

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



CARACTERIZACION DEL DAÑO MORFOLOGICO Y
FUNCIONAL EN CELULAS OK COMO MODELO DE
INTOXICACION POR MERCURIO.

Por

M. en C. MARIA DEL PILAR CARRANZA ROSALES

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

Junio 2004

TD
RA1231
.M5
C37
2004
c.1



1080125159

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**CARACTERIZACIÓN DEL DAÑO MORFOLÓGICO Y FUNCIONAL
EN CÉLULAS OK COMO MODELO DE INTOXICACIÓN POR
MERCURIO**

Por

M. en C. MARÍA DEL PILAR CARRANZA ROSALES

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

Junio 2004



TD

RA1231

-MS

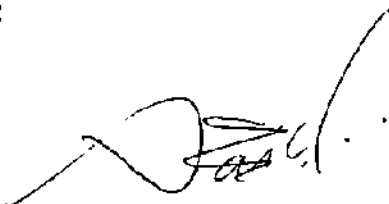
C37

2004

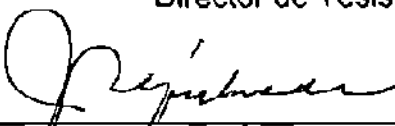


**CARACTERIZACIÓN DEL DAÑO MORFOLÓGICO Y FUNCIONAL
EN CÉLULAS OK COMO MODELO DE INTOXICACIÓN POR
MERCURIO**

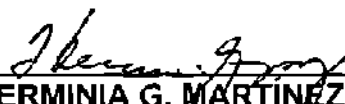
Aprobación de la Tesis:



DR. SALVADOR SAID FERNÁNDEZ
Director de Tesis



DR. JULIO SEPÚLVEDA SAAVEDRA
Co-Director de Tesis



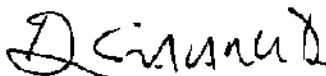
DRA. HERMINIA G. MARTÍNEZ RODRÍGUEZ
Co-Director de Tesis



DR. MARIO CÉSAR SALINAS CARMONA
Comisión de Tesis



DRA. ODILA SAUCEDO CÁRDENAS
Comisión de Tesis



DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO
Subdirector de Investigación y Estudios de Postgrado

CARACTERIZACIÓN DEL DAÑO MORFOLÓGICO Y FUNCIONAL EN CÉLULAS OK COMO MODELO DE INTOXICACIÓN POR MERCURIO

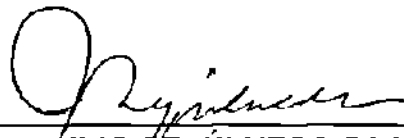
Presentado por:

M. en C. MARÍA DEL PILAR CARRANZA ROSALES

Este trabajo se realizó en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Universidad de Arizona y en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Salvador Said Fernández y la co-dirección del Dr. Julio Sepúlveda Saavedra y de la Dra Herminia G. Martínez Rodríguez. Fungió como director externo el Dr. A. Jay Gandolfi.



DR. SALVADOR SAID FERNÁNDEZ
DIRECTOR



DR. JULIO SEPÚLVEDA SAAVEDRA
CO-DIRECTOR



DRA. HERMINIA G. MARTÍNEZ RODRÍGUEZ
CO-DIRECTOR

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca crédito otorgada (Beca # 128022).

A la Coordinación de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social, por todas las facilidades brindadas, así como por la beca otorgada para realizar gran parte del trabajo experimental en la Universidad de Arizona.

Al Dr. A. Jay Gandolfi, por mostrarme con su ejemplo una visión integral e íntegra del científico. Con admiración y respeto.

Al Dr. Salvador Said Fernández, por todo el apoyo brindado durante mi formación.

Al Dr. Julio Sepúlveda Saavedra, por sus enseñanzas en el área de la morfología.

A la Comisión de Tesis, por sus acertados comentarios durante la revisión de la tesis.

Al Dr. Mario César Salinas Carmona, por su amable guía.

A todo el personal y estudiantes del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina (U.A.N.L), por los agradables momentos, en especial a la Q.C.B. Rosa María Leal, por su gran ayuda.

A mis amigos del CIBIN, Delia Cruz, y Antonio Narro, quienes compartieron conmigo todos los momentos que se suscitaron durante este periodo de formación.

A mis maestros todos, por sus enseñanzas.

A Dios.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Aspectos Generales de los Metales Pesados.....	1
1.2 Mercurio: Una Amenaza para la Salud	3
1.3 Mecanismos de Toxicidad del Mercurio	5
1.4 Mitocondrias: Blanco Celular del Mercurio.....	8
1.5 Alteraciones Ultraestructurales Inducidas por Mercurio.....	10
1.6 Células OK (Opossum Kidney) como Modelo de Estudio.....	20
1.7 Justificación	22
1.8 Hipótesis	23
1.9 Objetivo General	23
1.10 Objetivos Específicos	24
2. MATERIALES Y MÉTODOS	25
2.1 Material Biológico	25
2.2 Origen de los Reactivos	25
2.3 Equipo	27
2.4 Métodos	28
2.4.1 Mantenimiento de la Línea Celular	28
2.4.2 Intoxicación de las células OK con HgCl ₂	29
2.4.3 Ensayo de Reducción del MTT (Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]- 2,5-difeniltetrazolio)	30
2.4.4 Análisis del Contenido Intracelular de ATP	32
2.4.5 Microscopía confocal y Tinción con Mitotracker® Red	33
2.4.6 Microscopía de Luz con Contraste de Fase	34

2.4.7 Microscopía Electrónica de Transmisión	34
2.4.8 Análisis Estadístico	37
3. RESULTADOS.....	38
3.1 Efecto del mercurio sobre la función mitocondrial de las células OK.....	38
3.2 Efecto del mercurio sobre el contenido de ATP de las células OK.....	40
3.3 Análisis al microscopio de luz de los efectos del HgCl ₂ sobre la morfología de las células OK	43
3.4 Análisis ultraestructural de los cambios inducidos por HgCl ₂ en las células OK.....	48
3.5 Análisis mediante microscopía confocal del patrón de tinción con MitoTracker Red de las células OK intoxicadas con HgCl ₂	56
4. DISCUSIÓN	62
5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	79
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
APÉNDICE. Composición y Preparación de las Soluciones	99

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Actividad mitocondrial de las células OK tratadas con dosis y tiempos variables de HgCl ₂	39
2. Efecto del cloruro mercúrico sobre el contenido intracelular de ATP	41
3. Células OK control sin tratamiento. Microscopía de luz con contraste de fase.....	44
4. Células OK tratadas con 1 µM de HgCl ₂ a distintos tiempos de exposición. Microscopía de luz con contraste de fase	45
5. Células OK tratadas con 10 µM de HgCl ₂ a distintos tiempos de exposición. Microscopía de luz con contraste de fase	46
6. Células OK tratadas con 15 µM de HgCl ₂ a distintos tiempos de incubación. Microscopía de luz con contraste de fase	47
7. Células OK control, sin tratamiento. Micrografías electrónicas	51
8. Células OK expuestas a 1 µM de HgCl ₂ por diferentes tiempos de exposición. Micrografías electrónicas	52
9. Células OK expuestas a 10 µM de HgCl ₂ por diferentes tiempos. Micrografías electrónicas	53
10. Células OK expuestas a 15 µM de HgCl ₂ por diferentes tiempos. Micrografías electrónicas	54
11. Alteraciones ultraestructurales inducidas por 15 µM de HgCl ₂ en las células OK. Micrografías electrónicas	55
12. Células OK control sin tratamiento. Microscopía confocal	58
13. Células OK tratadas con 1µM de HgCl ₂ a distintos tiempos de incubación. Microscopía confocal	59

14. Células OK tratadas con 10 μM de HgCl_2 a distintos tiempos de incubación. Microscopía confocal	60
15. Células OK tratadas con 15 μM de HgCl_2 a distintos tiempos de incubación. Microscopía confocal	61

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

%	Por ciento
μ	Micras
μg/ml	Microgramos por mililitro
μl	Microlitros
°C	Grados centígrados
Abs	Absorbancia
ANOVA	Análisis de varianza
ATP	Trifosfato de adenosina
ATCC	American Type Culture Collection
Cd	Cadmio
Cd-Pb	Mezcla cadmio-plomo
cm ²	Centímetros cuadrados
CO ₂	Bióxido de carbono
Cols	Y colaboradores
cPKC	Proteínas cinasas C
DMS	Diferencias mínimas significativas
EPA	Environmental Protection Agency
g	Gramos
h	Horas
HCl	Ácido clorhídrico
HgCl ₂	Cloruro mercuríco
Hsp70	Proteínas de estrés térmico 70
kg	Kilogramos
MEM	Medio Esencial Mínimo de Eagle
mg	Miligramos
min	Minutos
mM	Concentración milimolar

mOsm	Miliosmoles
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
MT ⁺	Células MitoTracker positivas
MT ⁻	Células MitoTracker negativas
N	Normalidad de una solución
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
nm	Nanómetros
nM	Concentración nanomolar
PBS	Amortiguador de fosfatos pH 7.0
pH	Logaritmo negativo de la concentración de iones hidrógeno
PMS	Metasulfato de fenazina
PM	Transición de la permeabilidad mitocondrial
PMT	Poros de transición de la permeabilidad mitocondrial
rpm	Revoluciones por minuto
SH	Grupo SH
SSBH	Solución salina balanceada de Hanks
U/ml	Unidades por mililitro
URL	Unidades relativas de luz
vs	<i>Versus</i>

RESUMEN

María del Pilar Carranza Rosales

Fecha de Graduación: Junio de 2004

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del Estudio:

Caracterización del Daño Morfológico y Funcional en Células OK como Modelo de Intoxicación por Mercurio.

Número de Páginas: 107

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

Área de Estudio:

Morfología

Propósito:

Debido a que no se conocen los efectos del mercurio sobre líneas celulares de origen renal, en este trabajo enfocamos nuestro interés hacia la caracterización de alteraciones morfológicas y funcionales inducidas por el cloruro mercurico (HgCl_2) en células OK.

Método de Estudio:

Evaluamos la respuesta de células OK tratadas con dosis variables de HgCl_2 durante diferentes tiempos de incubación, mediante pruebas de función mitocondrial y análisis morfológicos utilizando microscopía de luz, microscopía electrónica de transmisión y microscopía confocal.

Resultados:

Dosis de 1 y 10 μM de HgCl_2 incrementaron la actividad del sistema mitocondrial succinato tetrazolio reductasa, así como el contenido intracelular de ATP, sin inducir alteraciones morfológicas. Con dosis de 15 μM disminuyó la actividad mitocondrial y el contenido endógeno de ATP. Al microscopio de luz, en los cultivos incubados con esta dosis, las células se redondearon, presentaron abundantes vacuolas y se desprendieron las monocapas. Los cambios ultraestructurales fueron: dispersión de los ribosomas, dilatación de las cisternas del retículo endoplásmico rugoso, aumento en el número de vacuolas citoplásmicas, condensación de la cromatina, invaginaciones de la membrana interna de la envoltura nuclear, cuerpos de inclusión citoplasmáticos, cuerpos apoptóticos y alteraciones en el tamaño y la morfología de las mitocondrias. Mediante microscopía confocal pudimos establecer cambios cualitativos inducidos por mercurio sobre el potencial de membrana mitocondrial. La disipación del potencial no se observó a tiempos cortos a esta misma dosis, ni tampoco con las dosis de 1 y 10 μM en todos los tiempos analizados.

Conclusiones:

A la dosis de 1 y 10 μM de HgCl_2 se estimula la actividad de deshidrogenasas mitocondriales y la producción endógena de ATP, pero no se observan cambios morfológicos mediante microscopía de luz, microscopía electrónica de transmisión y microscopía confocal. Con dosis de 15 μM de HgCl_2 se afectan notablemente la función mitocondrial, así como la morfología y la ultraestructura de las células OK.

Contribuciones:

El presente trabajo contribuye al conocimiento de los efectos sobre la ultraestructura y fisiología mitocondrial, asimismo en la morfología celular inducidos por cloruro mercurico en líneas celulares de origen renal. Además, el modelo que hemos empleado podría ser utilizado para evaluar el efecto de éste y otros metales pesados en diversos cultivos, para estudiar el fenómeno de hormesis y también en la investigación de nuevos agentes quelantes o de otros compuestos de interés terapéutico y/o toxicológico.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1 Aspectos Generales de los Metales Pesados.

De los 106 elementos de la tabla periódica, 80 son considerados como metales; muchos de ellos son necesarios para que puedan ocurrir procesos fisiológicos normales en los seres vivos, pero otros, como comentamos más adelante son tóxicos *per se* (Hughes, 1996). Aún aquellos metales que son considerados esenciales pueden resultar tóxicos cuando su concentración intracelular es excesiva. Entre los 80 metales conocidos, existen 40 que tienen pesos específicos mayores de 5 g/cm^3 , los cuales son definidos como "metales pesados" y se encuentran principalmente en forma dispersa en formaciones rocosas, pero también en el medio ambiente (Hughes, 1996).

Los seres humanos hemos estado expuestos a los metales pesados desde tiempos remotos. No obstante, en las últimas décadas se ha incrementado tanto el empleo de estos metales tóxicos y de sus compuestos, que hemos llegado al punto en el cual las sociedades dependen de ellos para el adecuado funcionamiento de casi todos sus procesos industriales. Esto ha ocasionado que los metales pesados sean abundantes en el agua, aire y suelo

y que debido al potencial carcinogénico que se les ha atribuido, representen una verdadera amenaza para la salud (ATSDR, 1999).

Los metales entran al cuerpo principalmente a través de la vía digestiva y respiratoria, mientras que la orina es la principal ruta de eliminación, aunque pueden ser excretados directamente hacia la luz del tracto digestivo a través de la mucosa intestinal. La circulación enterohepática de algunos compuestos metálicos orgánicos (por ejemplo metil mercurio) favorece que se incremente la vida media de este tipo de compuestos (Hughes, 1996).

Los metales pesados son redistribuidos naturalmente en el medio ambiente a través de ciclos biológicos y geológicos. Los ciclos biológicos incluyen bioconcentración por plantas y animales, así como su incorporación en las cadenas alimenticias. Actualmente, las cantidades de metales pesados emitidas de manera natural a la atmósfera, cuerpos de agua y suelos, han sido sobrepasadas por el ciclo antropogénico, como ocurre en el caso particular del mercurio (Klaassen, 1996).

Entre los metales pesados más conocidos, por sus aplicaciones y sus múltiples efectos tóxicos en los seres humanos y los animales se encuentran el mercurio, el plomo, el cadmio y el metaloide arsénico. La importancia toxicológica de algunos metales menos conocidos, tales como el indio y el galio

podría verse incrementada con nuevas aplicaciones en terapia antitumoral, microelectrónica y otras tecnologías (Klaassen, 1996).

Por ser el mercurio el objeto de esta tesis, a continuación se describen algunos aspectos relevantes de este metal.

1.2 Mercurio: Una Amenaza para la Salud

Aunque no se le conoce algún efecto benéfico para la fisiología humana, se ha estimado que un ser humano con un peso promedio de 70 kg, tiene una cantidad equivalente a 13 mg de mercurio en su cuerpo (Pier, 1975). El mercurio es un elemento muy reactivo y produce sus efectos tóxicos al unirse a grupos sulfhidrido, hidroxilo, carboxilo y fosforilo presentes en diversas moléculas o compuestos. Se encuentra ampliamente distribuido como contaminante ambiental e industrial. En humanos, se pueden encontrar niveles elevados de mercurio en la piel, las uñas, el pelo y los riñones. Las fuentes de exposición más importantes para los seres humanos son: (a) las amalgamas dentales, (b) los productos farmacéuticos, (c) los cosméticos y (d) los alimentos, principalmente pescado contaminado con mercurio (Eley, 1997).

En el medio ambiente se pueden encontrar tres formas químicas, cada una con propiedades de solubilidad, reacción química y toxicidad características (Clarkson, 2002). El *mercurio elemental* se libera hacia el medio ambiente a través de la evaporación de la corteza terrestre y de los océanos, así como por la quema de combustibles fósiles (ATSDR, 1999). Los *compuestos inorgánicos* mercuriosos (calomel) y las sales mercúricas se han empleado desde siglos pasados con fines medicinales y como detonadores en explosivos, respectivamente. Por otra parte, ciertos microorganismos que habitan en ríos y arroyos son capaces de biometilar los iones mercúricos para formar especies de *mercurio orgánico*, incluyendo metil, etil y fenil mercurio (Klaasen, 1990).

La exposición ocupacional juega un papel muy importante, sobre todo en ciudades altamente industrializadas. Todas las formas del metal se acumulan en distintos órganos, pero preferentemente en el riñón (WHO, 1991). La exposición a concentraciones elevadas de mercurio metálico, orgánico o inorgánico pueden dañar permanentemente los riñones, el cerebro y alterar el desarrollo fetal. Los efectos sobre la función cerebral pueden resultar en irritabilidad, temblores, alteraciones en la visión, el oído y problemas de memoria. También pueden presentarse daño hepático, náuseas, vómito, diarrea, aumento de la presión sanguínea y del ritmo cardíaco (ATSDR, 1999). Aunque no existen datos suficientes sobre inducción de cáncer, el cloruro mercúrico propicia la aparición de diferentes tipos de tumores en ratas y ratones

y el metil mercurio ha producido tumores en riñones de ratones machos. En base a datos epidemiológicos y experimentales actualmente disponibles, la Agencia Estadounidense para la Protección del Ambiente (EPA) ha determinado que los compuestos de cloruro mercúrico y metil mercurio son posibles carcinógenos para los seres humanos (ATSDR, 1999).

1.3 Mecanismos de Toxicidad del Mercurio

Se ha propuesto que el principal mecanismo de toxicidad del mercurio es su elevada afinidad hacia grupos sulfhidrilo presentes en ciertas proteínas (Clarkson 1972, Hughes 1957; Passow y cols., 1961). Debido a que las proteínas se encuentran tanto en los organelos como en el citoplasma y en las membranas celulares, y porque los grupos sulfhidrilo son muy importantes en la estructura y función de la mayoría de estas proteínas, los blancos específicos del mercurio no se han establecido del todo. Sin embargo, se ha propuesto que ocurre inactivación de enzimas, de proteínas estructurales y de procesos de transporte (Bulger 1986), así como alteraciones en la permeabilidad de la membrana plasmática por la formación de mercáptidos (Sahaphong y Trump 1971).

En los riñones, la toxicidad del mercurio se relaciona con su acumulación en los túbulos proximales y con su unión intracelular a grupos sulfhidrilo, carboxilo y fosforilo (Klaassen, 1996). Los resultados de estas interacciones son la inactivación de enzimas e inhibición de la síntesis de proteínas (Bohets y cols., 1995). También se ha observado inhibición de la multiplicación celular, disminución en la incorporación de uridina y timidina, rompimiento de cadena sencilla en el DNA y muerte celular, (Nakazawa y cols., 1975).

El mercurio altera el contenido intracelular de grupos tiol y de esta manera, induce estrés oxidativo, peroxidación de lípidos, disfunción mitocondrial y cambios en el metabolismo del hemo (Zalups y Lash 1994).

Se ha demostrado que el mercurio puede ocasionar despolarización de la membrana mitocondrial interna, con un aumento en la formación de peróxido de hidrógeno. Este evento se ha relacionado con la disminución de glutatión y oxidación de nucleótidos inducidas por mercurio, lo cual da lugar a un estado de estrés oxidativo que se caracteriza por aumento en la susceptibilidad de la membrana mitocondrial hacia la peroxidación de lípidos (Lund y cols., 1993). Estos mismos autores han propuesto que las alteraciones en la homeostasis mitocondrial del calcio inducidas por mercurio pueden exacerbar el estrés oxidativo inducido en células renales. Las etapas entre la unión a grupos tiol y la disfunción o daño celular no han sido elucidadas, sin embargo, existen algunas

teorías. Por ejemplo, Fowler (1993) sugiere que después de la entrada del mercurio o metil mercurio hacia las células de los túbulos proximales, por mecanismos de transporte a través de la membrana basolateral o de la membrana en borde de cepillo, ocurre una interacción con compuestos que poseen grupos tiol. Esta interacción produce alteraciones en la permeabilidad de la membrana celular hacia iones calcio e inhibe la función de las mitocondrias. Posiblemente después, a través de mecanismos de señalización desconocidos, el mercurio induce la síntesis de glutatión, metalotioneína y proteínas de estrés (Fowler, 1993). Sin embargo, debido a que la exposición a mercurio disminuye los mecanismos celulares de defensa contra el estrés oxidativo (superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa), se piensa que en los riñones, el daño epitelial ocurre como resultado de un aumento en la formación de radicales libres y peroxidación de lípidos (Gstraunthaler y cols., 1983). Por el contrario, en las mitocondrias ocurre disminución del glutatión, lo cual favorece un aumento de peróxido de hidrógeno en la membrana mitocondrial interna (Lund y cols., 1991) y puede contribuir al aceleramiento en el recambio de potasio y magnesio que ha sido observado a este nivel (Humes y Weinberg 1983). Se ha propuesto que el fallo renal agudo que resulta de la exposición a mercurio es debido principalmente a la disminución en la reabsorción de cloro y sodio en los túbulos proximales y a un aumento en la concentración de éstos.

Otros autores han demostrado que el mercurio inhibe una amplia variedad de enzimas. Sekowski y colaboradores (1997) utilizaron un complejo multiprotéico de células humanas al cual denominaron "sintetosoma de DNA" para evaluar *in vitro* los efectos del cloruro mercúrico sobre la replicación y síntesis de DNA mediada por este complejo. De acuerdo con los autores, el sintetosoma de DNA proporciona un ambiente altamente organizado para que ocurra la replicación de DNA y al mismo tiempo, permite identificar el mecanismo o el sitio donde ocurre el efecto mediado por mercurio. Los resultados de este grupo demostraron que la actividad de replicación y de polimerización del DNA, así como la fidelidad del sintetosoma fueron inhibidos específicamente por Hg^{2+} a concentraciones fisiológicas; según los autores de este trabajo, los iones mercúricos inhiben la etapa de elongación durante la replicación del DNA.

1.4 Mitochondrias: Blanco Celular del Mercurio

El mercurio es un agente nefrotóxico bien caracterizado, el cual causa daño a las células de los túbulos contorneados proximales (Fowler y Woods, 1977). Numerosos estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, han demostrado que las mitochondrias representan el blanco más sensible de los efectos de este metal, el cual se manifiesta principalmente como hinchamiento de estos organelos

(Fowler y Woods, 1977), disminución de la fosforilación oxidativa (Southard y Nitisewojo, 1973) y abatimiento de la síntesis de ATP (Nieminem y cols., 1990).

Como es bien sabido, las mitocondrias son organelos muy importantes para la fisiología celular. Además de su conocida función en la producción de energía (ATP), participan en el metabolismo de la urea, de los carbohidratos y en la biosíntesis del grupo hemo (Squibb y Fowler, 1981). La relevancia fisiológica de estos organelos ha aumentado debido a que se ha establecido que la concentración intracelular de ATP, así como la expresión de ciertas proteínas mitocondriales están involucradas directamente en los procesos de muerte celular por necrosis y apoptosis (Nicotera y cols., 1998; Kuwana y Newmeyer, 2003). Por otra parte, cuando las mitocondrias son afectadas por algún agente tóxico las células pueden entrar en estrés o incluso morir, debido a que, como se ha mencionado, las mitocondrias son las responsables de la producción de energía en las células. El efecto del mercurio sobre las mitocondrias ha sido descrito por varios grupos de investigadores (Weinberg y cols., 1982, Lund y cols., 1993, Königsberg y cols., 2001, Araragi y cols., 2003, Stacchiotti y cols., 2003).

1.5 Alteraciones Ultraestructurales Inducidas por Mercurio

Diversos investigadores han asociado cambios morfológicos y ultraestructurales en células intoxicadas con metales pesados (Pfaller y cols., 1990, Bizarro y cols., 2003). Dentro del riñón, el principal blanco del mercurio es la *pars recta* (segmento S3) de los túbulos proximales, principalmente en la región donde se unen la corteza y la médula externa (Stacchiotti y cols., 2003). La presencia de cambios morfológicos tubulares inducidos por HgCl₂ ha sido documentada *in vivo* (Rumbeiha y cols., 2000), e *in vitro*, tanto en túbulos proximales aislados (Fowler, 1972) como en cultivos de células provenientes del epitelio tubular renal (Duncan-Achanzar y cols., 1996). A pesar de que existen numerosos estudios, la patogénesis de la nefrotoxicidad inducida por mercurio, así como las alteraciones ultraestructurales inducidas por dosis variables del metal no han sido establecidas.

Como resultado de una búsqueda exhaustiva de reportes acerca de los efectos sobre la ultraestructura celular inducidos por los metales pesados, particularmente por mercurio, a continuación describimos los hallazgos publicados por distintos grupos de investigadores.

Uno de los trabajos más detallados al respecto es el que publicaron Gritzka y Trump en 1968, quienes emplearon ratas Sprague Dawley y eligieron

para su estudio diferentes tiempos de exposición y 2 dosis de HgCl₂: 4 y 16 mg por kg de peso.

Con 4 mg de HgCl₂ por kg de peso y tiempos de exposición de 3 y 6 h se observaron cambios muy sutiles y similares en ambos grupos a nivel del epitelio tubular renal. Un hallazgo interesante fue que los cambios observados no fueron uniformes, pues mientras que algunas células mostraban diferentes tipos de alteraciones, sus vecinas presentaban apariencia normal. Los núcleos permanecieron sin cambios, excepto porque ocasionalmente se observaron zonas focales densas en el nucléolo. El citoplasma se observó hinchado y menos denso que en la mayoría de las células normales. En algunas células, las mitocondrias perdieron sus gránulos de la matriz. El retículo endoplásmico rugoso presentó dilatación de las cisternas, pérdida de ribosomas y dispersión de los mismos por todo el citoplasma, mientras que el retículo endoplásmico liso mostró aumento en el número y tamaño de las cisternas. A las 12 y 24 h se observaron cambios similares entre los dos grupos, sin embargo, a las 24 h, todas las células de la *pars recta* habían experimentado necrosis. En las células necróticas de 12 h, las membranas celulares presentaron puntos de distorsión y ruptura. En el lado apical, las microvellosidades estaban casi completamente ausentes y la membrana plasmática tenía un contorno simple, difícilmente se pudieron evidenciar los complejos de unión intercelular. Muchas células perdieron su configuración columnar, volviéndose esféricas y perdiendo

contacto con la membrana basal. Los núcleos de las células necróticas a las 12 h de exposición a HgCl_2 mostraron una agregación muy marcada de la cromatina. A las 24 h se observó ruptura de la envoltura nuclear, los componentes del nucleoplasma tenían apariencia floculenta y estaban distribuidos al azar. En el citoplasma de una misma célula se podían observar áreas muy densas o diluidas, probablemente debido a condensación de proteínas citoplasmáticas. En las células menos dañadas las mitocondrias tenían apariencia normal, sin embargo, en la mayoría de los casos se observaron muy hinchadas y con depósitos amorfos y densos en la matriz (agregados densos), con frecuencia, el espacio intracristico estaba agrandado y la matriz aparecía más condensada. A las 24 h también se observó gran variabilidad en los cambios de las mitocondrias, pero la magnitud de las alteraciones fue mayor. En las mitocondrias más dañadas la matriz estaba muy hinchada y los depósitos denso-amorfos fueron de mayor tamaño. En todas las mitocondrias el número de crestas disminuyó. El retículo endoplásmico mostró cambios diversos, tanto a las 12 como a las 24 h. Hubo proliferación y fragmentación del retículo endoplásmico liso. El número de ribosomas disminuyó marcadamente a las 12 h, mientras que a las 24 h desaparecieron; debido a esto último, no se pudieron identificar las cisternas del retículo endoplásmico. A las 24 h, se presentaron depósitos de microcristales en algunas mitocondrias y los restos de crestas se identificaron como perfiles

tubulares membranosos dentro de la matriz, en algunas mitocondrias se observaron figuras similares a mielina.

Con la dosis de 16 mg de mercurio por kg de peso, los cambios ultraestructurales fueron similares a los observados con 4 mg, excepto por un desarrollo más rápido y calcificación más prominente. Los cambios más interesantes fueron en las mitocondrias; en las células menos afectadas la matriz aparecía hinchada, con pérdida de sus gránulos. No obstante, en la mayoría de las mitocondrias el daño fue más severo y se caracterizó por agregados floculentos y depósitos microcristalinos, así como hinchamiento y pérdida de los gránulos en la matriz. Las membranas y crestas mitocondriales estaban distorsionadas debido al hinchamiento de la matriz.

Por otro lado, Goyer y Krall (1969) estudiaron los cambios ultraestructurales que se presentan en mitocondrias aisladas de riñones de ratas intoxicadas con plomo durante ensayos controlados de respiración celular *in vitro*. Estos autores reportaron que las mitocondrias se transformaron de una conformación ultraestructural condensada (después de la intoxicación con plomo) a una conformación ortodoxa luego de unos minutos en presencia de piruvato-malato como sustrato de la respiración. Muchas mitocondrias no cambiaron de la forma condensada a la forma ortodoxa y degeneraron rápidamente. Los autores propusieron que los cambios observados pueden ser

debidos a los efectos nocivos del plomo sobre la cadena respiratoria y sobre un aumento en la labilidad de las membranas de las mitocondrias, las cuales experimentan degradación posterior.

En 1972, Fowler estudió los efectos de la exposición crónica (84-112 días) a metil mercurio (2.0 ppm) sobre la *pars recta* de los túbulos renales de ratas. Los cambios ultraestructurales fueron limitados a los túbulos proximales y consistieron en aumento del retículo endoplásmico liso y degeneración de las mitocondrias, seguidos de muerte celular.

En otro estudio, Ganote y cols., (1974) investigaron la secuencia de cambios morfológicos inducidos en los riñones de ratas inyectadas con 1mg de HgCl_2 por kg de peso. Ellos encontraron que las alteraciones morfológicas iniciales (8 h después de la intoxicación con mercurio) consistieron en pérdida de las membranas con borde de cepillo, dispersión de ribosomas y agregados citoplasmáticos de membranas provenientes del retículo endoplásmico liso, aparición de vacuolas y cuerpos densos amorfos en el citoplasma, así como agregación de la cromatina en el núcleo. En etapas tardías ocurrió hinchamiento celular acompañado de ruptura de la membrana plasmática y cambios mitocondriales que en conjunto caracterizaron el inicio de eventos de necrosis. A este tiempo, las mitocondrias contenían gránulos densos en la matriz y un material amorfo que se asoció con la presencia de calcio.

Desnoyers y Chang (1975) analizaron los cambios ultraestructurales producidos en hepatocitos de ratas intoxicadas con 10 mg de metil mercurio por kg de peso. A las 5 h, se observaron dilataciones en las cisternas del retículo endoplásmico rugoso, ondulación de las membranas de las mitocondrias y acumulación ocasional de lípidos. A las 24 h se observaron áreas focales con material amorfo producto de degradación citoplásmica. Las mitocondrias mostraron cambios prominentes a las 48 h, tales como hinchamiento de la matriz con pérdida de sus gránulos, así como rompimiento de la membrana externa y pérdida de las crestas, dando como resultado la presencia de cuerpos floculentos rodeados por una sola membrana que fueron vistos con frecuencia a este tiempo experimental. Sin embargo, en algunas mitocondrias con hinchamiento masivo se observaron crestas desplazadas hacia la periferia y anormalmente acortadas, pero sin gránulos en la matriz. Otro hallazgo importante fue la presencia cuerpos autofágicos que contenían organelos citoplásmicos degenerados o en procesos de degeneración.

Por otra parte, Fowler y Woods (1977) analizaron los cambios morfológicos en mitocondrias aisladas de ratas intoxicadas crónicamente (6 semanas) con dosis variables de metil mercurio. En los animales control, las mitocondrias estaban alargadas y las crestas tenían un arreglo regular, sin embargo, en las ratas tratadas con 5 y 10 ppm de metil mercurio observaron hinchamiento *in situ* de las mitocondrias presentes en las células de los túbulos

proximales, con crestas distorsionadas; estos efectos fueron más notables en los segmentos S2 y S3 de los túbulos proximales. Las alteraciones en la ultraestructura mitocondrial se relacionaron, mediante estudios bioquímicos, con pérdida de la función de enzimas involucradas en el metabolismo de las mitocondrias, tales como citocromo oxidasa, mono-amino oxidasa, deshidrogenasa málica y ALA sintetasa, así como alteración en los niveles de porfirinas urinarias.

Otros investigadores han empleado modelos menos convencionales para estudiar los efectos de los metales pesados sobre la ultraestructura celular. Por ejemplo Gullvag y cols., (1978) utilizaron los hígados de codornices a las cuales alimentaron con 0.8 ppm de metil mercurio adicionado durante 6 semanas en sus dietas. Sus hallazgos fueron, presencia de mitocondrias hinchadas, dilataciones del retículo endoplásmico liso, pérdida de ribosomas del retículo endoplásmico rugoso y aumento en el número de vesículas citoplásmicas.

Rao y cols., (1989) utilizaron patos para estudiar los cambios ultraestructurales inducidos en los riñones por efecto de mezclas de metil mercurio, plomo y cadmio. Las células de los túbulos proximales acumularon gotas de lípidos, observaron además cuerpos lisosomales y vacuolas unidas a la membrana celular. Los cambios observados se caracterizaron por acumulación de gotas de lípidos, aumento de lisosomas, mitocondrias

hinchadas, lisosomas con organelos en proceso de degeneración, vacuolas con estructuras similares a mielina y vacuolas unidas a la membrana celular.

Christensen y cols., (1993) estudiaron el efecto del metil mercurio en cultivos de macrófagos peritoneales de ratón. Luego de 24 h de intoxicación con dosis menores de 10 μM de metil mercurio, no se observaron cambios morfológicos comparados con los controles sin tratar. A concentraciones mayores de 10 μM , se observó el citoplasma condensado por la presencia de abundantes lisosomas y retículo endoplásmico rugoso. En algunas células, la membrana celular se desintegró y fue difícil establecer la presencia de estructuras citoplásmicas. A tiempos mayores de exposición (3 a 8 días), los cambios morfológicos asociados con toxicidad y muerte celular fueron más frecuentes, hasta llegar a un momento en que todas las células se volvieron picnóticas.

Más recientemente, Bucio y cols., (1995), estudiaron la toxicidad del mercurio y del cadmio sobre una línea celular establecida de hepatocitos humanos. En lo que respecta al mercurio, utilizaron concentraciones de 0.5 y 5 μM de HgCl_2 durante 24 h (dosis aguda baja y alta respectivamente) y 5 μM de HgCl_2 durante 7 días (dosis crónica). De acuerdo con sus hallazgos, en la dosis aguda baja, el citoplasma se observó vacuolado y con estructuras aparentemente formadas por microtúbulos, mientras que las mitocondrias

perdieron sus crestas. A la dosis aguda alta se observó acortamiento de las microvellosidades, vacuolización del citoplasma, disminución del retículo endoplásmico rugoso, aumento en el número de ribosomas libres, pérdida de los contactos intercelulares y lobulaciones e indentaciones del núcleo. La exposición de los hepatocitos a la dosis crónica indujo pérdida y acortamiento de las microvellosidades, cambios en la electrodensidad de la matriz mitocondrial y espacios vacíos en los sitios donde antes había retículo endoplásmico rugoso.

Rumbeiha y cols., (2000) utilizaron ratones a los que intoxicaron con 1.75 mg HgCl₂ por kg de peso, además de lipopolisacárido de *Escherichia coli*. A nivel ultraestructural, los cambios consistieron en pérdida de las microvellosidades apicales, aumento en el número de lisosomas secundarios y de gotas de lípidos, presencia de mitocondrias hinchadas, edema basal y dilatación de las membranas del retículo endoplásmico liso.

Utilizando el modelo de hepatocitos humanos, Königsberg y cols., (2001), encontraron cambios ultraestructurales inducidos por HgCl₂ a dosis de 5 µM, los cuales se relacionaron con un arreglo atípico de la cromatina. Las mitocondrias estaban alargadas y su membrana dispersa. A mayores aumentos observaron que existe daño a la membrana plasmática, que se perdieron los pliegues de la

membrana mitocondrial interna y que las membranas internas que conforman el retículo endoplásmico y aparato de Golgi se dispersaron por el citoplasma.

En un modelo experimental con delfines Wang y Pfeiffer (2001), realizaron uno de los primeros estudios ultraestructurales acerca de células renales de cetáceos expuestas a mercurio *in vitro*. Sus hallazgos demostraron la presencia de mitocondrias y retículo endoplásmico rugoso dilatados, cuerpos densos en las mitocondrias y pequeños gránulos esféricos muy electrodensos en el citoplasma, además de vacuolas citoplásmicas y figuras de mielina. Los cambios nucleares que observaron consistieron en cariólisis, protuberancias nucleares y fragmentación del nucléolo.

En otro estudio reciente, Stacchiotti y cols., (2003) intoxicaron ratas Sprague Dawley durante 24 h con 2 dosis subletales de HgCl₂ y establecieron que los cambios observados se relacionan directamente con la dosis de mercurio dentro de los túbulos proximales. El grupo de ratas que recibió 1 mg de HgCl₂ por kg de peso mostró alteraciones representadas por rompimiento de las microvellosidades, abundantes cuerpos lisosomales, mitocondrias hinchadas, vacuolización del citoplasma y figuras de mielina. También se observaron cambios nucleares tales como cromatolisis y desorganización parcial del nucléolo. Los animales que fueron intoxicados con 3.5 mg de HgCl₂

presentaron tanto apoptosis, como necrosis nuclear, daño en las membranas basolaterales y de borde de cepillo, mitocondrias anormales con las crestas casi totalmente destruidas y poli-ribosomas libres. El nucléolo se desorganizó por completo y su componente denso-fibrilar fue escaso, aunque en ocasiones se observó un cuerpo enrollado semejante a una inclusión, separado del nucléolo y casi continuo con la cromatina marginal.

1.6 Células OK (Opossum Kidney) como Modelo de Estudio

La línea celular que empleamos en este trabajo se seleccionó tomando en cuenta el hecho de que por su actividad fisiológica, el riñón, en particular la porción proximal de los túbulos renales, representan el blanco más sensible para evaluar el efecto del mercurio y otros agentes nefrotóxicos. Las células OK se aislaron originalmente a partir del riñón de la zarigüeya americana *Didelphys virginiana* (Koyama y cols., 1978); se consideran como un sistema modelo de túbulos proximales debido a la considerable similitud de sus procesos de transporte de solutos, tal como ocurre *in vivo* (Malström y cols., 1987). Estas células poseen propiedades altamente diferenciadas tales como una cadena hormonal completa de señales de transducción para la inhibición de la toma de fosfato por la hormona paratiroidea (Malström y cols., 1988). En cultivo desarrollan una organización polarizada, crecen formando monocapas

confluentes y desarrollan domos sobre soportes permeables. (Handler, 1986). Otras características que presentan son el transporte de hexosas, aminoácidos, fosfato inorgánico y la presencia de receptores para la hormona paratiroidea (Tertelbaum y Strewler, 1984). También permiten el intercambio de iones, así como el transporte de fosfato acoplado a sodio. En cultivo, el lado apical queda expuesto al medio de cultivo y es equivalente al lado luminal del epitelio tubular *in vivo*, pero al mismo tiempo queda accesible a diversos sustratos, en tanto que la membrana basolateral se orienta hacia el material de soporte (Malström y Murrer, 1986).

1.7 Justificación

La intoxicación por metales pesados representa un problema importante de salud pública. El mercurio es un metal pesado que debido a las aplicaciones que tiene en diversas industrias se ha convertido en un contaminante frecuente, pero además representa un serio riesgo a la salud de los seres humanos y de los animales.

Se han realizado numerosos estudios morfológicos, ultraestructurales y fisiológicos en células de animales intoxicados con dosis milimolares de HgCl_2 . Sin embargo, las alteraciones morfológicas y funcionales que son inducidas por mercurio no han sido del todo establecidas, no se conocen las dosis mínimas de mercurio capaces de causar estos daños al ser aplicadas directamente sobre las células y además, existen muy pocos estudios al respecto en los cuales se hayan empleado líneas celulares de riñón, el cual constituye el órgano blanco de este metal.

El modelo *in vitro* que empleamos en este trabajo ofrece la posibilidad de realizar estudios muy detallados desde el punto de vista morfológico, ultraestructural y fisiológico para estudiar los mecanismos de acción del metal. Además, una vez caracterizado, será muy útil para analizar el efecto de nuevos quelantes que sean útiles para el tratamiento de la intoxicación por mercurio. Por estos motivos, para este trabajo utilizamos una línea celular representativa de los túbulos proximales renales para caracterizar los efectos del mercurio sobre la ultraestructura y función mitocondrial *in vitro*.

1.8 Hipótesis

Las células OK representan un modelo de estudio adecuado para caracterizar el daño en la ultraestructura y función mitocondrial inducido por cloruro mercuríco (HgCl_2) y para conocer los tiempos y dosis en los que ocurren los cambios morfológicos y fisiológicos por intoxicación con mercurio en este modelo experimental.

1.9 Objetivo General

Analizar el efecto de dosis micromolares de HgCl_2 sobre la actividad funcional y sobre la ultraestructura de células OK, con énfasis en las mitocondrias.

1.10 Objetivos Específicos

1. Estudiar el efecto del mercurio sobre la actividad de deshidrogenasas mitocondriales en función de la reducción de una sal de tetrazolio (ensayo de reducción del MTT).
2. Analizar el efecto del mercurio sobre el contenido intracelular de ATP.
3. Analizar mediante microscopía de luz con contraste de fase los cambios morfológicos inducidos por mercurio.
4. Estudiar mediante microscopía electrónica de transmisión los cambios ultraestructurales que se presentan en células OK intoxicadas con mercurio, con énfasis en las mitocondrias.
5. Determinar mediante microscopía confocal los cambios inducidos por mercurio en el patrón de tinción del colorante afin a mitocondrias, MitoTracker Red.

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material Biológico

Se utilizó la línea de células OK (Opossum Kidney), ATCC 1840-CRL de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, EUA), entre los pasajes 80 a 100. Fueron cultivadas en medio esencial mínimo de Eagle (Gibco BRL, Life Technologies, Inc. Grand Island N.Y.), suplementado con 10% de suero fetal de bovino e incubadas a 37°C, en atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

2.2 Origen de los Reactivos

De **AGFA Corporation** (Ridgefield Park, NJ, USA): Película fotográfica AGFA Pan APX 25

De **Bio Whittaker** (Rockland, ME, USA): Kit ViaLight[®] HS para cuantificación de ATP.

De **Eastman Kodak Company** (Rochester, NY, USA): Papel para impresión fotográfica Kodabrome II RC-F2.

De **GIBCO BRL Laboratories** (Grand Island, NY, USA): Medio Esencial Mínimo de Eagle, Suero fetal de bovino.

De **Molecular Probes** (Eugene, OR, USA): Mitotracker[®] Red CMX2Ros.

De **Sigma Chemical Company** (Saint Louis, MO, USA): Acido clorhídrico, Alcohol etílico absoluto, alcohol isopropílico, Bicarbonato de sodio, Cloruro de calcio, Cloruro de magnesio, Cloruro mercúrico, Cloruro de potasio Cloruro de sodio, Dodecil sulfato de sodio, Fosfato monobásico de potasio, Fosfato dibásico de potasio, Glucosa, Hidróxido de sodio, Hidróxido de potasio, MTT (Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio), Penicilina, PMS (Metasulfato de Fenazina), Rojo de fenol, Sulfato de estreptomicina, Sulfato de magnesio.

De **Ted Pella Inc.** (Redding, CA, USA): Acetato de uranilo, Cacodilato de sodio, Citrato de plomo, Formaldehído, Resina Spur, Tetraóxido de osmio.

2.3 Equipo

Agitador magnético

Balanza analítica

Baño de agua

Campana de flujo laminar

Centrifuga con control de temperatura

Congelador (-20 °C)

Incubadora para cultivo celular con flujo regulable de CO₂

Lector de microplacas

Luminómetro

Microscopio confocal

Microscopio de luz con campo claro y contraste de fase

Microscopio electrónico de transmisión

Microscopio estereoscópico

Microscopio Invertido

Potenciómetro

Refrigerador

Tanque de nitrógeno líquido

Ultracongelador (-80 °C)

2.4 Métodos

El origen de los reactivos y equipo de laboratorio que se utilizaron en el presente trabajo se detalla en los apartados 2.2 y 2.3 de este capítulo. La preparación de las soluciones de trabajo se describe en el Apéndice.

2.4.1 Mantenimiento de la Línea Celular

Para el mantenimiento de rutina de los cultivos, las células OK se sembraron en botellas de poliestireno para cultivo (*Corning Incorporated, New York, USA*) con un área de 25 cm². Se utilizaron inóculos de 10,000 células/ml. Los cultivos se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO₂ hasta que las células formaron una monocapa confluyente; entonces, a partir de un cultivo fuente de inóculo, se subcultivaron tres botellas bajo condiciones de esterilidad de acuerdo con el protocolo que se detalla a continuación:

- 1.- Se retiró el medio de cultivo utilizando vacío.
- 2.- Se agregaron 0.5-1.0 ml de tripsina al 0.25%.
- 3.- Se incubó por 10-20 min a 37°C hasta que se desprendieron las células.
- 4.- Las células fueron resuspendidas utilizando medio de cultivo completo y se colocaron en un tubo estéril.

- 5.- Se lavó la botella con medio de cultivo, este volumen se colocó también en el tubo con las células.
- 6.- Se centrifugó a 1000 rpm por 10 min.
- 7.- Utilizando vacío, se eliminó el sobrenadante que contenía tripsina.
- 8.- Se resuspendió la pastilla celular utilizando 3 ml de medio basal y se centrifugó nuevamente como en el paso 6.
- 9.- Se eliminó el sobrenadante.
- 10.- Se resuspendió el paquete de células en 5 ml de medio de cultivo completo.
- 11.- Se tomó una alícuota y se contaron las células utilizando una cámara de Neubauer (*American Optical, Scientific Instruments, New York, USA*).
- 12.- Se sembraron 10,000 células/ml en botellas de cultivo nuevas y se agregaron a cada una 5 ml de medio de cultivo completo
- 13.- Se incubaron las botellas de cultivo dejando los tapones flojos, a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO₂.

2.4.2 Intoxicación de las células OK con HgCl₂

Monocapas confluentes de células OK, cultivadas en microplacas de 96 pozos, fueron incubadas por tiempos y dosis variables con cloruro mercuríco como se describe a continuación:

1. Se sembraron 2×10^4 células/pozo de una microplaca de 96 pozos.
2. Se incubó la microplaca a 37 °C en atmósfera húmeda y 5% de CO₂ hasta que se formó una monocapa confluyente.
3. Se incubaron las células en presencia de 0, 1, 10 y 15 µM of HgCl₂ durante 1, 3, 6 y 9 h.
4. Se procesaron según las necesidades experimentales, ya sea para realizar pruebas funcionales o análisis morfológicos, de acuerdo a como se describe en los apartados correspondientes.

2.4.3 Ensayo de Reducción del MTT (Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio)

Este ensayo se fundamenta en el hecho de que las mitocondrias intactas de células viables reducen la sal amarilla del colorante tetrazolio (MTT) y lo transforman en un compuesto insoluble de color azul (formazán). La cantidad de formazán producido es directamente proporcional a la actividad de deshidrogenasas mitocondriales, la cual se relaciona con la viabilidad celular (Mosmann, 1983). Bajo nuestras condiciones experimentales, el ensayo se realizó de la siguiente manera:

- 1.- Se sembraron 2×10^4 células en cada uno de los pozos de una microplaca de poliestireno de 96 pozos y se incubaron a 37°C con 5% de CO_2 y atmósfera húmeda, hasta que formaron una monocapa confluyente.
- 2.- Se eliminó el medio de cultivo y se sustituyó por 200 μl de medio de cultivo que contenía las diferentes concentraciones de HgCl_2 (0, 1, 10 y 15 μM).
- 3.- Las microplacas fueron incubadas durante 1, 3, 6 y 9 h a 37°C con 5% de CO_2 y atmósfera húmeda.
- 4.- Se decantó el medio con mercurio y se lavaron dos veces los pozos con 200 μl de PBS.
- 5.- Se agregaron a cada pozo 200 μl de una mezcla 5:1 de MTT y de PMS, respectivamente.
- 6.- Las microplacas fueron incubadas a 37°C por 75 min.
- 7.- Se decantaron los reactivos y se lavaron los pozos con PBS.
- 8.- Se agregaron 200 μl de alcohol isopropílico acidificado.
- 9.- Las microplacas se dejaron reposar por 15 min a temperatura ambiente y el alcohol fue resuspendido vigorosamente utilizando una pipeta de repetición.
- 10.- Se colocó el sobrenadante en una placa nueva y se leyó la absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas.

2.4.4 Análisis del Contenido Intracelular de ATP

Para este ensayo se utilizó el Kit Via Light HS de Bio Whittaker (Rockland, ME, USA). Se siguieron las indicaciones del fabricante, de acuerdo con la técnica que se detalla a continuación:

Se sembraron 2×10^4 células en un volumen de 100 μ l de medio completo en cada uno de los pozos de una microplaca de poliestireno de 96 pozos. Las microplacas se incubaron por 12 h para que las células formaran una monocapa. Una vez formadas las monocapas, se les retiró el medio de cultivo y se trataron con 0, 1, 10 y 15 μ M de HgCl_2 disueltos en 100 μ l de medio durante 1, 3, 6 y 9 h. Después de estos tiempos de incubación, se les adicionaron a cada pozo 100 μ l de "reactivo liberador de nucleótido" y se incubaron a temperatura ambiente por 30 min. Posterior a la incubación se transfirieron 180 μ l a una placa nueva y se adicionaron 20 μ l de "reactivo para monitorear ATP". Se incubó la microplaca por 10 min a temperatura ambiente y se leyó en un luminómetro Spectra Max 340 (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale CA). Los resultados se expresaron como unidades relativas de luz; se considera que la intensidad de la luz emitida se relaciona directamente con la concentración intracelular de ATP.

2.4.5 Microscopía Confocal y Tinción con Mitotracker® Red

Para el análisis al microscopio confocal se realizó lo siguiente:

1. Se sembraron 30×10^3 células sobre cubreobjetos de vidrio de 1.5 mm de grosor, colocados previamente en los pozos de una microplaca de 6 pozos.
2. Se incubó la microplaca a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO₂ hasta alcanzar aproximadamente el 75% de confluencia.
3. Los cultivos se incubaron durante 1, 3, 6 y 9 h en presencia de 0, 1, 10 y 15 μM de HgCl₂.
4. Después de cada tiempo experimental, se retiraron los tratamientos y se lavaron las células con PBS.
5. Se incubaron a 37°C por 30 min con una solución 200 nM de MitoTracker Red CMX2Ros (*Molecular Probes. Eugene OR, USA*) en medio de cultivo.
6. Se realizaron dos lavados con amortiguador de Dulbecco.
7. Se fijaron con formaldehído al 4% por 20 min a temperatura ambiente.
8. Se realizaron tres lavados con amortiguador de Dulbecco y se montó cada cubreobjeto sobre un portaobjetos empleando medio de montaje para muestras fluorescentes y se sellaron utilizando barniz de uñas.
9. Las preparaciones se observaron utilizando un microscopio confocal marca Leica modelo TCS-4D y el software SCANWARE versión 5.1b.

2.4.6 Microscopía de Luz con Contraste de Fase

Para este análisis, las células tratadas o no con mercurio, fueron visualizadas directamente sobre las botellas de cultivo utilizando un microscopio invertido marca Zeiss modelo Axiovert 100, con cámara fotográfica y editor de imágenes que nos permitieron tomar fotografías *in situ* utilizando contraste de fase.

2.4.7 Microscopía Electrónica de Transmisión

En esta etapa del estudio, se utilizaron cultivos de células OK crecidas sobre insertos Millipore-CM de 12 mm de diámetro y tamaño de poro de 45 μm . Se sembraron 6×10^5 células/ml sobre las membranas de los insertos en 400 μl de medio de cultivo completo y se incubaron a 37 °C hasta que formaron una monocapa confluyente. Una vez formadas las monocapas, se procesaron para su análisis al microscopio electrónico de transmisión de acuerdo al siguiente protocolo:

1. Se cultivaron las células OK sobre insertos Millicell CM hasta que formaron monocapas confluentes.
2. Se adicionaron los tratamientos experimentales durante los tiempos establecidos.

3. Se lavaron las monocapas celulares con PBS.
4. Se fijaron con glutaraldehído al 3 por 1 h a temperatura ambiente.
5. Se lavaron los insertos tres veces por 10 min cada vez, con PBS a temperatura ambiente.
6. Se post-fijaron con tetraóxido de osmio al 2% durante 1 h a temperatura ambiente.
7. Se lavaron 3 veces, 5 min cada vez, con amortiguador de cacodilatos 0.2 M a temperatura ambiente.
8. Se deshidrataron en etanol a temperatura ambiente, 5 min (1 vez) en cada uno de los siguientes: etanol al 50%, etanol al 70%, etanol al 80%, etanol al 95% (5 min, 3 veces) y etanol al 100% (5 min, 1 vez).
9. Se separaron las membranas de los insertos y se cortaron rectángulos de aproximadamente 1 x 0.5 mm, los cuales fueron colocados en moldes de inclusión.
10. Se pre-incluyeron en etanol/spur. (50:50) toda la noche, a temperatura ambiente.
11. Se incubaron durante 48 h a 4 °C en spur puro.
12. Se incluyeron en spur puro a 60 °C por 24 h.
13. Se prepararon pirámides y cortes semifinos con ayuda de navajas de un filo y de un microscopio estereoscópico.

14. Se prepararon cortes ultrafinos utilizando un ultramicrotomo RMC-MTX (*ISS Group Services Ltd, Manchester, UK*). Los cortes se colocaron sobre rejillas de cobre, las cuales fueron contrastadas con acetato de uranilo y citrato de plomo.
15. Las rejillas con los cortes fueron revisadas utilizando un microscopio electrónico de transmisión marca Philips modelo CM 12 y otro marca Zeiss modelo EM 109.
16. Se tomaron fotografías con películas Agfa Pan APX-25 con asa 100 y se imprimieron en papel fotográfico Kodak Kodabrome IIRC- F2.

2.4.8 Análisis Estadístico

Se empleó estadística descriptiva para comparar los valores de promedios y desviaciones estándar de los diferentes grupos experimentales con respecto a los controles no tratados con mercurio, también se utilizó estadística inferencial, mediante análisis de varianza (ANOVA) junto con una prueba de comparación múltiple de las diferencias mínimas significativas (DMS). Se aplicó un ANOVA de dos factores (factor A, dosis y factor B, tiempo), con cuatro tratamientos para cada uno (factor A: 0, 1, 10 y 15 μM de HgCl_2 vs factor B: 0, 1, 3, 6 y 9 h). Posteriormente, con resultados significativos del ANOVA bifactorial, se utilizó la prueba de comparaciones múltiples de las DMS. Esto, con el objeto de encontrar las diferencias de medias entre los pares de grupos. El nivel de significancia estadística fue de $\alpha = 0.05$.

Para el análisis de los datos se utilizó el programa de estadística SPSS® versión 11.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS

3.1 Efecto del mercurio sobre la función mitocondrial de las células OK.

Como se puede apreciar en la *figura 1*, la actividad de deshidrogenasas mitocondriales en los cultivos de células OK no se afecta por las dosis de 1 y 10 μM de HgCl_2 con respecto a las células del control sin tratamiento. El efecto sobre este parámetro se manifiesta a la dosis de 15 μM de HgCl_2 . A esta última dosis, a las 6 y 9 h de exposición al metal, se observó una clara disminución de la viabilidad, 31 y 47% respectivamente; comparada con 15 y 16% a 1 y 3 h de tratamiento con mercurio. Interesantemente, las células tratadas con las dosis de 1 y 10 μM de HgCl_2 mostraron un ligero incremento en la capacidad para reducir el MTT.

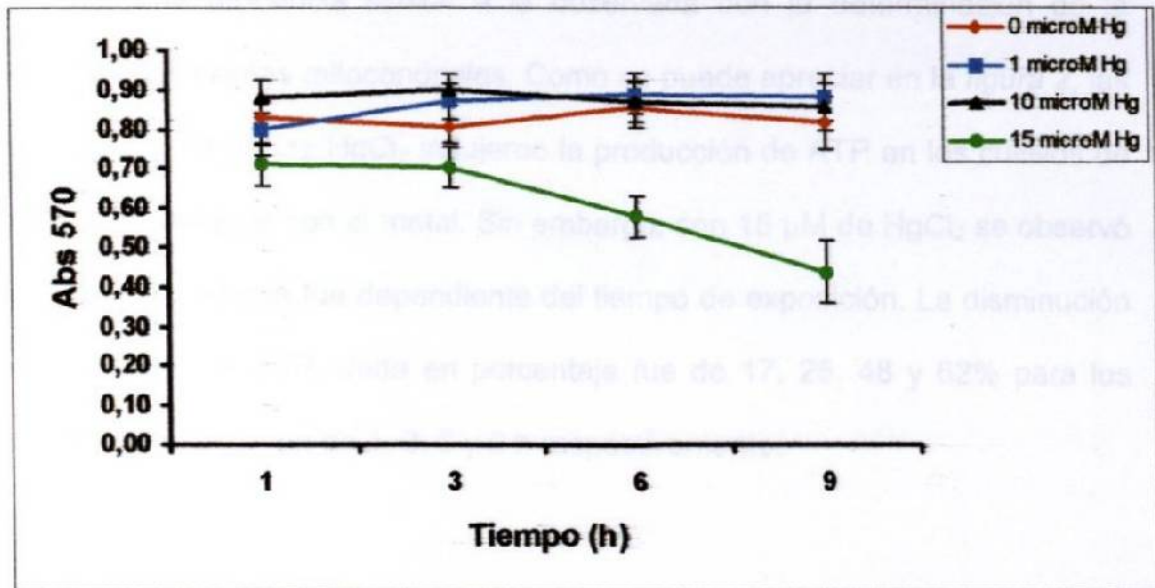


Figura 1. Actividad mitocondrial de las células OK tratadas con dosis y tiempos variables de HgCl₂. Con respecto a los cultivos control sin tratamiento, a las dosis de 1 y 10 μ M se observó un ligero incremento en todos los tiempos analizados, sobre la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales, el cual resultó ser estadísticamente significativo (ver la sección 3.3). Incubando con 15 μ M de HgCl₂, se observa una marcada disminución en la actividad de estas enzimas, la cual es estadísticamente significativa ($p < 0.05$), sobre todo a las 6 y 9 h de incubación.

3.2 Efecto del mercurio sobre el contenido de ATP de las células OK.

Con respecto a la medición de este otro parámetro fisiológico, se encontró una tendencia similar a la observada con la determinación de la actividad de enzimas mitocondriales. Como se puede apreciar en la *figura 2*, las dosis de 1 y 10 μM de HgCl_2 indujeron la producción de ATP en los cultivos de células OK tratados con el metal. Sin embargo, con 15 μM de HgCl_2 se observó una disminución que fue dependiente del tiempo de exposición. La disminución del contenido de ATP, dada en porcentaje fue de 17, 25, 48 y 62% para los tiempos de exposición de 1, 3, 6 y 9 h respectivamente.

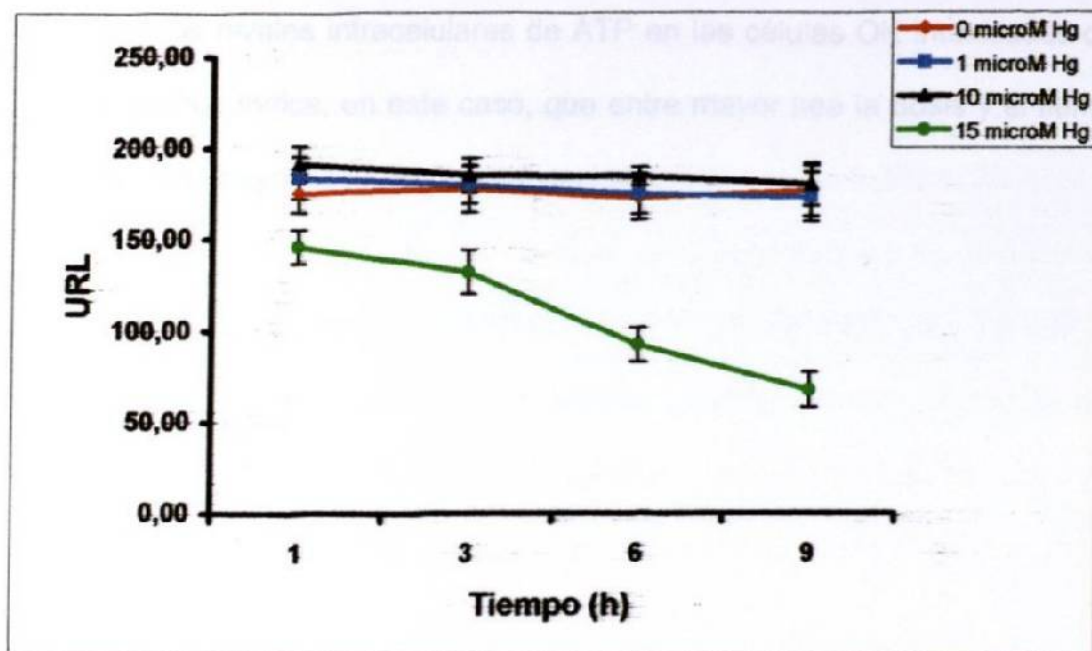


Figura 2. Efecto del cloruro mercúrico sobre el contenido intracelular de ATP. Dosis de 1 y 10 μM de HgCl_2 inducen un ligero incremento en los niveles de ATP, los cuales son estadísticamente significativos ($p < 0,05$). Con respecto a los cultivos control, el mercurio a dosis de 15 μM provoca disminución importante en los niveles de ATP en todos los tiempos estudiados ($p < 0,05$).

La interacción Dosis vs Tiempo resultó estadísticamente significativa ($p < 0.05$), tanto para la capacidad de reducir el MTT por las enzimas mitocondriales, como para los niveles intracelulares de ATP en las células OK intoxicadas con HgCl_2 . Esto nos indica, en este caso, que entre mayor sea la dosis y el tiempo de exposición, mayor será el efecto observado.

3.3 Análisis al microscopio de luz de los efectos del HgCl₂ sobre la morfología de las células OK

Se fotografiaron cultivos de células OK utilizando un microscopio de luz con contraste de fase. En la *figura 3a* se puede apreciar un cultivo confluyente de células OK control (sin tratamiento con mercurio). En una monocapa confluyente, las células poseen formas poliédricas irregulares y es posible apreciar que los límites celulares entre ellas se encuentran perfectamente definidos. Con frecuencia, en los cultivos 100% confluentes de células OK se observan "domos" (*figura 3b* flecha), estructuras que son indicativas de transporte transepitelial de solutos *in vitro* (Cereijido y cols. 1981).

Con dosis bajas [$1\ \mu\text{M}$ (*figura 4. a, b, c, d*) y $10\ \mu\text{M}$ (*figura 5. a, b, c, d*)], no se aprecian cambios morfológicos en todos los tiempos estudiados, pero tampoco en los tiempos tempranos (1 y 3 h) a la dosis de $15\ \mu\text{M}$ (*figura 6. a, b*). Las alteraciones se aprecian a las 6 y 9 h de exposición al mercurio a dosis de $15\ \mu\text{M}$, cuando el efecto dañino del mercurio se manifiesta por disgregación de la monocapa celular, así como por la pérdida de la morfología característica (*figura 6. c, d*).

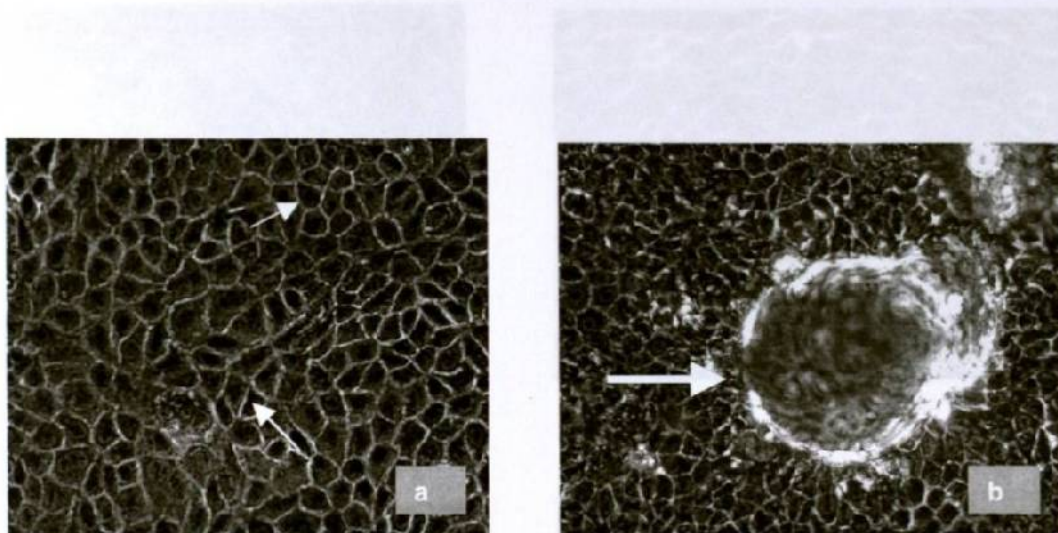


Figura 3. Células OK control sin tratamiento. a) Se observa un cultivo confluyente. Las células poseen formas poliédricas e irregulares cuyos límites celulares se aprecian claramente (flechas). b) Se observa un "domo" (flecha), característico de cultivos confluyentes. Los domos indican que el epitelio formado *in vitro* es funcional y que las células efectúan procesos de transporte transepitelial. Microscopía de luz con contraste de fase. Análisis *in situ*. 400X.

... OK tratadas con 1 μ M de HgCl₂ a distintos tiempos de exposición. a) 1 h, b) 2h. Se puede apreciar que con respecto a los cultivos control sin tratamiento, no se observan alteraciones morfológicas a todos los tiempos analizados y que la integridad de las células se mantiene sin alteraciones evidentes a este nivel de estudio. Microscopía de luz con contraste de fase. Análisis *in situ*. 400X.

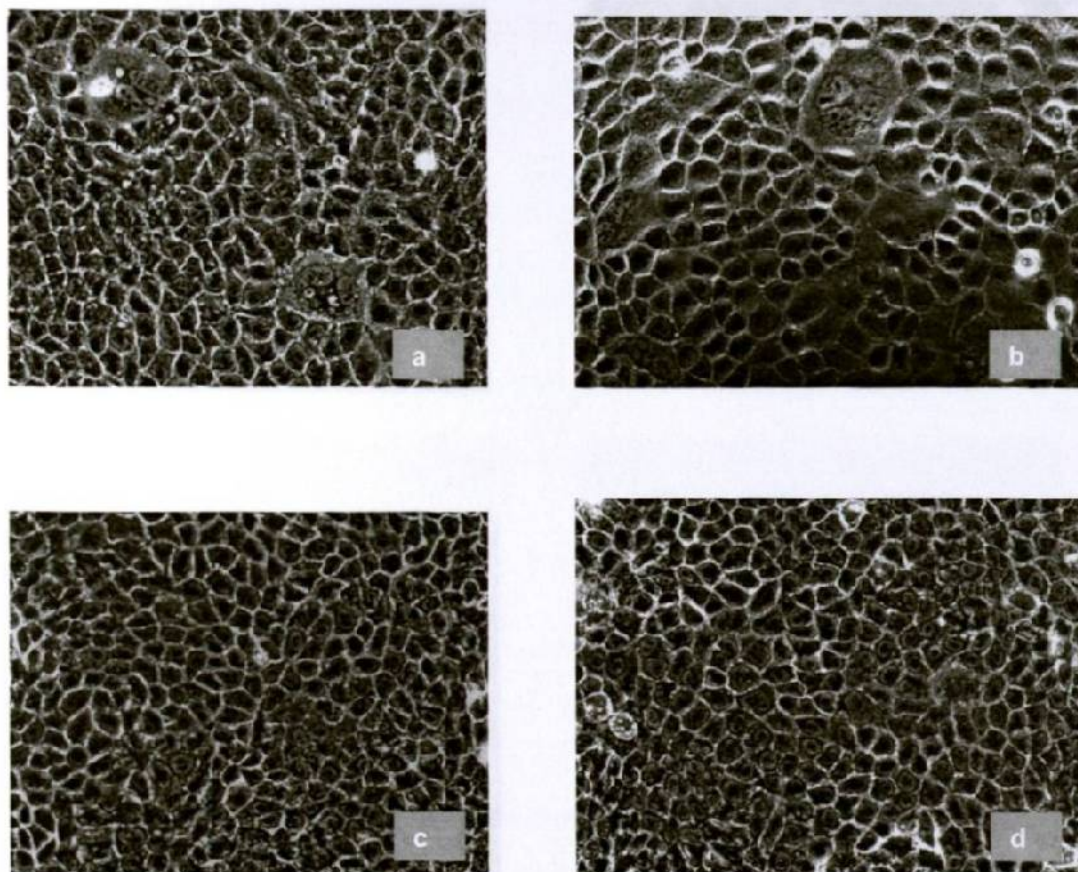


Figura 4. Células OK tratadas con 1 μM de HgCl_2 a distintos tiempos de exposición. a) 1 h, b) 3 h, c) 6 h y d) 9h. Se puede apreciar que con respecto a los cultivos control sin tratamiento, no existen cambios morfológicos a todos los tiempos analizados y que la integridad de las monocapas se mantiene sin alteraciones evidentes a este nivel de estudio. Microscopía de luz con contraste de fase. Análisis *in situ*. 400X

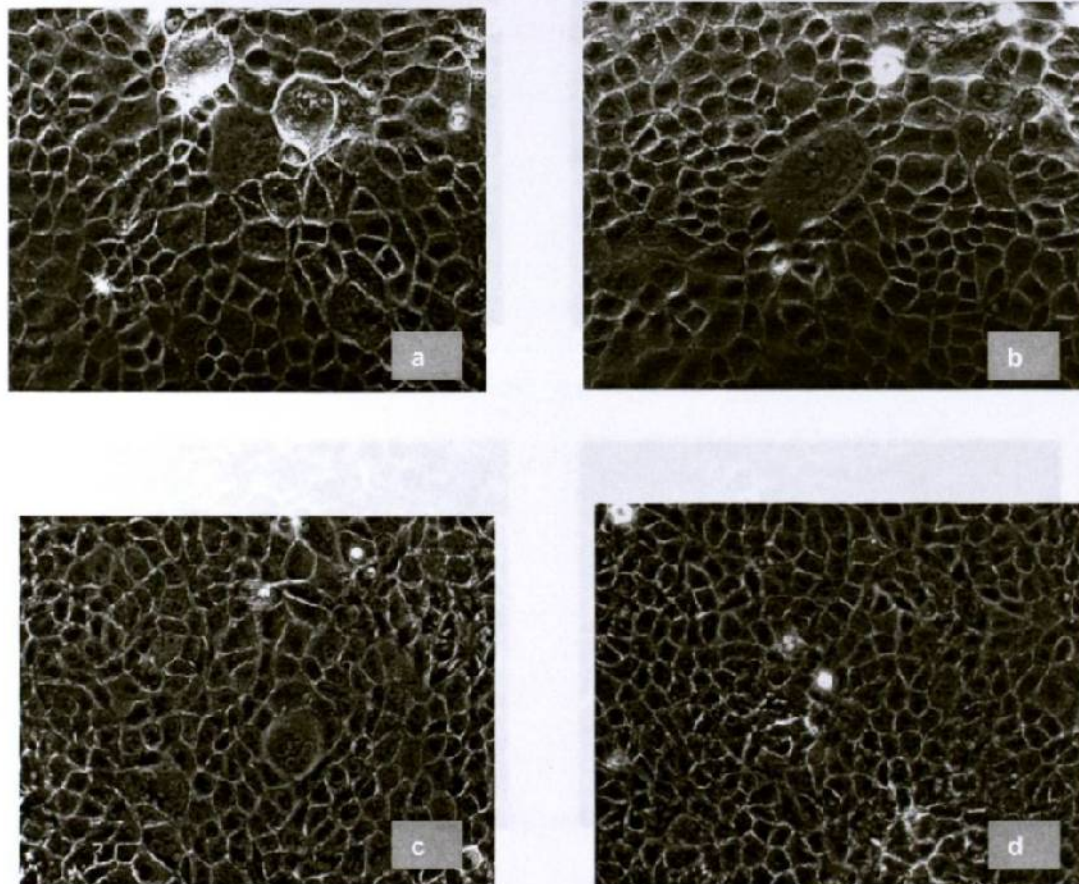


Figura 5. Células OK tratadas con $10 \mu\text{M}$ de HgCl_2 a distintos tiempos de exposición. a) 1 h, b) 3 h, c) 6 h y d) 9 h. Se observa que, de manera similar a lo encontrado con la dosis de $1 \mu\text{M}$ de HgCl_2 , no existen cambios morfológicos a todos los tiempos analizados con respecto a los cultivos control sin tratamiento. Microscopía de luz con contraste de fase. Análisis *in situ*. 400X.

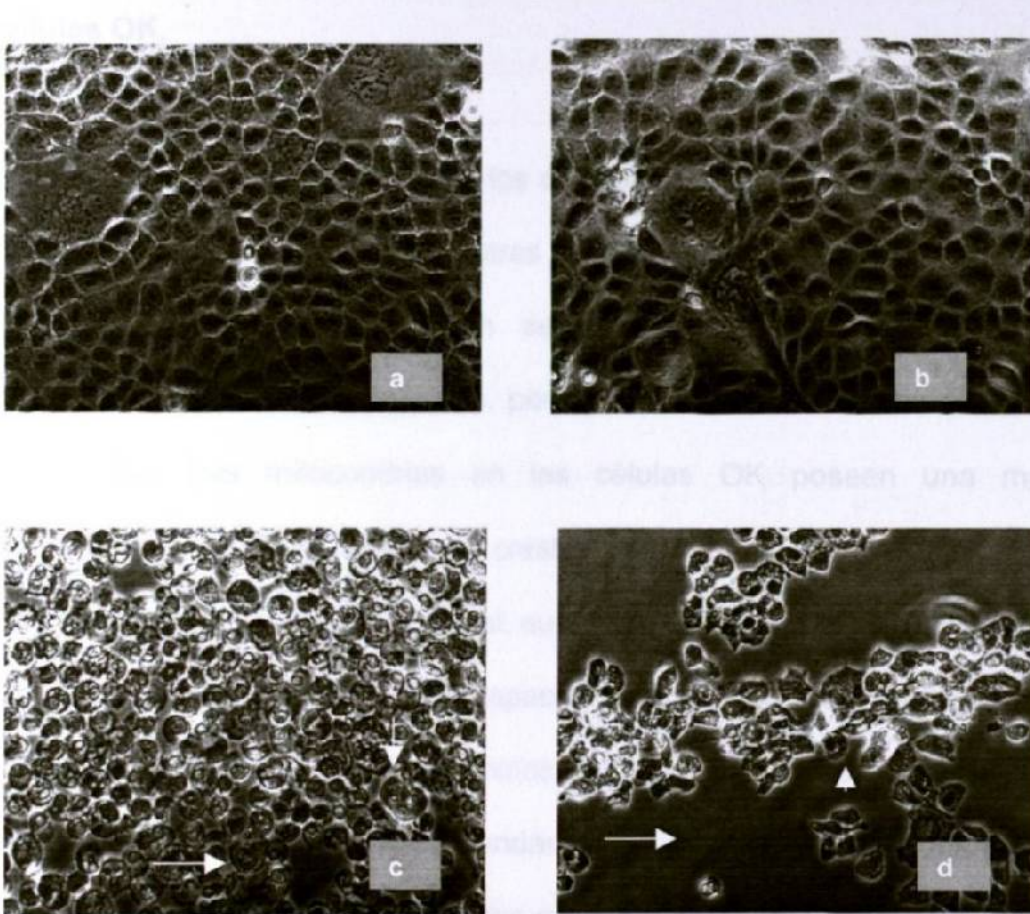
3.4 Análisis ultraestructural de los cambios inducidos por HgCl_2 en las

Figura 6. Células OK tratadas con $15 \mu\text{M}$ de HgCl_2 a distintos tiempos de incubación. **a) 1 h y b) 3 h**, en ambos tiempos se observa una monocapa confluyente sin cambios morfológicos importantes con respecto a los cultivos control sin tratamiento. **c) 6 h**, a este tiempo se observa que las células OK pierden su morfología característica y comienzan a redondearse (flechas). **d) 9 h**, se puede apreciar que se rompe la integridad de la monocapa celular (flecha) y las células muestran un grado de refringencia (cabeza de flecha) que no se observa a las dosis de 1 y $10 \mu\text{M}$ de mercurio. Microscopía de luz con contraste de fase. Análisis *in situ*. 400X.

3.4 Análisis ultraestructural de los cambios inducidos por HgCl₂ en las células OK.

Al microscopio electrónico, los cultivos control sin tratamiento muestran aspecto citoplásmico normal, mientras que el núcleo y los demás organelos no presentan alteraciones. También se observan abundantes mitocondrias, distribuidas por todo el citoplasma, pero preferentemente alrededor del núcleo (*figura 7a*). Las mitocondrias en las células OK poseen una marcada electrodensidad de la matriz y crestas muy alargadas que se disponen principalmente en forma longitudinal, aunque en algunas células se observan en un arreglo transversal. El espacio intracrístico es muy marcado. Ocasionalmente se presentan gránulos electrodensos en la matriz (*Figura 7b*, flechas). Se observan además abundantes ribosomas, libres y adheridos a las membranas del retículo endoplásmico rugoso (*Figura 7b*, flechas vacías).

Comparados con los cultivos control sin tratamiento, en los cultivos expuestos a las dosis de 1 y 10 μM de HgCl₂ no se observaron cambios morfológicos evidentes en todos los tiempos analizados. No se presentaron alteraciones con respecto a la electrodensidad citoplásmica, ni de la membrana celular, del núcleo y de los demás organelos celulares (*figuras 8 y 9*). En ocasiones se observaron mitocondrias con espacios vacíos en la matriz (*figura 9,a*), sin embargo, la mayoría de ellas tenían apariencia normal. Al analizar

estos grupos experimentales, la impresión general fue la de estar revisando muestras normales.

En las células incubadas con 15 μM de HgCl_2 , los cambios a 1 y 3 h de tratamiento son muy sutiles (*figura 10, a y b*), aunque se comienza a apreciar que la matriz mitocondrial posee mayor electrodensidad, mientras que el citoplasma muestra menor electrodensidad. Aparecen vacuolas citoplásmicas, inclusiones electrodensas y algunas figuras de mielina. Los cambios más dramáticos se observan a las 6 y 9 h de tratamiento con mercurio (*figura 10, c y d*). Además de los cambios descritos, se observan numerosas mitocondrias con forma de tiro al blanco, las cuales tienen disminuido el tamaño (*figura 10 c*) y mitocondrias con las crestas distorsionadas (*figura 10 d*). Los ribosomas son menos frecuentes y la pérdida de la electrodensidad citoplásmica se acentúa a las 9 h. Tanto a las 6 como a las 9 h no se observan los gránulos de la matriz mitocondrial. La membrana externa se separa de la interna ampliando considerablemente el espacio intermembranal, lo cual se aprecia con apariencia de "burbujas" (*figura 10 d, e, f*). También ocurre ruptura de la membrana mitocondrial externa, no obstante, las crestas alteradas morfológicamente tienden a mantenerse completas (*figuras 10 d, f*). Otras alteraciones ultraestructurales que se observaron a las 6 y 9 h de exposición a 15 μM de HgCl_2 consistieron en dispersión de los ribosomas por todo el citoplasma, desaparición completa de la estructura mitocondrial (*figura 11 a*), dilatación de

las membranas del retículo endoplásmico rugoso (*figura 11 b*) e invaginaciones de la membrana interna de la envoltura nuclear (*figuras 11 b y c*). Estas invaginaciones, cortadas en plano transversal, se pueden observar como pequeñas estructuras membranosas intranucleares de contenido ligeramente electrodensos y rodeadas por la cromatina (*figuras 11 c y d*). En muchas células, la cromatina presentó una agregación muy marcada (*figuras 11 c y d*). La presencia de cuerpos de inclusión citoplásmicos se hizo más evidente (*figura 11 e*). En algunas células se encontraron cuerpos apoptóticos, rodeados de doble membrana y que contenían mitocondrias en proceso de degeneración (*figura 11 f*).

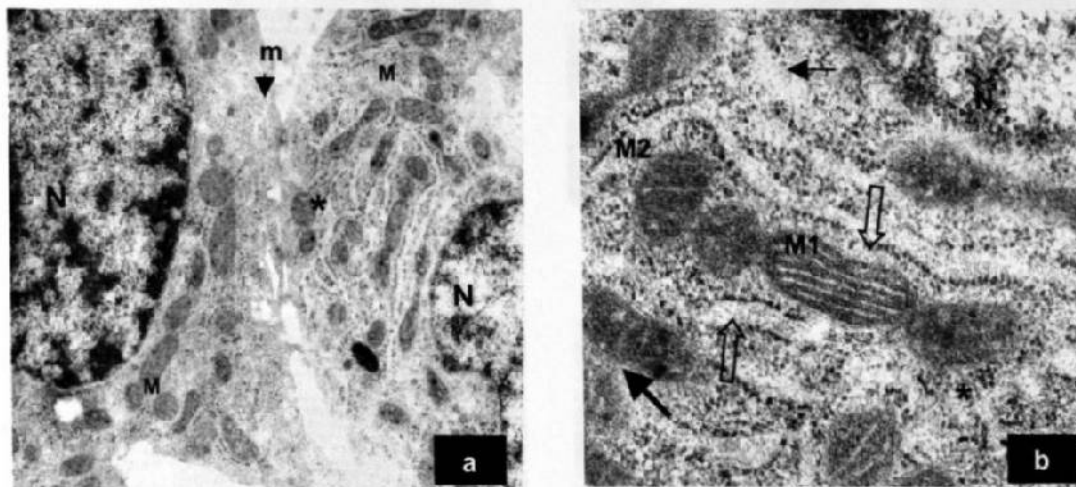


Figura 7. Células OK control, sin tratamiento. a) Se observa la ultraestructura normal. N=núcleo, M=mitocondrias, m=membrana plasmática (cabeza de flecha), ribosomas (*). 13,000X. b) Se observan cortes transversales de mitocondrias (M) con crestas longitudinales (M1), transversales (M2) y gránulos electrodensos en la matriz (flecha), nótese la marcada electrodensidad de la matriz mitocondrial. Perfiles de retículo endoplásmico rugoso (flechas vacías) y ribosomas libres (*). Microscopía electrónica de transmisión. Inclusión en resinas epóxicas. 60,000X.

OK expuestas a diferentes tiempos de exposición de 1 μM de HgCl_2 , a) 1 h, b) 2 h y c) 9 h. Se observan características ultraestructurales similares a las de las células control sin tratamiento. N=núcleo, M=mitocondrias, gránulos electrodensos en la matriz mitocondrial (flechas), perfiles de retículo endoplásmico rugoso (flechas vacías) y ribosomas libres (*). Microscopía electrónica de transmisión. Inclusión en resinas epóxicas. a, b y c, 28,000x; d, 60,000X.

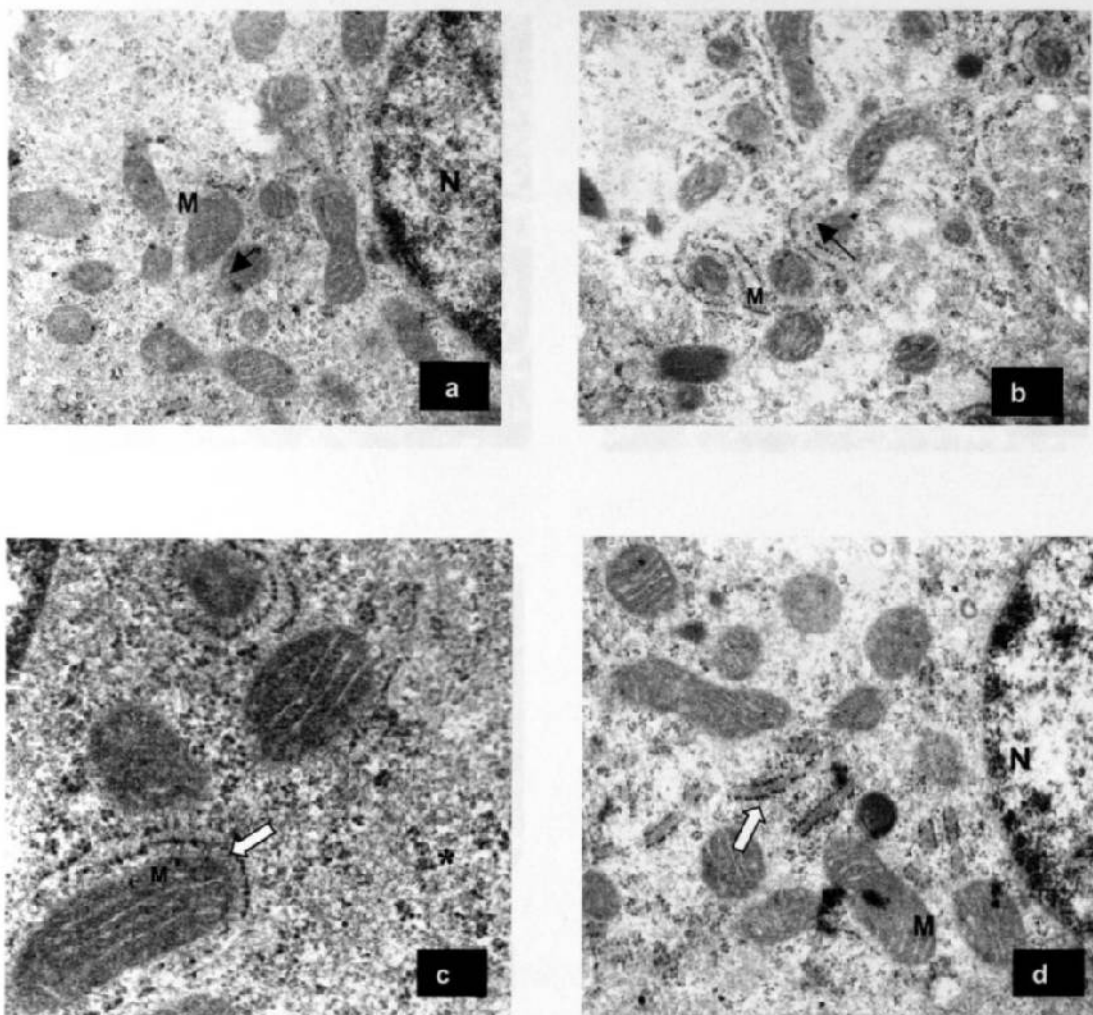


Figura 8. Células OK expuestas a diferentes tiempos de exposición de 1 μM de HgCl_2 . a) 1 h, b) 3 h, c) 6 h y d) 9 h. Se observan características ultraestructurales similares a las encontradas en las células control sin tratamiento. N=núcleo, M=mitocondrias, gránulos electrodensos en la matriz mitocondrial (flechas), perfiles de retículo endoplásmico rugoso (flechas vacías) y ribosomas libres (*). Microscopía electrónica de transmisión. Inclusión en resinas epóxicas. a, b y d, 28,000X; c, 60,000X.

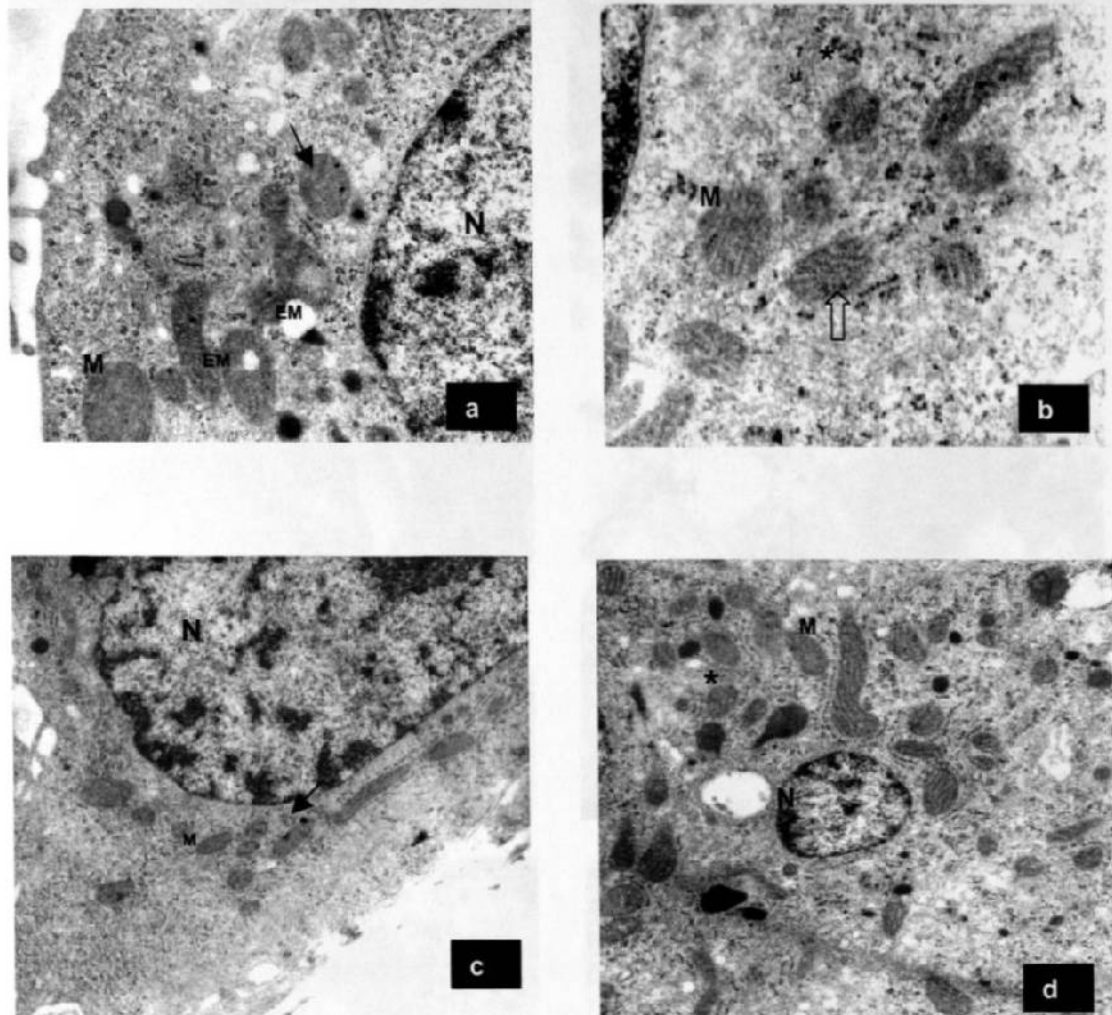


Figura 9. Células OK expuestas por diferentes tiempos a $10 \mu\text{M}$ de HgCl_2 . a) 1 h, b) 3 h, c) 6 h y d) 9 h. Comparados con los cultivos control (sin tratamiento) no existen cambios morfológicos notables. Ocasionalmente se observaron mitocondrias con espacios vacíos en la matriz (EM, figura a). N=núcleo, M=mitocondrias, perfiles de retículo endoplásmico rugoso (flechas vacías), ribosomas libres (*), gránulos electrodensos en la matriz mitocondrial (flechas). Microscopía electrónica de transmisión. Inclusión en resinas epóxicas. a y b, 20,000X; c y d, 15,000X.

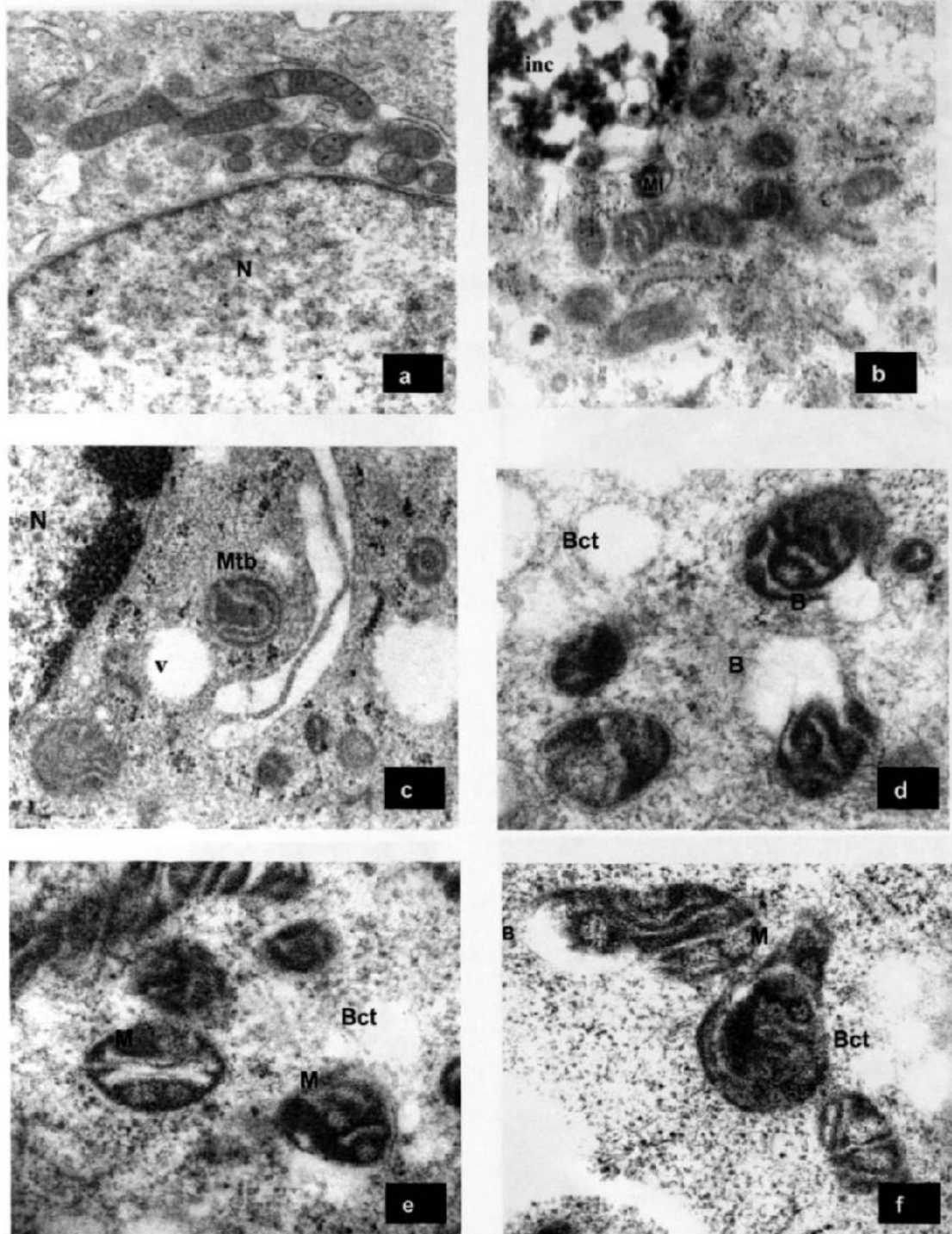


Figura 10. Células OK expuestas a $15 \mu\text{M}$ de HgCl_2 . a) 1 h, b) 3 h, se observan cambios sutiles en la ultraestructura mitocondrial y alteraciones citoplásmicas tales como presencia de inclusiones (inc) y figuras de mielina (Mi). c y d, 6 h, se observan mitocondrias con forma de tiro al blanco (Mtb) y mitocondrias cuyas membranas interna y externa se han separado, originando figuras con apariencia de "burbujas" (B), estas estructuras, cuando son cortadas en plano transversal (Bct), pueden ser confundidas con vacuolas sin serlo. e y f, 9 h, los cambios observados son similares a los que se presentan a las 6 h. Las mitocondrias en la mayoría de las células presentan morfología completamente alterada, con un incremento notable en la electrodensidad de la matriz. N=núcleo, M=mitocondrias, v=vacuolas. Microscopía electrónica de transmisión. Inclusión en resinas epóxicas. a y b, 12,000X; c, 60,000X; d, 80,000X; e, 150,000X; f, 125,000X).

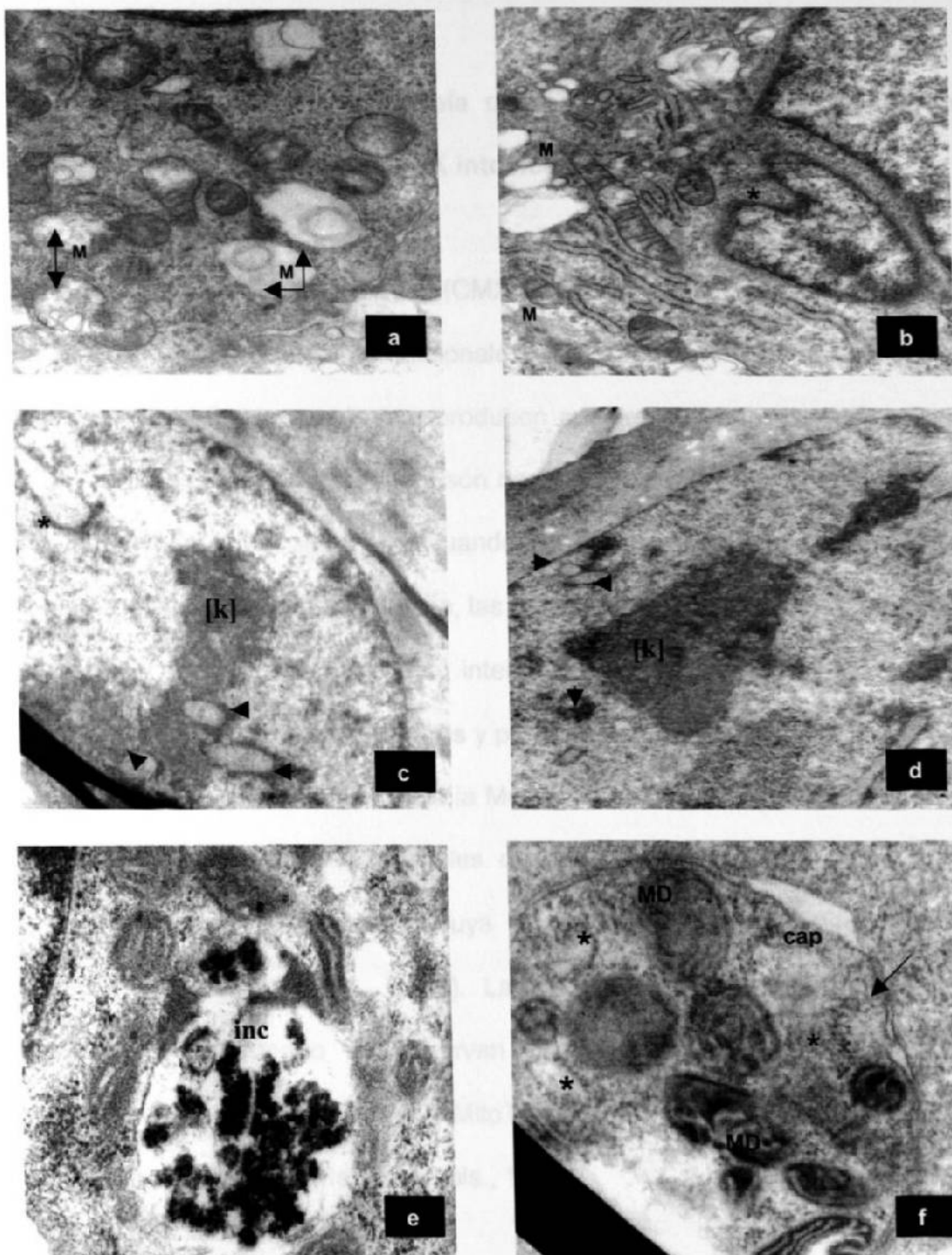


Figura 11. Alteraciones ultraestructurales inducidas por 15 μM de HgCl_2 en las células OK. a) Se observan alteraciones muy notables en la morfología de las mitocondrias (M). b) Se observan invaginaciones del núcleo celular (*) y mitocondrias alteradas morfológicamente (M). c y d). Detalle de alteraciones nucleares. Se observan invaginaciones de la membrana nuclear (*), reorganización de la cromatina [k] y pequeñas estructuras membranosas de contenido ligeramente electrodensos en la cromatina, rodeadas de la misma (cabezas de flecha). e) se observan inclusiones citoplasmáticas (inc). f) se observan cuerpos apoptóticos (cap), rodeados por doble membrana (flecha) y con mitocondrias (MD) y elementos del retículo endoplásmico rugoso (*) en proceso de degeneración. Microscopía electrónica de transmisión. Inclusión en resinas epóxicas. a y b, 12,000X; c y d, 7000X; e y f, 20,000X.

3.5 Análisis mediante microscopía confocal del patrón de tinción con MitoTracker Red de las células OK intoxicadas con HgCl₂.

Los colorantes MitoTracker (CMXH2 MRos) se utilizan cada vez con mayor frecuencia para análisis funcionales y de morfología de las mitocondrias. El patrón de la fluorescencia que producen sugiere que son específicos para dichos organelos. Estos colorantes son derivados de clorometil-rosaminas y se vuelven fluorescentes solamente cuando son oxidados dentro de las células. Debido a su potencial de membrana, las mitocondrias funcionales incorporan el colorante y éste se acumula en su interior, ahí, el grupo clorometil reacciona con grupos tiol presentes en péptidos y proteínas para formar un conjugado que puede ser fijado con aldehídos (De la Monte y Wands, 2001). La oxidación del MitoTracker Red por cultivos viables da origen a células que muestran un patrón "punteado" fluorescente, cuya distribución se ha asociado con las mitocondrias (Leira y cols., 2001). Las células se consideran MitoTracker positivas (MT⁺) cuando se observan puntos fluorescentes definidos que corresponden a las mitocondrias y MitoTracker negativas (MT⁻) si existe tinción citoplásmica difusa (Matylevitch y cols., 1998).

En este estudio, encontramos que las células OK presentan el mismo patrón de tinción con MitoTracker Red que ha sido descrito para otros tipos celulares. Como era de esperarse, la mayoría de las células en los cultivos

control (sin tratar con mercurio) fueron MT^+ (figura 12). Los hallazgos derivados de los estudios que realizamos utilizando microscopía confocal, sugieren que la intoxicación con mercurio a dosis bajas (1 y 10 μM) producen la misma tendencia que se observó con el ensayo de reducción del MTT, contenido intracelular de ATP, microscopía de luz y microscopía electrónica, es decir, a estas dosis, en todos los tiempos analizados, no se observan cambios en el patrón de tinción con respecto a los cultivos normales (figuras 13 y 14, a, b, c y d). A tiempos tempranos con la dosis de 15 μM de HgCl_2 (1 y 3 h), tampoco se aprecian cambios a este nivel (figura 15, a y b), sin embargo, luego de 6 h de tratamiento con el metal (figura 15, c), el patrón de tinción tiende a desaparecer y la fluorescencia comienza a verse difusa por el citoplasma, al mismo tiempo que la presencia de vacuolas citoplásmicas se vuelve más evidente. En las células expuestas a 15 μM de HgCl_2 durante 9 h (figura 15, d), la fluorescencia se difunde casi completamente y la vacuolización del citoplasma es mayor, sin embargo, aún es posible apreciar algunos puntos que brillan intensamente (figura 15, c y d). A este nivel de estudio se puede inferir, en general, que en las células expuestas a esta dosis y tiempos de incubación, el aspecto morfológico y la función mitocondrial y/o el potencial de membrana, se han alterado

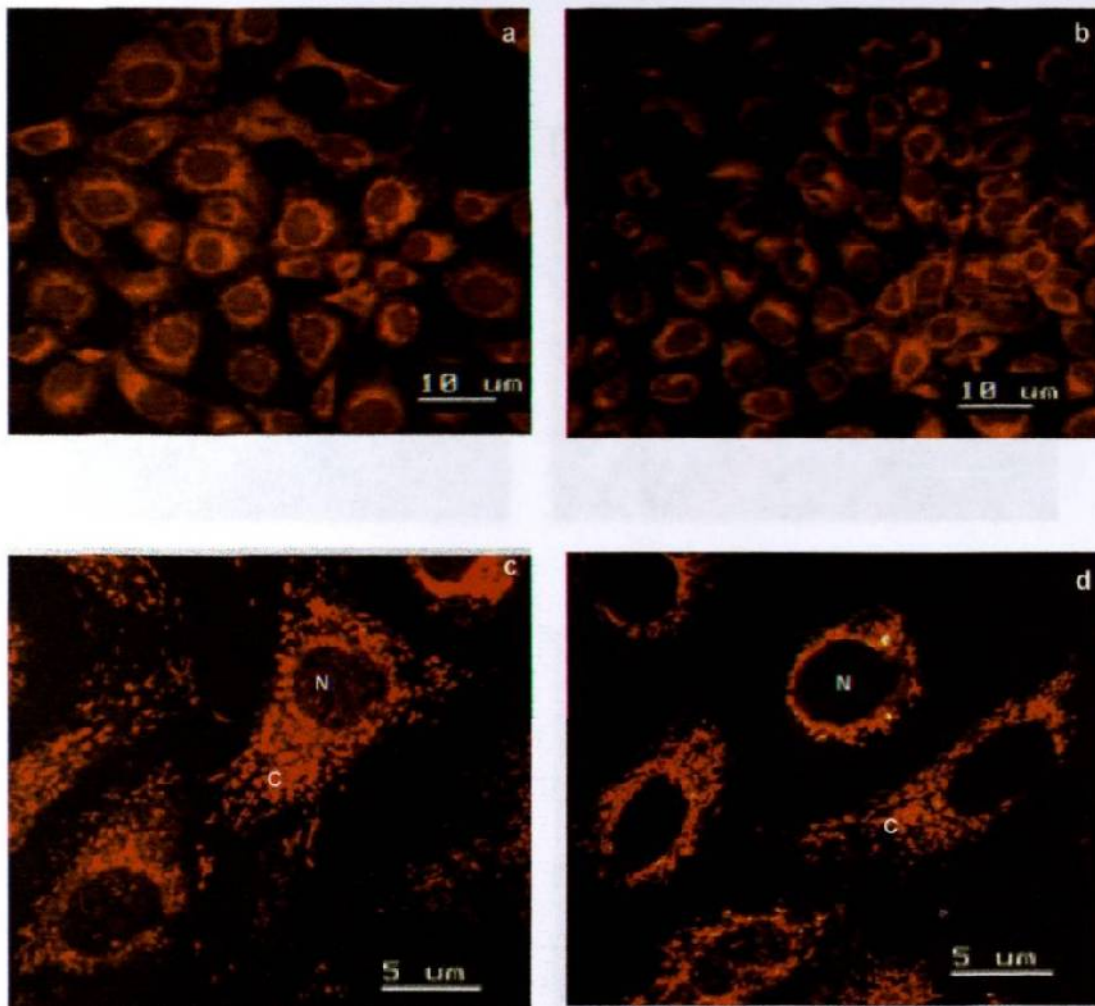


Figura 12. Células OK control sin tratamiento. a y b, se observa un aspecto panorámico del cultivo. Las células OK muestran un patrón "punteado fluorescente" al ser teñidas con el colorante MitoTracker Red, el cual se ha asociado con las mitocondrias y cuya intensidad se relaciona directamente del estado energético de las células. c y d, a mayor aumento, se observan detalles finos de la morfología de las células OK, así como el patrón punteado característico. Los puntos brillantes en el citoplasma corresponden a mitocondrias funcionales. N=núcleo, C=citoplasma. Microscopía confocal. Análisis *in situ*.

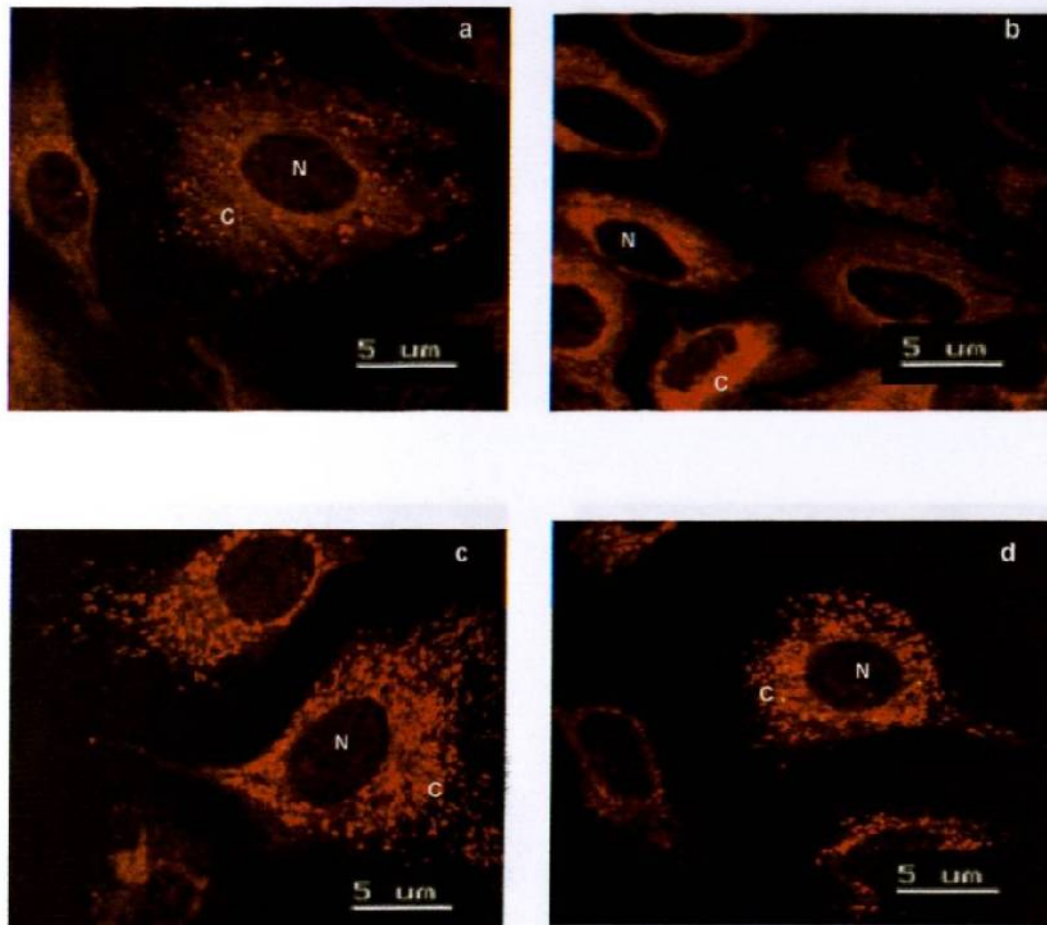


Figura 13. Células OK tratadas con $1\mu\text{M}$ de HgCl_2 a distintos tiempos de incubación. a) 1 h, b) 3 h, c) 6 h y d) 9 h. Se observa que comparado con los cultivos control sin tratamiento, no existen cambios en el patrón de tinción con el colorante MitoTracker Red en todos los tiempos analizados. N=núcleo, C=citoplasma. Microscopía confocal. Análisis *in situ*.

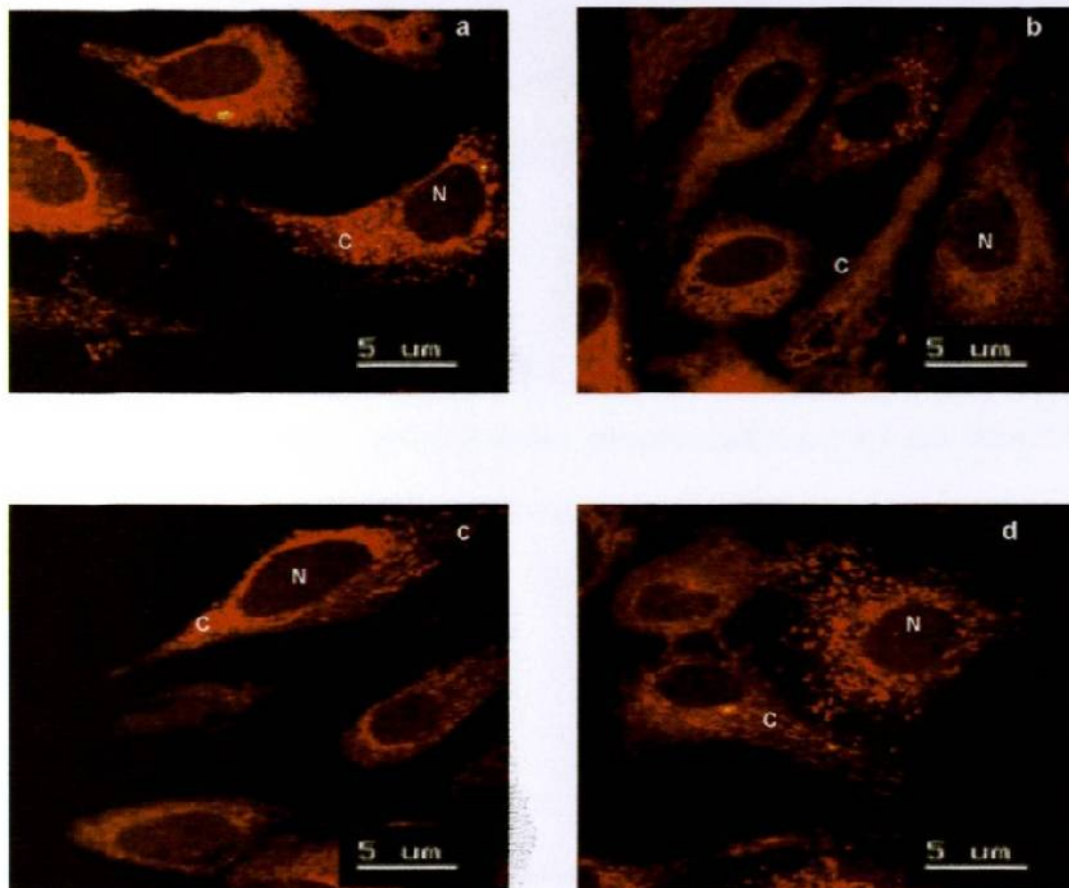


Figura 14. Células OK tratadas con 10 µM de HgCl₂ a distintos tiempos de incubación. a) 1 h, b) 3 h, c) 6 h y d) 9 h. Se observa que al igual que lo encontrado con la dosis de 1µM de HgCl₂, no se presentan cambios en el patrón de tinción con MitoTracker Red en todos los tiempos analizados. N=núcleo, C=citoplasma. Microscopía confocal. Análisis *in situ*.

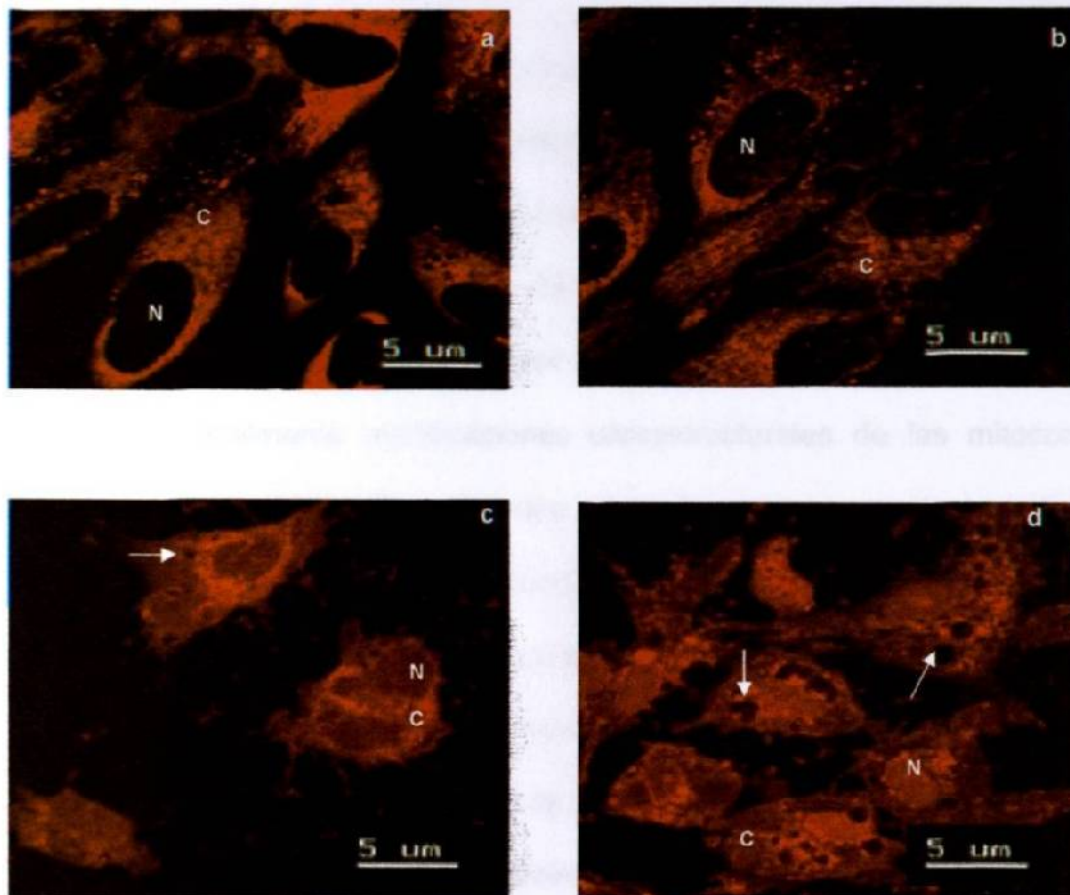


Figura 15. Células OK tratadas con $15 \mu\text{M}$ de HgCl_2 a distintos tiempos de incubación. a) 1 h y b) 3 h, a tiempos tempranos, no se aprecian cambios en el patrón de tinción con MitoTracker Red y por los tanto en el estado energético de las células OK. c) 6 h y d) 9 h, el patrón de tinción con MitoTracker Red se ha alterado drásticamente, la fluorescencia se dispersa por todo el citoplasma, incluyendo hacia el núcleo. El citoplasma muestra "agujeros" (flechas), los cuales son más numerosos a las 9 h. N=núcleo, C=citoplasma. Microscopía confocal. Análisis *in situ*.

CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN

Los metales pesados perturban a una gran variedad de órganos y sistemas. Los blancos de estos efectos tóxicos son enzimas y/o membranas u organelos membranosos, especialmente las mitocondrias. Es posible que algunos de los procesos bioquímicos que ocurren en las mitocondrias sean sensibles a los cambios inducidos por la generación de radicales libres, estrés oxidativo y finalmente modificaciones ultraestructurales de las mitocondrias (Bizarro y cols., 2003). Se sabe que parte del mecanismo de toxicidad del mercurio se relaciona con la inducción de estrés oxidativo, debido a que favorece la formación de peróxido de hidrógeno y por ende, de radicales libres (Lund y cols., 1993). En otros modelos de estudio, se ha establecido que el mercurio ocasiona despolarización de las mitocondrias y por lo tanto cambios en los procesos bioenergéticos (Weinberg y cols., 1982, Königsberg y cols., 2001), los cuales se relacionan con la integridad funcional de estos organelos.

Por los motivos anteriormente expuestos, nosotros estudiamos algunos aspectos funcionales de las mitocondrias utilizando dos ensayos ampliamente aceptados en estudios celulares *in vitro*. El primero de estos ensayos es el de la reducción de MTT (Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio); las sales de MTT se utilizan en ensayos de proliferación celular, pero también de

citotoxicidad. El anillo de tetrazolio de MTT es reducido a formazán (el cual es de color azul-púrpura), por el sistema succinato-tetrazolio reductasa, que se encuentra activo solamente en células viables. La intensidad de los cambios del color resultante se correlacionan directamente con actividad enzimática en células vivas. La capacidad de las células para reducir el MTT es un indicador de integridad y actividad mitocondrial, lo cual puede considerarse como un parámetro de viabilidad. En células en proceso activo de proliferación, la conversión de MTT aumenta, mientras que en células expuestas a un agente tóxico disminuye (Mosmann, 1983).

De acuerdo con nuestros resultados, en cultivos de células OK expuestos a dosis bajas de HgCl_2 (1 y 10 μM) se incrementa la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales arriba mencionadas, con respecto a las células control sin tratamiento. Este aumento fue de 4% y 6% para las concentraciones de 1 y 10 μM respectivamente (ver figura 1). La estimulación en la actividad celular en nuestro modelo de estudio se puede explicar sobre la base de una respuesta hormética. El concepto de hormesis se refiere al fenómeno asociado a la relación dosis-respuesta que se caracteriza por estimulación a dosis bajas e inhibición a dosis altas.

El efecto hormético se observa con frecuencia en experimentos adecuadamente diseñados y es de aplicación general, puesto que es

independiente del agente físico o químico, modelo biológico o tipo de medición final (Calabrese y Baldwin, 2003). En relación con los experimentos que nosotros realizamos, Damelin y cols., (2000) demostraron mediante ensayos de citotoxicidad y la prueba de reducción de MTT, que cultivos de células McCoy expuestas a concentraciones bajas de metales pesados (0.7 μM cloruro mercúrico, 1 μM de cloruro de cadmio y 3 μM de cloruro cúprico), mostraron aumento en la actividad celular, la cual coincidió con la producción de niveles elevados de Hsp 70 y metalotioneína. En un estudio posterior, Dameli y Alexander (2001) analizaron los eventos bioquímicos que se requieren para la inducción de la respuesta hormética. Según sus resultados, para que ocurra el fenómeno de hormesis existen dos premisas biológicas: la primera es un aumento de hasta un 15% en la captación de glucosa y la segunda, disminución de la respiración mitocondrial (hasta 23%).

Otros autores (Koutná y cols., 2003) utilizando también el ensayo de reducción de MTT, demostraron que existe aumento en la actividad y proliferación de células HeLa sometidas a radiaciones con rayos laser de baja potencia, ya sea en forma continua o en pulsos de radiación. Los trabajos mencionados permiten explicar los resultados no esperados, pero estadísticamente significativos, de un aumento en la actividad celular inducidos por dosis bajas de mercurio que encontramos en el presente trabajo, los cuales coinciden con una respuesta hormética de las células OK que han sido

sometidas a un estado de estrés y sugieren la posibilidad de que ocurra una respuesta de adaptación o de alerta fisiológica que permite a las células expuestas a dosis bajas de metales pesados contrarrestar los efectos nocivos del estrés oxidativo.

En cuanto al efecto tóxico inflingido por la dosis de 15 μM , medido por el ensayo de reducción de MTT, encontramos que ésta es la concentración inhibitoria de cloruro mercúrico para las células OK. La toxicidad de los metales pesados depende del tipo y la especie química del metal, y para cada una de ellas, dependiendo del modelo de estudio, la concentración tóxica es diferente (Klaassen, 1996). Por mencionar algunos ejemplos de dosis tóxicas en modelos celulares, Bucio y cols., (1995) demostraron que concentraciones de 50 y 100 μM de HgCl_2 son tóxicas para la línea celular hepática WRL-68; mientras que Suwalsky y cols., (2000) utilizaron dosis de hasta 500 μM de HgCl_2 para observar efectos dañinos en eritrocitos humanos. Por su parte, Araragi y cols., (2003) emplearon concentraciones en el rango de 1-10 mM del metal para inducir apoptosis en una línea de células de leucemia humana. Obviamente, la sensibilidad de las células OK en respuesta a dosis tóxicas de cloruro mercúrico, 15 μM en nuestro estudio, es característica de ellas.

La otra prueba funcional que utilizamos para analizar el efecto del HgCl_2 fue la medición del contenido endógeno de ATP en las células OK tratadas con

este metal. Los niveles intracelulares de ATP se utilizan como un indicador del estado energético, por lo tanto, son muy útiles en estudios metabólicos y fisiológicos (Stanley, 1986). Esto ha dado como resultado que la producción de ATP en células metabólicamente activas se considere como una alternativa tecnológica para cuantificar proliferación celular y para estudiar el efecto de sustancias que rompen el equilibrio energético de las células. Los niveles intracelulares de ATP son estrictamente regulados, puesto que son necesarios para la supervivencia de las células. Por lo tanto, las moléculas de ATP constituyen un criterio adicional a la capacidad de las mitocondrias de reducir el MTT para valorar la actividad metabólica de las células y especialmente de las mitocondrias en presencia y ausencia de diversos agentes tóxicos (Crouch y cols., 1993).

Algunos autores han demostrado que existe relación entre el inicio de la respuesta hacia el estrés celular con la disminución del contenido de ATP en la corteza renal. Es decir, la respuesta a un estímulo que produce estrés celular se inicia cuando la concentración de ATP disminuye por debajo del umbral de 50%. La disminución progresiva en los niveles de ATP da como resultado una respuesta más marcada con respecto a la sobre-expresión del factor de transcripción de proteínas de choque térmico (VanWhy y cols., 1994). En nuestro estudio, las células OK cultivadas con 1 y 10 μM de HgCl_2 durante 1, 3,

6 y 9 h mostraron, en promedio, un incremento moderado, pero significativo desde el punto de vista estadístico, en el contenido de ATP, el cual fue de 2% y 6% para las concentraciones de 1 y 10 μM de mercurio, respectivamente. Estos valores son similares a los incrementos porcentuales de actividad funcional estimada en función de la reducción de MTT. Sin embargo, aunque las curvas muestran tendencias parecidas, la cuantificación de ATP parece ser más sensible, puesto que el efecto en la disminución de este nucleótido a la dosis de 15 μM se refleja mejor desde tiempos tempranos (*ver figura 2*). Según Bravo y Ford (1990), el contenido intracelular de ATP en células en cultivo representa un marcador muy sensible de daño toxicológico; ellos analizaron la concentración de ATP en células LLC-PK1 y encontraron que se reduce a concentraciones de mercurio menores de las que causan daño ultraestructural a las mitocondrias. Sus hallazgos apoyan el hecho de que nosotros encontramos disminuido el contenido de ATP en tiempos tempranos de exposición a HgCl_2 , aún y cuando no fueron evidentes cambios muy importantes en la ultraestructura mitocondrial (*ver figuras 8 y 9*).

De la misma manera como se trató de explicar el efecto estimulante de la actividad mitocondrial inducido por mercurio a dosis bajas, tomando como base el fenómeno de hormesis, la producción de ATP en estas condiciones experimentales posiblemente constituye también, un estado fisiológico de adaptación celular para enfrentar los efectos nocivos de cualquier agente tóxico

para así poder llevar a cabo procesos de reparación celular o concluir la muerte celular, ya sea por necrosis o por apoptosis.

Por otro lado, ocurre una rápida disminución del ATP endógeno a consecuencia del daño celular inducido por cualquier agente que causa estrés oxidativo y/o agotamiento del oxígeno intracelular. Como se sabe, las mitocondrias representan la fuente generadora de ATP, pero también se sabe que el mercurio desacopla la fosforilación oxidativa y el transporte de electrones en la membrana mitocondrial interna. La marcada disminución de los niveles de ATP que encontramos durante este estudio en los cultivos de células OK tratadas con 15 μM de HgCl_2 , puede ser asociada con una interferencia en los mecanismos de respiración celular como ha sido demostrado por Weinberg y cols., (1982) y por Königsberg y cols., (2001) utilizando mitocondrias aisladas de riñón de ratas y hepatocitos humanos, respectivamente.

En cuanto a los hallazgos morfológicos, obtenidos mediante el análisis *in situ* con microscopía de luz y contraste de fase en los cultivos de células OK tratadas con 15 μM de HgCl_2 , estos se manifestaron únicamente a las 6 y 9 h de exposición. Los cambios más notables fueron (a) desprendimiento de la monocapa celular, (b) redondeamiento de las células y (c) aumento en el número de vacuolas citoplásmicas (ver figura 6). A pesar de que los estudios con microscopía de luz relacionados con el efecto de los metales pesados en

cultivo celular son escasos, alteraciones similares a este nivel fueron descritas por Zimmerhackl y cols., (1998) en las líneas de células LLC-PK1 y MDCK. Ellos encontraron que en presencia de dosis variables (0.1 a 50 μM) de cloruro de cadmio, se afectó la integridad de la monocapa celular debido a la pérdida de contactos intercelulares, lo que originó el redondeamiento de las células. Los autores relacionaron este hecho con la disminución de la resistencia eléctrica transepitelial y con interferencia con los complejos cadherina-catenina de la membrana plasmática. El cloruro mercúrico a dosis mayores de 15 μM también disminuye la resistencia eléctrica en monocapas de células OK en cultivo (Carranza, 1997). Los resultados que encontramos en este estudio, utilizando microscopía de luz, podrían explicarse tomando como base estas referencias.

En otro contexto de este trabajo, analizamos los cambios ultraestructurales dependientes de la dosis y tiempo de exposición a HgCl_2 en los cultivos de células OK como modelo de estudio. Las alteraciones ultraestructurales inducidas por mercurio que encontramos en el modelo empleado durante el presente trabajo, corresponden en gran parte con las descritas en modelos animales y en algunos modelos celulares con otros metales pesados (según se detalló en la sección 1.5 del capítulo 1). Comparado con los cultivos control sin tratamiento, en este trabajo encontramos que a las dosis de 1 y 10 μM de HgCl_2 , las células OK no exhiben cambios morfológicos en todos los tiempos estudiados (ver figuras 8 y 9); este hallazgo es similar a lo

reportado por Königsberg y cols., (2001) quienes intoxicaron hepatocitos humanos con dosis bajas de HgCl_2 durante 24 h.

Algo que es importante mencionar es el hecho de que existen muy pocos reportes acerca de los cambios ultraestructurales inducidos por mercurio, plomo, cadmio o arsénico en modelos celulares. Sobre todo, que son muy escasos los estudios de análisis ultraestructural y mercurio, en los cuales se utilicen líneas celulares de origen renal. Análisis detallados a este nivel, podrían ayudar a comprender parte del mecanismo involucrado en la fisiopatología del riñón en relación con estos agentes tóxicos.

Según Matylevitch y cols., (1998), la mayoría de las células que están en proceso de apoptosis, observadas con el microscopio electrónico, presentan mitocondrias de menor tamaño, aunque relativamente intactas, agregación de la cromatina, rompimiento de la envoltura nuclear y formación de pseudópodos en la membrana plasmática. De estas alteraciones que se mencionan, las que fueron visibles en nuestro estudio se apreciaron solamente en las células OK tratadas durante 6 y 9 h con la concentración de $15 \mu\text{M}$ de HgCl_2 . Nosotros pudimos observar que existe disminución del tamaño de las mitocondrias, como en el caso de las mitocondrias con forma de "tiro al blanco" (ver figura 10, c), o bien, como en el caso de las mitocondrias que muestran un elevado grado de condensación de la matriz (ver figuras 10, d y e). De acuerdo con esto,

consideramos que contrario a lo encontrado por Matylevitch, las mitocondrias de las células OK sí se encontraban alteradas desde el punto de vista morfológico.

Del trabajo publicado por Bizarro y cols., (2003), se puede suponer que el hinchamiento de las mitocondrias se debe en parte a la producción de radicales libres, los cuales aumentan la permeabilidad de las mitocondrias y permiten la entrada de iones calcio, este evento propicia el desacoplamiento de la respiración e hinchamiento osmótico, y da como resultado que se rompa la membrana mitocondrial interna y se inhiba la producción de energía.

En años anteriores, las microfotografías electrónicas de células en proceso de apoptosis se enfocaban principalmente a la presencia de alteraciones nucleares, tales como condensación y fragmentación de la cromatina, así como encogimiento de las células (Kerr y cols., 1972). Sin embargo, otros cambios ultraestructurales, tales como los que sufren las mitocondrias, fueron raramente discutidos y la morfología de estos organelos se interpretaba como "normal" o "ligeramente hinchada" (Majno y Joris, 1995; Krippner y cols., 1996). Contrastando fuertemente con esto, las alteraciones funcionales de las mitocondrias en células apoptóticas han sido claramente establecidas por varios autores (Petit y cols., 1995; Zamzami y cols., 1995).

En este orden de ideas, el trabajo publicado por Angermüller y cols., (1998) ayuda también a explicar las alteraciones sobre la morfología mitocondrial que encontramos durante el presente estudio, y al mismo tiempo, pone de manifiesto la importancia de los cambios ultraestructurales en estos organelos durante el proceso apoptótico. En el reporte que se cita, se utilizó factor de necrosis tumoral alfa para inducir apoptosis en ratones BALB/c previamente sensibilizados con galactosamina. Cinco horas después del tratamiento experimental, los hígados de los animales fueron procesados para diversos estudios, incluyendo microscopía electrónica de transmisión. Los autores demostraron que una característica muy notable que ocurre antes de que inicie el proceso apoptótico, aún antes de que se aprecie condensación de la cromatina, es la ruptura focal de la membrana mitocondrial externa y que la membrana interna se proyecta hacia afuera (a través de la abertura que se produce en la membrana externa), para formar una burbuja. No obstante, en la región de la mitocondria donde la membrana externa se encuentra intacta, las crestas se mantienen estrechamente empaquetadas y la burbuja puede ser percibida como una vesícula con muy pocas o con ningunas crestas. Los autores sugieren que éstas alteraciones representan lesiones pre-apoptóticas altamente específicas que se manifiestan con anterioridad a este proceso de muerte celular.

Con relación a este fenómeno morfológico, Mootha y cols., (2001) proponen un mecanismo apoptogénico adicional para explicar este tipo de alteraciones mitocondriales. En estudios realizados *in vivo*, la inyección de anticuerpos anti-Fas provocó un aumento en la permeabilidad mitocondrial con la subsecuente liberación de citocromo c. En cuanto al análisis ultraestructural, los autores utilizaron microscopía electrónica de transmisión de alto voltaje y reconstrucción tomográfica. Sus resultados demostraron la presencia de mitocondrias asimétricas con herniaciones de la matriz externa, similares a las descritas por Angermüller y cols., (1998), que originan lo que se observa como burbujas, así como desorganización de la membrana interna con pérdida parcial o completa de la estructura de las crestas. Aunque estos cambios se observaron desde tiempos tan tempranos como 90 min y 2 h, los autores no reseñan estas alteraciones como preámbulo del proceso apoptótico.

Las alteraciones mitocondriales que encontramos en las células OK incubadas con 15 μM de HgCl_2 (ver la figura 10, d y f) son similares a las descritas por Angermüller y cols., (1998) y por Mootha (2001), por lo que se podría suponer que, de acuerdo con el estudio más detallado de Angermüller (a nivel ultraestructural), en las células OK, el cloruro mercúrico induce lesiones pre-apoptóticas a tiempos tempranos después de la intoxicación con mercurio (6 h) y posiblemente liberación de citocromo c con activación del programa apoptótico.

También pudimos apreciar en nuestro estudio, bajo las condiciones que estamos describiendo (15 μM de HgCl_2 durante 6 y 9 h), que ocurre reorganización de la cromatina en agregados grandes (ver figura 11, c y d). Otro hallazgo interesante fue la presencia de pequeñas estructuras membranosas intranucleares de contenido ligeramente electrodenso, rodeadas por cromatina (ver figura 11, c y d, cabezas de flecha), las cuales dan la impresión de ser vesículas, sin serlo. Estas estructuras pueden corresponder a cortes transversales de las invaginaciones en la membrana interna de la envoltura nuclear (ver figura 11 b, c y d). Las invaginaciones posiblemente se extienden a distancias variables hacia el interior del núcleo celular. Con respecto a esto, se han descrito invaginaciones de la envoltura nuclear en procesos patológicos relacionados con cáncer (Stefaneanu y Tasca, 1979; Caruso, 1991; Kamei, 1994; Biernat, 2001); pero también en cultivos *in vitro* expuestos a cisplatino (Krajci y cols., 1999; Krajci y cols., 2000) y a cocaína (Johnson y Weissman, 1988). Las invaginaciones nucleares en células intoxicadas por mercurio permiten sugerir que si bien, las mitocondrias representan el organelo blanco del mercurio, posiblemente el núcleo es el segundo organelo en exhibir alteraciones morfológicas notables y aportan evidencia ultraestructural para la inclusión del mercurio como agente carcinogénico (actualmente se considera como potencialmente carcinogénico [ATSDR, 1999]).

Es posible que a mayores tiempos de exposición a mercurio, se puedan observar otros cambios en la ultraestructura celular, y que las invaginaciones que observamos en algunos núcleos de las células OK intoxicadas por mercurio, representan posiblemente el inicio de los cambios que darán como resultado la disgregación del nucleoplasma y finalmente, la disolución de la envoltura nuclear. El aspecto general de las células OK intoxicadas con 15 μM de HgCl_2 durante 6 y 9 h podría relacionarse con el de células que se encuentran en proceso de muerte celular.

La presencia de cuerpos de inclusión se ha descrito en casos de intoxicación por plomo, sin embargo, estos cuerpos son intranucleares (Walton 1973, Stiller y Friedrich 1983) y su patrón de agregación es diferente a los inducidos por mercurio en las células OK, los cuales se observaron en el citoplasma (*ver figura 11 e*). Otra de las alteraciones que encontramos fue la presencia de cuerpos apoptóticos que contenían mitocondrias en proceso de degeneración (*figura 11 f*), Desnoyers y Chang (1975) y Rao y cols., (1989) describieron cuerpos autofágicos en hepatocitos de rata intoxicados con metil mercurio y mencionan que contenían organelos degenerados o en proceso de degeneración, sin especificar que fueran mitocondrias.

Finalmente, estudiamos la interacción del mercurio en cultivos de células OK teñidas con MitoTracker Red, una sonda fluorescente cuyo uso se ha

extendido en investigación para monitorear el potencial de membrana mitocondrial. El razonamiento es que la sonda, que tiene carga positiva, se acumula en las mitocondrias energizadas en respuesta a cambios en el potencial de membrana. Después de esto, la sonda se une covalentemente a grupos SH presentes en proteínas mitocondriales por medio de una molécula clorometil. En este punto, la sonda no puede ser liberada, independientemente de que ocurra re-energización de las mitocondrias y por lo tanto se considera que representa de manera estable el potencial de membrana que existía en las mitocondrias antes de romper la integridad de la membrana. Se supone que las mitocondrias que experimentan liberación espontánea de la sonda han sido despolarizadas. (Macho y cols., 1996).

La despolarización de las mitocondrias puede ser ocasionada por inhibición de la respiración, aumento en la permeabilidad hacia protones (cationes divalentes), o ambos (Bernardi y cols., 1992), pero también por mercurio, como se ha descrito previamente (Weinberg y cols., 1982, Königsberg y cols., 2001).

En cuanto a los resultados que obtuvimos en cultivos control (no tratados con mercurio) y que fueron teñidos *in situ* con MitoTracker Red, observamos que en todos los casos, la fluorescencia se mostró con un patrón punteado que es típico de la distribución de las mitocondrias (ver figura 12) y que en los

cultivos expuestos a 1 y 10 μM de HgCl_2 durante 1, 3, 6 y 9 h, y 15 μM de HgCl_2 durante 1 y 3 h, el patrón de tinción no fue afectado (ver figuras 13, 14 y 15, a y b). Sin embargo, la exposición a dosis de 15 μM de HgCl_2 durante 6 y 9 h, alteró significativamente el patrón de tinción (ver figura 15 c y d). Debido a que el MitoTracker Red es útil para detectar cambios cualitativos en el potencial de membrana mitocondrial, los resultados que obtuvimos en este estudio, en los cuales se observan alteraciones en el patrón de tinción de las células OK tratadas con 15 μM de HgCl_2 durante 6 y 9 h, indican cambios importantes en el potencial de la membrana mitocondrial. Además, estos resultados también permiten apreciar otros cambios en el citoplasma de las células tratadas, lo que sugiere la posibilidad de que éstas se encontraban en proceso de muerte celular, probablemente por apoptosis, y que la inducción de este estado es dependiente de la dosis y del tiempo de exposición al HgCl_2 . El mecanismo de apoptosis inducido por mercurio ha sido sugerido por algunos investigadores (Shenker y cols., 2000; Königsberg y cols., 2001; Shenker y cols., 2002; Belletti y cols., 2002; Araragi y cols., 2003) y aunque nuestros estudios no fueron dirigidos expresamente al estudio de este fenómeno, en conjunto sugieren que también en las células OK intoxicadas con mercurio puede ocurrir este evento.

Como es bien sabido, la ejecución del programa apoptótico por proteínas mitocondriales implica la activación de diferentes mecanismos moleculares. Uno de los más estudiados es el fenómeno de transición en la

permeabilidad mitocondrial (PM), el cual implica un aumento repentino de la permeabilidad de la membrana interna hacia solutos. Generalmente se acepta que la PM es debida a la apertura de un canal iónico, conocido como poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTM), el cual es activado por iones calcio presentes en la matriz y posee sitios de regulación que pueden interactuar con mediadores de la muerte celular, y que su apertura *in vitro* se acompaña por despolarización e hinchamiento de la matriz mitocondrial (Petronilli y cols., 1994). Como se mencionó anteriormente, el colorante MitoTracker Red permite estudiar cambios cualitativos en el potencial de membrana mitocondrial, los cuales se asocian, entre otros factores, con la apertura del PTM. Por lo tanto, los resultados que obtuvimos del análisis al microscopio confocal sugieren que este evento ocurrió en las células OK expuestas a 15 μM de HgCl_2 durante 1, 3, 6 y 9 h, pero que el efecto más notable se presentó en los dos últimos tiempos analizados (*ver figura 15, c y d*).

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

- 5.1.** Se acepta la hipótesis de que las células OK constituyen un modelo adecuado para estudiar las alteraciones morfo-funcionales inducidas por cloruro mercúrico.
- 5.2.** Dosis de 1 y 10 μM de HgCl_2 estimulan la actividad del sistema deshidrogenasa-tetrazolio reductasa en las mitocondrias de células OK.
- 5.3** Dosis de 1 y 10 μM de HgCl_2 incrementan la producción endógena de ATP en las células OK.
- 5.4.** Comparado con los cultivos control sin tratamiento, las dosis de 1 y 10 μM de HgCl_2 no inducen cambios morfológicos a nivel de microscopía de luz con contraste de fase, ni de microscopía electrónica de transmisión.
- 5.5.** El análisis mediante microscopía confocal demuestra que las dosis de 1 y 10 μM de HgCl_2 no alteran el patrón de tinción con MitoTracker Red y por lo tanto, no rompen el potencial de membrana de las mitocondrias en cultivos de células OK.

5.6. La dosis de 15 μM de HgCl_2 es la dosis inhibitoria a la cual se observan efectos sobre la función mitocondrial, así como sobre la morfología y la ultraestructura de las células OK.

5.7 Perspectivas

El modelo celular que hemos caracterizado en el presente trabajo permitirá realizar análisis detallados desde el punto de vista morfológico y/o funcional, para estudiar los mecanismos de acción de otros compuestos sobre distintas líneas celulares; pero también podría ser muy útil para analizar el efecto de nuevos quelantes y sus mecanismos de transporte y de protección, para utilizarlos en el futuro como posibles agentes terapéuticos en casos de intoxicación por mercurio.

Otra perspectiva, tiene que ver con la observación de alteraciones nucleares inducidas por mercurio que no habían sido descritas previamente. Este hallazgo abre la posibilidad de realizar estudios con mercurio y otros metales pesados para caracterizar de manera más detallada la ultraestructura del núcleo en distintos modelos de estudio. Por otro lado, nuestros resultados propician que se estudie el fenómeno de apoptosis inducido por mercurio utilizando otras técnicas morfológicas y activación de caspasas, por ejemplo. No obstante, la perspectiva más interesante que se derivó de este trabajo se relaciona con el fenómeno de hormesis. Esto implica la reconsideración acerca de los niveles que hasta ahora se creían seguros para el organismo de muchos compuestos tóxicos, los cuales podrían dar lugar a patologías no asociadas con

ellos, o bien, poseer utilidad terapéutica. En el primer caso, por ejemplo, ya existe el debate acerca de si el plomo produce déficit intelectual en niños expuestos a niveles más bajos de lo que se consideraba normal para este metal, o bien, sobre la aparente contribución del mercurio orgánico con un aumento en el número de casos de autismo.

REFERENCIAS

Angermüller S, Künstle G, Tiegs G. (1998). Pre-apoptotic alterations in hepatocytes of TNF α -treated galactosamine-sensitized mice. *J Histochem Cytochem* 46:1175-1183.

Araragi S, Kondoh M, Kawase M, Saito S, Higashimoto M, Sato M. (2003). Mercuric chloride induces apoptosis via a mitochondrial-dependent pathway in human leukemia cells. *Toxicology* 184:1-9.

ATSDR. (1999). Toxicological profile for Mercury. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Atlanta, GA. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.

Belletti S, Orlandini G, Vettori, MV, Mutti A, Uggeri J, Scandroglio R, Alinovi R, Gatti R. (2002). Time course assessment of methyl mercury effects on C6 glioma cells: submicromolar concentrations induce oxidative DNA damage and apoptosis. *J Neurosc Res* 70:703-711.

Bernardi P, Vassanelli S, Veronese P, Colonna R, Szabó I, Zoratti M. (1992). Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations. *J Biol Chem* 267(5):2934-39.

Biernat W. (2001). Dysembryoplastic neuroectodermal tumor: An ultrastructural study of six cases. *Ultrastruct Pathol* 25:455-467.

Bizarro P, Acevedo S, Niño-Cabrera G, Mussali-Galante P, Pasos F, Avila-Costa MR, Fortoul TI. (2003). Ultrastructural modifications in the mitochondrion of mouse Sertoli cells after inhalation of lead, cadmium or lead-cadmium mixture. *Reprod Toxicol* 17:561-66.

Bohets HH, Van Thielen MN, Van der Biest I, Van Landeghem, D'Hase PC, Nouwen EJ, De Broe ME, Dierickx PJ. (1995). Cytotoxicity of mercury compounds in LLC-PK₁, MDCK and human proximal tubular cells. *Kidney Int* 47:395-403.

Bravo L, Ford SM. (1990). Cellular ATP levels and ultrastructural changes in mitochondria in LLC-PK₁ cells after HgCl₂ and CH₃HgOH insult. *Toxicologist* 10:103.

Bucio L, Souza A, Albores A, Sierra A, Chávez E, Cárabez A, Gutiérrez Ruiz MC. (1995). Cadmium and mercury toxicity in a human fetal hepatic cell line (WRL-68 cells). *Toxicology* 102:285-99.

Bulger RE. (1986). Renal damage caused by heavy metals. *Toxicol Pathol* 14:58-65.

Calabrese EJ, Baldwin LA. (2003). Hormesis: The dose-response revolution. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43:175-97.

Caruso RA. (1991). Intranuclear and intranucleolar tubular inclusions in gastric adenocarcinoma cells. *Ultrastruct Pathol* 15:139-48.

Carranza Rosales MP. (1997). Efecto del mercurio sobre el transporte transepitelial de seroalbúmina bovina en epitelios de células OK. Tesis de Maestría en Ciencias. Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. Monterrey, México.

Cerejido M, Ehrenfeld J, Fernández-Castelo S, Meza I. (1981). Fluxes, junctions and blisters in cultured monolayers of epithelioid cells (MDCK). En: Hormonal regulation of epithelial transport of ions and water. Scott WN y Goodman DBP editores. N Y Acad Sci. New York, USA.

Clarkson TW. (1972). The pharmacology of mercury compounds. *Annu Rev Pharmacol.* 1972; 12: 375-406.

Clarkson TW. (2002). The three modern faces of mercury. *Environ Health Perspect* 110(1):11-24.

Christensen MM, Ellermann-Eriksen S, Rungby J, Mogensen SC. (1993). Comparison of the interaction of methyl mercury and mercuric chloride with murine macrophages. *Arch Toxicol* 67(3):205-11.

Crouch SPM, Kozłowski R, Slater KJ, Fletcher J. (1993). The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J Immunol Methods* 160:81-8.

Damelin LH, Vokes S, Whittcutt JM, Damelin SB, Alexander JJ. (2000). Hormesis: a stress response in cells exposed to low levels of heavy metals. *Hum Exp Toxicol* 19:420-30.

Damelin LH, Alexander JJ. (2001). Metal-induced hormesis requires cPKC-dependent glucose transport and lowered respiration. *Hum Exp Toxicol* 20:347-58.

De la Monte S, Wands JR. (2001). Mitochondrial DNA damage and impaired mitochondrial function contribute to apoptosis of insulin-stimulated ethanol-exposed neuronal cells. *Alcohol Clin Exp Res* 25(6):898-906.

Desnoyers PA, Chang LW. (1975). Ultrastructural changes in rat hepatocytes following acute methyl mercury intoxication. *Environ Res* 9:224-39.

Duncan-Achanzar KB, Jones JT, Burke MF, Carter DE Laird HD 2nd. (1996). Inorganic mercury chloride-induced apoptosis in the cultured porcine renal cell line LLC-PK1. *J Pharmacol Exp Ther* 277(3):1726-32.

Eley BM. (1997). The future of dental amalgam: a review of the literature. Part 5: Mercury in urine, blood and body organs from amalgam fillings. *Br Dent J* 182:413-417.

Faith GC, Trump BF. (1965). An electron microscopic study of cellular death and necrosis in vitro of the proximal convoluted tubule of the rat kidney. *Am J Pathol* 46:4a.

Fowler BA. (1972). The morphologic effects of dieldrin and methyl mercuric chloride on *pars recta* segments of rat kidney proximal tubules. *Am J Pathol* 69(1):163-78.

Fowler BA, Woods JS. (1977). Ultrastructural and biochemical changes in renal mitochondria following chronic oral methyl mercury exposure: The relationship to renal function. *Exp Mol Pathol* 27:403-12.

Fowler BA. (1993). Mechanisms of kidney cell injury from metals. *Environ Health Perspect* 100:57-63.

Ganote CE, Reimer KA, Jennings RB. (1974). Acute mercuric chloride nephrotoxicity. An electron microscopic and metabolic study. *Lab Invest* 31(6):633-47.

Goyer RA, Krall R. (1969). Ultrastructural transformation in mitochondria isolated from kidneys of normal and lead-intoxicated rats. *J Cell Biol* 41:393-400.

Gritzka TL, Trump BF. (1968). Renal tubular lesions caused by mercuric chloride. Electron microscopic observations: Degeneration of the *pars recta*. *Am J Pathol* 52(6):1225-77.

Gstraunthaler G, Pfaller W, Kotanko P. (1983). Glutathione depletion and *in vitro* lipid peroxidation in mercury or maleate-induced acute renal failure. *Biochem Pharmacol* 32:2969-72.

Gullvag BM, Aagdal JP, Eskeland B. (1978). A fine structural study of liver (littoral) cells of methylmercury fed Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*). Acta Pharmacol Toxicol 43(2):93-98.

Handler JS. (1986). Studies of kidney cells in culture. Kidney Int. 30: 208-215.

Hughes WL. (1957). A physicochemical rationale for the biological activity of mercury and its compounds. Ann NY Acad Sci 65:454-60.

Hughes WW. (1996). Essentials of Environmental Toxicology. The Effects of environmentally hazardous substances on human health. Taylor & Francis publishers. Philadelphia, Pa. USA.

Humes HD, Weinberg JM. (1983). Cellular energetics in acute renal failure. En: Brenner BM, Lazarus JM, eds. Acute renal failure. Philadelphia, PA: W.B. Saunders, 47-98.

Johnson JE Jr., Weissman AD. (1988). Cocaine produces fine structural nuclear alterations in cultured neuroglioblastoma cells. Brain Res Bull 20:39-47.

Kamei H. (1994). Relationship of nuclear invaginations to perinuclear rings composed of intermediate filaments in MIA PaCa-2 and some other cells. *Cell Struct Funct* 19:123-32.

Klaassen CD. (1990). Heavy metals and heavy-metal antagonists. En: Gilman AC, Rall TW, Niew AS, Taylor P, editores: *The pharmacological basis of therapeutics*. 8th ed. Pergamon Press, New York, USA.

Klaassen CD. (1996). Casarett & Doull's. *Toxicology. The Basic Science of Poisons*. Chapter 23, Fifth Edition. Editor Curtis D Klaassen, Ed McGraw-Hill. New York, USA.

Königsberg M, López-Díazguerrero NE, Bucio L, Gutiérrez-Ruiz MC. (2001). Uncoupling effect of mercuric chloride on mitochondria isolated from an hepatic cell line. *J Applied Toxicology* 21:323-29.

Koutná M, Janisch R, Veselská R. (2003). Effects of low-power laser irradiation on cell proliferation. *Scripta Medica (BRNO)* 76:163-72.

Koyama H, Goodpasture C, MillerMM, Teplitz RL, Riggs AD (1978). Establishment and characterization of a cell line from the American opossum (*Didelphys virginiana*). *In Vitro* 14: 239-46.

Krajci D, Mares V, Lisa V. (1999). Ultrastructural response of the nuclear envelope (NE) of C6-glioma cells to cisplatin-induced apoptosis. *Gen Physiol Biophys* 18:59-63.

Krajci D, Mares V, Lisa V, Spanova A, Vorlicek J. (2000). Ultrastructure of nuclei of cisplatin-treated C6-glioma cells undergoing apoptosis. *Eur J Cell Biol* 79:365-76.

Krippner A, Matsuno-Yagi A, Gottlieb RA, Babior BM. (1996). Loss of function of cytochrome c in Jurkat cells undergoing Fas-mediated apoptosis. *Eur J Immunol* 25:3277-3284.

Kuwana T, Newmeyer DD. (2003). Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol.* 15(6):691-99.

Leira F, Vieites JM, Vieytes MR, Botana LM. (2001). Apoptotic events induced by the phosphatase inhibitor okadaic acid in normal human lung fibroblasts. *Toxicol in Vitro* 15:199-208.

Lund BO, Miller DM, Woods JS. (1991). Mercury-induced hydrogen peroxide production and lipid peroxidation *in vitro* in rat kidney mitochondria. *Biochem Pharmacol* 42, (Suppl): S181-S187.

Lund BO, Miller DM, Woods JS. (1993). Studies on Hg(II)-induced H₂O₂ formation and oxidative stress *in vivo* and *in vitro* in rat kidney mitochondria. *Biochem Pharmacol* 45(10):2017-24.

Macho A, Decaudin D, Castedo M, Hirsch T, Susin S, Zamzami N, Kroemer G. (1996). Chloromethyl-X-Rosamine is an aldehyde-fixable potential-sensitive fluorochrome for the detection of early apoptosis. *Cytometry* 25(4):333-40.

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

Malström K, Murrer H. (1986). Parathyroid hormone inhibits phosphate transport in OK cells but not in LLC-PK₁ and JTC-12. P3 cells. *Am J Physiol* 251:C23-C31.

Malmström K, Stange G, Murer H. (1987). Identification of proximal tubular transport functions in the established kidney cell line, OK. *Biochim. Biophys. Acta* 902: 269-77.

Malström K, Stange G, Murrer H. (1988). Intracellular cascades in the parathyroid-hormone-dependent regulation of Na⁺/phosphate cotransport in OK cells. *Biochem J* 251:207-213.

Matylevitch NP, Schuschereba ST, Mata JR, Gilligan GR, Lawlor DF, Goodwin CW, Bowman PD. (1998). Apoptosis and accidental cell death in cultured human keratinocytes after thermal injury. *Am J Pathol* 153(2):567-77.

Mootha VK, Wei MC, Buttle KF, Scorrano L, Panoutsakopoulou V, Mannella CA, Korsmeyer SJ. (2001). A reversible component of mitochondrial respiratory dysfunction in apoptosis can be rescued by exogenous cytochrome c. *EMBO J* 20:661-71.

Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application on proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Meth* 65:55-60.

Nakazawa N, Makino F, Okada S. (1975). Acute effects of mercury compounds on cultured mammalian cells. *Biochem Pharmacol* 24:489-93 .

Nicotera P, Leist M, Ferrando-may E. (1998). Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Toxicology Letters* 102-103:139-42.

Nieminem AL, Gores GJ, Dawson TL, Herman B, Lemasters JJ. (1990). Toxic injury from mercuric chloride in rat hepatocytes. *J Biol Chem* 265:2399-2408.

Passow H, Rothstein A, Clarkson T. (1961). The general pharmacology of the heavy metals. *Pharmacol Rev* 13:185-224.

Petit PX, Lecoœur H, Zorn E, Dauguet C, Mignotte B, Gougeon ML (1995). Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *J Cell Biol* 130:157-167.

Petronilli V, Nicolli A, Costantini P, Colonna R, Bernardi P. (1994). Regulation of the permeability transition pore, a voltage dependent mitochondrial channel inhibited by cyclosporin A. *Biochim Biophys Acta* 1187(2): 255-9.

Pfaller W, Gstraunthaler G, Willinger C. (1990). Morphology of renal tubular damage from nephrotoxins. *Toxicol Let* 53:39-43.

Pier SM. (1975). The role of heavy metals in human health. *Texas Rep Biol Med* 33(1):85-106.

Rao PV, Jordan SA, Bhatnagar MK. (1989). Ultrastructure of kidney of ducks exposed to methylmercury, lead and cadmium in combination. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 9(1): 19-44.

Rumbeiha W, Fitzgerald S, Braselton WE, Roth R, Kaneene J. (2000). Potentiation of mercury-induced nephrotoxicity by endotoxin in the Sprague-Dawley rat. *Toxicology* 149:75-87.

Rumbeiha WK, Fitzgerald SD, Braselton WE, Roth RA, Pestka JJ, Kaneene JB. (2000). Augmentation of mercury-induced nephrotoxicity by endotoxin in the mouse. *Toxicology* 151 (2000) 103–116.

Sahaphong S, Trump BF. (1971). Studies of cellular injury in isolated kidney tubules of the flounder. *Am J Pathol* 63:277-90.

Sekowski JW, Malkas LH, Wei Y, y cols.. (1997). Mercuric ion inhibits the activity and fidelity of the human cell DNA synthesesome. *Toxicol Appl Pharmacol* 145:268-76.

Shenker BJ, Guo TL, Shapiro IM. (2000). Mercury-induced apoptosis in human lymphoid cells: evidence that the apoptotic pathway is mercurial species dependent. *Environ Res Section A* 84: 89-99.

Shenker BJ, Pankoski L, Zekavat A, Shapiro IM. (2002). Mercury-induced apoptosis in human lymphocytes: caspase activation is linked to redox status. *Antiox and Redox Sign* 4:379-89.

Southard JH, Nitisewojo P. (1977). Loss of oxidative phosphorylation in mitochondria isolated from kidneys of mercury poisoned rats. *Byochem Biophys Res Commun* 52:921-27.

Squibb KS, Fowler BA. (1981). Relationship between metal toxicity to subcellular systems and the carcinogenic response. *Environ Health Perspec* 40:181-88.

Stacchiotti A, Borsani E, Rodella L, Rezzani R, Bianchi R. (2003). Dose-dependent mercuric chloride tubular injury in rat kidney. *Ultrastr Pathol* 27:253-59.

Stanley PE. (1986). Extraction of adenosine triphosphate from microbial and somatic cells. *Meth Enzimol* 113:14-22.

Stefaneanu L, Tasca C. (1979). An electron-microscopic study of human thyroid cancer. *Endocrinologie* 17:233-9.

Stiller D, Friedrich HJ. (1983). Ultrastructural and ultrahistochemical investigations of lead-induced intranuclear inclusion bodies in rat kidney. *Exp Path* 24:133-41.

Suwalski M, Ungerer B, Villena F, Cuevas F, Sotomayor C. (2000). HgCl₂ disrupts the structure of the human erythrocyte membrane and model phospholipid bilayers. *J Inorg Biochem* 81:267-73.

Tertelbaum AP, Strewler GJ. (1984). Parathyroid hormone receptors coupled to cyclic adenosine monophosphate formation in an established renal cell line. *Endocrinology* 114:980-985.

VanWhy SK, Mann AS, Thulin G, Zhu XH, Kashgarian M, Siegel NJ. (1994). Activation of heat-shock transcription factor by graded reductions in renal ATP *in vivo* in the rat. *J Clin Invest* 94:1518-23.

Walton JR. (1973). Intranuclear inclusion in the lead-poisoned cultured kidney cell. *J Path* 112:213-19.

Wang A, Pfeiffer CJ. (2001). Cytopathology induced by mercuric chloride and methyl mercury in cultured renal cells of the Atlantic spotted dolphin (*Stenella plagiodon*). *J Submicrosc Cytol Pathol* 33(1-2):7-16.

Weinberg JM, Harding PG, Humes HD. (1982). Mitochondrial bioenergetics during the initiation of mercuric chloride induced renal injury. II. Functional alterations of renal cortical mitochondria isolated after mercuric chloride treatment. *J Biological Chemistry* 257(1): 68-74.

WHO. (1991). Inorganic Mercury. Environmental Health Criteria 118, World Health Organization, Geneva.

Zalups RK, Lash LH. (1994). Advances in understanding the renal transport and toxicity of mercury. *J Toxicol Environ Health* 42:1-44.

Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Zanin C, Vayssiere JL, Petit PX, Kroemer G. (1995). Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *J Exp Med* 181:1661-1672.

Zimmerhackl LB, Momm F, Wiegele G, Brandis M. (1998). Cadmium is more toxic to LLC-PK1 cells than to MDCK cells acting on the cadherin-catenin complex. *Am J Physiol* 275 (Renal Physiol 44):F143-F153.

APÉNDICE

Composición y Preparación de las Soluciones

A-1 Técnicas de Cultivo Celular

Amortiguador de Dulbecco.

Se pesan 8 g de NaCl, 0.22 g de KCl, 1.13 g de Na₂HPO₄, 0.20 g de KH₂PO₄, 0.11 g de CaCl₂, 0.101 g de MgCl₂ y 0.9 g de Glucosa y se disuelven en 900 ml de agua desionizada, se ajusta el pH a 7.4 con NaOH 1 N y se afora a 1000 ml. Se esteriliza en autoclave a 121 °C por 15 min y se almacena a -20 °C.

Amortiguador de pH Isotónico de Tris 1 X (Salino TD).

Se pesan 8.0 g de NaCl, 3.75 g de KCl, 0.1 g de Na₂HPO₄ y 3.0 g de Trizma base. Se disuelven los componentes en 800 ml de agua desionizada y se dejan en agitación hasta que la solución adquiera la temperatura ambiente (aproximadamente 15 min). Se ajusta el pH a 7.4 con HCl 1 N y se afora a 1000 ml con agua desionizada. Se distribuye en frascos de vidrio, cada uno con 50 ml y se esterilizan en autoclave por 15 min a 121 °C. Se almacena a temperatura ambiente.

Amortiguador Salino de Fosfatos (PBS).

Se pesan 6.5 g de NaCl, 2.8 g de K_2HPO_4 y 0.4 g de KH_2PO_4 . Se disuelven estos componentes en 800 ml de agua desionizada, se ajusta el pH a 7.4 con NaOH 10 N y se afora a 1000 ml. Se distribuye en frascos de vidrio de 100 ml y se esteriliza en autoclave por 15 min a 121 °C. Se almacena a temperatura ambiente.

Mezcla de Antibióticos. [Penicilina (200,000 UI) y Estreptomicina (0.5 g)].

La mezcla se prepara a partir de frascos de Penicilina G-sódica cristalina de 1×10^6 unidades y sulfato de estreptomicina de 1 g. Se disuelven los componentes en forma individual en 2 ml de agua desionizada. Se toman 0.4 ml del frasco de penicilina y se mezclan con 1 ml de la solución de estreptomicina. La mezcla se afora a 100 ml con agua desionizada y se esteriliza por filtración. Se almacena en fracciones de 10 ml en tubos estériles con tapón de rosca a -20 °C.

Medio Esencial Mínimo de Eagle (MEM) Basal.

Para preparar el medio basal, el contenido de un sobre con 9.6 g (*Gibco BRL, Life Technologies, Inc. Grand Island N.Y.*) se disuelve en 800 ml de agua desionizada y se le añaden 2.2 g de $NaHCO_3$. Se ajusta el pH a 6.8 con HCl 1 N y se agrega 1 ml de una mezcla antibióticos (100 U/ml de penicilina y 100

µg/ml de estreptomycin). Se afora el volumen a 1000 ml y se esteriliza por filtración a través de membranas de nitrocelulosa con diámetro de poro de 0.22 µ. El medio de cultivo se divide en fracciones de 90 ml en frascos de vidrio estériles, con tapón de rosca, y se incuban a 37°C por 48 h en prueba de esterilidad. Los frascos conteniendo medio de cultivo se almacenan a 4°C hasta su uso.

Medio de Cultivo Completo.

Antes de utilizarse, el MEM basal debe ser suplementado con 10 % de suero fetal de bovino, estéril e inactivado por calor. Se incuban los frascos con el medio de cultivo a 37°C por 48 h en prueba de esterilidad para posteriormente almacenarse a 4°C, hasta su uso.

Rojo de Fenol. Solución al 1 %.

Se pesa 1 g de rojo de fenol y se disuelve en 20 ml de NaOH 1 N, se afora a 100 ml con agua desionizada. Se filtra a través de papel Whatman # 1 y después se esteriliza por filtración con membranas Millipore de 0.22 µm. Se almacena a -20 °C.

Tripsina. Concentrado al 2.5%.

Se pesan 2.5 g de tripsina 1:250 (*Difco*) y se disuelven en 100 ml de agua desionizada fría. Se deja a 4 °C en agitación lenta toda la noche, luego se filtra a través de papel Whatman # 1 utilizando un embudo Büchner y después se esteriliza por filtración a través de membranas Millipore de 0.22 µm. Se divide en fracciones de 10 ml y se almacena a -20 °C.

Tripsina 0.25% (1X).

En condiciones asépticas se mezclan las siguientes soluciones (previamente esterilizadas), en frascos con 50 ml de Salino TD 1X estéril: 5 ml de la solución de tripsina al 2.5%, 0.3 ml de rojo de fenol al 1%, y 0.5 ml de la solución de penicilina-estreptomicina (100 X). Se distribuye en alícuotas de 10 ml en tubos de vidrio con tapón de rosca, estériles. Se toman al azar menos tres tubos del lote recién preparado y se incuban a 36 °C por 48 h para comprobar su esterilidad. Se almacena a -20°C.

A-2 Técnicas Morfológicas

Acetato de Uranilo al 5%.

Se pesan 2.5 g de acetato de uranilo y se disuelven en 50 ml de etanol al 50%.

La solución se almacena a 4 °C protegida de la luz.

Amortiguador de Cacodilatos 0.2 M pH 7.4.

Se prepara una solución 0.2 M de cacodilato de sodio pesando 42.8 g de $\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, esta cantidad se disuelve en 1000 ml de agua. La solución de trabajo se prepara mezclando 50 ml de la solución de cacodilato de sodio 0.2 M con 2.7 ml de HCl 0.2 M. Se ajusta el pH de la solución a 7.4 y se almacena a 4 °C en frascos de vidrio.

Citrato de Plomo al 0.4%.

Se pesan 0.2 g de citrato de plomo y se disuelven en 50 ml de agua MilliQ, se añaden 2 gotas de NaOH 10 N para evitar que se precipite y se almacena a 4 °C protegido de la luz.

Contrastación de Cortes Ultrafinos

En una caja de petri limpia se coloca un papel parafilm con unas gotas de acetato de uranilo al 5%, sobre las gotas se colocan las rejillas con los cortes, procurando que éstos queden hacia abajo para que tengan contacto directo con esta solución y se incuban a temperatura ambiente por 5 min. Las rejillas se

lavan suavemente con agua ultrapura y se colocan sobre una gota de citrato de plomo al 0.4%, de la misma manera que para el acetato de uranilo. Se incuban 5 min a temperatura ambiente, posteriormente se lavan 1 min con agua ultrapura y se dejan secar sobre un papel filtro en una caja de petri cerrada.

Formaldehído al 4%.

Se toman 10 ml de formaldehído al 16% contenidos en una ampollita de vidrio y se complementan con 30 ml de amortiguador de Dulbecco. La solución se almacena a 4 °C.

Glutaraldehído al 2.5 %.

Se toman 10 ml de glutaraldehído concentrado (25%) y se aforan a 100 ml con amortiguador de cacodilatos 0.2 M pH 7.4. La preparación de este reactivo debe llevarse a cabo en la campana de extracción para evitar los vapores tóxicos que se producen.

Soporte para Rejillas

Se calienta agua a 40 °C en una caja de petri y se le deja caer una gota de colodión. Una vez que se forma una película sobre el agua, se colocan las rejillas con el lado opaco hacia abajo. Para sacar las rejillas se coloca papel parafilm sobre toda la superficie y se levanta, las rejillas se pegan al papel. Se dejan secar a temperatura ambiente y se pueden utilizar después de 24 h.

Tetraóxido de Osmio al 2%.

Se prepara en campana de extracción. El reactivo comercial se obtiene en cápsulas que contienen 1 g. Para evitar contaminar el reactivo, la cápsula que lo contiene debe ser lavada en su exterior utilizando detergente neutro (extrán) y posteriormente se enjuaga 5-10 veces con agua desionizada. Se introduce la cápsula en un frasco ámbar de 100 ml de capacidad que ha sido rigurosamente lavado, y se agita fuertemente para romper la cápsula en el interior del frasco, después se agregan 50 ml de buffer de cacodilatos 0.2 M pH 7.4 y se almacena a 4 °C.

A-3 Pruebas Funcionales

Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio. MTT (2 mg/ml).

Se pesan 0.02 g de MTT y se disuelven en 10 ml de SSBH. Se esteriliza por filtración con membranas de 0.22 μm de diámetro de poro y se coloca en un tubo de vidrio estéril. Se almacena a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, cubierto con papel de aluminio para protegerlo de la oxidación catalizada por la luz.

Isopropanol Acido.

Se mezclan 160 μl de HCl 12.5 M con 49.84 ml de isopropanol. Se almacena a temperatura ambiente.

Metasulfato de Fenazina. PMS (3.5 mg/ml).

Se pesan 0.035 g de metasulfato de fenazina y se disuelven en 10 ml de agua desionizada. Se esteriliza por filtración con filtros de 0.22 μm y se coloca en un tubo de vidrio estéril. Se almacena a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Mitotracker® Red.

Se disuelve el polvo liofilizado (50 μg) contenido en una ampolleta en 1 ml de DMSO. A partir de esta solución, se preparan diluciones en medio de cultivo para ser empleadas en los ensayos de análisis al microscopio confocal. La solución concentrada se almacena a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ protegida de la luz.

Solución Salina Balanceada de Hanks (SSBH 1X).

Se pesan 0.07 g de CaCl_2 , 1.0 g de Glucosa, 7.2 g de NaCl , 0.4 g de KCl , 0.2 g de MgSO_4 y 0.12 g de Trizma base. Se disuelven los componentes en 800 ml de agua desionizada, se ajusta el pH a 7.0 con HCl 5 N y se afora a 1000 ml. Posteriormente se ajusta la osmolaridad a 300 ± 10 mOsm con NaCl . Se esteriliza por filtración y se distribuye en fracciones de 100 ml en frascos de vidrio, estériles con tapón de rosca. Se almacena a -20°C .

Soluciones de Cloruro Mercúrico (HgCl_2).

Se pesan 0.02715 g de HgCl_2 y se disuelven en 100 ml de agua Milli Q para obtener una solución concentrada (1 mM), la cual se esteriliza por filtración y se almacena a 4°C . A partir de esta solución, se preparan las concentraciones de trabajo (1, 10 y 15 μM) disolviendo el volumen adecuado en medio de cultivo.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

María del Pilar Carranza Rosales
Candidata para el Grado de
Doctora en Ciencias con Especialidad en Morfología

Título de la Tesis: Caracterización del daño morfológico y funcional en células OK como modelo de intoxicación por mercurio.

Campo de Estudio: Morfología

Biografía:

Datos Personales: Nacida en Gómez Palacio, Durango, el 29 de noviembre de 1960. Hija de la Sra. Ana María Rosales Moya y del Señor Víctor Carranza Fernández.

Escolaridad: 1980 a 1985, Química Bacterióloga Parasitóloga por la Facultad de Ciencias Biológicas (U.A.N.L.); 1994 a 1997, Maestría en Ciencias con Especialidad en Biología Celular por la Facultad de Ciencias Biológicas (U.A.N.L.).

Experiencia Profesional: Instructora de los Laboratorios de Fisiología y Biología Celular en las licenciaturas en Biología y Químico Bacteriólogo Parasitólogo. Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. (Abril 1984-Octubre 1986); Maestra del Curso de Fisiología. Escuela de Graduados de la Escuela Normal Superior de Nuevo León (Febrero-Mayo 1985); Responsable del Control de Calidad y Producción en Botanas Leo (Enero 1987-Octubre 1988); Responsable del Control de Calidad y Producción en Naranjadas la Huerta (Octubre 1988-Septiembre 1989); Profesional no docente en la Unidad de Hígado. Facultad de Medicina, U.A.N.L. (Octubre 1989-Septiembre 1991); Química. Laboratorio del Hospital Infantil-SSA (Octubre 1990-Enero 1992); Química. Instituto Mexicano del Seguro Social (Diciembre 1991-Enero 1993); Becaria de Investigación, Centro de investigación Biomédica del Noreste-IMSS (Marzo 1993-Septiembre 1994); Técnica en Investigación. Centro de investigación Biomédica del Noreste-IMSS (Septiembre 1994-Junio 1997); Maestra Colaboradora de los cursos de Citogenética y de Estructura y Función de Membranas en la Maestría en Ciencias Biológicas especialidad de Genética. División de Estudios de Postgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas-UANL (Septiembre-1997-Febrero-1998); Maestra Colaboradora del curso de Biología Celular de la Maestría en Ciencias Veterinarias. División de Estudios de Postgrado de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UANL (Febrero 1997-Enero 2000); Representante Médico para Laboratorios Byk Gulden (Febrero 1996-Octubre 1998); Investigadora Asociada A. Centro de Investigación Biomédica del Noreste-IMSS (Junio 1997-marzo 2003); Investigadora Asociada B. Centro de Investigación Biomédica del Noreste-IMSS (Marzo 2003 a la fecha; Colaboradora del Cuerpo Académico del Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Biológicas-UANL (Septiembre 2003 a la fecha). Nueve artículos Científicos, 5 de ellos indexados en MedLine.



