

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



FACTOR DE NECROSIS TUMORAL α Y
GRANULOCITOS NEUTROFILOS EN LA
PRODUCCION DEL SINDROME DE INSUFICIENCIA
RESPIRATORIA DEL ADULTO CAUSADO POR
PEROXISOMICINA A-1

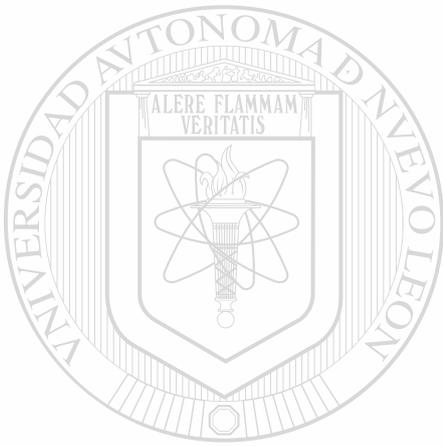
Por

QCB RAQUEL GUADALUPE BALLESTEROS ELIZONDO

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

DICIEMBRE, 2000

DIC



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

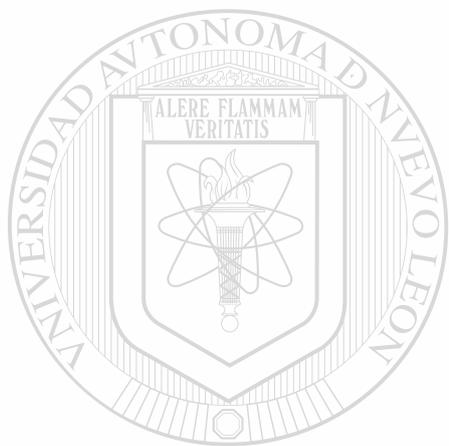
QCB RAQUEL GUADALUPE BALLESTEROS ELIZONDO

TD
QK495
.R45
B366
2000
c.1

2000



1080111678



UANL

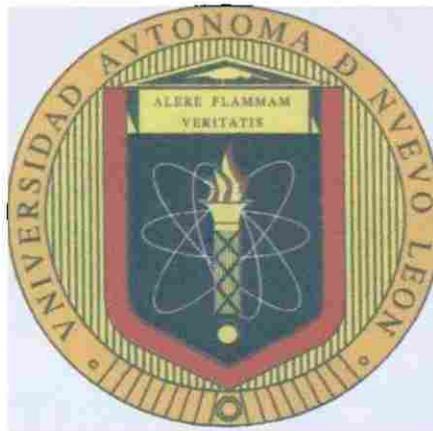
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**FACTOR DE NECROSIS TUMORAL α Y GRANULOCITOS NEUTROFILOS
EN LA PRODUCCION DEL SINDROME DE INSUFICIENCIA
RESPIRATORIA DEL ADULTO CAUSADO POR**

PEROXISOMICINA A-1

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN

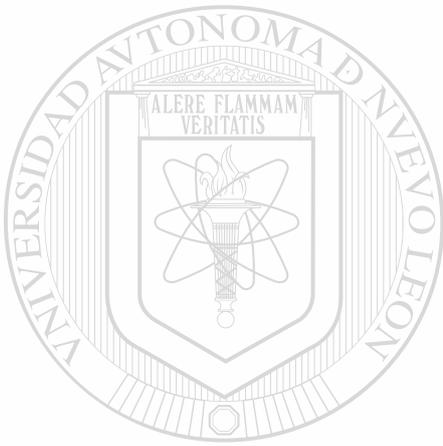
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
Por

QCB RAQUEL GUADALUPE BALLESTEROS ELIZONDO

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

Diciembre, 2000

TD
QK495
.R45
B366
2000
C1



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**FACTOR DE NECROSIS TUMORAL α Y GRANULOCITOS NEUTROFILOS
EN LA PRODUCCION DEL SINDROME DE INSUFICIENCIA RESPIRATORIA
DEL ADULTO CAUSADO POR PEROXISOMICINA A-1**

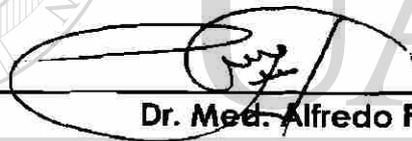
Aprobación de la tesis:



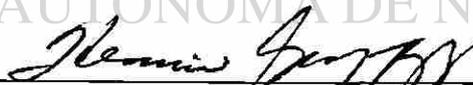
M.C.P. y Ph.D. Julio Sepúlveda Saavedra
Director de Tesis



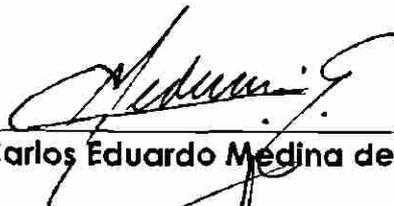
Dra. Ma. Del Socorro Flores De Castañeda
Co-Director de Tesis



Dr. Med. Alfredo Piñeyro López



Dra. Herminia Martínez Rodríguez



Dr. Med. Carlos Eduardo Medina de la Garza



Dr. Roberto Mercado Longoria
Subdirector de Investigación y Estudios de Posgrado

**"FACTOR DE NECROSIS TUMORAL α Y GRANULOCITOS NEUTROFILOS
EN LA PRODUCCION DEL SINDROME DE INSUFICIENCIA RESPIRATORIA
DEL ADULTO CAUSADO POR PEROXISOMICINA A-1"**

Presentado por:

Q. C. B. Raquel Gpe. Ballesteros Elizondo.

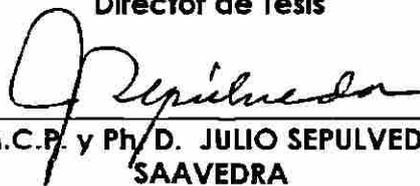
Este trabajo se realizó en el departamento de Histología y en el Centro de Control de Enfermedades Infecciosas del departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría del Dr. Julio Sepúlveda Saavedra y la coasesoría de la Dra Ma. del Socorro Flores de Castañeda.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FIRMAS

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Director de Tesis


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

Co-Director de tesis


DRA. MA. DEL SOCORRO FLORES
DE CASTAÑEDA

DEDICATORIA

Con todo mi amor para mis **preciosos**

mi esposo Abel Fernando
mi hijo Edgar Fernando



Por ser una fuente de inspiración inagotable
para mi continua superación

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

con amor

Raquel G. Ballesteros Elizondo.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



AGRADECIMIENTOS

Agradezco a **Dios** porque guía mis pasos en la luz a cada instante.

Agradezco a mis padres **Andrés y Romelia**, que me han dado la vida, ofreciéndome así la oportunidad de explorar, de aprender y de crecer.

Agradezco a mis **hermanos y sus familias** por haberme apoyado, animado y escuchado en todo momento.

Agradezco a "**mi tía Chelito**" por ser un ejemplo de amor, servicio, fortaleza y unión, aunque físicamente ya no se encuentre entre nosotros.

Agradezco a los **miembros del postgrado de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León UANL** por aceptarme como estudiante de su programa Doctoral.

Agradezco al **Dr. Jesús Ancer Rodríguez** Director de la Facultad de Medicina y del Hospital Universitario José E. González por el apoyo brindado para realizar mis estudios de postgrado y la realización de este trabajo.

Agradezco sinceramente al **Dr. Julio Sepúlveda Saavedra** por brindarme la oportunidad de iniciarme en la investigación biomédica y en la Docencia de la Histología, por su apoyo constante para realizar el trabajo experimental, por las facilidades otorgadas para realizar mis estudios de postgrado, por la excepcional confianza que siempre me ha ofrecido y por compartir conmigo su amplia experiencia en Morfología.

Agradezco a la **Dra. María del Socorro Flores de Castañeda** por su profesionalismo, por sus grandes enseñanzas en el mundo de la Inmunología, por sus consejos y por su fina amistad. ®

Agradezco al **Dr. Alfredo Piñeyro López** por ser un excelente ejemplo a seguir, por permitirme participar en su línea de investigación, por el apoyo que recibí para realizar el trabajo de tesis y por sus acertados comentarios para mejorar esta tesis.

Agradezco al **Dr. Carlos E. Medina de la Garza** por su paciencia y profesionalismo con la que revisó mi manuscrito de tesis. Su visión científica es ejemplar.

Agradezco a la **Dra. Herminia Martínez Rodríguez** por sus valiosas observaciones y sus acertados comentarios para realizar esta tesis, por su paciencia y el apoyo que siempre me brindo para concluir mis estudios de postgrado.

Agradezco a **mis maestros** por participar en mi formación y por sus invaluable enseñanzas

Agradezco a **todos mis compañeros del postgrado** por haberme permitido compartir con ellos nuestros ideales y porque al crecer juntos pude aprender de cada uno de ellos, mil gracias a todos.

Agradezco a mis grandes amigos el **Dr. Jesús Manuel Rodríguez Medina y a la Dra. Leticia Moreno Martínez** por sus grandes enseñanzas en todos los aspectos, por el apoyo que siempre he recibido de ellos y por ser un ejemplo a seguir.

Agradezco a una buena amiga la **Dra. Rosa María Medina Hernández** por brindarme su amistad y por compartir conmigo su amplia experiencia en Histología.

Agradezco a **todo el personal del Departamento de Histología** de la Facultad de Medicina UANL por el apoyo que siempre he recibido de todos ellos.

Agradezco a mi amiga **Rosa María Leal de Tamez** por el apoyo y amistad que siempre he recibido de ella.

Agradezco al **QBP José Ruiz Ordoñez** por el apoyo incondicional que siempre me ha mostrado y por permitirme usar su equipo de computación para la preparación de esta tesis.

Agradezco al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la Beca de manutención con registro 83142** otorgada para la realización del Doctorado en Ciencias con especialidad en Morfología.

Agradezco a la **MVZ Ruth Alvarez Cantú** por las finas atenciones que siempre me mostró, para la preparación de los animales utilizados en este trabajo de tesis.

Agradezco a la **M.C. Laura Esther Martínez Villarreal** por su profesionalismo y por ser una excelente amiga.

Agradezco al **Dr. Jaime García Juárez** por el apoyo brindado en una parte de la impresión de esta tesis.

Mil gracias
Raquel G. Ballesteros Elizondo

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCION	1
1.1 HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	12
1.1.1 Hipótesis de trabajo	12
1.1.2 Objetivos específicos	12
2. MATERIAL Y METODOS	14
2.1 MATERIAL BIOLÓGICO	14
2.2 EQUIPO	14
2.3 REACTIVOS	15
2.4 METODOS	17
2.4.1 Grupos experimentales	17
2.4.2 Microscopía electrónica	19
2.4.3 Análisis ultraestructural	20
2.4.4 Análisis morfométrico	20
2.4.5 Análisis estadístico	21
2.4.6 Obtención de sangre para la cuantificación de TNF α	22
2.4.7 Homogenizado de pulmón para la cuantificación de TNF α	22
2.4.8 Cuantificación de TNF α por ELISA	23
2.4.9 Determinación de proteínas por el método de Lowry	23
2.4.10 Cultivo de órgano	24
2.3.10.1 Preparación del pulmón para el cultivo de órgano	24
2.3.10.2 Preparación de las placas de cultivo con gelfoam	25
2.3.10.3 Medio de cultivo	26
2.3.10.4 Prueba de viabilidad (Actividad de LDH)	26
3 RESULTADOS	28
3.1 Análisis Morfológico con microscopía de Luz	28
3.1.1 Descripción morfológica con microscopía de luz	28
3.2 Análisis Ultraestructural	36

3.2.1 Descripción ultraestructural de la lesión pulmonar	36
3.2.2 Descripción ultraestructural de células NK	37
3.3 Análisis Morfométrico a microscopía de Luz	41
3.3.1 Peroxisomicina A-1 en suspensión con solución salina	41
3.3.1.1 Polimorfonucleares	41
3.3.1.2 Macrófagos	42
3.3.1.3 Linfocitos	42
3.3.2 Peroxisomicina A-1 en dilución con aceite de cártamo	44
3.3.2.1 Polimorfonucleares	44
3.3.2.2 Macrófagos	44
3.3.2.3 Linfocitos	45
3.3.3 Peroxisomicina A-1 en dilución con Haemaccel	47
3.3.3.1 Polimorfonucleares	47
3.3.3.2 Macrófagos	47
3.3.3.3 Linfocitos	48
3.3.3.4 Células NK	50
3.4 Cuantificación de TNF α en suero de ratones	51
3.5 Cuantificación de TNF α en sobrenadante de homogenizado de pulmón	54
3.6 Cultivo de órgano	56
3.6.1 Viabilidad celular	56
3.6.2 Análisis a Microscopía de luz de los fragmentos en cultivo	57
3.6.3 Análisis ultraestructural del cultivo de órgano	59

4 DISCUSION	62
-------------	----

5 CONCLUSIONES, PERSPECTIVAS Y CONTRIBUCIONES	69
5.1 CONCLUSIONES	69
5.2 PERSPECTIVAS	70
5.3 CONTRIBUCIONES	71

BIBLIOGRAFIA	72
--------------	----

APENDICES

APENDICE A

Técnica de inclusión en resina epóxica	79
Fijador Karnovsky-Ito	79
Tinción de cortes semifinos con azul de toluidina	80
Técnica de contrastación de cortes finos	80
TABLA IV Cultivo de órgano: características y condiciones	81
Método para determinar la actividad de LDH	82
Cuantificación de TNF α por ELISA	83
Método de Lowry para determinar la concentración de proteína	85

APENDICE B

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis doctoral se presentaron en dos congresos internacionales (copias de resúmenes)	87
--	----



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

C ₂ HCl ₃ O ₂ , TCA	Ácido Tricloracético
BSA	Albúmina sérica bovina
α	Alfa
β	Beta
Na ₂ CO ₃	Carbonato de calcio
CD-1	Cepa CD-1
CD	Grupo de diferenciación
CHAPS	Colamidopropil dimetil amonio 1 propano sulfanato.
DL ₅₀	Dosis Letal 50
CO ₂	Dióxido de Carbono
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
E.U.A.	Estados Unidos de América
PAF	Factor Activador de Plaquetas
GM-CSF	Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos y Macrófagos
TNFα	Factor de Necrosis Tumoral alfa
PMSF	Fenil metil sulfonil-fluoruro
C3	Fracción 3 del Complemento.
C5a	Fracción 5a del Complemento.
γ	Gamma
°C	Grados Celsius
g	Gramos
Hz	Hertz
NaOH	Hidróxido de sodio.
h	Horas
INFγ	Interferón gama
IL-1	Interleucina-1
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
K	Karwinskia (género)
Kg	Kilogramo
LBA	Lavado bronquio alveolar
LDH	Lactato Deshidrogenasa.
LPS	Lipopolisácarido
MEM	Medio esencial mínimo

µg	Microgramo
µl	Microlitro
mg	Miligramos
mg-prot	Miligramo de proteína
mm ³	Milímetro cúbico
ml	Mililitro
mM	Milimolar
min	Minutos
nm	Nanometro
NAD	Nicotin Adenin Dinucleotido (oxidado)
NADH	Nicotin Adenin Dinucleotido (reducido)
N	Normalidad
NO	Oxido Nítrico
NK	Natural Killer
PSF	Penicilina-Estreptomicina-Fungizona
HRP	Peroxidasa de rábano picante
PA-I	Peroxisomicina A-I
pg	Picogramos
PMN	Polimorfonucleares
%	Porcentaje
K	Potasio
PGE	Prostaglandina
TNF-BP	Proteína de fusión del Factor de Necrosis Tumoral
r.p.m.	Revoluciones por minuto.
SIRA	Síndrome de Insuficiencia Respiratoria del Adulto.
Na	Sodio
HBSS	Solución Salina Balanceada de Hanks
CuSO ₄	Sulfato de cobre

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



LISTA DE TABLAS

TABLA		Página
I	Moléculas de adhesión en la membrana celular de leucocitos y células endoteliales	7
II	Grupos Experimentales	17
III	Lecturas de absorbancia y concentración de TNF α de problemas y controles	52
IV	Cultivo de órgano: características y condiciones empleadas para el pulmón de ratón cepa CD1	81



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura química de la Peroxisomicina A-1	4
2	Resumen de la estrategia experimental	19
3	Fotomicrografía de luz de corte semifino de pulmón	21
4	Cámara de cultivo de órgano	25
5	Fotomicrografías de luz de cortes semifinos de pulmón control solución salina y post tratamiento con Peroxisomicina A-1 en suspensión con solución salina	30
6	Fotomicrografías de luz de cortes semifinos de pulmón control aceite de cártamo y post tratamiento con Peroxisomicina A-1 disuelta en aceite de cártamo	31
7	Fotomicrografías de luz de cortes semifinos de pulmón control Haemaccel y post tratamiento con Peroxisomicina A-1 en dilución con Haemaccel	32
8	Fotomicrografía de luz de células NK en pulmón de ratón tratado con Peroxisomicina A1 disuelta en Haemaccel	33
9	Fotomicrografías de luz de cortes semifinos de pulmón control sin tratamiento y control positivo con LPS	35
10	Micrografías electrónicas de transmisión de pulmón control y post-tratamiento con Peroxisomicina A-1	38
11	Micrografías electrónicas de transmisión de pulmón control y post-tratamiento con Peroxisomicina A-1	39
12	Micrografía electrónica de transmisión de una célula NK en pulmón de ratón tratado con Peroxisomicina A1 disuelta en Haemaccel.	40
13	Cinéticas de PMN, macrófagos y linfocitos en pulmón de ratón tratado con Peroxisomicina A1 en suspensión con solución salina	43
14	Cinéticas de PMN, macrófagos y linfocitos en pulmón de ratón tratado con Peroxisomicina A1 en dilución con aceite de cártamo	46

15	Cinéticas de PMN, macrófagos y linfocitos en pulmón de ratón tratado con Peroxisomicina A1 en dilución con Haemaccel	49
16	Cinética de células NK en pulmón de ratón tratado con Peroxisomicina A1 en dilución con haemaccel y vehículo haemaccel	50
17	Cinética de pgTNF α /ml de suero de ratones que recibieron diferentes tratamientos de Peroxisomicina A1 y controles correspondientes	53
18	Cinética de pgTNF α /mg de proteína en sobrenadante de homogenizado de pulmones de ratones que recibieron diferentes tratamientos de Peroxisomicina A1 y controles correspondientes	55
19	Liberación de LDH al medio de cultivo en presencia y ausencia de Peroxisomicina A1 (2 μ g/ml) a diferentes tiempos de cultivo	56
20	Fotomicrografías de luz de cortes semifinos de pulmón en cultivo de órgano control y en presencia de Peroxisomicina A-1 (2 μ g/ml)	58
21	Micrografías de pulmón de ratón en cultivo de órgano control y en presencia de Peroxisomicina A-1 (2 μ g/ml)	60
22	Micrografía de macrófago alveolar de pulmón en cultivo de órgano en presencia de Peroxisomicina A1 (2 μ g/ml)	61
23	Mecanismo de daño pulmonar	66
24	Curva patrón de TNF α , método de ELISA	84
25	Curva patrón de proteína, método de Lowry	86

RESUMEN

Raquel Gpe. Ballesteros Elizondo

Fecha de graduación: Diciembre 2000

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina.

Título del Estudio:

**FACTOR DE NECROSIS TUMORAL α Y
GRANULOCITOS NEUTROFILOS EN LA
PRODUCCION DEL SINDROME DE
INSUFICIENCIA RESPIRATORIA DEL ADULTO
CAUSADO POR PEROXISOMICINA A-1**

Número de páginas: 87

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

Área de Estudio: Morfología

Propósito y Método del Estudio: La Peroxisomicina A-1 es una antracenona dimérica aislada de las plantas del género *Karwinskia*. La ingesta accidental del fruto maduro de esta planta causa lesiones neurológicas, pulmonares, hepáticas y renales, por lo que se han llevado a cabo diversos estudios bioquímicos y morfológicos con el propósito de obtener información acerca del mecanismo de acción. El propósito de este trabajo es encontrar mayor información sobre la lesión pulmonar inducida por Peroxisomicina A-1 en ratones cepa CD-1 y proponer un mecanismo de daño pulmonar. Se describe la lesión pulmonar a microscopía de luz y electrónica y su correlación con el TNF α en suero y pulmón de ratones intoxicados.

Conclusiones y Contribuciones: la lesión pulmonar se caracterizó por acúmulo de polimorfonucleares y linfocitos atrapados en los capilares alveolares asociados al daño de la barrera alvéolo capilar, macrófagos alveolares, membrana hialina y hemorragia alveolar. Aumento de TNF α en suero y pulmón a tiempos iniciales de intoxicación, que se correlaciona con el mayor número de polimorfonucleares encontrados en la lesión pulmonar, en la que intervienen infiltrados celulares como polimorfonucleares, linfocitos, macrófagos y mediadores químicos como el TNF α . Los resultados obtenidos demuestran que la lesión pulmonar inducida por Peroxisomicina A-1 en ratones es reproducible, y es un modelo muy útil para investigar otros mediadores químicos involucrados en la lesión pulmonar.

FIRMA DEL DIRECTOR DE TESIS


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

CAPITULO UNO

INTRODUCCION

El género *Karwinskia* es un taxón perteneciente a la familia Rhamnaceae, constituido por arbustos y pequeños árboles, que incluye 15 especies cuyo hábitat natural se extiende desde el sur de los Estados Unidos de América a México, Centroamérica, norte de Colombia, Cuba, Haití y República Dominicana. Según Fernández Nava¹, México cuenta con 12 especies distintas, y de éstas *Karwinskia humboldtiana* destaca por la mayor extensión territorial de su hábitat. En varias especies animales, incluyendo al humano, la ingestión de grandes cantidades del fruto de la planta causa intoxicación de evolución mortal^{2,3}.

En el humano, el cuadro clínico de la intoxicación con esta planta se ha descrito como una parálisis de los miembros inferiores, flácida, simétrica, ascendente y progresiva que en casos graves puede causar parálisis bulbar y muerte. Los pacientes intoxicados presentan un cuadro neurológico similar al de la poliomielitis, al síndrome de Guillian-Barré o a otras polirradiculoneuritis, con las que suele confundirse^{4,5,6,7}. Si el paciente sobrevive, la recuperación es lenta pero puede ser completa.

Aunque se ha resaltado el cuadro neurológico como el más grave dentro de los síntomas de la intoxicación, se ha reportado en la literatura

que las alteraciones respiratorias son las causantes de la muerte en las personas que ingieren el fruto maduro^{8,9,10,11,12}. Como una explicación a esto, se ha propuesto que al ascender la parálisis, puede afectar al diafragma, ocasionando las alteraciones respiratorias descritas que pueden llegar a causar la muerte del paciente¹⁰.

Carrada-Bravo¹³ reportó la intoxicación de 21 niños que presentaron alteraciones neurológicas como poliradiculoneuritis, parálisis ascendente bilateral, trastornos de la deambulación y en los casos de defunción, el diagnóstico fue de insuficiencia cardiorrespiratoria con bronconeumonía terminal.

El principio tóxico de esta planta se encuentra principalmente en la semilla, a partir de la cual Dreyer y cols¹⁴ extrajeron cuatro antracenos diméricos, que fueron denominadas de acuerdo a su peso molecular como: T-496, T-514, T-516, y T-544. Su concentración varía en función del clima, altitud, composición química del terreno y grado de humedad existente en donde crece la planta.

Para el aislamiento y purificación de estos compuestos Guerrero y cols¹⁵ realizaron una modificación al método utilizado por Dreyer y col.¹⁴ para simplificar el procedimiento de purificación, debido a que el método utilizado por Dreyer era extremadamente difícil.

Recientemente se han aislado compuestos de estructura química similar a partir de otras plantas del mismo género: un diastereoisómero de la T-514 de la *Karwinskia parvifolia*, la T-510 de la *K.affin humboldtiana*, y otro isómero de la T-514 de la *K. umbellata*.¹⁶ Además del fruto, también se ha demostrado la presencia de T-544 y T-516 en la raíz y de la T-496 en las hojas de la *K. humboldtiana*, pero en concentraciones mas bajas.

Waksman y col.¹⁷ efectuaron el análisis químico y toxicológico de compuestos purificados a partir de los frutos de diez especies de plantas

del género *Karwinskia*; todas las plantas se caracterizan por la presencia de estos compuestos antracénicos, sin embargo se encontraron variaciones en el contenido de las toxinas. En el estudio toxicológico realizado con las toxinas purificadas, se observó que la T-544 es la responsable del efecto neurológico, la T-596 produce un cuadro diarréico cuando se administra oralmente y la T-514 causa daño grave al pulmón, hígado y riñón. Estudios efectuados para determinar la dosis letal media de estos compuestos demostraron que la T-514 es la más tóxica¹⁸.

Garza y col. efectuaron estudios para comparar la citotoxicidad *in vitro* de las toxinas T-514 y T-544 extraídas de *K. humboldtiana*, para ello se realizaron estudios en cultivo de células de piel y de hepatocitos. Se demostró que la T-514 causa mayor toxicidad hepática que la T-544 *in vitro*.¹⁹ Por otra parte se analizó la toxicidad del diastereoisómero de la T-514 y se encontró que la hepatotoxicidad *in vitro* de este compuesto es muy similar a la de la T-514²⁰.

La selectividad de la T-514 para el hígado y el pulmón, sin daño neurológico periférico, llevaron a la determinación de la DL₅₀ en distintas especies de animales, además de otras pruebas de toxicidad aguda. La curva de la distribución de la letalidad siempre mostró una forma particularmente empinada, que habla de una variación biológica estrecha, lo que permitió plantear la hipótesis de que si hubiera toxicidad selectiva de la T-514 entre células de origen benigno y células neoplásicas malignas, por pequeña que fuera, la T-514 podría tener un potencial efecto antineoplásico^{21,22}.

Fue así como Piñeyro y col.²³ en estudios realizados *in vitro* en diferentes líneas celulares humanas demostraron que la T-514 posee dicho efecto en células neoplásicas de pulmón, de colon, y de hígado. Tales hallazgos han sido confirmados por investigadores de las

universidades de Berlín y Freiburg (Alemania) y recientemente en el Instituto Nacional de Cáncer (E.U.A.). Por lo anteriormente expuesto, puede considerarse a la T-514 como un potencial fármaco antineoplásico por lo que se solicitó una patente para su uso, que fue autorizada por la Comunidad Económica Europea²⁴, Estados Unidos de Norteamérica²⁵ y Japón²⁶.

Debido a que se desconoce el mecanismo de acción de la T-514, en los últimos años se han llevado a cabo diversos estudios bioquímicos y morfológicos con el propósito de obtener información acerca de éste.

Sepúlveda y col.²⁷ demostraron que la T-514 tiene un efecto selectivo e irreversible sobre los peroxisomas de levaduras metilotróficas, por lo que se le renombró Peroxisomicina A-1 (Fig. 1)

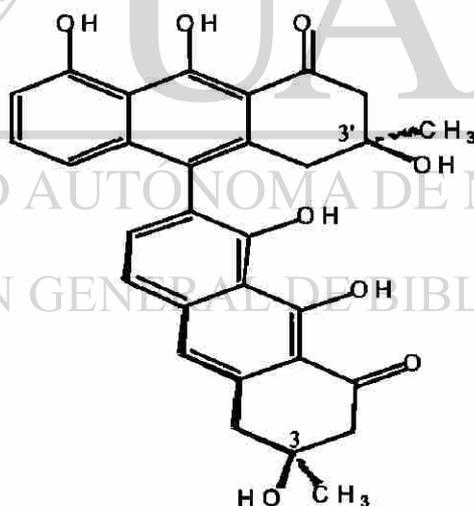


Figura 1. Estructura química de la Peroxisomicina A-1

En la intoxicación experimental inducida en ratones con el fruto completo o con las toxinas purificadas T-514 y T-544, se demostró que tanto el fruto como las toxinas purificadas son marcadamente citotóxicos y causan daño hepatopulmonar grave. En estos estudios se estableció que la T-514 produce un efecto tóxico más marcado sobre el hígado, pulmón y riñón que la T-544. La lesión pulmonar se caracterizó por congestión moderada y hemorragia alveolar²⁸.

En la intoxicación experimental con el fruto completo administrado en rata, cobayo, hamster y perro, se reprodujo el daño hepático y pulmonar. En la lesión pulmonar se reportó congestión intersticial en todas las especies y algunos animales presentaron edema y hemorragia masiva²⁹.

Sepúlveda y col.³⁰ reportaron la ultraestructura del pulmón de hámster, cobayo, rata y mono intoxicados experimentalmente con Peroxisomicina A-1. Se demostró la presencia de daño a la célula endotelial capilar, caracterizado por edema o lisis, además de un acúmulo de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) con signos morfológicos de activación, estrechamente asociados al endotelio capilar; destrucción de la barrera alvéolo-capilar y hemorragia, lo que permitió proponer la hipótesis de que la intoxicación con Peroxisomicina A-1 causa un Síndrome de Insuficiencia Respiratoria del Adulto (SIRA), ya que la imagen histopatológica es similar a la descrita como característica de este síndrome; y se propuso la participación de otros factores endógenos como mediadores del daño pulmonar.

El Síndrome de Insuficiencia Respiratoria del Adulto (SIRA) es una alteración respiratoria aguda que se presenta como respuesta del pulmón a un daño directo o indirecto de la barrera alvéolo capilar.

El SIRA fue formalmente descrito en 1967³¹. Se desencadena por múltiples causas y condiciones, tales como choque de cualquier etiología, procesos infecciosos, sepsis por bacterias Gram negativas, traumatismos, sobredosis de drogas, tóxicos inhalados, trastornos hemáticos, trastornos metabólicos³². Tiene una mortalidad del 60-70% por lo que ha sido motivo de una gran cantidad de estudios³³, tendientes a esclarecer su patogénesis.

Uno de los principales hallazgos histológicos reportados para el SIRA, es la infiltración de PMN en el parénquima pulmonar, por lo que se propuso a la leucostasis pulmonar como un mecanismo participante en la patogénesis del SIRA³⁴. Numerosos estudios realizados en modelos experimentales como ratas, conejos, cerdos, cabras, perros y monos han permitido identificar a los PMN como los mediadores centrales del daño agudo al pulmón³⁵⁻³⁸.

Para explicar el secuestro de los PMN se han propuesto la participación de dos eventos importantes: 1) liberación de factores estimulantes de los PMN producidos por macrófagos activados y 2) la adhesión de los PMN a las células endoteliales^{39,40}.

Ambos eventos involucran la activación inicial de los macrófagos de pulmón y de las células endoteliales del lecho capilar pulmonar. En un estudio sobre el daño agudo al pulmón, realizado en conejos, se describieron alteraciones estructurales en los macrófagos alveolares, como desorganización del citoplasma y vacuolización, que se asocian con la liberación de factores quimiotácticos⁴⁰. Por otra parte las células endoteliales y los PMN expresan moléculas de adhesión en la superficie de sus membranas, y éstas al reconocerse y unirse facilitan la adhesión, dando como resultado el acúmulo de PMN en el pulmón³⁹ (Tabla I).

TABLA I.

MOLECULAS DE ADHESION EN LA MEMBRANA CELULAR DE LEUCOCITOS Y CELULAS ENDOTELIALES.

Moléculas de adhesión	Leucocito	Célula endotelial
Integrina-Immunoglobulina ^a	CD11a/CD18 (LFA-1)	ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102)
	CD11b/CD18 (Mac-1, Mo1, CR3)	ICAM-1 (CD54)
	CD11c/CD18	?
	VLA-4 (CD49d/CD29)	VCAM-1 (CD106)
Selectina-carbohidrato ^b	L-Selectina (CD62L)	glyCAM-1 ^c
	Sialylated Lewis (CD15s)	E-Selectina (CD62E)
	Sialylated Lewis (CD15s)	P-Selectina (CD62P)

^a Receptores de integrina en leucocitos que se unen a ligandos en la célula endotelial que son miembros de la familia de las inmunoglobulinas.

^b Receptores de selectinas que se expresan en ambos tipos celulares y que reconocen carbohidratos específicos.

^c GlyCAM-1 es un ligando en venulas de endotelio alto, el ligando para L-Selectina en endotelio sistémico no ha sido identificado.

Los PMN activados pierden su capacidad de deformarse para pasar por los capilares, debido a que presentan una reorganización de la actina-f del citoesqueleto, y liberan productos tales como: radicales tóxicos del oxígeno, metabolitos del ácido araquidónico, proteasas y factor activador de plaquetas entre otras. Las enzimas proteolíticas digieren a las membranas y proteínas extracelulares, que junto con los mediadores químicos son a su vez un estímulo para el desarrollo de la respuesta inflamatoria^{41,42}.

Estudios iniciales sobre la etiopatogenia del SIRA implicaban a los factores del complemento, metabolitos del ácido araquidónico, proteasas, plaquetas y factores de coagulación como responsables del daño pulmonar^{43,44}. Sin embargo, estudios posteriores realizados en modelos animales demostraron que no se reproducen todas las alteraciones pulmonares al administrar experimentalmente infusiones intravenosas de estos factores por separado⁴⁵.

Existen múltiples agentes que pueden activar a los PMN, tales como: las citocinas, fracciones del complemento, enzimas proteolíticas del plasma, metabolitos del ácido araquidónico, aminas, radicales tóxicos del oxígeno y enzimas hidrolíticas⁴⁶. Sin embargo se ha implicado al factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) en la patogénesis del SDRA, como el más potente activador de los PMN, y el primero entre varias otras citocinas que se liberan bajo el efecto de un estímulo⁴⁷.

El TNF α es un polipéptido de bajo peso molecular, que se encuentra en la superficie celular como un polipéptido de 233 aminoácidos. Este se fragmenta en un péptido más pequeño, de 157 aminoácidos, que se encuentra en la circulación como un trímero, ambas formas son biológicamente activas⁴⁸.

El TNF α es producido por varios tipos de células, aunque los monocitos y macrófagos son los productores más importantes en respuesta a un estímulo exógeno. El lipopolisacárido de la pared bacteriana (LPS) es el inductor más potente conocido⁴⁹.

En la fase aguda de la inflamación, los macrófagos activados liberan grandes cantidades de TNF α que induce la expresión de moléculas de adhesión intercelular ICAM-1 en las células endoteliales y la expresión de CD11a/CD18^{50,51} en los PMN. El TNF α como mediador de la inflamación, participa en la patogénesis de la caquexia, choque séptico, rechazo de transplantes, y citólisis de tumores. Es un componente crucial de la inducción de la respuesta inmune, estimula la proliferación de los linfocitos T y aumenta la actividad de las células NK. Puede ser tóxico directamente para las células, a través de la producción de radicales tóxicos del oxígeno. Actúa de forma autocrina sobre los macrófagos estimulando la producción de otras citocinas como Interleucina-1 (IL-1), Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-8 (IL-8) e Interleucina-10 (IL-10).

TNF α estimula la respuesta de fase aguda a nivel sistémico, induce fiebre vía producción hipotalámica de prostaglandina E-2 (PGE-2), activa a los PMN y aumenta la expresión de moléculas clase I y II del complejo mayor de histocompatibilidad, por lo que favorece la actividad antimicrobiana del sistema inmune⁴⁸.

La endotoxina o lipopolisacárido (LPS) de la pared celular de bacterias Gram negativas es la sustancia mas utilizada para reproducir todas las alteraciones del SIRA. En modelos animales se han logrado identificar una gran cantidad de mediadores químicos involucrados en el daño pulmonar incluyendo al TNF α ^{52,53,54}. Cuando TNF α recombinante se inyecta por vía intravenosa se observa la presencia de PMN, linfocitos y macrófagos en la microvasculatura pulmonar, además de daño a las células endoteliales y edema intersticial^{55,56,57}. Las alteraciones observadas son similares a las que se encuentran en la endotoxemia, lo cual sugiere que el TNF α es el primer mediador para desencadenar el SIRA. En otros estudios se administraron anticuerpos policlonales anti-TNF α a ratones y conejos con choque endotóxico, y anticuerpos monoclonales anti-TNF α a monos con bacteremia por *E. coli*, y se observó que se inhibe el daño letal causado por la endotoxina o bacteremia^{58,59}.

Estudios mas recientes han empleado una proteína de fusión que se une al TNF (TNF-BP) para neutralizar los efectos de TNF, dicha proteína de fusión corresponde a la porción extracelular del receptor de membrana para TNF α . La neutralización del TNF α protege al huésped mediante: a) la atenuación de la citotoxicidad de TNF α ; b) inhibición de la liberación de factores secundarios tóxicos inducidos por el TNF α ; y c) prevención de la liberación de otras citocinas que en sinergia incrementan la toxicidad del TNF α ^{60,61}.

Normalmente los niveles de citocinas circulantes en suero no son detectables, pero existen reportes en humanos a los que se les administró por vía intravenosa LPS y posteriormente se les midieron los niveles de citocinas presentes en el suero. Se observó que los niveles más altos de $\text{TNF}\alpha$ estaban presentes a los 90 minutos, IL-1 de 3-4h, $\text{INF}\gamma$ e IL-6 a las 8h⁴⁸.

Se ha implicado en la patogénesis del SIRA⁶² a la interleucina 8 (IL-8) ya que causa activación de los neutrófilos, mediante el aumento de quimiotaxis, desgranulación y liberación de enzimas hidrolíticas, así como la expresión de moléculas de adhesión que le permite la unión a las células endoteliales. Estudios recientes reportan que el LPS, $\text{TNF}\alpha$, IL-1 son factores capaces de estimular la liberación de IL-8^{63,64,65} de diferentes tipos celulares como monocitos macrófagos, linfocitos T, neutrófilos, células endoteliales. De lo que se infiere que IL-8 no es la citocina que inicialmente se induce para desencadenar el SDRA.

Existen estudios que han buscado la presencia de IL-8 en lavado bronquio alveolar (LBA) de pacientes con SIRA y en pacientes con riesgo a desencadenar SIRA^{66,67}, en los que se encontraron niveles de IL-8 más altos en LBA que en suero. Este estudio sugiere la utilidad de la medición de IL-8 en LBA de pacientes con riesgo a desencadenar SIRA como un indicador para el progreso del síndrome.

Actualmente se conoce que la patogénesis del SIRA es muy compleja, se sabe que el $\text{TNF}\alpha$ tiene una participación central, ya que es el que inicia los eventos que involucran a numerosas citocinas, mediadores químicos, y tipos celulares.

Como ya se mencionó el $\text{TNF}\alpha$ actúa de manera autocrina sobre los macrófagos para la liberación de IL-1, IL-6, IL-8, factor activador de plaquetas (PAF) y ácido araquidónico que se metaboliza para formar leucotrienos, tromboxano A2 y prostaglandinas PGE-2 y PGI-2.

Por otro lado los linfocitos T son activados por IL-1 e IL-6 y producen Interferón gama (IFN γ), Interleucina-2 (IL-2), Interleucina-4 (IL-4) y Factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF). PAF hace que se incremente la permeabilidad endotelial. Subsecuentemente el endotelio libera óxido nítrico (NO) el cual relaja al músculo liso e inhibe la agregación plaquetaria. La liberación de PGI-2 en respuesta al TNF α causa vasodilatación y disminución de la resistencia vascular sistémica. La cascada del complemento, particularmente los fragmentos C3 y C5a, contribuye a la estimulación de los neutrófilos. Los neutrófilos al unirse al endotelio inducen daño por la liberación de radicales tóxicos del oxígeno y de enzimas lisosomales. Tracey y Cerami propusieron que la producción local de factores quimiotácticos amplifica la lesión mediante el aumento del número de neutrófilos adheridos al endotelio⁴⁹.

Tomando en cuenta que el daño pulmonar es una de las alteraciones más severas en los pacientes intoxicados accidentalmente con el fruto maduro de plantas del género *Karwinskia*, y en animales intoxicados experimentalmente con el fruto maduro o con toxinas purificadas, y que el cuadro histopatológico pulmonar es similar al reportado para el SIRA, consideramos importante reproducir el daño pulmonar en ratones cepa CD-1 intoxicados experimentalmente con Peroxisomicina A-1, y por un lado evaluar la presencia del TNF α en suero y en homogenado de pulmón, y por otra parte caracterizar por microscopía de luz y electrónica la lesión pulmonar mediante el análisis morfométrico de las células que se encuentran presentes. Todo esto con el propósito de conocer si el TNF α está relacionado con la lesión pulmonar ocasionada por la intoxicación con Peroxisomicina A-1, lo cual confirmaría que la Peroxisomicina A-1 desencadena un SIRA.

1.1 Hipótesis de Trabajo y Objetivos

1.1.1 Hipótesis de Trabajo

El efecto de la Peroxisomicina A-1 sobre pulmón se debe a una estimulación de los granulocitos neutrófilos, llevada a cabo por mediadores como el factor de necrosis tumoral α .

1.1.2 Objetivos específicos

1.-Intoxicar ratones cepa CD-1 por vía intraperitoneal, con 13.04 mg/Kg de peso de Peroxisomicina A-1 disuelta en diferentes vehículos (aceite de cártamo, solución salina, Haemacel).

2.-Caracterizar la lesión pulmonar por un análisis morfométrico con microscopía de luz.

3.-Evaluar los cambios ultraestructurales que ocurren en la célula endotelial y en la barrera alvéolo-capilar.

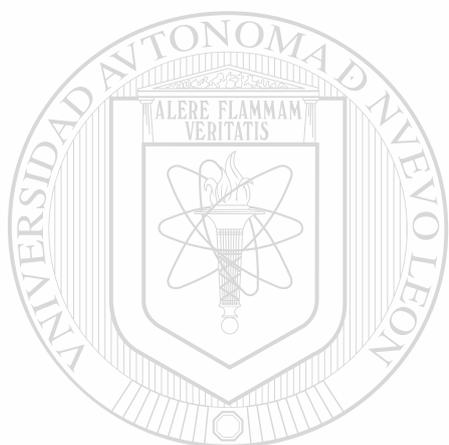
4.-Cuantificar el TNF α en suero de animales intoxicados experimentalmente con Peroxisomicina A-1.

5.-Cuantificar el TNF α presente en el homogenizado de pulmón de animales intoxicados experimentalmente con Peroxisomicina A-1.

6.-Contrastar los resultados obtenidos por intoxicación con Peroxisomicina A-1 contra LPS (control positivo) y controles negativos (vehículos y sin tratamiento).

7.-Evaluar con microscopía de luz y electrónica de transmisión la lesión inducida por Peroxisomicina A-1 en el pulmón en cultivo de órgano.

8.-Comparar el efecto de la Peroxisomicina A-1 sobre el pulmón *in vitro* con el efecto producido *in vivo*.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPITULO DOS

MATERIAL Y METODOS

2.1 Material Biológico



Ratones albinos machos cepa CD1 adultos jóvenes (30-35g) del bioterio del departamento de Histología de la Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León.

2.2 Equipo

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

Microcentrífuga para tubos Ependorff IEC Micro-MB

Centrífuga IEC Clinical

Incubadora de CO₂ HotPack modelo 351820

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

Espectrofotómetro Beckman

Ultramicrotomo LKB BROMMA ULTROME® MODELO 2088

Preparador de cuchillas de vidrio LKB BROMMA modelo 7800 KnifeMaker

Autoclave Market Forge Sterilmatic Modelo STM-E

Fotomicroscopio Carl-Zeiss modelo I.

Microscopio Estereoscópico American Optical modelo 569

Microscopio Electrónico de Transmisión, Carl-Zeiss modelo EM 109, con aceleración de voltaje de 80 kv

Lector de placas de ELISA Diamedix BP-96 (Microassay Reader)

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

2.3 REACTIVOS

Para el desarrollo de esta tesis se utilizaron productos químicos de grado analítico, y en todos los casos se utilizó agua desionizada con una conductividad de 18 megohms•cm

Los reactivos y material utilizados en la técnica de microscopía electrónica: glutaraldehído al 25%, paraformaldehído, ácido pícrico, tetraóxido de osmio, nitrato de uranilo, cacodilato de sodio, resinas epóxicas de baja hidratación, rejillas de cobre, acetato de uranilo, citrato de plomo, azul de toluidina, moldes de inclusión y material quirúrgico fino se obtuvieron de Electron Microscopy Science. La cuchilla de diamante y el vidrio para preparar cuchillas se obtuvieron de Pelco International. Los rollos de película para el microscopio electrónico de transmisión fueron de la casa Agfa-Gevaert AG. El papel para la impresión de micrografías en blanco y negro fue de la marca Eastman Kodak Company.

Lipopolisacárido (LPS) de *E. coli* 0111:B4 marca Sigma Chemical Company.

Los estuches comerciales de la técnica de ELISA para la determinación de TNF α en suero y homogenizados de pulmón fueron de la marca GENZYME.

El Haemaccel que se utilizó para diluir la Peroxisomicina A-1 fue de la marca Behring

Para el homogenizado de pulmón: se utilizó PMSF (Fenil metil sulfonil fluoruro), CHAPS (3-[[3-Colamidopropil] dimetil amonio] 1 propano sulfonato) marca Sigma Chemical Company.

Para el cultivo de órgano: Se utilizó medio esencial mínimo (MEM) con sales de Eagle, insulina, acetato de retinal, hidrocortisona, penicilina-estreptomicina-fungizona (PSF), gentamicina, piruvato, y solución de Hanks se obtuvieron de Sigma Chemical Company. Las placas de cultivo se obtuvieron de Costar. Los cartuchos y filtros para esterilizar soluciones fueron de Millipore Corporation. El Gelfoam que se utilizó en las placas de cultivo fue de la marca Upjohn Company, Agar bacteriológico marca BIOXON, β -NADH se adquirió de Merck.

Los reactivos utilizados para la determinación de proteínas por el método de Lowry: albúmina sérica bovina, Tartrato de Na y K, Sulfato de cobre (CuSO₄), Carbonato de sodio (Na₂CO₃), Hidróxido de sodio (NaOH) y Folin Ciocalteu se obtuvieron de Productos Químicos Monterrey.

Peroxisomicina A-1. Este compuesto antracénico se aisló y purificó en el laboratorio de extracción del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, fue amablemente proporcionada por el Dr. Alfredo Piñeyro López. Y se almacenó a -20 °C protegida de la luz y la humedad

2.4 METODOS

2.4.1 Grupos experimentales

Se utilizaron 400 ratones albinos machos cepa CD-1 con un peso promedio de 30g, divididos en ocho grupos de 50 animales cada uno, que recibieron los siguientes tratamientos:

Tres grupos a los que se les administró Peroxisomicina A-1, a una concentración de 13.04mg/kg de peso que equivale a dos veces la DL₅₀ determinada para esta especie. Fue disuelta en cada uno de los siguientes vehículos: aceite de cártamo, Haemaccel o en suspensión con solución salina.

Un grupo control positivo recibió LPS. Tres grupos control negativo recibieron únicamente vehículos por separado: aceite de cártamo, solución salina, Haemaccel. Un cuarto grupo no recibió ningún tratamiento (Tabla II).

TABLA II.

#Ratones cepa CD1	Condición experimental ^a	Tiempos de intoxicación ^b
50	13.04mg/Kg de peso PA1/solución salina	
50	13.04mg/Kg de peso PA1/Ac. de cártamo	
50	13.04mg/Kg de peso PA1/Haemaccel	0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3,
50	Vehículo solución salina	3.5, 4, 4.5, 5h
50	Vehículo aceite de cártamo	
50	Vehículo Haemaccel	
50	LPS Control positivo	
50	Sin Tratamiento	

^aEn el tratamiento de Peroxisomicina A-1 en suspensión con solución salina, la Peroxisomicina A1 se disolvió en etanol absoluto y después se agregó la solución salina formándose así una suspensión.

^bLos 50 ratones de cada condición experimental se subdividieron en 10 grupos de 5 ratones para cada tiempo experimental.

Para cada condición experimental se utilizaron 50 ratones, los que se subdividieron en 10 grupos de 5 ratones que se sacrificaron a los siguientes tiempos después de la administración de los tratamientos: 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 y 5h.

Los tratamientos se administraron en forma de una dosis única por vía intraperitoneal. En cada uno de los tiempos experimentales mencionados, cada uno de los ratones se sacrificó por dislocación cervical, se sujetó a una base de corcho y se llevó a cabo asepsia del abdomen con alcohol etílico al 70%. Se abrió la cavidad abdominal y se hizo una punción en la vena cava inferior para obtener la mayor cantidad de sangre. Posterior a la punción, se abrió el tórax para obtener los pulmones, de los cuales el pulmón derecho se fragmentó en porciones de 1mm³. Los fragmentos se procesaron hasta su inclusión en resinas epóxicas. El pulmón izquierdo se homogenizó para realizar la cuantificación de TNF α por un método de ELISA.

En el sobrenadante del homogenizado se llevó a cabo la cuantificación de proteínas por el método de Lowry⁶⁸.

Las muestras de suero y pulmones para homogenizar fueron almacenados a -70°C hasta colectar el total de las muestras de todos los grupos de tratamiento.

La figura 2 muestra un diagrama que representa la estrategia experimental de este trabajo.

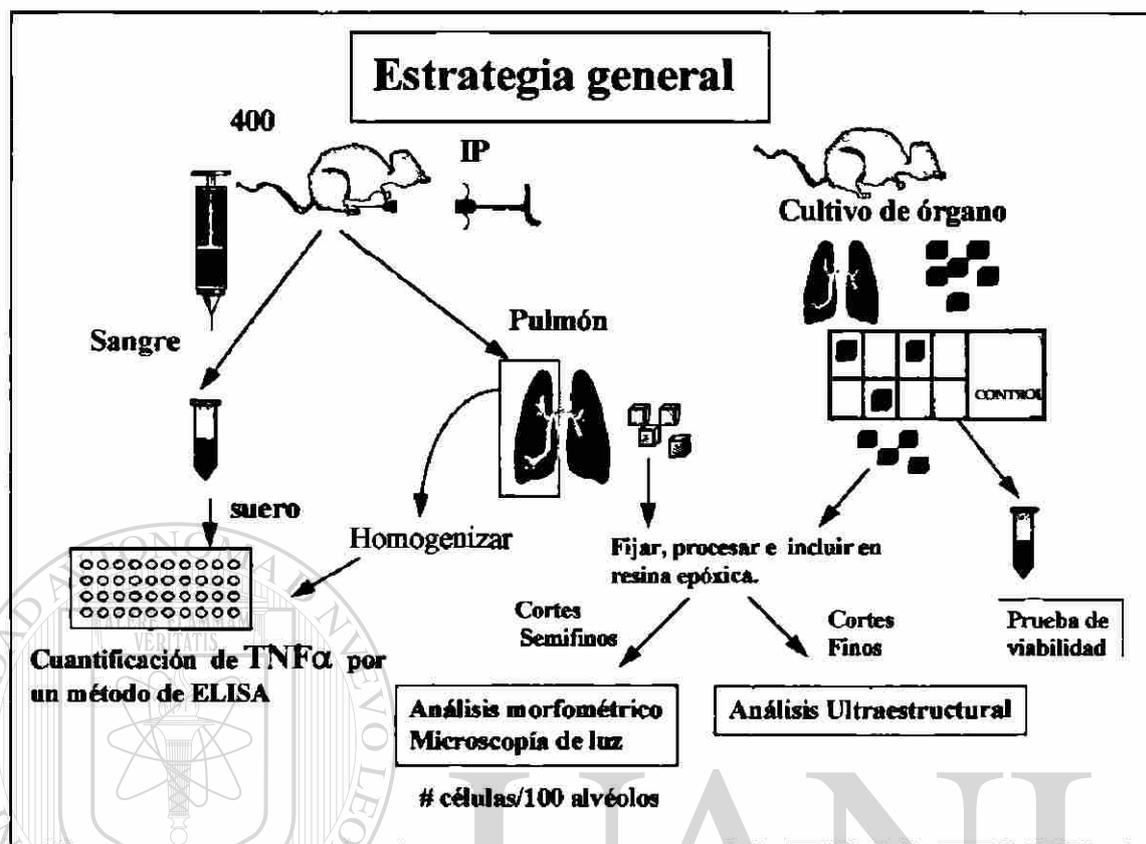


Figura 2. Resumen de la estrategia experimental

2.4.2 Microscopía electrónica

Todas las muestras de pulmón destinadas para microscopía electrónica se fijaron en una solución de Karnovsky-Ito al 1.5% en buffer de cacodilatos⁶⁹; posteriormente se lavaron, y se llevó a cabo una postfijación en tetraóxido de osmio al 2%. Enseguida se hizo una tinción en bloque con nitrato de uranilo al 1%, posteriormente una deshidratación gradual con diferentes concentraciones de acetona y finalmente los fragmentos se incluyeron en resinas epóxicas⁷⁰. (Apéndice A)

2.4.3 Análisis ultraestructural

A partir de las muestras de pulmón procesado hasta su inclusión en resinas epóxicas se prepararon cortes finos en un ultramicrotomo LKB Ultratome V, los cuales se montaron en rejillas de cobre y se contrastaron con citrato de plomo y acetato de uranilo^{71,72}, para ser observados en un microscopio electrónico Carl Zeiss EM 109

Se llevó a cabo la evaluación ultraestructural de la región alveolar del pulmón de animales intoxicados con los diferentes tratamientos de Peroxisomicina A-1, fragmentos de cultivo en presencia de Peroxisomicina A-1 y controles correspondientes.

2.4.4 Análisis morfométrico

En el caso de las muestras sometidas a la evaluación morfométrica se prepararon cortes semifinos de 1 μ m de grosor y se tiñeron con azul de toluidina para ser observados en un microscopio de luz Carl Zeiss a 1250 aumentos

Se contó el número de perfiles celulares correspondientes a PMN, Macrófagos y Linfocitos presentes por cada 100 alvéolos para cada tiempo y condición experimental (Fig. 3)

Después de haber realizado el conteo de perfiles celulares correspondientes al pulmón de cada uno de los animales de cada condición experimental, se obtuvo el valor promedio y la desviación estándar de cada una de las mediciones. Posteriormente se graficó el número de perfiles celulares en función del tiempo.

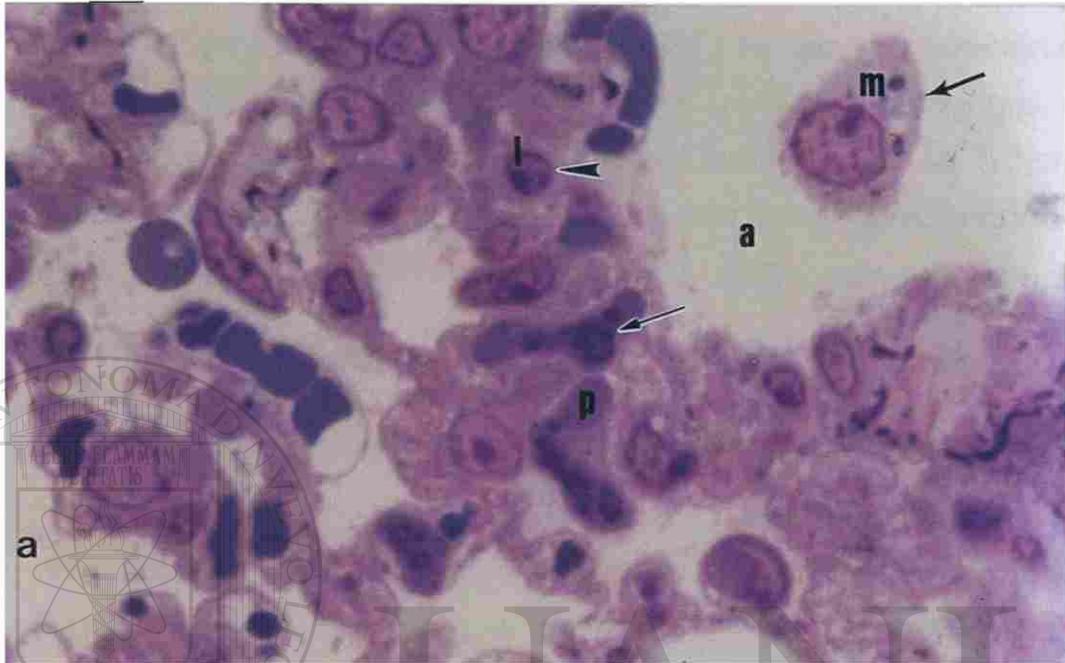


Figura 3. ANALISIS MORFOMETRICO: Pulmón de ratón que muestra los diferentes tipos de perfiles celulares que se contaron, **p** polimorfonucleares y **l** linfocitos dentro de capilares, y **m** macrófagos dentro de **a** espacios alveolares. Fotomicrografía de luz. Inclusión en resinas epóxicas, Azul de toluidina, 126x

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2.4.5 Análisis estadístico

En el análisis morfométrico cada punto de las gráficas es el valor promedio de cinco conteos: para cada tiempo y tratamiento se obtuvo un valor promedio con su desviación estándar, y estos fueron sometidos a una contrastación estadística con la prueba t-student pareada, comparándose siempre los datos obtenidos de los grupos problema tratados con Peroxisomicina A-1 y sus controles correspondientes. La significancia estadística se representa en todas las gráficas con un asterisco.

2.4.6 Obtención de sangre para la cuantificación de TNF α

Se obtuvo una muestra de sangre de cada uno de los 400 ratones que recibieron los diferentes tratamientos en cada uno de los tiempos experimentales. Se abrió la cavidad abdominal y se hizo una punción en la vena cava inferior para obtener la mayor cantidad de sangre. La sangre se dejó coagular; posteriormente se centrifugó y se hicieron alícuotas de 250 μ l, y se conservaron a -70°C hasta que se llevó a cabo la cuantificación del TNF α por el método de ELISA con un estuche comercial marca Genzyme.

2.4.7 Homogenizado de pulmón para la cuantificación de TNF α

En un homogenizador Bellco de 50-60Hz se homogenizó el pulmón (obtenido como se describe en la sección 2.4.1) en 1.5ml de solución salina balanceada de Hanks (HBSS) fría (4°C) que contenía 2mM de PMSF como inhibidor de proteasas y 0.1% de CHAPS como detergente para membranas.

Durante el procedimiento se mantuvo el tubo de homogenización en hielo, se midió el volumen total y se separó una alícuota para la determinación de proteínas totales. El homogenizado se centrifugó en tubos Eppendorf a 14000 r.p.m. a 4°C por 25min., se separó el sobrenadante y se midió el volumen total. Finalmente se realizó la cuantificación de proteínas por el método de Lowry⁶⁴ y la cuantificación de TNF α por el método de ELISA utilizando un estuche comercial de la marca Genzyme.

2.4.8 Cuantificación de TNF α por ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)

En la prueba de ELISA para la cuantificación de TNF α se empleó el principio de anticuerpos múltiples en sandwich. La placa de ELISA de 96 pocillos plásticos de microtitulación estaba cubierta con anticuerpo monoclonal anti TNF α de ratón, que se utilizó para unir al TNF α presente en estándares y muestras problema.

Posteriormente se lavó la placa para retirar el material libre que no se unió y se agregó anticuerpo policlonal anti TNF α conjugado con peroxidasa (anti-TNF α Conjugado HRP) que se unió al TNF α .

La placa se lavó de nuevo para retirar el material libre (no unido).

Se agregó la solución de substrato que dio inicio a la reacción de la peroxidasa, la cual se detectó por medio de un cambio de color en la solución, posteriormente esta reacción se detuvo por acidificación con H₂SO₄ 1M. La absorbancia que se midió a 450nm es proporcional a la concentración de TNF α presente en los estándares y en las muestras problema.

Para calcular la concentración de TNF α de las muestras problema, se realizó una curva de calibración de estándares de 35, 140, 560 y 2240pg/ml de TNF α (Apéndice A). Al obtener las lecturas de los estándares se hizo una curva de concentración mediante un análisis de regresión lineal y se calculó la concentración de las muestras problemas.

2.4.9 Determinación de proteínas por el método de LOWRY

Se llevó a cabo una precipitación de las proteínas con ácido tricloracético (C₂HCl₃O₂, TCA) al 10%, posteriormente al precipitado se le agregó una mezcla de tartrato de Na y K al 0.6%, CuSO₄ al 0.3%, Na₂CO₃ al 30%, NaOH 0.8N y agua desionizada.

Se dejó reposar por 10 minutos a temperatura ambiente, y se le agregó una mezcla de reactivo de Folin-Ciocalteu 2N y agua desionizada; se

dejo reposar 30 minutos a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 750nm, se ajustó el cero con el blanco de reactivo.

Se utilizó una curva de calibración de proteínas de estándares de albúmina sérica bovina (BSA) para calcular la concentración de proteínas de las muestras problema. (Apéndice A)

2.4.10 Cultivo de órgano

El cultivo de órgano se llevó a cabo de acuerdo con la técnica descrita por Sepúlveda y col.⁷³. Todo el material empleado para el cultivo de órgano se esterilizó por calor húmedo en el autoclave (121°C por 45 minutos) y por (gas 2horas). El medio nutriente y suplementos se esterilizaron por filtración con membrana de 0.22µm de poro. El procedimiento de cultivo se llevó a cabo bajo una campana de flujo laminar horizontal en condiciones estériles.

2.4.10.1 Preparación del pulmón para el cultivo de órgano.

Debido a las características histológicas de pulmón, para el cultivo de órgano se utilizó una técnica de expansión de espacios alveolares, mediante la inyección de agar a través de la tráquea, de esta manera se evitó que se colapsaran los alvéolos⁷⁴.

Para esto se sacrificó un ratón por dislocación cervical, se perfundió con solución salina a través del ventrículo derecho para retirar la sangre de los pulmones, se extrajo el bloque cardiopulmonar (tráquea, pulmones y corazón) y se canalizó a través de la tráquea, para inyectar agar bacteriológico marca BIOXON al 0.5% disuelto en medio de cultivo. Posteriormente el pulmón se mantuvo en una caja de Petri estéril a 4°C por 15 minutos. Después de que se solidificó el agar se separaron los pulmones y se fragmentaron en porciones de 1 mm³

2.4.10.2 Preparación de las placas de cultivo con gelfoam.

Previo a la incubación de los explantes de pulmón cada placa de cultivo (Fig. 4) fue cubierta con una esponja de colágena (Gelfoam) y se esterilizaron todas las placas con gas.

Al llevar a cabo el procedimiento de cultivo el Gelfoam se impregnó con cada una de las cuatro concentraciones de Peroxisomicina A-1 en el medio de cultivo por separado. También se impregnaron otras esponjas con medio nutriente sin Peroxisomicina A-1.

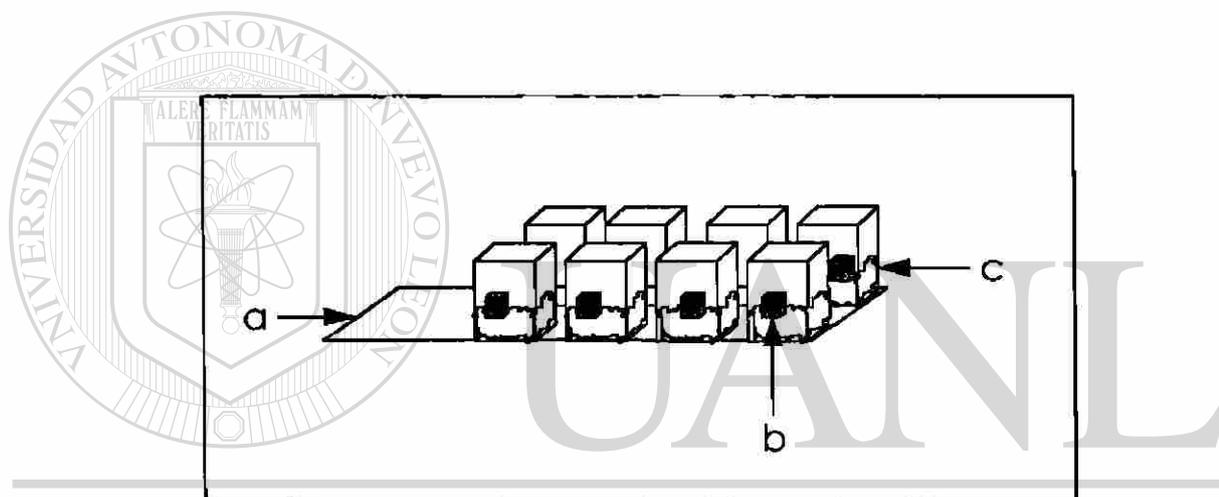


Figura 4. Cámara de cultivo de órgano (a), fragmentos de pulmón (b), soporte de colágena impregnado con medio de cultivo y Peroxisomicina A1 (c).

2.4.10.3 Medio de cultivo

Se utilizó medio esencial mínimo (MEM) con sales de Eagle (SIGMA) suplementado con 1.0 mg/ml de insulina 0.1mg/ml de acetato de retinal, 0.1mg/ml de hidrocortisona, 0.1% de penicilina-estreptomomicina-fungizona (PSF) y 100 mg/ml de gentamicina.

Se preparó una solución concentrada de 1mg/ml de Peroxisomicina A-1, inmediatamente antes de su uso, de la siguiente forma: primero se disolvió en 50µl de etanol absoluto, y se llevo a un 1ml con medio nutriente y posteriormente se prepararon 4 concentraciones finales de Peroxisomicina A-1 en el medio de cultivo 0.2, 2, 5 y 25 µg/ml

La incubación de los fragmentos se llevó a cabo en una incubadora Hotpack en 95% de aire y 5% de CO₂ a los siguientes tiempos: 1,2,4,6,8,12 y 24h con cuatro concentraciones diferentes de Peroxisomicina A-1 y sus correspondientes controles sin Peroxisomicina A-1. (Apéndice A)

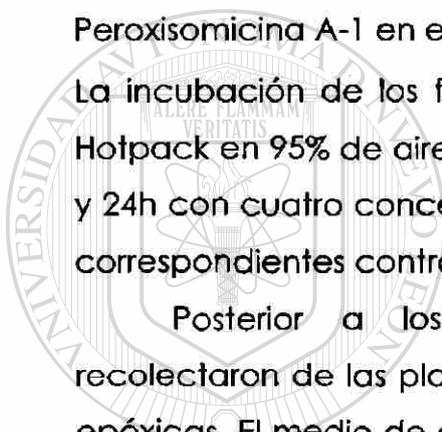
Posterior a los tiempos experimentales los explantes se recolectaron de las placas y se procesaron hasta su inclusión en resinas epóxicas. El medio de cultivo se recolectó para llevar a cabo la prueba de viabilidad.

2.4.10.4 Prueba de viabilidad

Actividad de LDH en el medio de cultivo

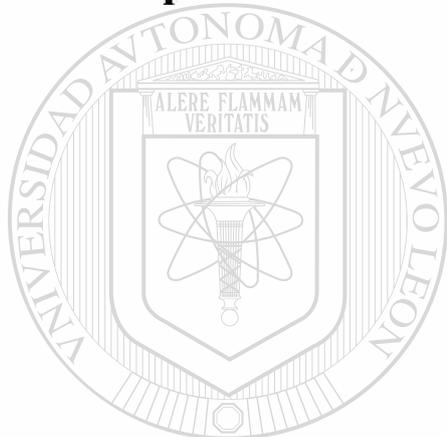
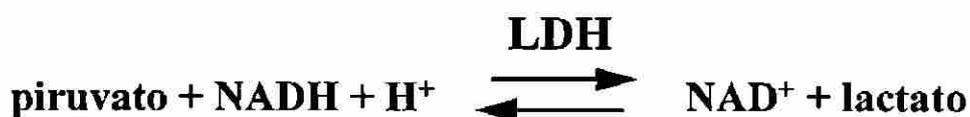
Se determinó la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa liberada al medio de cultivo para tener un valor cuantitativo de la pérdida de viabilidad celular⁷⁵.

Se consideró un cultivo viable, aquel en el que se obtuvo una liberación de LDH al medio de cultivo menor del 20%.



Se colectó el medio de las placas de cultivo, se centrifugaron (14,000 rpm, 4°C, 5 a 10 minutos) y en los sobrenadantes se determinó la actividad de LDH.

La actividad de LDH se determinó según el método espectrofotométrico de Vassault, el cual se basa en la medición de la oxidación de NADH a NAD⁺, a una longitud de onda de 340nm. El procedimiento se muestra en Apéndice A



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



CAPITULO TRES

RESULTADOS

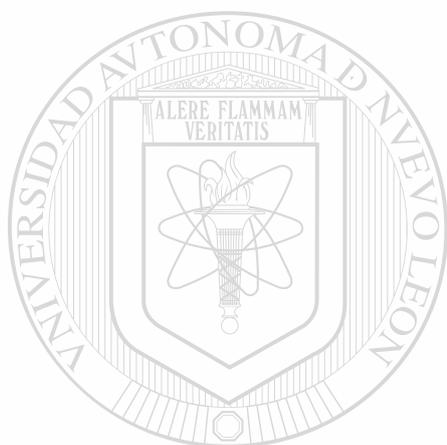
3.1 Análisis morfológico a microscopía de luz

3.1.1 Descripción morfológica a microscopía de luz de la lesión pulmonar de ratones intoxicados con Peroxisomicina A-1 disuelta en diferentes vehículos:

Las figuras 5, 6 y 7 muestran las alteraciones histológicas presentes en la lesión pulmonar de los animales tratados con Peroxisomicina A-1 disuelta en diferentes vehículos. La lesión se caracterizó por la presencia de PMN en los capilares alveolares y congestión vascular que se observó desde los 30 min posteriores a la intoxicación, aumentando progresivamente. También se pudo identificar la presencia de una "membrana hialina" en los alvéolos, la que se observa como un material granular de tinción acidófila. Estas alteraciones en conjunto causaron un aumento del grosor de los tabiques interalveolares. Se identificó hemorragia alveolar después de 4h de intoxicación.

En los capilares alveolares se observaron también linfocitos aunque en menor cantidad que los PMN. Por el contrario, en los espacios alveolares las células predominantes fueron los macrófagos alveolares.

En particular en la lesión pulmonar causada por Peroxisomicina A-1 disuelta en Haemaccel se observó un tipo celular diferente a lo observado antes dentro de los capilares alveolares. Estas células fueron identificadas posteriormente como linfocitos grandes granulares (células NK) al cumplir con las características morfológicas descritas para estas células (Fig. 8)



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

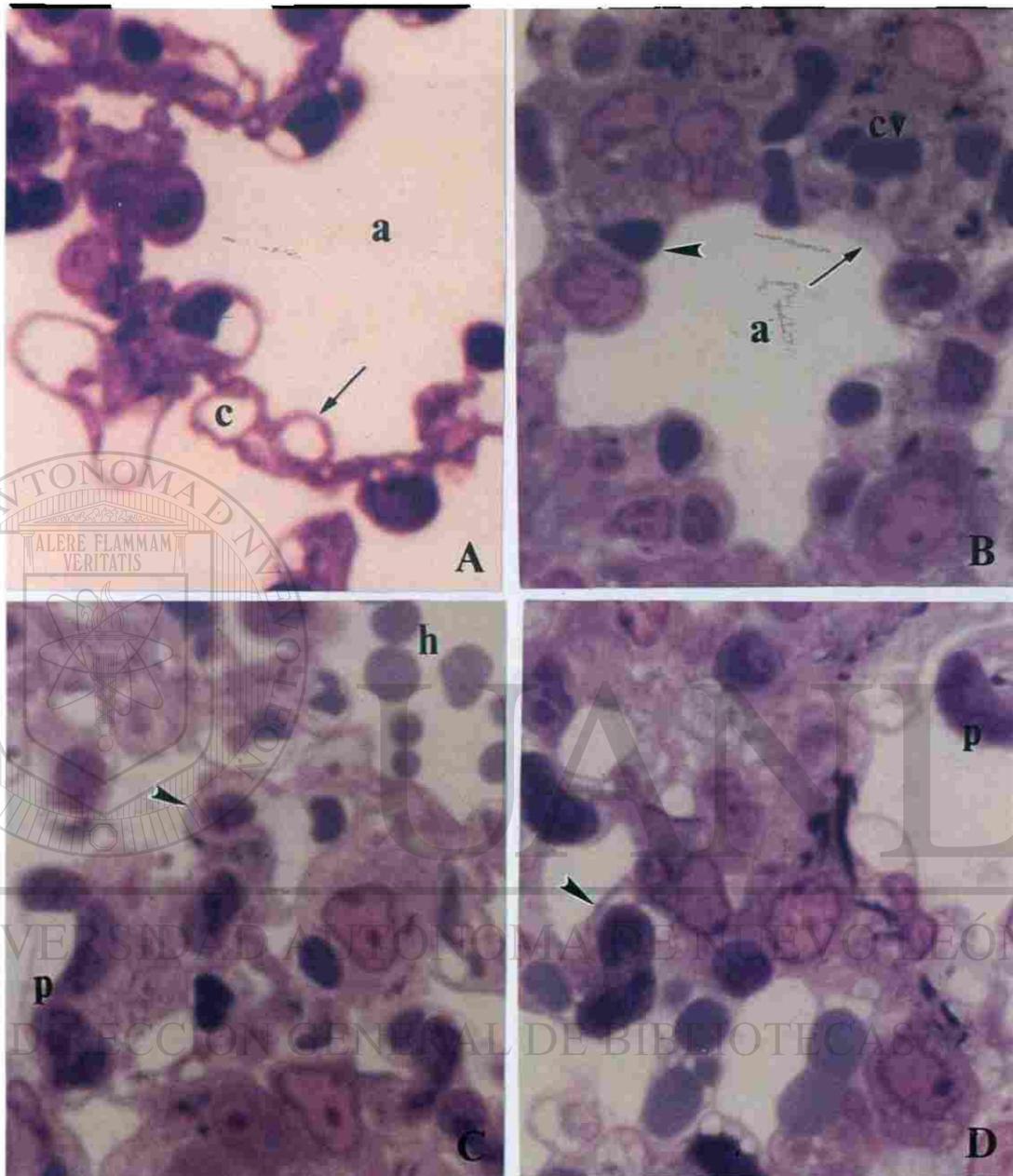


Figura 5. Pulmón de ratón A) tratamiento con 0.2ml de solución salina (control). Obsérvese los espacios alveolares bien distendidos **a**, paredes alveolares delgadas (flecha) y capilares vacíos **c**. B-D Tratamiento con 13.04mg/Kg de peso de Peroxisomicina A-1 en suspensión con solución salina. B) 2h post-tratamiento obsérvese los tabiques interalveolares gruesos (cabeza de flecha), la presencia de la membrana hialina (flecha) y congestión vascular **cv**. C) 4.5h post-tratamiento obsérvese la presencia de polimorfonucleares atrapados en capilares alveolares **p**, hemorragia alveolar **h**, engrosamiento de los tabiques interalveolares. D) 5h post-tratamiento obsérvese los tabiques interalveolares muy gruesos, polimorfonucleares atrapados en los capilares alveolares y congestión vascular. Fotomicrografías de luz. Inclusión en resinas epóxicas, Azul de toluidina 126x.

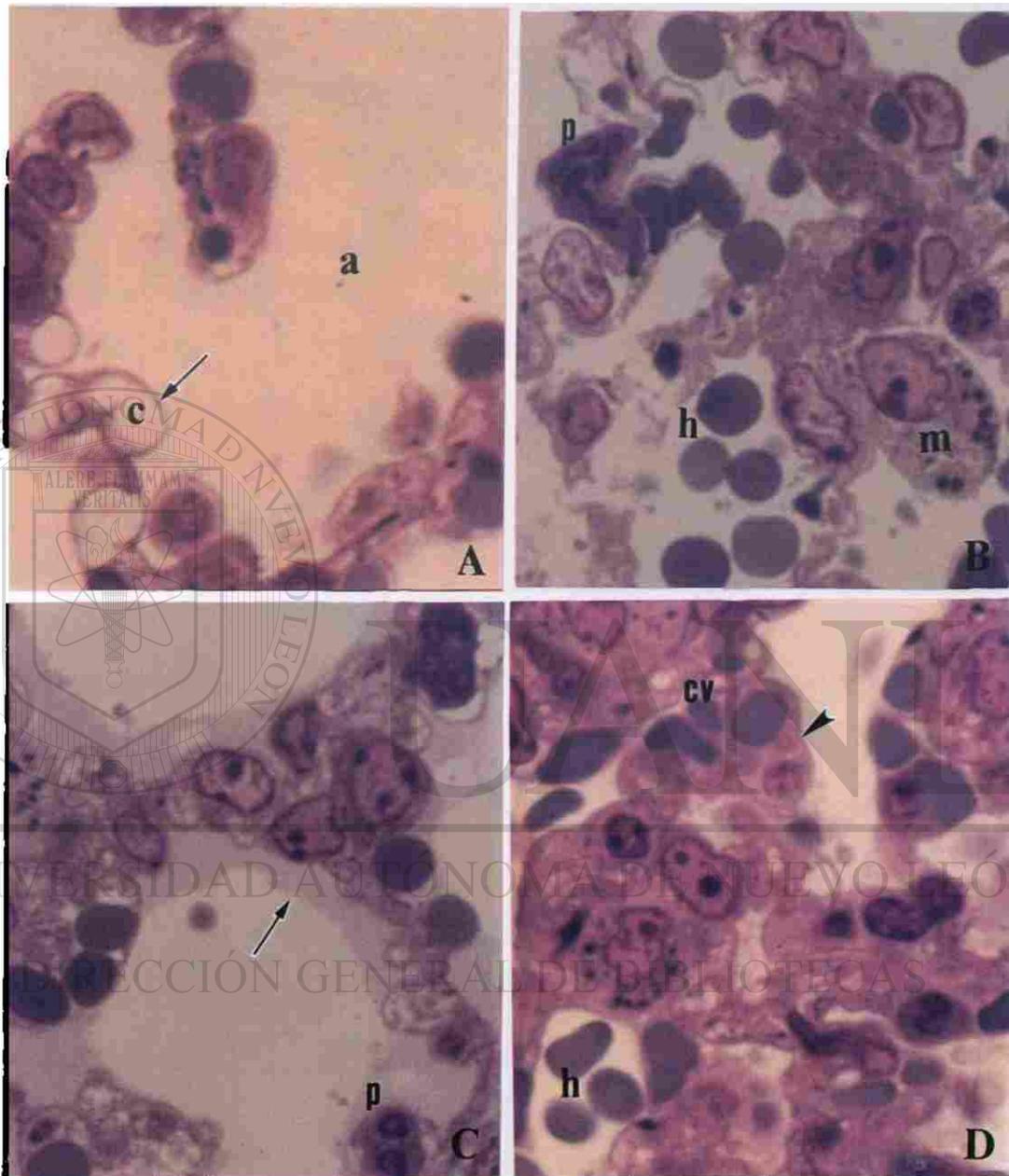


Figura 6. Pulmón de ratón A) tratamiento con 0.2ml de aceite de cártamo (control). Muestra las paredes alveolares delgadas y capilares vacíos (flecha). B-D Tratamiento con 13.04mg/Kg de peso de peroxisomicina A-1 en dilución con aceite de cártamo. B) 2h post-tratamiento obsérvese hemorragia alveolar h, polimorfonucleares atrapados en capilares alveolares p, un macrófago en un espacio alveolar m. C) 3h post-tratamiento obsérvese la membrana hialina (flecha) y polimorfonucleares atrapados en capilares. D) 5h post-tratamiento obsérvese el aumento de grosor de los tabiques interalveolares (cabeza de flecha), congestión vascular cv, hemorragia alveolar. Fotomicrografía de luz. Inclusión en resinas epóxicas, Azul de toluidina 126x.

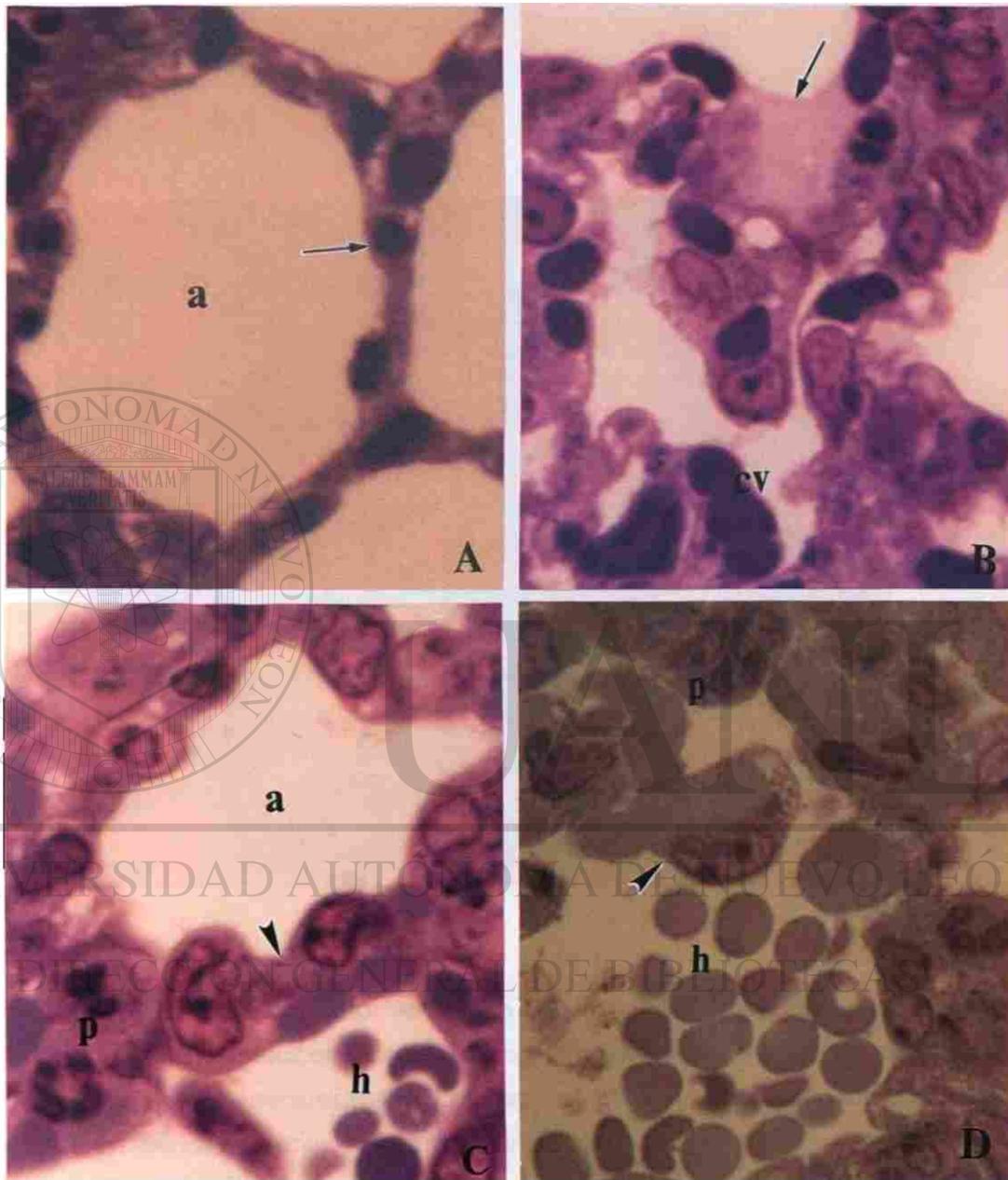
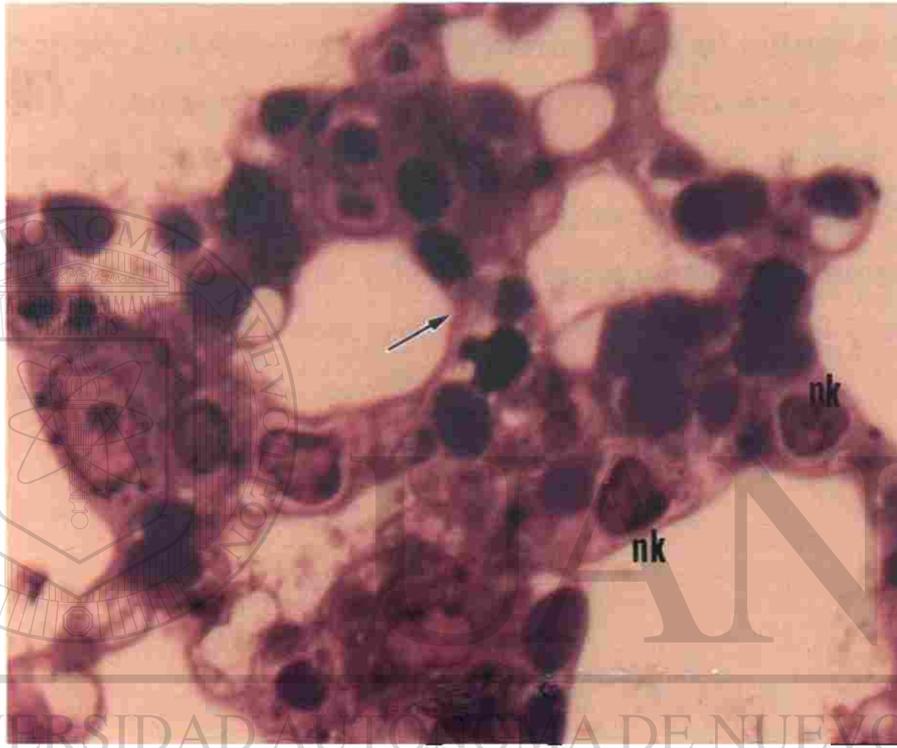


Figura 7. Pulmón de ratón A) tratamiento con 0.2ml de Haemaccel (control). Muestra espacios alveolares bien distendidos y tabiques interalveolares delgados. B-D Tratamiento con 13.04mg/Kg de peso de Peroxisomicina A-1 en dilución con Haemaccel. B) 1h post-tratamiento muestra congestión vascular cv y membrana hialina (flecha). C) 2.5h post-tratamiento obsérvese el aumento de grosor de los tabiques interalveolares (cabeza de flecha), hemorragia alveolar, membrana hialina y polimorfonucleares en los capilares alveolares p. D) 5h post-tratamiento obsérvese la hemorragia alveolar, polimorfonucleares atrapados en capilares alveolares p, engrosamiento de los tabiques interalveolares. Fotomicrografía de luz. Inclusión en resinas epóxicas, Azul de toluidina 126x.



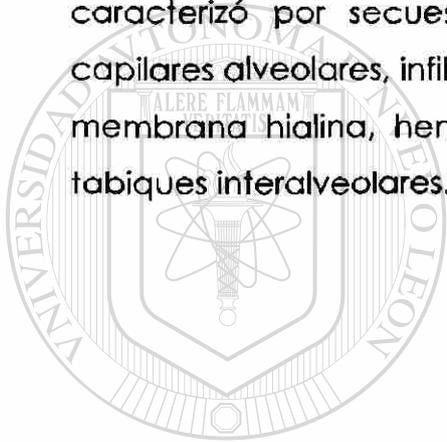
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figura 8. Pulmón de ratón. Tratamiento con 13.04mg/Kg de peso de Peroxisomicina A-1 en dilución con Haemaccel. Obsérvese engrosamiento de los tabiques interalveolares (flecha), Células NK atrapadas en capilares alveolares NK. Fotomicrografía de luz. Inclusión en resinas epóxicas, Azul de toluidina 126x.

Todos los resultados morfológicos de microscopía de luz obtenidos del análisis de cortes semifinos de los diferentes tratamientos con Peroxisomicina A-1 y controles correspondientes fueron comparados con los resultados obtenidos del control sin tratamiento (Fig. 9A) que correspondió a nuestro control negativo y con el tratamiento con LPS (Fig.9B) que correspondió a nuestro control positivo, en el que se observó la lesión histopatológica característica del SIRA en su fase aguda. Se caracterizó por secuestro de polimorfonucleares y linfocitos en los capilares alveolares, infiltración de leucocitos y eritrocitos en el intersticio, membrana hialina, hemorragia alveolar y aumento del grosor de los tabiques interalveolares.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

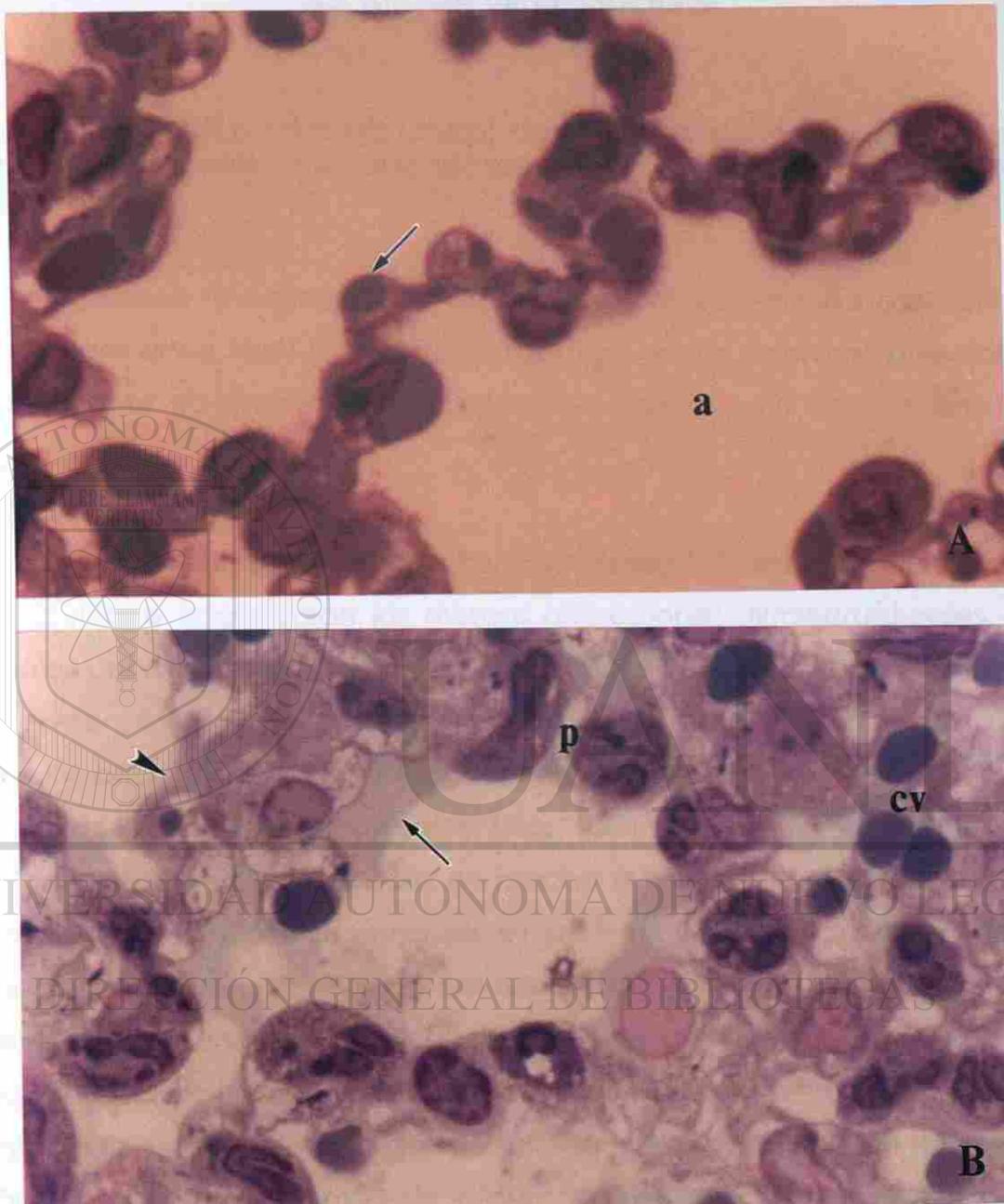


Figura 9. Pulmón de ratón. A) Control sin tratamiento que muestra espacios alveolares bien distendidos **a**, tabiques interalveolares delgados y capilares ocupados por eritrocitos (flecha). B) 2h de tratamiento con 400µg de LPS/0.2ml de solución salina, obsérvese la lesión característica del SDRA, abundantes polimorfonucleares atrapados en los capilares alveolares **p**, membrana hialina (flecha), congestión vascular **cv**, engrosamiento de los tabiques interalveolares (cabeza de flecha). Fotomicrografía de luz. Inclusión en resinas epóxicas, Azul de toluidina, 126x.

3.2 Análisis ultraestructural

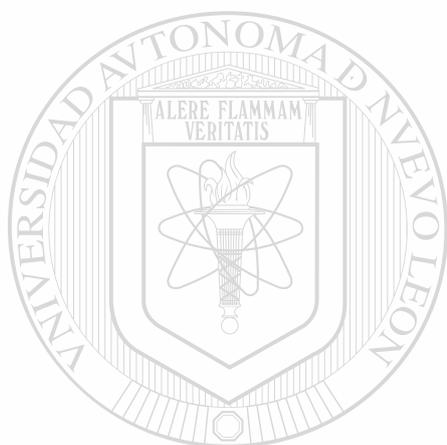
3.2.1 Descripción ultraestructural de la lesión pulmonar de ratones intoxicados con Peroxisomicina A-1 disuelta en diferentes vehículos:

Se observó daño gradual de la barrera alvéolo-capilar asociado a la presencia de PMN y linfocitos atrapados en los capilares alveolares. También se observaron macrófagos alveolares como lo muestran las figuras 10 y 11.

En los tres tratamientos de Peroxisomicina A-1 disuelta en diferentes vehículos se encontraron las mismas alteraciones ultraestructurales, las cuales consistieron en que a tiempos iniciales de intoxicación se observó la presencia de PMN en capilares alveolares, sin daño aparente a las células endoteliales (Fig. 10B), posteriormente se observó la adhesión de PMN a las células endoteliales (Fig. 10C), también se encontraron linfocitos en los capilares pero en mucha menor cantidad comparada con los PMN. Las células endoteliales presentaron edema, ruptura de la membrana y desorganización del citoplasma (Fig. 10C). En los espacios alveolares observamos la presencia de material electrodense, esto es lo que se conoce a microscopía de luz como membrana hialina (Fig. 10D). También se observó edema y destrucción de las células del intersticio (Fig. 11A). Al mayor tiempo de intoxicación se encontró destrucción de las células endoteliales, daño a la membrana basal y daño a neumocitos tipo I (Fig. 11B) lo que dio como resultado ruptura de la barrera alvéolo-capilar y la presencia de PMN atrapados en la luz capilar como se muestra en la (Fig 11C).

3.2.2 Linfocitos grandes granulares (Células NK) en la lesión pulmonar de animales tratados con Peroxisomicina A-1 disuelta en Haemaccel.

Como se mencionó en la descripción a microscopía de luz, la lesión pulmonar de los animales tratados con Peroxisomicina A1 disuelta en Haemaccel mostró la presencia de posibles células NK además de los tipos celulares ya descritos; en la (Fig. 12) se muestra la ultraestructura de esta célula, en este caso atrapada en un capilar alveolar.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

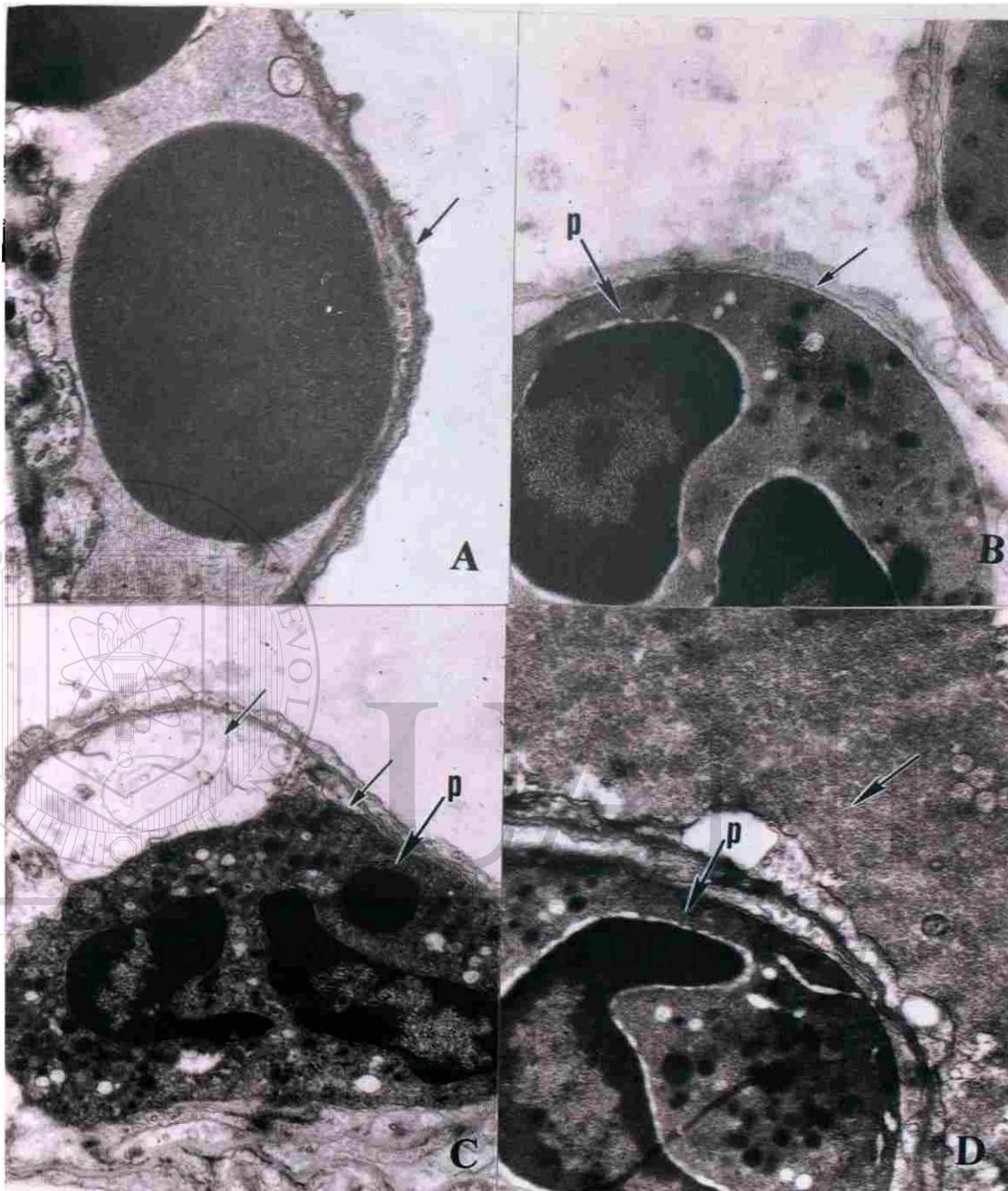


Figura 10. Pulmón de ratón A)Control sin tratamiento obsérvese la membrana alvéolo capilar delgada (flecha), B-D Tratamiento con 13.04mg/Kg de peso de Peroxisomicina A-1 que muestra daño a la barrera alvéolo capilar. B) Polimorfonuclear p dentro de un capilar sin daño a célula endotelial (flecha). C) Adhesión de polimorfonuclear p en célula endotelial con edema (flecha). D) Material electrodense en el espacio alveolar (flecha). Micrografías electrónicas de transmisión, Inclusión en resinas epóxicas, contrastación de cortes ultrafinos con Acetato de uranilo y Citrato de plomo. 7000x

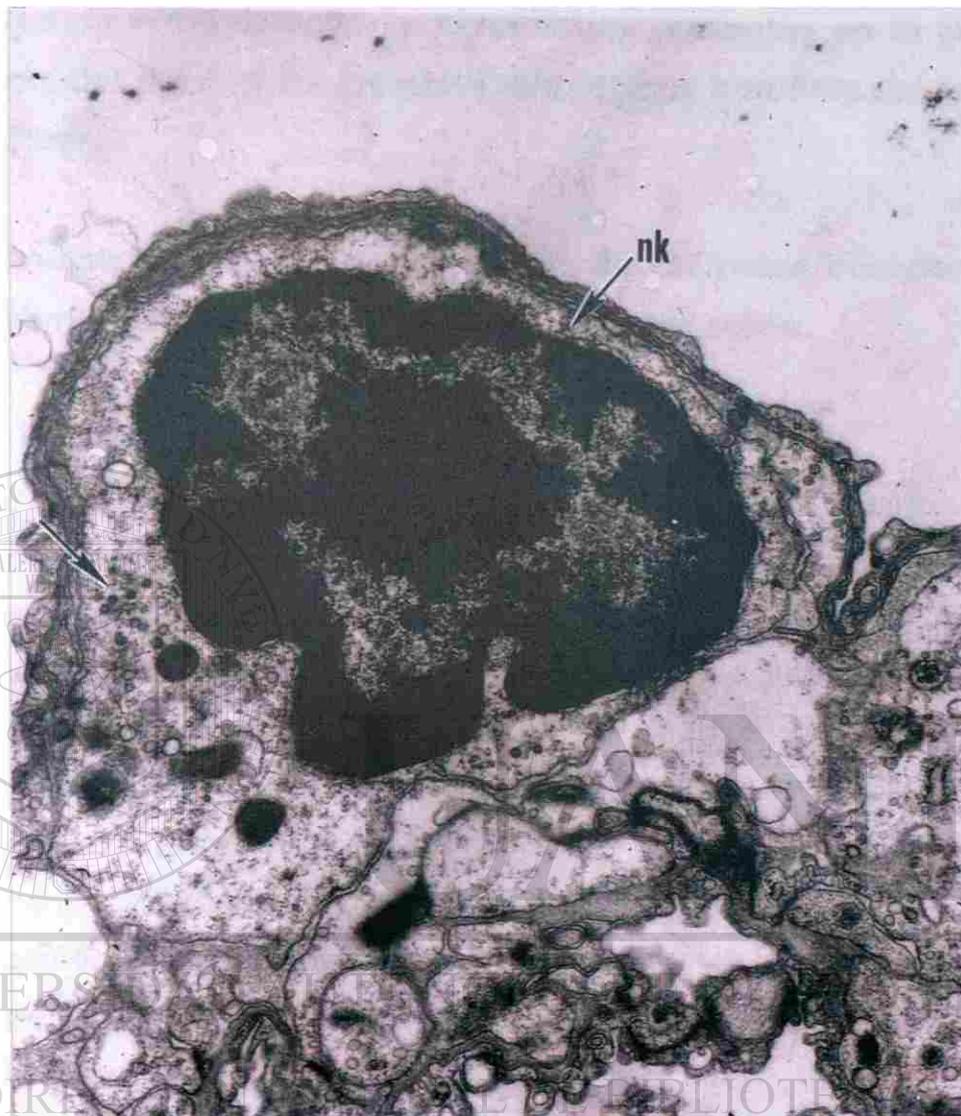


Figura 12. Pulmón de ratón. Tratamiento con 13.04mg/Kg de peso de Peroxisomicina A-1 en dilución con Haemaccel. Obsérvese una célula NK atrapada en un capilar alveolar los gránulos en su citoplasma (flecha) y el núcleo indentado es característico de este tipo celular. Micrografía electrónica de transmisión, Inclusión en resinas epóxicas, contrastación de cortes ultrafinos con Acetato de uranio y Citrato de plomo. 7000x

3.3 Análisis morfométrico por microscopía de luz de perfiles celulares de PMN, linfocitos y macrófagos presentes en la región alveolar del pulmón de animales intoxicados con Peroxisomicina A-1 y control.

3.3.1 Análisis morfométrico de pulmón de animales tratados con Peroxisomicina A-1 en suspensión con solución salina.

3.3.1.1 POLIMORFONUCLEARES.-

El análisis morfométrico de los PMN presentes en los pulmones de ratones que recibieron el tratamiento con Peroxisomicina A-1 en suspensión con solución salina (Fig.13A) mostró un aumento muy pronunciado de estas células después de 1.5h de intoxicación, que posteriormente disminuyó en tiempos intermedios para aumentar gradualmente hasta el mayor tiempo experimental. Al graficarse los datos muestran una curva bifásica.

Se encontró diferencia significativa ($p < 0.001$) en todos los puntos al comparar los datos obtenidos con el tratamiento de Peroxisomicina A-1 en suspensión con solución salina y aquellos obtenidos con el vehículo solución salina.

En la (Fig. 13A) también muestra el resultado obtenido con el tratamiento con LPS (control positivo), que fue donde se encontró la mayor cantidad de PMN en todos los tiempos estudiados y se obtuvo una diferencia significativa ($p < 0.001$) al compararse con los datos obtenidos en los pulmones de animales tratados con el vehículo solución salina.

En los pulmones de animales control sin tratamiento y de aquellos tratados con el vehículo solución salina, fue en donde se encontró la menor cantidad de PMN.

3.3.1.2 MACROFAGOS

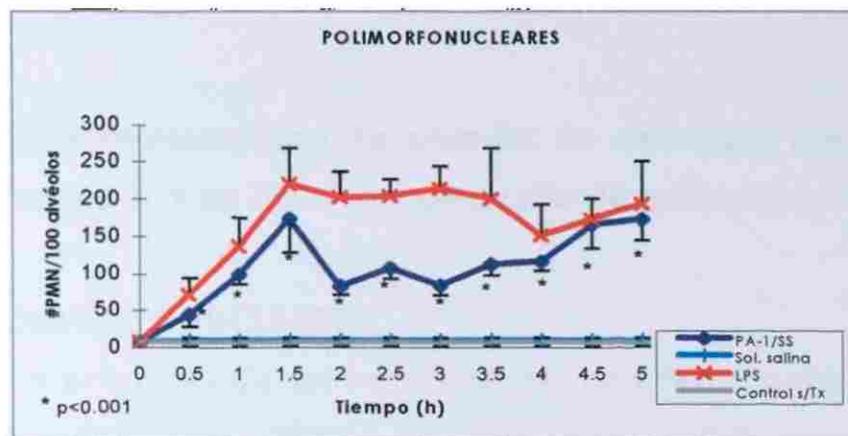
La (Fig. 13B) muestra la cantidad de macrófagos alveolares presentes en los pulmones de animales tratados con Peroxisomicina A-1 en suspensión con solución salina. Se observó un aumento en función del tiempo, que mostró diferencia significativa ($p < 0.001$) en todos los tiempos al comparar los datos con el pulmón de animales a los que se les administró solamente vehículo solución salina.

Los pulmones de animales que recibieron el tratamiento con LPS mostraron la mayor cantidad de macrófagos alveolares, comparado con los otros tratamientos analizados. Se encontró una diferencia significativa en todos los tiempos ($p < 0.001$) al comparar los datos de LPS y vehículo solución salina. En el tratamiento con vehículo solución salina y control sin tratamiento la cantidad de macrófagos que se observó fue la mas baja de todos los tratamientos y no se encontró diferencia significativa al compararlos entre sí.

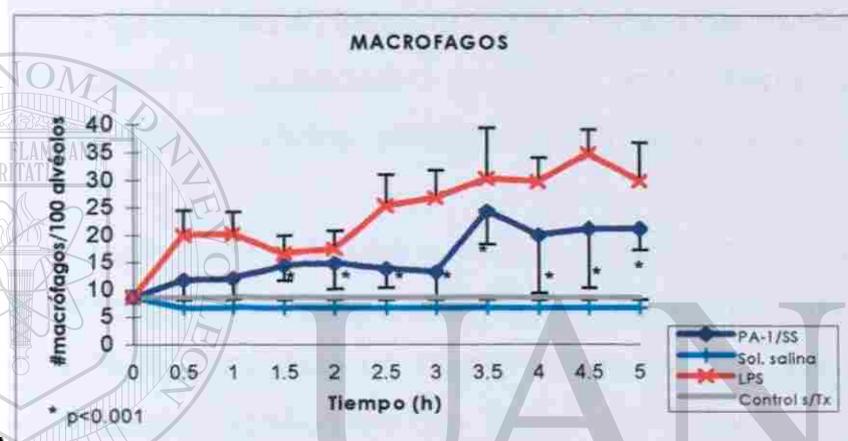
3.3.1.3 LINFOCITOS

La cantidad de linfocitos en los pulmones de animales intoxicados con Peroxisomicina A-1 en suspensión con solución salina (Fig.13C) aumentó en función del tiempo. Se encontró diferencia significativa ($p < 0.001$) desde 2.5 hasta 5h al compararlos con el vehículo solución salina. Los pulmones de animales que recibieron el tratamiento con LPS mostraron que la cantidad de linfocitos aumentó en función del tiempo. Además se encontró diferencia significativa ($p < 0.001$) en todos los tiempos experimentales al compararlos con los pulmones de animales que recibieron únicamente el vehículo solución salina.

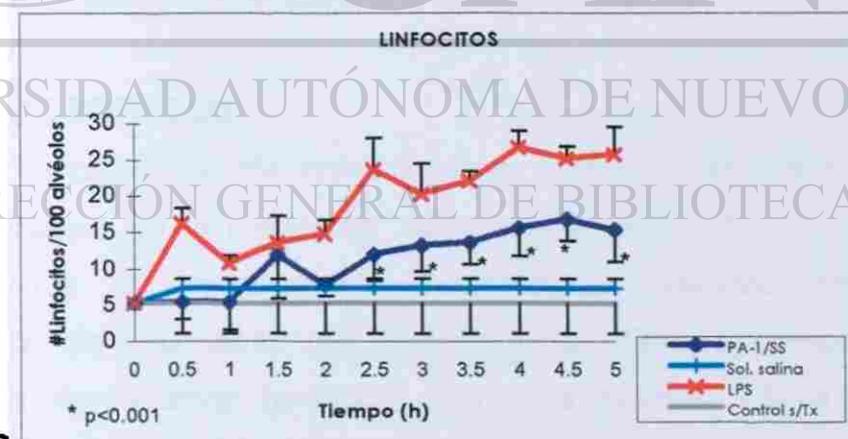
En los pulmones de los animales tratados con vehículo solución salina y control sin ningún tratamiento, fue donde se observó la menor cantidad de linfocitos comparada con todos los tratamientos.



A



B



C

Figura 13. Gráfica A, B y C muestran las Cinéticas de polimorfonucleares, macrófagos y Linfocitos en pulmón de ratón tratado con: Peroxisomicina A-1 en suspensión con solución salina, Lipopolisacárido LPS, Control vehículo solución salina, Control sin tratamiento. Después de llevar a cabo el análisis morfométrico en cortes semifinos. Los valores de cada punto representan la media de cinco conteos para cada tiempo \pm desviación estándar.

3.3.2 Análisis morfométrico de pulmón de animales tratados con Peroxisomicina A-1 en dilución con aceite de cártamo.

3.3.2.1 POLIMORFONUCLEARES:

En los pulmones de animales tratados con Peroxisomicina A-1 en dilución con aceite de cártamo (Fig. 14A) se observó aumento gradual en la cantidad de PMN hasta llegar al mayor tiempo de intoxicación.

Se encontró diferencia significativa ($p < 0.001$) en los tiempos de 3 a 5 horas al comparar los datos obtenidos con el vehículo aceite de cártamo.

Al observar el pulmón de animales a los que se les administró el vehículo aceite de cártamo se encontró que se induce un incremento en la cantidad de PMN, pero éste no aumenta en función del tiempo. Se encontró diferencia significativa en todos los tiempos ($p < 0.001$) al comparar los datos con el control sin ningún tratamiento.

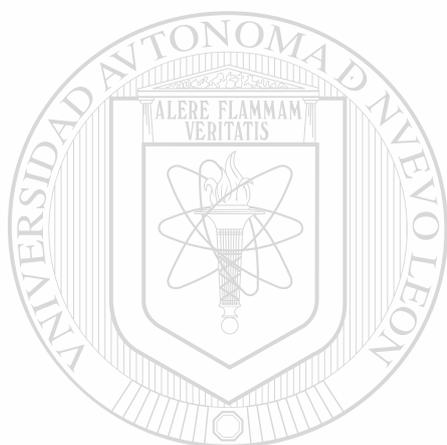
3.3.2.2 MACROFAGOS:

En los pulmones de animales que recibieron el tratamiento con Peroxisomicina A-1 en dilución con aceite de cártamo (Fig.14B) se observó que la cantidad de macrófagos alveolares mostró una tendencia de aumento en función del tiempo, encontrándose diferencia significativa ($p < 0.001$) para los puntos 2.5, 4.5 y 5h al compararlos con el vehículo aceite de cártamo.

El vehículo aceite de cártamo tuvo un comportamiento similar al control sin ningún tratamiento ya que solo encontramos diferencia significativa a las 5h ($p < 0.05$)

3.3.2.3 LINFOCITOS:

En los pulmones de animales que recibieron el tratamiento con Peroxisomicina A-1 en dilución con aceite de cártamo (Fig. 14C) mostraron que la cantidad de linfocitos sigue una tendencia de aumento con respecto al tiempo de intoxicación, se encontró diferencia significativa ($p < 0.001$) en los puntos 3.5, 4.5 y 5h, al compararlos con el vehículo aceite de cártamo. No se encontró diferencia significativa al comparar el vehículo aceite de cártamo y el control sin tratamiento.

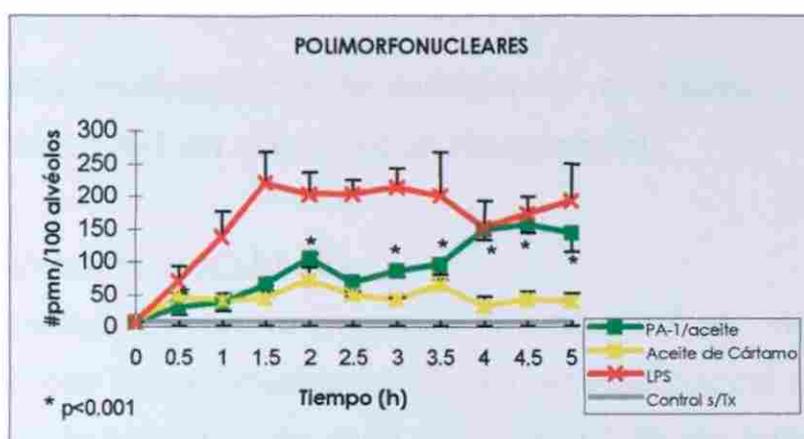


UANL

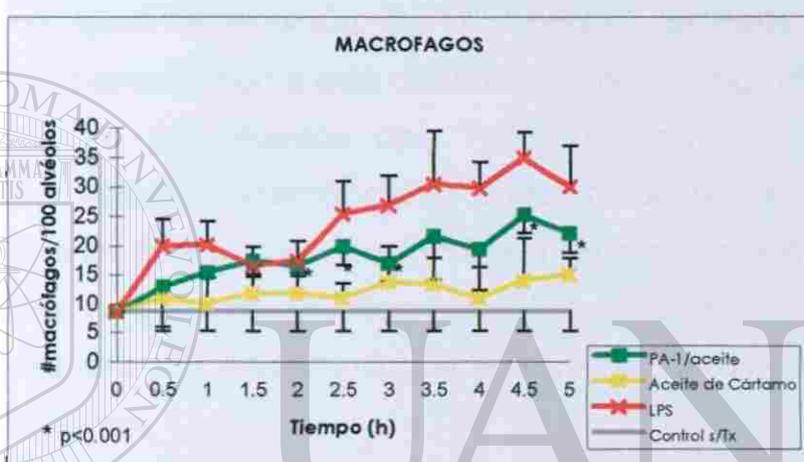
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



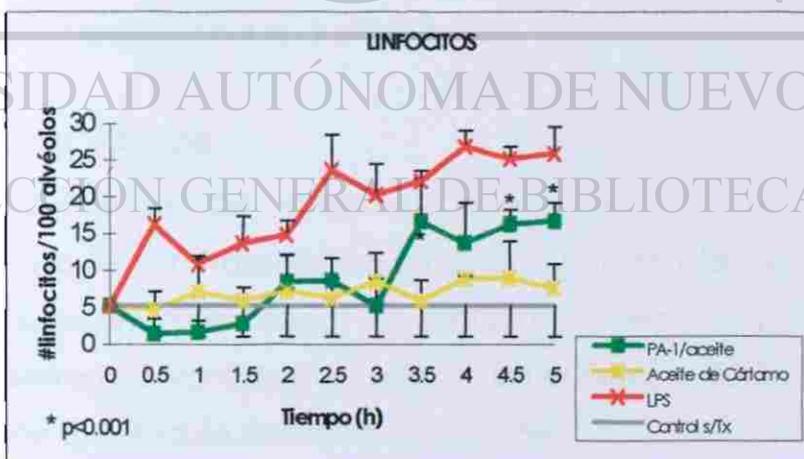
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



A



B



C

Figura 14. Gráfica A, B y C muestran las Cinéticas de polimorfonucleares, macrófagos y Linfocitos en pulmón de ratón tratado con: Peroxisomicina A-1 en dilución con aceite de cártamo, Lipopolisacárido LPS, Control vehículo aceite de cártamo, Control sin tratamiento. Después de llevar a cabo el análisis morfológico en cortes semifinos. Los valores de cada punto representan la media de cinco conteos para cada tiempo \pm desviación estándar.

3.3.3 Análisis morfométrico de pulmón de animales tratados con Peroxisomicina A-1 en dilución con Haemaccel.

3.3.3.1 POLIMORFONUCLEARES

Los pulmones de animales a los que se les administró el tratamiento con Peroxisomicina A-1 disuelta en Haemaccel mostraron un aumento en la cantidad de PMN posterior a 1.5h de intoxicación, se observó una ligera disminución de la cantidad de PMN en tiempos intermedios, y posteriormente esta cantidad aumentó (Fig. 15A)

Al comparar los tratamientos con Peroxisomicina A-1 disuelta en Haemaccel y vehículo Haemaccel se encontró diferencia significativa ($p < 0.001$) para los tiempos de 1 hasta 5 horas de intoxicación

En el tratamiento con vehículo Haemaccel se observó un aumento de PMN con respecto al control sin ningún tratamiento pero no aumentó en función del tiempo.

Existe diferencia significativa ($p < 0.05$) al comparar los datos del vehículo Haemaccel con el control sin tratamiento.

3.3.3.2 MACROFAGOS

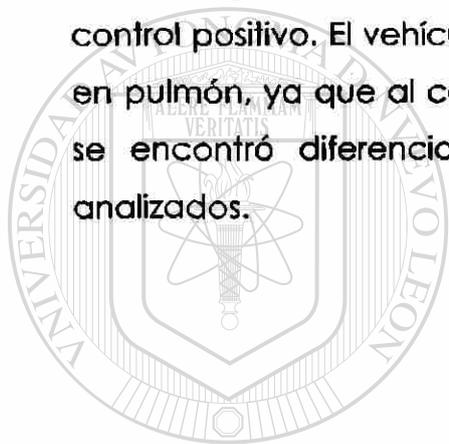
Los pulmones de animales que recibieron el tratamiento Peroxisomicina A-1 en Haemaccel mostraron una tendencia al aumento en la cantidad de macrófagos en función del tiempo, ya que solo se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) en el tiempo de 5h al comparar los datos con el vehículo Haemaccel (Fig.15B)

No se encontró diferencia significativa al comparar el control sin tratamiento y el vehículo Haemaccel.

3.3.3.3 LINFOCITOS

En los pulmones de animales que recibieron el tratamiento con Peroxisomicina A-1 en dilución con Haemacel (Fig. 15C) mostraron la mayor cantidad de linfocitos, se encontró diferencia significativa ($p < 0.001$) para los tiempos de 1.5 hasta 5h al comparar los datos con el vehículo Haemacel.

La cantidad de linfocitos que se encontró en el tratamiento con Peroxisomicina A-1 disuelta en Haemacel superó a la cantidad de linfocitos que se observó con el tratamiento de LPS que utilizamos como control positivo. El vehículo Haemacel induce un aumento de linfocitos en pulmón, ya que al compararlo con el control sin ningún tratamiento, se encontró diferencia significativa ($p < 0.001$) en todos los tiempos analizados.

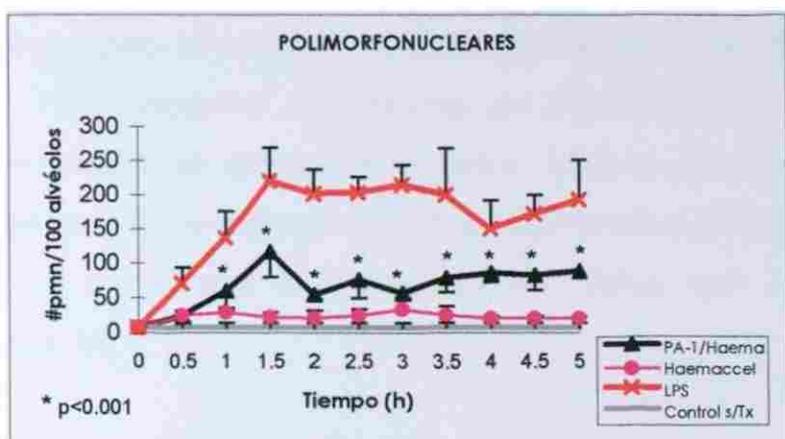


UANL

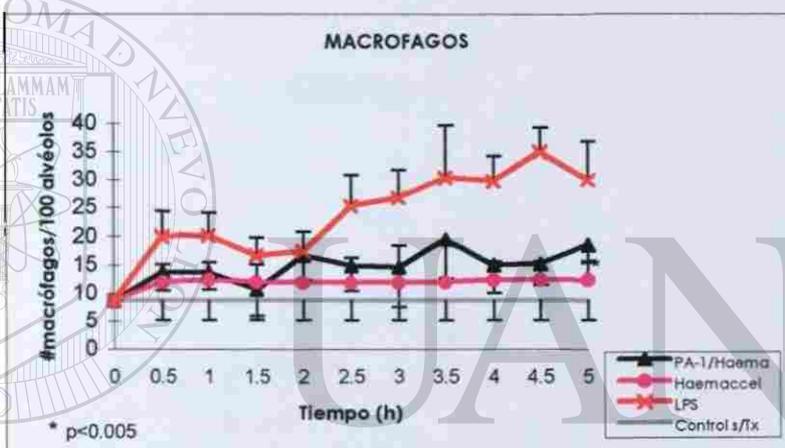
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

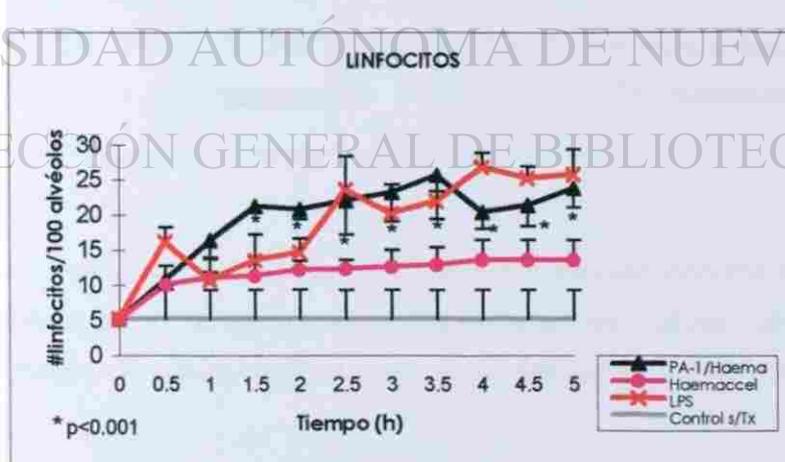




A



B



C

Figura 15. Gráfica A, B y C muestran las Cinéticas de polimorfonucleares, macrófagos y Linfocitos en pulmón de ratón tratado con: Peroxisomicina A-1 en dilución con Haemacel, Lipopolisacárido LPS, Control vehículo Haemacel, Control sin tratamiento. Después de llevar a cabo el análisis morfométrico en cortes semifinos. Los valores de cada punto representan la media de cinco conteos para cada tiempo \pm desviación estándar.

3.3.3.4 Células NK

Al llevar a cabo el análisis morfométrico del pulmón de animales tratados con Peroxisomicina A1 disuelta en Haemacel y el control vehículo Haemacel se contaron posibles células NK presentes en capilares alveolares. Se encontró diferencia significativa $p < 0.001$ para los tiempos de 3.5 a 5 horas al comparar los datos con el vehículo Haemacel (Fig. 16)

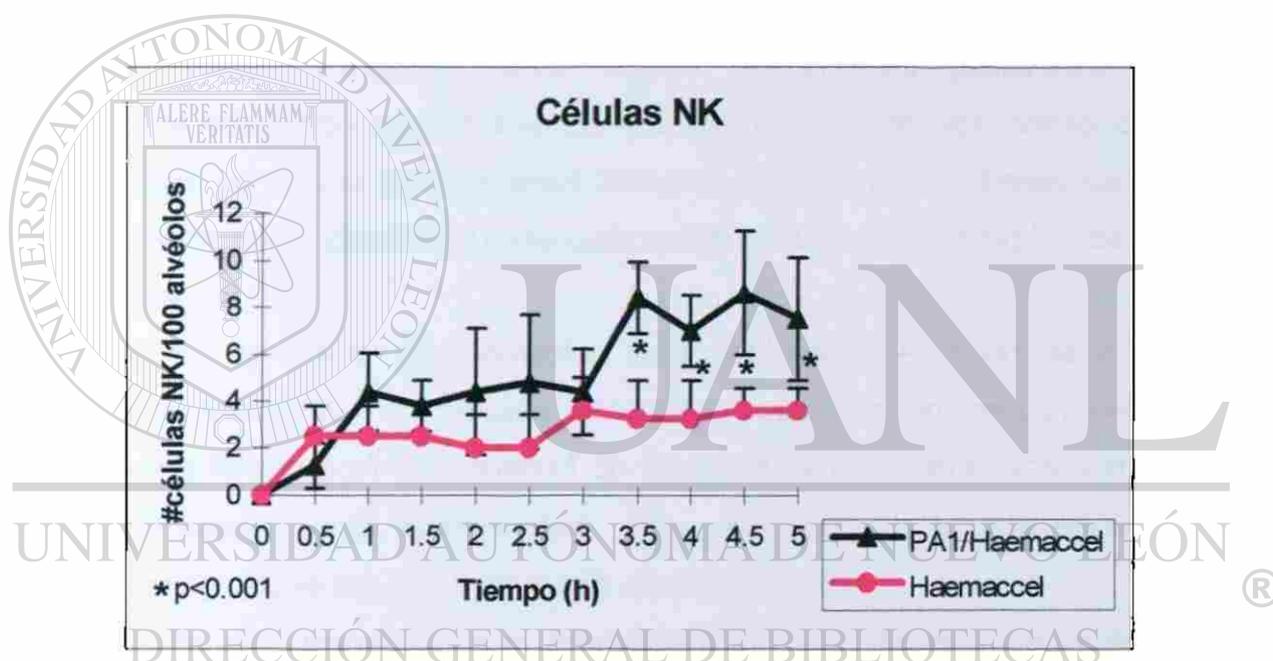


Figura 16. Cinética de células NK en pulmón de ratón tratado con Peroxisomicina A1 disuelto en Haemacel y control vehículo Haemacel los valores de cada punto representan la media de cinco conteos para cada tiempo experimental \pm desviación estándar

3.4 Cuantificación de TNF α en suero de ratones intoxicados con Peroxisomicina A-1 disuelta en diferentes vehículos.-

La (Fig. 16) muestra los valores de TNF α en suero de ratones tratados con Peroxisomicina A1 disuelta en diferentes vehículos y controles correspondientes.

Los niveles de TNF α obtenidos para el tratamiento con Peroxisomicina A1 en suspensión con solución salina después de 1 y 1.5h de intoxicación, fueron de 10755.94 pg/ml de suero y 9315.24 pg/ml de suero respectivamente, estos niveles fueron muy parecidos a los encontrados con el tratamiento de LPS que utilizamos como control positivo, ya que a estos mismos tiempos se obtuvieron niveles de 10800 pg/ml de suero después 1h de aplicación de LPS y 10723 pg/ml de suero posterior a 1.5h.

En el suero de animales que recibieron el tratamiento con Peroxisomicina A-1 en dilución con Haemaccel, encontramos niveles de TNF α de 984.98 pg/ml de suero 1.5h después de la intoxicación, y a las 2h encontramos una disminución muy marcada que posteriormente aumentó desde las 3h hasta las 5h de intoxicación.

En el tratamiento con Peroxisomicina A-1 disuelta en aceite de cártamo los niveles de TNF α que se encontraron en tiempos iniciales fueron muy bajos, pero a 3 h de intoxicación se encontró 134.06 pg/ml de suero el cual disminuyó a partir de 4h.

En el suero de animales que recibieron vehículo aceite de cártamo encontramos 862.04 pg/ml de suero a las 2h después del tratamiento, y a las 3h de tratamiento los niveles fueron de 625.10 pg/ml de suero, sorpresivamente estos niveles se mantuvieron altos al compararlos con los valores obtenidos con los sueros de los animales tratados con Peroxisomicina A-1 en dilución con aceite de cártamo.

El vehículo Haemacel indujo niveles bajos de TNF α en todos los tiempos experimentales.

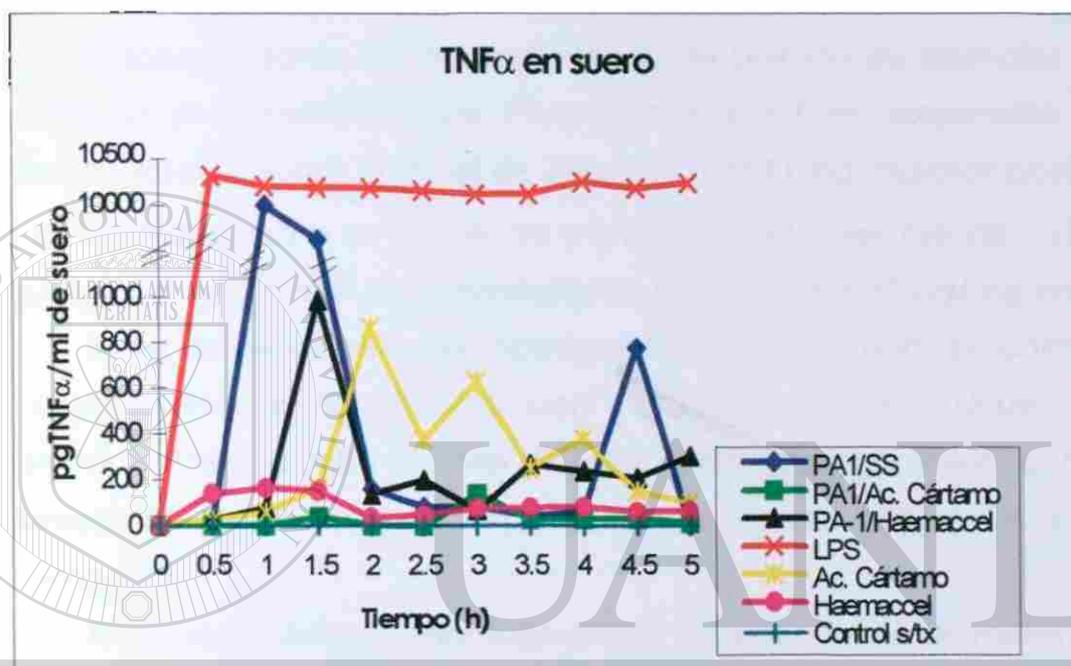
En los sueros de los animales tratados con el vehículo solución salina y los controles sin ningún tratamiento no se encontraron niveles de TNF α en ningún tiempo experimental.

Como una manera de verificar la reproducibilidad y confiabilidad de las lecturas y controles se repitieron algunas determinaciones como lo muestra la Tabla III.

TABLA III

Tratamiento	Absorbancia	Concentración pg/ml
Control sin Tx.	0.231	0
	0.222	0
LPS 30min.	0.712	1098.54
	0.727	1121.68
PA-1/Aceite 3.5h	0.249	27.77
	0.252	32.40
PA-1/Aceite 4h	0.282	78.68
	0.279	74.05
LPS (Sobrenadante) 5h	1.076	8060.18
	0.960	6953.69

Tabla III lecturas de absorbancia y concentración de TNF α de problemas y controles.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Figura 17. Cinética de pg de $TNF\alpha$ /ml de suero de ratones que recibieron diferentes tratamientos de Peroxisomicina A-1(PA1) y controles correspondientes. Cada punto representa un pool de sueros de 5 ratones para cada tiempo experimental.

3.5 Cuantificación de TNF α en homogenizado de pulmón de ratones con diferentes tratamientos.-

La (Fig.18) muestra los niveles de TNF α en pg/mg de proteína (pg/mg-prot) en el sobrenadante del homogenizado de pulmón de animales que recibieron Peroxisomicina A1 disuelta en diferentes vehículos y controles correspondientes.

El sobrenadante del homogenizado de pulmón de animales que recibieron el tratamiento con Peroxisomicina A-1 en suspensión con solución salina, mostró un nivel de TNF α de 1337.81 pg/mg-prot posterior a 1h de tratamiento. A las 3h de tratamiento el nivel fue de 1115.86 pg/mg-prot y a las 4.5h de tratamiento se encontró 658.97 pg/mg-prot.

En el sobrenadante del homogenizado de pulmón de animales que recibieron el tratamiento con Peroxisomicina A-1 disuelta en Haemacel se encontró un nivel de 553.85 pg/mg-prot posterior a 2h de intoxicación, a las 4.5h de intoxicación los niveles fueron de 430.45 pg/mg-prot.

El sobrenadante del homogenizado de pulmón de animales que recibieron el tratamiento con Peroxisomicina A-1 en dilución con aceite de cártamo se encontró 393.9 pg/mg-prot después de 2.5h de tratamiento, los niveles fueron similares para el resto de los tiempos experimentales.

En el sobrenadante de los pulmones de los ratones tratados con LPS (control positivo) fue donde se encontraron los niveles más altos de pg de TNF α /mg-prot comparado con todos los tratamientos analizados. En el tratamiento vehículo aceite de cártamo se observaron niveles mas altos comparados con el tratamiento con Peroxisomicina A-1 disuelta en aceite de cártamo.

En el tratamiento vehículo Haemacel observamos niveles más bajos comparados con el control sin ningún tratamiento en tiempos iniciales, pero después de 4h hubo un ligero aumento.

El vehículo solución salina y el control sin ningún tratamiento mostraron los niveles más bajos de todos los tratamientos.

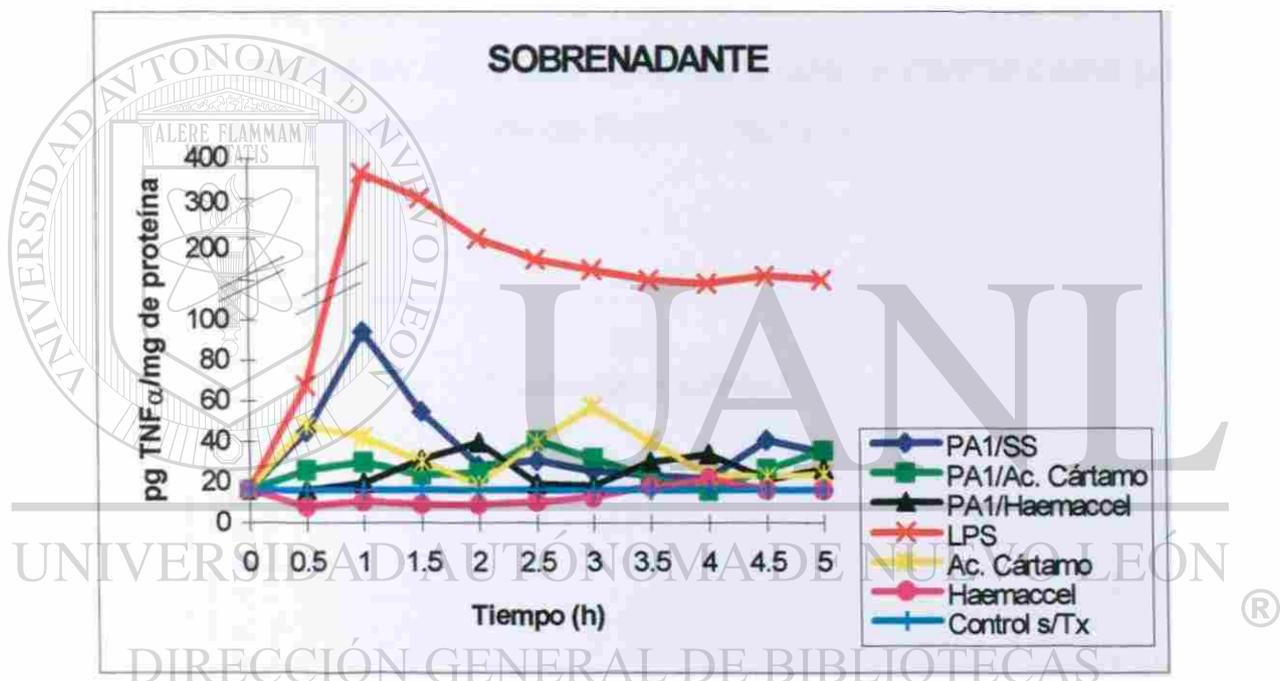


Figura 18. Cinética de pg de $TNF\alpha$ /mg de proteína en el sobrenadante de homogenizado de pulmones de ratones que recibieron diferentes tratamientos de Peroxisomicina A-1 (PA1) y controles correspondientes. Cada punto representa un pool de sobrenadante de homogenizado de pulmón de 5 ratones para cada tiempo experimental.

3.6 Cultivo de órgano

3.6.1 Viabilidad celular

Los fragmentos de pulmón de ratón sin tratamiento que se cultivaron con diferentes concentraciones de Peroxisomicina A-1, fueron viables según los resultados obtenidos con la prueba de viabilidad de LDH que se libera al medio de cultivo durante el tiempo de incubación (Fig. 19), en la que obtuvimos lecturas menores al 20% de unidades totales de LDH que es la máxima cantidad aceptable que indica la viabilidad de un tejido *in vitro*.

Estos resultados fueron obtenidos tanto para cultivos control como para las diferentes concentraciones de Peroxisomicina A-1.

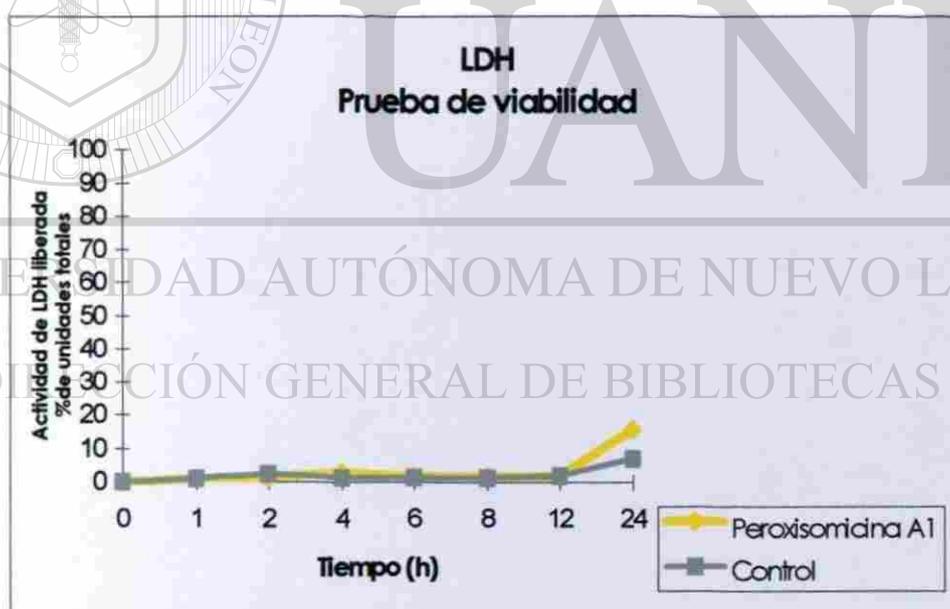
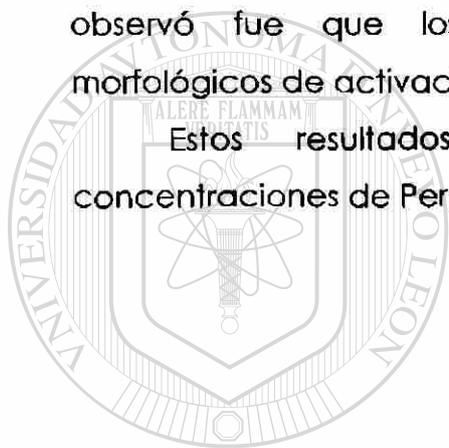


Figura 19. Liberación de LDH al medio de cultivo en presencia y ausencia de Peroxisomicina A1 (2µg/ml) a diferentes tiempos de cultivo. La actividad de LDH se determinó por triplicado, en el sobrenadante del medio de cultivo de cada placa.

3.6.2 Análisis por microscopía de luz de los explantes de pulmón en cultivo de órgano.

El análisis por microscopía de luz de los explantes de pulmón incubados con Peroxisomicina A-1 a diferentes tiempos mostró espacios alveolares bien distendidos y tabiques interalveolares delgados; no se observó la presencia de PMN, eosinófilos, linfocitos o células NK atrapados en la luz de los capilares alveolares, se observó una apariencia histológica normal del pulmón. La única alteración que se observó fue que los macrófagos alveolares mostraron signos morfológicos de activación (Fig. 20).

Estos resultados fueron similares para las diferentes concentraciones de Peroxisomicina A1 utilizadas.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

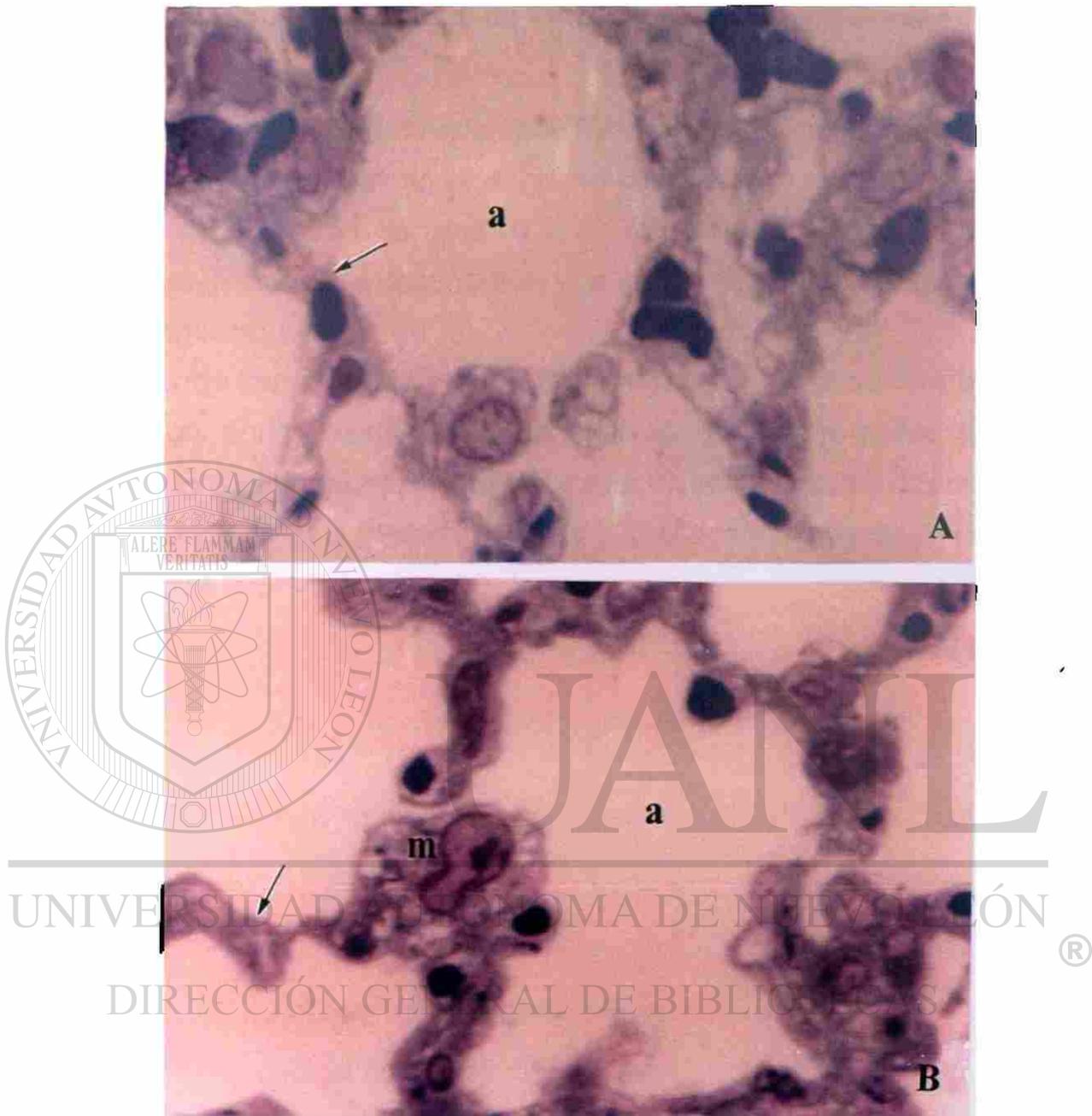
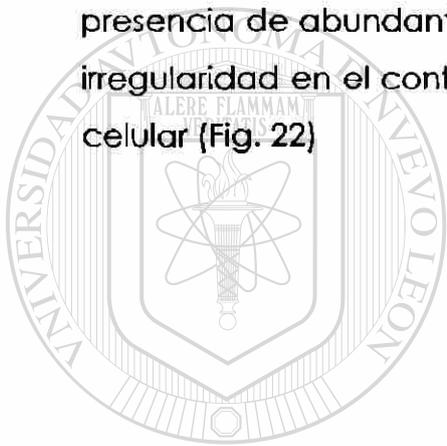


Figura 20. Pulmón de ratón A) Control sin tratamiento que muestra espacios alveolares bien distendidos **a**, tabiques interalveolares delgados (flecha) y capilares ocupados por eritrocitos. B) 6h de cultivo de órgano en presencia de 2µg/ml de Peroxisomicina A-1 obsérvese los espacios alveolares bien distendidos **a**, tabiques interalveolares delgados (flecha) macrófagos alveolares con signos morfológicos de activación **m**. Fotomicrografía de luz. Inclusión en resinas epóxicas, Azul de toluidina, 126x.

3.6.3 Análisis ultraestructural de los explantes de pulmón en cultivo

En el análisis ultraestructural de los explantes de pulmón incubados con Peroxisomicina A-1 no se encontró daño en células endoteliales ni en neumocitos tipo I, se observó la barrera alvéolo-capilar íntegra en todos los tiempos de incubación y a diferentes concentraciones de Peroxisomicina A-1 (Fig. 21)

Un hallazgo importante fue el de los macrófagos alveolares, los cuales mostraron signos morfológicos de activación caracterizados por la presencia de abundantes vesículas vacías en el citoplasma, además de irregularidad en el contorno celular, lo que indica una intensa actividad celular (Fig. 22)



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



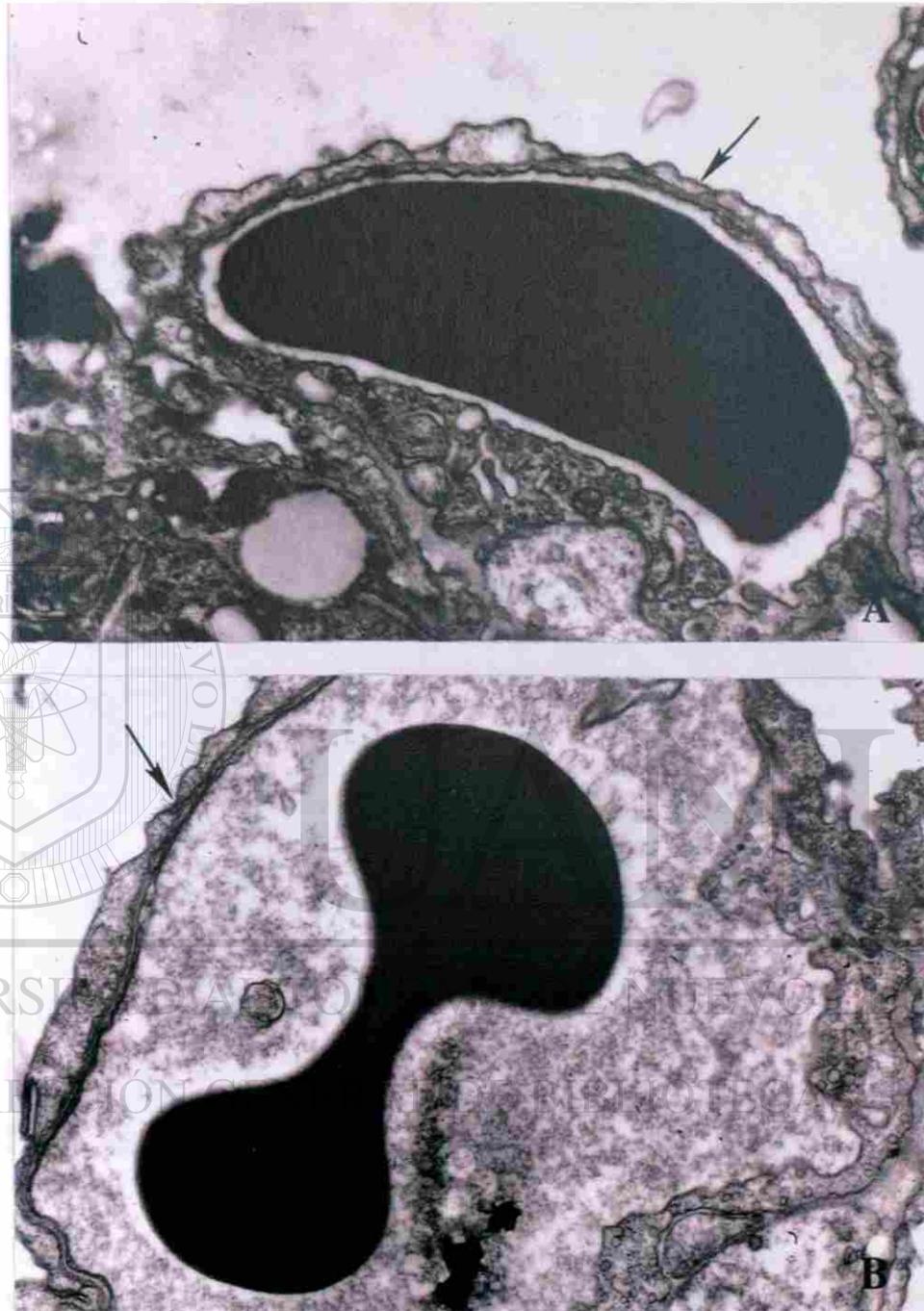


Figura 21. Pulmón de ratón en cultivo de órgano A) Control sin Peroxisomicina A-1 obsérvese un capilar ocupado por un eritrocito y la barrera alvéolo capilar delgada (flecha), B) 6h de incubación en presencia de $2\mu\text{g/ml}$ de Peroxisomicina A-1 que muestra un capilar alveolar con la barrera alvéolo capilar íntegra. (flecha). Micrografías electrónicas de transmisión. Inclusión en resinas epóxicas, Contrastación de cortes ultrafinos con Acetato de uranilo y Citrato de plomo. 7000x

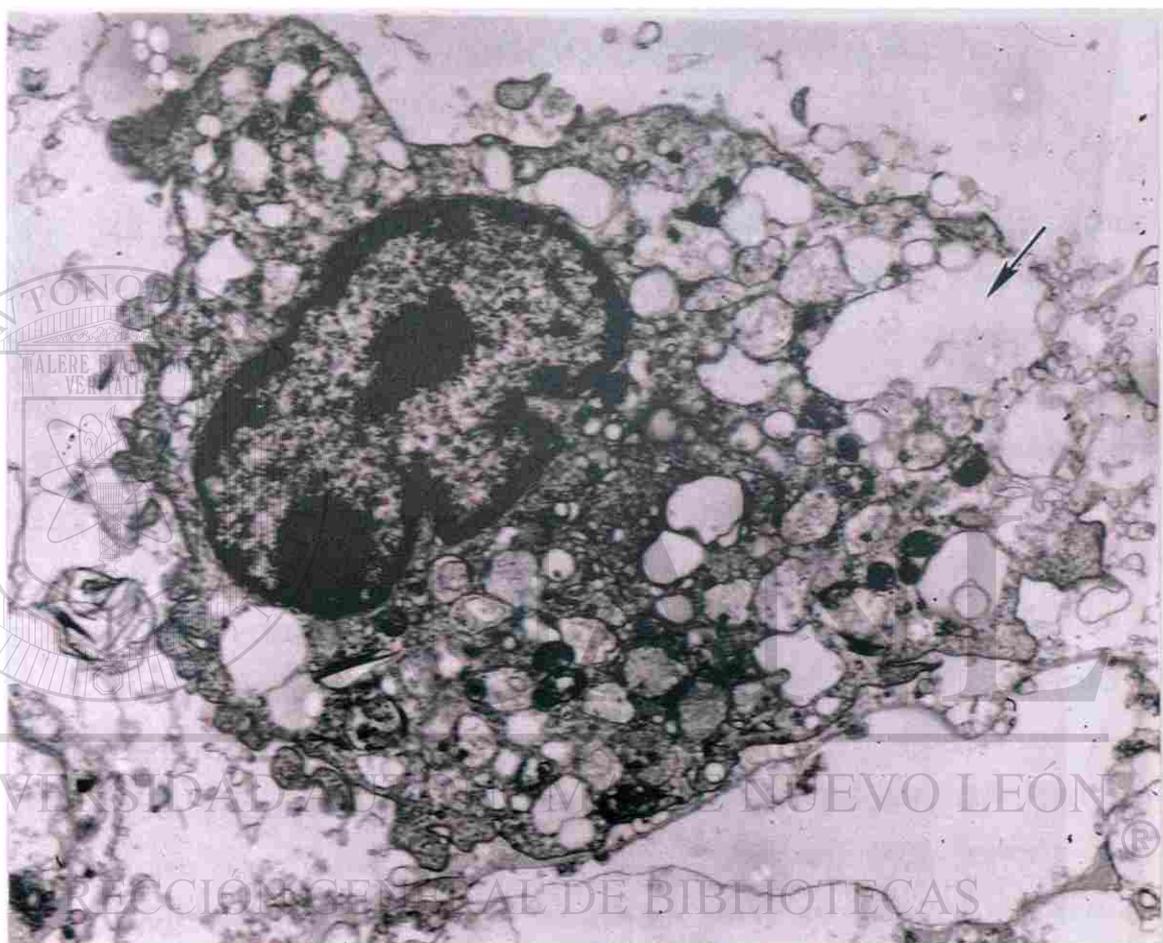


Figura 22. Macrófago alveolar de pulmón en cultivo de órgano incubado con $2\mu\text{g/ml}$ de Peroxisomicina A-1 que muestra abundantes vesículas vacías en su citoplasma (flecha). Micrografía Electrónica de Transmisión. Inclusión en resinas epóxicas, Contrastación de cortes ultrafinos con Acetato de uranilo y Citrato de plomo. 7000x

CAPITULO CUATRO

DISCUSION

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten aceptar la hipótesis de trabajo propuesta, ya que se logró identificar la presencia de TNF α tanto en el suero como en el homogenado pulmonar de ratones intoxicados con Peroxisomicina A-1, en concentraciones significativamente superiores a los presentes en los animales control sin tratamiento. Además se encontró una estrecha relación entre la cantidad de PMN presentes en la región alveolar del pulmón y la concentración de TNF α en suero y pulmón.

Sobre la ultraestructura del pulmón de hámster, cobayo, rata y mono intoxicados experimentalmente con Peroxisomicina A-1, Sepúlveda y col.³⁰ proponen analizar la participación de factores mediadores del daño pulmonar. Con base en este reporte nos propusimos evaluar la relación existente entre los PMN y el TNF α al comparar los datos obtenidos con los provenientes de animales control sin tratamiento, control vehículo y control positivo tratado con LPS. Las alteraciones morfológicas observadas en el pulmón de ratón descritas en este trabajo no habían sido reportadas con anterioridad. Y coinciden con las descripciones realizadas por Sepúlveda y col.³⁰ en otras especies estudiadas.

Como una forma de cuantificar el grado de daño pulmonar presente en los ratones intoxicados con Peroxisomicina A1 se diseñó un

análisis morfométrico en el que se contaron los perfiles celulares de PMN, linfocitos y macrófagos presentes en la región alveolar del pulmón, en los cortes histológicos estudiados.

El análisis morfométrico por microscopía de luz, mostró que hay un aumento gradual en la cantidad de PMN, linfocitos y macrófagos en función del tiempo. Esto coincide con la lesión pulmonar de animales que recibieron TNF α recombinante⁷⁶ en los que se reporta un incremento de PMN desde los 30min que fue mas marcado a las 2h.

También se encontró que los vehículos; aceite de cártamo y Haemaccel por si mismos causan un aumento en la cantidad de PMN, linfocitos y macrófagos pero estos no aumentan en función del tiempo.

Cuando se utilizaron vehículos acuosos para disolver la Peroxisomicina A-1 el aumento de PMN fue mayor en tiempos iniciales, que el observado en el tratamiento de Peroxisomicina A-1 disuelta en aceite de cártamo. Posiblemente la Peroxisomicina A-1 en presencia de vehículos acuosos se absorbe más rápido y se observa el efecto a tiempos más cortos.

En el análisis morfométrico se encontró que el tratamiento de Peroxisomicina A-1 disuelta en Haemaccel, causó un aumento en la cantidad de linfocitos en todos los tiempos experimentales, superior a los valores que se encontraron con los siguientes tratamientos: LPS (control positivo), Peroxisomicina A-1 en suspensión con solución salina y Peroxisomicina A-1 disuelta en aceite de cártamo.

Se encontró también que el vehículo Haemaccel es capaz de causar un acumulo de linfocitos superior a los que se encontraron con la administración de los vehículos aceite de cártamo, solución salina y control sin ningún tratamiento.

Estos datos sugieren la existencia de un estímulo de la respuesta inmune en los animales intoxicados experimentalmente con Peroxisomicina A-1 disuelta en Haemaccel.

En los tratamientos con Peroxisomicina A-1 en suspensión con solución salina y Peroxisomicina A-1 en dilución con Haemaccel se encontraron niveles altos de TNF α en suero y en pulmón en los tiempos iniciales de intoxicación (1.5h). A tiempos mayores no se encontraron niveles altos de TNF α . La concentración de TNF α en tiempos iniciales se correlaciona con la mayor cantidad de PMN encontrada a estos mismos tiempos de intoxicación. Esto coincide con lo reportado por Leeper-Woodford y col. ellos encontraron TNF α en circulación desde 90-120min después del inicio de septicemia⁷⁷

Con el tratamiento Peroxisomicina A-1 disuelta en aceite de cártamo no se encontraron niveles altos de TNF α en suero, a pesar de que se observó la lesión pulmonar característica. No obstante se encontraron niveles altos de TNF α en el lavado peritoneal de ratones intoxicados con Peroxisomicina A-1 disuelta en aceite de cártamo (datos no mostrados)

Se encontraron niveles moderados de TNF α presentes en el suero y en el pulmón de animales que recibieron el tratamiento con el vehículo aceite de cártamo. El análisis por microscopía de luz, del pulmón de estos animales mostró que si existe un acúmulo de PMN en los capilares alveolares, pero estos no aumentan con respecto al tiempo de intoxicación.

En el tratamiento con LPS (control positivo) se encontró la mayor concentración de TNF α en suero y en pulmón ya que es el inductor más potente conocido, también se observó la lesión histopatológica característica del SIRA en su fase aguda lo que nos permitió comparar

los hallazgos histopatológicos presentes, con los observados con los tratamientos de Peroxisomicina A-1.

Por otro lado se comparó la lesión pulmonar causada por la intoxicación experimental en ratones cepa CD-1, con el efecto presente en explantes de pulmón incubados con Peroxisomicina A-1 a diferentes concentraciones.

Al evaluar la ultraestructura de los explantes de pulmón en cultivo se encontró que no presentan ninguna alteración de la morfología normal de la barrera alvéolo-capilar. Esto sugiere que es necesaria la presencia de células y de mediadores químicos, que se encuentran en la sangre en el animal completo.

Nuestros resultados sugieren que el $TNF\alpha$ no es el único mediador químico involucrado en el desarrollo de la lesión pulmonar ya que a tiempos de intoxicación más largos los niveles de $TNF\alpha$ disminuyen pero la cantidad de PMN y la magnitud de la lesión pulmonar siguen en aumento, lo que sugiere la participación de otras citocinas causantes de la lesión pulmonar.

En base a estos resultados se propone un mecanismo de daño pulmonar causado por Peroxisomicina A-1 (Fig. 23)

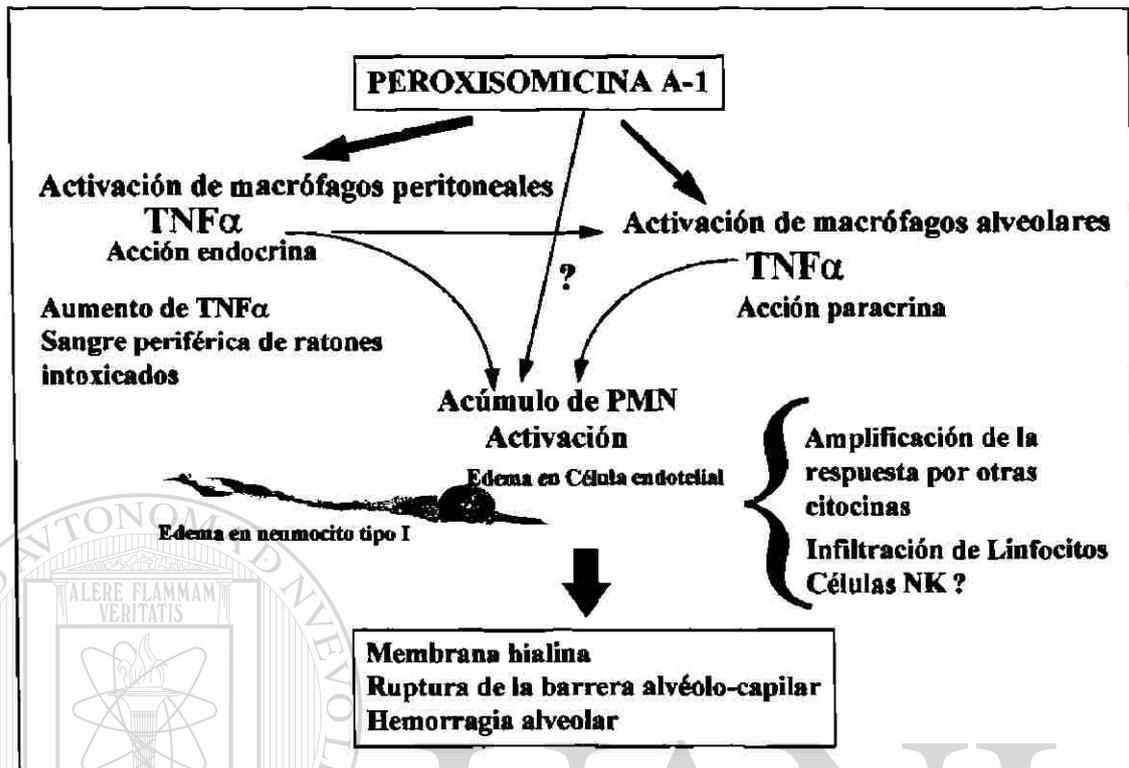


Figura 23 Mecanismo propuesto de daño pulmonar

Recientemente se ha reportado que el TNF α es la citocina que activa una serie de eventos que desencadenan la liberación de otras citocinas⁶³ entre ellas IL-8 cuya función es la de incrementar la quimiotaxis, desgranulación, liberación de enzimas lisosomales, así como la expresión de moléculas de adhesión en PMN. La IL-8 es una quimocina alfa producida principalmente por macrófagos activados y por una gran variedad de tipos celulares después de la administración de un agente estimulante como LPS, TNF α , IL-1 β ^{62,63,64}, por lo que se propone que esta citocina, entre otras, sea la que mantenga la lesión pulmonar en tiempos de intoxicación más prolongados.

Probablemente esto es lo que sucede en los animales intoxicados con Peroxisomicina A-1 en los que el TNF α está presente en tiempos iniciales, pero que posteriormente disminuye. Todo esto sugiere que el TNF α sea el iniciador de una cascada de eventos en los que intervienen otros

factores amplificadores de la lesión observada en el tejido pulmonar a tiempos mayores posteriores a la intoxicación.

Los hallazgos encontrados en este trabajo sugieren que la Peroxisomicina A-1 causa la activación de macrófagos peritoneales y alveolares, ya que se conoce que este tipo celular produce la mayor cantidad de $\text{TNF}\alpha$ posterior al efecto de un estímulo⁴⁷.

Nuestros resultados permiten suponer la participación del $\text{TNF}\alpha$ en el desarrollo de la lesión pulmonar en ratones intoxicados con dosis tóxicas de Peroxisomicina A-1. Es posible que este mecanismo intervenga en el caso de la intoxicación en humanos.

Existen reportes de pacientes intoxicados con el fruto completo de plantas del género *Karwinskia*, que cursan con neutrofilia, la cual fue asociada a complicaciones bronconeumónicas⁷, sobre este dato nuestros resultados sugieren la participación de factores estimuladores de neutrófilos como el $\text{TNF}\alpha$.

Por otro lado los resultados que se obtuvieron a partir del estudio *in vitro* incubando los explantes de pulmón en presencia de Peroxisomicina A-1 indican la participación de mediadores químicos del daño pulmonar presentes en el animal completo, que al no estar presentes en el sistema *in vitro* evitan la lesión causada por Peroxisomicina A-1.

En un estudio en el que se incubaron PMN en presencia de Peroxisomicina A-1⁷⁸, se encontró que los PMN presentaban signos morfológicos de activación, representados por una gran cantidad de vesículas vacías y la presencia de pseudópodos en la membrana celular, por lo que no se puede descartar el probable estímulo directo de la Peroxisomicina A-1 sobre los PMN.

En la lesión pulmonar causada por Peroxisomicina A-1 disuelta en haemaccel, se encontró la presencia de un tipo celular diferente, que se identificó morfológicamente como correspondiente a las células NK⁷⁹. No podemos descartar la posibilidad de que también estén involucradas en el desarrollo de la lesión pulmonar, ya que se conoce que este tipo celular se estimula por la presencia de citocinas como TNF α , por lo que es necesario evaluar su participación.

La figura 23 resume datos e información recabada en este trabajo en forma de un mecanismo propuesto de daño pulmonar el cual permite proponer la participación del TNF α en el desarrollo de la lesión pulmonar, así como su relación con el infiltrado celular de PMN, linfocitos, macrófagos alveolares y células NK. Es importante señalar que la lesión pulmonar coincide con la descrita para el SIRA en su fase aguda³³.

Con lo anterior no se descarta la participación de otros factores amplificadores de la lesión, por lo que el TNF α se considera el iniciador de una cascada de eventos químicos y celulares que intervienen para llevar a cabo el daño pulmonar.

Este modelo animal reproduce la lesión pulmonar característica de este tipo de intoxicación, por lo que es útil para continuar el estudio de diferentes mediadores del daño pulmonar, así como también para la identificación precisa de las células participantes tales como las células NK.

CAPITULO CINCO

CONCLUSIONES, PERSPECTIVAS Y CONTRIBUCIONES

5.1 CONCLUSIONES

1.-Se acepta la hipótesis de trabajo propuesta:

" El efecto de la Peroxisomicina A-1 sobre pulmón se debe a una estimulación de los granulocitos neutrófilos, llevada a cabo por mediadores como el factor de necrosis tumoral α "

2.-El infiltrado celular de la lesión pulmonar inducida por Peroxisomicina A-1 está formado por PMN, linfocitos y macrófagos

3.-La Peroxisomicina A-1 induce una elevación rápida del nivel de TNF α en sangre y en pulmón, que varía con los distintos vehículos utilizados y que es más intensa y de rápida aparición con la utilización de vehículos acuosos (haemacel y solución salina).

4.-Existe una correlación entre la cantidad de PMN y la concentración de $TNF\alpha$ en los tiempos iniciales de la intoxicación con Peroxisomicina A-1.

5.- La lesión pulmonar inducida por Peroxisomicina A-1 es progresiva a pesar de que los niveles de $TNF\alpha$ disminuyen en el tiempo; lo cual sugiere la participación de otros factores activadores de los PMN.

6.-Tanto las alteraciones histológicas (acúmulo de PMN) y ultraestructurales (daño a la barrera alvéolo capilar) observadas en el pulmón de ratón intoxicado con Peroxisomicina A-1, como los niveles aumentados de $TNF\alpha$ en sangre y pulmón, coinciden con lo reportado para la fase aguda del SIRA.

7.- Las alteraciones observadas en el animal completo no se reproducen en los explantes de pulmón incubados con Peroxisomicina A-1 *in vitro*, lo que comprueba la participación de factores que no están presentes en el cultivo de órgano.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

5.2 PERSPECTIVAS

1.- Estudiar la participación de otras citocinas involucradas en la lesión pulmonar causada por Peroxisomicina A-1.

2.-Estudiar si existe estimulación de macrófagos alveolares y peritoneales cuando la administración de la Peroxisomicina A-1 es intraperitoneal.

3.-Analizar cual es el significado del aumento de linfocitos observado en la intoxicación de Peroxisomicina A-1 en dilución con Haemacel.

4.-Confirmar por medio de marcadores inmunocitoquímicos la identidad de las posibles células NK, presentes en la lesión pulmonar cuando se administra la Peroxisomicina A-1 disuelta en Haemacel.

5.-Buscar la relación existente entre el aumento de linfocitos y el posible efecto antineoplásico de la Peroxisomicina A-1

5.3 CONTRIBUCIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten proponer un mecanismo de daño pulmonar causado por la intoxicación experimental con Peroxisomicina A-1; por lo que este trabajo marca el inicio de una línea de investigación que nos permita continuar con el esclarecimiento de los mediadores químicos y celulares involucrados en el desarrollo de la lesión pulmonar. El modelo animal utilizado en este trabajo (ratón cepa CD-1) es de fácil obtención y manejo en el laboratorio, por lo que es un modelo útil para continuar con otros estudios.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.-Fernández, Nava R. (1992) Nombres comunes, usos y distribución Geográfica del género *Karwinskia* (Rhamnaceae) en México. Anales. institut. Biol. Univ. Nac. Auton. México, Se. Bot. 63 (1), 1-23.
- 2.-Castillo Najera, F., (1920) Contribución al estudio de la parálisis tóxica. Un envenenamiento colectivo con tullidora. Memoria del V Congreso Médico Mexicano, Dirección de Talleres Gráficos, 1, 240.
- 3.-Del Pozo, EC. (1965) Los efectos paralizantes de la tullidora. Estudios clínicos y experimentales Gac. Med Méx; 179-182
- 4.-Padrón Puyou F. (1951) Estudio clínico experimental por *Karwinskia humboldtiana* (Tullidora) en niños. Gac. Méd. Méx. 81, 299-311.
- 5.-Escobar, A., Nieto D., (1965) Aspectos neuropatológicos de la intoxicación con *Karwinskia humboldtiana*. Estudio experimental. Gac. Med Méx; 95: 163-178.
- 6.-Charlton, K., Pierce, K., (1970) A Neuropathy in goats caused by experimental coyotillo (*Karwinskia humboldtiana*) poisoning. Path. Vet. 7: 420-434.
- 7.-Segovia, A. y Zermeño, F. (1972) Poliradiculitis tóxica por *Karwinskia humboldtiana*. A propósito de un caso. Med. Hosp. Infant. Mex. 29, 87.
- 8.-Montoya, M., López, G. and Hernández, A. (1982) Intoxicación por *Karwinskia humboldtiana*. Conceptos actuales. Rev. med. Inst. Mexicano Seguro Social 6. 707.
- 9.-Bustamante Sarabia, J., Olvera Rabiela, JE., Nieto-Cañedo, LC. (1978) Intoxicación fatal por tullidora (*Karwinskia humboldtiana*) Comunicación de un caso. Gac. Med Méx; 114:241242.
- 10.-Puértolas- Márquez, MA., Nava -Jiménez, O., Medina-López, HA., López-Orozco, FX., Oyervides-Pinales, JF., (1984) Poliradiculoneuritis por *Karwinskia humboldtiana*. Informe de seis casos. Rev. Med. IMSS; 22:25-27.

- 11 Arellano- Cervantes E., Mendoza Cruz, JF., Domínguez-Chávez, FJ., (1994) Intoxicación por *Karwinskia johnstonii* estudio de 12 pacientes. Bol Med Hosp Inf Mex; 51:105-112.
- 12.-Bermúdez de Rocha, MV., Lozano Meléndez, F., Salazar Leal, ME., Waksman de Torres, N., Piñeyro López A. (1993) Intoxicación de una familia por *Karwinskia humboldtiana* (Tullidora) Gac. Méd Méx; 131:100-106
- 13.-Carrada-Bravo, T., López-Leal, H., Vázquez-Arias, G., Ley-López, A.,(1983) Brote epidémico de polirradiculoneuritis por tullidora *Karwinskia humboldtiana*. Bol. Med. Hosp. Infant. Méx., Vol. 40, 139-147.
- 14.- Dreyer, D., Arai, I., Bashuman, C., Anderson, W., Smith R. Daves, D. (1975) "Toxins causing non inflammatory paralytic neuropathy. Isolation and structure elucidation. J. Am. Chem. Soc., 97, 4985-4990.
- 15.-Guerrero, M., Piñeyro, A. and Waksman, N. (1987) Extraction and quantification of toxins from *Karwinskia humboldtiana* (tullidora). Toxicon, 25, 565-568.
- 16.-Rivas, V., Torres, R., Waksman, N., (1990) Dimeric anthracenones from *Karwinskia* species. Planta Méd; 56:562-563.
- 17.-Waksman, N., Martínez, L. (1989) Chemical and Toxicological screening in genus *Karwinskia* (México). Rev. Latinoamer. Quím. 23/1 y 22/4, 25-27.
- 18.-Bermúdez-Barba, MV., (1989) Toxicidad aguda de la *Karwinskia humboldtiana* en diferentes especies de animales Tesis doctoral, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey N.L.,
- 19.-Garza, L., Hsieh, G., Acosta, D., Torres, O., Piñeyro, A. (1992) Toxicity assessment of toxins T514 and T-544 of Buckthorn (*K. humboldtiana*) in primary skin and liver cell cultures, Toxicology 73, 259-267.
- 20.-Garza, L., Jiang, T., Acosta, D., Torres, O., Waksman, N., Piñeyro, A. (1994) Comparison of the hepatotoxicity of toxin T-514 of *Karwinskia humboldtiana* and its diastereoisomer in primary liver cell cultures, Toxicon, 32:10: 1287- 1291.
- 21.-Piñeyro A. (1990) Toxicidad selectiva in vitro de la toxina T514 de la *Karwinskia humboldtiana*. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. UANL. Monterrey, N.L. México.
- 22.-Loomis, T. (1978) Numbers in toxicology. In: T.Loomis, (De), Essentials of toxicology, Lea and Febiger, Philadelphia, 2, 13-28.

- 23.-Piñeyro, A., Martínez de Villarreal, L. and González, R. (1994) In vitro selective toxicity of toxin T-514 from *K. humboldtiana* (Buckthorn) plant on various human tumor cell lines. *Toxicology*. 92, 227-227.
- 24.-Piñeyro, A. (1995) Europaishen Patentblatt 95/48 (29.11.95) Patentnummer: 0467407
- 25.-Piñeyro, A. (1996) Bioscience patent "Pharmaceutically acceptable anthracene compounds" number:5578646.
- 26.-Piñeyro, A. Patente Japonesa número 2651758.
- 27.-Sepúlveda, J., Van der klei, I., Keizer, I., Piñeyro A., Harder W. and Veenhuis, M. (1992) Studies on the effect of toxin T-514 on the integrity of peroxisomes in methylotrophic yeasts. *FEMS Microbiology Letter* 91, 207-212.
- 28.-Bermúdez, M. V., Gonzalez-Spencer, D., Guerrero, M., Waksman, N., Piñeyro, A. (1986) Experimental intoxication with fruit and purified toxins of buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*). *Toxicon* 24, 1091-1097
- 29.- Bermúdez, M. V., Martínez FJ., Salazar ME., Waksman N., Piñeyro A. (1992) Experimental acute intoxication with ripe fruit of *Karwinskia humboldtiana* (tullidora) in rat, guinea pig, hamster and dog *Toxicon* 30, 1493-1496.
- 30.-Sepúlveda-Saavedra, J., González-Corona, B., Tamez Rodríguez, V., Bermúdez de Rocha, M., Piñeyro-López, A., (1992) Ultraestructure of the lesion induced by toxin T-514 insolated from *K. humboldtiana* in the alveolar region of the lung. *Proc. E.M.S.A. 50th Ann. Mee. Sn. Fco. Press.*
- 31.-Asbaugh, D., Bigelow, D., Petty, T. (1967) Acute respiratory distress adults. *Lancet*, 2, 319-323.
- 32.-Putterman, C. (1988) Adult Respiratory Distress Syndrome:Current Concepts. *Resuscitation*, 16: 91-105.
- 33.-Fein, A., Wiener-Kronish, J., Niederman, M., Matthay, M. (1986) Pathophysiology of the Adult Respiratory Distress Syndrome. *Acute Lung Injury* 3, 429-453.
- 34.-Wittles, E., Coalson, J., Welch, M. (1974) Pulmonary intravascular leukocyte sequestration. A potential mechanism of lung injury. *Am. Rev. Respir. Dis.* 109:502-509.

- 35.-Lien, D.C., Wagner, W.W.Jr, Capen, R.L, et al (1987) Physiological neutrophil sequestration in the lung: visual evidence for localization in capillaries. *J. Appl. Physiol.* 62:1236-1243.
- 36.-Staub, B.C., Schultz, E.L., Albertine, K.H., (1982) Leucocytes and pulmonary microvascular injury. *Ann. N Y Acad. Sci.* 384:332-343.
- 37.-Doerschuk, C.M., Allard, M.F., Martin, B.A., MacKenzie, A., Autor, A.P., Hogg, J.C.,(1987) The marginated pool of neutrophils in the lungs of rabbits. *J. Appl. Physiol.* 63:1806-1815.
- 38.-Hogg, J.C., McLean, T., Martin, B.A., Wiggs, B., (1988) Erythrocyte transit and neutrophil concentration in the dog lung. *J. Appl. Physiol.* 65:1217-1225.
- 39.-Harada, R., Bowman, C., Fox, F. (1982) Alveolar macrophage secretions Initiators of inflammation in pulmonary oxygen toxicity. *Chest* 52-54.
- 40.-Bowman, C., Vatter, A., Buttler, E. (1983) hyperoxia injures endothelial cells in cultures and causes increased neutrophil adherence. *Am. Rev. Respir. Dis.* 128:469-472.
- 41.-Lobb, R., (1992) Integrin-immunoglobulin superfamily interaction in endothelial-leukocyte adhesion in: Harlan, J. Liu, D., eds. *Adhesion: Its role in inflammatory disease*. New York: W.h. Freeman, 1-18.
- 42.-Zimmerman, G., Attilio, D., Renzety, D., Hill, H. (1983) Functional and Metabolic Activity of Granulocytes from patients with Adult Respiratory Distress Syndrome. *Am. Rev. Respir. Dis.* 127:290-300.
-
- 43.-Boxer, L., Axtell, R., Suchard, S. (1990) The Role of the neutrophil in Inflammatory Diseases of the lung. *Blood Cells* 16:25-42.
- 44.-Brigham, K., Ogletree, M. (1981) Effects of prostaglandins and related compounds on lung vascular permeability. *physiopathol Respir.*, 17: 703-722.
- 45.- Brigham, K. (1985) Metabolites of arachidonic acid in experimental lung vascular injury. *Fed. Proc.*, 44:43-45.
- 46.-Flick, M. (1986) Mechanisms of Acute Lung Injury. *Critical Care Clinics* Vol.2 Num. 3:455-470.
- 47.-Sandborg, R., Smolen, J. (1988) Early Biochemical events en leukocyte Activation. *Laboratory Investigation* Vol. 59, No.3:300-320.

- 48.-Chollet-Martin, S., Montravers, P., Gilbert, C., Elbim, C., Desmots, J. (1994) Relationships between Polymorphonuclear Neutrophils and Cytokines in Patients with Adult Respiratory Distress Syndrome. *Annals New York Academy of Sciences*. Vol. 725:354-366
- 49.-Tracey, K., Cerami, A. (1993) Tumor Necrosis Factor, other Cytokines and Disease. *Ammu. Rev. Cell Biol.* 9:317-343.
- 50.-Pass, H., Mew, D., Temeck, B. (1995) The Macrophage, TNF, and other Cytokines. *Chest Surgery Clinics of North America*. 5:73-90.
- 51.-Mackay, F., Loetscher, H., Stueber, D., Gehr, G., Lesslauer, W. (1993) Tumor Necrosis Factor α (TNF α)- induced Cell Adhesion to Human Endothelial Cells is Under Dominant Control of One TNF Receptor Type, TNF-R55. *J. Exp. Med.* 177:1277-1286.
- 52.-Krunkosky, T., Fischer, B., Akley, N., Adler, K. (1996) Tumor Necrosis Factor alpha (TNF α)- induced ICAM-1 Surface Expression in Airway Epithelial Cells *in vitro*: Possible Sinal Transduction Mechanisms. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 796:30-
- 53.-Parsons, P., Worthen, G., Moore, E. (1989) The association of circulating endotoxin with the development of the adult respiratory distress syndrome. *Am. Rev. Respir. Dis.* 140:294-301
- 54.-Rush, B., Sori, A., Murphy, T. (1988) Endotoxemia and bacteremia during hemorrhagic shock. *Ann. Surg.* 207:549-554.
-
- 55.-Michie, H., Manogue, K., Springgs, D. (1988) Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. *N Engl. J. Med.* 318:1481-1486.
- 56.-Atkinson, Y., Marasco, W., López, A., Vadas, M. (1988) Recombinant human tumor necrosis factor α . Regulation of N-formymethionylleucylphenylalanine receptor affinity and fuction on human neutrophils. *J. Clin. Invest.*;81:759-765.
- 57.-Larick, J., Graham, D., Toy, K., Lin, L.Senyk, G., Fendly, B. (1987) Recombinant tumor necrosis factor causes activation of human granulocytes. *Blood* 69:640-644
- 58.-Tracey, K., Beutler, B., Lowry, S., (1986) Shock and tissue injury induced by human recombinant cachectin. *Science* 234:470-474.
- 59.-Tracey, K., Fong, Y., Hesse, D., Manogue, K., Lee, A. (1987) Anti cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteremia. *Nature* 330:662-664.

- 60.-Beutler, B., Milsark, I., Cerami, A., (1985) Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science* 229:869-871.
- 61.-Lesslauer, W., Tabuchi, H., Gentz, R., Brockhaus, M., Juergen, E., (1991) recombinant soluble tumor necrosis factor receptor proteins protect mice from lipopolysaccharide- induced lethality. *Eur. J. Immunol.* 21:2883-2886.
- 62.-Nicola, N. (1994) *Guidebook to Cytokines and their receptors.* A Sambrook and Tooze publication at Oxford University Press Oxford. 67-73
- 63.-Strieter, R., Chensue, S., Basha, M., Standiford, T., Lynch, J., Baggiolini, M., Kunkel, S.(1990) Human alveolar macrophage gene expression of interleukin-8 by tumor necrosis factor-alpha, lipopolysaccharide, and interleukin-1 beta. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 4:321-326.
- 64.-Brasier, A., Jamaluddin, M., Casola, A., Duan, W., Shen, Q., Garofalo, R. (1998) A promoter recruitment mechanism for tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-8 transcription in type II pulmonary epithelial cells. Dependence on nuclear abundance of Rel A, NF-kappa B1, and c-Rel transcription factors. *J. Biol. Chem* 6:3551-3561.
- 65.-Lakshminarayanan, V., Beno, D., Costa, R., Roebuck, K., (1997) Differential regulation of interleukin-8 and intercellular adhesion molecule-1 by H₂O₂ and tumor necrosis factor-alpha in endothelial and epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 52:32910-32918.
-
- 66.-Donnelly, S., Strieter, R., Kunkel, S., Walz, A., Robertson, C..(1993) Interleukin-8 and development of adult respiratory distress syndrome in at risk patient groups. *Lancet* 341:643-647.
- 67.-Matsubara, H., Fujishima, S., Sayama, K., Akasaka, Y., Yamasawa, F., Ishizaka, A. (1996) High concentrations of interleukin 8 in bronchoalveolar lavage fluid from a patient with adult respiratory distress syndrome. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 5:552-556.
- 68.-Peterson, G. (1977) Micrometodo de Lowry para determinación de proteínas. *Anal. Biochem.* 83:346-356.
- 69.-Ito & Karnovsky M. (1968) Formaldehyde-glutaraldehyde fixative containing trinitro compounds. *J. of Cell Biol.* 39:168
- 70.-Luft, J., (1961). Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9:409-414

- 71.-Watson, M. L., (1958) Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. II Applications of solutions containing lead and barium. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 4:475, 727-730
- 72.-Vewable, J.H., and Coggeshall, r., (1965) A Simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 25:407-408
- 73.-Sepúlveda J., Velázquez B., Quezada R., Nuñez A., and Vázquez D. (1986). In vitro organogenesis and differentiation of fetal lung rudiments grown in chamber slides. *In vitro* 22:27A
- 74.-Fisher, G., Placke, M. (1987) In vitro models of lung toxicity. *Toxicology.* 47:71-93.
- 75.-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 118-126.
- 76.-Johnson J., Brigham K., Jesmok G., Meyrick (1991) Morphologic changes in Lungs of Anesthetized sheep following intravenous infusion of recombinant tumor necrosis factor α . *Am. Rev. Respir. Dis.* 144: 179-186
- 77.-Leeper-Woodford S., Carey P., Byrne K., Jenkins J., Fisher B., Blocher Ch., (1991) Tumor necrosis Factor alpha and beta subtypes appear in circulation during onset of sepsis-induced lung injury *Am. Rev. Respir Dis* 143: 1076-1082.
-
- 78.-Ballesteros, R., Sepúlveda, J., Medina, C., Piñeyro, A. (1992) Estructura del efecto inducido por T-514 extraída de *Karwinskia parvifolia* en polimorfonucleares humanos. X Encuentro de Investigación Biomédica; Fac. de Medicina de la UANL.
- 79.-Grossi C., Cadoni A., Zicca A., Leprini A., Ferrarini M., (1982) Large granular Lymphocytes in human peripheral Blood: Ultraestructural and Cytochemical Characterization of the granules. *Blood*, Vol. 59, No.2 277-283

APENDICE A

TECNICA DE INCLUSION EN RESINA EPOXICA

1. Fragmentar el pulmón en porciones de 1mm³, fijar en una solución de Karnovsky-Ito a temperatura ambiente por 30 minutos.
2. Lavar tres veces de cinco minutos con buffer de cacodilatos 0.1 M pH 7.2-7.4
3. Post-fijar con tetraóxido de osmio al 2% por 30 minutos.
4. Lavar tres veces de cinco minutos con buffer de Cacodilatos 0.1M pH 7.2-7.4
5. Contrastar en bloque con Nitrato de uranilo al 1% por 30 minutos.
6. Lavar tres veces de cinco minutos con buffer de cacodilatos 0.1M pH 7.2-7.4
7. Desidratar las muestras durante cinco minutos cada uno, con acetona al 30%, 50%, 70%, 90%, y tres veces con acetona al 100%.
8. Impregnación del tejido en una mezcla 1:1 de Acetona-Epon (Resinas epóxicas) durante toda la noche.
9. Pre inclusión a temperatura ambiente durante 60 minutos, colocando las muestras en moldes para inclusión con epon al 100%
10. Inclusión y polimerización a 60°C durante 24-48h

FIJADOR KARNOVSKY-ITO

1. Se disuelven 16gr. de paraformaldehído en 400ml de agua desionizada.
2. Calentar cerca del punto de ebullición y agregar varias gotas de hidróxido de sodio para quitar la turbidez.
3. Agregar 32ml de glutaraldehído al 25%, 0.08gr de ácido pícrico y 400ml de buffer de cacodilatos 0.1M pH =7.2 - 7.4
4. Guardar en un frasco ámbar.

TINCIÓN DE CORTES SEMIFINOS CON AZUL DE TOLUIDINA

1. Obtener cortes (1 μm) de pulmón procesado con resinas epóxicas
2. Colocar los cortes en un portaobjetos
3. Mediante el uso de una placa de calor pegar los cortes al portaobjeto.
4. Colocar una gota de Azul de toluidina (5gr de Borato de sodio, 100ml de agua desionizada, y azul de toluidina 1gr.) sobre los cortes por 10 segundos.
5. Lavar el portaobjeto con agua destilada hasta quitar el exceso de colorante
6. Pasar gentilmente una gasa limpia sobre los cortes para secar el exceso de agua.

TECNICA DE CONTRASTACION DE CORTES FINOS

1. Obtener cortes finos (100nm)
2. Montar los cortes en rejillas de cobre
3. En una caja petri limpia colocar las rejillas con los cortes hacia abajo sobre gotas de acetato de uranilo (disolver 0.5g de acetato de uranilo en alcohol etílico al 50%)
4. Lavar las rejillas con agua ultrapura por un minuto y dejar secar
5. Colocar las rejillas con los cortes hacia abajo sobre gotas de citrato de plomo al 0.4% (0.04g de citrato de plomo en 10 ml de agua ultrapura) agregar tres gotas de hidróxido de sodio al 10% para ayudar a disolver)
6. Lavar con agua ultrapura por un minuto y dejar secar sobre papel filtro en una caja de petri cerrada.

TABLA IV
CULTIVO DE ORGANO: CARACTERISTICAS Y CONDICIONES EMPLEADAS
PARA EL PULMON DE RATON CEPA CD1

Ratones cepa CD1	Incubación a 37°C (6-8 explantes de pulmón de 1mm ³ con MEM y suplementos)	Concentración de PA1	Total de placas de cultivo ^b	Tiempos de Incubación ^c
5	Cuatro concentraciones de PA1 y controles sin PA1 de cada tiempo de cultivo	0.0µg/ml	4	1, 2, 4, 6, 8, 12 24h
		0.2µg/ml	4	
		2.0µg/ml	4	
		5.0µg/ml	4	
		25µg/ml	4	

^a Como ya se mencionó la Peroxisomicina A1 se disolvió primero en etanol absoluto y después en medio de cultivo.

^b Cada placa de cultivo tiene 8 espacios útiles para colocar explantes de cultivo de órgano

^c Las diferentes concentraciones de PA1 y controles correspondientes se cultivaron por triplicado para cada tiempo de incubación.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

METODO PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD DE LACTATO DESHIDROGENASA (LDH)

1. Centrifugar los medios de cultivo (14,000 rpm, 4°C 5-10 minutos) para obtener el sobrenadante.
2. Llevar a cabo la reacción enzimática directamente en la cubeta espectrofotométrica agregar 833µl de una solución de β-NADH (0.113mg/ml disuelto en el amortiguador de Tris-HCL, libre de inhibidores) mas 70 µl de sobrenadante del medio de cultivo, tapar la cubeta y agitar dos veces por inversión.
3. Anotar el valor de la absorbancia de "fondo" (background) a 340nm cada minuto hasta que la lectura se estabilice. Normalmente se determino la absorbancia durante 3 a 4 minutos.
4. Iniciar la reacción enzimática, agregar 167µl de piruvato de sodio (9.76 mM disuelto en amortiguador Tris-HCL) tapar la cubeta y agitar dos veces por inversión.
- 5.-Anotar la disminución en la absorbancia a 340nm cada minuto y monitorear hasta por 10 minutos, o hasta que ocurra un cambio lineal de la absorbancia de ≥ 0.2
6. 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.

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

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

10 min = Tiempo de ensayo

1.07ml = Volumen total de ensayo en la cubeta

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

CUANTIFICACION DE TNF α POR ELISA

1. En los pocillos de la placa de ELISA se colocaron 100 μ l de estándares de TNF α de 0 pg/ml, 35pg/ml, 140pg/ml, 560 pg/ml y 2240pg/ml por duplicado y 50 μ l de suero problema y controles. A todas las muestras de suero problema y controles se les agregó 50 μ l de buffer de lavado, se cubrió la placa con cinta adhesiva y se incubó a 37°C por 2 horas.

2. Transcurrido este tiempo se removió el líquido invirtiendo la placa y dando una fuerte sacudida. Cada uno de los pocillos se lavó cuatro veces con 200 μ l de buffer de lavado cada vez, la placa se colocó sobre papel secante para retirar el exceso de líquido.

3. Enseguida se agregó 100 μ l de conjugado HRP anti TNF α en cada pocillo, la placa se cubrió con cinta adhesiva y se incubó a 37°C por 1 hora.

4. Después de esta incubación, se removió el líquido y cada uno de los pocillo se lavó cuatro veces de la manera antes descrita, se secó el exceso de líquido.

5. Se agregó 100 μ l de solución de sustrato a cada pocillo, se incubó a temperatura ambiente en la oscuridad por 10 minutos.

6. Para detener la reacción se agregó 100 μ l de ácido sulfúrico 1M. El color azul de las placas cambió a un color amarillo, la intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de TNF α .

7. Se leyó la absorbancia a 450nm en un lector de placas de ELISA ajustando el 0 con el estándar de 0 pg/ml.

8. Al obtener las lecturas de los estándares se hizo una curva de concentración mediante un análisis de regresión lineal y se calculó la concentración de las muestras problemas. Se tomó en cuenta el factor de dilución 2 para la concentración final de los problemas.

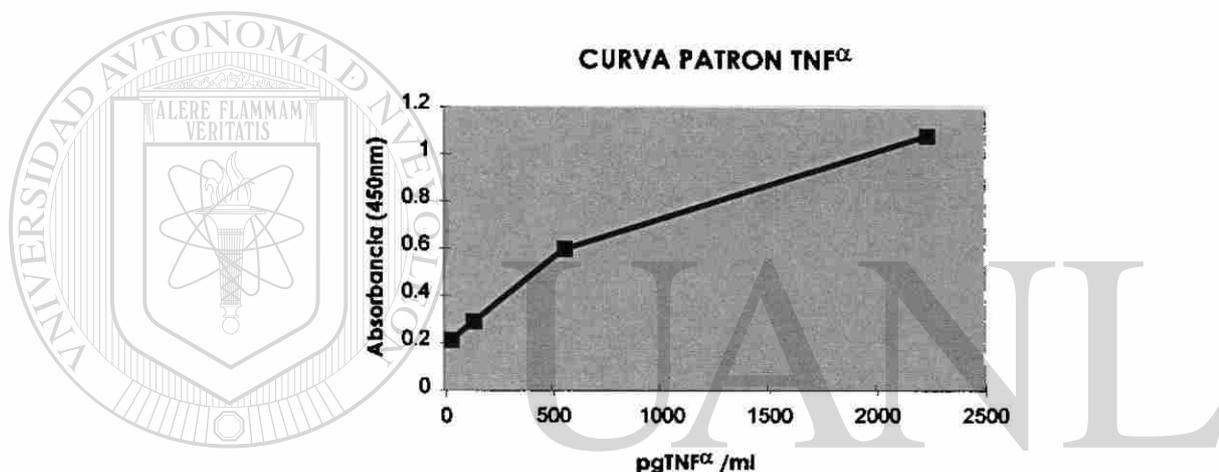


Figura 24. Curva patrón de TNF α cada punto representa los valores de los estándares utilizados y los puntos resultaron del análisis de cuatro determinaciones

METODO DE LOWRY PARA DETERMINAR LA CONCENTRACION DE PROTEINA

Se llevo a cabo una precipitación de proteínas con ácido tricloracético de la siguiente manera:

1. Se colocó 0.5ml de la muestra (sobrenadante del homogenizado) en dilución adecuada mas 1 ml de Ácido tricloracético (TCA) al 10%, se reposaron los tubos por 10 minutos, posteriormente se centrifugaron a 2000rpm por 20-30 minutos, se decantó el sobrenadante de todos los tubos y se procedió a secar la pared de cada tubo.

2. A las muestras precipitadas en forma de pastilla se agregó 0.399ml de una solución que contenía: 0.033ml de tartrato de Na y K al 0.6%,

0.033ml de CuSO_4 al 0.3%,

0.033ml de Na_2CO_3 al 30%,

0.1 ml de NaOH 0.8N y

0.2ml de agua desionizada.

El volumen final de cada tubo fue de 0.4ml.

3. Posteriormente se agregó 0.033ml de Folin Ciocalteau 2N y 0.167ml de agua desionizada.

4. Incubación a temperatura ambiente por 30 minutos.

5. Determinar la absorbancia a 750nm ajustando el cero con el blanco de reactivo.

6. Para los cálculos de concentración de proteína se utilizaron los valores de la curva patrón de BSA y se aplicó la fórmula correspondiente.

CURVA PATRON DE PROTEINAS LOWRY

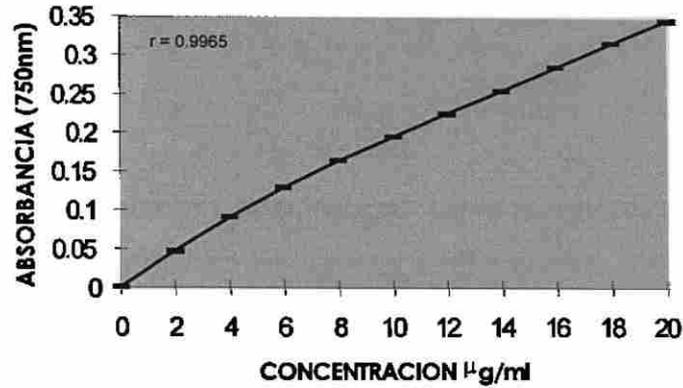
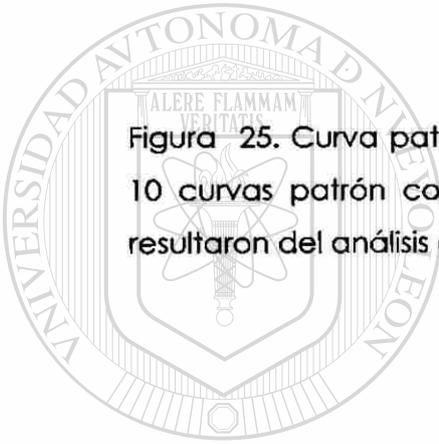


Figura 25. Curva patrón de proteína, cada punto representa el promedio de 10 curvas patrón con su desviación estándar y los puntos de cada curva resultaron del análisis de tres determinaciones.



UANL

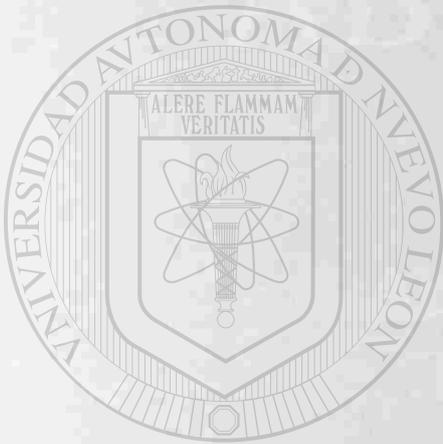
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

APENDICE B

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis doctoral se presentaron en dos congresos internacionales (se anexan copias de los resúmenes).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

The
FASEB
JOURNAL

ABSTRACTS
PART II

Abstracts 3618-6467
Tutorials T1-T18

Experimental Biology 98[®]
San Francisco, CA
April 18-22, 1998

An Annual Meeting of Professional Research Scientists

Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology
Volume 12, Number 5, March 20, 1998

4565

IMAGING OF LIPOPOLYSACCHARIDE (LPS) RELEASE AND OUTER MEMBRANE DISRUPTION IN *Pseudomonas aeruginosa* BY X-RAY MICROSCOPY.

M. J. Muzynski and J. M. Rahgozari. Arnold Palmer Hospital for Children and Women, Orlando, FL 32806.

LPS is an important factor in pathogenesis of inflammation characteristic for the chronic *P. aeruginosa* infection in Cystic Fibrosis (CF) patients. *P. aeruginosa* is believed to survive in the CF lung as microcolonies covered by biofilms; in addition, the *P. aeruginosa* strains isolated from CF patients are also highly mucoid. These factors suggest that *P. aeruginosa* surface is masked and should not be inducing such inflammation. We used a bench-top source of laser (insect plasma) to generate X-rays to image live cells (in 0.9% phosphate buffered saline). A 5µl cell suspension was placed on a photomask, covered with a (100nm) SiN window, sealed and then positioned in vacuum close to the X-ray source. The resist was then scanned by atomic force microscope to generate an image of differential X-ray absorption. By this technique we have captured images (exposure <10 nanosec) of live cells of *Pseudomonas aeruginosa*. LPS release and membrane disruption was induced by adding gentamicin at 25µg/ml for 15 minutes. X-ray micrographs of gentamicin treated cells show formation of distinct beaded-like structures on cell surface, cell envelope dissociation and presence of granular content (0-7µm scale) between cell and envelope. We propose that use of some antibiotics, may lead to continuous release of LPS from partially damaged bacteria to result in sustained *in vivo* induction of inflammatory mediators from neutrophils and macrophages leading to severe lung damage. This work was supported by a grant from Mr. John Brittingham to Orlando Regional Healthcare Foundation.

4566

UPREGULATION OF MURINE ICAM-1 IS INDEPENDENT OF TNF-α AND IL-1β IN A549 CELLS EXPOSED TO LIPOPOLYSACCHARIDE (LPS)

Cathy Fakler, Bei Wu, Harilyn McMicken, Stephen Welty, Baylor Coll. of Med.

ICAM-1 is increased in mouse lungs exposed to hyperoxia or LPS. The goals of this study were to determine the mechanisms of ICAM-1 regulation in lung cells (A549) exposed to LPS. ICAM-1 mRNA is induced at 1.2 and 4h of exposure. To determine whether TNF-α or IL-1β mediates ICAM-1 induction the cytokines were measured after LPS exposure. TNF-α and IL-1β levels were not detectable. To determine whether levels below the limits of detection could induce ICAM-1, cells were incubated with ab to the cytokines. There was no inhibition ICAM-1 induction. To determine DNA sequences of the murine ICAM-1 gene involved in the regulation of ICAM-1, we sequenced the 3' flanking region of murine ICAM-1 from -2434 to the start site, and made serial deletion constructs. We reported that LPS induced reporter gene expressions in A549 cells transfected with sequences -353 and -309, but not with -280, suggesting that the DNA between -309 and -280 is important for induction. To determine the sequence in this region to which protein binds we conducted mobility shift assays in which we used as a probe the sequence from -305 to -281, which contains an AP-1 like site, and observed protein binding. Mutating the AP-1-like site TGACTCC to CAGTTCC abolished binding. However, the same mutation in -353 and -309 did not abolish induction. In conclusion, LPS induction of ICAM-1 is independent of TNF-α and IL-1β in A549 cells, and protein binding to an AP-1-like site in the ICAM-1 promoter does not appear to elicit ICAM-1 induction. Further studies to identify mechanisms for ICAM-1 expression are crucial to molecular interventions in sepsis. Supported by NIH RD27823.

4567

KETAMINE SUPERINDUCES HEME OXYGENASE-1 (HO-1) IN MURINE PERITONEAL MACROPHAGES AFTER EXPOSURE TO ENDOTOXIN (LPS)

Keith Hunter, Augustine MK Choi, Melville Wyche, (SPON: MCHOI), Departments of Anesthesiology, Howard University, Washington, DC 20060 and Pulmonary and Critical Care Medicine*, Johns Hopkins University, Baltimore, MD 21224

Ketamine is a sympathomimetic anesthetic agent that has been recognized for its protective role in endotoxic shock and in LPS-induced lung injury. Antioxidant enzymes have been shown to provide protection against the deleterious effects of LPS. Here we chose to examine whether one such antioxidant enzyme and stress response gene heme oxygenase-1 (HO-1) may play a role in the ketamine-induced protective effect against LPS. Murine peritoneal macrophages (RAW 264.7 cells) were exposed to LPS (1 µg/ml) in the presence or absence of ketamine and the steady state levels of HO-1 mRNA were determined by Northern blot analysis. LPS treatment induced HO-1 mRNA levels in RAW 264.7 cells in a time and dose dependent manner. When cells were pretreated with ketamine (10 µg/ml) for 1 h prior to exposure to LPS (1 µg/ml), we observed that ketamine caused a superinduction of HO-1 mRNA. Ketamine alone also induced HO-1 mRNA levels in RAW 264.7 cells. Our data suggest that the stress response gene HO-1 may play a role in ketamine-induced protection against LPS.

Supported by: Foundation for Anesthesia Education and Research

4568

CD14 and interleukin-8 are localized primarily to alveolar macrophages in a rabbit model of acute bacterial pneumonia

C.W. Frevert, O. Kankawa, K. Wynant, T.R. Martin, Seattle VAMC and the University of Washington, Seattle, WA 98108

Neutrophil (PMN) recruitment is an important component of early host defenses in bacterial pneumonia. Evidence suggests that membrane CD14 mediates the recognition of gram negative cell wall products by macrophages, resulting in the production of a variety of inflammatory mediators including the PMN chemotactic factor, IL-8. Even though *in vitro* data has shown that many cells are capable of making this chemokine, it is unknown which cells are responsible for IL-8 production *in vivo*. **Goals:** To study the tissue distribution of CD14 and IL-8 in the lungs of normal rabbits and rabbits treated with intratracheal (IT) *Escherichia coli*. **Methods:** Rabbits were treated with intratracheal *E. coli* (1×10^7 cfu) and then studied 4 hr later. CD14 and IL-8 were localized in tissue sections using immunohistochemistry with polyclonal anti-rabbit CD14 antibody (5 µg/ml) and an affinity purified polyclonal anti-rabbit IL-8 antibody (5 µg/ml). **Results:** Using the anti-CD14 antibody, we observed that CD14 staining localized primarily to AM in the lungs of normal and *E. coli* treated rabbits. When slides were stained using the anti-IL-8 antibody, IL-8 staining was seen only in the lungs of rabbits instilled with *E. coli* and this staining was localized primarily to AM in these lungs. Thus, within the sensitivity of immunohistochemistry, CD14 and interleukin-8 are localized primarily to alveolar macrophages in a rabbit model of *E. coli* pneumonia. Supported by NIH GM37696 and American Heart Association of Washington

4569

PEROXISOMICINE A-1 INDUCES TNFα SECRETION AND PMN INFILTRATION IN THE LUNG MICROVASCULAR BED OF THE ALBINO MICE (CD-1).

R. Ballesteros, S. Flores, A. Piñeyro and G. Saucedo. Dept. de Histología, Microbiología y Farmacología, Facultad de Medicina, U.A.N.L., Monterrey, Nuevo León, México, 64460.

Accidental ingestion of ripe fruits from genus *Karwinskia* plants causes faecoid parafas in intoxicated humans. After a literature review we found that death in intoxicated humans is caused by lung dysfunction such as respiratory failure, pneumonia, and cardio-respiratory arrest. In a previous study we reported that T514 or Peroxisomicine A-1, one of the toxic substances present in the fruit of *Karwinskia*, causes lung damage characterized by polymorphonuclear (PMN) infiltration and breakage of the alveolo-capillary membrane. This lesion is similar to the one described for the Adult Respiratory Distress Syndrome (ARDS). To further characterize the lung damage, we studied the cell pattern in the lung of intoxicated mice and the presence of tumor necrosis factor α (TNFα) both in circulating blood and in lung homogenates, since it is well established that TNFα is one of the main mediators involved in the production of ARDS. Mice were injected intraperitoneally with the following treatments: 1) peroxisomicine dissolved in carthamus oil, 2) peroxisomicine in salt solution, 3) peroxisomicine in haemacel, 4) lipopolysaccharide (LPS, positive control), 5) carthamus oil, 6) salt solution, 7) haemacel and 8) negative control without any treatment.

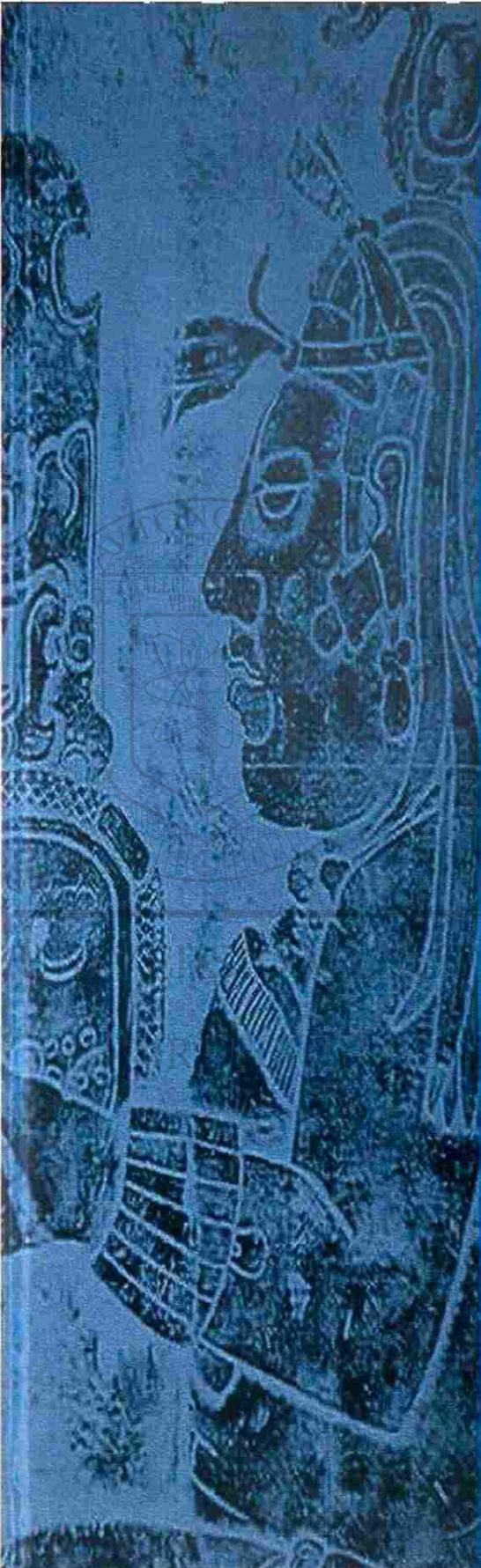
Each half hour after treatments lung and blood samples were collected, beginning at 0.5 h and up to 5 h. Part of the lung was embedded in epoxy resin for light and electron microscopy evaluation, and the remaining was homogenized for TNFα quantification by ELISA. TNFα was quantified in blood also. Peroxisomicine induced lung damage characterized by infiltration of PMN. Macrophages and lymphocytes were also present in increased amounts compared to negative controls. TNFα was present in the lung and serum of mice treated with peroxisomicine, although higher concentrations were found when peroxisomicine was diluted in aqueous solutions. LPS causes the most severe damage recorded and the highest induction of TNFα both in blood and lung homogenates. Carthamus oil induced a slight PMN infiltration in the lung and TNFα increase both in lung and serum.

4570

IL-8 RECRUITS NEUTROPHILS TO THE LUNGS IN RESPONSE TO AEROSOLIZED ENDOTOXIN

B.T. Peterson, E.J. Miller and P. McWaters, University of Texas Health Center, Tyler, TX 75710 and CSIRO Div. of Animal Health, Parkville, Victoria, Australia.

To determine the mechanism of neutrophil (PMN) movement through the lungs in response to aerosolized *E. coli* endotoxin (LPS), we anesthetized 6 sheep with halothane, ventilated them with 25 mg LPS or saline (n=2), collected lung lymph and plasma every 30 minutes, and performed 2 single-cycle lung lavages 3 hours later. The PMN concentration in the epithelial lining fluid (ELF) was significantly greater in the sheep that received LPS vs. the control sheep (542 ± 188 (se) vs. 3 ± 2 10^6 cells/ml ELF, $p < 0.01$). The IL-8 concentration also increased above control values (1818 ± 443 vs 15 ± 4 ng/ml ELF) and there was a strong correlation between the PMN and IL-8 concentrations among the 12 lavages ($r = 0.96$, $p < 0.001$). The lung lymph contained no PMNs and negligible IL-8 concentrations. However, in 4 additional sheep anesthetized with pentobarbital, the fraction of PMNs in the lung lymph increased to $44 \pm 8\%$ but the IL-8 concentration increased to only 53 ± 28 ng/ml lymph, a value considerably less than that in the ELF (2019 ± 542 ng/ml ELF) or the plasma (172 ± 41 ng/ml). Therefore, we conclude that IL-8 released into the air spaces in response to LPS recruits neutrophils into the lungs, but it does not explain the appearance of PMNs in the lung lymph. (Supported by NIH grant R29-HL55622)



ELECTRON MICROSCOPY 1998

Volume IV

Biological Sciences

EDITED BY

H A CALDERÓN BENAVIDES

M JOSÉ YACAMÁN

ÓNOMA DE NUEVO LEÓN
ERAL DE BIBLIOTECAS

Peroxisomicine A-1 induces TNF α secretion and pmn infiltration in lung microvascular bed of the albino mice (CD-1)

R.Ballesteros*, S.Flores**, A. Piñeyro***, J. Sepúlveda*

*Departamento de Histología Facultad de Medicina, U.A.N.L., Monterrey, Nuevo León, México, 64460.

**Departamento de Microbiología Facultad de Medicina, U.A.N.L., Monterrey, Nuevo León, México, 64460.

***Departamento de Farmacología Facultad de Medicina, U.A.N.L., Monterrey, Nuevo León, México, 64460.

Accidental ingestion of ripe fruits from genus *Karwinskia* plants causes flaccid paralysis in intoxicated humans. After a literature review we found that death in intoxicated humans is caused by lung disfunction such as respiratory failure, pneumonia, and cardio-respiratory arrest. In a previous study we reported that T514 or Peroxisomicine A-1, one of the toxic substances present in the fruit of *Karwinskia*, causes lung damage characterized by polymorphonuclear (PMN) infiltration and breakage of the alveolo-capillary membrane. This lesion is similar to the one described for the Adult Respiratory Distress Syndrome (ARDS) [2].

To further characterize the lung damage, we studied the cell pattern in the lung of intoxicated mice and the presence of tumor necrosis factor alfa (TNF α) both in circulating blood and in lung homogenates, since it is well established that TNF α is one of the main mediators involved in the production of ARDS. Mice were injected intraperitoneally with the following treatments: 1) peroxisomicine dissolved in carthamus oil, 2) peroxisomicine in salt solution, 3) peroxisomicine in haemacel, 4) lipopolysaccharide (LPS, positive control), 5) carthamus oil, 6) salt solution, 7) haemacel and 8) negative control without any treatment.

Each half hour after treatments lung and blood samples were collected, beginning at 0.5 h and up to 5 h. Part of the lung was embedded in epoxy resin for light Fig 1 and electron microscopy evaluation, and the remaining was homogenized for TNF α quantification by ELISA.

Peroxisomicine induced lung damage characterized by infiltration of PMN Fig 2. Macrophages and lymphocytes were also present in increased amounts compared to negative controls. TNF α was present in the lung and serum of mice treated with peroxisomicine, although higher concentrations were found when peroxisomicine was diluted in aqueous solutions. LPS causes the most severe damage recorded and the highest induction of TNF α both in blood and lung homogenate[3]. Carthamus oil induced a slight PMN infiltration in the lung and TNF α increase both in lung and serum.

References

- 1.-Bermúdez V. et al., Intoxicacion de una familia por *Karwinskia humboldtiana* (tullidora) Gac. Med. Mex. Vol.131 No.1 pp 100-106 1995.
- 2.- Sepúlveda-Saavedra J. et al., Ultrastructure of the lesion induced by toxin T-514 isolated from *K. humboldtiana* in the alveolar region of the lung. Proc. E.M.S.A. 50th Ann. Mee. Sn. Fco. Press, 1992.
- 3.-Denis M., A Mouse model of the lung injury induced by Microbial Products. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. Vol.10. pp. 658-664, 1994.

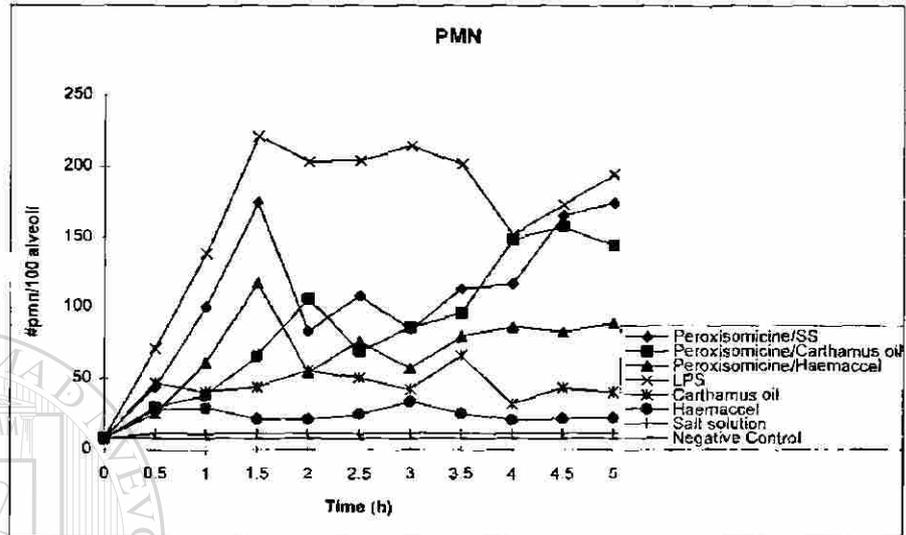


Fig. 1. PMN in mouse lung treated with peroxisomicine A-1 and controls.

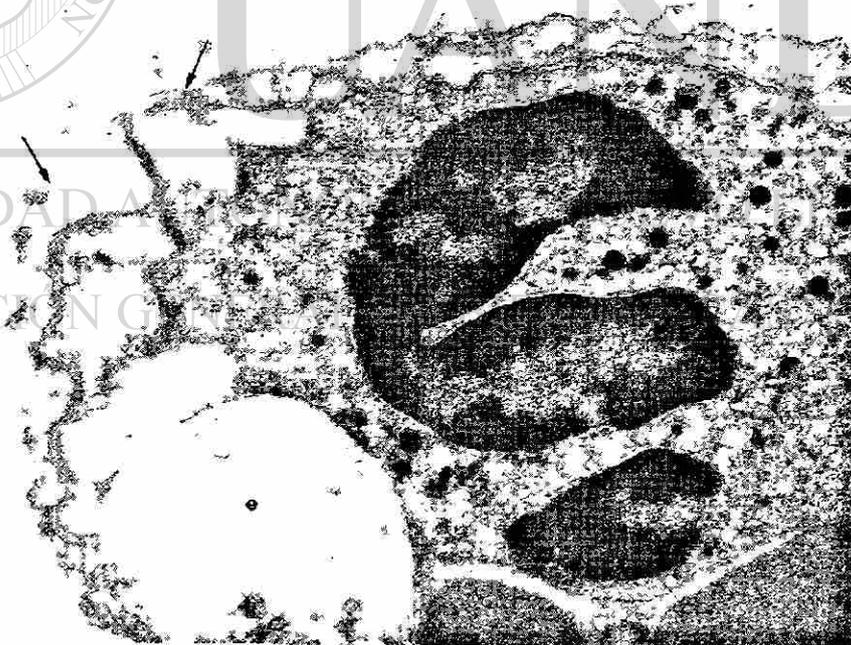


Fig. 2. PMN in alveolar capillary adherent to the endothelial cell (e). Edema and destruction of the alveolar-capillary barrier is present (arrow) 7000X.

RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

Raquel Guadalupe Ballesteros Elizondo

Candidato para el grado de

Doctor en Ciencias con especialidad en Morfología

Título de Tesis: FACTOR DE NECROSIS TUMORAL α Y GRANULOCITOS NEUTROFILOS EN LA PRODUCCION DEL SINDROME DE INSUFICIENCIA RESPIRATORIA DEL ADULTO CAUSADO POR PEROXISOMICINA A-1

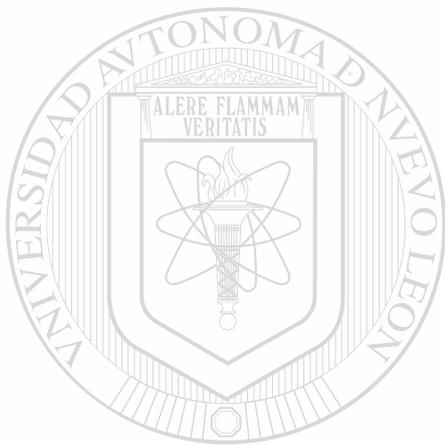
Área de Estudio: Morfología

Biografía:

Datos personales: Nacida en Monclova, Coahuila, el 29 de mayo de 1965, hija de Sr. Andrés Ballesteros de la Cruz y Sra. Romelia Elizondo Elizondo.

Escolaridad: Egresada de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, con el título profesional de Químico Clínico Biólogo en Noviembre de 1988.

Experiencia Profesional: Químico del Laboratorio de Análisis Clínico del Hospital San José de Monterrey de 1988-1992, Personal Profesional no Docente de tiempo completo del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León desde 1989, Maestro de teoría y práctica de la materia de Histología desde 1994, Coordinador del laboratorio de Análisis de Imágenes e Histoquímica desde 1996, 15 trabajos de investigación presentados en congresos nacionales e Internacionales, Estudiante distinguido del Doctorado en Ciencias con especialidad en Morfología en 1998, dos artículos publicados en revistas con arbitraje internacional, Miembro de la sociedad de Química, Miembro de la sociedad de Microscopía electrónica, Candidato a Investigador del Sistema Nacional de Investigadores desde 1998.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



