



**EFFECTO DE LA T-514 DEL GENERO Karwinskia
SOBRE LA ULTRAESTRUCTURA DE LOS
TUBULOS CONTORNEADOS PROXIMALES
DEL RIÑON in vitro**

POR

BIOLOGO RICARDO LEON ACOSTA GARCIA

**TESIS PRESENTADA A LA
FACULTAD DE MEDICINA
DE LA
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA
LA OBTENCION DEL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MORFOLOGIA**

MONTERREY, N. L.

AGOSTO DE 1995

TM

QP98

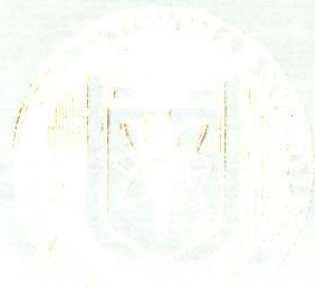
.K37

A2

C.1



1080071655



EPECIO...
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
ESTADOS UNIDOS MEXICANOS
CARRERAS DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS
CARRERA DE INGENIERÍA EN QUÍMICA

FOR

INGENIERO RICARDO LEÓN AGOSTA GARCÍA

TESIS PRESENTADA A LA
FACULTAD DE MEDICINA

DE LA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

COMO REQUISITO PARCIAL PARA
LA OBTENCION DEL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MORFOLOGÍA

MONTERREY, N. L.

AGOSTO DE 1988



TM
QR 981
. KB7
A2



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA

EFFECTO DE LA T-514 DEL GENERO Karwinskia SOBRE LA
ULTRAESTRUCTURA DE LOS TUBULOS CONTORNEADOS PROXIMALES
DEL RIÑON in vitro

TESIS

QUE EN OPCION AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN MORFOLOGIA

PRESENTA

BIOLOGO RICARDO LEON ACOSTA GARCIA.

COMISION DE TESIS INTEGRADA POR:

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

M.C.P. y Dr. med. LOURDES GARZA OCAÑAS

M.C.P. y Dr. med. GUADALUPE ARREDONDO DE ARREOLA

Biól. M. C. y Dr. C. JUAN MANUEL SOLIS SOTO

Q.B.P. y Dr. C. HERMINIA MARTINEZ RODRIGUEZ

Monterrey, N.L. Agosto de 1995.

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

ASESOR

M.C.P. y Dr. med. LOURDES GARZA OCAÑAS

COASESOR

ESTE TRABAJO SE DESARROLLO EN EL DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

DEL CENTRO MEDICO Y DE CIENCIAS DE LA SALUD DE LA

UNIVERSIDAD DE TEXAS EN SAN ANTONIO, TEXAS, E.U.A.

Y EN EL LABORATORIO DE MICROSCOPIA ELECTRONICA

DEL DEPARTAMENTO DE HISTOLOGIA DE

LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA U.A.N.L

AGRADECIMIENTOS

Quiero manifestar mi profunda gratitud a mi asesor el Dr. Julio Sepúlveda Saavedra por su invaluable guía, sus valiosos consejos, y sus precisas observaciones, además de su paciencia para conmigo y su sólido apoyo durante el desarrollo de este trabajo y de la maestría en general, que me han conducido a ampliar y mejorar mis horizontes y perspectivas como investigador científico.

Agradezco también a la Dra. Lourdes Garza Ocañas por sus siempre amable y oportuna contribución al mejoramiento de este trabajo.

Manifiesto mi agradecimiento al Dr. Juan Manuel Solís Soto por sus agudas y acertadas observaciones al presente trabajo.

Agradezco a la Dra. Guadalupe Arredondo de Arreola y a la Dra. Herminia Martínez Rodríguez, de la Comisión de Tesis por las inapreciables aportaciones y correcciones hechas al trabajo.

Deseo agradecer sinceramente al Dr. Ricardo Garza Quintero por su preciosa ayuda, colaboración y enseñanzas para el aislamiento de los túbulos contorneados proximales y la aplicación de los tratamientos durante la parte experimental de este trabajo.

Agradezco al Lic. Roberto Mercado de la Facultad de Ciencias Biológicas por su ayuda en el análisis estadístico de los resultados de este trabajo.

Agradezco en lo que vale la ayuda técnica brindada por Víctor Juárez Morín en todo el aspecto fotográfico.

INDICE

CAPITULO	PAGINA
PORTADA	I
COMISION DE TESIS	II
ASESORES E INSTITUCIONES	III
AGRADECIMIENTOS	IV
INDICE	V
INTRODUCCION	1
Hipotesis	3
Objetivos	4
MATERIAL Y METODO	4
Obtención de los túbulos contorneados proximales	4
Exposición de los túbulos contorneados proximales a los tratamientos	5
Procesamiento para microscopía electrónica de transmisión	6
Medición de la actividad de la deshidrogenasa láctica	7
Evaluación estadística	7
RESULTADOS	9
Análisis morfológico	9
Análisis morfométrico	12
DISCUSION	14
CONCLUSIONES	19
RESUMEN	20
REFERENCIAS	38
APENDICE	42

INTRODUCCION

El fruto de las plantas del género Karwinskia produce envenenamiento en los animales que lo ingieren, llegando en muchos casos a ocasionarles la muerte. Las especies animales productivas sufren con frecuencia intoxicación, representando pérdidas económicas. Las especies más afectadas son vacas, cabras, conejos, pollos y borregos, (1). Así mismo existen reportes clínicos de personas intoxicadas por ingerir el fruto de esta planta, (2).

Generalmente la intoxicación es accidental, produciéndose de 2 a 4 semanas después de la ingestión, una polineuropatía progresiva caracterizada por parálisis asimétrica ascendente que en los casos más graves puede causar la muerte por parálisis bulbar, (2). Bermúdez y cols. mencionan que varios autores han reportado que tanto en humanos como en animales, el consumo de grandes cantidades del fruto produce la muerte en un lapso de 24 a 48 horas, sin la aparición de síntomas neurológicos, (2). Bermúdez y cols., (3) trabajando con perros, hámsters, cobayos y ratas a las que dió a consumir el fruto de la planta Karwinskia humboldtiana observaron que a excepción del perro, los animales tratados morían sin signos de daño neurológico; en las autopsias realizadas a estos animales encontró lesiones severas en hígado, pulmón y riñón, que explicarían la causa de muerte como un efecto directo y temprano sobre éstos órganos, comprobándolo al no encontrar lesiones en el sistema nervioso periférico.

Dreyer y cols. obtuvieron 4 toxinas de tipo antracénónico de las semillas de la Karwinskia humboldtiana, denominándolas según su peso molecular, como: T-496, T-514, T-516 y T-544. Además, Waksman y cols. (4), aislaron un isómero de la T-514 a partir de Karwinskia parvifolia, otro T-iso-514 de Karwinskia humboldtiana y un T-510 de Karwinskia affin humboldtiana.

De los diferentes efectos en los organismos intoxicados, la T-514 provoca lesiones en hígado, pulmón y riñón. En hígado las lesiones han sido descritas como necrosis centrilobulillar, esteatosis y extensa congestión venovascular intersticial severa, sin que se presentara daño neurológico periférico, (3).

A nivel subcelular, Tamez y cols. (5), reportan en el riñón lesiones como glomérulos congestionados y células de los túbulos contorneados proximales (TCP) con vacuolas de grasa y lesión subnuclear. También se han observado con microscopía de luz, acúmulos de grasa demostrados mediante la técnica del Rojo Oleoso, y necrosis selectiva importante en TCP de riñón de ratas tratadas con la T-514 in vivo (6).

En estudios realizados con TCP (7), se ha observado con microscopía electrónica de transmisión, ruptura en la membrana celular y microvellosidades, alteración de la forma y el tamaño mitocondrial, con destrucción de las crestas y extracción de la matriz de este organelo, en TCP de riñón de ratas que recibieron in vivo la T-514 por vía intraperitoneal.

Garza-Ocañas y cols. (8), reportan daño inducido en células epiteliales de TCP incubadas con la T-514, consistente en citólisis dosis-dependiente, indicada por la liberación de la enzima Deshidrogenasa Láctica al medio; reporta además hasta un 60 % de reducción en la actividad mitocondrial.

En base a estos antecedentes de lesión renal inducida por esta toxina aplicada in vivo é in vitro, particularmente sobre el túbulo, se considera que los efectos de ésta pueden ser estudiados en forma más directa y rápida en sistemas como los TCP aislados, (9).

El epitelio de los TCP esta constituido por células que tienen microvellosidades en su superficie apical, numerosas mitocondrias y abundantes peroxisomas (10); estas características las distinguen de las células del resto de las estructuras renales, y son especializaciones que les capacitan para la realización de funciones como la reabsorción de del filtrado glomerular: glucosa, aminoácidos y sales de fosfato, potasio y cloro, así como para el metabolismo de peróxido de hidrógeno.

Por esta alta actividad metabólica, estas células tienen grandes requerimientos de oxígeno, siendo por lo tanto particularmente susceptibles al daño por hipoxia (12), y por agentes bloqueadores de la producción de energía mitocondrial, como por ejemplo: rotenona, antimicina, cianuro y ouabaína, (13). Contra esta lesión tubular se ha reportado un efecto citoprotector de algunos aminoácidos como la glicina, alanina, cisteína, glutamato, y del glutatión, aplicados in vitro (14).

Las técnicas de preparación in vitro de TCP aislados y la acción protectora de la glicina, constituyen en conjunto, un modelo útil en el estudio del mecanismo de lesión inducida por la T-514, sobre el riñón. En estas preparaciones, los TCP conservan su organización histológica tridimensional, en la que se mantiene la relación y comunicación entre las células epiteliales, y entre éstas y su membrana basal, por lo que representan un modelo experimental intermedio, entre las técnicas de cultivo de células, donde éstas se encuentran separadas unas de otras sin conservar su membrana basal, y los modelos animales en los que la aplicación in vivo tiene sus desventajas inherentes. En base a los antecedentes mencionados proponemos la hipótesis de que la toxina 514 del género Karwinskia provoca daño directo en el epitelio de los túbulos contorneados proximales, que se puede demostrar a nivel ultraestructural en un modelo in vitro. Los objetivos planteados para la comprobación de la hipótesis son:

- 1.- Observar con microscopía electrónica de transmisión, los cambios morfológicos en los túbulos contorneados proximales aislados incubados con T-514 por diferentes tiempos y concentraciones.**
- 2.- Determinar el efecto citoprotector de la glicina en preparaciones tratadas con T-514 por los mismos tiempos y concentraciones.**
- 3.- Determinar el daño a las células epiteliales evaluando la integridad de la membrana celular y la estructura mitocondrial.**
- 4.- Analizar estadísticamente los resultados comparando los grupos tratado y control**

MATERIAL Y METODO

Obtención de los Túbulos Contorneados Proximales:

Como material biológico se utilizaron conejos blancos Nueva Zelanda adultos, de 2 a 2.5 Kgs de peso, proporcionados por el bioterio del Departamento de Patología del Centro de Ciencias de la Salud de la Universidad de Texas.

Se les aplicó por vía intramuscular una dosis de 3.5 ml. de una mezcla de anestésicos formada de Xilazina (Rompum, Haber Mobey Corp.), Ketamina (Vetalar, Parke-Davis Veterinary), y Acepromacina (Promace, Aveco Company).

Se abrió la cavidad abdominal del conejo en la línea media, se retiraron los riñones y se hemisectaron sagitalmente con una navaja de un filo. Se retiró la cápsula y se colectó la corteza con tijeras finas. Después ésta se picó finamente y se trató con colagenasa disuelta en solución "high" Krebs. Se incubó en un agitador rotador con baño maría a 37^o C., por 4-5 min. a 200 r.p.m., y posteriormente a 120 r.p.m. durante 30 min., momento en el que se

detuvo la acción de la colagenasa añadiendo solución "low" Krebs. La muestra se centrifugó 2 veces a 450 r.p.m. por 3 min. cada una, y posteriormente se centrifugó en Percoll al 48 % disuelto en solución "low" Krebs durante 35 min. a 17,500 r.p.m., en una ultracentrífuga refrigerada Beckmann J2-21, con rotor de ángulo fijo, para obtener un gradiente de densidad, del cual se retiró la fracción correspondiente a los TCP y se descartaron las fracciones que contenían el resto de las estructuras renales. La fracción se sometió de nuevo a centrifugación repetida dos veces por 3 min., a 450 r.p.m.

Exposición de los TCP a los tratamientos:

Las muestras enriquecidas de TCP (Fig.1), se incubaron en un agitador rotador a 120 r.p.m. durante 30 min. a 37° C. Se tomaron alícuotas de 5 ml. y en éstas se aplicó el tratamiento respectivo: en las alícuotas que recibieron el agente tóxico, se agregaron 50 microlitros de T-514 en una concentración de 15.5 mM., durante los siguientes tiempos: 15 y 30 min. En los tratamientos donde se utilizó glicina como protector, se añadieron 50 microlitros de ésta inmediatamente antes de la toxina, en una concentración de 2 mM, y se dejaron en incubación por los mismos tiempos mencionados para la toxina. Se tomaron alícuotas iguales al inicio del experimento como tiempo cero y un control sin tratamiento a los 30 minutos.

Los tratamientos considerados fueron en total 6:

Tratamiento	Abreviatura
1.- tiempo cero	To
2.- 15' con T-514 sin glicina.	15' T-514 S/G
3.- 15' con T-514 con glicina.	15' T-514 C/G
4.- 30' con T-514 sin glicina.	30' T-514 S/G
5.- 30' con T-514 con glicina.	30' T-514 C/G
6.- tiempo control de 30'	Control 30'

Al final de los tiempos determinados de exposición, se tomaron 2 alícuotas de 50 microlitros con TCP de cada tratamiento. Una de ellas se destinó para su procesamiento para microscopía electrónica de transmisión, y la segunda para la medición de la actividad de la enzima deshidrogenasa láctica libre en el medio.

Procesamiento para microscopía electrónica de transmisión.

Técnica de inclusión en resinas epóxicas (19):

-Fijación de las muestras en Glutaraldehído al 2.5 % en buffer de cacodilatos durante 1 hora a 4^o C.

-Post-fijación en Tetraóxido de Osmio al 1 %.

-Deshidratación por inmersión en alcoholes de diferentes porcentajes de concentración en incremento gradual: 60, 70, 80, 90, 100 y 100, durante 5' c/u.

-Preinclusión en óxido de propileno-resina epóxica en proporción 3:1, 1:1, 0:3 durante 2, 2 y 12 horas respectivamente, a temperatura ambiente.

-Inclusión en resinas epóxicas y polimerización a 60^o C durante 12 horas.

Se obtuvieron 3 bloques de cada tratamiento, en los que posteriormente se realizaron cortes finos, que se montaron en rejillas. Después se llevó a cabo un análisis morfológico ultraestructural y morfométrico semiautomatizado de las células de los TCP en el sistema computarizado Morphon, para lo que se imprimieron en papel las imágenes de ultraestructura de 5 campos seleccionados al azar de cada rejilla (20): obtenidas del microscopio electrónico de transmisión EM-109 a un aumento de 4,400 X, evaluándose el daño citoplásmico membranaral y de microvellosidades, y lesiones mitocondriales en crestas y matriz (Figura 2).

Esta parte del procedimiento morfométrico de la ultraestructura de las células de los TCP, incluyó la captación de las imágenes mediante una cámara de video que las transmitió a una computadora alimentada con el programa Morphon, en ésta se grabaron y se almacenaron en la memoria, de donde fueron rescatadas posteriormente, para llevarse a un monitor, en el que se proyectaron para las determinaciones de mitocondrias totales por campo presentes en los diferentes tratamientos aplicados, el conteo de mitocondrias agrupadas en 3 tipos: electrodensas, intermedias y claras, según su electrodensidad, y la medición del diámetro transversal menor expresado en micras de los diversos planos de sección que presentaron dichos organelos: transversal, longitudinal u oblicuo, conteo de figuras mitocondriales en semilunas y conteo de autofagosomas conteniendo mitocondrias (Figura 2).

Medición de la actividad de la deshidrogenasa láctica libre:

En la segunda alícuota de cada tratamiento se midió fluorométricamente el porcentaje de la actividad de la enzima deshidrogenasa láctica liberada al medio como un indicador de daño a la célula. Esta enzima cataliza la conversión de piruvato a lactato con la oxidación de NADH a NAD, donde el piruvato es el substrato y el NADH es el cofactor.

Evaluación Estadística:

Los datos obtenidos de las mediciones realizadas durante el análisis morfométrico fueron sometidos a procedimientos estadísticos descriptivos para la determinación de la media, desviación estándar, error estándar de la media, rango, mínimo y máximo; además se aplicaron otros métodos, como el análisis de varianza por la prueba múltiple de medias de Scheffé, y la "t" de Student para muestras pareadas como sigue (21):

–Conteo mitocondrial.–

Se comparó el valor de la media del número de mitocondrias totales de cada tratamiento, en un análisis de varianza por la prueba múltiple de medias de Scheffé.

Se comparó el valor de la media del número de mitocondrias de los tres tipos mencionados dentro de cada tratamiento por la prueba "t" de Student para muestras pareadas.

M. claras VS M. intermedias

M. claras VS M. oscuras

M. intermedias VS M. oscuras

Se comparó el valor de la media del número de mitocondrias claras, intermedias y oscuras en los diferentes tratamientos en un análisis de varianza por la prueba múltiple de medias de Scheffé,

–Diámetro mitocondrial

Se comparó el valor de la media del diámetro de las mitocondrias totales, así como de las claras, intermedias y oscuras, cada tratamiento en un análisis de varianza por la prueba múltiple de medias de Scheffé,

Se comparó el valor de la media del diámetro de los tres tipos mencionados de mitocondrias en cada tratamiento por la prueba de "t" de Student para muestras pareadas:

M. claras VS M. intermedias

M. claras VS M. oscuras

M. intermedias VS M. oscuras

RESULTADOS

Análisis Morfológico:

Tiempo cero

La observación con microscopía electrónica de transmisión mostró la ultraestructura de los TCP del tiempo cero con la morfología típica, (Figura 4), de los túbulos normales: citoplasma conservado, microvellosidades largas, y membranas sin alteración. Se observó el núcleo con heterocromatina localizada en acúmulos electrodensos por la parte interna de la envoltura nuclear y la eucromatina dispersa por todo el interior del núcleo presentando el nucléolo con su morfología característica. Se observó claramente la polaridad morfológica celular, como se mostró en las células normales. En el citoplasma basal celular, por debajo del núcleo y localizadas entre largos plegamientos de la porción basal de la membrana celular se encontraron abundantes mitocondrias en las que se apreció su forma y estructura interna característica, con las membranas externa e interna íntegras, esta última con sus crestas típicas rodeadas de matriz uniformemente conservada. Además, se encontraron peroxisomas con una placa marginal electrodensa en estrecha relación con la membrana de este organelo; así mismo, se observaron organelos como retículo endoplásmico rugoso y liso, complejo de Golgi y vesículas endocíticas de aspecto normal. La membrana celular apical mostró microvellosidades largas en toda su superficie.

Durante la revisión de las muestras de este tiempo se observaron mitocondrias de formas muy variables, presentándose algunas imágenes circulares, otras ovaladas, alargadas y aún bifurcadas, según su disposición al plano del corte.

En éste y en todos los tratamientos se observaron mitocondrias con menor o mayor grado de electrodensidad de la matriz, que se clasificaron de acuerdo a ésta en 3 tipos:

- a)- electrodensas,
- b)- intermedias y
- c)- claras, (Fig. 3).

Se determinaron la cantidad total de mitocondrias por tratamiento y la cantidad de cada uno de los tipos mencionados; así mismo se midió el diámetro de las mitocondrias tanto consideradas en conjunto como separadas en los tres tipos, siendo estos datos registrados y analizados mediante la prueba de "t" de Student y un análisis de varianza por la prueba múltiple de medias de Scheffé, según se describió en material y métodos, para evaluar los diferentes tratamientos y tiempos aplicados a los TCP. Los datos se presentan como valores promedio en las tablas a, b, y c de los resultados del análisis morfométrico.

T-514, 15' sin glicina

En las células del epitelio de los TCP de este tratamiento, se presentó la polaridad celular como se observó en las muestras del tiempo cero; en las imágenes de ultraestructura de estas células se observó el núcleo de localización basal con estructura normal; mitocondrias de ubicación basal principalmente, con estructura similar a la descrita para el tiempo cero en cuanto a forma y tamaño; se observó la presentación de los 3 tipos mitocondriales según su electrodensidad descritos anteriormente; en la parte apical de la célula se presentaron numerosas vesículas endocíticas de diversos tamaños; la membrana celular se encontró completa en la superficie apical, presentando microvellosidades sin alteraciones, (Fig 5).

T-514, 30' sin glicina

El efecto de la toxina observado en estas muestras fué más marcado que en el tratamiento anterior; la ultraestructura celular se vió alterada en general, perdiéndose en las células más afectadas su polaridad; el núcleo se apreció más electrodenso y deformado en su superficie. El daño citoplásmico, con vesiculación y extracción del contenido celular

debido a rupturas de la membrana celular apical. En la superficie apical se observó la alteración y desprendimiento de las microvellosidades en algunos segmentos de la membrana. Más evidentemente se manifestó el daño en las mitocondrias. Estos organelos presentaban alteración en su forma, tamaño y estructura normal. La forma circular fué la presentación predominante en este tratamiento, acompañada de aumento en el diámetro. Además en las mitocondrias alteradas en su forma y volumen, se observó la pérdida de la matriz en diversos grados, advirtiéndose ésto por la variable electrodensidad en el interior mitocondrial y por la fragmentación, y ruptura de las membranas interna y externa de este organelo, (Figura 6).

En este tratamiento, se observaron casos interesantes de mitocondrias con pérdida de electrodensidad por la pérdida de su matriz, rodeadas individualmente de manera parcial, por una mitocondria más electrodensa con forma de semiluna. En otros casos, las mitocondrias presentaban un tabique membranal medio, que las cruzaba totalmente de un lado a otro, estando en relación con la membrana interna. También se reconoció la presencia de numerosos autofagosomas con restos de mitocondrias en su interior.

T-514, 15' con glicina.

El aspecto celular en las muestras que recibieron la toxina y glicina durante este tiempo, fué muy similar al de las muestras del tiempo cero.

Aquí se conservó la polaridad en la estructura celular; el núcleo se encontró íntegro y de características típicas, con localización principalmente basal; el citoplasma estuvo bien conservado. Las mitocondrias de ubicación basal conservaron su estructura normal en forma y tamaño, siendo posible identificar también los 3 tipos de electrodensidad ya mencionados. En la porción apical de la célula se pudieron ver vesículas endocíticas abundantes. La membrana de la superficie apical mostró microvellosidades íntegras normales, (Figura 7).

T-514, 30' con glicina

La ultraestructura de estas células fué muy similar a las del tiempo cero; se conservó la polaridad celular, con la distribución ya conocida de los organelos, que presentaron la morfología típica, principalmente el núcleo y las mitocondrias. Tampoco se advirtió extracción del citoplasma, o alteración de las microvellosidades en la superficie apical de la membrana de la célula, (Figura 8).

Control 30'

Aquí se presentó el aspecto normal del epitelio de los TCP, como se vió en las muestras del tiempo cero y en las que recibieron glicina. Se observaron la mitocondrias normales ubicadas en la porción basal del citoplasma que se vió homogéneamente electrodenso, sin señales de extracción. Núcleo sin lesión aparente, superficie apical de la membrana celular continua, provista de microvellosidades completas sin daño, (Figura 9)

En la Figura 10 se muestra un resumen del aspecto observado de las mitocondrias en los diferentes tratamientos.

Análisis Morfométrico

Los datos de las determinaciones morfométricas de cada tiempo y tratamiento se dan a continuación, e incluyen:

a) El conteo de mitocondrias totales (sin separarlas en los 3 grados de electrodensidad), por campo. El promedio del total de mitocondrias por tratamiento se muestra en la tabla I y en la gráfica I, en donde se observa que existe diferencia significativa entre el tiempo cero y el tratado con T-514 por 30' S/G, presentando este último una cantidad menor de mitocondrias.

b) El conteo de mitocondrias de los 3 tipos en cada tratamiento. Los promedios de estos valores se muestran en la tabla II y en la gráfica II donde se señalan los casos en que existió diferencia significativa, por la presencia de mayor cantidad de mitocondrias claras en los grupos tratados con toxina 514 durante 30 minutos sin glicina.

c) La medición del diámetro mitocondrial consideradas en conjunto, por tratamiento. Los valores promedio en micras se presentan en la tabla III y la gráfica III, señalándose los casos donde existió diferencia significativa, debida al mayor diámetro de las mitocondrias de los grupos tratados con la toxina 514 por 30 minutos sin glicina.

d) La medición del diámetro de las mitocondrias separadas en los tres tipos. Esto se muestra en la tabla IV y en la gráfica IV, donde se observa un mayor diámetro en las mitocondrias claras estadísticamente significativa.

e) La cantidad de mitocondrias rodeadas de semilunas electrodensas. Esto se muestra en la tabla V y en la gráfica V, siendo significativamente mayor en los grupos tratados con toxina 514 por 30 minutos sin glicina.

f) La presencia de autofagosomas conteniendo mitocondrias. Esto se da en la tabla VI y en la gráfica VI, presentándose mayor cantidad en los tratados con toxina durante 30 minutos sin glicina.

Los datos se expresan en todos los casos como valores promedio con las desviaciones estándar respectivas de cada tratamiento; se incluyen los resultados de un análisis de varianza por la prueba múltiple de medias de Scheffé con un nivel de significancia de 0.05, y de la prueba de "t" de Student para muestras pareadas.

Liberacion de deshidrogenasa láctica

Los datos de las mediciones del porcentaje de la actividad de la deshidrogenasa láctica como índice de liberación al medio, se muestran en la gráfica VII y demuestran ser significativamente mayores en las muestras tratadas con la toxina 514 durante 30 minutos sin glicina.

DISCUSION

En algunos de los estudios realizados in vivo aplicando la toxina T-514 en varias especies de animales, se ha reportado con microscopía de luz y electrónica de transmisión, daño renal, principalmente a nivel de los túbulos contorneados proximales (TCP), estableciendo al riñón como un órgano blanco de la toxina (2, 3, 5, 6). Sin embargo, dada la compleja estructura renal y las interacciones entre los diversos eventos que ocurren en este órgano, (11, 12), se dificulta la distinción más fina de los sitios y mecanismos de lesión observada. En este aspecto, los estudios in vitro tienen la ventaja de permitir la aplicación directa y controlada de tratamientos elegidos a muestras de tejidos o células de interés, obtenidas de organismos adecuados (12).

Se ha evaluado la T-514 en monocapas de células de TCP de riñón, con dichas ventajas (8). Otra técnica es el aislamiento de TCP, que se ha utilizado para la aplicación in vitro de diversos agentes citotóxicos bloqueadores de la producción de energía mitocondrial (9, 12, 13, 14); así mismo, en este trabajo se llevó a cabo la exposición de TCP a la toxina T-514 en muestras libres de otras estructuras renales, obtenidas en suficiente cantidad y pureza siguiendo este modelo. Esto constituye una contribución importante a los estudios de nefrotoxicidad inducida por la T-514, ya que es un abordaje que proporciona información de la respuesta de células que conservan su comunicación entre sí y su membrana basal, y representa un modelo experimental intermedio entre las técnicas de cultivo donde las células se encuentran separadas unas de otras y no conservan su membrana basal, y los modelos animales que tienen las desventajas ya mencionadas.

En el análisis morfológico realizado durante este estudio se mostró la lesión inducida por la T-514 sobre la ultraestructura de los TCP, en base a la conocida estructura normal de esta porción renal (10), y a la conservación de la integridad de las muestras del tiempo cero y del tiempo control de 30 min. que no recibieron la toxina. Estas observaciones in vitro reproducen los reportes de daño inducido sobre los TCP de la aplicación in vivo de esta toxina (2, 3, 5, 6, 15). La lesión ultraestructural es más evidente a los 30 minutos de incubación, comparada con los demás tiempos, y es similar al daño citoplásmico y mitocondrial descrito en los reportes de aplicación de los agentes citotóxicos, (9, 12, 13, 14), donde se ha observado la alteración de la forma y el tamaño de la mitocondria, con extracción de la matriz y destrucción de las crestas de este organelo; ruptura de la membrana celular apical y salida del contenido citoplásmico al exterior de la célula.

En el estudio morfométrico las mediciones de diámetro realizadas en las mitocondrias de cada tiempo consideradas en conjunto, muestran valores más altos a los 30 minutos de exposición a la toxina, estadísticamente significativos de acuerdo a la prueba de Scheffé, con un nivel de significancia de 0.05, comparados con los demás tiempos, lo que se interpreta como un aumento de volumen acompañado, según se describió ya en los resultados del análisis morfológico, de extracción de la matriz de este organelo debido al efecto de la toxina. La comparación de las medias del diámetro de las mitocondrias separadas en los tres tipos (claras, intermedias y oscuras), muestra que las diferencias de diámetro, y por lo tanto de volumen, son significativas según la prueba de "t" de Student para muestras pareadas, lo que apoya la relación entre la pérdida de la electrodensidad y el aumento de volumen que es mayor en las muestras del grupo tratado con la toxina.

El conteo de mitocondrias totales por tiempo (sin separarse en los 3 tipos), muestra el valor más clara y significativamente bajo a los 30 min. de incubación con la toxina, lo que representa un dato más de un efecto de disminución del número de éstas.

El conteo de mitocondrias separadas en los 3 tipos, fué significativamente más bajo en las mitocondrias intermedias de los 30 min. de incubación con la toxina, comparado con el número de mitocondrias intermedias del resto de los tratamientos, si se considera que ésta es la forma normal, puede explicarse que hubo un efecto que provocó su disminución, (16).

Al comparar mediante la prueba de "t" de Student para muestras pareadas, el número de mitocondrias de los tres tipos en cada tratamiento se encontró diferencia estadística significativa en la mayoría de los casos, las excepciones fueron los tres casos mencionados de los grupos que recibieron la toxina sin añadir glicina, lo cual se explica porque estos tratamientos presentaron los valores más bajos de mitocondrias intermedias (mitocondrias normales).

Es bién conocido que el número de organelos por célula puede ser regulado de acuerdo a las necesidades; un gran incremento de las mitocondrias puede observarse si un músculo esquelético en reposo es estimulado repetidamente para contraerse por un tiempo prolongado (17). En circunstancias especiales, la división de los organelos es controlada con precisión por la célula. Las mitocondrias se originan por el crecimiento y división de mitocondrias ya existentes. Estudios de microscopía electrónica sugieren que la división de estos organelos se inicia con un plegamiento de la membrana interna, como ocurre en la división de muchas bacterias, implicando esto que se trata de un proceso controlado en lugar de una ruptura en dos al azar (18).

Otro de los puntos analizados con respecto a la destrucción de las mitocondrias dañadas fué la presencia de autofagosomas conteniendo restos de mitocondrias en su interior. El conteo de estos autofagosomas en cada uno de los tiempos mostró su presencia relativamente abundante en cantidades variables en todos ellos, advirtiéndose sin embargo, que a los 30 minutos de incubación con la toxina se observaron además, en un número

significativamente más alto comparado con los demás tratamientos, mitocondrias alteradas rodeadas de semilunas electrodensas, que pudieran considerarse mitocondrias en división como una tendencia de la célula al mantenimiento de su integridad y función, aunque dicha recuperación no fué evaluada en este trabajo.

Las observaciones a nivel ultraestructural ya descritas concuerdan con los datos obtenidos durante el análisis morfométrico de las muestras, estableciendo la existencia y grado de lesión celular por la T-514.

Aunado a los estudios anteriores, la determinación del grado de lesión membranal por la medición de la DHL liberada al medio, apoyó la interpretación de daño a los 30 min. de incubación. En este tiempo los valores fueron más altos, en comparación a los demás tiempos.

El efecto protector de la glicina contra los agentes bloqueadores de la función mitocondrial, se manifestó contra la T-514 según la conservación observada en la ultraestructura celular y mitocondrial de los TCP incubados por 15 y 30 min. con toxina, donde se añadió este aminoácido; en este tratamiento, el aspecto de las muestras fué como el de los tiempos cero y control de 30 min. Existió una gran diferencia en el daño de las muestras tratadas con toxina solamente y las que recibieron la toxina y glicina.

La diferencia más marcada se presentó a los 30 min. de incubación.

El análisis morfométrico mostró cantidades significativamente mayores de mitocondrias totales en las muestras de 30 min. que recibieron toxina y glicina, que en las que solo recibieron la T-514.

En cuanto a los promedios de mitocondrias separadas en 3 tipos, los valores encontrados fueron más altos en el tipo de mitocondrias intermedias en los tratamientos: T0, 15 y 30 min. de incubación con toxina y glicina, y control de 30 min., lo que indica una predominancia de las formas normales, a diferencia de las muestras que recibieron solo toxina por 30', que presentaron los valores significativamente más bajos.

La medición del diámetro de las mitocondrias de las muestras dió valores más bajos en las que recibieron glicina que en las que solo se aplicó la toxina, y son semejantes a los datos encontrados para los tiempos cero y control.

Estos datos señalan una protección de la glicina hacia el daño celular, y en particular de la mitocondria, si se toma en cuenta que el aspecto claro de estos organelos se debe a la extracción de su matriz debido al daño, y que el mayor diámetro indica aumento de volumen, también como resultado del daño. Otro dato en apoyo a estas observaciones lo representan los valores de la medición de la DHL libre en el medio, que indican una menor citólisis, ya que son más bajos en las muestras con toxina y glicina que en las que recibieron solo toxina.

El conteo de autofagosomas en estas muestras dió una cantidad muy semejante a las obtenidas para los demás tratamientos, incluyendo los tiempos cero y control, como ya se mencionó. Aquí se presentaron formas de mitocondrias en semilunas en una cantidad significativamente menor que en el tiempo de 30 min. incubado con toxina solamente.

La similitud entre el efecto del bloqueo específico de la cadena respiratoria mediante agentes citotóxicos, (9, 12, 13, 14), y el efecto de la T-514 sobre la mitocondria y la célula en general, en el modelo de TCP aislados de riñón, indica un posible efecto directo de la toxina

sobre este organelo y apunta hacia un posible modo de acción parecido al de los agentes mencionados.

La conservación de la integridad celular de los TCP que recibieron glicina de acuerdo al análisis morfológico de las muestras, comparadas con las tratadas solo con toxina, señala un efecto protector de este aminoácido, como se ha reportado con algunos agentes citotóxicos (9, 12, 13, 14); El análisis morfométrico y estadístico de las medias de las muestras presenta valores de los grupos que recibieron glicina, sin diferencia significativa a los tiempos cero y control de 30 minutos, determinándose de acuerdo a la prueba de "t" de Student, que existió significancia en la diferencia entre los grupos de 30' que recibieron glicina y los que solo recibieron toxina durante ese tiempo.

CONCLUSIONES

La hipótesis planteada para este trabajo del efecto tóxico directo de la toxina T-514 en el modelo in vitro Túbulo Contorneado Proximal aislado de riñón, se confirmó de acuerdo a las observaciones morfológicas a ultraestructura, apoyadas en la caracterización morfométrica.

Se observó que el daño se localizó importantemente en las mitocondrias, las que mostraron cambios ultraestructurales relacionados con este efecto: aumento de volumen, pérdida de la matriz y destrucción por la vía autofágica lisosomal.

Además se observó presencia de división mitocondrial, interpretada como una respuesta proliferativa compensatoria.

Se demostró que el daño producido por la toxina 514 fué disminuído por la adición de glicina al medio de incubación, lo que sugiere una similitud entre el mecanismo de acción de los agentes que envenenan a la cadena respiratoria y la T-514.

RESUMEN

La T-514 del género Karwinskia afecta el hígado, pulmón y riñón de animales intoxicados experimentalmente. La aplicación de esta toxina a células de túbulo contorneado proximal (TCP) en cultivo, provocó daño celular y reducción de la actividad mitocondrial. La hipótesis del trabajo es que el daño inducido por la T-514 se podía demostrar a ultraestructura en TCP aislados del riñón. Los objetivos fueron: 1)- obtención de TCP aislados del riñón de conejo; 2)- aplicación de 50 microlitros de toxina 15.5 mM. durante 15' y 30' a TCP aislados; aplicación de 50 microlitros de glicina 2 mM. además de la toxina a otras alicuotas; se tomaron un tiempo cero y un control de 30'. 3)- evaluación a microscopía electrónica de transmisión (MET) del daño celular y mitocondrial. 4)- análisis estadístico. Los TCP se obtuvieron del riñón de conejos Nueva Zelanda por centrifugación en Percoll. De cada tratamiento se tomaron 2 alicuotas, una para MET y la otra para la medición de la actividad de la enzima deshidrogenasa láctica. Se prepararon 3 bloques de resinas, se montaron cortes finos en 3 rejillas y de cada una se tomaron 5 micrografías electrónicas a un aumento de 4,400 X, en las que se realizó un análisis morfológico y otro morfométrico. Se contaron las mitocondrias totales por tratamiento, el número de mitocondrias de 3 tipos de electrodensidad: claras (C), intermedias (I) y oscuras (O). Se midió el diámetro mitocondrial total por tratamiento, se midió el diámetro de las mitocondrias separadas en los 3 tipos (C, I, y O). Se realizó un análisis de varianza de Scheffé (0.05) y una "t" de Student para muestras pareadas (0.05). Los tiempos cero y control de 30' mostraron las características de los TCP normales. Las tratadas con la T-514 mostraron extracción de citoplasma, ruptura de membrana celular y pérdida de matriz mitocondrial con aumento de volumen de éstas. Las que recibieron glicina mostraron un aspecto similar al tiempo cero y control de 30'. Se confirmó la hipótesis del daño ultraestructural in vitro de la T-514 en el TCP aislado del riñón de conejo de acuerdo a la observación morfológica y a la caracterización morfométrica celular, principalmente en la mitocondria, presentándose división de este organelo como una respuesta proliferativa compensatoria. La glicina disminuyó el efecto de la T-514 lo que sugiere una similitud entre el daño por esta toxina y los agentes que envenenan la cadena respiratoria.

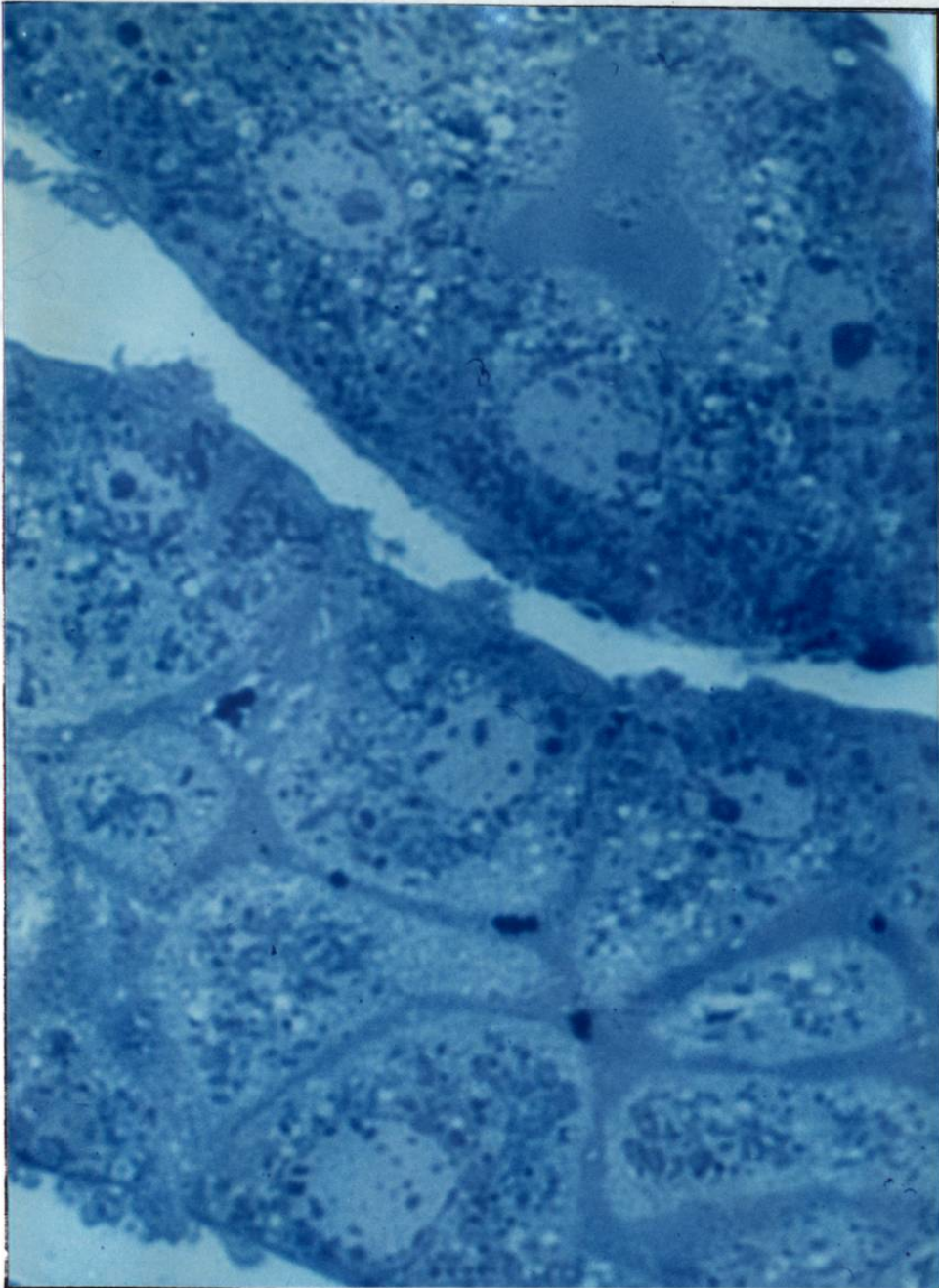


Fig. 1- Corte semifino de túbulo contorneado proximal de riñón de conejo obtenidos por centrifugación en Percoll, donde se puede apreciar la pureza de la muestra y la separación adecuada entre ellos y otras estructuras renales. Se conserva la organización tubular tridimensional y la integridad del epitelio.

Micrografía de luz de cortes teñidos con Azul de Toluidina.

Aumento= 125 X

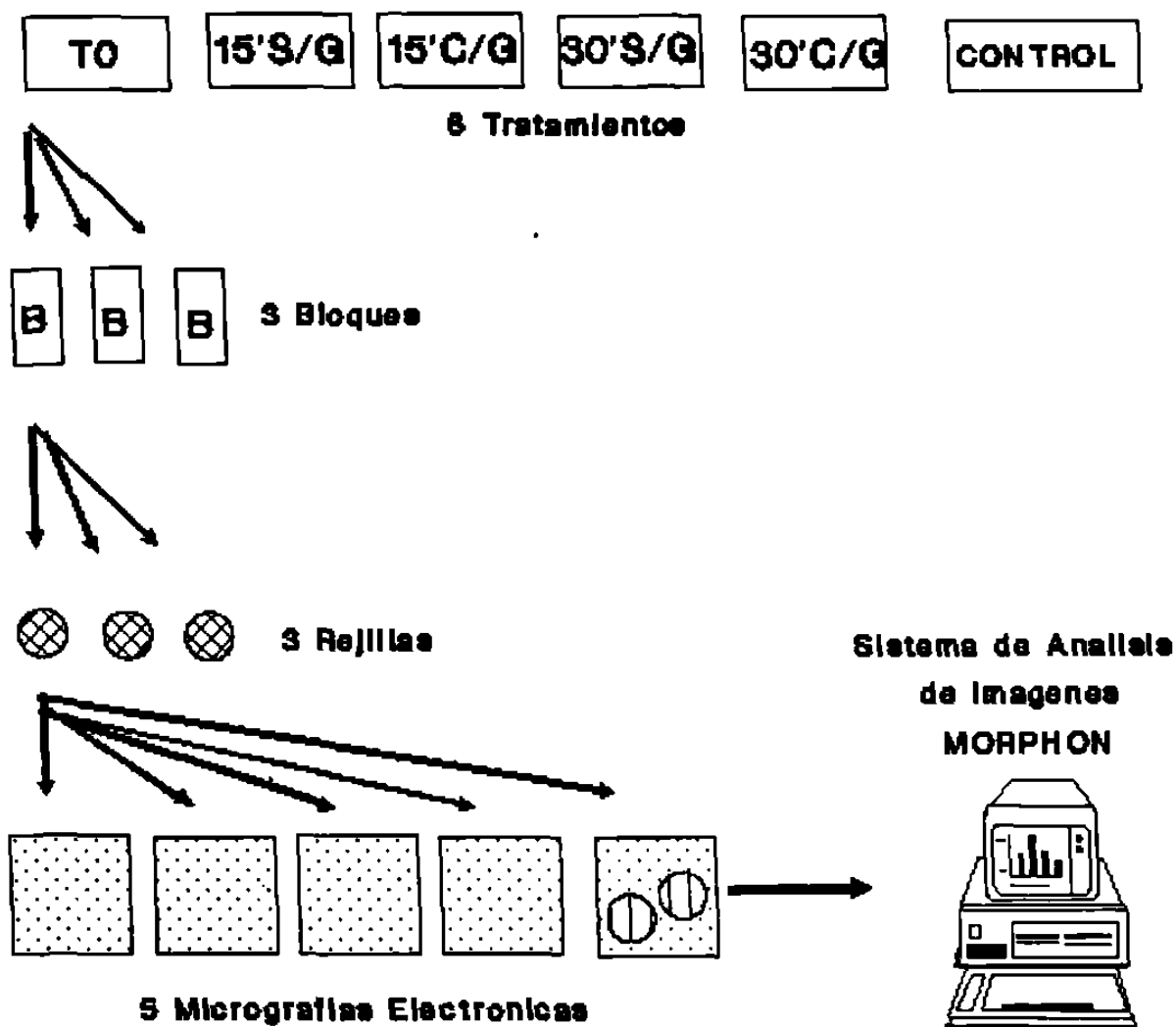


Figura No. 2: Procedimiento de muestreo utilizado durante la obtención del material grafico para los análisis morfológicos y morfométricos de los tubulos contorneados proximales.

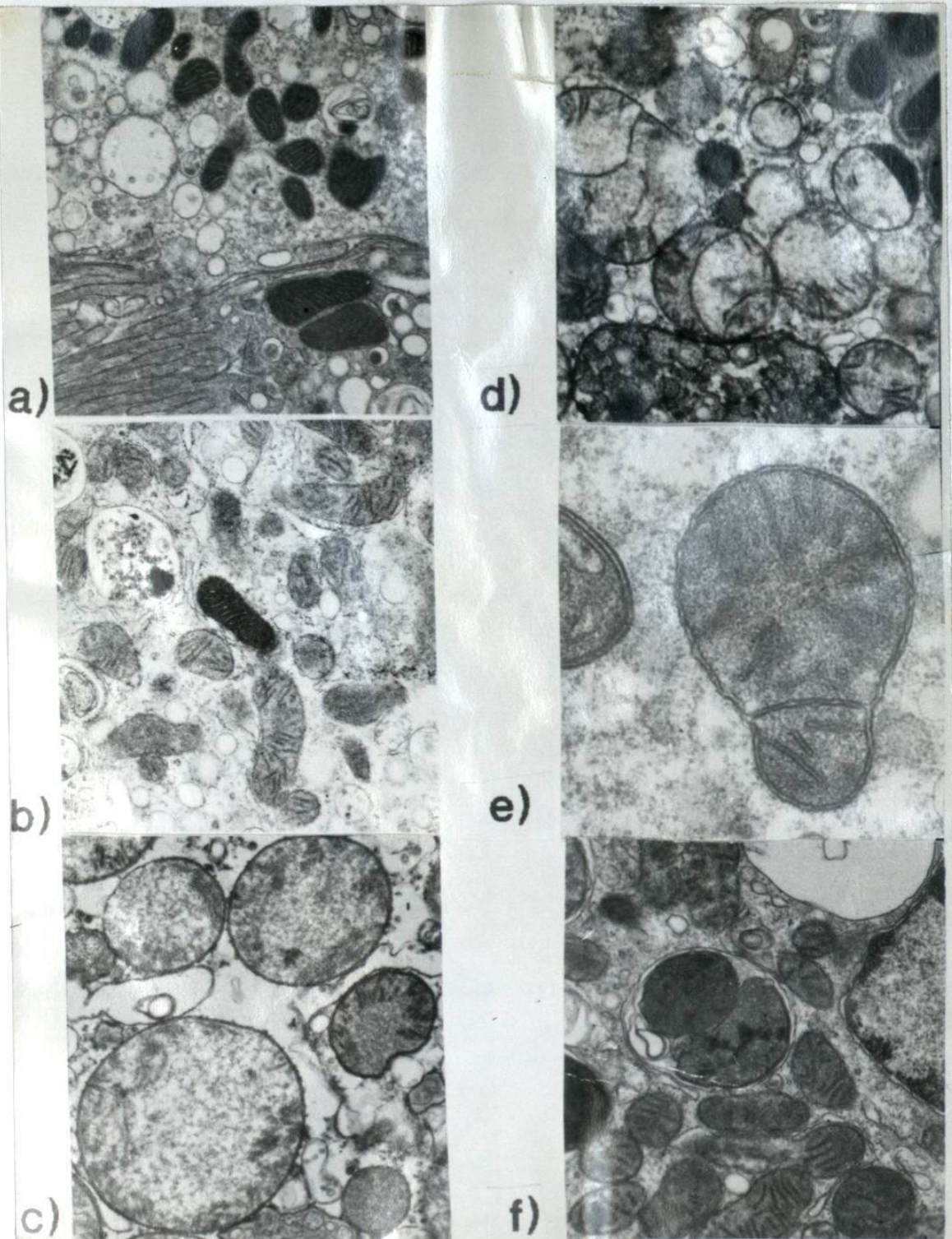


Fig. 3- Composición de microfografías electrónicas de transmisión que ilustran los tres tipos de electrodensidad mitocondrial observada y la alteración del diámetro normal.
 a)-oscuras, b)-intermedias, c) claras, d)-semilunas, e)-en división, f)-autofagosomas.
 Aumento= 4,400 X

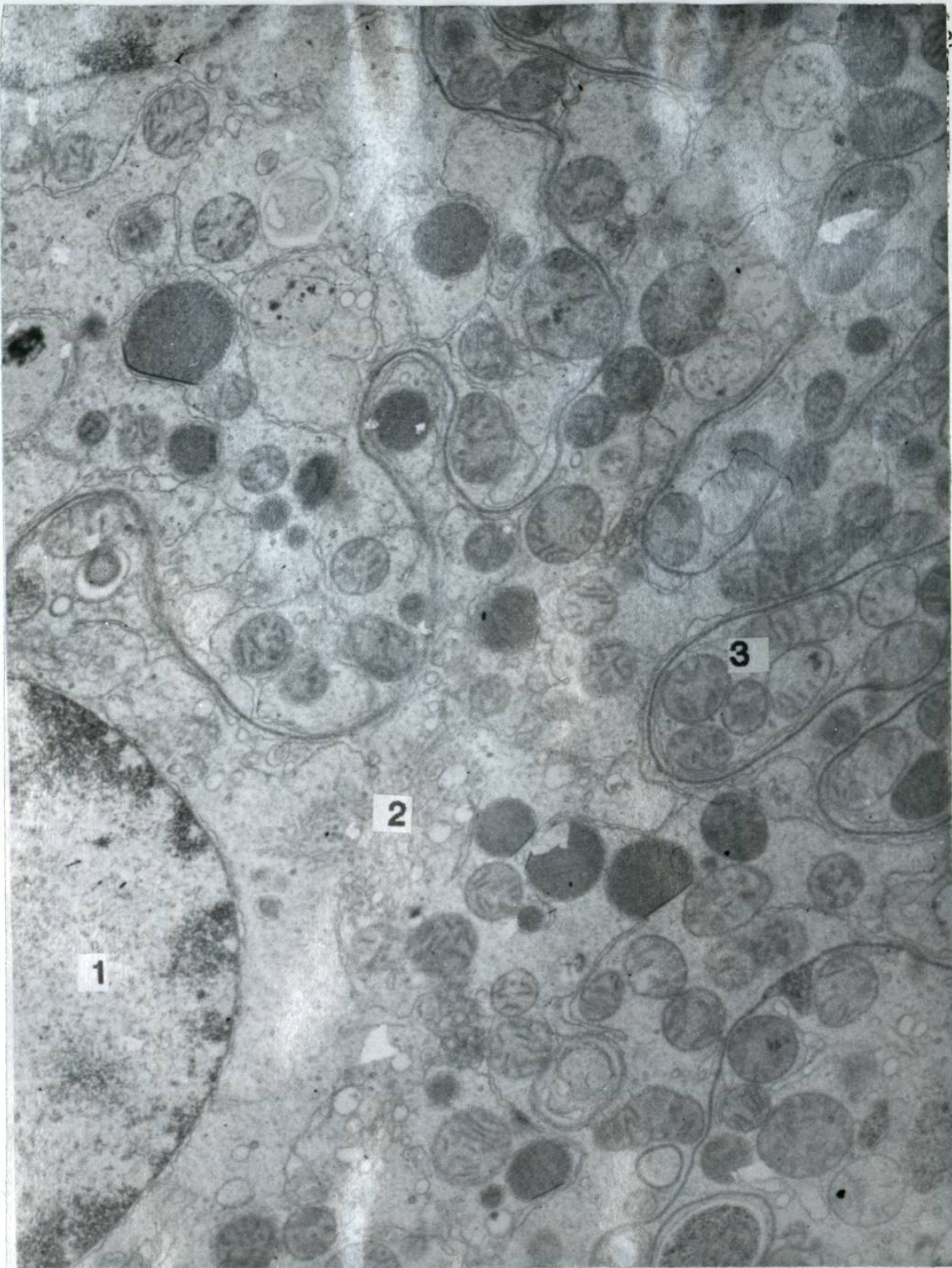


Fig. 4-Micrografía electrónica de TCP del tiempo cero con la estructura bien conservada del epitelio, con: 1)- núcleo redondeado, 2)- citoplasma conservado, 3)-mitocondrias con su forma y aspecto típicos

Aumento= 4,400 X.

Aumento= 4,400 X.

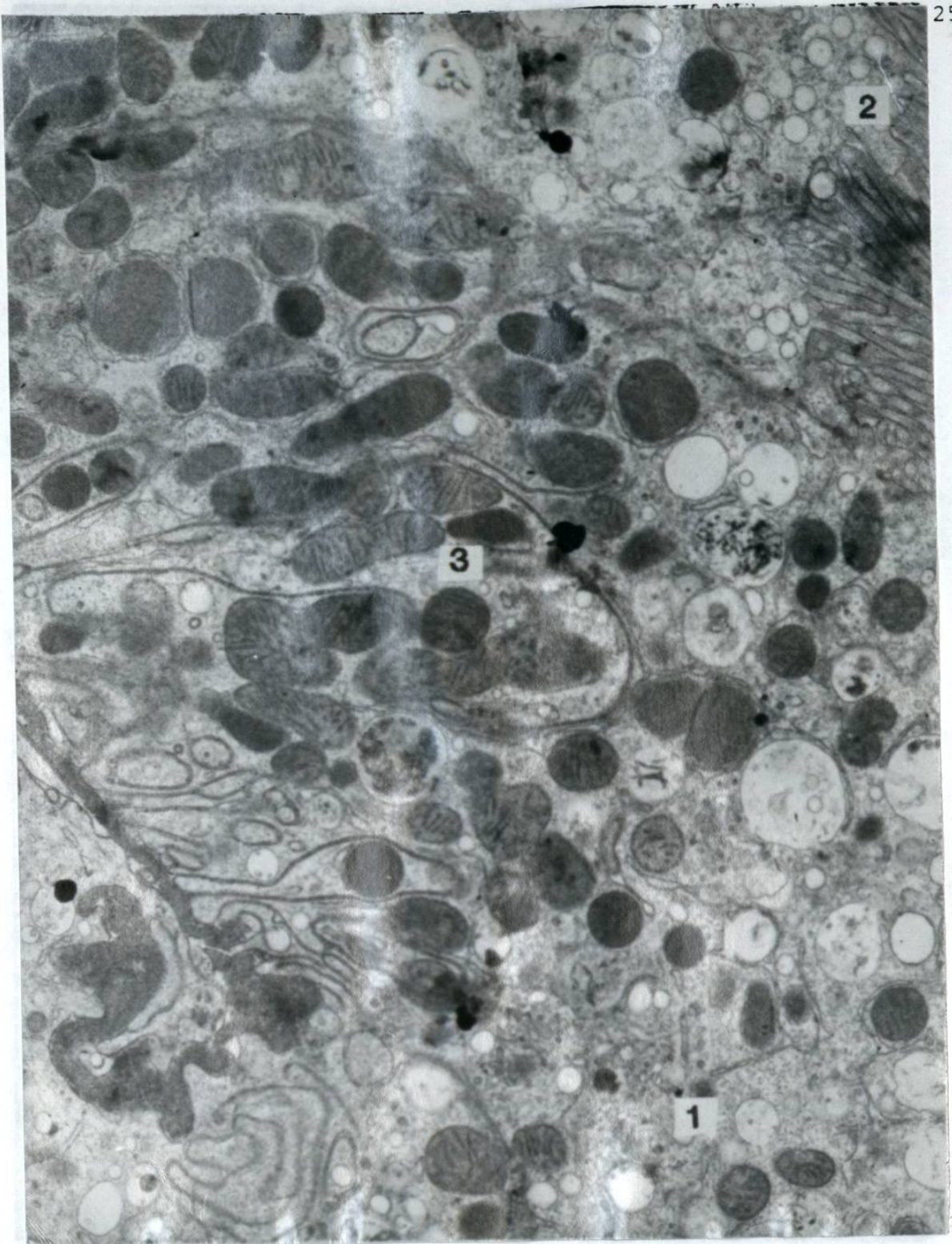


Fig. 5- Ultraestructura de células de TCP tratadas con toxina 514 durante 15 minutos que muestra: 1)- la conservación del citoplasma, 2)- microvellosidades completas y 3)- mitocondrias sin alteración. Aumento= 4,400 X.

desprendimiento de las microvellosidades, 5)- aumento del citoplasma con pérdida de la forma típica, 6)- estropeamiento de la matriz y ruptura de crestas.

Aumento= 4,400 X.

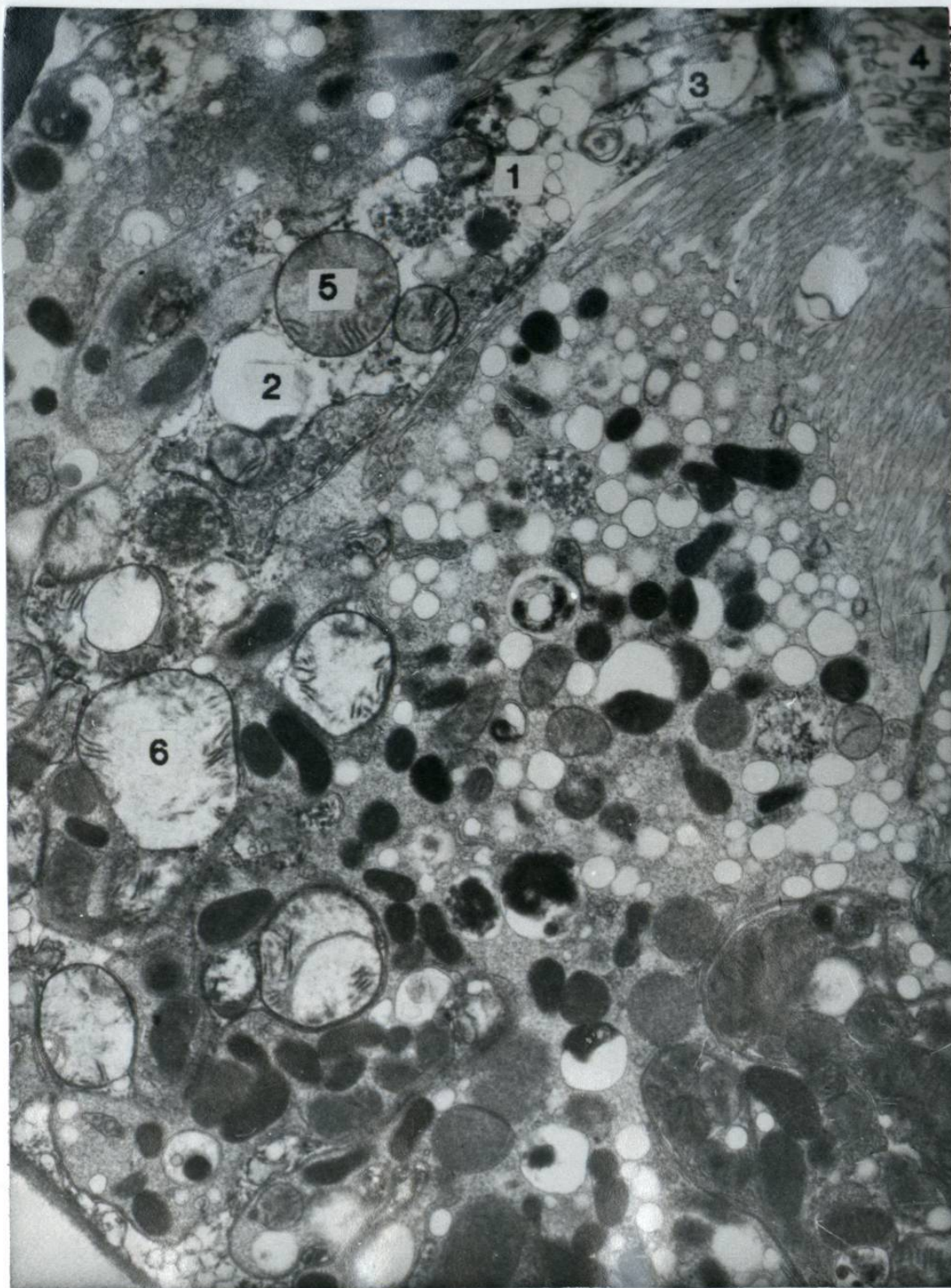


Fig.6- Imagen de la ultraestructura de células de TCP tratados con T-514 durante 30 minutos que presentan: 1)- extracción y 2)- vesiculación del citoplasma, 3)- discontinuidad de la membrana apical, 4)- desprendimiento de las microvellosidades, 5)- aumento del diámetro mitocondrial con pérdida de la forma típica, 6)- extracción de la matriz y ruptura de crestas.

Aumento= 4,400 X.

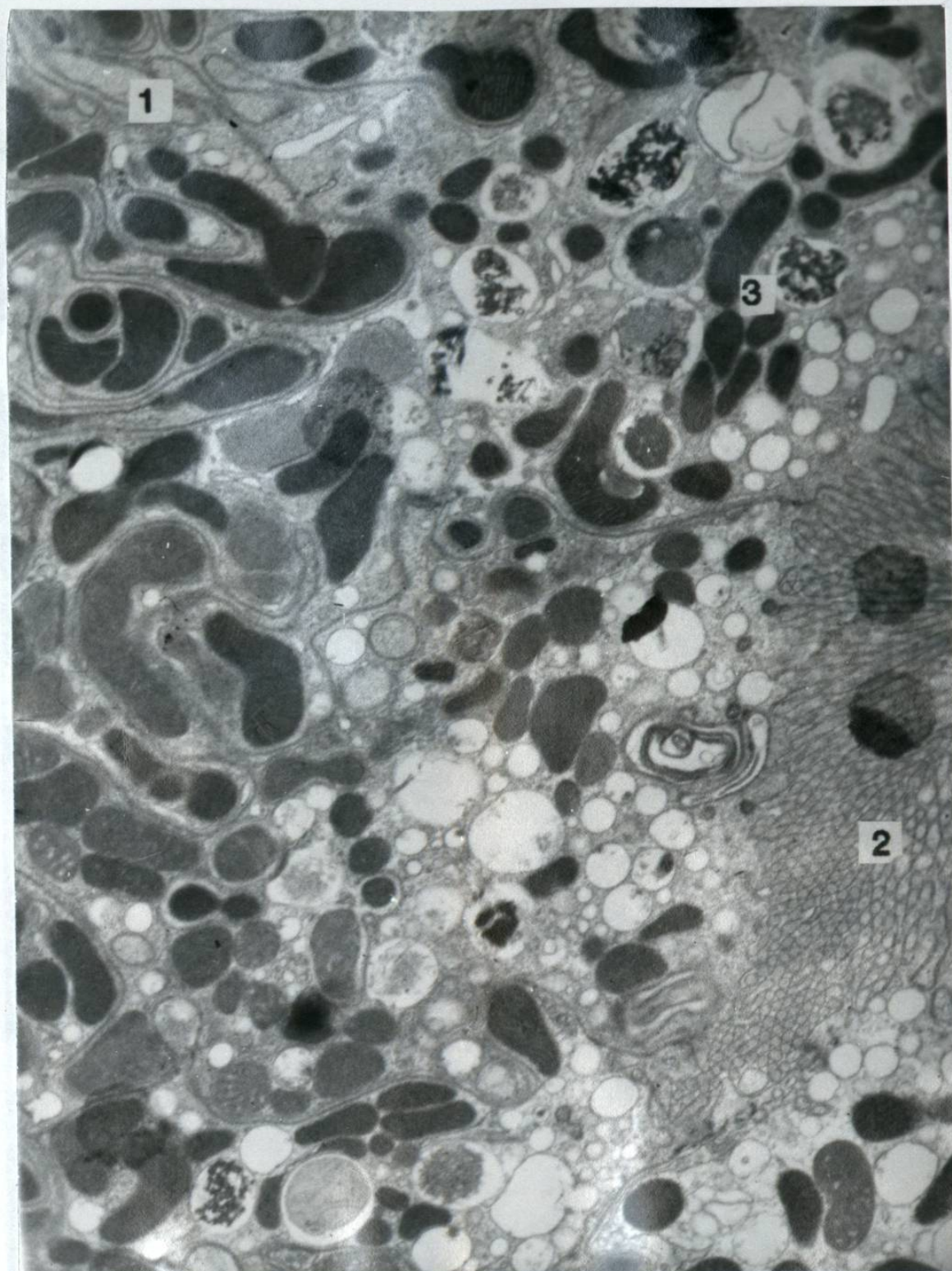


Fig. 7- Células de TCP tratados durante 15 minutos con toxina 514 y glicina, donde se aprecia: 1)- citoplasma sin daño aparente, 2)- microvellosidades completas, 3)- mitocondrias de aspecto normal.
Aumento= 4,400 X.

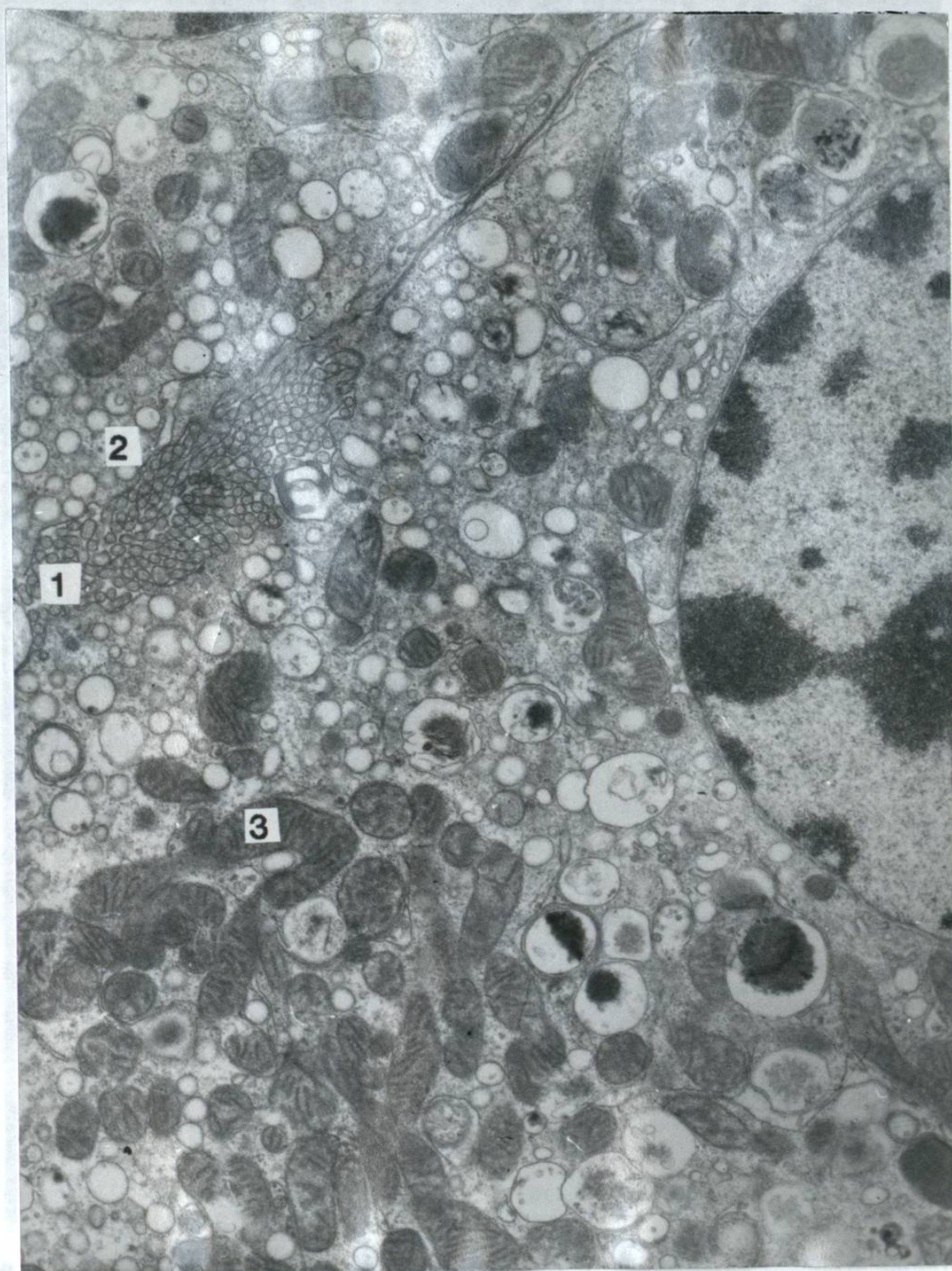


Fig. 8- Células de TCP tratados durante 30 minutos con T-514 y con glicina que presentan:
1)- conservación de las microvellosidades, 2)- conservación de la membrana celular apical,
3)- mitocondrias de aspecto normal.
Aumento= 4,400 X.

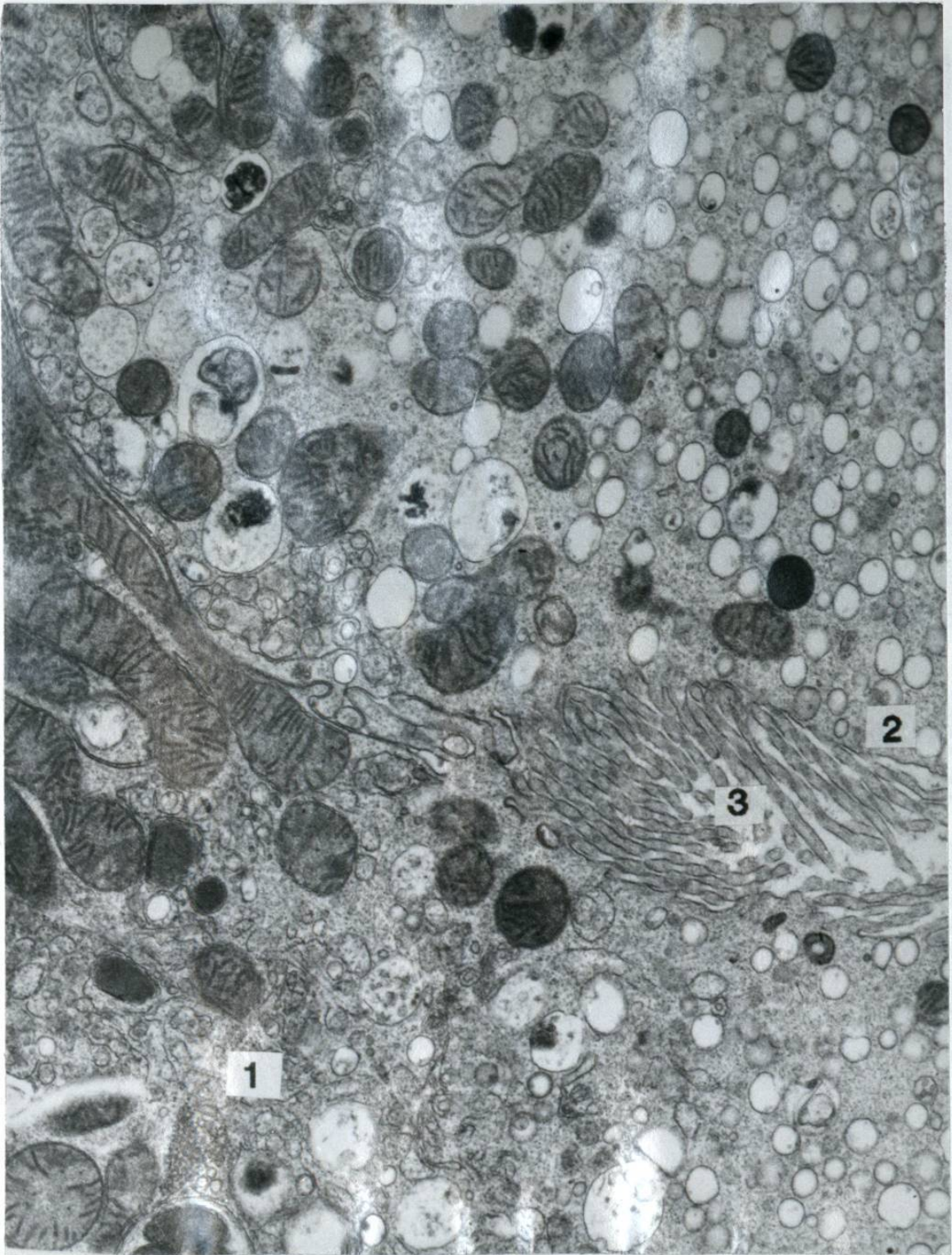


Fig. 9- Epitelio bien conservado de muestras de TCP incubadas sin tratamiento durante 30 minutos como control: 1)- citoplasma normal, 2)- membrana celular continua, 3)- microvellosidades completas, 4)- mitocondrias sin daño.
Aumento= 4,400 X.

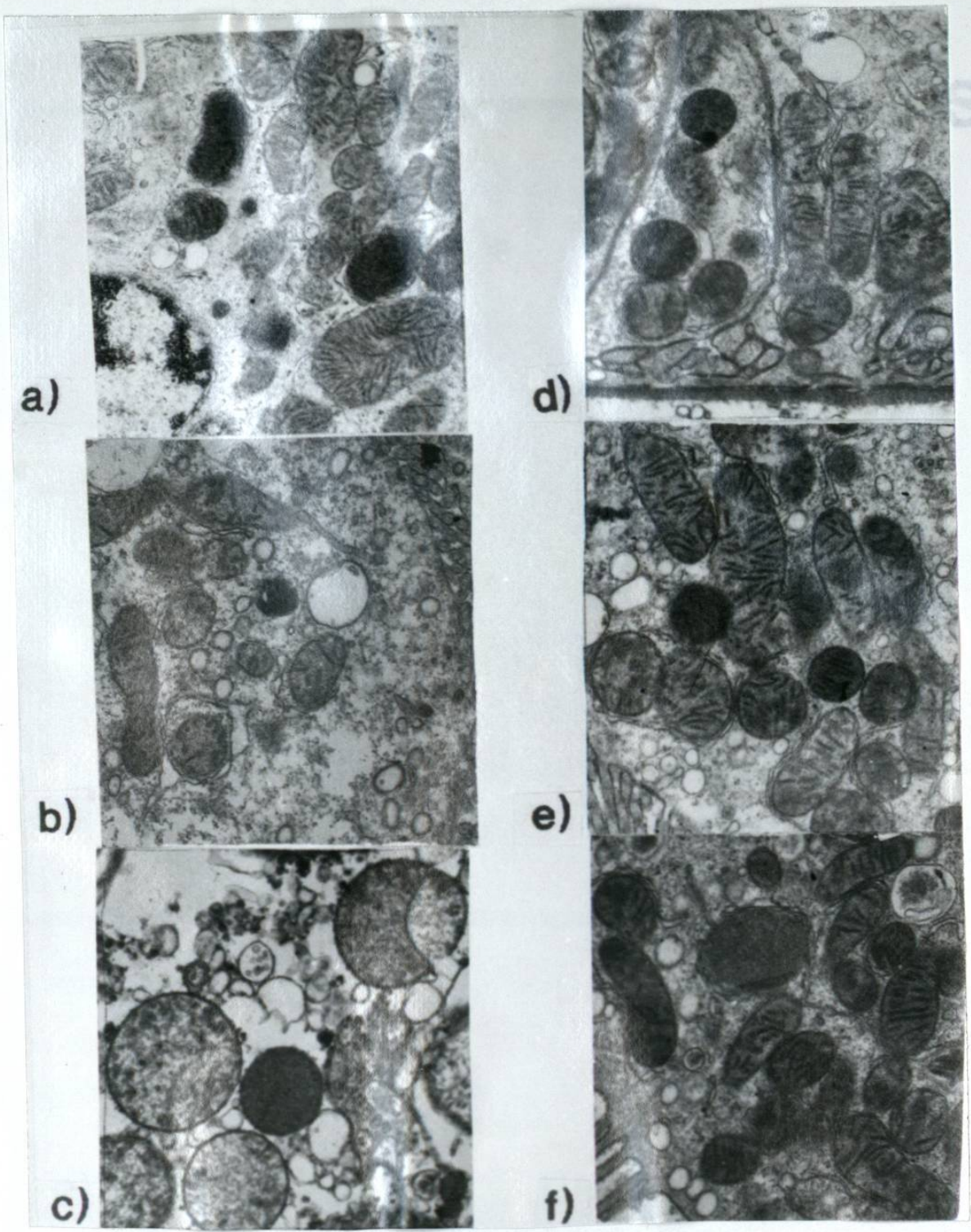
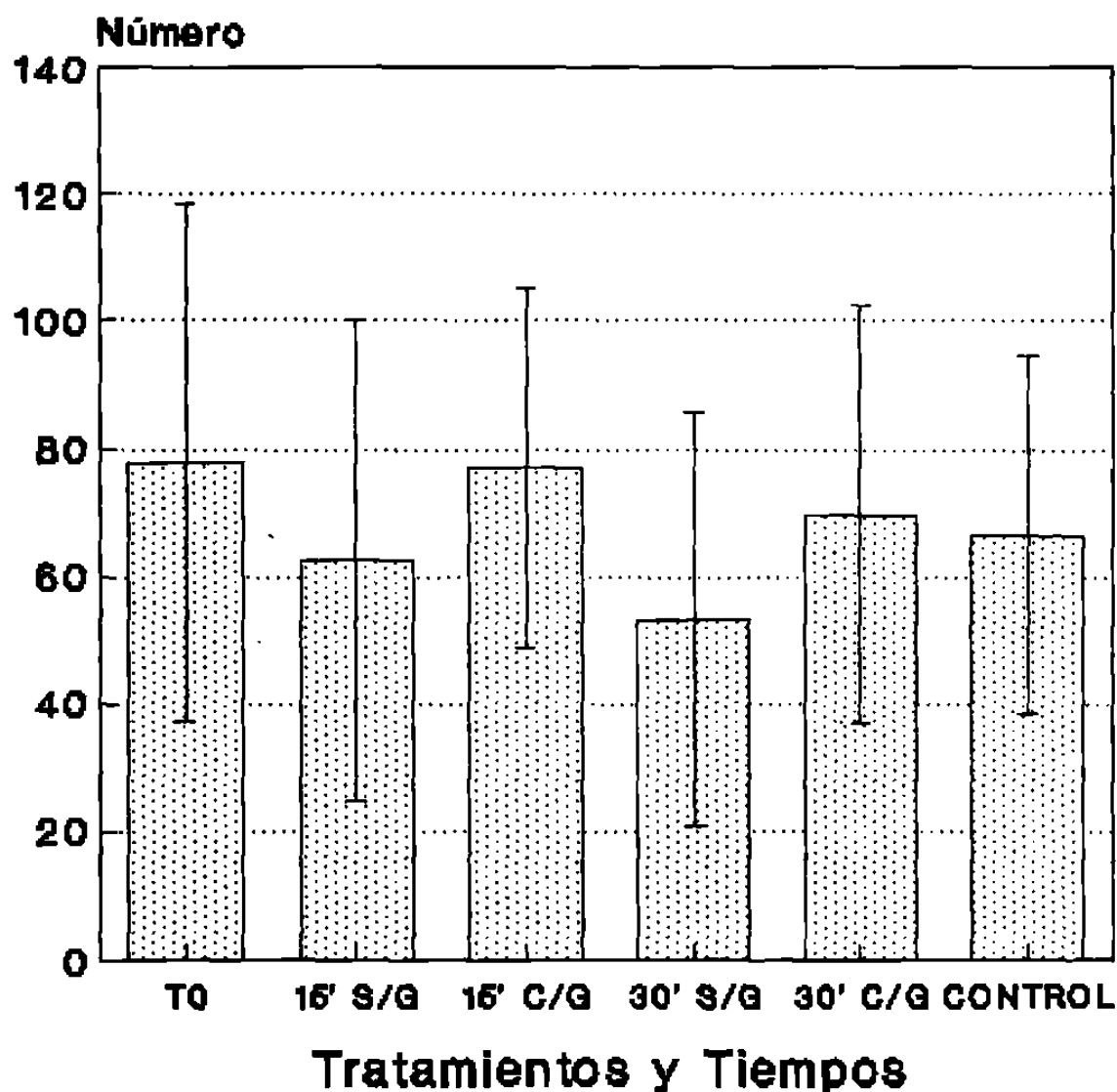


Fig. 10- Composición de micrografías electrónicas que presentan un resumen del aspecto mitocondrial bajo los tratamientos aplicados con los daños descritos en cada caso: a)- tiempo cero, b)- T-514 15min. S/G, c)- T-514 30 min. S/G, d)- control de 30 min., e)- T-514 15 min. C/G, f)- T-514 30 min. C/G.

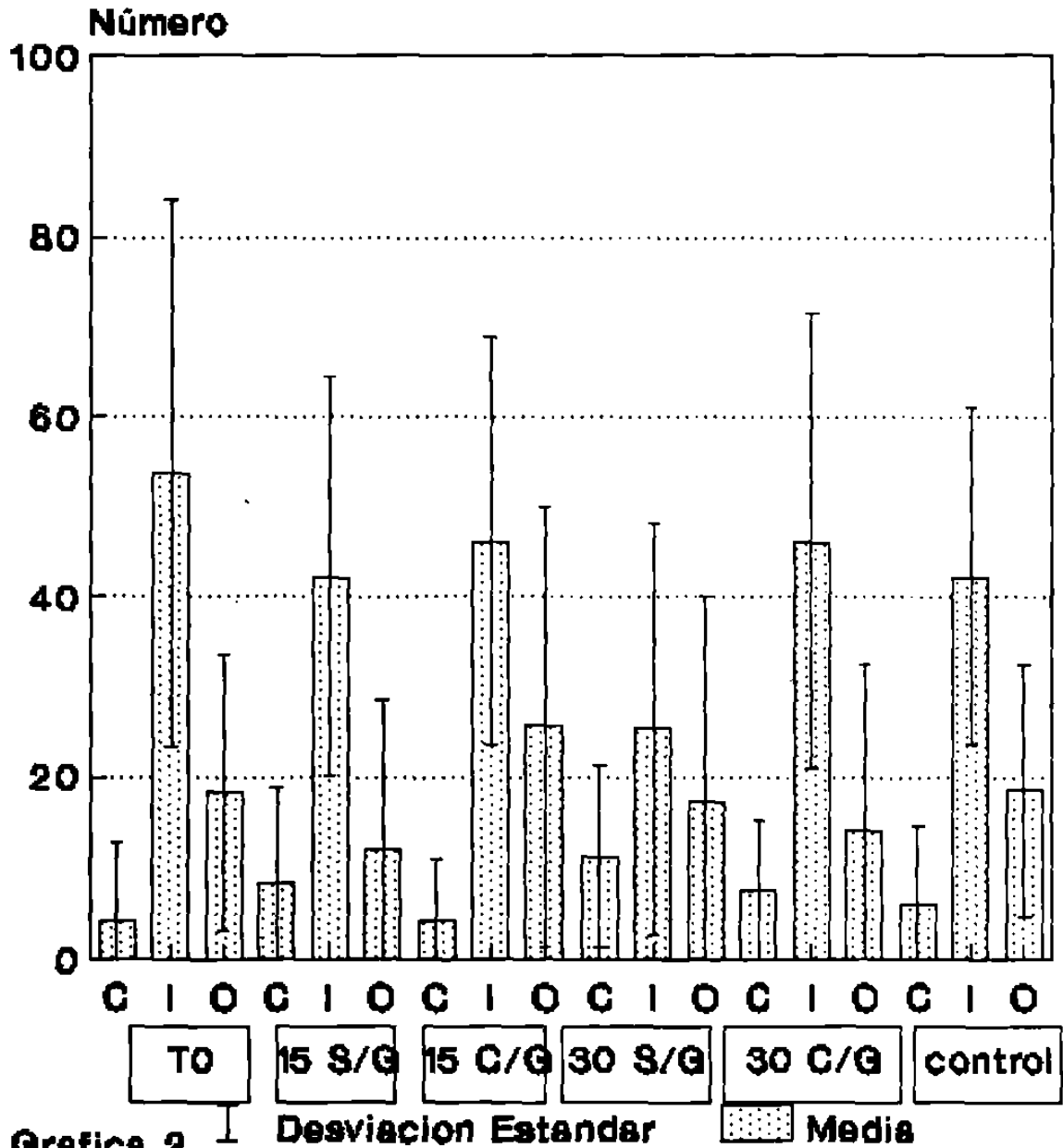
Número de Mitocondrias Promedio de los Totales



Grafica 1 I Desviacion Estandar  Media

Se muestran los valores promedio de los conteos de mitocondrias sin separar en los 3 tipos de electrodensidad

Número de Mitochondrias Separadas por tipo

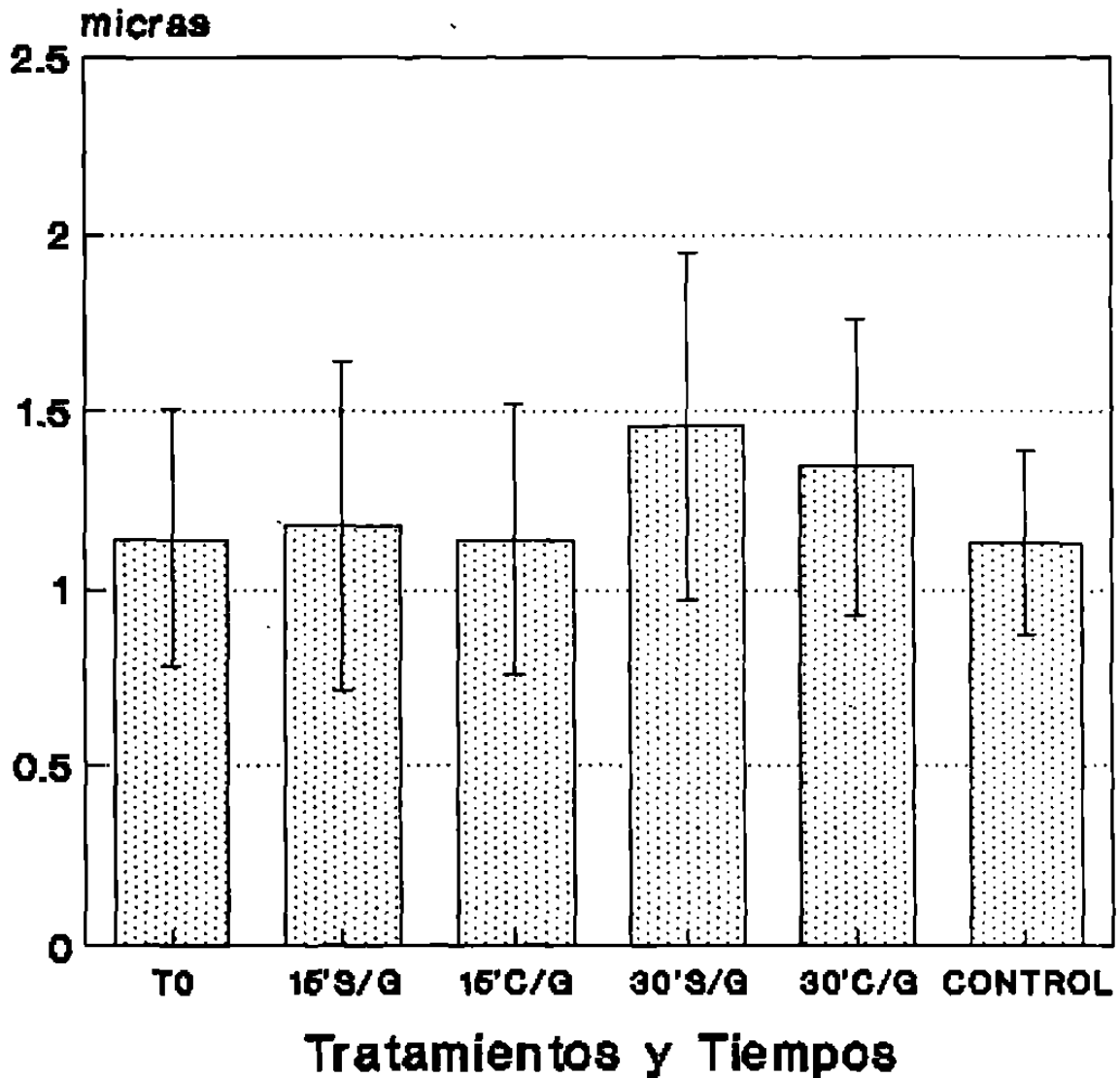


Grafica 2

Se muestran los valores promedio de los 3 tipos de mitochondrias: C=claras, I=intermedias y O=oscuras

Mitocondrias Totales

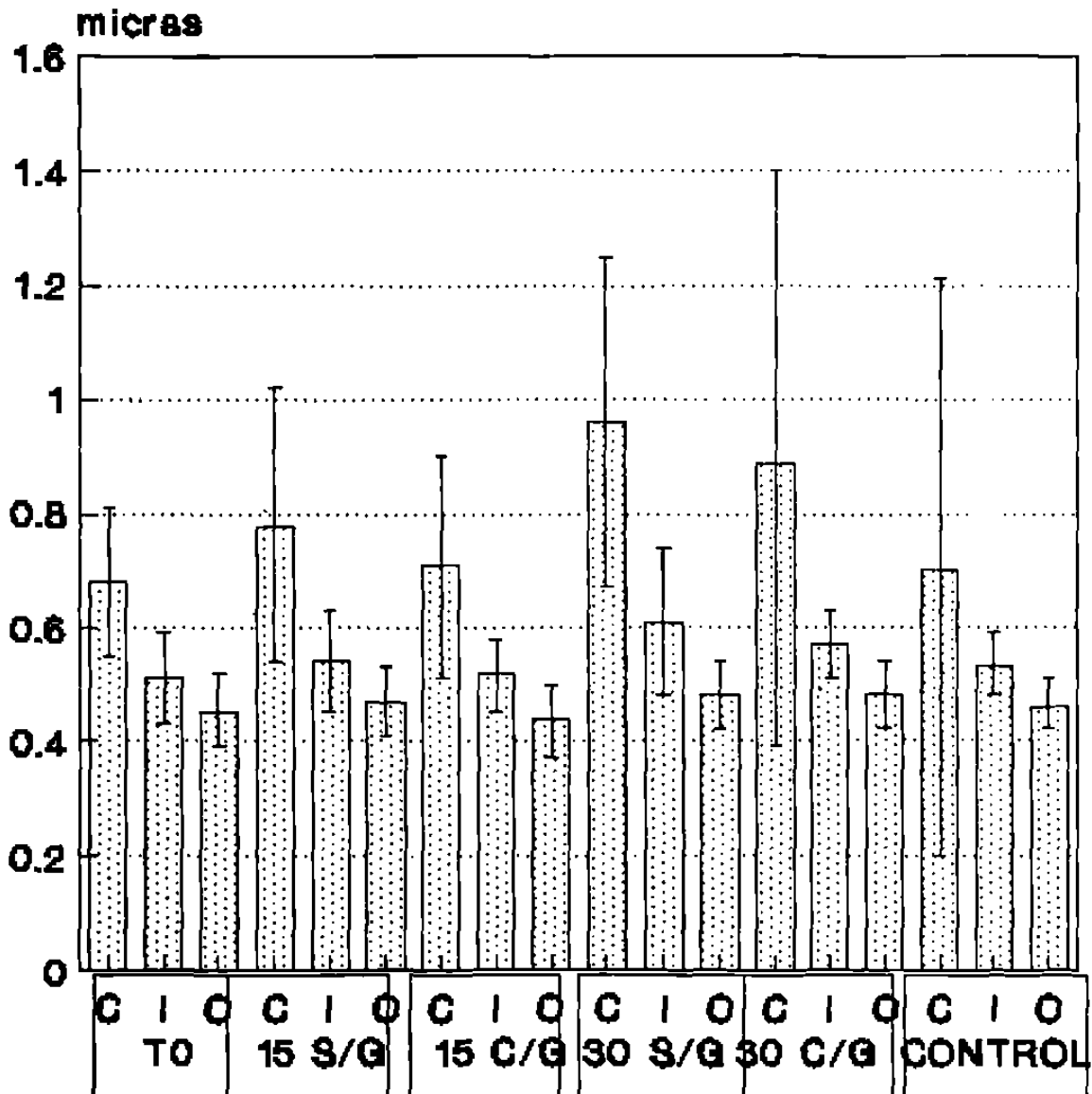
Promedio del Diámetro



I Desviación Estándar  Media

Grafica 3: muestra los valores promedio de los diámetros de las mitocondrias sin separar en 3 tipos

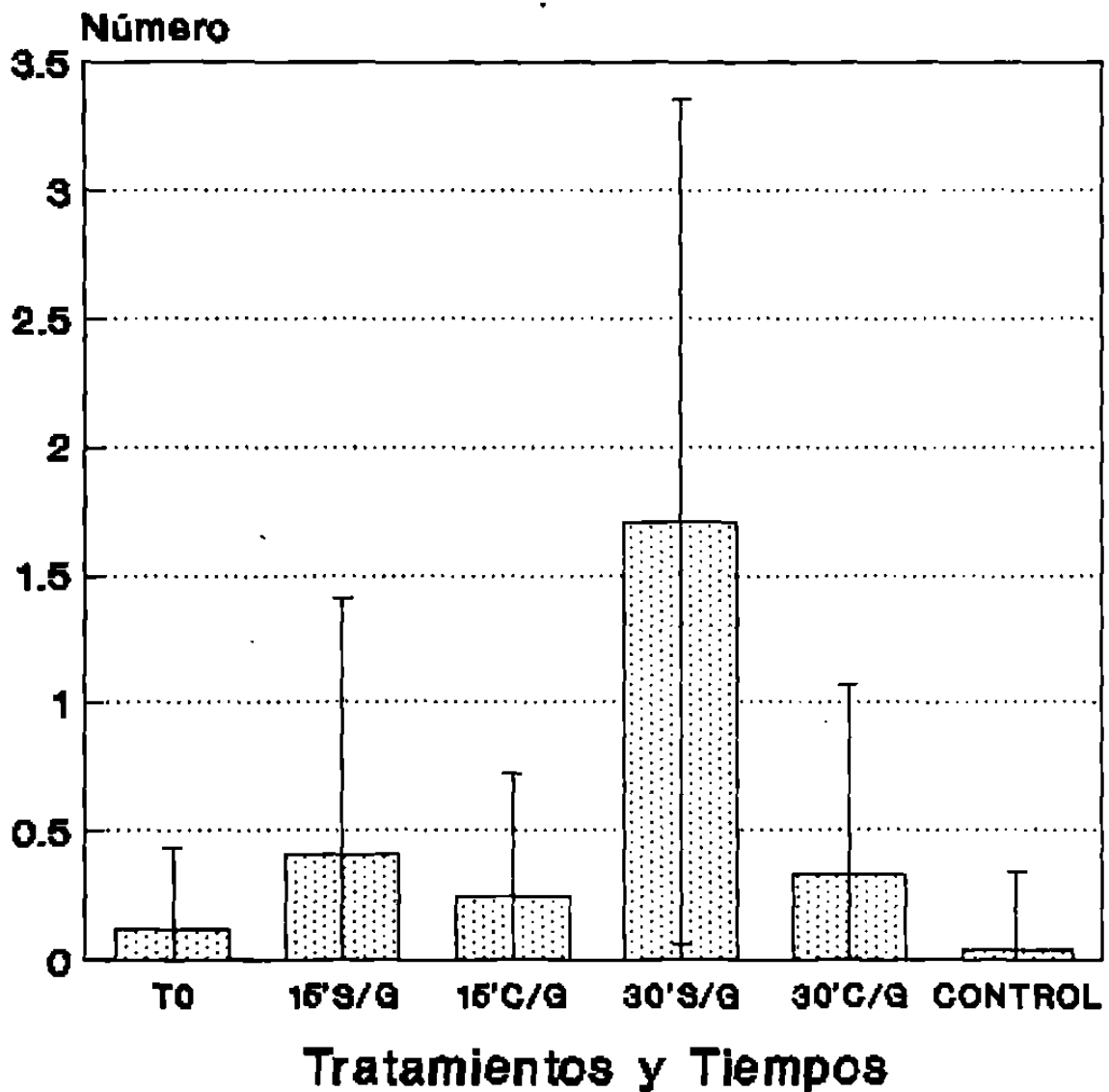
Diámetro Mitochondrial Separadas por tipo



Grafica 4: $\bar{\quad}$ Desviación Estándar  Media

Se muestran los valores promedio del diámetro de las mitocondrias C=claras, I=intermedias y O=oscuras

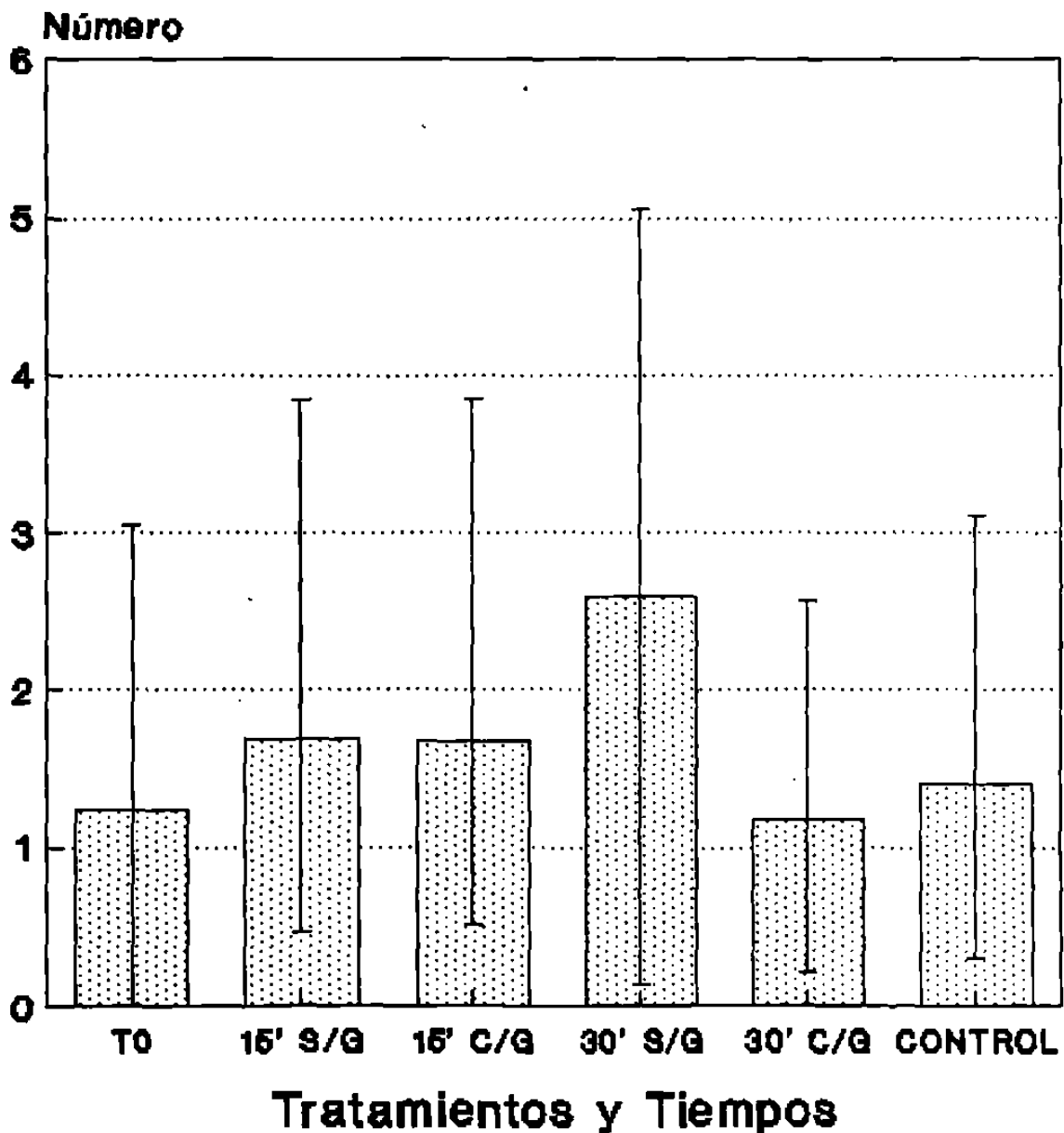
Número de Mitocondrias en División



Grafica 5: I Desviación Estándar  Media

Se muestran los valores promedio de las mitocondrias en división

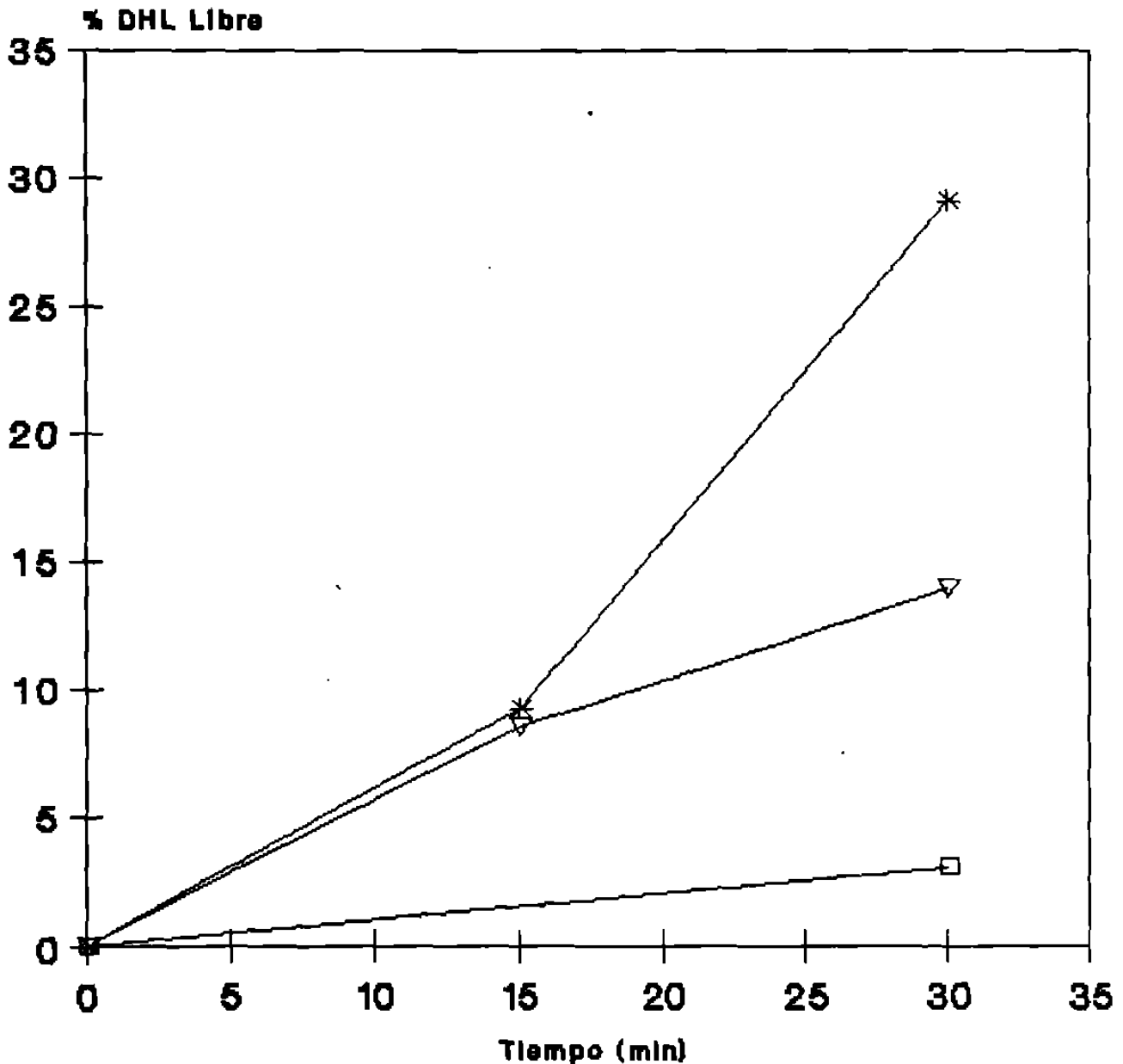
Número de Autofagosomas



Grafica 6- I Desviación Estándar ■ Media

Muestra los valores promedio de los autofagosomas conteniendo mitocondrias en degradacion.

Porcentaje de DHL Libre



—□— T0 y Control

—▽— T-514 con glicina

—*— T5-14 sin glicina

Grafica 7 Datos de la medición del porcentaje de actividad de la enzima DHL liberada al medio de incubación.

REFERENCIAS

- 1.-González-Costilla, O., R.K. Maiti, L. Villarreal
Estudio sobre las plantas forrajeras y tóxicas del Municipio de Matehuala, S.L.P. México.
Publicaciones Biológicas FCB/UANL; 5 :2; p. 4-8 ; 1991.
Monterrey, N.L., México.

- 2.-Bermúdez, M.V., D.J. González-Spencer, M. Guerrero, N. Waksman, A. Piñeyro.
Experimental intoxication with fruit and purified toxins of Buckthorn, (Karwinskia humboldtiana).
Toxicon, 1986; 24: 1091.

- 3.-Bermúdez, M.V.
Toxicidad aguda de la Karwinskia humboldtiana en diferentes especies de animales.
Tesis Doctoral, U.A.N.L., Monterrey N.L., 1989.

- 4.-Waksman, N.
Obtención de un Producto de interés Farmacológico.
IX Encuentro de Investigación Biomédica.
U.A.N.L., Monterrey, N.L., México., 1991.

- 5.-Tamez, V., J. Ancer, J. Sepúlveda, V. Bermúdez y A. Piñeyro.
Cambios histopatológicos y ultraestructurales en riñón é hígado de Macacus rhesus producidos por la T-514 aislada de Karwinskia humboldtiana, (Tullidora).
VII Encuentro Regional de Investigación Biomédica. U.A.N.L.
Monterrey, N. L., 1990.

- 6.-Sepúlveda, J.
Comunicación Personal, 1992.

- 7.-Sepúlveda, J., R. Acosta
Comunicación Personal
1992

- 8-Garza-Ocañas, L., T. Jaing, D. Acosta, O. Torres y A. Piñeyro.**
Evaluación de la nefrotoxicidad de la toxina T-514 de Karwinskia humboldtiana en cultivo de células epiteliales de riñón.
XV Congreso Nacional de Farmacología
San Miguel de Allende, Gto., México, 1992.
- 9-Garza-Quintero, R., J. Ortega-López, J.H. Stein, and M. A. Venkatachalam.**
Alanine protects rabbit proximal tubules against anoxic injury in vitro.
Am. J. Physiol. 258 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 27: F1075-F1083, 1990.
- 10-Díaz-Flores, L., G. Ortiz-Urdiain, G. Sánchez.**
Bases ultraestructurales en Citología, Histología y Anatomía Patológica.
Primera Edición
Editorial Médica y Técnica, S.A.
Barcelona, España., 1974.
- 11-Rhodin, J.**
Histology.
Urinary Sistem.
Oxford University Press., pp. 648-674.
New York, U.S.A., 1974.
- 12-Weinberg, J. M.**
Oxygen deprivation-induced injury to isolated rabbit kidney tubules.
J. Clin. Invest., 1985; 76: 1193-1208.
- 13-Weinberg, J.M., L. Nissim, N. Roeser, J. A. Davis, S. Schultz and L. Nissim.**
Relationships between intracellular aminoacid levels and protection against injury to isolated proximal tubules.
Am. J. Physiol., 260: F410-F419; 1991.
- 14-Weinberg, J.M., J. A. Davis, M. Abarzúa, T. Kiane and R. Kunkel.**
Protection by Glycine of proximal tubules from injury due to inhibitors of the mitochondrial ATP production.
A. J. Physiol., 258: C1127-C1140; 1990.

- 15-.Tamez, V., J. Ancer, J. Sepúlveda, V. Bermúdez y A. Piñeyro.
Cambios histopatológicos y ultraestructurales en riñón de hígado de Macacus rhesus
producidos por la T-514 aislada de Karwinskia humboldtiana, (Tullidora).
VII Encuentro Regional de Investigación Biomédica. U.A.N.L.
Monterrey, N.L.,1990.
- 16-.Albert, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and J. D. Watson.
Molecular Biology of the Cell.
Garland Publishing, Inc.
2° Edition, p: 667
New York and London. 1990
- 17-.Gerald K.
Biología Celular
Mc Graw Hill
2ª Edición, p: 334
México. 1989
- 18-.Molecular Cell Biology
Darnell, J., H. Lodish and D. Baltimore.
Scientific American Books
2ª Edition, p: 114
New York, 1990.
- 19- Bancroft, J.D., A. Stevens
Theory and Practice of Histological Techniques
Churchill Livingston
2a. Edición
Edimburg London Melbourne New York;1982:42-45
- 20-..Weibel, E. R.
Practical Methods for Biological Morphometry
In Stereological Methods.
Academic Press,
New York, 1979; Vol. 1:120.

21-.Spiegel, M.R.

Estadística

Mc Graw-Hill

2° Edición

México, 1991, pp. 91, 375 y 411.

Apéndice

Tratamiento:	Promedio	Desviación Estándar
Tiempo cero =	77.78	40.65
T-514, 15' sin glicina=	62.44	37.90
T-514, 15' con glicina=	76.95	28.24
T-514, 30' sin glicina=	53.13	32.57
T-514, 30' con glicina=	69.50	32.83
Control 30'=	66.51	28.08

Tabla I:

Muestra el valor promedio del número total de mitocondrias por tratamiento

Análisis de varianza: prueba de Scheffé= significancia de 0.05

Existe diferencia significativa entre el Tiempo 0 y el T-514, 30' S/G.

Ver Gráfica 1.

Tratamiento	Electrodensas	Intermedias	Claras
Tiempo cero=	18.42	53.80	4.38
T-514, 15' S/G=	12.02	42.24	8.44
T-514, 15' C/G=	25.80	46.22	4.37
T-514, 30' S/G=	17.22	25.51	11.31
T-514, 30' C/G=	14.29	46.25	7.59
Control 30'=	18.62	42.28	6.02

Tabla II:

Muestra el valor promedio del número de mitocondrias de cada tipo encontradas en los tratamientos.

Análisis de varianza: prueba de Scheffé= Significancia=0.05.

Existe diferencia significativa entre:

Mitocondrias claras de— T-514, 30'S/G vs Tiempo cero

Mitocondrias claras de— T-514, 30'S/G vs T-514, 15'C/G.

Mit.intermedias de— T-514, 30'S/G vs Tiempo cero

Mit.intermedias de— T-514, 30'S/G vs T-514, 15'C/G

Mit.intermedias de— T-514, 30'S/G vs T-514, 30'C/G.

Mit. oscuras de— T-514, 15'C/G vs T-514, 15'S/G.

Prueba de "t" de Student para muestras pareadas=

Existe diferencia significativa entre los tres tipos de mitocondrias de todos los tratamientos, excepto en los siguientes casos: Mit. claras vs Mit. oscuras de T-514, 15' S/G.

Mit. claras vs Mit. oscuras de T-514, 30' S/G.

Mit. interm. vs Mit. oscuras de T-514, 30' S/G.

Ver Gráfica 2.

Tratamiento	Media	Desviación Estándar
Tiempo cero	1.14	0.36
T-514,15' S/G	1.17	0.46
T-514,15' C/G	1.14	0.38
T-514,30' S/G	1.46	0.48
T-514,30' C/G	1.35	0.41
Control 30'	1.13	0.25

Tabla III:

Muestra los valores promedio del diámetro del total de mitocondrias sin separarlas en los tres tipos.

Análisis de varianza por la prueba múltiple de Scheffé:

Nivel de significancia= 0.05

Existe diferencia significativa entre:

T-514, 30' S/G vs Tiempo 0

T-514, 30' S/G vs T-514, 15'C/G

T-514, 30' S/G vs Control 30'

Ver Gráfica 3

Tratamiento	Electrodensas	Intermedias	Claras
Tiempo cero=	0.45	0.51	0.68
T-514, 15' S/G=	0.47	0.54	0.78
T-514, 15' C/G =	0.44	0.52	0.71
T-514, 30' S/G =	0.48	0.64	0.96
T-514, 30' C/G=	0.48	0.57	0.89
Control 30'=	0.46	0.53	0.70

Tabla IV:

Se presentan los promedios de los diámetros de los tres tipos mitocondriales.

Análisis de varianza= prueba Scheffé:Significancia- 0.05.

Mitocondrias claras= no hay diferencia significativa entre los tratamientos.

Existe diferencia significativa entre los siguientes tratamientos:

T-514, 30'S/G vs Tiempo 0

T-514, 30'S/G vs T-514, 15'S/G

T-514, 30'S/G vs T-514, 15'C/G

T-514, 30'S/G vs Control 30'

Mitocondrias oscuras:

T-514,30'S/G vs T-514,15'C/G.

Prueba de "t" de Student para muestras pareadas:

Existe diferencia significativa entre los tres tipos de mitocondrias de todos los tratamientos.

Ver Gráfica 4.

Tratamiento	Semilunas
Tiempo Cero=	5
T-514, 15' S/G=	18
T-514, 15' C/G=	11
T-514, 30' S/G=	75
T-514, 30' C/G=	15
Control 30'=	2

Tabla V:

Muestra los valores totales de las mitocondrias con semilunas en cada tratamiento.

Ver Gráfica 5.

Tratamiento	Autofagosomas
Tiempo Cero=	48
T-514, 15' S/G=	69
T-514, 15' C/G=	68
T-514, 30' S/G=	96
T-514, 30' C/G=	38
Control 30'=	43

Tabla VI:

Muestra los valores totales de autofagosomas conteniendo mitocondrias encontrados en los tratamientos.

Ver Gráfica 6.

