

### 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.

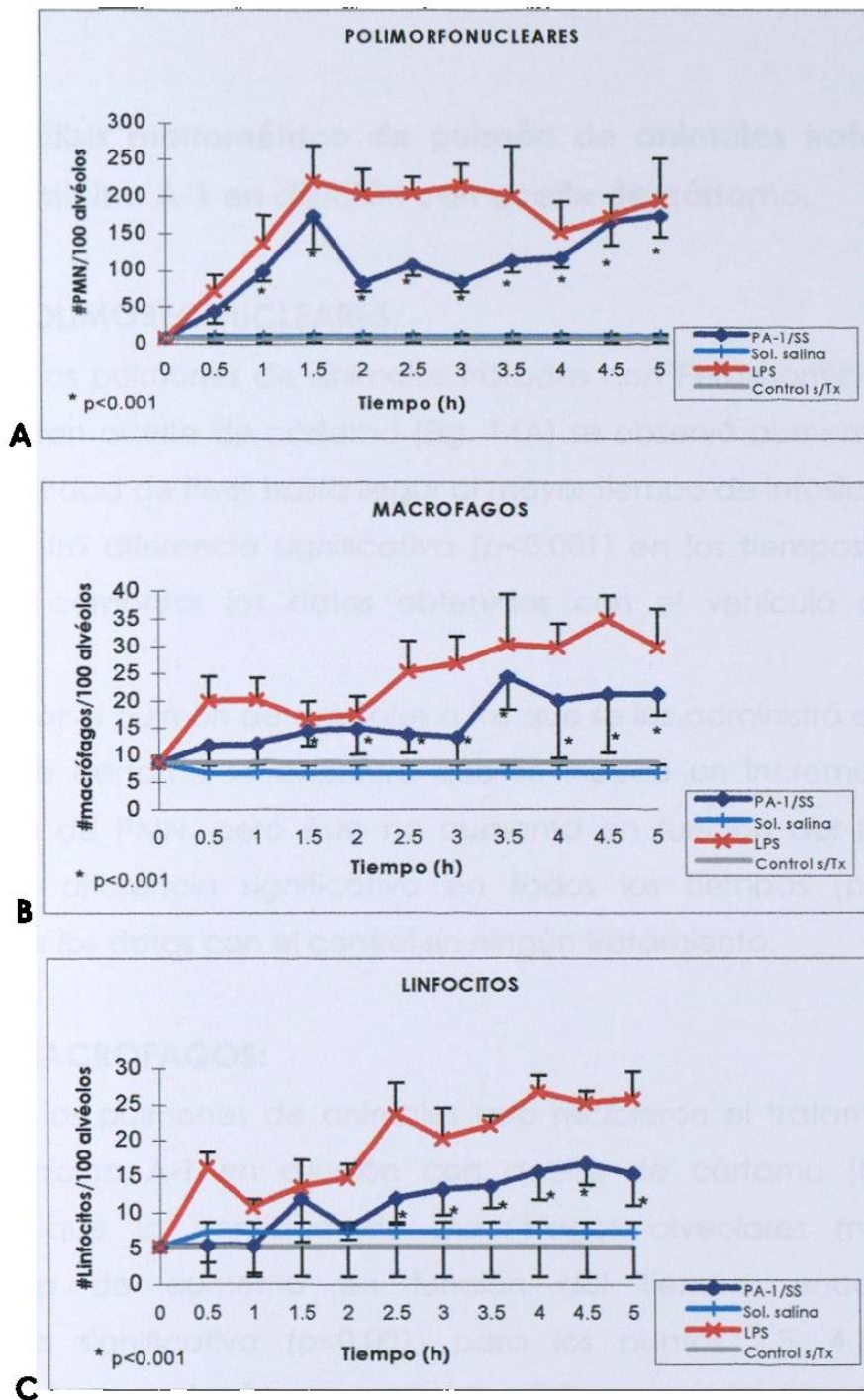


Figura 13. Gráfica A, B y C muestran las Cinéticas de polimorfonucleares, macrófagos y Linfocitos en pulmón de ratón tratado con: Peroxisomicina A-1 en suspensión con solución salina, Lipopolisacárido LPS, Control vehículo solución salina, Control sin tratamiento. Después de llevar a cabo el análisis 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.

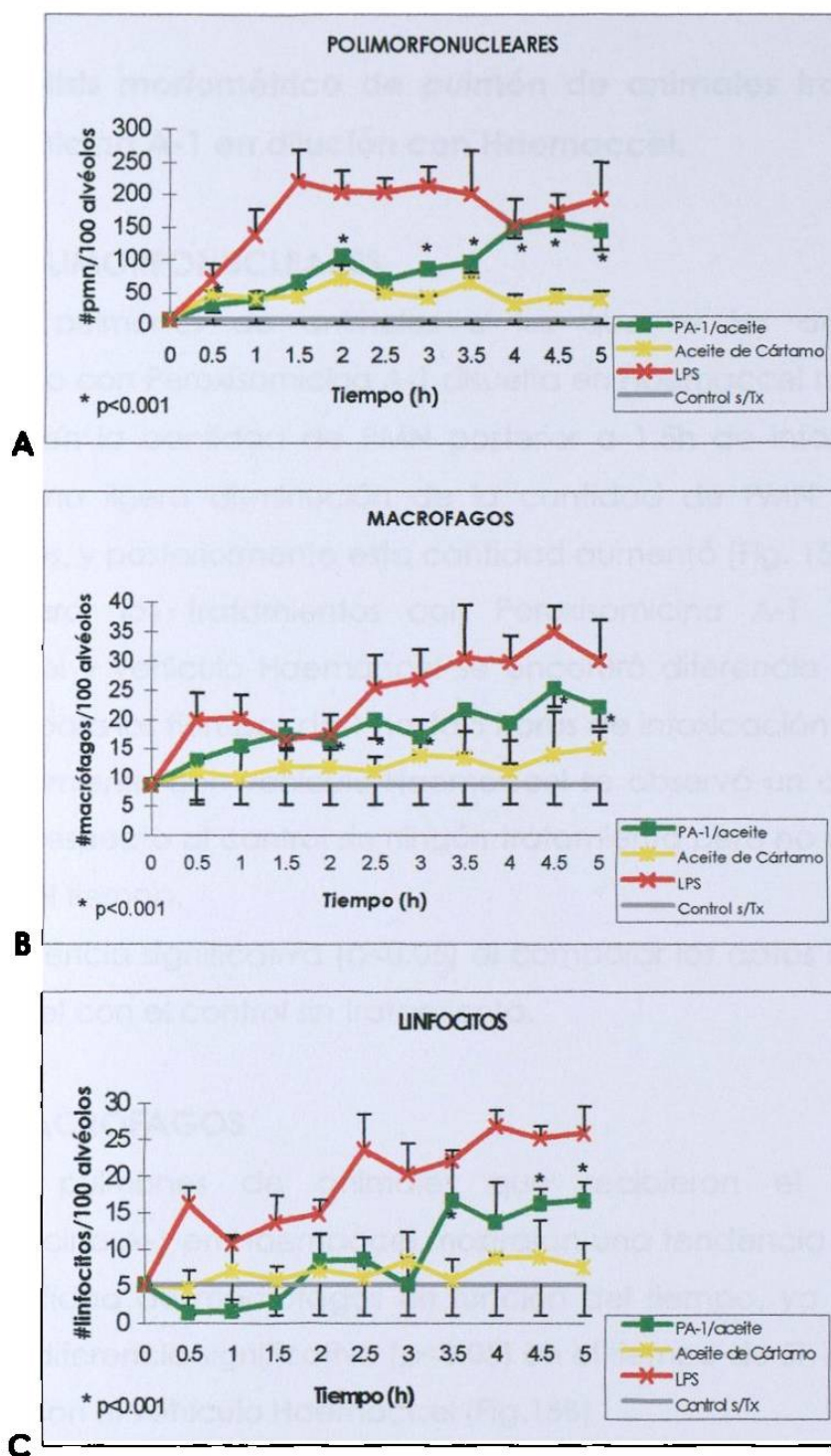


Figura 14. Gráfica A, B y C muestran las Cinéticas de polimorfonucleares, macrófagos y Linfocitos en pulmón de ratón tratado con: Peroxisomicina A-1 en dilución con aceite de cártamo, Lipopolisacárido LPS, Control vehículo aceite de cártamo, Control sin tratamiento. Después de llevar a cabo el análisis morfométrico 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 Haemaccel (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 Haemaccel.

La cantidad de linfocitos que se encontró en el tratamiento con Peroxisomicina A-1 disuelta en Haemaccel superó a la cantidad de linfocitos que se observó con el tratamiento de LPS que utilizamos como control positivo. El vehículo Haemaccel 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.

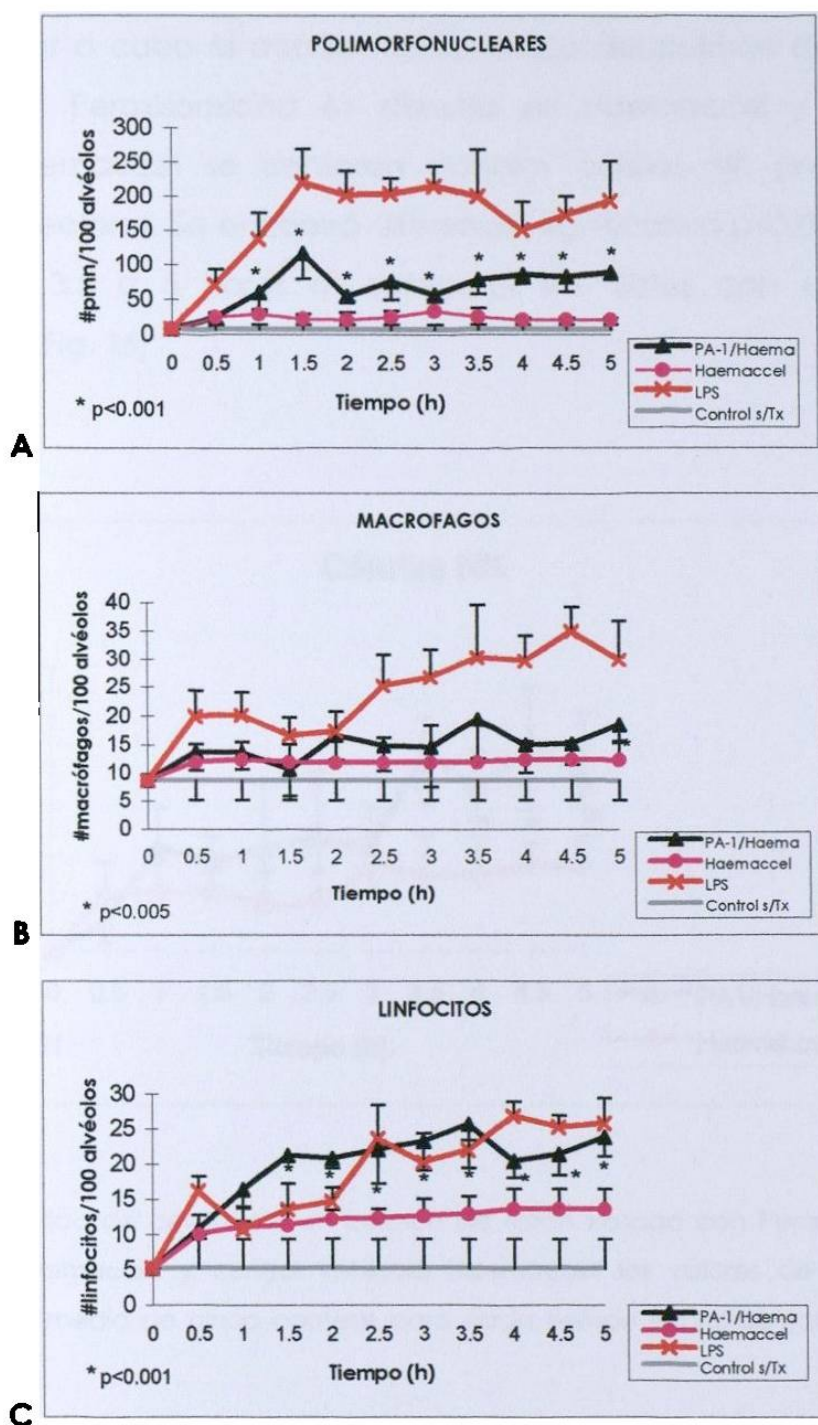


Figura 15. Gráfica A, B y C muestran las Cinéticas de polimorfonucleares, macrófagos y Linfocitos en pulmón de ratón tratado con: Peroxisomicina A-1 en dilución con Haemacel, Lipopolisacárido LPS, Control vehículo Haemacel, Control sin tratamiento. Después de llevar a cabo el análisis morfométrico en 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)

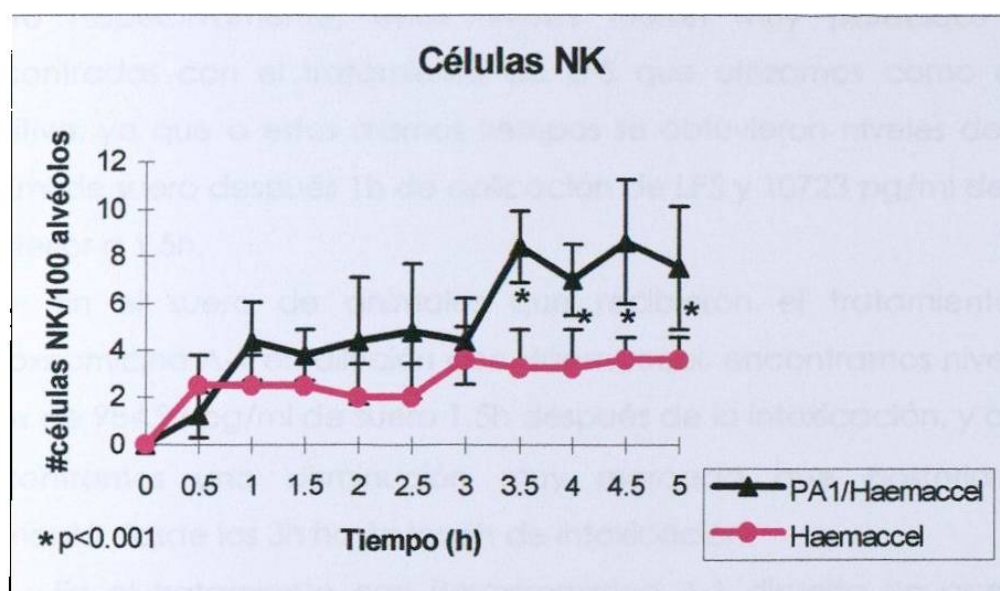


Figura 16. Cinética de células NK en pulmón de ratón tratado con Peroxisomicina A1 disuelto en Haemacel y control vehículo Haemacel los valores de cada punto representan la media de cinco conteos para cada tiempo experimental  $\pm$  desviación estándar

### **3.4 Cuantificación de TNF $\alpha$ en suero de ratones intoxicados con Peroxisomicina A-1 disuelta en diferentes vehículos.-**

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

Los niveles de TNF $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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**

<b>Tratamiento</b>	<b>Absorbancia</b>	<b>Concentración pg/ml</b>
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 $\alpha$  de problemas y controles.

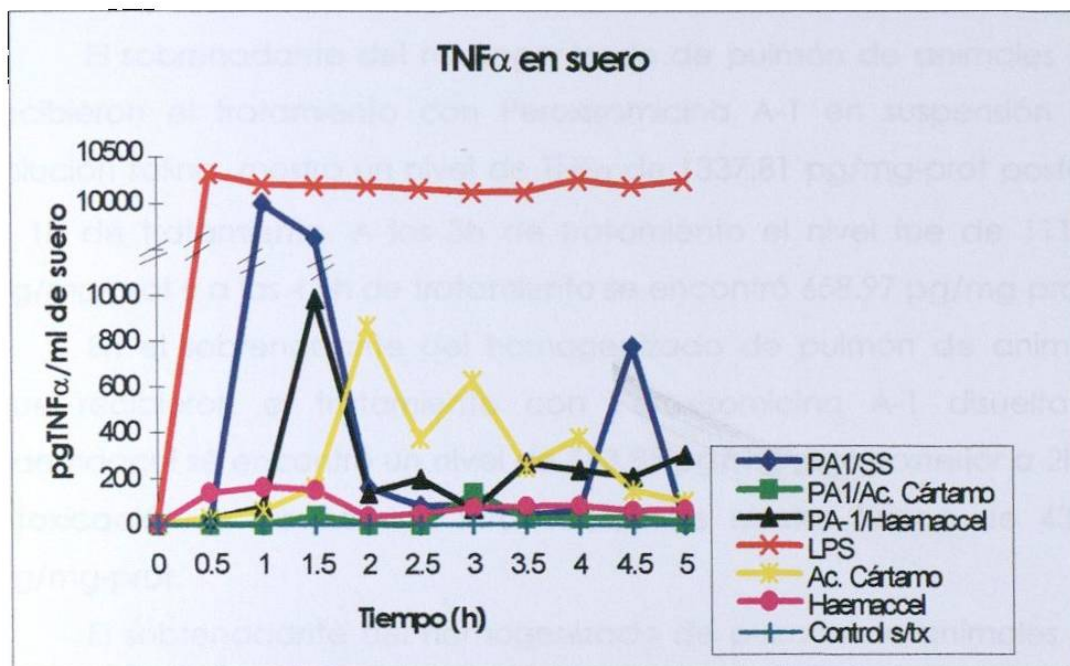


Figura 17. Cinética de pg de TNF $\alpha$ /ml de suero de ratones que recibieron diferentes tratamientos de Peroxisomicina A-1(PA1) y controles correspondientes. Cada punto representa un pool de sueros de 5 ratones para cada tiempo experimental.

### **3.5 Cuantificación de TNF $\alpha$ en homogenizado de pulmón de ratones con diferentes tratamientos.-**

La (Fig.18) muestra los niveles de TNF $\alpha$  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 $\alpha$  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 sé 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 $\alpha$ /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.

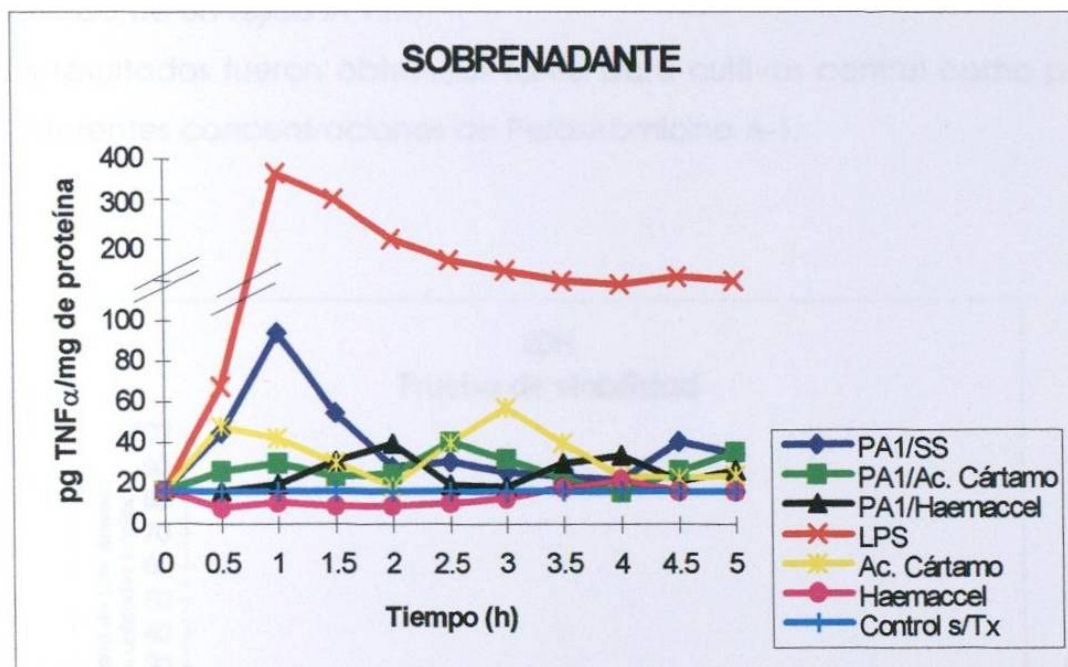


Figura 18. Cinética de pg de  $TNF\alpha$ /mg de proteína en el sobrenadante de homogenizado de pulmones de ratones que recibieron diferentes tratamientos de Peroxisomicina A-1 (PA1) y controles correspondientes. Cada punto representa un pool de sobrenadante de homogenizado de pulmón de 5 ratones para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

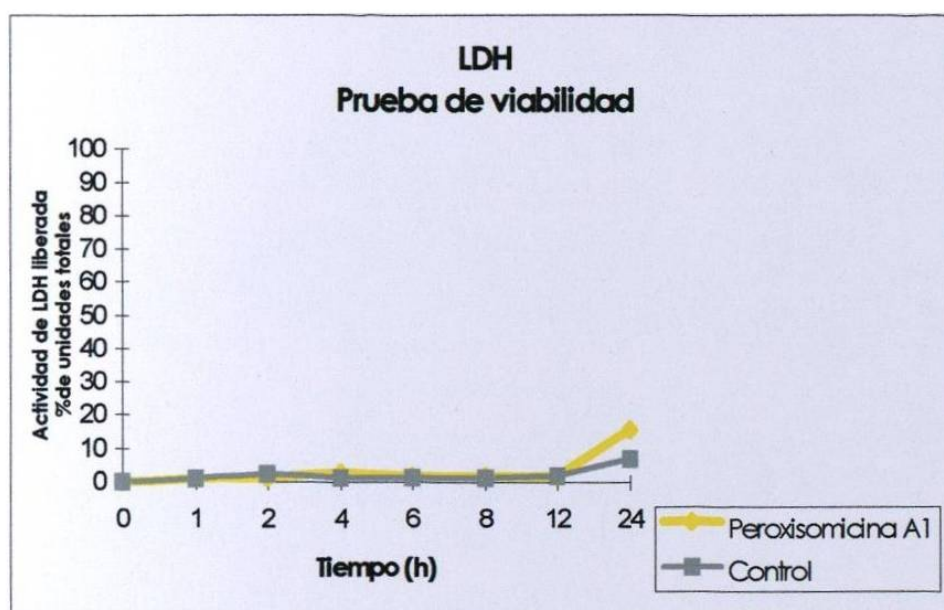


Figura 19. Liberación de LDH al medio de cultivo en presencia y ausencia de Peroxisomicina A1 ( 2 $\mu$ g/ml) a diferentes tiempos de cultivo. La actividad de LDH se determinó por triplicado, en el sobrenadante del medio de cultivo de cada placa.

### **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.



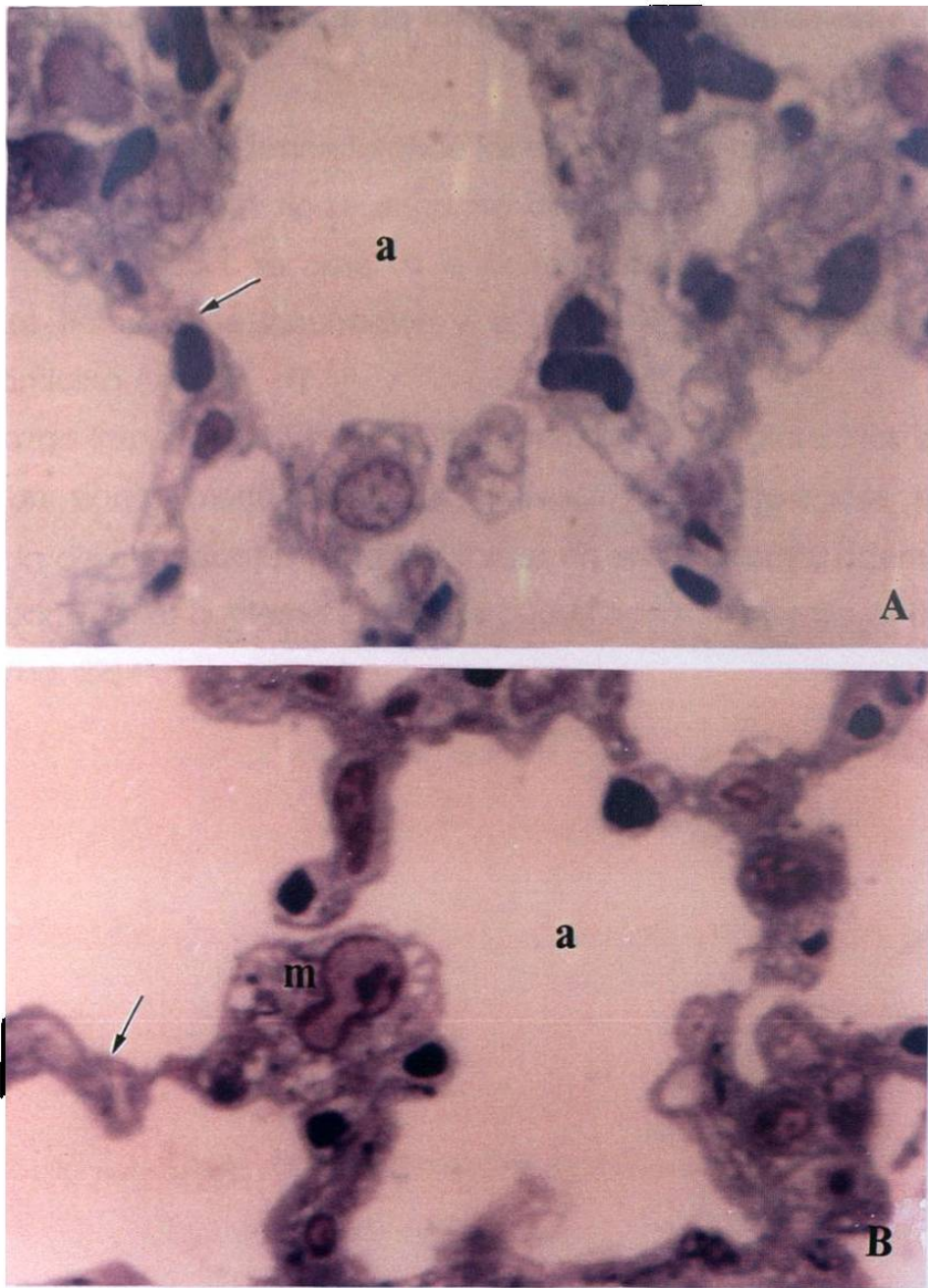


Figura 20. Pulmón de ratón A) Control sin tratamiento que muestra espacios alveolares bien distendidos **a**, tabiques interalveolares delgados (flecha) y capilares ocupados por eritrocitos. B) 6h de cultivo de órgano en presencia de 2µg/ml de Peroxisomicina A-1 obsérvese los espacios alveolares bien 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)

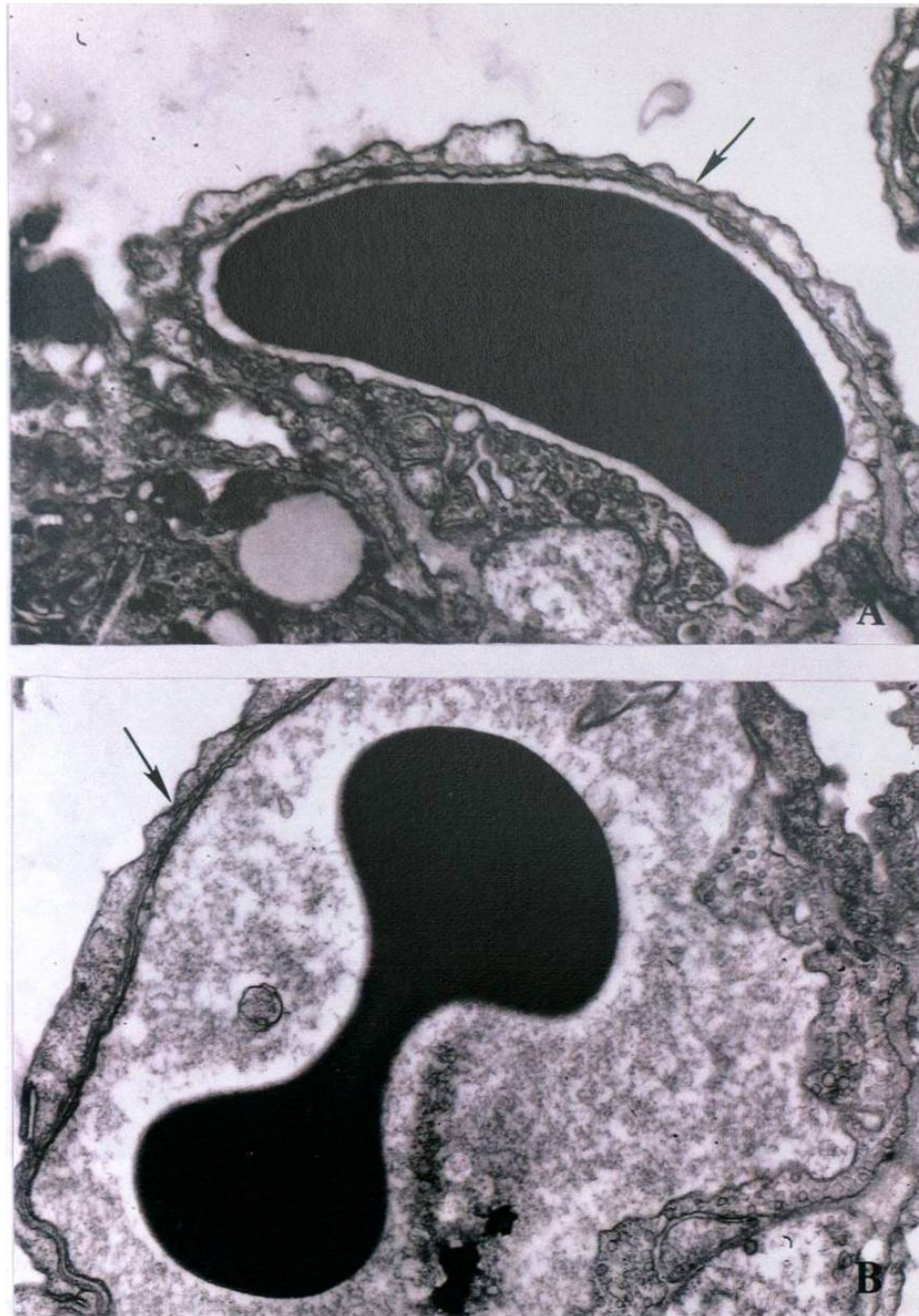


Figura 21. Pulmón de ratón en cultivo de órgano A)Control sin Peroxisomicina A-1 obsérvese un capilar ocupado por un eritrocito y la barrera alvéolo capilar delgada (flecha), B)6h de incubación en presencia de  $2\mu\text{g/ml}$  de Peroxisomicina A-1 que muestra un capilar alveolar con la barrera alvéolo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

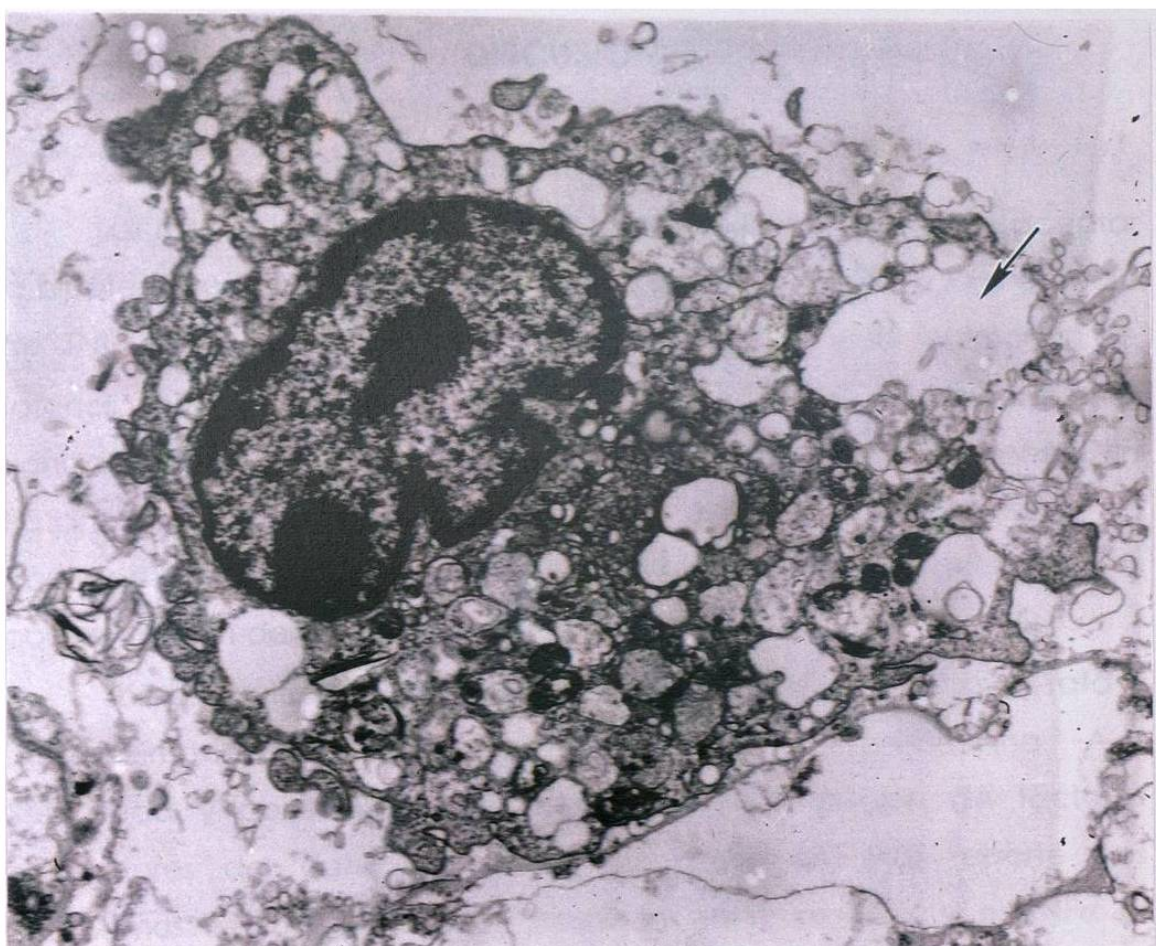


Figura 22. Macrófago alveolar de pulmón en cultivo de órgano incubado con  $2\mu\text{g/ml}$  de Peroxisomicina A-1 que muestra abundantes vesículas vacías en su citoplasma (flecha). Micrografía Electrónica de Transmisión. Inclusión en resinas epóxicas, Contrastación de cortes ultrafinos con Acetato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

Sobre la ultraestructura del pulmón de hámster, cobayo, rata y mono intoxicados experimentalmente con Peroxisomicina A-1, Sepúlveda y col.<sup>30</sup> 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 $\alpha$  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.<sup>30</sup> 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 $\alpha$  recombinante<sup>76</sup> 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 $\alpha$  en suero y en pulmón en los tiempos iniciales de intoxicación (1.5h). A tiempos mayores no se encontraron niveles altos de TNF $\alpha$ . La concentración de TNF $\alpha$  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 $\alpha$  en circulación desde 90-120min después del inicio de septicemia<sup>77</sup>

Con el tratamiento Peroxisomicina A-1 disuelta en aceite de cártamo no se encontraron niveles altos de TNF $\alpha$  en suero, a pesar de que se observó la lesión pulmonar característica. No obstante se encontraron niveles altos de TNF $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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  $\text{TNF}\alpha$  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  $\text{TNF}\alpha$  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)



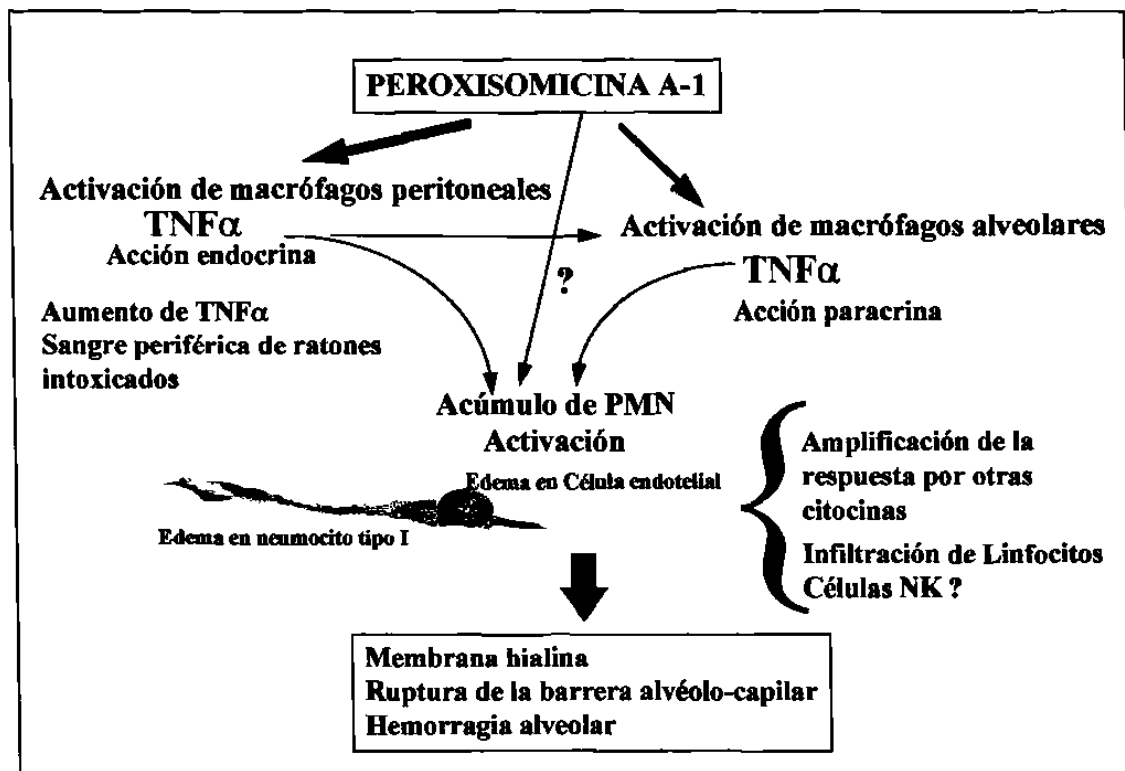


Figura 23 Mecanismo propuesto de daño pulmonar

Recientemente se ha reportado que el TNF $\alpha$  es la citocina que activa una serie de eventos que desencadenan la liberación de otras citocinas<sup>63</sup> 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 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ <sup>62,63,64</sup>, 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 $\alpha$  está presente en tiempos iniciales, pero que posteriormente disminuye. Todo esto sugiere que el TNF $\alpha$  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 estímulo<sup>47</sup>.

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 bronconeumónicas<sup>7</sup>, 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-1<sup>78</sup>, 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 NK<sup>79</sup>. 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 $\alpha$ , 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 $\alpha$  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 aguda<sup>33</sup>.

Con lo anterior no se descarta la participación de otros factores amplificadores de la lesión, por lo que el TNF $\alpha$  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 $\alpha$  "**

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 $\alpha$  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.

## 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., Martinez, 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 efect 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 secuestration. Apotential 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 margined 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 in 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  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )- 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 $\alpha$ )- 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 $\alpha$ . 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) Diferential regulation of interleukin-8 and intercellular adhesion molecule-1 by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and tumor necrosis factor-alpha in endotelial 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. 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). Improvementsin epoxy resin embbending 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  $\alpha$ . *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