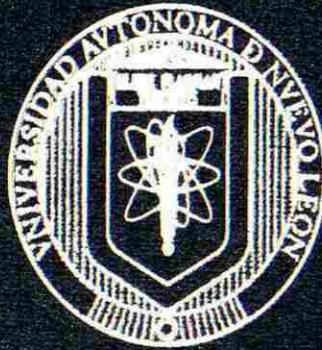


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**EVALUACION MORFOLOGICA Y BIOQUIMICA DE LA
PRESENCIA DE APOPTOSIS EN VARIOS ORGANOS
DEL RATON TRATADO CON UNA DOSIS TOXICA
DE PEROXISOMICINA A1.**

POR

ING. BIOQ. ADOLFO SOTO DOMINGUEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
DE MAESTRIA EN CIENCIAS CON ORIENTACION
EN MORFOLOGIA**

Agosto 2005

AGOSTO

JING. BLOQ. ADOLFO SOTO DOMINGUEZ

TM

QH603

.P47

S67

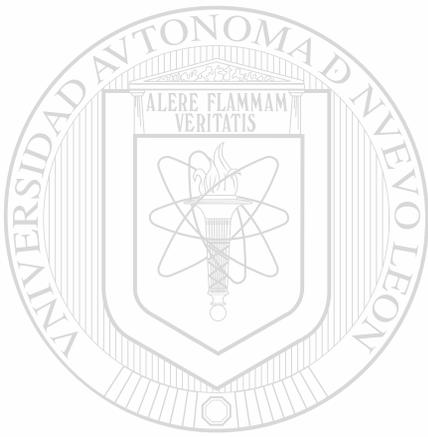
2005

e.1

2005



1080127598

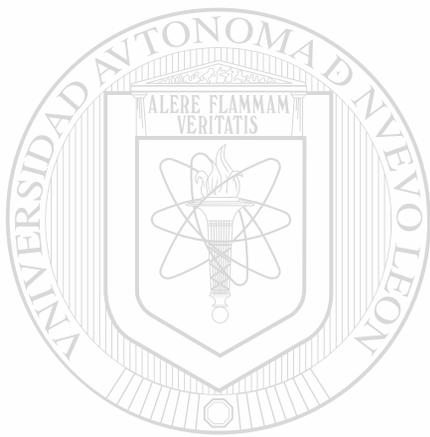


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

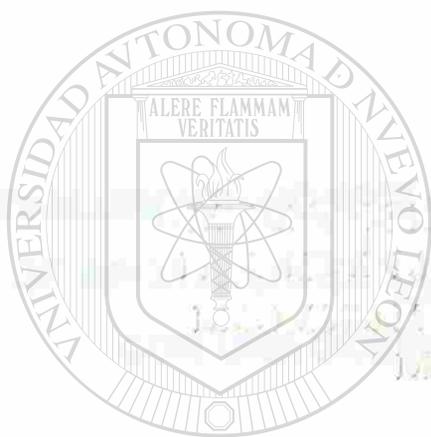


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

EXAMEN DE INGRESO

19 de Agosto 2005



U A N L

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

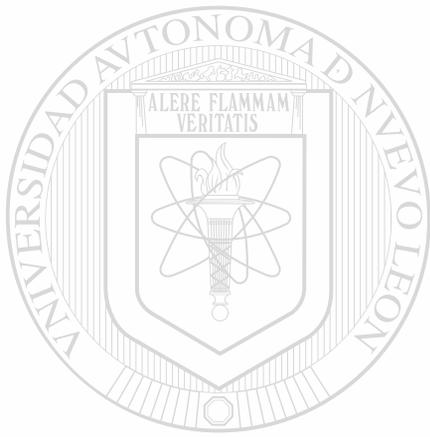
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
DE MAESTRIA EN CIENCIAS CON ORIENTACION
EN MORFOLOGIA

Agosto 2005



TM
QH603
.P47
S67
2005



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



EVALUACIÓN MORFOLÓGICA Y BIOQUÍMICA DE LA PRESENCIA DE APOPTOSIS EN VARIOS ÓRGANOS DEL RATÓN TRATADO CON UNA DOSIS TÓXICA DE PEROXISOMICINA A1.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
POR

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ING. BIOQ. ADOLFO SOTO DOMÍNGUEZ.

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN
EN MORFOLOGIA

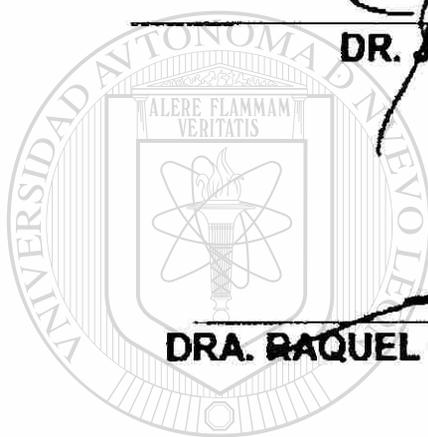
Agosto 2005

**EVALUACIÓN MORFOLÓGICA Y BIOQUÍMICA DE LA
PRESENCIA DE APOPTOSIS EN VARIOS ÓRGANOS DEL RATÓN
TRATADO CON UNA DOSIS TÓXICA DE PEROXISOMICINA A1**

Aprobación de la Tesis:



DR. JULIO SEPULVEDA SAAVEDRA
Director de Tesis



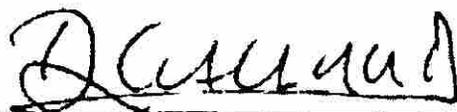
DRA. RAQUEL GUADALUPE BALLESTEROS ELIZONDO
Comisión de Tesis

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DRA. ODILA SAUCEDO CARDENAS
Comisión de Tesis

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO
Subdirector
de Estudios de Posgrado

**EVALUACIÓN MORFOLÓGICA Y BIOQUÍMICA DE LA PRESENCIA
DE APOPTOSIS EN VARIOS ÓRGANOS DEL RATÓN
TRATADO CON UNA DOSIS TÓXICA DE PEROXISOMICINA A1.**

Presentado por:

Ing. Bioq. Adolfo Soto Domínguez.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Bajo la dirección del Ph. D. Julio Sepúlveda Saavedra y la co-dirección de la Dra. Odila Saucedo Cárdenas y la Dra. Raquel Guadalupe Ballesteros Elizondo.

FIRMAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Director de Tesis


M.C.P. y Ph. D.
Julio Sepúlveda Saavedra

Co-Directora de Tesis


Dra. Odila Saucedo Cárdenas.

Co-Directora de Tesis


Dra. Raquel Guadalupe
Ballesteros Elizondo.

DEDICATORIA

Para mis padres:

Sr. Elías Soto Sánchez y

Sra. Teresa Domínguez Crispín

Por su amor incondicional cada día, por ser un ejemplo de perseverancia, humildad y honradez para guiarme en el camino de la verdad y la justicia, si tuviera una opción los escogería a ustedes, si tuviera dos opciones...los escogería dos veces.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

"Honra a tu padre y a tu madre, para que tus días se alarguen sobre la tierra que Jehová tu Dios te da."

Éxodo 20:12

AGRADECIMIENTOS

A ti **Señor Jesucristo** por ser la razón de mi vida, porque a través de tu amor y misericordia has hecho posible este trabajo, que mi vida honre tu nombre para darte la gloria y el imperio por los siglos de los siglos, amén.

A mis padres: **Elías y Teresa**, mis hermanos: **Ma. Esther, Marco Antonio, Blanca Azucena y Abigail del Carmen**, por sus palabras de ánimo, este triunfo también es de ustedes.

A mis sobrinos: **Izamar, Elías, Karina, Edgar, Aleida, Anita, Margarita, Geraldine, Wendy y ¿?** por ser un regalo de Dios para nuestras vidas, mis cuñados: **Cristina y Gerardo, Pedro, Erika y Jonatán**, mis suegros, **Pedro y Sonia**, gracias por enriquecer nuestra familia.

A mi amada familia: mi esposa **Flor**, chaparrita, bendito sea Dios por permitirme compartir la vida contigo... aún después de la muerte. **Dianita**, hijita, perdón por ese tiempo que no pasé contigo y las tantas veces que te dormías esperando a que llegara tu papá, a mi **bebé** (tres meses de gestación) que aún sin conocerte ya eres parte importante de mi, mi vida por ustedes.

Al **Ph. D. Julio Sepúlveda S.** por aceptarme en su grupo de trabajo, por su calidad humana y paciencia para compartir conmigo su gran experiencia en las ciencias morfológicas y su apoyo cada día, estoy en deuda con usted.

A la **Dra. Odila Saucedo C.** por esas palabras de ánimo aun hasta altas horas de la noche, por animarme a ser mejor cada día "esta bien, pero se puede mejorar".

A la **Dra. Raquel Ballesteros E.** por su apoyo y acertados comentarios para esta tesis, que bendición trabajar con usted.

Al **Dr. Roberto Montes de Oca L., Dr. Ricardo Salazar A. y Dr. Arturo Chávez R.** que ejemplo de humildad son, que Dios bendiga el fruto de su trabajo.

A mis compañeros: **Diana, Blanca, Humberto, Vivis, Arnulfo, Cecy, Jaime, Cristian, Katia, Rodrigo, Marcos, Martha**, especialmente a mi compadre **Eduardo**, que privilegio conocerlos. ®

Al **personal docente, administrativo y técnico del Departamento de Histología**, "estuve en hombros de gigantes..."

A mis pastores: **Esteban y Marcela, Francisco y Regina** y las congregaciones de Templo Cristiano y Templo Emmanuel por sus oraciones, gracias.

A mi gran amigo y maestro **M.C. Javier Morán M.** no lo defraudaré.

A mis amigos wangos: **Luis (Chompi), Luis (Chuchelo), Jacob (Chino), Samuel (Vena), Iván (Pim pon), Dany (Congo), Pedro (Perico), Jonás, Filo, Abel (Choco), Alex (Toto), Jesús (Chuyote)** y los que falten...Vamos Canadiense!!!

A **PROMEP** por la beca de apoyo económico al proyecto **103.5/04/757**

A **CONACYT** por la beca crédito **171880** para la realización de la maestría.

TABLA DE CONTENIDO

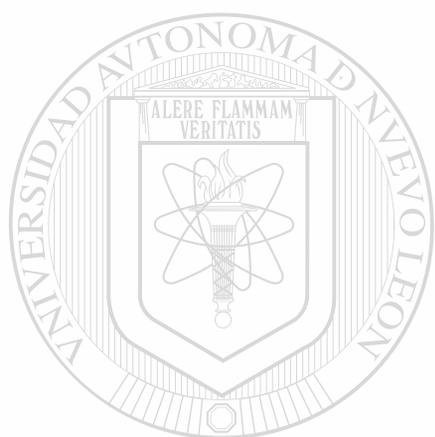
Pág.

CAPÍTULO

1. INTRODUCCIÓN.....	
1.1. Apoptosis.	1
1.2. Sistemas de Detección de Apoptosis.....	5
1.2.1. Microscopia de Luz.....	
1.2.2. Microscopia Electrónica de Transmisión.....	6
1.2.3. TUNEL.....	7
1.2.4. Electroforesis.....	8
1.2.5. Cuantificación del DNA fragmentado.....	9
1.3. Peroxisomicina A1 (PA1).....	11
1.4. JUSTIFICACIÓN.	16
1.5. OBJETIVO GENERAL.	
1.6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	
2.1. Material.....	17
2.1.1. Material Biológico.....	
2.1.2. Grupos Experimentales.....	
2.1.3. Reactivos.....	18
2.1.4. Material de Técnicas Morfológicas y Bioquímicas.....	19
2.1.5. Equipo Utilizado.....	
2.2. Estrategia Experimental.	20
2.3. Métodos.....	21
2.3.1. Obtención de la muestra.	
2.3.2. Procesamiento de los órganos.	
2.3.3. Análisis Morfológico.....	22
2.3.3.1. Microscopia de Luz.....	
2.3.3.1.1. Hematoxilina y Eosina, Tricrómico de Massón.....	
2.3.3.1.2. TUNEL.....	
2.3.3.2. Microscopia Electrónica de Transmisión.....	23
2.3.4. Análisis Bioquímico.....	24

3.1.2.2.1.	Grupos control sin tratamiento y control vehículo...	
3.1.2.2.2.	Grupos intoxicados con PA1, 4, 8, 12 y 24 hrs de exposición.....	40
3.1.2.3.	Microscopia Electrónica de Transmisión.....	
3.1.2.3.1.	Grupos control sin tratamiento y control vehículo...	41
3.1.2.3.2.	Grupo intoxicado con PA1, 4 hrs de exposición.....	42
3.1.2.3.3.	Grupo intoxicado con PA1, 24 hrs de exposición...	44
3.1.3.	PULMÓN.....	
3.1.3.1.	Microscopia de luz.....	
3.1.3.1.1.	Grupos control sin tratamiento y control vehículo...	45
3.1.3.1.2.	Grupo intoxicado con PA1, 4 hrs de exposición.....	
3.1.3.1.3.	Grupo intoxicado con PA1, 8 hrs de exposición.....	
3.1.3.1.4.	Grupo intoxicado con PA1, 12 hrs de exposición....	
3.1.3.1.5.	Grupo intoxicado con PA1, 24 hrs de exposición...	
3.1.3.2.	Inmunohistoquímica para el análisis de la fragmentación de la cromatina utilizando TUNEL.....	47
3.1.3.2.1.	Grupos control sin tratamiento y control vehículo...	
3.1.3.2.2.	Grupos intoxicados con PA1, 4, 8, 12 y 24 hrs de exposición.....	48
3.1.3.3.	Microscopia Electrónica de Transmisión.....	49
3.1.3.3.1.	Grupos control sin tratamiento y control vehículo...	50
3.1.3.3.2.	Grupo intoxicado con PA1, 4 hrs de exposición.....	
3.1.3.3.3.	Grupo intoxicado con PA1, 24 hrs de exposición...	52
3.2.	Análisis Bioquímico.....	
3.2.1.	Detección del DNA fragmentado mediante geles de agarosa..	
3.2.2.	Cuantificación del DNA fragmentado por espectrofotometría UV-VIS.....	54
3.3.	Análisis Estadístico.....	
4.	DISCUSIÓN.....	55
5.	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	59
5.1.	Conclusiones.....	

5.2. Perspectivas.....	
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
APÉNDICE A.....	70
APENDICE B.....	74



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

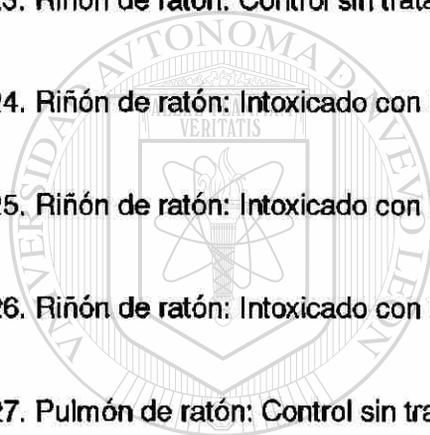


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PAG.
1. Cuadro comparativo de las diferencias morfológicas entre necrosis y apoptosis.....	2
2. Hígado de ratón intoxicado con PA1, 24 hrs de exposición: condensación de la cromatina y cuerpo apoptótico.....	6
3. Hígado de ratón intoxicado con PA1, 4 y 24 hrs de exposición: Alteraciones mitocondriales pre-apoptósicas y cuerpo apoptótico fagocitado.....	7
4. Riñón de ratón intoxicado con PA1, 24 hrs de exposición: Detección de la fragmentación de la cromatina mediante TUNEL.....	8
5. Fragmentación de la cromatina y su análisis mediante geles de agarosa.....	9
6. Reacción Difenilamina- DNA y liberación del fósforo.....	10
7. <i>K. humboldtiana</i> , su fruto y la estructura química de la T514 o Peroxisomicina A1.....	12
8. Órganos Blanco de la T 514: Hígado, Riñón y Pulmón en roedores.....	12
9. Estrategia experimental.....	20
10. Hígado de ratón: Control sin tratamiento y Control vehículo.....	27
11. Hígado de ratón: Intoxicado con PA1, 24 hrs. de exposición.....	28
12. Hígado de ratón, Controles de la técnica de TUNEL.....	29
13. Hígado de ratón: Control sin tratamiento y Control vehículo.....	29
14. Hígado de ratón: Intoxicado con PA1, 24 horas de exposición.....	30
15. Hígado de ratón: Control sin tratamiento e Intoxicado con PA1, 4 hrs de exposición...	32
16. Hígado de ratón: Intoxicado con PA1, 24 horas de exposición.....	33

17. Riñón de ratón: Control sin tratamiento: Corteza y Médula.....	35
18. Riñón de ratón: Intoxicado con PA1, 24 horas de exposición: Corteza.....	37
19. Riñón de ratón: Intoxicado con PA1, 24 horas de exposición: Médula.....	37
20. Riñón de ratón: Control vehículo.....	38
21. Riñón de ratón: Intoxicado con PA1, 24 horas de exposición: Corteza.....	39
22. Riñón de ratón: Intoxicado con PA1, 24 horas de exposición: Médula.....	39
23. Riñón de ratón: Control sin tratamiento: Corteza y Médula.....	41
24. Riñón de ratón: Intoxicado con PA1, 4 horas de exposición.....	42
25. Riñón de ratón: Intoxicado con PA1, 24 horas de exposición: Corteza.....	43
26. Riñón de ratón: Intoxicado con PA1, 24 horas de exposición: Médula.....	43
27. Pulmón de ratón: Control sin tratamiento.....	44
<hr/>	
28. Pulmón de ratón: Intoxicado con PA1, 24 horas de exposición.....	46
29. Pulmón de ratón: Control sin tratamiento.....	47
30. Pulmón de ratón: Intoxicado con PA1, 24 horas de exposición.....	48
31. Pulmón de ratón: Control sin tratamiento.....	49
32. Pulmón de ratón Intoxicado con PA1, 24 hrs. de exposición. Célula Sanguínea.....	50
33. Pulmón de ratón Intoxicado con PA1, 24 hrs. de exposición. Neumocito II.....	51
34. Fragmentación de DNA en HIGADO de ratón: Sin Tratamiento, Vehículo 24 hrs e Intoxicados con PA1.....	52

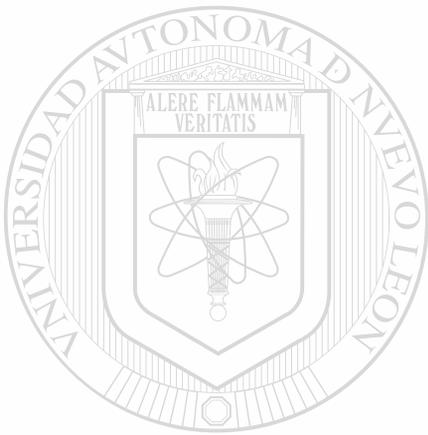


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

35. Fragmentación de DNA en RIÑÓN de ratón: Sin Tratamiento, Vehículo 24 hrs e Intoxicados con PA1.....	53
36. Fragmentación de DNA en PULMÓN de ratón: Sin Tratamiento, Vehículo 24 hrs e Intoxicados con PA1.....	53
37. Gráfica de la cuantificación de DNA fragmentado en Hígado, Riñón y Pulmón de ratón: Intoxicado con PA1, 24 horas de exposición.....	54
38. Curva de calibración para la cuantificación de DNA fragmentado.....	83



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



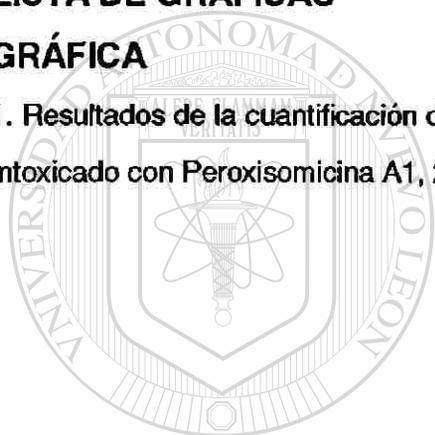
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE TABLAS

TABLA	PAG.
1. Resumen de estudios de apoptosis causada por PA1.....	15
2. Volúmenes, lecturas de absorbancia y diferencias de la curva de calibración.....	82
3. Resultados y análisis estadístico de la cuantificación de DNA (Proporción de DNA fragmentado).....	83

LISTA DE GRÁFICAS

GRÁFICA	PAG.
1. Resultados de la cuantificación de DNA en Hígado, Riñón y Pulmón de ratón del grupo Intoxicado con Peroxisomicina A1, 24 horas de exposición.....	54



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



APÉNDICE A

TÉCNICAS Y MÉTODOS.

A.1 Técnica para inclusión en resinas epóxicas.....	70
A.2 Técnica Histológica para muestras embebidas en parafina.....	70
A.3 Tinción con Hematoxilina y Eosina (H y E).....	71
A.4 Tricrómico de Massón.....	71
A.5 Método inmunohistoquímico TUNEL.....	72
A.6 Técnica de extracción de DNA fragmentado.....	73
A.7 Método espectrofotométrico para cuantificación de DNA fragmentado.....	73

APÉNDICE B

SOLUCIONES

B.1 ANALISIS MORFOLÓGICO.

B.1.1 Formaldehído 4 %..... 74

B. 1.2 PBS 10 X.....

B. 1.3 Fijador de Karnovsky- Ito.....

B. 1.4 Glutaraldehído 2.5 %..... 75

B. 1.5 Buffer de Cacodilatos 0.1 M pH 7.4.....

B. 1.6 Tetraóxido de osmio 2 %.....

B 1.7 Nitrato de uranilo acuoso 1%.....

B. 1.8 Resina epóxica 76

B. 1.9 Azul de Toluidina 5 %.....

B. 1.10 Acetato de uranilo 5 % en alcohol etílico 50 %..... 76

B. 1.11 Citrato de plomo 0.4 %.....

B. 1.12 Hematoxilina de Gill.

B. 1.13 Eosina.....

B. 1.14 Solución de Alcohol-Ácido..... 77

B. 1.15 Solución de Agua Amoniacal (Virador).....

B. 1.16 Hematoxilina férrica de Weigert.....

B. 1.17 Solución de Fucsina ácida y Escarlata de Biebrich.....

B.1.18 Solución de Ácidos Fosfomolibdico y Fosfotúngstico... 78

B 1.19 Solución de Azul de Anilina.....

B.1.20 Solución acuosa de Ácido Acético al 1%.....

B. 1.21 Solución Fijadora de Bouin.....

B. 2 INMUNOHISTOQUÍMICA (TUNEL).

B. 2.1 Solución de proteinasa K.....

B. 2.2 Solución bloqueadora.....

B. 2.3 Solución de Buffer de marcaje TdT 1 X..... 79

B. 2.4 Mezcla de Reacción de Marcaje

B. 2.5 Buffer Stop TdT 1X

B. 2.6 Solución Strep-HRP.....

B. 2.7 Solución de DAB.....

B. 2.8 Verde de metilo 1 %..... 80

B. 2.9 CONTROL POSITIVO.....

B. 2.10 CONTROL NEGATIVO.....

B. 3 ANÁLISIS BIOQUÍMICO

B.3.1 Buffer frío (Fosfato 50 mM/L, NaCl 120 mM/L y EDTA 10 mM/L, pH 7.4).....

B.3.2 SEVAGE.....

B.3.3 RNAsa libre de DNAsa (a concentración de 200 µg/mL).... 81

B.3.4 Buffer Tris-EDTA 1 X (Tris-HCl 10 mM/L, pH 8.0 y EDTA 1 mM/L).....

B.3.5 Buffer de carga (jugo azul).....

B.3.6 Buffer TBE 10 X (Tris 89 mM/L, Borato 89 mM/L y EDTA 2 mM/L, pH 8.0)

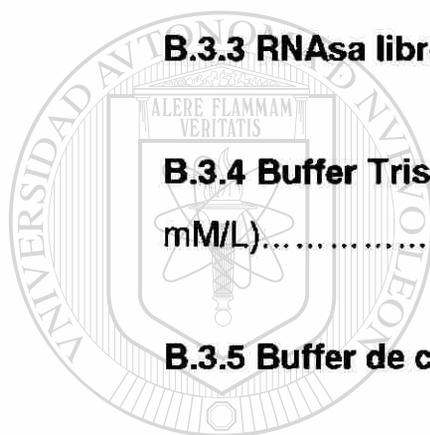
B.3.7 Ácido Perclórico (HClO₄) 10 N.....

B.3.8 Reactivo de Difenilamina (DPA).....

B. 3.9 Stock de acetaldehído (C₂H₄O) 16 mg/mL..... 82

B.3.10 Hidróxido de Sodio (NaOH) 1M.....

B.4 CURVA DE CALIBRACIÓN 82



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

NOMENCLATURA

%	Porcentaje
*	Diferencia estadísticamente significativa
~	Aproximadamente
<	Menor que
µm	Micrómetros
2DL ₅₀	Dos veces la dosis letal 50
c/u	Cada uno
Ca ²⁺	Calcio
Cat	Catálogo
Cm	Centímetro
cols.	Colaboradores
D.E.	Desviación Estándar
DAB	Diaminobencidina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP's	Dinucleótido trifosfato
DPA	Difenilamina
dUTP	Diuracil Trifosfato
EDTA	Ácido Etilendiaminotetracético
ej.	Ejemplo
fig.	Figura
g	Gravedades
grs	Gramos
H y E	Hematoxilina y Eosina
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogeno
HRP	Peroxidasa de Rábano.
hrs	Horas
i.p.	Intraperitoneal
Interp.	Interpolación
Kg	Kilogramos
L	Litros
M	Molaridad

Mesh	Divisiones
mg	Miligramos
Mg ²⁺	Magnesio
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Micromoles
N	Normalidad
nm	Nanómetros
°C	Centígrados
OH	Hidroxilo
P	Pastilla
PA1	Peroxisomicina A1
pb	Pares de bases
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
pH	Potencial de hidrogeno
PMN	Polimorfonucleares
S	Sobrenadante
Seg	Segundos
Strep	Estreptavidina
TBE	Amortiguador Tris- Borato-EDTA
TDT	Deoxinucleotidil Transferasa Terminal
TE	Tris-EDTA
TNF α	Factor de Necrosis Tumoral α
UV	Ultravioleta
V	Volts
μ g	Microgramos
μ L	Microlitro

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

RESUMEN

ADOLFO SOTO DOMÍNGUEZ

Fecha de Graduación: Agosto 2005

Universidad Autónoma de Nuevo León.
Facultad de Medicina.

Título

EVALUACIÓN MORFOLÓGICA Y BIOQUÍMICA
DE LA PRESENCIA DE APOPTOSIS EN VARIOS
ÓRGANOS DEL RATÓN TRATADO CON UNA
DOSIS TÓXICA DE PEROXISOMICINA A1.

Número de páginas:

83

Área de estudio: Morfología

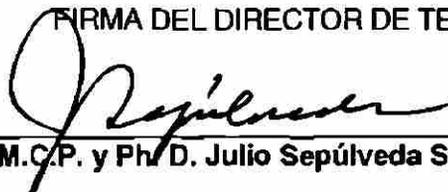
Candidato para el grado de Maestro en
Ciencias con Orientación en Morfología.

Propósito y Método del Estudio: Las células en proceso de apoptosis en tejidos analizados mediante microscopia de luz pueden presentar reducción del tamaño normal por condensación del citoplasma, la membrana plasmática forma protuberancias o "ampollas", pérdida de microvellosidades. En el núcleo la cromatina se condensa y se deposita sobre la envoltura nuclear para posteriormente fragmentarse. Finalmente la cromatina con organelos se incluyen en una membrana formando cuerpos apoptóticos que son fagocitados por macrófagos o por células vecinas. Etapas tempranas de apoptosis pueden ser detectadas por alteraciones mitocondriales: ruptura de la membrana externa, protrusión de la membrana interna a través de ésta ruptura con preservación de las crestas en el resto de la membrana interna. La fragmentación internucleosomal de la cromatina durante la apoptosis ocurre a intervalos de ~200 pb, los fragmentos son visualizados como un patrón de escalera mediante electroforesis del DNA en geles de agarosa. La liberación del ortofosfato inorgánico del DNA cuantificado mediante espectrofotometría permite conocer la proporción de fragmentación del DNA. La Peroxisomicina A1 (PA1), es una toxina aislada de la *Karwinskia humboldtiana* cuyos órganos blanco son: hígado, riñón y pulmón. Estudios recientes en hígado de ratón albino intoxicado con PA1 demostraron cuerpos apoptóticos a partir de las 8 horas aumentando con el tiempo.

El objetivo de este trabajo es: Identificar la presencia de apoptosis por métodos morfológicos y bioquímicos en riñón y pulmón de ratón intoxicado con PA1 y su cuantificación comparativa con la apoptosis observada en el hígado. Se emplearon 60 ratones CD-1 divididos en tres grupos: Sin tratamiento, Vehículo (aceite de cártamo) e Intoxicado con PA1 (2DL₅₀) administrada vía i.p. Se colectaron hígado, riñón y pulmón de todos los animales sacrificados a 4, 8, 12 y 24 horas post-intoxicación y divididos en tres fracciones: 1) Análisis Morfológico: TUNEL y microscopía de luz (H y E y tricrómico de Massón), 2) Microscopía Electrónica y 3) Métodos Bioquímicos: electroforesis del DNA en gel de agarosa y cuantificación de la fragmentación del DNA por espectrofotometría.

Conclusiones y Perspectivas: Se confirma la presencia de apoptosis inducida por la PA1 en hígado ya reportada, además se reporta por primera vez la inducción de apoptosis en células de riñón y pulmón caracterizada por la presencia de alteraciones preapoptóticas mitocondriales, cuerpos apoptóticos y ruptura internucleosomal de la cromatina demostrada por TUNEL y electroforesis del DNA en geles de agarosa. También se observaron células necróticas en el epitelio de los túbulos contorneados proximales en riñón. La cuantificación del DNA mostró que la intensidad de apoptosis es mayor en hígado, menor en riñón y finalmente en pulmón. Se propone que el hígado del ratón intoxicado con PA1 puede utilizarse como modelo para el estudio de la apoptosis causada por PA1.

FIRMA DEL DIRECTOR DE TESIS



M.C.P. y Ph.D. Julio Sepúlveda Saavedra

CAPÍTULO 1

INTRODUCCION

1.1 Apoptosis:

El término apoptosis (*apoptosis*, en griego “caída natural de las hojas en otoño”) fue acuñado en 1972 por Kerr y cols.¹ para describir las características morfológicas de la muerte celular programada (apoptosis) opuestas a la muerte celular accidental llamada necrosis.

Éstos procesos difieren en la vía de inducción: la necrosis es inducida por químicos letales, eventos biológicos y físicos, los cuales provocan un daño celular, mientras que la apoptosis se puede presentar de manera normal manteniendo la integridad funcional y estructural de los órganos y tejidos, en los cuales se requieren mecanismos homeostáticos estrictamente controlados a fin de regular el balance entre la proliferación celular (incremento en el número de células) y la disminución del número de células (produciendo la apoptosis).²

Sin embargo, además de lo anterior la apoptosis en estudios recientes tanto morfológicos como bioquímicos ha sido demostrada como respuesta a agentes tóxicos, quimioterapia o radiación, como por ejemplo: en el tratamiento contra neoplasias o cáncer^{3,4}.

En los tejidos, los eventos presentes en la necrosis y apoptosis son diferentes⁵ (fig 1). La necrosis causa muerte celular como resultado de un daño directo que usualmente inicia en la superficie de la célula, ésta se hincha y posteriormente ocurre lisis temprana antes de cualquier alteración morfológica significativa en el núcleo, mientras que en la apoptosis las células muestran encogimiento o formación de burbujas o ampollas en la superficie celular. A nivel nuclear, las células necróticas eventualmente exhiben hinchazón en el núcleo, mientras que en las células en apoptosis se muestran cambios morfológicos nucleares como: condensación de la cromatina e hipersegmentación de la cromatina de tamaño irregular, estas estructuras

pueden ser observadas en los cuerpos apoptóticos (fragmentos celulares rodeados de membrana). En las etapas tardías ambos procesos también difieren, en la apoptosis la formación de cuerpos apoptóticos evita la inflamación provocada por liberación incontrolada de contenidos intracelulares mientras que en la necrosis la ruptura del plasmalema desencadena procesos inflamatorios.⁶

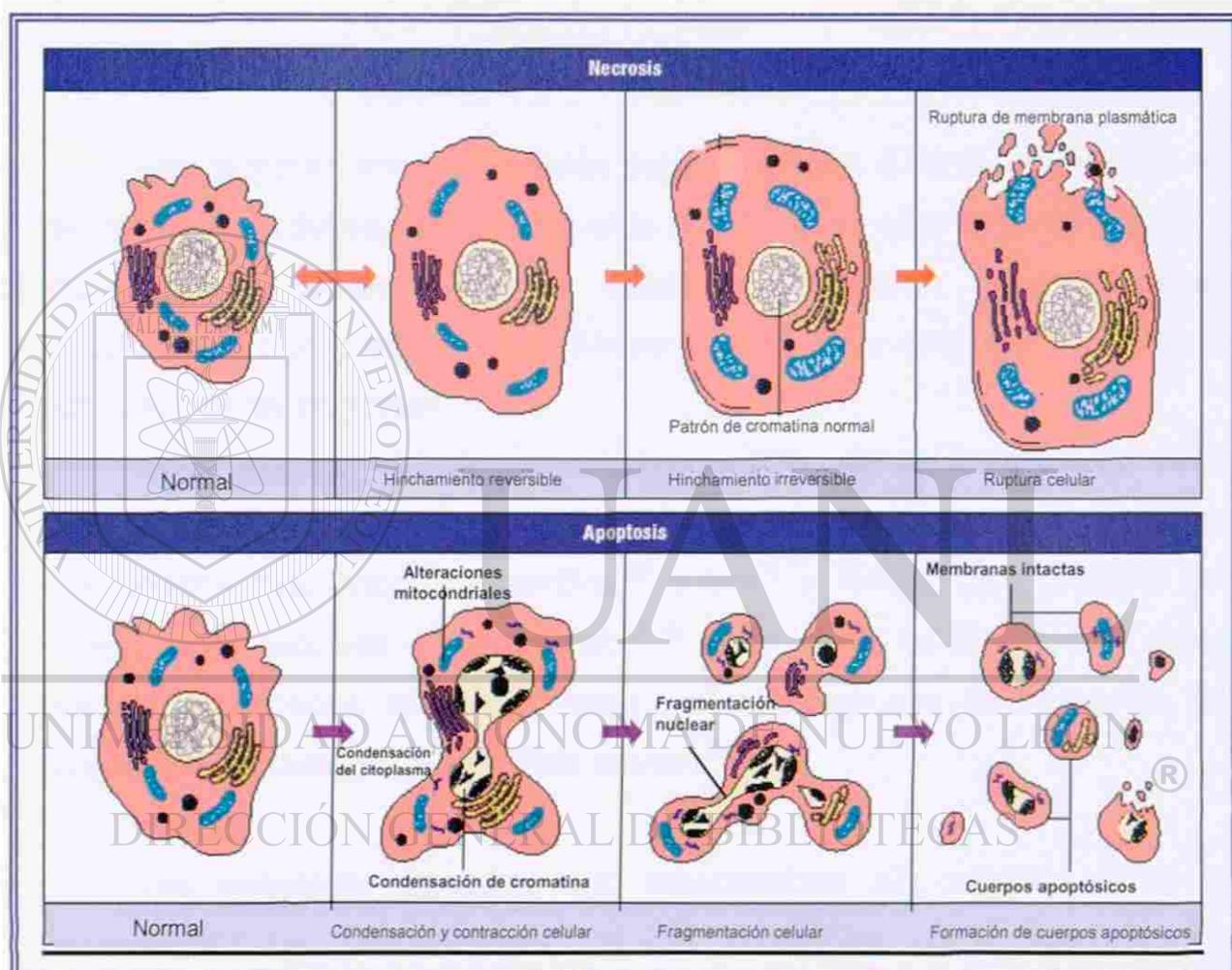


FIGURA 1. Cuadro comparativo de las diferencias morfológicas entre necrosis y apoptosis.

La apoptosis de ésta manera es un proceso altamente regulado que puede ser inducido, estimulado e inhibido en diferentes etapas, en que se involucra la acción de activadores, efectores y reguladores negativos o inhibidores.

El proceso de apoptosis puede ser visto como una cascada de eventos cuya secuencia precisa aún no está clara ya que algunos pasos en la cascada

difieren entre tipos celulares,⁷ no solamente por la fuerte relación con el proceso de proliferación y diferenciación,⁸ sino por las interacciones específicas de receptor-ligando. Esta activación conduce a la formación de un complejo de señalizaciones intracelulares que subsecuentemente pueden activar proteínas o mensajeros iniciadores o efectores. Dentro de las proteínas involucradas en la cascada de apoptosis se han realizado numerosos estudios sobre una familia de enzimas llamadas caspasas (cisteín-aspartato proteasas) iniciadoras y efectoras, por ejemplo caspasa 8 y caspasa 3.⁹

Las caspasas iniciadoras están colocadas en la cima de la jerarquía de las caspasas.¹⁰ Subsecuentemente ellas rompen y de esta manera activan a una segunda subpoblación de caspasas conocidas como caspasas ejecutoras.¹¹ La progresión irreversible de la cascada de apoptosis inicia con la activación de las segundas.

Las caspasas iniciadoras son responsables de cambios morfológicos importantes por ejemplo la fragmentación del citoesqueleto y las proteínas relacionadas incluyendo la vimentina,¹² actina¹³ y fodrina (una proteína del citoesqueleto asociada a membrana).^{14,15} Entre otros, se piensa que estos eventos apoptóticos tempranos están relacionados con la formación de ampollas o vesículas en la superficie celular.¹⁶

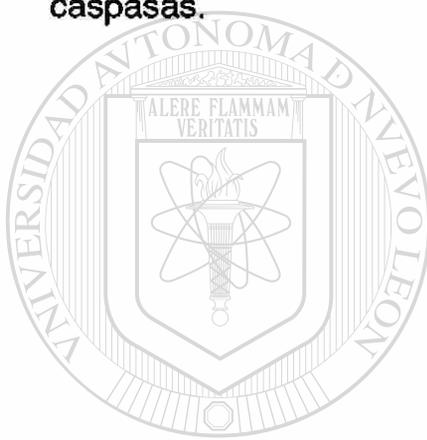
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Las caspasas ejecutoras son responsables de cambios como la condensación y fragmentación de la cromatina, externalización de fosfatidilserina y formación de cuerpos apoptóticos.¹⁷ La activación de estas caspasas esta estrechamente relacionada con la familia bcl-2 de las proteínas de las mitocondrias. Los varios miembros de esta familia promueven (bad, bak, bax, bcl-xs, bik, hrk) o inhiben (A1, bcl-2, bcl-w, bcl-xl, bfl-1,brag-1, mcl-1, NR13) rompiendo la ejecución de las caspasas.^{11,18,19}

En estudios bioquímicos sobre apoptosis en células de mamíferos llamó la atención el complejo papel de la mitocondria, ya que en estos estudios se identificaron varias proteínas mitocondriales que pueden activar o inhibir

directamente el programa de apoptosis, como por ejemplo Bcl-2²⁰, un gen cuyo producto proporciona resistencia a apoptosis en linfocitos^{18, 21-25}.

Estas proteínas se encuentran normalmente en el espacio intermembranal de la mitocondria y que en respuesta a diversos estímulos de activación de apoptosis son liberadas al citosol y/o al núcleo. Estas proteínas pueden activar o inhibir la cascada de apoptosis, una de estas proteínas es la enzima citocromo c (sintetizada por un gen nuclear), la cual es un componente de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria y que al ser liberada al citosol cuando ocurre la ruptura de la membrana externa activa la cascada de caspasas.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.2 SISTEMAS DE DETECCIÓN DE APOPTOSIS.

Como ya se mencionó, la apoptosis involucra una serie de eventos celulares que pueden ser observados mediante microscopia de luz y microscopia electrónica de transmisión y detectadas mediante métodos inmunohistoquímicos y bioquímicos.

1.2.1 MICROSCOPIA DE LUZ

En los tejidos el proceso de apoptosis afecta a células de manera dispersa en lugar de a grupos de células contiguas.

Al observar cortes de tejidos a microscopia de luz se pueden encontrar células en proceso de apoptosis con la presencia de un halo claro alrededor, debido al encogimiento celular o bien las células pueden mostrar un tamaño menor del normal, también se presenta pérdida de microvellosidades, si la célula es secretora puede presentar una desgranulación previa al encogimiento.

Los cambios que ocurren en el núcleo proveen una evidencia inequívoca del desarrollo de la apoptosis. A bajo aumento en el núcleo se puede apreciar condensación de la cromatina o depósitos en masas de tinción densa depositadas sobre la envoltura así como aumento o disminución del tamaño nuclear.²⁶

Simultáneamente con los cambios ocurridos en el núcleo el citoplasma se condensa y se empiezan a formar protuberancias o “ampollas” en la superficie celular, ocasionando un encogimiento o reducción en el volumen celular, también se pueden apreciar claras vesículas en algunas regiones del citoplasma aunque de manera poco frecuente. La siguiente fase en la célula en apoptosis es la fragmentación del núcleo y la formación de cuerpos apoptóticos en que se mantiene la integridad de la membrana y se pueden observar los organelos bien preservados (fig 2).

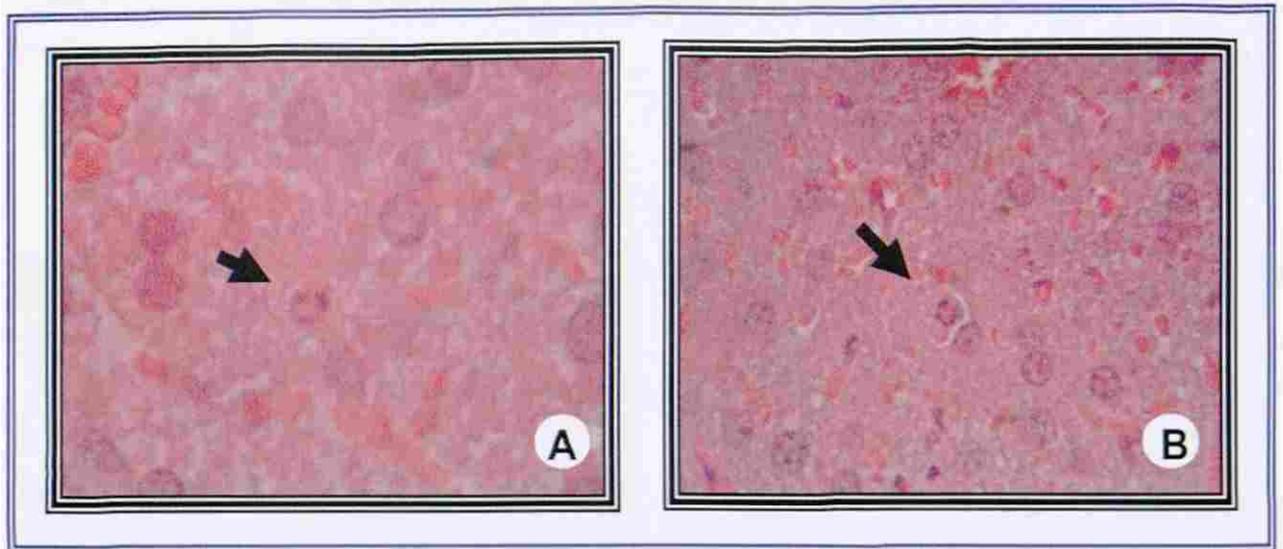


FIGURA 2. Hígado de ratón tratado con PA1. Tiempo de exposición 24 horas. **A)** Condensación de la cromatina sobre la envoltura nuclear (flecha). **B)** Cuerpo apoptótico (flecha). Microscopia de luz. Inclusión en parafina. H y E. A 1000X, B 400X.

1.2.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Estudios ultraestructurales han reportado cambios pre-apoptóticos en la mitocondria previos a la fragmentación de la cromatina (fig. 3 A), estos cambios consisten en “herniaciones” de la membrana interna a través de la ruptura de membrana externa con hinchazón focal de la matriz y pérdida de las crestas cercanas a la ruptura. Las crestas, membrana interna y externa restantes de la mitocondria permanecen intactas.²⁷ En contraste con los cambios mitocondriales mencionados en la apoptosis, en la necrosis las mitocondrias se hinchan, hay pérdida de las crestas y extracción parcial o total de la matriz mitocondrial.

Dentro de los tejidos, los cuerpos apoptóticos son rápidamente fagocitados por macrófagos residentes o bien por células vecinas incluyendo células epiteliales, dentro de los fagosomas los cuerpos apoptóticos (fig. 3 B) son degradados por enzimas lisosomales derivados de la célula fagocítica. A microscopia electrónica se pueden apreciar remanentes de estos cuerpos como

masas densas de cromatina o bien residuos no digeribles dentro de los telolisosomas.²⁶

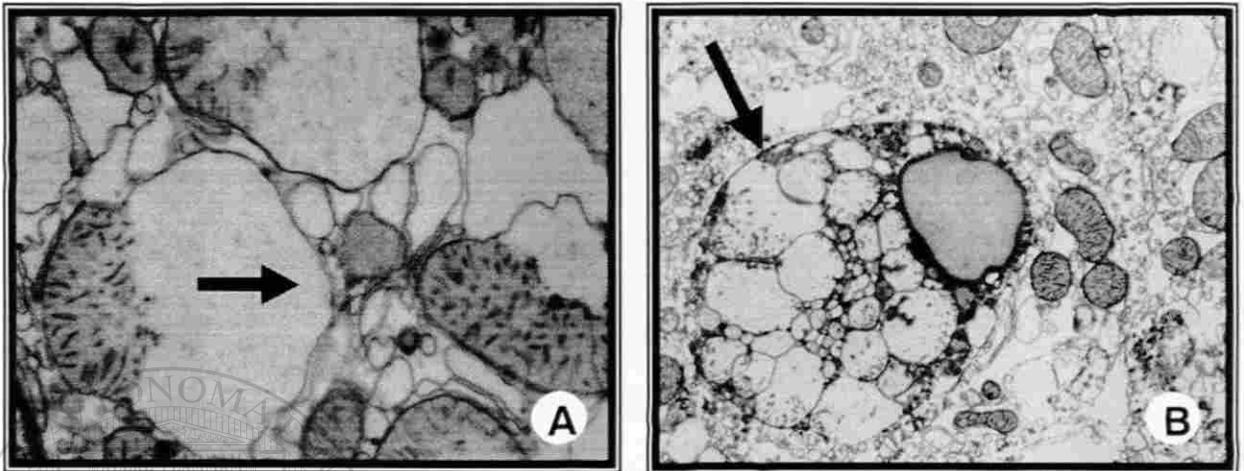


FIGURA 3. Hígado de ratón tratado con PA1. **A) 4 hrs de exposición:** alteración mitocondrial pre-apoptósica (flecha). **B) 24 hrs. de exposición:** Cuerpo apoptósico (flecha). Microscopia electrónica de transmisión. Inclusión en resinas epóxicas, contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo. A) 7000X, B) 4400X

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

1.2.3 TUNEL

Una de las herramientas empleadas para la detección de la fragmentación de la cromatina asociada a apoptosis es el método comúnmente conocido como TUNEL (Tdt-mediated dUTP-biotin Nick-End Labeling).²⁸

Éste método permite detectar las zonas de fragmentación de la cromatina producto de las endonucleasas activadas, las cuales generan una multitud de fragmentos de DNA con los extremos 3'OH libres, estos extremos por estar expuestos pueden ser detectados por la adición de deoxinucleótidos en una reacción catalizada por una deoxinucleotidil transferasa terminal (TDT) observando finalmente una señal de positividad en el núcleo por medio de un marcador (fig. 4).

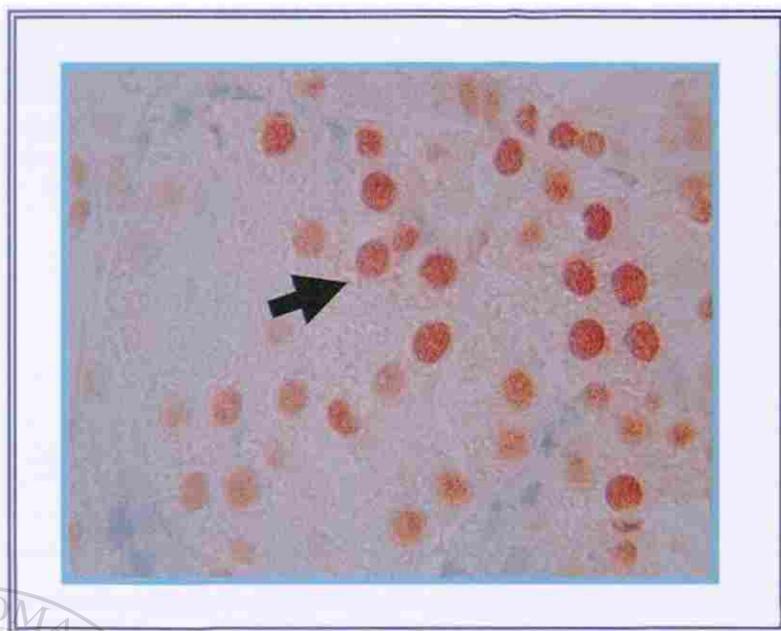


FIGURA 4. Riñón de ratón tratado con PA1. Tiempo de exposición 24 horas. Núcleos positivos (Flecha). Microscopia de luz. Inclusión en parafina. TUNEL. 1000X.

1.2.4 ELECTROFORESIS:

La fragmentación regular del DNA es otra característica para analizar las células en apoptosis debido a que al extraer el DNA éste se encuentra degradado en un patrón internucleosomal.^{29,30} La fragmentación se produce por activación de endonucleasas dependientes de Ca^{2+} y Mg^{2+} a intervalos de ~200 pares de bases. Este DNA fragmentado es frecuentemente analizado utilizando geles de agarosa (fig. 5) en los cuales se observan los fragmentos de la cromatina en un "patrón en escalera".^{30,31}

En la necrosis se presenta una fragmentación al azar con degradación del DNA atribuida a la liberación de enzimas lisosomales hidrolíticas.³²

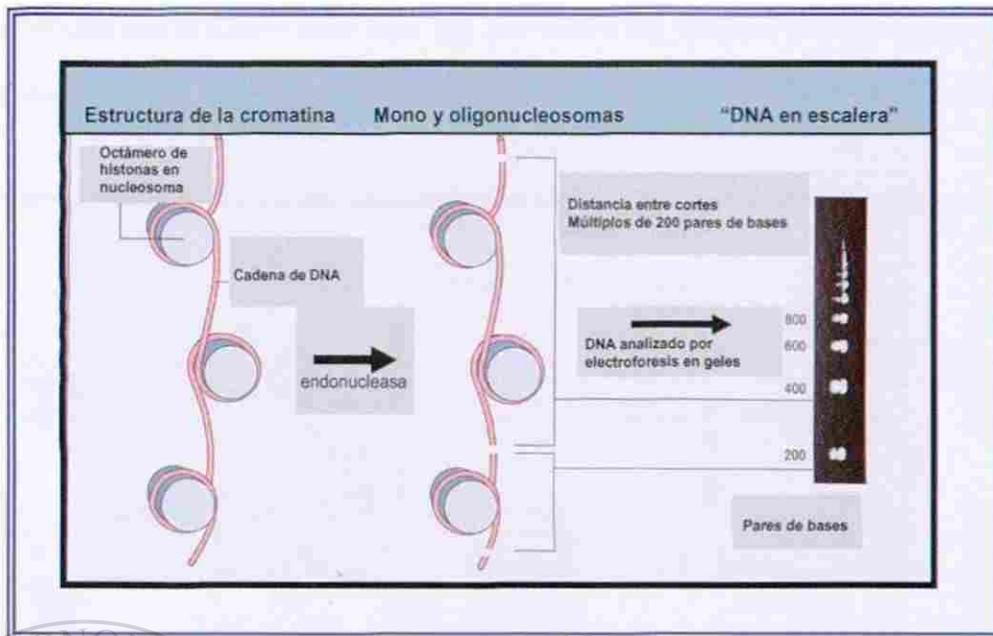


FIGURA 5. Fragmentación de la cromatina y su análisis mediante geles de agarosa.

1.2.5 CUANTIFICACIÓN DEL DNA FRAGMENTADO.

Los métodos bioquímicos permiten no solo la extracción del DNA total de las células presentes en tejidos o en cultivo, sino además realizar evaluaciones para conocer el estado en que se encuentra este DNA, uno de los métodos que permiten realizar esto es por ejemplo un método espectrofotométrico reportado por Burton en 1956³³ y modificado por Jian y cols. en 2002³⁴ mediante el cual se puede determinar el porcentaje de fragmentación del DNA presente en muestras que contienen tanto células apoptósicas como no apoptósicas y que esta determinación cuantitativa de la fragmentación del DNA se debe a la correlación con la proporción de células en apoptosis.

El mecanismo de reacción en este método es la liberación del fósforo inorgánico mediante la interacción entre las purinas del DNA (adenina y guanina) con el grupo amino de la difenilamina, esta reacción colorimétrica es potenciada por la presencia de acetaldehído el cual no muestra interferencia en

las absorbancias a 595 y 650 nm. La cantidad de fósforo inorgánico liberado es una relación indirecta de la cantidad de DNA presente en la muestra (fig. 6).

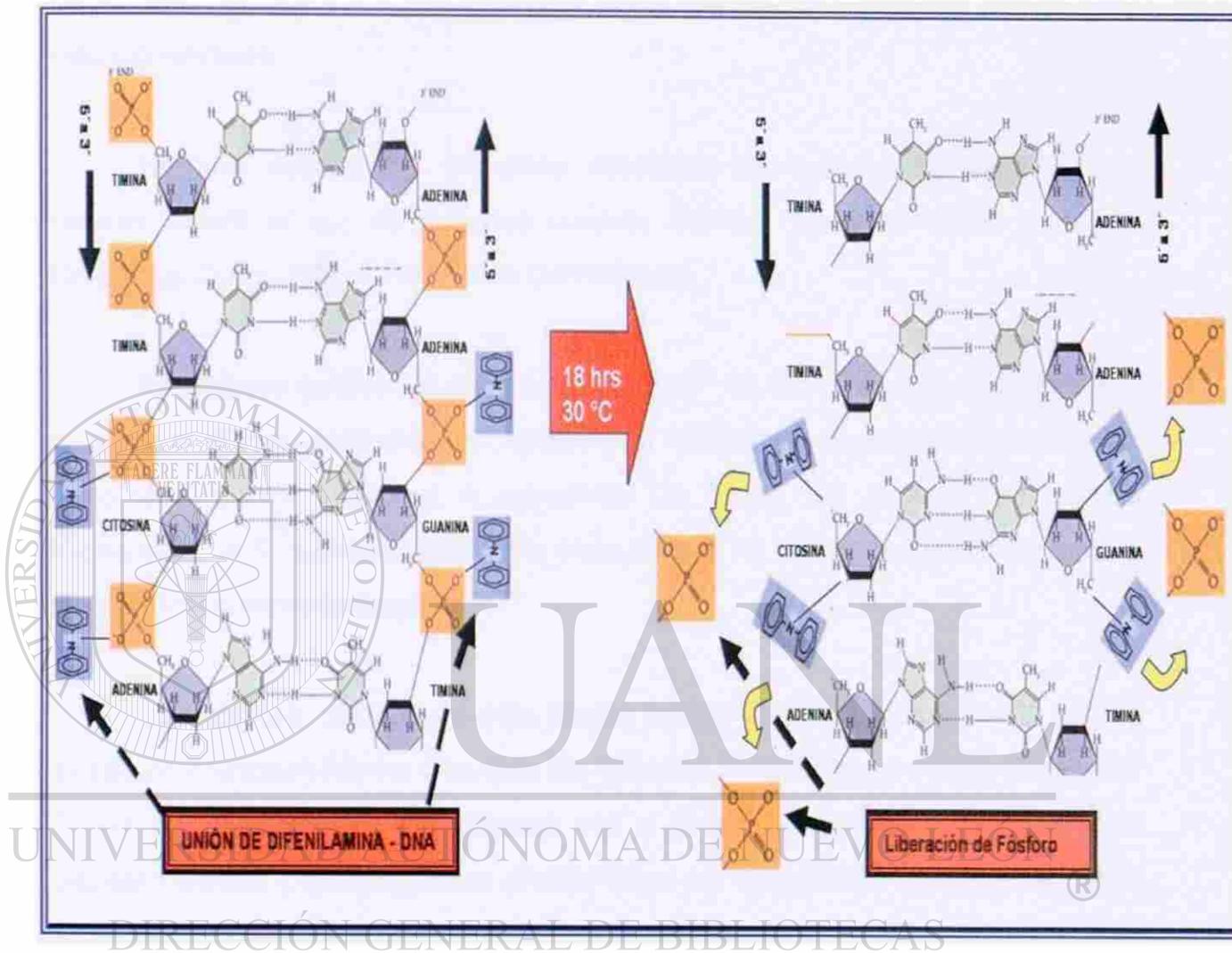


FIGURA 6. Reacción Difenilamina- DNA y liberación del fósforo.

1.3 Peroxisomicina A1 (PA1).

El género *Karwinskia* pertenece a la familia *Rhamnaceae* y está constituido por arbustos y árboles pequeños que crecen en zonas tropicales y áreas desérticas.

Se han descrito 15 especies diferentes del género *Karwinskia*, que habitan desde el sur de Estados Unidos, México, Centroamérica, norte de Colombia, Cuba, Haití y República Dominicana.

En México existen 12 especies distintas³⁵ de las cuales la más común y abundante por su extensión territorial es la *Karwinskia humboldtiana* (también conocida como tullidora o coyotillo). De todas las plantas del género *Karwinskia*, la *K. humboldtiana* es la especie que ha sido más estudiada tanto a nivel químico como toxicológico.³⁶

Los efectos tóxicos de esta planta fueron descritos por primera vez en 1769 por Francisco Xavier Clavijero en "Historia de la Antigua o Baja California"³⁷, en la cual describió por primera vez a la *K. humboldtiana* dentro de las plantas nocivas y extravagantes encontradas por los jesuitas en Baja California a finales del siglo XVIII.

En 1975 Dreyer y Cols.³⁸ aislaron por primera vez del endocarpio de la *Karwinskia humboldtiana*, cuatro toxinas denominadas por su peso molecular como: T 496, T 514, T 516 y T 544.

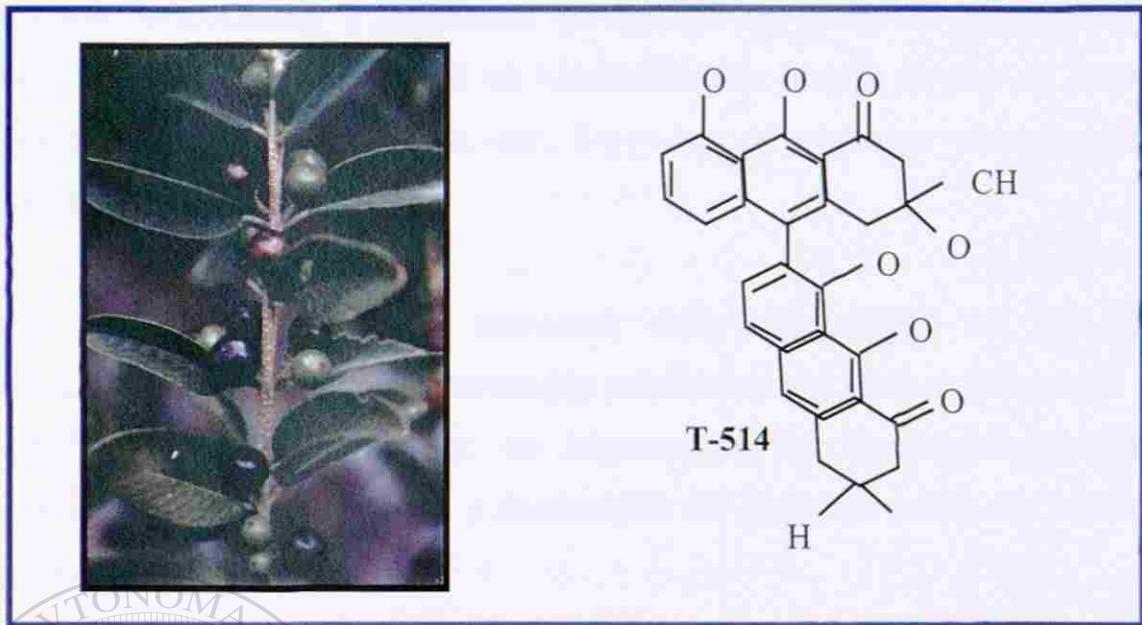


FIGURA 7. *K. humboldtiana*, su fruto y la estructura química de la T-514 o Peroxisomicina A1.

En los estudios de Bermúdez y cols. con animales intoxicados con T-514 se estableció que los órganos blanco de ésta toxina son: hígado, riñón y pulmón,³⁹⁻⁴² tanto en roedores y primates. En humanos⁴³ solo se obtuvo evidencia clínica del daño causado a estos tres órganos.

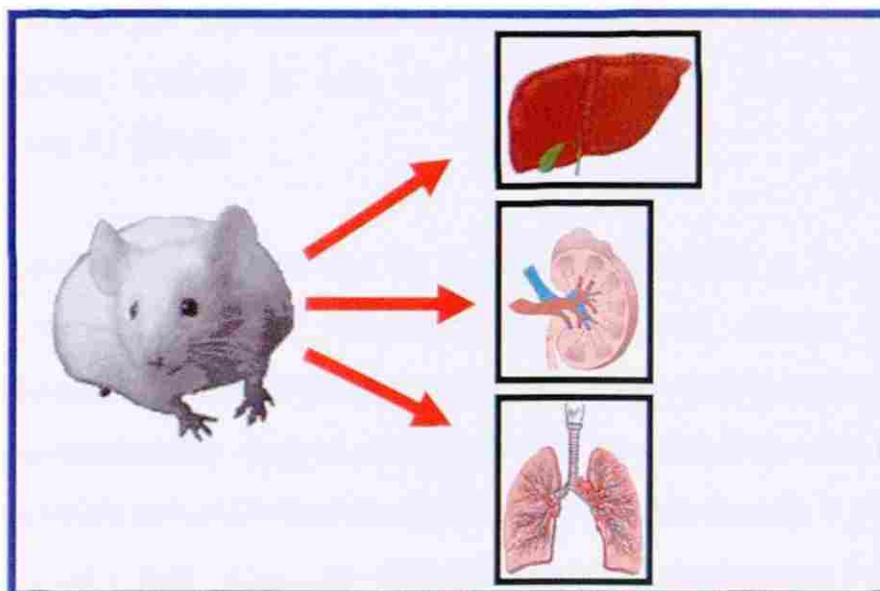


FIGURA 8. Órganos Blanco de la T 514: Hígado, Riñón y Pulmón en roedores.

Además la T-514 produce en el hígado, dependiendo de la dosis, necrosis centrobulillar y esteatosis, (infiltración de grasa en hepatocitos). La lesión más notable encontrada en hepatocitos en etapas tardías de animales intoxicados experimentalmente con T-514, es la excesiva acumulación de lípidos intracelulares.^{39, 44}

En otros estudios se demostró, daño mitocondrial en las células epiteliales de los túbulos contorneados proximales del riñón causado por la T-514.⁴⁵ A nivel ultraestructural, en mitocondrias se demostró: aumento de volumen, pérdida de la matriz y destrucción del organelo por la vía autofágica lisosomal.

Piñeyro, en 1990⁴⁶ describió por primera vez la toxicidad selectiva de la T-514 sobre algunas líneas celulares tumorales humanas de hígado, pulmón y colon, lo que ha motivado a estudios a fin de establecer a la T-514 como un posible agente antineoplásico, obteniendo una patente para su utilización, otorgada por la Comunidad Económica Europea,⁴⁷ EUA,⁴⁸ Japón, Corea, Canadá y México.⁴⁹

Estudios realizados por Sepúlveda y cols.⁵⁰ en levaduras metilotróficas, demostraron que la T-514 causa, a dosis no letales, un daño selectivo e irreversible sobre los peroxisomas. Sugiriendo que el peroxisoma fuera el organelo blanco. Debido a esto se renombró a la toxina T-514 como Peroxisomicina A1 (PA1).

Para evaluar la interacción de la PA1 con el DNA y la activación de apoptosis Lansiaux y cols.⁵¹ Realizaron estudios con células de leucemia humana resistentes y sensibles a la droga antitumoral mitoxantrona (HL-60/MX2 y HL60 respectivamente) reportando que la PA1 no interaccionaba con el DNA, sino que mostraba una actividad inhibitoria de la topoisomerasa II pero no sobre la topoisomerasa I, éste efecto de inhibición de la topoisomerasa II puede servir

como una señal de inducción de la activación de la muerte celular en las células de leucemia expuestas a esta toxina, además en ambas líneas celulares se presentaba pérdida de células de cada fase del ciclo celular y un gran incremento en la región sub-G₁ lo cual es característico de las células apoptóticas siendo esto más pronunciado en la línea HL-60 que en la HL60/MX2 (la cual tenía una actividad reducida de topoisomerasa II). Las células HL-60 tratadas con PA1 estimulaban el rompimiento de la poly (ADP-ribosa) polimerasa por las proteasas intracelulares como la caspasa-3.

En éste estudio también se caracterizó un metabolito radical de la T-514 llamado T-510R el cual mostró una menor actividad inhibitoria con la topoisomerasa II y 3-4 veces menos tóxicas para ambos tipos celulares.

Martínez y cols. (2001)⁵² reportaron que la PA1 indujo apoptosis en líneas celulares establecidas en un cultivo primario de cardiomiocitos de rata neonatal, y que las líneas transformadas fueron más sensibles que las líneas no transformadas. En este estudio mediante citometría de flujo se encontró la apariencia de células que contenían menos de 2c DNA, lo que indica degradación del DNA nuclear característico de la muerte celular por apoptosis y que la PA1 inhibe la proliferación de varias líneas celulares por la acumulación de células en etapas G₂/M indicando más probablemente el retraso en G₂. ®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

En 2002, Santoyo⁵³ reportó en su tesis de maestría el efecto protector del clofibrato sobre el hígado de ratón albino tratado con PA1 y demostró la presencia de alteraciones pre-apoptóticas mitocondriales específicas característica que antecede a la fragmentación de la cromatina a las 4 horas de exposición a una dosis única de PA1 y cuerpos apoptóticos a 24 horas de exposición en el grupo de ratones pretratados con clofibrato e intoxicados con PA1.

Ballesteros y cols. (2002)⁵⁴ describieron aumento de la actividad de la citocromo oxidasa en mitocondrias de algunos hepatocitos en hígado de ratón

albino intoxicado con una dosis única de 2DL₅₀ disuelta en aceite de cártamo como vehículo. Esto ha sido reportado por Angermüller y cols.²⁷ como signo temprano de apoptosis.

TABLA 1. RESUMEN DE ESTUDIOS DE APOPTOSIS CAUSADA POR PA1

<i>IN VITRO</i>	<i>IN VIVO</i>										
<p>➤ Lansiaux y cols. (2001) * Células de leucemia humana HL-60 y HL-60/MX2</p>	<p>➤ Santoyo (2002). Hígado normal de ratón. * Alteraciones mitocondriales preapoptóticas. * Cuerpos apoptóticos.</p>										
<p>➤ Martínez y cols. (2001). * Líneas celulares establecidas transformadas</p> <table border="0"> <tr> <td>1.- Jurkat</td> <td>6.- 293</td> </tr> <tr> <td>2.- Hela</td> <td>7.- Rat2</td> </tr> <tr> <td>3.- MCF-7</td> <td>8.- BALB/3T3</td> </tr> <tr> <td>4.- HT29</td> <td>9.- 3T3SV2</td> </tr> <tr> <td>5.- HepG2</td> <td></td> </tr> </table>	1.- Jurkat	6.- 293	2.- Hela	7.- Rat2	3.- MCF-7	8.- BALB/3T3	4.- HT29	9.- 3T3SV2	5.- HepG2		<p>➤ Ballesteros y cols.(2002). Hígado normal de ratón. * Actividad de Citocromo Oxidasa</p>
1.- Jurkat	6.- 293										
2.- Hela	7.- Rat2										
3.- MCF-7	8.- BALB/3T3										
4.- HT29	9.- 3T3SV2										
5.- HepG2											

1.4 JUSTIFICACIÓN

Teniendo en cuenta los estudios anteriores, consideramos de interés evaluar si la apoptosis descrita en hígado también se presenta en los otros órganos blanco de la PA1, como son el riñón y pulmón y determinar la intensidad de apoptosis en éstos órganos para seleccionar el que la presente en mayor grado como un modelo de estudio de apoptosis.

1.5 OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la presencia de apoptosis por métodos morfológicos y bioquímicos en riñón y pulmón de ratón intoxicado con PA1 y su cuantificación comparativa con la apoptosis observada en el hígado.

1.6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1.- Evaluar la presencia de cambios histológicos característicos de apoptosis mediante microscopia de luz en riñón y pulmón de ratones tratados con PA1.
- 2.- Evaluar la ultraestructura en riñón y pulmón de ratones tratados con PA1.
- 3.- Detectar la fragmentación de la cromatina mediante métodos inmunohistoquímicos (TUNEL) y geles de agarosa en hígado, riñón y pulmón de ratones tratados con PA1.
- 4.- Cuantificar la fragmentación del DNA en hígado, riñón y pulmón de ratones tratados con PA1 mediante métodos espectrofotométricos y realizar un análisis estadístico y comparativo.

CAPITULO 2

MATERIAL Y MÉTODOS:

2.1 MATERIAL.

2.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO.

En este estudio se emplearon 60 ratones machos adultos jóvenes (5-6 semanas de edad) de la cepa CD-1, con peso entre 25 y 35 grs los cuales fueron proporcionados por el bioterio del Departamento de Histología, los ratones se mantuvieron en una dieta estándar de laboratorio con agua *ad libitum*.

2.1.2 GRUPOS EXPERIMENTALES.

# RATONES CEPA CD1 (n= 60)	CONDICIONES EXPERIMENTALES	HORAS DE EXPOSICIÓN
20	1.- 2DL ₅₀ de PA1 (28 mg/Kg de peso) disuelta en aceite de cártamo comercial como vehículo administrada vía i.p.	4, 8 12 y 24.
20	2.- Vehículo administrada vía i.p.	4, 8 12 y 24.
20	3.- Sin Tratamiento	4, 8 12 y 24.

2.1.3 REACTIVOS.

Los reactivos utilizados en este estudio fueron de alta calidad analítica. Glutaraldehído, tetraóxido de osmio, resinas epóxicas, cacodilato de sodio, acetato de uranilo, nitrato de uranilo, citrato de plomo, azul de toluidina, de Electron Microscopy Sciences (USA).

Paraformaldehído, cloruro de sodio, cloruro de potasio, fosfato monobásico y dibásico de sodio, fosfato monobásico de potasio, peróxido de hidrógeno, ácido etilendiaminotetracético, xilencianol, bromofenol, trizma base, ácido bórico, difenilamina, glicerol y alcohol isoamílico de Sigma Chemical Company (USA).

Ácido clorhídrico, borato de sodio, yodato de sodio, sulfato de aluminio, ácido acético glacial, eosina amarillenta, hidróxido de amonio, hematoxilina anhidra, cloruro férrico, ácido fosfomolibdico y fosfotúngstico, hidróxido de sodio, ácido sulfúrico, metanol y ácido perclórico de Analytika Tecnología Industrial Química (México), alcohol etílico de CTR (México), Escarlata de Biebrich de HYCEL de México (México), Fucsina ácida de MCB Manufacturing Chemical Inc. (USA), Azul de anilina de Eastman Kodak (USA), ácido pícrico de B&A Specialty Chemical Divisions (USA), Cloroformo de ICN Biomedicals (USA), Agarose multi-purpose molecular grade de Biorline, (USA).

Vidrio para preparar las cuchillas de Pelco y cuchilla de diamante marca Diatome (Suiza), rejillas de cobre (200 mesh) y moldes de inclusión de Electron Microscopy Sciences (USA).

Placas fotográficas para el microscopio electrónico de transmisión Kodak Electron Microscopy Film 4489 3 ¼ x 4" Cat No. 74100.

2.1.4 MATERIAL DE TÉCNICAS MORFOLOGICAS Y BIOQUIMICAS.

Material quirúrgico, guantes de látex, recipientes de vidrio, jeringas y agujas, puntillas para pipetas, tubos eppendorf de 1.5 mL estériles, agua ultrapurificada por el sistema Milli-Q de Millipore.

2.1.5 EQUIPO UTILIZADO.

- * Microscopio Electrónico de Transmisión, Carl Zeiss EM 110
 - * Foto Microscopio Carl Zeiss
 - * Microscopio de campo claro Carl Zeiss
 - * Microscopio Estereoscópico American Optical
 - * Ultramicrotomo RMC modelo MTX.
 - * Preparador de cuchillas de vidrio LKB Bromma 7800 knifemaker.
 - * Vórtex VX 100 Labnet Internacional Inc.
-
- * Potenciómetro Orion Research.
 - * Balanza Analítica Mettler.
 - * Homogenizador manual Biovortexer No. 1083. Biospect Products.
 - * Centrífuga refrigerada Mikro 22 R, Hettich Zentrifugen.
 - * Espectrofotómetro Beckman DU 7500 con arreglo de diodos.
 - * Centro de Inclusión Tissue Tek. II
 - * Placa de calentamiento con agitador magnético FELISA
 - * Juego de pipetas calibradas de 10, 20, 200 y 1000 μ L pipet lite Rainin
 - * Fuente de poder Power Static r 300, Labnet Internacional Inc.
 - * Incubadora Gravity Convection Incubator, economy model 2EG.
 - * Transiluminador Biorad UV 2000
 - * Fotodocumentador Biorad Digi Doc

2.2. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental empleada se ilustra en el esquema de la figura 9.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

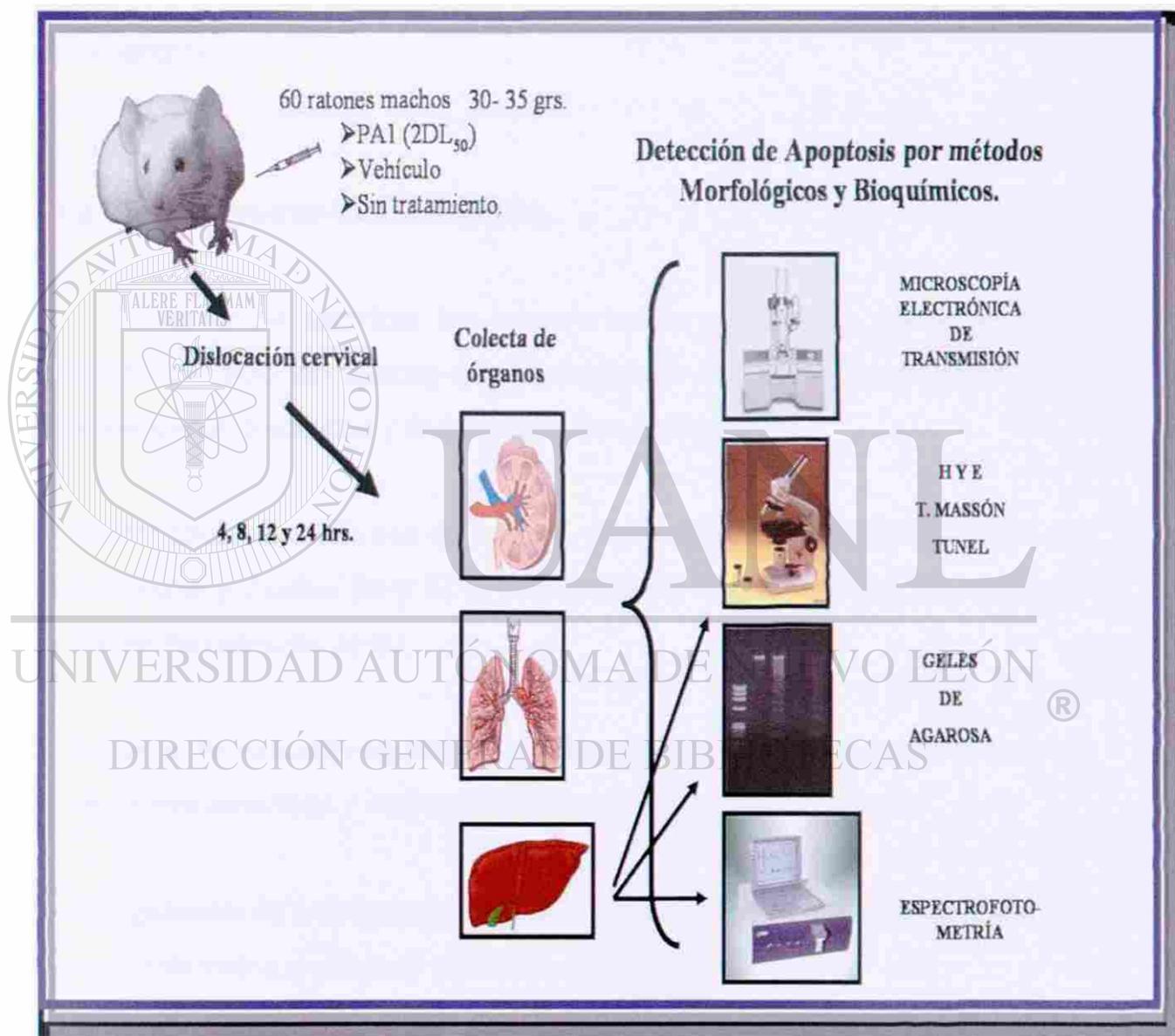


FIGURA 9. Esquema que ilustra la estrategia experimental empleada en este estudio.

2.3 MÉTODOS

2.3.1 Obtención de la muestra.

Los ratones de todos los grupos fueron sacrificados por dislocación cervical a tiempos de 4, 8, 12 y 24 hrs posterior a la administración de toxina o vehículo, los ratones del grupo sin tratamiento también fueron sacrificados en estos tiempos.

2.3.2 Procesamiento de los órganos

Después del sacrificio, los ratones fueron perfundidos por el ventrículo izquierdo con solución fijadora de glutaraldehído al 0.25 %, posteriormente los órganos fueron disecados y divididos en tres partes:

1.- Procesados por la técnica de inclusión en parafina para: TUNEL, tinción con Hematoxilina y Eosina (H y E) y Tricrómico de Massón, éstos se analizaron mediante microscopia de luz.

2.- Técnica de inclusión en resinas epóxicas para su análisis a microscopia de luz en cortes semifinos y microscopia electrónica en cortes finos.

3.- Congelación de una fracción para el análisis mediante métodos bioquímicos: espectrofotometría y geles de agarosa.

2.3.3.- ANÁLISIS MORFOLÓGICO.

2.3.3.1 Evaluación mediante microscopia de luz.

Las muestras fueron procesadas por la técnica de inclusión en parafina: Fijación con formaldehído al 4 %, deshidratadas en alcoholes graduales 60-100 % e inclusión en parafina.

2.3.3.1.1 Hematoxilina y Eosina (H y E) y Tricrómico de Massón.

Se realizaron cortes histológicos de 5 μm y se tiñeron con H y E o Tricrómico de Massón.

Estas técnicas se describen ampliamente en el apéndice A.

2.3.3.1.2 Inmunohistoquímica para el análisis de la fragmentación de la cromatina utilizando TUNEL.

La técnica de TUNEL se llevó a cabo utilizando el kit de Trevigen® para muestras fijadas con formaldehído al 4 %, embebidas en parafina y cortes de 6 μm .

La fragmentación del DNA se detectó añadiendo dUTPs macados en los extremos 3'OH libres del DNA mediante la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal (TDT) y posteriormente reconocidos por un anticuerpo antidigoxigenina unido a peroxidasa, la positividad se identificó con H_2O_2 -diaminobencidina observando una coloración marrón oscuro en los núcleos positivos o bien verde claro (tinción de contraste: verde de metilo) en los núcleos negativos para ésta técnica.

Estas muestras se analizaron mediante microscopia de luz.

CONTROLES PARA LA TÉCNICA:

Positivo: Los cortes fueron tratados con nucleasa para inducir la fragmentación del DNA.

Negativo: Se empleó agua destilada en lugar de la enzima TDT.

El procedimiento se describe en el apéndice A.

2.3.3.2 Evaluación mediante microscopía electrónica de transmisión

El tejido fue fijado en solución de Karnovsky-Ito (ácido pícrico, formaldehído, glutaraldehído en buffer de cacodilatos con pH 7.2-7.4, postfijados en solución acuosa de tetraóxido de osmio 2%, deshidratado con acetonas graduales 30%-100% e incluidos en resinas epóxicas.

Los moldes se colocaron a 60 °C por 24 hrs para la polimerización y posteriormente se prepararon dos tipos de cortes:

A) Semifinos: de aproximadamente 350 nm de grosor, se montaron en un portaobjetos y se tiñeron con azul de toluidina y se analizaron a microscopía de luz.

B) Finos: de aproximadamente 100 nm de grosor y se contrastaron con sales de metales pesados para el análisis ultraestructural.

Esta técnica se describe ampliamente en el apéndice A.

2.3.4 ANÁLISIS BIOQUÍMICO.

2.3.4.1 Detección de la fragmentación del DNA en geles de agarosa.

La evaluación de apoptosis mediante éste método tiene su fundamento en la detección de la ruptura del DNA internucleosomal característica de la apoptosis. Estos fragmentos son los responsables del patrón en escalera que se visualiza en geles de agarosa

El análisis para la detección de la fragmentación del DNA se realizó en las fracciones de hígado, riñón y pulmón colectadas de los ratones de los grupos de estudio en los tiempos establecidos y almacenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. En el momento de su análisis, las muestras se descongelaron y se mantuvieron en hielo a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, en una caja petri de vidrio y con un bisturí se fragmentó hasta formar una papilla. Posteriormente el tejido se transfirió a un tubo eppendorf, se agregó el buffer frío en una relación 1:3, y la muestra se homogenizó a razón de 10 "stokes" con intervalos de 10 segundos y 5 en hielo, en seguida se centrifugó a $27000\text{ } \times g$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 minutos, se colectó el sobrenadante (el cual contiene el DNA fragmentado) y después de un tratamiento con RNAsa se extraído el DNA mediante fenol-cloroformo, el DNA se resuspendió en buffer TE 1 X y se mezcló con buffer de carga sometiendo las muestras a electroforesis en gel de agarosa al 1.8 % con $0.4\text{ }\mu\text{g/mL}$ de bromuro de etidio en buffer TBE 1 X a 60 V/cm por 1 hr. Después de éste tiempo el gel fue visualizado en un transiluminador de luz ultravioleta y fotodocumentado.

Esta técnica se describe en el apéndice A.

2.3.4.2 Cuantificación de la fragmentación del DNA mediante espectrofotometría.

La determinación del DNA se realizó de acuerdo al método descrito por Burton (1956)³³ y modificado por Jian y cols (2002).³⁴

Esta técnica se empleó en el análisis del hígado, riñón y pulmón de los ratones del grupo intoxicado con PA1 a 24 horas a fin de determinar mediante la cuantificación del DNA fragmentado el grado de inducción de apoptosis en cada uno de los órganos blanco para la toxina y su comparación entre si.

Las muestras se fragmentaron, homogenizaron y centrifugaron a 27,000 x g a 4 °C, se colectó el sobrenadante (DNA fragmentado) y la pastilla (DNA genómico), a ambas fracciones se les añadió ácido perclórico a una concentración final de 0.5 N y se hidrolizaron a 70 °C por 70 minutos posteriormente se centrifugaron a 4000 x g, se colectaron nuevamente los sobrenadantes y se midió el volumen, los sobrenadantes se mezclaron con dos volúmenes del reactivo de difenilamina (acetaldehído, difenilamina, ácido acético, ácido sulfúrico) y se incubaron a 30 °C por 18 hrs. Posterior a este tiempo se midió la absorbancia a 595 y 650 nm

La diferencia entre las lecturas a 595 nm - 650 nm se interpoló en la ecuación de la regresión lineal de la curva de calibración, determinando de ésta manera la proporción o porcentaje de DNA presente en cada una de las fracciones (DNA genómico y DNA fragmentado). La suma de estas proporciones corresponde al DNA total (100%) en la muestra.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Esta técnica se describe en el apéndice A.

2.3.5 Análisis estadístico.

El porcentaje de DNA fragmentado determinado mediante espectrofotometría se realizó por triplicado. Posteriormente los resultados se sometieron a la prueba de T de Student con un grado de significancia de $p < 0.01$ con el propósito de determinar la diferencia existente entre la apoptosis presente en los órganos analizados.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 ANALISIS MORFOLÓGICO.

Los resultados del análisis de cortes histológicos, semifinos y finos de hígado, riñón y pulmón de los ratones de los grupos control sin tratamiento y control vehículo, fueron comparados con los resultados del grupo intoxicado con peroxisomicina A1 a 4, 8, 12 y 24 hrs de exposición.

3.1.1 HÍGADO.

3.1.1.1 MICROSCOPIA DE LUZ

3.1.1.1.1 GRUPOS CONTROL SIN TRATAMIENTO Y CONTROL VEHÍCULO.

En el hígado de los ratones de éstos grupos (fig. 10 A y B) se observaron hepatocitos dispuestos de manera radial similar a rueda de carreta en forma de láminas anastomosadas de una o dos células de grosor con respecto a las venas centrales, las láminas están separadas por los espacios sinusoidales en los que se observó la presencia de eritrocitos y núcleos de células endoteliales. Los hepatocitos mostraron una forma poligonal o poliédrica con uno o dos núcleos con abundante eucromatina y nucleolos prominentes, en su citoplasma se observaron además pequeñas vacuolas generadas probablemente por la extracción de lípidos y glucógeno.

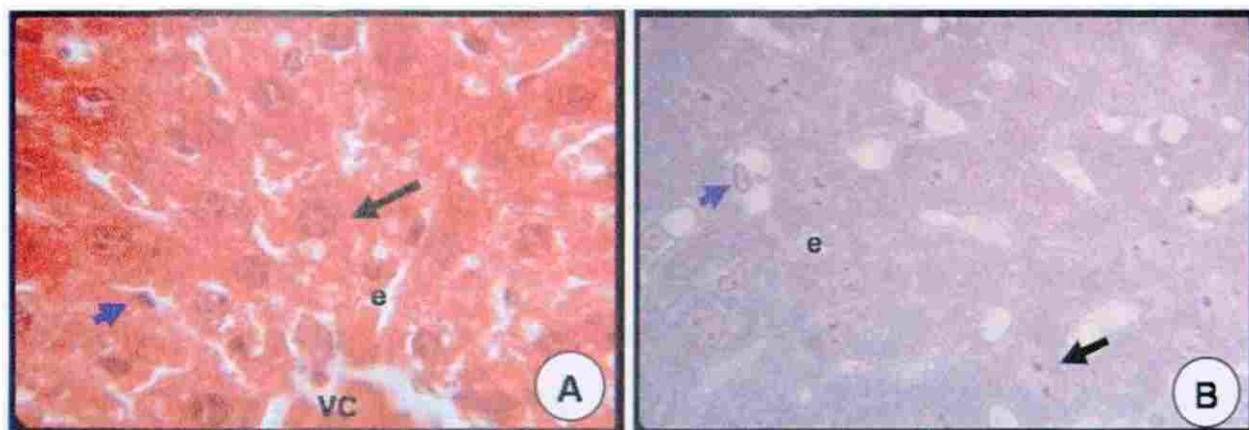


FIGURA 10. Hígado de ratón de los grupos **A) Control sin tratamiento:** Núcleo euromático (flecha negra), núcleo de célula endotelial (flecha azul), eritrocitos en sinusoides (e), vena central (VC). **B) Control vehículo:** Muestra los mismos hallazgos descritos para el control sin tratamiento. Microscopia de luz. A) Inclusión en parafina. Tricrómico de Massón 1000X. B) Inclusión en resinas epóxicas, Azul de Toluidina, 1000X.

3.1.1.1.2 GRUPO INTOXICADO CON PEROXISOMICINA A1, 4 HORAS DE EXPOSICIÓN:

En este tiempo se observan hepatocitos con núcleos euromáticos con nucleolos evidentes y un aparente incremento de lípidos en el citoplasma, además se pueden apreciar hepatocitos con núcleos con pequeñas condensaciones de la cromatina en la periferia de la envoltura nuclear, así como pequeñas zonas de condensación del citoplasma, algunos núcleos también muestran tamaños variables.

3.1.1.1.3 GRUPO INTOXICADO CON PEROXISOMICINA A1, 8 HORAS DE EXPOSICIÓN:

El análisis histológico de hígado de los ratones intoxicados con PA1 mostró un incremento de las alteraciones descritas en el grupo intoxicado con PA1 4 horas de exposición, un número mayor de hepatocitos alterados de tinción más intensa alternando con hepatocitos morfológicamente normales. En este tiempo se empiezan a ver núcleos de forma muy irregular con grandes agregados de cromatina sobre la envoltura nuclear.

3.1.1.1.4 GRUPO INTOXICADO CON PEROXISOMICINA A1, 12 HORAS DE EXPOSICIÓN:

En el análisis histológico del hígado de los ratones intoxicados con PA1 se observó mayor intensidad de las alteraciones descritas en los grupos intoxicados con PA1 a 4 y 8 horas de exposición, se encontró en este tiempo la presencia de cuerpos apoptóticos fagocitados por células vecinas, éstos cuerpos pueden contener fragmentos del núcleo con depósitos densos de cromatina y pequeñas porciones de citoplasma, todo envuelto por una membrana y a su vez rodeados de un espacio o halo claro característico de la vesícula fagocítica .

3.1.1.1.5 GRUPO INTOXICADO CON PEROXISOMICINA A1, 24 HORAS DE EXPOSICIÓN:

En este tiempo de intoxicación el hígado se observa con daño generalizado en los hepatocitos con abundantes vacuolas por la acumulación de lípidos en su citoplasma, zonas de hemorragia y abundantes cuerpos apoptóticos (fig. 11).

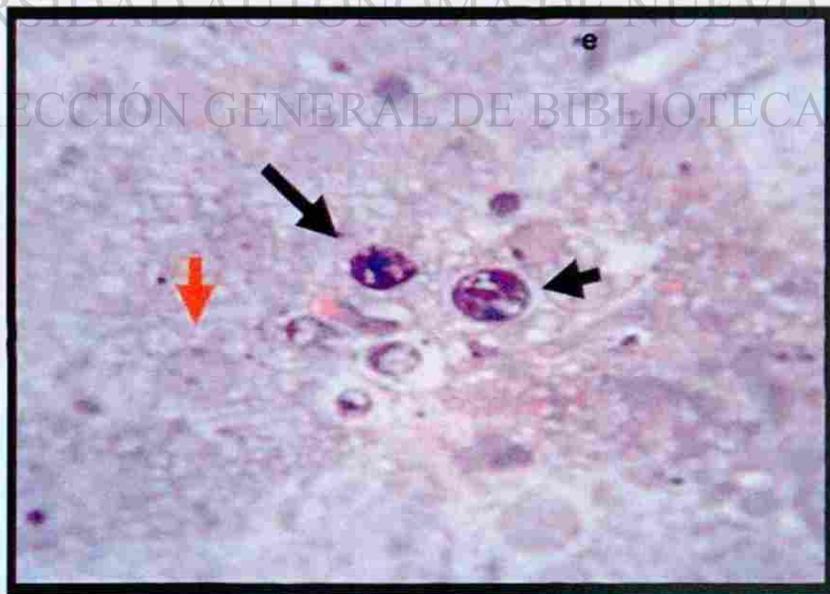


FIGURA 11. Hígado de ratón del grupo: Intoxicado con Peroxisomicina A1, 24 horas de exposición. Núcleo de tamaño variable (flecha roja), cuerpos apoptóticos (flechas negras), eritrocito en sinusoide (e). Microscopia de luz. Inclusión en resinas epóxicas. Azul de Toluidina, 1000X.

3.1.1.2 INMUNOHISTOQUÍMICA PARA EL ANÁLISIS DE LA FRAGMENTACIÓN DE LA CROMATINA UTILIZANDO TUNEL.

3.1.1.2.1 Controles para la técnica de TUNEL

Se utilizaron cortes de hígado del grupo control sin tratamiento para la preparación de los controles positivo y negativo de la técnica de TUNEL (fig 12).

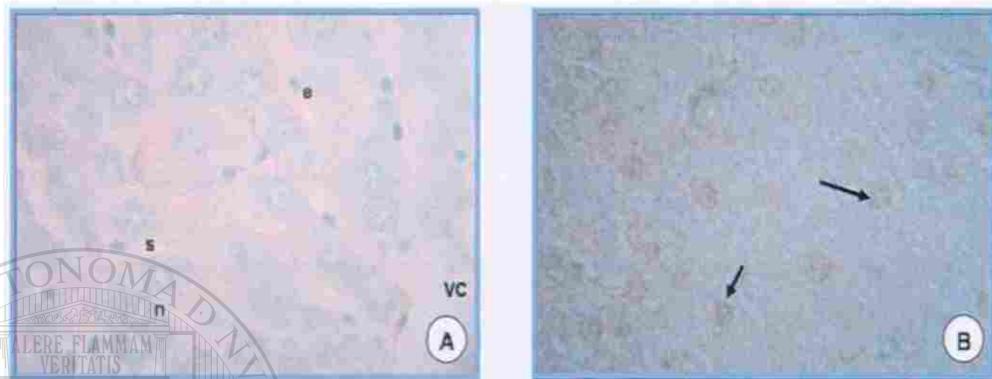


FIGURA 12. Hígado de ratón del grupo control sin tratamiento, **Controles de la técnica de TUNEL:** **A) Control Negativo:** Núcleo negativo (n), espacios sinusoidales (s), eritrocitos (e), vena central (VC). **B) Control Positivo:** Núcleos positivo (flechas), Microscopia de luz. Inclusión en parafina. TUNEL. 1000X.

3.1.1.2.2 GRUPOS CONTROL SIN TRATAMIENTO Y CONTROL VEHÍCULO.

Los cortes histológicos del hígado de los grupos control sin tratamiento (fig 13 A) y control vehículo (fig. 13 B) mostraron resultados negativos a la fragmentación de la cromatina, se observan los núcleos solo con la tinción de contraste (verde de metilo).

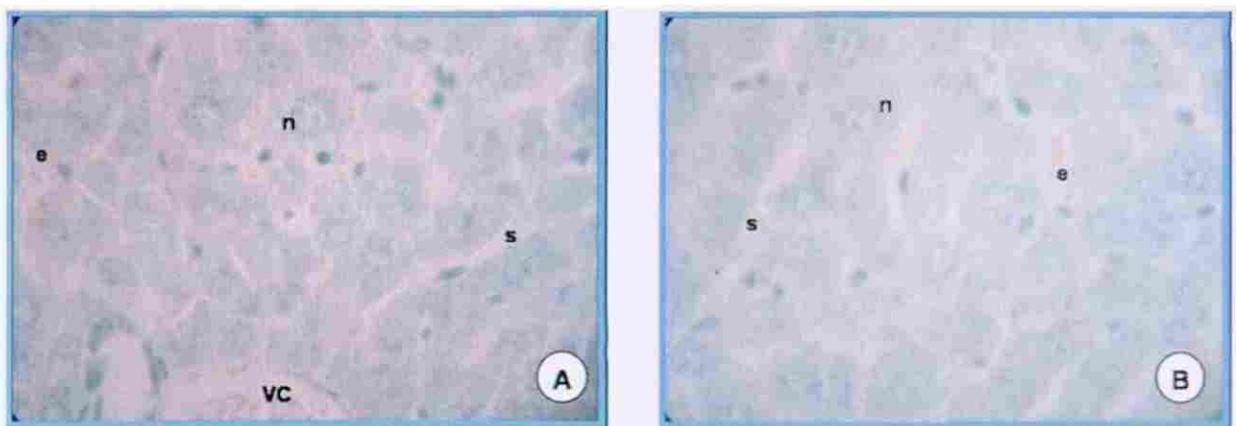


FIGURA 13. Hígado de ratón de los grupos, **A) Control sin tratamiento:** Núcleos negativos (n), espacios sinusoidales (s), eritrocitos (e), vena central (VC). **B) Control vehículo:** se observan los mismos elementos que en el control sin tratamiento. Microscopia de luz. Inclusión en parafina. TUNEL. 1000X.

3.1.1.2.3 GRUPOS INTOXICADOS CON PEROXISOMICINA A1: 4, 8, 12 y 24, HORAS DE EXPOSICIÓN:

Los cortes histológicos de hígado de los ratones del grupo intoxicado con Peroxisomicina A1 a 4, 8, 12 y 24 horas de exposición mostraron un aumento gradual en la positividad con respecto al tiempo.

Destacando a 24 horas de exposición (fig. 14) numerosos hepatocitos con núcleos positivos alternando con hepatocitos con núcleos negativos para esta técnica.

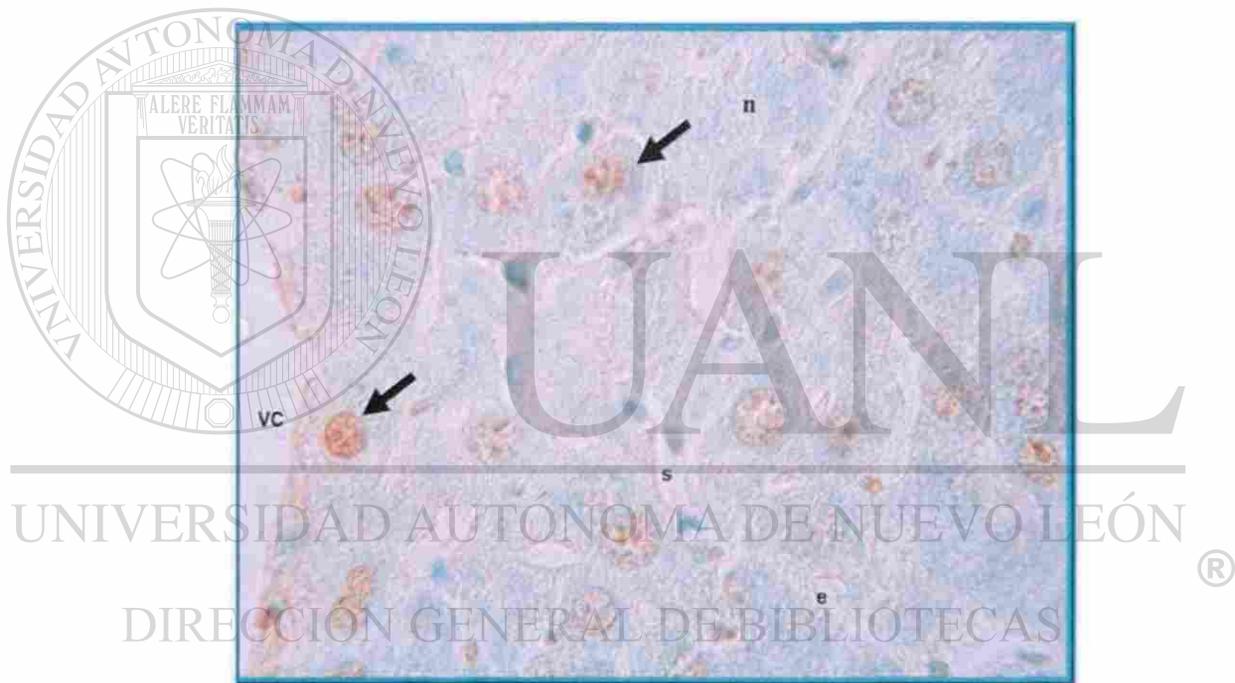


FIGURA 14. Hígado de ratón del grupo: **Intoxicado con Peroxisomicina A1, 24 horas de exposición,** núcleos positivos (flechas) núcleos negativos (n), sinusoides (s) eritrocitos (e), vena central (VC). Microscopía de luz. Inclusión en parafina. TUNEL. 1000X.

3.1.1.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.

Los resultados del análisis ultraestructural de hígado de los grupos control sin tratamiento y control vehículo fueron comparados con los resultados de las muestras de los grupos intoxicado con Peroxisomicina A1, 4 horas de exposición para determinar las alteraciones mitocondriales pre-apoptósicas y 24 horas de exposición para la evaluación ultraestructural de las alteraciones características de apoptosis.

3.1.1.3.1 GRUPO CONTROL SIN TRATAMIENTO Y GRUPO CONTROL VEHÍCULO.

El análisis a microscopia electrónica de transmisión de cortes finos de hígado de ratón de los grupos control sin tratamiento y control vehículo mostró una ultraestructura normal para éste órgano.

En el hígado (fig. 15 A) se observaron hepatocitos separados por los espacios sinusoidales con eritrocitos y plaquetas así como núcleos de células endoteliales. Los hepatocitos mostraron límites celulares bien definidos, con uno o dos núcleos eucromáticos con integridad en la envoltura nuclear y uno o dos nucleolos claramente visibles, en el citoplasma se observaron, mitocondrias, retículo endoplásmico rugoso y liso, aparato de Golgi y otros organelos de morfología normal.

3.1.1.3.2 GRUPO INTOXICADO CON PEROXISOMICINA A1, 4 HORAS DE EXPOSICIÓN.

En el análisis ultraestructural de hígado de los ratones de este tiempo se observaron hepatocitos con morfología normal, que alternan con hepatocitos con núcleos de tamaño variable y pequeñas condensaciones de la cromatina en la periferia de la envoltura nuclear, en el citoplasma se observaron abundantes

cuerpos electrodensos que pueden ser peroxisomas y lisosomas, en éste tiempo se encontraron mitocondrias de apariencia normal junto con mitocondrias aumentadas de volumen y ligera extracción de la matriz destacando las mitocondrias con alteraciones pre-apoptóticas: en un extremo integridad en las crestas, mientras que en el extremo opuesto se observa ruptura de la membrana externa y protrusión de la membrana interna con ausencia de crestas y matriz de baja electrodensidad que en cortes transversales tienen la apariencia de vesículas vacías (fig. 15 B).

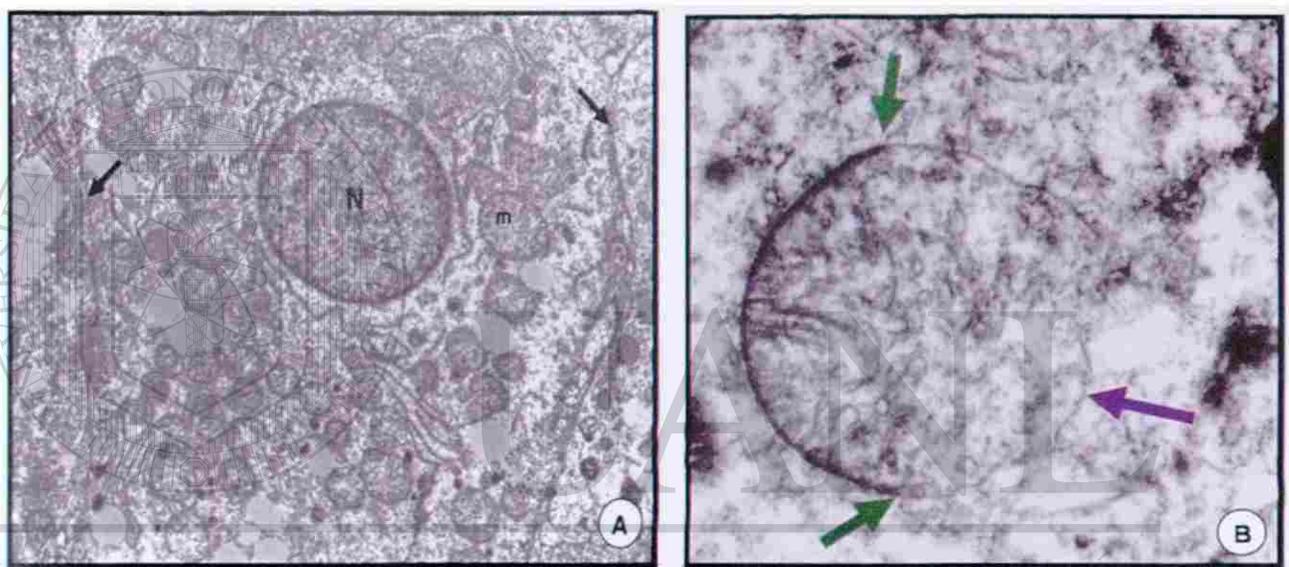


FIGURA 15. Hígado de ratón de los grupos: **A) Control sin tratamiento:** se observa un hepatocito con núcleo eucromático (N), mitocondrias de apariencia normal (m), las flechas negras señalan los límites celulares. **B) Intoxicado con Peroxisomicina A1, 4 horas de exposición.** Mitocondria con alteraciones preapoptóticas: ruptura de membrana interna (flechas verdes) y protrusión de membrana interna (flecha morada). Microscopia electrónica de transmisión. Inclusión en resinas epóxicas, contrastado con acetato de uranilo y citrato de plomo. A) 3150X, B) Amplificado a partir de 4000X.

3.1.1.3.3 GRUPO INTOXICADO CON PEROXISOMICINA A1, 24 HORAS DE EXPOSICIÓN.

En este tiempo de intoxicación el hígado (fig. 16) mostró un daño generalizado en los hepatocitos con infiltración de grasa en el citoplasma, numerosas mitocondrias con las alteraciones previamente descritas para el grupo intoxicado con PA1 4 horas de exposición (fig. 15 B) coexistiendo con

mitocondrias de apariencia normal, además destacan abundantes cuerpos apoptóticos que contienen citoplasma, organelos y fragmentos del núcleo con densas masas de cromatina bien preservados rodeados de membrana, además se observó un halo claro rodeando la vesícula fagocítica, los cuerpos apoptóticos mostraron distinta electrodensidad en comparación con las células ultraestructuralmente normales (fig. 16).

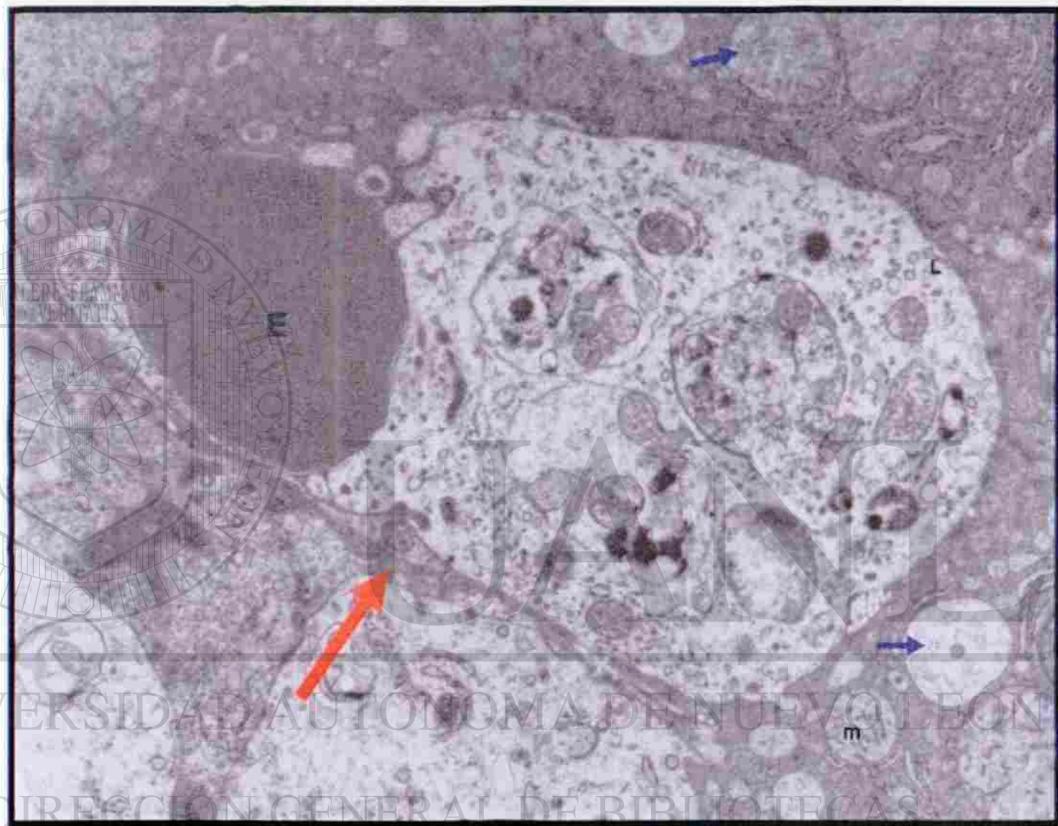


FIGURA 16. Hígado de ratón del grupo: Intoxicado con Peroxisomicina A1, 24 horas de exposición. Se observa el citoplasma de un hepatocito con mitocondrias alteradas (flechas azules) y otras con morfología normal (m), cuerpo apoptótico (flecha roja) con cuerpos autofágicos en su interior, eritrocito en sinusoide (E). Microscopía electrónica de transmisión. Inclusión en resinas epóxicas, contrastado con acetato de uranilo y citrato de plomo. 4000X.

3.1.2 RIÑÓN

3.1.2.1 MICROSCOPIA DE LUZ

3.1.2.1.1 GRUPOS CONTROL SIN TRATAMIENTO Y CONTROL VEHÍCULO.

En la **corteza de riñón** (fig. 17 A) se observaron los túbulos contorneados proximales con epitelio cúbico simple con borde en cepillo y núcleos basales, los túbulos contorneados distales mostraron un epitelio cúbico simple bajo con núcleos centrales o apicales con uno o dos nucleolos, las células de la mácula densa con su epitelio cilíndrico simple con núcleo central, además en los rayos medulares formados por túbulos colectores corticales con su epitelio cúbico simple compuesto por células principales con núcleo central ovalado y microvellosidades romas y de células intercaladas con núcleos centrales redondos. La técnica de tricrómico de Massón, mediante la tinción en color azul de las fibras de colágena de la membrana basal nos permitió observar integridad en el epitelio de cada uno de los túbulos.

En los corpúsculos renales se observó el espacio de Bowman limpio, el epitelio plano simple de la hoja parietal de la cápsula de Bowman, la luz de los capilares del glomérulo ocupados por eritrocitos, así como las células mesangiales intraglomerulares.

En la **médula renal** (fig. 17 B) se observó el epitelio cúbico simple de los túbulos colectores, los epitelios cúbicos simples con microvellosidades y vellosidades romas de las porciones rectas gruesas descendentes y ascendentes de los túbulos proximales y distales respectivamente, capilares y las porciones delgadas del asa de Henle con un epitelio plano simple.

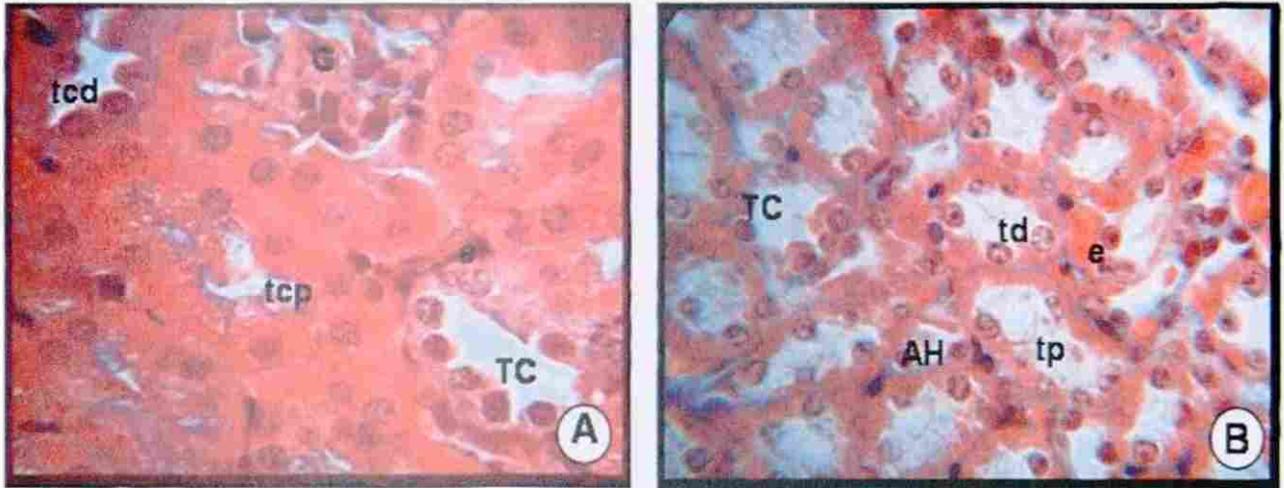


FIGURA 17. Riñón de ratón del grupo: **Control sin tratamiento.** **A) Corteza:** se observan túbulos contorneados proximales (tcp) y túbulos contorneados distales (tcd), túbulo colector (TC), glomérulo (G) y eritrocitos (e). **B) Médula:** se observan partes rectas de los túbulos proximales (tp), túbulos distales (td), túbulo colector (TC) y asa de Henle (AH). Microscopia de luz. Inclusión en parafina. Tricrómico de Massón, 1000X.

3.1.2.1.2 GRUPO INTOXICADO CON PEROXISOMICINA A1, 4 HORAS DE EXPOSICIÓN.

En los cortes histológicos de riñón se aprecian las alteraciones características de apoptosis: condensación de la cromatina, condensación del citoplasma y tamaños variables en los núcleos de las células epiteliales de los túbulos contorneados proximales, distales, y túbulos colectores en la corteza así como en las estructuras de la médula, cabe destacar que en éste tiempo se aprecia integridad de las microvellosidades de las células epiteliales y no se observan alteraciones en las células mesangiales intraglomerulares.

3.1.2.1.3 GRUPO INTOXICADO CON PEROXISOMICINA A1, 8 HORAS DE EXPOSICIÓN.

En este tiempo se observa un incremento en las alteraciones descritas en las células epiteliales de las estructuras del riñón, además pequeñas zonas

con células que muestran pérdida de microvellosidades en las porciones apicales y zonas con extracción del citoplasma por la presencia de necrosis.

3.1.2.1.4 GRUPO INTOXICADO CON PEROXISOMICINA A1, 12 HORAS DE EXPOSICIÓN.

En éste tiempo se incrementan las alteraciones mencionadas y se observa condensación de la cromatina en las células mesangiales intraglomerulares. Además de lo anterior se presentan zonas mas generalizadas de necrosis permaneciendo la integridad de la membrana basal en el epitelio de las estructuras tubulares tanto en la corteza como en la médula renal.

3.1.2.1.5 GRUPO INTOXICADO CON PEROXISOMICINA A1, 24 HORAS DE EXPOSICIÓN.

En el riñón tanto en la corteza (fig. 18) como en la médula (fig. 19) se aprecian numerosas zonas con células donde se observan las características de apoptosis ya descritas, destacan en este tiempo la presencia de cuerpos apoptóticos en las células mesangiales intraglomerulares y en las células epiteliales de los túbulos proximal, distal y colector, además de acentuarse la necrosis.

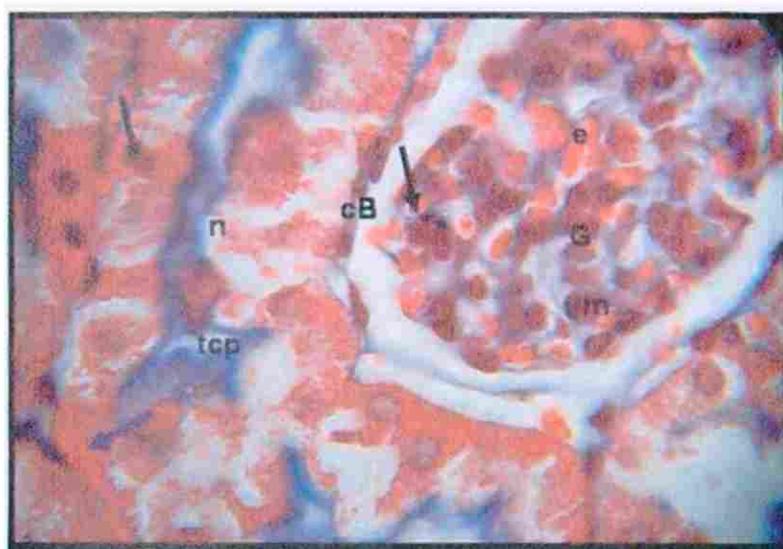


FIGURA 18. Riñón de ratón del grupo: Intoxicado con Peroxisomicina A1, 24 horas de exposición. Corteza: donde se observan túbulos contorneados proximales (tcp), túbulos contorneados distales (tcd), células mesangiales intraglomerulares, glomérulo (G), cápsula de Bowman (cB), eritrocitos (e), núcleos con condensación de la cromatina (flechas negras), condensación del citoplasma (flecha azul), áreas con necrosis (n). Microscopia de luz. Inclusión en parafina. Tricrómico de Massón, 1000X.

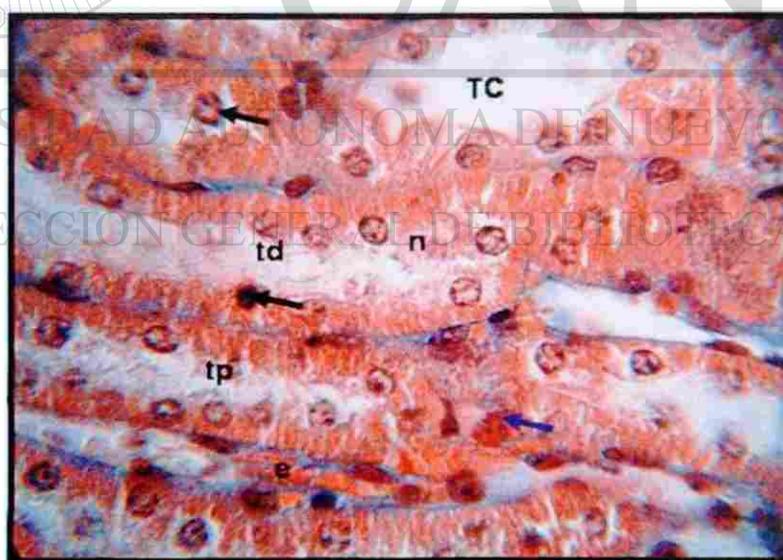
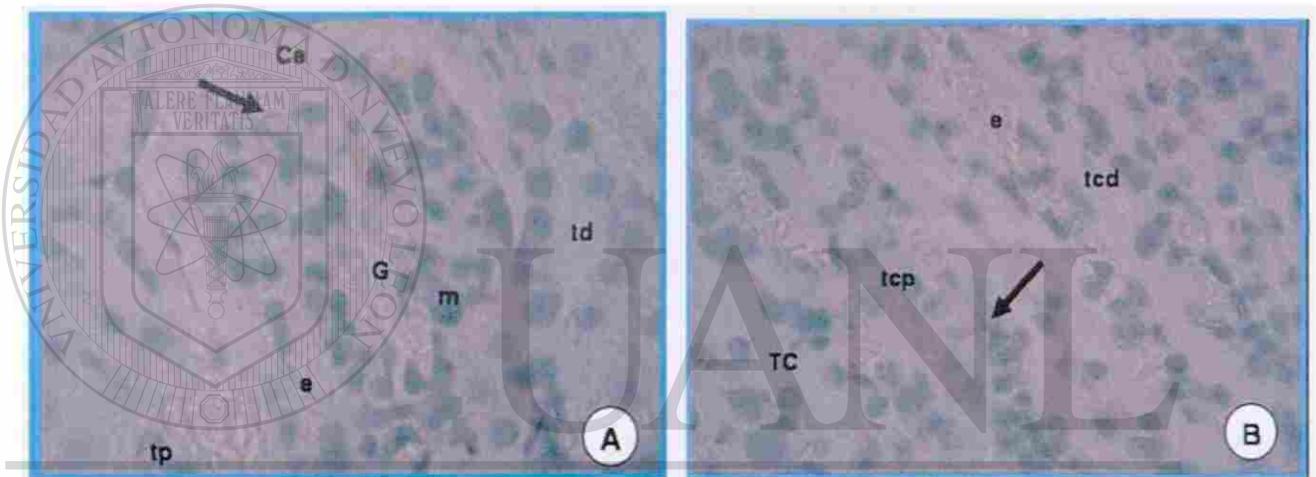


FIGURA 19. Riñón de ratón del grupo: Intoxicado con Peroxisomicina A1, 24 horas de exposición. Médula: Porciones rectas de los túbulos proximales (tp), túbulos distales (td) y túbulo colector (TC), núcleos con condensación de la cromatina (flechas negras), condensación del citoplasma (flecha azul), áreas con necrosis (n) y eritrocitos (e). Microscopia de luz. Inclusión en parafina. Tricrómico de Massón, 1000X.

3.1.2.2 INMUNOHISTOQUÍMICA PARA EL ANALISIS DE LA FRAGMENTACIÓN DE LA CROMATINA UTILIZANDO TUNEL.

3.1.2.2.1 GRUPO CONTROL SIN TRATAMIENTO Y CONTROL VEHÍCULO

Los cortes histológicos de riñón, de los grupos control sin tratamiento y control vehículo (fig.20 A y B) mostraron resultados negativos a la fragmentación de la cromatina, los núcleos se observaron solo con la tinción de contraste (verde de metilo) tanto en la corteza como en la médula.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FIGURA 20. Riñón de ratón del grupo: **Control vehículo.** **A) Corteza:** Se observan túbulos contorneados proximales (tp), túbulos contorneados distales (td), glomérulo (G), células mesangiales intraglomerulares (m), cápsula de Bowman (Ca), núcleo negativo (flecha) **B) Médula:** túbulo colector (TC), parte rectas de túbulos proximales (tcp) y distales (tcd), capilares con eritrocitos (e), núcleo negativo (flecha). Microscopia de luz. Inclusión en parafina. TUNEL, 1000 X.

3.1.2.2.2 GRUPOS INTOXICADOS CON PEROXISOMICINA A1: 4, 8, 12 y 24, HORAS DE EXPOSICIÓN:

En los cortes histológicos de riñón de los ratones de los grupos Intoxicados con Peroxisomicina A1 a 4, 8, 12 y 24 horas de exposición mostraron un aumento gradual en la positividad con respecto al tiempo.

A 24 horas de exposición la corteza de riñón (fig 21) mostró positividad en las células epiteliales de los túbulos contorneados proximales y distales,

túbulos colectores, en las células epiteliales de la capa parietal de la cápsula de Bowman y mesangiales intraglomerulares.

En la médula (fig. 22) se observó positividad en los núcleos de las células epiteliales de las porciones rectas del sistema tubular.

Además de lo anterior, tanto en la corteza como en la médula se observaron células con núcleos negativos para esta técnica.

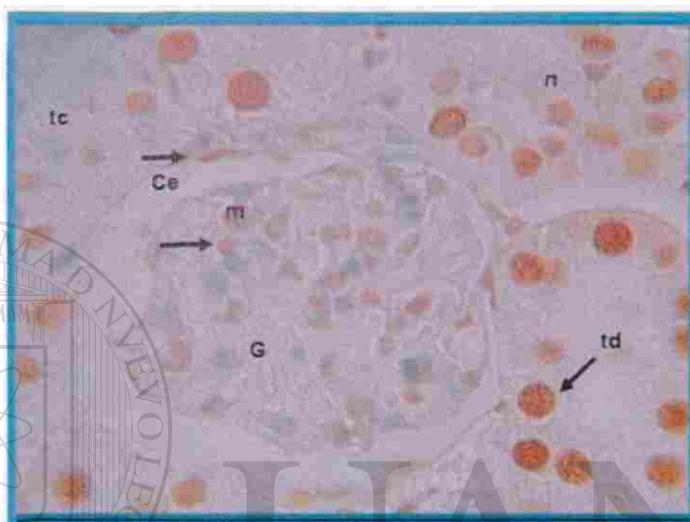


FIGURA 21. Riñón de ratón del grupo: Intoxicado con Peroxisomicina A1, 24 horas de exposición. Corteza: Se observan núcleos positivos (flechas), Túbulo contorneado distal (td), Túbulo contorneado proximal (tc), Glomérulo (G), Células mesangiales (m), Capa parietal de la cápsula de Bowman (Ce), Núcleo negativo (n). Microscopia de luz. Inclusión en parafina. TUNEL. 1000 X.

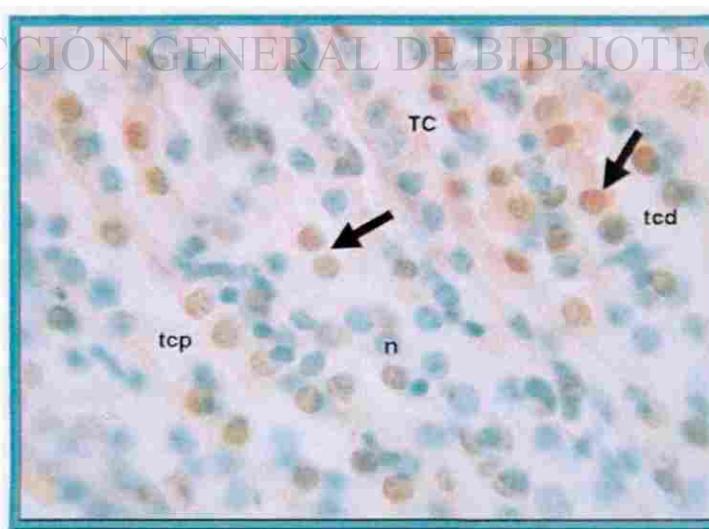


FIGURA 22. Riñón de ratón del grupo: Intoxicado con Peroxisomicina A1, 24 horas de exposición. Médula: Túbulos Colectores (TC), Parte recta de túbulos proximales (tcp), Parte recta de túbulos distales (tcd), núcleos positivos (flechas), núcleo negativo (n). Microscopia de luz. Inclusión en parafina. TUNEL. 1000 X.

3.1.2.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.

3.1.2.3.1. GRUPO CONTROL SIN TRATAMIENTO Y CONTROL VEHÍCULO

En la corteza de riñón (fig. 23 A) se observaron los túbulos contorneados proximales con epitelio cúbico simple con borde en cepillo y núcleos basales y numerosas mitocondrias y cuerpos electrodensos que pueden corresponder a peroxisomas, los túbulos contorneados distales mostraron un epitelio cúbico simple bajo con núcleos centrales o apicales con uno o dos nucleolos y abundantes mitocondrias, las células de la mácula densa con su epitelio cilíndrico simple con núcleo central, además en los rayos medulares formados por túbulos colectores corticales compuestos de células principales con núcleo central ovalado con microvellosidades cortas y de células intercaladas con núcleos centrales redondos.

En los corpúsculos renales se observó el espacio de Bowman limpio y distendido, el epitelio plano simple de la hoja parietal de la cápsula de Bowman, capilares fenestrados del glomérulo ocupados por eritrocitos, la capa visceral compuesta por los podocitos con sus prolongaciones primarias y secundarias así como células mesangiales intraglomerulares de morfología normal.

En la médula renal (fig. 23 B) se observó el epitelio cúbico simple de los túbulos colectores compuesto por células claras y oscuras, las partes rectas de los túbulos proximales y distales con epitelios cúbicos simples con microvellosidades y vellosidades romas respectivamente, así como el epitelio plano simple del asa de Henle.

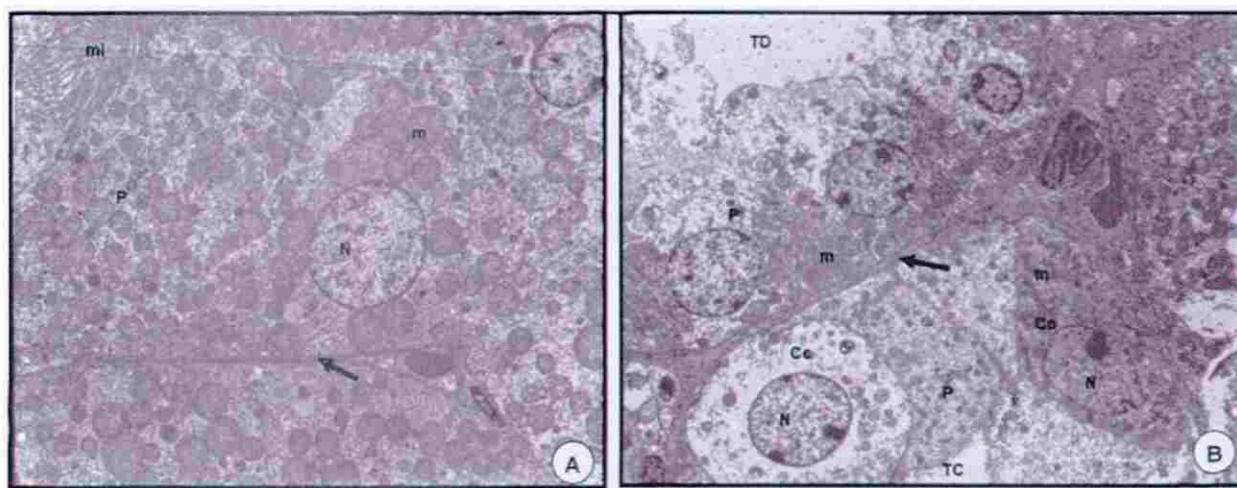


FIGURA 23. Riñón de ratón del grupo: Control sin tratamiento. **A) Corteza:** se observan células de los túbulos contorneados proximales con núcleos eucromáticos (N), abundantes mitocondrias (m), cuerpos electrodensos (P), microvellosidades (mi), membrana basal (flecha negra). **B) Médula:** se observa la parte recta de túbulo distal (TD) y túbulo colector (TC) con células claras (Cc) y oscuras (Co), núcleos (N), mitocondrias (m), cuerpos electrodensos (P), membrana basal (flecha negra). Microscopia electrónica de transmisión. Inclusión en resinas epóxicas, contrastado con acetato de uranilo y citrato de plomo A: 2500X, B: 2000 X.

3.1.2.3.2 GRUPO INTOXICADO CON PEROXISOMICINA A1, 4 HORAS DE EXPOSICIÓN.

En las células epiteliales de las estructuras de la corteza y médula de riñón destacó la presencia de mitocondrias con alteraciones pre-apoptósicas (fig. 24 A) junto con mitocondrias normales, también se observaron mitocondrias con signos francos de necrosis (fig. 24 B) caracterizado por aumento de volumen, pérdida de las crestas y extracción de la matriz, además de núcleos picnóticos.

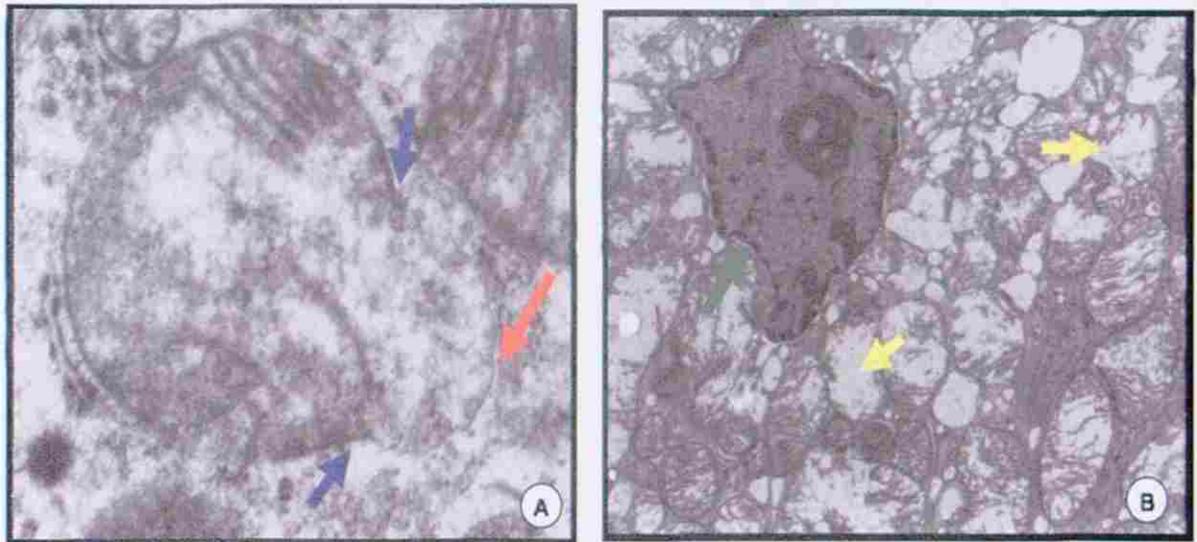


FIGURA 24. Riñón de ratón del grupo: Intoxicado con Peroxisomicina A1, 4 horas de exposición. **A) Mitocondria con alteraciones pre-apoptósicas:** ruptura de m. externa (flechas azules), herniación (flecha roja). **B) Signos de necrosis:** mitocondrias con matriz extraída y pérdida de las crestas (flechas amarillas), núcleo picnótico (flecha verde). Microscopía electrónica de transmisión. Inclusión en resinas epóxicas, contrastado con acetato de uranilo y citrato de plomo. A) Amplificación a partir de 10000X, B) 6300X

3.1.2.3.3 GRUPO INTOXICADO CON PEROXISOMICINA A1, 24 HORAS DE EXPOSICIÓN.

En riñón, tanto en la corteza (fig. 25) como en la médula (fig. 26) se observaron numerosas zonas de células con características de apoptosis y necrosis ya descritas así como cuerpos apoptóticos en las células epiteliales de los túbulos proximales, túbulos distales y túbulos colectores, en los corpúsculos renales se apreció condensación de la cromatina y cuerpos apoptóticos en las células mesangiales intraglomerulares.

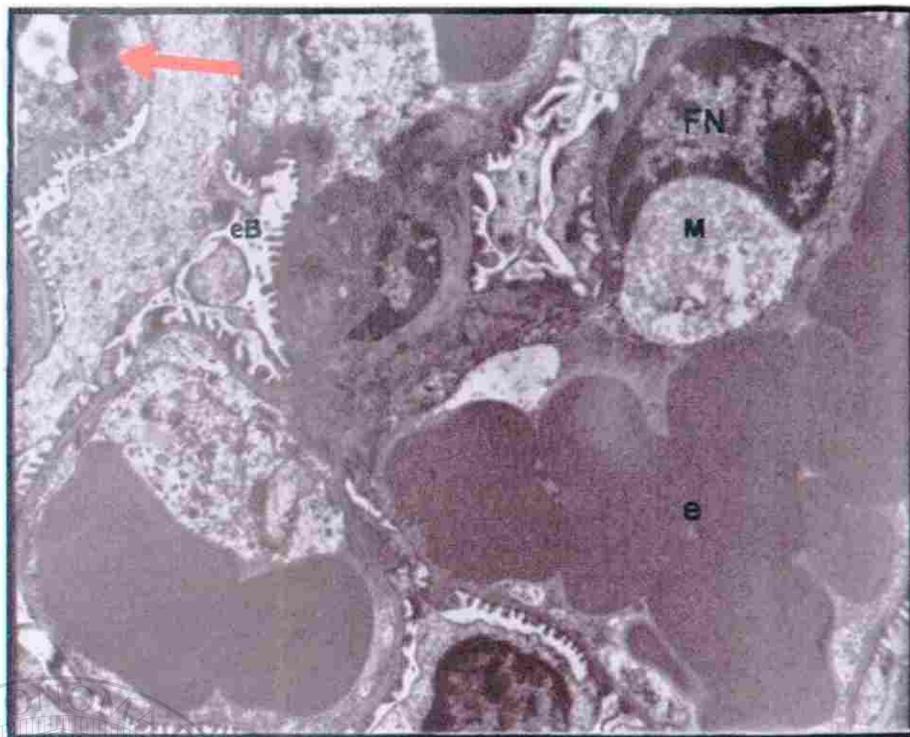


FIGURA 25. Riñón de ratón del grupo: Intoxicado con Peroxisomicina A1, 24 horas de exposición. Corteza: Células mesangiales intraglomerulares (M) con cromatina en forma de semiluna (FN), cuerpo apoptótico (flecha roja), espacio urinario (eB), eritrocitos (e). Microscopia electrónica de transmisión. Inclusión en resinas epóxicas, contrastado con acetato de uranilo y citrato de plomo. 4000 X.

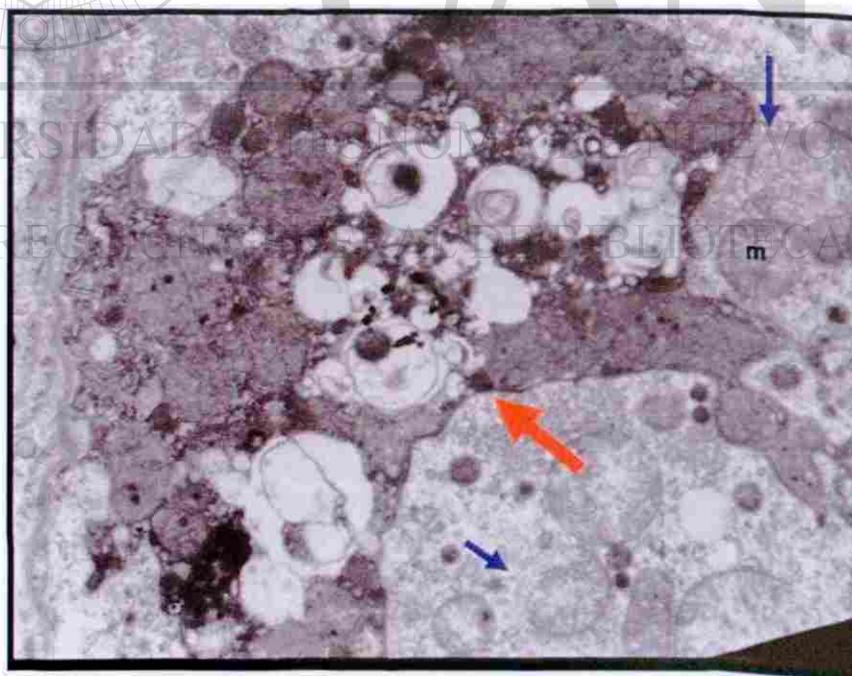


FIGURA 26. Riñón de ratón del grupo: Intoxicado con Peroxisomicina A1, 24 horas de exposición. Médula: célula de porción recta del túbulo proximal con cuerpo apoptótico (flecha roja), mitocondrias alteradas (flechas azules), mitocondrias normales (m), Microscopia electrónica de transmisión. Inclusión en resinas epóxicas, contrastado con acetato de uranilo y citrato de plomo. 4000 X.

3.1.3. PULMÓN

3.1.3.1 MICROSCOPIA DE LUZ

3.1.3.1.1 GRUPOS CONTROL SIN TRATAMIENTO Y CONTROL VEHÍCULO

En los cortes histológicos de pulmón de los grupos control sin tratamiento (fig 27) y control vehículo analizados se observó la histología normal de éste órgano: espacios alveolares limpios y bien distendidos, además de capilares ocupados por eritrocitos en los tabiques interalveolares y algunas fibras de colágena teñidas con el tricrómico de Massón. El epitelio que tapiza el tabique interalveolar, formado por neumocitos tipo I y tipo II de morfología normal.

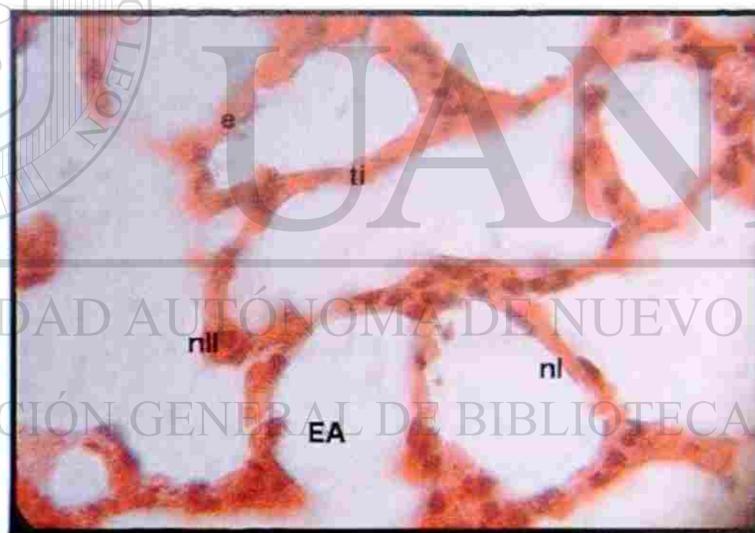


FIGURA 27. Pulmón de ratón del grupo: **Control sin tratamiento:** se observan espacios alveolares (EA), tabiques interalveolares (ti), neumocitos tipo I (nl), neumocitos tipo II (nli), y eritrocitos en los capilares (e). Microscopia de luz. Inclusión en parafina. Tricrómico de Massón. 1000 X.

3.1.3.1.2 GRUPO INTOXICADO CON PEROXISOMICINA A1, 4 HORAS DE EXPOSICIÓN.

En los cortes histológicos de pulmón se observaron núcleos de neumocitos I y II de tamaño variable y algunos presentaban zonas de condensación de cromatina perinuclear, pequeñas zonas hemorrágicas en los espacios interalveolares y un ligero engrosamiento del tabique interalveolar.

3.1.3.1.3 GRUPO INTOXICADO CON PEROXISOMICINA A1, 8 HORAS DE EXPOSICIÓN.

En éste tiempo en los cortes de pulmón se hace evidente la condensación de la cromatina en células sanguíneas y ocasionalmente en los núcleos de neumocitos I y II, además de condensación en el citoplasma y se aprecia material hialino en los espacios alveolares al parecer exudado junto con zonas hemorrágicas.

3.1.3.1.4 GRUPO INTOXICADO CON PEROXISOMICINA A1, 12 HORAS DE EXPOSICIÓN.

En los cortes de pulmón se observa incremento del daño descrito y la presencia de infiltrado celular: polimorfonucleares (PMN) y linfocitos que junto con los focos hemorrágicos ocupa casi la totalidad de algunos espacios alveolares.

3.1.3.1.5 GRUPO INTOXICADO CON PEROXISOMICINA A1, 24 HORAS DE EXPOSICIÓN.

En el pulmón de los ratones del grupo intoxicado con Peroxisomicina A1 a 24 hrs de exposición (fig. 28) se observan abundantes PMN, linfocitos y zonas de hemorragia en los espacios alveolares, engrosamiento del tabique interalveolar, exudado, edema celular y cuerpos apoptóticos principalmente en células sanguíneas y ocasionalmente en los neumocitos I y II.

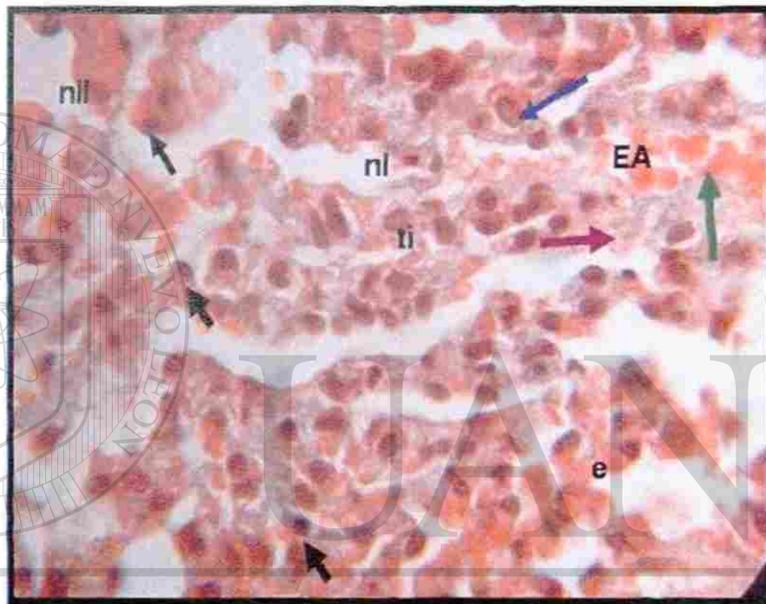


FIGURA 28. Pulmón de ratón del grupo: Intoxicado con Peroxisomicina A1, 24 horas de exposición: donde se observa infiltrado celular y hemorragia (flechas verdes) en el espacio alveolar (EA), tabiques interalveolares (ti), núcleos con cromatina condensada (flechas negras), condensación del citoplasma (flecha azul) y exudado (flecha morada), neumocitos tipo I (nl), neumocitos tipo II (nli), eritrocitos (e). Microscopia de luz. Inclusión en parafina. Tricrómico de Massón. 1000 X.

3.1.3.2. INMUNOHISTOQUÍMICA PARA EL ANALISIS DE LA FRAGMENTACIÓN DE LA CROMATINA UTILIZANDO TUNEL.

3.1.3.2.1 GRUPO CONTROL SIN TRATAMIENTO Y CONTROL VEHÍCULO

Los cortes histológicos de pulmón de los ratones de los grupos control sin tratamiento (fig 29) y control vehículo evaluados mediante la técnica de TUNEL mostraron resultados negativos para ésta técnica tanto en los núcleos de los neumocitos I y II como en las células sanguíneas y endoteliales de los capilares.



FIGURA 29. Pulmón de ratón del grupo. **Control sin tratamiento:** donde se observan núcleos negativos (flechas), espacios alveolares (EA), tabiques interalveolares (ti), neumocitos tipo I (ni), neumocitos tipo II (nii), eritrocitos en los capilares (e). Microscopia de luz. Inclusión en parafina. TUNEL, 1000 X.

3.1.3.2.2 GRUPOS INTOXICADOS CON PEROXISOMICINA 4, 8, 12 y 24, HORAS DE EXPOSICIÓN:

En los cortes histológicos de pulmón de los ratones de los grupos Intoxicados con Peroxisomicina A1 a 4, 8, 12 y 24 horas de exposición se observaron resultados positivos en las células del parénquima pulmonar y células endoteliales que se incrementaron de manera gradual con respecto al tiempo.

Cabe destacar que en las muestras de pulmón del grupo intoxicado a 24 horas de exposición (fig. 30) se observaron núcleos positivos a la fragmentación de la cromatina en los neumocitos tipo I y tipo II así como en las células sanguíneas dentro de capilares.

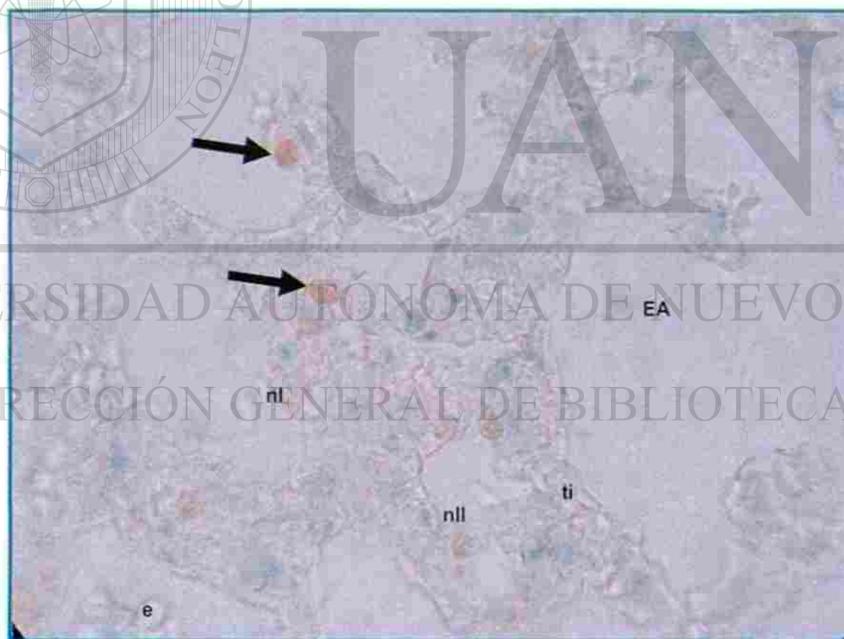


FIGURA 30. Pulmón de ratón del grupo: Intoxicado con Peroxisomicina A1, 24 horas de exposición: se observan núcleos positivos (flechas negras), espacios alveolares (EA) tabiques interalveolares (ti) neumocitos tipo I (nl), neumocitos tipo II (nll), eritrocitos en los capilares (e). Microscopia de luz. Inclusión en parafina. TUNEL, 1000 X.

3.1.3.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.

3.1.3.3.1 GRUPO CONTROL SIN TRATAMIENTO Y CONTROL VEHÍCULO

En el análisis ultraestructural del pulmón de los ratones de los grupos control sin tratamiento (fig 31) y control vehículo se observaron los espacios alveolares limpios y distendidos separados por tabiques interalveolares, además de capilares ocupados por eritrocitos y leucocitos, el epitelio que tapiza los tabiques interalveolares, formado por los neumocitos tipo I, con su morfología normal: células planas con núcleo aplanado y escasas mitocondrias, neumocitos tipo II de forma redondeada, núcleo redondo, cuerpos lamelares y numerosas mitocondrias.

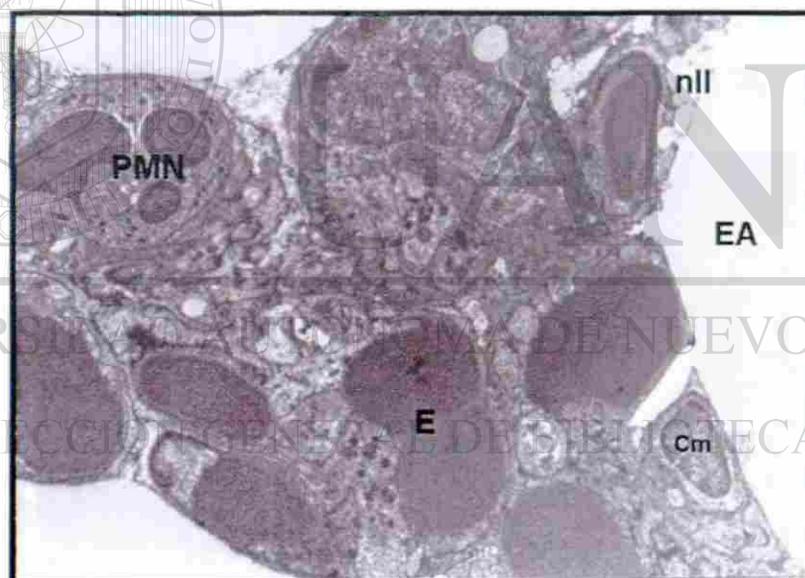


FIGURA 31. Pulmón de ratón del grupo: **Control sin tratamiento:** se observan espacios alveolares (EA), Polimorfonucleares (PMN) en el capilar, neumocitos tipo II (nII), célula mononuclear (Cm) y eritrocitos (E). Microscopía electrónica de transmisión. Inclusión en resinas epóxicas, contrastado con acetato de uranilo y citrato de plomo. 3150 X.

3.1.3.3.2 GRUPO INTOXICADO CON PEROXISOMICINA A1, 4 HORAS DE EXPOSICIÓN.

A 4 hrs se encontraron las alteraciones mitocondriales pre-apoptóticas en células sanguíneas (principalmente PMN) y ocasionalmente en los neumocitos I y II, zonas hemorrágicas en los espacios alveolares y ligero engrosamiento del tabique interalveolar con edema en el neumocito tipo.

3.1.3.3.3 GRUPO INTOXICADO CON PEROXISOMICINA A1, 24 HORAS DE EXPOSICIÓN.

En el pulmón de los ratones de éste grupo se observan abundantes PMN, linfocitos, hemorragia en los espacios alveolares, engrosamiento del tabique interalveolar, exudado, edema en neumocito I y célula endotelial, daño a la barrera alveolo-capilar y cuerpos apoptóticos en células sanguíneas (fig. 32) y ocasionalmente en los neumocitos I y neumocitos II (fig. 33).

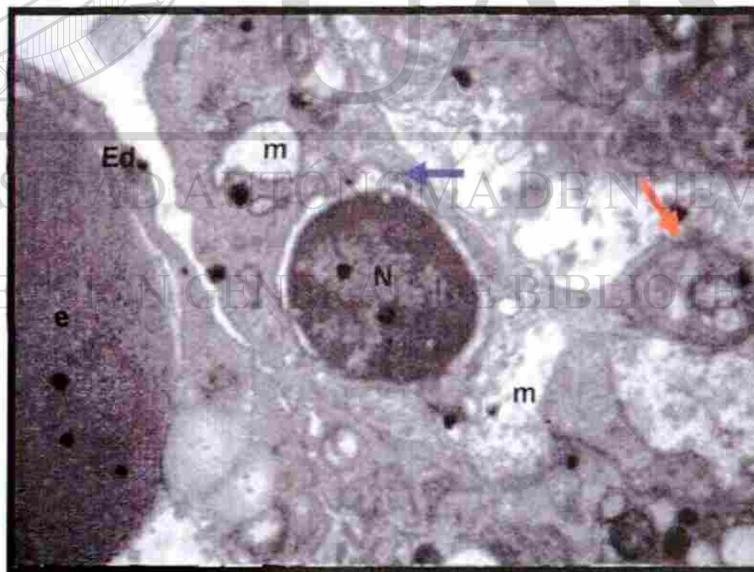


FIGURA 32. Pulmón de ratón del grupo: Intoxicado con Peroxisomicina A1, 24 horas de exposición: se observa un monocito con cromatina condensada (N), cisterna perinuclear dilatada (flecha azul), mitocondrias alteradas (m), cuerpo apoptótico (flecha roja), célula endotelial (ED) y eritrocito (e). Microscopia electrónica de transmisión. Inclusión en resinas epóxicas, contrastado con acetato de uranilo y citrato de plomo. 6000 X.

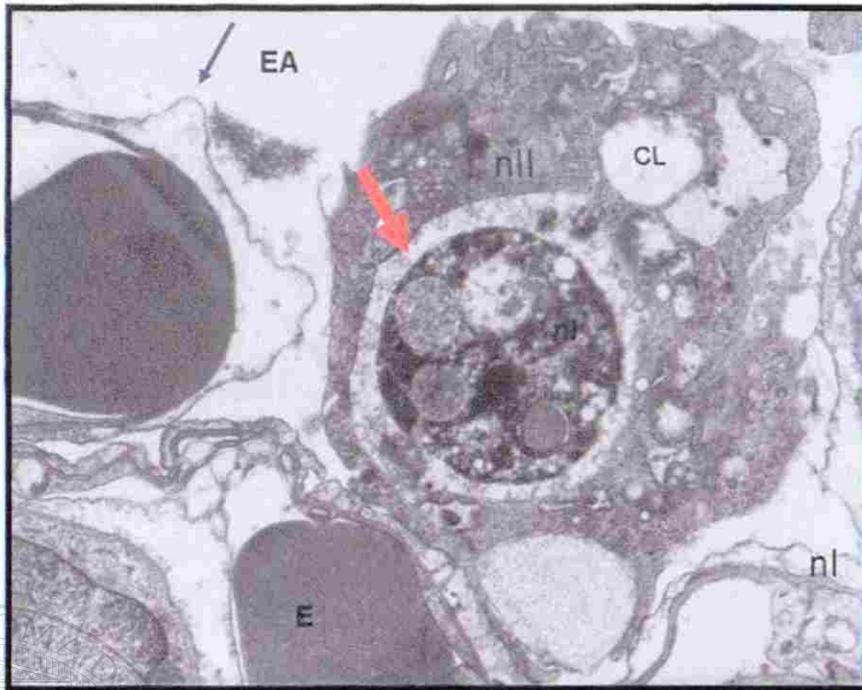
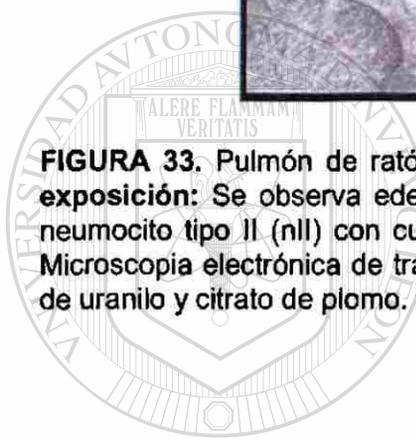


FIGURA 33. Pulmón de ratón del grupo: Intoxicado con Peroxisomicina A1, 24 horas de exposición: Se observa edema celular (flecha azul) del neumocito tipo I (nl), eritrocitos (E), neumocito tipo II (nll) con cuerpos lamelares (CL) y un gran cuerpo apoptótico (flecha roja). Microscopia electrónica de transmisión. Inclusión en resinas epóxicas, contrastado con acetato de uranilo y citrato de plomo. 6300 X.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.2 ANALISIS BIOQUÍMICO.

3.2.1 DETECCIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN DEL DNA EN GELES DE AGAROSA.

Mediante éste método se evaluó la presencia de apoptosis en tejido de hígado, riñón y pulmón de ratón de los grupos control sin tratamiento, control vehículo e intoxicado con Peroxisomicina A1 a tiempos de 4, 8, 12 y 24 horas de exposición.

En el grupo experimental de PA1 se logró visualizar el patrón de escalera característico de la ruptura del DNA internucleosomal que ocurre durante el proceso de apoptosis.

El patrón en escalera del DNA se visualizó en geles de agarosa al 1.8 % conteniendo 0.4 µg/mL de bromuro de etidio mediante un transiluminador de luz ultravioleta

En las figuras 34, 35 y 36 se muestran los resultados obtenidos para cada uno de los órganos analizados.

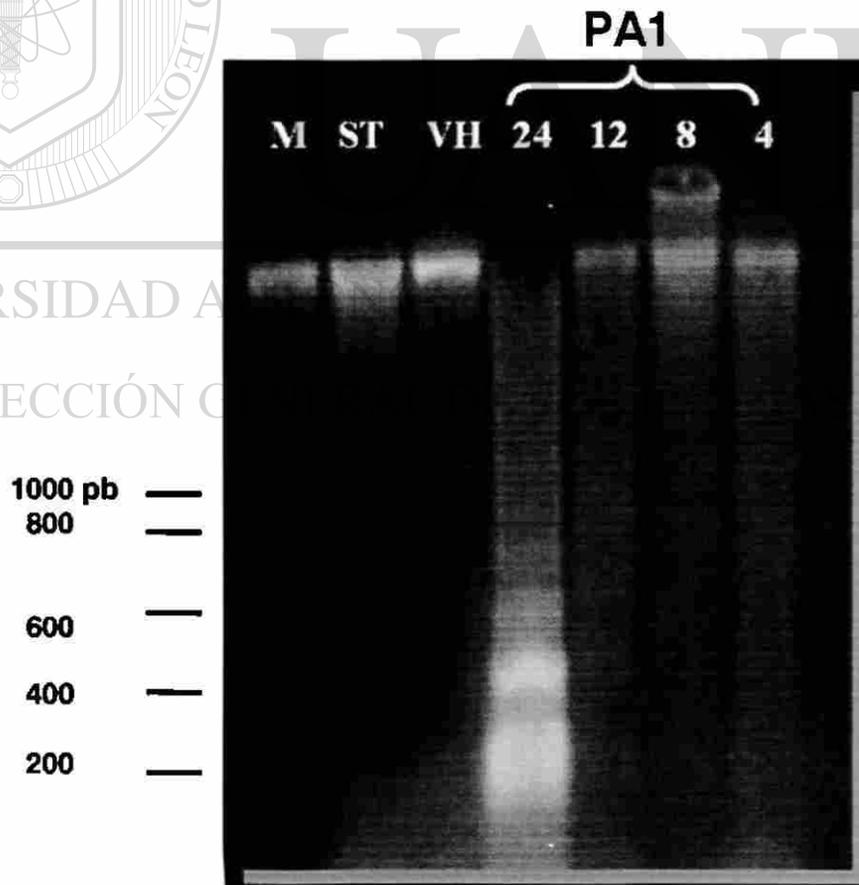


FIGURA 34. Fragmentación del DNA en HIGADO de ratón en cada uno de los grupos analizados. M: Marcador de peso molecular, ST: Sin tratamiento, VH: Vehículo 24 hrs; PA1: Intoxicados con Peroxisomicina A1 a los tiempos indicados. Obsérvese el DNA fragmentado en el grupo de 24 horas de exposición.

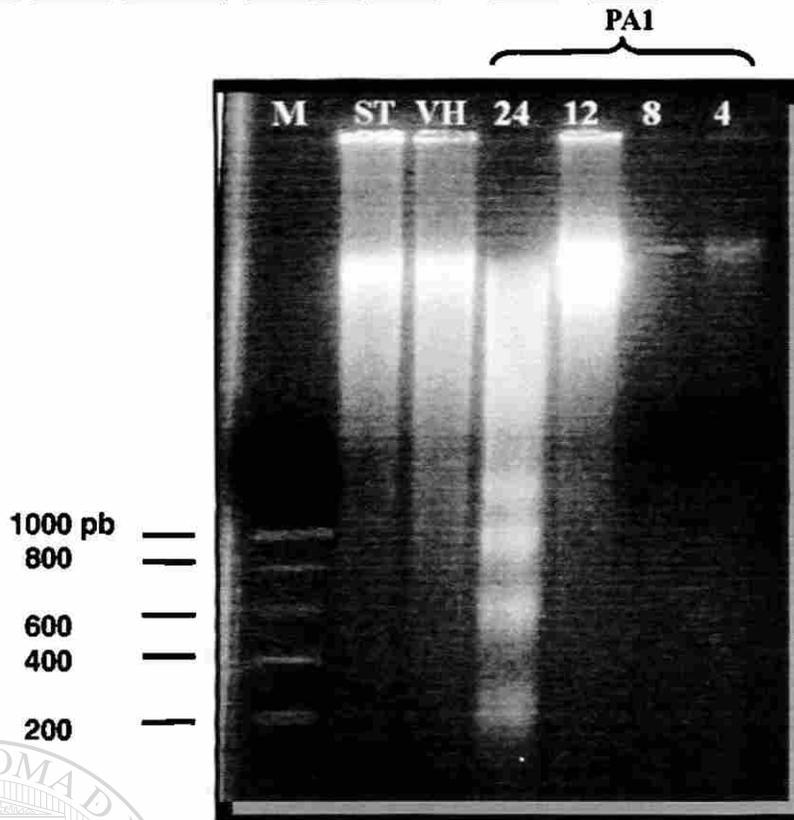


FIGURA 35. Fragmentación del DNA en RIÑÓN de ratón en cada uno de los grupos analizados. **M:** Marcador de peso molecular, **ST:** Sin tratamiento, **VH:** Vehículo 24 hrs; **PA1:** Intoxicados con Peroxisomicina A1 a los tiempos indicados. Obsérvese el DNA fragmentado en el grupo de 24 horas de exposición.

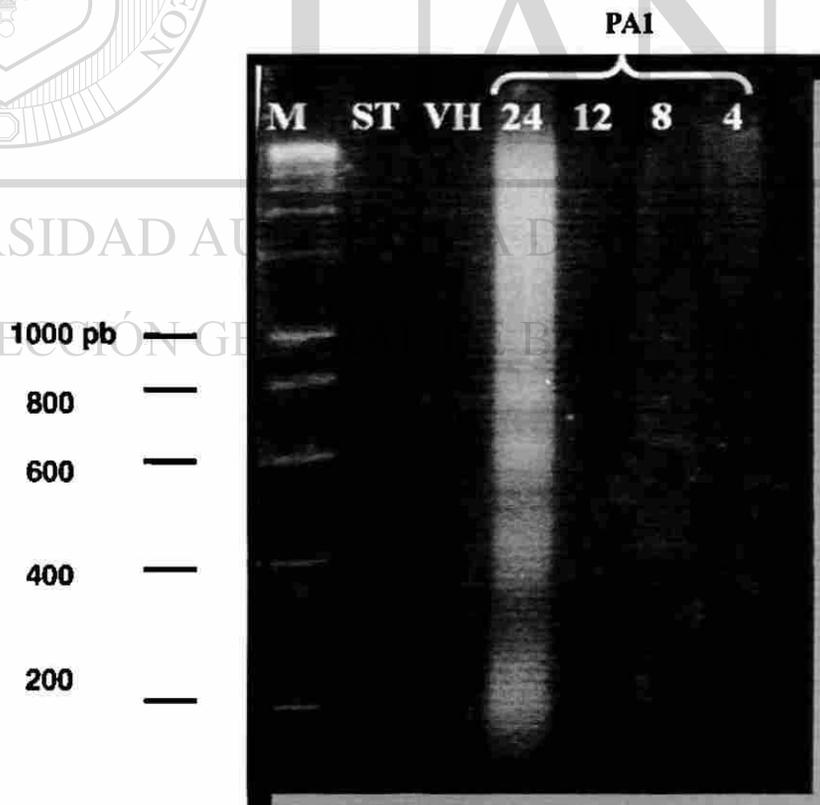


FIGURA 36. Fragmentación del DNA en PULMÓN de ratón en cada uno de los grupos analizados. **M:** Marcador de peso molecular, **ST:** Sin tratamiento, **VH:** Vehículo 24 hrs; **PA1:** Intoxicados con Peroxisomicina A1 a los tiempos indicados. Obsérvese el DNA fragmentado en el grupo de 24 horas de exposición.

3.2.2 CUANTIFICACIÓN DEL DNA FRAGMENTADO POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE.

Este método nos permitió evaluar la incidencia de apoptosis en hígado, riñón y pulmón de ratones intoxicados con PA1 a 24 horas de exposición mediante la determinación de la proporción de DNA fragmentado presente en las muestras empleando un método espectrofotométrico.

3.3 ANALISIS ESTADÍSTICO.

La cuantificación de la fragmentación del DNA mediante espectrofotometría se realizó por triplicado y los datos se sometieron a la prueba T de Student utilizando un grado de significancia de $p < 0.01$.

Los resultados de la cuantificación de DNA en hígado, riñón y pulmón se ilustran en la gráfica de barras mostrando la diferencia significativa entre cada uno de los órganos analizados (fig. 37).

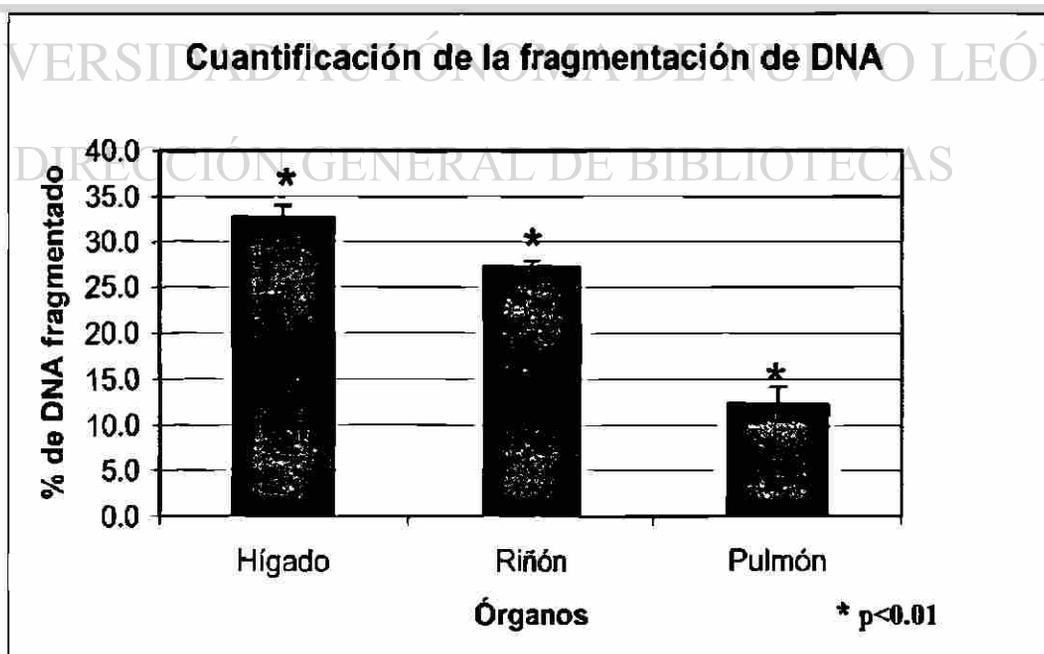


FIGURA 37. Resultados de la cuantificación de DNA en Hígado, Riñón y Pulmón de ratón del grupo Intoxicado con Peroxisomicina A1, 24 hrs de exposición.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

En base a los resultados del presente estudio se cumplió el objetivo general "Evaluar la presencia de apoptosis por métodos morfológicos y bioquímicos en riñón y pulmón de ratón intoxicado con PA1 y su cuantificación comparativa con la apoptosis observada en el hígado."

Este estudio se realizó en un modelo *in vivo* analizando los órganos blanco para la Peroxisomicina A1: hígado, riñón y pulmón^{39,40} de ratones intoxicados con una dosis única de 2DL₅₀ de PA1 disuelta en aceite de cártamo, colectando éstos órganos a tiempos de 4, 8, 12 y 24 horas de exposición.

En los estudios morfológicos a microscopía de luz y microscopía electrónica de transmisión en hígado se confirmó la presencia de esteatosis, congestión vascular, hemorragia, pérdida de las uniones intercelulares, condensación del citoplasma, alteraciones morfológicas nucleares como condensación de la cromatina y aumento o disminución del tamaño nuclear, cuerpos autofágicos,⁵⁵ alteraciones mitocondriales y cuerpos apoptóticos.⁵³ Estas alteraciones se observaron a partir de las 4 horas y fueron incrementándose con el tiempo hasta las 24 horas posteriores a la intoxicación. Éstos hallazgos ya habían sido reportados en estudios previos realizados en un modelo *in vivo*.⁵³

Las alteraciones mitocondriales reportadas por Angermüller y cols.,²⁷ proponen que estas anteceden a la fragmentación de la cromatina y que representan un marcador temprano de la apoptosis. En el presente estudio observamos dichas alteraciones y un incremento con respecto al tiempo en la positividad a la fragmentación de la cromatina en las muestras de hígado, riñón y pulmón. Es por esto que se puede considerar que a partir de las 4 a 8 horas

ya se ha iniciado el proceso de apoptosis evidenciándose a las 24 horas de exposición por la presencia de abundantes cuerpos apoptóticos.

En el análisis histológico y ultraestructural de corteza y médula de riñón a 4, 8 y 12 hrs post-intoxicación se observaron las alteraciones sugestivas de apoptosis ya descritas y a partir de las 12 hrs se encontraron cuerpos apoptóticos. También se observó un daño generalizado sobre el epitelio de los túbulos de estas regiones con integridad de la membrana basal, pérdida de las microvellosidades, núcleos picnóticos y mitocondrias con extracción de la matriz en las células epiteliales a las 4 horas posterior a la intoxicación, estas alteraciones morfológicas han sido reportadas como marcadores de necrosis.⁵⁶

Los riñones además de regular líquidos corporales como la orina participan de manera importante en procesos de excreción de productos químicos o tóxicos del torrente sanguíneo como antibióticos, antimicóticos, analgésicos antipiréticos y cafeína⁵⁷ sobre los cuales se ha descrito que causan tanto apoptosis^{58,59} como necrosis⁶⁰ en el parénquima renal teniendo un efecto inicial importante sobre la barrera de filtración en el glomérulo, células mesangiales intraglomerulares y epitelio del túbulo proximal principalmente.

Debido a dicha función los resultados obtenidos en nuestro estudio sugieren un efecto directo de la toxina sobre las estructuras de la corteza⁴⁵ y médula renal que resulta en una activación simultánea de necrosis y apoptosis por la PA1.

Además, en estudios recientes se ha propuesto que aunque necrosis y apoptosis son esencialmente dos tipos diferentes de muerte celular pueden tener limitados traslapes moleculares en una respuesta celular ante un compuesto tóxico a la misma dosis administrada y que la amplitud del daño que finalmente activará la apoptosis y la necrosis dependerá de factores toxicocinéticos, reconocimiento de receptores, bioactivación y lesión específica de cada tipo celular.⁶¹

Por otro lado en el análisis del pulmón a 4 horas post-intoxicación se observaron las alteraciones pre-apoptóticas ya descritas y a partir de las 24 horas se observaron alteraciones sugestivas de apoptosis y cuerpos apoptóticos en las células de la sangre principalmente y ocasionalmente en los neumocitos I y II, éstos resultados se correlacionan con los descritos por Ballesteros y cols.⁶² Además de lo anterior, a partir de 4 horas post-intoxicación se observó daño pulmonar, edema, abundante infiltrado celular, principalmente polimorfonucleares (PMN) y linfocitos, daño en la barrera alveolo-capilar y daño sobre los neumocitos I y II por la presencia de exudado y hemorragia en la luz alveolar. Estos hallazgos se correlacionan con los reportados en estudios previos^{63,64} realizados en ratones intoxicados con PA1 disuelta en solución salina, aceite de cártamo y haemaccel administrada vía i.p. e i.v. respectivamente en donde analizaron el suero y sobrenadante del homogenizado pulmonar a partir de 0.5 horas hasta 5 horas encontrando un valor elevado de TNFa, reportando la máxima concentración y mayor número de PMN a partir de 1-1.5 horas de exposición a la toxina, esto podría sugerir una posible relación entre los valores de TNFa y la presencia de apoptosis a tiempos posteriores, ya que existen estudios en los que se reporta que TNFa al ser liberado por monocitos y macrófagos en el torrente sanguíneo activa a los PMN que al ser activados expresan moléculas de adhesión que les permite 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 alveolo-capilar.⁶⁵⁻⁶⁷ Además se ha demostrado que TNFa puede mostrar efecto en la inducción de apoptosis al desencadenar una cascada que conduce a la activación de proteínas intracelulares citosólicas y mitocondriales que participan de manera importante en los cambios pre-apoptóticos mitocondriales y en la formación de cuerpos apoptóticos,⁶⁸ de manera que se puede sugerir que liberación de TNFa pudiera estar involucrado en la activación de apoptosis inducida por la Peroxisomicina A1 en las células sanguíneas y ocasionalmente en las del parénquima pulmonar.

La evaluación del DNA fragmentado visualizado por un patrón en escalera de multímeros de ~200 pb en geles de agarosa,²⁹⁻³¹ demuestra que durante la apoptosis el DNA es fraccionado por la activación de endonucleasas, estos fragmentos fueron observados de manera muy clara en los tres órganos analizados a 24 horas de exposición a la PA1. Destaca en este estudio que en el análisis del riñón a las 24 horas de exposición se observó el patrón en escalera característico de apoptosis y una degradación del DNA característico de la necrosis, éste "barrido" del DNA en el gel es muestra de la degradación al azar atribuida a la necrosis causada por la liberación de enzimas lisosomales hidrolíticas³² confirmando con esto los hallazgos en los análisis histológicos y ultraestructurales mencionando que a 4, 8 y 12 horas de exposición este método no detectó los fragmentos.

Los resultados obtenidos en la cuantificación de DNA mediante métodos espectrofotométricos mostraron que la PA1 tiene un efecto mayor en la inducción de apoptosis sobre el hígado, en menor cantidad en el riñón y finalmente en el pulmón. Estos resultados confirman los hallazgos obtenidos con las técnicas o procedimientos antes descritos además sugieren que la inducción de apoptosis por la PA1 en mayor proporción en el hígado es debido al efecto metabólico de éste órgano sobre numerosos compuestos liposolubles entre ellos medicamentos como el acetaminofén⁶⁹ o compuestos tóxicos aromáticos como estireno además de terpenoides olefínicos como las antracenonas que pueden ser metabolizados a compuestos epóxidos⁷⁰ que pueden inducir la apoptosis en células hepáticas.⁷¹

Todo esto demuestra que en los órganos blanco de la PA1 se presenta una respuesta de apoptosis, aunque de intensidad variable y acompañada de necrosis en las células del riñón.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.

5.1 CONCLUSIONES.

1.- Se demuestra la inducción de apoptosis por una dosis tóxica de PA1 en riñón y pulmón presentándose con mayor intensidad en el riñón y menor en pulmón, sin embargo, la intensidad de apoptosis en estos órganos es menor a la que se presenta en el hígado.

2.- En las células de riñón además de presentarse la apoptosis, también se observó la presencia de necrosis.

5.2 PERSPECTIVAS.

1.- Se propone que el hígado del ratón intoxicado con PA1 puede utilizarse como modelo para el estudio de la apoptosis causada por PA1.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1.- Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide –ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26: 239-257.

2.- Erickson G.F. (1997). Defining apoptosis: players and systems. *J. Soc. Gynecol. Invest.* 4: 219-228.

3.- Hickman J.A. (1992) apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer metastasis Rev* 11: 121-139.

4.- Eastman A. (1990) Activation of programmed cell death by anticancer agents: cisplatin as a model system. *Cancer cells* 2: 275-280.

5.- Majno G., Joris I. (1995) Review: apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol* 146: 3-15.

~~6.- Kerr J.F.R Gobe G.C., Winterfold C.M., Harmon B.V. (1995) Anatomical method in cell death. *Methods cell. Biol.* 46: 1-27.~~

7.- Villa P., Kaufmann S.C., Earnshaw W.C.(1997). Caspase and caspase inhibitors. *Trends Biochem Sci* 22: 388-392.

8.- Hengartner M.O.(1997). Apoptosis and the shape of death. *Dev Genet* 21: 245-248.

9.- Fraser A., Evan G. (1996) A licence to kill. *Cell* 85: 781-784.

10.- Cohen G.M.(1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Bio chem J* 326: 1-16.

11.- Mignote B, Vayssiere J.L.(1998) Mitochondria and apoptosis. Eur. J. Biochem. 252: 1-15.

12.- Engeland M van, Kuijpers H.J., Ramaeckers F.C., Reutelingsperger C.P., Schutte B.(1997). Plasma membrane alterations and cytoskeletal changes in apoptosis. Exp. Cell. Res. 235: 421-430.

13.- Kalayar C., Ord T., Testa M.P. Zhong L.T., Bredesen D.E. (1996). Cleavage of actin by interleukin β -converting enzyme to reverse DNase I inhibition. Proc Natl Acad Sci USA 93: 2234-2238.

14.- Martín S.J., O'Brien G. A., Nishioka W.K., McGahon A.J., Mahboubi A., Saïdo T.C., Green D.R. (1995). Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis. J. Biol. Chem. 270: 6425-6428.

15.- Greidinger E.I., Miller D.K., Yamin T.T., Casciola-Rosen L., Rosen A.(1996). Secuencial activation of three distinct ICE-like activities in Fas-ligated Jurkat cells. FEBS Lett. 390: 299-303.

16.- McCarthy N.J., Whyte M.K., Gilbert C.S., Evan G.I. (1997). Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage, or the Bcl-2 homologue Bak. J. Cell Biol. 136: 215-227.

17.- Hengartner M.O.(2000). The biochemistry of apoptosis. Nature 407: 770-776

18.- Hockenberry ., Nuñez G., Milliman C., Schreiber R.D., Korsmeyer S.J. (1990) Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. Nature 348: 334-336.

19.- Renvoize C., Roger R., Moulian N., Bertoglio J. (1997) Bcl-2 expression in target cells leads to functional inhibition of caspase-3 protease family in human NK and lymphokine-activation killer cell granule-mediated apoptosis. *J. Immunol* 159:126-134.

20.- Vaux D.L., Cory S. and Adams J.M. (1988) Bcl-2 gen promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335: 440-442.

21.- Liu X., Kim C.N., Yang J., Jemmerson R. and Wang, X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts. Requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86:147-157.

22.- Susin S.A., Lorenzo H.K., Zamzami N., Marzo I., Show B.E., Brothers G.M., Mangion J., Jacotot E., Costantani P., Loeffler M. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis inducing factor. *Nature* 397: 441-446.

23.- Du C., Fang M., Li Y., Li L. and Wang X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*. 102:33-42.

24.-Verhagen A.M., Ekert P.G., Pakusch M., Silke R.J., Connolly L.M. Reid G.E., Moritz R.L., Simpson R.J. and Vaux D.L. (2000). Identification of DIABLO a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins *Cell*. 102: 43-53.

25.- Li L.Y., Lou X., Wang. (2001). Endonuclease G (Endo G) is an apoptosis DNase when released from mitochondria. *Nature* 412:95-99.

26.- Kerr, J.F.R., Winterford, C.M. and Harmon, B.V. Morphological Criteria for Identifying Apoptosis. (1994). Cell Biology: A Laboratory Handbook. Academic Press, Inc. págs. 319-329.

27.- Angermuller, S., Schuman J., Fahimi H.D., Tiede G. (1999) Ultrastructural alterations of mitochondria in pre-apoptotic and apoptotic hepatocytes of TNF- α -treated galactosamine-sensitized mice. Ann NY Acad. Sci. 887, 12-1748.

28.- Schmitz, G. (1991). Nonradiative labeling of oligonucleotides in vitro with the hapten digoxigenin by tailing with terminal transferase in Anal Biochem. 192:222-231.

29.-Compton M.M. (1992). A biochemical hallmark of apoptosis. Internucleosomal degradation of the genome. Cancer Metastasis. Rev. 11:105-119.

30.-Wyllie A.H. (1980) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. Nature 284:555-556.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
31.- Arends M.J., Morris R.G., Wyllie A.H. (1990). Apoptosis: the role of the endonuclease. Am. J. Pathol 136: 593-608.

32.- Kerr J.F.R and Harmon B.V. (1991) Definition and incidence of apoptosis: a historical perspective. In Apoptosis: The Molecular Basis of Cell Death, pp.5-29, Tomei, I.D. and Cope F.O.(eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

33.-Burton K.(1956). A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction of the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. Biochem J. 62: 315-321.

- 34.- Jian Guan,MD, Da-di Jin, Li-juan Jin and Qi Lu. (2002) Apoptosis in organs of rats in early stage alter polytrauma combined with shock. *J. Trauma.* 52: 104-111.
- 35.- Fernández Nava R.(1992). Nombres comunes, usos y distribución geográfica del género *Karwinskia* (*Rhamnaceae*) en México. *Anales Inst. Biol. UNAM, Ser.Bot.*63:1-3.
- 36.- Arellano E., Mendoza J.F., Domínguez F.J. (1994). Intoxicación por *Karwinskia johnstonii* Fernández estudio de 12 pacientes. *Bol.Méd. Hosp. Infant. Méx.* 51: 105-112.
- 37.- Clavijero F.X. (1982). Plantas nocivas y extravagantes. En Manuel León Portilla (Editor), "Historia de la Antigua o Baja California", Editorial Porrúa, 3a. Edición.pp 31-33.
- 38.- Dreyer D.L., Arai I., Bachman C.D., Anderson W.R., Jr., Smith R.G., And Daves G.D., Jr. (1975) Toxins causing noninflammatory paralytic neuronopathy. Isolation and structure elucidation. *J. Am. Chem. Soc.* 97:4895-4890.
- 39.- Bermúdez M.V., Gonzalez-Spencer D., Guerrero M., Waksman N., and Piñeyro A.(1986). Experimental intoxication with fruit and purified toxins of buckthorn (*Karwinskia humboltiana*). *Toxicon* 24:1091-1097.
- 40.- Bermúdez M.V., Martinez F.J., Salazar M.E., Waksman N. and Piñeyro A.(1992) Experimental acute intoxication with ripe fruit of *Karwinskia humboltiana* (tullidora) in rat, guinea-pig, hamster, and dog. *Toxicon.*30:1493-1496.
- 41.- Sepúlveda-Saavedra J., González-Corona B., Taméz-Rodríguez V.A., Bermúdez de Rocha M.V.y Piñeyro-Lopez A. (1992).Ultraestructure of the lesion

induced by toxin T-514 isolated from *K.humboltiana* in the alveolar region of the lung. Proc. 50th Ann. Meet. EMSA. Bailey G.W., Bentley J., Small J.A. (Editors). Published by San Francisco press, Inc. pp 640-641.

42.- Taméz-Rodríguez V.A., Sepúlveda –Saavedra J., Bermúdez de Rocha M.V. y Piñeyro López, A. (1991). Autofagia de peroxisomas en el hígado de *macaco fascicularis* intoxicado con peroxisomicina A1 (T514). Memorias del IX Encuentro de Investigación Biomédica (Trabajo Mural). Facultad de Medicina, UANL.

43.- Piñeyro López A., González Guerrero J.F., Vidal Gutiérrez O., Lozano Meléndez F., Ancer Rodríguez J., Marfil Rivero., González Alanis R., y Piñeyro Garza E. (1992). Estudio Fase I de la T-514 (Peroxisomicina): Resultados clínicos. Memorias del IX Encuentro de Investigación Biomédica. Facultad de Medicina, UANL. Pp 159.

44.- Taméz Rodríguez V.A., Ancer-Rodríguez J., Sepúlveda-Saavedra J., Bermúdez de Rocha M.V., y Piñeyro López A. (1989). Cambios histopatológicos y ultraestructurales en riñón e hígado de *Macacus rhesus* producidos por la T-514 aislada de la *Karwinskia humboltiana* (tullidora). Memorias del VII. Encuentro Regional de Investigación Biomédica. Facultad de Medicina, UANL. pp18.

45.- Acosta García Ricardo (1995). Efecto de la T-514 del genero *Karwinskia* sobre la ultraestructura de los túbulos contorneados proximales del riñón *in vitro*. Tesis de maestría. Facultad de Medicina, UANL, México.

46.- Piñeyro L.A. (1990). Toxicidad selectiva *in vitro* de la toxina T 514 de la *Karwinskia humboltiana*. Tesis doctoral. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo Leon. Monterrey, N.L., México.

47.- Piñeyro A.(1995). European Patentblatt 95/48 (29.11.95) Patent number: 0467407.

48.- Piñeyro A. (1996). Bioscience patent "Pharmaceutically acceptable anthracene compounds number 5578646.

49.- Patente Japonesa número 2651758, Coreana 202320. Canadiense 2047550. Mexicana 9100290.

50.- Sepúlveda Saavedra J., van der Klei I.J., Keizer I., Piñeyro López A., Harder W. And Venhuis M. (1992). Studies on the effect of toxin T-514 on the integrity of peroxisomes in methylotrophic yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* 91: 207-212.

51.- Lansiaux A., Laine W., Baldeyrou B., Mahieu Ch., Wattez N., Vezin H., Martinez F.J., Piñeyro A. and Bailly Ch. (2001). DNA topoisomerase II inhibition by peroxisomicine A1 and its radical metabolite induces apoptotic cell death of HL-60 and HL-60/MX2 human leukemia cells. *Chem. Res Toxicol.* 14: 16-24.

52.- Martínez F.J., Guo-Quing Zeng, Piñeyro A., Garza-Ocañas L., Tomei D. And Umansky S.R. (2001) Apoptosis induction and cell cycle perturbation in established cell lines by peroxisomicine A1 (T514). *Drug and Chemical Toxicology* 24(3):237-299.

53.- Santoyo Pérez M.E. (2002). Efectos de la peroxisomicina A1 sobre el hígado de ratón tratado con clofibrato. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México.

54.- Ballesteros-Elizondo, R.G., Santoyo Pérez M., Piñeyro-López A., Sepúlveda Saavedra J.(2002). Dosis tóxicas de Peroxisomicina A1 causan alteraciones pre-apoptósicas y apoptosis en el hígado del ratón albino. *Memorias del XX*

Congreso Nacional de Investigación Biomédica, Facultad de Medicina, UANL.,
pág S87.

55.- Moreno Martínez M.L. (2000). Efecto de la Peroxisomicina A1 sobre la autofagia de peroxisomas en el hígado de *Macaca fascicularis* en un modelo *in vitro*. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México.

56.- Searle J., Kerr J.F.R and Bishop C.J.(1982). Necrosis and Apoptosis:Distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Patol.Anuu.17*:229-259

57.- Rocha GM, Michea LF, Peters EM, Kirby M, Xu Y, Ferguson DR, Burg MB. (2001). Direct toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs for renal medullary cells. *Proc Natl Acad Sci U S A. 98*(9): 5317-5322.

58.- El Mouedden M, Laurent G, Mingeot-Leclercq MP, Taper HS, Cumps J, Tulkens PM. (2000) Apoptosis in Renal Proximal Tubules of Rats Treated with Low Doses of Aminoglycosides.*Antimicrob Agents Chemother. 44*(3): 665-675.

59.- Varlam DE, Siddiq MM, Parton LA, Rüssmann H. (2001). Apoptosis Contributes to Amphotericin B- Induced Nephrotoxicity. *Antimicrob Agents Chemother. 45*(3): 679-685.

60.- Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM. (1999). Aminoglycosides: Nephrotoxicity. *Antimicrob Agents Chemother. 43*(5): 1003-1012.

61.- Raffray M. and Cohen G.M. (1997). Apoptosis and Necrosis in Toxicology: A Continuum or Distinct Modes of Cell Death?. *Pharmacol.Ther.75*:No.3,pp.153-177.

62.- Ballesteros-Elizondo, R.G., Santoyo Pérez M., Piñeyro-López A., Sepúlveda Saavedra J. (2001). Efecto de la Peroxisomicina A1 sobre el pulmón de ratón albino CD-1 tratado con clofibrato. Memorias del XIX Congreso Nacional de Investigación Biomédica, Facultad de Medicina, UANL.

63.-Ballesteros Elizondo R.G (2000). Factor de Necrosis Tumoral α y granulocitos neutrófilos en la producción del síndrome de insuficiencia respiratoria del adulto causado por Peroxisomicina A1. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México.

64.- García Juárez J. (2004). Cuantificación de PMN, linfocitos y macrófagos alveolares en el pulmón del ratón albino tratado con una dosis tóxica de PA1 en haemacel y su relación con el TNF α . Tesis de Maestría. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México.

65.- Zimmerman G. and Rezetti (1983) A. Functional and metabolic activity of granulocytes from patients with adult respiratory distress syndrome. *Am. Rev. Respir. Dis.* 127:290-300

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

66.- Chollet S., Montravers P., Gilbert C., Elbim C. and Desmots J. (1994) Relationship between polymorphonuclear neutrophils and cytokines in patients with adult respiratory distress syndrome. *Ann N. Acad. Sci.* 354-366.

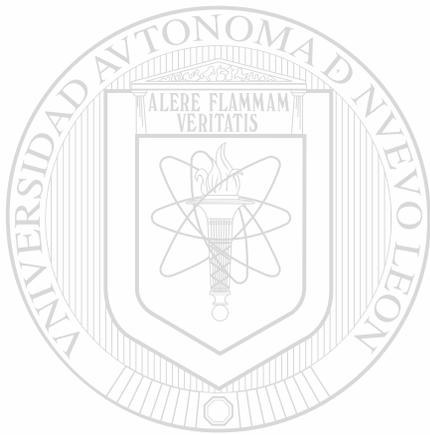
67.- Sandborg R. and Smolen J., (1988) Early biochemical events in leukocyte activation. *Lab invest* 59(2):300-320.

68.- Ding W.X., and Yin X.M. (2004). Dissection of the multiple mechanism of TNF α induced apoptosis in liver injury. *J.Cell.Mol.Med.* Vol.8 No.4, pp 445-454.

69.- Gyamlani GG, Parikh CR. (2002). Acetaminophen toxicity: suicidal vs accidental. *Crit Care.* 6(2): 155-159.

70.- Argiriadi MA, Morisseau C, Hammock BD, Christianson DW. (1999) Detoxification of environmental mutagens and carcinogens: Structure, mechanism, and evolution of liver epoxide hydrolase. Proc Natl Acad Sci U S A. Sep 14; 96(19): 10637-10642.

71.- Chen J.K., Capdevila J., Harris RC. (2001). Cytochrome P450 Epoxygenase Metabolism of Arachidonic Acid Inhibits Apoptosis. Mol Cell Biol. Sep; 21(18): 6322-6331.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

APENDICE A

A.1 Técnica para inclusión en resinas epóxicas.

- 1.- Fijar en Karnovsky-Ito a temperatura ambiente 30 min a 1 hora.
 - 2.- Lavar en buffer de cacodilatos 3 veces 5 min cada lavado.
 - 3.- Postifijar en tetraóxido de osmio 2% 30 min.
 - 4.- Lavar en buffer de cacodilatos 3 veces 5 min cada lavado.
 - 5.- Nitrato de uranilo acuoso 1% 30 min.
 - 6.- Lavar en buffer de cacodilatos 3 veces 5 min cada lavado.
 - 7.- Acetona 30% 5 min.
 - 8.- Acetona 50% 5 min.
 - 9.- Acetona 70% 5 min.
 - 10.- Acetona 90% 5 min.
 - 11.- Acetona 100% 3 veces por 5 min.
 - 12.- Acetona-Epón 1:1 1 hora o toda la noche.
- Dejar evaporar bajo campana de extracción por 4 hrs o hasta que la resina se vuelva mas viscosa.
- 13.- Epón puro 1 hr.
 - 14.- Inclusión y polimerización de 12 a 72 hrs a 60°C.

Se preparan dos tipos de cortes:

A) Semifinos: de aproximadamente 350 μm de grosor, se montan en un portaobjetos y se tiñen con azul de toluidina y se analizan mediante microscopia de luz.

B) Finos: de aproximadamente 100 nm de grosor y se contrastan con soluciones acuosas de acetato de uranilo al 5% y citrato de plomo al 0.4% para el análisis ultraestructural.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

A.2 Técnica Histológica para muestras embebidas en parafina.

- 1.- Obtención de la muestra.
- 2.- Fijación con formaldehído al 4 %.
- 3.- Lavado en agua corriente.
- 4.- Deshidratación en alcoholes graduales 60 – 100 %.
- 5.- Aclaración con xilol.
- 6.- Preinclusión (impregnación en parafina).
- 7.- Inclusión definitiva para la formación del bloque.
- 8.- Microtomía.
- 9.- Adhesión de los cortes en baño de flotación.
- 10.- Desparafinar e hidratar.
- 11.- Coloración o Tinción.
- 12.- Deshidratación y aclaración.
- 13.- Montaje con resina sintética.

A.3 Tinción con Hematoxilina y eosina (H y E).

- 1.- Desparafinar con xilol 5 min.
- 2.- Etanol-Xilol 5 min.
- 3.- Etanol absoluto 2 min.
- 4.- Alcohol etílico 96° 2 min.
- 5.- Agua destilada, enjuague lento.
- 6.- Hematoxilina de Gill, 2 min.
- 7.- Agua de la llave (2 lavados), enjuague lento.
- 8.- Alcohol Ácido, 1 inmersión rápida.
- 9.- Agua de la llave (2 lavados), enjuague lento.
- 10.- Agua amoniacal 2 inmersiones rápidas.
- 11.- Agua de la llave (2 lavados), enjuague lento.
- 12.- Agua destilada, enjuague lento.
- 13.- Eosina 6 inmersiones.
- 14.- Alcohol etílico 96° enjuague breve.
- 15.- Alcohol etílico 96° 1 min.
- 16.- Etanol absoluto (2 cambios) 2 min.
- 17.- Etanol-Xilol 3 min.
- 18.- Xilol 2 min.
- 19.- Xilol 3 min.
- 20.- Montaje con resina sintética o Entellan.

A.4 Tricrómico de Massón.

Fijación.- formaldehído al 4 %

Inclusión.- En parafina y cortes de 5 µm de espesor.

- 1.- Desparafinar con xilol e hidratar pasando por alcohol y agua destilada. ®
- 2.- Usar como "mordente" el fijador de Bouin por 30-60 min a 56 °C, o toda la noche a temperatura ambiente.
- 3.- Lavar en agua corriente hasta que el color amarillo desaparezca.
- 4.- Enjuagar los cortes en agua destilada.
- 5.- Pasar los cortes a la hematoxilina Férrica de Weigert durante 10 min.
- 6.- Lavar en agua corriente, 5 min o hacer 3 cambios de 15 seg.
- 7.- Enjuagar en agua destilada.
- 8.- Teñir con la solución de Fucsina-Escarlata por 5 seg (el tiempo depende de la calidad y/o concentración y tiempo de uso o de preparación del colorante).
- 9.- Lavar varias veces en agua destilada hasta que ésta deje de teñirse.
- 10.- Pasar los cortes a la solución de ácidos Fosfomolibdico-Fosfotúngstico durante 10 min. Enjuagar brevemente con agua destilada.
- 11.- Colorear con la solución de Azul de Anilina durante 15 seg (el tiempo depende de la calidad y/o concentración y tiempo de uso del reactivo).
- 12.- Lavar con agua destilada varias veces hasta eliminar el exceso del colorante.
- 13.- Pasar al acético acuoso por 1-2 min.

- 14.- Deshidratar en alcohol de 96° por unos seg (cuidar que no se decolore).
- 15.- Continuar con el alcohol absoluto hasta acarar en xilol y montar en resina.

A.5 MÉTODO INMUNOHISTOQUÍMICO PARA DETECTAR LA FRAGMENTACIÓN DE LA CROMATINA UTILIZANDO TUNEL.

Para cortes fijados con formaldehído al 4 % y embebidos en parafina y cortes de 6 μ m.

I.- DESPARAFINAR:

- 1.- Colocar los cortes en estufa a 57°C, 5 min.
- 2.- Pasar cortes a 2 cambios de xilol 5 min c/u.
- 3.- Hidratar en alcoholes graduales 100%, 95 % y 70%, 5 min c/u.
- 4.- Sumergir en PBS 1 X, 2 cambios 5 min c/u.

NO PERMITA QUE LOS CORTES SE SEQUEN.

II.- PROTOCOLO DEL KIT

- 1.- Sumergir las muestras en PBS 1 X 10 min a Temperatura Ambiente (TA).
* Secar cuidadosamente alrededor de la muestra.
- 2.- Cubrir con 50 μ L/muestra de solución de proteinasa K, incubar de 15 a 30 min. a 37°C.
- 3.- Lavar 2 veces en agua desionizada 2 min c/u.
- 4.- Sumergir las muestras en solución bloqueadora por 5 min (NO más) a TA
- 5.- Lavar las muestras en PBS 1 X, 1 min.
- 6.- Sumergir en Buffer TdT 1 X, 5 min.
- 7.- Cubrir la muestra con 50 μ L de mezcla de reacción de marcaje e incubar de 30 a 60 min. a 37°C en cámara húmeda.
- 8.- Sumergir en Buffer Stop TdT 1 X, 5 minutos a temperatura ambiente
- 9.- Lavar 2 veces en PBS 1X 2 min c/u a TA.
- 10.- Cubrir la muestra con 50 μ L de solución Strep-HRP e incubar 10 min. 37 °C
- 11.- Lavar 2 veces en PBS 1X 2 min c/u.
- 12.- Sumergir en solución de DAB de 2 a 7 min.
- 13.- Lavar en varios cambios de agua desionizada 2 min c/u.

III.- CONTRATINCIÓN:

- 1.- Sumergir las muestras en agua desionizada por 2 min.
- 2.- Sumergir las muestras de 5 segundos a 5 min. en verde de metilo.
- 3.- Lavar las muestras subsecuentemente sumergiéndolas 10 veces en cada uno:
 - Agua desionizada.
 - Etanol 70 %, 2 cambios.
 - Etanol 95 %, 2 cambios.
 - Etanol 100 %, 2 cambios.
 - Xilol 2 cambios.
- 4.- Limpie el exceso de xilol
- 5.- Montar y almacenar en oscuridad.

A.6 DETECCIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN DE DNA MEDIANTE GELES DE AGAROSA.

* Después del sacrificio, cada órgano es tratado con 3 strokes de un homogenizador en buffer frío.

- 1.- Centrifugar el homogenizado a 27000 x g por 20 min.
- 2.- Remover las proteínas del sobrenadante por extracción con fenol-cloroformo hasta que la interfase este clara.
- 3.- Después del tratamiento con RNAsa libre de DNAsa por 30 min a 37 °C, una extracción final es colectada.
- 4.- Precipitar el DNA por la adición de 2 volúmenes 100% etanol.
- 5.- Centrifugar por 10 min a 5000 x g.
- 6.- Enjuagar la pastilla con etanol 70% y se deja secar.
- 7.- Resuspender la pastilla en buffer Tris-EDTA 1 X (TE) a 4 °C.
- 8.- Combinar con buffer de carga.
- 9.- Las muestras se someten a electroforesis en gel de agarosa al 1.8 % con 1 µg/mL de bromuro de etidio en buffer TBE 1X a 60 V/cm por 1 hora.
- 10.- El DNA es visualizado en un transiluminador de luz ultravioleta y fotografiado.

A.7 CUANTIFICACIÓN MEDIANTE MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS LA FRAGMENTACIÓN DEL DNA.

* Después del sacrificio, cada órgano es tratado con 3 strokes de un homogenizador en buffer frío.

- 1.- Centrifugar el homogenizado a 27000 x g por 20 minutos.
- 2.- Colectar el sobrenadante (que contiene el DNA fragmentado soluble) y la pastilla (conteniendo DNA genómico, suspendido en buffer TE).
- 3.- Añadir ácido perclórico a la muestra a una concentración final de 0.5 N.
- 4.- Hidrolizar la muestra a 70 °C por 70 min.
- 5.- Enfriar a 4 °C por 5 min.
- 6.- Centrifugar por 6 minutos a 4000 x g a 4 °C para remover las proteínas.
- 7.- Colectar los sobrenadantes
- 8.- Realizar la reacción con el reactivo de difenilamina (DPA) mezclando dos volúmenes de DPA con el sobrenadante y la pastilla.
- 9.- Incubar la mezcla a 30 °C por 18 hrs.
- 10.- Medir la absorbancia a 595 nm y 650 nm.
- 11.- Obtener la diferencia entre absorbancias (595 nm -650 nm).
- 12.- Interpolar en la curva de calibración de DNA.

APENDICE B

SOLUCIONES:

B.1 ANALISIS MORFOLÓGICO.

B.1.1 Formaldehído 4 %

* Para preparar 500 ml

Paraformaldehído	20 grs
Agua destilada	450 mL

* Calentar a 60 °C por 30 minutos

PBS 10X	50 mL
---------	-------

Ajustar pH a 7.2
Almacenar a 4 °C.

B. 1.2 PBS 10 X

NaCl	8 grs.
KCl	0.2 grs.
Na ₂ HPO ₄	1.44 grs.
KH ₂ PO ₄	0.24 grs.

B. 1.3 Fijador de Karnovsky- Ito.

Solución madre.

Paraformaldehído	16 grs.
Agua bidestilada	400 mL

* Calentar cerca del punto de ebullición y agregar varias gotas de hidróxido de sodio para quitar la turbidez.

Solución de trabajo:

Solución madre	400 mL
Buffer de cacodilatos 0.1 M pH 7.4	400 mL
Glutaraldehido 25 %	32 mL
Ácido pícrico	0.08 grs.

B. 1.4 Glutaraldehído 2.5 %

Glutaraldehído 25 %		10 mL
Buffer de cacodilatos	0.1 M pH 7.4	90 mL

B. 1.5 Buffer de Cacodilatos 0.1 M pH 7.4

Solución A		
Cacodilato de Sodio		4.28 grs.
Agua destilada		100 mL

Solución B		
Ácido Clorhídrico		0.5 mL
Agua destilada		25 mL

Solución de trabajo

Solución A		100 mL
Solución B		5.4 mL

Aforar a 200 mL con agua destilada.

B. 1.6 Tetraóxido de osmio 2 %

Tetraóxido de osmio		1 gr.
Buffer de cacodilatos 0.1 M	pH 7.4	50 mL

B 1.7 Nitrato de uranilo acuoso 1%

Nitrato de uranilo		1 grs.
Aforara a 100 mL		

B. 1.8 Resina epóxica

En este estudio se preparó resina epóxica MEDIA

Resina		23.8 mL (29 gr)
DDSA		16.0 mL(16 gr)
NMA		11.5 mL (14.3 gr).
DMP 30		1 mL (1 gr).

B. 1.9 Azul de Toluidina 5 %

Borato de sodio (Borax)		5 grs.
Agua destilada		100 mL

* Se calienta hasta que se disuelva completamente

Azul de toluidina 1 grs.

* Se agrega la solución de borato de sodio, se agita para disolver y se filtra.

B. 1.10 Acetato de uranilo 5 % en alcohol etílico 50 %

Acetato de uranilo 0.5 grs.

Alcohol etílico 50 % 10 mL

* Se guarda en refrigeración y se protege de la luz con papel aluminio.

B. 1.11 Citrato de plomo 0.4 %

Citrato de plomo 0.04 grs.

Agua destilada 10 mL

Se añaden unas gotas de hidróxido de sodio 1N hasta disolver.

B. 1.12 Hematoxilina de Gill.

Agua destilada 730 mL

Etilenglicol 250 mL

Hematoxilina anhidra (polvo) 2.0 grs.

* Si está en cristales pesar 2.36 grs.

Yodato de Sodio 0.2 grs.

Sulfato de aluminio 17.6 grs.

Ácido acético glacial 2.0 mL

* Para la preparación se debe seguir el orden, en agitación, a temperatura ambiente por 1 hora, filtrar antes de usar por primera vez.

B. 1.13 Eosina.

Solución stock (concentrada):

Eosina amarillenta 1.0 grs.

Agua destilada 20 mL

Alcohol del 96° 80 mL

Solución de trabajo:

Tomar una parte de la solución stock y agregarla en tres parte de alcohol de 80°. Antes de usar agregar 0.5 mL de ácido acético glacial, por cada 100 mL de colorante preparado y agitar.

B. 1.14 Solución de Alcohol-Ácido (Diferenciador o decolorante).

Alcohol de 70°	99 mL
Ácido Clorhídrico (HCl)	1 mL

B. 1.15 Solución de Agua Amoniacal (Virador).

Agua destilada	99 mL
Hidróxido de Amonio	1 mL

B. 1.16 Hematoxilina Férrica de Weigert

Solución A

Hematoxilina (anhidra)	1 gr.
Alcohol de 96°	100 mL

Solución B

Cloruro férrico acuoso al 29 %	4 mL
Agua destilada	95 mL
Ácido clorhídrico conc.	1 mL

Solución de trabajo:

Mezclar partes iguales de las soluciones A y B. (Debe renovarse periódicamente dependiendo del uso y de consistencia, con el tiempo suele precipitarse).

*** Solución acuosa de Cloruro Férrico**

Cloruro férrico	14.5 grs.
Agua destilada	50 mL

B. 1.17 Solución de Fucsina ácida y Escarlata de Biebrich.

Escarlata de Biebrich acuosa al 1 %	90 mL
Fucsina ácida acuosa al 1 %	10 mL
Ácido acético glacial	1 mL

*** Solución acuosa de escarlata de Biebrich**

Escarlata de Biebrich	1 gr
-----------------------	------

Agua destilada	100 mL
* Solución acuosa de Fucsina ácida	
Fucsina ácida	1 gr
Agua destilada	100 mL

B.1.18 Solución de Ácidos Fosfomolibdico y Fosfotúngstico.

Ácido Fosfomolibdico	5 grs
Ácido Fosfotúngstico.	5 grs.
Agua destilada	200 mL

B 1.19 Solución de Azul de Anilina

Azul de anilina	2.5 grs
Agua destilada	100 mL
Ácido acético glacial	2 mL

B.1.20 Solución acuosa de Ácido Acético al 1%.

Ácido acético glacial	1 mL
Agua destilada	99 mL

B. 1.21 Solución Fijadora de Bouin

Solución acuosa saturada de ácido pícrico	75 mL
Formaldehído (36-38 %)	25 mL
Ácido acético glacial	5 mL

B. 2 INMUNOHISTOQUÍMICA (TUNEL).

La técnica de TUNEL se determinó utilizando el kit de Trevigen®, las soluciones marcadas con * se deben preparar no más de 30 minutos antes de usarse.

*** B. 2.1 Solución de proteinasa K.**

	2 muestras	4 muestras	10 muestras
Agua desionizada	100 µL	200 µL	500 µL
Proteinasa K	2 µL	4µL	10 µL

*** B. 2.2 Solución bloqueadora:**

Metanol	45 mL
Peróxido de Hidrógeno 30%	5 mL

B. 2.3 Solución de Buffer de marcaje TdT 1 X

- Diluir el buffer TdT 10 X utilizando agua destilada.
- Use 50 mL de Buffer TdT 1 X para procesar de 1 a 10 muestras
- Separe una alícuota de 50 µL por muestra para preparar la mezcla de reacción de marcaje (paso 7), y almacenar en hielo

*** B. 2.4 Mezcla de Reacción de Marcaje**

- Descongele la mezcla de TdT y dNTP a TA, colóquela en hielo
- Para mantener la actividad óptima de la enzima saque del refrigerador el tubo de la enzima solo el tiempo necesario para tomar el volumen.
- Mantenga la mezcla en hielo.
- Prepare 50 µL por muestra de la manera siguiente:

	2 muestras	4 muestras	10 muestras
Mezcla de TdT dNTP	2 µL	4 µL	10 µL
Stock Catiónica 50 X	2 µL	4µL	10 µL
Enzima TdT	2 µL	4µL	10 µL
Buffer de marcaje TdT 1X	100µL	200µL	500 µL

B. 2.5 Buffer Stop TdT 1X

- Diluir el buffer stop TdT 10 X utilizando agua destilada, almacenar a temperatura ambiente.
- Use 50 mL de buffer stop TdT 1 X para procesar de 1 a 10 muestras.

Buffer Stop TdT 1X	5 mL
Agua desionizada	45 mL

*** B. 2.6 Solución Strep-HRP**

- Use 50 µL Solución Strep-HRP por muestra
- Almacene la solución a temperatura ambiente.
- Para preparar añada:

	2 muestras	4 muestras	10 muestras
PBS 1 X	100 µL	200 µL	500 µL
Strep-HRP	2 µL	4µL	10 µL

*** B. 2.7 Solución de DAB .**

- Descongele DAB a 37 °C. Almacene a temperatura ambiente **NO** en hielo, precipita la solución DAB.
- Prepare la solución no más de 30 minutos antes de usarla.
- Use 50 mL de solución DAB para procesar de 1 a 10 muestras.
- Para preparar añada:

PBS 1 X	50 mL
DAB	250 µL
H ₂ O ₂ 30%	50 µL

B. 2.8 Verde de metilo 1 %

- Esta listo para usarse, Puede re-usarse, almacene en recipiente cerrado, si precipita, filtre.

B. 2.9 CONTROL POSITIVO:

TACS-Nucleasa y Buffer

Buffer de marcaje TdT 1X	50 µL
Mezcla de TdT dNTP	1 µL
Stock Catiónica 50 X	1 µL
Enzima TdT	2 µL
TACS-Nucleasa	1 µL

B. 2.10 CONTROL NEGATIVO:

- Sustituir la enzima TdT de la mezcla por agua milliq.

B. 3 ANÁLISIS BIOQUÍMICO

B.3.1 Buffer frío (Fosfato 50 mM/L, NaCl 120 mM/L y EDTA 10 mM/L, pH 7.4).

* Preparar 50 mL

NaHPO ₄ (1M)	2.5 mL
NaH ₂ PO ₄ (1M)	2.5 mL
NaCl (1M)	6 mL
EDTA (0.5M)	1 mL

Aforar a 50 mL con Agua milliq.

B.3.2 SEVAGE

Cloroformo	24 mL
Alcohol isoamílico	1 mL

B.3.3 RNAsa libre de DNAsa (a concentración de 200 µg/mL).

A partir de una solución de trabajo de 10 µg/µL, adicionar 20 µL.

B.3.4 Buffer Tris-EDTA 1 X (Tris-HCl 10 mM/L, pH 8.0 y EDTA 1 mM/L) a 4 °C.

* Preparar 50 mL

Tris-HCl 1 M pH 7.5	500 µL
EDTA 0.5 M pH 8.0	100 µL
Agua milliq.	49.4 mL

B.3.5 Buffer de carga (jugo azul).

Xilencianol	30 mg
Bromofenol	30 mg
Agua milliq	12 mL
Glicerol	3.6 mL

B.3.6 Buffer TBE 10 X (Tris 89 mM/L, Borato 89 mM/L y EDTA 2 mM/L, pH 8.0)

Trizma base	108 grs.
Acido bórico	55 grs.
EDTA 0.5 M pH 8.0	40 mL

* Ajustar pH a 8.0 y aforar a 1000 mL

B.3.7 Ácido Perclórico (HClO₄) 10 N.

*Preparar 25 mL

P.M. 88 u.m.a	
HClO ₄	2.840 mL
Aforar a 25 mL con agua milliq.	

B.3.8 Reactivo de Difenilamina (DPA).

*Preparar 100 mL, almacenar en oscuridad y frasco ámbar.

Difenilamina	1.5 grs.
Acido Acético glacial	100 mL
Acido Sulfúrico	1.5 mL

* 1 mL de stock de acetaldehído, 16 mg/mL, es añadido a 100 mL de la solución de difenilamina antes del ensayo.

B. 3.9 Stock de acetaldehído (C₂H₄O) 16 mg/mL

*Preparar 25 mL, almacenar en oscuridad y frasco ámbar.

P.M. 44.05 u.m.a
I= 0.788 gr/mL

C₂H₄O 0.507 mL
Aforar a 25 mL con agua milliq.

B.3.10 Hidróxido de Sodio (NaOH) 1M

*Preparar 25 mL

P.M. 40 u.m.a

NaOH 1 gr.
Aforar a 25 mL con agua milliq.

B.4 CURVA DE CALIBRACIÓN

A partir de una solución patrón concentrada de 11.475 µg/mL de DNA se preparó la siguiente curva de calibración.

Tabla 2 Volúmenes, lecturas de absorbancia y diferencias de la curva de calibración

Conc. DNA (µg)	Stock DNA µL	DPA+Acet. µL	Agua µL	595 nm	650 nm	Diferencia
0.06	5.228	10.456	984.31	0.001	0.004	-0.003
0.08	6.971	13.942	979.0	0.03	0.026	0.004
0.1	8.714	17.429	973.85	0.038	0.032	0.006
0.12	10.457	20.914	968.62	0.249	0.241	0.008
0.14	12.200	24.400	963.39	0.07	0.059	0.011
0.18	15.686	31.372	952.94	0.464	0.448	0.016
BLANCO		10	990			

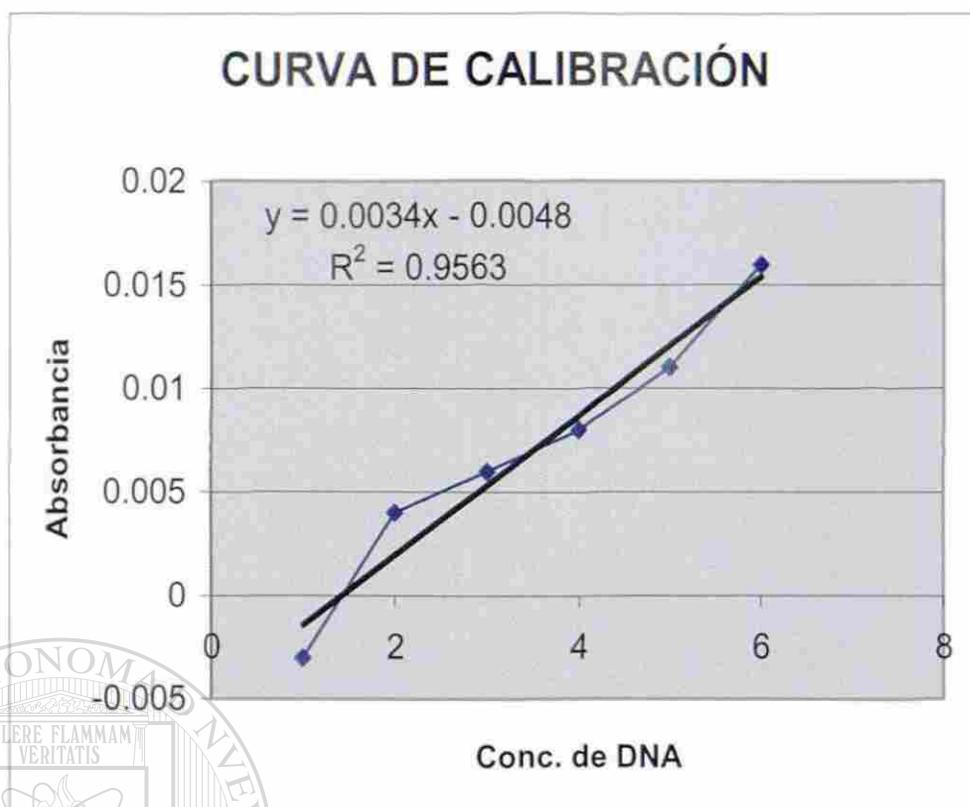
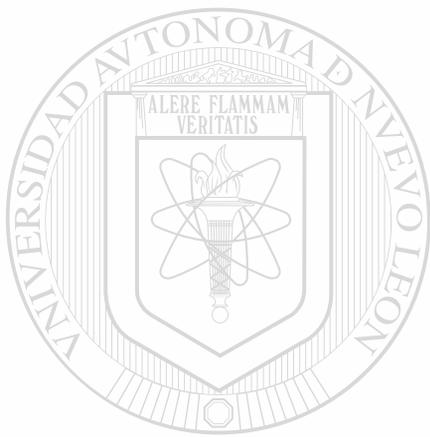


FIGURA 38. Curva de calibración para la cuantificación del DNA fragmentado empleando un método espectrofotométrico (595 nm- 650 nm).

Tabla 3 Resultados y análisis estadístico de la cuantificación de DNA fragmentado (proporción de DNA fragmentado).

ORGANOS	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Promedio	Prom. Final
HIGADO	32,0	31,5	30,9	31,5	32.8 % ± 1.2 *
	31,1	24,9	45,6	33,9	
	31,5	23,8	43,7	33,0	
RIÑÓN	21,8	25,4	33,0	26,7	27.2 % ± 0.7 *
	22,8	22,8	35,5	27,0	
	27,6	20,6	35,7	28,0	
PULMÓN	6,2	12,2	14,8	11,1	12.0 % ± 1.9 *
	9,1	10,1	13,1	10,8	
	8,7	16,6	17,4	14,2	

*p<0.01



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



