

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*

Por:

QFB MARIA LETICIA MORENO MARTINEZ

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

Agosto, 2000

MARIA J. ETICIA MORENO MARTINEZ

, 2000

TD
QH603
.P47
M6
c.1

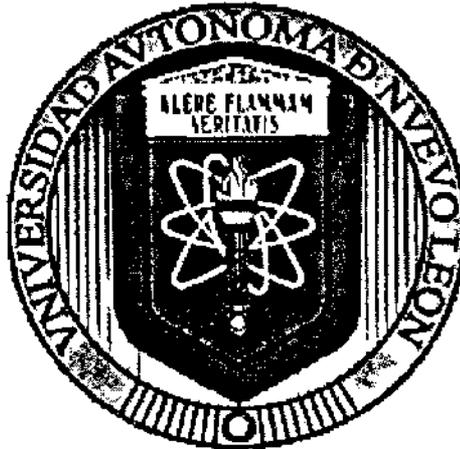


1080095049

- 5 7

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***

Por:

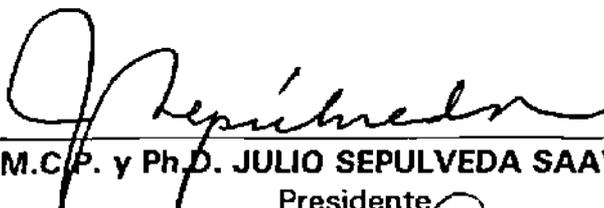
QFB MARIA LETICIA MORENO MARTINEZ

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

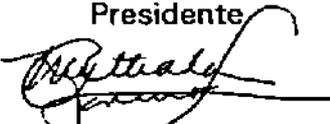
Agosto, 2000

**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:



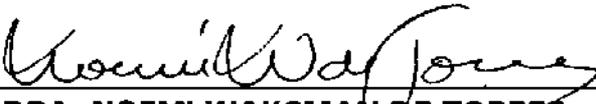
M.C.P. y Ph.D. JULIO SEPULVEDA SAAVEDRA
Presidente



Dr. ren. nat. MYRTHALA MORENO SEPULVEDA
Secretario



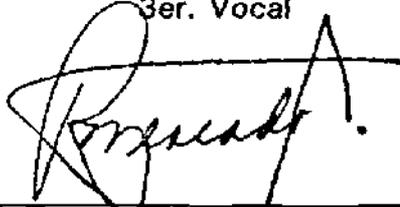
Dr. med. ALFREDO PIÑEYRO LOPEZ
1er. Vocal



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

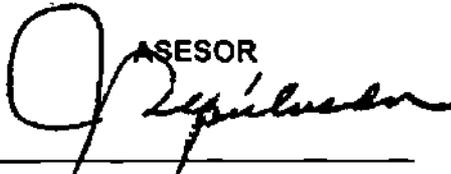
**"EFECTO DE LA PEROXISOMICINA A1 SOBRE LA AUTOFAGIA
DE PEROXISOMAS EN EL HIGADO DE MACACA
FASCICULARIS EN UN MODELO *IN VITRO*".**

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.

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**

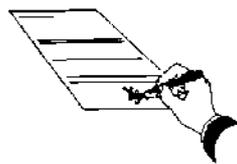
***Para mi esposo Jesús Manuel Rodríguez Medina
Mi hija linda Leticia María Rodríguez Moreno
Mi pequeñita Gloria Lisset Rodríguez Moreno***

**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 Víctor 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 Frias Trejo** por su ayuda en la preparación de los cortes finos y a los **Sres. Víctor 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.*

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCION	1
1.1 PEROXISOMICINA A1	1
1.2 PEROXISOMAS	6
1.2.1 Generalidades	6
1.2.2 Morfología peroxisomal	7
1.2.3 Función peroxisomal	8
1.2.3.1 Catalasa y tiolasa peroxisomales	10
1.2.3.2 Enfermedades peroxisomales	11
1.2.3.2.1 Recambio de peroxisomas en las enfermedades peroxisomales	12
1.2.4 Biogénesis peroxisomal	12
1.3 PROCESO AUTOFAGICO LISOSOMAL	13
1.3.1 Autolisosomas: Morfología y función	15
1.3.2 Inhibidores de la vía autofágica lisosomal	15
1.3.3 Degradación peroxisomal	16
1.4 ANALISIS DE LA DEGRADACION PEROXISOMAL	17
1.5 ANTECEDENTES EXPERIMENTALES DIRECTOS	18
1.6 HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	20
1.6.1 Hipótesis de trabajo	20
1.6.2 Objetivo general	20
1.6.3 Objetivos específicos	20
1.7 IMPORTANCIA	21
2. MATERIALES Y METODOS	22
2.1 ORIGEN DE LOS REACTIVOS Y EL MATERIAL	22
2.2 MATERIAL BIOLÓGICO	24
2.3 EQUIPO	24

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	36
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	68
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

Capítulo	Pág.
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 tiolasa	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

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 condrodisplasia 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
VVI	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 extralida 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 disminuida 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