

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 polirradiculoneuritis, 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 antracenónicos, 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)

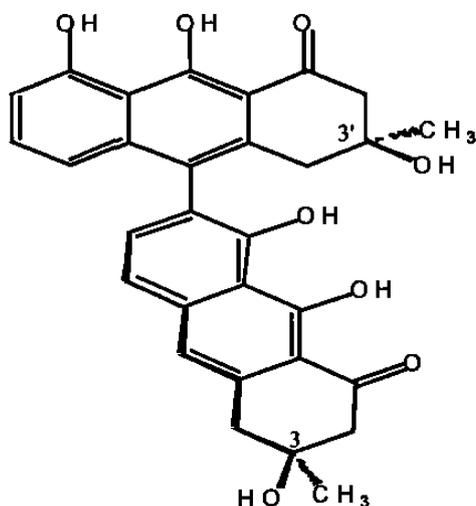


Figura 1. Estructura química de la Peroxisomicina A-1

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-Inmunoglobulina ^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 ($\text{TNF}\alpha$) 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 $\text{TNF}\alpha$ 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 $\text{TNF}\alpha$ 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 $\text{TNF}\alpha$ 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 $\text{TNF}\alpha$ 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*.

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 sulfanato) 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	0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5h
50	13.04mg/Kg de peso PA1/Ac. de cártamo	
50	13.04mg/Kg de peso PA1/Haemaccel	
50	Vehículo solución salina	
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 coleccionar 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.

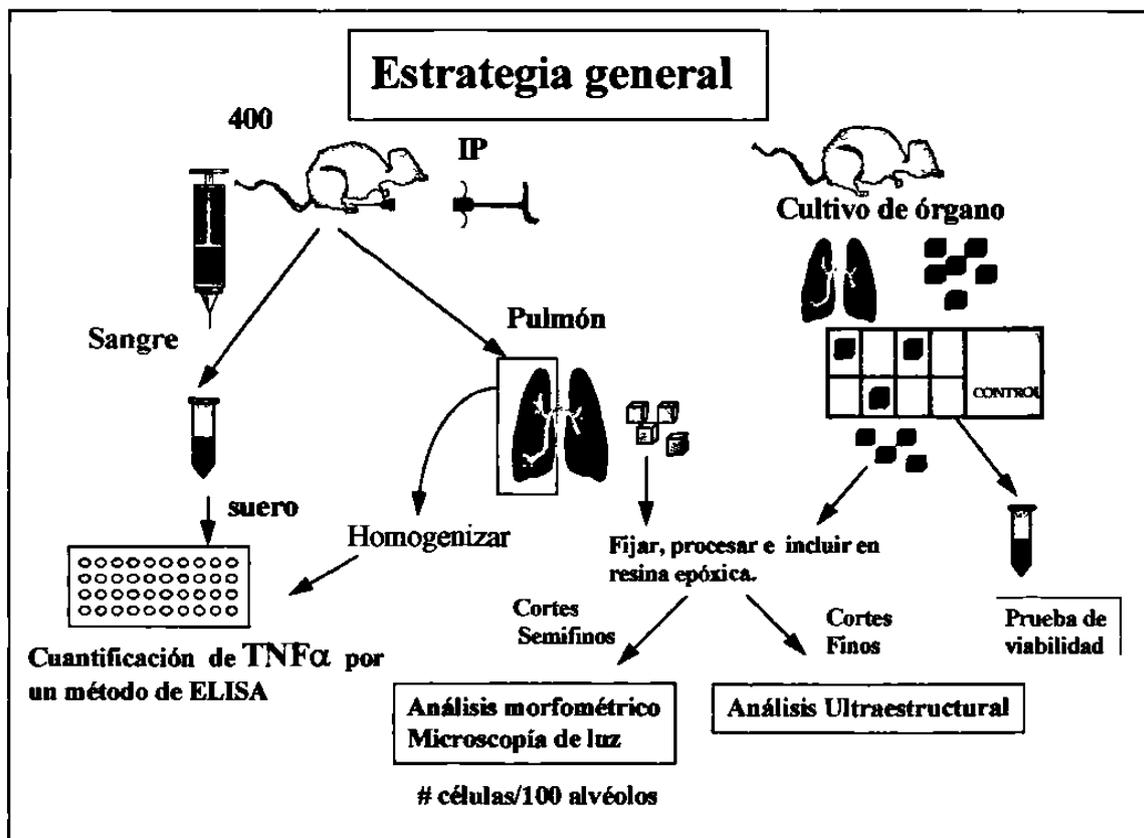


Figura 2. Resumen de la estrategia experimental

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.

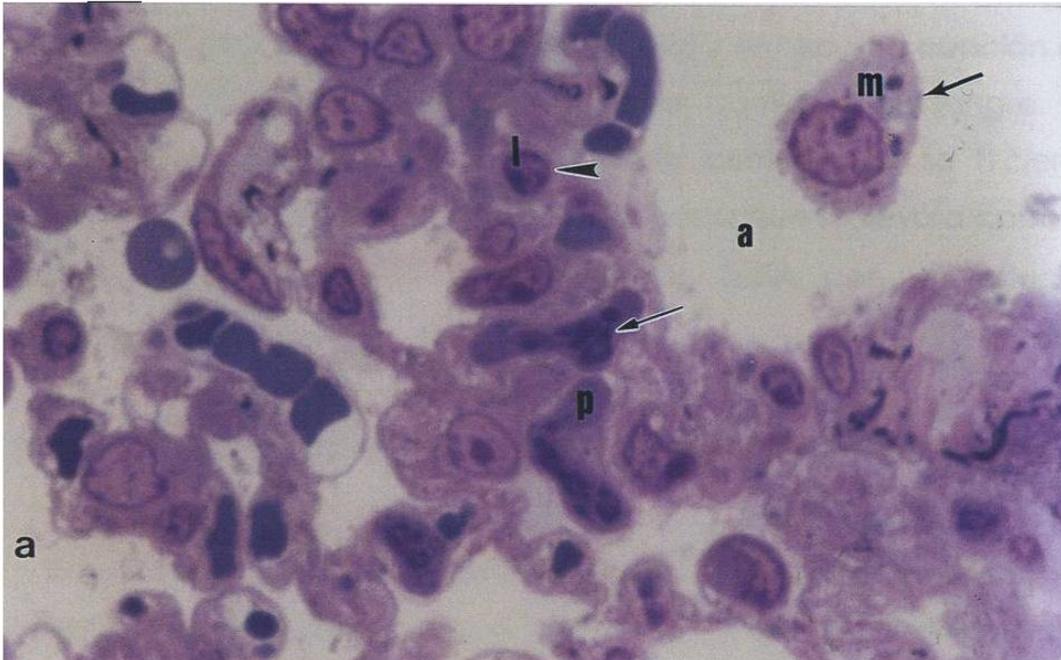


Figura 3. ANALISIS MORFOMETRICO: Pulmón de ratón que muestra los diferentes tipos de perfiles celulares que se contaron, **p** polimorfonucleares y **l** linfocitos dentro de capilares, y **m** macrófagos dentro de **a** espacios alveolares. Fotomicrografía de luz. Inclusión en resinas epóxicas, Azul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

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.

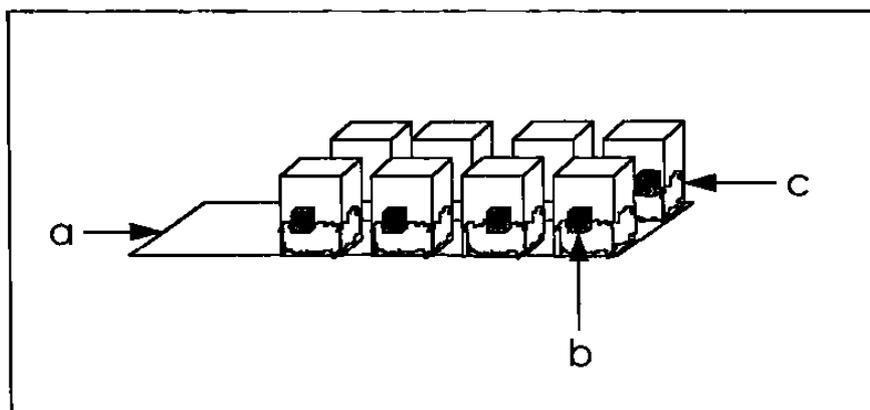


Figura 4. Cámara de cultivo de órgano (a), fragmentos de pulmón (b), soporte de colágena impregnado con medio de cultivo y Peroxisomicina A1 (c).

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-estreptomicina-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

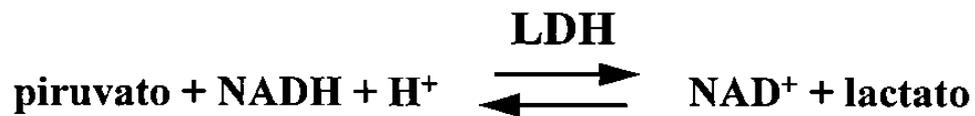
Actividad de LDH en el medio de cultivo

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



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)

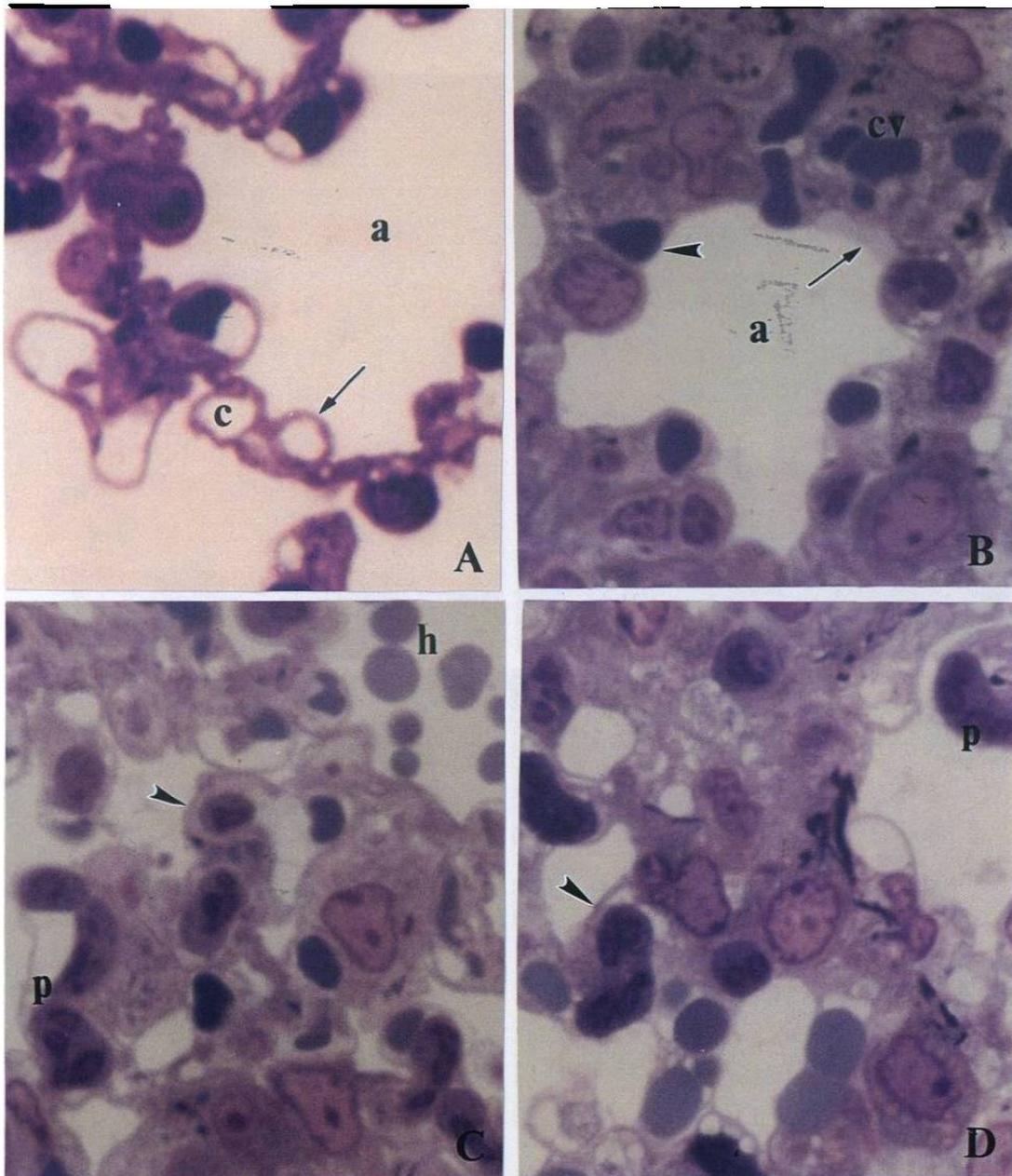


Figura 5. Pulmón de ratón A) tratamiento con 0.2ml de solución salina (control). Obsérvese los espacios alveolares bien distendidos **a**, paredes alveolares delgadas (flecha) y capilares vacíos **c**. B-D Tratamiento con 13.04mg/Kg de peso de Peroxisomicina A-1 en suspensión con solución salina. B) 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.

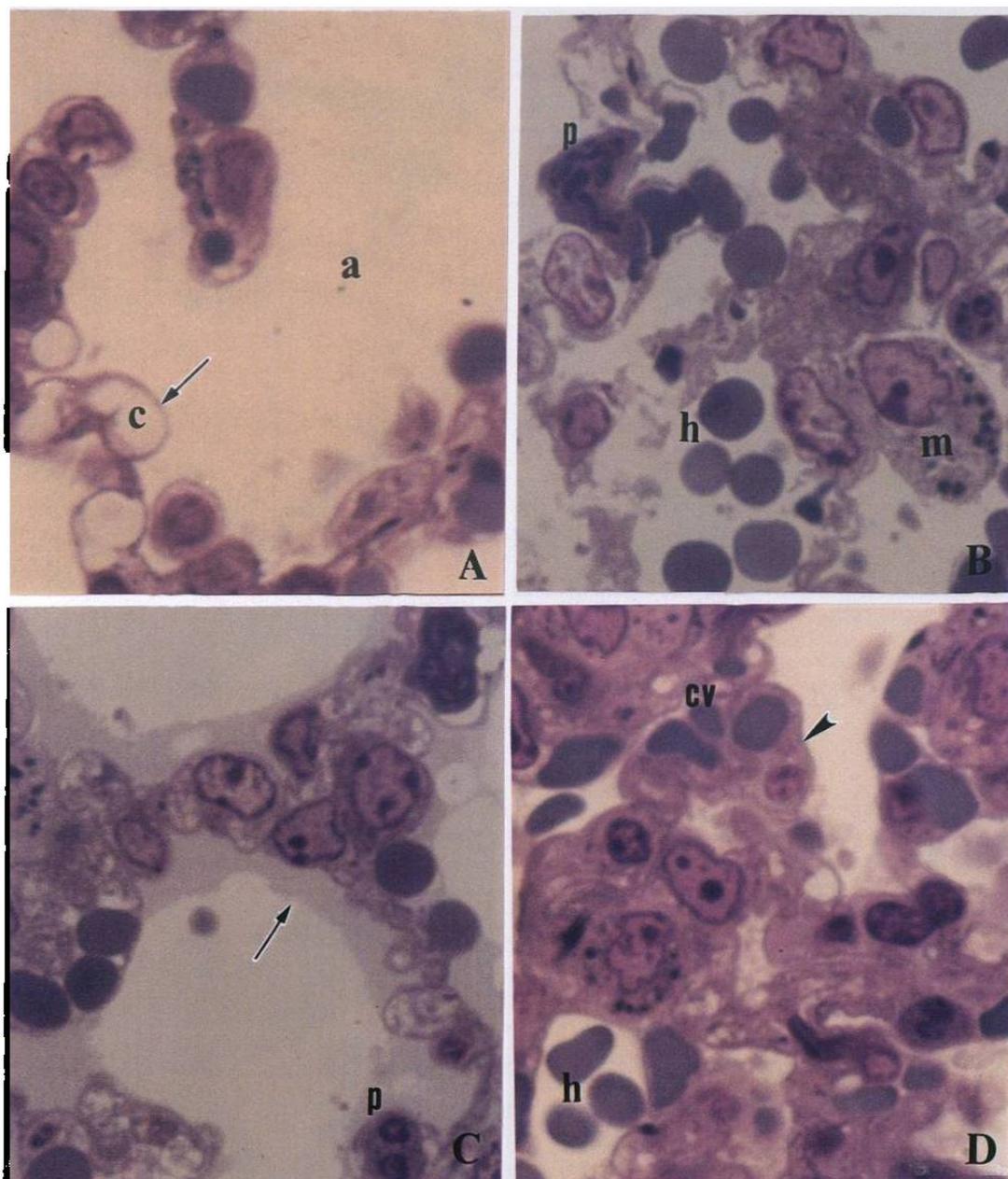


Figura 6. Pulmón de ratón A) tratamiento con 0.2ml de aceite de cártamo (control). Muestra las paredes alveolares delgadas y capilares vacíos (flecha). B-D Tratamiento con 13.04mg/Kg de peso de peroxisomicina A-1 en dilución con aceite de cártamo. B) 2h post-tratamiento obsérvese hemorragia alveolar 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.

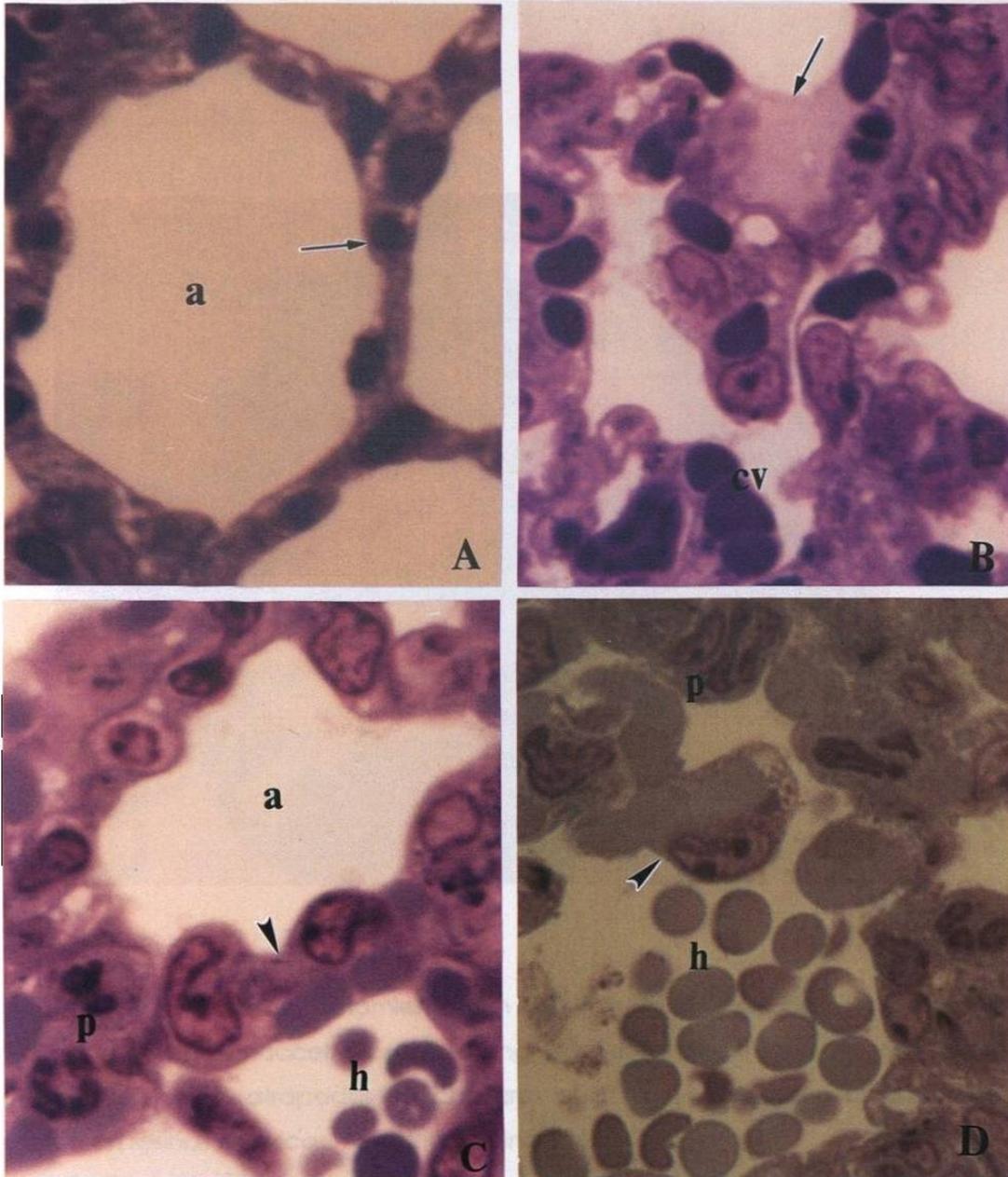


Figura 7. Pulmón de ratón A) tratamiento con 0.2ml de Haemaccel (control). Muestra espacios alveolares bien distendidos y tabiques interalveolares delgados. B-D Tratamiento con 13.04mg/Kg de peso de Peroxisomicina A-1 en dilución con Haemaccel. B) 1h post-tratamiento muestra congestión vascular cv y 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.

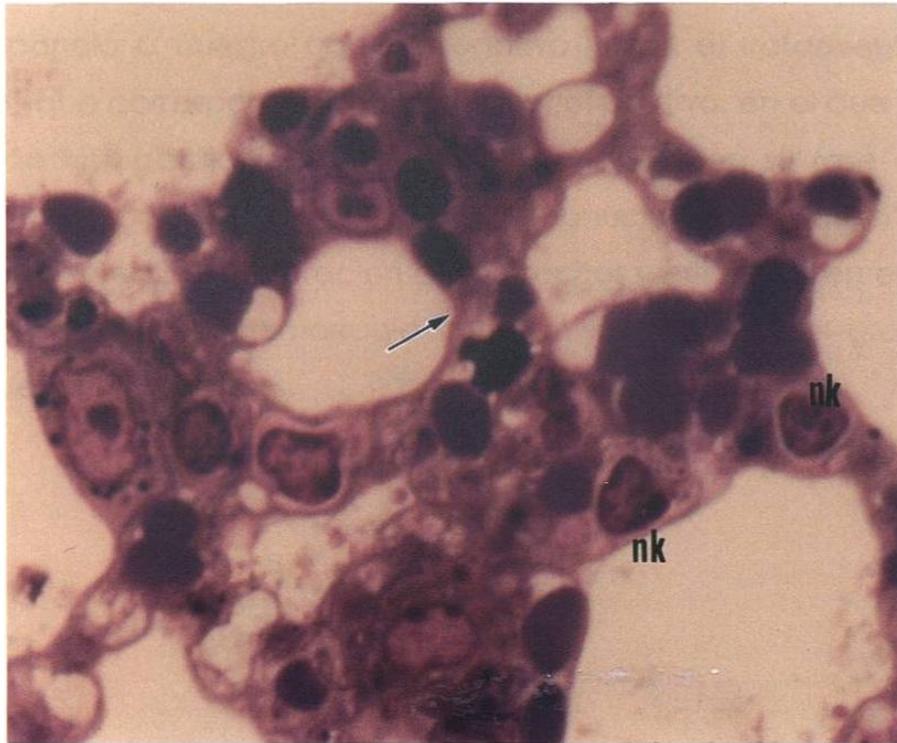


Figura 8. Pulmón de ratón. Tratamiento con 13.04mg/Kg de peso de Peroxisomicina A-1 en dilución con Haemaccel. Obsérvase engrosamiento de los tabiques interalveolares (flecha), Células NK atrapadas en capilares alveolares **NK**. Fotomicrografía de luz. Inclusión en resinas epóxicas, Azul de toluidina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

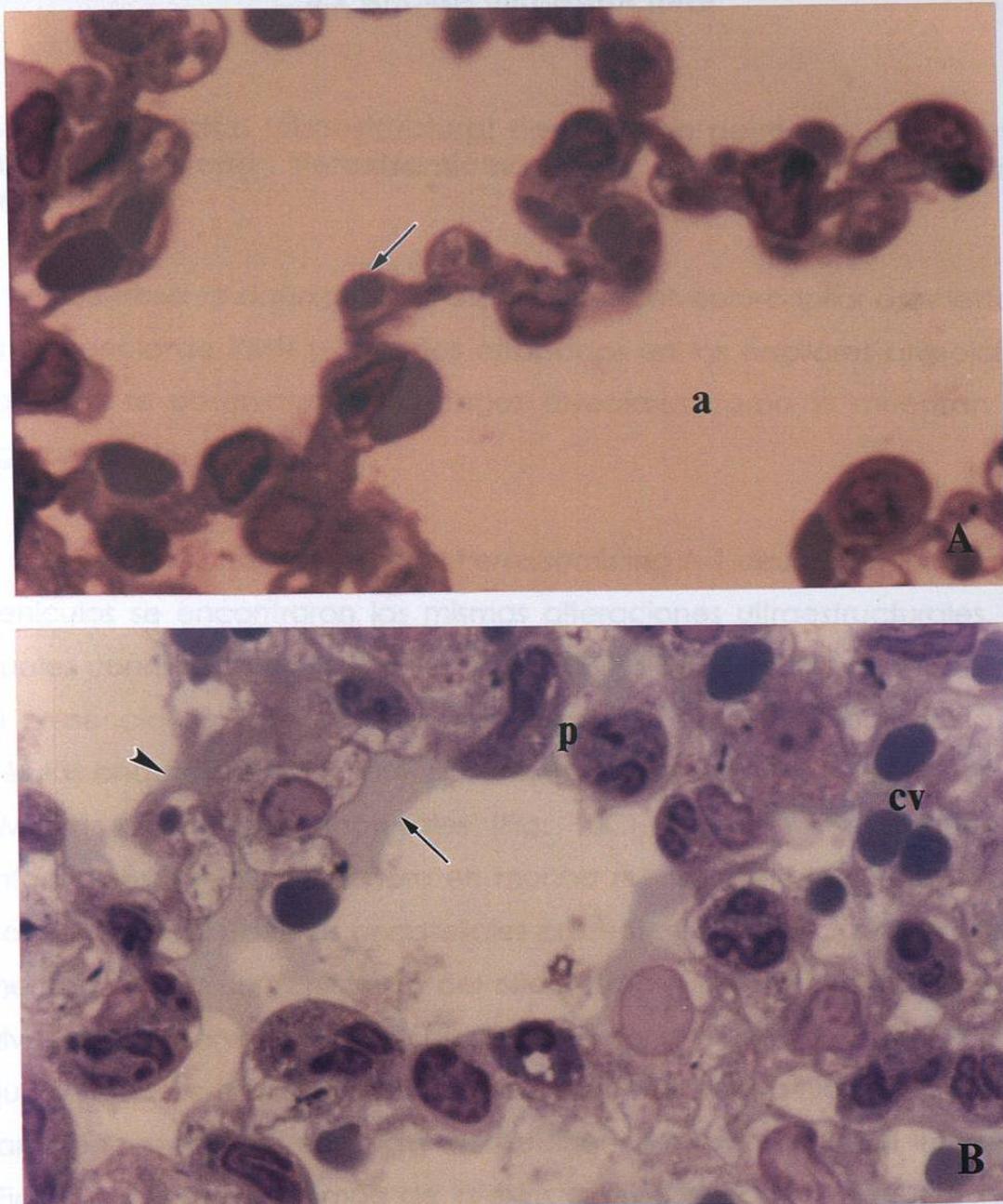


Figura 9. Pulmón de ratón. A) Control sin tratamiento que muestra espacios alveolares bien distendidos **a**, tabiques interalveolares delgados y capilares ocupados por eritrocitos (flecha). B) 2h de tratamiento con 400µg de LPS/0.2ml de solución salina, obsérvese la lesión característica del SDRA, abundantes 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.

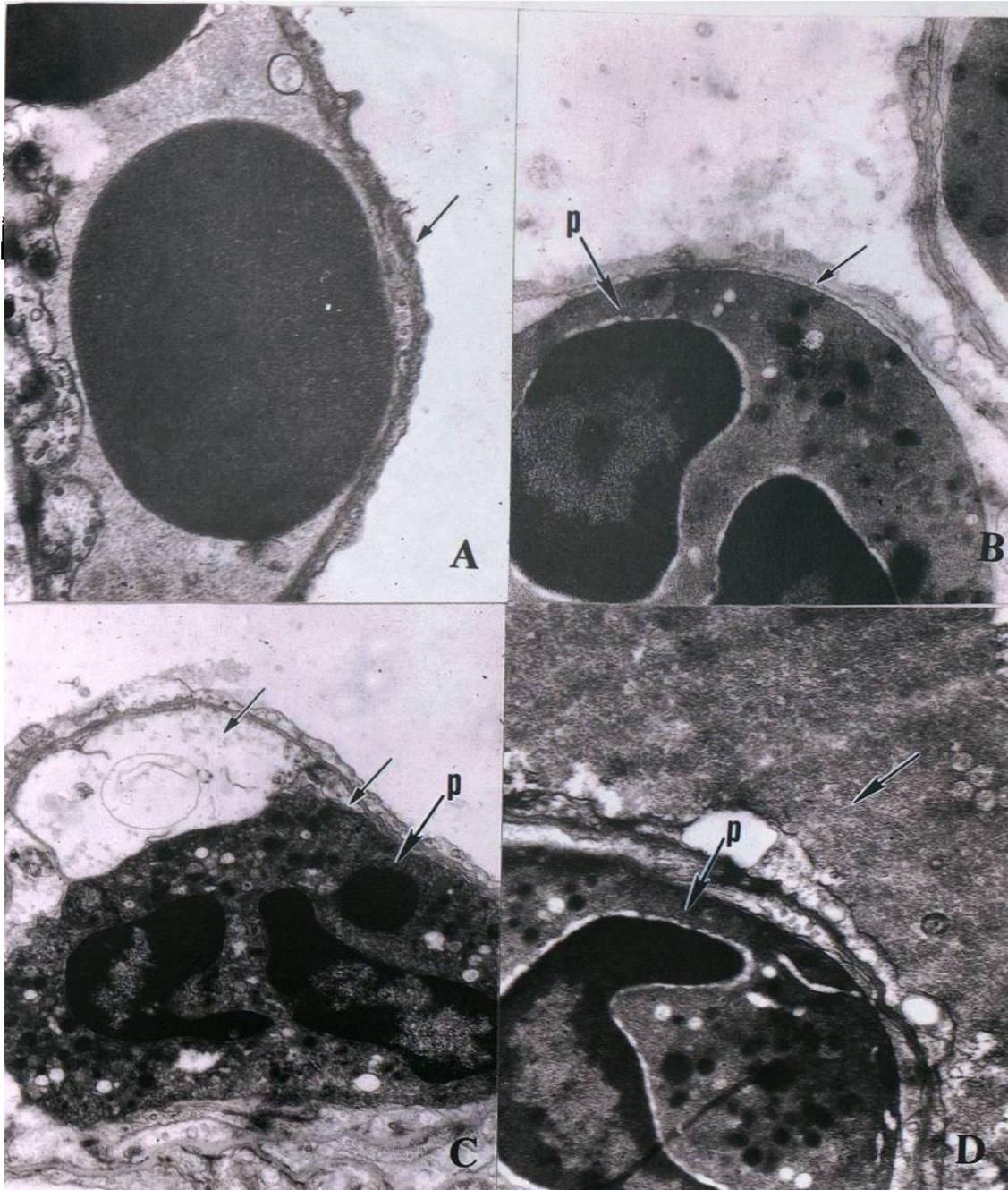


Figura 10. Pulmón de ratón A)Control sin tratamiento obsérvese la membrana alvéolo capilar delgada (flecha), B-D Tratamiento con 13.04mg/Kg de peso de Peroxisomicina A-1 que muestra daño a la barrera alvéolo capilar. B)Polimorfonuclear p dentro de un capilar sin daño a célula endotelial (flecha). C) 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

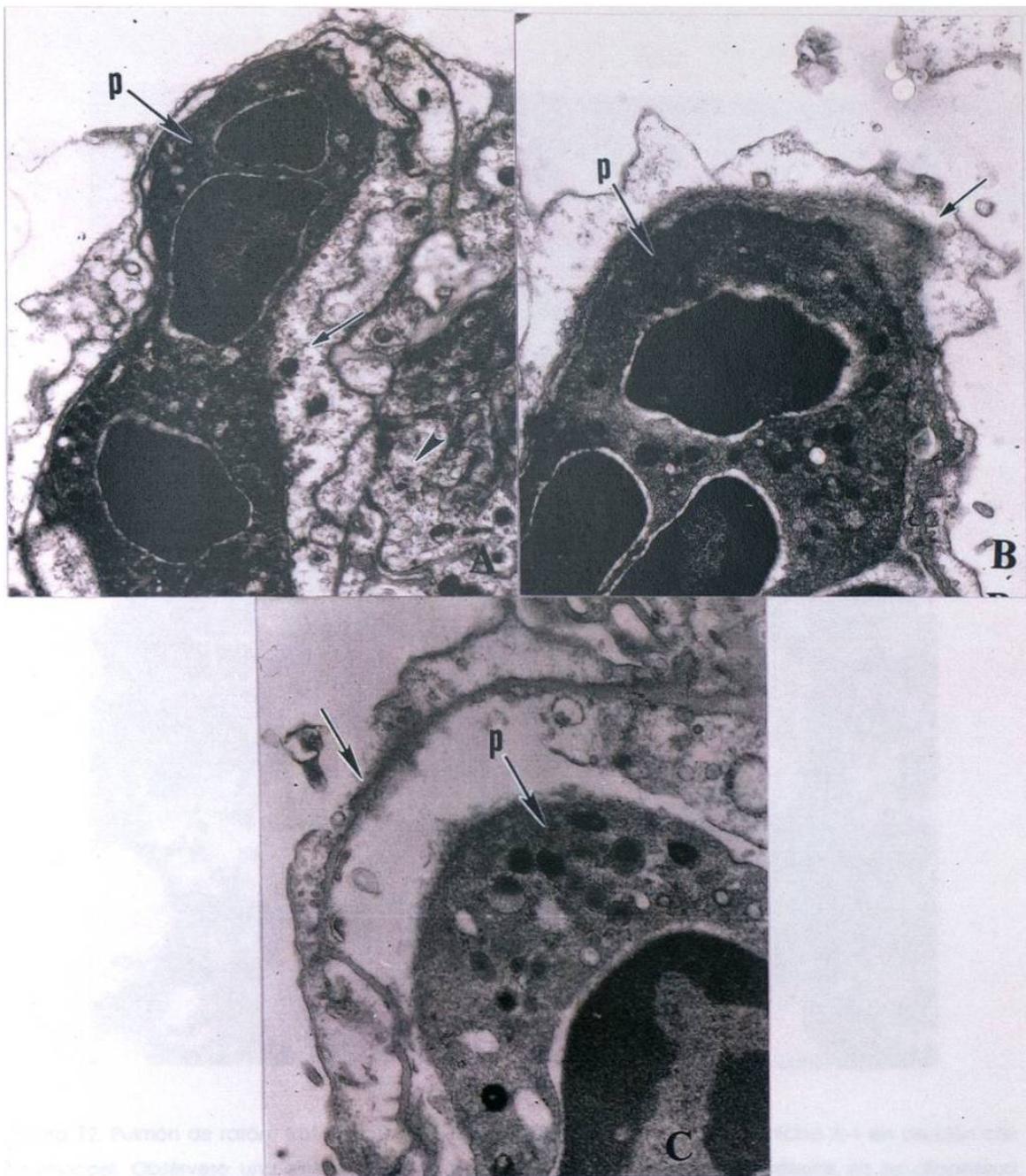


Figura 11. Pulmón de ratón tratado con 13.04mg/kg de peso de Peroxisomicina A-1 A) Polimorfonuclear atrapado en un capilar alveolar la (flecha) muestra daño y destrucción de la célula endotelial y la cabeza de flecha muestra daño a las células del intersticio. B) obsérvese daño y destrucción de neumocito tipo I (flecha). C) Daño y destrucción de la barrera alvéolo capilar (flecha). Micrografías electrónicas de transmisión. Inclusión en resinas epóxicas, contrastación de cortes ultrafinos con Acetato de uranilo y Citrato de plomo. 7000x

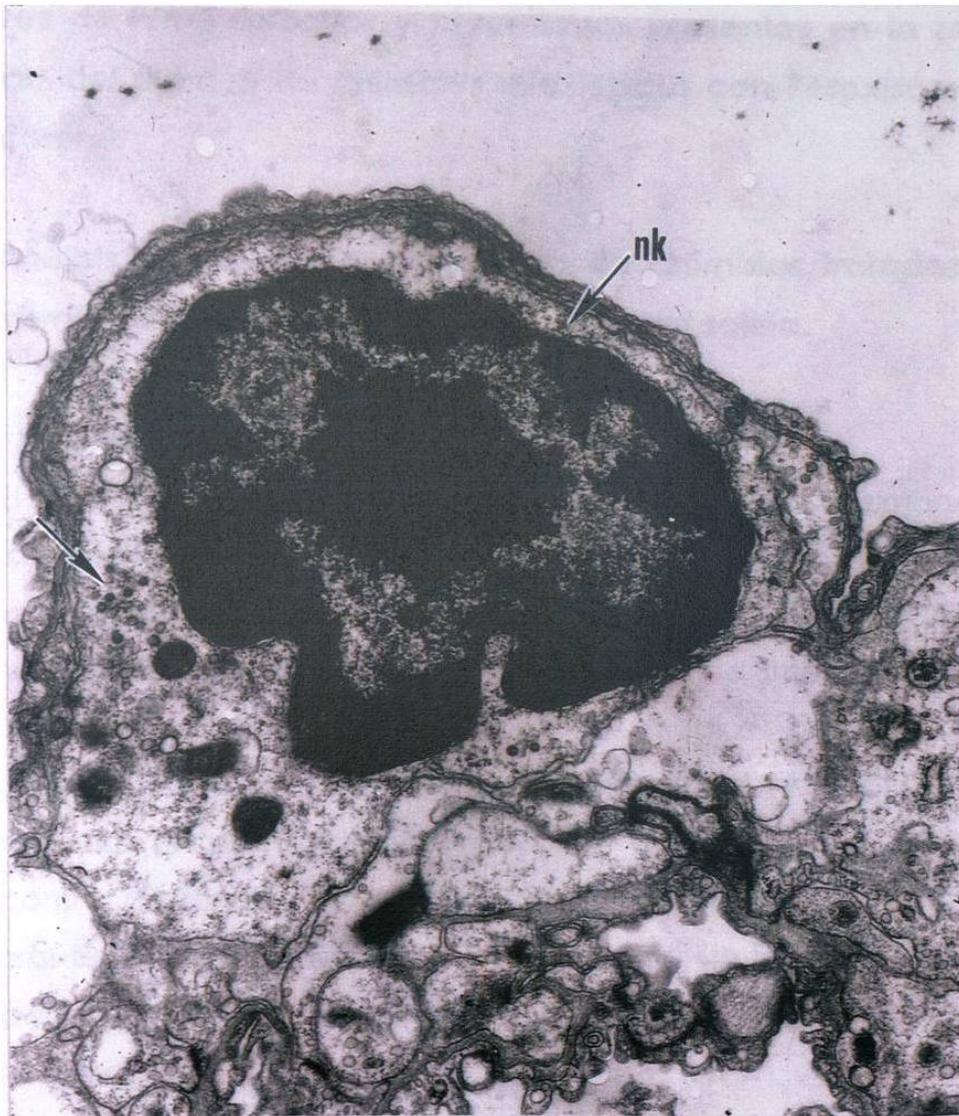


Figura 12. Pulmón de ratón. Tratamiento con 13.04mg/Kg de peso de Peroxisomicina A-1 en dilución con Haemaccel. Obsérvese una célula NK atrapada en un capilar alveolar los gránulos en su citoplasma (flecha) y el núcleo indentado es característico de este tipo celular. Micrografía electrónica de transmisión,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