem. Cytochem.* 36: 329-336.
-
65. Chu R., Lin Y., Usuda N., Rao M.S., Reddy J.K., and Yeldandi A.V. (1996). Mutational analysis of the putative copper-binding site of rat urate oxidase. 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: 781-786.
66. Veenhuis M., van Dijken J.P., and Harder W. (1983). The significance of peroxisomes in the metabolism of one carbon compounds in yeasts. *Adv. Micro. Biol. Physiol.* 24: 1-82.
67. Usuda N., Reddy K.M., Hashimoto T., Rao M.S., and Reddy J.K. (1988). Tissue specificity and species differences in the distribution of urate oxidase in peroxisomes. *Lab. Invest.* 58: 100-111.
68. Zaar K., Völkl A., and Fahimi H. (1991). Purification of marginal plates from bovine renal peroxisomes: Identification with L- α -hydroxyacid oxidase B. *J. Cell Biol.* 113: 113-121.
69. Lazarow P.B. (1987). The role of peroxisomes in mammalian cellular metabolism. *J. Inher. Metab. Dis.* 10: 11-22.
70. Hashimoto T. (1982). Individual peroxisomal β -oxidation enzymes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 386: 5-12.

71. Moser H. W. (1987). New approaches in peroxisomal disorders. *Dev. Neurosci.* **9**: 1-18.
72. Lazarow P.B. (1988). Peroxisomes. In: *The liver: Biology and pathology*. I.M. Arias, W.B. Jakovy, H. Popper, D. Schachter, and D.A. Shafritz (Editors). Raven Press Ltd., New York. Second Edition. pp 241-254.
73. Müller W.M., van der Krift T.P., Krouwer A.J.J., Wösten H.A.B., van der Voort L.H.M., Smaal E.B., and Verkleij A.J. (1991). Localization of the pathway of the penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *EMBO J.* **10**: 489-495.
74. Harder W., and Veenhuis M. (1989). Metabolism of one-carbon compounds. In: *The yeasts*. A.H. Rose, and J.S. Harrison (Editors). Academic Press London. Second Edition. **3**: 289-316.
75. Montgomery R., Conway T.W., and Spector A. A. *Biochemistry: A Case-Oriented Approach*. Stephanie Manning, and Anne Gunter (Editors). The C. V. Mosby Company. Fifth Edition, 1990. pp 202 y 510.
76. Hess R., Stäubli W., and Riess W. (1965). Nature of the hepatomegaly effect produced by ethyl-chlorophenoxy-isobutyrate in the rat. *Nature* **208**: 856-858.
77. Gorgas K., and Krisans S.K. (1989). Zonal heterogeneity of peroxisome proliferation and morphology in rat liver after gemfibrozil treatment. *J. of Lipid Research* **30**: 1859-1875.
78. Reddy J.K., and Chu R. (1996). Peroxisome proliferator-induced pleiotropic responses: Pursuit of a phenomenon. 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**: 176-201.
79. Thangada S., Alvarez K., Mangino M., Usman M. I., Rao M. S., and Reddy J.K. (1989). An *in vitro* demonstration of peroxisome proliferation and increase in peroxisomal β -oxidation system mRNAs in cultured rat hepatocytes treated with ciprofibrate. *FEBS Letters* **250**: 205-210.
-
80. Pegg M., Crane D.I., and Masters C. J. (1986). Confirmation that catalase is a glycoprotein. *Biochem. Intl.* **122**: 831-838.
81. Lehninger A. L. *Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular*. Ediciones Omega, S. A. Barcelona. Segunda Edición. 1978. pp 61, 216, 514 y 579.
82. Nicholls P., and Schonbaum G.R. (1963). Catalases. In: *The Enzymes*. P.D. Boyer, H. Lardy, and K. Myrback (Editors). Academic Press, New York and London. Second Edition. **8**: 147-225.
83. Chance B. (1969). The behaviour of catalase and peroxidase in coupled reactions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **168**: 354-355.
84. Hashimoto T. (1996). Peroxisomal β -oxidation: enzymology and molecular biology. 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**: 86-98.

85. 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**: 450-460.
86. Moser H.W., and Moser A. B. (1996). Peroxisomal disorders: Overview. 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.
87. Suzuki Y., Shimozawa N., Takahashi Y., Imamura A., Kondo N. and Orii T. (1996). Peroxisomal disorders: clinical aspects. 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**: 442-449.
88. Mosser J., Douar A.-M., Sarde C.-O., Kioschis P., Feil R., Moser H., Poustka A.-M., Mandel J.-L., and Aubourg P. (1993). Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature* **361**: 726-730.
89. Santos M.J., Imanaka T., Shio H., and Lazarow P.B. (1988). Peroxisomal integral membrana proteins in control and Zellweger fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **263**: 10502-10509.
90. Heikoop J.C., Van Den Berg M., Strijland A., Weijers P.J., Just W. W., Meijer A. J., and Tager J. M. (1992). Turnover of peroxisomal vesicles by autophagic proteolysis in cultured fibroblasts from Zellweger patients. *Eur. J. Cell Biol.* **57**: 165-171.
91. Lazarow P.B., and Fujiki Y. (1985). Biogenesis of peroxisomes. *Ann. Rev. Cell Biol.* **1**: 489-530.
92. South S. T., and Gould S. J. (1999). Peroxisome synthesis in the absence of preexisting peroxisomes. *J. Cell Biol.* **144**: 255-266.
-
93. Titorenko V. I., and Rachubinski R. A. (July 1998). The endoplasmic reticulum plays an essential role in peroxisome biogenesis. *TIBS* **23**: 231-233.
94. Rehling P., Albertini M., and Kunau W.-H. (1996). Protein import into peroxisomes: new developments. 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**: 442-449.
95. Baumgart E., Völkl A., Hashimoto T., and Fahimi D. (1989). Biogenesis of peroxisomes: Immunocytochemical investigation of peroxisomal membrane proteins in proliferating rat liver peroxisomes and in catalase-negative membrane loops. *J. Cell Biol.* **108**: 2221-2231.
96. Walton P.A., Wendland M., Subramani S., Rachubinski R.A., and Welch W. J. (1994). Involvement of 70-kD heat-shock proteins in peroxisomal import. *J. Cell Biol.* **125**: 1037-1046.
97. Schmorer, C.M., Cox, J.R., and Mortimore, G.E. (1979). Alterations of lysosomal density by sequestered glycogen during deprivation-induced autophagy in rat liver. *Biochem. Res. Comm.* **87**: 163-170.
98. Grinde, B. (1985). Autophagy and lysosomal proteolysis in the liver. *Experientia* **41**: 1089-1095.

99. Gordon, P.B., and Seglen, P.O. (1988). Prelysosomal convergence of autophagic and endocytic pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151: 40-47.
100. Seglen P.O., Berg T. O., Blankson H., Fengsrud M., Holen I., and Stromhaug P.E. (1996). Structural aspects of autophagy. *Adv. Exp. Med. Biol.* 389: 103-111.
101. Pitt D. *Lisosomas y Función Celular. Temas Integrados a la Biología.* Compañía Editorial Continental, S.A. de C.V., México, 1982. pp 12, 26-32.
102. Kovacs J., Laszlo L., and Kovacs A. L. (1988). Regression of autophagic vacuoles in pancreatic acinar, seminal vesicle epithelial, and liver parenchymal cells. A comparative morphometric study of the effect of vinblastine and leupeptin followed by cycloheximide treatment. *Exp. Cell Res.* 174: 244-251.
103. Fengsrud M., Roos N., Berg T., Liou W., Slot J. W., and Seglen P. O. (1995). Ultrastructural and immunocytochemical characterization of autophagic vacuoles in isolated hepatocytes: Effects of vinblastine and asparagine on vacuole distributions. *Exp. Cell Res.* 221: 504-519.
104. Schneider D. L. (1979). The acidification of rat liver lysosomes "in vitro": a role for the membranous ATPase as a protein pump. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 87: 559-565.
105. Seglen P.O., Gordon P. B., Grinde B., Solheim A. E., Kovács A. L., and Poli A. (1981). Inhibitors and pathways of hepatocytic protein degradation. *Acta Biol. Med. Ger.* 40: 1587-1598.
106. Dunn W. A., Jr. (1990a). Studies on the mechanism of autophagy: formation of the autophagic vacuole. *J. Cell Biol.* 110: 1923-1933.
107. Dunn W. A., Jr. (1990b). Studies on the mechanism autophagy: maturation of the autophagic vacuole. *J. Cell Biol.* 110: 1935-1945.
-
108. Yokota S., Tsuji H., Kato K. (1985). Localization of cathepsin D in rat liver. Immunocytochemical study using post-embedding immunoenzyme and protein A-gold techniques. *Histochemistry* 82: 141-148.
109. Liou W., Geuze H. J., Geelen M. J. H., and Slot J. W. (1997). The autophagic and endocytic pathways converge at the nascent autophagic vacuoles. *J. Cell Biol.* 136: 61-70.
110. Marzella L., Ahlberg J., and Glaumann H. (1982). Isolation of autophagic vacuoles from rat liver: morphological and biochemical characterization. *J. Cell Biol.* 93: 144-154.
111. Hoyvik H., Gordon P.B., and Seglen P.O. (1986). Use of a hydrolysable probe [¹⁴C]lactose, to distinguish between pre-lysosomal and lysosomal steps in the autophagic pathway. *Exp. Cell Res.* 166: 1-14.
112. Poole B., Leighton F., and de Duve C. (1969). The synthesis and turnover of rat liver peroxisomes. II. Turnover of peroxisome proteins. *J. Cell Biol.* 41: 536-546.
113. Glaumann H., Ericsson J. L. E., and Mazarella L. (1980). Mechanisms of intralysosomal degradation with special reference to autophagocytosis and heterophagocytosis of cell organelles. *Int. Rev. Cytobiol.* 73: 149-182.
114. Matsushita M., Saito T., Koino H., Kuruhara Y., Abe S., and Ogawa K. (1982). Autophagy of peroxisomes in hepatic parenchymal cells. *Acta Histochem. Cytochem* 1: 277-283.

115. Yokota S. (1993). Formation of autophagosomes during degradation of excess peroxisomes induced by administration of dioctyl phthalate. *Eur. J. Cell Biol.* 61: 67-80.
116. Yokota S., Himeno M., Roth J., Brada D., and Kato K. (1993). Formation of autophagosomes during degradation of excess peroxisomes induced by di-(2-ethylhexyl)phthalate treatment. II. Immunocytochemical analysis of early and late autophagosomes. *Eur. J. Cell Biol.* 62: 372-383.
117. Yokota S., Himeno M., and Kato K. (1995). Formation of autophagosomes during degradation of excess peroxisomes induced by di-(2-ethylhexyl)phthalate treatment. III. Fusion of early autophagosomes with lysosomal compartments. *Eur. J. Cell Biol.* 66: 15-24.
118. Kondo K., and Makita T. (1997). Inhibition of peroxisomal degradation by 3-methyladenine (3MA) in primary cultures of rat hepatocytes. *Anat. Rec.* 247: 449-454.
119. Yokota S. (1998). Intracellular degradation of peroxisomes and their proteins. In: *Peroxisome: Biogenesis, function and disease. International Symposium - CREST Research Conference. Kyushu University, Fukuoka, Japan.* pp P15.
120. Baba M. K., Takeshige K., Baba N., and Ohsumi Y. (1994). Ultrastructural analysis of the autophagic process in yeast: detection of autophagosomes and their characterization. *J. Cell Biol.* 124: 903-913.
121. Veenhuis M., Douma A. C., Harder W., and Osumi M. (1983). Degradation and turnover of peroxisomes in the yeast *Hansenula polymorpha* induced by selective inactivation of peroxisomal enzymes. *Arch. Microbiol.* 134: 193-203.
122. Gunkel K., van der Klei I. J., Barth G., and Veenhuis M. (1999). Selective peroxisome degradation in *Yarrowia lipolytica* after shift of cells from acetate/oleate/ethylamine into glucose/ammonium sulfate-containing media. *FEBS Lett.* 451: 1-4.
123. Bormann C., and Sahm H. (1978). Degradation of microbodies in relation to activities of alcohol oxidase and catalase in *Candida boidinii*. *Arch. Microbiol.* 117: 67-72. Cited in: Sakai Y., Koller A., Rangell L. K., Keller G. A., and Subramani S. (1998). Peroxisome degradation by microautophagy in *Pichia pastoris*: Identification of specific steps and morphological intermediates. *J. Cell Biol.* 141: 625-636.
124. Sepúlveda Saavedra J. Comunicación personal.
125. Yasmineh W. G., Parkin J. L., Caspers J. I., and Theologides A. (1991). Tumor necrosis factor/cachectin decreases catalase activity of rat liver. *Cancer Research* 51: 3990-3995.
126. Eckstein P., and Zuckerman S. (1957). Monkeys. In: *The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals.* A. N: Worden, W. Lane-Petter, and H. Himsforth (Editors). Courier Printing and Publishing Co. Ltd. England. Second Edition. pp 663-674.
127. Sepúlveda J., Velásquez B., Quezada R., Nuñez A., and Vásquez D. (1986). *In vitro* organogenesis and differentiation of fetal lung rudiments grown in chamber slides. *In vitro* 22: 27A.
128. Ulrich R. G., Aspar D. G., Cramer C. T., Kletzien R. F., and Ginsberg L. C. (1990). Isolation and culture of hepatocytes from the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 26: 815-823.

129. Seglen P. O. (1976). Preparation of isolated rat liver cells. In: *Methods in Biology* 4. David M. Prescott (Editor). Academic Press, New York. 13: 29-83.
130. Bancroft J. D., and Stevens A. *Theory and Practice of Histological Techniques*. Churchill Livingstone. Edinburgh London Melbourne and New York. Second Edition. 1982. pp 109-114, 180-190, y 217-223.
131. Diamondstone T. I. (1966). Assay of tyrosine aminotransferase activity by conversion of p-hydroxyphenylpyruvate to p-hydroxybenzaldehyde. *Anal. Biochem.* 16: 395-401.
132. Granner D. K. and Tomkins G. M. (1970). of Tyrosine aminotransferase (rat liver). In: *Methods Enzymol.* Tabor H. and Tabor C. W. (Editors). Academic Press, New York. 17 A: 633-637.
133. Gelehrter T. D., Emanuel J. R., and Spencer C. J. (1972). Induction of tyrosine aminotransferase by dexamethasone, insulin, and serum. Characterization of the induced enzyme. *J. Biol. Chem.* 247: 6197-6203.
134. Cook J. A., and Mitchell J. B. (1989). Viability measurements in mammalian cell systems. *Anal. Biochem.* 179: 1-7.
135. Marc A., Wagner A., Martial A., Goergen J. L., Engasser J. M., Geaugey V., and Pinton H. (1991). Potential and pitfalls of using LDH release for the evaluation of animal cell death kinetics. In Spier R., Griffiths J. B., and Meigner B. (Editors). *Production of Biologicals from Animal Cells in Culture*, Butterworth-Heinemann, Oxford. pp 569-575.
136. Vassault A. (1983). Lactate dehydrogenase: UV-method with pyruvate and NADH. In: *Methods of Enzymatic Analysis III. Enzymes 1: Oxidoreductases, Transferases.* Bergmeyer H. U., Bergmeyer J., and Grassl M. (Editors). Verlag-Chemie, Weinheim. Third Edition pp 118-126.
137. Angermüller S., and Fahimi H. D. (1981). Selective cytochemical localization of peroxidase, cytochrome oxidase and catalase in rat liver with 3,3'-diaminobenzidine. *Histochemistry* 71: 33-44.
138. Beier K., and Fahimi H. D. (1991). Environmental pollution by common chemicals and peroxisome pollution: efficient detection by cytochemistry and automatic image analysis. *Progr. Histochem. Cytochem.* 23: 150-163.
139. Gomori G. (1941). Distribution of acid phosphatase in the tissues under normal and under pathologic conditions. *Arch. Pathol.* 32: 189-199. Citado en: Troyer H. *Principles and techniques of histochemistry. Phosphatases.* Little, Brown and Company (Inc.) Boston. First Edition. 1980. pp 209-232.
140. Hugon J. S., Maestracci D., and Menard D. (1973). Stimulation of glucose-6-phosphatase activity in the mucosal cells of the mouse intestine. *J. Histochem. Cytochem.* 21: 426-440.
141. Weibel E. R. (1969). Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int. Rev. Cytol.* 26: 235-302.
142. Aebi H. (1974). Katalase. In: *Methoden der enzymatischen Analyse.* Bergmeyer H. U. (Editor). New York: Weinheim. 3rd Edn. pp 713-718.

143. Moreno de la Garza M., Schultz-Borchard U., Crabb J. W., and Kunau W. H. (1985). Peroxisomal beta-oxidation system of *Candida tropicalis*. Purification of a multifunctional protein possessing enoyl-CoA hydratase, 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase and 3-hydroxyacyl-CoA epimerase activities. *Eur. J. Biochem.* **148**: 285-291.
144. Goldstone A., Koenig H., Nayyar R., Hughes C., and Lu C. (1973). Isolation and characterization of a rough microsomal fraction from rat kidney. *Biochem J.* **132**: 259-266.
145. Fiske C. H., and SubbaRow Y. J. (1925). *J. Biol. Chem.* **66**: 375-400. Citado en: Goldstone A., Koenig H., Nayyar R., Hughes C., and Lu C. (1973). Isolation and characterization of a rough microsomal fraction from rat kidney. *Biochem J.* **132**: 259-266.
146. Anson (1939). *J. Gen. Physiol.* **22**: 79-89. Citado en: Yamamoto K., Katsuda N., Himeno M., and Kato K. (1979). Cathepsin D of rat spleen. Affinity purification and properties of two types of cathepsin D. *Eur. J. Biochem.* **95**: 459-467.
147. Yamamoto K., Katsuda N., Himeno M., and Kato K. (1979). Cathepsin D of rat spleen. Affinity purification and properties of two types of cathepsin D. *Eur. J. Biochem.* **95**: 459-467.
148. Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
149. Häussinger D., Schliess F., Dombrowski F., and Vorn-Dahl S. (1999). Involvement of p38^{MAPK} in the regulation of proteolysis by liver cell hydration. *Gastroenterology* **116**: 921-935.
150. Serafini B., Stefanini S., Ceru M. P., and Sartori C. (1998). Lysosomal involvement in the removal of clofibrate-induced rat liver peroxisomes. A biochemical and morphological analysis. *Biol. Cell.* **90**: 229-237.
151. Kopitz J., Kisen G. Ø., Gordon P. B., Bohley P., and Seglen P. O. (1990). Nonselective autophagy of cytosolic enzymes by isolated rat hepatocytes. *J. Cell Biol.* **111**: 941-953.
152. Sakai Y., Koller A., Rangell L. K., Keller G. A., and Subramani S. (1998). Peroxisome degradation by microautophagy in *Pichia pastoris*: Identification of specific steps and morphological intermediates. *J. Cell Biol.* **141**: 625-636.
153. Bergamini E., De Tata V., Cubeddu T. L., Masiello P., and Pollera M. (1987). Increased degradation in rat liver induced by antilipolytic agents: a model for studying autophagy and protein degradation in liver?. *Exp. Mol. Pathol.* **46**: 114-122.

RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

María Leticia Moreno Martínez

Candidata para el Grado de

Doctor en Ciencias con Especialidad en Morfología

Titulo de la Tesis: EFECTO DE LA PEROXISOMICINA A1 (PA1) SOBRE LA AUTOFAGIA DE PEROXISOMAS EN EL HIGADO DE MACACA FASCICULARIS EN UN MODELO IN VITRO

Area de Estudio: Morfología

Biografía:

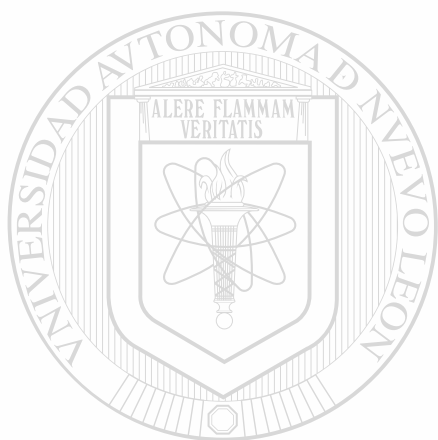
Datos Personales: Nacida en la ciudad de San Luis Potosí, SLP, México, el 18 de Mayo de 1957, hija del Abogado Gabriel Moreno Medina y la QFB Celina Martínez Mojica.

Estado civil: Casada. **Esposo:** Dr. Jesús Manuel Rodríguez Medina. **Hijos:** Leticia María Rodríguez Moreno y Gloria Lisset Rodríguez Moreno.

Escolaridad: Egresada de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Escuela de Ciencias Químicas, grado obtenido Química Farmacobióloga (QFB) en 1980.

Experiencia Profesional: Química de los Laboratorios de Análisis Clínicos, delegación San Luis Potosí: Hospital del ISSTE de 1979 a 1980, y Hospital del IMSS en 1981. Química del Laboratorio de Análisis Clínicos del Centro Médico del Potosí en 1981. Investigador de Tiempo Completo del Laboratorio de Biología Molecular y en la actualidad Laboratorio de Proteínas, Peptidos y Regulación (PPR), de la Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP), de 1978 a la fecha. Co-Responsable del Laboratorio de PPR y Profesor-Investigador de Tiempo Completo nivel III, de 1984 a la fecha. Profesor Adjunto del Curso "Nutrición, Crecimiento y Desarrollo", en la Facultad de Medicina, UASLP, de 1979 a 1982. Profesor Titular del mismo Curso, de 1982 a 1992. Profesor del Curso "Aspectos Médicos y Biológicos del Cancer", con el tema "Mecanismos de Acción Hormonal", Facultad de Medicina, UASLP, en Noviembre-Diciembre de 1984. Profesor del Curso de "Bioquímica y su Laboratorio", en la Facultad de Medicina, UASLP, de 1990 a 1993. Profesor de Posgrado del Curso Biomédico Básico para Residentes en la Especialidad de Dermatología, Facultad de Medicina, UASLP, en 1987 y en 1991. Profesor del Curso de "Bioquímica de Posgrado" en la Especialización

de Odontopediatría de la Escuela de Estomatología, UASLP, de 1990 a 1993. Presentación de 22 trabajos de Investigación en Congresos Nacionales e Internacionales, desde 1980 a la fecha. Dos veces nombrada Estudiante Distinguida del Doctorado en Ciencias con especialidad en Morfología, ciclos escolares de 1994-1995 y de 1995-1996. Premio al mejor proyecto de Tesis de posgrado en el área morfológica, en 1995. Miembro Titular de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología, A.C., desde 1990. Socia Fundadora de la Asociación de Profesores de Bioquímica, A.C., desde 1992. Permiso académico (Años Sabáticos y Comisiones) otorgado por la Comisión Mixta de Vigilancia de la UASLP, para efectuar los estudios de Doctorado en Ciencias con especialidad en Morfología, en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, a partir de Septiembre de 1993.

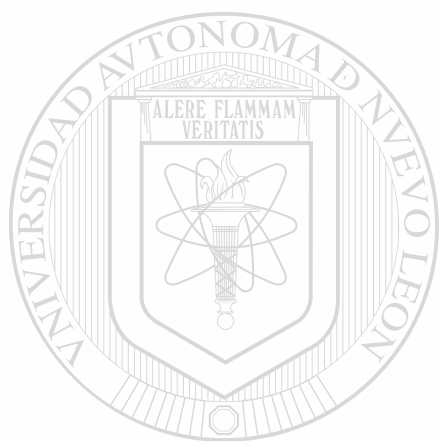


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS





UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



