

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

QCB RAQUEL GUADALUPE BALLESTEROS ELIZONDO

TD
QK495
.R45
B366
2000
c.1

2000



1080111678

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

TD
QK49S
.R4S
B366
2000
C1

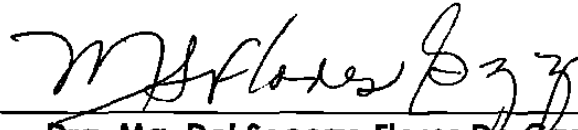


**FACTOR DE NECROSIS TUMORAL α Y GRANULOCITOS NEUTROFILOS
EN LA PRODUCCION DEL SINDROME DE INSUFICIENCIA RESPIRATORIA
DEL ADULTO CAUSADO POR PEROXISOMICINA A-1**

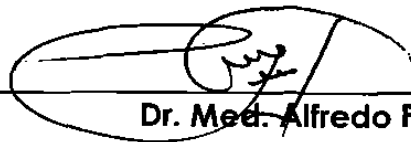
Aprobación de la tesis:



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



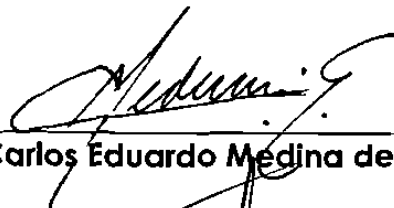
Dra. Ma. Del Socorro Flores De Castañeda
Co-Director de Tesis



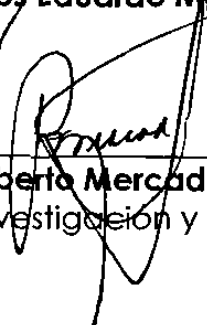
Dr. Med. Alfredo Piñeyro López



Dra. Herminia Martínez Rodríguez



Dr. Med. Carlos Eduardo Medina de la Garza



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

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

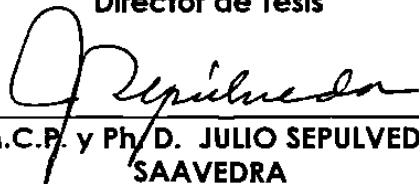
Presentado por:

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.

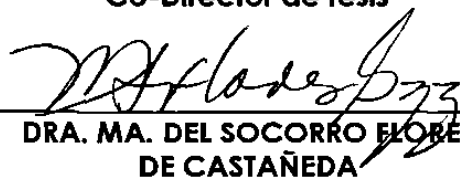
FIRMAS

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

con amor

Raquel G. Ballesteros Elizondo.

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 lía 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 |
|--|----|

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 1propano 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 | <i>Karwinskia</i> (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-1 | Peroxisomicina A-1 |
| 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 |

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 |

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

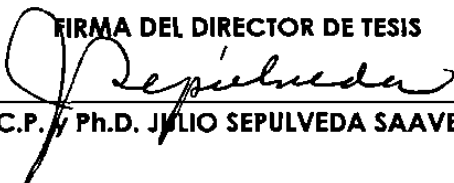
**Candidato para el grado de Doctor
en Ciencias con especialidad en
Morfología**

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