

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



EFFECTOS DE LA PEROXISOMICINA A1 SOBRE EL
HIGADO DE RATON TRATADO CON CLOFIBRATO

POR

Q. F. B. MARTHA EUGENIA SANTOYO PEREZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con especialidad en
Morfología

Febrero del 2002

Q. F. B. MARTHA EUGENIA SANTOYO PEREZ

TM
QH603
.P47
S2
c.1



1080113110

231884

QH 603

.747

S2

c.1

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



**EFFECTO DE LA PEROXISOMICINA A1 SOBRE EL
HÍGADO DE RATÓN TRATADO CON CLOFIBRATO**

POR

Q.F.B. MARTHA EUGENIA SANTOYO PÉREZ

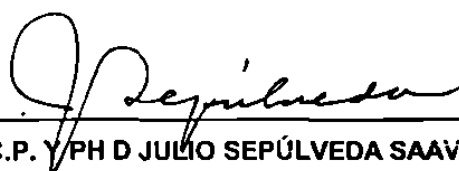
**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con especialidad en
Morfología**

Febrero del 2002



**EFFECTO DE LA PEROXISOMICINA A1 SOBRE EL
HÍGADO DE RATÓN TRATADO CON CLOFIBRATO**

Aprobación de la tesis:



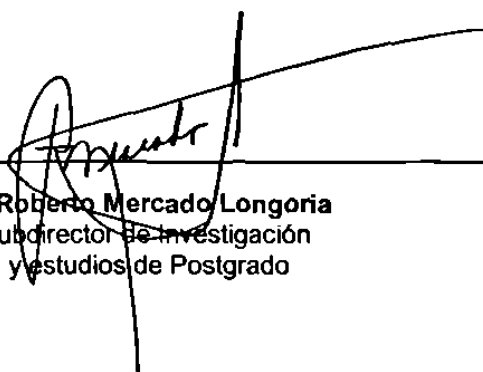
M.C.P. Y PH D JULIO SEPÚLVEDA SAAVEDRA
Director de tesis



Dr. med. ALFREDO PIÑEYRO LOPEZ
Codirector de tesis



M.C.P. y M.C. BEATRIZ GONZALEZ CORONA
Comisión de tesis



Dr Roberto Mercado Longoria
Subdirector de investigación
y estudios de Postgrado

**EFFECTO DE LA PEROXISOMICINA A1 SOBRE EL
HÍGADO DE RATÓN TRATADO CON CLOFIBRATO**

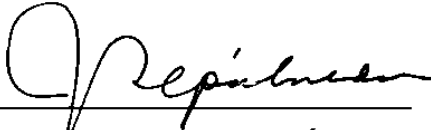
Presentado por:

Q.F.B. MARTHA EUGENIA SANTOYO PÉREZ

Este trabajo se realizó en los departamentos de Histología y de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León. Bajo la asesoría del Dr. Julio Sepúlveda Saavedra y la coasesoría de la Dra. Myrthala Moreno Sepúlveda.

FIRMAS

ASESOR



**M.C.P. Y PH D JULIO SEPÚLVEDA
SAAVEDRA**

COASESORA

**DRA. REN. NAT. MYRTHALA MORENO
SEPÚLVEDA**

DEDICATORIA

*Para Lino y Martha a ellos también les pertenece
este triunfo.
Gracias por aceptarme
como soy.*

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por acompañarme en todo momento y no dejarme desfallecer en los momentos difíciles.

A ti **mamá** que aunque sabías que estabas lejos de mí, siempre me sentí acompañada de tus oraciones.

A ti **papá** que diste un ejemplo de lucha y perseverancia, a cada instante estuviste conmigo.

A mis hermanas: **Any, Lucita, Rosa Elena, Guera, Chela y Lolis**, por escucharme siempre con tanta paciencia, por aguantarme, gracias por ser mis hermanas.

A mis hermanos **Francisco, Jesús y Jorge** que aunque lejos de mí, nunca los olvido. Los quiero mucho.

A mis hermanos **Alvaro y Salvador**, a mi abuelita, **tía Angelita**, y suegros el brillo de su estrella siempre me acompaña.

A todos mis sobrinos, cuñadas y cuñados en especial a **Víctor, Lucy, Marcela, Mauricio y Arlette** por quereme como soy, por el apoyo desinteresado que siempre me han brindado.

Al **Dr. Julio Sepúlveda Saavedra** por haberme aceptado en su grupo de trabajo, por toda su paciencia, sus enseñanzas que me han hecho crecer no solo en el ámbito profesional sino también en lo personal. Gracias por su apoyo y comprensión.

A todo el personal que labora en el departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la UANL. por toda su colaboración, apoyo y hospitalidad en especial a **Rosy** y a **Nora** porque siempre tuvieron tiempo para escucharme.

Al **QCB José Ordóñez, Dra. Raquel Ballesteros, Dra. Beatriz Corona**. Gracias por transmitirme sus experiencias profesionales ello fue muy valioso para la realización de mi trabajo.

Al **Dr. Jaime García** por brindarme siempre su apoyo incondicional.

A todos mis maestros en especial a la **Dra. Herminia Martínez** por todas sus enseñanzas. Gracias.

A la **Dra. Beatriz Velásquez** por su confianza en mí, por su apoyo y todos sus consejos. Gracias.

A la **Dra. Myrthala Moreno Sepúlveda** por su coasesoría que fue esencial para la realización de mi trabajo. Gracias por no haberme dejado sola nunca.

Al **Dr. Alfredo Piñeyro López** por la donación de la peroxisomicina A1 y por sus valiosos comentarios.

Al **Dr. Jesús Noyola Bernal** Director de la Facultad de Medicina de la UASLP que gracias a su intervención en mi área laboral pude culminar con éxito este postgrado.

A **Willy, Edmundo, Dr. Loredo, Paco Escalante e Irene** mis compañeros y amigos del departamento de C. Morfológicas de la Facultad de Medicina de la UASLP. les agradezco mucho todo su apoyo, sus palabras de aliento, por aguantarme siempre.

A mis amigas **Perin, Liliana, Lety, Celia y Lilia** por todas las porras que me echaron, por acompañarme en las buenas y las malas por ser mis amigas. Gracias.

A **Tere** y a **Vero** que no tengo palabras para agradecerles toda su hospitalidad y la amistad que me han brindado. Mil gracias por todo.

A mis compañeros de Maestría: **Pilar, Polo, Hilda, Nancy Aurora y Diana** gracias por compartir conmigo este periodo de mi vida, experiencias que nunca olvidaré.

A **PROMEP** por la beca de apoyo económico que me otorgó esto hizo posible la realización de este postgrado: Maestría en Ciencias Morfológicas.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo		Página
I INTRODUCCIÓN		
1.1	PEROXISOMICINA A1	1
1.2	PEROXISOMAS	4
1.2.1	Generalidades	4
1.2.2	Morfología	5
1.2.3	Identificación bioquímica y citoquímica	5
1.2.4	Función	6
1.2.5	Biogénesis peroxisomal	6
1.2.6	Enfermedades peroxisomales	6
1.3	CLOFIBRATO	7
1.3.1	Proliferadores peroxisomales	7
1.3.2	Efectos del clofibrato	11
1.3.3	Efecto hepatoprotector	11
1.4	JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	12
1.4.1	Justificación	12
1.4.2	Hipótesis de trabajo	12
1.4.3	Objetivo general	12
1.4.4	Objetivos específicos	12
II MATERIALES Y MÉTODOS		
2.1	MATERIAL	14
2.1.1	Material biológico	14
2.1.2	Tratamiento de los animales	14
2.1.3	Técnicas morfológicas	14
2.1.4	Técnicas bioquímicas	15

Capítulo	Página
2.2 EQUIPO	15
2.3 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	16
2.4 MÉTODOS	17
2.4.1 Obtención de la muestra	17
2.4.2 Preparación del homogenado de hígado	17
2.4.3 Análisis morfológico	17
2.4.1.Detección citoquímica de la actividad de catalasa	17
2.4.2 Microscopía de luz y electrónica	18
2.4.4 Análisis bioquímico	18
2.4.4.1 Determinación de aspartato aminotransferasa	18
2.4.4.2 Determinación de alanina aminotransferasa	19
2.4.4.3 Determinación de la actividad de catalasa en homogenados de hígado	19
2.4.4.4 Determinación de proteínas totales	20
2.4.5. Análisis estadístico	21
III RESULTADOS	22
3.1 ANÁLISIS MORFÓLOGICO A MICROSCOPIA DE LUZ	22
3.1.1 Control sin tratamiento	22
3.1.2 Control vehículo	23
3.1.3 Control de proliferación peroxisomal	23
3.1.4 Pretratamiento con aceite de cártamo e intoxicación con PA1 a un tiempo de exposición de 4 horas	25
3.1.5 Pretratamiento con clofibrato e intoxicación con PA1 a un tiempo de exposición de 4 horas	25
3.1.6 Pretratamiento con aceite de cártamo e intoxicación con PA1 a un tiempo de exposición de 8 horas	26

Capítulo	Página
3.1.7 Pretratamiento con clofibrato e intoxicación con PA1 a un tiempo de exposición de 8 horas	26
3.1.8 Pretratamiento con aceite de cártamo e intoxicación con PA1 a un tiempo de exposición de 24 horas	28
3.1.9 Pretratamiento con clofibrato e intoxicación con PA1 a un tiempo de exposición de 24 horas	28
3.2 ANÁLISIS A MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	30
3.2.1 Control sin tratamiento	30
3.2.2 Control vehículo	30
3.2.3 Control de proliferación peroxisomal	30
3.2.4 Pretratamiento con aceite de cártamo e intoxicación con PA1 a un tiempo de exposición de 4 horas	33
3.2.5 Pretratamiento con clofibrato e intoxicación con PA1 a un tiempo de exposición de 4 horas	33
3.2.6 Pretratamiento con aceite de cártamo e intoxicación con PA1 a un tiempo de exposición de 8 horas	35
3.2.7 Pretratamiento con clofibrato e intoxicación con PA1 a un tiempo de exposición de 8 horas	35
3.2.8 Pretratamiento con aceite de cártamo e intoxicación con PA1 a un tiempo de exposición de 24 horas	36
3.2.9 Pretratamiento con clofibrato e intoxicación con PA1 a un tiempo de exposición de 24 horas	36
3.3 ANÁLISIS BIOQUÍMICO	39
3.3.1 Determinación de aspartato aminotransferasa en suero (AST)	39
3.3.1.1 A las 4 horas	39
3.3.1.2 A las 8 horas	39

Capítulo	Página
3.3.1.3 A las 24 horas	39
3.3.2 Determinación de alanina aminotransferasa en suero (ALT)	41
3.3.1.1 A las 4 horas	41
3.3.1.2 A las 8 horas	41
3.3.1.3 A las 24 horas	41
3.3.3. Determinación de la actividad de catalasa en homogenados	42
IV DISCUSIÓN	43
V CONCLUSIONES, PERSPECTIVAS Y CONTRIBUCIONES	46
5.1 Conclusiones	46
5.2 Perspectivas	47
5.3 Contribuciones	47
APÉNDICES	
APÉNDICE A. TABLA 2. Técnica citoquímica para detección de la actividad de catalasa peroxisomal	48
TABLA 3. Técnica de inclusión en resinas epóxicas	49
TABLA 4. Técnica bioquímica para la determinación de aspartato y alanina aminotransferasa en suero	50
TABLA 5. Técnica bioquímica para determinar la actividad de catalasa peroxisomal	51
TABLA 6. Método para determinar la concentración de proteínas totales	52
APÉNDICE B SOLUCIONES	53
APÉNDICE C. Cálculo de la actividad enzimática	57
REFERENCIAS	61

LISTA DE TABLAS

TABLA		Página
1	Efectos del clofibrato.	11
2	Técnica citoquímica para detección de la actividad de catalasa peroxisomal.	48
3	Técnica de inclusión en resinas epóxicas.	49
4	Técnica bioquímica para la determinación de aspartato y alanina aminotransferasas en suero.	50
5	Técnica bioquímica para determinar la actividad de catalasa peroxisomal.	51
6	Método para determinar la concentración de proteínas totales.	52

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura química de la T 514 o peroxisomicina A1.	2
2. Vía respiratoria peroxisomal.	4
3. Estructura química del clofibrato y ácido clofibrico.	8
4. Mecanismo de acción de los proliferadores peroxisomales por vía de receptores específicos.	9
5. Secuencia de eventos en la inducción de tumores en roedores expuestos por largos períodos de tiempo a proliferadores peroxisomales.	10
6. Estrategia experimental.	17
7. Curva patrón de proteínas de Bradford.	22
8. Hígado de ratón. Control sin tratamiento, control vehículo y control de proliferación peroxisomal.	24
9. Hígado de ratón. Tiempo de exposición 4 horas.	25
10. Hígado de ratón. Tiempo de exposición 8 horas.	27
11. Hígado de ratón. Tiempo de exposición 24 horas.	29
12. Hígado de ratón. Control sin tratamiento y control vehículo.	31
13. Hígado de ratón. Tratamiento con clofibrato.	32
14. Hígado de ratón. Tiempo de exposición 4 horas.	34
15. Hígado de ratón. Tiempo de exposición 8 horas.	35
16. Hígado de ratón. Tiempo de exposición 24 horas.	37
17. Hígado de ratón. Alteración mitocondrial.	38

18. Gráfica del análisis cuantitativo de la aspartato aminotransferasa.	40
19. Gráfica del análisis cuantitativo de la alanina aminotransferasa.	41
20. Gráfica de la actividad de catalasa.	42

NOMENCLATURA

Abs.	Absorbancia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGCML	Ácidos grasos de cadena muy larga
AGCL	Ácidos grasos de cadena larga
ALT	Alanina aminotransferasa
AST	Aspartato aminotransferasa
b	Espesor de la cubeta (distancia que recorre el haz de luz)
C1	Átomo de carbono
CO ₂	Bióxido de carbono
Co-A	Acil co-enzima A
Cols	Colaboradores
Conc.	Concentración
cm ²	Centímetro cuadrado
DAB	Diaminobenzidina
DTE	Ditioerítról
EDTA	Ácido etilén diamino-tetrasódico
g	Gramo
h	Hora
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
H ₂ O	Agua
IU/l	Unidades internacionales por litro
Kg	Kilogramo
l	Litros
M	Molar
Mesh	Divisiones

min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mg	Miligramos
n	Número de muestras
ng	Nanogramo
Nm	Nanómetro
O ₂	Oxígeno
PA1	Peroxisomicina A1
Ph	Potencial de hidrógeno
PMSF	Fosfil-metil-sulfonil-fluoruro
p/v	Peso por volumen
r.p.m	Revoluciones por minuto
t	Tiempo
T 496, T 514	
Y T 544	Toxinas 496, 514 y 544
TGO	Transaminasa glutámica oxalacética
TGP	Transaminasa glutámica pirúvica
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
v/v	Volumen/volumen
Vol	Volumen
u	Unidades internacionales de actividad enzimática
μ g	Microgramo
μ m	Micrómetro
μ mol	Micromol
%	Por ciento
λ	Longitud de onda
ϵ	Absortividad molar

<	Menor que
ΔA	Cambio de absorbancia
ΔC	Cambio de concentración
*	Diferencia estadística significativa con respecto al control absoluto
-	Menos
$2DL_{50}$	Dos veces la dosis letal 50

RESUMEN

MARTHA EUGENIA SANTOYO PÉREZ

Fecha de Graduación: Febrero del 2002

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Título del Estudio:

EFFECTO DE LA PEROXISOMICINA A1
SOBRE EL HÍGADO DE RATÓN
TRATADO CON CLOFIBRATO

Número de páginas:69

Candidata para el grado de Maestría en
Ciencias con especialidad en
Morfología

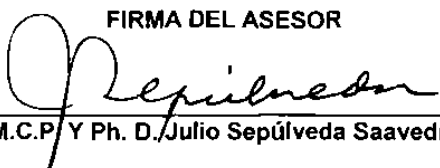
Area de Estudio: Morfología

Propósito y método del Estudio: T 514 es uno de los cuatro principios tóxicos extraídos de las plantas del género *Karwinskia*. La ingestión de los frutos de estas plantas causan neuropatía en animales y humanos. Roedores y monos intoxicados experimentalmente con T 514 mostraron daño hepático, pulmonar y renal grave. Estudios en hígado de la rata, ratón y mono intoxicados con T 514 demostraron una disminución en el número de peroxisomas. En levaduras metilotróficas T514 causa daño irreversible sobre la membrana peroxisomal de estas células, por ello se le renombró peroxisomicina A1(PA1). El clofibrato induce un aumento en el número de peroxisomas y protege al hígado contra la intoxicación de algunos compuestos; por lo que es importante conocer la interacción biológica de estos dos compuestos. El propósito de este trabajo es investigar si el clofibrato tiene un efecto protector contra el daño hepático causado por la PA1. Se utilizaron muestras de sangre e hígado de ratón CD-1 tratado con clofibrato, PA1, combinación de ambos y aceite de cártamo como control.

Se efectuaron estudios morfológicos (histológicos y ultraestructurales), y bioquímicos (niveles enzimáticos séricos de aspartato y alanina aminotrasferasas, además de la actividad de catalasa en homogenado de hígado).

Conclusiones y Contribuciones: Se confirmaron los hallazgos ya reportados para el clofibrato como un proliferador peroxisomal e inductor de la catalasa. Se demostró la existencia de daño hepático, ya descrito, causado por la PA1 con los datos provenientes del análisis histológico, ultraestructural y enzimático. A nivel celular se observaron cuerpos autofágicos conteniendo peroxisomas y esteatosis. Además se observó la presencia de apoptosis y alteraciones mitocondriales, aspectos no reportados previamente. El pretratamiento con clofibrato disminuyó estos efectos citotóxicos y el daño hepático evaluado por el estudio morfológico, el efecto protector es de aproximadamente un 50% evaluado por los niveles de aminotrasferasas.

FIRMA DEL ASESOR


M.C.P/Y Ph. D. Julio Sepúlveda Saavedra

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 PEROXISOMICINA A1.

El género *Karwinskia* es un Taxón que pertenece a la familia de las Rhamnaceae¹ y consiste en arbustos y árboles pequeños que crecen en zonas tropicales y desérticas.

Existen 15 especies que habitan desde el sur de Estados Unidos, México, Centroamérica, norte de Colombia, Cuba, Haití y República Dominicana. En México existen 12 especies distintas² de las cuales *Karwinskia humboldtiana* es la más abundante³. La ingestión accidental del fruto de esta planta causa parálisis. Esta es una de las primeras descripciones del efecto tóxico que se tienen en la literatura y se remonta hacia finales del siglo XVIII en la obra "Historia de la Antigua o Baja California"⁴.

Dreyer y cols.⁵ en 1975 aislaron por primera vez del endocarpio de la *Karwinskia humboldtiana* cuatro sustancias que fueron identificadas como antracenas diméricas y fueron denominadas de acuerdo a su peso molecular como T 496, T 514, T 516, y la T 549.

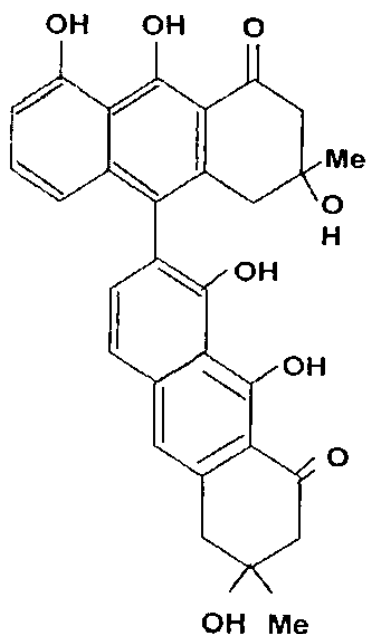


Figura 1. Estructura química de T-514 o Peroxisomicina A1.

Más tarde Waksman y cols.^{6 y 7} aislaron de la *K. parvifolia*, *K. tehuacana* y *K. Lumbellata* otros compuestos antracénicos: un diastereoisómero de la T 514 , un isómero de posición de la T 514 (iso T 514) y la T 510.

Bermúdez y cols.⁸ trataron ratones con toxinas purificadas T 514 o T 544 o con fruto verde o maduro de la *Karwinskia humboldtiana*. Ellos demostraron que en ambos casos se presenta daño hepático y pulmonar grave. En este mismo estudio también se demostró que el fruto verde es más tóxico que el maduro y que la T 514 a diferencia de la T 544 tiene un efecto tóxico más marcado sobre el hígado, pulmón y riñón. Las lesiones pulmonares consistieron en congestión vascular progresiva y hemorragia. En el hígado causó congestión, hemorragia, degeneración hepática y necrosis centrolobulillar.

Estudios con microscopía de luz realizados en hígado de macacos intoxicados con T 514 demostraron la presencia de esteatosis y necrosis; de acuerdo con estos datos, los estudios de microscopía electrónica mostraron depósito de lípidos en el citoplasma asociado con cambios degenerativos subcelulares.⁹

En rata, hámster y cuyo intoxicados con fruto maduro de *Karwinskia humboldtiana* se reportó la presencia de lesiones hepáticas, renales y pulmonares suficientemente graves para causar la muerte. También se demostró la selectividad tóxica hepatopulmonar¹⁰.

Sepúlveda y cols¹¹. Realizaron estudios en levaduras metilotróficas *Hansenula polymorpha* y *Candida boidini*, y observaron que en presencia de dosis no letales de T 514 se presenta ruptura selectiva e irreversible de la membrana peroxisomal de estas células, siendo removidos los peroxisomas dañados para su degradación en la vacuola digestiva. Debido a este hallazgo se renombró a la T 514, Peroxisomicina A1. Además del daño sobre la membrana peroxisomal, en este mismo estudio se reportó que no se afectan la actividad de las enzimas peroxisomales catalasa y alcohol oxidasa.

El análisis cuantitativo de peroxisomas en hígado de rata, ratón y monos intoxicados con la T 514 mostró disminución en el número de este organelo^{12 y 13}. Este hallazgo sugiere que al igual que en las levaduras la PA1 causa daño selectivo a los peroxisomas de los mamíferos, los cuales después son removidos por la vía autofágica. Este último dato se comprobó en cultivo de órgano de hígado de *macaca fascicularis*¹⁴.

Piñeyro y col¹⁵. describieron por primera vez la toxicidad selectiva *in vitro* de la PA1 sobre diferentes líneas celulares cancerosas humanas provenientes del pulmón, hígado y colon. Esto fue confirmado por investigadores de las universidades de Berlín y Freiburg (Alemania) y recientemente en el Instituto Nacional de Cáncer (EUA). Esto ha motivado a que se intensifiquen los estudios encaminados a establecer a la PA1 como un posible agente antineoplásico. Se solicitó una patente para este uso y se le han otorgado seis patentes: en la comunidad de países europeos, Japón, Corea, Canadá, México y Estados Unidos^{16,17,18}.

1.2 PEROXISOMAS

1.2.1 Generalidades.

Los peroxisomas fueron descritos por primera vez por Rodhin en 1954. Él describió a este organelo en túbulos contorneados de riñón de ratón mediante microscopía electrónica. Los llamó microcuerpos^{19 y 20}, De Duve y cols²¹ fueron los primeros en llamarlos peroxisomas, ya que mediante estudios bioquímicos demostraron la presencia de oxidasas que al reaccionar con el sustrato forman peróxido de hidrógeno y este a su vez es degradado por la catalasa. A este mecanismo que sucede en el peroxisoma se le conoce como "vía respiratoria peroxisomal"^{21,22,23,24} (fig. 2).

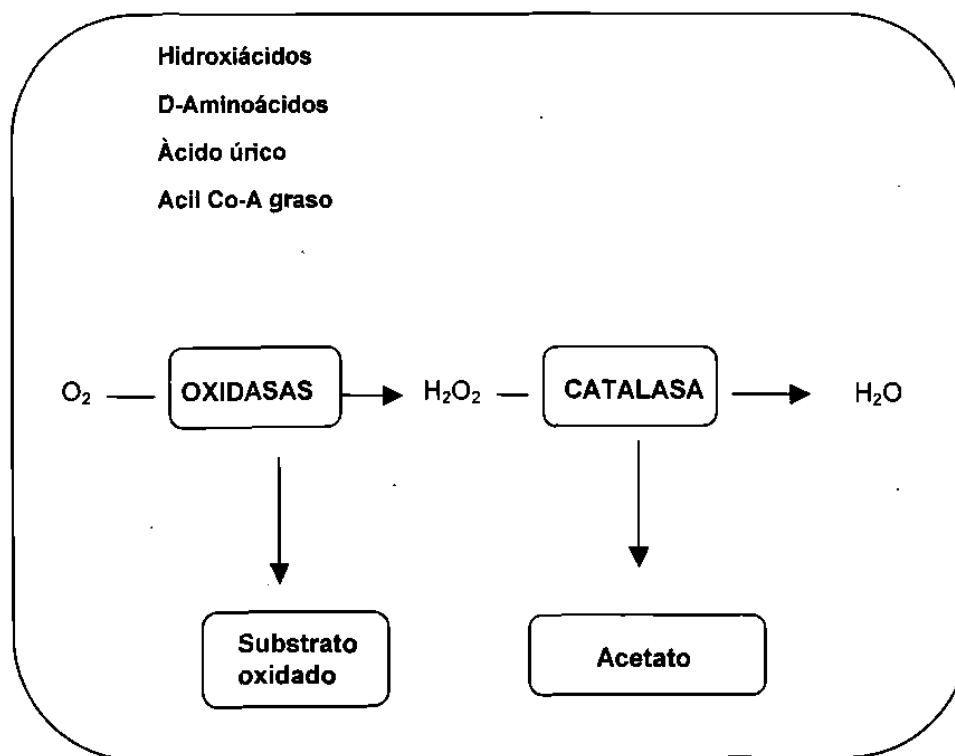


Figura 2. Vía respiratoria peroxisomal.

Investigaciones del ciclo del glioxilato²⁵ en las semillas del frijol llevaron al descubrimiento de partículas subcelulares que contenían las mismas enzimas que los peroxisomas y desde entonces quedó establecido el nombre de glioxisomas en las plantas y peroxisomas en los tejidos animales.

1.2.2 Morfología.

Los peroxisomas se encuentran en todas las células eucariotes (a excepción de los eritrocitos maduros^{20,23,26}) desde los organismos más sencillos, como las levaduras hasta los más complejos como el hombre. Su diámetro oscila entre 0.1-1.5 μm , poseen forma irregular. Los hepatocitos de los roedores contienen entre 400–600 peroxisomas, esto representa el 2% del volumen celular²⁷ y tienen un promedio de vida de cuatro días²⁸. Están limitados por una membrana de 4.5-8 nm de grosor^{39, 30 y 31}. Esta membrana es altamente permeable a moléculas pequeñas como sacarosa, substratos pequeños e iones inorgánicos además de ser resistente a la lisis por digitonina y susceptible a la ruptura por tratamientos físicos como el congelamiento³². La matriz es electrodensa y finamente granular. Datos inmunocitoquímicos han demostrado que las enzimas no se encuentran distribuidas uniformemente, lo que nos indica que poseen un alto grado de organización estructural y que además este depende de la especie³³. Estudios bioquímicos revelan la presencia de la enzima urato oxidasa asociada a un cristaloides localizado en el centro de los peroxisomas del hígado de la rata^{34 y 35}. En algunas otras especies como en el hombre, los peroxisomas no presentan estas estructuras ya que carecen de esta enzima. En los peroxisomas de ciertas especies se observa una estructura electrodensa, aplanada, localizada en la periferia del organelo adyacente a la membrana denominada "placa marginal" compuesta por L- α -oxidasa B hidroxilácida³⁶.

1.2.3 Identificación bioquímica e histoquímica.

Los peroxisomas se identifican en las células mediante técnicas bioquímicas, citoquímicas^{37 y 38} e inmunocitoquímicas para demostrar la presencia o la actividad de enzima como la de catalasa.

1.2.4 Función.

Los peroxisomas participan en una gran variedad de procesos anabólicos y catabólicos en la célula. Entre los más importantes se encuentran: el metabolismo del peróxido de hidrógeno. La β - oxidación de ácidos grasos de cadena larga (AGCL) y muy larga (AGCML), la biosíntesis de ácidos biliares y plasmalógenos, catabolismo de purinas y algunas reacciones del metabolismo del colesterol^{23,24,39,40}.

Además, las funciones peroxisomales en otros organismos incluyen la fotorespiración en las plantas, biosíntesis de penicilina en hongos filamentosos⁴¹, y el metabolismo de compuestos con un átomo de carbono (C1) en levaduras⁴² entre otras.

1.2.5 Biogénesis Peroxisomal.

Los peroxisomas se generan por fisión de peroxisomas existentes, que posteriormente adquieren proteínas de matriz y de membrana sintetizadas en el citoplasma (polisomas libres) y a través de la incorporación de vesículas provenientes del retículo endoplásmico rugoso^{43,44,45}.

1.2.6 Enfermedades Peroxisomales.

El estudio de las enfermedades humanas que involucran deficiencias en el metabolismo peroxisomal se ha incrementado en los últimos años, y en la actualidad se han descrito por lo menos 14 enfermedades peroxisomales, las que se han clasificado dependiendo de los trastornos clínicos o bioquímicos que presentan. Estas enfermedades se caracterizan ya sea por un defecto en la biogénesis peroxisomal con disminución o ausencia total de peroxisomas, o por deficiencia de una o más enzimas peroxisomales. Algunos ejemplos de estas enfermedades son el Síndrome de Zellweger o Síndrome Cerebrohepatorrenal, la enfermedad infantil de Refsum, acatalasemia, adrenoleucodistrofia neonatal y ligada al cromosoma X^{23,29,46,47,48}.

1.3 CLOFIBRATO.

1.3.1 Proliferadores peroxisomales.

Tanto en las levaduras como en los mamíferos los peroxisomas tienen la capacidad de proliferar y de modificar su composición como respuesta a agentes químicos o por factores ambientales (insecticidas, productos del petróleo, etc.)^{29,49}. A estos compuestos capaces de inducir a un aumento peroxisomal se les denomina proliferadores peroxisomales, de los cuales los más importantes son:

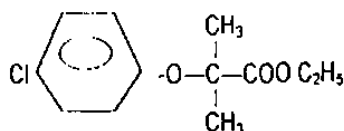
- Todos los compuestos derivados de los fibratos: clofibrato, bezafibrato, ciprofibrato, fenofibrato, gemfibrosil, etc.
- Algunos compuestos no relacionados con clofibrato: aspirina, clorclicicina, clorpromazina, fenotiacina, tiadenol, ácido fólico, ácido valproico, entre otros.
- Condiciones fisiológicas: dieta alta en grasas, dieta alta en fitol, inanición, deficiencia de vitamina E, hipertiroidismo.
- Agentes contaminantes ambientales: plásticidas, herbicidas, insecticidas, agentes desengrasantes^{29,50,51} etc.

Se ha reportado que en hepatocitos de roedores tratados con clofibrato (etil-*p*-paraclorofenoisobutirato) cuyo metabolito activo es el ácido clofibrato, los peroxisomas ocupan hasta el 10% del volumen celular y en el homogenizado del hígado de estos animales se encontró que aumenta aproximadamente al doble la actividad de catalasa, mientras la actividad de enzimas involucradas en la β -oxidación incrementan en aproximadamente 10 a 20 veces⁵². Además de los cambios bioquímicos, también se manifiestan cambios morfológicos como lo es el aumento en el tamaño de los peroxisomas y complejidad del retículo peroxisomal.

Los proliferadores peroxisomales causan un efecto pleiotrófico común en los roedores así como hepatomegalia. Este agrandamiento del hígado ocurre a los primeros días de la aplicación del compuesto y se mantiene de esta forma hasta que es suspendida la administración del químico.

Se cree que los efectos comunes de los proliferadores peroxisomales son debidos a que comparten una semejanza en su formula estructural.

CLOFIBRATO



AC. CLOFÍBRICO

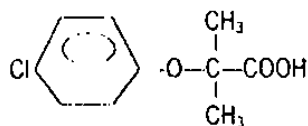


Figura 3. Estructura química del clofibrato y ácido clofíbrico.

Se ha propuesto un mecanismo mediado por receptores nucleares para explicar la respuesta a los proliferadores peroxisomales en donde el receptor se une al proliferador en el citoplasma celular formando así un complejo, el cual actúa directamente sobre el ADN modificando la transcripción de los genes peroxisomales^{51,52,53}. El esquema con esta hipótesis se ilustra en la figura 4.

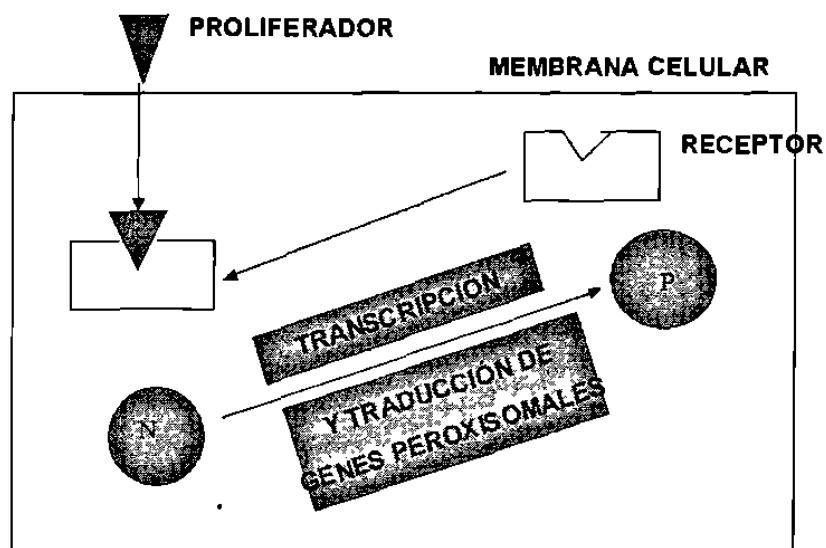


Figura 4. Mecanismo de acción de los proliferadores peroxisomales por vía de receptores específicos.

Se ha reportado que los receptores nucleares involucrados en este mecanismo pertenecen a la superfamilia de ligandos esteroideos⁵⁴. Roedores que han sido expuestos por largos periodos de tiempo a proliferadores peroxisomales, desarrollan carcinomas hepatocelulares. Esto se ha explicado como resultado de un estrés oxidativo causado por la producción elevada del peróxido de hidrógeno, y de radicales tóxicos del oxígeno^{51,52,55} y al daño al DNA que causan.

En la figura 5 se muestra la hipótesis que postula la formación de tumores carcinogénicos^{55,57}.

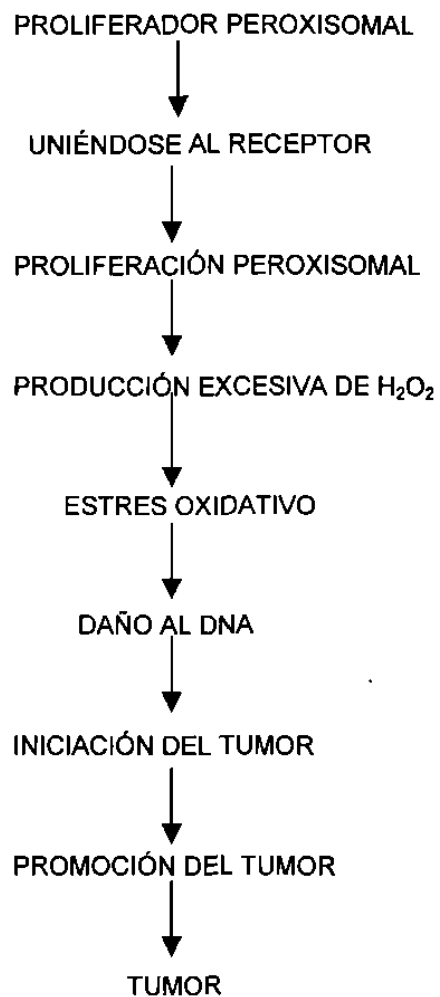


Figura 5. Secuencia de eventos de la inducción de tumores en roedores expuestos por largos períodos de tiempo con proliferadores peroxisomales.

También se han reportado agentes que causan una disminución en el número de peroxisomas: la peroxisomicina A1^{12,13} y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α)⁵⁶.

1.3.2 Efectos del Clofibrato.

En la tabla 1 se muestran los principales efectos causados por el clofibrato

EFECTOS DEL CLOFIBRATO	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Disminución de Lípidos séricos ▪ Disminución del Colesterol sérico 	<ul style="list-style-type: none"> • Aumenta el número de peroxisomas • Aumenta las enzimas peroxisomales <p>Sobre todo las involucradas en el metabolismo de ácidos de cadena larga y muy larga^{50y 51}, sin embargo el aumento de estas enzimas no va acompañado del aumento proporcional de catalasa peroxisomal que es la enzima que degrada al peróxido de hidrógeno^{50y 51}.</p>
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Inducción de carcinomas hepatocelulares en roedores tratados por largos periodos de tiempo. 	

TABLA 1

1.3.3 Efecto hepatoprotector.

Se reporta que el pretratamiento con clofibrato previene las lesiones hepáticas en ratas intoxicadas con acetoaminofén, tetracloruro de carbono, bromobenzoato, dietilmaleato, paraquat, nitrofurantoina y nitrosourea⁵⁸. Estos estudios fueron realizados *in vitro* e *in vivo*, y en ambos casos se reportó que hay un efecto hepatoprotector. Se demuestra por estudios morfológicos y bioquímicos que en ratas intoxicadas con tetracloruro de carbono, cloroformo y bromobenzoato, previamente tratadas con clofibrato, existe protección contra el efecto tóxico de estas sustancias⁵⁹. Existen varias hipótesis respecto al mecanismo de acción, aunque aún no se ha esclarecido, algunos autores sugieren que es mediado por los niveles del glutatión hepático reducido que se encuentra aumentado en los animales que han recibido clofibrato⁵⁹.

1.4 JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.

1.4.1 Justificación.

Como está reportado en la literatura, el clofibrato es una droga hipolipidémica e inductor de la proliferación peroxisomal^{60, 61}; y en las últimas décadas se ha demostrado que tiene un efecto protector contra químicos hepatotóxicos: acetoaminofen, tetracloruro de carbono, bromobenzoato, dietilmaleato, paraquat, nitrofurantoina y nitrosurea⁵⁸, cloroformo y bromobenceno⁵⁹.

Por otro lado la peroxisomicina A1 causa una disminución en el número de peroxisomas^{12,13} y es un agente marcadamente hepatotóxico^{8,9,10}. Tomando en cuenta los efectos descritos para cada compuesto, resulta de interés conocer cual es la interacción biológica que pueda existir entre ellos.

1.4.2 HIPÓTESIS DE TRABAJO.

El clofibrato tiene un efecto hepatoprotector contra la intoxicación causada por la peroxisomicina A1.

1.4.3 OBJETIVO GENERAL.

Evaluar el efecto del clofibrato como agente hepatoprotector y proliferador peroxisomal, en ratones intoxicados con peroxisomicina A1.

1.4.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la histología y ultraestructura del hígado de ratones CD-1, de los siguientes grupos:

- A) Grupo experimental: ratones pretratados con clofibrato (500 mg/kg) diluido con aceite de cártamo y confrontados con una dosis de $2DL_{50}$ (28 mg/kg.) de PA1 disuelta en aceite de cártamo.
- B) Control positivo de proliferación peroxisomal: ratones pretratados con clofibrato y confrontados con una dosis de vehículo.
- C) Control positivo de daño hepático: ratones pretratados con vehículo y confrontados con una dosis de $2DL_{50}$ (28 mg/kg.) de PA1.
- D) Control vehículo: ratones tratados sólo con el vehículo.
- E) Control absoluto: sin tratamiento.

2. Evaluar la actividad de las enzimas aspartato y alanina aminotransferasas en el suero de ratones de todos los grupos.

3. Evaluar la proliferación peroxisomal por medio de la determinación de la actividad de la catalasa en hígado de ratones CD-1 de todos los grupos.

CAPITULO 2

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 MATERIAL.

2.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO.

90 ratones albinos de la cepa CD-1, machos con un peso de 25 ~ 35 gramos.

2.1.2 TRATAMIENTO DE LOS ANIMALES.

- A) Se utilizó como vehículo aceite de cártamo de marca comercial, este mismo se empleo como solvente para la PA1 y el clofibrato.
- B) Clofibrato [2-(p-chlorophenoxy)-2-methylpropionic acid ethyl ester] en estado líquido de la marca Calbiochem(E.U.A).
- C) Peroxisomicina A1, lote 84, extraída y purificada en el laboratorio de extracción del departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. la PA1 fue sometida a todas las pruebas fisicoquímicas y biológicas de control de calidad.

2.1.3 TÉCNICAS MORFOLÓGICAS.

Los reactivos utilizados fueron de alta calidad analítica, el agua utilizada fue ultrapurificada (sistema Milli-Q de Millipore).

- A) Glutaraldehído, Tetraóxido de osmio, resinas epóxicas, cacodilato de sodio, acetato de uranilo, citrato de plomo, azul de toluidina, rejillas de cobre (200 "mesh") y moldes de inclusión; todo este material se obtuvo de Electron Microscopy Sciences (E.U.A).
- B) La diaminobenzidina (3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride dihydrate), glicina y peróxido de hidrógeno se obtuvieron de Sigma Chemical Company (E.U.A).
- C) El vidrio para preparar las cuchillas de Pelco y la cuchilla de diamante de la marca Diatome (Suiza).
- D) Los rollos de película para el microscopio electrónico de transmisión de la marca Agfa–Gevaert AG (Alemania).
- E) El papel para la impresión de las micrografías electrónicas fue de la marca Eastman Kodak.

2.1.4 TÉCNICAS BIOQUÍMICAS.

- A) Jeringas, agujas, material quirúrgico estéril; agua ultrapurificada por el sistema Milli–Q de Millipore.
- B) Microtainer de la casa Becton Dickinson.
- C) Fosfato monoácido y diácido de potasio, peróxido de hidrógeno, sacarosa, DTE, PMSF, triton X 100 y EDTA de Sigma Company (E.U.A). Hidróxido de sodio y etanol de Merck.(Alemania).
- D) Albúmina sérica y reactivo de Bradford de Bio–Rad.

2.2 EQUIPO.

- Microscopio electrónico de trasmisión, Carl Zeiss EM 109.
- Foto microscopio Carl Zeiss.
- Microscopio estereoscópico American Optical.
- Ultramicrotomo LKB BROMNA ULTRATOME.
- Preparador de cuchillas de vidrio LKB BROMNA.

- Vortex de American Scientific Products.
- Potenciometro Orion Research.
- Homogenizador de tejidos Potter-Evelhjeim, marca Bellco.
- Espectrofótometro Spectronic.
- Autoanalizador automático Beckman con sistema SYNCHRON CX®.
- Balanza Analítica Mettler.

2.3 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental que se siguió se esquematiza en la figura 6.

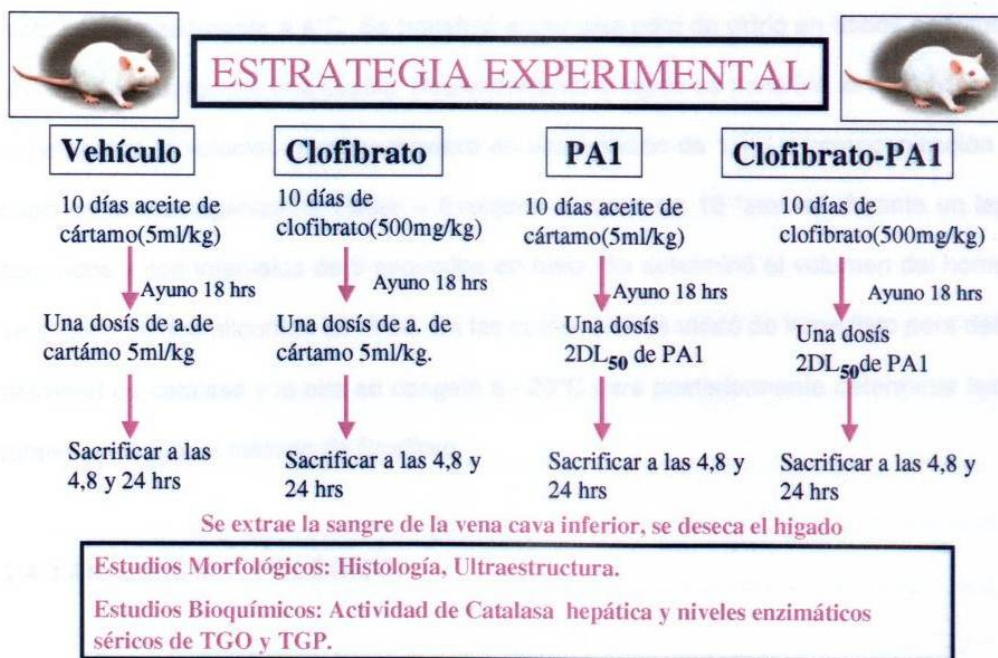


Figura 6. Estrategia experimental.

2.4 MÉTODOS.

2.4.1 Obtención de la muestra.

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical. Después, se procedió a realizar la disección, se extrajo la sangre de la vena cava inferior, se disecó el hígado, el cual fue fragmentado en tres porciones: las dos primeras para inclusión en resinas epóxicas, y la tercera se pesó y congeló a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, para la técnica bioquímica de la actividad de catalasa.

2.4.2 Preparación del homogenado del hígado.

Una de las porciones de hígado que se tenía almacenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ se descongeló y mantuvo en hielo aproximadamente a 4°C . Se transfirió a una caja petri de vidrio en donde se fragmentó con un bisturí hasta formar una papilla. Posteriormente el tejido se transfirió al vaso homogenizador, se le agregó la solución homogenizadora en una relación de 1:4. La homogenización se llevó a cabo en un homogenizador Potter – Evehjem a razón de 10 “stokes” durante un lapso de 15 segundos y con intervalos de 5 segundos en hielo. Se determinó el volumen del homogenado y se separaron dos alícuotas de .5 ml. De las cuales una se utilizó de inmediato para determinar la actividad de catalasa y la otra se congeló a -20°C para posteriormente determinar las proteínas totales mediante el método de Bradford.

2.4.3 ANÁLISIS MORFOLÓGICO.

2.4.3.1 Detección citoquímica de la actividad de catalasa peroxisomal.

La actividad citoquímica de catalasa peroxisomal, se detectó por el método de Angermüller y Fahimi³⁷. El procedimiento que se realizó para esta técnica se muestra en el apéndice A tabla 2.

2.4.3.2 Microscopia de luz y electrónica.

Las muestras fueron procesadas con la técnica habitual para microscopia electrónica: el tejido fue fijado en solución de Karnovsky-Ito (ácido pícrico, formaldehído, glutaraldehído) en buffer de cacodilatos con pH 7.2-7.4. Postfijados en solución acuosa de tetraóxido de osmio al 2%, incluidos en resinas epóxicas. Se prepararon dos tipos de cortes:

- A) **Semifinos**, de 1µm de grosor, se montaron en un portaobjetos de los cuales uno se tiñó con azul de toluidina y el otro no se tiñó, ambos para análisis por microscopía de luz.
- B) **Finos**, de aproximadamente 100 nm de grosor y contrastados con soluciones acuosas de acetato de uranilo al 5% y citrato de plomo al 0.4%, para el análisis de la ultraestructura.

El procedimiento que se llevó a cabo para realizar esta técnica se muestra en el apéndice A tabla 3.

2.4.4 ANALISIS BIOQUÍMICO.

2.4.4.1 Determinación de aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) en suero.

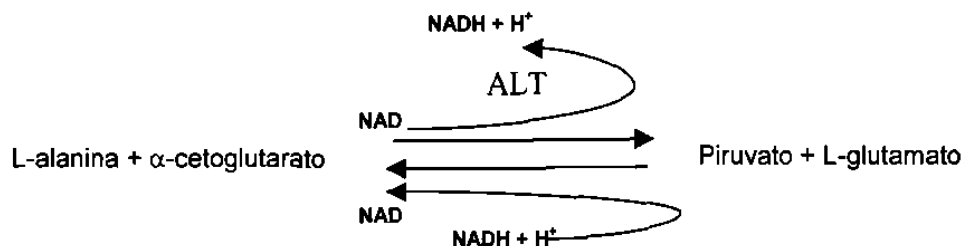
En la clínica son importantes dos transaminasas del suero la AST y ALT anteriormente conocidas como TGO y TGP respectivamente. El tejido hepático es rico en ambas enzimas y cuando existen lesiones en este tejido en donde se presenta citólisis del hepatocito hay un aumento en los niveles séricos de ellas. Por ello se utilizan como un parámetro para evaluar el grado de daño hepático.

En la siguiente reacción, la aspartato amino transferasa cataliza la transaminación reversible de L-aspartato y α -cetoglutarato a oxaloacetato y L-glutamato.



2.4.4.2 Determinación de alanina aminotransferasa (ALT) en suero.

En la siguiente reacción, la alanina amino transferasa cataliza la transaminación reversible de L-alanina y α -cetoglutarato a piruvato y L-glutamato.



En ambas reacciones el sistema SYNCHRON CX mide el cambio de absorbancia a 340 nm, producido por el aumento o disminución de $\text{NADH} + \text{H}^+$ que ocurre durante la reacción enzimática.

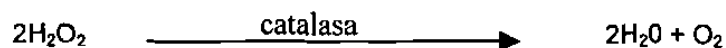
Este cambio de absorbancia es directamente proporcional a las actividades de la aspartato amino transferasa y alanina aminotrasferasa en la muestra.

El procedimiento que se llevó a cabo para realizar esta técnica se muestra en el apéndice A tabla 3.

2.4.4.3 Determinación de la actividad de catalasa en homogenados.

La actividad de catalasa se determinó por el método de Aebi³⁹. Este método espectrofotométrico se basa en la determinación de la disminución del peróxido de hidrógeno que actúa como sustrato, a una longitud de onda de 240 nm, temperatura de 25°C y pH 7.4.

La actividad catalítica se muestra en la siguiente reacción:



Una unidad de catalasa se define³⁸ como la cantidad necesaria de enzima para transformar un μmol de peróxido de hidrógeno por minuto, a 25 °C.

El procedimiento que se llevó a cabo para la determinación de la actividad de catalasa peroxisomal se muestra en el apéndice A tabla 4 .

2.4.4.4 Determinación de Proteínas totales

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford⁶² el cuál se basa en la unión del colorante azul de Coomassie brillante G-250 a las proteínas causando un cambio del pico máximo de absorción del colorante de 465 nm a 595 nm. El incremento de absorbancia a 595 nm es proporcional a la concentración de proteínas.

El procedimiento que se siguió para realizar esta técnica se muestra en el apéndice A tabla 6.

Para cada determinación se realizó una curva de calibración con estándares de albúmina sérica bovina a partir de una concentración de 2.5 hasta 20 μg de proteína, como se describe a continuación:

Tubo	Concentración	Agua destilada (μl)	Solución patrón (μl)
1	2.5	197.5	2.5
2	5.0	195.0	5.0
3	7.5	192.5	7.5
4	10.0	190.0	10.0
5	12.5	187.5	12.5
6	15.0	185.0	15.0
7	20.0	180.0	20.0
8	-----	200.0	-----

Cada uno de los estándares se preparó por triplicado. En la figura 7 del apéndice A se muestra una de las curvas patrón que se utilizaron para calcular la concentración de proteínas totales, la explicación de los cálculos se ejemplifica en el apéndice C.

2.4.5. Análisis estadístico.

Cada una de las determinaciones analíticas: determinación de aminotransferasas, de actividad de catalasa y de proteínas totales, se realizaron por triplicado y se sometieron a la prueba de T de Student, para determinar la posible diferencia significativa con respecto al control sin tratamiento (control absoluto).

La prueba de T Student se realizó con un valor de $n = 3$, utilizando un grado de significancia de $P \geq 0.05$.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 ANÁLISIS MORFOLÓGICO POR MICROSCOPIA DE LUZ.

3.1.1 CONTROL SIN TRATAMIENTO.

Todos los resultados histológicos y citoquímicos obtenidos del análisis de cortes semifinos a microscopía de luz, de todos los tiempos y condiciones experimentales, fueron comparados con los resultados obtenidos del control sin tratamiento (fig. 8A). Este correspondió a nuestro control absoluto; en el que se observó la histología normal del hígado, con hepatocitos ordenados en placas o láminas interconectadas. Estas láminas de hepatocitos están dispuestas radialmente con respecto a las ramas terminales de las venas hepáticas que corresponden a las venas centrales.

Estas placas de hepatocitos están en relación a un lado y a otro con los sinusoides hepáticos, en las paredes de los cuales se observan núcleos de células que corresponden a células endoteliales y de Kupffer. Los hepatocitos muestran una forma poligonal o poliédrica con límites celulares definidos, uno o dos núcleos claros, centrales, con uno o más nucleolos. En su citoplasma se observan algunas gotas de lípidos, estructuras densas y oscuras que corresponden a peroxisomas y a otros organelos celulares.

3.1.2. CONTROL VEHÍCULO.

La figura 8 B nos muestra el análisis histológico obtenido de los cortes de hígado de ratón tratados con aceite de cártamo que correspondió a nuestro grupo control vehículo.

En este se observó la histología normal semejante a la del control absoluto ya descrita.

3.1.3. CONTROL DE PROLIFERACIÓN PEROXIOSOMAL.

Nuestro grupo control de proliferación peroxisomal lo conformaron ratones que fueron tratados con clofibrato. En la figura 8 C se muestra que la estructura histológica observada en estos cortes es semejante a la del control absoluto, diferenciándose únicamente por la presencia de numerosos puntos oscuros en el citoplasma que corresponden a los peroxisomas, los cuales aumentan progresivamente en relación con el tiempo de exposición.

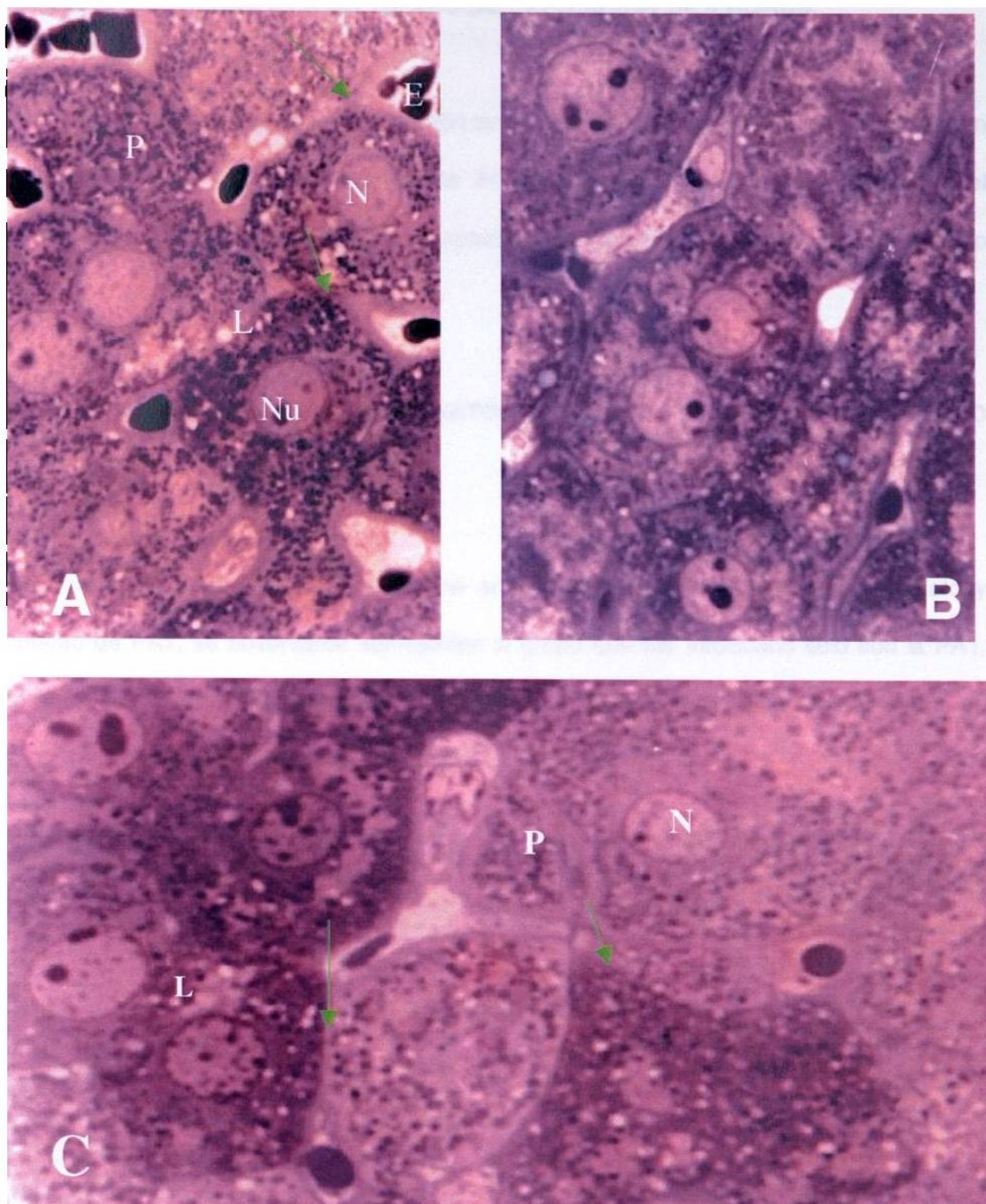


Figura 8. Hígado de ratón. **A) Control sin tratamiento.** Muestra hepatocitos normales con núcleos eucromáticos (N), nucleolos prominentes (Nu) y en el citoplasma gotas de lípidos (L) y peroxisomas (P). Obsérvense los límites celulares bien definidos (flechas) además de sinusoides con eritrocitos en su interior(E). **B) Control vehículo.** Se muestran los hepatocitos semejantes al control absoluto. **C) Control de proliferación peroxisomal (grupo tratado con clofibrato) a un tiempo de exposición de 24 horas.** Se observan hepatocitos normales con núcleo claro (N), y en su citoplasma numerosos peroxisomas (P), y algunas gotas de lípidos (L) Nótese los Límites celulares definidos (flecha). Fotomicrografía de luz. Inclusión en resinas epóxicas. Azul de toluidina. 126x.

3.1.4 PRETRATAMIENTO CON ACEITE DE CÁRTAMO E INTOXICACIÓN CON PEROXISOMICINA A1 A UN TIEMPO DE EXPOSICIÓN DE 4 HORAS.

Se observa por primera vez ligera congestión sinusoidal. En algunos hepatocitos se muestran áreas pequeñas con discontinuidad de los límites celulares, además de mostrar en el citoplasma algunos depósitos pequeños de lípidos, y algunos núcleos disminuidos de tamaño (Fig. 9A).

3.1.5 PRETRATAMIENTO CON CLOFIBRATO E INTOXICACIÓN CON PA1 A UN TIEMPO DE EXPOSICIÓN DE 4 HORAS.

En los cortes de hígado de ratones que se sometieron al pretratamiento con clofibrato y tratamiento de PA1, se observaron semejantes al grupo que fue intoxicado solo con la PA1, excepto en los límites celulares que en este caso, se mostraron definidos además de observarse numerosos peroxisomas en el citoplasma (fig. 9B).

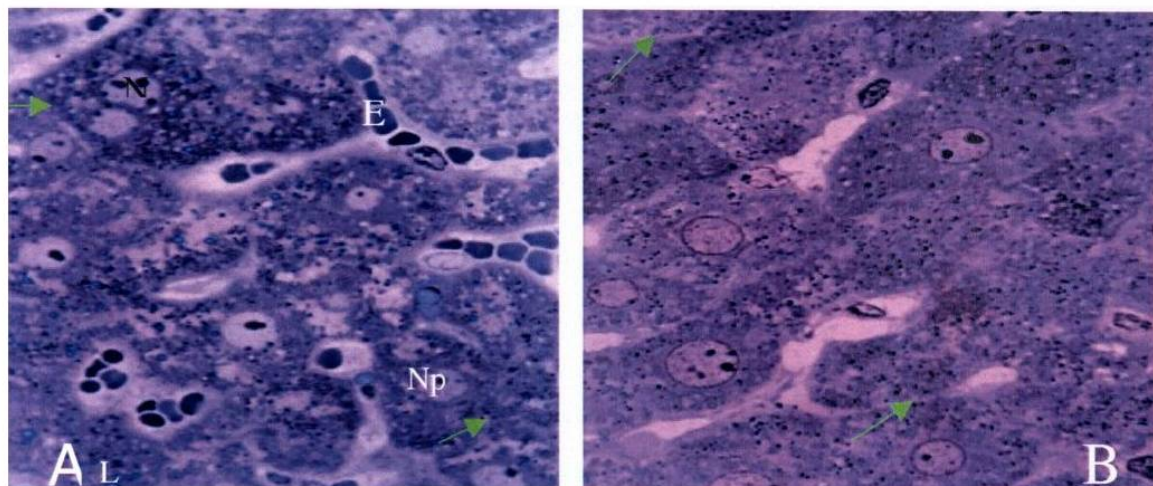


Figura 9. Hígado de ratón. Tiempo de exposición 4 horas. **A) Control positivo de daño hepático (tratado con PA1).** Se muestra una ligera congestión sinusoidal con eritrocitos en su interior (E), algunos hepatocitos con pérdida parcial de sus límites celulares (flecha) con núcleos eucromáticos (N), algunos núcleos disminuidos de tamaño (Np), y en el citoplasma gotas de lípidos (L). **B) Tratado con clofibrato – PA1.** Se muestran los hepatocitos semejantes a la fotomicrografía de la izquierda. Nótese los límites celulares definidos (flecha) y el creciente número de peroxisomas. Fotomicrografía de luz. Inclusión en resinas epóxicas. Azul de toluidina. 100x.

3.1.6 PRETRATAMIENTO CON ACEITE DE CÁRTAMO E INTOXICACIÓN CON PEROXISOMICINA A1 A TIEMPO DE EXPOSICIÓN DE 8 HORAS.

En los cortes de hígado del grupo de ratones tratados solo con la PA1 y sacrificados a las 8 horas, se presentó un número mayor de hepatocitos con pérdida de los límites celulares, núcleos disminuidos de tamaño y que se tiñen más intensamente. Estos hepatocitos se encuentran alternando con otros de estructura normal (fig. 10A).

3.1.7. PRETRATAMIENTO CON CLOFIBRATO E INTOXICACIÓN CON PEROXISOMICINA A1 A TIEMPO DE EXPOSICIÓN DE 8 HORAS.

En contraste con los cortes de hígado de los ratones que se sometieron al pretratamiento con clofibrato e intoxicados con PA1, los hepatocitos continúan conservando sus límites celulares definidos y en general la apariencia es semejante al grupo de exposición de 4 horas ya que se presentan células con núcleos disminuidos de tamaño y en el citoplasma numerosos peroxisomas (fig.10B).

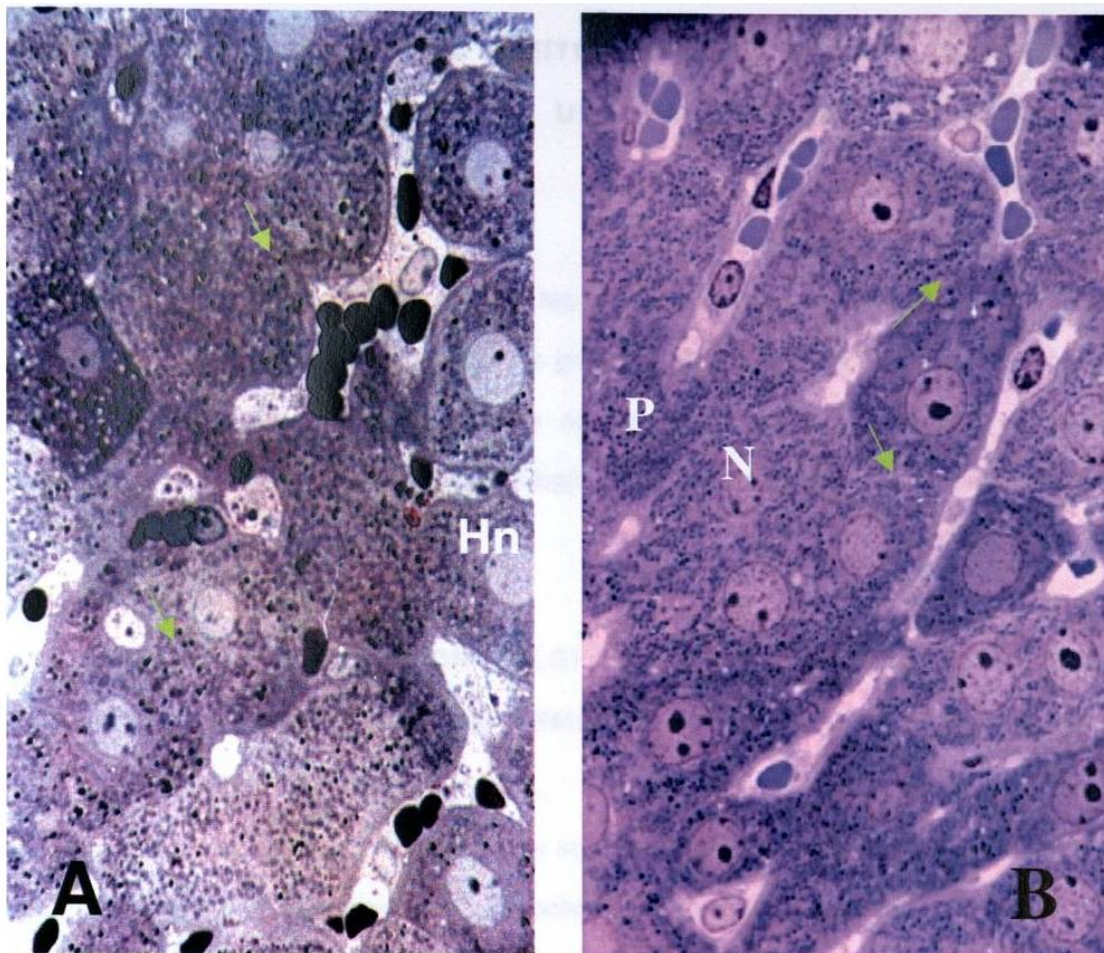


Figura 10. Hígado de ratón. Tiempo de exposición 8 horas. **A) Tratamiento con PA1.** Se muestran hepatocitos normales (Hn), entre otros con límites celulares incompletos (flecha) y núcleos teñidos y reducidos de tamaño (N). **B) Tratamiento con clofibrato – PA1.** Se observan hepatocitos con límites celulares bien definidos (flecha), el citoplasma con numerosos peroxisomas (P) y núcleos teñidos y reducidos de tamaño (N). Fotomicrografía de luz. Inclusión en resinas epóxicas. Azul de toluidina. 100x..

3.1.8 PRETRATAMIENTO CON ACEITE DE CÁRTAMO E INTOXICACIÓN CON PEROXISOMICINA A1 A UN TIEMPO DE EXPOSICIÓN DE 24 HORAS.

A este tiempo de intoxicación en los cortes de hígado de los ratones que se trataron con PA1 se presentó un daño generalizado, con infiltración grasa y áreas hemorrágicas; en los hepatocitos se observan vesículas con fragmentos de núcleo con cromatina condensada y restos citoplásmicos en su interior, que por su morfología corresponden a cuerpos apoptóticos (fig. 11 A).

3.1.9 PRETRATAMIENTO CON CLOFIBRATO E INTOXICACIÓN CON PEROXISOMICINA A1 A UN TIEMPO DE EXPOSICIÓN DE 24 HORAS.

En los cortes de hígado de los ratones que se sometieron a un pretratamiento con clofibrato e intoxicaron con la Pa1, se observaron hepatocitos que mostraron una morfología normal con límites celulares definidos, núcleos claros y nucleolos prominentes, alternando con otros que mostraron un núcleo basófilo y reducido de tamaño. Además de otros que contenían en su citoplasma cuerpos apoptóticos (fig.11B).

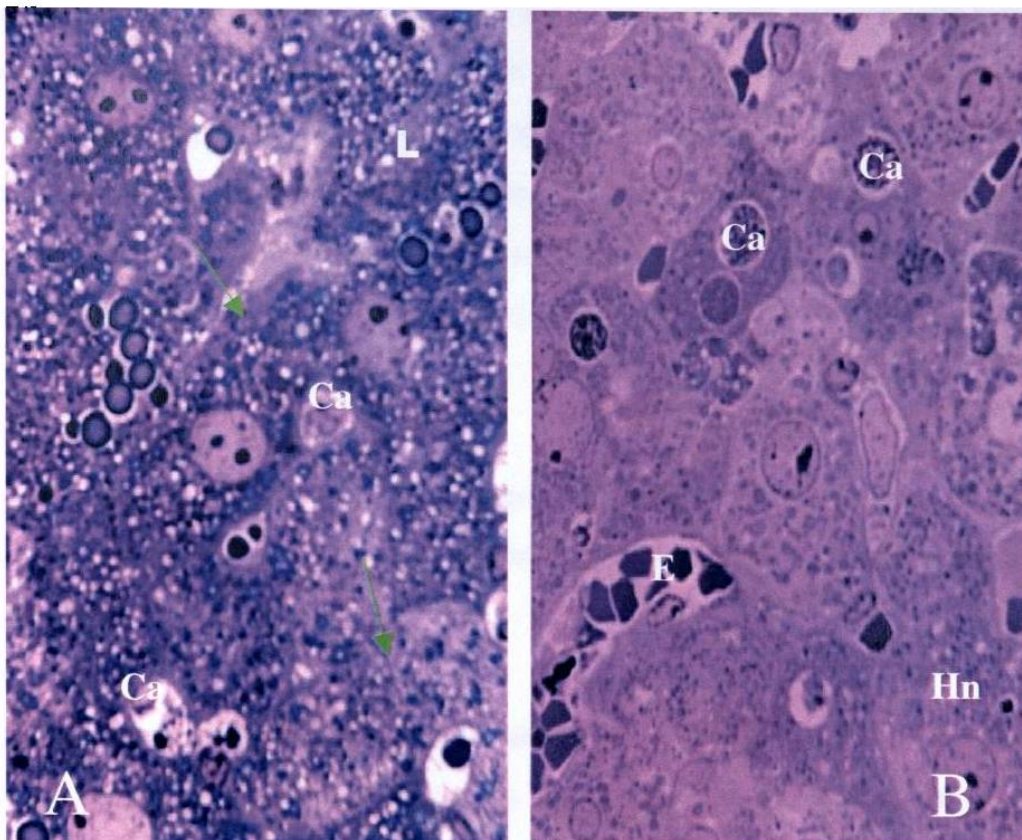


Figura 11. Hígado de ratón. Tiempo de exposición 24 horas. **A) Tratamiento con PA1.** Se observan hepatocitos sin límites celulares (flecha), en su citoplasma múltiples gotas de lípidos (L) además de cuerpos apoptóticos (Ca), y áreas hemorrágicas. **B) Tratamiento de clofibrato – PA1.** Se muestran hepatocitos de apariencia normal con límites celulares definidos (Hn), alternando con otros hepatocitos que presentan cuerpos apoptóticos en su citoplasma (Ca) y sinusoides congestivos con eritrocitos en su interior (E). Fotomicrografía de luz. Inclusión en resinas epóxicas. Azul de toluidina. 100x.

3.2 ANÁLISIS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

3.2.1 CONTROL SIN TRATAMIENTO.

Todos los resultados ultraestructurales y citoquímicos obtenidos del examen de cortes ultrafinos a microscopía electrónica de transmisión, de todos los tiempos y condiciones experimentales fueron comparados con los resultados obtenidos del control sin tratamiento (fig. 12A), que correspondió a nuestro control absoluto. En este se observó la ultraestructura normal de los hepatocitos con membranas celulares íntegras, núcleos eucromáticos y nucleolos evidentes; en el citoplasma los organelos íntegros: mitocondrias, peroxisomas, retículo endoplásmico liso y rugoso, complejo de Golgi; además de lisosomas, cuerpos autofágicos y gotas lipídicas.

3.2.2. CONTROL VEHÍCULO.

En la figura 12B se muestra el análisis morfológico obtenido de los cortes de hígado de ratón tratados con aceite de cártamo, en el que se observó una ultraestructura celular semejante a la del control absoluto.

3.2.3 CONTROL DE PROLIFERACIÓN PEROXISOMAL.

En la figura 13A y B se muestra la ultraestructura celular observada en los cortes de hígado pretratados con clofibrato y tratados con aceite de cártamo en los cuales se observó una ultraestructura semejante a la del control absoluto, excepto que se presentaron numerosos peroxisomas.

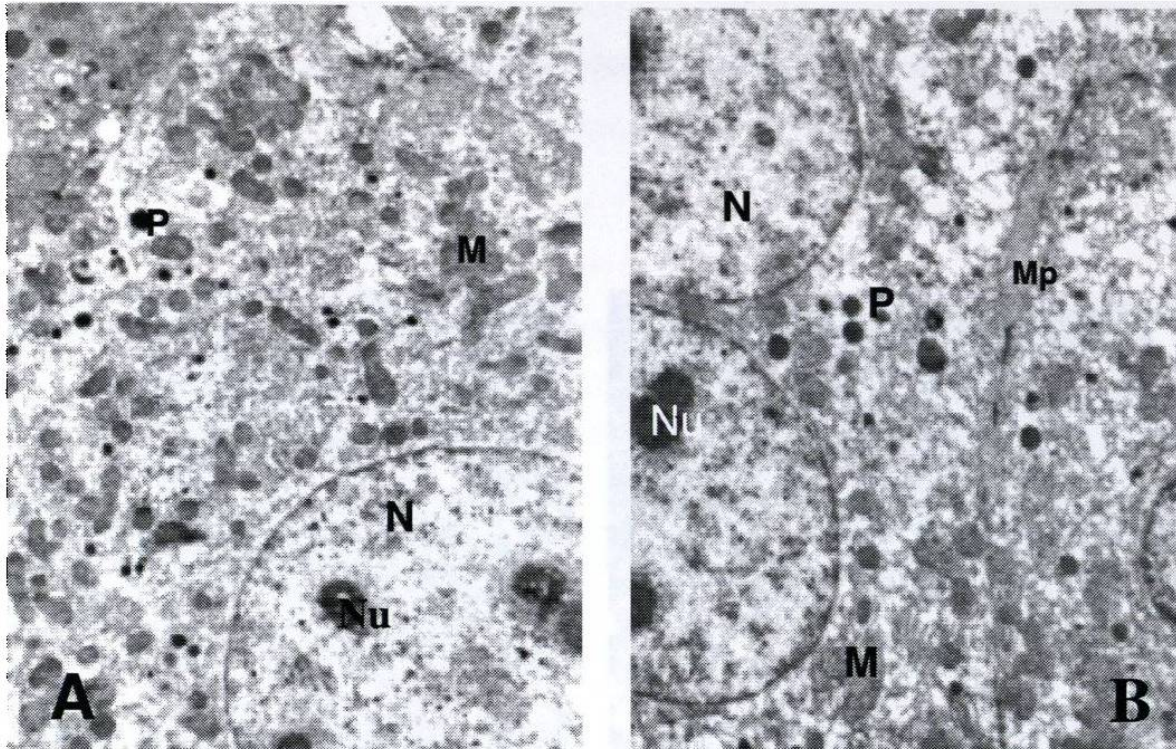


Figura 12. Hígado de ratón. **A) Sin tratamiento (control absoluto).** Se muestra un hepatocito con Núcleo eucromático (N), nucleolos (Nu), mitocondrias (M), peroxisomas (P). **B) Tratamiento con vehículo (aceite de cártamo).** Se muestra un hepatocito binucleado con la membrana citoplásmica (Mp), núcleos claros (N), nucleolos (Nu), y en el citoplasma mitocondrias (M), peroxisomas (P). Micrografías electrónicas de transmisión, inclusión en resinas epóxicas, contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo. 3000x.

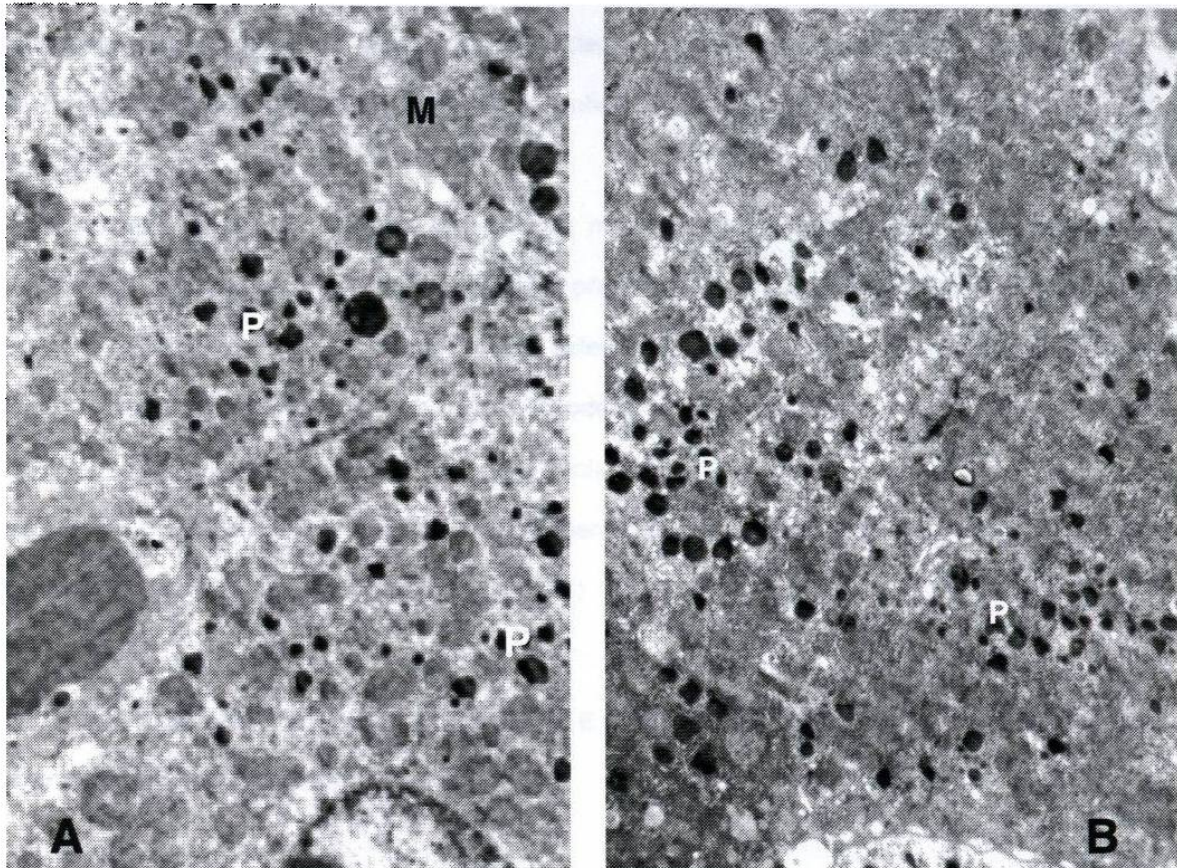


Figura 13. Hígado de ratón. Tratamiento con clofibrato. **A) Tiempo de exposición 4 horas.** Se muestra un hepatocito con ultraestructura normal. En el citoplasma mitocondrias (M), obsérvese los numerosos peroxisomas (P). **B) Tiempo de exposición 8 horas.** Nótese el aumento de peroxisomas (P). Micrografías electrónicas de transmisión, inclusión en resinas epóxicas, contrastado con acetato de uranilo y citrato de plomo. 3000x.

3.2.4 PRETRATAMIENTO CON ACEITE DE CÁRTAMO E INTOXICACIÓN CON PEROXISOMICINA A1 A UN TIEMPO DE EXPOSICIÓN DE 4 HORAS.

En los cortes de hígado de ratón intoxicados con solo la PA1 a este tiempo de exposición, se observaron hepatocitos con núcleos claros, nucleolos evidentes, en el citoplasma: peroxisomas, cuerpos autofágicos, algunos de los cuales contienen peroxisomas, gotas lipídicas de diversos tamaños.

En todos los hepatocitos además de presentar mitocondrias de apariencia normal, también se observaron mitocondrias alteradas: Un extremo presenta las crestas mitocondriales íntegras y en el otro extremo pérdida de la membrana externa con protusión de la membrana interna conteniendo matriz mitocondrial de baja electrodensidad y ausencia de crestas, que en cortes transversales tiene la apariencia de vesículas vacías (fig. 17A y B).

Algunas otras mitocondrias se mostraron aumentadas de volumen, con baja electrodensidad, pérdida parcial de la estructura interna (fig. 14 A).

3.2.5 PRETRATAMIENTO CON CLOFIBRATO E INTOXICACIÓN CON PA1 A UN TIEMPO DE EXPOSICIÓN DE 4 HORAS.

En los cortes ultrafinos de hígado de ratón pretratado con clofibrato e intoxicado con PA1, los hepatocitos muestran una ultraestructura semejante al control absoluto excepto que se observan en el citoplasma numerosos peroxisomas (fig 14 B).

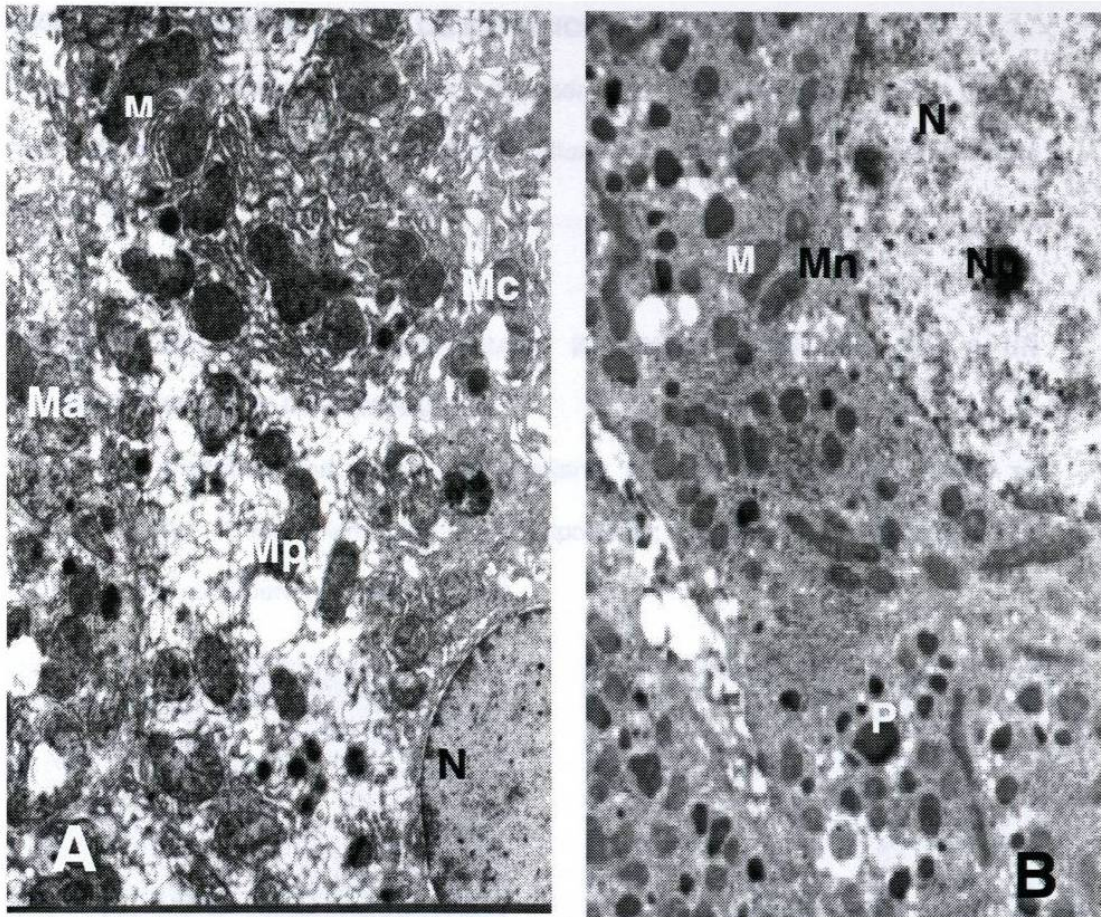


Figura 14. Hígado de ratón. Tiempo de exposición 4 horas. **A) Pretratamiento con aceite de cártamo e intoxicado con PA1.** Se muestra el núcleo de un hepatocito (N), en el citoplasma mitocondrias con apariencia normal (M), mitocondrias aumentadas de volumen y baja electrodensidad (Ma), mitocondrias con protusión de la membrana interna (Mp) y mitocondrias con pérdida de la matriz, estructura interna y discontinuidad parcial de las membranas (Mc). **B) Pretratamiento con clofibrato e intoxicado con PA1.** Se muestra un hepatocito con núcleo eucromático (N), nucleolo (Nu), membrana nuclear (Mn), mitocondrias (M) y nótese la presencia de numerosos peroxisomas (P). Micrografías electrónicas de transmisión, inclusión en resinas epóxicas, contrastado con acetato de uranilo y citrato de plomo. 4400x.

3.2.6 PRETRATAMIENTO CON ACEITE DE CÁRTAMO E INTOXICACIÓN CON PEROXISOMICINA A1 A UN TIEMPO DE EXPOSICIÓN DE 8 HORAS.

Los hepatocitos de la mayor parte de las mitocondrias se observan semejantes a los del control absoluto. También se observan algunas alteradas, semejantes a las del tiempo de intoxicación de 4 horas. (fig.15A).

3.2.7 PRETRATAMIENTO CON CLOFIBRATO E INTOXICACIÓN CON PA1 A UN TIEMPO DE EXPOSICIÓN DE 8 HORAS.

Los hepatocitos muestran una apariencia semejante al grupo de ratones que solo se intoxicaron con PA1, a este mismo tiempo de exposición; excepto que en citoplasma se presentaron numerosos peroxisomas (fig. 15B).

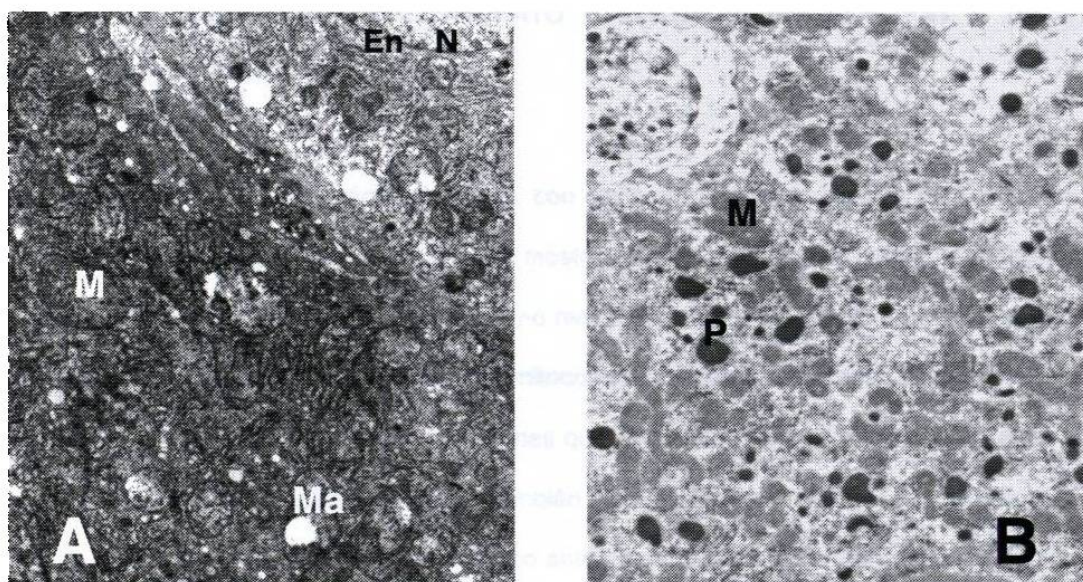


Figura 15. Hígado de ratón. Tiempo de exposición 8 horas. **A) Pretratamiento con aceite de cártamo e intoxicado con PA1.** Se muestra parte del núcleo de un hepatocito (N), la envoltura nuclear (En) y en el citoplasma la mayoría de las mitocondrias con apariencia normal (M) y mitocondrias alteradas con pérdida parcial de matriz y estructura interna (Ma). **B) Pretratamiento con clofibrato e intoxicado con PA1.** Se muestra un hepatocito que en el citoplasma presenta mitocondrias normales (M) y nótese la presencia de numerosos peroxisomas (P). Micrografías electrónicas de transmisión, inclusión en resinas epóxicas, contrastado con acetato de uranilo y citrato de plomo. 4400x.

3.2.8 PRETRATAMIENTO CON ACEITE DE CÁRTAMO E INTOXICACIÓN CON PEROXISOMICINA A1 A UN TIEMPO DE EXPOSICIÓN DE 24 HORAS.

En los cortes de hígado de ratón intoxicados con PA1 y sacrificados 24 horas después, se observaron hepatocitos con daño severo generalizado con acúmulos lipídicos, en el citoplasma la alteración mitocondrial se presenta generalizada con el patrón característico ya descrito en el grupo de ratones intoxicados con PA1 expuestos durante 4 horas (fig. 17 A). Además se observaron numerosos cuerpos tanto autofágicos como apoptóticos (fig. 16A).

3.2.9 PRETRATAMIENTO CON CLOFIBRATO E INTOXICACIÓN CON PA1 A UN TIEMPO DE EXPOSICIÓN DE 24 HORAS.

En los cortes de hígado de ratón pretratados con clofibrato e intoxicados con PA1 a este mismo tiempo de exposición, los hepatocitos mostraron un daño significativamente menor en comparación con el grupo de ratones que no recibieron el pretratamiento con clofibrato, sin embargo se presentaron las alteraciones mitocondriales semejantes a las ya descritas, en un número menor que en el grupo de ratones que solo se intoxicaron con la PA1 a este mismo tiempo de exposición (fig.17B). También se presentaron cuerpos autofágicos, apoptóticos en menor proporción que el grupo antes mencionado. Además de numerosos peroxisomas (fig. 16B).

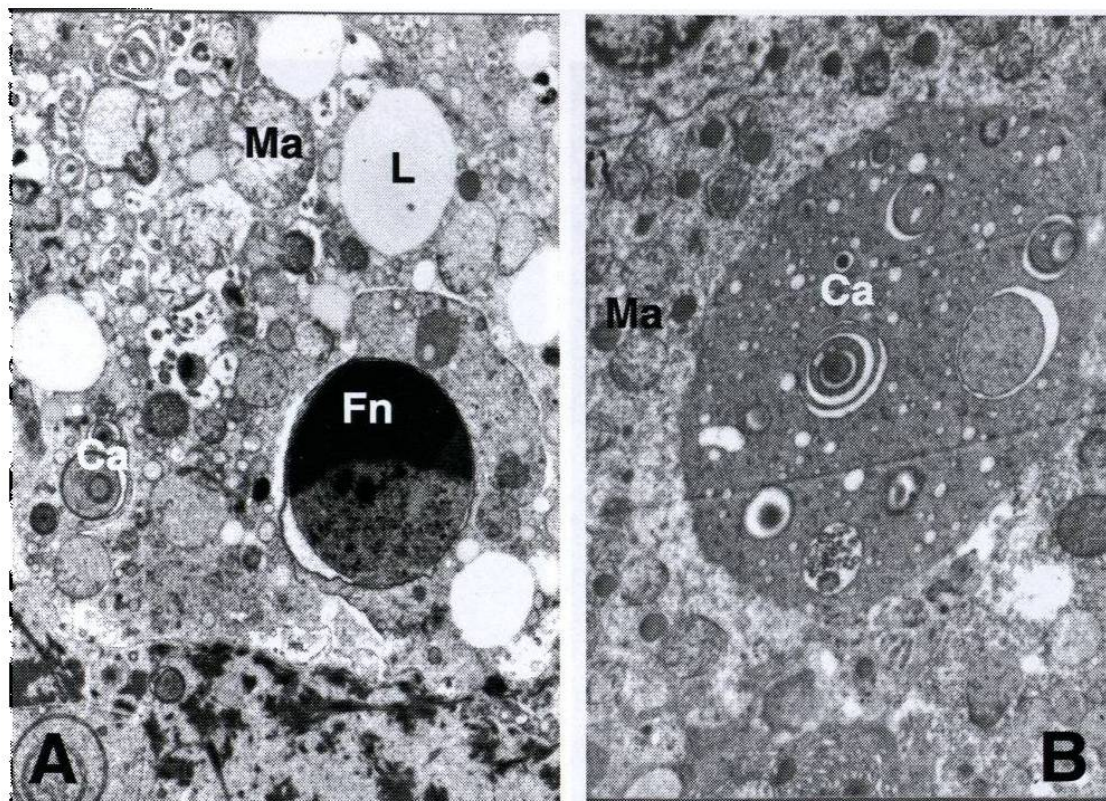


Figura 16. Hígado de ratón. Tiempo de exposición 24 horas. **A) Pretratamiento con aceite de cártamo e intoxicado con PA1.** Se muestran en el citoplasma de un hepatocito numerosas mitocondrias alteradas (Ma), un fragmento de núcleo con la cromatina en forma de media luna, característico de un cuerpo apoptótico (Fn), cuerpos apoptóticos (Ca) y gotas de lípidos (L). **B) Pretratamiento con clofibrato e intoxicado con PA1.** Se muestran mitocondrias alteradas, notese la disminución del daño en contraste con las mitocondrias de la foto de la izquierda (Ma), un gran cuerpo apoptótico (Ca) y numerosos peroxisomas (P). Micrografías electrónicas de transmisión, inclusión en resinas epóxicas, contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo. 4400x.

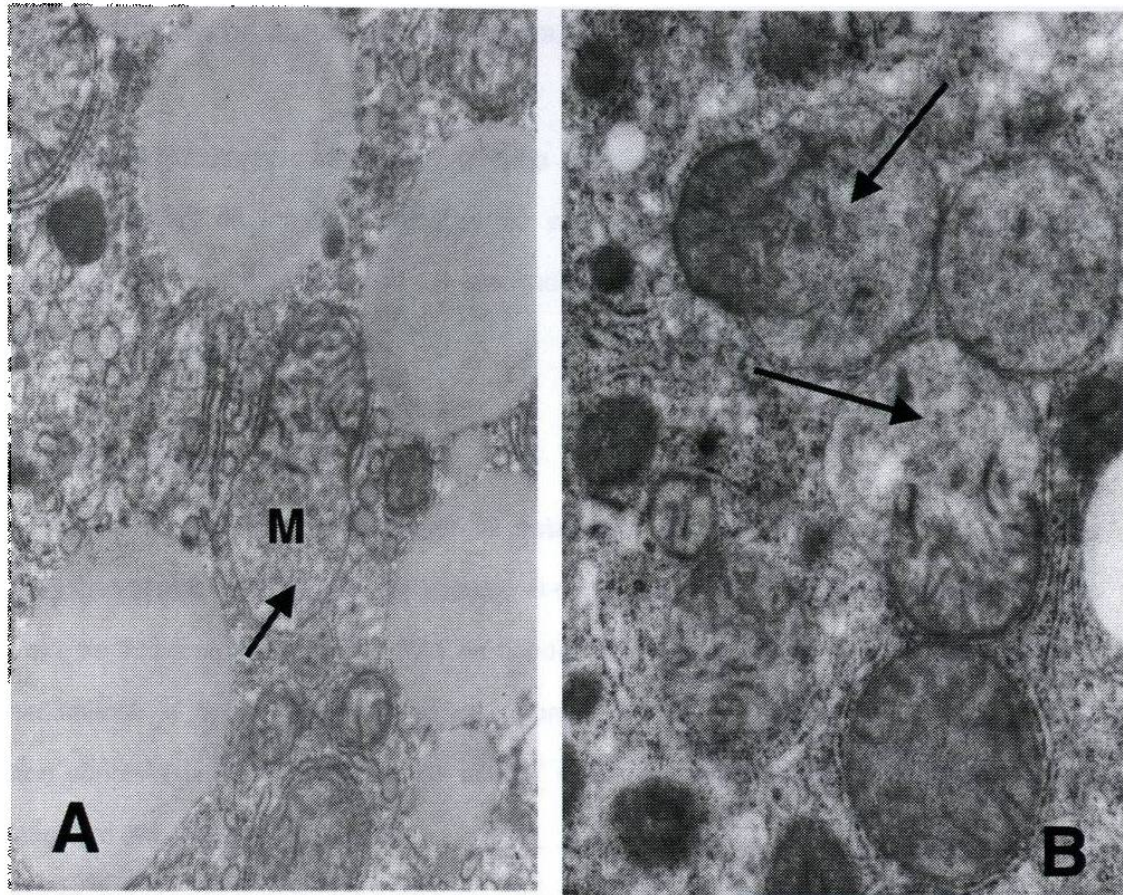


Figura 17. Hígado de ratón. Tiempo de exposición 24 horas. **A) Pretratamiento con aceite de cártamo e intoxicado con PA1.** Se muestra mitocondria alterada (M) obsérvese el patrón característico en un extremo las crestas y en el otro una protusión de la membrana externa con matriz que carece de la estructura interna (flecha). **B) Pretratamiento con clofibrato e intoxicado con PA1.** Se muestra la alterción mitocondrial carcaterística (flecha). Micrografías electrónicas de transmisión, inclusión en resinas epóxicas, contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo. 12000x.

3.3 ANALISIS BIOQUÍMICO

3.3.1 DETERMINACIÓN DE ASPARTATO AMINOTRANSFERA EN SUERO (AST).

Este parámetro lo utilizamos para evaluar el daño hepático. Todos los resultados cuantitativos obtenidos del análisis de las transaminasas en suero, de todos los tiempos y condiciones experimentales fueron comparados con los resultados obtenidos del control sin tratamiento que correspondió a nuestro control absoluto.

3.3.1.1 A LAS 4 HORAS.

En el grupo de ratones que se sometieron al tratamiento con clofibrato se muestra un ligero ascenso de los valores de unidades con respecto al control absoluto, en contraste con el grupo de ratones que se intoxicaron solo con la PA1 en donde la concentración de esta enzima se mostró aproximadamente al doble. En el grupo de ratones que se pretrataron con clofibrato y se intoxicaron con PA1 la concentraciones de la AST mostraron valores muy semejantes a los del control absoluto (fig. 18).

3.3.1.2. A LAS 8 HORAS.

Los valores de esta enzima son semejantes a los del grupo de 4 horas.

3.3.1.3 A LAS 24 HORAS.

En el grupo de ratones tratados con clofibrato la concentración de la AST, mostró un aumento aproximadamente del doble, en contraste con el grupo de ratones intoxicados con la PA1 los valores de la AST alcanzaron cifras hasta 11 veces más altas; sin embargo en el grupo pretratado con clofibrato e intoxicado con la PA1 los valores disminuyeron aproximadamente al 50% con respecto al grupo intoxicado con la PA1 (fig. 18).

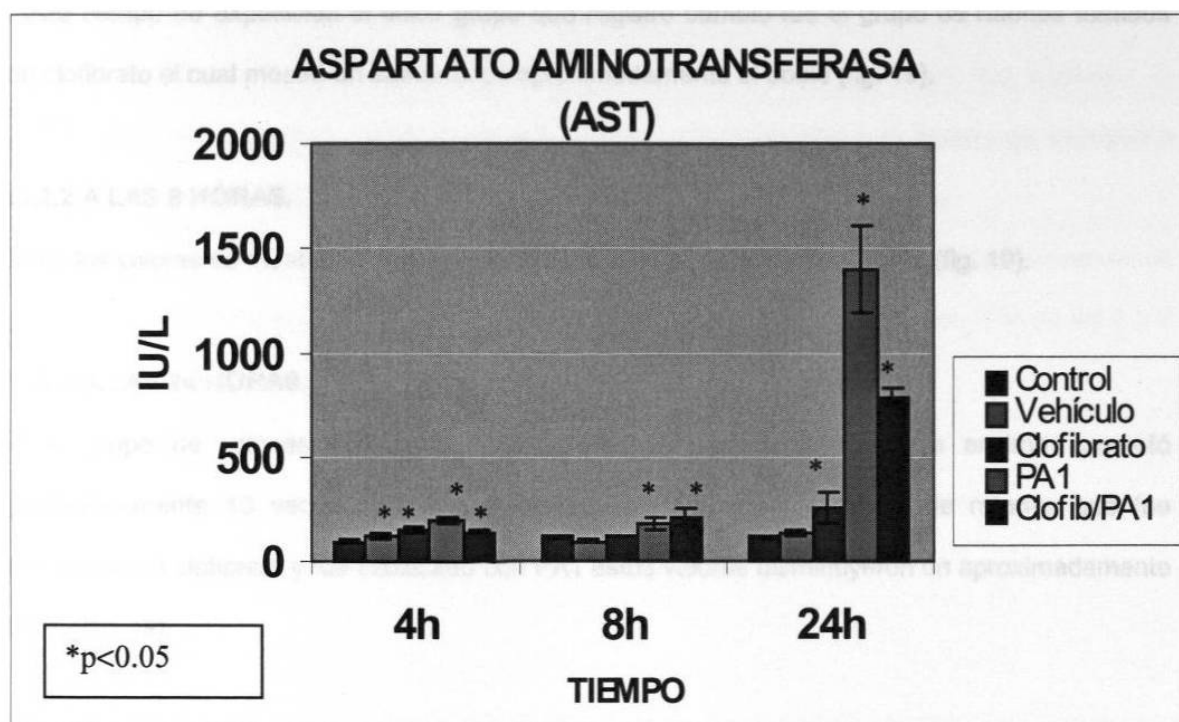


Figura 18. Análisis cuantitativo de aspartato aminotransferasa. Se tomaron como valores de referencia las unidades internacionales obtenidas en el grupo control sin tratamiento. Obsérvese como a las 24 horas la concentración de la enzima alcanza niveles muy elevados, en el grupo intoxicado con PA1 y ese valor disminuye (787 IU/l) en el grupo que fue pretratado con clofibrato e intoxicado con la PA1.

3.3.2 DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE ALANINA AMINOTRANSFERASA EN SUERO (ALT).

3.3.2.1 A LAS 4 HORAS.

A este tiempo de exposición el único grupo que registró cambio fue el grupo de ratones tratados con clofibrato el cual mostró un aumento de aproximadamente el doble (fig. 19).

3.3.2.2 A LAS 8 HORAS.

Todos los valores se mostraron semejantes al tiempo de exposición de 4 horas (fig. 19).

3.3.2.3 A LAS 24 HORAS.

En el grupo de ratones intoxicados con la PA1 la concentración de la enzima aumentó aproximadamente 13 veces más que el control absoluto y en el grupo de ratones que fue pretratado con clofibrato y fue intoxicado con PA1 estos valores disminuyeron en aproximadamente el 50% (fig.19).

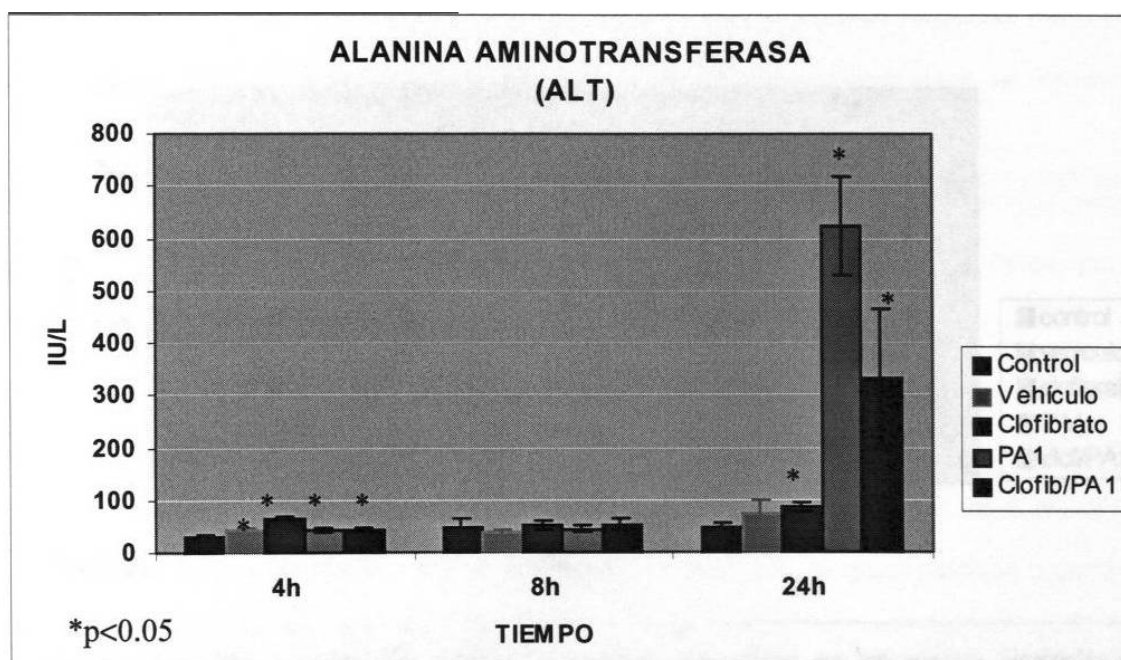


Figura 19. Análisis cuantitativo de alanina aminotransferasa. Se tomaron como valores de referencia las unidades internacionales obtenidas en el grupo de control sin tratamiento. Obsérvese como a las 24 horas la concentración de la enzima alcanza niveles muy elevados (624 IU/L), en el grupo intoxicado con PA1 y ese valor disminuye (331 IU/l) en el grupo que fue pretratado con clofibrato e intoxicado con la PA1.

3.3.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE CATALASA EN HOMOGENADOS DE HÍGADO.

Todos los resultados de todos los tiempos y condiciones experimentales que obtuvimos fueron comparados con los resultados obtenidos del control sin tratamiento (control absoluto).

En la figura 20 se muestra como en el grupo de ratones que se trataron con clofibrato la concentración de la enzima aumenta de una manera progresiva sobre el tiempo de exposición hasta alcanzar más del doble aproximadamente con respecto al control absoluto.

Caso contrario sucedió con el grupo de ratones intoxicados con la PA1 en donde observamos como los niveles de la enzima disminuyeron sobre el tiempo de exposición sobre todo de las 4 a 8 horas, ya que de las 8 a 24 horas se mantuvieron los niveles casi iguales.

En el grupo de ratones que se sometieron al pretratamiento con clofibrato e intoxicados con PA1 los niveles de la actividad de catalasa se mantuvieron semejantes a las del control absoluto en los tres tiempos de exposición.

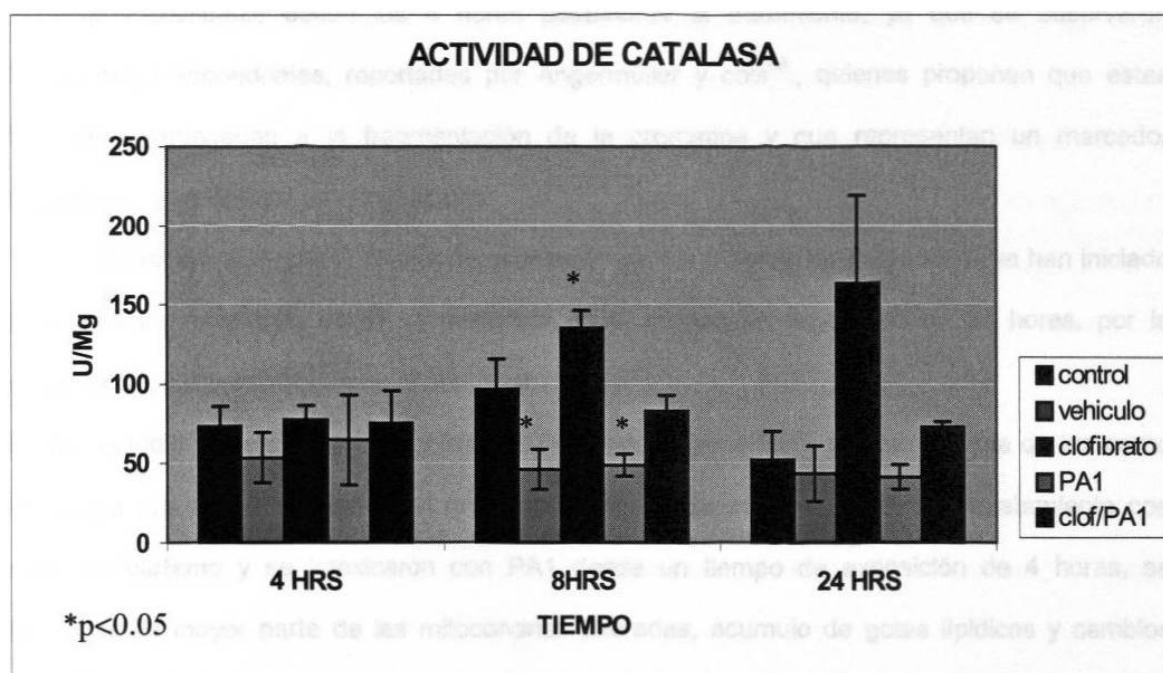


Figura 20. Actividad de catalasa. Notése el aumento progresivo en los niveles enzimáticos del grupo del clofibrato conforme pasa el tiempo de exposición; en contraste con la disminución causada en el grupo PA1. Obsérvese como los niveles de la actividad de catalasa en el grupo de clofibrato/PA1 se mantienen semejantes al control absoluto.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos nuestros resultados, se acepta la hipótesis de trabajo planteada: "el clofibrato tiene un efecto hepatoprotector contra la intoxicación causada por la peroxisomicina A1".

En el presente estudio, se confirmó la presencia de congestión vascular, hemorragia, degeneración hepática, esteatosis y necrosis, así como autofagia de peroxisomas en hígado de ratones pretratados con aceite de cártamo e intoxicados con PA1. Además se demostró que la PA1 causa apoptosis identificable desde las 4 horas posteriores al tratamiento, ya que se observaron alteraciones mitocondriales, reportadas por Angermüller y cols⁶³, quienes proponen que estas alteraciones anteceden a la fragmentación de la cromatina y que representan un marcador temprano de la apoptosis en el hepatocito.

Por ello, consideramos que al tiempo de exposición de 4 a 8 horas los hepatocitos ya han iniciado el proceso de apoptosis, como se evidencia en el tiempo de exposición de 24 horas, por la presencia de numerosos cuerpos apoptóticos.

Nuestro estudio se realizó *in vivo*, y los estudios morfológicos tanto de microscopía de luz como electrónica nos indicaron que en el grupo de ratones que se sometieron al pretratamiento con aceite de cártamo y se intoxicaron con PA1 desde un tiempo de exposición de 4 horas, se observaron la mayor parte de las mitocondrias alteradas, acumulo de gotas lipídicas y cambios degenerativos sub-celulares.

En el grupo de ratones que se sometieron por 10 días al pretratamiento con clofibrato y se intoxicaron posteriormente con PA1, a las 4 horas de exposición todos los hepatocitos se

mostraron semejantes al control absoluto, solo se diferenciaron por la presencia de numerosos peroxisomas. En este mismo grupo de ratones pero a un tiempo de exposición de 8 horas, nuevamente se observó la proliferación peroxisomal, sin embargo no hubo diferencia con respecto al grupo de ratones intoxicados con PA1 a este mismo tiempo de exposición. En contraste, a las 24 horas de exposición se presentaron áreas de hepatocitos semejantes a las del control absoluto. También se observó: proliferación peroxisomal, alteración mitocondrial como la ya descrita, además de numerosos cuerpos autofágicos. Se observaron numerosos cuerpos apoptóticos que aunque no se cuantificaron, aparentemente son más numerosos aun, que en el grupo de ratones que solo fueron intoxicados con PA1, por ello se sugiere examinar en estudios futuros la existencia de un posible efecto sinérgico de estos dos compuestos respecto a la inducción de apoptosis.

Por otro lado también se ha reportado que el clofibrato induce a la apoptosis de células de hepatoma AH-130⁶⁴. El mecanismo por el cual el clofibrato induce a estas células al proceso de apoptosis tampoco se ha esclarecido.

Los resultados morfológicos, sugieren que el clofibrato tuvo un efecto protector contra el daño hepático causado por la PA1 que fue más notable a las 24 horas de exposición. Así se disminuye el depósito de lípidos y el deterioro de la ultraestructura de los hepatocitos.

Otro parámetro empleado para evaluar el posible efecto protector del clofibrato fue la determinación de los niveles enzimáticos de las aminotransferasas (AST y ALT) en suero. Los niveles de las aminotransferasas se elevan progresivamente con el tiempo de exposición en el grupo de ratones que se intoxicaron con PA1, lo que nos indica un daño hepático severo con citólisis del hepatocito, a las 24 horas de exposición.

En contraste con el grupo de ratones que fue sometido al pretratamiento con clofibrato e intoxicado con la PA1, estos niveles enzimáticos disminuyen hasta alcanzar valores de aproximadamente un 50% con respecto a los del grupo de ratones intoxicados con PA1, lo que confirmó el efecto protector sobre la citólisis.

La determinación de la actividad de catalasa, fue otro de los parámetros utilizados para evaluar la respuesta de los hepatocitos a los distintos tratamientos, este se empleó para evaluar indirectamente el número de peroxisomas.

En el grupo de ratones tratados con el clofibrato se observó un aumento progresivo de la actividad de catalasa con el tiempo de exposición, este aumento rebasó a más del doble con respecto a los niveles enzimáticos del control absoluto. Lo que nos indica el aumento en el número de peroxisomas ya reportado^{35 y 59}.

En el grupo de ratones que fue pretratado con el clofibrato e intoxicado con la PA1 la actividad de catalasa permaneció semejante al grupo control absoluto lo que sugiere que el número de peroxisomas se conservó casi inalterable.

Todos estos datos permiten concluir que la PA1 causa por un lado un efecto citolítico que ocasiona el aumento de los niveles de las aminotransferasas, y por otro lado induce a la aparición de apoptosis. Mientras que con el clofibrato se protege al hepatocito del efecto citolítico no así de la inducción a la apoptosis, la que se incrementa en este grupo de tratamiento.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES, PERSPECTIVAS Y CONTRIBUCIONES

5.1 CONCLUSIONES.

1. Se acepta la hipótesis de trabajo planteada: "el clofibrato tiene un efecto hepatoprotector contra la intoxicación causada por la peroxisomicina A1.
2. Se confirma el efecto hepatotóxico de la PA1 ya reportado y se demuestra la presencia de apoptosis.
3. Se confirma la proliferación peroxisomal en hígado de ratones tratados con clofibrato, esto demostrado por la determinación de la actividad de catalasa que se mostró aumentada en los grupos de ratones con tratamiento de clofibrato (control de proliferación peroxisomal).
4. Se demuestra por primera vez una alteración mitocondrial característica que antecede a la fragmentación de cromatina, proceso que se hace evidente en la apoptosis, a las 4, 8 y 24 horas de exposición a la PA1 y a las 8 y 24 horas de exposición del grupo de ratones pretratados con clofibrato e intoxicados con PA1.
5. Se demuestra el efecto hepatoprotector del clofibrato sobre el efecto citotóxico y citolítico causado por la intoxicación aguda producida por la PA1, sin protección contra el efecto de apoptosis. Estos eventos al parecer son dos mecanismos diferentes de respuesta celular a la presencia de PA1.

5.2 PERSPECTIVAS.

1. Investigar si la PA1 causa directa o indirectamente la apoptosis observada.
2. Realizar estudios citoquímicos para citocromo oxidasa como marcador temprano de la apoptosis.
3. Evaluar la existencia de un posible efecto sinérgico entre la PA1 y el clofibrato, cuantificando las células pre-apoptóticas y apoptóticas presentes en todos los grupos de ratones que se estudiaron comparandolos entre sí.
4. Evaluar la función peroxisomal determinando la actividad de Acil Co A oxidasa.

5.3 CONTRIBUCIONES.

Con este estudio se contribuye a esclarecer el mecanismo de acción de la peroxisomicina A1, y se sugiere evaluar la existencia de un posible efecto sinérgico entre la PA1 y el clofibrato en la inducción de apoptosis.

APENDICE A

TABLA 2

TÉCNICA CITOQUÍMICA PARA LA DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD DE CATALASA PEROXISOMAL.

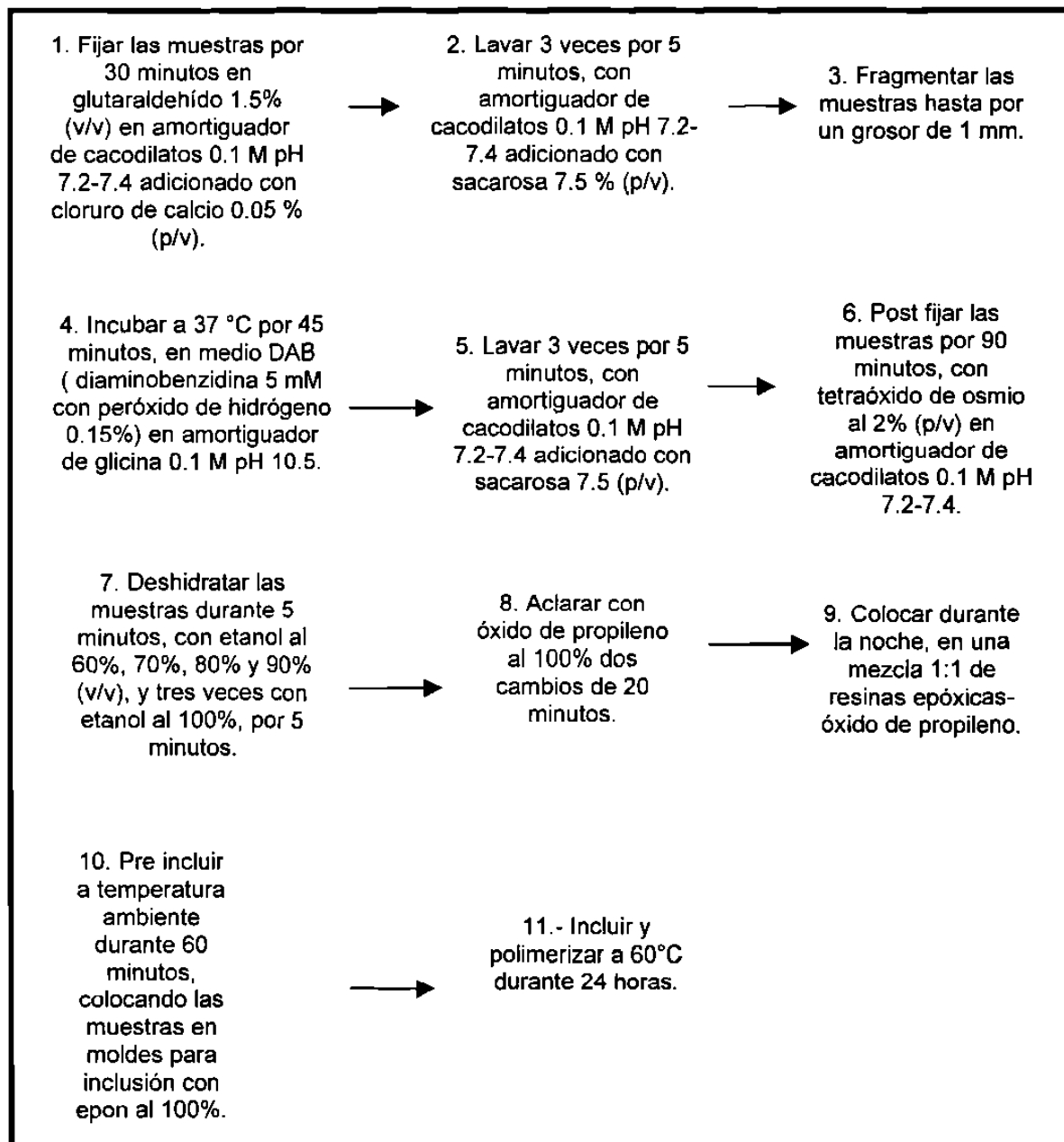


TABLA 3

TÉCNICA DE INCLUSIÓN EN RESINAS EPÓXICAS

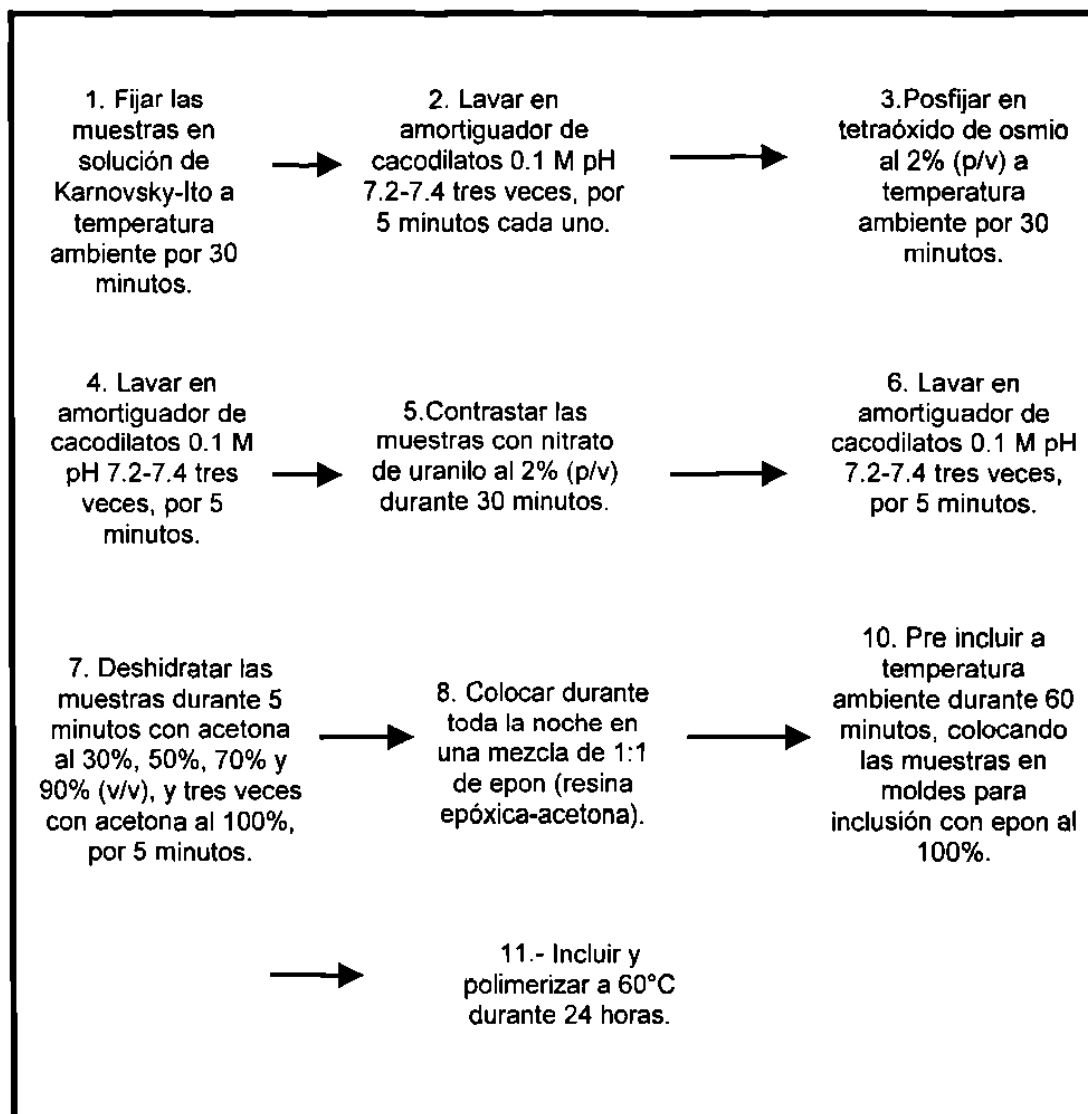


TABLA 4

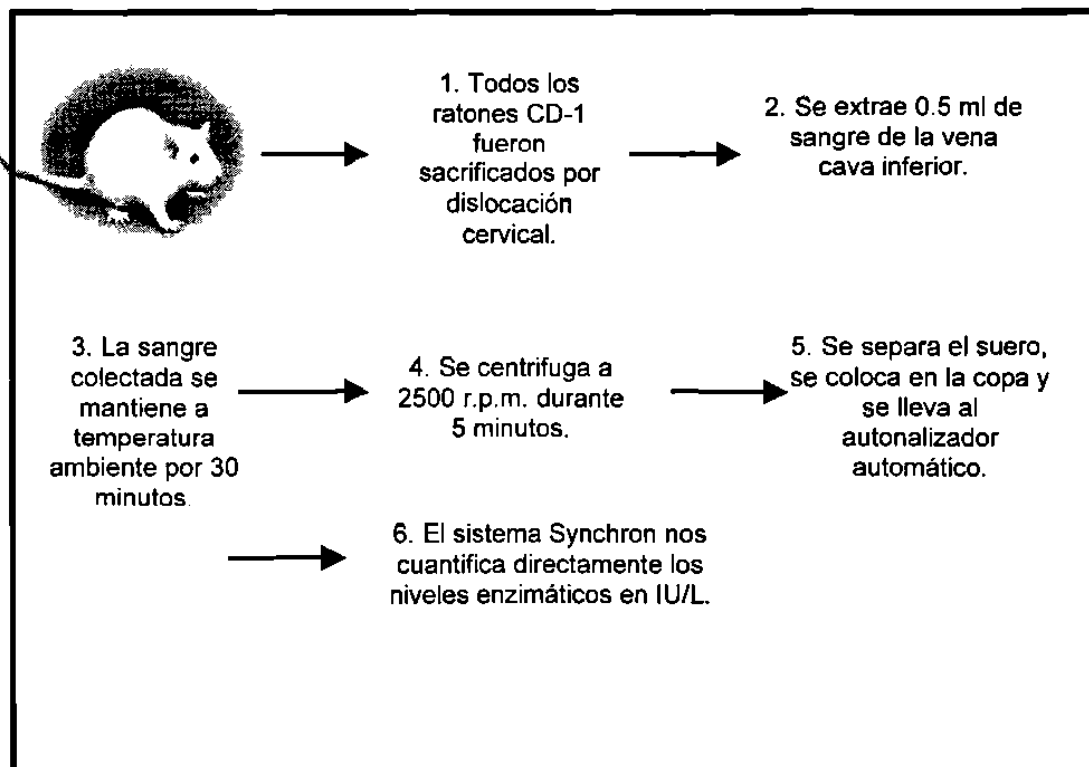
TÉCNICA BIOQUÍMICA PARA LA DETERMINACIÓN DE ASPARTATO Y ALANINA AMINOTRASFERASAS EN SUERO.

TABLA 5

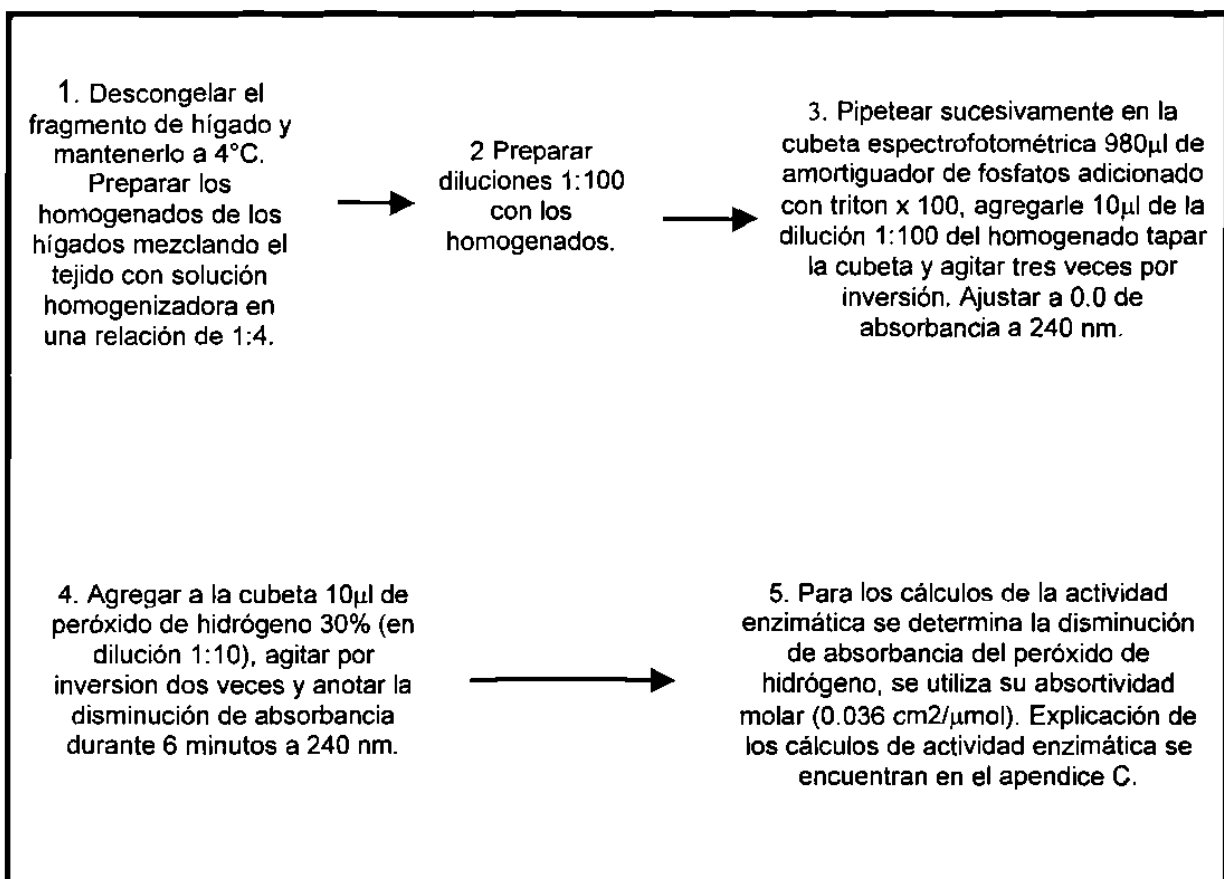
TÉCNICA BIOQUÍMICA PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD DE CATALASA PEROXISOMAL.

TABLA 6

MÉTODO PARA DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

<p>1. Pipetear 200 μl de la muestra (1:2000) y añadir 1 ml del colorante de Bio- Rad (diluido 1:5 con agua desionizada). Filtrar el colorante diluido antes de usarse.</p> <p>3. Realizar los cálculos para determinar la concentración de proteínas totales, utilizando los valores de la curva patrón de albúmina sérica bovina y aplicar la fórmula correspondiente.</p>	<p>2. Reposar las soluciones durante 30 minutos y determinar absorbancia a 595 nm.</p>
--	--

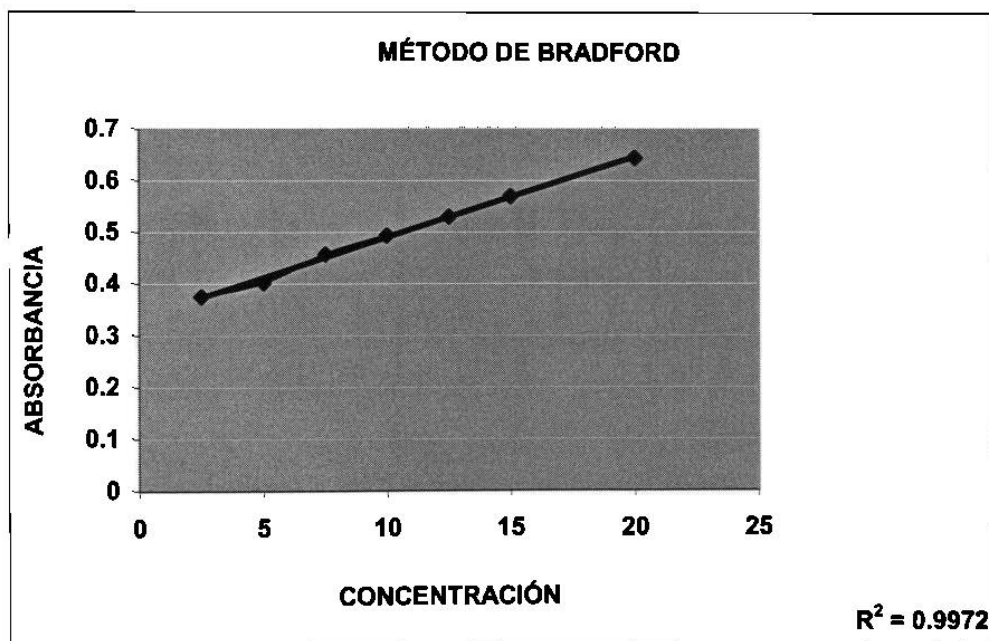


Figura 7. Curva patrón de proteínas obtenida mediante el método Bradford.

APENDICE B

SOLUCIONES

B.1 PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES PARA LAS TÉCNICAS DE MORFOLOGÍA.

B.1.1 Glutaraldehído 1.5% en buffer de cacodilatos 0.1 M adicionadao con cloruro de calcio 0.05%.

Glutaraldehído al 25%	15 ml
Cloruro de calcio	0.125 g
Buffer de cacodilatos 0.1 M pH 7.2-7.4	250 ml

B.1.2 Fijador de Karnovsky-Ito.

Solución madre.

Paraformaldehído	16 g
Agua ultrapura	400 ml

Calentar cerca del punto de ebullición y agregar unas gotas de hidróxido de sodio Para quitar la turbidez.

Solución de trabajo.

Solución Madre	400 ml
Buffer de cacodilatos 0.1 M	400 ml
Glutaraldehído 25%	32 ml
Ácido pícrico	0.08 g

B.1.3. Fijador de tetraóxido de osmio al 2%.

tetraóxido de osmio	1.0 g
---------------------	-------

Buffer de cacodilatos 0.1 M a pH 7.2 – 7.4 50 ml

B.1.4 Buffer de cacodilatos 0.1 M.

Solución A.

Cacodilato de sodio 4.28 g
 Agua ultrapura 100 ml

Solución B.

Ácido clorhídrico concentrado 0.5 ml
 Agua ultrapura 25 ml

Solución de trabajo

Solución A 100 ml
 Solución B 5.4 ml

Aforar a 200 ml con agua ultrapura y ajustar el pH a 7.2 -7.4.

B.1.5 Buffer de glicina-PBS 0.1 M.

Solución A.

Glicina 0.4125 g
 Cloruro de sodio 0.32175 g
 Agua ultrapura 55 ml

Solución B.

Hidróxido de sodio 0.18 g
 Agua ultrapura 45 ml

Solución de trabajo.

Solución A 55 ml
 Solución B 45 ml

Aforar con agua ultrapura a 100 ml y ajustar a pH 10.5.

B.1.6 Medio de incubación diaminobenzidina.

Diaminobenzidina 0.018 g
 Buffer de glicina-salina 10 ml

Ajustar a un pH 10.5 con hidróxido de sodio al 10% y agregar 0.05 ml de peróxido de hidrógeno.

B.1.7 Preparación de la mezcla de resinas epóxicas.

DDSA	4.3 ml
Resina	4.34 ml
NMA	1.4 ml
DMP-30	0.2 ml

B.2 PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES PARA LAS TÉCNICAS BIOQUÍMICAS.**B.2.1 Buffer de fosfato de potasio 50mM pH 7.4.**

Solución A.

Fosfato diácido de potasio 1 M	100 ml
--------------------------------	--------

Solución B.

Fosfato monoácido de potasio 1M	100 ml
---------------------------------	--------

Solución madre.

Ajustar el pH de la solución B a 7.4, utilizando la solución A. Almacenar a 4°C.

Solución de trabajo.

Diluir la solución madre 1:20 con agua ultrapura. La concentración final de esta solución es 50 mM.

B.2.2 Solución madre de PMSF.

Solución A.

PMSF	2 g
Etanol	100 ml

Solución de trabajo.

Solución A	5 ml
Buffer de fosfato de potasio 50 mM	100 ml

B.2.3 Solución homogenizadora.

		Concentración final
Solución madre de PMSF	1.25 ml	0.1% v/v
Sacarosa	1.95 g	.25 M
EDTA	0.0146 g	2 mM
DTE	0.0077 g	2 mM

Diluir y aforar a 25 ml con buffer de fosfato de potasio 50 mM.

B.2.4 Solución de peróxido de hidrógeno 1:10.

Peróxido de hidrógeno al 30%	1 ml
Buffer de fosfato de potasio 50 mM	9 ml

B.2.5 Solución patrón de albúmina sérica (1mg/ml).

Albúmina sérica	10 mg
Agua ultrapura	10 ml

B.2.6 Buffer de fosfato de potasio 50 mM – triton x 100 (1:100).

Triton x 100	0.1 ml
Buffer de fosfato de potasio 50 mM	99.9 ml

APENDICE C

CÁLCULO DE LA ACTIVIDAD DE ENZIMÁTICA

La actividad enzimática se expresa en unidades internacionales (U). Se define como una unidad a la transformación de 1 μ mol de sustrato o la formación de 1 μ mol de producto por minuto.

Matemáticamente se expresa como sigue:

$$U = \Delta C/t \quad \text{ecuación 1}$$

Despejando:

$$\Delta C = (U) (t) \quad \text{ecuación 2}$$

La actividad enzimática por lo general se expresa por unidad de volumen es decir, U/ml. Al despejar la ecuación 2 se expresaría como:

$$\Delta C = (U/ml) (t) \quad \text{ecuación 3}$$

Todas las determinaciones espectrofotométricas se basan en la ley de Lambert – Beer. Esta ley establece que el cambio de absorbancia es directamente proporcional a la absorptividad molar y al cambio de concentración de compuesto a analizar así como al trayecto óptico del haz. Esto se expresa matemáticamente como sigue:

$$\Delta A = (\epsilon) (\Delta C) (b) \quad \text{ecuación 4}$$

Al sustituir ΔC en la ecuación 3 resultará la ecuación 5.

$$\Delta A = (\epsilon) U/ml (t) (b) \quad \text{ecuación 5}$$

Al despejar U/ml resultará:

$$U/ml = \Delta A / \epsilon b t \quad \text{ecuación 6}$$

Donde:

U = Unidades de actividad ($\mu\text{mol}/\text{min}$)

ΔA = Cambio de absorbancia del compuesto

ϵ = Absortividad molar del peróxido de hidrógeno ($0,036 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$)

b = Espesor de la cubeta (cm)

t = tiempo (min)

ΔC = Cambio de concentración del compuesto (μmol)

Sustituyendo: la absortividad molar de H_2O_2 , el espesor de la cubeta (1cm) y el tiempo (1min)

se obtendrá:

$$U/\text{ml} = \Delta A / (0.036 \text{ cm}^2 / \mu\text{mol}) (1 \text{ cm}) (1 \text{ min})$$

$$U/\text{ml} = \Delta A / 0,036 \text{ cm}^3 \text{ min} / \mu\text{mol}$$

$$U/\text{ml} = \Delta A (27,7 \mu\text{mol} / \text{min ml})$$

$$U/\text{ml} = \Delta A (27,7 U/\text{ml}) \quad \text{ecuación 7}$$

Para calcular la actividad de catalasa (U/ml) se toman además en cuenta otros parámetros como son: volumen de la cubeta (1 ml), la dilución de la muestra en la cubeta (1:100 excepto en el grupo del clofibrato que se utilizó un dilución 1:200) y el factor de dilución (100).

Integrando estos valores en la ecuación 7 resulta:

$$U/\text{ml} = (\Delta A) (27,7 U/\text{ml}) (\text{Vol. de la cubeta}) (\text{dilución en la cubeta}) (\text{F. de dilución})$$

$$U/\text{ml} = (\Delta A) (27,7 U/\text{ml}) (1\text{ml}) (100) (100)$$

Suponiendo que el cambio de absorbancia (ΔA) es de 0.019 resultará:

$$U/\text{ml} = (0.019) (27,7 U/\text{ml}) (1\text{ml}) (100) (100)$$

$$U/\text{ml} = 5263$$

CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES.

En la tabla 6 se explica la técnica que se realizó para determinar la concentración de proteínas totales. Se emplearon estándares de concentración conocida a los que se les determinó su

absorbancia y se preparó la curva patrón, después se calculó la concentración de los problemas aplicando la ecuación de la recta.

$$Y = mX + b \quad \text{ecuación 8}$$

Donde:

Y = Absorbancia del problema

X = Concentración del problema

m = Pendiente de la recta

b = Intercepto con el eje Y

Despejando X en la ecuación 8 resulta:

$$X = Y - b / m \quad \text{ecuación 9}$$

Suponiendo que los valores de m = .0109 y el valor de b = .3784 y el de

$$Y = .447$$

Sustituyendo resulta:

$$X = .447 - .3784 / .0109$$

$$X = 6.29$$

La fórmula para calcular la concentración de proteínas en la muestra total es:

$$\text{mg/ml} = (X) (D) (5) / 1000 \quad \text{ecuación 10}$$

Donde:

X = concentración del problema

D = Dilución empleada (1:2000)

5 = Factor para expresar el valor en 1 ml

1000 = Para transformar de μg a mg.

Sustituyendo el valor de X anterior en la ecuación 10 resultará:

$$\text{mg/ml} = (6.29) (2000) (5) / 1000$$

mg/ml = 62.9 es la concentración de proteínas totales.

CÁLCULO DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA ENZIMA.

Cuando se desea conocer la proporción de una enzima con respecto a la concentración de proteínas de la muestra se determina la actividad específica de la enzima (U/mg).

La actividad específica se calculó dividiendo la actividad de catalasa (U/ml) entre la concentración de proteínas (mg/ml).

Se expresan en U/mg

$U/mg = U/ml \text{ homogenado} / mg/ml \text{ proteína}$

$U/mg = U/ml / mg/ml$

ecuación 11

Sustituyendo los valores del ejemplo:

$mg/ml = 62.9$ y $U/ml = 5263$

$U/mg = 5263 / 62.9$

Actividad específica = 83.67 U/mg

REFERENCIAS

1. Padrón-Puyou F. (1951) Estudio Clínico experimental de la parálisis por *Karwinskia humboldtiana* (tullidora) en niños. Gac. Méd. Méx. 81:299- 311.
2. Fernández Nava, R. (1992). Nombres comunes, usos y distribución geográfica del género *Karwinskia* (Rhamnaceae) en México. Anal. Inst. Biol. UNAM, Ser. Bot. 63: 1-23.
3. Arellano E., Mendoza J.F. Domínguez F.J. (1994). Intoxicación por *Karwinskia johnstonii* Fernández estudio de 12 pacientes . Bol. Med. Hosp. Infant. Méx. 51: 105-112.
4. Clavijero F.X. (1982) . Plantas Nocivas y extravagantes. En: Manuel León Portilla (editor), "Historia de la Antigua o Baja California", Editorial Porrúa 3era. edición, pp 31-33. Citado en: Piñeyro L.A. (1990) Toxicidad selectiva *in vitro* de la toxina T 514 de la *Karwinskia humboldtiana*. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N.L., México.
5. Dreyer D.L., Arai I., Baushman C.D., Anderson W.R. Jr., Smith R.G., and Daves G. D., Jr. (1975). Toxins causing non inflammatory paralytic neuropathy. Isolation and structure elucidation. J. Am. Chem. Soc. 97: 4986-4990.
6. Waksman de Torres N., And Ramírez Durón R. (1992). Isolation of a new dimeric anthracenone from *Karwinskia parvifolia*. Rev. Latinoamer. Quím. 23/1: 25-26.

7. Rivas V., Torres R., and Waksman N., (1990). Dimeric anthracenones from *Karwinskia* species. *Planta Médica* 56: 562-563.
8. Bermúdez M.V., González-Spencer D., Guerrero M., Waksman N., and Piñeyro A. (1986) Experimental intoxication with fruit and purified toxins of buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*). *Toxicon* 24:1091-1097.
9. Tamez Rodríguez V.A., Ancer-Rodríguez J., Sepúlveda Saavedra .J., Bermúdez de Rocha M.V. y Piñeyro-López A. (1989). Cambios Histopatológicos y ultraestructurales en riñón e hígado de *Macacus rhesus* producidos por la T514 aislada de la *Karwinskia humboldtiana* (tullidora). *Memorias del VII Encuentro Regional de Investigación. Biomédica. Facultad de Medicina, UANL* pp 18.
10. Bermúdez M.V., Martínez F.J., Salazar M.E., Waksman N., and Piñeyro A. (1992). Experimental acute intoxication with ripe fruit of *Karwinskia humboldtiana* (tullidora) in rat, guinea-pig, hamster and dog. *Toxicon*. 30: 1493-1496.
11. Sepúlveda-Saavedra J., van der Klei I.J., Keizer I., Piñeyro-López A., Harder W., and Veenhuis M., (1992). Studies on the effect of toxin T 514 on the integrity of peroxisomes in methylotrophic yeast. *FEMS Microbiol. Lett.* 91: 207-221.
12. Sepúlveda-Saavedra J., Bermúdez de Rocha M.V., Tamez-Rodríguez V.A., Ballesteros-Elizondo R.G., Moreno-Sepúlveda M., Piñeyro-López A. (1998) Quantitative analysis of liver peroxisomes in rats intoxicated with peroxisomicine-A1. *Toxicol. Lett.* 98: 71-75.
13. Moreno -Sepúlveda M., Vargas- Zapata R., Ballesteros Elizondo R., Piñeyro López A., and Sepúlveda-Saavedra J. (1997). Studies on the effect of peroxisomicine on catalase activity in albino mice. *Toxicon* 35: 777-783.

14. Moreno Martínez, Ma. Leticia. (2000). Efecto de la peroxisomicina A1 sobre la autofagia de peroxisomas en el hígado de *Macacca fascicularis* en un modelo *in vitro*. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. UANL.
15. Piñeyro A., Martínez de Villarreal L., and González R. (1994). *In vitro* selective toxicity of toxin T 514 from *Karwinskia humboldtiana* (buckthorn) plant on various human tumour cell lines. *Toxicology* 92: 217-224.
16. Piñeyro A. (1995). Europaishen Patentblatt 95/48 (29.11.95) Patent numer: 0467407.
17. Piñeyro A. (1996). Bioscience patent "Pharmaceutically acceptable anthracene compounds" number 5578646.
18. Piñeyro López A., Patentes: Japonesa No. 2651758. Coreana No. 202320. Canadiense No. 2047550. Mexicana No. 9100290.
19. Rhodin J. (1954). Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed convoluted tubule cells of the mouse kidney. Ph. D. Thesis Karolinska Institutet. Aktiebolaget Godvil, Stockholm. Citado en: (1995). Master C., and Crane D. The peroxisome: a vital organelle. Cambridge University Press.
20. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Watson J.D. (1989). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, Inc., New York & London. Second Edition. 16 F, 406, 406 FF, 431-433, 459, 460 y 461 F.
21. De Duve C., and Baudhuin, P. (1966). Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol. Rev.* 46: 323-357.

22. Riede U. N., Fringes B., and Moore G.W. (1983). Peroxisomes in cellular injury and disease. In cellular Pathobiology of Human Disease. Gustav Fisher New York, Inc. pp 139-170.
23. Van den Bosch H., Schutgens R.B.H., Wanders R.J.A., and Tager J.M. (1992). Biochemistry of peroxisomes . *Ann Rev. Biochem.* 61: 157-197.
24. Singh I. (1996). Mammalian Peroxisomes: Metabolism of oxygen and reactive oxygen species. In: Peroxisomes: Biology and role in toxicology and disease. Janardan K Reddy, Tetsuya Suga, Guy P. Mannaerts, Paul B. Lazarow, and Suresh Subramani (Editors). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 804: 612-627.
25. Briedenbach W., and Beeveers, H. (1967). Association of the glyoxylate cycle enzymes in a novel subcellular particle from castor bean endosperm. *Biochem. Biophys. Acta* 27: 462-469.
26. Holtzman E., and Novikoff A. B. (1987). Peroxisomas (microcuerpos, glioxisomas). En: *Estructura y dinámica celular*. Nueva Editorial Interamericana. México, D.F. 3ª. Edición en español. pp 244-252.
27. Anthony L.E., Schmucker D.L., Mooney J.S., Jones A.L. (1978). A quantitative analysis of fine structure and drug metabolism in liver of clofibrate treated young adult and retired breeder rats. *J. Lipid. Res.* 19: 154-165.
28. Poole B., Higashi T., and de Duve C. (1970). The Synthesis and turnover of rat liver peroxisomes. III. The size distribution of peroxisomes and incorporation of new catalase. *J. Cell Biol.* 45: 408-415.
29. Master C., and Crane D. (1995). *The peroxisome: a vital organelle*. Cambridge University Press. First published. pp 1-27, 37-38, 174-203 y 225-245.

30. Lazarow P.B. (1984). The peroxisomal membrane. In: Membrane structure and function. Bittar E.E. (Editor). John Wiley and Sons Inc. 5: 1-31.
31. Beard M.E., and Allen J.M. (1968). A study of the properties of renal microbodies. *J. Exptl. Zool.* 168: 477-490.
32. Master C.J., and Holmes R. (1977). Peroxisomes: new aspects of cell physiology and Biochem. *Physiol. Rev.* 57: 816-882.
33. Usuda N., Yokota S., Ichikawa R., Hasimoto T., and Nogata T. (1991). Immunoelectron microscopic study of a new D-amino acid oxidase-immunoreactive subcompartment in rat liver peroxisomes. *J. Histochem. Cytochem.* 39: 95-102.
34. Baudhuin P., Beaufay H., and de Duve C. (1965). Combined biochemical and morphological study at particulate fractions from rat liver. *J. Cell Biol.* 26: 219-243.
35. Völkl A., Baumgart E., and Fahimi H.D. (1988). Localization of urate oxidase in the crystalline cores of rat liver peroxisomes by immunocytochemistry and immunoblotting. *J. Histochem. Cytochem.* 36: 329-336.
36. Zaar K., Völk A, and Fahimi H.D. (1991). Purification of marginal plates from bovine renal peroxisomes: identification with L- α hydroxyacid oxidase B. *J. Cell Biol.* 113: 113-121.
37. Angermüller S., Fahimi H.D. (1981). Selective Cytochemical localization of peroxidase, cytochrome oxidase and catalase in rat liver with 3,3'-diaminobenzidine. *Histochemistry* 71: 33-44.

38. Aebi H. (1974). Katalase. In: Methoden der enzymatischen Analyse. Bergmeyer. H.U. (Editor). New York: Weinheim. 3rd Edn. pp 713- 718.
39. Mannaerts G.P., and Van Veldhoven P.P. (1963). Metabolic role of mammalian peroxisomes. In: Peroxisomes: Biology and importance in toxicology and medicine. Gordon Gibson, and Brian Lake (Editors). Taylor & Francis Ltd. London, Washington, D.C. pp 19-62
40. Lazarow P.B. (1987). The role of peroxisomes in mammalian cellular metabolism. *J. Inher. Metab. Dis.* 10: 11-22.
41. Müller W.M., van der Krift T.P., Krouwer A.J.J., Wösten H.A.B., van der Voort L.H.M., Smaal E.B., and Verkleij, A.J. (1991). Localization of the pathway of the Penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *EMBO J.* 10: 489-495.
42. Harder W., and Veenhuis M. (1989). Metabolism of one-carbon compounds. In: *The yeast*. A.H. Rose, and J.S. Harrison (Editors). Academic Press London. Second Edition. 3: 289-316.
43. Novikoff, A., Shin, W. Y. (1964). The endoplasmic reticulum in the Golgi zone and its relations to microbodies, Golgi apparatus and autophagic vacuoles in rat liver cells. *J. Microsc.* 3: 187-206.
44. Lazarow, P.B., and Fujiki, Y. (1985). Biogenesis of peroxisomes. *Ann. Rev. Cell. Biol.* 1: 489-530.
45. Titorenko, V.I., and Rachubinski R.A. (July 1998). The endoplasmic reticulum plays an essential role in peroxisome biogenesis. *TIBS* 23: 231-233
46. Moser H.W. (1987). New approaches in peroxisomal disorders. *Dev. Neurosci.* 9: 1-18.

47. Moser H.W., and Moser A.B. (1996). Peroxisomal disorders: Overview. In: Peroxisomes: Biology and role in toxicology and disease. Janardan K. Reddy, Tetsuya Suga, Guy P. Mannaerts, Paul B. Lazarow, and Suresh Subramani (Editors). Ann. N.Y. Acad. Sci. 804: 427-441.
48. Suzuki Y., Shimozawa N., Takahashi Y., Imamura A., Kondo N. And Orii T. (1996). Peroxisomal disorders: clinical aspects. In: Peroxisomes: Biology and role in toxicology and disease. Janardan K. Reddy, Tetsuya Suga, Guy P. Mannaerts, Paul B. Lazarow, and Suresh Subramani (Editors) Ann. N. Y. Acad. Sci. 804: 442-449.
49. Fahimi H.D., Baumgart., Beier K., Pill J., Hartig F., and Völkl A. (1993). Ultrastructural and biochemical aspects of peroxisome proliferation and biogenesis in different mammalian species. In: Peroxisomes: Biology and importance in toxicology and medicine. Gordon Gibson, and Brian Lake (Editors). Taylor & Francis Ltd London, Washington, D. C. pp 395-424.
50. Gorgas K., and Krisans S.K. (1989) Zonal heterogeneity of peroxisome proliferation and morphology in rat liver after gemfibrozil treatment. J. Of Lipid Research 30: 1859-1875.
51. Reddy J.K., and Chu R. (1996) Peroxisome proliferator-induced pleiotropic responses: Pursuit of a phenomenon. In: Peroxisomes: Biology and role in toxicology and disease. Janardan K. Reddy, Tetsuya Suga, Guy P. Mannaerts, Paul B. Lazarow, and Suresh Subramani (Editors). Ann. N.Y. Acad. Sci. 804: 176-201
52. Thangada S., Alvarez K., Mangino M., Usman M. I., Rao M. S., and Reddy J. K. (1989). An *in vitro* demonstration of peroxisomes proliferation and increase in peroxisomal β -oxidation system mRNAs in cultured rat hepatocytes treated with ciprofibrate. FEBS Lett. 250: 205-210.

53. Thorp J.M. and Waring W.S. (1962). Modification of metabolism and distribution of lipids by ethyl Chlorophenoxyisobutyrate. *Nature* 194: 948-949.
54. Issemann I. And Green S.(1990). Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347: 645-650.
55. Goldfischer S.L. and Reddy J.K. (1984). Peroxisomes (microbodies) in cell pathology. *Intl. Rev. Exp. Pathol.* 26:45-84.
56. Yasmineh W. G., Parkin J.L., Caspers J.I. and Thelogides A. (1991). Tumor necrosis factor/cachectin decreases catalase activity of the rat liver. *Cancer Res.* 51: 3990-3995.
57. Reddy, J.K. and Lalwani, N.D. (1983). Carcinogenesis by hepatic peroxisome proliferators: evaluation of the risk of hypolipidemic drugs and industrial plasticizers to humans. Cited in: (1995). Master C., and Crane D. *The peroxisome: a vital organelle.* Cambridge University Press. 220-221.
57. Nicholls-Grzemski Burcham P.C., Calder I.C., Priestly, B.G. (1996). In: *Peroxisomes. Biology and Role in Toxicology and disease.* Reddy, T. Suga, G.P. Mannaerts, P.B. Lazarow, and S. Subramani. (Editors). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 804: 742-744 .
59. Manautou, J.E., Silva, V.M., Henning, G.E., Whiteley, H.E. (1997). Repeated dosing with the peroxisome proliferator clofibrate decreases the toxicity of model hepatotoxic agents in male mice . *Toxicology* 127: 1-10.
60. Hess R., Stäubli W. and Riess W. (1965). Nature of the hepatomegalic effect produced by ethyl- chlorophenoxy-isobutyrate in the rat. *Nature* 208: 856-858.

61. Svoboda D. and Azarnoff D. (1966). Response of hepatic microbodies to a hypolipidemic agent ethyl- chlorophenoxy-isobutyrate (CPIB). *J.Cell Biol.* 30: 442-450.
62. Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 249-255.
63. Angermüller S., Künstle G., and Tiegs G. (1998). Pre-apoptotic Alterations in Hepatocytes of TNF α - treated Galactosamine- sensitized Mice. *J. Histochem. Cytochem.* 46 (10): 1175-1183.
64. Canuto, R.A., Muzio, G., Bonelli, G., Maggiora, M., Autelli, R., Barbiero, G., Costelli, P., Brossa, O., and Baccino, F.M. (1998). Peroxisome Proliferators Induce Apoptosis in Hepatoma Cells. *Cancer Det. Prev.* 22 (4): 357-366.

RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

Martha Eugenia Santoyo Pérez

**Canditata para Grado de
Maestra en Ciencias con especialidad en Morfología**

**Tesis: EFECTO DE LA PEROXISOMICINA A1 SOBRE EL HÍGADO DE RATÓN
TRATADO CON CLOFIBRATO**

Área de Estudio: Morfología

Biografía:

Datos Personales: Nacida en San Luis Potosí, SLP, México. El 19 de enero de 1956. Hija del ganadero de reses bravas Salvador Santoyo Morales y María Dolores Pérez Lamas. Estado civil: Casada. Esposo: Lic. Lino Agundis Rodríguez. Hija: Martha Eugenia Agundis Santoyo.

Escolaridad: Egresada de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Escuela de Ciencias Químicas, grado obtenido Química Farmacobióloga en 1979-

Experiencia Profesional: Laboratorios farmacéuticos Codex en 1978. Responsable del Laboratorio de Histología de la Facultad de Medicina de UASLP desde 1981. Profesor Investigador en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, desde 1981 a la fecha. Instructor del laboratorio de Histología en el primer semestre de la carrera de MCP en la Facultad de Medicina de UASLP desde 1985. Maestra auxiliar en el curso de Histología de la especialidad de odontopediatría de la Facultad de Estomatología de UASLP de 1989 a 1995. Maestra auxiliar en el curso de técnicas experimentales impartido dentro del programa de Maestría en Biología Celular en la Facultad de Medicina de la UASLP. Profesor adjunto en la impartición del curso teórico y práctico de Histología en la Facultad de Medicina de la UASLP desde 1990 a la fecha.

