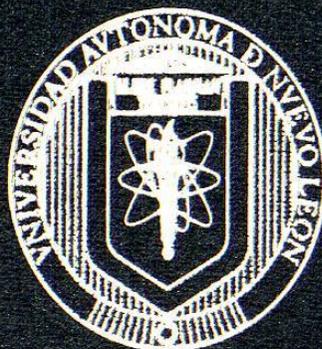


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



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

POR

ING. BIOQ. ADOLFO SOTO DOMINGUEZ

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

Agosto 2005

AGOSTO

ING. BILLO DOMINGUEZ

TM
QH603
.P47
S67
2005
c.1

2005



1080127598

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

ESCUELA DE CIENCIAS DE LA SALUD

FACULTAD DE MEDICINA



IDENTIFICACION MORFOLOGICA Y BIOQUIMICA DE LA
FIBROSIS DE ALCOHOL EN VARIOS ORGANOS
DE LA RATON BLANCO CON UNA DOSE TOXICA
DE TETRACICLINA AL.

POR

ING. BIOL. ADOLFO SOTO DOMINGUEZ

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

Agosto 2005

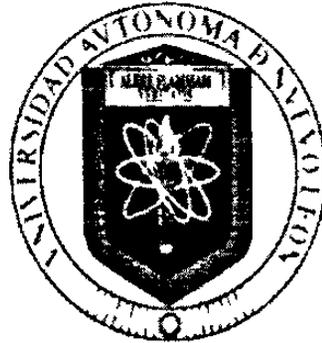


TM
QH603
.P47
S67
2005



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



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

POR

ING. BIOQ. ADOLFO SOTO DOMÍNGUEZ.

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

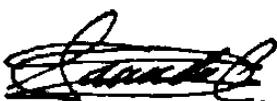
Agosto 2005

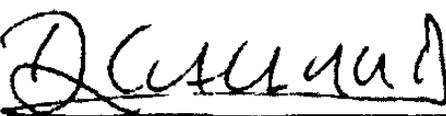
**EVALUACIÓN MORFOLÓGICA Y BIOQUÍMICA DE LA
PRESENCIA DE APOPTOSIS EN VARIOS ÓRGANOS DEL RATÓN
TRATADO CON UNA DOSIS TÓXICA DE PEROXISOMICINA A1**

Aprobación de la Tesis:


DR. JULIO SEPULVEDA SAAVEDRA
Director de Tesis


DRA. RAQUEL GUADALUPE BALLESTEROS ELIZONDO
Comisión de Tesis


DRA. ODILA SAUCEDO CARDENAS
Comisión de Tesis


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

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

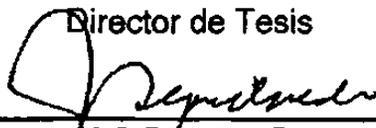
Presentado por:

Ing. Bioq. Adolfo Soto Domínguez.

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

FIRMAS

Director de Tesis



M.C.P. y Ph. D.

Julio Sepúlveda Saavedra

Co-Directora de Tesis



Dra. Odila Saucedo Cárdenas.

Co-Directora de Tesis



**Dra. Raquel Guadalupe
Ballesteros Elizondo.**

DEDICATORIA

Para mis padres:

Sr. Elías Soto Sánchez y

Sra. Teresa Domínguez Crispín

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

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

Éxodo 20:12

AGRADECIMIENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

| | |
|---|------------------------|
| 2.3.4.1. Geles de Agarosa..... | |
| 2.3.4.2. Espectrofotometría..... | |
| 2.3.5. Análisis Estadístico..... | 25 |
| 3. RESULTADOS..... | |
| 3.1. Análisis Morfológico..... | 26 |
| 3.1.1. HIGADO..... | |
| 3.1.1.1. Microscopia de luz..... | |
| 3.1.1.1.1. Grupos control sin tratamiento y control vehículo... | |
| 3.1.1.1.2. Grupo intoxicado con PA1, 4 hrs de exposición..... | 27 |
| 3.1.1.1.3. Grupo intoxicado con PA1, 8 hrs de exposición..... | |
| 3.1.1.1.4. Grupo intoxicado con PA1, 12 hrs de exposición.... | 28 |
| 3.1.1.1.5. Grupo intoxicado con PA1, 24 hrs de exposición... | |
| 3.1.1.2. Inmunohistoquímica para el análisis de la fragmentación de la cromatina utilizando TUNEL..... | 29 |
| 3.1.1.2.1. Controles para la técnica de TUNEL..... | |
| 3.1.1.2.2. Grupos control sin tratamiento y control vehículo... | |
| 3.1.1.2.3. Grupos intoxicados con PA1, 4, 8, 12 y 24 hrs de exposición..... | 30 31 |
| 3.1.1.3. Microscopia Electrónica de Transmisión..... | |
| 3.1.1.3.1. Grupos control sin tratamiento y control vehículo... | |
| 3.1.1.3.2. Grupo intoxicado con PA1, 4 hrs de exposición..... | 32 |
| 3.1.1.3.3. Grupo intoxicado con PA1, 24 hrs de exposición.... | 34 |
| 3.1.2. RIÑÓN..... | |
| 3.1.2.1. Microscopia de luz..... | |
| 3.1.2.1.1. Grupos control sin tratamiento y control vehículo... | 35 |
| 3.1.2.1.2. Grupo intoxicado con PA1, 4 hrs de exposición..... | |
| 3.1.2.1.3. Grupo intoxicado con PA1, 8 hrs de exposición..... | 36 |
| 3.1.2.1.4. Grupo intoxicado con PA1, 12 hrs de exposición.... | |
| 3.1.2.1.5. Grupo intoxicado con PA1, 24 hrs de exposición... | |
| 3.1.2.2. Inmunohistoquímica para el analisis de la fragmentación de la cromatina utilizando TUNEL..... | 38 |

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

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

LISTA DE FIGURAS

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

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

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

LISTA DE TABLAS

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

LISTA DE GRÁFICAS

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

APÉNDICE A

TÉCNICAS Y MÉTODOS.

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

APÉNDICE B

SOLUCIONES

B.1 ANALISIS MORFOLÓGICO.

| | |
|---|----|
| B.1.1 Formaldehído 4 %..... | 74 |
| B. 1.2 PBS 10 X..... | |
| B. 1.3 Fijador de Karnovsky- Ito..... | |
| B. 1.4 Glutaraldehído 2.5 %..... | 75 |
| B. 1.5 Buffer de Cacodilatos 0.1 M pH 7.4..... | |
| B. 1.6 Tetraóxido de osmio 2 %..... | |
| B 1.7 Nitrato de uranilo acuoso 1% | |
| B. 1.8 Resina epóxica | |
| B. 1.9 Azul de Toluidina 5 %..... | |
| B. 1.10 Acetato de uranilo 5 % en alcohol etílico 50 %..... | 76 |
| B. 1.11 Citrato de plomo 0.4 %..... | |
| B. 1.12 Hematoxilina de Gill. | |
| B. 1.13 Eosina..... | |
| B. 1.14 Solución de Alcohol-Ácido..... | 77 |

| | |
|---|-----------|
| B. 1.15 Solución de Agua Amoniacal (Virador)..... | |
| B. 1.16 Hematoxilina férrica de Weigert..... | |
| B. 1.17 Solución de Fucsina ácida y Escarlata de Biebrich..... | |
| B.1.18 Solución de Ácidos Fosfomolibdico y Fosfotúngstico... | 78 |
| B 1.19 Solución de Azul de Anilina..... | |
| B.1.20 Solución acuosa de Ácido Acético al 1%..... | |
| B. 1.21 Solución Fijadora de Bouin..... | |
| | |
| B. 2 INMUNOHISTOQUÍMICA (TUNEL). | |
| | |
| B. 2.1 Solución de proteinasa K..... | |
| B. 2.2 Solución bloqueadora..... | |
| B. 2.3 Solución de Buffer de marcaje TdT 1 X..... | 79 |
| B. 2.4 Mezcla de Reacción de Marcaje | |
| B. 2.5 Buffer Stop TdT 1X | |
| B. 2.6 Solución Strep-HRP..... | |
| B. 2.7 Solución de DAB..... | |
| B. 2.8 Verde de metilo 1 %..... | 80 |

| | |
|---|-----------|
| B. 2.9 CONTROL POSITIVO..... | |
| B. 2.10 CONTROL NEGATIVO..... | |
| B. 3 ANÁLISIS BIOQUÍMICO | |
| B.3.1 Buffer frío (Fosfato 50 mM/L, NaCl 120 mM/L y EDTA 10 mM/L, pH 7.4)..... | |
| B.3.2 SEVAGE..... | |
| B.3.3 RNAsa libre de DNAsa (a concentración de 200 µg/mL).... | 81 |
| B.3.4 Buffer Tris-EDTA 1 X (Tris-HCl 10 mM/L, pH 8.0 y EDTA 1 mM/L)..... | |
| B.3.5 Buffer de carga (jugo azul)..... | |
| B.3.6 Buffer TBE 10 X (Tris 89 mM/L, Borato 89 mM/L y EDTA 2 mM/L, pH 8.0) | |
| B.3.7 Ácido Perclórico (HClO₄) 10 N..... | |
| B.3.8 Reactivo de Difenilamina (DPA)..... | |
| B. 3.9 Stock de acetaldehído (C₂H₄O) 16 mg/mL..... | 82 |
| B.3.10 Hidróxido de Sodio (NaOH) 1M..... | |
| B.4 CURVA DE CALIBRACIÓN | 82 |

NOMENCLATURA

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

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

RESUMEN

ADOLFO SOTO DOMÍNGUEZ

Fecha de Graduación: Agosto 2005

Universidad Autónoma de Nuevo León.
Facultad de Medicina.

Título

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

Número de páginas:

83

Área de estudio: Morfología

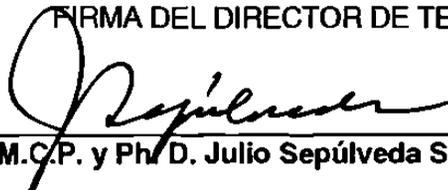
Candidato para el grado de Maestro en
Ciencias con Orientación en Morfología.

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

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

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

FIRMA DEL DIRECTOR DE TESIS



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

CAPÍTULO 1

INTRODUCCION

1.1 Apoptosis:

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

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

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

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

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

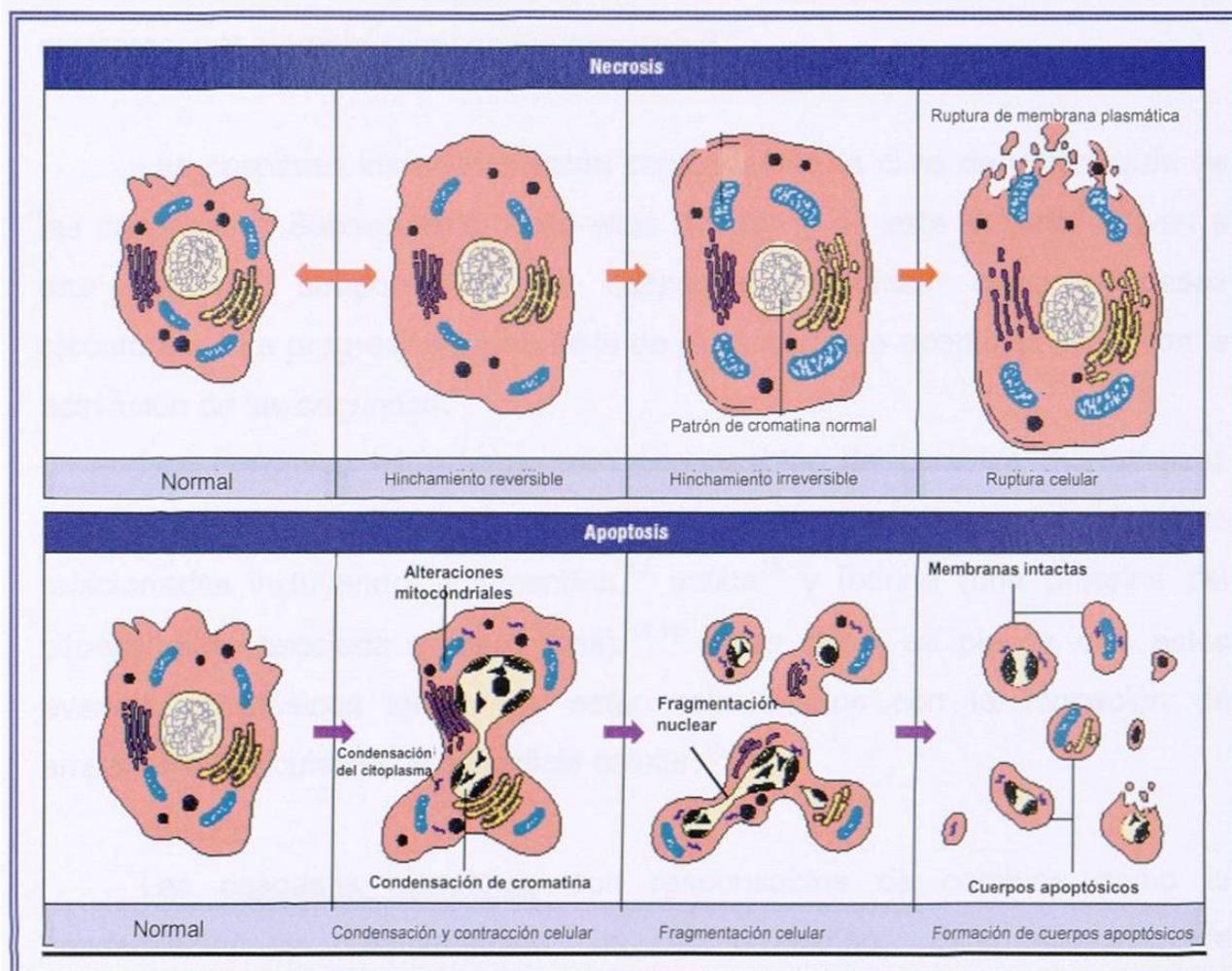


FIGURA 1. Cuadro comparativo de las diferencias morfológicas entre necrosis y apoptosis.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2 SISTEMAS DE DETECCIÓN DE APOPTOSIS.

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

1.2.1 MICROSCOPIA DE LUZ

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

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

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

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

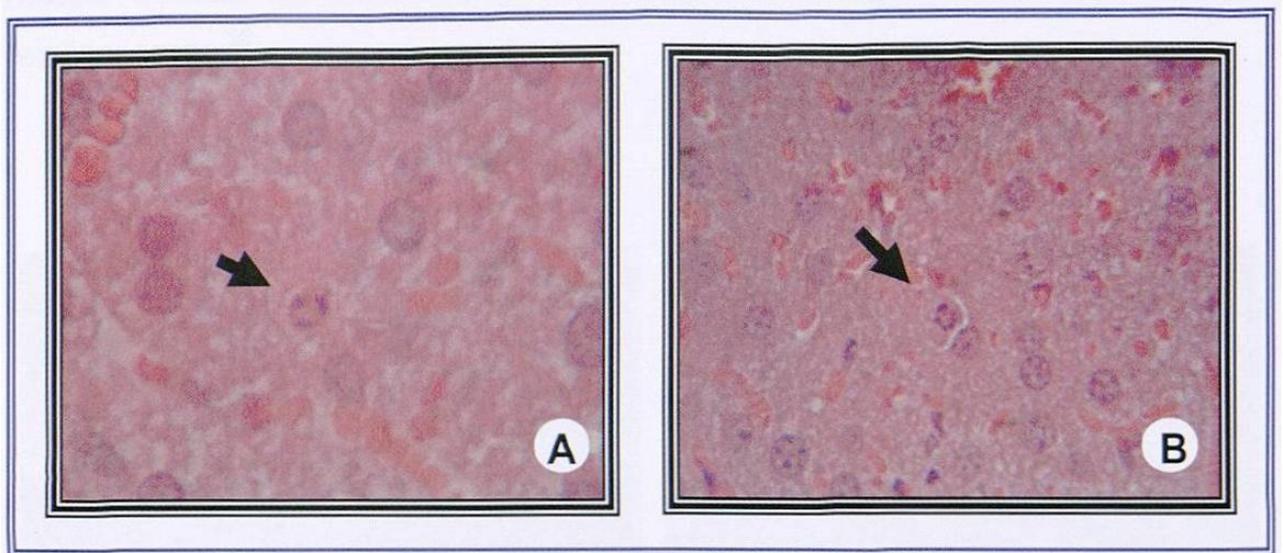


FIGURA 2. Hígado de ratón tratado con PA1. Tiempo de exposición 24 horas. **A)** Condensación de la cromatina sobre la envoltura nuclear (flecha). **B)** Cuerpo apoptótico (flecha). Microscopia de luz. Inclusión en parafina. H y E. A 1000X, B 400X.

1.2.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

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

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

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

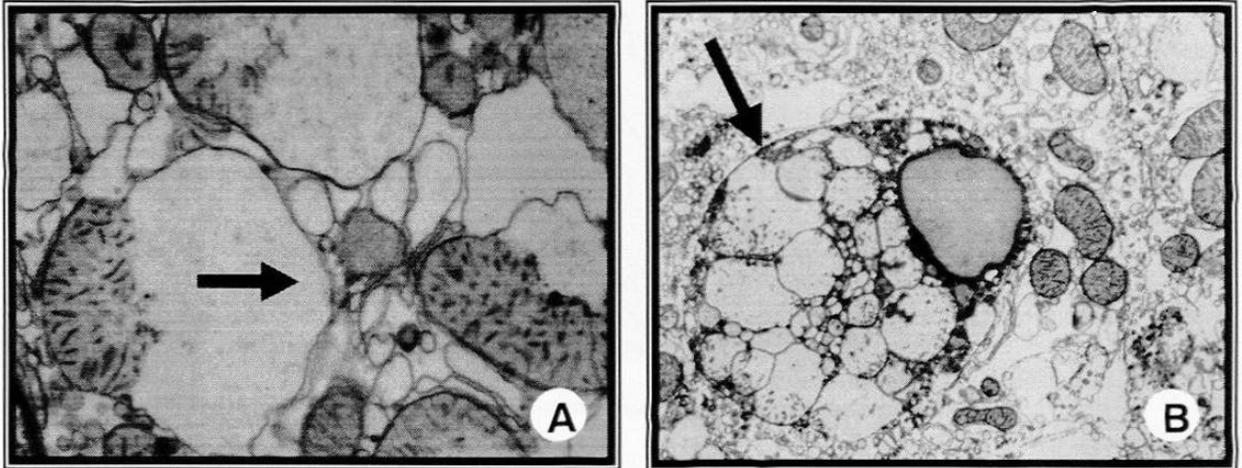


FIGURA 3. Hígado de ratón tratado con PA1. **A) 4 hrs de exposición:** alteración mitocondrial pre-apoptósica (flecha). **B) 24 hrs. de exposición:** Cuerpo apoptótico (flecha). Microscopía electrónica de transmisión. Inclusión en resinas epóxicas, contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo.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

1.2.3 TUNEL

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

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

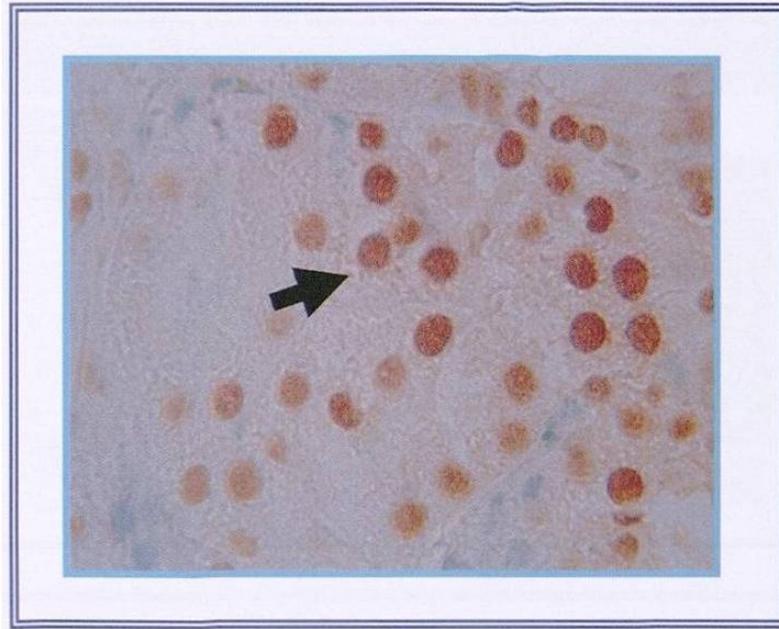


FIGURA 4. Riñón de ratón tratado con PA1. **Tiempo de exposición 24 horas.** Núcleos positivos (Flecha). Microscopia de luz. Inclusión en parafina. TUNEL. 1000X.

1.2.4 ELECTROFORESIS:

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

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

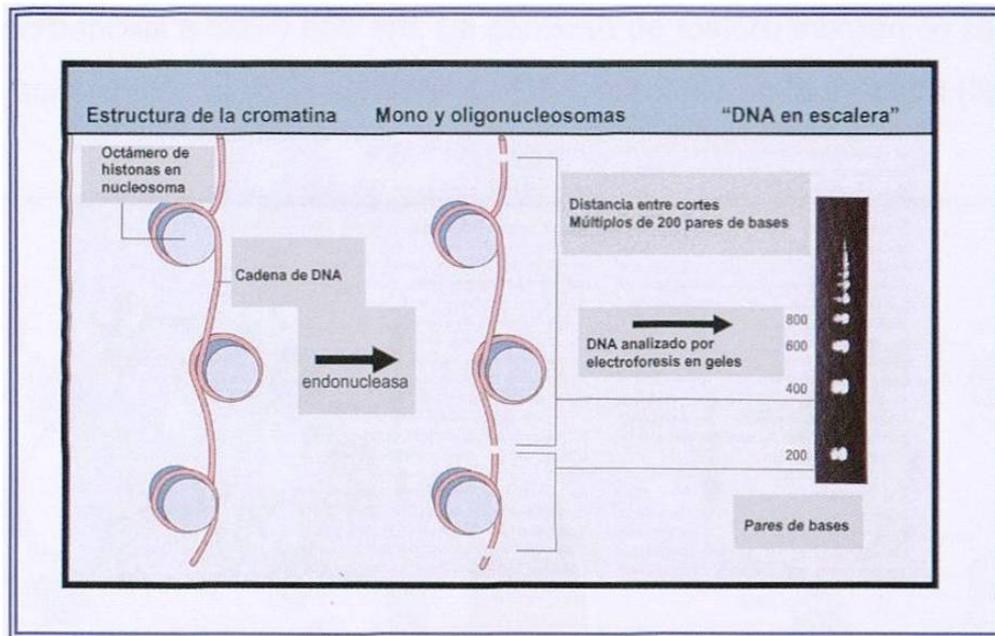


FIGURA 5. Fragmentación de la cromatina y su análisis mediante geles de agarosa.

1.2.5 CUANTIFICACIÓN DEL DNA FRAGMENTADO.

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

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

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

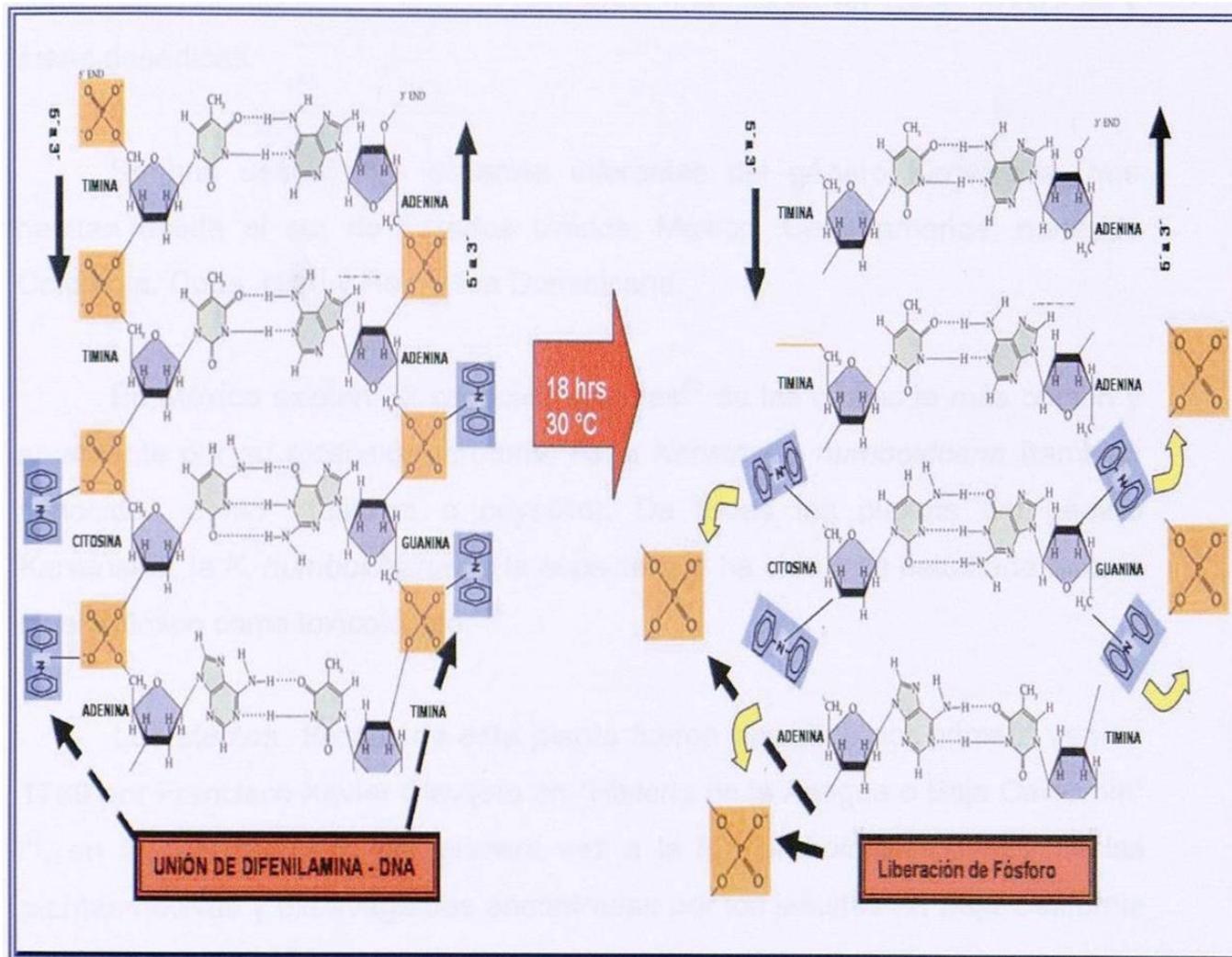


FIGURA 6. Reacción Difenilamina- DNA y liberación del fósforo.

1.3 Peroxisomicina A1 (PA1).

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

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

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

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

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

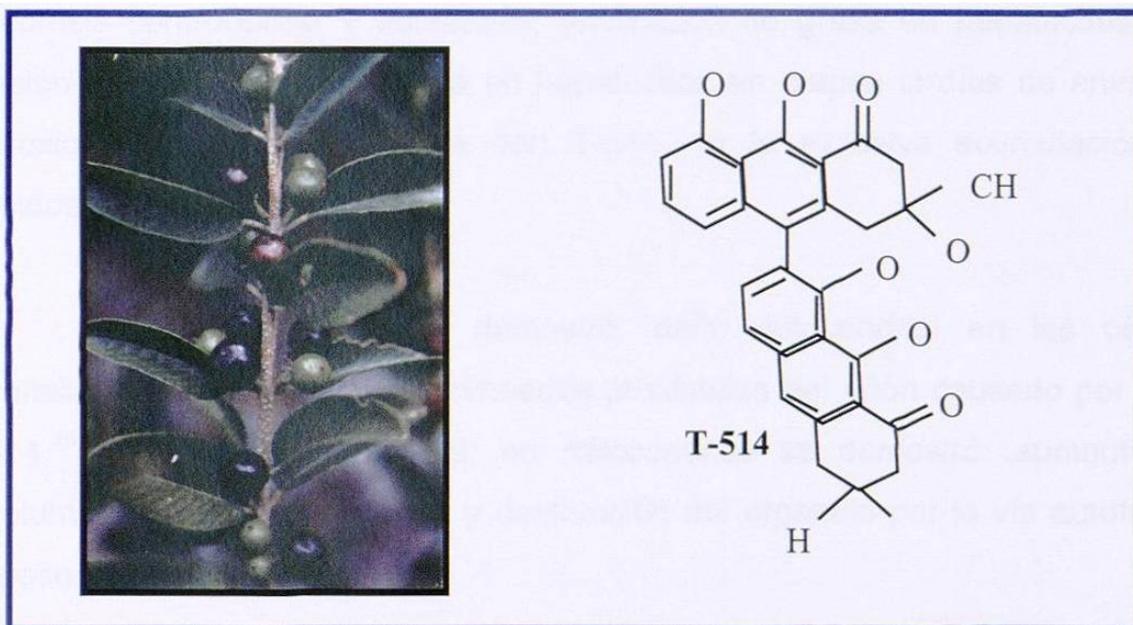


FIGURA 7. *K. humboldtiana*, su fruto y la estructura química de la T-514 o Peroxisomicina A1.

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

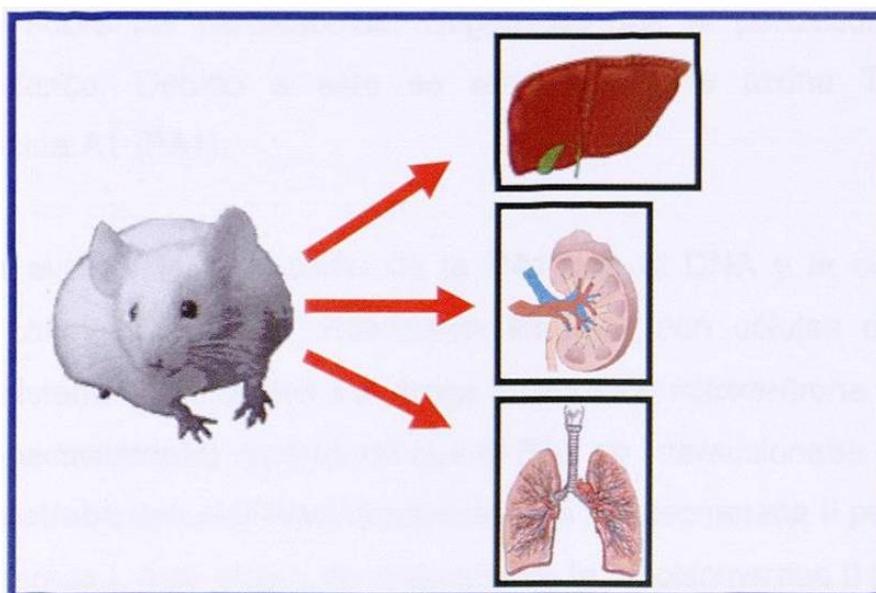


FIGURA 8. Órganos Blanco de la T 514: Hígado, Riñón y Pulmón en roedores.

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

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

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

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

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

como una señal de inducción de la activación de la muerte celular en las células de leucemia expuestas a esta toxina, además en ambas líneas celulares se presentaba pérdida de células de cada fase del ciclo celular y un gran incremento en la región sub-G₁ lo cual es característico de las células apoptóticas siendo esto más pronunciado en la línea HL-60 que en la HL60/MX2 (la cual tenía una actividad reducida de topoisomerasa II). Las células HL-60 tratadas con PA1 estimulaban el rompimiento de la poly (ADP-ribosa) polimerasa por las proteasas intracelulares como la caspasa-3. En éste estudio también se caracterizó un metabolito radical de la T-514 llamado T-510R el cual mostró una menor actividad inhibitoria con la topoisomerasa II y 3-4 veces menos tóxicas para ambos tipos celulares.

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

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

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

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

TABLA 1. RESUMEN DE ESTUDIOS DE APOPTOSIS CAUSADA POR PA1

| <i>IN VITRO</i> | <i>IN VIVO</i> | | | | | | | | | | |
|--|---|---------|----------|----------|-----------|--------------|----------|------------|-----------|--|--|
| <p>➤ Lansiaux y cols. (2001) * Células de leucemia humana HL-60 y HL-60/MX2</p> | <p>➤ Santoyo (2002). Hígado normal de ratón. * Alteraciones mitocondriales preapoptósicas. * Cuerpos apoptósicos.</p> | | | | | | | | | | |
| <p>➤ Martínez y cols. (2001). * Líneas celulares establecidas transformadas</p> <table data-bbox="170 1456 743 1713"> <tr> <td>1.- Jurkat</td> <td>6.- 293</td> </tr> <tr> <td>2.- Hela</td> <td>7.- Rat2</td> </tr> <tr> <td>3.- MCF-7</td> <td>8.- BALB/3T3</td> </tr> <tr> <td>4.- HT29</td> <td>9.- 3T3SV2</td> </tr> <tr> <td>5.- HepG2</td> <td></td> </tr> </table> | 1.- Jurkat | 6.- 293 | 2.- Hela | 7.- Rat2 | 3.- MCF-7 | 8.- BALB/3T3 | 4.- HT29 | 9.- 3T3SV2 | 5.- HepG2 | | <p>➤ Ballesteros y cols.(2002). Hígado normal de ratón. * Actividad de Citocromo Oxidasa</p> |
| 1.- Jurkat | 6.- 293 | | | | | | | | | | |
| 2.- Hela | 7.- Rat2 | | | | | | | | | | |
| 3.- MCF-7 | 8.- BALB/3T3 | | | | | | | | | | |
| 4.- HT29 | 9.- 3T3SV2 | | | | | | | | | | |
| 5.- HepG2 | | | | | | | | | | | |

1.4 JUSTIFICACIÓN

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

1.5 OBJETIVO GENERAL:

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

1.6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

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

CAPITULO 2

MATERIAL Y MÉTODOS:

2.1 MATERIAL.

2.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO.

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

2.1.2 GRUPOS EXPERIMENTALES.

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

2.1.3 REACTIVOS.

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

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

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

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

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

2.1.4 MATERIAL DE TÉCNICAS MORFOLOGICAS Y BIOQUIMICAS.

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

2.1.5 EQUIPO UTILIZADO.

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

2.2. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

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

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

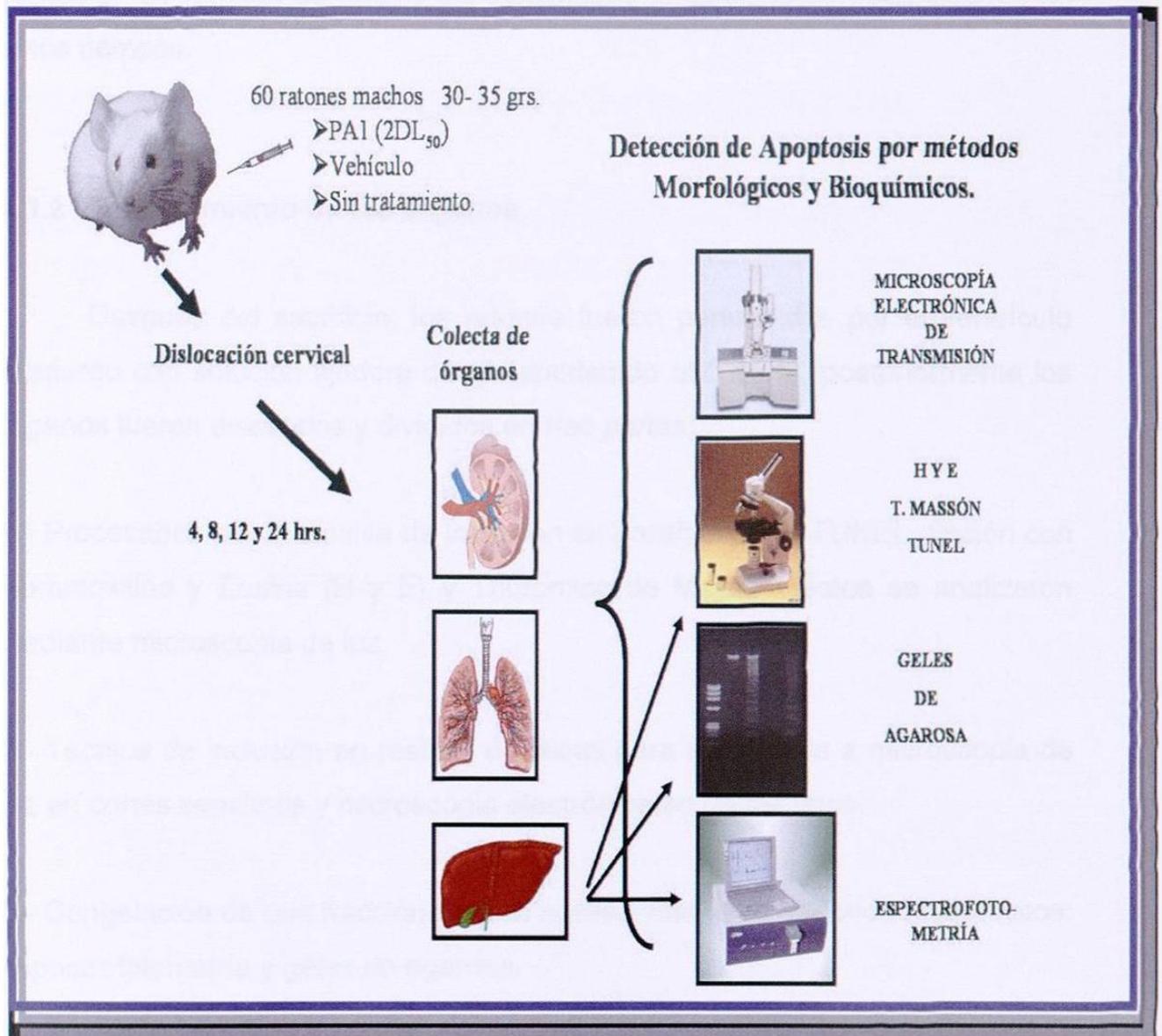


FIGURA 9. Esquema que ilustra la estrategia experimental empleada en este estudio.

2.3 MÉTODOS

2.3.1 Obtención de la muestra.

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

2.3.2 Procesamiento de los órganos

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

- 1.- Procesados por la técnica de inclusión en parafina para: TUNEL, tinción con Hematoxilina y Eosina (H y E) y Tricrómico de Massón, éstos se analizaron mediante microscopia de luz.
- 2.- Técnica de inclusión en resinas epóxicas para su análisis a microscopia de luz en cortes semifinos y microscopia electrónica en cortes finos.
- 3.- Congelación de una fracción para el análisis mediante métodos bioquímicos: espectrofotometría y geles de agarosa.

2.3.3.- ANÁLISIS MORFOLÓGICO.

2.3.3.1 Evaluación mediante microscopia de luz.

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

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

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

Estas técnicas se describen ampliamente en el apéndice A.

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

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

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

Estas muestras se analizaron mediante microscopia de luz.

CONTROLES PARA LA TÉCNICA:

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

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

El procedimiento se describe en el apéndice A.

2.3.3.2 Evaluación mediante microscopía electrónica de transmisión

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

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

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

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

Esta técnica se describe ampliamente en el apéndice A.

2.3.4 ANÁLISIS BIOQUÍMICO.

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

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

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

Esta técnica se describe en el apéndice A.

2.3.4.2 Cuantificación de la fragmentación del DNA mediante espectrofotometría.

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

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

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

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

Esta técnica se describe en el apéndice A.

2.3.5 Análisis estadístico.

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

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 ANALISIS MORFOLÓGICO.

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

3.1.1 HÍGADO.

3.1.1.1 MICROSCOPIA DE LUZ

3.1.1.1.1 GRUPOS CONTROL SIN TRATAMIENTO Y CONTROL VEHÍCULO.

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