

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA**



**ANÁLISIS MORFOMETRICO COMPARATIVO DEL
EFECTO DE PA1, ISOPA1, PA2 Y T-544 SOBRE
PEROXISOMAS DE *C. goldmani***

Por

JUAN CARLOS SEGOVIANO RAMIREZ

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

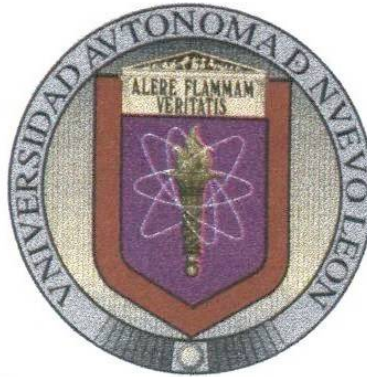
Diciembre de 2001



1080113105

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**ANALISIS MORFOMETRICO COMPARATIVO DEL
EFECTO DE PA1, ISOPA1, PA2 Y T-544 SOBRE
PEROXISOMAS DE *C. boidinii***

Por

JUAN CARLOS SEGOVIANO RAMIREZ

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

Diciembre de 2001

FTM
99981
K37
S4
C.1



**ANALISIS MORFOMETRICO COMPARATIVO DEL EFECTO DE PA1, ISOPA1,
PA2 Y T-544 SOBRE PEROXISOMAS DE *C. boidinii***

Aprobación de la Tesis:



Ph. D. JULIO SEPULVEDA SAAVEDRA
Director de Tesis



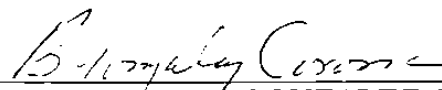
Dr. C. RICARDO SALAZAR ARANDA
Comisión de Tesis




Dr. med. ALFREDO PIÑEYRO LOPEZ
Comisión de Tesis



DRA. NOEMI WAKSMAN DE TORRES
Comisión de Tesis



M.C. BEATRIZ GONZALEZ CORONA
Comisión de Tesis



DR. ROBERTO MERCADO LONGORIA
Subdirector
de Investigación y Estudios de Posgrado

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Julio Sepúlveda Saavedra Asesor de mi tesis. Así como a la Dra. Myrthala Moreno Sepúlveda, a los Doctores Beatriz González Corona, Noemí Waksman de Torres y Alfredo Piñeyro y al M. C. Ricardo Salazar por formar parte del Comité de Tesis, por sus valiosas sugerencias e interés en la revisión del presente trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

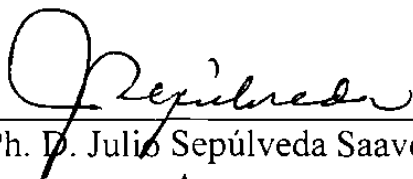
Al Departamento de Histología Facultad de Medicina por permitirme el uso de su equipo e instalaciones y muy especialmente a los técnicos: Sra. Nora Frías Trejo y Sr. Víctor Juárez Morín por su invaluable ayuda en el desarrollo de este estudio.

A mi familia por el apoyo que siempre me ha brindado.

**Análisis morfométrico comparativo del efecto de PA1, IsoPA1,
PA2 y T-544 sobre peroxisomas de *C. boidinii***

Presentado por: Med. Cir. Juan Carlos Segoviano Ramírez

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. bajo la asesoría del Ph.D. Julio Sepúlveda Saavedra y la coasesoría de la Dra. Myrthala Moreno Sepúlveda



Ph. D. Julio Sepúlveda Saavedra
Asesor

Dra. Myrthala Moreno Sepúlveda
Coasesor

Dedicatoria

A Mis Padres...

A la Familia Segoviano Ramírez.

Especialmente a doña Cecilia Ramírez Ramírez...

...Gracias Madre por ayudarme tanto

y darme su apoyo.

RESUMEN

Juan Carlos Segoviano Ramírez

Fecha de Graduación: Diciembre 2001

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Título del Estudio

**ANÁLISIS MORFOMÉTRICO COMPARATIVO
DEL EFECTO DE PA1, ISOPA1, PA2 Y T-544
SOBRE PEROXISOMAS DE *C. boidinii*.**

Número de Páginas: 56

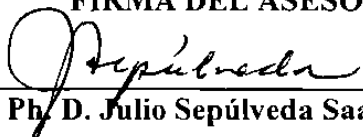
**Candidato para el grado de Maestro en Ciencias
con Especialidad en Morfología.**

Area de Estudio: Morfología.

Propósito y Método de Estudio: El presente trabajo se diseñó con el fin de conocer el grado de toxicidad de PA1, IsoPA1, PA2 y T-544 sobre los peroxisomas de *C. boidinii* mediante la cuantificación de la lesión que producen sobre la membrana peroxisomal y correlacionar su estructura química con la magnitud del efecto observado, partiendo del supuesto de que las diferencias en la intensidad de la lesión producida se pueden evidenciar mediante un análisis morfométrico comparativo. Para esto se realizaron cortes de bloques de resina epóxica con muestras de *C. boidinii* que previamente habían sido incubadas con cada uno de los compuestos antracenónicos mencionados y un grupo control con medio nutriente únicamente. Se obtuvieron micrografías electrónicas de transmisión y se formaron cinco grupos. Se efectuó un análisis morfométrico mediante el cual se cuantificó para cada grupo: el número de células con al menos un peroxisoma lesionado, el número de peroxisomas totales y el número de peroxisomas lesionados. Lo anterior se respaldó con un análisis morfológico de la ultraestructura celular de *C. boidinii* que incluyó el total de las micrografías tomadas.

Conclusiones y Contribuciones: Se comprobó una vez más la lesión sobre la membrana peroxisomal que producen PA1, IsoPA1, PA2 y T-544, lo que concuerda con estudios anteriores. Además, en las células incubadas tanto con IsoPA1 como con PA2 se observó la presencia de mitocondrias de forma y tamaño anormales. El número de células con al menos un peroxisoma lesionado fue igual entre los cultivos incubados con PA1, IsoPA1 o PA2, en el caso de T-544 fue menor siendo esta diferencia estadísticamente significativa. Las células incubadas con PA1 tuvieron el menor número de peroxisomas totales así como de peroxisomas lesionados con relación a IsoPA1, PA2 y T-544, los cuales no mostraron diferencia estadística entre sí en ninguno de los casos. En este estudio pudimos apreciar una clara diferencia entre el efecto producido por PA1 y T-544 concluyendo que PA1 es más tóxico que T544. No fue posible establecer estadísticamente una clara diferencia entre los efectos de PA2 e IsoPA1 en relación a T-544 y PA1. Es posible que exista tal diferencia pues al menos morfológicamente se evidenció que PA2 e IsoPA1 tienen efectos en otros organelos como la mitocondria. Será necesario el diseño de otros estudios para esclarecer si existe diferencia tanto en el grado de toxicidad como en su mecanismo de acción.

FIRMA DEL ASESOR



Ph. D. Julio Sepúlveda Saavedra

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN.	1
	1.1 Antecedentes	1
	1.2 Justificación	13
	1.3 Hipótesis	13
	1.4 Objetivos	14
	1.4.1 Objetivo General.	14
	1.4.2 Objetivos Específicos	14
2	MATERIAL Y METODOS	15
	2.1 Material	15
	2.1.1 Reactivos	15
	2.1.2 Material Biológico	15
	2.1.3 Equipo	16
	2.2 Estrategia Experimental	16
3	RESULTADOS	21
	3.1 Análisis Morfológico	21
	3.2 Análisis Morfométrico	27
4	DISCUSION	34
5	CONCLUSIONES	40
	BIBLIOGRAFIA	41

APENDICES

APENDICE A.- PREPARACION DE LAS REJILLAS CON SOPORTE.	47
APENDICE B.- PREPARACION DE SOLUCIONES	48
APENCIDE C.- OBTENCION DE LOS CORTES EN EL ULTRAMICROTOMO	49
APENDICE D.- CONTRASTACION DE LOS CORTES	50
APENDICE E.- MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	51
APENDICE F.- REVELADO Y AMPLIFICACIÓN DE LAS MICROGRAFIAS	52
APENDICE G.- CALCULO DE LAS VARIABLES POR EL METODO DE CONTEO DE PUNTOS	53

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Densidad Numérica de Células con Peroxisomas Lesionados.	27
II. Densidad Numérica Peroxisomal Total	29
III. Densidad Numérica de los Peroxisomas Lesionados	31
IV. Resumen de las Densidades Numéricas Calculadas para los Diferentes Grupos de Tratamiento	33

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura Química de T-514, T-544, T-516 y T-496	2
2. Estructuras Químicas de IsoT-514 (IsoPA1), DiastT-514 (PA2) y T-510	2
3. Tinción Citoquímica para la Catalasa de Peroxisomas en Cortes de Hígado de Rata Tratados con PA1	5
4. Vía Autofágica Lisosomal	6
5. Ultraestructura del Peroxisoma	6
6. Ultraestructura Normal de una Levadura de <i>C. boidinii</i> . . .	7
7. Ruptura de la Membrana Peroxisomal de <i>H. polymorpha</i> Producidas por PA1.	9
8. Efectos sobre los Peroxisomas de <i>C. boidinii</i> Producidos por PA1, Isopa1, PA2 y T-544	12

9.	Estrategia para el Muestreo de Perfiles Celulares	17
10.	Plantilla Morfométrica y Cálculo de NvCe-PeL.	18
11.	Estrategia para el Muestreo de Perfiles Peroxisomales . . .	20
12.	Descripción Morfológica de <i>C. boidinii</i> Grupo Control	
	Negativo	22
13.	Descripción Morfológica de <i>C. boidinii</i> Grupo PA1	23
14.	Descripción Morfológica de <i>C. boidinii</i> Grupo Isopa1	24
15.	Descripción Morfológica de <i>C. boidinii</i> Grupo PA2	25
16.	Descripción Morfológica de <i>C. boidinii</i> Grupo T-544	26
17.	Densidad Numérica de Células con Peroxisomas	
	Lesionados.	28
18.	Densidad Numérica Peroxisomal Total	30
19.	Densidad Numérica de Peroxisomas Lesionados	32

Abreviaturas

%	Valor Porcentual
µg/ml	Microgramos por Mililitro
Ac	Anticuerpo
Ce-PeL	Células con Peroxisomas Lesionados
D	Diámetro
Diast T-514	Diastereoisómero de T-514
DL50	Dosis Letal Media
g	Gramos
I	Intersecciones de las Líneas de Prueba con los Perfiles de las Estructuras de Interés
IsoPA1	Isoperoxisomicina A1
IsoT-514	Isómero de Posición de T-514
M	Mitocondria
mL	Mililitros

mm	milímetros
N	Núcleo
N_A	Area del Corte
N_V	Densidad Numérica (Número de Perfiles de Interés por Unidad de Volumen).
$N_V\text{Cel-PeL}$	Densidad Numérica de Células con Peroxisomas Lesionados
$N_V\text{PeL}$	Densidad Numérica de Peroxisomas Lesionados.
$N_V\text{Pe-Total}$	Densidad Numérica Peroxisomal Total
°C	Grados Celsius
P	Puntos Extremos de las Líneas de Prueba
PA1	Peroxisomicina A1
PA2	Peroxisomicina A2
Pe	Peroxisomas
RER	Retículo Endoplásmico Rugoso
T-496	Compuesto Antracenónico de Peso Molecular Igual a 496
T-510	Compuesto Antracenónico de Peso Molecular Igual a 596
T-514	Compuesto Antracenónico de Peso Molecular Igual a 514
T-516	Compuesto Antracenónico de Peso Molecular Igual a 516
T-544	Compuesto Antracenónico de Peso Molecular Igual a 544

V	Vacuola
v s	Proporción Volumen Superficie
z	Longitud de las Líneas de Prueba

CAPITULO 1

INTRODUCCION

1.1 Antecedentes

El género *Karwinskia*, se integra por un grupo de arbustos pertenecientes a la familia de las Rhamnáceas¹ que se caracterizan por el contenido de antracenas diméricas.² Este género consta de 15 especies que se distribuyen desde el sur de Texas hasta Colombia,³ de las cuales 11 se encuentran en México⁴ donde *Karwinskia humboldtiana* es la más abundante.⁵

En 1975 Dreyer y colaboradores aislaron y caracterizaron del fruto y semilla de *Karwinskia humboldtiana* cuatro antracenas diméricas a las que, de acuerdo a su peso molecular, se les nombró T-496, T-514 ó Peroxisomicina A1 (PA1), T-516 y T-544⁶ (Figura 1).

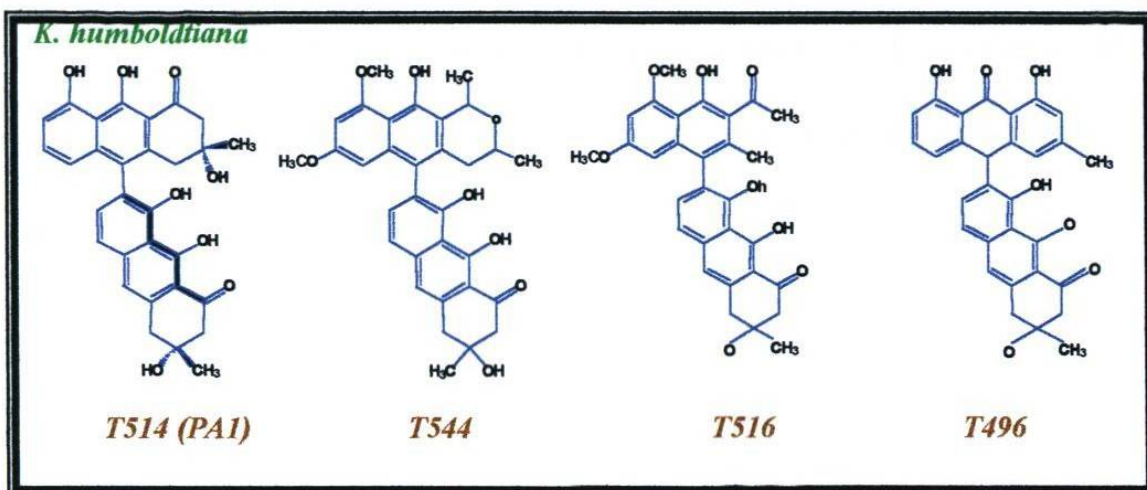


Figura 1. Estructura química de T514, T-544, T-516 Y T-496. Dreyer y colaboradores., 1975.

Recientemente se han aislado compuestos estructuralmente relacionados de distintas plantas pertenecientes al mismo género: un Diastereoisomero de T-514 ó Peroxisomicina A2 (PA2),⁷ un isómero de posición de T-514 ó Isoperoxisomicina A1 (IsoPA1)⁸, y la T-510⁸ entre otros (Figura 2).

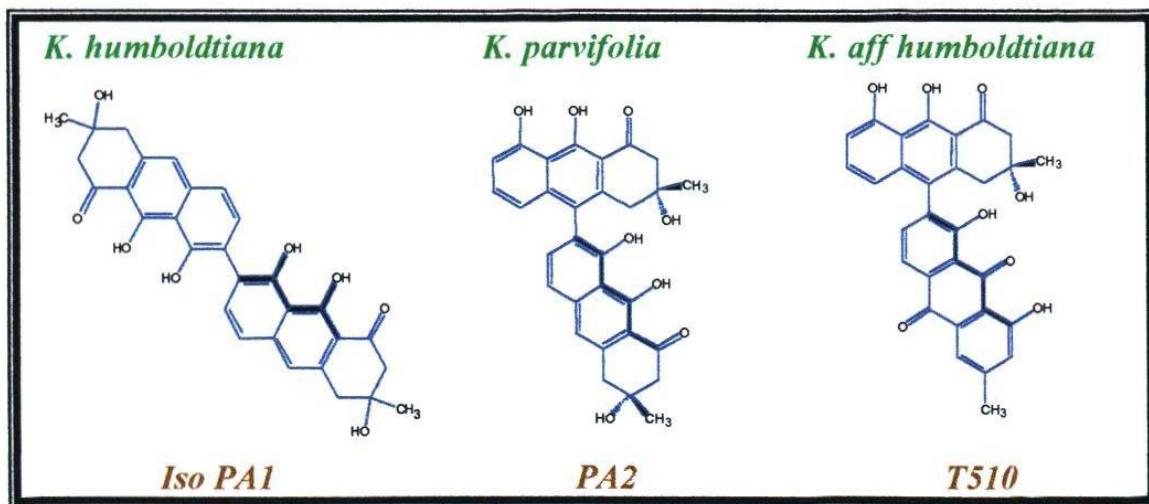


Figura 2. Estructuras químicas de Iso-T514 (Iso-PA1), Diast-T-544 (PA2), y T-510. Waksman y colaboradores, 1990.

Desde 1981 en el Departamento de Farmacología y Toxicología, de esta Facultad de Medicina, se inició una línea de investigación con el propósito de estudiar la actividad biológica de los compuestos antracénicos aislados de las plantas del género *Karwinskia*.

Los compuestos se han aislado de diferentes partes de la planta como raíz, tallo y hojas. El tipo de compuesto aislado y su concentración varía según la especie de la planta, estación del año, altitud y clima de la región de recolecta. En el caso de la PA1, se sabe que se encuentra en mayor cantidad en el fruto (semilla) de *K. humboldtiana* y su concentración es mayor en fruto verde que en el maduro.⁹

Se ha observado que, en ingesta accidental, el fruto es tóxico para cabras, ovejas, ganado vacuno y para el ser humano.¹⁰ También lo es, en condiciones experimentales, para ratones, cerdos de Guinea, hámsteres, excepto para perros.¹¹

La intoxicación accidental produce parálisis flácida, progresiva, ascendente y simétrica y puede ocasionar la muerte por parálisis bulbar. Otros autores han reportado que en animales intoxicados experimentalmente ocurre daño en hígado, pulmón y riñón y que la muerte sobreviene en ausencia de datos neurológicos.^{12, 13}

Actualmente se ha demostrado en animales que T-496 causa un cuadro diarreico. PAI provoca daño grave a hígado, pulmón y riñón y que T-544 es la responsable del daño neurológico.^{11. 12}

La selectividad de la PAI para hígado y pulmón demostrada por Bermúdez y colaboradores^{11. 12} los llevó a determinar la DL50 en distintas especies de animales. Observaron que mostraba una curva de distribución de letalidad dosis-respuesta con una pendiente muy empinada,¹⁴ este tipo de curva indica una variación biológica muy estrecha.¹⁵

Lo anterior permitió plantear la hipótesis de una probable toxicidad selectiva de PAI sobre células malignas.

En 1994, Piñeyro y colaboradores demostraron por primera vez que la PAI exhibe toxicidad selectiva sobre líneas celulares de origen neoplásico¹⁶ por lo que la propusieron como agente antineoplásico y solicitaron una patente para su uso como tal, la cual fue otorgada primero por la Comunidad Económica Europea¹⁷ y recientemente por los Estados Unidos de América¹⁸ y Japón.¹⁹

La meta principal en la investigación de la quimioterapia contra el cáncer es encontrar medicamentos con toxicidad selectiva. Una vez demostrada dicha toxicidad para la PAI es importante conocer su mecanismo de acción.

Uno de los efectos de la intoxicación experimental en ratas con PA1 es la disminución del número de peroxisomas de los hepatocitos,²⁰ lo mismo ocurre en el caso de monos, según observaciones morfológicas preliminares²¹ (Figura 3).

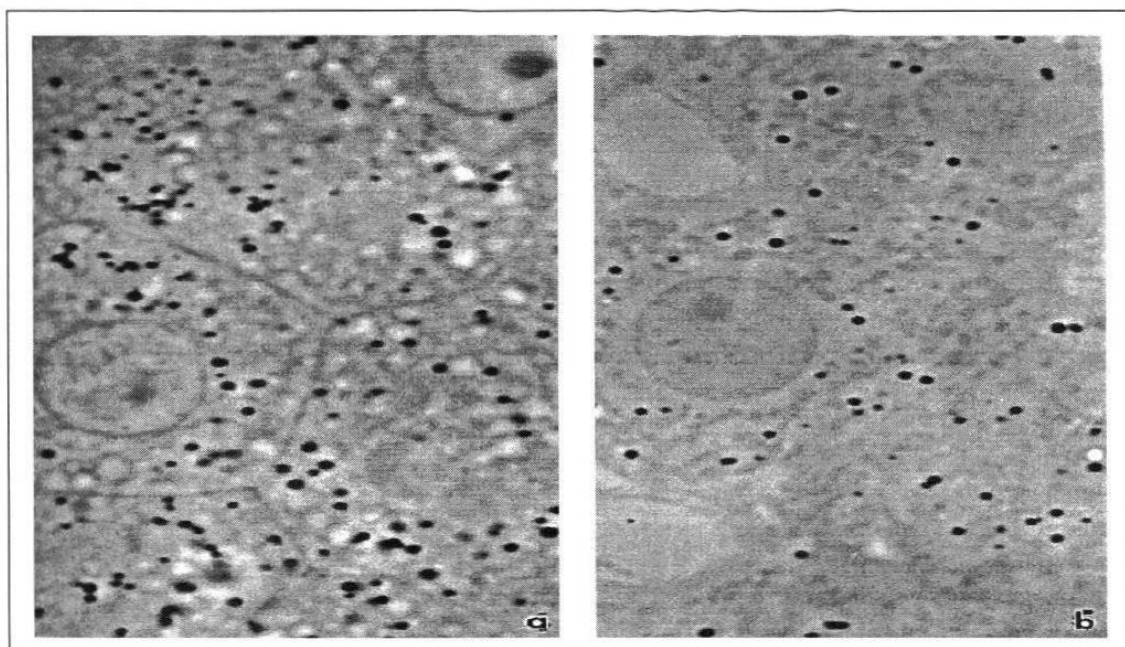


Figura 3. Fotomicrografía de contraste de fases. Cortes de hígado de rata que muestran los peroxisomas teñidos citoquímicamente para la demostración de catalasa. (A) control (B) dos horas después del tratamiento con PA1. Sepúlveda Saavedra y colaboradores, 1998.

En el hígado del mono *macaca fascicularis*, en un modelo *in vitro*, se ha demostrado que esta disminución del número de peroxisomas es causada por la degradación de los peroxisomas por la vía autofágica lisosomal como consecuencia del daño al organelo²² (Figura 4).

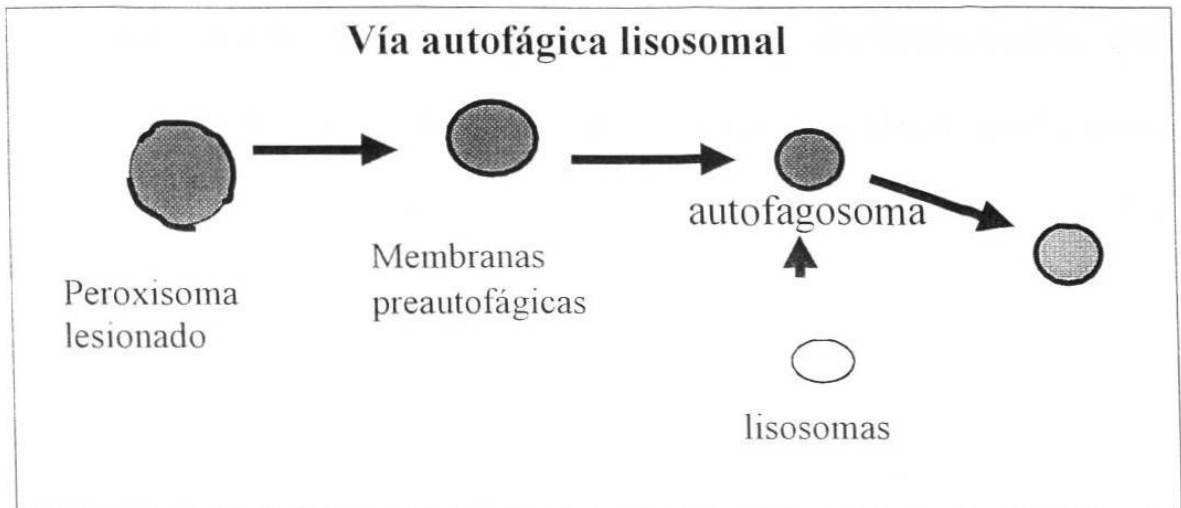


Figura 4. Vía autofágica lisosomal. Moreno Martinez ML. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina, UANL. Agosto 2000.

El peroxisoma es un organelo presente en todas las células eucarióticas, desde levaduras hasta animales superiores, se caracteriza por tener una morfología muy simple: contiene una matriz electrodensa y está rodeado por una membrana única (Figura 5).

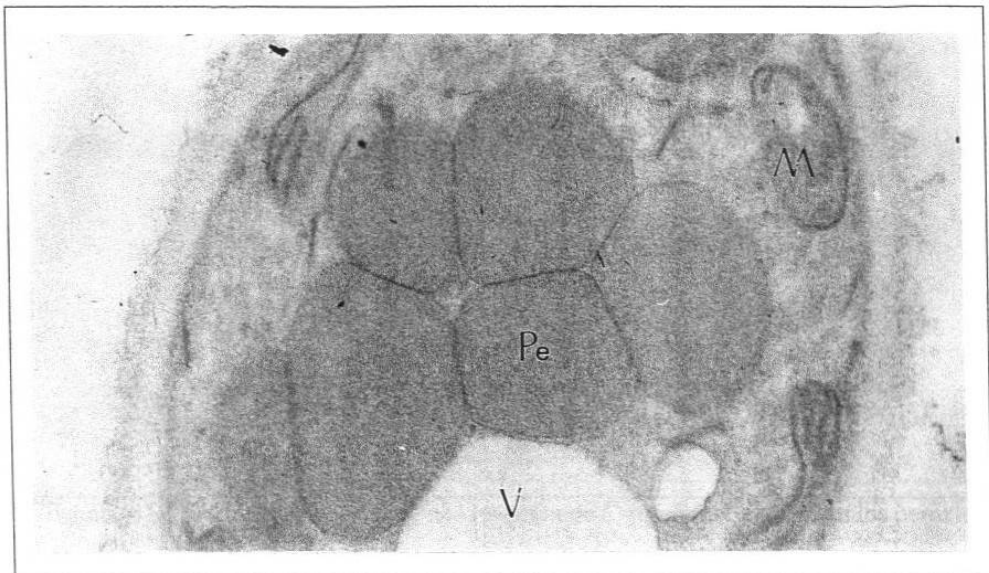


Figura 5. Ultraestructura del peroxisoma, está formado por una membrana única y una matriz electrodensa homogénea. Micrografía electrónica de transmisión, resina epóxica. Acetato de uranilo. 7000x.

Sus funciones principales incluyen reacciones de oxidación en las que participa oxígeno molecular: oxidación de D-aminoácidos y metabolismo de lípidos, varias reacciones en la biosíntesis de plasmalógenos, ácidos biliares y colesterol.²³

Las levaduras son un modelo idóneo para el estudio de la función peroxisomal, ya que a través de la manipulación de los nutrientes del medio donde se cultivan se puede inducir la proliferación de peroxisomas e influir en su composición enzimática²⁴ (Figura 6). Algunas de las enzimas altamente específicas de peroxisomas de levaduras metilotróficas son la alcohol oxidasa, dihidroxiacetona sintasa y la catalasa²⁵.

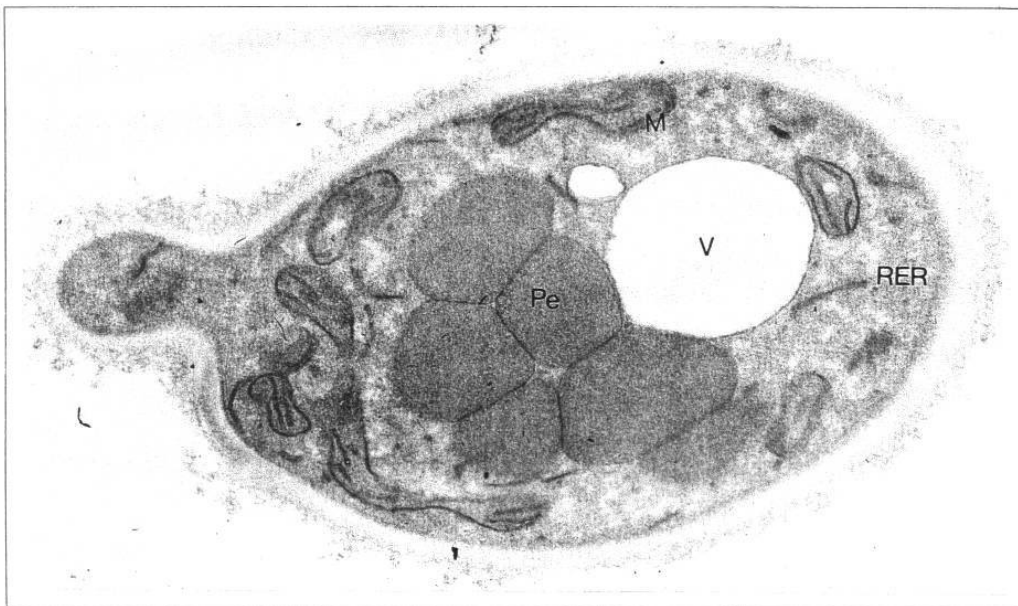


Figura 6. Ultraestructura normal de una levadura de *C. boidinii*. Se aprecian los peroxisomas en el centro (Pe), las mitocondrias hacia la periferia (M), la vacuola autofágica (V) y el retículo endoplásmico rugoso (RER), así como la membrana y pared celular. Micrografía electrónica de transmisión, resina epóxica, acetato de uranilo, 7000x.

En el caso de las levaduras metilotróficas, al cultivarlas en medios con metanol como única fuente de carbono, se induce la proliferación peroxisomal y la síntesis de enzimas que intervienen en el metabolismo del metanol como la enzima alcohol oxidasa. Como resultado se forman grupos de peroxisomas que llegan a ocupar hasta un 80% del volumen celular.²⁶

En 1992 Sepúlveda y colaboradores²⁷ utilizaron levaduras metilotróficas como modelo de estudio para obtener mayor información acerca del efecto de T-514 sobre los peroxisomas. Descubrieron que a dosis no letales T-514 produce daño selectivo e irreversible sobre la membrana peroxisomal (Figura 7). Por ello se le renombró a la T-514 como Peroxisomicina A1 (PA1). A partir de entonces también se renombró al Isómero de posición de T-514 como Isoperoxisomicina A1 (Iso-PA1) y al Diastereoisómero de T-514 como Peroxisomicina A2 (PA2) (Figura 7).

Por otro lado, observaron que cuatro horas después del tratamiento, las levaduras comenzaron a crecer nuevamente, lo que se asoció al desarrollo de peroxisomas pequeños.

Así mismo demostraron que no ocurrió inhibición de la actividad de las enzimas peroxisomales catalasa y alcohol oxidasa.

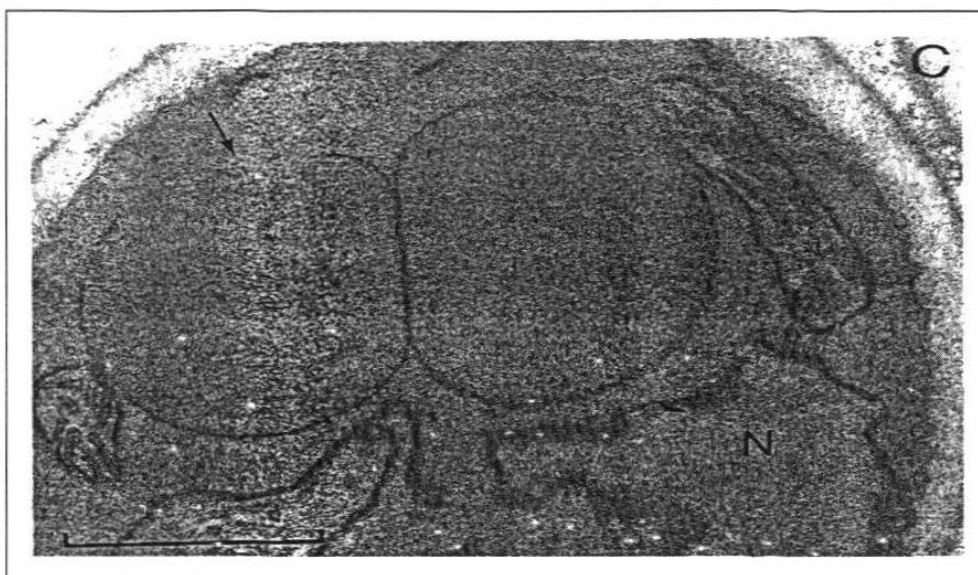


Figura 7. Micrografía electrónica de transmisión. Célula de *H. polymorpha*, incubada 30 minutos en presencia de $2\mu\text{g/ml}$ de PA1 que muestra las interrupciones en la membrana peroxisomal.

Moreno y colaboradores en 1995²⁸ empleando catalasa hepática purificada de tres especies animales, encontraron que la actividad de esta enzima fue inhibida por la PA1 *in vitro*.

Otros compuestos antracénónicos también inhibieron la actividad de la catalasa bovina, estableciéndose una relación entre la estructura química y el grado de inhibición de los compuestos probados. Las toxinas más activas fueron las que poseen dos grupos antracénónicos: PA1 y PA2.²⁸

Posteriormente se intentó demostrar este efecto inhibitorio *in vivo*, reportándose que este efecto no ocurre ni en cortes de tejido hepático de ratón incubados con PA1 ni está presente en el hígado de ratones intoxicados con PA1.²⁹

Estos hallazgos indican que en el ratón la catalasa no parece estar involucrada en el mecanismo que conduce al daño peroxisomal y que su actividad no resulta afectada como consecuencia de éste.²⁹

Considerando el efecto de PA1 ya mencionado y la similitud estructural con otras antracenonas diméricas extraídas de plantas del género *Karwinskia*, Salazar³⁰ investigó si dicho efecto fuese exclusivo de PA1.

Estos estudios demostraron que las toxinas analizadas produjeron una disminución de la viabilidad celular tanto en cultivos con metanol como con glucosa como única fuente de carbono.

A través del análisis morfológico, mediante microscopía de luz, las células cultivadas en metanol en presencia de PA1 mostraron que la PA1 produjo una desorganización celular proporcional a la concentración de la toxina: a 10 µg/ml se observaron vacuolas alargadas con agregados de peroxisomas en su interior, a 50 µg/ml el daño fue más evidente. La IsoPA1 produjo una desorganización muy parecida a la causada por PA1 a las mismas dosis. La PA2 no produjo cambios y la T-544 sólo a dosis elevadas mostró daño similar al observado con 10 µg/ml de PA1. En contraste las células que crecieron en medio con glucosa como única fuente de carbono y en presencia de los compuestos, no mostraron daño a las diferentes concentraciones utilizadas.

Los estudios de microscopía electrónica de transmisión revelaron que las células mostraron cambios desde los 30 minutos sobre los peroxisomas: ruptura de las membranas, incorporación y degradación dentro de la vacuola. Se observó que la intensidad del daño peroxisomal fue proporcional al tiempo de incubación con todos los compuestos utilizados.

Las células expuestas a T-544 mostraron un daño más intenso sobre la membrana peroxisomal en todos los tiempos de exposición, evidenciado por la pérdida completa de la membrana y la presencia de peroxisomas de varios tamaños (Figura 8).

Salazar demostró que la actividad de la catalasa no fue afectada, a pesar de los efectos arriba mencionados, después de 24 horas de exposición a los compuestos antracénicos³⁰. Todos estos hallazgos coinciden con lo reportado anteriormente por Sepúlveda y colaboradores²⁷ y por Moreno y colaboradores²⁹ para la PA1.

En el caso de la T-544 parece no haber correlación entre el daño peroxisomal causado y la viabilidad de la levadura.

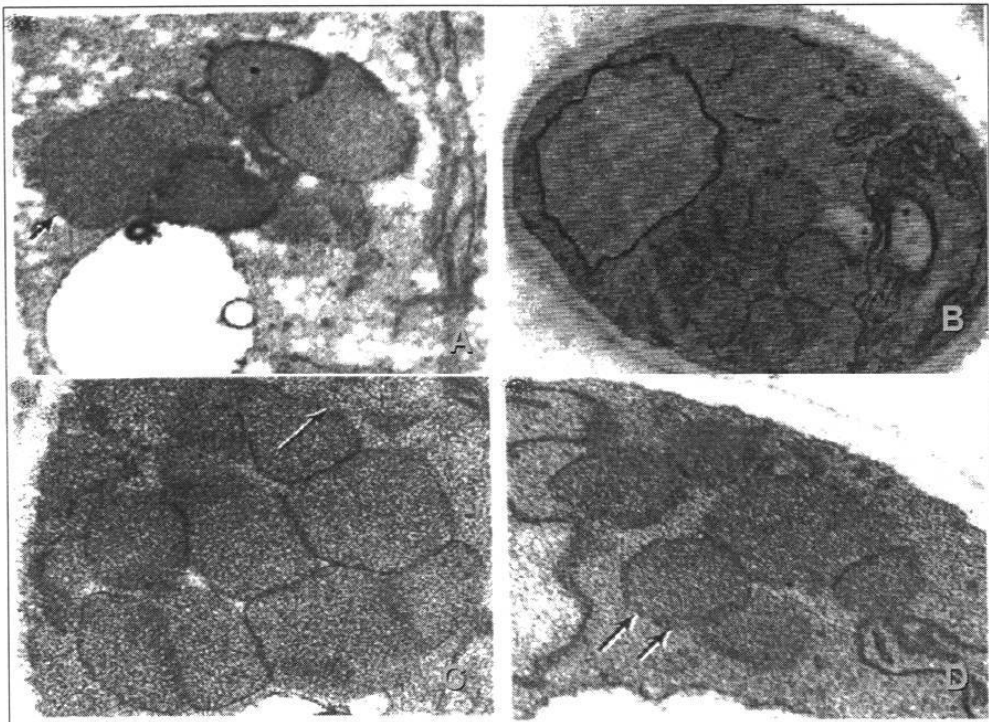


Figura 8. Micrografía electrónica de transmisión. Células de *C. boydii* cultivadas en medio con metanol, expuestas a 2 $\mu\text{g/ml}$ de los compuestos antracénónicos durante 1 hora. (A) PA1, (B) IsoPA1, (C) PA2 y (D) T-544. Se observan sus efectos sobre los peroxisomas. 12000x. Salazar Aranda R. Tesis de Maestría, Facultad de Medicina, U.A.N.L. 1997.

1.2 Justificación

Conocer el grado de toxicidad de PA1, IsoPA1, PA2 y T544 sobre los peroxisomas, nos permitirá correlacionar la estructura química de cada compuesto con los efectos observados y así contribuir al conocimiento de su mecanismo de acción.

1.3 Hipótesis

Existen diferencias en la intensidad de la lesión producida por cada una de las antracenonas diméricas PA1, PA2, IsoPA1 y T-544 sobre los peroxisomas de *C. boidinii* que se pueden evidenciar mediante un análisis morfométrico comparativo.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

Cuantificar, mediante un estudio morfométrico, el daño causado por PA1, IsoPA1, PA2 y T-544, sobre los peroxisomas de *C. boidinii*.

1.4.2 Objetivos Específicos

- 1.- Calcular la densidad numérica de las levaduras con daño peroxisomal presentes en los cultivos tratados y control sin tratamiento.
- 2.- Calcular la densidad numérica de los peroxisomas presentes tanto en las levaduras tratadas como en las levaduras control sin tratamiento.
- 3.- Calcular la densidad numérica de los peroxisomas lesionados presentes tanto en las levaduras tratadas como en las levaduras control sin tratamiento.
- 4.- Realizar la contrastación estadística de los efectos de las diferentes toxinas sobre las células de *C. boidinii* y respecto a las células control.

CAPITULO 2

MATERIAL Y METODOS

2.1 Material

2.1.1 Reactivos

Acetato de uranilo

Alcohol etílico al 50%

agua ultra pura

2.1.2 Material biológico

Muestras de *C. boidinii* incubadas con PA1, IsoPA1, PA2 o T544, incluidas en resina epóxica.

2.1.3 Equipo

Microscopio estereoscópico

Ultramicrotomo RMC MT-X

Cuchillas de cristal

Cuchilla de diamante

Microscopio electrónico ZEISS EM109

Amplificadora fotográfica

Computadora personal

Software NCSS[®]

2.2 Estrategia experimental

Se partió de bloques de resina epóxica, con muestras de *Candida boidinii* incubadas con cada una de las cuatro toxinas: PA1, IsoPA1, PA2 o T544 a una dosis de 2 µg/ml durante 2 horas y un control de células que no fueron expuestas a toxina alguna (Figura 9).

Estos bloques fueron proporcionados por Salazar-Aranda quien los preparó durante la realización de su trabajo de tesis de maestría.

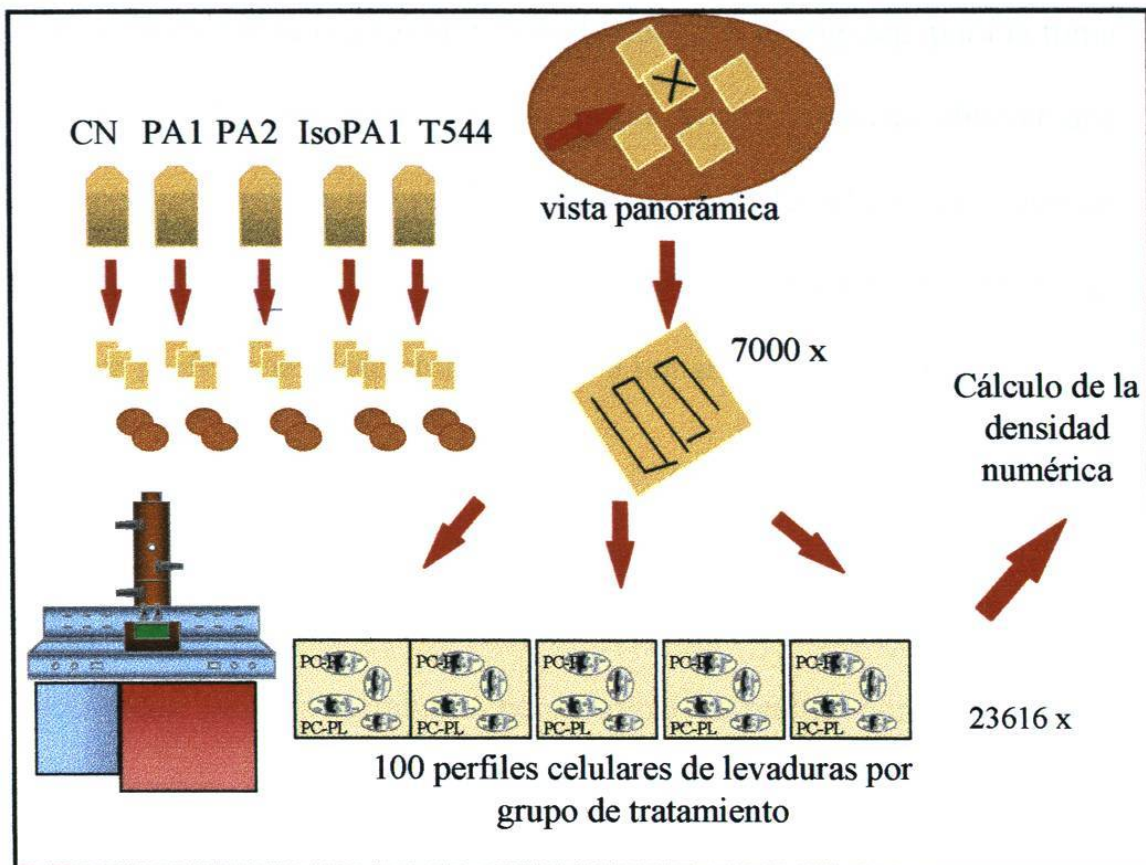


Figura 9. Esquema que muestra la estrategia general aplicada en el presente estudio para reunir la muestra de micrografías y realizar el cálculo de la densidad numérica.

Se obtuvieron cortes finos de los bloques de resinas epóxicas en un ultramicrotomo RMC MT-X con cuchilla de diamante los cuales se montaron sobre rejillas de cobre 200 mesh, se contrastaron con acetato de uranilo y se llevaron a observación a un microscopio electrónico de transmisión ZEISS EM109.

Una vez en el microscopio bajo una vista panorámica se seleccionó aleatoriamente uno de los cortes presentes, el cual fue centrado y amplificado a 7000x.

Posteriormente se realizó un recorrido del corte en zig-zag para la toma de las micrografías. Se observaron los cortes necesarios hasta obtener una muestra con un total de 100 perfiles celulares de la levadura por grupo de tratamiento. Por ultimo se imprimieron dichas micrografías en papel fotográfico profesional Kodabrome II Rc F3 tamaño 203 x 240 mm.

El calculo de la densidad numérica celular total y posteriormente de la densidad numérica de los perfiles celulares que presentaron alguna solución de continuidad sobre la membrana peroxisomal, se realizó por el método de conteo de puntos, por cuadruplicado (Figura 10).

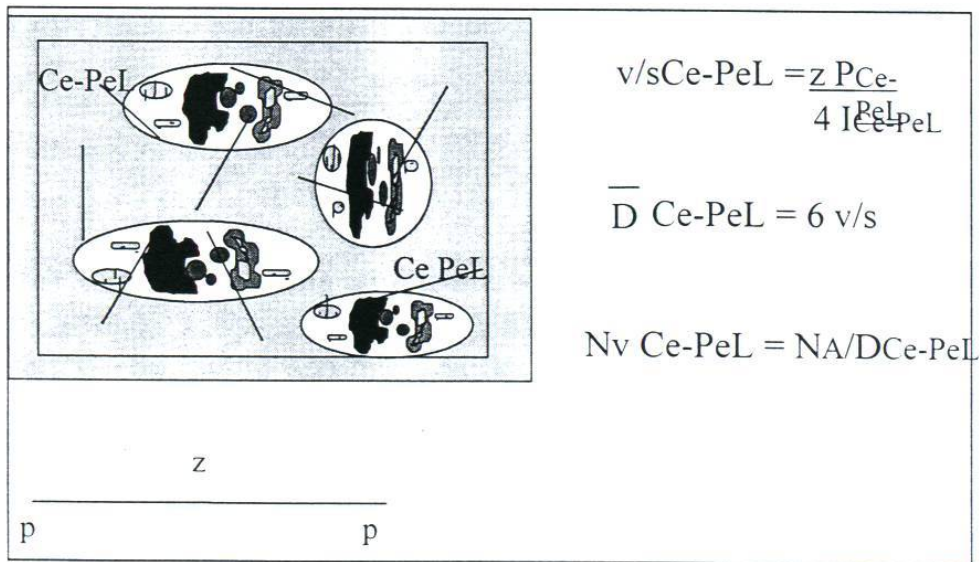


Figura 10. Gráfico que muestra la forma en que se sobrepone la plantilla morfométrica sobre la micrografía así como las fórmulas morfométricas empleadas según Weibel y colaboradores³¹.

En este método se hace uso de una plantilla morfométrica que se sobrepone en las micrografías y se cuenta el número de intersecciones de las líneas de prueba sobre el perfil de las estructuras de interés (perímetro de las levaduras y de los peroxisomas), así como el número de extremos de las líneas que cayeron dentro de dichas estructuras. Posteriormente mediante la aplicación de fórmulas morfométricas se calcula la proporción volumen/superficie, diámetro de las estructuras y densidad numérica de las mismas.

De las muestras de micrografías arriba mencionadas, se seleccionaron al azar un grupo de ellas y se llevaron a la mayor ampliación posible, de tal forma que la imagen ampliada de los perfiles celulares no rebasara el tamaño de un papel de impresión de 101 mm x 127 mm, logrando una ampliación sobre el papel de 40891x. Se excluyeron todos aquellos perfiles celulares que a la misma ampliación rebasaron los límites del papel fotográfico. Se reunió una muestra de 30 impresiones fotográficas con un número variable de perfiles peroxisomales en su interior (Figura 11).

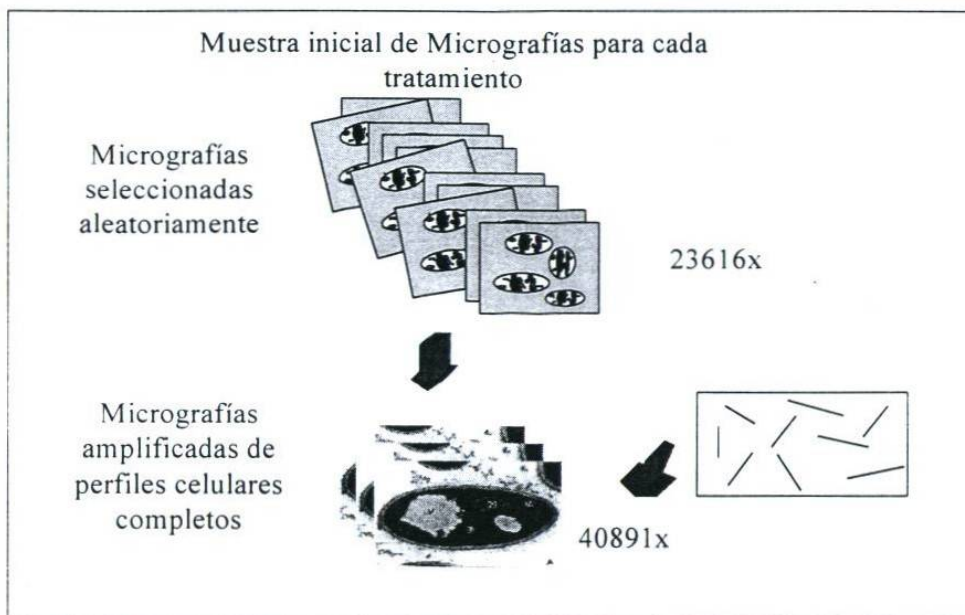


Figura 11. Esquema que muestra la estrategia aplicada para obtener la muestra de micrografías y realizar el cálculo de la densidad numérica peroxisomal.

Sobre dichos perfiles y nuevamente mediante el método de conteo de puntos se calculó la densidad numérica peroxisomal total y la densidad numérica de peroxisomas lesionados.

La contrastación estadística de los efectos de las diferentes toxinas sobre las células de *C. boidinii* se analizó mediante estadística descriptiva. La comparación entre las muestras se realizó mediante la prueba de ANOVA para determinaciones múltiples.

CAPITULO 3

RESULTADOS

3.1 Análisis Morfológico

Las micrografías del grupo control exhibieron a las levaduras con una morfología normal. Se apreciaron los perfiles de *C. boidinii* bien definidos, el núcleo con membrana íntegra y nucleoplasma con electrodensidad heterogénea, localizado en el centro del citoplasma pero ligeramente desplazado a la periferia por los peroxisomas, los cuales presentaron varios tamaños, perfiles bien definidos, membrana íntegra, matriz de electrodensidad homogénea, agrupados en el ecuador de la célula; mitocondrias localizadas hacia la periferia, alargadas, otras esféricas, con sus membranas íntegras y tamaño dentro de parámetros normales, algunas

en proceso de división; retículo endoplásmico rugoso (RER) hacia la periferia del citosol, sin alteraciones aparentes y por último la vacuola digestiva en posición central y con escaso contenido de material electrodenso en su interior (Figura 12).



Figura 12. Grupo control negativo, se aprecian dos levaduras en proceso de división por gemación. Los perfiles celulares muestran una morfología normal. Sólo se aprecia el efecto inductor del metanol sobre el número de peroxisomas (Pe) los cuales se encuentran localizados en el ecuador de la célula. También se observa la morfología normal del núcleo (N), mitocondrias (M) y vacuola (V). Micrografía electrónica de transmisión, resina epóxica, acetato de uranilo 7000x.

El grupo tratado con PA1 mostró los peroxisomas de varios tamaños, con fragmentación de la membrana peroxisomal y en algunos casos dichos peroxisomas se encontraron rodeados por membranas preautofágicas, muy cerca de la vacuola, o incluso dentro de la misma.

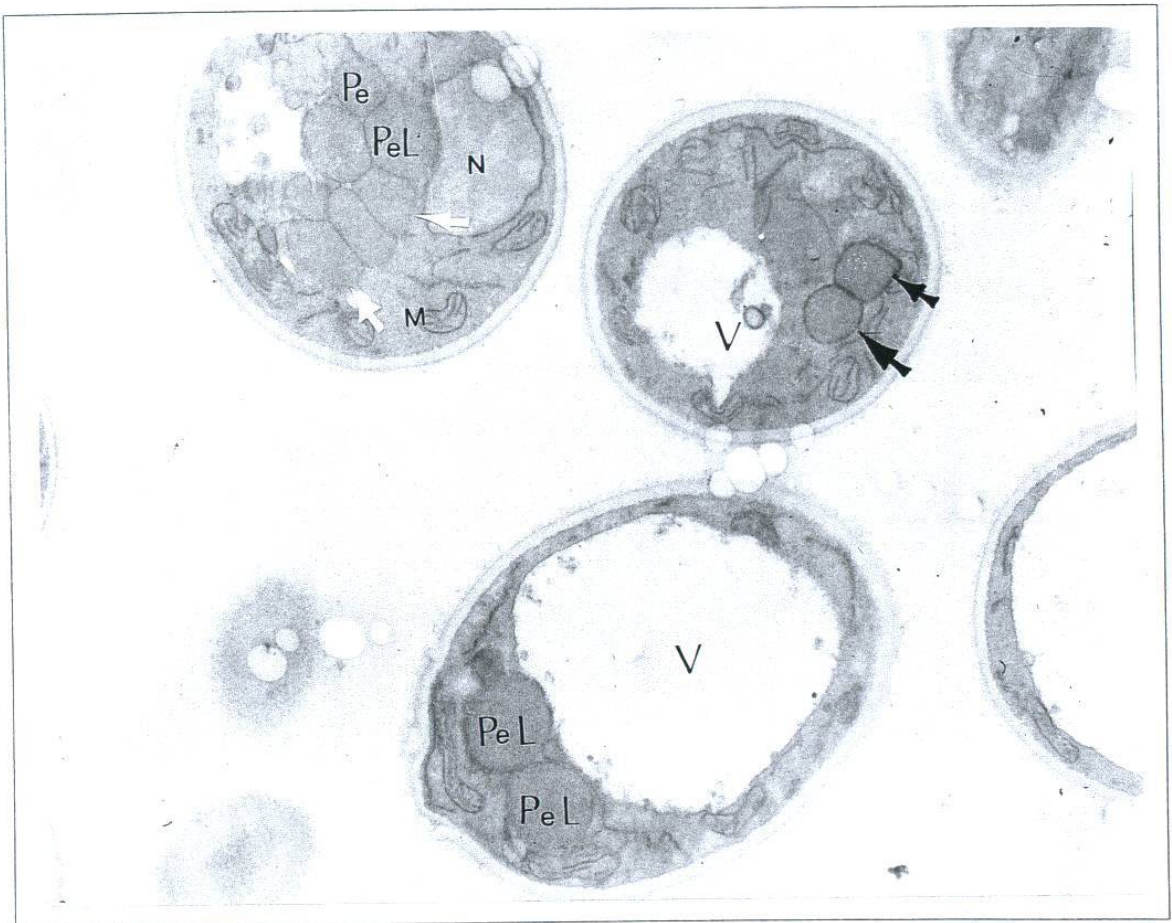


Figura 13. Células de *C. bovidinii* tratadas con PA1 a dosis de 2 $\mu\text{g/ml}$ durante dos hrs. Se aprecia que el número de peroxisomas (Pe) disminuyó notablemente en relación al grupo control, también se observan algunos peroxisomas con ruptura de su membrana (PeL). Las flechas claras indican el sitio de ruptura de la membrana peroxisomal, las flechas oscuras indican a las membranas preautofágicas que rodean a algunos peroxisomas lesionados. Micrografía electrónica. Inclusión en resinas epóxicas. Acetato de uranilo. 7000x.

Se observó la vacuola aumentada de tamaño con relación al grupo control, con mayor cantidad de material electrodenso en su interior y localizada en el centro de la célula. Las mitocondrias, RER y el núcleo sin alteración aparente (Figura 13).

Los perfiles celulares de las levaduras que fueron incubadas con IsoPA1 presentaron cambios morfológicos similares a los que se observaron en el grupo tratado con PA1. Además, las mitocondrias exhibieron formas irregulares alejándose de las descripciones clásicas: cilíndricas o esféricas. El tamaño también fue altamente anormal, se apreciaron megamitocondrias ubicadas hacia la periferia. No se apreciaron alteraciones en otros organelos subcelulares (Figura 14).

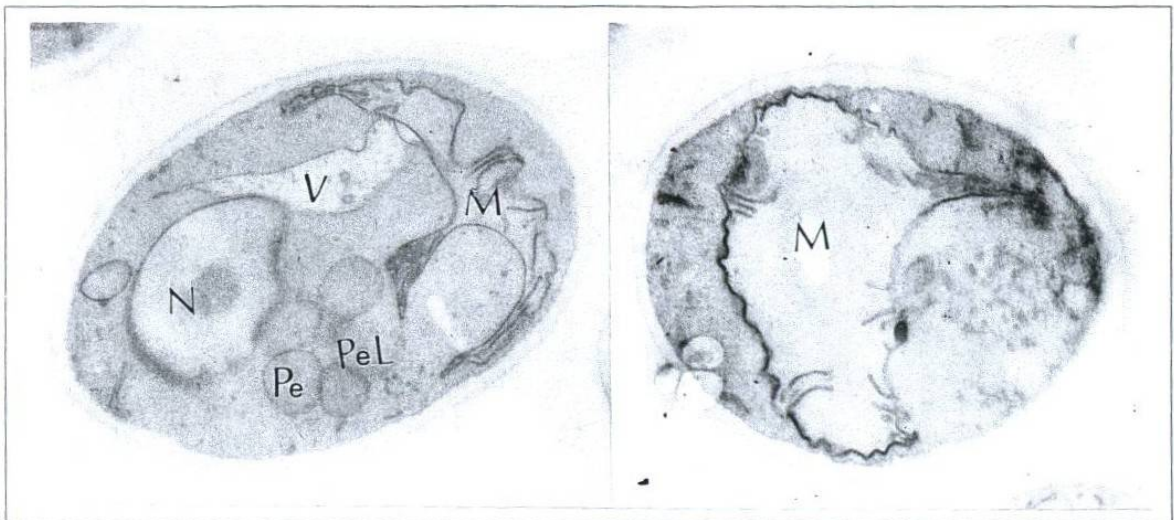


Figura 14. Células de *C. boidinii* incubadas con IsoPA1 a dosis de 2 $\mu\text{g/ml}$ durante dos horas donde se indican con flechas las lesiones sobre la membrana peroxisomal (PeL), también se puede ver que las mitocondrias (M) presentan formas y tamaño anormales. Otros organelos presentes son la vacuola (V) y el núcleo (N). Micrografía electrónica. Inclusión en resinas epóxicas. Acetato de uranilo. 7000x.

En el grupo tratado con PA2 también se observaron soluciones de continuidad en la membrana de los peroxisomas, al igual que con PA1 e IsoPA1. Las mitocondrias exhibieron formas anormales: aquí se aprecian alargadas. También mostraron volumen ligeramente mayor que las del grupo control. Aunque esta alteración no es tan exagerada como ocurrió con el grupo de IsoPA1(Figura 15).

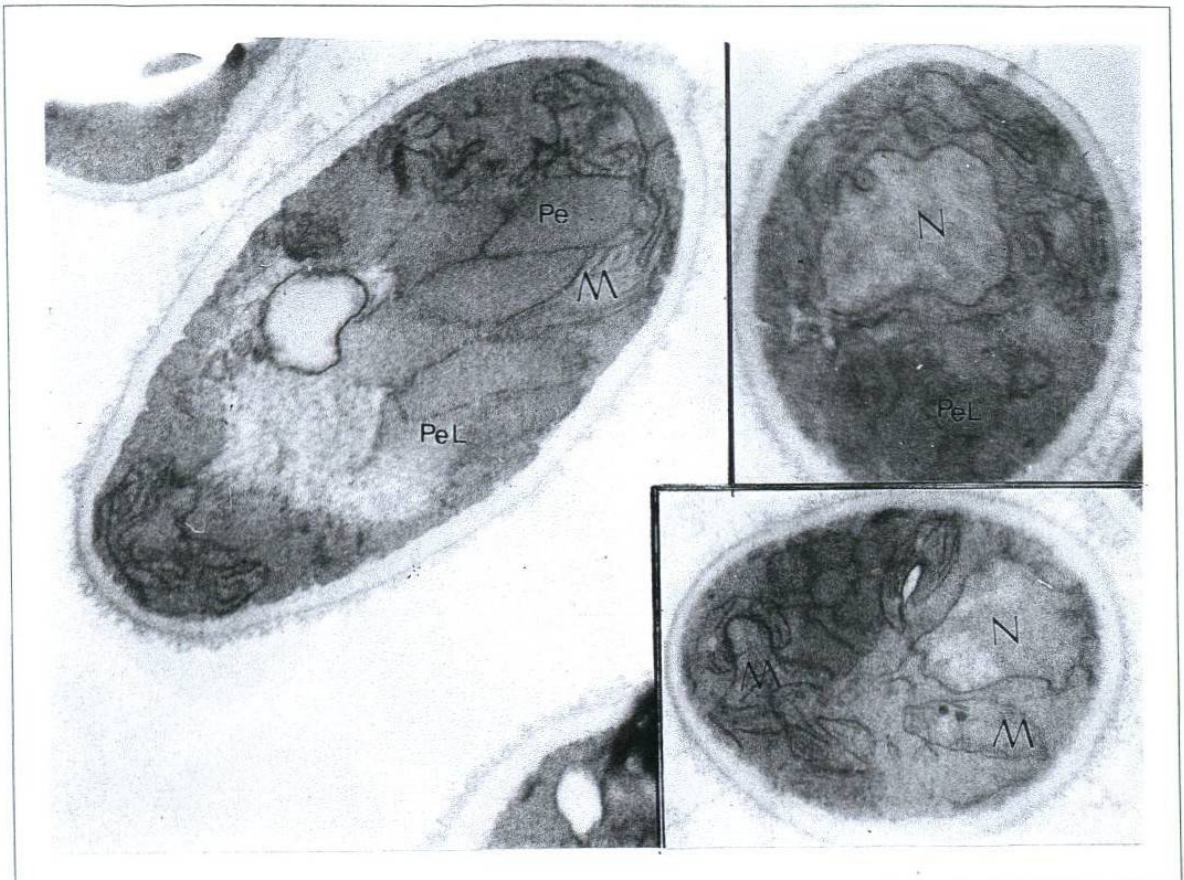


Figura 15. Células de *C. bovidinii* incubadas con PA2. Se aprecian las mitocondrias (M) de forma y tamaños anormales. También se aprecian otras estructuras como el núcleo (N), y los peroxisomas (Pe), algunos de los cuales presentan la solución de continuidad en su membrana (PeL). Micrografía electrónica. Inclusión en resinas epóxicas. Acetato de uranilo. 7000x.

El grupo tratado con T544 mostró una mayor masa peroxisomal con relación al grupo tratado con PA1. estos peroxisomas se localizaron en el ecuador de la célula. Existieron peroxisomas con soluciones de continuidad sobre sus membranas. Además se observó la presencia de peroxisomas de diversos tamaños como lo reportó Salazar y colaboradores. Las mitocondrias y demás estructuras subcelulares presentaron forma, volumen y distribución normales (Figura 16).

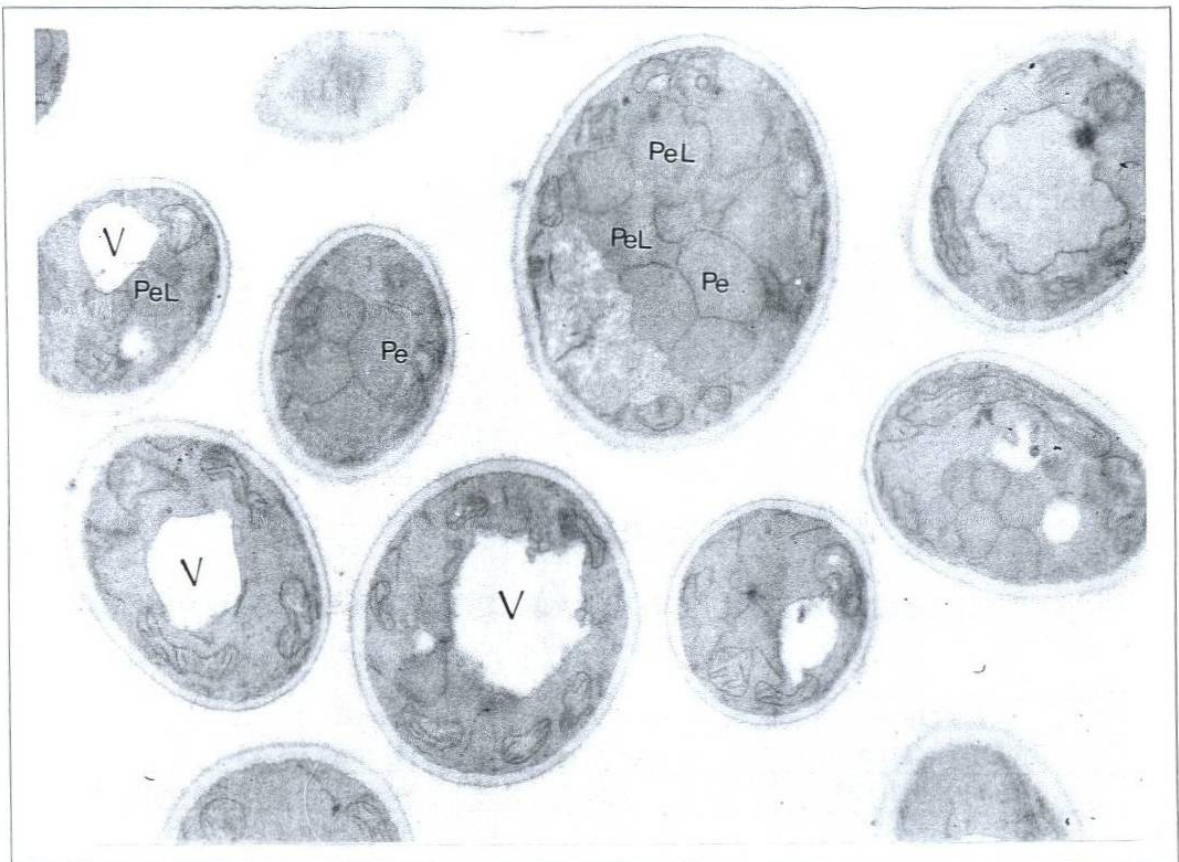


Figura 16 Celulas de *C. bodinii* incubada con T-544 a dosis de $2 \mu\text{g/ml}$ durante 2 horas. Se observa una mayor masa de peroxisomas de varios tamaños, tanto integros (Pe), como peroxisomas lesionados (PeL), localizados en el ecuador de la célula. Micrografía electrónica. Inclusión en resinas epóxicas. Acetato de uranilo $7000\times$.

3.2 Análisis Morfométrico.

El diámetro promedio de las células de *C. boidinii* sobre las micrografías fue de 54.8 mm con una desviación estándar de ± 12.95 mm, que equivale en dimensiones reales 2.32 ± 0.6 micras.

El grupo control no mostró perfiles peroxisomales con alguna solución de continuidad sobre su membrana, el número de perfiles celulares con al menos un peroxisoma lesionado (densidad numérica de las células con peroxisomas lesionados o NvCel-PeL) por grupos de tratamiento se muestra en la tabla 1.

TABLA 1

**DENSIDAD NUMERICA CELULAS CON PEROXISOMAS LESIONADOS
(NvCel-PeL)**

	Densidad numérica	Desviación estándar	ANOVA Alfa = 0.05
Grupo control	0.0	0.0	P < 0.0000001
PA1	919.7	47.5	
IsoPA1	867.2	48.9	
PA2	863.4	81.2	
T-544	646.9	33.4	P < 0.0000001

PA1, Peroxisomicina A1; IsoPA1, isoperoxisomicina A1; PA2, peroxisomicina A2 y T-544.

La contrastación estadística de NvCel-PeL por grupos de tratamiento, mediante la prueba de ANOVA para determinaciones múltiples, no evidenció diferencia significativa entre PA1, IsoPA1 y PA2. En cambio, tanto el grupo control como el grupo tratado con T544 tuvieron una cuenta inferior con relación a dichos compuestos y la diferencia fue estadísticamente significativa ($P < 0.0000001$) (Figura 17).

Efecto de los compuestos antracénónicos sobre *C. boidinii*

Densidad numérica de células con peroxisomas lesionados

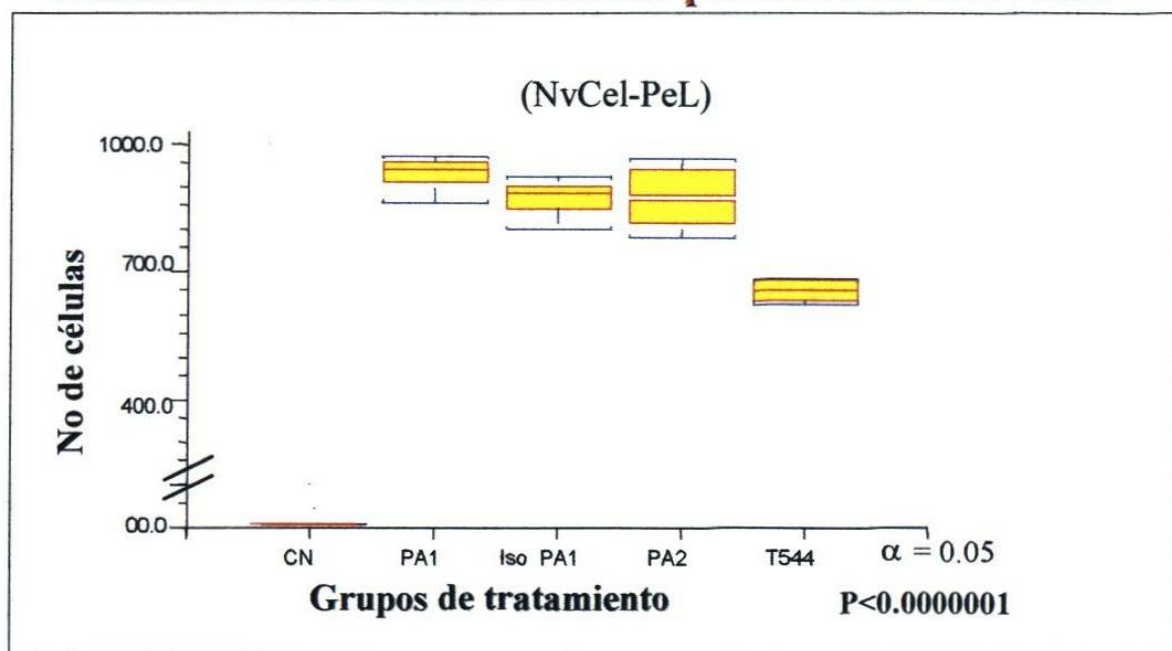


Figura 17. - Gráfica de cajas donde se observa el número de células de *C. boidinii* con al menos un peroxisoma lesionado en su citosol por grupos de tratamiento. Existe una diferencia estadística entre el grupo control y los grupos tratados con los diferentes compuestos antracénónicos. Así como de T544 con relación a los otros compuestos. ANOVA alfa 0.05.

El cálculo del número total de peroxisomas por célula (densidad numérica peroxisomal total o NvPe Total) por grupos de tratamiento se muestran en la tabla 2.

TABLA 2
DENSIDAD NUMERICA PEROXISOMAL TOTAL
(NvPe-Total)

	Densidad numérica	Desviación estándar	ANOVA Alfa = 0.05
Grupo control	2020.2	123.3	P = 0.000063
Pa1	1534.0	60.7	P = 0.000063
IsoPa1	1770.1	123.8	
Pa2	1707.9	110.4	
T544	1654.3	82.2	

PA1, peroxisomicina A1; IsoPA1, isoperoxisomicina A1; PA2, peroxisomicina A2 y T-544.

El grupo control tuvo el mayor número de peroxisomas (densidad numérica peroxisomal total) de todos los grupos de tratamiento, PA1 tuvo el menor; ambos conteos fueron estadísticamente diferentes a los de IsoPA1, PA2 y T544, (ANOVA $p= 0.000063$), estos últimos tuvieron conteos muy similares entre sí y no se encontró diferencia estadística significativa entre ellos (Figura 18).

Efecto de los compuestos antracénicos sobre *C. boidinii*

Densidad numérica peroxisomal total

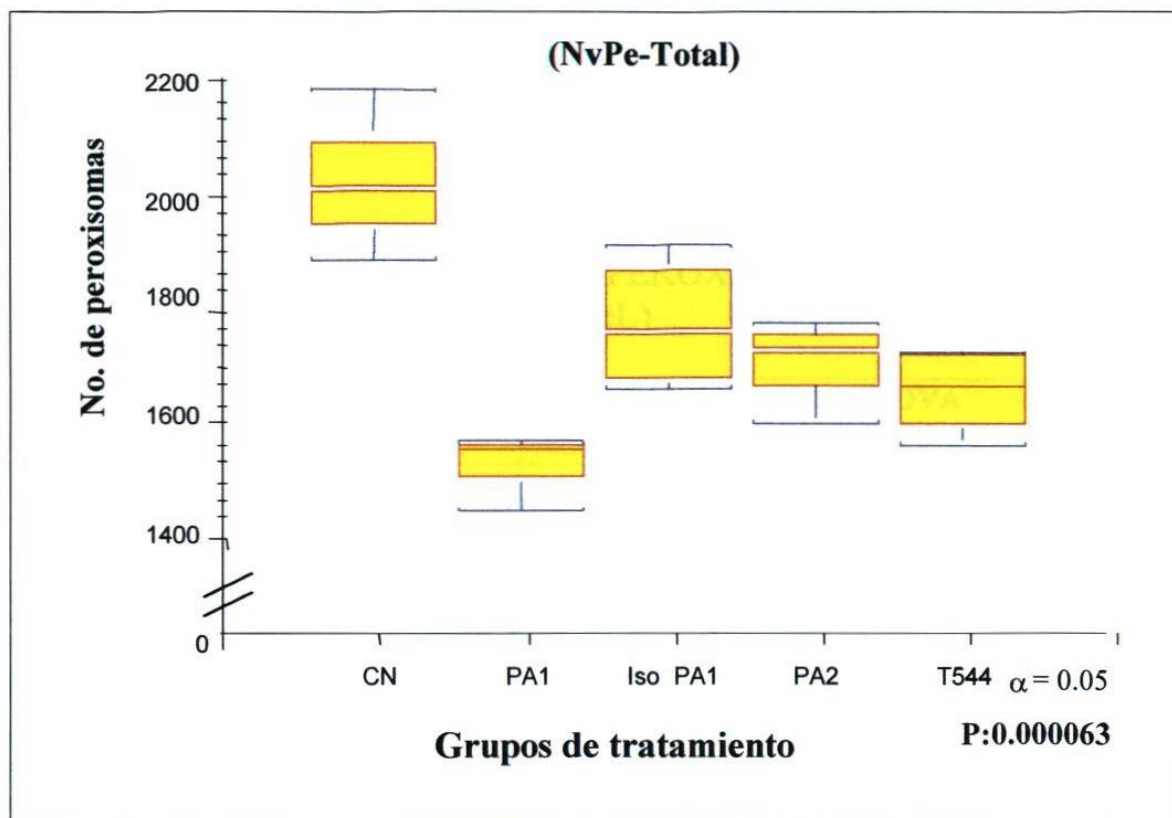


Figura 18. - Gráfica de cajas donde se aprecia el número total de peroxisomas (NvPe-Total) por grupos de tratamiento, existe diferencia estadística entre el grupo control y los grupos de tratamiento, así mismo se aprecia que el grupo tratado con PA1 fue el que tuvo una menor NvPe total que los grupos tratados con los otros compuestos antracénicos.

Al contabilizar el número de peroxisomas con ruptura de su membrana por grupos de tratamiento (densidad numérica de peroxisomas lesionados o NvPeL) se observó que PA1 tuvo una cantidad menor que los demás grupos, siendo estadísticamente diferente, en cambio Iso PA1, PA2 y T544 tuvieron cuentas muy similares entre sí, sin que se pudiera establecer una

diferencia estadística significativa entre ellos como se puede ver en la tabla 3.

TABLA 3

DENSIDAD NUMERICA DE LOS PEROXISOMAS LESIONADOS (NvPeL)

	Densidad numérica	Desviación estándar	ANOVA Alfa = 0.05
Grupo control	<200	10.3	P < 0.0000001
Pa1	728.6	26.1	P < 0.0000001
IsoPa1	928.6	80.6	
Pa2	856.2	52.2	
T544	809.9	44.7	

PA1, peroxisomicina A1; IsoPA1, isoperoxisomicina A1; PA2, peroxisomicina A2 y T-544.

Únicamente el grupo control negativo y el grupo tratado con PA1 mostraron una diferencia estadísticamente significativa en relación el resto de los grupos de tratamiento (**P < 0.0000001**) (Figura 19).

Efecto de los compuestos antracénicos sobre *C. boidinii*

Densidad numérica de los peroxisomas lesionados

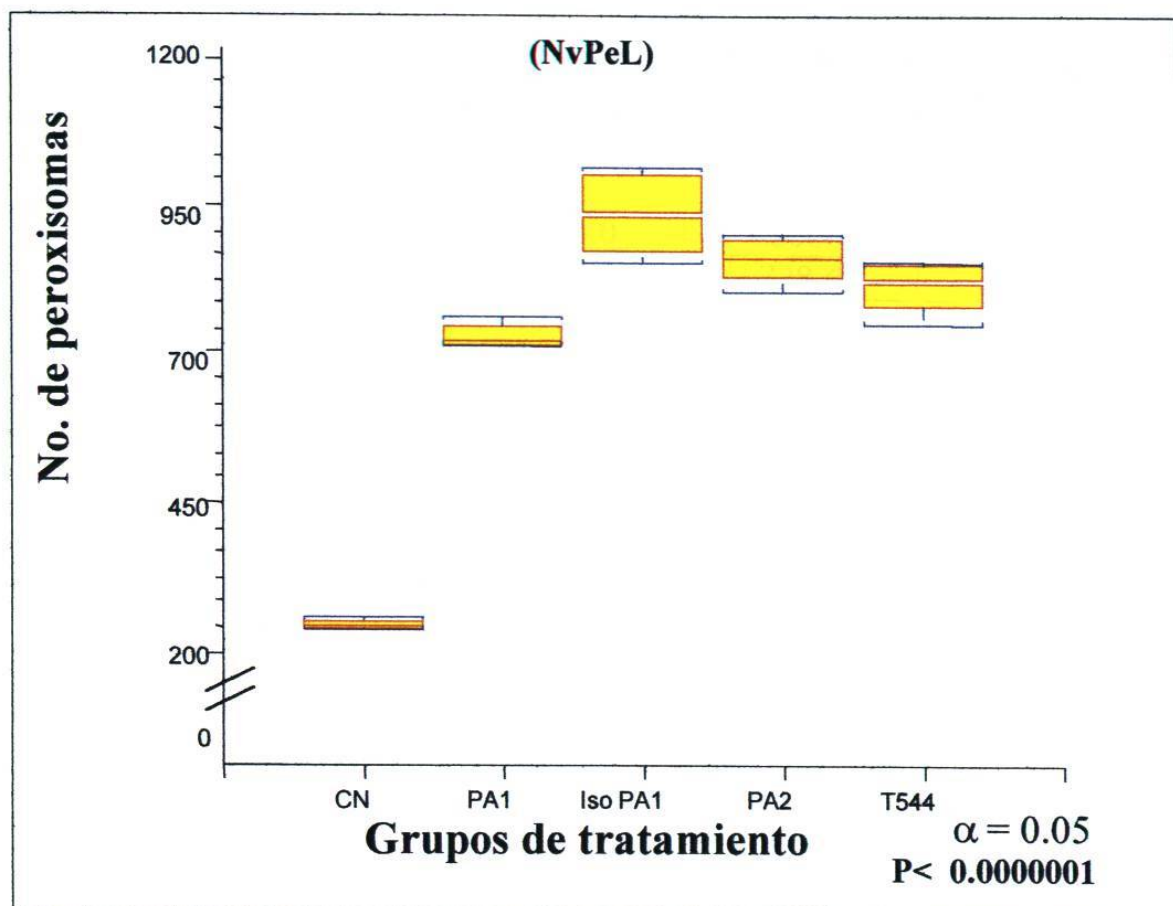


Figura 19. - Gráfica de cajas que muestra el número de peroxisomas lesionados por grupos de tratamiento.

El grupo tratado con PA1 fue el que mostró el menor número de peroxisomas lesionados con relación a los otros grupos de tratamiento, el grupo control mostró el menor número de peroxisomas lesionados.

La tabla 4 muestra los datos de todas las mediciones efectuadas por grupos de tratamiento, donde se puede observar que la proporción de

peroxisomas lesionados y peroxisomas totales entre PA1 y T544 fue igual.

Dicha proporción fue diferente a la que presentan IsoPA1 y PA2.

TABLA 4

**RESUMEN DE LAS DENSIDADES NUMERICAS CALCULADAS
PARA LOS DIFERENTES GRUPOS DE TRATAMIENTO.**

Grupos de tratamiento	NvCel-PeL	NvPe-Total	NvPeL	NvPeL/NvPe-Total
Grupo control	0.0	2020.0	<200.0	9.9%
PA1	919.7	1534.0	728.6	47.5%
IsoPA1	867.2	1770.1	928.6	52.4%
PA2	863.4	1707.9	856.2	50.1%
T544	646.9	1654.3	809.9	47.9%

CN, Control negativo; PA1, peroxisomicina A1; IsoPA1, isoperoxisomicina A1; PA2, peroxisomicina A2 y T-544.

CAPITULO 4

DISCUSION

En el presente estudio se comprobó la hipótesis de que los compuestos antracénicos analizados: PA1, IsoPA1, PA2 y T544, fueron capaces de lesionar la membrana peroxisomal de *C. boidinii* con diferente intensidad.

Este trabajo se diseñó con el propósito de conocer el grado de toxicidad de dichos compuestos sobre los peroxisomas de *C. boidinii*, y correlacionar su estructura química con la magnitud del daño observado.

La toxicidad se evaluó mediante la cuantificación morfométrica de la lesión sobre la membrana peroxisomal, partiendo del supuesto de que las diferencias en la intensidad de la lesión se pueden evidenciar mediante un análisis morfométrico comparativo.

A través del análisis morfológico se comprobó una vez más la lesión sobre la membrana peroxisomal que producen PA1, IsoPA1, PA2 y T-544,

lo que concuerda con los estudios de Sepúlveda Saavedra y colaboradores²⁶, y Salazar Aranda³⁰.

Aun cuando en las observaciones por microscopía de contraste de fases de los cultivos que crecieron en metanol como fuente única de carbono y en presencia de PA2, Salazar Aranda no observó cambios en la organización celular de *C. boidinii*, en los estudios de microscopía electrónica de transmisión realizados por él mismo, demostró que PA2 produjo lesión sobre la membrana peroxisomal. En nuestro estudio además de corroborar lo reportado por Salazar Aranda³⁰ de que PA2 es capaz de producir ruptura de la membrana peroxisomal también observamos que este compuesto puede producir cambios en la morfología normal de la mitocondria, efecto que también lo presentaron las células de *C. boidinii* incubadas con IsoPA1.

En las células incubadas con IsoPA1 y PA2, observamos formas irregulares y abigarradas de las mitocondrias así como el tamaño de las mismas fuera de parámetros normales, lo cual no se había reportado con anterioridad, aunque con PA2 aparentemente la magnitud del daño mitocondrial fue menor. A diferencia de estos dos compuestos, hasta el momento no se ha reportado que PA1 haya producido daño a otros organelos celulares.

Lo anterior indica que las características estructurales comunes de PA1, IsoPA1, PA2 y T544 podrían ser las responsables del daño peroxisomal y que las diferencias existentes en IsoPA1 y PA2 respecto a PA1 las responsables de producir alguna lesión mitocondrial o en otros organelos.

En un estudio previo Moreno²⁸ y colaboradores reportaron relaciones estrechas entre la estructura química y el efecto (grado de inhibición de la catalasa bovina) de los compuestos antracénicos. Ellos también reportaron que las toxinas más activas son las que poseen dos grupos antracénicos: PA1 y PA2.

Estudios más minuciosos en este sentido deberán ser implementados en un futuro con el fin de determinar si existe lesión en otros organelos, o incluso en otros modelos celulares, así mismo para confirmar el daño mitocondrial observado y el mecanismo por el cual se produce.

Por último, también en este estudio se observó la presencia de peroxisomas de varios tamaños en las micrografías de todos los grupos de tratamiento, aunque el tamaño del perfil de cualquier estructura está influenciado por el nivel al cual pase la cuchilla al momento del corte. Este estudio no incluyó algún método para medir dicho parámetro.

En el análisis morfométrico pudimos observar diferencias estadísticamente significativas en la capacidad para producir la lesión peroxisomal entre PA1 y T544, capacidad que influyó en la densidad numérica (conteo) de células con peroxisomas lesionados (NvCel-PeL), correlacionando con lo reportado por Salazar³⁰.

Los cultivos incubados con PA1, IsoPA1 y PA2 tuvieron NvCel-PeL muy similares entre sí, dichas densidades resultaron ser mayores a la del grupo tratado con T544. Esto puede deberse a las diferencias estructurales entre las moléculas de los compuestos.

Todos los compuestos antracénónicos analizados produjeron la lesión sobre la membrana peroxisomal. Al calcular la densidad numérica peroxisomal total (NvPe-Total ó número total de peroxisomas por célula) así como el número de peroxisomas con lesión sobre su membrana (densidad numérica de peroxisomas lesionados NvPeL), se encontró que el grupo tratado con PA1 fue el que tuvo el conteo menor, tanto de peroxisomas totales como de peroxisomas lesionados en relación con los otros grupos de tratamiento, los cuales no mostraron diferencia estadística entre ellos. Una vez más PA1 fue la más activa y T544 la menos activa, resultados que coinciden de nuevo con lo reportado por Salazar³⁰.

La baja densidad numérica peroxisomal total y baja densidad numérica de peroxisomas lesionados mostradas por PA1 muy probablemente se debieron a que su toxicidad aceleró la tasa de recambio peroxisomal en las células de este grupo.

No fue posible establecer una clara diferencia entre los efectos de PA2 e IsoPA1 en relación con T544 y PA1 ya que al mismo tiempo que mostraron un número menor de células con al menos un peroxisoma lesionado con relación a T544, también mostraron un número mayor de peroxisomas totales que el encontrado en el grupo tratado con PA1. Aún cuando Salazar había reportado que IsoPA1 mostró un efecto similar al de PA1 tanto en la magnitud del daño peroxisomal como en la desorganización celular, en nuestro estudio no fue posible confirmarlo ya que encontramos que IsoPA1 produjo un menor efecto sobre los peroxisomas que PA1 y dicho efecto fue muy similar al que produjo PA2.

Es posible que exista tal diferencia pues adicionalmente, en el análisis morfológico, se evidenció que PA2 e IsoPA1 tienen efectos en otros organelos como la mitocondria, como ya se había comentado en párrafos anteriores. Será necesario el diseño de otros estudios para esclarecer si existe diferencia tanto en su grado de toxicidad como en su mecanismo de acción.

En resumen, se concluye que PA1 es más tóxica para los peroxisomas que T544, pues aunque proporcionalmente la cantidad de peroxisomas lesionados fue la misma (47%) con ambos compuestos, la PA1 tuvo menor cuenta peroxisomal total por célula, menor número de peroxisomas lesionados, y a la vez mayor número de células con daño peroxisomal que T544. En éste último compuesto el efecto fue exactamente el contrario: mayor número de peroxisomas totales, y como consecuencia de peroxisomas lesionados por célula, pero el número de células con peroxisomas lesionados fue menor.

CAPITULO 5

CONCLUSIONES

Se comprueba la hipótesis de que existen diferencias en la intensidad de la lesión producida por los compuestos antracénicos analizados sobre los peroxisomas de *C. boidinii*.

Atendiendo a la intensidad del daño podemos concluir que:

PA1 mostró una mayor capacidad para producir la lesión peroxisomal que IsoPA1, PA2 y T544.

T544, a la dosis utilizada, tuvo el menor efecto sobre los peroxisomas entre los cuatro compuestos estudiados.

IsoPA1 y PA2 exhibieron el mismo efecto sobre la membrana peroxisomal.

IsoPA1 y PA2 produjeron alteraciones en la forma y tamaño normales de las mitocondrias de *C. boidinii*.

CAPITULO 6

BIBLIOGRAFIA

1. -Padrón-Puyou F. Estudio Clínico experimental de la parálisis por *Karwinskia humboldtiana* (tullidora) en niños. Gac. Med Mex 1951;81:300-311.
- 2.-Waksman N, Martínez L, Fernández R. Chemical and toxicological screening in genus *Karwinskia* (México) Rev. Latinoam Quim 1989;20:27-29.
- 3.-DC Marsh, A.B. Clawson G.C. Roe. U.S. Department of Agricultural Technical Bulletin, 1928;29:1.
4. -Fernández-Nava R. Nombres comunes, usos y distribución geográfica del género *Karwinskia* (Rhamnaceae) de México. Anales Inst Biol Universidad Nacional Autónoma de México. Ser Bot 1992;63:1-23.

5.- Arellano E, Mendoza JF, Domínguez FJ, Intoxicación por *Karwinskia johnstonii* Fernández estudio de 12 pacientes. Bol Med Hosp Infant Mex 1994; 51:105-112.

6.- Dreyer DL, Arai I, Bachman CD, Anderson WR Jr, Smith RG, Daves D Jr. Toxins causin non inflammatory paralytic neuropathy. Isolation and structure elucidation. J Am Chem Soc. 1975;97:4986-4990.

7.-Waksman de Torres N, Ramírez Durón R. Isolation of a new dimeric anthracenone from *Karwinskia parvifolia*. Rev Latinoam Quim. 1992;23:25-27.

8.- Rivas GV, Torres SR, Waksman de Torres N. Dimeric Anthracenones from *Karwinskia species*. J med Plant Res 1990;56:562-563.

9.- Guerrero M, Piñeyro A, Waksman N. Extraction and quantification of toxins from *Karwinskia humboldtiana* (tullidora) Toxicon 1987;25:565-568

10.-Bermúdez de Rocha MV, Lozano Meléndez FE, Salazar Leal ME, Waksman de Torres N, Piñeyro López A. Intoxicación de una familia por *Karwinskia humboldtiana* (tullidora). Gac. Med. Mex 1995;131:100-106

11.-Bermúdez M.V, Martínez F.J, Salazar M.E, Waksman N, Piñeyro A. Experimental acute intoxication with ripe fruit of *Karwinskia*

humboldtiana (tullidora) in rat, Guinea pig, hamster and dog. *Toxicon* 1992;11:1493-1496.

12.- Bermúdez M.V, González-Spencer D, Guerrero M, Waksman N, Piñeyro A. Experimental intoxication with fruit and purified toxins of Buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*). *Toxicon* 1986;24:1091-1097.

13.- Weller R, Mitchell J, Daves D Jr. Buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*) toxins. In experimental and clinical neurotoxicology, p. 336 (Williams and Wilkins, Eds) Baltimore.1980.

14.- Bermúdez citado en: Piñeyro-López A, Martínez de Villarreal L, and González-Alanis, R. *In vitro* selective toxicity of toxin T-514 from *Karwinskia humboldtiana* (buckthorn) plant on various human tumor cell lines. *Toxicol*, 1994;92:217-227.

15.- Loomis 1974 citado en: Piñeyro-López, A., Martínez, L. and González-Alanis, R. *In vitro* selective toxicity of toxin T-514 from *Karwinskia humboldtiana* (buckthorn) plant on various human tumor cell lines. *Toxicol*, 1994;92:217-227.

16. - Piñeyro-López A., Martínez de Villarreal L. and González-Alanis R. *In vitro* selective toxicity of toxin T-514 from *Karwinskia humboldtiana* (buckthorn) plant on various human tumor cell lines. *Toxicol*, 1994;92:217-227.

17.- Piñeyro, A. (1995). Europaichen Patentblatt 95/48 (29.11.95)
Patentnummer: 0467407.

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

19.- Patente Japonesa No. 2651758.

20.- Sepúlveda-Saavedra J, Bermúdez de Rocha MV, Tamez-Rodríguez VA, Ballesteros-Elizondo RG, Moreno Sepúlveda M, Piñeyro-López A. Quantitative analysis of liver peroxisomes in rats intoxicated with peroxisomicine-A1. *Toxicol Lett* 1998;98:71-75.

21.- Piñeyro Lopez A. Resultados no publicados, citado en: Sepúlveda-Saavedra J, Van der Klei IJ, Keizer Y, Piñeyro-Lopez A, Harder W, Veenuis M. Studies on the effect of toxin T-514 on the integrity of peroxisomes in methylotrophic yeast. *FEMS Microbiol Lett* 1992;91:207-212.

22.- Moreno Martínez ML. Efecto de la Peroxisomicina A1 sobre la autofagia de peroxisomas en el hígado de *Macaca fascicularis* en un modelo *in vitro*. Tesis de Doctorado. Facultad de Medicina U.A.N.L.(2000).

23.- Lazarow PB. What is a peroxisome? *Toxicology and Industrial Health* 1987;3:1-6.

24.- Sahm H, Roggenkamp R, Wagner F and Hinkelman W. Microbodies in methanol grown *Candida boidinii*. J. Gen microbiol. 1975;88:218-222.

25.- Veenhuis, M., van Dijken, J.P. and Harder, W. The significance of peroxisomes in the metabolism of one carbon compounds in yeast. Adv. Micro. Biol. Physiol. 1983;24:1-82.

26.- Goodman JM, Trapp S, Hwang H. and Veenhuis M. Peroxisomes induced in *Candida boidinii* by methanol, oleic acid and D-alanine vary in metabolic function but share common integral membrane proteins. J Cell Sci. 1990;97:193-204.

27.-Sepúlveda-Saavedra J, Van der Klei IJ, Keizer Y, Piñeyro-Lopez A, Harder W, Veenhuis M. Studies on the effect of toxin T-514 on the integrity of peroxisomes in methylotrophic yeast. FEMS Microbiol Lett 1992;91:207-212.

28.-Moreno-Sepúlveda M, Vargas-Zapata R, Esquivel-Escobedo D, Waksman de Torres N, Piñeyro-Lopez A. Effect of peroxisomicine and related anthracenones on catalase activity. Plan Med 1995;61:337-340.

29.- Moreno-Sepúlveda M, Vargas-Zapata R, Ballesteros-Elizondo R, Piñeyro-López A, Sepulveda-Saavedra J. Studies of the effect of peroxisomicine on catalase activity in albino mice. Toxicol 1997;35:1-7.

30.- Salazar Aranda R. Efecto in vivo de diversas antracenas diméricas sobre peroxisomas de *Candida boidinii*. Tesis de Maestría. Fac. de Med. U.A.N.L.(1997).

31.- Weibel, E.R. Stereological Principles for morphometry in electron microscopic cytology. Int Rev Cytol. 1969; 26:235-302.

APENDICE A

Preparación de las rejillas con soporte

Se calienta agua en una placa de petri a 40°C y se deja caer una gota de colodión. Al formarse una película sobre el agua se van colocando las rejillas con el lado opaco hacia abajo. Para sacar las rejillas se coloca un papel parafilm sobre toda la superficie y se levanta, las rejillas se pegan en el papel. Se dejan secar y se pueden utilizar un día después.

APENDICE B

Preparación de soluciones

Solución contrastante

Acetato de uranilo 5%	0.5 g
Alcohol etílico 50% preparado con agua ultra pura	10 mL
Se guarda en el refrigerador cubierto con papel aluminio	

APENDICE C

Obtención de los cortes en el ultramicrotomo

Los bloques fueron preparados bajo un microscopio estereoscópico para formar una pirámide en el sitio donde se encontraba la muestra.

Posteriormente se lleva el bloque al ultramicroscopio en donde con la ayuda de una cuchilla de diamante se obtienen los cortes finos que serán montados sobre las rejillas de cobre.

APENDICE D

Contrastación de los cortes

En una placa petri bien limpia se coloca un papel parafilm con gotas de acetato de uranilo y sobre las gotas se colocan las rejillas cuidando de ponerlas con los cortes hacia abajo para que estén en contacto con el colorante. Se dejan por 5 ó 7 minutos dependiendo de la muestra. Se lavan las rejillas por 1 minuto con agua ultra pura y se secan.

APENDICE E

Microscopia electrónica

Una vez contrastadas las rejillas estas se colocan dentro del portamuestras del microscopio electrónico el cual se introduce lentamente dentro de la esclusa y una vez que se ha extraído el aire y se tiene dicha esclusa al vacío, se introduce lentamente para colocar la muestra en el eje de trayectoria de los electrones dentro del tubo del microscopio electrónico. Mediante una película fotográfica que previamente se ha colocado dentro de la cámara del microscopio se recaban las imágenes generadas por el paso de electrones a través de la muestra.

APENDICE F

Revelado y amplificación de las micrografías

Una vez tomadas las micrografías, el rollo es revelado en un cuarto oscuro mediante el uso de soluciones fotográficas reveladoras y fijadoras. Posteriormente se deja secar el rollo de película fotográfica y se recortan las micrografías, las cuales se colocan dentro de la amplificadora y mediante el uso de luz blanca graduada en tiempo e intensidad se imprimen los negativos sobre papel fotográfico de 203 x 240 mm

APENDICE G

Calculo de las variables por el método de cuenta puntos.

Mediante una plantilla con líneas rectas de longitud conocida (z) orientadas al azar, la cual se sobrepuso a cada una de las micrografías, se calcula la proporción volumen-superficie de los perfiles de las estructuras de interés $(v/s)^{30}$ con la fórmula:

$$v/s = \frac{zP}{4I}$$

z = longitud de las líneas de prueba.

P = Número de extremos de las líneas de prueba que caen dentro de los perfiles de las estructuras.

I = Número de intersecciones de las líneas de prueba con los perfiles de las estructuras.

Posteriormente se calcula el diámetro promedio de las estructuras $(D)^{30}$ con la fórmula:

$$D = 6 \sqrt[3]{I}$$

Y por último se calcula la densidad numérica (N_v) con la fórmula:

$$N_v = N_A / D$$

N_A = unidad de área del corte

N_v = densidad numérica o número promedio de perfiles.



