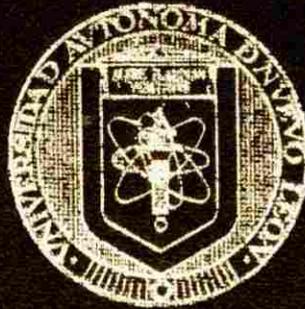


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



CUANTIFICACION DE PMN, LINFOCITOS Y
MACROFAGOS ALVEOLARES EN EL PULMON DEL
RATON ALBINO TRATADO CON UNA DOSIS
TOXICA DE PA1 EN HAEMACCEL Y SU RELACION
CON EL TNF-a

POR

M.C.P. JAIME GARCIA JUAREZ

Como requisito para obtener el grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con Especialidad en
MORFOLOGIA

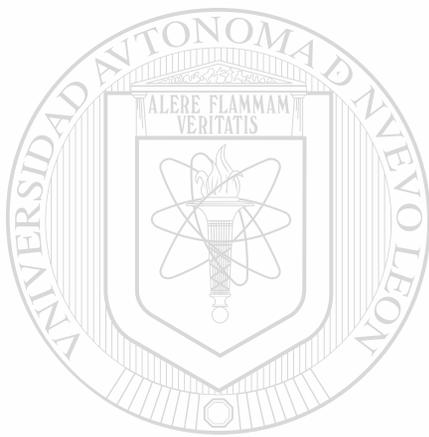
JUNIO 2004

TM
QF981
.K37
G3
2004
c.1

MONTE JAIMÉ COARON
JUAN MARIN



1080125650



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**CUANTIFICACIÓN DE PMN, LINFOCITOS Y MACRÓFAGOS
ALVEOLARES EN EL PULMÓN DEL RATÓN ALBINO TRATADO
CON UNA DOSIS TÓXICA DE PA1 EN HAEMACCEL Y SU
RELACIÓN CON EL TNF- α**

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Por

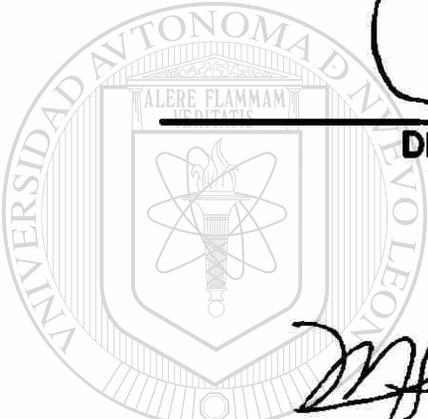
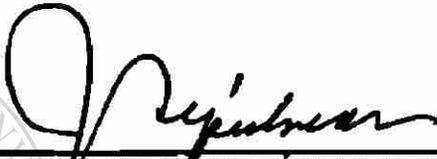
M.C.P. JAIME GARCÍA JUÁREZ

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

Junio, 2004

CUANTIFICACIÓN DE PMN, LINFOCITOS Y MACRÓFAGOS ALVEOLARES EN EL PULMÓN DEL RATÓN ALBINO TRATADO CON UNA DOSIS TÓXICA DE PA1 EN HAEMACCEL Y SU RELACIÓN CON EL TNF- α

Aprobación de la Tesis:



DR. JULIO SEPÚLVEDA SAAVEDRA

Director de Tesis



DRA. MA. DEL SOCORRO FLORES GONZÁLEZ

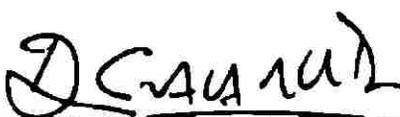
Co-Directora de Tesis

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



DRA. RAQUEL GPE. BALLESTEROS ELIZONDO

Miembro de la Comisión de Tesis



DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO

Subdirector

de Investigación y Estudios de Postgrado

**CUANTIFICACION DE PMN, LINFOCITOS Y MACROFAGOS ALVEOLARES
EN EL PULMON DEL RATON ALBINO TRATADO CON UNA DOSIS TOXICA
DE PA1 EN HAEMACCEL Y SU RELACION CON EL TNF- α**

Presentado por:

M.C.P. Jaime García Juárez

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

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

FIRMAS

Director de Tesis



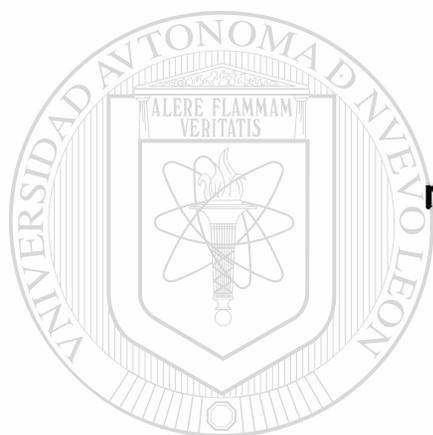
**M.C.P. y Ph. D. JULIO
SEPÚLVEDA SAAVEDRA**

Co-Directora de Tesis



**DRA. MA. DEL SOCORRO
FLORES GONZALEZ**

DEDICATORIA



**Para Patricia,
mi esposa,
mi compañera de juventud.**

**Este logro
también es tuyo.**

Con cariño,

te agradezco por todo

el apoyo que me has

brindado.

Jaime.

Agradecimientos

Gracias Dios, porque me das vida, porque me das salud, por el trabajo que me permites tener, por estar en este lugar y en este tiempo y entre muchas cosas más, por permitir que termine esta maestría. Gracias por todas las personas abajo listadas.

Gracias Patricia, por la paciencia y el amor que me has demostrado desde que eres mi compañera y esposa.

Gracias Dr. Julio Sepúlveda Saavedra, por la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo, por su profesionalismo, paciencia, experiencia y por todo el apoyo que me ha brindado durante mi formación.

Gracias Dra. Ma. del Socorro Flores González, por los consejos, formación, experiencia y apoyo que me dió durante la maestría.

Gracias Dra. Raquel Gpe. Ballesteros Elizondo, por la ayuda, los consejos y la experiencia que me compartiste.

Gracias Dr. Alfredo Piñeyro López, por la donación de la PA1 y por permitimos estudiar parte de sus efectos.

Gracias Dra. Herminia Martínez y miembros de la Subdirección de Investigación y Estudios de Postgrado por esta oportunidad de superación.

Gracias al PAICYT por financiar la parte inicial de este trabajo.

Gracias a todos los miembros del Departamento de Histología, por la ayuda, apoyo, consejos y compañía que me han dado. Gracias Rosy y Nora por su ayuda al preparar material para microscopía electrónica.

Gracias a todos mis compañeros de Maestría y a los compañeros de Doctorado que me han acompañado durante mi formación. Gracias Aurelio, Prisco y Martha por compartir los primeros momentos. Gracias Angeles, Rafael, Hiram, Marcos, Jorge, Diana, Humberto, Blanca y a todos los compañeros que me ayudaron en algún momento del trabajo experimental.

Gracias Francisco García y Josefina Juárez, por ser mis padres. Gracias a mis hermanas y a mi hermano, por todo el apoyo que me han dado.

Gracias a todos mis amigos de batalla, por tener el mismo propósito en la vida, por pelear por ser mejores y diferentes, por su apoyo y por estar al tanto de mis logros.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Gracias a todos los estudiantes de medicina que me acompañaron y ayudaron en algún momento de este trabajo. Gracias Alejandro Navarro, por tu valiosa ayuda en el inicio del trabajo. Gracias Gabriela, Sayuri, Javier y Angela, también espero que les haya servido esta experiencia.

Gracias a todos mis amigos de carrera por su ánimo. Gracias Mario Alberto Valdéz, por ayudarme a manejar los programas de computadora que usé y por los consejos relacionados a este tema.

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Peroxisomicina A1.....	1
1.2 Haemacel®.....	5
1.3 Síndrome de Insuficiencia Respiratoria del Adulto (SIRA).....	5
1.4 Factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α).....	7
1.5 JUSTIFICACIÓN.....	8
1.6 OBJETIVO GENERAL.....	8
1.7 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	10
2.1 Material biológico utilizado.....	10
2.2 Equipo utilizado.....	10
2.3 Reactivos utilizados.....	11
2.4 Grupos experimentales.....	12
2.5 Preparación y administración de la PA1.....	13
2.6 Obtención de las muestras de sangre y pulmón.....	14
2.7 Procesamiento de las muestras.....	15
2.8 Análisis morfométrico y estadístico.....	15
2.9 Homogenización de pulmón para la cuantificación de TNF-α.....	16
2.10 Cuantificación de TNF-α por ELISA.....	17
2.11 Cuantificación de proteínas.....	17

3. RESULTADOS	18
3.1 Descripción histológica del pulmón a microscopía de luz	18
3.1.1 Control sin tratamiento	18
3.1.2 Control tratado con vehículo Haemacel®	18
3.1.3 Tratamiento con PA1 en Haemacel	19
3.1.4 Control positivo tratado con LPS	20
3.2 Análisis morfométrico a microscopía de luz	24
3.2.1 Polimorfonucleares	24
3.2.2 Macrófagos alveolares	25
3.2.3 Linfocitos	25
3.3 Descripción ultraestructural del pulmón	27
3.3.1 Control sin tratamiento	27
3.3.2 Control tratado con vehículo Haemacel	27
3.3.3 Tratamiento con PA1 en Haemacel	28
3.3.4 Control positivo tratado con LPS	28
3.4 Cuantificación de TNF-α en suero y homogenado pulmonar por el método de ELISA	33
4. DISCUSIÓN	35
5. CONCLUSIONES, PERSPECTIVAS Y CONTRIBUCIONES	39
5.1 CONCLUSIONES	39
5.2 PERSPECTIVAS	40
5.3 CONTRIBUCIONES	40
REFERENCIAS	41

LISTA DE FIGURAS

Figura

1. Arbusto de la <i>Karwinskia humboldtiana</i>	2
2. Estructura química de la T-514 (Peroxisomicina A1).....	3
3. Diseño experimental del trabajo.....	13
4. Pulmón de ratón, fotomicrografías, control sin tratamiento y 0.5 h posterior al tratamiento con Haemaccel por vía i.v.....	20
5. Pulmón de ratón, fotomicrografías, 1 h y 1.5 h posterior al tratamiento con Haemaccel por vía i.v.....	21
6. Pulmón de ratón, fotomicrografías, 3 h y 4.5 h posterior al tratamiento con Haemaccel por vía i.v.....	21
7. Pulmón de ratón, fotomicrografías, 0.5 h y 1 h posterior al tratamiento con PA1 en Haemaccel por vía i.v.....	22
8. Pulmón de ratón, fotomicrografías, 1.5 h y 3 h posterior al tratamiento con PA1 en Haemaccel por vía i.v.....	22
9. Pulmón de ratón, fotomicrografías, 4.5 h posterior al tratamiento con PA1 en Haemaccel por vía i.v. y 1.5 h posterior al tratamiento con LPS por vía i.v.....	23
10. Pulmón de ratón, fotomicrografías, 3 h y 4.5 h posterior al tratamiento con LPS por vía i.v.....	23
11. Cinéticas de PMN, macrófagos alveolares y linfocitos en el pulmón de ratón.....	26

12. Pulmón de ratón, micrografías electrónicas, control sin tratamiento.....	29
13. Pulmón de ratón, micrografías electrónicas, 0.5 h y 1 h posterior al tratamiento con Haemaccel, 0.5 h y 1 h posterior al tratamiento con PA1 en Haemaccel.....	30
14. Pulmón de ratón, micrografías electrónicas, 1.5 h y 3 h posterior al tratamiento con Haemaccel, 1.5 h y 3 h posterior al tratamiento con PA1 en Haemaccel.....	31
15. Pulmón de ratón, micrografías electrónicas, 4.5 h posterior al tratamiento con Haemaccel, 4.5 h posterior al tratamiento con PA1 en Haemaccel, 1.5 h y 3 h posterior al tratamiento con LPS.....	32
<hr/>	
16. Cinética de la concentración de TNF-α en suero.....	33
17. Cinética de la concentración de TNF-α en pulmón.....	34
18. Curva patrón de TNF-α.....	51
19. Curva patrón de proteínas.....	53

Abreviaturas y símbolos

α	Alfa
β	Beta
CD-1	Cepa de ratones CD-1
CD11/18	Molécula de diferenciación de grupo 11/18 (siglas en inglés)
CHAPS	Colamidopropil dimetil amonio 1 propano sulfonato
C3a	Fracción 3a del Complemento
C5a	Fracción 5a del Complemento
cols.	Colaboradores
Corp.	Corporation, corporación (siglas en inglés)
d.u.	Dosis única
Dr.	Doctor
ELISA	Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima (siglas en inglés)
fig.	Figura
G	Calibre de aguja
g	Gramos
h	Horas
Haem	Haemaccel®
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1 (siglas en inglés)
ICAM-2	Molécula de adhesión intercelular 2 (siglas en inglés)
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
Inc	Incorporation, Corporación, Asociación (siglas en inglés)
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenoso
Kg	Kilogramo, kilogramos
λ	Lambda, longitud de onda
LFA-1	Antígeno de función de linfocitos (siglas en inglés)
linf	Linfocito
LPS	Lipopolisacárido
M	Molar

mac	Macrófago
Mac-1	Molécula de adhesión celular 1
min	Minutos
ml	Mililitro, mililitros
mm³	Milímetros cúbicos
µg	Microgramos
µm	Micrómetros
N	Normal
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
nM	Nanomolar
NK	Natural killer, asesinas naturales (siglas en inglés)
PA1	Peroxisomicina A1
pg	Picogramos
pH	Logaritmo negativo de la concentración de iones H⁺
PMN	Polimorfonuclear, polimorfonucleares
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoruro
®	Marca registrada
r.p.m.	Revoluciones por minuto
T	Toxina
™	Trade mark, marca comercial (siglas en inglés)
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral alfa (siglas en inglés)
Tx	Tratamiento
seg	Segundos
SIRA	Síndrome de Insuficiencia Respiratoria del Adulto
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
UV	Ultravioleta
2DL₅₀	Dos veces la dosis letal media
°C	Grados centígrados, grados Celsius
%	Por ciento
<	Menor que
-	Menos

RESUMEN

Jaime García Juárez

Fecha de graduación: Junio 2004

Universidad Autónoma de Nuevo León.
Facultad de Medicina.

Título del Estudio:

CUANTIFICACION DE PMN, LINFOCITOS Y MACROFAGOS ALVEOLARES EN EL PULMON DEL RATON ALBINO TRATADO CON UNA DOSIS TOXICA DE PA1 EN HAEMACCEL Y SU RELACION CON EL TNF- α

Número de páginas: 55

Area de Estudio: Morfología

Candidato para el grado de Maestro en Ciencias con Especialidad en Morfología

Propósito y Método de estudio: La T-514 es una toxina producida por las plantas del género *Karwinskia*. También se llama peroxisomicina A1 (PA1) por alterar de forma selectiva e irreversible la membrana de los peroxisomas de levaduras metilotróficas. La PA1 tiene toxicidad selectiva *in vitro* sobre células tumorales de hígado, colon y pulmón. Actualmente se encuentra en estudios de fase clínica I en pacientes con carcinoma terminal, sin tratamiento alternativo. Los animales intoxicados experimentalmente con PA1 sufren daño en riñón, hígado y pulmón. En el pulmón de roedores y monos, la PA1 ocasiona un infiltrado inflamatorio. Además, cuando se administra por vía i.p. en roedores, ocasiona una elevación de TNF- α . Este trabajo evalúa el efecto de una dosis tóxica i.v. de PA1 en Haemacel® sobre el pulmón del ratón albino, ya que en los estudios de fase clínica I se utiliza esta vía y este vehículo para su administración.

Se recolectaron ambos pulmones; el pulmón derecho se homogenizó y en el sobrenadante se cuantificó TNF- α por ELISA y proteínas por el método de Lowry, el pulmón izquierdo se fragmentó y se procesó para su revisión histológica, morfométrica y ultraestructural. Se extrajo la sangre de la vena cava inferior, para cuantificar TNF- α sérico por ELISA.

Conclusiones y contribuciones: En el estudio morfométrico se encontró un aumento en el número de pmn, macrófagos y linfocitos presentes en la región alveolar del pulmón, en los grupos tratados con PA1 en Haemacel, y en los tratados con Haemacel, comparados con el grupo control sin tratamiento. A microscopía electrónica se encontró edema de las células endoteliales y alveolares de tipo I, exudado en el espacio aéreo, ruptura de la barrera alvéolo-capilar y hemorragia en los grupos tratados con PA1 en Haemacel. En el grupo tratado con Haemacel, se encontró edema de las células endoteliales y alveolares tipo I. También se encontró elevación de TNF- α sérico y pulmonar en el grupo tratado con PA1 en Haemacel y elevación de TNF- α pulmonar en el grupo tratado con Haemacel, comparados con el grupo control sin tratamiento. Los resultados obtenidos demuestran que la PA1 administrada por vía i.v. ocasiona infiltrado inflamatorio y daño a la barrera alvéolo-capilar, y elevación de TNF- α sérico y pulmonar. También se demostró que la administración i.v. de Haemacel ocasiona daño pulmonar y elevación de TNF- α pulmonar.

FIRMA DEL DIRECTOR DE TESIS



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

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Peroxisomícin A1

Las plantas del género *Karwinskia* pertenecen a la familia *Rhamnaceae*, consisten en arbustos y árboles pequeños que se localizan a lo largo de casi todo el territorio de la República Mexicana, sur de los Estados Unidos, Centroamérica, norte de Colombia, Cuba, Haití y República Dominicana. En el territorio mexicano destaca la *Karwinskia humboldtiana* por ser la más abundante.¹ Se sabe que la ingestión del fruto de esta planta por el humano y varias especies de animales provoca una intoxicación que se manifiesta con una parálisis flácida, simétrica, progresiva y ascendente. Este cuadro clínico es similar al síndrome de Guillian-Barré, la poliomielitis y otras polirradiculoneuritis y en los casos graves puede causar parálisis bulbar y muerte.^{2,3,4}

Estos efectos tóxicos fueron descritos por primera vez a fines del siglo XVIII por el historiador jesuita Don Francisco Xavier Clavijero.⁵ En 1917, Castillo Nájera reportó que en las necropsias de los casos fatales sólo se encontraba daño en los nervios periféricos.⁶ Sin embargo, en los casos de intoxicación aguda existen reportes de otras causas de muerte, como insuficiencia respiratoria aguda grave, neumonía fulminante y paro cardiorrespiratorio; sin presentar el cuadro clínico característico de parálisis previamente descrito.^{7,8}



Figura 1. Arbusto de la *Karwinskia humboldtiana* que muestra el fruto maduro de color violeta oscuro.⁴⁸

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

El principio tóxico de esta planta se encuentra en las semillas del fruto (fig. 1), de donde Dreyer y cols. en 1975 aislaron 4 compuestos químicos, que en un principio se consideraron neurotoxinas, los cuales son clasificados como antracenosas, y que se nombraron: T-544, T-496, T-514 (fig. 2) y T-516 en base a su peso molecular.⁹ En trabajos más recientes, Waskman y cols. aislaron un isómero y un diastereoisómero de T-514 a partir de la *K. umbellata* y de la *K. parvifolia* respectivamente, y aislaron la T-510 a partir de la *K. affin humboldtiana*.^{10,11}



Figura 2. Estructura química de la T-514 (Peroxisomicina A1).⁵⁵

Varios estudios de intoxicación experimental con el fruto molido y con las toxinas aisladas en diferentes especies animales fueron realizados por Bermúdez y cols. En estos trabajos se encontró que, los animales intoxicados presentan disnea, daño pulmonar, hepático y renal; quedó establecido también que la T-544 es la responsable de producir la parálisis, la T-496 produce un cuadro diarreico y la T-514 causa daño al hígado, pulmón y riñón.^{12,13,14}

Los experimentos realizados por Sepúlveda y cols. en levaduras metilotróficas permitieron observar que, la T-514 a dosis subletales produce un efecto nocivo específico sobre la membrana de los peroxisomas, razón por la cual se propuso nombrarla peroxisomicina A1 (PA1).¹⁵

En 1992, Sepúlveda y cols. describieron la ultraestructura de la lesión pulmonar en el material de autopsia de roedores y monos intoxicados con PA1

y observaron hemorragia y edema intra-alveolar grave, destrucción de la barrera alveólo-capilar, alteraciones en la célula endotelial y acúmulo de polimorfonucleares (PMN) en los capilares, asociados estrechamente al endotelio vascular y con signos morfológicos de desgranulación y activación. Estos hallazgos son similares a los descritos en el Síndrome de Insuficiencia Respiratoria del Adulto (SIRA).¹⁶

En trabajos realizados en ratas intoxicadas experimentalmente con la PA1 se reportó que el daño provocado al pulmón ocurre de forma gradual.¹⁷ Ballesteros y cols., reportaron que al aplicar la PA1 por vía i.p. en diferentes vehículos (aceite, solución salina y Haemacel®), ocasiona una lesión en la región alveolar del pulmón del ratón albino. Esta lesión consiste en edema de las células endoteliales y alveolares, presencia de membrana hialina y ruptura de la barrera alveólo-capilar. También se observa un incremento en el número de PMN, macrófagos alveolares, linfocitos y posibles células NK; además de aumento de TNF- α en el sobrenadante del homogenado pulmonar y en el suero.^{18,19}

Piñeyro y cols. reportaron por primera vez la toxicidad selectiva *in vitro* de la PA1 sobre líneas celulares cancerosas humanas provenientes del pulmón, hígado y colon. Esto fue confirmado por investigadores de las Universidades de Berlín y Freiburg (Alemania) y recientemente por el Instituto Nacional de Cáncer (E.U.A.). Por esta razón se ha considerado como un potencial agente antineoplásico.²⁰ Se han otorgado así mismo seis patentes para su uso; en la comunidad de países europeos, Japón, Corea, Canadá, México y Estados Unidos.^{21,22,23} En la actualidad se administra PA1 a pacientes con carcinoma terminal sin tratamiento alternativo dentro del protocolo I 1/15 de ensayo en fase clínica I. Para su administración i.v. se utiliza el Haemacel como vehículo.²⁴

1.2 Haemacel®

El Haemacel es un sustituto del plasma; contiene polipéptidos de gelatina degradada unidos por puentes de urea, cationes, aniones, polipéptidos aniónicos y agua destilada. Está indicado en el tratamiento del choque hipovolémico, pérdida de sangre, pérdida de plasma, deshidratación, durante cirugías, en la hemodiálisis y como vehículo en la administración de medicamentos. En los estudios de fase clínica I ya mencionados anteriormente, se utiliza como vehículo para la administración de PA1 por vía i.v.²⁴

Esta solución puede ocasionar efectos colaterales en pacientes sensibles, reacciones de tipo anafiláctico y anafilactoide.^{25,26,27} Se ha reportado incluso una reacción fatal después de su administración.²⁸ Se sabe que cuando es administrado por vía i.v. a humanos puede ocasionar un incremento en la concentración plasmática de histamina.²⁹ En experimentos realizados en conejos se ha encontrado que incrementa el número de granulocitos en pulmón, hígado y bazo.³⁰

En estudios realizados *in vitro*, se ha reportado que el Haemacel ocasiona una elevación del TNF- α en sangre de animales y de humanos.³¹ Ballesteros y cols. encontraron que al administrarlo por vía i.p., provoca un incremento en el número de células inflamatorias en el pulmón y elevación de TNF- α en el sobrenadante del homogenado pulmonar del ratón albino.^{18,19}

1.3 Síndrome de Insuficiencia Respiratoria del Adulto (SIRA)

El Síndrome de Insuficiencia Respiratoria del Adulto (SIRA), es una forma fulminante de insuficiencia respiratoria que ocurre como resultado final de un daño directo o indirecto a la membrana alveólo-capilar.^{32,33} Ashbaugh describió

por primera vez este síndrome en 1967. En este reporte se describe como una forma grave de insuficiencia respiratoria, caracterizada por hipoxemia refractaria, rigidez pulmonar e infiltrados difusos en las radiografías de tórax.³⁴

Este síndrome puede ser causado por una amplia variedad de agentes que dañan de manera directa o indirecta el pulmón, tales como: aspiración gástrica, drogas (heroína, colchicina, barbitúricos, salicilatos, dextrán 40, etc.), infecciones (neumonías bacterianas, virales, fúngicas y parasitarias; tuberculosis, sepsis por gram negativos), desórdenes metabólicos (uremia, cetoacidosis diabética, pancreatitis), traumatismos (quemaduras, embolia, fracturas múltiples, choque de cualquier etiología, etc.), desórdenes inmunitarios (vasculitis, enfermedad de Goodpasture, etc.) y otras, como en este caso la PA1. El común denominador de todas las causas anteriormente mencionadas es el daño a la membrana alveolo-capilar. El SIRA causa una mortalidad del 50 al 70% en los pacientes afectados.^{32,35,36}

Se conoce que existen diversos mediadores tanto celulares como humorales, los cuales participan en el inicio y evolución de la lesión pulmonar, entre los mediadores celulares se encuentran los PMN, a los cuales se les ha llamado células mediadoras centrales del SIRA, estas células inician la lesión a partir del endotelio pulmonar.³⁷

Los PMN se encargan de la defensa celular primaria contra bacterias, al ser activados por citocinas como el TNF- α pierden su capacidad para deformarse debido a modificaciones en el citoesqueleto de la célula, y quedan atrapados en la microcirculación pulmonar. A su vez expresan las moléculas de adhesión CD11/18 (LFA-1 y Mac-1), las cuales se unen a las moléculas de adhesión ICAM-1 e ICAM-2 del endotelio activado.^{38,39,40}

Los PMN activados liberan mediadores químicos tales como: fragmentos de complemento (C5a, C3a), enzimas proteolíticas del plasma, metabolitos del ácido araquidónico (tromboxano A2, prostaglandinas), lípidos vasoactivos (factor activador de las plaquetas), aminas (histamina, serotonina), radicales tóxicos del oxígeno y citocinas.^{41,42}

1.4 Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)

El TNF- α es una citocina producida principalmente por macrófagos activados, y por otras células. Tiene un amplio espectro de acciones biológicas sobre numerosas células blanco inmunes y no inmunes. Existen numerosos reportes de que el TNF- α participa en la producción del SIRA. También se produce el TNF- β (linfotóxina) por los linfocitos T. Ambos son polipéptidos y son liberados en respuesta a estímulos como: endotoxinas (LPS), enterotoxinas, hongos, etc.³⁸ El TNF- α induce a PMN y a células endoteliales a expresar moléculas de adhesión en el lecho vascular del pulmón.^{43,44,45}

Así mismo se ha demostrado la participación de otros mediadores químicos como las interleucinas 6 y 8 (IL-6 e IL-8), entre otros. Estos se han relacionado con la acumulación de PMN en el lecho capilar del pulmón y pueden tener cierto valor pronóstico acerca del riesgo de desarrollar el SIRA.^{46,47}

El TNF- α es secretado por una amplia variedad de células, además de los macrófagos y los monocitos. Entre estas células se encuentran los linfocitos T, adipocitos, queratinocitos, osteoblastos, mastocitos, células beta del páncreas, astrocitos, endotelio, neuronas y muchas otras.⁴⁵

1.5 JUSTIFICACIÓN

El interés de este estudio es el de analizar la histología y la ultraestructura del pulmón de ratón cuando se administra una dosis tóxica por vía i.v. de PA1 en vehículo Haemacel, ya que ésta vía y este vehículo son los utilizados para su administración en pacientes con carcinoma terminal sin tratamiento alternativo en estudios de fase clínica I.

No existen estudios en los que se cuantifique el TNF- α en suero y sobrenadante del homogenado pulmonar posterior a la intoxicación i.v. de PA1.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

1.6 OBJETIVO GENERAL

Evaluar y cuantificar la presencia de células PMN, macrófagos alveolares y linfocitos presentes en la lesión pulmonar causada por una dosis tóxica por vía i.v. de PA1 en vehículo Haemacel y correlacionarlo con los valores de TNF- α presentes en suero y pulmón.

1.7 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1. Evaluar la histología del pulmón en ratones CD-1 tratados por vía i.v. con PA1 en Haemaccel, y en los siguientes grupos control:**
 - a) Control vehículo Haemaccel.**
 - b) Control positivo tratado con lipopolisacárido (LPS).**
 - c) Control sin tratamiento.**
 - 2. Cuantificar mediante un análisis morfométrico la cantidad de PMN, macrófagos alveolares y linfocitos presentes en el pulmón.**
-
- 3. Evaluar el pulmón mediante microscopía electrónica de transmisión.**
 - 4. Cuantificar el TNF- α en el suero y en el sobrenadante del homogenado pulmonar por el método de ELISA.**

CAPÍTULO 2

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Material biológico utilizado

Se utilizaron ratones albinos adultos jóvenes cepa CD-1. Todos los ratones pesaron entre 30 y 35 g. Estos animales fueron obtenidos del bioterio del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

2.2 Equipo utilizado

Balanza de barra triple Analit® modelo 4066.

Báscula analítica Mettler AE 160.

Vortex VX100 y microcentrífuga Spectrafuge 16M de Labnet.

Centrífuga Beckman GS-15R.

Potenciómetro Orion Research modelo 601 A / digital ionalyzer.

Placa caliente Corning Hot Plate Stirrer PC-351.

Estufa eléctrica Equiphos S.A.

Autoclave Market Forge Sterilmatic Modelo STM-E.

Congelador Revco de -70 °C.

Refrigerador Supermatic® modelo 0803.

Campana de extracción.

Ultramicrotomo RMC MT-X.

Preparador de cuchillas LKB BROMMA 7800 KnifeMaker.

Microscopio estereoscópico American Optical Corp. modelo 569.

Microscopio de luz de campo claro EAGLE modelo CM240.

Fotomicroscopio modelo I de Carl Zeiss.

Microscopio electrónico de transmisión modelo EM109 de Carl Zeiss.

Homogenizador de tejidos Bellco de 30-110 r.p.m., 110 volts y 50/60 Hz, con émbolo de teflón y vaso de vidrio Potter-Elvehjem

Espectrofotómetro Milton Roy Spectronic 601.

Lavador automático de placas de ELISA ImmunoWash modelo 1575 de Bio-Rad.

Lector de placas de ELISA Benchmark Microplate Reader de Bio-Rad.

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

2.3 Reactivos utilizados

Haemacel® Poligelina, lote BCH9016, fabricado en Alemania por Hoechst

Marion Roussel Deutschland GmbH.

Lipopolisacárido bacteriano BE. coli 055:B5 Bacto® lote 93251JA.

Peroxisomicina A1 (lote 86), aislada y purificada en el Laboratorio de Extracción del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la UANL. Este compuesto antracenónico, fue proporcionado por el Dr. Alfredo Piñeyro López. Se almacenó a -20 °C, protegido de la luz y de la humedad mientras fue utilizado.

Reactivos utilizados en la técnica de microscopía electrónica y microscopía de luz: glutaraldehído, hidróxido de sodio, cacodilato de sodio, tetraóxido de osmio, nitrato de uranilo, resinas epóxicas Pelco® Eponate de Ted Pella Inc., azul de toluidina, borato de sodio, acetato de uranilo y citrato de plomo de Electron Microscopy Sciences. Acetona, ácido pícrico, paraformaldehído y ácido clorhídrico de Analítica Inc. Siempre se utilizó agua ultrapura.

Material de consumo usado en microscopía: estuche de disección, navajas de un filo, hojas para bisturí, aplicadores de madera, moldes de inclusión, vasos de precipitado, pipetas, probetas, viales, rejillas de cobre de Electron Microscopy Sciences. Cuchillas de vidrio y de diamante de Pelco® International. Rollos de película a color Fuji film asa-100 para el fotomicroscopio, rollos de película blanco y negro Agfa-Gevaert AG para el microscopio electrónico, papel para impresión de micrografías en blanco y negro Eastman Kodak Company.

Reactivos utilizados para la homogenización del pulmón: PMSF (fenil metil sulfonil fluoruro), CHAPS (3-[(3-colamidopropil) dimetil amonio] 1 propano sulfonato) de Sigma. Para la determinación de la concentración de proteínas por el método de Lowry se usó: albúmina sérica bovina Cat. A-7906 y Folin-Ciocalteu de Sigma, ácido tricloroacético, tartrato de sodio y potasio, sulfato de cobre y carbonato de sodio de Productos Químicos Monterrey.

Para determinar el TNF- α se utilizó el kit comercial IDELISA™ Mouse TNF- α (IDEL-MuTa-96) de ID Labs Inc. Pipetas automáticas simples de 200 μ l y de 1,000 μ l, y múltiple de 50 μ l, puntillas para pipetas, recipiente con hielo frapé.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2.4 Grupos experimentales

Se utilizaron 64 ratones albinos machos, de la cepa CD-1, cada uno de ellos pesó entre 30 y 35 g. Fueron divididos en 14 grupos, de la siguiente manera: cinco grupos de 5 ratones cada uno, fueron tratados con PA1. Se les administró una d.u. de 28 mg/Kg de peso corporal, la cual equivale a 2DL₅₀ determinada para esta especie. La PA1 se administró por vía i.v. utilizando Haemaccel como vehículo. Cinco grupos de 5 ratones cada uno, fueron tratados solamente con el vehículo Haemaccel, se les administró una d.u. de 11.2 ml/Kg de peso corporal en d.u. a cada uno.

Tres grupos de 3 ratones cada uno se utilizaron como control positivo de daño pulmonar, a estos ratones se les administró una d.u. de 0.1 mg (100 µg) de LPS en 0.2 ml de solución fisiológica estéril por vía i.v. Un grupo de 5 ratones se utilizó como control sin tratamiento. En la figura 3 se muestra de manera esquemática y general, el diseño experimental que se llevó a cabo para la realización de este trabajo.



Figura 3. Diseño experimental del trabajo.

2.5 Preparación y administración de la PA1

La peroxisomicina A1 fue pesada en una balanza analítica Mettler AE 160, en un vial de vidrio de fondo plano previamente esterilizado. Posteriormente se agregó el vehículo Haemaccel gota a gota, mezclando cuidadosa y lentamente

con un agitador de vidrio previamente esterilizado, hasta obtener una suspensión homogénea.

Una vez que los ratones completaron un ayuno de 8 h, se les administró una d.u. de PA1 en Haemaccel por vía i.v., a través de la vena lateral derecha de la cola, previa asepsia con alcohol. Se utilizaron jeringas de 0.5 ml para insulina con aguja ultra fina de calibre 30 G para este propósito. Se aplicó la dosis completa de PA1 a cada ratón en un lapso de 30 seg aproximadamente, asegurando que recibiera la totalidad de la dosis por esa vía sin romper la vena y sin infiltrar los tejidos blandos de la cola. Para la administración de vehículo Haemaccel se realizó el mismo procedimiento.

El LPS fue pesado de la misma manera que la PA1, posteriormente se disolvió con solución fisiológica estéril en un vial de vidrio de fondo plano previamente esterilizado. Se aplicó una d.u. de 100 µg de LPS en 0.2 ml de solución fisiológica por vía i.v. a cada ratón. Los ratones que recibieron vehículo Haemaccel y PA1 en Haemaccel por vía i.v. se sacrificaron a las 0.5 h, 1 h, 1.5 h, 3 h y 4.5 h después del tratamiento. Los ratones tratados con LPS por vía i.v. se sacrificaron a las 1.5 h, 3 h y 4.5 h. Los ratones que no recibieron ningún tratamiento, se sacrificaron posterior al ayuno de 8 h.

2.6 Obtención de las muestras de sangre y pulmón

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y se colocaron en una base de madera con corcho para su disección. Se realizó asepsia del abdomen con alcohol etílico al 70 % y se abrió la cavidad abdominal. Se realizó una punción en la vena cava inferior y se obtuvo la mayor cantidad de sangre posible. Se usaron jeringas de 3 ml con aguja de calibre 27 G para este propósito. La sangre que se obtuvo fue colocada en viales Eppendorf de 1.5 ml

previamente esterilizados y etiquetados. Se abrió la cavidad torácica y se extrajeron ambos pulmones, el pulmón derecho se almacenó a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ para el análisis bioquímico.

El pulmón izquierdo fue fragmentado en porciones de 0.5 mm de diámetro y se fijaron en solución de Karnovsky-Ito dentro de viales de vidrio. Los detalles sobre la preparación de esta solución se encuentran en el Apéndice H.

2.7 Procesamiento de las muestras

La sangre se dejó coagular y luego fue centrifugada a 2,500 r.p.m. por 5 min hasta separar el suero. Posteriormente se formó un "pool" de 5 sueros para cada tiempo experimental y se almacenaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ junto con el pulmón derecho de cada ratón hasta obtener todas las muestras. Los fragmentos del pulmón izquierdo fueron fijados en solución de Karnovsky-Ito (Apéndice H), se postfijaron en tetraóxido de osmio y se procesaron hasta su inclusión en resinas epóxicas (Apéndice A).

A partir de los bloques obtenidos se realizaron cortes semifinos y finos para su observación a microscopía de luz y a microscopía electrónica de transmisión, respectivamente. Los cortes semifinos fueron teñidos con azul de toluidina (Apéndice B), en ellos se evaluó la histología de la lesión pulmonar, comparando siempre los cortes de pulmón del grupo de ratones tratado con PA1 en Haemaccel con los grupos control sin tratamiento, control tratado con vehículo y control positivo tratado con LPS. También se usaron para el análisis morfométrico. Los cortes finos se prepararon según el Apéndice C y luego se utilizaron para evaluar la ultraestructura del daño pulmonar bajo un microscopio electrónico de transmisión Carl Zeiss EM109, comparando los mismos grupos experimentales.

2.8 Análisis morfométrico y estadístico

En los cortes semifinos teñidos con azul de toluidina se contabilizaron las siguientes células: PMN, linfocitos y macrófagos alveolares. Este conteo se realizó bajo microscopía de luz usando el objetivo 100x y ocular 10x. Se contabilizó el total de perfiles celulares por cada 100 alveólos revisados en forma aleatoria y de cada ratón. Se calculó la media de cada perfil celular y su desviación estándar. Posteriormente se graficaron en función del tiempo experimental. La fig. 11 muestra estos resultados, cada punto de la gráfica representa la media de cinco conteos con su desviación estándar.

Estos datos fueron sometidos a una contrastación estadística con la prueba t-Student pareada, comparándose siempre los datos obtenidos de los grupos problema tratados con PA1 en Haemaccel y sus controles correspondientes. La significancia estadística se representa en todas las gráficas con un asterisco.

2.9 Homogenización de pulmón para la cuantificación de TNF- α

Este proceso se llevó a cabo en un homogenizador Bellco de 50-60 Hz. Una vez obtenido el pulmón derecho se homogenizó en 1.5 ml de solución salina balanceada de Hanks fría (4 °C) que contenía: 2 nM 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 14,000 r.p.m. por 30 min. Posteriormente se separó el sobrenadante y se midió el volumen total. Se formaron "pools" de sobrenadantes para cada tiempo experimental con 50 μ l de sobrenadante de cada pulmón. Se realizó una cuantificación de TNF- α por el método de ELISA con un kit comercial y la cuantificación de proteínas por el método de Lowry.

2.10 Cuantificación de TNF- α por ELISA

Se utilizó el kit IDELISA™ Mouse TNF- α . Es un inmunoensayo enzimático tipo sandwich, con el cual se cuantifican las formas libres de TNF- α de ratón. Se visualiza por medio de la enzima fosfatasa alcalina conjugada a streptavidina, a la cual se le agrega un sustrato cromogénico. El procedimiento completo, la curva de calibración y la ecuación utilizadas para el cálculo de la concentración de las muestras problema, se encuentran referidos en el Apéndice D y E.

2.11 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo por el método de Lowry. Esto se realizó con el fin de calcular la concentración de TNF- α por mg de proteína presente en el sobrenadante del homogenado pulmonar. Primero se obtuvo una curva de calibración estándar de proteínas, con albúmina sérica bovina a concentraciones conocidas. Una vez obtenida esta curva de calibración patrón, se calculó la concentración de proteína en el sobrenadante, usando un análisis de regresión lineal.

Se precipitaron las proteínas con ácido tricloroacético al 10 %, luego se le agregó al precipitado una mezcla de tartrato de sodio y potasio al 6 %, sulfato de cobre al 0.3 %, carbonato de sodio al 30 %, hidróxido de sodio al 0.8 N y agua ultrapura (Apéndice L). Después de reposar por 10 min. se le agregó una mezcla del reactivo de Folín-Ciocalteau al 2 N y agua ultrapura, dejando reposar 30 min. a temperatura ambiente y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a una λ de 660 nm, ajustando con el blanco de reactivo previamente. Los detalles del procedimiento y la curva de calibración se incluyen en los Apéndices F y G.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Descripción histológica del pulmón a microscopía de luz

3.1.1 Control sin tratamiento

Las muestras de pulmón obtenidas de los ratones que no recibieron tratamiento fueron utilizadas para revisar la histología normal de la región alveolar. En estas muestras, los espacios aéreos se observaron limpios y bien distendidos, ocasionalmente se encontraron macrófagos alveolares dentro de ellos. En los tabiques interalveolares que limitan a los espacios aéreos, se observó a los capilares ocupados principalmente por eritrocitos (fig. 4A). Se observaron algunas fibras elásticas presentes en el intersticio, debido a su afinidad por el colorante azul de toluidina. Se observó el epitelio que tapiza a los tabiques interalveolares, formado por neumocitos tipo I y tipo II, de aspecto normal.

3.1.2 Control tratado con vehículo Haemaccel®

A las 0.5 h posteriores al tratamiento con vehículo Haemaccel por vía i.v., se encontraron áreas con aparente reducción del espacio aéreo y un incremento en el grosor de la pared alveolar (fig. 4B). Se observó la presencia de un infiltrado de células inflamatorias, formado principalmente por células polimorfonucleares (PMN) y por algunos linfocitos. El endotelio, los neumocitos tipo I y tipo II se observaron de apariencia normal. En las muestras de pulmón obtenidas 1 h después del tratamiento, se observaron células PMN ocupando la luz de los capilares (fig. 5A).

A las 1.5 h, 3 h y 4.5 h posteriores al tratamiento, se observó un aparente aumento de macrófagos alveolares con citoplasma vacuolado en la luz de los espacios aéreos (figuras 5B, 6A y 6B), linfocitos (figuras 5B y 6B) y PMN en la luz capilar. Las células endoteliales, los neumocitos tipo I y neumocitos tipo II conservaron en algunas áreas una apariencia normal y en otras presentaron ligero edema.

3.1.3 Tratamiento con PA1 en Haemacel

En los cortes de pulmón de los ratones tratados con una dosis tóxica de PA1 en vehículo Haemacel, se observó un incremento en el grosor de los tabiques interalveolares, debido a congestión vascular y un infiltrado inflamatorio, formado principalmente por células PMN. Este infiltrado inflamatorio fue muy notorio desde las 0.5 h y 1 h posteriores al tratamiento (figuras 7A y 7B). Los neumocitos tipo I y tipo II conservaron su aspecto normal. A las 1.5 h se pudo observar la presencia de exudado presente en la luz de los espacios aéreos (fig. 8A). También se observó la presencia de edema en los neumocitos tipo I y en el endotelio capilar. Dentro de los capilares se observaron células PMN y linfocitos.

A las 3 h posteriores al tratamiento, se observaron áreas de microhemorragia (fig. 8B). Se observó un aparente incremento de macrófagos alveolares presentes en los espacios aéreos y se observaron células PMN y algunos linfocitos dentro de los capilares. Las células endoteliales y los neumocitos tipo I presentaron edema. A las 4.5 h posteriores al tratamiento, se observaron áreas de microhemorragia, con abundantes eritrocitos dentro de la luz alveolar (fig. 9A). También fue muy notoria la presencia de áreas con exudado en los espacios aéreos. Los tabiques interalveolares se observaron engrosados, debido a congestión vascular y a la presencia de células PMN y algunos linfocitos. El endotelio y los neumocitos tipo I mostraron edema. También se observó un aparente incremento de macrófagos alveolares.

3.1.4 Control positivo de daño pulmonar tratado con LPS

En las muestras de pulmón obtenidas 1.5 h posterior al tratamiento con LPS por vía i.v. se observó un engrosamiento de las paredes alveolares, ocasionado por congestión vascular y por infiltrado inflamatorio compuesto principalmente por células PMN (fig. 9B) y por algunos linfocitos. Se observaron áreas de microhemorragia y exudado en el espacio aéreo. En los cortes de 3 h y 4.5 h posteriores al tratamiento se observaron áreas de exudado, edema celular y microhemorragia (figuras 10A y 10B). Se observó un aparente aumento de macrófagos alveolares (fig. 10B) y edema en las células endoteliales y los neumocitos tipo I.

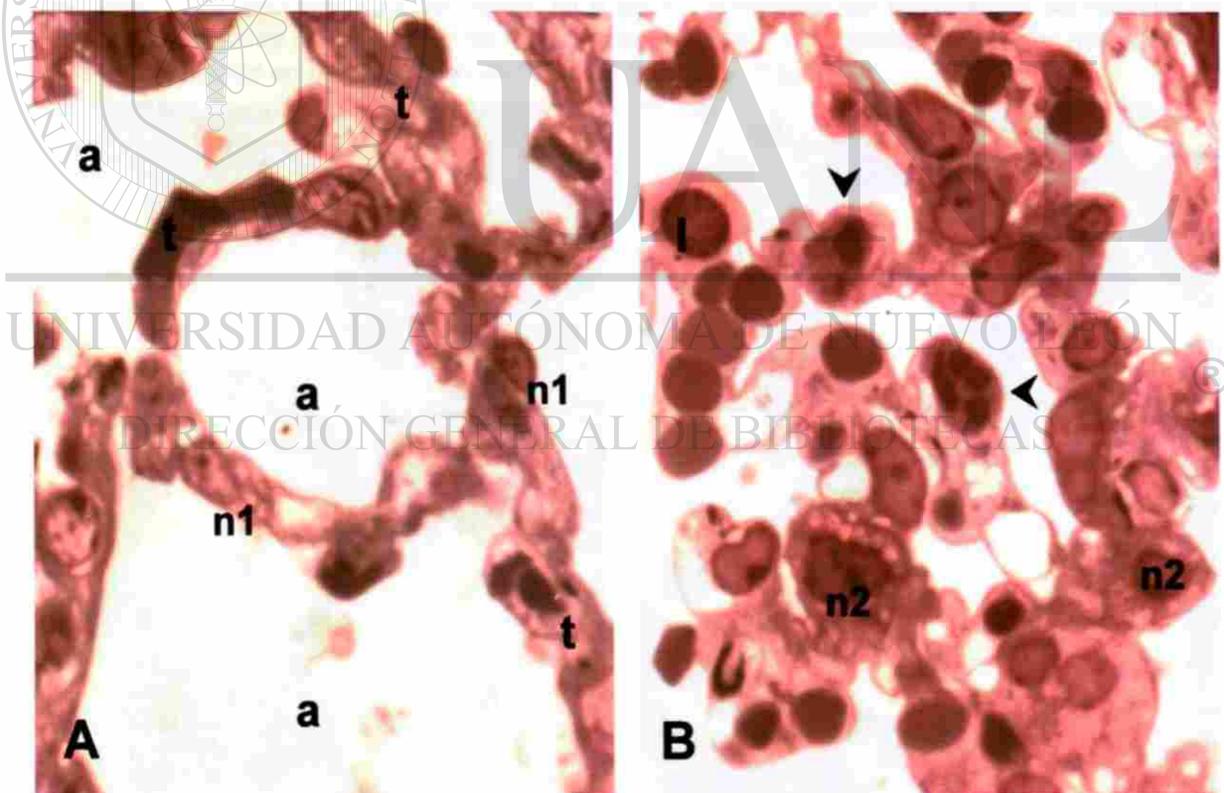


Figura 4. Pulmón de ratón. A) Sin tratamiento, se observa el espacio alveolar (a) bien distendido, tabiques interalveolares (t) delgados, cuyos capilares están ocupados por eritrocitos. Neumocitos tipo I (n1) delgados y de aspecto normal. B) A las 0.5 h posterior al tratamiento con Haemacel por vía i.v. Nótese un incremento en el grosor de la pared alveolar, células polimorfonucleares (cabezas de flecha) y linfocito (l). Los neumocitos tipo II (n2) se observan de aspecto normal. Inclusión en resinas epóxicas. Azul de toluidina. 126x.

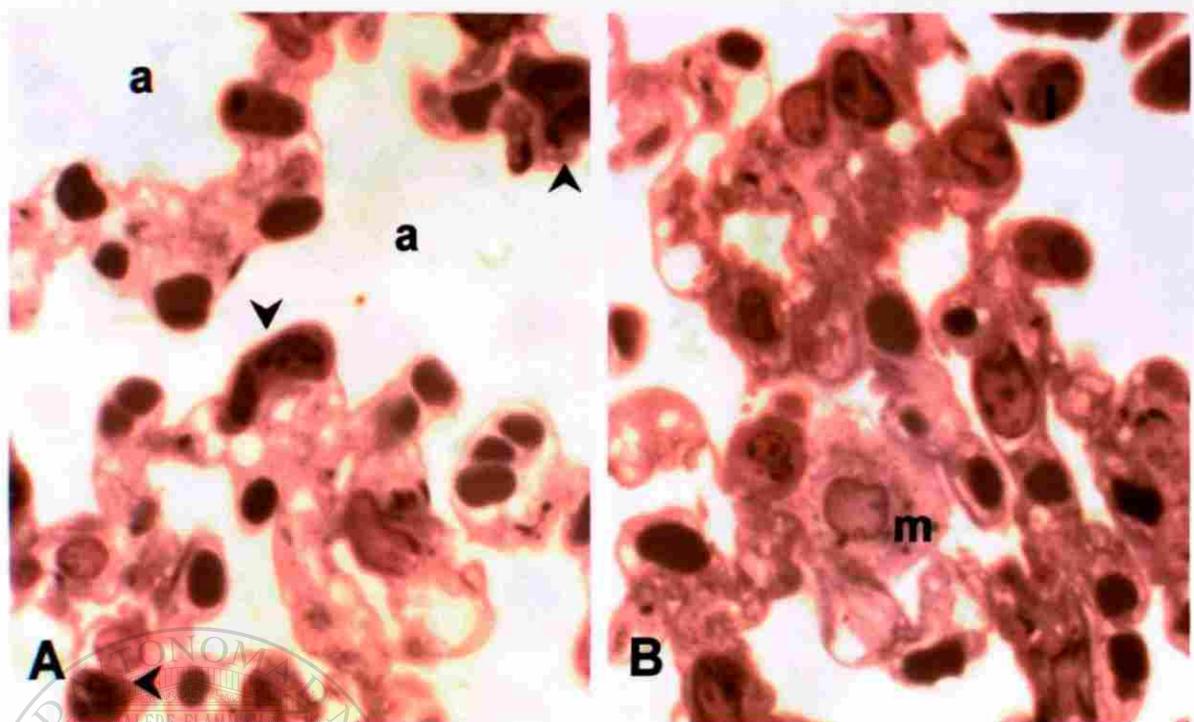


Figura 5. Pulmón de ratón. A) 1 h posterior al tratamiento con vehículo Haemacel por vía i.v. Espacio alveolar limpio (a), polimorfonucleares (cabezas de flecha) atrapados en los capilares de los tabiques interalveolares. B) A las 1.5 h después del tratamiento. Se observa un linfocito (l) presente en un capilar del tabique interalveolar y un macrófago alveolar (m) en la luz alveolar. Inclusión en resinas epóxicas. Azul de toluidina. 126x.

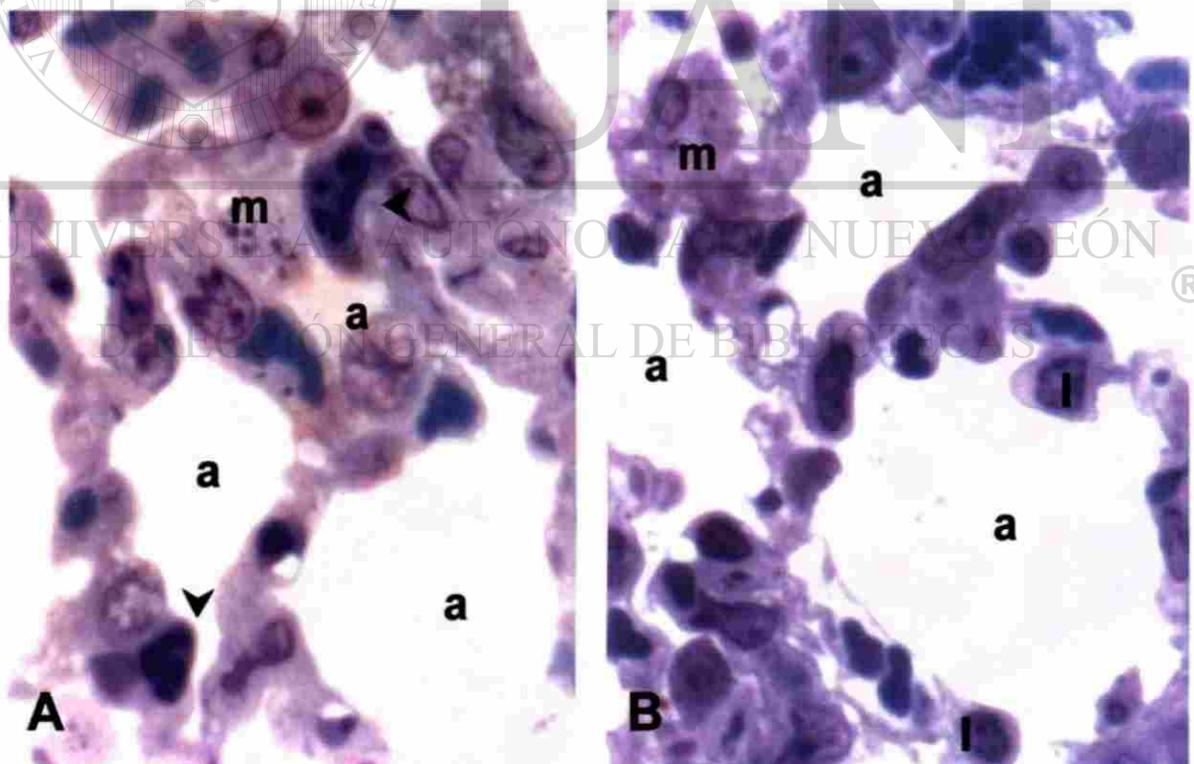


Figura 6. Pulmón de ratón. A) A las 3 h después del tratamiento con Haemacel por vía i.v. Se observa un macrófago (m) dentro de un espacio alveolar (a), polimorfonucleares (cabezas de flecha) dentro de los capilares. B) A las 4.5 h posterior al tratamiento con Haemacel por vía i.v. En esta sección del corte se aprecian linfocitos (l) presentes en los capilares de los tabiques interalveolares y un macrófago alveolar (m) en el espacio aéreo (a). Inclusión en resinas epóxicas. Azul de toluidina. 126x.

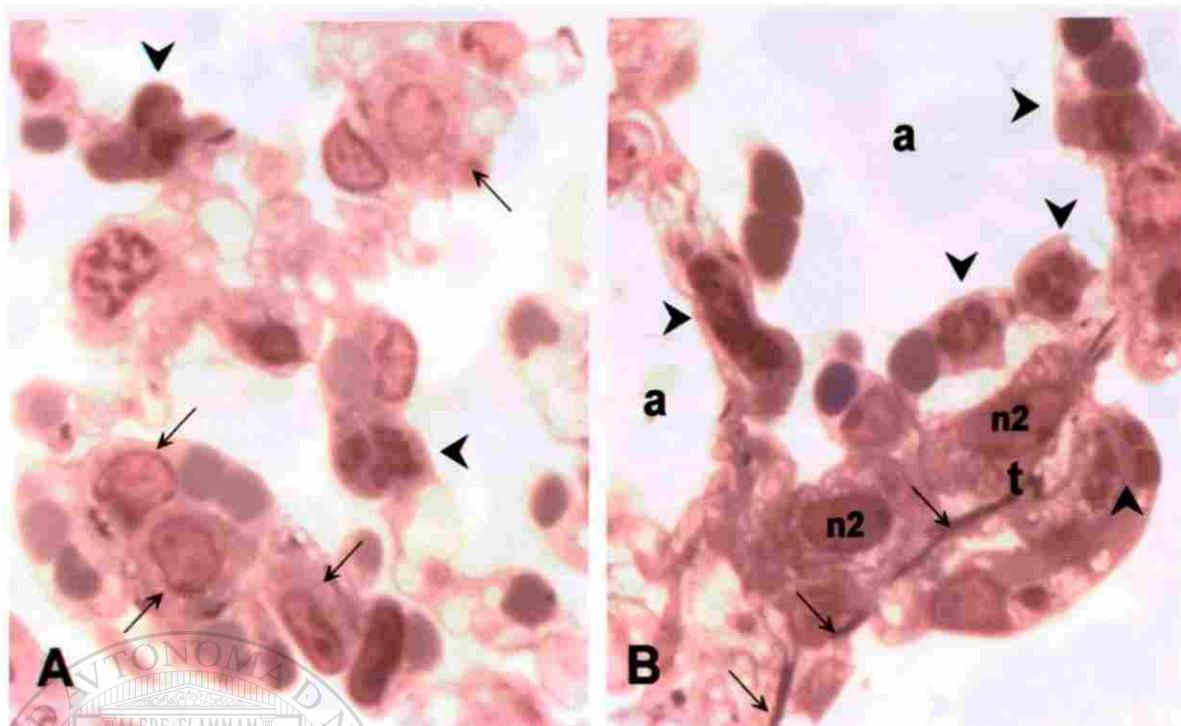


Figura 7. Pulmón de ratón. A) A las 0.5 h posterior al tratamiento con PA1 en Haemacel por vía i.v. Polimorfonucleares (cabezas de flecha) atrapados en los capilares, neumocitos tipo II de aspecto normal (flechas). B) 1 h después del tratamiento con PA1 en Haemacel por vía i.v. Polimorfonucleares (cabezas de flecha) en los capilares, engrosamiento de la pared del tabique interalveolar (t). Fibras elásticas (flechas) y neumocitos tipo II (n2) de aspecto normal, luz alveolar (a) aparentemente limpia. Inclusión en resinas epóxicas. Azul de toluidina. 126x.

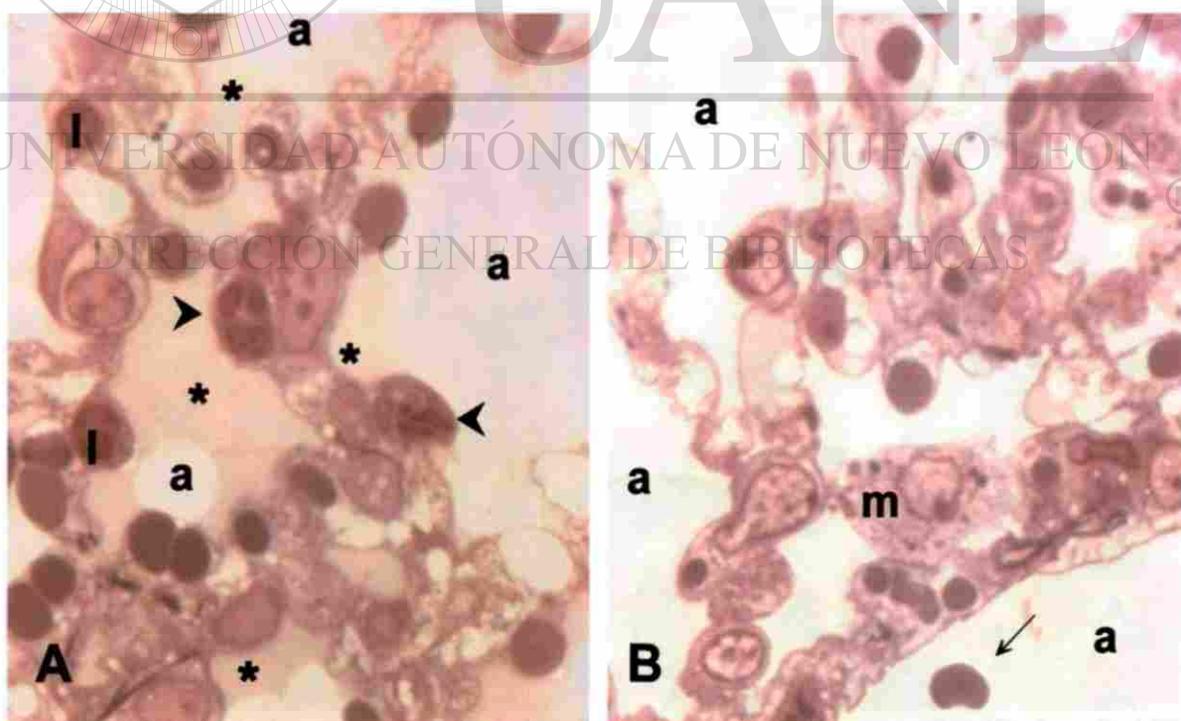


Figura 8. Pulmón de ratón. A) 1.5 h posterior al tratamiento con PA1 en Haemacel por vía i.v. Polimorfonucleares (cabezas de flecha) y linfocitos (l) en los capilares, ligera congestión vascular. Exudado (*) en la luz alveolar (a). B) A las 3 h posterior a la administración de PA1 en Haemacel por vía i.v. Microhemorragia (flecha) en el espacio aéreo (a), se observa un macrófago alveolar (m). Inclusión en resinas epóxicas. Azul de toluidina. 126x.

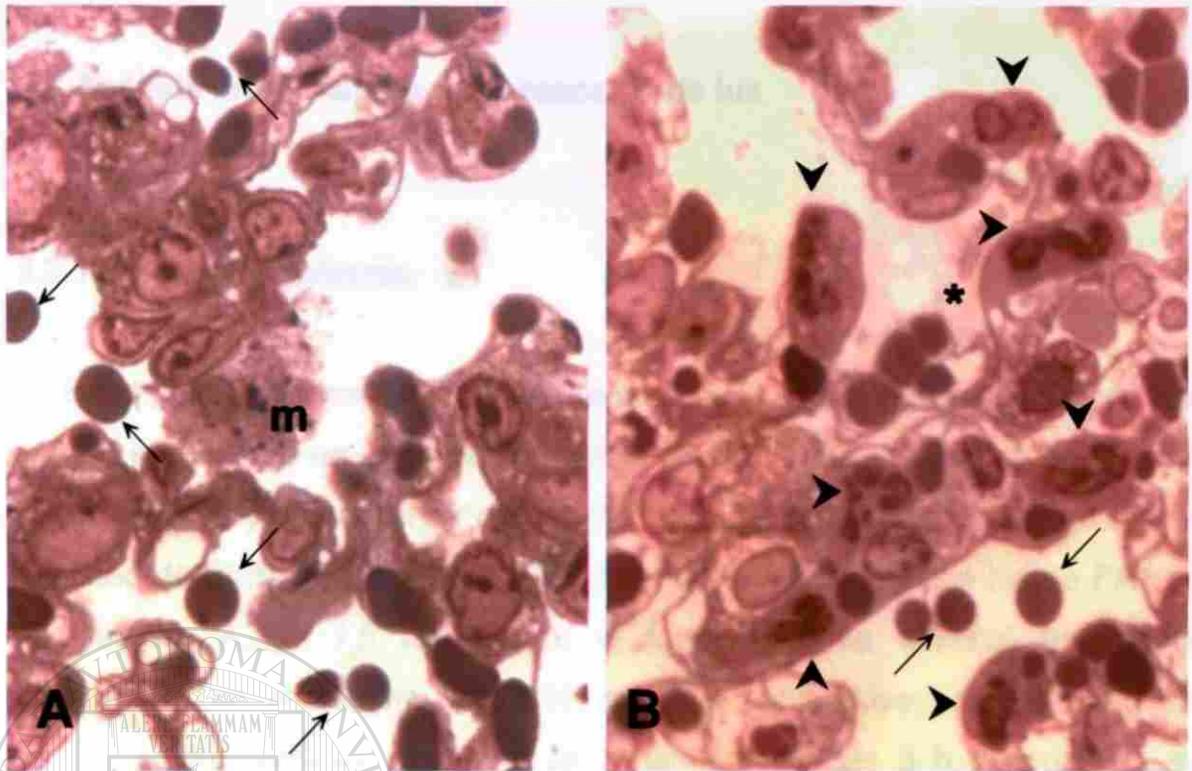


Figura 9. Pulmón de ratón. A) A las 4.5 h después del tratamiento con PA1 en Haemacel por vía i.v. Microhemorragia (flechas) y macrófago alveolar (m) presentes. B) A las 1.5 h después de la administración i.v. de LPS. Polimorfonucleares (cabezas de flecha), exudado (*) y microhemorragia (flechas). Inclusión en resinas epóxicas. Azul de toluidina. 126x.

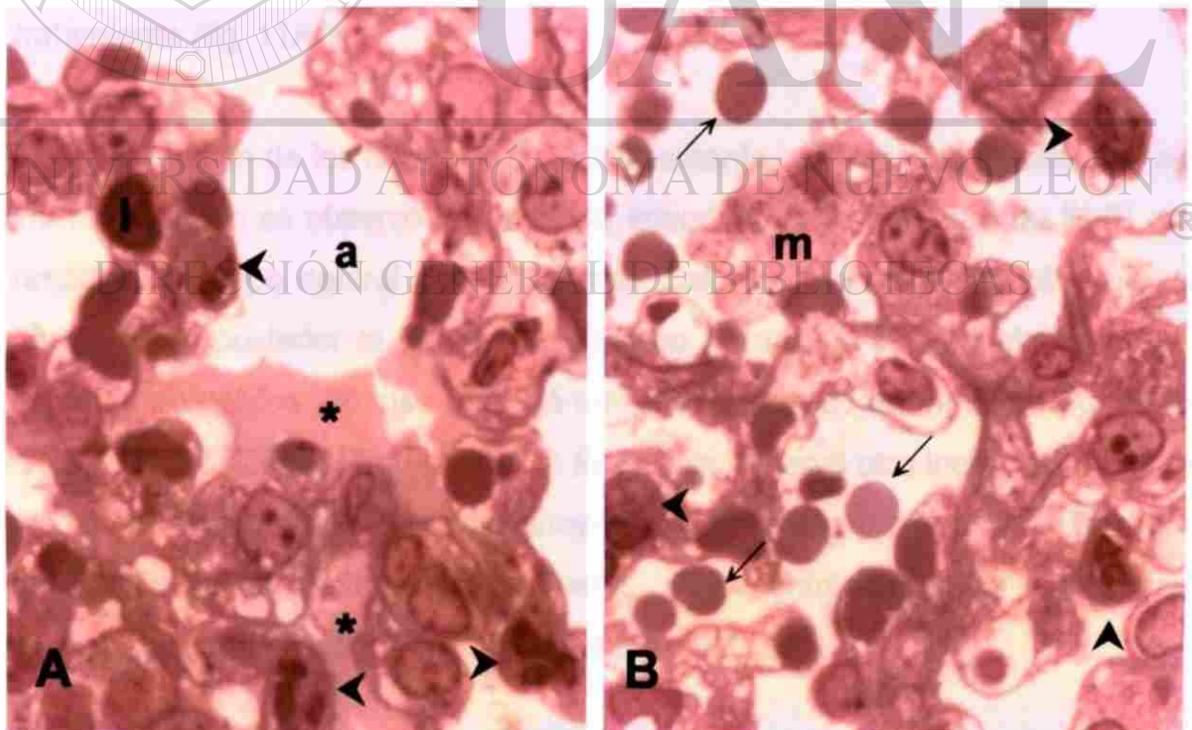


Figura 10. Pulmón de ratón. A) A las 3 h después de la administración i.v. de LPS. Polimorfonucleares (cabezas de flecha) y linfocito (l) dentro de capilares, exudado (*) en la luz alveolar (a). B) A las 4.5 h después de la administración i.v. de LPS. Microhemorragia en la luz alveolar (flechas), se observan polimorfonucleares (cabezas de flecha) y un macrófago alveolar (m). Inclusión en resinas epóxicas. Azul de toluidina. 126x.

3.2 Análisis morfométrico a microscopía de luz

3.2.1 Polimorfonucleares

En el pulmón de los ratones que fueron tratados con PA1 en Haemaccel por vía i.v. se observó un aumento de PMN presentes en la región alveolar. Este incremento se pudo observar desde 0.5 h posterior al tratamiento. La mayor cantidad de PMN se encontró 1 h después de la administración i.v. de PA1 en Haemaccel. A las 1.5 h posterior al tratamiento se observó una ligera disminución en el número de PMN, pero manteniéndose por arriba de los grupos control vehículo y control sin tratamiento. A las 3 h después de su administración i.v. se mantuvo esta tendencia y a las 4.5 h se observó otro ligero incremento en el número de PMN. En todos los tiempos experimentales se encontró diferencia significativa ($p < 0.001$) con respecto al grupo control sin tratamiento (fig. 11A).

En el pulmón de los ratones tratados solamente con vehículo Haemaccel por vía i.v. también se observó un aumento importante en el número de PMN con respecto al grupo control sin tratamiento. Este incremento se logró observar desde 0.5 h posterior al tratamiento, tiempo en el cual se encontró la mayor cantidad de células. Sólo se observó un ligero descenso en el número de PMN a las 1.5 h posterior al tratamiento. A las 3 h se observó otro incremento y a las 4.5 h el número de PMN disminuyó ligeramente. Al comparar los datos obtenidos con el control sin tratamiento, se encontró diferencia significativa ($p < 0.02$) en todos los tiempos experimentales.

Al comparar los datos de los grupos tratados con PA1 en Haemaccel por vía i.v. y los tratados solamente con vehículo Haemaccel por la misma vía, se encontró diferencia significativa ($p < 0.04$) en los tiempos 1.5 h y 4.5 h.

3.2.2 Macrófagos alveolares

En el pulmón de los ratones tratados con PA1 en Haemaccel por vía i.v. se observó una tendencia al aumento en el número de macrófagos alveolares en todos los tiempos revisados, pero sólo se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) a las 1.5 h y 3 h posteriores al tratamiento al compararlo con el grupo control sin tratamiento (fig 11B). Al comparar los datos obtenidos del tratamiento con vehículo Haemaccel por vía i.v. y el control sin tratamiento no se observó diferencia significativa. Al comparar los tratamientos PA1 en Haemaccel y vehículo Haemaccel, solamente se observó diferencia significativa ($p < 0.04$) a las 1.5 h posterior al tratamiento.

3.2.3 Linfocitos

En el pulmón de los ratones tratados con PA1 en Haemaccel se observó una tendencia al aumento en el número de linfocitos en función del tiempo. Al comparar los resultados obtenidos con el grupo control sin tratamiento se encontró diferencia significativa ($p < 0.005$) en los tiempos 1 h, 1.5 h, 3 h y 4.5 h (fig. 11C). En el pulmón de los ratones tratados con el vehículo Haemaccel también se observó la misma tendencia al aumento en función del tiempo, encontrándose diferencia significativa ($p < 0.04$) a las 1 h, 1.5 h, 3 h y 4.5 h posteriores al tratamiento. Al comparar los datos obtenidos del tratamiento con PA1 en Haemaccel y el control vehículo Haemaccel se encontró diferencia significativa ($p < 0.02$) a las 1 h y 1.5 h posterior al tratamiento.

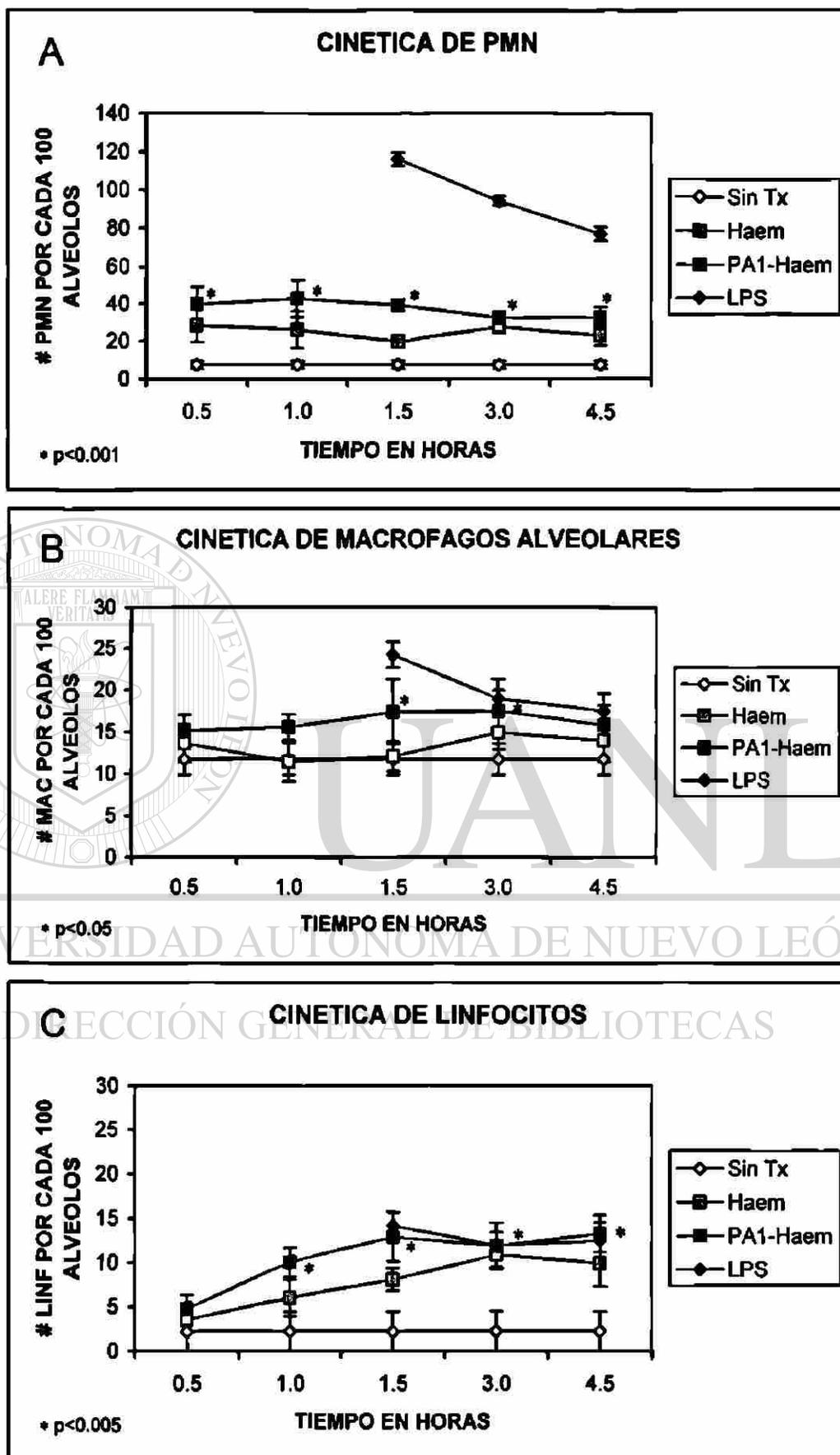


Figura 11. Cinéticas de PMN, macrófagos alveolares y linfocitos por cada 100 alveólos en el pulmón de ratón. Cada punto en la gráfica representa la media de 5 conteos con su desviación estándar. La diferencia significativa está representada por un asterisco (*).

3.3 Descripción ultraestructural del pulmón

3.3.1 Control sin tratamiento

En los cortes finos de pulmón de los ratones que no recibieron tratamiento se observó la ultraestructura normal. En estas preparaciones se observaron los espacios aéreos limpios y bien distendidos, ocasionalmente se encontró la presencia de macrófagos alveolares y de cuerpos lamelares (fig.12B) dentro de la luz alveolar. Los neumocitos tipo II mostraron una ultraestructura íntegra y de aspecto normal. Los neumocitos tipo I, las células endoteliales y la membrana basal, que forman la barrera alveólo-capilar, se observaron íntegros y de aspecto normal. Los capilares pulmonares se encontraron en la mayoría de los casos ocupados por eritrocitos (fig. 12), y ocasionalmente por PMN o linfocitos. En las células endoteliales se pudieron observar la presencia de vesículas pinocíticas en su interior.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

3.3.2 Control tratado con vehículo Haemaccel

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

En el pulmón de los ratones que fueron tratados con Haemaccel por vía i.v., se presentó edema en las células endoteliales desde las 0.5 h después del tratamiento (figuras 13A y 14A). Los neumocitos tipo I también mostraron edema desde este mismo tiempo experimental (figuras 13A, 14A y 14C), no se presentó daño aparente a la membrana basal. En la mayor parte de las áreas donde se localizó edema celular, se observaron PMN (figuras 13A y 14A) y linfocitos ocupando la luz de los capilares (fig. 13C), además se observaron ocasionalmente eosinófilos (datos no mostrados) y monocitos (fig. 15A). También se observó la presencia de macrófagos en la luz alveolar. Los neumocitos tipo II conservaron su apariencia normal.

3.3.3 Tratamiento con PA1 en vehículo Haemaccel

En los cortes finos de pulmón de los ratones que fueron tratados con PA1 en Haemaccel, se observó que existe daño en la región alveolar. Desde las 0.5 h posterior al tratamiento se encontró un engrosamiento del tabique interalveolar debido a congestión vascular, edema de las células endoteliales y alveolares tipo I, y la presencia de leucocitos atrapados en los capilares, principalmente PMN (figuras 13B, 13D, 14B y 15B). Se observó también la presencia de áreas con ruptura de los neumocitos tipo I (fig.13B).

En los cortes de pulmón de 1 h, 1.5 h, 3 h y 4.5 h posteriores al tratamiento, se encontraron áreas en las cuales se observó un notable edema celular (figuras 13D, 14B, 14D y 15B). Se observó la presencia de linfocitos y ocasionalmente algunos eosinófilos dentro de la luz capilar (datos no mostrados). La fig. 14D muestra la presencia de un macrófago alveolar con signos morfológicos de activación dentro de la luz alveolar. En la barrera alveolo-capilar se encontró un marcado edema de la célula endotelial y del neumocito tipo I, además de áreas de adelgazamiento y ruptura de la membrana basal. En los cortes de 1 h posterior al tratamiento, se observó la presencia de material granular electrodensó (exudado) en la luz alveolar (figuras 13D y 14B), y en los cortes de 4.5 h posterior al tratamiento se encontraron zonas de microhemorragia (fig. 15B).

3.3.4 Control positivo tratado con LPS

Los cortes finos de pulmón de los ratones que fueron tratados con LPS, sirven para comparar el daño pulmonar producido por este tratamiento con el daño producido por el tratamiento con PA1 en vehículo Haemaccel.

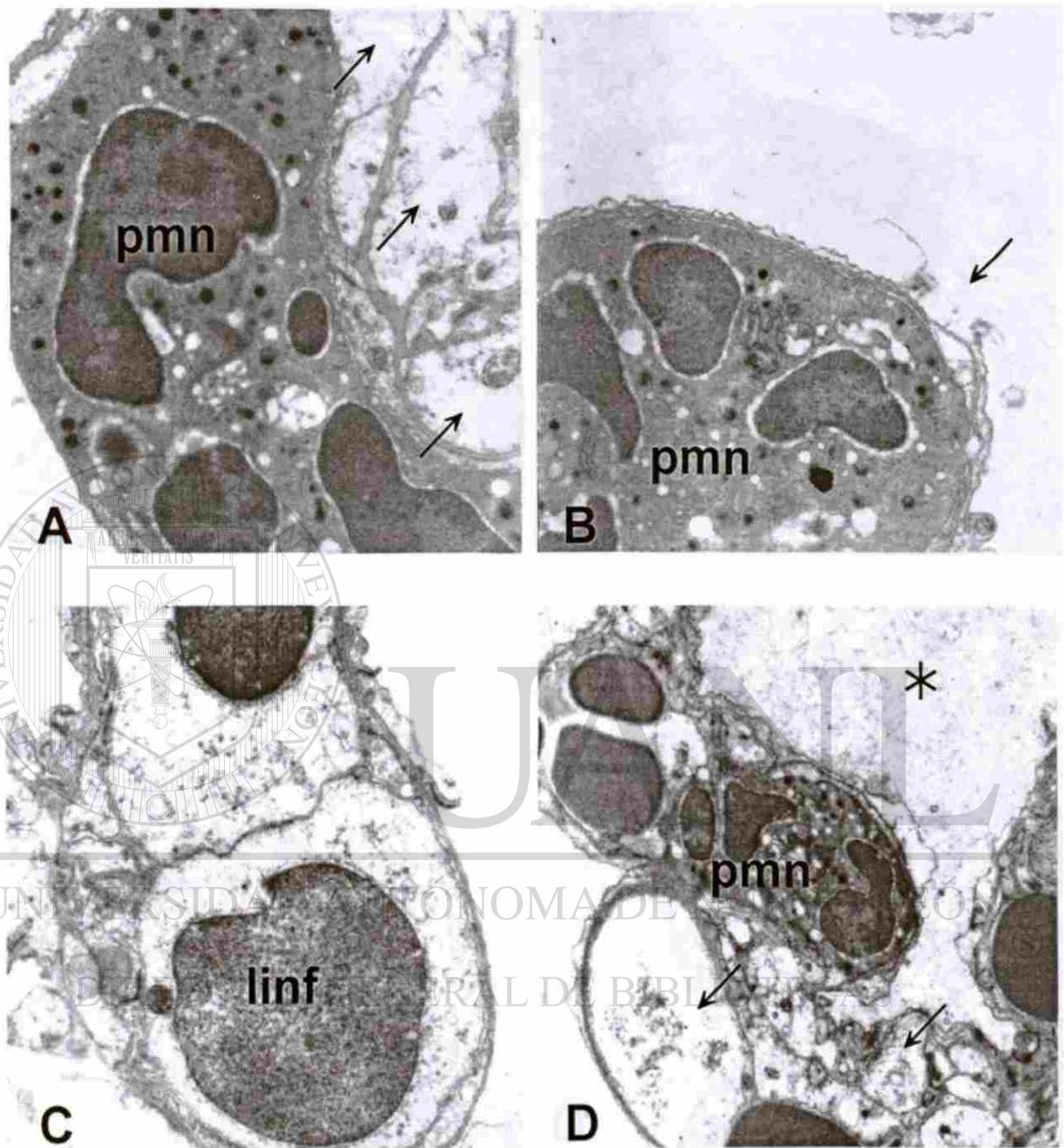


Figura 13. Pulmón de ratón. Micrografías electrónicas de transmisión. **A)** 0.5 h posterior al tratamiento i.v. con Haemaccel, polimorfonuclear (pmn) presente en un capilar de un tabique interalveolar, se observa edema celular (flechas), 7,000x. **B)** 0.5 h posterior al tratamiento i.v. con PA1 en Haemaccel. Se observa un polimorfonuclear (pmn) y ruptura del neumocito tipo II (flecha), 7,000x. **C)** 1 h posterior al tratamiento i.v. con Haemaccel. Linfocito (linf) presente en un capilar alveolar, 7,000x. **D)** 1 h posterior al tratamiento i.v. con PA1 en Haemaccel. Se observa un polimorfonuclear (pmn) atrapado en la luz de un capilar, edema de la célula endotelial y de los neumocitos tipo I (flechas). Nótese la presencia de exudado (*) en la luz alveolar. Inclusión en resinas epóxicas, 3,000x.

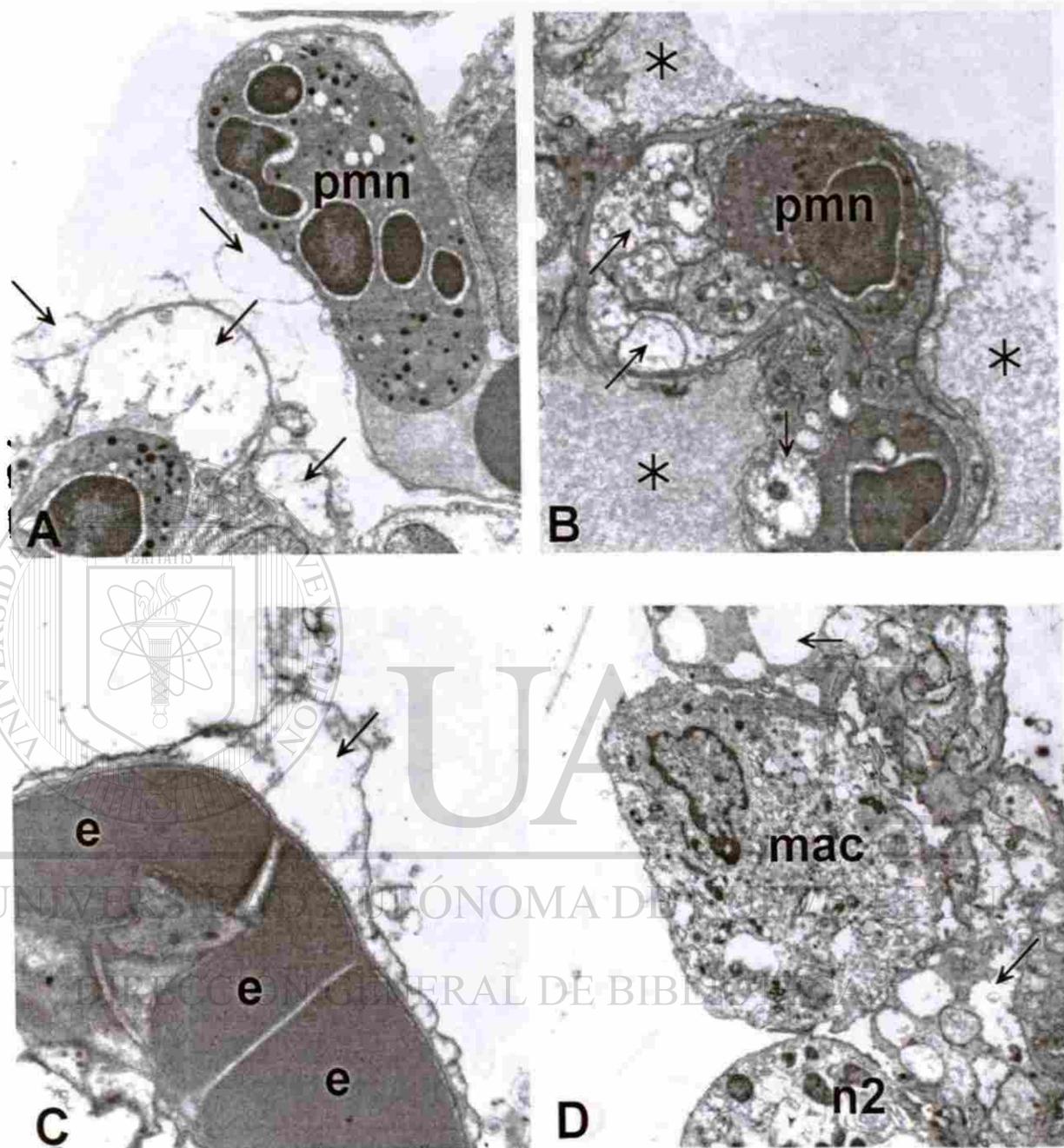


Figura 14. Pulmón de ratón. Micrografías electrónicas de transmisión. **A)** A las 1.5 h posterior al tratamiento i.v. con Haemaccel. Polimorfonucleares (pmn) dentro de la luz capilar del tabique interalveolar. Nótese el edema de las células endoteliales y de los neumocitos tipo I (flechas), 4,400x. **B)** A las 1.5 h después del tratamiento i.v. con PA1 en Haemaccel, se observa un polimorfonuclear (pmn) atrapado dentro de un capilar, edema de las células endoteliales (flechas) y la presencia de exudado (*), 4,400x. **C)** A las 3 h después del tratamiento i.v. con Haemaccel. En esta área se aprecian eritrocitos (e) ocupando un capilar alveolar y edema del neumocito tipo I (flecha), 7,000x. **D)** A las 3 h después del tratamiento i.v. con PA1 en Haemaccel. Se observa un macrófago alveolar (mac) dentro del espacio aéreo, edema celular (flechas) y parte de un neumocito tipo II (n2). Inclusión en resinas epóxicas, 3,000x.

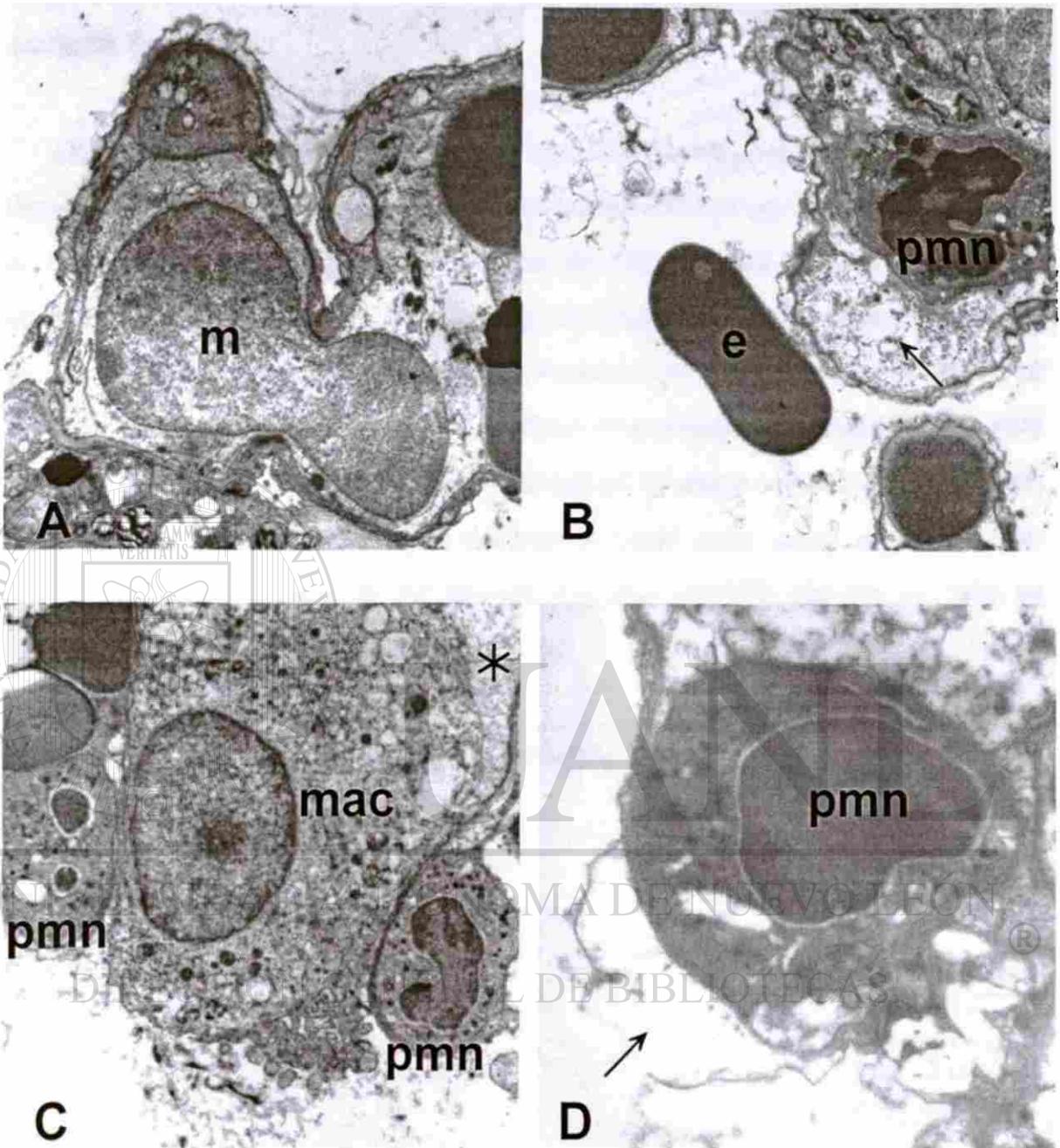


Figura 15. Pulmón de ratón. Micrografías electrónicas de transmisión. **A)** A las 4.5 h después del tratamiento i.v. con Haemaccel. Se aprecia un monocito (m) transitando dentro de la luz capilar, 4,400x. **B)** A las 4.5 h posterior al tratamiento i.v. con PA1 en Haemaccel. Se observa un polimorfonuclear (pmn), edema del endotelio capilar (flecha) y la presencia de un eritrocito (e) fuera de la luz capilar, 3,000x. **C)** Control positivo a las 1.5 h después del tratamiento i.v. con LPS. Se observa un macrófago alveolar (mac) transitando entre dos tabiques interalveolares, en los cuales se observan polimorfonucleares (pmn) en los capilares. Obsérvese el exudado (*), 3,000x. **D)** A las 3 h después del tratamiento i.v. con LPS. Se observa la presencia de un polimorfonuclear (pmn) dentro de la luz capilar. Obsérvese el adelgazamiento de la membrana basal, el edema celular y la ruptura del neumocito tipo I (flecha). Inclusión en resinas epóxicas, 7,000x.

3.4 Cuantificación de TNF- α en suero y homogenado pulmonar por el método de ELISA

En el suero de los ratones tratados con PA1 en Haemacel se observó un incremento de TNF- α 1 h después de su administración por vía i.v. A las 1.5 h se observó una caída en la concentración de TNF- α hasta 0 pg/ml de suero. A las 3 h y 4.5 h posteriores a su administración se muestra una ligera elevación. En el suero de los ratones tratados solamente con el vehículo Haemacel, no se encontró elevación de TNF- α en los tiempos experimentales estudiados en este trabajo. La concentración de TNF- α obtenida en el grupo control sin tratamiento fue de 0 pg/ml de suero. Las concentraciones más altas de TNF- α se obtuvieron en los sueros de los ratones tratados con LPS por vía i.v., que se usaron como control positivo (fig. 16).

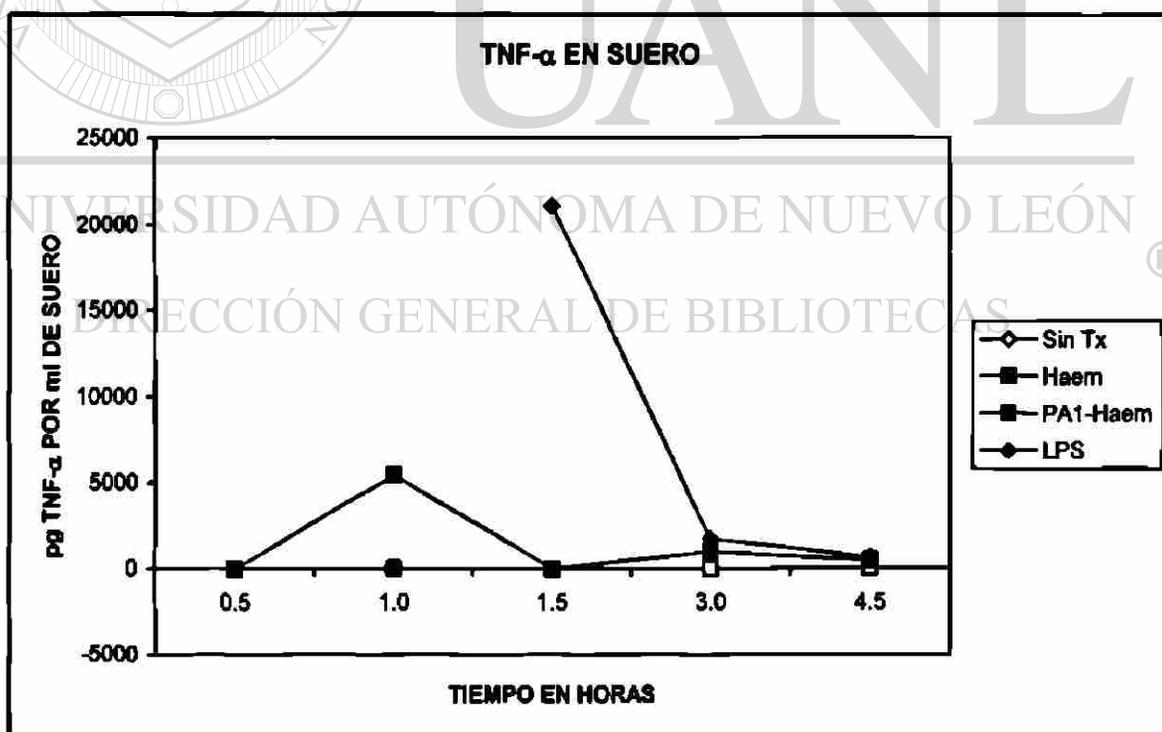


Figura 16. Cinética que muestra los resultados obtenidos de la cuantificación de TNF- α en el suero de los ratones. Cada punto de la gráfica representa un pool de sueros de 5 ratones para cada tiempo experimental y resultaron del promedio de 2 determinaciones.

En el sobrenadante del homogenado pulmonar de los ratones tratados con PA1 en Haemacel, se observó un aumento gradual en la concentración de TNF- α a partir de las 0.5 h, el pico máximo de TNF- α se observó a las 1.5 h posterior al tratamiento. Después de este tiempo se observó una disminución gradual de TNF- α pero sin llegar a 0 pg/mg de proteína. La administración i.v. de vehículo Haemacel, ocasionó un incremento en la concentración de TNF- α en el pulmón de los ratones a las 0.5 h, 1 h y 1.5 h posteriores al tratamiento. A las 3 h y 4.5 h se observó una disminución en la concentración de TNF- α , incluso por debajo de la encontrada en los ratones que no recibieron tratamiento. La concentración de TNF- α en los animales tratados con LPS mostraron los valores más altos, y se tomaron como control positivo (fig. 17).

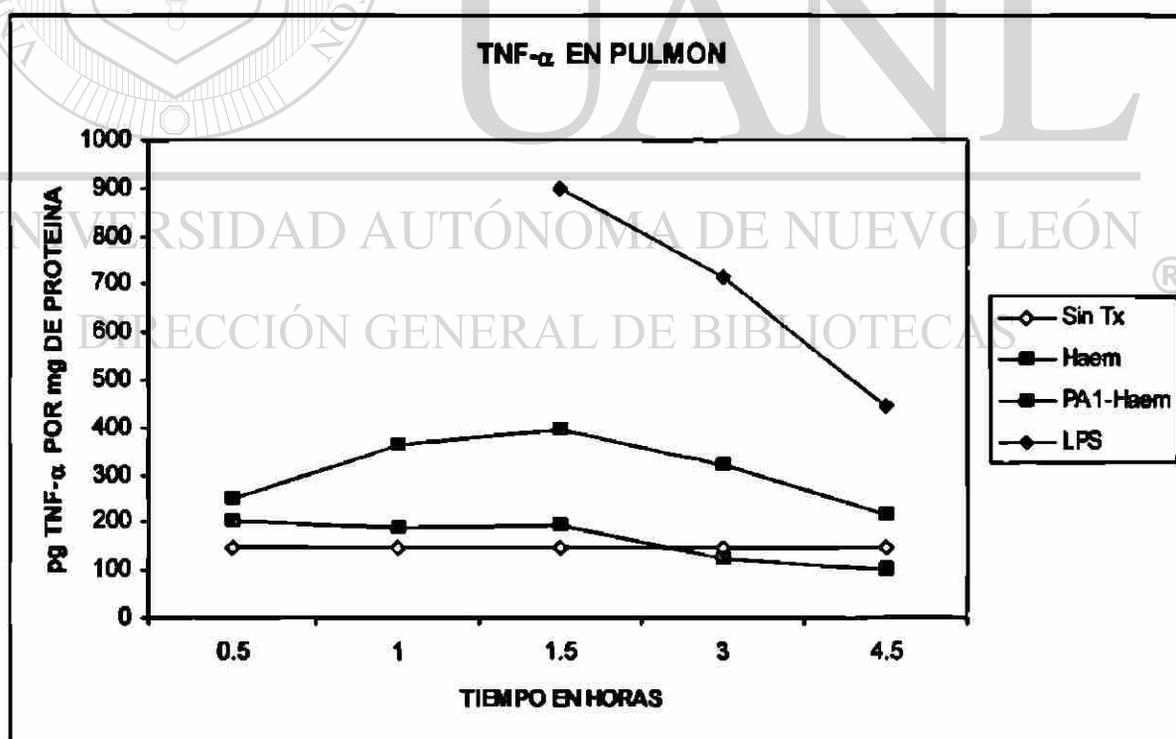


Figura 17. Cinética que muestra los resultados obtenidos de la cuantificación de TNF- α en el sobrenadante del homogenado pulmonar. Cada punto de la gráfica representa un pool de sobrenadante de 5 ratones para cada tiempo experimental y resultaron del promedio de 2 determinaciones.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

Con los resultados obtenidos en este trabajo se demuestra que la administración i.v. de PA1 en vehículo Haemacel® ocasiona daño pulmonar en el ratón albino, caracterizado por un incremento en el número de PMN, edema de células endoteliales y alveolares tipo I, y daño a la barrera aire-sangre. Además se produce liberación de TNF- α hacia el torrente sanguíneo y localmente en el pulmón, el cual se detecta en suero y en el sobrenadante del homogenado pulmonar, respectivamente.

Sepúlveda y cols. en 1992, describieron la ultraestructura de la lesión pulmonar causada por intoxicación experimental con PA1 en el material de necropsias de hámster, cobayo, rata y mono; encontrándose similar a la que se presenta en el SIRA.¹⁶

Ballesteros y cols. en 1998, estudiaron el efecto de la administración i.p. de PA1 en diferentes vehículos; tales como aceite de cártamo, solución salina y Haemacel sobre el pulmón del ratón albino.^{18,19} Se reportó que la administración i.p. de vehículo Haemacel y de PA1 en Haemacel producen daño pulmonar. Es en este trabajo donde se reporta por primera vez que estos dos tratamientos ocasionan una elevación de TNF- α , el cual coincide con un incremento en el número de PMN presentes en el pulmón.

Como ya se mencionó en el capítulo 1, los PMN juegan un papel muy importante como mediadores celulares del daño pulmonar en el SIRA. Estas células, al ser activadas expresan moléculas de adhesión que les permiten unirse de forma firme al endotelio activado de los capilares pulmonares. Una vez que se adhieren al endotelio, los PMN inician el daño pulmonar directamente sobre la barrera aire-sangre.^{38,39,40}

En numerosos trabajos se ha reportado la participación del TNF- α en el SIRA. Se sabe que el TNF- α es una citocina que actúa como mediador en la respuesta inflamatoria temprana y tardía. Esta citocina, activa y recluta leucocitos durante la inflamación de las vías aéreas.^{43,44} El TNF- α es causante de una gran variedad de respuestas celulares y orgánicas incluyendo fiebre, choque, daño tisular, necrosis tumoral, anorexia, inducción de otras citocinas y moléculas que regulan el proceso inmunológico, proliferación y diferenciación celular, así como apoptosis (muerte celular programada).^{41,53}

Estos resultados sugieren que la PA1 puede tener un efecto inductor sobre las células que producen y secretan TNF- α , principalmente los monocitos y los macrófagos. Una vez liberado, el TNF- α activa a los PMN, quedando atrapados en los capilares del pulmón, razón por la cual se encuentran aumentados en el pulmón de los ratones intoxicados con PA1.

Resulta interesante que en el trabajo experimental de Ballesteros, se encontró la máxima concentración de TNF- α y el mayor número de PMN a las 1.5 h después de la administración de PA1 en Haemaccel por vía i.p.^{18,19} En el presente trabajo, se encontró la máxima concentración de TNF- α y el mayor número de PMN 1 h después de su administración i.v. Esto es de esperarse, ya que la PA1 administrada por la vía i.v. se distribuye rápidamente a todo el organismo, mientras que por la vía i.p. su distribución es lenta.

Además en el presente trabajo se encontró más elevado el TNF- α , en comparación con el reportado en el trabajo de Ballesteros. Esto se puede explicar por que al aplicar la PA1 por vía i.v., se distribuye de forma sistémica estimulando más células en todo el organismo, mientras que por vía i.p. tiene que pasar primero a través del peritoneo.

La elevación de TNF- α que se produce cuando se administra PA1 por vía i.p. puede estar relacionada con la apoptosis que se presenta en hepatocitos en el modelo murino *in vivo* que fue utilizado por Santoyo, en su tesis de maestría.⁵⁰ En el presente trabajo no se observaron cuerpos apoptóticos en el pulmón del ratón, pero esto es de esperarse, ya que la evidencia de cuerpos apoptóticos encontrada por Santoyo en el hígado se presentó a tiempos experimentales más largos (8 h y 24 h). Sería interesante estudiar, mediante técnicas morfológicas especiales o por medio de técnicas moleculares, la presencia de cambios pre-apoptóticos en el pulmón de ratón a los tiempos que se revisaron en el presente trabajo y correlacionarlos con el TNF- α .

Se sabe que *in vitro*, el Haemacel puede estimular la producción de TNF- α .³¹ El presente trabajo se realizó en un modelo *in vivo*, y se encontró que la administración i.v. de Haemacel produce una elevación de TNF- α en el sobrenadante del homogenado pulmonar a las 0.5 h, 1 h y 1.5 h posteriores a su administración i.v., aunque no se encontró elevación de TNF- α en suero.

Es posible que la administración i.v. de Haemacel estimule la producción de TNF- α por macrófagos alveolares y otras células presentes en el parénquima pulmonar, pero que no estimule de igual manera en otros órganos. Se sabe que no todos los macrófagos del organismo responden de igual forma ante un mismo estímulo *in vivo*, aún cuando *in vitro* lo pueden hacer de forma similar.⁵¹

Esto podría deberse a factores tales como la presencia de barreras entre la sangre y los tejidos en donde se encuentran éstas células, o tal vez al tipo de endotelio presente; por ejemplo: si es fenestrado o continuo. Sería interesante estudiar si el Haemacel provoca una liberación de histamina en el parénquima pulmonar, provocando una mayor permeabilidad endotelial y facilitando que los componentes de su fórmula estimulen de forma más directa a los macrófagos alveolares y a otras células presentes en el pulmón. Esto explicaría por qué aumenta el TNF- α en el homogenado pulmonar y no en el suero.

Además se sabe que compuestos tóxicos como el LPS estimulan la producción de TNF- α por las células alveolares tipo II, en modelos *in vitro*.⁵⁴ Sería interesante estudiar si el Haemacel puede inducir la secreción de TNF- α por los neumocitos tipo II, ya que también estas células puedan estar contribuyendo a que aumente el TNF- α en el pulmón del ratón. Esto también podría ayudar a explicar el aumento de TNF- α en el pulmón del ratón cuando se administra la PA1 en Haemacel. Además nos permitiría saber si son varias células del pulmón las que pueden estar contribuyendo al aumento de TNF- α .

Como se observó en el estudio morfométrico y en la cuantificación de TNF- α , el daño producido por el Haemacel es bastante considerable y es posible que esté potenciando el daño que ocasiona la PA1. Si se le restara el daño ocasionado por la sola administración de Haemacel, al ocasionado por la administración de los dos compuestos juntos, se reduciría notablemente el daño aparente al pulmón del ratón en lo que se refiere al infiltrado inflamatorio y al TNF- α encontrado en el parénquima pulmonar. Se pueden seguir estudiando otros factores mediadores en este modelo experimental, el cual presenta un daño pulmonar muy similar al encontrado en el SIRA y de esta forma contribuir al entendimiento de este síndrome para su mejor tratamiento.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES, PERSPECTIVAS Y CONTRIBUCIONES

5.1 CONCLUSIONES

1. La PA1 en Haemacel® administrada por vía i.v. ocasiona daño pulmonar, que se caracteriza por un infiltrado celular inflamatorio y por lesión de la barrera aire-sangre. Esta lesión consiste en edema y ruptura de la célula endotelial y del neumocito tipo I, adelgazamiento y ruptura de la membrana basal, presencia de exudado y hemorragia en la luz alveolar.

2. La PA1 en Haemacel administrada por vía i.v. ocasiona también un incremento de TNF- α en sangre y en el pulmón. Por lo tanto, estimula de forma directa o indirecta a las células productoras y secretoras de TNF- α , en el pulmón y en todo el organismo.

3. El Haemacel aplicado por vía i.v. también ocasiona daño pulmonar, que se caracteriza por un infiltrado celular inflamatorio y por lesión de la barrera aire-sangre. Esta lesión consiste en edema de la célula endotelial y del neumocito tipo I, sin presentar exudado ni hemorragia. Además, eleva el TNF- α en el pulmón, aunque no así en la sangre.

5.1 PERSPECTIVAS

1. Identificar mediante marcadores inmunohistoquímicos los tipos de células mononucleares presentes en el infiltrado inflamatorio de la lesión pulmonar causada por intoxicación experimental con PA1 en Haemacel.

2. Estudiar si los neumocitos tipo II y los macrófagos alveolares secretan TNF- α cuando se administra Haemacel por vía i.v. y correlacionarlo con el aumento de esta citocina en pulmón.

3. Evaluar mediante técnicas morfológicas especiales o por medio de técnicas moleculares, la presencia de cambios pre-apoptóticos en el pulmón de ratón a los tiempos revisados en el presente trabajo y correlacionarlos con el incremento de TNF- α .

4. Evaluar la participación de otras citocinas y de otros factores químicos involucrados en la lesión pulmonar causada por la intoxicación experimental con PA1.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

5.3 CONTRIBUCIONES

Con los resultados obtenidos en este trabajo se contribuye a conocer más acerca del mecanismo de acción de la PA1, cuando es administrada por vía i.v. Se reporta por primera vez que la intoxicación experimental por vía i.v. de PA1 en vehículo Haemacel ocasiona daño pulmonar y elevación de TNF- α en suero y en el pulmón. Además, se contribuye al esclarecimiento de un posible efecto adverso relacionado a la aplicación i.v. de Haemacel, ya que su sola administración ocasiona daño y elevación de TNF- α en el pulmón del ratón albino.

REFERENCIAS

1. Fernández-Nava R. Nombres comunes, usos y distribución geográfica del género *Karwinskia* (*Rhamnaceae*) en México. *Anal Inst Biol UNAM Ser Bot* 1992;63:1-23.
2. Del Pozo EC. Los efectos paralizantes de la tullidora. Estudios clínicos y experimentales. *Gac Med Mex* 1965;95:179-182.
3. Escobar A, Nieto D. Aspectos neuropatológicos de la intoxicación con *Karwinskia humboldtiana*. Estudio experimental. *Gac Med Mex* 1965;95:163-167.
4. Puértolas Márquez MA, Nava-Jiménez O, Medina-López HA, López-Orozco FX, Oyervides-Pinales JF. Polirradiculoneuritis por *Karwinskia humboldtiana*. Informe de seis casos. *Rev Med IMSS* 1984;22:25-27.
5. Clavijero FX. "Historia de la antigua o Baja California". México D.F., Ed. Porrúa S.A., 3^{ra} Ed., 1982; 31-33.
6. Castillo Nájera F. "Contribución al estudio de la parálisis tóxica. Un envenenamiento colectivo con tullidora". En memoria del V Congreso Médico Mexicano, 1920; 1: 240-244.
7. Bustamante-Sarabia J, Olvera-Rabiela J, Nieto-Cañedo L. Intoxicación fatal por tullidora (*Karwinskia humboldtiana*). Comunicación de un caso. *Gac Méd Méx* 1978; 114: 241-244.
8. Bermúdez MV, Lozano FE, Salazar ME, Waskman N, Piñeyro A. Intoxicación de una familia por *Karwinskia humboldtiana* (Tullidora). *Gac Med Mex* 1995; 131: 100-106.
9. Dreyer DL, Arai I, Bachman CD, Anderson Jr WR, Smith RG, Daves Jr GO. Toxins causing noninflammatory paralytic neuropathy. Isolation and structure elucidation. *J Am Chem Soc* 1975; 97: 4985-4990.

10. Rivas V, Torres R, Waskman N. Dimeric anthracenones from *Karwinskia* species. *Planta Medica* 1990; 56: 562-563.
11. Waksman N, Ramírez R. Isolation of a new dimeric anthracenone from *Karwinskia parvifolia*. *Rev Latinoamer Quim* 1992; 23: 25-27.
12. Bermúdez MV, González-Spencer D, Guerrero M, Waskman N, Piñeyro A. Experimental intoxication with fruit and purified toxins of buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*). *Toxicon* 1986; 24: 1091-1097.
13. Bermúdez-Barba MV. Toxicidad aguda de la *Karwinskia humboldtiana* en diferentes especies de animales. Tesis doctoral, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, N.L., 1989.
14. Bermúdez MV, Martínez FJ, Salazar ME, Waskman N, Piñeyro A. Experimental acute intoxication with ripe fruit of *Karwinskia humboldtiana* in rat, guinea-pig, hamster and dog. *Toxicon* 1992; 30: 1493-1496.
15. Sepúlveda-Saavedra J, Van Der Klei I, Kaiser I, Piñeyro-López A, Harder W, Veenhuis M. Studies on the effect of T-514 on the integrity of peroxisomes in methyltrophic yeast. *FEMS Microbiol, Lett* 1992; 91: 207-212.
16. Sepúlveda J, González B, Tamez V, Bermúdez MV, Piñeyro A. Ultrastructure of the lesion induced by toxin T-514 isolated from *K. humboldtiana* in the alveolar region of the lung. Fiftieth Annual Meeting electron microscopy society of america 1992; 640-641.
17. Sepúlveda J, González B, Tamez V, Lozano F, Salazar ME, Bermúdez MV, Piñeyro A. Polimorfonucleares durante la evolución de la lesión inducida por la toxina T-514 en el pulmón de la rata: análisis morfométrico. VIII Enc Reg de Invest Bioméd 1990; 19.
18. Ballesteros R, Flores S, Piñeyro A, Sepúlveda J. Peroxisomicine A-1 induces TNF- α secretion and pmn infiltration in lung microvascular bed of the albino mice (CD-1). *Electron Microscopy* 1998;4:501-502.

19. Ballesteros R. Factor de necrosis tumoral α y granulocitos neutrófilos en la producción del síndrome de insuficiencia respiratoria del adulto causado por peroxisomicina A-1. Tesis doctoral. Diciembre 2000.
20. Piñeyro-López A, Martínez L, González-Alanís R. In vitro selective toxicity of toxin T-514 from *Karwinskia humboldtiana* (buckthorn) plant on various human tumor cell lines. *Toxicology* 1994;92:217-227
21. Piñeyro A. 1995. *Europaishen Patentblatt* 95/48 (29.11.95). Patent number: 0467407
22. Piñeyro A. 1996. Bioscience patent "Pharmaceutically acceptable anthracene compounds" number 5578646
23. Piñeyro-López A. Patentes: Japonesa No. 2651758. Coreana No. 202320. Canadiense No. 2047550. Mexicana No. 9100290
24. Piñeyro y cols. Protocolo I 1/15 del Ensayo de Fase Clínica I en pacientes con carcinoma avanzado sin tratamiento alternativo.
25. Prevedoros HP, Bradburn NT, Harrison GA. Three cases of anaphylactoid reaction to Haemacel. *Anaesth Intensive Care* 1990 Aug;18(3):409-12.
26. Fenwick DG, Andersen GJ, Munt PS. Anaphylactoid reaction to Haemacel. *Anaesth Intensive Care* 1995 Aug;23(4):521-2.
27. Chew GY, Phan TG, Quin JW. Anaphylactic or anaphylactoid reaction to Haemacel? *Med J Aust* 1999 Oct 4;171(7):387-8.
28. Freeman MK. Fatal reaction to haemacel. *Anaesthesia* 1979 Apr;34(4):341-3
29. Lorenz W, Doenicke A, Messmer K, Reimann HJ, Thermann M, Lahn W, Berr J, Schmal A, Dormann P, Regenfuss P, Hamelmann H. Histamine release in human subjects by modified gelatin (Haemacel) and dextran: an explanation for anaphylactoid reactions observed under clinical conditions? *Br J Anaesth* 1976 Feb; 48(2):151-65

30. Sitarska E, Kostrzewska E, Konopka L, Sokolowska K. [Effect of gelatin and dextran infusion on the reticuloendothelial system]. *Acta Haematol Pol* 1979 Oct;10(4):275-81
31. Sirtl C, Salewsky G, Baier J, Lange S, Laubenthal H, Neumann HA. [Effect of colloidal plasma substitutes on liberation of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in human whole blood *in vitro*] *Infusionsther Transfusionsmed.* 1995 Dec;22(6):332-8.
32. C. Puttermann. Adult respiratory distress syndrome: Current concepts. *Resuscitation* 1988; 16: 91-105.
33. Anthony R. Dal Nogare. Southwestern Internal Medicine Conference: Adult respiratory distress syndrome. *The Am J of Med Sciences* 1989; 298: 413-430.
34. Ashbaugh D, Biegelow D, Petty T. Acute respiratory disease in adults. *Lancet* 1967; 2: 319-323.
35. Rocker G, Wiseman M, Pearson D, Shale D. Diagnostic criteria for Adult Respiratory Distress Syndrome: time for reappraisal. *Lancet* 1989; 21: 120-123.
36. Articas A, J Carlet, J R Le Gall, C Chastang, L Blanch and R Fernández. 1991. Clinical presentation, prognostic factors and outcome of ARDS in the European Collaborative Study (1985-1987): a preliminary report. In W. M. Zapol and F. Lemaire, editors. *Adult Respiratory Distress Syndrome*. Marcel Dekker, New York. 37-64.
37. Flein A, Wiener-Kronish J, Niederman M, Matthay M. Pathophysiology of the adult respiratory distress syndrome. *Acute Lung Injury* 1986; 2: 120-123.
38. Zimmerman G, Renzetti A. Functional and metabolic activity of granulocytes from patients with adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1983; 127: 290-300.

39. Chollet S, Montravers P, Gilbert C, Elbim C, Desmouts J. Relationship between polymorphonuclear neutrophils and cytokines in patients with adult respiratory distress syndrome. *Ann N Acad Sci* 1994; 354-366.
40. Sandborg R, Smolen J. Early biochemical events in leukocyte activation. *Lab Invest* 1988; 59(2): 300-320.
41. Windsor A, Mullen P, Fowler A, Sugerman H. Role of the neutrophil in adult respiratory distress syndrome. *Acute Lung Injury* 1986; 2: 120-123.
42. Thommasen H, Russel A, Boyho W. Transient leukopenia associated with adult respiratory distress syndrome. *Lancet* 1984; 1: 809-812.
43. Lukacs N, Strieter R, Chensue S, Kunkel S. Tnf alpha mediates recruitment of neutrophils and eosinophils during airway inflammation. *J Immuno* 1995; 154: 5411-5417.
44. Sherry B, Cerami A. Cachectin/Tumor Necrosis Factor exert endocrine, Paracrine and autocrine control of inflammatory responses. *J Cell Biol* 1988; 107: 1269-1277.
-
45. Nicola N. Cytokines and their receptors, a Sambrook and Tooze publication at Oxford University Press New York, 1994.
46. Donnelly T, Meade P, Jagels M, Cryer H. Cytokine, complement and endotoxin profiles associated with the development of the adult respiratory distress syndrome after severe injury. *Critical care Medicine* 1994; 22(5): 768-776.
47. Donnelly SC. Interleukin-8 and development of adult respiratory distress syndrome in at risk patient groups. *Lancet* 1993; 341; 643-647.
48. Tamez V. Estudios de toxicidad dérmica de la T-514 (Peroxisomicina A1) aislada del género *Karwinskia* en conejos Nueva Zelanda. Tesis doctoral. Abril 2001.

49. Steven M, Min H, Alan L, William H, Jianyi W, Gerald M, David K, Wayne W, Leah E, Shawkat D. Tumor Necrosis Factor- α plays a central role in Interleukin-2 induced pulmonary vascular leak and lymphocyte accumulation. *Cell Immunol* 1994;157:170-180.
50. Santoyo M. Efecto de la peroxisomicina A1 sobre el hígado de ratón tratado con clofibrato. Tesis de maestría. Febrero 2002.
51. Michel D, Lui G, Michel W, André C. A mouse model of injury induced by microbial products: implication of Tumor Necrosis Factor. *Am J Resp Cell and Mol Biol* 1994;10:658-664.
52. Torsten T, Concepción M, Antoni T, Herman C, Xavier F, Abel M, José-Maria N, Elisabet Z. Comparison of systemic cytokine levels in patients with acute respiratory distress syndrome, severe pneumonia, and controls. *Thorax* 2000;55:46-52.
53. Falfán V R. Factor de necrosis tumoral: Actividad biológica en neumopatías intersticiales. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2002 15(1):48-53.
54. Song Yong, Shi Yi, Alden H and Xianzhong M. Induction of type II alveolar epithelial cells apoptosis in mouse by lipopolysaccharide does not require TNF- α . *Chin Med J* 2003;116(4):625-629.
55. Gómez M, Garza L, Waksman N, Piñeyro A. Detección de los metabolitos de la toxina T-514 (Peroxisomicina A1) del género *Karwinskia* *in vivo* e *in vitro*. *Ciencia UANL* 2002;5(4):485-492.

APÉNDICE

A. Técnica de inclusión en resinas epóxicas

1. Obtener y fragmentar el pulmón con una navaja de bisturí en trozos de aproximadamente 1 mm^3 en una caja de Petri con solución fijadora.
2. Sumergir en solución fijadora de Karnovsky-Ito (Apéndice H) por 30 min a temperatura ambiente o toda la noche a $8 \text{ }^\circ\text{C}$.
3. Lavar en buffer de cacodilatos al 0.1 M (Apéndice I) por 5 min, 3 veces.
4. Postfijar en tetraóxido de osmio al 2 % por 30 min.
5. Lavar en buffer de cacodilatos al 0.1 M por 5 min, 3 veces.
6. Contrastar en bloque con nitrato de uranilo al 1 % por 30 min.
7. Lavar en buffer de cacodilatos al 0.1 M por 5 min, 3 veces.
8. Deshidratar en acetona al 30, 50, 70 y 90 % por 5 min en cada una, y en acetona al 100 % por 5 min, 3 veces.
9. Preincluir en acetona-epon 1:1 por 60 min a temperatura ambiente o toda la noche a $8 \text{ }^\circ\text{C}$.
10. Incluir en epon puro (Apéndice J) por 60 min a temperatura ambiente, colocar las muestras en moldes y polimerizar a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24-72 h.

NOTA: Los bloques se dejan enfriar, se extraen del molde y se rebajan bajo microscopía estereoscópica. Para observar las muestras en el microscopio de luz de campo claro, se cortan en el ultramicrotomo con cuchilla de vidrio y se tiñen con azul de toluidina (Apéndice B). Para observar las muestras en el microscopio electrónico de transmisión, se cortan con cuchilla de diamante, se colocan en rejillas de cobre y se contrastan (Apéndice C).

B. Tinción de cortes semifinos con azul de toluidina

1. Obtener varios cortes semifinos de 650 nm de grosor.
2. Colocar los cortes en un portaobjetos limpio.
3. Pegar los cortes al portaobjetos usando una placa caliente.
4. Colocar una gota de azul de toluidina (Apéndice K) sobre los cortes y dejarlos sobre la placa caliente por 10 seg aproximadamente.
5. Lavar cuidadosamente el portaobjetos con agua ultrapura.
6. Secar suavemente el portaobjetos con una gasa limpia.

C. Contrastación de cortes finos

1. Obtener varios cortes finos de 100 nm de grosor.
2. Montar los cortes en rejillas de cobre.
3. Colocar las rejillas con los cortes hacia abajo sobre una gota de acetato de uranilo (0.5 g de acetato de uranilo disuelto en alcohol etílico al 50 %), en una caja de Petri limpia.
4. Lavar las rejillas sobre gotas de agua ultrapura por 1 min y dejar secar.
5. Colocar las rejillas sobre gotas de citrato de plomo al 0.4 % (0.04 g de citrato de plomo en 10 ml de agua ultrapura más 3 gotas de hidróxido de sodio para ayudar a disolver).
6. Lavar las rejillas sobre gotas de agua ultrapura por 1 min y dejar secar sobre papel filtro en una caja de Petri cerrada y etiquetada.

D. Cuantificación de TNF- α por el método de ELISA

Para determinar el TNF- α en suero y en el sobrenadante del homogenado pulmonar de los ratones se utilizó el kit comercial ID *ELISA*[™] Mouse TNF- α (IDEL-MuTa-96) de ID Labs Inc. Este kit es un inmunoensayo enzimático tipo sandwich, con el cual se cuantifican las formas libres de TNF- α de ratón. El modo de visualización es por medio de la enzima fosfatasa alcalina conjugada a streptavidina, a la cual se le agrega un sustrato cromogénico.

Primero se reconstituyeron los siguientes reactivos:

1. Anti-TNF- α de ratón biotinilado con 3.5 ml de diluyente.
2. TNF- α recombinante de ratón con 1 ml de diluyente.

Se desempacó la placa de plástico con 96 pocillos de microtitulación precubiertos con anticuerpo anti-TNF- α de ratón. En los primeros pocillos y por duplicado se dispensaron 100 μ l de cada estándar de TNF- α recombinante de ratón que se prepararon a las siguientes concentraciones: 1600 pg/ml, 400 pg/ml, 100 pg/ml y 25 pg/ml, el diluyente se utilizó como blanco (0 pg/ml).

En los siguientes pocillos se dispensaron 50 μ l de diluyente y 50 μ l de cada una de las muestras problema, todos por duplicado. Las muestras problema fueron los "pools" de suero y de sobrenadante de homogenado pulmonar.

Una vez colocadas todas las muestras se realizó el siguiente procedimiento:

1. Incubar a temperatura ambiente por 1 h. En este paso se une el TNF- α a los anticuerpos unidos a la placa.

2. **Dispensar 25 μ l de anticuerpo anti-TNF- α conjugado con biotina e incubar a temperatura ambiente por 3 h. Durante este paso, el TNF- α libre se uni3 a los anticuerpos unidos a la placa y a los anticuerpos conjugados con biotina.**
3. **Lavar los pocillos con buffer de lavado. Este proceso se realiz3 en un lavador autom3tico de placas de ELISA previamente programado con 2 ciclos de 5 lavados cada uno, en los cuales se dispensaron 250 μ l de buffer de lavado a cada pocillo previa aspiraci3n del contenido de los mismos. El intervalo de tiempo de espera entre ambos ciclos fue de 5 min. Al terminar este proceso se sacudi3 la placa sobre papel secante para retirar el remanente de buffer. La finalidad de este paso es retirar el anticuerpo conjugado con biotina que no se uni3 a TNF- α .**
4. **Dispensar 50 μ l de fosfatasa alcalina conjugada con estreptavidina a cada pocillo e incubar a temperatura ambiente por 45 min. En este paso, la estreptavidina se une a la biotina ligada a los anticuerpos unidos a TNF- α .**
5. **Lavar los pocillos con buffer de lavado igual que en el paso 3. El prop3sito de este paso es retirar el exceso de fosfatasa alcalina conjugada con estreptavidina que no se uni3.**
6. **Dispensar 200 μ l de crom3geno en cada uno de los pocillos y dejar incubar durante 15 min. La finalidad de este paso es revelar la presencia de anticuerpo anti-TNF- α .**
7. **Colocar la placa en el lector de placas de ELISA y proceder de inmediato a su lectura a una longitud de onda de 490 nm.**
8. **Realizar una curva de calibraci3n de TNF- α , graficando la absorbancia de los est3ndares en funci3n de la concentraci3n (Ap3ndice E, fig. 18).**

9. Calcular mediante un análisis de regresión lineal la concentración de TNF- α en las muestras problema, tomando en cuenta un factor de dilución de 2.

E. Curva patrón de TNF- α

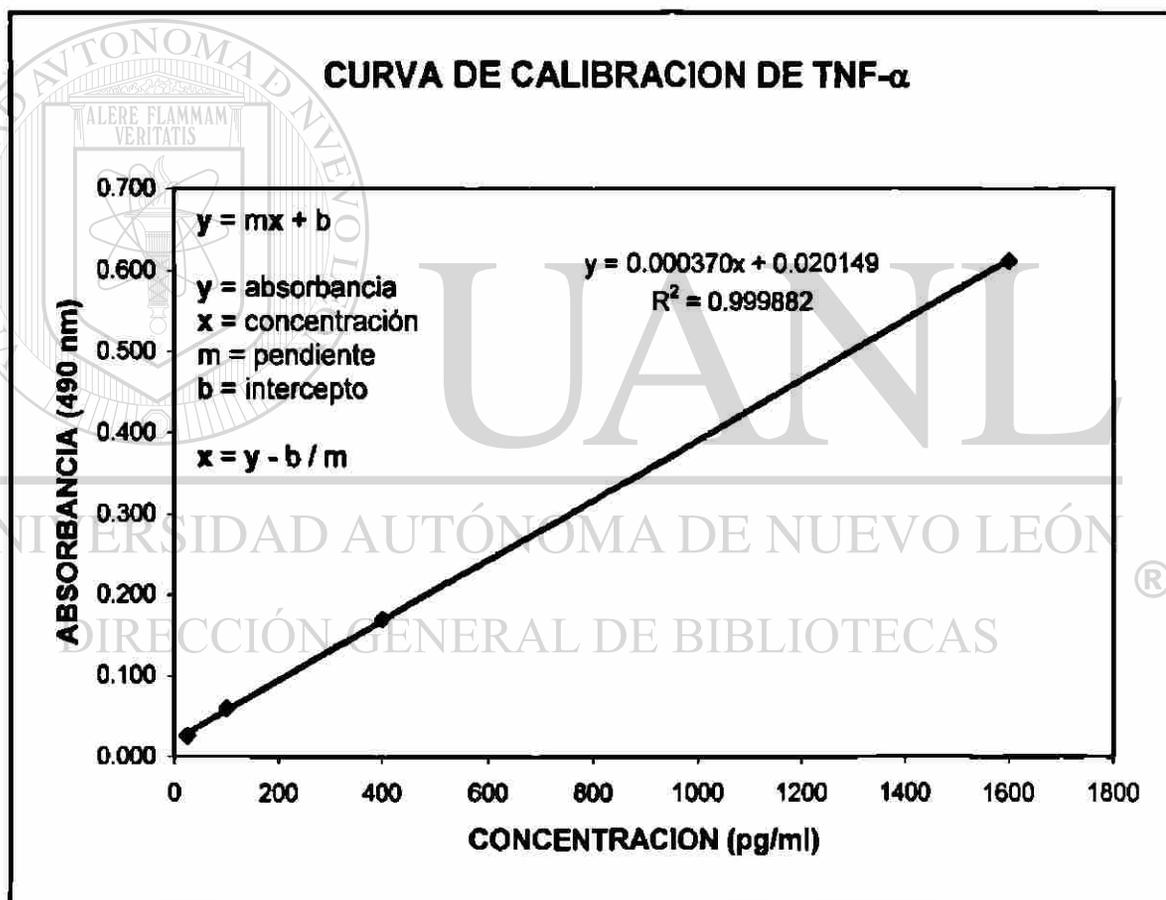


Figura 18. Curva patrón de TNF- α , cada punto representa el valor promedio de la absorbancia de cada estándar utilizado y resultan del análisis de 2 determinaciones. Se incluye la ecuación utilizada para calcular la concentración de TNF- α en las muestras problema.

F. Determinación de la concentración de proteínas por el método de Lowry

Primero se obtuvo una curva patrón de proteínas, para lograr esto se utilizó albúmina sérica bovina a concentraciones conocidas. La albúmina fue pesada en una balanza analítica y se preparó un estándar concentrado de 2 mg de albúmina en 10 ml de agua ultrapura. A partir de éste se obtuvo una alícuota de 200 $\mu\text{g/ml}$ y posteriormente se obtuvieron 0.4 ml de cada una de las siguientes concentraciones estándar: 20, 18, 16, 14, 12, 10, 8, 6, 4 y 2 $\mu\text{g/ml}$ y se usaron 0.4 ml de agua ultrapura como 0 $\mu\text{g/ml}$. Se aplicó el método de Lowry que se describe abajo, desde el paso 4 hasta el final.

Se graficó la absorbancia obtenida en función de la concentración de albúmina y de esta manera se obtuvieron 5 curvas de calibración estándar por triplicado. Posteriormente se integraron y se obtuvo el promedio de las 5 curvas con su desviación estándar. Una vez obtenida esta curva patrón de proteínas (Apéndice G, fig. 19) se calculó la concentración de proteínas en los alícuotas de sobrenadante de homogenado pulmonar, usando un análisis de regresión lineal y tomando en cuenta un factor de dilución de 2. Después se obtuvo la cantidad total de proteínas por volumen total del sobrenadante de homogenado. Se utilizaron alícuotas de sobrenadante en una dilución 1:200.

Pasos del Método de Lowry:

- 1. Tomar 0.5 ml de cada alícuota de sobrenadante de homogenado pulmonar en tubos de ensayo y precipitar proteínas con 1 ml de ácido tricloroacético al 10 %. Dejar reposar por 30 min.**
- 2. Centrifugar a 3000 r.p.m. por 30 min. Decantar el sobrenadante y dejar secar cada tubo de ensayo sobre papel absorbente.**
- 3. Agregar 0.4 ml de agua ultrapura a cada tubo.**

4. Agregar 0.4 ml de la solución C (Apéndice L). Reposar por 10 min a temperatura ambiente.
5. Agregar 0.2 ml de una mezcla de Folin-Ciocalteu al 2 N y agua ultrapura. Dejar reposar por 30 min a temperatura ambiente.
6. Medir la absorbancia en el espectrofotómetro de luz-UV a una λ de 660 nm.

G. Curva patrón de proteínas

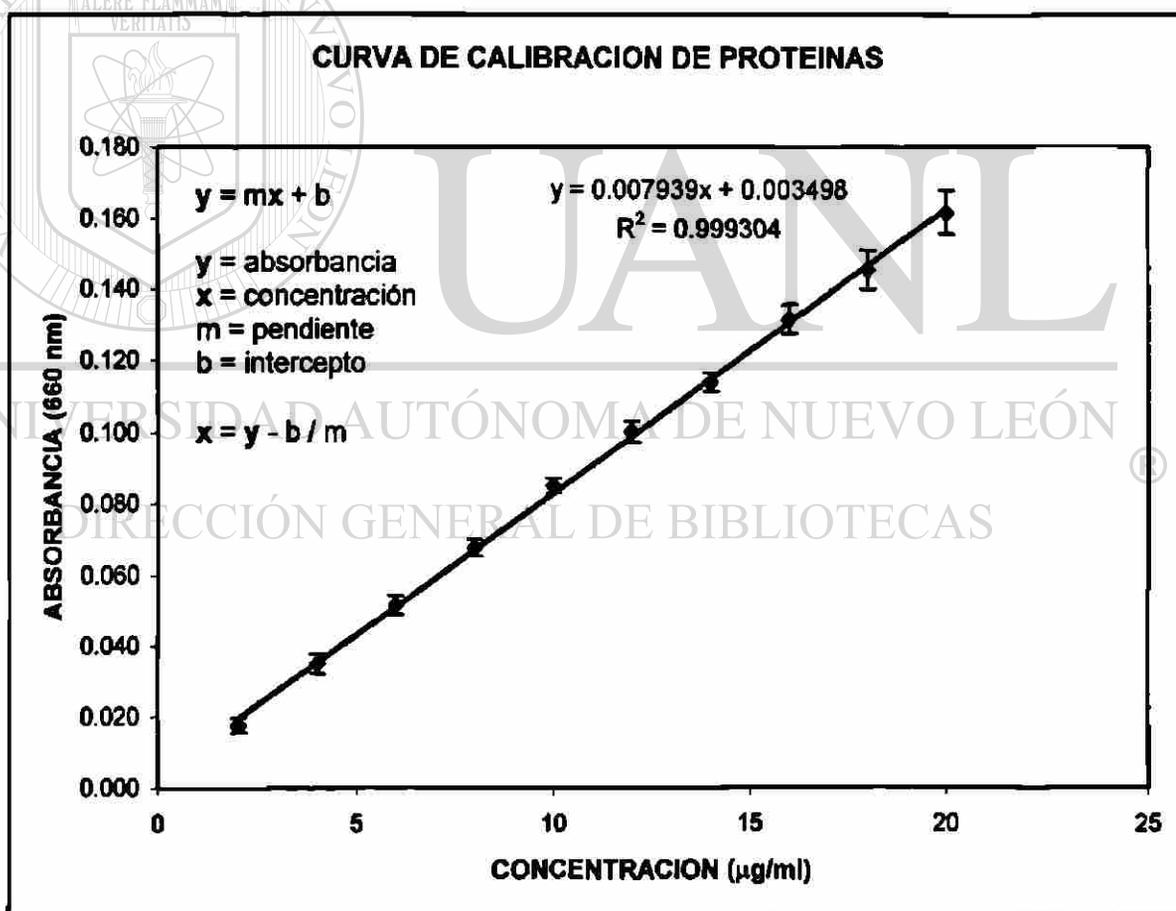


Figura 19. Curva patrón de proteínas, cada punto representa el promedio de 5 curvas de calibración con su desviación estándar. Los puntos de cada curva de calibración resultaron del análisis de 3 determinaciones. Se incluye la ecuación utilizada para calcular las concentraciones en las muestras problema.

H. Preparación de fijador de Karnovsky-Ito

1. Disolver 16 g de paraformaldehído en 400 ml de agua ultrapura.
2. Calentar sin llegar al punto de ebullición bajo una campana de extracción.
3. Agregar varias gotas de hidróxido de sodio (de 2 a 11 gotas) para quitar la turbidez.
4. Dejar enfriar bajo la campana de extracción.
5. Agregar 400 ml de buffer de cacodilatos al 0.1 M y a pH de 7.2-7.4 (Apéndice I).
6. Agregar 32 ml de glutaraldehído al 25 %.
7. Agregar 0.08 g de ácido pícrico.
8. Mezclar vigorosamente.
9. Se almacena a 4 °C en un frasco de vidrio ámbar.

I. Preparación de buffer de cacodilatos al 0.1 M

Preparar una solución A

1. Se ocupa un volumen de 200 ml de agua ultrapura.
2. Agregar 8.56 g de cacodilato de sodio y mezclar.

Preparar una solución B

1. Se ocupa un volumen de 25 ml de agua ultrapura.
2. Agregar 0.5 ml de ácido clorhídrico.

NOTA: Se utilizan los 200 ml de la solución A y se le agregan 10.8 ml de la solución B, se afora a 400 ml con agua ultrapura y se ajusta el pH a 7.4 con hidróxido de sodio.

J. Preparación de resinas epóxicas (consistencia suave)

Para preparar epon suave se mezcla cuidadosamente lo siguiente:

Resina	27 g
DDSA	21.5 g
NMA	8.5 g
DMP30	1 g

NOTA: Una vez preparado, se guarda dentro de jeringas en el congelador.

K. Preparación de azul de toluidina

1. Agregar 5 g de borato de sodio en 100 ml de agua ultrapura y calentar hasta que se disuelva.
2. Agregar 1 g de azul de toluidina y agitar hasta disolver.
3. Filtrar para usarse.

L. Preparación de la solución C

Tartrato de sodio y potasio al 0.6 %, sulfato de cobre al 0.3 %, carbonato de sodio al 30 %, hidróxido de sodio al 0.8 N y agua ultrapura.

NOTA: Se tomaron en cuenta las siguientes cantidades para cada tubo:

Tartrato de sodio y potasio	0.033 ml
Sulfato de cobre (CuSO ₄)	0.033 ml
Carbonato de sodio (Na ₂ CO ₃)	0.033 ml
Hidróxido de sodio (NaOH)	0.100 ml
Agua ultrapura (H ₂ O)	0.200 ml

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Jaime García Juárez

**Candidato para el Grado de
Maestría en Ciencias con especialidad en Morfología**

Tesis: CUANTIFICACIÓN DE PMN, LINFOCITOS Y MACRÓFAGOS ALVEOLARES EN EL PULMÓN DEL RATÓN ALBINO TRATADO CON UNA DOSIS TÓXICA DE PA1 EN HAEMACCEL Y SU RELACIÓN CON EL TNF- α

Área de Estudio: Morfología

Biografía:

Datos personales: Nacido en Guadalupe, Nuevo León, México. El 10 de Agosto de 1970. Hijo del Sr. Francisco García Hernández y la Sra. Josefina Juárez Rodríguez. Actualmente, casado con la Dra. Patricia Galván Gálvez.

Escolaridad: Egresado de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León en 1994. Grado obtenido: Médico Cirujano Partero en Mayo de 1997.

Experiencia profesional: Instructor de prácticas de la materia de Histología de 1989 a 1993. Servicio Social de Medicina en la Jurisdicción I de la S.S.A. de San Luis Potosí, S.L.P., de Agosto de 1994 a Julio de 1995. Consulta General en Clínica y Maternidad Alba de Abril de 1997 hasta Septiembre de 1999. Participación como profesor en la Aplicación del Exámen de Aptitudes Académicas *The College Board* a los alumnos de primer ingreso a Medicina en 1999, 2000 y 2001. Participación como profesor en el Curso de Capacitación para el Exámen Nacional de Residencias Médicas con el Tema: Tejidos Básicos en 1999, 2000 y 2001. Participación en el XX Congreso Nacional de Investigación Biomédica en Octubre de 2002 y en el XXI Congreso Nacional de Investigación Biomédica en Octubre de 2003. Participación como instructor de prácticas del curso de Histología de Postgrado de Septiembre de 2003 a Febrero de 2004. Profesor de prácticas de Histología de Pregrado desde Septiembre de 1997 y de teoría de Histología de Pregrado desde Septiembre de 2000 hasta la fecha, en la Facultad de Medicina de la U.A.N.L.

