

FIGURA 10. Hígado de ratón de los grupos **A) Control sin tratamiento:** Núcleo eucromático (flecha negra), núcleo de célula endotelial (flecha azul), eritrocitos en sinusoides (e), vena central (VC). **B) Control vehículo:** Muestra los mismos hallazgos descritos para el control sin tratamiento. Microscopia de luz. A) Inclusión en parafina. Tricrómico de Massón 1000X. B) Inclusión en resinas epóxicas, Azul de Toluidina, 1000X.

3.1.1.1.2 GRUPO INTOXICADO CON PEROXISOMICINA A1, 4 HORAS DE EXPOSICIÓN:

En este tiempo se observan hepatocitos con núcleos eucromáticos con nucleolos evidentes y un aparente incremento de lípidos en el citoplasma, además se pueden apreciar hepatocitos con núcleos con pequeñas condensaciones de la cromatina en la periferia de la envoltura nuclear, así como pequeñas zonas de condensación del citoplasma, algunos núcleos también muestran tamaños variables.

3.1.1.1.3 GRUPO INTOXICADO CON PEROXISOMICINA A1, 8 HORAS DE EXPOSICIÓN:

El análisis histológico de hígado de los ratones intoxicados con PA1 mostró un incremento de las alteraciones descritas en el grupo intoxicado con PA1 4 horas de exposición, un número mayor de hepatocitos alterados de tinción más intensa alternando con hepatocitos morfológicamente normales. En este tiempo se empiezan a ver núcleos de forma muy irregular con grandes agregados de cromatina sobre la envoltura nuclear.

3.1.1.1.4 GRUPO INTOXICADO CON PEROXISOMICINA A1, 12 HORAS DE EXPOSICIÓN:

En el análisis histológico del hígado de los ratones intoxicados con PA1 se observó mayor intensidad de las alteraciones descritas en los grupos intoxicados con PA1 a 4 y 8 horas de exposición, se encontró en este tiempo la presencia de cuerpos apoptóticos fagocitados por células vecinas, éstos cuerpos pueden contener fragmentos del núcleo con depósitos densos de cromatina y pequeñas porciones de citoplasma, todo envuelto por una membrana y a su vez rodeados de un espacio o halo claro característico de la vesícula fagocítica .

3.1.1.1.5 GRUPO INTOXICADO CON PEROXISOMICINA A1, 24 HORAS DE EXPOSICIÓN:

En este tiempo de intoxicación el hígado se observa con daño generalizado en los hepatocitos con abundantes vacuolas por la acumulación de lípidos en su citoplasma, zonas de hemorragia y abundantes cuerpos apoptóticos (fig. 11).

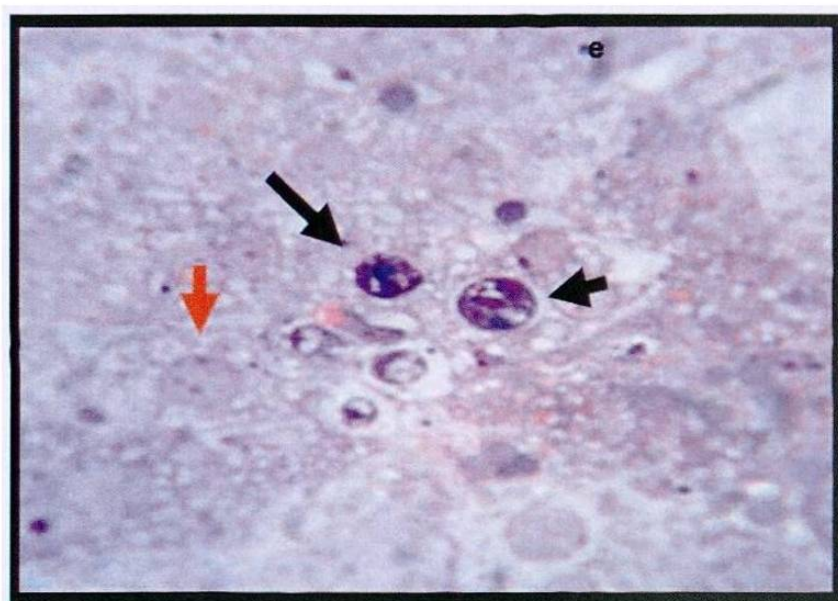


FIGURA 11. Hígado de ratón del grupo: Intoxicado con Peroxisomicina A1, 24 horas de exposición. Núcleo de tamaño variable (flecha roja), cuerpos apoptóticos (flechas negras), eritrocito en sinusoide (e). Microscopia de luz. Inclusión en resinas epóxicas. Azul de Toluidina, 1000X.

3.1.1.2 INMUNOHISTOQUÍMICA PARA EL ANÁLISIS DE LA FRAGMENTACIÓN DE LA CROMATINA UTILIZANDO TUNEL.

3.1.1.2.1 Controles para la técnica de TUNEL

Se utilizaron cortes de hígado del grupo control sin tratamiento para la preparación de los controles positivo y negativo de la técnica de TUNEL (fig 12).

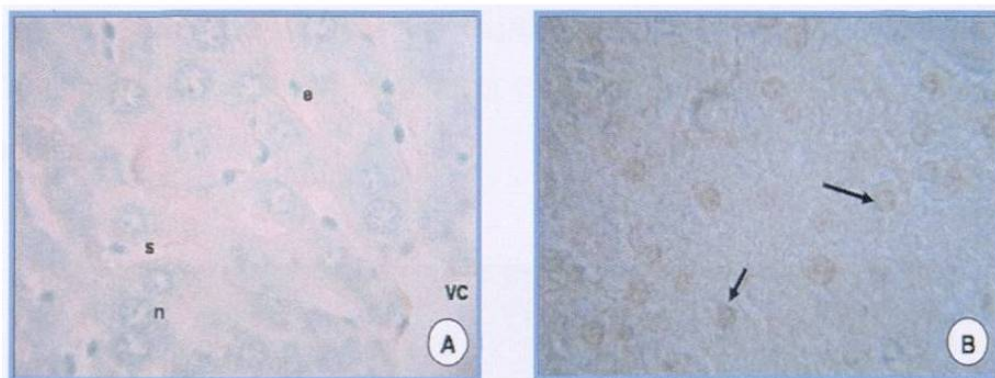


FIGURA 12. Hígado de ratón del grupo control sin tratamiento, **Controles de la técnica de TUNEL:** **A) Control Negativo:** Núcleo negativo (n), espacios sinusoidales (s), eritrocitos (e), vena central (VC). **B) Control Positivo:** Núcleos positivo (flechas), Microscopia de luz. Inclusión en parafina. TUNEL. 1000X.

3.1.1.2.2 GRUPOS CONTROL SIN TRATAMIENTO Y CONTROL VEHÍCULO.

Los cortes histológicos del hígado de los grupos control sin tratamiento (fig 13 A) y control vehículo (fig. 13 B) mostraron resultados negativos a la fragmentación de la cromatina, se observan los núcleos solo con la tinción de contraste (verde de metilo).

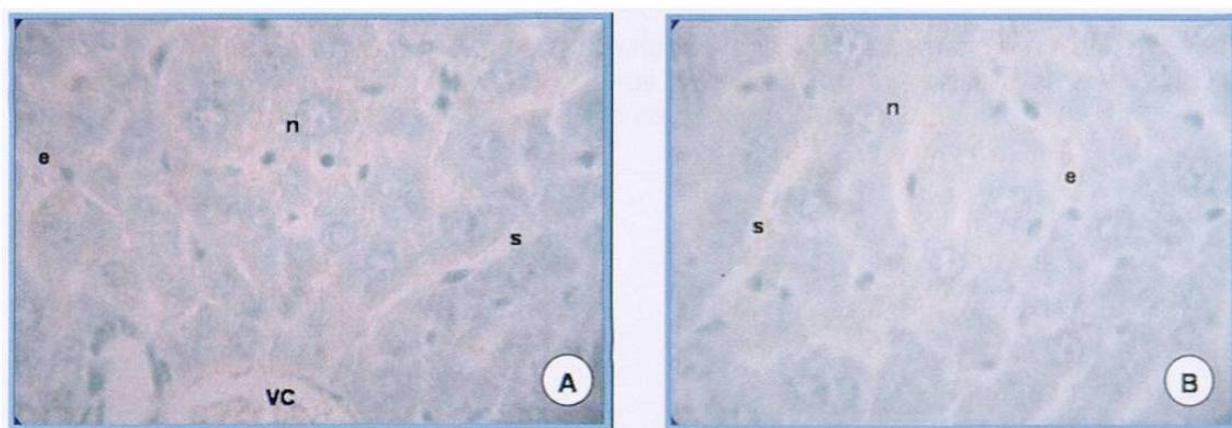


FIGURA 13. Hígado de ratón de los grupos, **A) Control sin tratamiento:** Núcleos negativos (n), espacios sinusoidales (s), eritrocitos (e), vena central (VC). **B) Control vehículo:** se observan los mismos elementos que en el control sin tratamiento. Microscopia de luz. Inclusión en parafina. TUNEL. 1000X.

3.1.1.2.3 GRUPOS INTOXICADOS CON PEROXISOMICINA A1: 4, 8, 12 y 24, HORAS DE EXPOSICIÓN:

Los cortes histológicos de hígado de los ratones del grupo intoxicado con Peroxisomicina A1 a 4, 8, 12 y 24 horas de exposición mostraron un aumento gradual en la positividad con respecto al tiempo.

Destacando a 24 horas de exposición (fig. 14) numerosos hepatocitos con núcleos positivos alternando con hepatocitos con núcleos negativos para esta técnica.

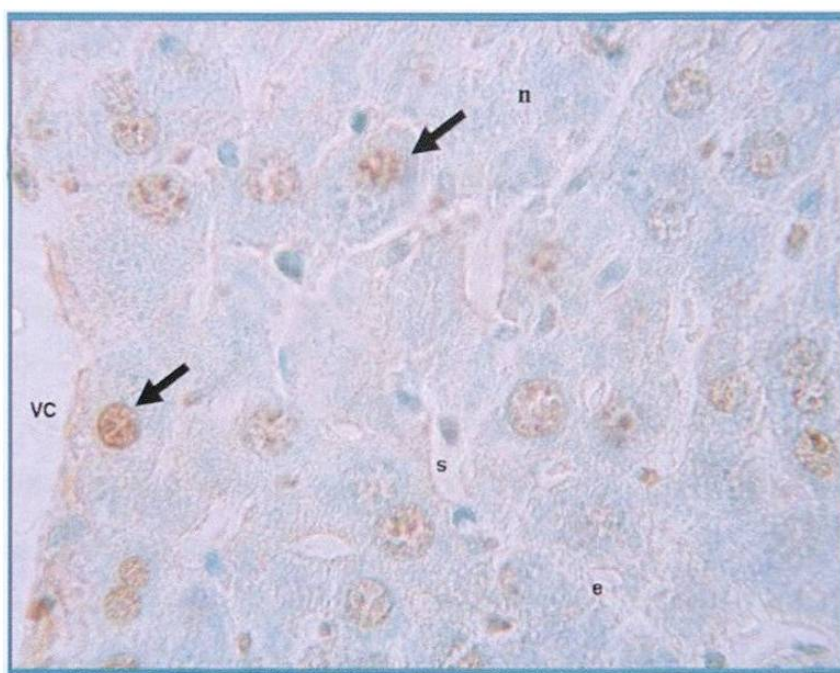


FIGURA 14. Hígado de ratón del grupo: **Intoxicado con Peroxisomicina A1, 24 horas de exposición**, núcleos positivos (flechas) núcleos negativos (n), sinusoides (s) eritrocitos (e), vena central (VC). Microscopia de luz. Inclusión en parafina. TUNEL. 1000X.

3.1.1.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.

Los resultados del análisis ultraestructural de hígado de los grupos control sin tratamiento y control vehículo fueron comparados con los resultados de las muestras de los grupos intoxicado con Peroxisomicina A1, 4 horas de exposición para determinar las alteraciones mitocondriales pre-apoptósicas y 24 horas de exposición para la evaluación ultraestructural de las alteraciones características de apoptosis.

3.1.1.3.1 GRUPO CONTROL SIN TRATAMIENTO Y GRUPO CONTROL VEHÍCULO.

El análisis a microscopia electrónica de transmisión de cortes finos de hígado de ratón de los grupos control sin tratamiento y control vehículo mostró una ultraestructura normal para éste órgano.

En el hígado (fig. 15 A) se observaron hepatocitos separados por los espacios sinusoidales con eritrocitos y plaquetas así como núcleos de células endoteliales. Los hepatocitos mostraron límites celulares bien definidos, con uno o dos núcleos eucromáticos con integridad en la envoltura nuclear y uno o dos nucleolos claramente visibles, en el citoplasma se observaron, mitocondrias, retículo endoplásmico rugoso y liso, aparato de Golgi y otros organelos de morfología normal.

3.1.1.3.2 GRUPO INTOXICADO CON PEROXISOMICINA A1, 4 HORAS DE EXPOSICIÓN.

En el análisis ultraestructural de hígado de los ratones de este tiempo se observaron hepatocitos con morfología normal, que alternan con hepatocitos con núcleos de tamaño variable y pequeñas condensaciones de la cromatina en la periferia de la envoltura nuclear, en el citoplasma se observaron abundantes

cuerpos electrodensos que pueden ser peroxisomas y lisosomas, en éste tiempo se encontraron mitocondrias de apariencia normal junto con mitocondrias aumentadas de volumen y ligera extracción de la matriz destacando las mitocondrias con alteraciones pre-apoptósicas: en un extremo integridad en las crestas, mientras que en el extremo opuesto se observa ruptura de la membrana externa y protrusión de la membrana interna con ausencia de crestas y matriz de baja electrodensidad que en cortes transversales tienen la apariencia de vesículas vacías (fig. 15 B).

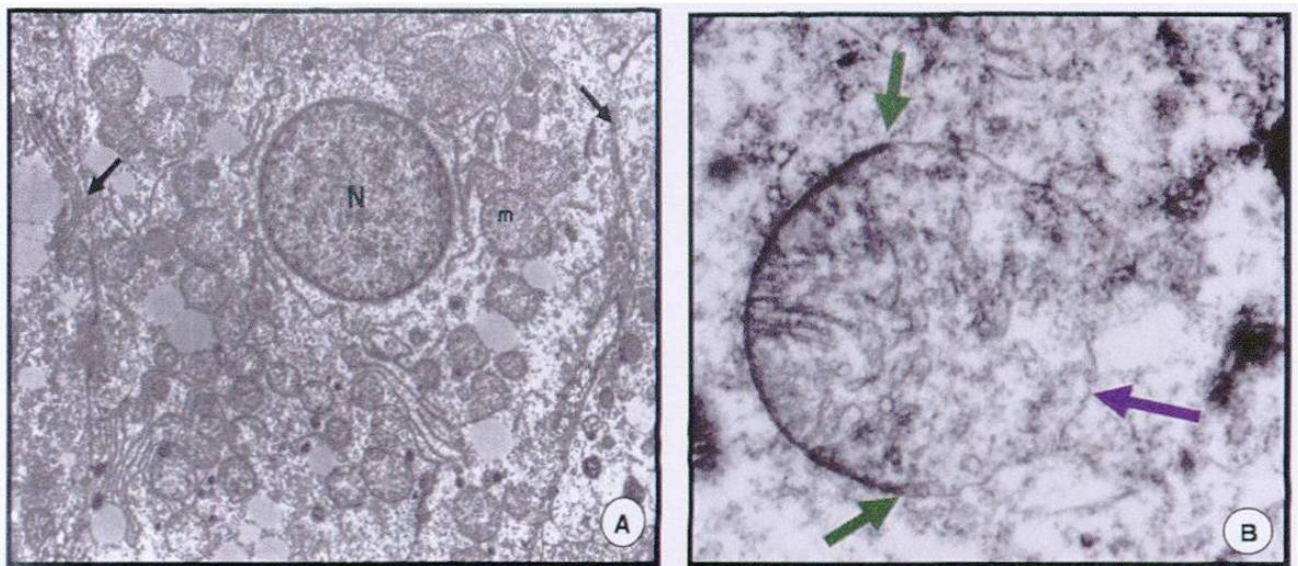


FIGURA 15. Hígado de ratón de los grupos: **A) Control sin tratamiento:** se observa un hepatocito con núcleo eucromático (N), mitocondrias de apariencia normal (m), las flechas negras señalan los límites celulares. **B) Intoxicado con Peroxisomicina A1, 4 horas de exposición.** Mitocondria con alteraciones preapoptósicas: ruptura de membrana interna (flechas verdes) y protrusión de membrana interna (flecha morada). Microscopia electrónica de transmisión. Inclusión en resinas epóxicas, contrastado con acetato de uranilo y citrato de plomo. A) 3150X, B) Amplificado a partir de 4000X.

3.1.1.3.3 GRUPO INTOXICADO CON PEROXISOMICINA A1, 24 HORAS DE EXPOSICIÓN.

En este tiempo de intoxicación el hígado (fig. 16) mostró un daño generalizado en los hepatocitos con infiltración de grasa en el citoplasma, numerosas mitocondrias con las alteraciones previamente descritas para el grupo intoxicado con PA1 4 horas de exposición (fig. 15 B) coexistiendo con

mitocondrias de apariencia normal, además destacan abundantes cuerpos apoptóticos que contienen citoplasma, organelos y fragmentos del núcleo con densas masas de cromatina bien preservados rodeados de membrana, además se observó un halo claro rodeando la vesícula fagocítica, los cuerpos apoptóticos mostraron distinta electrodensidad en comparación con las células ultraestructuralmente normales (fig. 16).

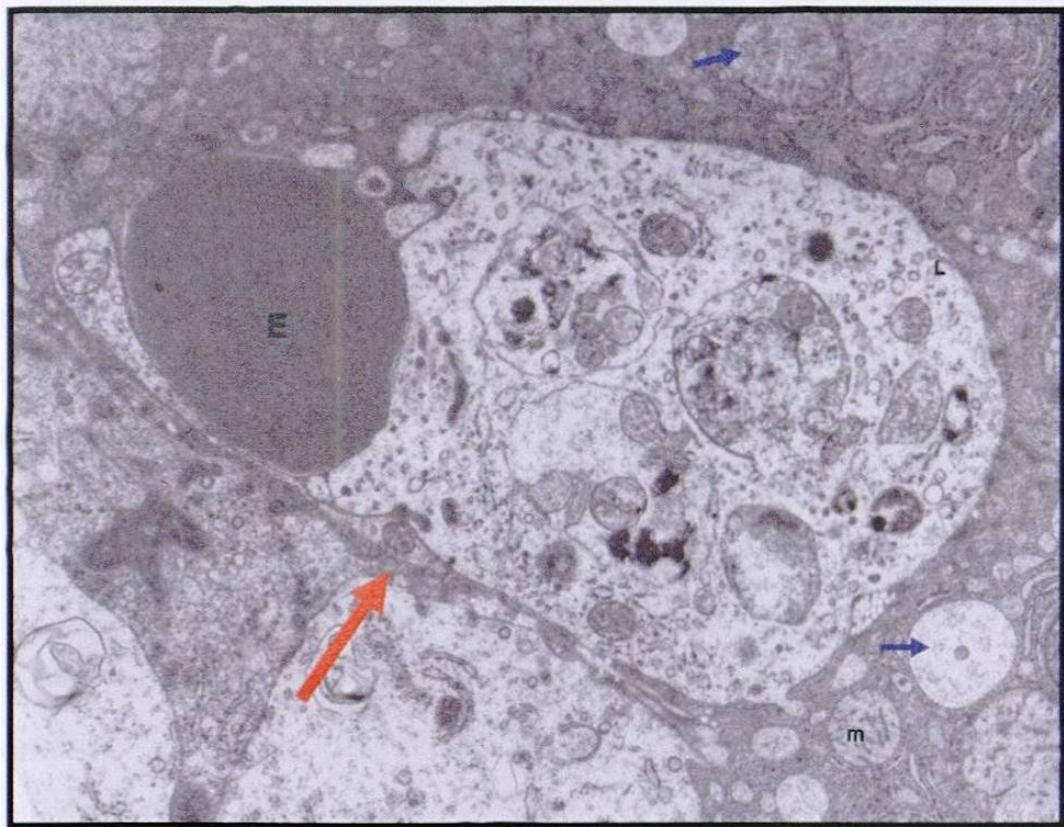


FIGURA 16. Hígado de ratón del grupo: Intoxicado con Peroxisomicina A1, 24 horas de exposición. Se observa el citoplasma de un hepatocito con mitocondrias alteradas (flechas azules) y otras con morfología normal (m), cuerpo apoptótico (flecha roja) con cuerpos autofágicos en su interior, eritrocito en sinusoides (E). Microscopía electrónica de transmisión. Inclusión en resinas epóxicas, contrastado con acetato de uranilo y citrato de plomo. 4000X.

3.1.2 RIÑÓN

3.1.2.1 MICROSCOPIA DE LUZ

3.1.2.1.1 GRUPOS CONTROL SIN TRATAMIENTO Y CONTROL VEHÍCULO.

En la **corteza de riñón** (fig. 17 A) se observaron los túbulos contorneados proximales con epitelio cúbico simple con borde en cepillo y núcleos basales, los túbulos contorneados distales mostraron un epitelio cúbico simple bajo con núcleos centrales o apicales con uno o dos nucleolos, las células de la mácula densa con su epitelio cilíndrico simple con núcleo central, además en los rayos medulares formados por túbulos colectores corticales con su epitelio cúbico simple compuesto por células principales con núcleo central ovalado y microvellosidades romas y de células intercaladas con núcleos centrales redondos. La técnica de tricrómico de Massón, mediante la tinción en color azul de las fibras de colágena de la membrana basal nos permitió observar integridad en el epitelio de cada uno de los túbulos.

En los corpúsculos renales se observó el espacio de Bowman limpio, el epitelio plano simple de la hoja parietal de la cápsula de Bowman, la luz de los capilares del glomérulo ocupados por eritrocitos, así como las células mesangiales intraglomerulares.

En la **médula renal** (fig. 17 B) se observó el epitelio cúbico simple de los túbulos colectores, los epitelios cúbicos simples con microvellosidades y vellosidades romas de las porciones rectas gruesas descendentes y ascendentes de los túbulos proximales y distales respectivamente, capilares y las porciones delgadas del asa de Henle con un epitelio plano simple.

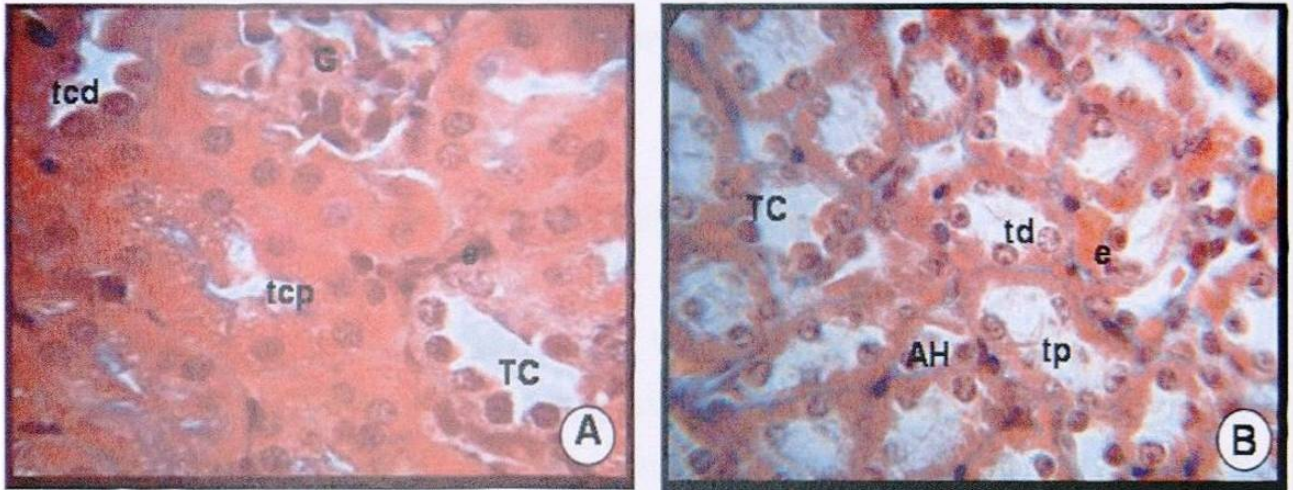


FIGURA 17. Riñón de ratón del grupo: **Control sin tratamiento.** **A) Corteza:** se observan túbulos contorneados proximales (tcp) y túbulos contorneados distales (tcd), túbulo colector (TC), glomérulo (G) y eritrocitos (e). **B) Médula:** se observan partes rectas de los túbulos proximales (tp), túbulos distales (td), túbulo colector (TC) y asa de Henle (AH). Microscopia de luz. Inclusión en parafina. Tricrómico de Massón, 1000X.

3.1.2.1.2 GRUPO INTOXICADO CON PEROXISOMICINA A1, 4 HORAS DE EXPOSICIÓN.

En los cortes histológicos de riñón se aprecian las alteraciones características de apoptosis: condensación de la cromatina, condensación del citoplasma y tamaños variables en los núcleos de las células epiteliales de los túbulos contorneados proximales, distales, y túbulos colectores en la corteza así como en las estructuras de la médula, cabe destacar que en éste tiempo se aprecia integridad de las microvellosidades de las células epiteliales y no se observan alteraciones en las células mesangiales intraglomerulares.

3.1.2.1.3 GRUPO INTOXICADO CON PEROXISOMICINA A1, 8 HORAS DE EXPOSICIÓN.

En este tiempo se observa un incremento en las alteraciones descritas en las células epiteliales de las estructuras del riñón, además pequeñas zonas

con células que muestran pérdida de microvellosidades en las porciones apicales y zonas con extracción del citoplasma por la presencia de necrosis.

3.1.2.1.4 GRUPO INTOXICADO CON PEROXISOMICINA A1, 12 HORAS DE EXPOSICIÓN.

En éste tiempo se incrementan las alteraciones mencionadas y se observa condensación de la cromatina en las células mesangiales intraglomerulares. Además de lo anterior se presentan zonas mas generalizadas de necrosis permaneciendo la integridad de la membrana basal en el epitelio de las estructuras tubulares tanto en la corteza como en la médula renal.

3.1.2.1.5 GRUPO INTOXICADO CON PEROXISOMICINA A1, 24 HORAS DE EXPOSICIÓN.

En el riñón tanto en la corteza (fig. 18) como en la médula (fig. 19) se aprecian numerosas zonas con células donde se observan las características de apoptosis ya descritas, destacan en este tiempo la presencia de cuerpos apoptóticos en las células mesangiales intraglomerulares y en las células epiteliales de los túbulos proximal, distal y colector, además de acentuarse la necrosis.

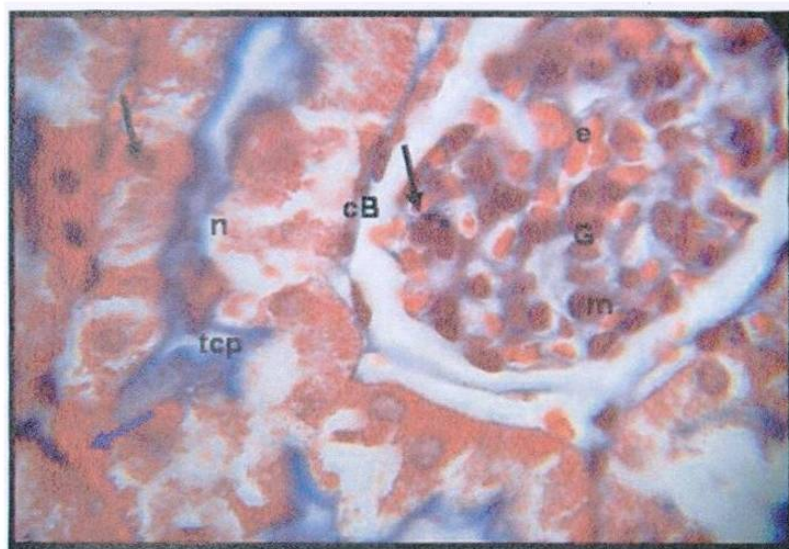


FIGURA 18. Riñón de ratón del grupo: Intoxicado con Peroxisomicina A1, 24 horas de exposición. Corteza: donde se observan túbulos contorneados proximales (tcp), túbulos contorneados distales (tcd), células mesangiales intraglomerulares, glomérulo (G), cápsula de Bowman (cB), eritrocitos (e), núcleos con condensación de la cromatina (flechas negras), condensación del citoplasma (flecha azul), áreas con necrosis (n). Microscopia de luz. Inclusión en parafina. Tricrómico de Massón, 1000X.

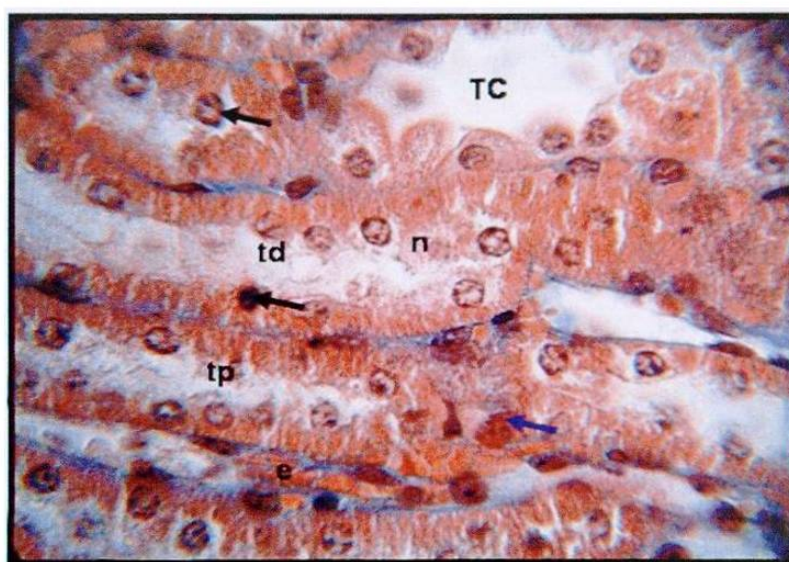


FIGURA 19. Riñón de ratón del grupo: Intoxicado con Peroxisomicina A1, 24 horas de exposición. Médula: Porciones rectas de los túbulos proximales (tp), túbulos distales (td) y túbulo colector (TC), núcleos con condensación de la cromatina (flechas negras), condensación del citoplasma (flecha azul), áreas con necrosis (n) y eritrocitos (e). Microscopia de luz. Inclusión en parafina. Tricrómico de Massón, 1000X.

3.1.2.2 INMUNOHISTOQUÍMICA PARA EL ANALISIS DE LA FRAGMENTACIÓN DE LA CROMATINA UTILIZANDO TUNEL.

3.1.2.2.1 GRUPO CONTROL SIN TRATAMIENTO Y CONTROL VEHÍCULO

Los cortes histológicos de riñón, de los grupos control sin tratamiento y control vehículo (fig.20 A y B) mostraron resultados negativos a la fragmentación de la cromatina, los núcleos se observaron solo con la tinción de contraste (verde de metilo) tanto en la corteza como en la médula.

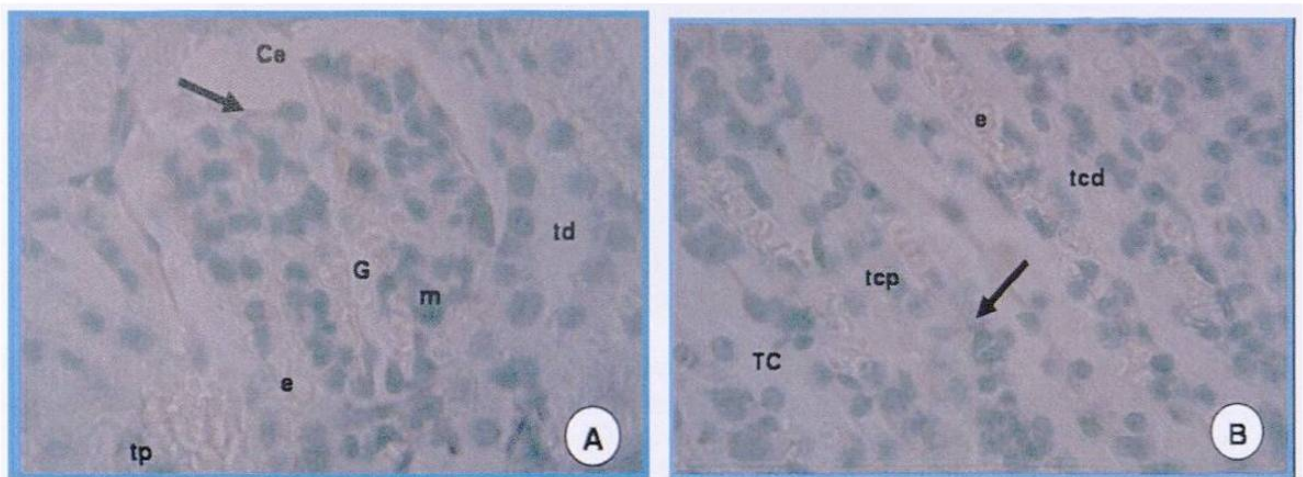


FIGURA 20. Riñón de ratón del grupo: **Control vehículo.** **A) Corteza:** Se observan túbulos contorneados proximales (tp), túbulos contorneados distales (td), glomérulo (G), células mesangiales intraglomerulares (m), cápsula de Bowman (Ca), núcleo negativo (flecha) **B) Médula:** túbulo colector (TC), parte rectas de túbulos proximales (tcp) y distales (tcd), capilares con eritrocitos (e), núcleo negativo (flecha). Microscopia de luz. Inclusión en parafina. TUNEL, 1000 X.

3.1.2.2.2 GRUPOS INTOXICADOS CON PEROXISOMICINA A1: 4, 8, 12 y 24, HORAS DE EXPOSICIÓN:

En los cortes histológicos de riñón de los ratones de los grupos Intoxicados con Peroxisomicina A1 a 4, 8, 12 y 24 horas de exposición mostraron un aumento gradual en la positividad con respecto al tiempo.

A 24 horas de exposición la corteza de riñón (fig 21) mostró positividad en las células epiteliales de los túbulos contorneados proximales y distales,

túbulos colectores, en las células epiteliales de la capa parietal de la cápsula de Bowman y mesangiales intraglomerulares.

En la médula (fig. 22) se observó positividad en los núcleos de las células epiteliales de las porciones rectas del sistema tubular.

Además de lo anterior, tanto en la corteza como en la médula se observaron células con núcleos negativos para esta técnica.

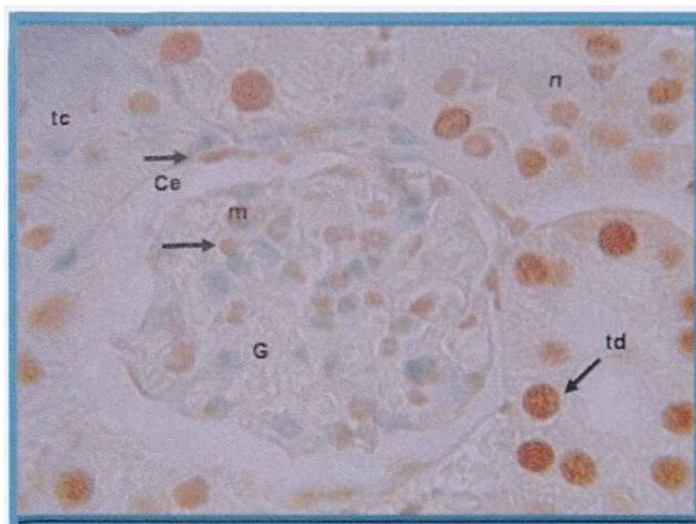


FIGURA 21. Riñón de ratón del grupo: **Intoxicado con Peroxisomicina A1, 24 horas de exposición.** **Corteza:** Se observan núcleos positivos (flechas), Túbulo contorneado distal (td), Túbulo contorneado proximal (tc), Glomérulo (G), Células mesangiales (m), Capa parietal de la cápsula de Bowman (Ce), Núcleo negativo (n). Microscopia de luz. Inclusión en parafina. TUNEL. 1000 X.

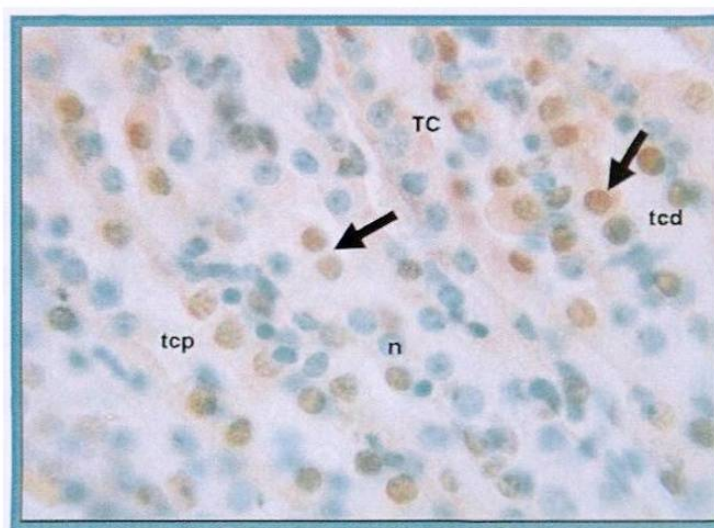


FIGURA 22. Riñón de ratón del grupo: **Intoxicado con Peroxisomicina A1, 24 horas de exposición.** **Médula:** Túbulos Colectores (TC), Parte recta de túbulos proximales (tcp), Parte recta de túbulos distales (tcd), núcleos positivos (flechas), núcleo negativo (n). Microscopia de luz. Inclusión en parafina. TUNEL. 1000 X.

3.1.2.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.

3.1.2.3.1. GRUPO CONTROL SIN TRATAMIENTO Y CONTROL VEHÍCULO

En la corteza de riñón (fig. 23 A) se observaron los túbulos contorneados proximales con epitelio cúbico simple con borde en cepillo y núcleos basales y numerosas mitocondrias y cuerpos electrodensos que pueden corresponder a peroxisomas, los túbulos contorneados distales mostraron un epitelio cúbico simple bajo con núcleos centrales o apicales con uno o dos nucleolos y abundantes mitocondrias, las células de la mácula densa con su epitelio cilíndrico simple con núcleo central, además en los rayos medulares formados por túbulos colectores corticales compuestos de células principales con núcleo central ovalado con microvellosidades cortas y de células intercaladas con núcleos centrales redondos.

En los corpúsculos renales se observó el espacio de Bowman limpio y distendido, el epitelio plano simple de la hoja parietal de la cápsula de Bowman, capilares fenestrados del glomérulo ocupados por eritrocitos, la capa visceral compuesta por los podocitos con sus prolongaciones primarias y secundarias así como células mesangiales intraglomerulares de morfología normal.

En la médula renal (fig. 23 B) se observó el epitelio cúbico simple de los túbulos colectores compuesto por células claras y oscuras, las partes rectas de los túbulos proximales y distales con epitelios cúbicos simples con microvellosidades y vellosidades romas respectivamente, así como el epitelio plano simple del asa de Henle.

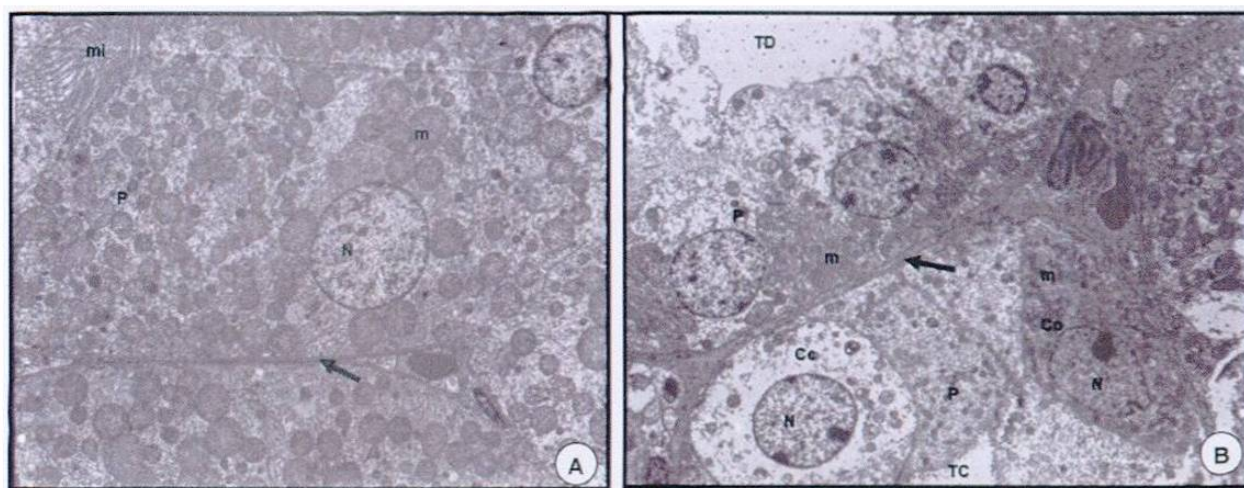


FIGURA 23. Riñón de ratón del grupo: Control sin tratamiento. **A) Corteza:** se observan células de los túbulos contorneados proximales con núcleos eucromáticos (N), abundantes mitocondrias (m), cuerpos electrodensos (P), microvellosidades (mi), membrana basal (flecha negra). **B) Médula:** se observa la parte recta de túbulo distal (TD) y túbulo colector (TC) con células claras (Cc) y oscuras (Co), núcleos (N), mitocondrias (m), cuerpos electrodensos (P), membrana basal (flecha negra). Microscopia electrónica de transmisión. Inclusión en resinas epóxicas, contrastado con acetato de uranilo y citrato de plomo A: 2500X, B: 2000 X.

3.1.2.3.2 GRUPO INTOXICADO CON PEROXISOMICINA A1, 4 HORAS DE EXPOSICIÓN.

En las células epiteliales de las estructuras de la corteza y médula de riñón destacó la presencia de mitocondrias con alteraciones pre-apoptósicas (fig. 24 A) junto con mitocondrias normales, también se observaron mitocondrias con signos francos de necrosis (fig. 24 B) caracterizado por aumento de volumen, pérdida de las crestas y extracción de la matriz, además de núcleos picnóticos.

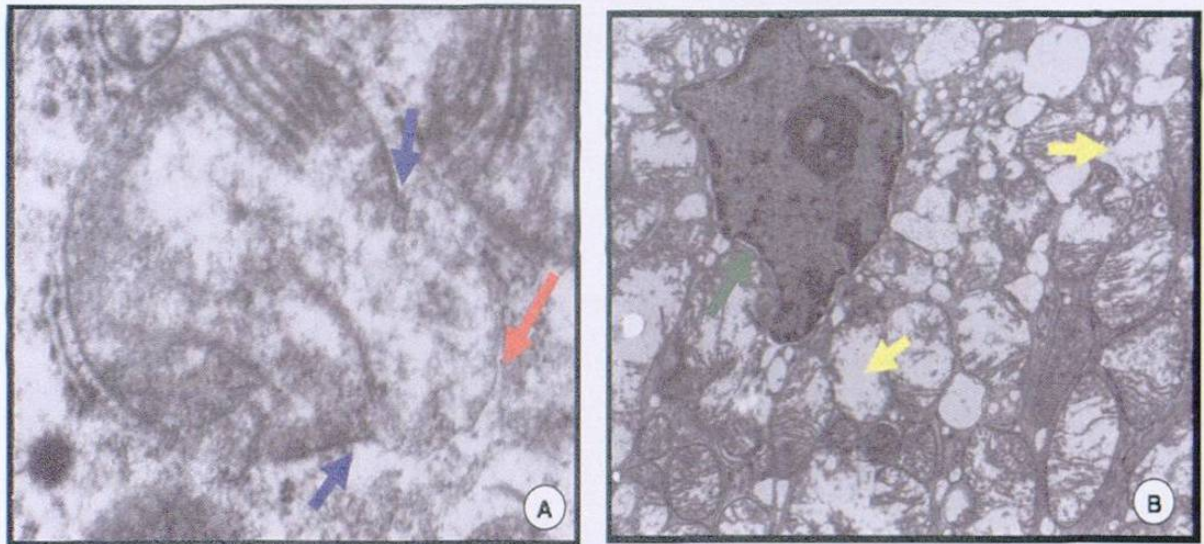


FIGURA 24. Riñón de ratón del grupo: Intoxicado con Peroxisomicina A1, 4 horas de exposición. **A) Mitocondria con alteraciones pre-apoptósicas:** ruptura de m. externa (flechas azules), herniación (flecha roja). **B) Signos de necrosis:** mitocondrias con matriz extraída y pérdida de las crestas (flechas amarillas), núcleo picnótico (flecha verde). Microscopía electrónica de transmisión. Inclusión en resinas epóxicas, contrastado con acetato de uranilo y citrato de plomo. A) Amplificación a partir de 10000X, B) 6300X

3.1.2.3.3 GRUPO INTOXICADO CON PEROXISOMICINA A1, 24 HORAS DE EXPOSICIÓN.

En riñón, tanto en la corteza (fig. 25) como en la médula (fig. 26) se observaron numerosas zonas de células con características de apoptosis y necrosis ya descritas así como cuerpos apoptóticos en las células epiteliales de los túbulos proximales, túbulos distales y túbulos colectores, en los corpúsculos renales se apreció condensación de la cromatina y cuerpos apoptóticos en las células mesangiales intraglomerulares.

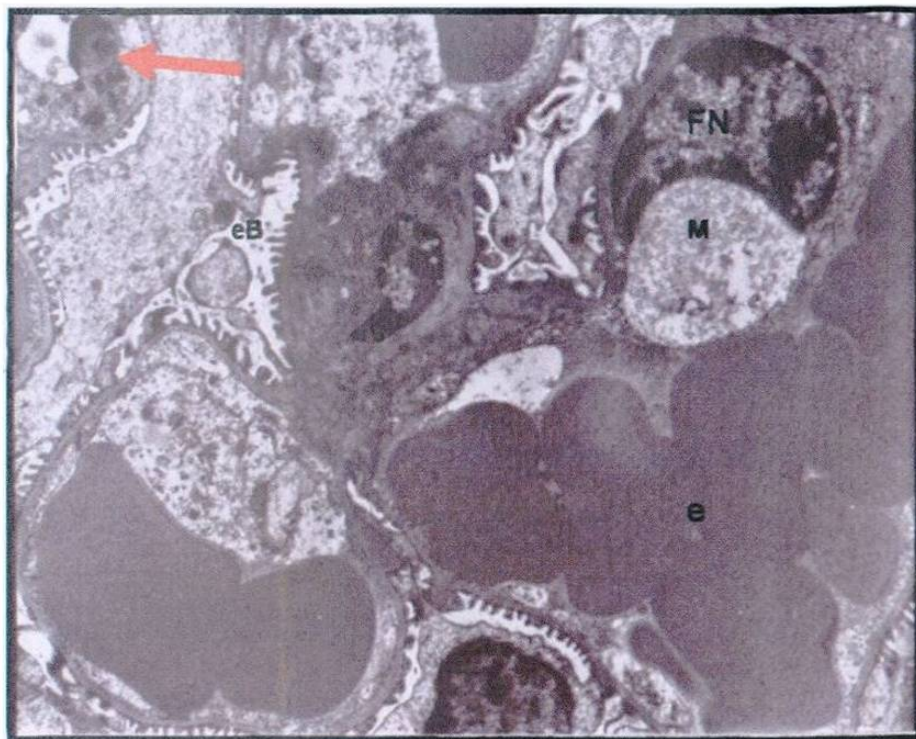


FIGURA 25. Riñón de ratón del grupo: Intoxicado con Peroxisomicina A1, 24 horas de exposición. Corteza: Células mesangiales intraglomerulares (M) con cromatina en forma de semiluna (FN), cuerpo apoptótico (flecha roja), espacio urinario (eB), eritrocitos (e). Microscopia electrónica de transmisión. Inclusión en resinas epóxicas, contrastado con acetato de uranilo y citrato de plomo. 4000 X.

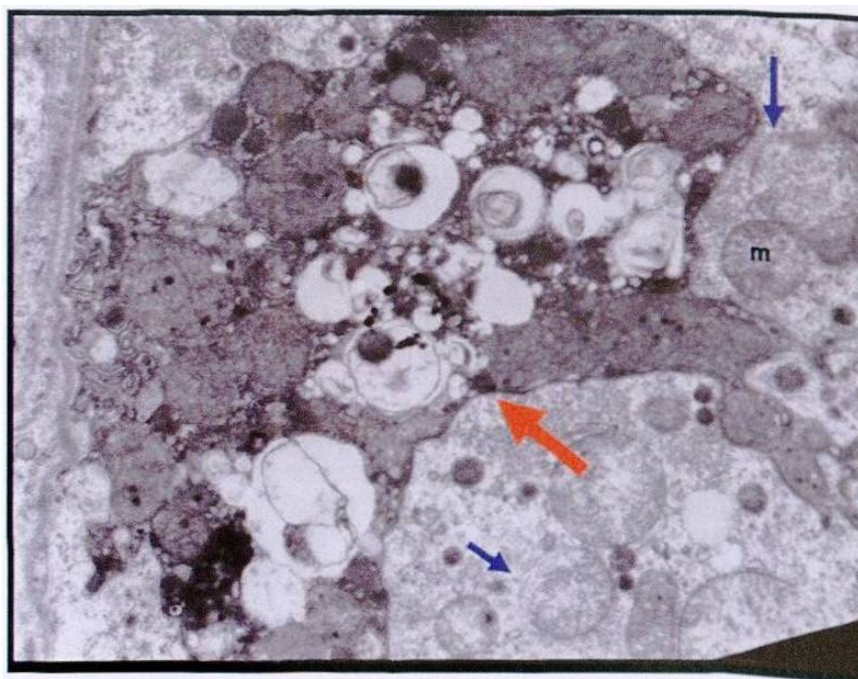


FIGURA 26. Riñón de ratón del grupo: Intoxicado con Peroxisomicina A1, 24 horas de exposición. Médula: célula de porción recta del túbulo proximal con cuerpo apoptótico (flecha roja), mitocondrias alteradas (flechas azules), mitocondrias normales (m), Microscopia electrónica de transmisión. Inclusión en resinas epóxicas, contrastado con acetato de uranilo y citrato de plomo. 4000 X.

3.1.3. PULMÓN

3.1.3.1 MICROSCOPIA DE LUZ

3.1.3.1.1 GRUPOS CONTROL SIN TRATAMIENTO Y CONTROL VEHÍCULO

En los cortes histológicos de pulmón de los grupos control sin tratamiento (fig 27) y control vehículo analizados se observó la histología normal de éste órgano: espacios alveolares limpios y bien distendidos, además de capilares ocupados por eritrocitos en los tabiques interalveolares y algunas fibras de colágena teñidas con el tricrómico de Massón. El epitelio que tapiza el tabique interalveolar, formado por neumocitos tipo I y tipo II de morfología normal.

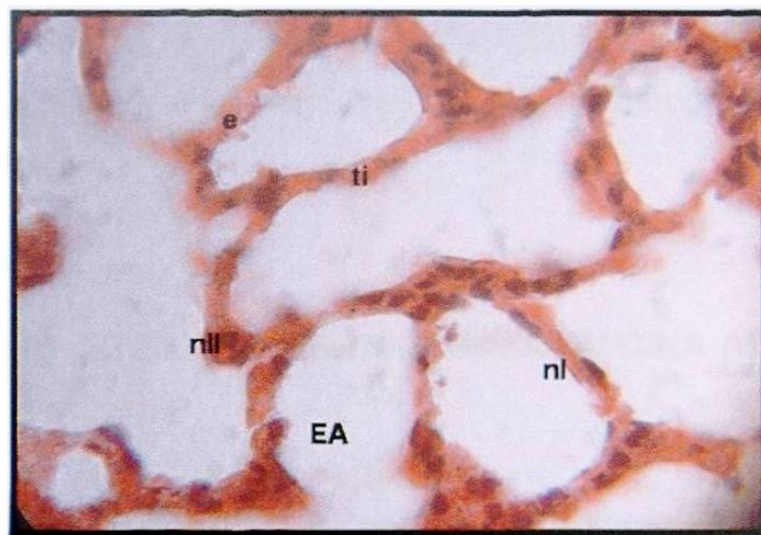


FIGURA 27. Pulmón de ratón del grupo: **Control sin tratamiento:** se observan espacios alveolares (EA), tabiques interalveolares (ti), neumocitos tipo I (nl), neumocitos tipo II (nll), y eritrocitos en los capilares (e). Microscopia de luz. Inclusión en parafina. Tricrómico de Massón. 1000 X.

3.1.3.1.2 GRUPO INTOXICADO CON PEROXISOMICINA A1, 4 HORAS DE EXPOSICIÓN.

En los cortes histológicos de pulmón se observaron núcleos de neumocitos I y II de tamaño variable y algunos presentaban zonas de condensación de cromatina perinuclear, pequeñas zonas hemorrágicas en los espacios interalveolares y un ligero engrosamiento del tabique interalveolar.

3.1.3.1.3 GRUPO INTOXICADO CON PEROXISOMICINA A1, 8 HORAS DE EXPOSICIÓN.

En éste tiempo en los cortes de pulmón se hace evidente la condensación de la cromatina en células sanguíneas y ocasionalmente en los núcleos de neumocitos I y II, además de condensación en el citoplasma y se aprecia material hialino en los espacios alveolares al parecer exudado junto con zonas hemorrágicas.

3.1.3.1.4 GRUPO INTOXICADO CON PEROXISOMICINA A1, 12 HORAS DE EXPOSICIÓN.

En los cortes de pulmón se observa incremento del daño descrito y la presencia de infiltrado celular: polimorfonucleares (PMN) y linfocitos que junto con los focos hemorrágicos ocupa casi la totalidad de algunos espacios alveolares.