

APENDICE A

ESTUDIO PILOTO

A.1 OBJETIVO DEL ESTUDIO PILOTO.

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

A.2 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .

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

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

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

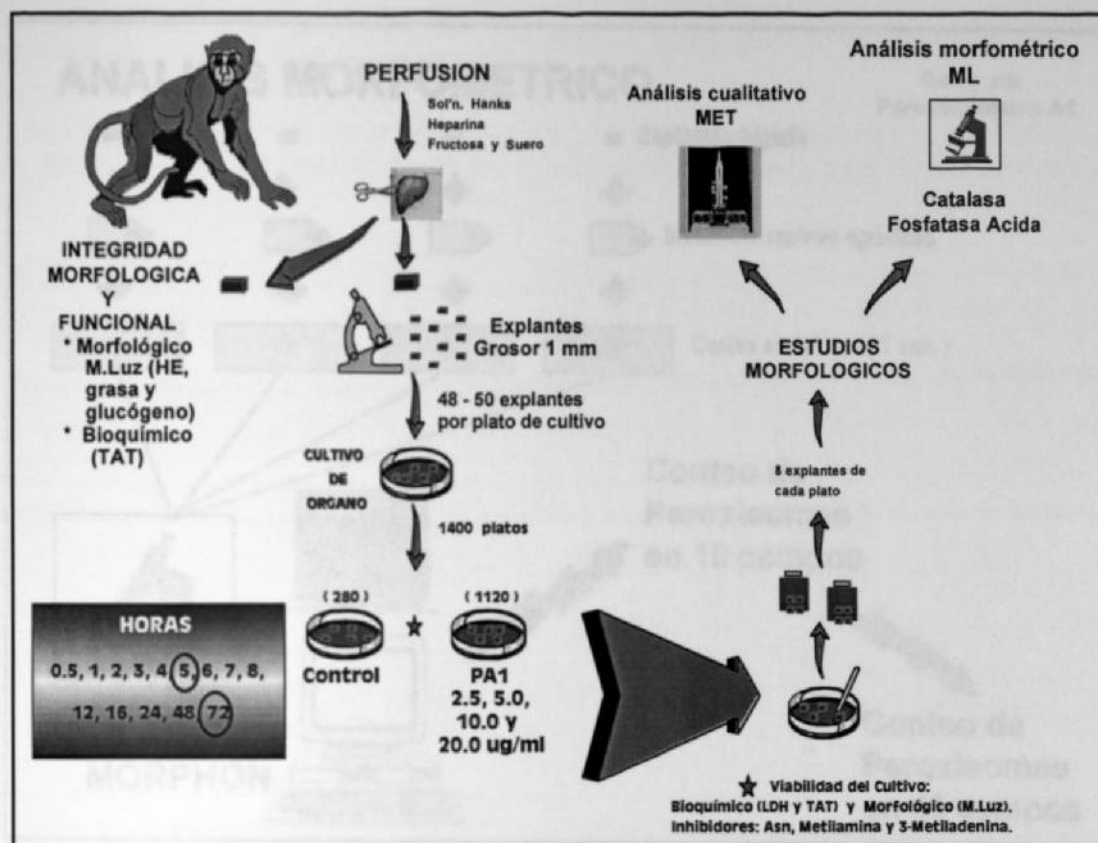


Figura 28. Resumen de la estrategia experimental del estudio piloto; puntos más relevantes. Microscopía electrónica de transmisión (MET) y microscopía de luz (ML).

A.2.1.5 En la figura 29, se presenta el análisis morfométrico por microscopía de luz; detalles de estas técnicas se encuentran en el capítulo de materiales y métodos.

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 peroxidación AI) y se concluyó que en los cultivos provenientes de hígado congelado-descongelado, aún en presencia del OMSO 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 con peroxidación AI pero con ácido al 0.1 % (aH), que fue la concentración de disolución para la leucina. Se probaron varios medios nutricionales (MEM, Dulbecco y L-15), suplementos y condiciones de volumen de hígado por plato de cultivo. Después de analizar los parámetros anteriores, se estableció la técnica para el cultivo de órgano que se describe en la sección 2.4.3 del capítulo de materiales y métodos.

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

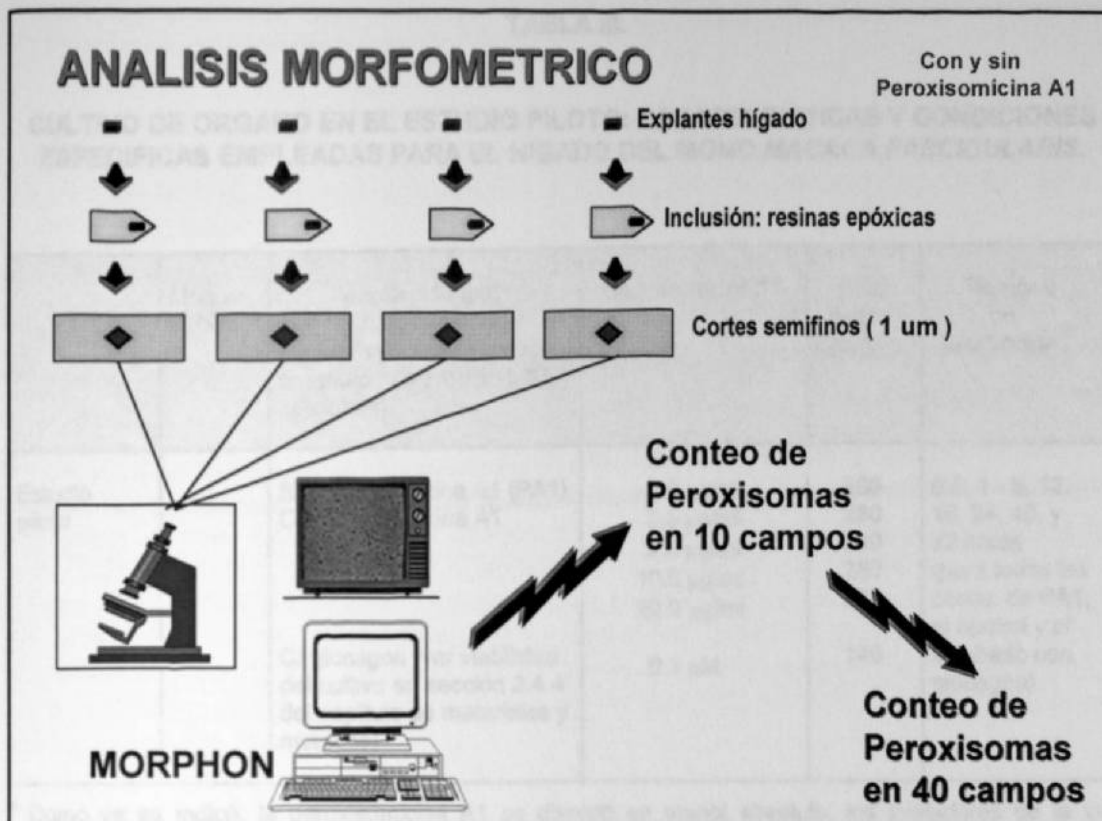


Figura 29. Análisis morfométrico por microscopía de luz (ML) como parte fundamental de la estrategia experimental del estudio piloto.

A.2.1 Estandarización del cultivo de órgano.

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

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

TABLA III.

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

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

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

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

A.3 RESULTADOS

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

A.3.1 Integridad morfológica y funcional del hígado.

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

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

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

A.3.1.2 Análisis bioquímico.

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

TABLA IV.

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

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

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

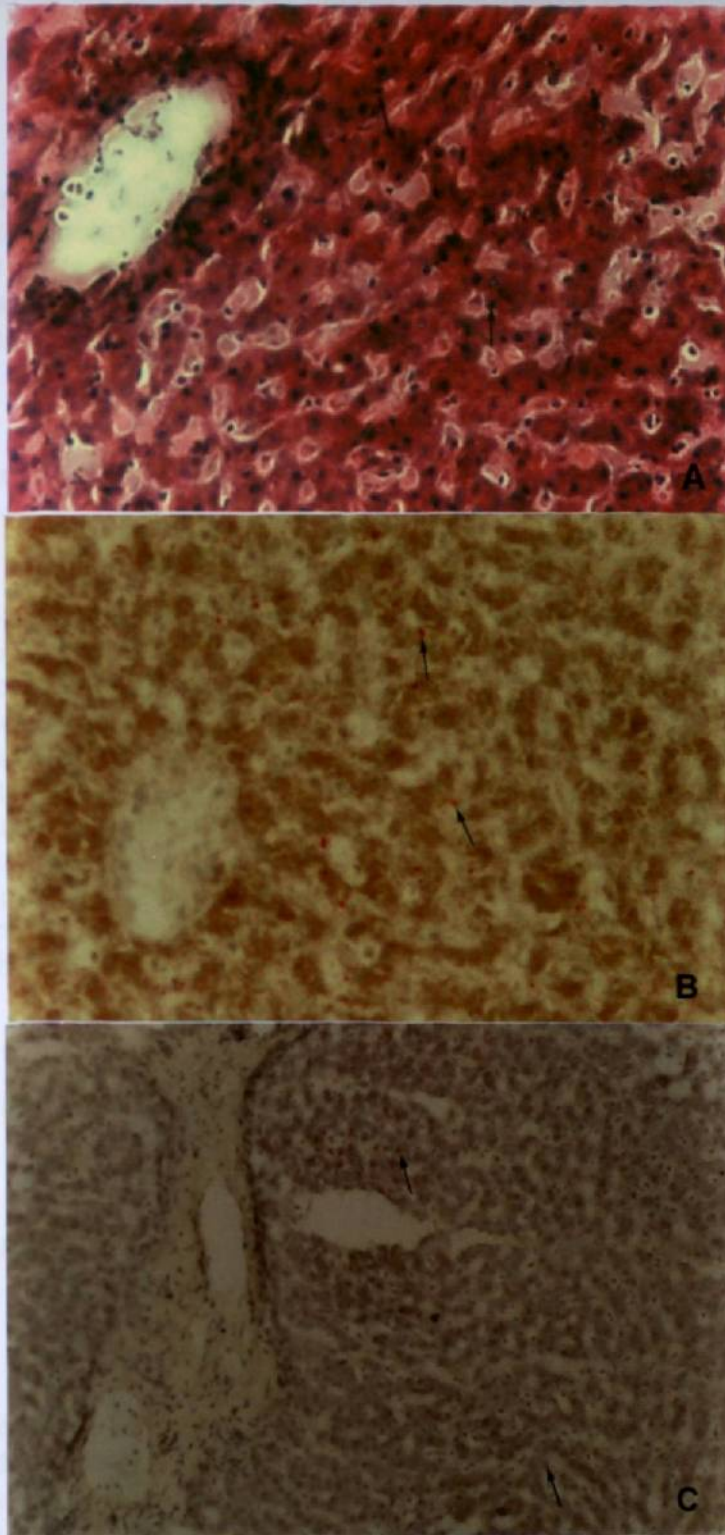


Figura 30. Hígado de *Macaca fascicularis*, en el tiempo cero. A: Tinción de hematoxilina y eosina (HE). Núcleo del hepatocito (↑). 50 X. B: Tinción del rojo oleoso O. Depósito de grasa (↑). 50 X. C: Reacción del ácido peryódico de Schiff (PAS). Núcleo del hepatocito (↑). 31 X. Microscopía de luz, campo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

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

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

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

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

A.3.2.2 Análisis bioquímico.

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

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

TABLA V.

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

ACTIVIDAD ESPECIFICA DE TAT (U/mg Proteína.) ± DESVIACION ESTANDAR						
Horas Cultivo			Concentración de Peroxisomicina A1 (PA1)			
	S/Glucagon S/PA1	C/Glucagon S/PA1	2.5 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml
0.5	0.093 ± 0.021	0.154 ± 0.017	0.088 ± 0.021	0.095 ± 0.013	0.115 ± 0.020	0.101 ± 0.015
1	0.089 ± 0.015	0.265 ± 0.058	0.091 ± 0.013	0.090 ± 0.012	0.092 ± 0.010	0.091 ± 0.016
2	0.127 ± 0.014	0.353 ± 0.039	0.123 ± 0.015	0.118 ± 0.010	0.125 ± 0.012	0.126 ± 0.018
3	0.136 ± 0.022	0.415 ± 0.063	0.118 ± 0.024	0.130 ± 0.022	0.133 ± 0.018	0.137 ± 0.025
4	0.130 ± 0.018	0.515 ± 0.049	0.127 ± 0.016	0.125 ± 0.027	0.119 ± 0.023	0.118 ± 0.019
5	0.124 ± 0.011	0.545 ± 0.037	0.122 ± 0.019	0.118 ± 0.016	0.125 ± 0.014	0.121 ± 0.020
6	0.128 ± 0.018	0.673 ± 0.058	0.115 ± 0.011	0.124 ± 0.018	0.120 ± 0.011	0.098 ± 0.017
7	0.117 ± 0.026	0.573 ± 0.060	0.121 ± 0.018	0.119 ± 0.014	0.117 ± 0.013	0.120 ± 0.013
8	0.125 ± 0.014	0.201 ± 0.031	0.099 ± 0.023	0.127 ± 0.013	0.118 ± 0.016	0.124 ± 0.014
12	0.119 ± 0.012	0.146 ± 0.022	0.089 ± 0.019	0.099 ± 0.015	0.120 ± 0.027	0.113 ± 0.016
16	0.102 ± 0.013	0.130 ± 0.019	0.098 ± 0.017	0.088 ± 0.021	0.105 ± 0.019	0.111 ± 0.012
24	0.112 ± 0.017	0.187 ± 0.021	0.106 ± 0.020	0.107 ± 0.011	0.095 ± 0.018	0.099 ± 0.011
48	0.097 ± 0.019	0.109 ± 0.015	0.099 ± 0.013	0.105 ± 0.016	0.121 ± 0.020	0.100 ± 0.019
72	0.096 ± 0.025	0.112 ± 0.011	0.101 ± 0.021	0.096 ± 0.019	0.098 ± 0.014	0.102 ± 0.010

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

A.3.2.2.2 Liberación de lactato deshidrogenasa (LDH).

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

TABLA VI.

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

ACTIVIDAD DE LDH (U totales), % DE LIBERACIÓN ± DESVIACION ESTANDAR					
Horas Cultivo	Concentración de Peroxisomicina A1 (PA1)				
	Control Sin PA1	2.5 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml
0.5	8.28 ± 1.04	10.36 ± 1.28	9.38 ± 0.89	11.71 ± 2.11	12.34 ± 1.29
1	8.44 ± 0.69	11.67 ± 0.99	12.46 ± 1.01	12.20 ± 3.05	10.37 ± 1.35
2	5.85 ± 1.06	7.92 ± 0.85	8.46 ± 1.07	10.56 ± 0.73	8.94 ± 1.99
3	8.00 ± 0.92	10.80 ± 0.97	9.03 ± 0.59	7.57 ± 0.38	8.58 ± 1.63
4	7.93 ± 1.82	9.36 ± 1.88	4.97 ± 0.80	5.63 ± 0.31	8.11 ± 0.67
5	8.51 ± 1.22	4.96 ± 0.52	8.88 ± 0.93	17.35 ± 1.50	15.36 ± 1.12
6	16.06 ± 2.05	12.99 ± 2.02	14.53 ± 1.54	19.12 ± 1.88	29.96 ± 1.34
7	18.11 ± 2.83	27.15 ± 2.01	33.15 ± 2.97	37.66 ± 3.45	29.45 ± 3.08
8	26.96 ± 1.74	32.05 ± 2.93	19.89 ± 2.56	34.54 ± 2.56	33.19 ± 4.05
12	29.91 ± 3.70	28.97 ± 2.65	27.23 ± 3.05	36.98 ± 3.11	41.33 ± 5.09
16	31.87 ± 3.28	30.54 ± 3.04	59.22 ± 4.82	55.36 ± 4.44	70.86 ± 8.30
24	32.33 ± 2.97	32.81 ± 3.38	67.89 ± 5.17	68.29 ± 6.53	71.23 ± 6.79
48	30.07 ± 3.19	39.46 ± 2.69	70.56 ± 6.13	71.23 ± 6.12	78.45 ± 7.93
72	33.59 ± 4.33	38.16 ± 3.90	68.51 ± 7.76	65.25 ± 4.87	75.45 ± 6.76

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

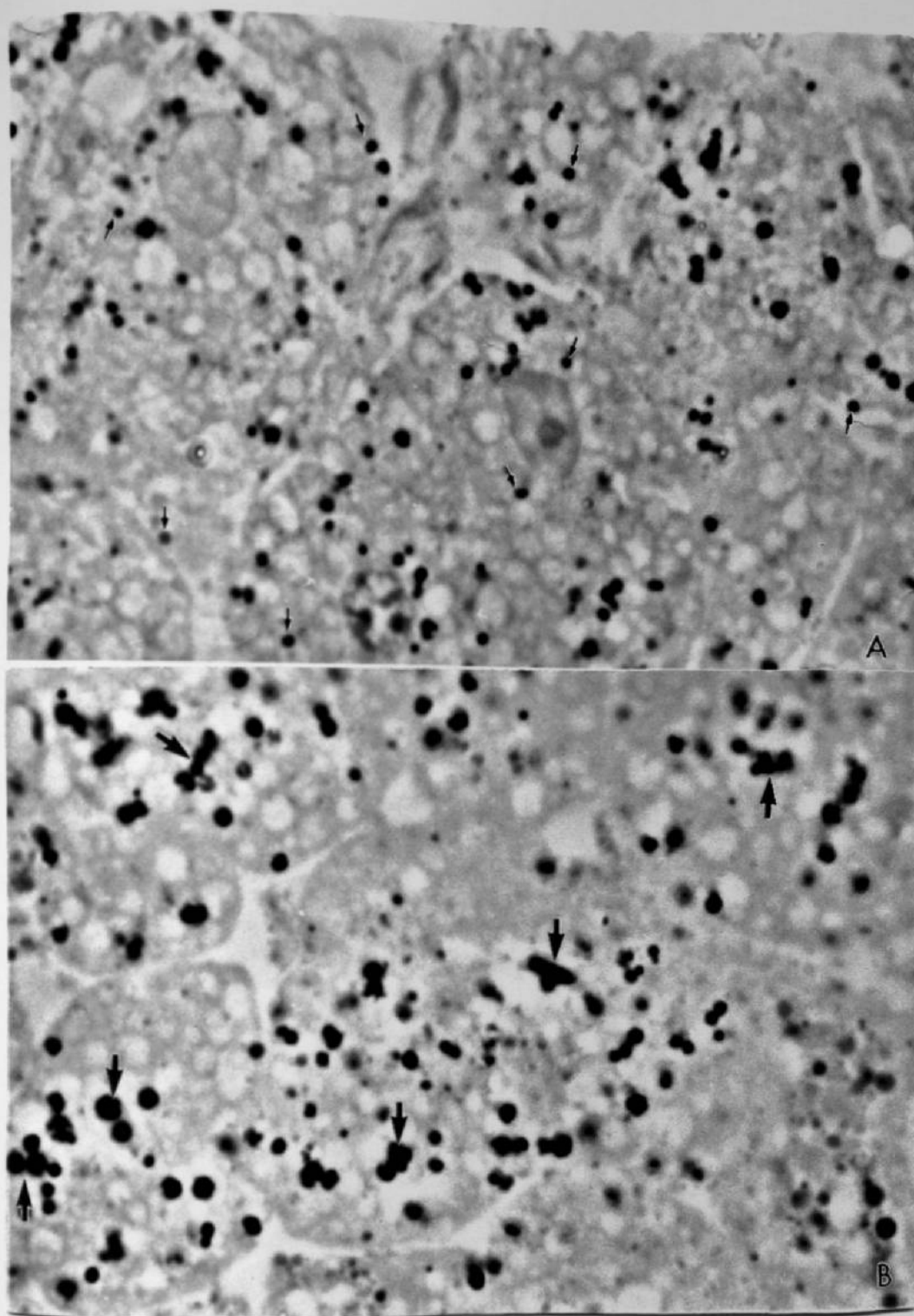


Figura 31. Explantes de hígado de *Macaca fascicularis*, incubados por 2 horas. A. Control sin peroxisomicina A1, y B. 10 µg/ml de peroxisomicina A1. Se observan en las micrografías, peroxisomas positivos a la reacción de catalasa, *aislados* (↑) y *agrupados* (↑). Microscopía de contraste de fases.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

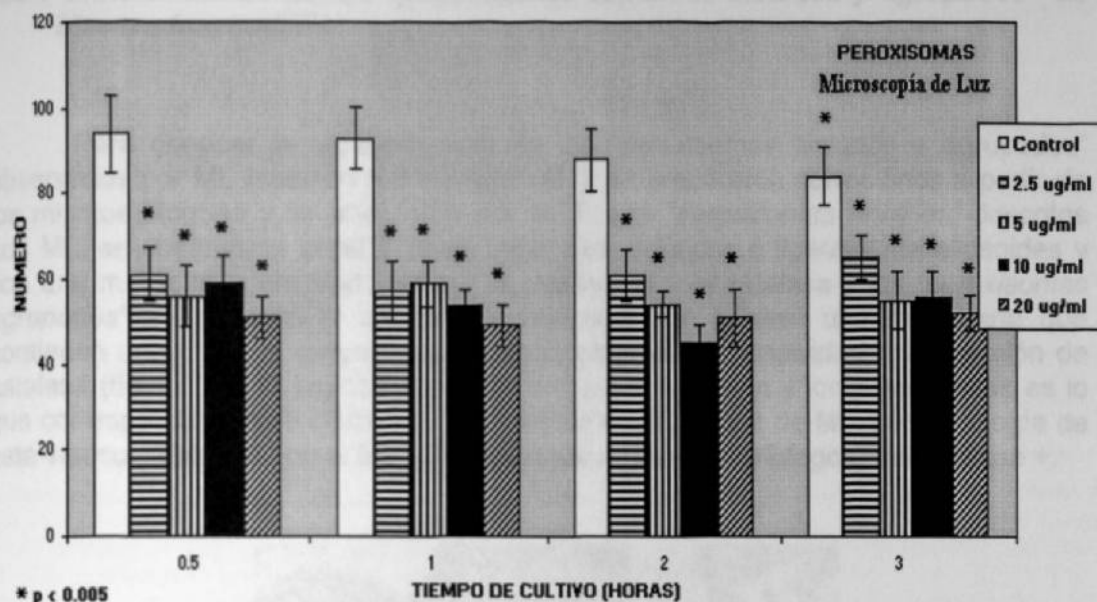


Figura 32. Efecto de varias concentraciones de peroxisomicina A1 (2.5, 5, 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$) sobre el número de *peroxisomas aislados* a diferentes tiempos de cultivo de los explantes del hígado de *Macaca fascicularis*. Los valores de cada barra representan la media \pm desviación estándar de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

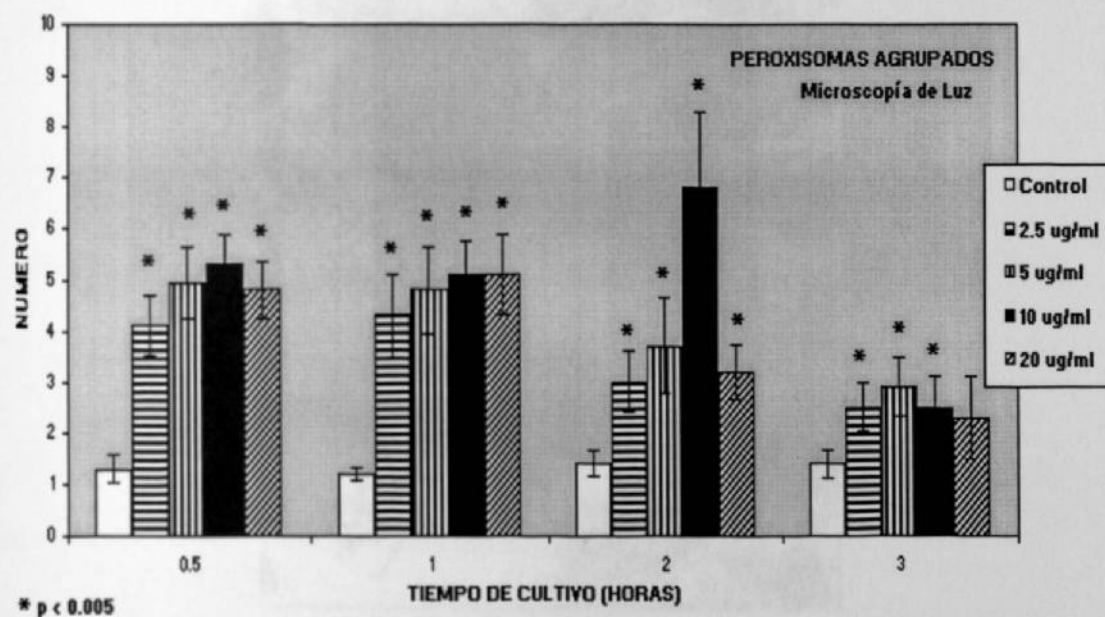


Figura 33. Efecto de varias concentraciones de peroxisomicina A1 (2.5, 5, 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$) sobre el número de *peroxisomas agrupados en racimos* a diferentes tiempos de cultivo de los explantes del hígado de *Macaca fascicularis*. Los valores de cada barra representan la media \pm desviación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

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

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

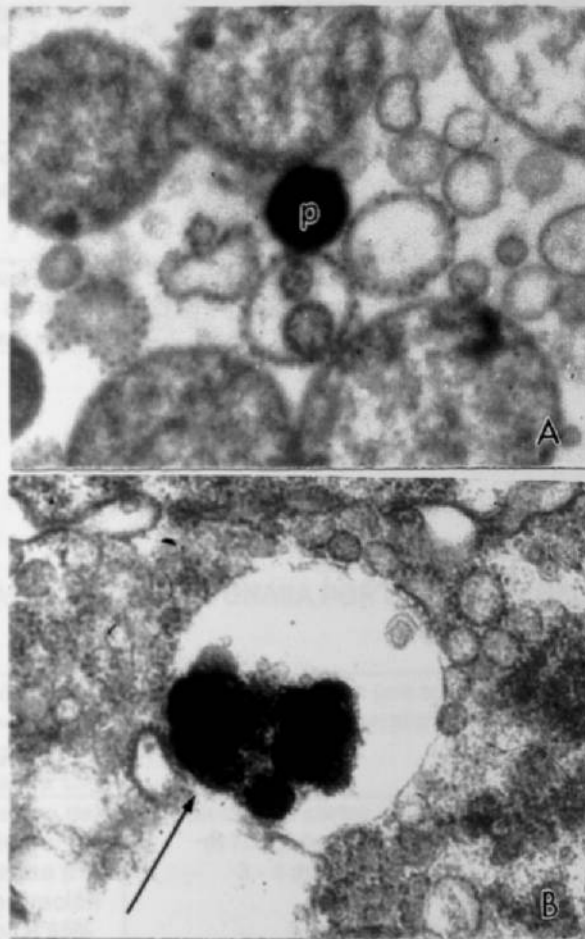


Figura 34. Explantes de hígado de *Macaca fascicularis*, incubados por 2 horas. A. Control. Se observa un peroxisoma (p). B. Incubado con 10 µg/ml de peroxisomicina A1. Se observa un autofagosoma. Membrana del autofagosoma que rodea a varios peroxisomas catalasa positivo (↑). Microscopía electrónica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

APENDICE B

TABLA 1

TINCION CON HEMATOXILINA Y EOSINA.

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

TABLA 2

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

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

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

TABLA 3

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

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

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

TABLA 4

METODO PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD DE TIROSINA AMINOTRANSFERASA ^a.

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

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

TABLA 5

METODO PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD DE LACTATO DESHIDROGENASA ^a.

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

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

TABLA 6

**TECNICA CITOQUIMICA PARA LA DETECCION DE LA ACTIVIDAD DE CATALASA
PEROXISOMAL ⁴.**

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

⁴ Para los controles negativos, se incubaron a 37°C las muestras en el medio de DAB, en ausencia del substrato (peróxido de hidrógeno).

TABLA 7

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

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

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

TABLA 8

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

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

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

TABLA 9

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

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

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

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

TABLA 10

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

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

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

TABLA 11

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

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

- ^a Simultáneamente con los sobrenadantes control y problema, se preparó para cada experimento una curva patrón de fosfato inorgánico, para lo cual se empleó una solución de trabajo de KH₂PO₄ 1mM. De esta solución se tomaron los volúmenes adecuados para obtener los estándares de fosfato, que fueron desde 0.1 hasta 1 μmol y se diluyó hasta 1 ml con el amortiguador de homogenización a la misma concentración final que tienen las muestras. Después se procedió igual que para los sobrenadantes de las muestras.
- * Reactivo reductor de Fiske & Subbarow (ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico, sulfito de sodio y bisulfito de sodio) de Sigma: 0.25 g del reactivo se disolvió en agua desionizada hasta un volumen de 10 ml (solución reductante).

CURVA PATRON DE FOSFATO FISKE & SUBBAROW

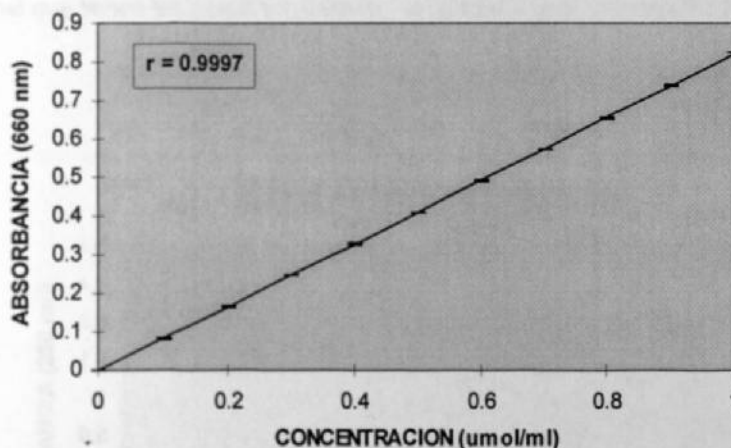


Figura 35. Curva patrón de fosfato inorgánico, cada punto representa el promedio de 15 curvas patrón con su desviación estándar, y los puntos de cada curva resultaron del análisis de cuatro determinaciones.

TABLA 12

ENSAYO BIOQUIMICO PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD DE CATEPSINA D LISOSOMAL ^a.

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

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

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

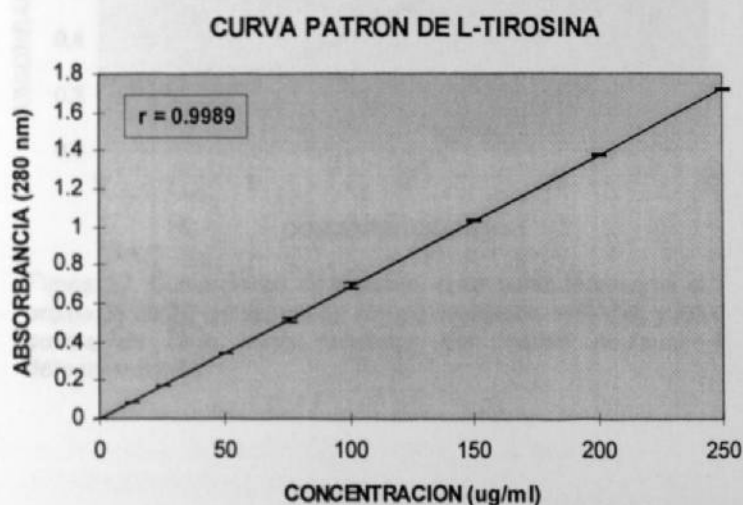


Figura 36. Curva patrón de L-tirosina, cada punto representa el promedio de 15 curvas patrón con su desviación estándar, y los puntos de cada curva resultaron del análisis de cuatro determinaciones.

TABLA 13

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

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

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

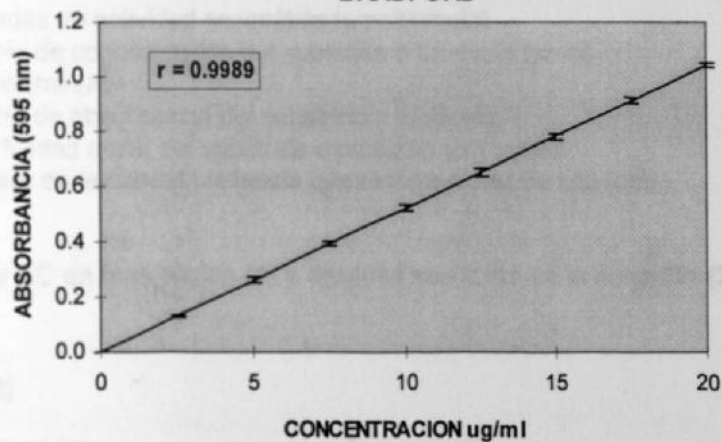
CURVA PATRON DE PROTEINAS
BRADFORD

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

APENDICE C

CALCULO DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA.

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

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

$$U = \Delta C / t \quad \text{Ecuación (1)}$$

$$\Delta A = (\epsilon) (\Delta C) (d) \quad \text{Ecuación (2)}$$

Donde: U = Unidades de actividad enzimática ($\mu\text{mol}/\text{minuto}$)
 ΔC = Cambio de concentración del sustrato o producto (μmol)
t = Tiempo (minuto)
 ΔA = Cambio de absorbancia del sustrato o producto
 ϵ = Absorptividad molar del sustrato o producto ($\text{cm}^2/\mu\text{mol}$)
d = Espesor de la cubeta (distancia que recorre el haz de luz) (cm)

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

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

$$\Delta A = (\epsilon) (U) (t) (d) \quad \text{Ecuación (3)}$$

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

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

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

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

Por lo tanto la ecuación (3) se puede expresar

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

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

Ecuación general para el cálculo de la actividad enzimática.

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

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

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

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

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

10 min = Tiempo del ensayo

1.07 ml = Volumen total del ensayo en la cubeta

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

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

De forma tal que:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Si el intercepto es cero se obtiene:

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

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

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

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

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

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

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

Esto es:

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

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

Por razones de simplicidad la fórmula anterior se puede expresar:

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

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

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

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

* 0.1 = Abs del problema = Y

0.329 y 0.657 = Abs. de los estándares

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

15 min = Tiempo del ensayo

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

0.1 ml = Volumen de la fuente de enzima

Dilución de la fuente de enzima (homogenizado).

De forma tal que:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

$$\boxed{\text{U/ml} = 0.4066}$$

Actividad de FAc

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

REFERENCIAS

1. Fernández, Nava R. (1992). Nombres comunes, usos y distribución geográfica del género *Karwinskia* (Rhamnaceae) en México. *Anales Inst. Biol. UNAM, Ser.Bot.* **63**: 1-23.
2. Segovia A. y Zermefio F. (1972). Poliradiculitis tóxica por *Karwinskia humboldtiana*. A propósito de un caso. *Med. Hosp. Infant. Méx.* **29**: 87.
3. Montoya M., López G., y Hernández A. (1982). Intoxicación por *Karwinskia humboldtiana*. Conceptos actuales. *Rev. Med. IMSS (Méx.)* **6**: 707-709.
4. Padrón-Puyou F. (1951). Estudio clínico experimental de la parálisis por *Karwinskia humboldtiana* (tullidora) en niños. *Gac. Méd. Méx.* **81**: 299-311.
5. Bermúdez de Rocha M.V., Lozano Meléndez F.E., Salazar Leal M.E., Waksman de Torres N. y Piñeyro López A. (1995). Intoxicación de una familia por *Karwinskia humboldtiana* (tullidora). *Gac. Méd. Méx. (Casos Clínicos)* **131**: 100-106.
6. Bermúdez-de Rocha M.V., Lozano-Meléndez F.E., Tamez-Rodríguez V.A., Díaz-Cuello G. y Piñeyro-López A. (1995). Frecuencia de intoxicación con *Karwinskia humboldtiana* en México. *Salud Publica Méx.* **37**: 57-62.
7. Puertolas M., Nava O., Medina H., López F., Oyervides J. (1984). Poliradiculoneuritis por *Karwinskia humboldtiana*. *Rev. Med. IMSS (Méx.)* **22**: 22-27.
8. Clavijero F.X. (1982). Plantas nocivas y extravagantes. En: Manuel León Portilla (Editor), "Historia de la Antigua o Baja California", Editorial Porrúa 3era. edición, pp 31-33. Citado en: Piñeyro L.A. (1990) Toxicidad selectiva *in vitro* de la toxina T 514 de la *Karwinskia humboldtiana*. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N.L., México.
9. Ruiz-Ordoñez J., Torres C.T. y Piñeyro López A. (1991). Aspectos morfológicos relevantes en el fruto de *Karwinskia humboldtiana* Zucc. (Coyotillo). Memorias del IX Encuentro de Investigación Biomédica (Trabajo mural). Facultad de Medicina, UANL.
10. Padrón Francisco. (1956). El Médico y el Folklore. Talleres Gráficos de la Editorial Universitaria, San Luis Potosí, S.L.P., Méx. pp 140-141.
11. Dreyer D.L., Arai I., Bachman C.D., Anderson W.R., Jr., Smith R.G., and Daves G.D., Jr. (1975) Toxins causing noninflammatory paralytic neuropathy. Isolation and structure elucidation. *J. Am. Chem. Soc.* **97**: 4895-4990.
12. Lisková D., Ruiz O.J., Lux A., and Piñeyro I.A. (1994). Tissue culture of *Karwinskia humboldtiana* -a plant producing toxins with antitumoural effects. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* **36**: 339-343.
13. Guerrero M., Piñeyro A. and Waksman N. (1987). Extraction and quantification of toxins from *Karwinskia humboldtiana* (tullidora). *Toxicon.* **25**: 565-568.

14. Waksman N. and Martínez L. (1989). Chemical and toxicological screening in genus *Karwinskia* (México). *Rev. Latinoamer. Quím.* 20/1: 27-29.
15. Waksman de Torres N. and Ramírez Durón R. (1992). Isolation of a new dimeric anthracenone from *Karwinskia parvifolia*. *Rev. Latinoamer. Quím.* 23/1 and 22/4: 25-27.
16. Rivas V., Torres R., and Waksman N. (1990). Dimeric anthracenones from *Karwinskia* species. *Planta Médica* 56: 562-563.
17. Piñeyro L.A. (1990) Toxicidad selectiva *in vitro* de la toxina T 514 de la *Karwinskia humboldtiana*. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N.L., México.
18. Bermúdez M.V., González-Spencer D., Guerrero M., Waksman N., and Piñeyro A. (1986). Experimental intoxication with fruit and purified toxins of buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*). *Toxicon* 24:1091-1097.
19. Bermúdez M.V., Martínez F.J., Salazar M.E., Waksman N. and Piñeyro A. (1992). Experimental acute intoxication with ripe fruit of *Karwinskia humboldtiana* (tullidora) in rat, guinea-pig, hamster, and dog. *Toxicon.* 30: 1493-1496.
20. Sepúlveda-Saavedra J., González-Corona B., Támez-Rodríguez V.A., Bermúdez de Rocha M.V., y Piñeyro-López A. (1992). Ultrastructure of the lesion induced by toxin T-514 isolated from *K. humboldtiana* in the alveolar region of the lung. Proc. 50th Ann. Meet. EMSA. Bailey G.W., Bentley J., Small J.A. (Editors). Published by San Francisco Press, Inc. pp.640-641.
21. Támez Rodríguez V.A., Sepúlveda Saavedra J., Bermúdez de Rocha M.V., y Piñeyro López, A. (1991). Autofagia de peroxisomas en el hígado del macaco *Fascicularis* intoxicado con peroxisomicina A1 (T-514). Memorias del IX Encuentro de Investigación Biomédica (Trabajo mural). Facultad de Medicina, UANL.
22. Piñeyro López A., González Guerrero J.F., Vidal Gutiérrez O., Lozano Meléndez F., Ancer Rodríguez J., Marfil Rivero J., González Alanís R., y Piñeyro Garza E. (1992). Estudio Fase I de la T-514 (peroxisomicina): Resultados clínicos. Memorias del IX Encuentro de Investigación Biomédica. Facultad de Medicina, UANL. pp 159.
23. Támez Rodríguez V.A., Ancer-Rodríguez J., Sepúlveda Saavedra J., Bermúdez de Rocha M.V., y Piñeyro López, A. (1989). Cambios histopatológicos y ultraestructurales en riñón e hígado de *Macacus rhesus* producidos por la T-514 aislada de la *Karwinskia humboldtiana* (tullidora). Memorias del VII Encuentro Regional de Investigación Biomédica. Facultad de Medicina, UANL. pp 18.
24. French S.W. Biochemical basis for alcohol-induced liver injury. (1989). *Clin. Biochem.* 22: 41-49.
25. Riede U. N., Fringes B., and Moore G.W. (1983). Peroxisomes in cellular injury and disease. In *Cellular Pathobiology of Human Disease*. Gustav Fisher New York, Inc. pp 139-170.
26. Bosch H. van den, Schutgens R.B.H., Wanders R.J.A., and Tager J.M. (1992). Biochemistry of peroxisomes. *Ann. Rev. Biochem.* 61: 157-197.

27. Garza-Ocañas L., Hsieh G.C., Acosta D., Torres-Alanis O., and Piñeyro-López A. (1992). Toxicity assesment of toxins T-514 and T-544 of buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*) in primary skin and liver cell cultures. *Toxicology* 73: 191-201.
28. Garza-Ocañas L., Jiang T., Acosta D., Torres-Alanis O., Waksman de Torres N., and Piñeyro-López A. (1994). Comparison of the hepatotoxicity of toxin T-514 of *Karwinskia humboldtiana* and its diastereoisomer in primary liver cell cultures. *Toxicon*. 32: 1287-1291.
29. Martínez F.J., Ramírez R., Waksman N., and Piñeyro A. (1996). Experimental evidence for toxic damage induced by a dimeric anthracenone: diast. T-514 (peroxisomicine A2). *Toxicol. Lett.* 90: 155-162.
30. Garza-Ocañas L., Torres-Alanis O., and Piñeyro-López A. (1990). Effect of toxin 514 of *Karwinskia humboldtiana* on liver microsomal lipid peroxidation stimulated by Fe²⁺-ADP complexes and NADPH *in vitro*. *Eur. J. Pharm.* 183: 1550-1551.
31. Moreno-Sepúlveda M., Vargas-Zapata R., Esquivel-Escobedo D., Waksman de Torres N., and Piñeyro-López A. (1995). Effect of Peroxisomicine and related anthracenones on catalase activity. *Planta Med.* 61: 337-340.
32. Acosta García Ricardo L. (1995). Efecto de la T-514 del género *Karwinskia* sobre la ultraestructura de los tubulos contorneados proximales del riñón *in vitro*. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, N.L., México.
33. Piñeyro A., Martínez de Villarreal L., and González R.(1994). *In vitro* selective toxicity of toxin T 514 from *Karwinskia humboldtiana* (buckthorn) plant on various human tumor cell lines. *Toxicology* 92: 217-227.
34. Piñeyro López A., González Alanis R., y Martínez de Villarreal L.E. (1993). Potencial efecto antineoplásico de las toxinas extraídas del género *Karwinskia*. En: *La Investigación Científica de la Herbolaria Medicinal Mexicana*. Secretaría de Salud, México. Edición conmemorativa. pp 209- 232.
35. Loomis T. (1978). Numbers in Toxicology. In: T. Loomis (Ed.), *Essentials of Toxicology*, Lea and Febiger, Philadelphia, 2: 13-28.
36. Piñeyro A. (1995). *Europaishen Patentblatt* 95/48 (29.11.95) Patent nummer: 0467407.
37. Piñeyro A. (1996). Bioscience patent "Pharmaceutically acceptable anthracene compounds" number 5578646.
38. Patente Japonesa número 2651758.
39. Moreno-Sepúlveda M., Vargas-Zapata R., Ballesteros-Elizondo R., Piñeyro-López A., and Sepúlveda -Saavedra J. (1997). Studies on the effect of peroxisomicine on catalase activity in albino mice. *Toxicon* 35: 777-783.
40. Sepúlveda-Saavedra J., Bermúdez de Rocha M.V., Tamez-Rodríguez V.A., Ballesteros-Elizondo R.G., Moreno-Sepúlveda M., and Piñeyro-López A. (1998). Quantitative analysis of liver peroxisomes in rats intoxicated with peroxisomicine-A₁. *Toxicol. Lett.* 98: 71-75.

41. Goodman J.M., Trapp S., and Hwang H. (1990). Peroxisomes induced in *Candida boidinii* by methanol, oleic acid and D-alanine vary in metabolic function but share common integral membrane proteins. *J. Cell Sci.* 97: 193-204.
42. Sahm, H., Roggenkamp R., Wagner F., and Hinkelman W. (1975). Microbodies in methanol grown *Candida boidinii*. *J. Gen. Microbiol.* 88: 218-222.
43. Goodman J.M. (1985). Dihydroxyacetone synthase is an abundant constituent of the methanol-induced peroxisome of *Candida boidinii*. *J. Biol. Chem.* 260: 7108-7113.
44. Sepúlveda-Saavedra J., van der Klei I.J., Keizer I., Pifeyro-López A., Harder W., and Veenhuis M. (1992). Studies on the effect of toxin T-514 on the integrity of peroxisomes in methylotrophic yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* 91: 207-212.
45. Rhodin J. (1954). Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed convoluted tubule cells of the mouse kidney. Ph. D. Thesis, Karolinska Institutet. Aktiebolaget Godvil, Stockholm. Cited in: Masters C., and Crane D. *The peroxisome: a vital organelle*. Cambridge University Press 1995. First published. pp 2.
46. Van den Bosch H., Schutgens R.B.H., Wanders R.J.A., and Tager J.M. (1992). Biochemistry of peroxisomes. *Ann. Rev. Biochem.* 61: 157-197.
47. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Watson J.D. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, Inc., New York & London. Second Edition. 1989. pp 16 F, 406, 406 FF, 431-433, 459, 460 y 461 F.
48. De Duve C., and Baudhuin P. (1966). Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol. Rev.* 46: 323-357.
49. Singh I. (1996). Mammalian Peroxisomes: Metabolism of oxygen and reactive oxygen species. In: *Peroxisomes: Biology and role in toxicology and disease*. Janardan K. Reddy, Tetsuya Suga, Guy P. Mannaerts, Paul B. Lazarow, and Suresh Subramani (Editors). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 804: 612-627.
50. Holtzman E., and Novikoff A. B.. Peroxisomas (microcuerpos, glioxisomas). En: *Estructura y dinámica celular*. Nueva Editorial Interamericana. México, D.F. 3a. Edición en español. 1987. pp 244-252.
51. Masters C., and Crane D. *The peroxisome: a vital organelle*. Cambridge University Press. First published. 1995. pp 1-27, 37-38, 174-203, y 225-245.
52. Masters C.J., and Holmes R. (1977). Peroxisomes: new aspects of cell physiology and biochemistry. *Physiol. Rev.* 57: 816-882.
53. Roels F., Espeel M., Pauwels M., De Craemer D., Egberts H.J.A., and van der Spek P. (1991). Different types of peroxisomes in human duodenal epithelium. *Gut* 32: 858-865.
54. Van der Klei I.J., and Veenhuis M. (1996). Peroxisome biogenesis in the yeast *Hansenula polymorpha*: A structural and functional analysis. In: *Peroxisomes: Biology and role in toxicology and disease*. Janardan K. Reddy, Tetsuya Suga, Guy P. Mannaerts, Paul B. Lazarow, and Suresh Subramani (Editors). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 804: 47-59.
55. Tolbert N.E. (1981). Metabolic pathways in peroxisomes and glyoxysomes. *Annu. Rev. Biochem.* 50: 133-157.

56. Opperdoes F.R. (1987). Topogenesis of glycolytic enzymes in *Trypanosoma brucei*. *Biochem. Soc. Symp.* 53: 123-129.
57. Müller M. (1973). Peroxisomes and hydrogenosomes in protozoa. *J. Histochem. Cytochem.* 21: 955-957.
58. Mannaerts G.P., and Van Veldhoven P.P. (1993). Metabolic role of mammalian peroxisomes. In: *Peroxisomes: Biology and importance in toxicology and medicine*. Gordon Gibson, and Brian Lake (Editors). Taylor & Francis Ltd. London, Washington, D. C. pp 19-62.
59. Fahimi H.D., Baumgart E., Beier K., Pill J., Hartig F., and Völkl A. (1993). Ultrastructural and biochemical aspects of peroxisome proliferation and biogenesis in different mammalian species. In: *Peroxisomes: Biology and importance in toxicology and medicine*. Gordon Gibson, and Brian Lake (Editors). Taylor & Francis Ltd. London, Washington, D. C. pp 395-424.
60. Lazarow P.B. (1984). The peroxisomal membrane. In: *Membrane structure and function*. Bittar E.E. (Editor). John Wiley and Sons Inc. 5: 1-31.
61. Beard M.E., and Allen J.M. (1968). A study of the properties of renal microbodies. *J. Exptl. Zool.* 168: 477-490.
62. Usuda N., Yokota S., Ichikawa R., Hashimoto T., and Nogata T. (1991). Immunoelectron microscopic study of a new D-amino acid oxidase-immunoreactive subcompartment in rat liver peroxisomes. *J. Histochem Cytochem.* 39: 95-102.
63. Baudhuin P., Beaufay H., and de Duve C. (1965). Combined biochemical and morphological study at particulate fractions from rat liver. *J. Cell Biol.* 26: 219-243.
64. Völkl A., Baumgart E., and Fahimi H.D. (1988). Localization of urate oxidase in the crystalline cores of rat liver peroxisomes by immunocytochemistry and immunoblotting. *J. Histochem. Cytochem.* 36: 329-336.
65. Chu R., Lin Y., Usuda N., Rao M.S., Reddy J.K., and Yeldandi A.V. (1996). Mutational analysis of the putative copper-binding site of rat urate oxidase. In: *Peroxisomes: Biology and role in toxicology and disease*. Janardan K. Reddy, Tetsuya Suga, Guy P. Mannaerts, Paul B. Lazarow, and Suresh Subramani (Editors). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 804: 781-786.
66. Veenhuis M., van Dijken J.P., and Harder W. (1983). The significance of peroxisomes in the metabolism of one carbon compounds in yeasts. *Adv. Micro. Biol. Physiol.* 24: 1-82.
67. Usuda N., Reddy K.M., Hashimoto T., Rao M.S., and Reddy J.K. (1988). Tissue specificity and species differences in the distribution of urate oxidase in peroxisomes. *Lab. Invest.* 58: 100-111.
68. Zaar K., Völkl A., and Fahimi H. (1991). Purification of marginal plates from bovine renal peroxisomes: Identification with L- α -hydroxyacid oxidase B. *J. Cell Biol.* 113: 113-121.
69. Lazarow P.B. (1987). The role of peroxisomes in mammalian cellular metabolism. *J. Inher. Metab. Dis.* 10: 11-22.
70. Hashimoto T. (1982). Individual peroxisomal β -oxidation enzymes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 386: 5-12.

71. Moser H. W. (1987). New approaches in peroxisomal disorders. *Dev. Neurosci.* 9: 1-18.
72. Lazarow P.B. (1988). Peroxisomes. In: *The liver: Biology and pathology*. I.M. Arias, W.B. Jakovy, H. Popper, D. Schachter, and D.A. Shafritz (Editors). Raven Press Ltd., New York. Second Edition. pp 241-254.
73. Müller W.M., van der Krift T.P., Krouwer A.J.J., Wösten H.A.B., van der Voort L.H.M., Smaal E.B., and Verkleij A.J. (1991). Localization of the pathway of the penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *EMBO J.* 10: 489-495.
74. Harder W., and Veenhuis M. (1989). Metabolism of one-carbon compounds. In: *The yeasts*. A.H. Rose, and J.S. Harrison (Editors). Academic Press London. Second Edition. 3: 289-316.
75. Montgomery R., Conway T.W., and Spector A. A. *Biochemistry: A Case-Oriented Approach*. Stephanie Manning, and Anne Gunter (Editors). The C. V. Mosby Company. Fifth Edition, 1990. pp 202 y 510.
76. Hess R., Stäubli W., and Riess W. (1965). Nature of the hepatomegaly effect produced by ethyl-chlorophenoxy-isobutyrate in the rat. *Nature* 208: 856-858.
77. Gorgas K., and Krisans S.K. (1989). Zonal heterogeneity of peroxisome proliferation and morphology in rat liver after gemfibrozil treatment. *J. of Lipid Research* 30: 1859-1875.
78. Reddy J.K., and Chu R. (1996). Peroxisome proliferator-induced pleiotropic responses: Pursuit of a phenomenon. In: *Peroxisomes: Biology and role in toxicology and disease*. Janardan K. Reddy, Tetsuya Suga, Guy P. Mannaerts, Paul B. Lazarow, and Suresh Subramani (Editors). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 804: 176-201.
79. Thangada S., Alvares K., Mangino M., Usman M. I., Rao M. S., and Reddy J.K. (1989). An *in vitro* demonstration of peroxisome proliferation and increase in peroxisomal β -oxidation system mRNAs in cultured rat hepatocytes treated with ciprofibrate. *FEBS Letters* 250: 205-210.
80. Pegg M., Crane D.I., and Masters C. J. (1986). Confirmation that catalase is a glycoprotein. *Biochem. Intl.* 122: 831-838.
81. Lehninger A. L. *Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular*. Ediciones Omega, S. A. Barcelona. Segunda Edición. 1978. pp 61, 216, 514 y 579.
82. Nicholls P., and Schonbaum G.R. (1963). Catalases. In: *The Enzymes*. P.D. Boyer, H. Lardy, and K. Myrback (Editors). Academic Press, New York and London. Second Edition. 8: 147-225.
83. Chance B. (1969). The behaviour of catalase and peroxidase in coupled reactions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 168: 354-355.
84. Hashimoto T. (1996). Peroxisomal β -oxidation: enzymology and molecular biology. In: *Peroxisomes: Biology and role in toxicology and disease*. Janardan K. Reddy, Tetsuya Suga, Guy P. Mannaerts, Paul B. Lazarow, and Suresh Subramani (Editors). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 804: 86-98.

85. Wanders R. J. A., Jansen G., van Roermund C. W. T., Denis S., Schutgens R. B. H., and Jakobs B. S. (1996). Metabolic aspects of peroxisomal disorders. In: *Peroxisomes: Biology and role in toxicology and disease*. Janardan K. Reddy, Tetsuya Suga, Guy P. Mannaerts, Paul B. Lazarow, and Suresh Subramani (Editors). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 804: 450-460.
86. Moser H.W., and Moser A. B. (1996). Peroxisomal disorders: Overview. In: *Peroxisomes: Biology and role in toxicology and disease*. Janardan K. Reddy, Tetsuya Suga, Guy P. Mannaerts, Paul B. Lazarow, and Suresh Subramani (Editors). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 804: 427-441.
87. Suzuki Y., Shimozawa N., Takahashi Y., Imamura A., Kondo N. and Orii T. (1996). Peroxisomal disorders: clinical aspects. In: *Peroxisomes: Biology and role in toxicology and disease*. Janardan K. Reddy, Tetsuya Suga, Guy P. Mannaerts, Paul B. Lazarow, and Suresh Subramani (Editors). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 804: 442-449.
88. Mosser J., Douar A.-M., Sarde C.-O., Kioschis P., Feil R., Moser H., Poustka A.-M., Mandel J.-L., and Aubourg P. (1993). Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature* 361: 726-730.
89. Santos M.J., Imanaka T., Shio H., and Lazarow P.B. (1988). Peroxisomal integral membrana proteins in control and Zellweger fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 263: 10502-10509.
90. Heikoop J.C., Van Den Berg M., Strijland A., Weijers P.J., Just W. W., Meijer A. J., and Tager J. M. (1992). Turnover of peroxisomal vesicles by autophagic proteolysis in cultured fibroblasts from Zellweger patients. *Eur. J. Cell Biol.* 57: 165-171.
91. Lazarow P.B., and Fujiki Y. (1985). Biogenesis of peroxisomes. *Ann. Rev. Cell Biol.* 1: 489-530.
92. South S. T., and Gould S. J. (1999). Peroxisome synthesis in the absence of preexisting peroxisomes. *J. Cell Biol.* 144: 255-266.
93. Titorenko V. I., and Rachubinski R. A. (July 1998). The endoplasmic reticulum plays an essential role in peroxisome biogenesis. *TIBS* 23: 231-233.
94. Rehling P., Albertini M., and Kunau W.-H. (1996). Protein import into peroxisomes: new developments. In: *Peroxisomes: Biology and role in toxicology and disease*. Janardan K. Reddy, Tetsuya Suga, Guy P. Mannaerts, Paul B. Lazarow, and Suresh Subramani (Editors). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 804: 442-449.
95. Baumgart E., Völkl A., Hashimoto T., and Fahimi D. (1989). Biogenesis of peroxisomes: Immunocytochemical investigation of peroxisomal membrane proteins in proliferating rat liver peroxisomes and in catalase-negative membrane loops. *J. Cell Biol.* 108: 2221-2231.
96. Walton P.A., Wendland M., Subramani S., Rachubinski R.A., and Welch W. J. (1994). Involvement of 70-kD heat-shock proteins in peroxisomal import. *J. Cell Biol.* 125: 1037-1046.
97. Schmorer, C.M., Cox, J.R., and Mortimore, G.E. (1979). Alterations of lysosomal density by sequestered glycogen during deprivation-induced autophagy in rat liver. *Biochem. Res. Comm.* 87: 163-170.
98. Grinde, B. (1985). Autophagy and lysosomal proteolysis in the liver. *Experientia* 41: 1089-1095.

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

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

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

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

RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

María Leticia Moreno Martínez

Candidata para el Grado de

Doctor en Ciencias con Especialidad en Morfología

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

Area de Estudio: Morfología

Biografía:

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

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

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

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

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



