

3.6 ESTUDIO DE LA VIA AUTOFAGICA LISOSOMAL.

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

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

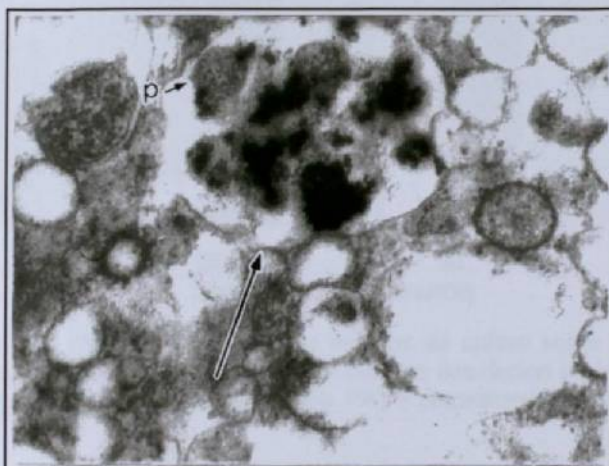


Figura 13. Explante de hígado de *Macaca fascicularis*, incubado por 60 minutos, con 10 $\mu\text{g/ml}$ de peroxisomicina A1. Se observa un autolisosoma que muestra positividad a la fosfatasa ácida y una estructura que parece ser un peroxisoma (p). Membrana del autolisosoma que rodea al peroxisoma y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

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

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

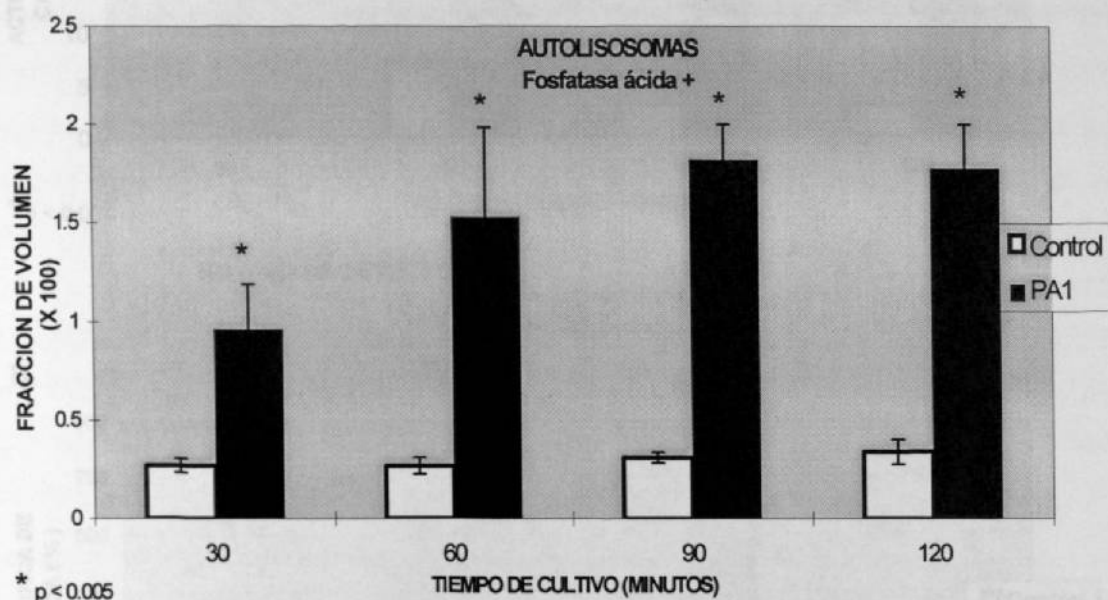


Figura 14. Efecto de PA1 (10 $\mu\text{g/ml}$) a diferentes tiempos de cultivo sobre la fracción de volumen lisosomal. Los valores de cada barra representan la media \pm desviación estándar de 64 micrografías electrónicas, correspondientes a 80 platos de cultivo. PA1 = peroxisomicina A1.

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

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

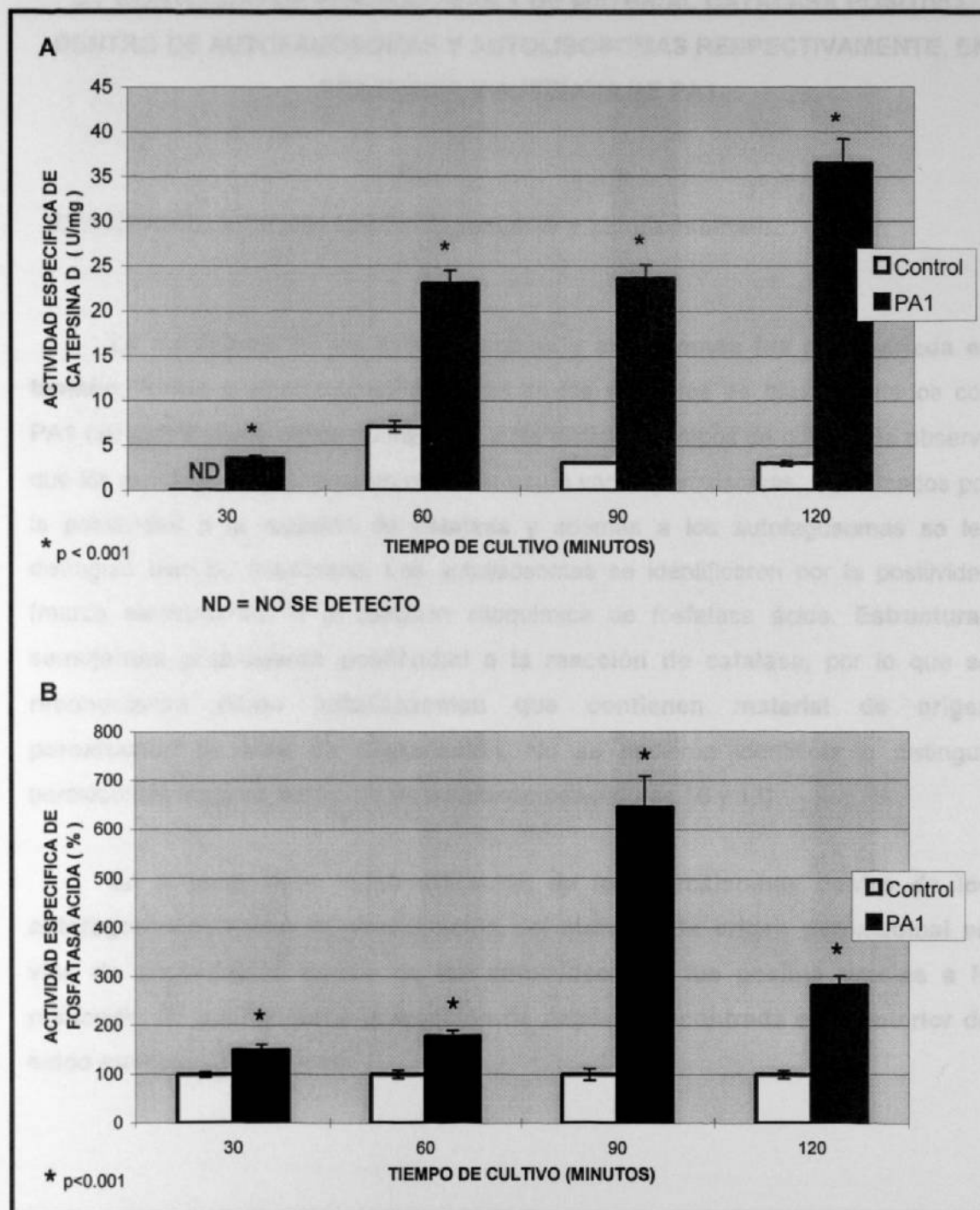


Figura 15. Efecto de PA1 (10 $\mu\text{g/ml}$) a diferentes tiempos de cultivo sobre la actividad específica de dos enzimas lisosomales. A. **Catepsina D** (U/mg Proteína), y B. **fosfatasa ácida** (U/mg Proteína, %). La actividad de las enzimas se determinó por quintuplicado, en el homogenizado proveniente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

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

3.7.1 Ultraestructura de los autofagosomas y autolisosomas.

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

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

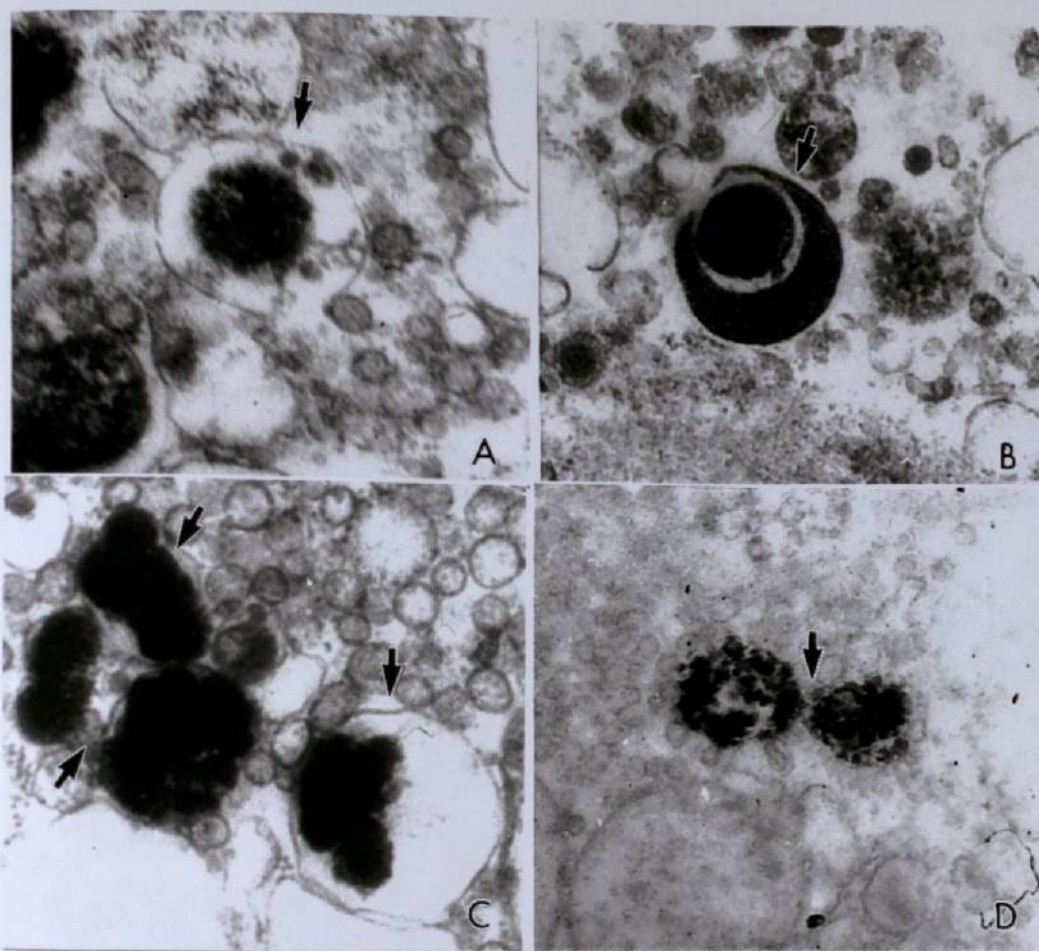


Figura 16. Explantes de hígado de *Macaca fascicularis*, incubados con 10 $\mu\text{g/ml}$ de peroxisomicina A1. A. 30 minutos, B. 60 minutos, C. 90 minutos y D. 120 minutos. Se observan varios **autofagosomas catalasa positivo** (A-C) y dos **autolisosomas catalasa positivo** (D). Microscopía electrónica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

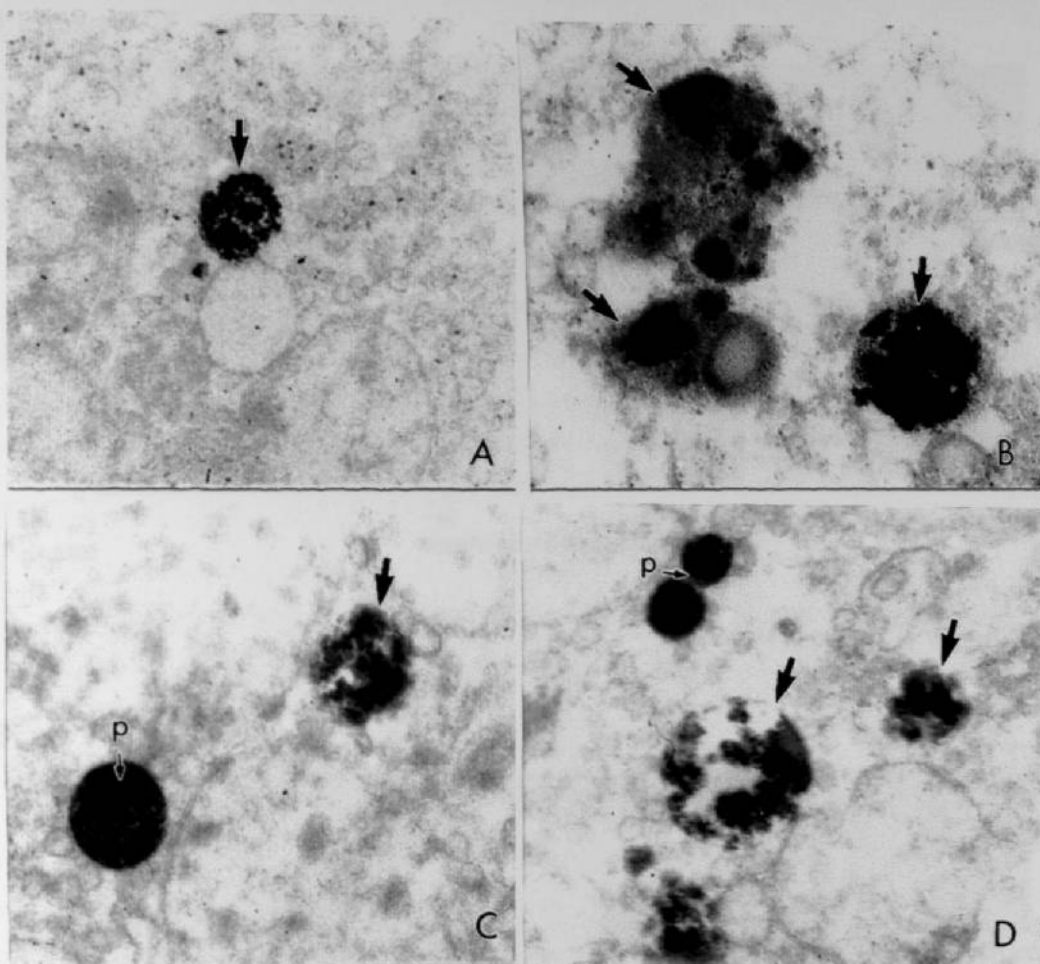


Figura 17. Explantes de hígado de *Macaca fascicularis*. A. y B. **Autolisosomas fosfatasa ácida positivo**, C. y D. **autolisosomas catalasa positivo**. Compárese en C. y D., la imagen de los **peroxisomas (p)** con la de los autolisosomas, ambos catalasa positivo. Microscopía electrónica de transmisión.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

3.7.2 Fracción de volumen de los autofagosomas y autolisosomas.

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

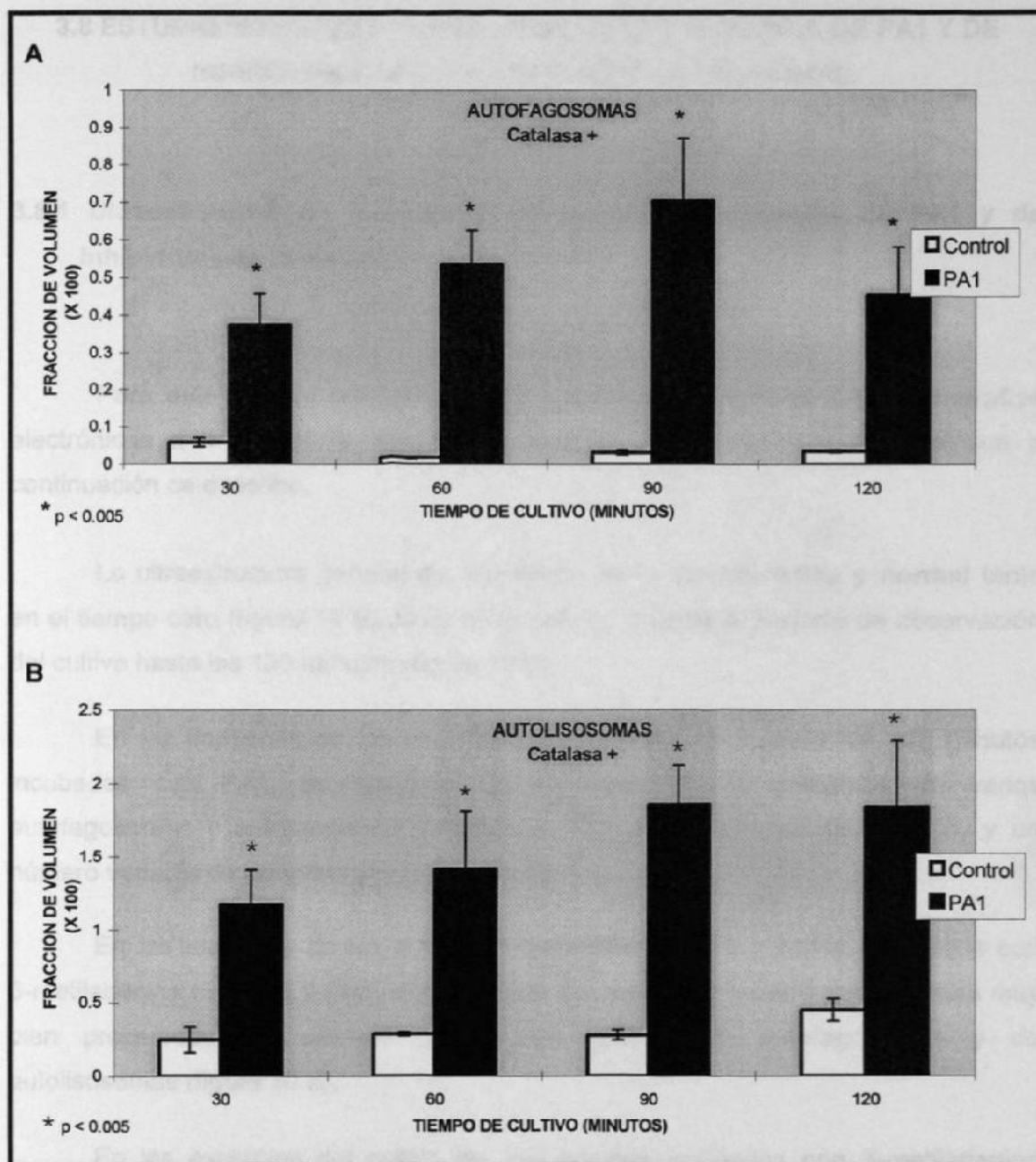


Figura 18. Efecto de PA1 (10 $\mu\text{g/ml}$) a diferentes tiempos de cultivo sobre la fracción de volumen de: A. autofagosomas catalasa positivo y B. autolisosomas catalasa positivo. Los valores de cada barra representan la media \pm desviación estándar de 64 micrografías electrónicas, correspondientes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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

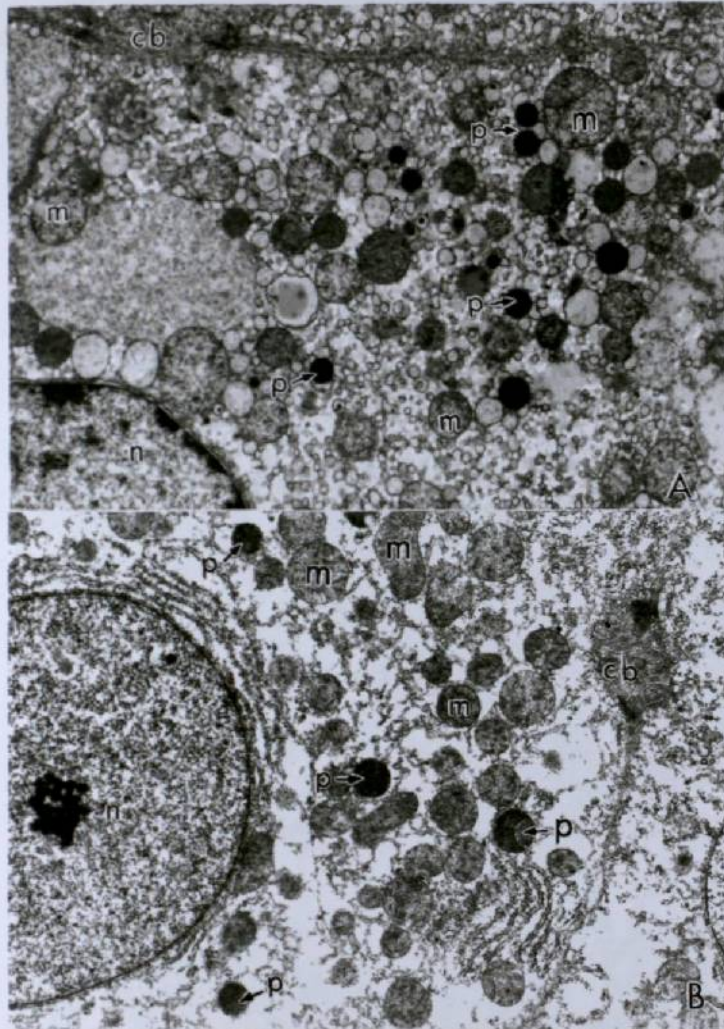


Figura 19. Explantes de hígado de *Macaca fascicularis*. A. Tiempo cero, B. incubado 120 minutos en un cultivo de órgano sin peroxisomicina A1. Se observan el núcleo (n), mitocondria (m), canaliculo biliar (cb) y peroxisoma (p) **bien conservados**. Estos últimos organelos, con una marcada electrodensidad,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

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

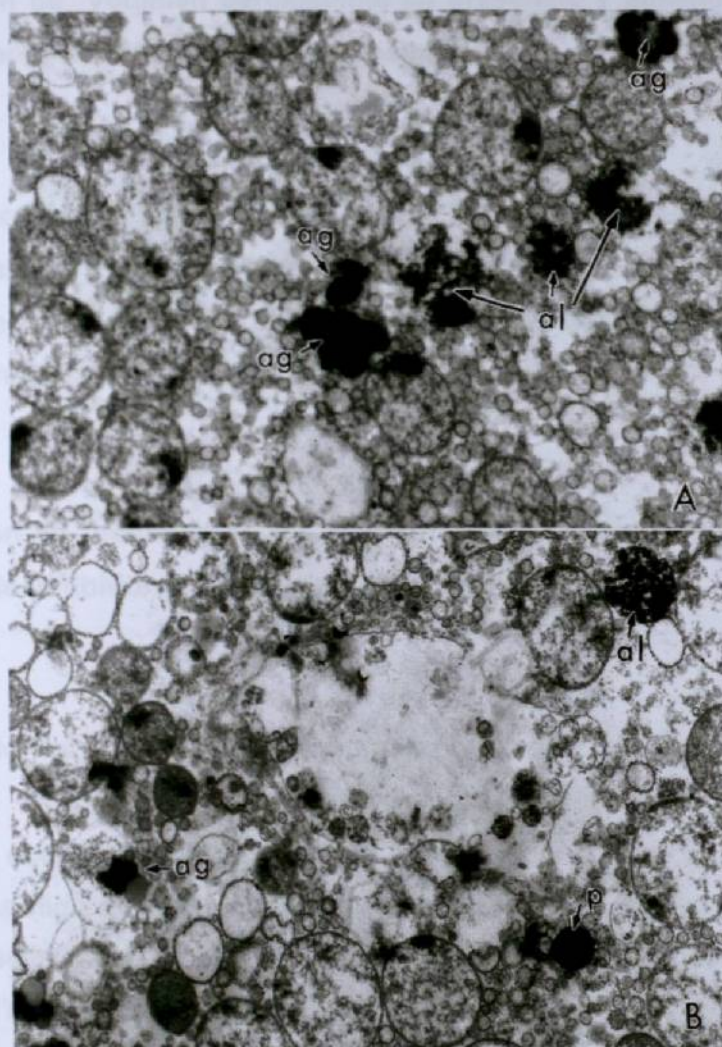


Figura 20. Explantes de hígado de *Macaca fascicularis*, incubados 120 minutos. A. 10 µg/ml de peroxisomicina A1, B. 10 µg/ml de peroxisomicina A1 y 5 mM de 3-metiladenina. Se observan organelos con positividad a la reacción de catalasa: peroxisomas (p), autofagosomas (ag) y autolisomas (al). Microscopía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

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

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

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

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

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

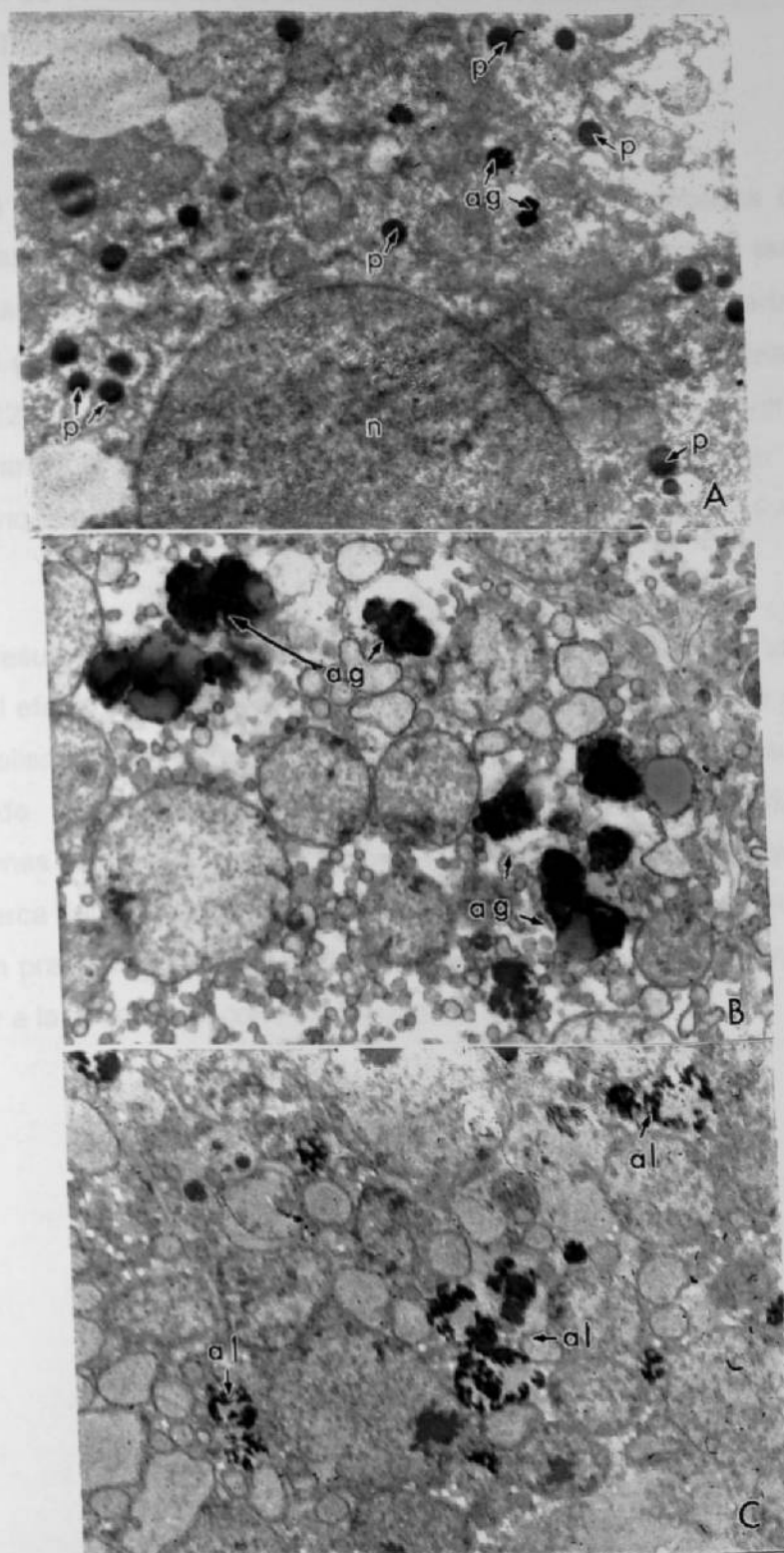


Figura 21. Explantes de hígado de *Macaca fascicularis*, incubados 120 minutos. A. 5 mM de 3-metiladenina, B. 10 mM de DL-asparagina, y C. 10 mM de metilamina. Se observan organelos con positividad a la reacción de catalasa: peroxisomas (p), autofagosomas (ag) y autolisosomas (al). Microscopía electrónica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

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

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

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

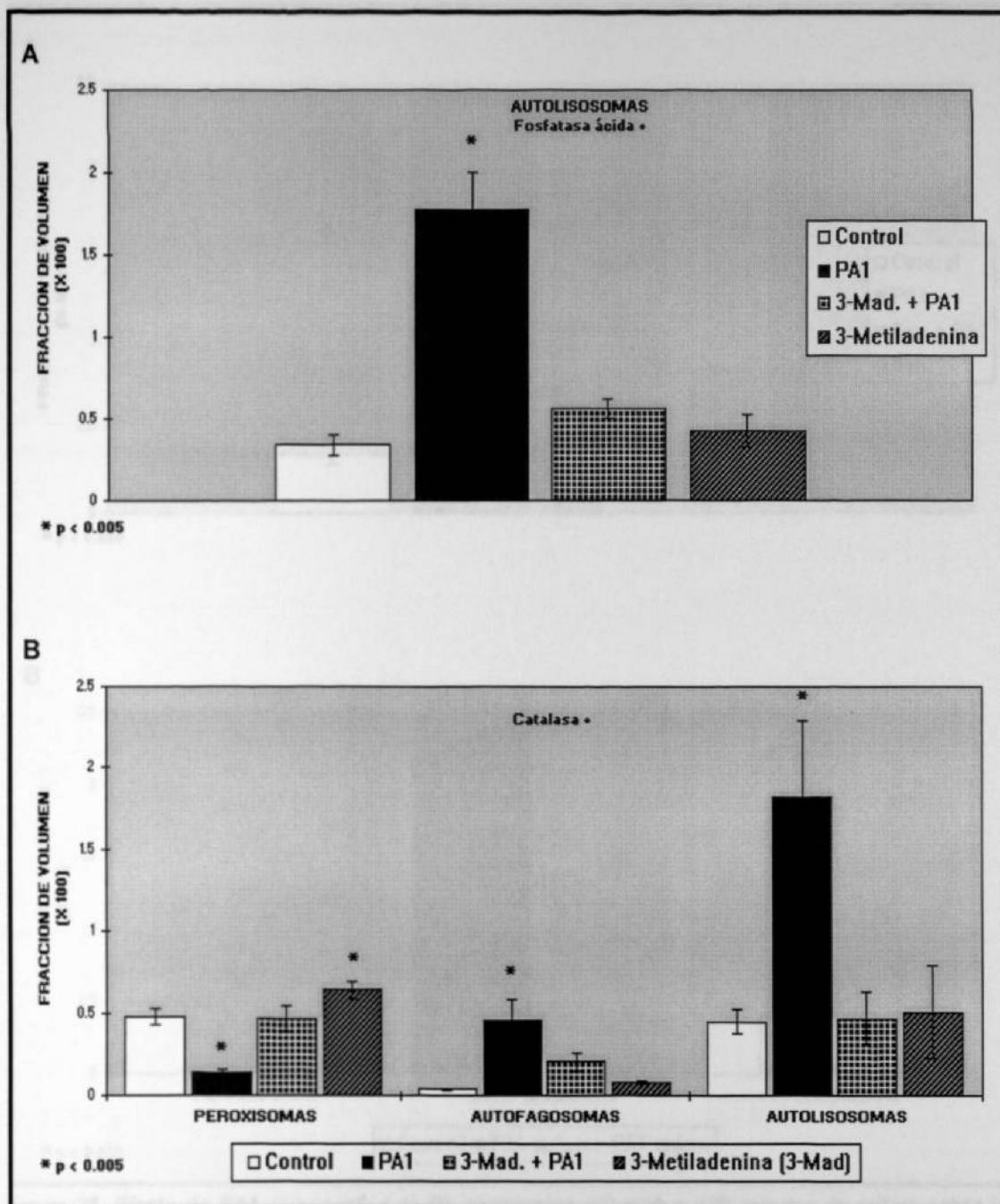


Figura 22. Efecto de PA1 (10 μ g/ml) y de 3-metiladenina (5 mM) a 120 minutos de cultivo sobre la fracción de volumen de: A. autolisosomas fosfatasa ácida positivo, y B. peroxisomas, autofagosomas y autolisosomas catalasa positivo. Los valores de cada barra representan la media \pm desviación estándar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

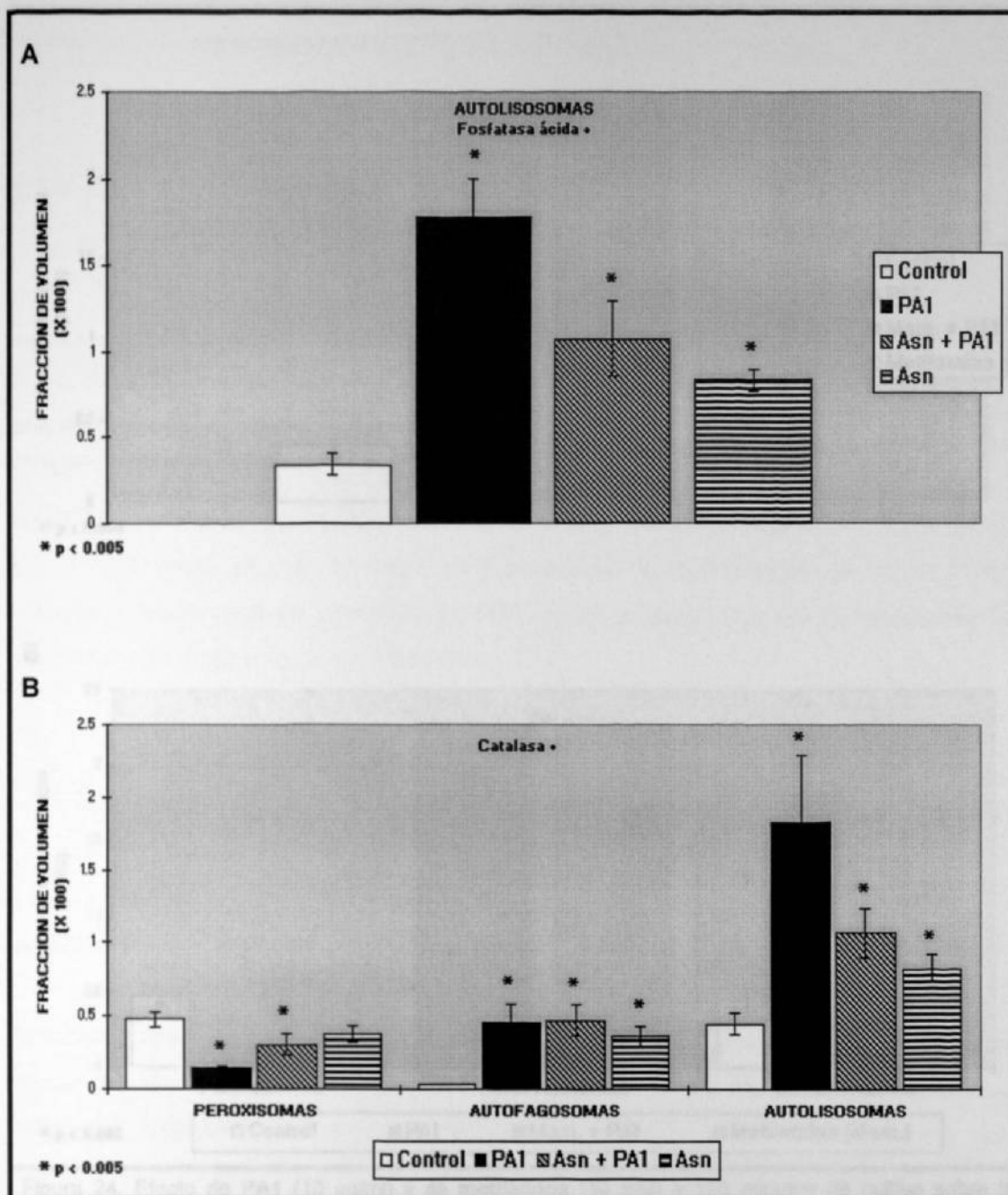


Figura 23. Efecto de PA1 (10 μ g/ml) y de DL-asparagina (10 mM) a 120 minutos de cultivo sobre la fracción de volumen de: A. autolisosomas fosfatasa ácida positivo, y B. peroxisomas, autofagosomas y autolisosomas catalasa positivo. Los valores de cada barra representan la media \pm desviación estándar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

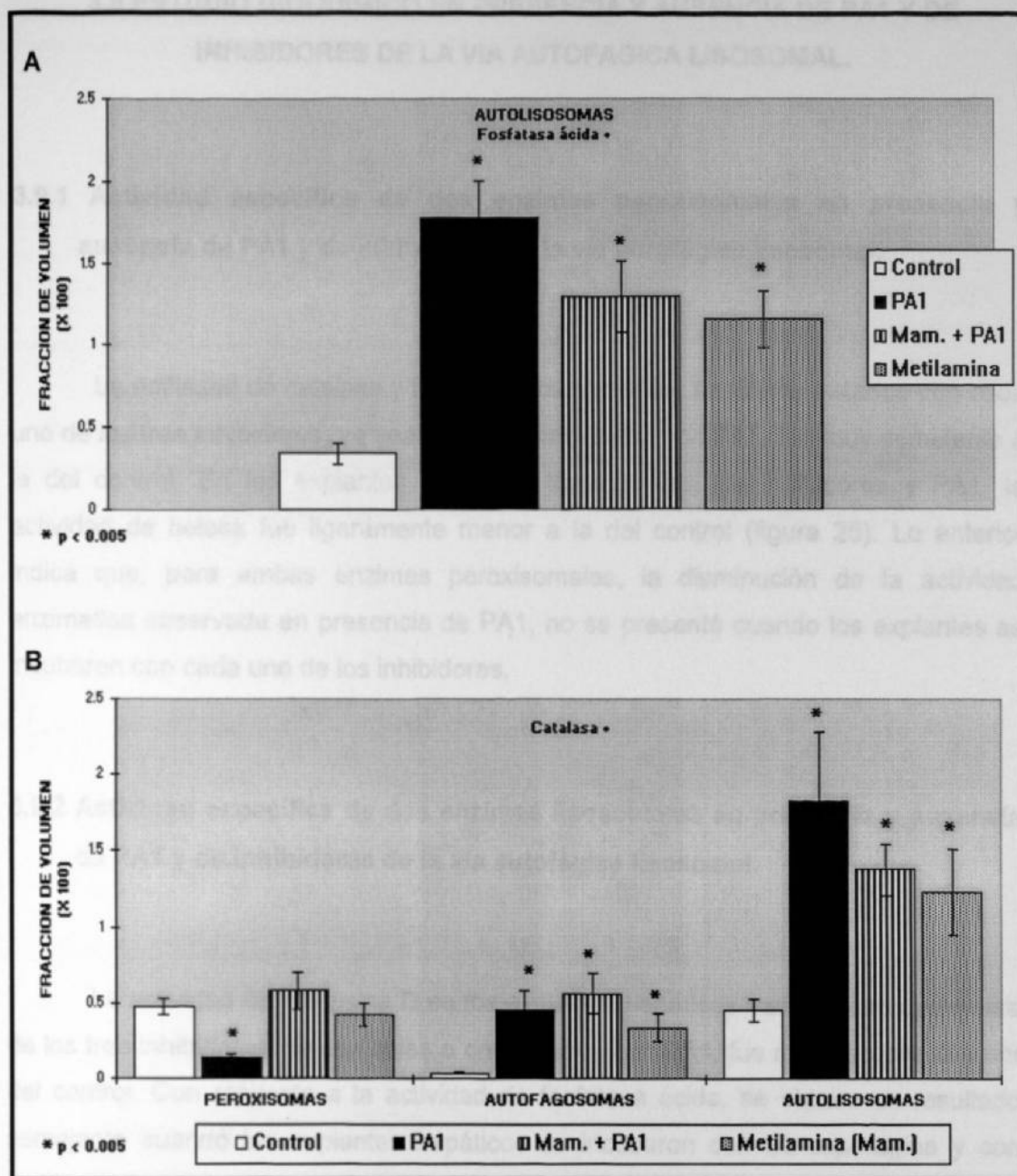


Figura 24. Efecto de PA1 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y de metilamina (10 mM) a 120 minutos de cultivo sobre la fracción de volumen de: A. autolisosomas fosfatasa ácida positivo, y B. peroxisomas, autofagosomas y autolisosomas catalasa positivo. Los valores de cada barra representan la media \pm desviación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

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

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

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

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

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

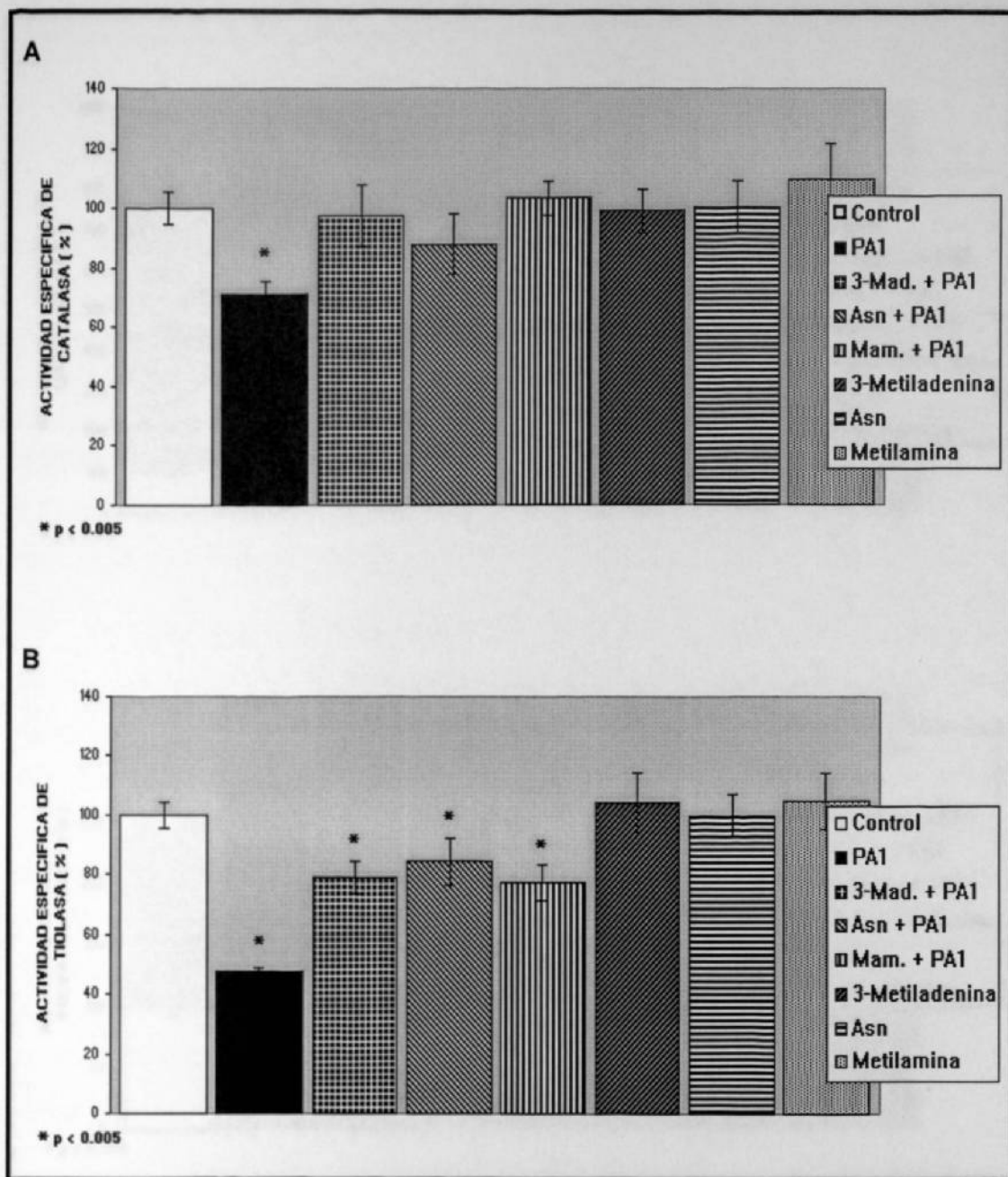


Figura 25. Efecto de PA1 (10 $\mu\text{g/ml}$) y de tres inhibidores de la vía autofágica lisosomal a 120 minutos de cultivo, sobre la actividad específica (U/mg proteína, %) de dos enzimas peroxisomales. **A.** Catalasa, y **B.** 3-oxoacil-CoA tiolasa. La actividad de las enzimas se determinó por quintuplicado,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

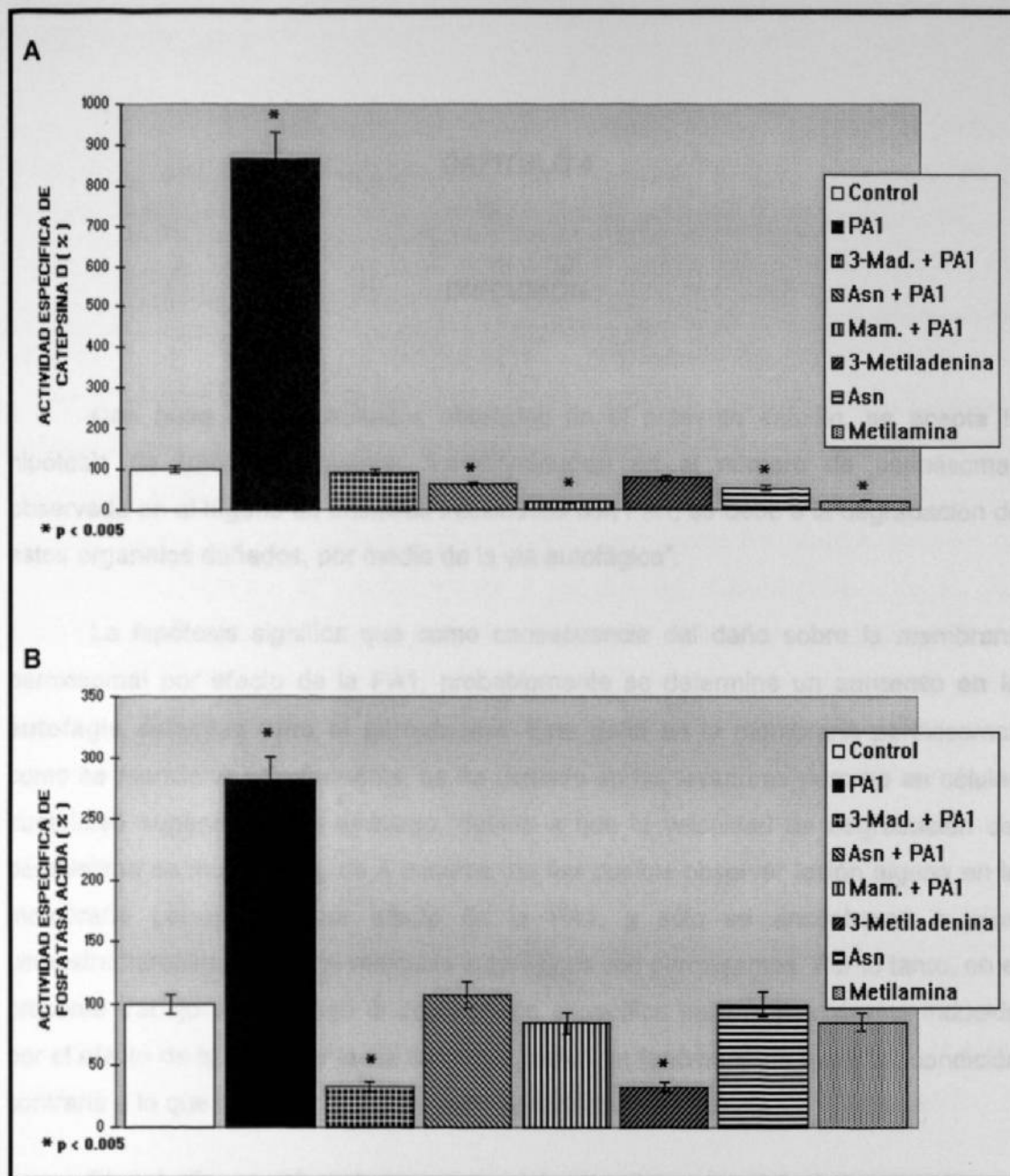


Figura 26. Efecto de PA1 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y de tres inhibidores de la vía autofágica lisosomal a 120 minutos de cultivo, sobre la actividad específica (U/mg proteína, %) de dos enzimas lisosomales. **A.** Catepsina D, y **B.** fosfatasa ácida. La actividad de las enzimas se determinó por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

CAPITULO 4

DISCUSION

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

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

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

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

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

Se ha demostrado que la actividad de algunas enzimas peroxisomales, como la catalasa, aún se detecta en la vesícula autofágica con peroxisomas^{21,25}; además, el tratamiento con PA1 no interfiere con la actividad de esta enzima según fue demostrado por Sepúlveda y cols.⁴⁴ y Moreno y cols.³⁹. Lo anterior, nos permitió detectar la actividad de catalasa aún en etapas tardías de la autofagia. En varios estudios^{115-118,160} se ha utilizado a la catalasa como marcador peroxisomal, para analizar la degradación de este organelo bajo distintas condiciones.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

analizarse tanto la fracción de volumen peroxisomal y la de los cuerpos autofágicos como la actividad de las enzimas marcadoras lisosomales, en presencia de cualquiera de los tres inhibidores de la vía autofágica lisosomal se encontró una respuesta que fue dirigida a anular el efecto de PA1. Los inhibidores bloquean el proceso autofágico lisosomal en diferentes pasos, por ejemplo, para el caso de 3-metiladenina, que se conoce inhibe la formación de autofagosomas porque bloquea el secuestro autofágico^{109,110,116,161}, se encontró el nivel de autofagosomas catalasa + muy cercano al control, y se obtuvo un aumento con una diferencia significativa, en los peroxisomas en relación al control (basal). Este último hallazgo, probablemente es el resultado de que se acumularon peroxisomas en el citoplasma, por el bloqueo autofágico ocasionado por la 3-metiladenina. Los resultados observados tanto morfológicos como bioquímicos, en los controles internos de cada uno de los tres inhibidores (esto es cuando el inhibidor se encuentra sólo), coinciden con los reportes de otros autores^{106,107,110,118,163}.

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

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

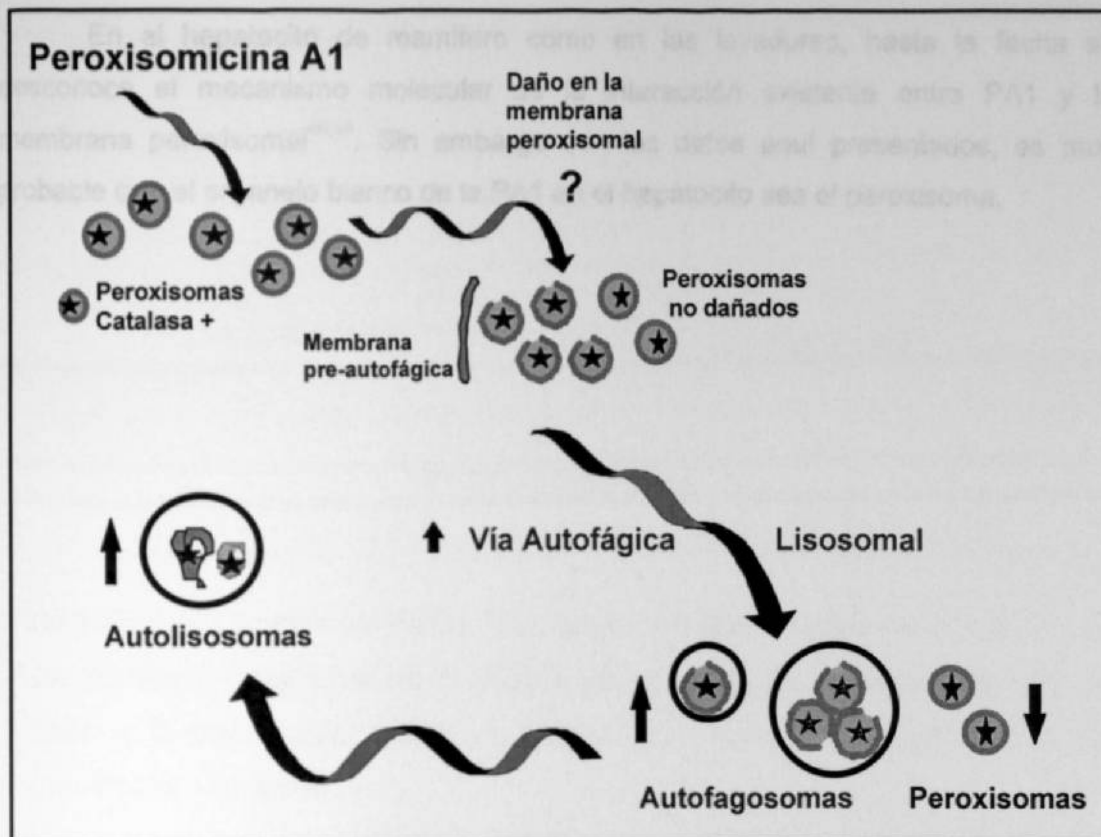


Figura 27. Esquema del mecanismo propuesto, mediante el cual peroxisomicina A1 (PA1) disminuye el número de peroxisomas en el hepatocito de *Macaca fascicularis*, en un modelo *in vitro*.

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

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

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

CAPITULO 5

CONCLUSIONES, PERSPECTIVAS Y CONTRIBUCIONES.

5.1 CONCLUSIONES

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

5.2 PERSPECTIVAS

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

5.3 CONTRIBUCIONES

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