

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 antracenonas 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 antracenónicos aislados de diferentes especies del género *Karwinskia*, así como también a la caracterización morfológica y funcional de la planta mantenida tanto en condiciones de invernadero como en cultivo *in vitro*¹². Los compuestos antracenónicos 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 antracenónicos 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 affin humboldtiana* se aisló la T 510¹⁷.

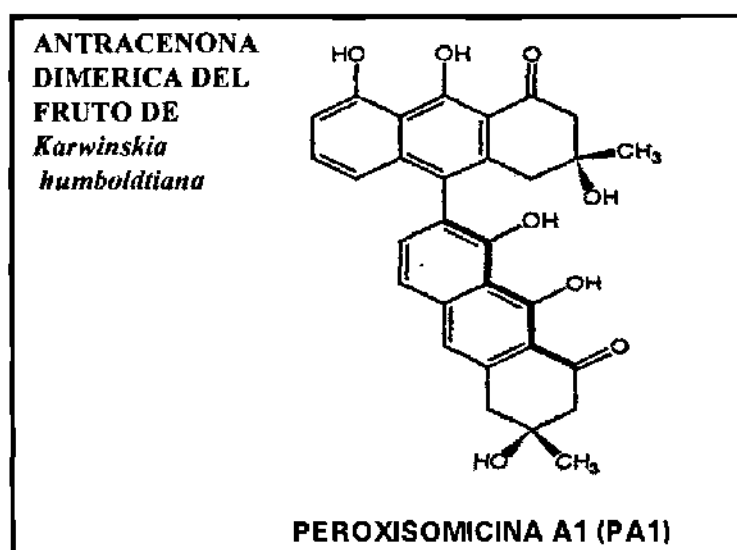


Figura 1. Estructura química de la toxina T 514 o PA1.

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 lipidoperoxidación microsomal hepática estimulada por Fe²⁺-ADP y NADPH*³⁰, 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 antracenónicos aislados y purificados de especies del género *Karwinskia*. En este estudio se encontró una relación estrecha entre la estructura de estos compuestos antracenónicos 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*”^{25,48,49}.

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^{25,52,53}; *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^{46,47,60}.

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 cristaloide o nucleoide"^{46,47,50,51,60}. Por ejemplo, la composición del cristaloide 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 cristaloideos, 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 cristaloideos. La actividad de urato oxidasa, se encuentra tanto en la matriz peroxisomal como en el nucleoide. 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^{51,58}. 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^{78,79}.

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^{68,80}, y tiene como grupo prostético al hemo^{51,81}. Dependiendo de las condiciones del medio, la catalasa lleva a cabo las siguientes reacciones:

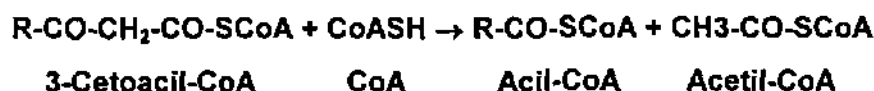


Ambas reacciones se inician con la formación de un complejo primario entre el peróxido de hidrógeno y el hierro del hemo, éste reacciona con otra molécula, ya sea

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 substratos 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^{48,51,71,85}. 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 condrodysplasia 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^{51,71,85,88}, en donde se presentan anomalías bioquímicas predominantes como son *defectos en la biosíntesis de plasmalógenos, metabolismo del ácido pipecólico, 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.

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.

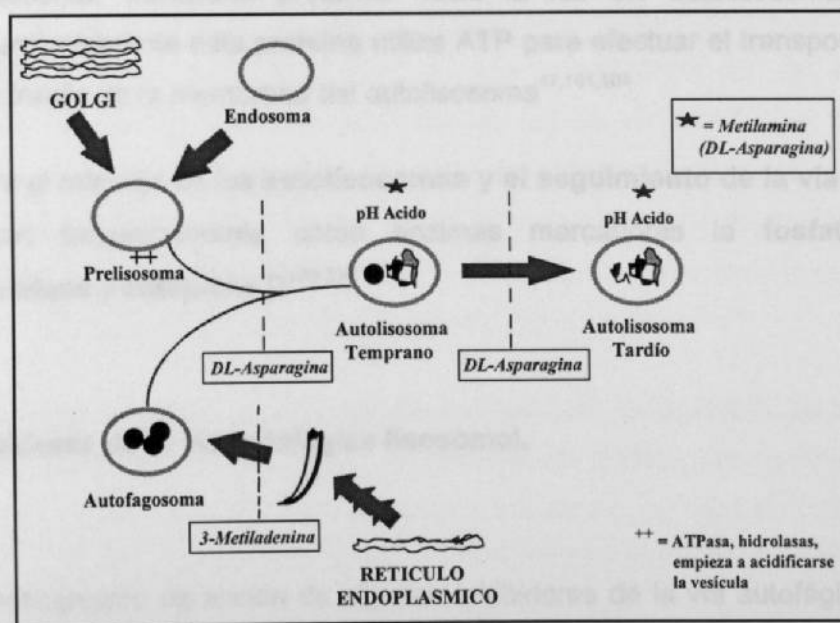


Figura 2. Diagrama de la vía autofágica lisosomal en donde se señalan los sitios de bloqueo de algunos inhibidores específicos.

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 fosfatasas**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^{25,115-119}. 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}.

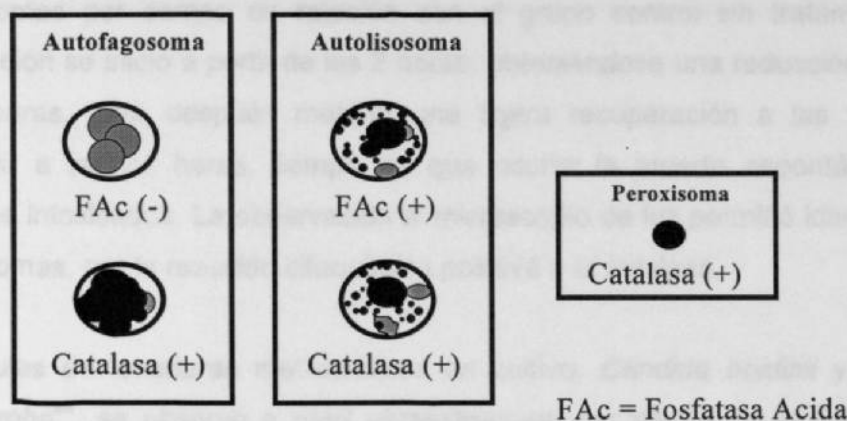


Figura 3. Diagrama del marcaje con técnicas citoquímicas para el estudio de la autofagia peroxisomal.

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^{86,87}.

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 μ m) 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 uranilo, 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 sustratos 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 sustratos 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 sustratos, 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 °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 BIOLOGICO

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.

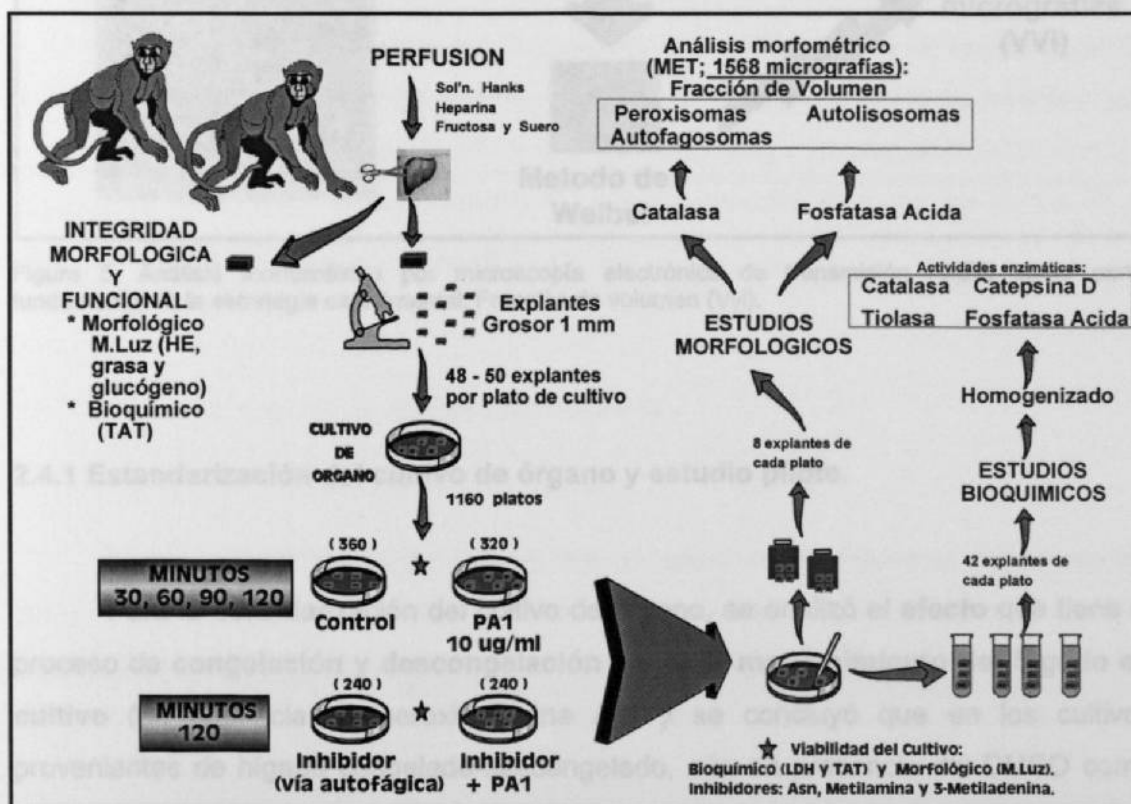


Figura 4. Resumen de la estrategia experimental, puntos más relevantes (no se incluye el estudio piloto y la estandarización de las técnicas).

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.

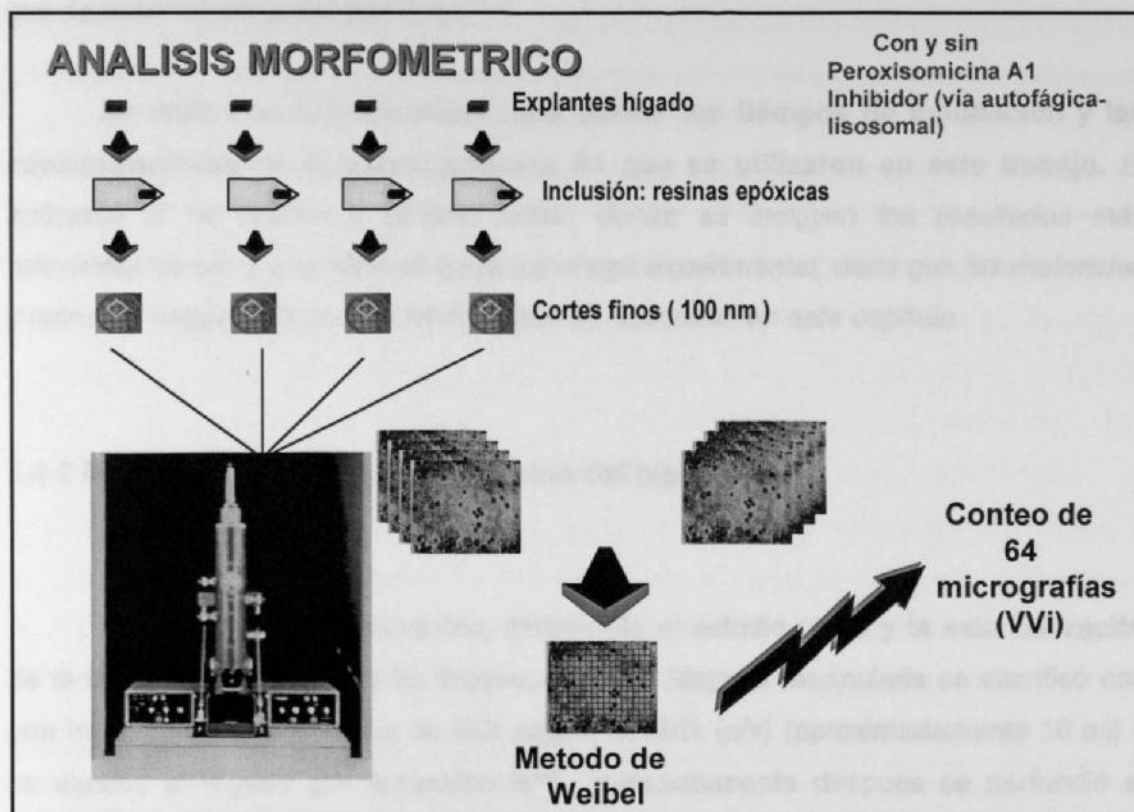


Figura 5. Análisis morfométrico por microscopía electrónica de transmisión (MET) como parte fundamental de la estrategia experimental. Fracción de volumen (Vvi).

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 laparatomía¹²⁶. 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 metodos 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 estreptomicina 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 llevo 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 estreptomycin 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 *	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)	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)
Experimento según objetivos e hipótesis de trabajo	2	S/ peroxisomicina A1 (PA1) C/ peroxisomicina A1 C/ metilamina C/ 3-metiladenina C/ DL-asparagina C/ metilamina + PA1 C/ 3-metiladenina + PA1 C/ DL-asparagina + PA1 C/ glucagon (ver viabilidad del cultivo en sección 2.4.4)	0.0 µg/ml 10.0 µg/ml 10.0 mM 5.0 mM 10.0 mM 10.0 mM + 10.0 µg/ml 5.0 mM + 10.0 µg/ml 10.0 mM + 10.0 µg/ml 0.1 µM	360 320 80 80 80 80 80 80 160	30, 60, 90, y 120 minutos (para PA1 y el control) 120 minutos (para los tres inhibidores, y los inhíbs. con PA1) 30, 60, 90, y 120 minutos

* 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 "a/ 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. \approx 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 microscopia de luz** (en el estudio piloto; sección 2.4.5.3) y para el **análisis morfométrico con microscopia 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 superpuso 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 autolisosomas que contienen material de origen peroxisomal.
3. Se determinó la fracción de volumen aplicando la fórmula:

$$V_{vi} = P_i / P_c$$

Donde V_{vi} = es la fracción de volumen del organelo en análisis

P_i = puntos que coinciden del organelo en análisis

P_c = 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 substrato 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:

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

* 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.

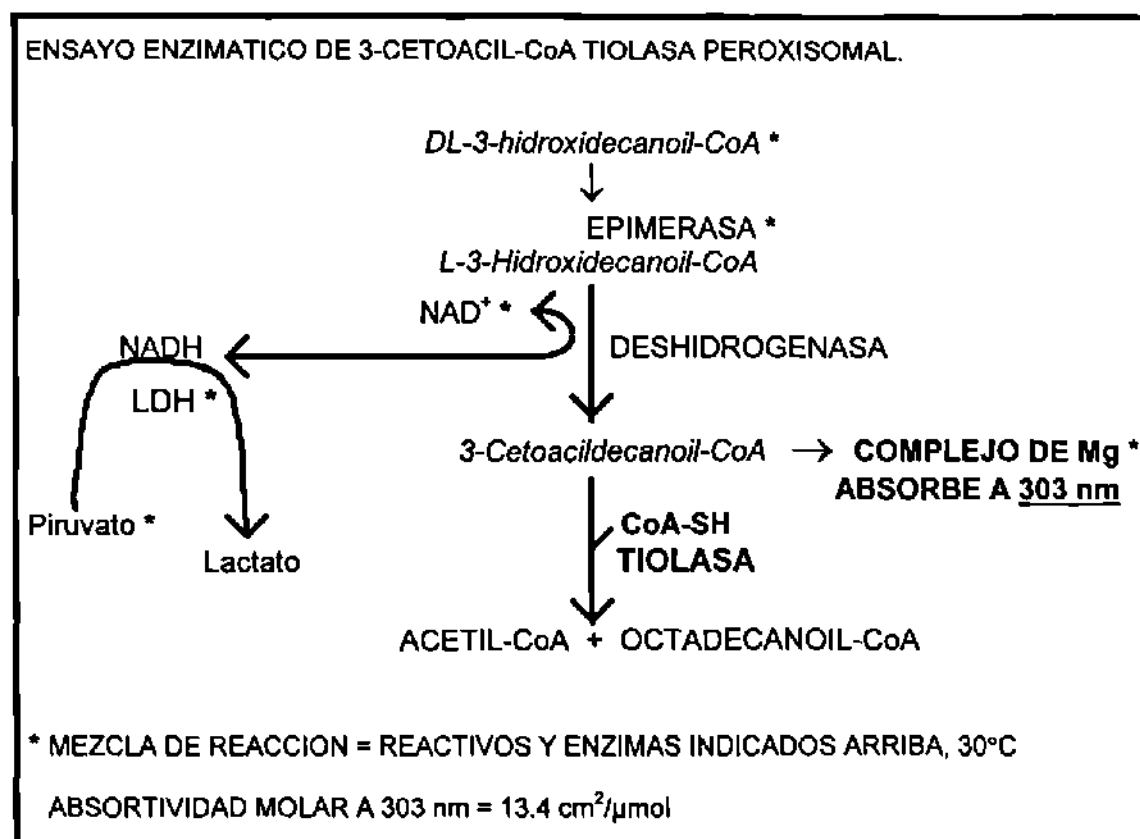


Figura 6. Fundamento de las reacciones del método de Moreno de la Garza M. y cols. derivado de Middleton B.¹⁴⁵ para la determinación de la actividad de tiolasa peroxisomal.

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 μmol 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.**

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*.

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).

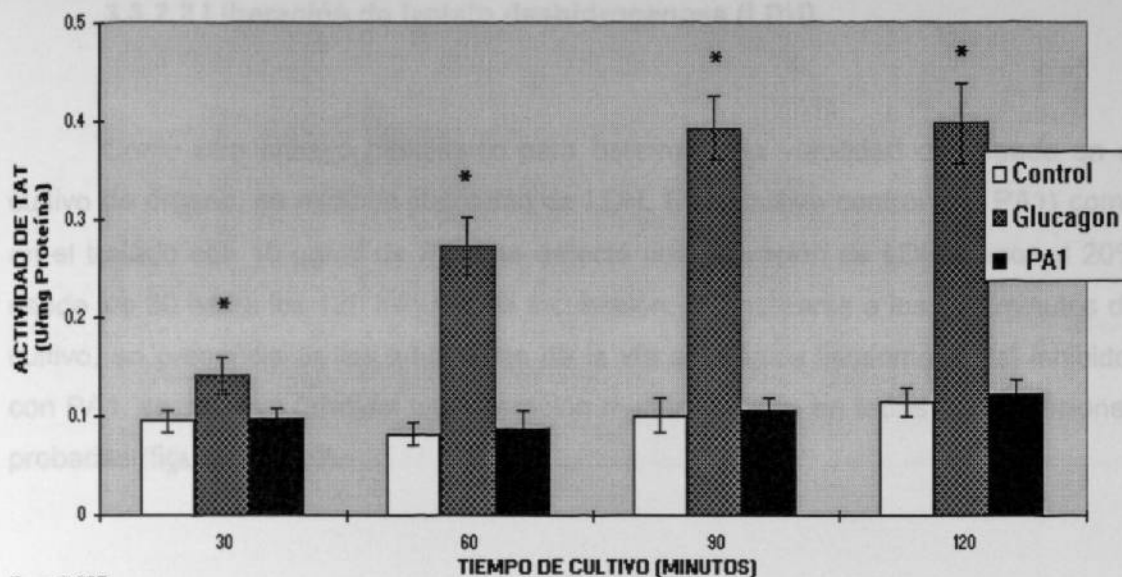


Figura 7. Efecto de glucagon ($0.1 \mu\text{M}$) y de PA1 ($10 \mu\text{g/ml}$) sobre la actividad específica de tirosina aminotransferasa (TAT) a diferentes tiempos de cultivo. La actividad de TAT se determinó por quintuplicado, en el homogenizado proveniente de los explantes de hígado de 2 platos de 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.

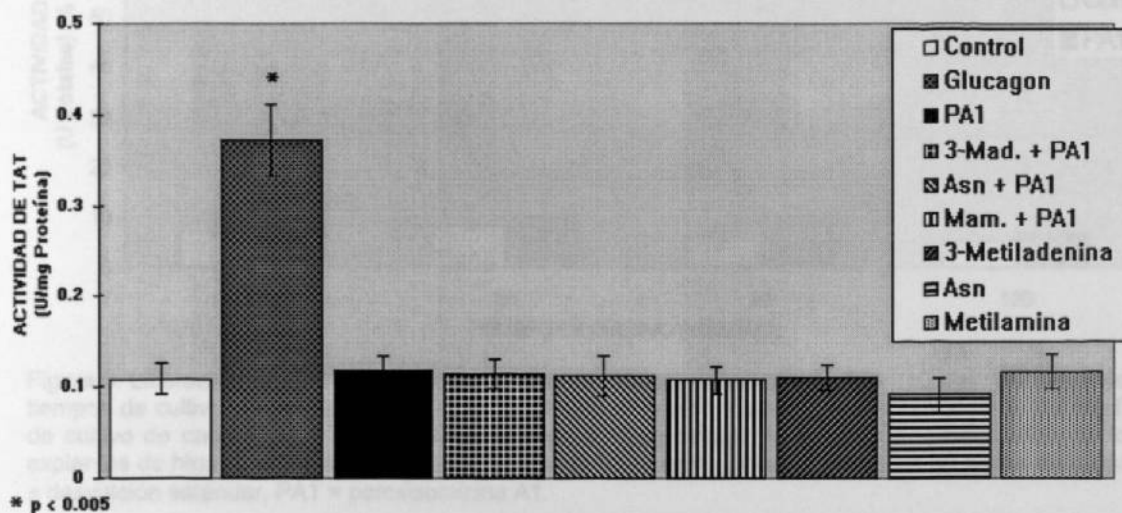


Figura 8. Efecto de glucagon ($0.1 \mu\text{M}$), de PA1 ($10 \mu\text{g/ml}$), de tres inhibidores de la vía autofágica lisosomal y de cada uno de los inhibidores combinado con PA1 sobre la actividad específica de tirosina aminotransferasa (TAT), a 120 minutos de cultivo. La actividad de TAT se determinó 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).

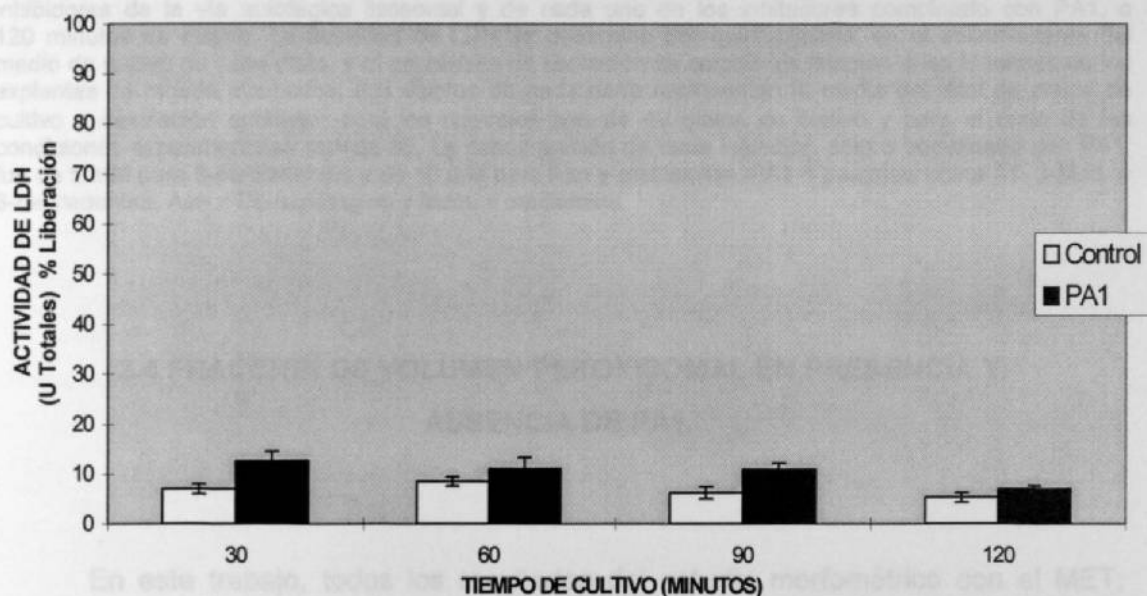


Figura 9. Liberación de LDH al medio de cultivo en presencia y ausencia de PA1 (10 $\mu\text{g/ml}$) a diferentes tiempos de cultivo. La actividad de LDH se determinó por quintuplicado, en el sobrenadante del medio de cultivo de cada plato, y el porcentaje de liberación se calculó en relación a las U 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.

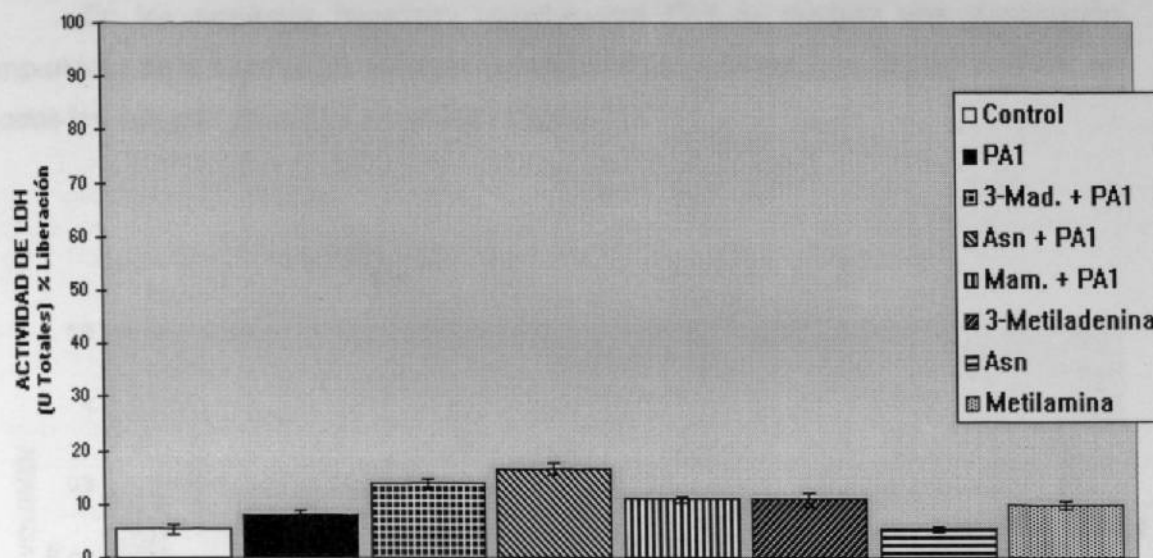


Figura 10. Liberación de LDH al medio de cultivo en presencia y ausencia de PA1 (10 $\mu\text{g/ml}$), de tres inhibidores de la vía autofágica lisosomal y de cada uno de los inhibidores combinado con PA1, a 120 minutos de cultivo. La actividad de LDH se determinó por quintuplicado, en el sobrenadante 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 FRACCION DE VOLUMEN PEROXISOMAL EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE PA1.

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).

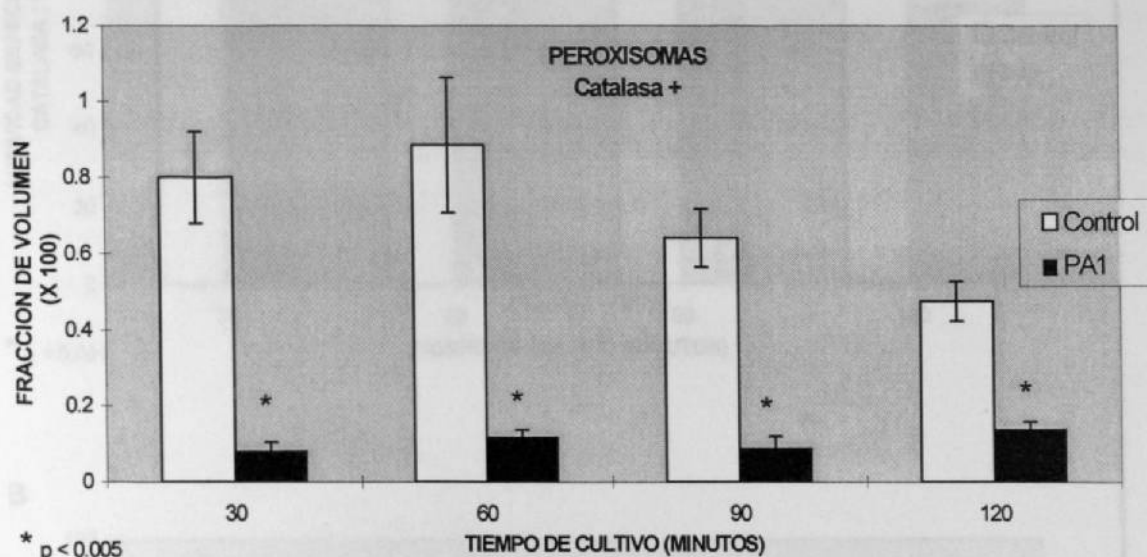


Figura 11. Efecto de PA1 (10 μ g/ml) a diferentes tiempos de cultivo sobre la fracción de volumen peroxisomal. Los valores de cada barra representan la media \pm desviación estándar de 64 micrografías electrónicas, correspondientes a 80 platos de cultivo. PA1 = peroxisomicina A1.

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).

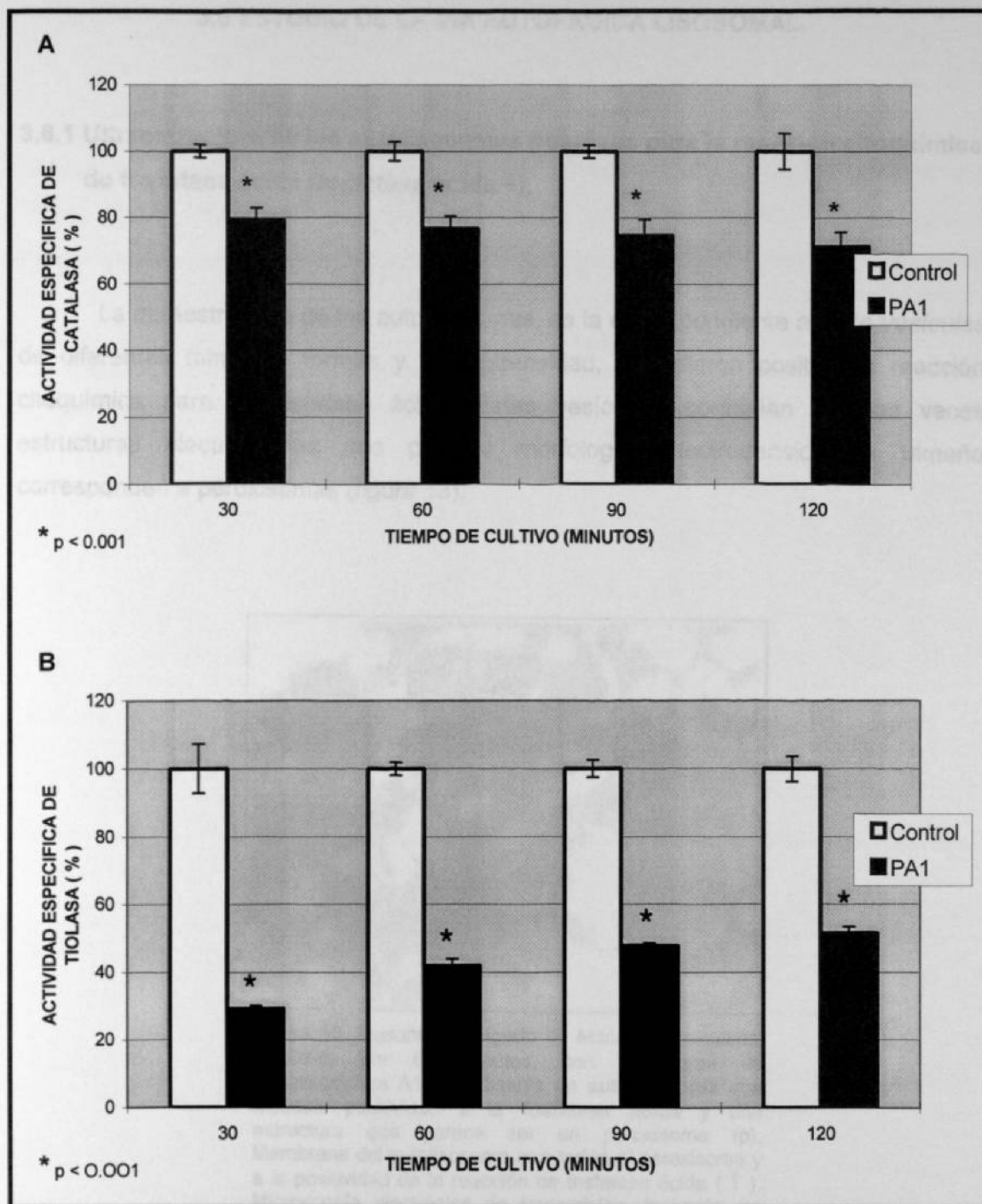


Figura 12. Efecto de PA1 (10 $\mu\text{g/ml}$) a diferentes tiempos de cultivo sobre la actividad específica (U/mg proteína, %) de dos enzimas peroxisomales. A. Catalasa, y B. 3-oxoacil-CoA tiolasa. La actividad de las enzimas se determinó por quintuplicado, en el homogenizado proveniente de los explantes 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 \pm desviación estándar. PA1 = peroxisomicina A1.