

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

En el pulmón de los ratones del grupo intoxicado con Peroxisomicina A1 a 24 hrs de exposición (fig. 28) se observan abundantes PMN, linfocitos y zonas de hemorragia en los espacios alveolares, engrosamiento del tabique interalveolar, exudado, edema celular y cuerpos apoptóticos principalmente en células sanguíneas y ocasionalmente en los neumocitos I y II.

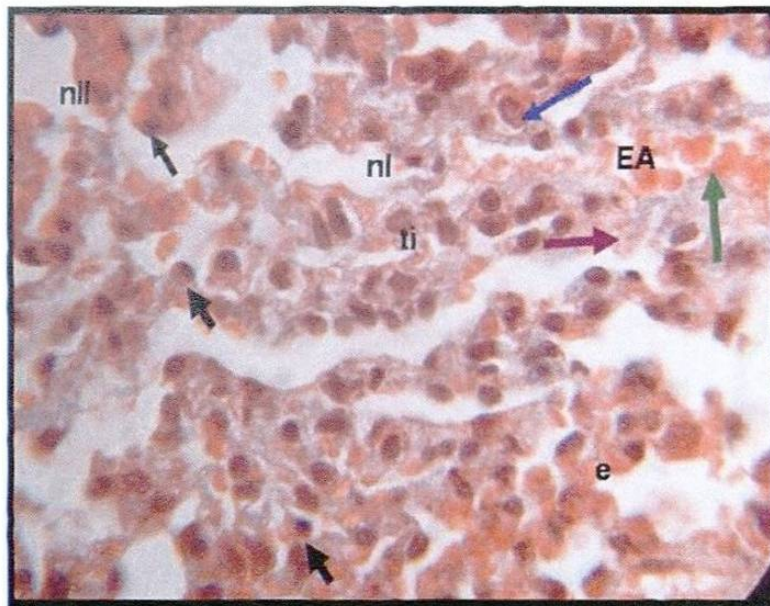


FIGURA 28. Pulmón de ratón del grupo: Intoxicado con Peroxisomicina A1, 24 horas de exposición: donde se observa infiltrado celular y hemorragia (flechas verdes) en el espacio alveolar (EA), tabiques interalveolares (ti), núcleos con cromatina condensada (flechas negras), condensación del citoplasma (flecha azul) y exudado (flecha morada), neumocitos tipo I (nl), neumocitos tipo II (nli), eritrocitos (e). Microscopia de luz. Inclusión en parafina. Tricrómico de Massón. 1000 X.

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

3.1.3.2.1 GRUPO CONTROL SIN TRATAMIENTO Y CONTROL VEHÍCULO

Los cortes histológicos de pulmón de los ratones de los grupos control sin tratamiento (fig 29) y control vehículo evaluados mediante la técnica de TUNEL mostraron resultados negativos para ésta técnica tanto en los núcleos de los neumocitos I y II como en las células sanguíneas y endoteliales de los capilares.

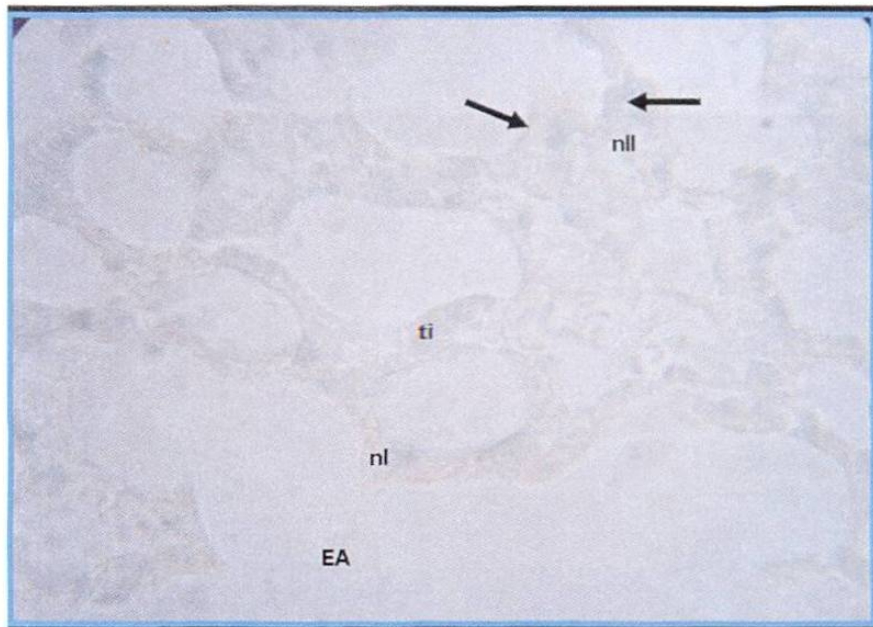


FIGURA 29. Pulmón de ratón del grupo. **Control sin tratamiento:** donde se observan núcleos negativos (flechas), espacios alveolares (EA), tabiques interalveolares (ti), neumocitos tipo I (nl), neumocitos tipo II (nll), eritrocitos en los capilares (e). Microscopia de luz. Inclusión en parafina. TUNEL, 1000 X.

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

En los cortes histológicos de pulmón de los ratones de los grupos Intoxicados con Peroxisomicina A1 a 4, 8, 12 y 24 horas de exposición se observaron resultados positivos en las células del parénquima pulmonar y células endoteliales que se incrementaron de manera gradual con respecto al tiempo.

Cabe destacar que en las muestras de pulmón del grupo intoxicado a 24 horas de exposición (fig. 30) se observaron núcleos positivos a la fragmentación de la cromatina en los neumocitos tipo I y tipo II así como en las células sanguíneas dentro de capilares.

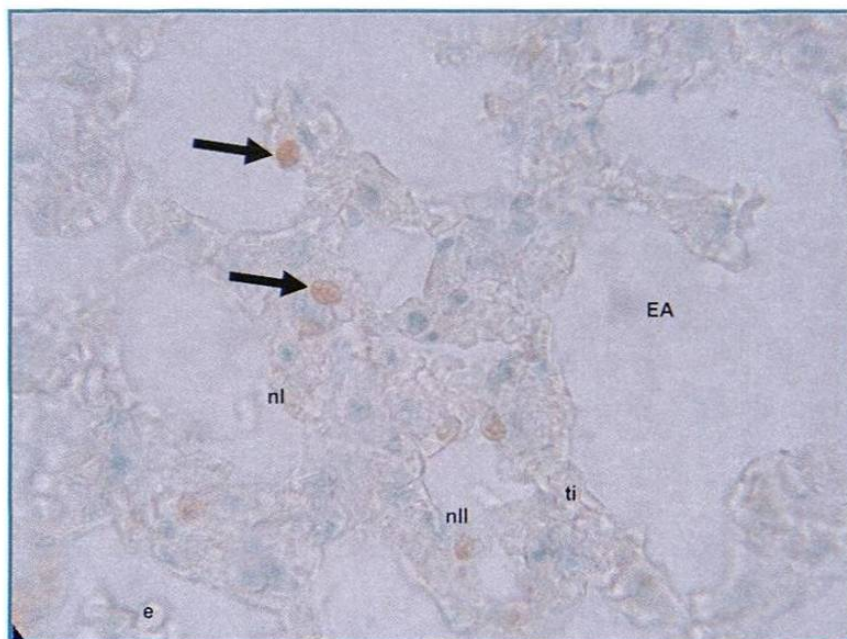


FIGURA 30. Pulmón de ratón del grupo: Intoxicado con Peroxisomicina A1, 24 horas de exposición: se observan núcleos positivos (flechas negras), espacios alveolares (EA) tabiques interalveolares (ti) neumocitos tipo I (nl), neumocitos tipo II (nll), eritrocitos en los capilares (e). Microscopía de luz. Inclusión en parafina. TUNEL, 1000 X.

3.1.3.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.

3.1.3.3.1 GRUPO CONTROL SIN TRATAMIENTO Y CONTROL VEHÍCULO

En el análisis ultraestructural del pulmón de los ratones de los grupos control sin tratamiento (fig 31) y control vehículo se observaron los espacios alveolares limpios y distendidos separados por tabiques interalveolares, además de capilares ocupados por eritrocitos y leucocitos, el epitelio que tapiza los tabiques interalveolares, formado por los neumocitos tipo I, con su morfología normal: células planas con núcleo aplanado y escasas mitocondrias, neumocitos tipo II de forma redondeada, núcleo redondo, cuerpos lamelares y numerosas mitocondrias.

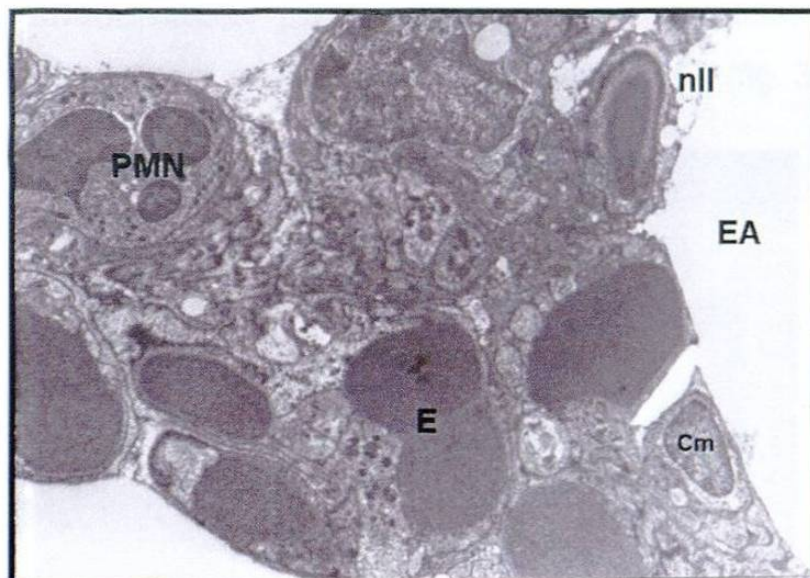


FIGURA 31. Pulmón de ratón del grupo: **Control sin tratamiento:** se observan espacios alveolares (EA), Polimorfonucleares (PMN) en el capilar, neumocitos tipo II (nII), célula mononuclear (Cm) y eritrocitos (E). Microscopía electrónica de transmisión. Inclusión en resinas epóxicas, contrastado con acetato de uranilo y citrato de plomo. 3150 X.

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

A 4 hrs se encontraron las alteraciones mitocondriales pre-apoptóticas en células sanguíneas (principalmente PMN) y ocasionalmente en los neumocitos I y II, zonas hemorrágicas en los espacios alveolares y ligero engrosamiento del tabique interalveolar con edema en el neumocito tipo.

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

En el pulmón de los ratones de éste grupo se observan abundantes PMN, linfocitos, hemorragia en los espacios alveolares, engrosamiento del tabique interalveolar, exudado, edema en neumocito I y célula endotelial, daño a la barrera alveolo-capilar y cuerpos apoptóticos en células sanguíneas (fig. 32) y ocasionalmente en los neumocitos I y neumocitos II (fig. 33).

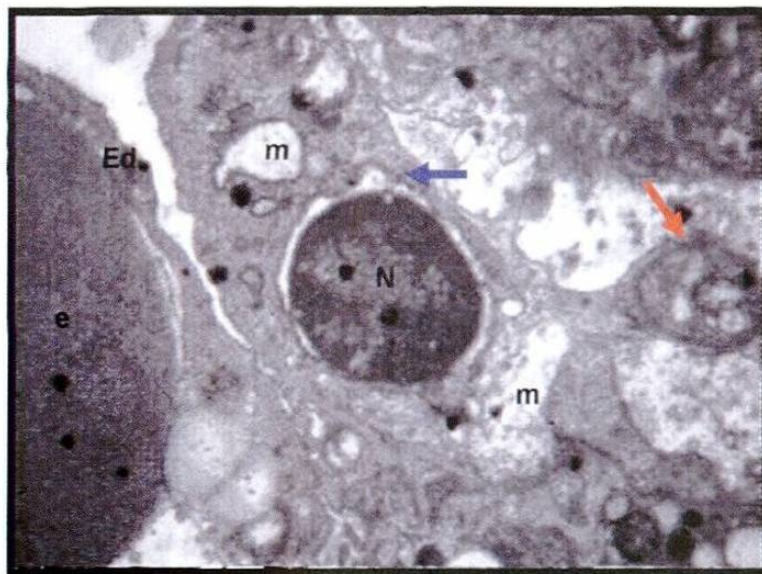


FIGURA 32. Pulmón de ratón del grupo: Intoxicado con Peroxisomicina A1, 24 horas de exposición: se observa un monocito con cromatina condensada (N), cisterna perinuclear dilatada (flecha azul), mitocondrias alteradas (m), cuerpo apoptótico (flecha roja), célula endotelial (ED) y eritrocito (e). Microscopia electrónica de transmisión. Inclusión en resinas epóxicas, contrastado con acetato de uranilo y citrato de plomo. 6000 X.

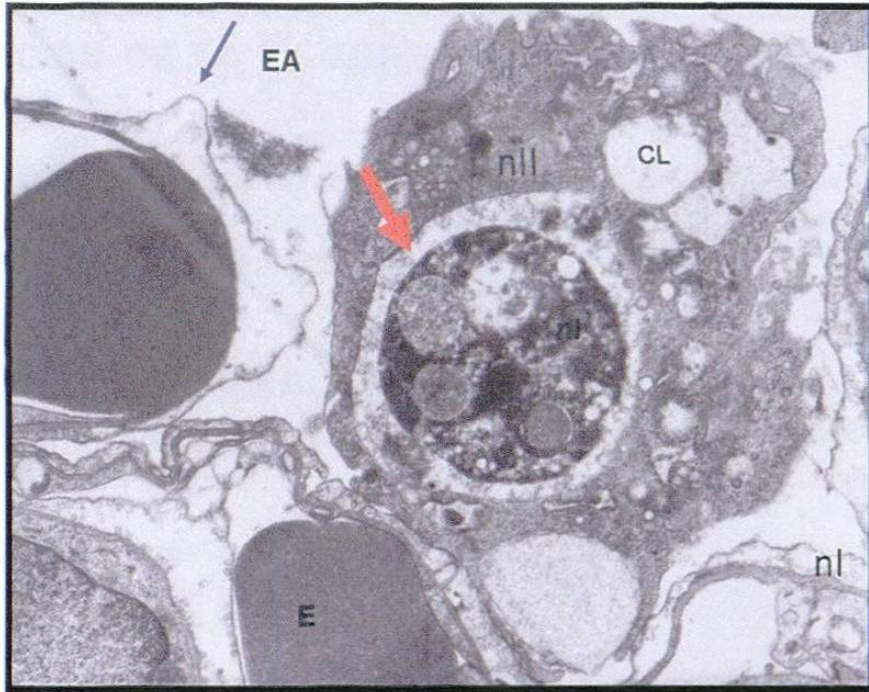


FIGURA 33. Pulmón de ratón del grupo: Intoxicado con Peroxisomicina A1, 24 horas de exposición: Se observa edema celular (flecha azul) del neumocito tipo I (nI), eritrocitos (E), neumocito tipo II (nII) con cuerpos lamelares (CL) y un gran cuerpo apoptótico (flecha roja). Microscopía electrónica de transmisión. Inclusión en resinas epóxicas, contrastado con acetato de uranilo y citrato de plomo. 6300 X.

3.2 ANALISIS BIOQUÍMICO.

3.2.1 DETECCIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN DEL DNA EN GELES DE AGAROSA.

Mediante éste método se evaluó la presencia de apoptosis en tejido de hígado, riñón y pulmón de ratón de los grupos control sin tratamiento, control vehículo e intoxicado con Peroxisomicina A1 a tiempos de 4, 8, 12 y 24 horas de exposición.

En el grupo experimental de PA1 se logró visualizar el patrón de escalera característico de la ruptura del DNA internucleosomal que ocurre durante el proceso de apoptosis.

El patrón en escalera del DNA se visualizó en geles de agarosa al 1.8 % conteniendo 0.4 $\mu\text{g/mL}$ de bromuro de etidio mediante un transiluminador de luz ultravioleta

En las figuras 34, 35 y 36 se muestran los resultados obtenidos para cada uno de los órganos analizados.

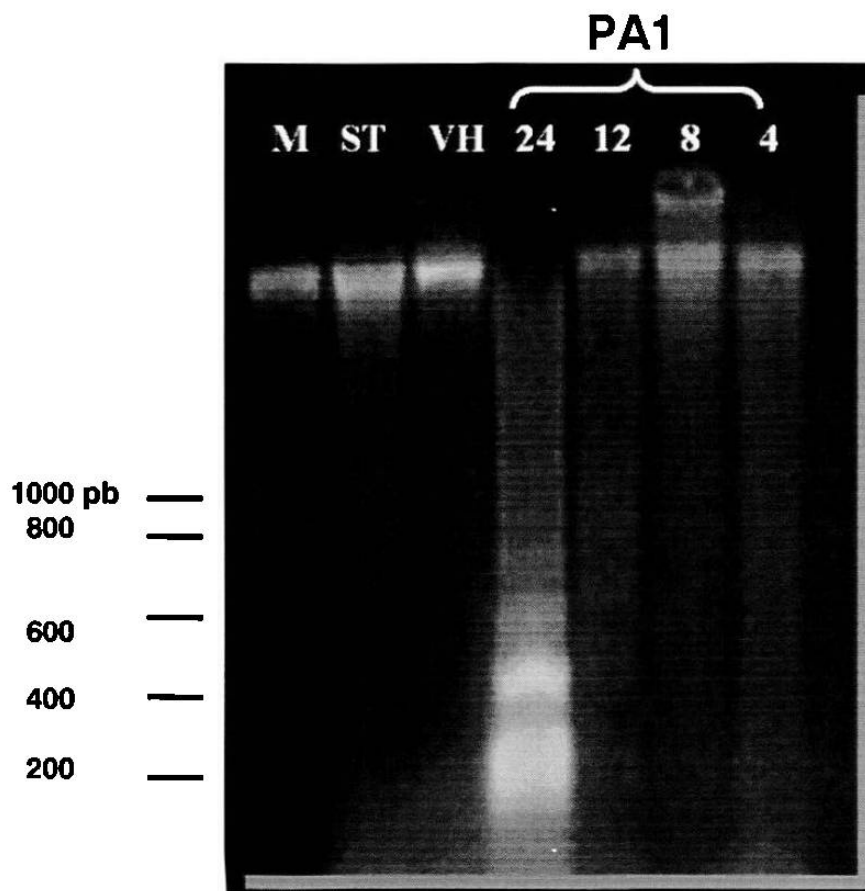


FIGURA 34. Fragmentación del DNA en HIGADO de ratón en cada uno de los grupos analizados. **M:** Marcador de peso molecular, **ST:** Sin tratamiento, **VH:** Vehículo 24 hrs; **PA1:** Intoxicados con Peroxisomicina A1 a los tiempos indicados. Obsérvese el DNA fragmentado en el grupo de 24 horas de exposición.

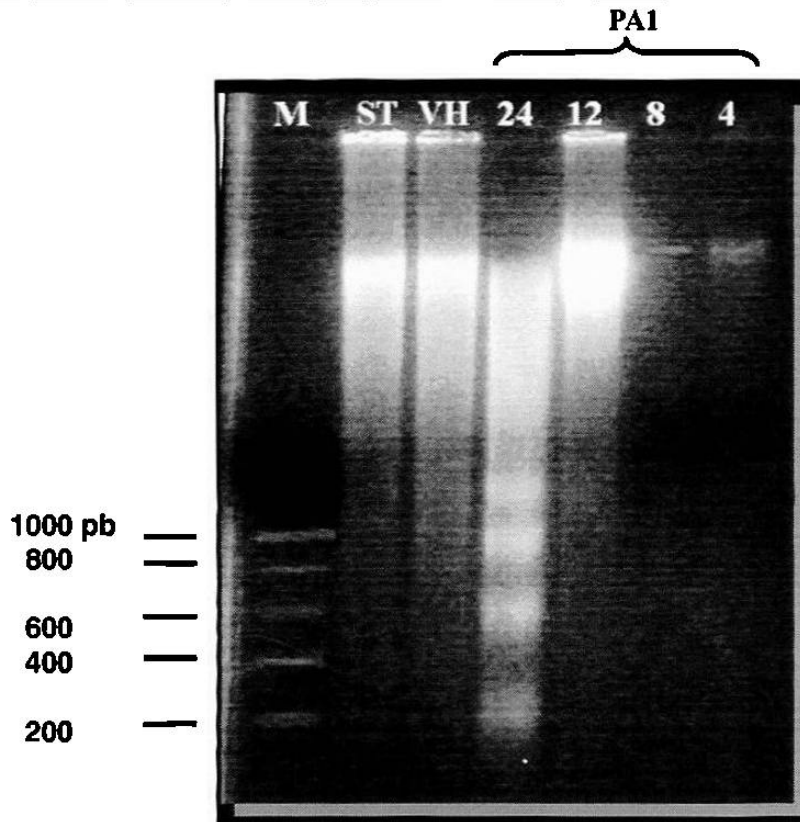


FIGURA 35. Fragmentación del DNA en RIÑÓN de ratón en cada uno de los grupos analizados. **M:** Marcador de peso molecular, **ST:** Sin tratamiento, **VH:** Vehículo 24 hrs; **PA1:** Intoxicados con Peroxisomicina A1 a los tiempos indicados. Obsérvese el DNA fragmentado en el grupo de 24 horas de exposición.

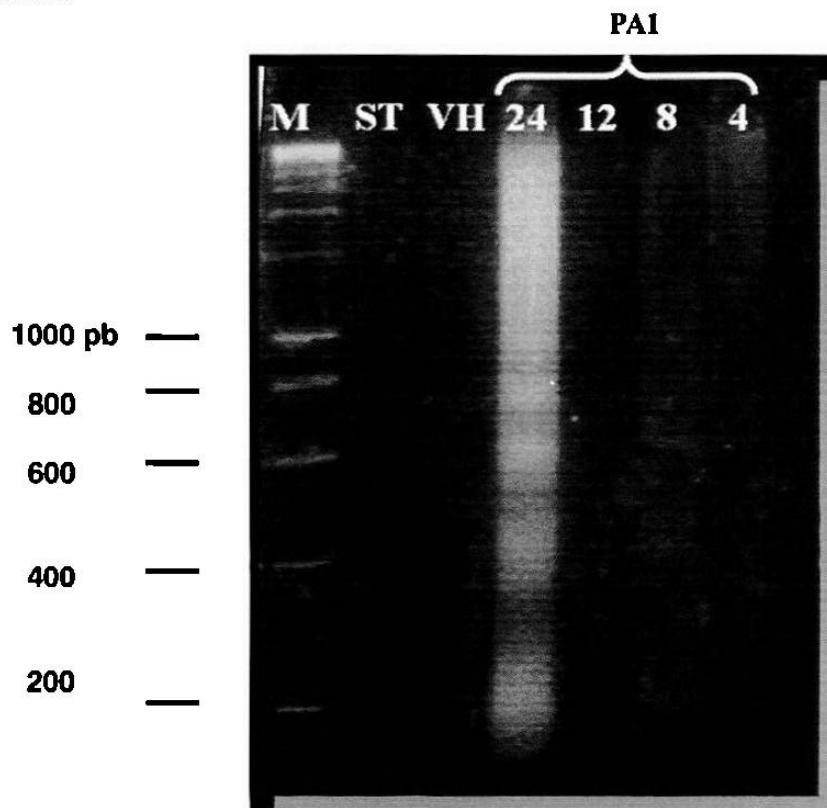


FIGURA 36. Fragmentación del DNA en PULMÓN de ratón en cada uno de los grupos analizados. **M:** Marcador de peso molecular, **ST:** Sin tratamiento, **VH:** Vehículo 24 hrs; **PA1:** Intoxicados con Peroxisomicina A1 a los tiempos indicados. Obsérvese el DNA fragmentado en el grupo de 24 horas de exposición.

3.2.2 CUANTIFICACIÓN DEL DNA FRAGMENTADO POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE.

Este método nos permitió evaluar la incidencia de apoptosis en hígado, riñón y pulmón de ratones intoxicados con PA1 a 24 horas de exposición mediante la determinación de la proporción de DNA fragmentado presente en las muestras empleando un método espectrofotométrico.

3.3 ANALISIS ESTADÍSTICO.

La cuantificación de la fragmentación del DNA mediante espectrofotometría se realizó por triplicado y los datos se sometieron a la prueba T de Student utilizando un grado de significancia de $p < 0.01$.

Los resultados de la cuantificación de DNA en hígado, riñón y pulmón se ilustran en la gráfica de barras mostrando la diferencia significativa entre cada uno de los órganos analizados (fig. 37).

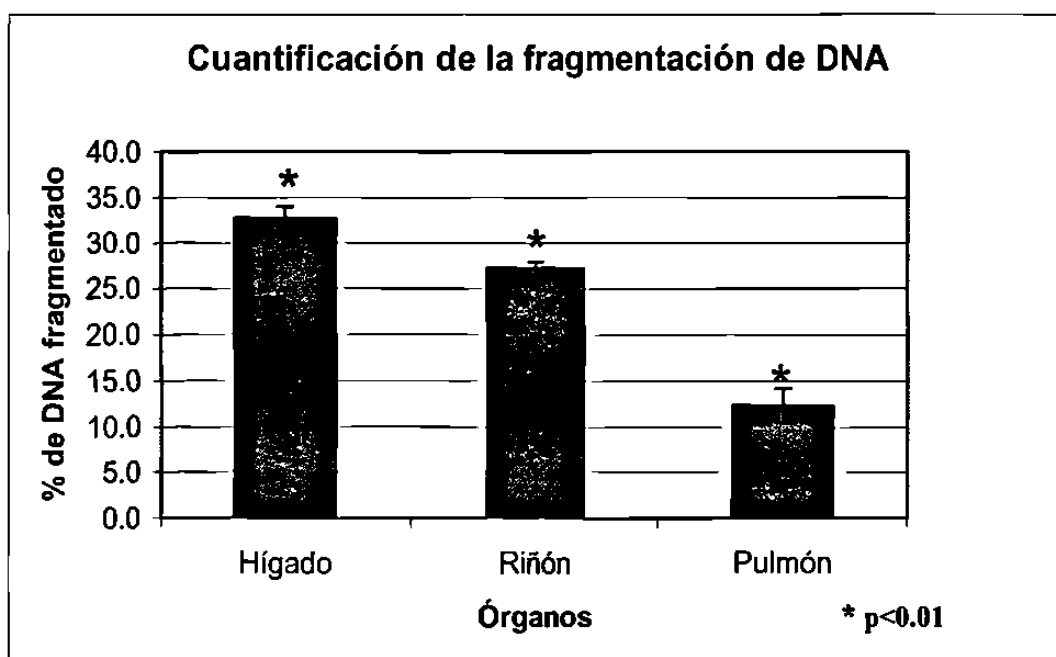


FIGURA 37. Resultados de la cuantificación de DNA en Hígado, Riñón y Pulmón de ratón del grupo Intoxicado con Peroxisomicina A1, 24 hrs de exposición.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

En base a los resultados del presente estudio se cumplió el 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."

Este estudio se realizó en un modelo *in vivo* analizando los órganos blanco para la Peroxisomicina A1: hígado, riñón y pulmón^{39,40} de ratones intoxicados con una dosis única de 2DL₅₀ de PA1 disuelta en aceite de cártamo, colectando éstos órganos a tiempos de 4, 8, 12 y 24 horas de exposición.

En los estudios morfológicos a microscopía de luz y microscopía electrónica de transmisión en hígado se confirmó la presencia de esteatosis, congestión vascular, hemorragia, pérdida de las uniones intercelulares, condensación del citoplasma, alteraciones morfológicas nucleares como condensación de la cromatina y aumento o disminución del tamaño nuclear, cuerpos autofágicos,⁵⁵ alteraciones mitocondriales y cuerpos apoptóticos.⁵³ Estas alteraciones se observaron a partir de las 4 horas y fueron incrementándose con el tiempo hasta las 24 horas posteriores a la intoxicación. Éstos hallazgos ya habían sido reportados en estudios previos realizados en un modelo *in vivo*.⁵³

Las alteraciones mitocondriales reportadas por Angermüller y cols.,²⁷ proponen que estas anteceden a la fragmentación de la cromatina y que representan un marcador temprano de la apoptosis. En el presente estudio observamos dichas alteraciones y un incremento con respecto al tiempo en la positividad a la fragmentación de la cromatina en las muestras de hígado, riñón y pulmón. Es por esto que se puede considerar que a partir de las 4 a 8 horas

ya se ha iniciado el proceso de apoptosis evidenciándose a las 24 horas de exposición por la presencia de abundantes cuerpos apoptóticos.

En el análisis histológico y ultraestructural de corteza y médula de riñón a 4, 8 y 12 hrs post-intoxicación se observaron las alteraciones sugestivas de apoptosis ya descritas y a partir de las 12 hrs se encontraron cuerpos apoptóticos. También se observó un daño generalizado sobre el epitelio de los túbulos de estas regiones con integridad de la membrana basal, pérdida de las microvellosidades, núcleos picnóticos y mitocondrias con extracción de la matriz en las células epiteliales a las 4 horas posterior a la intoxicación, estas alteraciones morfológicas han sido reportadas como marcadores de necrosis.⁵⁶

Los riñones además de regular líquidos corporales como la orina participan de manera importante en procesos de excreción de productos químicos o tóxicos del torrente sanguíneo como antibióticos, antimicóticos, analgésicos antipiréticos y cafeína⁵⁷ sobre los cuales se ha descrito que causan tanto apoptosis^{58,59} como necrosis⁶⁰ en el parénquima renal teniendo un efecto inicial importante sobre la barrera de filtración en el glomérulo, células mesangiales intraglomerulares y epitelio del túbulo proximal principalmente. Debido a dicha función los resultados obtenidos en nuestro estudio sugieren un efecto directo de la toxina sobre las estructuras de la corteza⁴⁵ y médula renal que resulta en una activación simultánea de necrosis y apoptosis por la PA1.

Además, en estudios recientes se ha propuesto que aunque necrosis y apoptosis son esencialmente dos tipos diferentes de muerte celular pueden tener limitados traslapes moleculares en una respuesta celular ante un compuesto tóxico a la misma dosis administrada y que la amplitud del daño que finalmente activará la apoptosis y la necrosis dependerá de factores toxicocinéticos, reconocimiento de receptores, bioactivación y lesión específica de cada tipo celular.⁶¹

Por otro lado en el análisis del pulmón a 4 horas post-intoxicación se observaron las alteraciones pre-apoptósicas ya descritas y a partir de las 24 horas se observaron alteraciones sugestivas de apoptosis y cuerpos apoptósicos en las células de la sangre principalmente y ocasionalmente en los neumocitos I y II, éstos resultados se correlacionan con los descritos por Ballesteros y cols.⁶² Además de lo anterior, a partir de 4 horas post-intoxicación se observó daño pulmonar, edema, abundante infiltrado celular, principalmente polimorfonucleares (PMN) y linfocitos, daño en la barrera alveolo-capilar y daño sobre los neumocitos I y II por la presencia de exudado y hemorragia en la luz alveolar. Estos hallazgos se correlacionan con los reportados en estudios previos^{63,64} realizados en ratones intoxicados con PA1 disuelta en solución salina, aceite de cártamo y haemaccel administrada vía i.p. e i.v. respectivamente en donde analizaron el suero y sobrenadante del homogenizado pulmonar a partir de 0.5 horas hasta 5 horas encontrando un valor elevado de TNFa, reportando la máxima concentración y mayor número de PMN a partir de 1-1.5 horas de exposición a la toxina, esto podría sugerir una posible relación entre los valores de TNFa y la presencia de apoptosis a tiempos posteriores, ya que existen estudios en los que se reporta que TNFa al ser liberado por monocitos y macrófagos en el torrente sanguíneo activa a los PMN que al ser activados expresan moléculas de adhesión que les permite unirse de forma firme al endotelio activado de los capilares pulmonares. Una vez que se adhieren al endotelio, los PMN inician el daño pulmonar directamente sobre la barrera alveolo-capilar.⁶⁵⁻⁶⁷ Además se ha demostrado que TNFa puede mostrar efecto en la inducción de apoptosis al desencadenar una cascada que conduce a la activación de proteínas intracelulares citosólicas y mitocondriales que participan de manera importante en los cambios pre-apoptósicos mitocondriales y en la formación de cuerpos apoptósicos,⁶⁸ de manera que se puede sugerir que liberación de TNFa pudiera estar involucrado en la activación de apoptosis inducida por la Peroxisomicina A1 en las células sanguíneas y ocasionalmente en las del parénquima pulmonar.

La evaluación del DNA fragmentado visualizado por un patrón en escalera de multímeros de ~200 pb en geles de agarosa,²⁹⁻³¹ demuestra que durante la apoptosis el DNA es fraccionado por la activación de endonucleasas, estos fragmentos fueron observados de manera muy clara en los tres órganos analizados a 24 horas de exposición a la PA1. Destaca en este estudio que en el análisis del riñón a las 24 horas de exposición se observó el patrón en escalera característico de apoptosis y una degradación del DNA característico de la necrosis, éste "barrido" del DNA en el gel es muestra de la degradación al azar atribuida a la necrosis causada por la liberación de enzimas lisosomales hidrolíticas³² confirmando con esto los hallazgos en los análisis histológicos y ultraestructurales mencionando que a 4, 8 y 12 horas de exposición este método no detectó los fragmentos.

Los resultados obtenidos en la cuantificación de DNA mediante métodos espectrofotométricos mostraron que la PA1 tiene un efecto mayor en la inducción de apoptosis sobre el hígado, en menor cantidad en el riñón y finalmente en el pulmón. Estos resultados confirman los hallazgos obtenidos con las técnicas o procedimientos antes descritos además sugieren que la inducción de apoptosis por la PA1 en mayor proporción en el hígado es debido al efecto metabólico de éste órgano sobre numerosos compuestos liposolubles entre ellos medicamentos como el acetaminofen⁶⁹ o compuestos tóxicos aromáticos como estireno además de terpenoides olefínicos como las antracenonas que pueden ser metabolizados a compuestos epóxidos⁷⁰ que pueden inducir la apoptosis en células hepáticas.⁷¹

Todo esto demuestra que en los órganos blanco de la PA1 se presenta una respuesta de apoptosis, aunque de intensidad variable y acompañada de necrosis en las células del riñón.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.

5.1 CONCLUSIONES.

1.- Se demuestra la inducción de apoptosis por una dosis tóxica de PA1 en riñón y pulmón presentándose con mayor intensidad en el riñón y menor en pulmón, sin embargo, la intensidad de apoptosis en estos órganos es menor a la que se presenta en el hígado.

2.- En las células de riñón además de presentarse la apoptosis, también se observó la presencia de necrosis.

5.2 PERSPECTIVAS.

1.- Se propone que el hígado del ratón intoxicado con PA1 puede utilizarse como modelo para el estudio de la apoptosis causada por PA1.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide –ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26: 239-257.
- 2.- Erickson G.F. (1997). Defining apoptosis: players and systems. *J. Soc. Gynecol. Invest.* 4: 219-228.
- 3.- Hickman J.A. (1992) apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer metastasis Rev* 11: 121-139.
- 4.- Eastman A. (1990) Activation of programmed cell death by anticancer agents: cisplatin as a model system. *Cancer cells* 2: 275-280.
- 5.- Majno G., Joris I. (1995) Review: apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol* 146: 3-15.
- 6.- Kerr J.F.R Gobe G.C., Winterfold C.M., Harmon B.V. (1995) Anathomical method in cell death. *Methods cell. Biol.* 46: 1-27.
- 7.- Villa P., Kaufmann S.C., Earnshaw W.C.(1997). Caspase and caspase inhibitors. *Trends Biochem Sci* 22: 388-392.
- 8.- Hengartner M.O.(1997). Apoptosis and the shape of death. *Dev Genet* 21: 245-248.
- 9.- Fraser A., Evan G. (1996) A licence to kill. *Cell* 85: 781-784.
- 10.- Cohen G.M.(1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Bio chem J* 326: 1-16.

- 11.- Mignote B, Vayssiere J.L.(1998) Mitochondria and apoptosis. Eur. J. Biochem. 252: 1-15.
- 12.- Engeland M van, Kuijpers H.J., Ramaeckers F.C., Reutelingsperger C.P., Schutte B.(1997). Plasma membrane alterations and cytoskeletal changes in apoptosis. Exp. Cell. Res. 235: 421-430.
- 13.- Kalayar C., Ord T., Testa M.P. Zhong L.T., Bredesen D.E. (1996). Cleavage of actin by interleukin 1 β -converting enzyme to reverse DNase I inhibition. Proc Natl Acad Sci USA 93: 2234-2238.
- 14.- Martín S.J., O'Brien G. A., Nishioka W.K., McGahon A.J., Mahboubi A., Saido T.C., Green D.R. (1995). Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis. J. Biol. Chem. 270: 6425-6428.
- 15.- Greidinger E.I., Miller D.K., Yamin T.T., Casciola-Rosen L., Rosen A.(1996). Secuencial activation of three distinct ICE-like activities in Fas-ligated Jurkat cells. FEBS Lett. 390: 299-303.
- 16.- McCarthy N.J., Whyte M.K., Gilbert C.S., Evan G.I. (1997). Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage, or the Bcl-2 homologue Bak. J. Cell Biol. 136: 215-227.
- 17.- Hengartner M.O.(2000). The biochemistry of apoptosis. Nature 407: 770-776
- 18.- Hockenberry ., Nuñez G., Milliman C., Schreiber R.D., Korsmeyer S.J. (1990) Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. Nature 348: 334-336.

- 19.- Renvoize C., Roger R., Moulian N., Bertoglio J. (1997) Bcl-2 expression in target cells leads to functional inhibition of caspase-3 protease family in human NK and lymphokine-activation killer cell granule-mediated apoptosis. *J. Immunol* 159:126-134.
- 20.- Vaux D.L., Cory S. and Adams J.M. (1988) Bcl-2 gen promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335: 440-442.
- 21.- Liu X., Kim C.N., Yang J., Jemmerson R. and Wang, X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts. Requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86:147-157.
- 22.- Susin S.A., Lorenzo H.K., Zamzami N., Marzo I., Show B.E., Brothers G.M., Mangion J., Jacotot E., Costantani P., Loeffler M. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis inducing factor. *Nature* 397: 441-446.
- 23.- Du C., Fang M., Li Y., Li L. and Wang X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*. 102:33-42.
- 24.-Verhagen A.M., Ekert P.G., Pakusch M., Silke R.J., Connolly L.M. Reid G.E., Moritz R.L., Simpson R.J. and Vaux D.L. (2000). Identification of DIABLO a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins *Cell*. 102: 43-53.
- 25.- Li L.Y., Lou X., Wang. (2001). Endonuclease G (Endo G) is an apoptosis DNase when released from mitochondria. *Nature* 412:95-99.

- 26.- Kerr, J.F.R., Winterford, C.M. and Harmon, B.V. Morphological Criteria for Identifying Apoptosis. (1994). Cell Biology: A Laboratory Handbook. Academic Press, Inc. págs. 319-329.
- 27.- Angermuller, S., Schuman J., Fahimi H.D., Tiede G. (1999) Ultrastructural alterations of mitochondria in pre-apoptotic and apoptotic hepatocytes of TNF-alpha-treated galactosamine-sensitized mice. Ann NY Acad. Sci. 887, 12-1748.
- 28.- Schmitz, G. (1991). Nonradiative labeling of oligonucleotides in vitro with the hapten digoxigenin by tailing with terminal transferase in Anal Biochem. 192:222-231.
- 29.-Compton M.M. (1992). A biochemical hallmark of apoptosis. Internucleosomal degradation of the genome. Cancer Metastasis. Rev. 11:105-119.
- 30.-Wyllie A.H. (1980) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. Nature 284:555-556.
- 31.- Arends M.J., Morris R.G., Wyllie A.H. (1990). Apoptosis: the role of the endonuclease. Am. J. Pathol 136: 593-608.
- 32.- Kerr J.F.R and Harmon B.V. (1991) Definition and incidence of apoptosis: a historical perspective. In Apoptosis: The Molecular Basis of Cell Death, pp.5-29, Tomei, I.D. and Cope F.O.(eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- 33.-Burton K.(1956). A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction of the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. Biochem J. 62: 315-321.

- 34.- Jian Guan,MD, Da-di Jin, Li-juan Jin and Qi Lu. (2002) Apoptosis in organs of rats in early stage alter polytrauma combined with shock. J. Trauma. 52: 104-111.
- 35.- Fernández Nava R.(1992). Nombres comunes, usos y distribución geográfica del género *Karwinskia* (*Rhamnaceae*) en México. Anales Inst. Biol. UNAM, Ser.Bot.63:1-3.
- 36.- Arellano E., Mendoza J.F., Domínguez F.J. (1994). Intoxicación por *Karwinskia johnstonii* Fernández estudio de 12 pacientes. Bol.Méd. Hosp.. Infant. Méx. 51: 105-112.
- 37.- Clavijero F.X. (1982). Plantas nocivas y extravagantes. En Manuel León Portilla (Editor), "Historia de la Antigua o Baja California", Editorial Porrúa, 3a. Edición.pp 31-33.
- 38.- Dreyer D.L., Arai I., Bachman C.D., Anderson W.R., Jr., Smith R.G., And Daves G.D., Jr. (1975) Toxins causing noninflammatory paralytic neuropathy.Isolation and structure elucidation.J.Am.Chem.Soc.97:4895-4890.
- 39.- Bermúdez M.V., Gonzalez-Spencer D., Guerrero M., Waksman N., and Piñeyro A.(1986). Experimental intoxication with fruit and purified toxins of buckthorn (*Karwinskia humboltiana*). Toxicon 24:1091-1097.
- 40.- Bermúdez M.V., Martinez F.J., Salazar M.E., Waksman N. and Piñeyro A.(1992) Experimental acute intoxication with ripe fruit of *Karwinskia humboltiana* (tullidora) in rat, guinea-pig, hamster, and dog. Toxicon.30:1493-1496.
- 41.- Sepúlveda-Saavedra J., González-Corona B., Taméz-Rodríguez V.A., Bermúdez de Rocha M.V.y Piñeyro-Lopez A. (1992).Ultraestructure of the lesion

induced by toxin T-514 isolated from *K.humboltiana* in the alveolar region of the lung. Proc. 50th Ann. Meet. EMSA. Bailey G.W., Bentley J., Small J.A. (Editors). Published by San Francisco press, Inc. pp 640-641.

42.- Taméz-Rodríguez V.A., Sepúlveda –Saavedra J., Bermúdez de Rocha M.V. y Piñeyro López, A. (1991). Autofagia de peroxisomas en el hígado de *macaco fascicularis* intoxicado con peroxisomicina A1 (T514). Memorias del IX Encuentro de Investigación Biomédica (Trabajo Mural). Facultad de Medicina, UANL.

43.- Piñeyro López A., González Guerrero J.F., Vidal Gutiérrez O., Lozano Meléndez F., Ancer Rodríguez J., Marfil Rivero., González Alanis R., y Piñeyro Garza E. (1992). Estudio Fase I de la T-514 (Peroxisomicina): Resultados clínicos. Memorias del IX Encuentro de Investigación Biomédica. Facultad de Medicina, UANL. Pp 159.

44.- Taméz Rodríguez V.A., Ancer-Rodríguez J., Sepúlveda-Saavedra J., Bermúdez de Rocha M.V., y Piñeyro López A. (1989). Cambios histopatológicos y ultraestructurales en riñón e hígado de *Macacus rhesus* producidos por la T-514 aislada de la *Karwinskia humboltiana* (tullidora). Memorias del VII. Encuentro Regional de Investigación Biomédica. Facultad de Medicina, UANL. pp18.

45.- Acosta García Ricardo (1995). Efecto de la T-514 del genero *Karwinskia* sobre la ultraestructura de los túbulos contorneados proximales del riñón *in vitro*. Tesis de maestría. Facultad de Medicina, UANL, México.

46.- Piñeyro L.A. (1990). Toxicidad selectiva *in vitro* de la toxina T 514 de la *Karwinskia humboltiana*. Tesis doctoral. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo Leon. Monterrey, N.L., México.

47.- Piñeyro A.(1995). European Patentblatt 95/48 (29.11.95) Patent number: 0467407.

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

49.- Patente Japonesa número 2651758, Coreana 202320. Canadiense 2047550. Mexicana 9100290.

50.- Sepúlveda Saavedra J., van der Klei I.J., Keizer I., Piñeyro López A., Harder W. And Venhuis M. (1992). Studies on the effect of toxin T-514 on the integrity of peroxisomes in methylotrophic yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* 91: 207-212.

51.- Lansiaux A., Laine W., Baldeyrou B., Mahieu Ch., Wattez N., Vezin H., Martinez F.J., Piñeyro A. and Bailly Ch. (2001). DNA topoisomerase II inhibition by peroxisomicine A1 and its radical metabolite induces apoptotic cell death of HL-60 and HL-60/MX2 human leukemia cells.*Chem. Res Toxicol*, 14: 16-24.

52.- Martínez F.J., Guo-Quing Zeng, Piñeyro A., Garza-Ocañas L., Tomei D. And Umansky S.R. (2001) Apoptosis induction and cell cycle perturbation in established cell lines by peroxisomicine A1 (T514). *Drug and Chemical Toxicology* 24(3):237-299.

53.- Santoyo Pérez M.E. (2002). Efectos de la peroxisomicina A1 sobre el hígado de ratón tratado con clofibrato. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México.

54.- Ballesteros-Elizondo, R.G., Santoyo Pérez M., Piñeyro-López A., Sepúlveda Saavedra J.(2002). Dosis tóxicas de Peroxisomicina A1 causan alteraciones pre-apoptósicas y apoptosis en el hígado del ratón albino. *Memorias del XX*

Congreso Nacional de Investigación Biomédica, Facultad de Medicina, UANL.,
pág S87.

55.- Moreno Martínez M.L. (2000). Efecto de la Peroxisomicina A1 sobre la autofagia de peroxisomas en el hígado de *Macaca fascicularis* en un modelo *in vitro*. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México.

56.- Searle J., Kerr J.F.R and Bishop C.J.(1982). Necrosis and Apoptosis:Distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Patol.Anuu.17*:229-259

57.- Rocha GM, Michea LF, Peters EM, Kirby M, Xu Y, Ferguson DR, Burg MB. (2001). Direct toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs for renal medullary cells. *Proc Natl Acad Sci U S A. 98*(9): 5317-5322.

58.- El Mouedden M, Laurent G, Mingeot-Leclercq MP, Taper HS, Cumps J, Tulkens PM. (2000) Apoptosis in Renal Proximal Tubules of Rats Treated with Low Doses of Aminoglycosides.*Antimicrob Agents Chemother. 44*(3): 665-675.

59.- Varlam DE, Siddiq MM, Parton LA, Rüssmann H. (2001). Apoptosis Contributes to Amphotericin B- Induced Nephrotoxicity. *Antimicrob Agents Chemother. 45*(3): 679-685.

60.- Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM. (1999). Aminoglycosides: Nephrotoxicity. *Antimicrob Agents Chemother. 43*(5): 1003-1012.

61.- Raffray M. and Cohen G.M. (1997). Apoptosis and Necrosis in Toxicology: A Continuum or Distinct Modes of Cell Death?. *Pharmacol.Ther.75*:No.3,pp.153-177.

- 62.- Ballesteros-Elizondo, R.G., Santoyo Pérez M., Piñeyro-López A., Sepúlveda Saavedra J. (2001). Efecto de la Peroxisomicina A1 sobre el pulmón de ratón albino CD-1 tratado con clofibrato. Memorias del XIX Congreso Nacional de Investigación Biomédica, Facultad de Medicina, UANL.
- 63.-Ballesteros Elizondo R.G (2000). Factor de Necrosis Tumoral α y granulocitos neutrófilos en la producción del síndrome de insuficiencia respiratoria del adulto causado por Peroxisomicina A1.Tesis Doctoral. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México.
- 64.- García Juárez J. (2004). Cuantificación de PMN, linfocitos y macrófagos alveolares en el pulmón del ratón albino tratado con una dosis tóxica de PA1 en haemaccel y su relación con el TNF α . Tesis de Maestría. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México.
- 65.- Zimmerman G. and Rezetti (1983) A. Functional and metabolic activity of granulocytes from patients with adult respiratory distress syndrome. *Am. Rev. Respir. Dis.* 127:290-300
- 66.- Chollet S., Montravers P., Gilbert C., Elbim C. and Desmots J. (1994) Relationship between polymorphonuclear neutrophils and cytokines in patients with adult respiratory distress syndrome. *Ann N. Acad. Sci.* 354-366.
- 67.- Sandborg R. and Smolen J., (1988) Early biochemical events in leukocyte activation. *Lab invest* 59(2):300-320.
- 68.- Ding W.X., and Yin X.M. (2004). Dissection of the multiple mechanism of TNF α induced apoptosis in liver injury. *J.Cell.Mol.Med.*Vol.8 No.4,pp 445-454.
- 69.- Gyamlani GG, Parikh CR. (2002). Acetaminophen toxicity: suicidal vs accidental. *Crit Care.* 6(2): 155-159.

70.- Argiriadi MA, Morisseau C, Hammock BD, Christianson DW. (1999) Detoxification of environmental mutagens and carcinogens: Structure, mechanism, and evolution of liver epoxide hydrolase. Proc Natl Acad Sci U S A. Sep 14; 96(19): 10637-10642.

71.- Chen J.K., Capdevila J., Harris RC. (2001). Cytochrome P450 Epoxygenase Metabolism of Arachidonic Acid Inhibits Apoptosis. Mol Cell Biol. Sep; 21(18): 6322-6331.

APENDICE A

A.1 Técnica para inclusión en resinas epóxicas.

- 1.- Fijar en Karnovsky-Ito a temperatura ambiente 30 min a 1 hora.
 - 2.- Lavar en buffer de cacodilatos 3 veces 5 min cada lavado.
 - 3.- Postifijar en tetraóxido de osmio 2% 30 min.
 - 4.- Lavar en buffer de cacodilatos 3 veces 5 min cada lavado.
 - 5.- Nitrato de uranilo acuoso 1% 30 min.
 - 6.- Lavar en buffer de cacodilatos 3 veces 5 min cada lavado.
 - 7.- Acetona 30% 5 min.
 - 8.- Acetona 50% 5 min.
 - 9.- Acetona 70% 5 min.
 - 10.- Acetona 90% 5 min.
 - 11.- Acetona 100% 3 veces por 5 min.
 - 12.- Acetona-Epón 1:1 1 hora o toda la noche.
- Dejar evaporar bajo campana de extracción por 4 hrs o hasta que la resina se vuelva mas viscosa.
- 13.- Epón puro 1 hr.
 - 14.- Inclusión y polimerización de 12 a 72 hrs a 60°C.

Se preparan dos tipos de cortes:

A) Semifinos: de aproximadamente 350 μm de grosor, se montan en un portaobjetos y se tiñen con azul de toluidina y se analizan mediante microscopia de luz.

B) Finos: de aproximadamente 100 nm de grosor y se contrastan con soluciones acuosas de acetato de uranilo al 5% y citrato de plomo al 0.4% para el análisis ultraestructural.

A.2 Técnica Histológica para muestras embebidas en parafina.

- 1.- Obtención de la muestra.
- 2.- Fijación con formaldehído al 4 %.
- 3.- Lavado en agua corriente.
- 4.- Deshidratación en alcoholes graduales 60 – 100 %.
- 5.- Aclaración con xilol.
- 6.- Preinclusión (impregnación en parafina).
- 7.- Inclusión definitiva para la formación del bloque.
- 8.- Microtomía.
- 9.- Adhesión de los cortes en baño de flotación.
- 10.- Desparafinar e hidratar.
- 11.- Coloración o Tinción.
- 12.- Deshidratación y aclaración.
- 13.- Montaje con resina sintética.

A.3 Tinción con Hematoxilina y eosina (H y E).

- 1.- Desparafinar con xilol 5 min.
- 2.- Etanol-Xilol 5 min.
- 3.- Etanol absoluto 2 min.
- 4.- Alcohol etílico 96° 2 min.
- 5.- Agua destilada, enjuague lento.
- 6.- Hematoxilina de Gill, 2 min.
- 7.- Agua de la llave (2 lavados), enjuague lento.
- 8.- Alcohol Ácido, 1 inmersión rápida.
- 9.- Agua de la llave (2 lavados), enjuague lento.
- 10.- Agua amoniaca 2 inmersiones rápidas.
- 11.- Agua de la llave (2 lavados), enjuague lento.
- 12.- Agua destilada, enjuague lento.
- 13.- Eosina 6 inmersiones.
- 14.- Alcohol etílico 96° enjuague breve.
- 15.- Alcohol etílico 96° 1 min.
- 16.- Etanol absoluto (2 cambios) 2 min.
- 17.- Etanol-Xilol 3 min.
- 18.- Xilol 2 min.
- 19.- Xilol 3 min.
- 20.- Montaje con resina sintética o Entellan.

A.4 Tricrómico de Massón.

Fijación.- formaldehído al 4 %

Inclusión.- En parafina y cortes de 5 µm de espesor.

- 1.- Desparafinar con xilol e hidratar pasando por alcohol y agua destilada.
- 2.- Usar como "mordente" el fijador de Bouin por 30-60 min a 56 °C, o toda la noche a temperatura ambiente.
- 3.- Lavar en agua corriente hasta que el color amarillo desaparezca.
- 4.- Enjuagar los cortes en agua destilada.
- 5.- Pasar los cortes a la hematoxilina Férrica de Weigert durante 10 min.
- 6.- Lavar en agua corriente, 5 min o hacer 3 cambios de 15 seg.
- 7.- Enjuagar en agua destilada.
- 8.- Teñir con la solución de Fucsina-Escarlata por 5 seg (el tiempo depende de la calidad y/o concentración y tiempo de uso o de preparación del colorante).
- 9.- Lavar varias veces en agua destilada hasta que ésta deje de teñirse.
- 10.- Pasar los cortes a la solución de ácidos Fosfomolibdico-Fosfotúngstico durante 10 min. Enjuagar brevemente con agua destilada.
- 11.- Colorear con la solución de Azul de Anilina durante 15 seg (el tiempo depende de la calidad y/o concentración y tiempo de uso del reactivo).
- 12.- Lavar con agua destilada varias veces hasta eliminar el exceso del colorante.
- 13.- Pasar al acético acuoso por 1-2 min.

- 14.- Deshidratar en alcohol de 96° por unos seg (cuidar que no se decolore).
- 15.- Continuar con el alcohol absoluto hasta acarar en xilol y montar en resina.

A.5 MÉTODO INMUNOHISTOQUÍMICO PARA DETECTAR LA FRAGMENTACIÓN DE LA CROMATINA UTILIZANDO TUNEL.

Para cortes fijados con formaldehído al 4 % y embebidos en parafina y cortes de 6 μm .

I.- DESPARAFINAR:

- 1.- Colocar los cortes en estufa a 57°C, 5 min.
- 2.- Pasar cortes a 2 cambios de xilol 5 min c/u.
- 3.- Hidratar en alcoholes graduales 100%, 95 % y 70%, 5 min c/u.
- 4.- Sumergir en PBS 1 X, 2 cambios 5 min c/u.

NO PERMITA QUE LOS CORTES SE SEQUEN.

II.- PROTOCOLO DEL KIT

- 1.- Sumergir las muestras en PBS 1 X 10 min a Temperatura Ambiente (TA).
* Secar cuidadosamente alrededor de la muestra.
- 2.- Cubrir con 50 μL /muestra de solución de proteinasa K, incubar de 15 a 30 min. a 37°C.
- 3.- Lavar 2 veces en agua desionizada 2 min c/u.
- 4.- Sumergir las muestras en solución bloqueadora por 5 min (NO más) a TA
- 5.- Lavar las muestras en PBS 1 X, 1 min.
- 6.- Sumergir en Buffer TdT 1 X, 5 min.
- 7.- Cubrir la muestra con 50 μL de mezcla de reacción de marcaje e incubar de 30 a 60 min. a 37°C en cámara húmeda.
- 8.- Sumergir en Buffer Stop TdT 1 X, 5 minutos a temperatura ambiente
- 9.- Lavar 2 veces en PBS 1X 2 min c/u a TA.
- 10.- Cubrir la muestra con 50 μL de solución Strep-HRP e incubar 10 min. 37 °C
- 11.- Lavar 2 veces en PBS 1X 2 min c/u.
- 12.- Sumergir en solución de DAB de 2 a 7 min.
- 13.- Lavar en varios cambios de agua desionizada 2 min c/u.

III.- CONTRATINCIÓN:

- 1.- Sumergir las muestras en agua desionizada por 2 min.
- 2.- Sumergir las muestras de 5 segundos a 5 min. en verde de metilo.
- 3.- Lavar las muestras subsecuentmente sumergiéndolas 10 veces en cada uno:
 - Agua desionizada.
 - Etanol 70 %, 2 cambios.
 - Etanol 95 %, 2 cambios.
 - Etanol 100 %, 2 cambios.
 - Xilol 2 cambios.
- 4.- Limpie el exceso de xilol
- 5.- Montar y almacenar en oscuridad.

A.6 DETECCIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN DE DNA MEDIANTE GELES DE AGAROSA.

* Después del sacrificio, cada órgano es tratado con 3 strokes de un homogenizador en buffer frío.

- 1.- Centrifugar el homogenizado a 27000 x g por 20 min.
- 2.- Remover las proteínas del sobrenadante por extracción con fenol-cloroformo hasta que la interfase este clara.
- 3.- Después del tratamiento con RNAsa libre de DNAsa por 30 min a 37 °C, una extracción final es colectada.
- 4.- Precipitar el DNA por la adición de 2 volúmenes 100% etanol.
- 5.- Centrifugar por 10 min a 5000 x g.
- 6.- Enjuagar la pastilla con etanol 70% y se deja secar.
- 7.- Resuspender la pastilla en buffer Tris-EDTA 1 X (TE) a 4 °C.
- 8.- Combinar con buffer de carga.
- 9.- Las muestras se someten a electroforesis en gel de agarosa al 1.8 % con 1 µg/mL de bromuro de etidio en buffer TBE 1X a 60 V/cm por 1 hora.
- 10.- El DNA es visualizado en un transiluminador de luz ultravioleta y fotografiado.

A.7 CUANTIFICACIÓN MEDIANTE MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS LA FRAGMENTACIÓN DEL DNA.

* Después del sacrificio, cada órgano es tratado con 3 strokes de un homogenizador en buffer frío.

- 1.- Centrifugar el homogenizado a 27000 x g por 20 minutos.
- 2.- Colectar el sobrenadante (que contiene el DNA fragmentado soluble) y la pastilla (conteniendo DNA genómico, suspendido en buffer TE).
- 3.- Añadir ácido perclórico a la muestra a una concentración final de 0.5 N.
- 4.- Hidrolizar la muestra a 70 ° C por 70 min.
- 5.- Enfriar a 4 ° C por 5 min.
- 6.- Centrifugar por 6 minutos a 4000 x g a 4 ° C para remover las proteínas.
- 7.- Colectar los sobrenadantes
- 8.- Realizar la reacción con el reactivo de difenilamina (DPA) mezclando dos volúmenes de DPA con el sobrenadante y la pastilla.
- 9.- Incubar la mezcla a 30 ° C por 18 hrs.
- 10.- Medir la absorbancia a 595 nm y 650 nm.
- 11.- Obtener la diferencia entre absorbancias (595 nm -650 nm).
- 12.- Interpolar en la curva de calibración de DNA.

APENDICE B

SOLUCIONES:

B.1 ANALISIS MORFOLÓGICO.

B.1.1 Formaldehído 4 %

* Para preparar 500 ml

Paraformaldehído	20 grs
Agua destilada	450 mL

* Calentar a 60 °C por 30 minutos

PBS 10X	50 mL
---------	-------

Ajustar pH a 7.2
Almacenar a 4 °C.

B. 1.2 PBS 10 X

NaCl	8 grs.
KCl	0.2 grs.
Na ₂ HPO ₄	1.44 grs.
KH ₂ PO ₄	0.24 grs.

B. 1.3 Fijador de Karnovsky- Ito.

Solución madre.

Paraformaldehído	16 grs.
Agua bidestilada	400 mL

* Calentar cerca del punto de ebullición y agregar varias gotas de hidróxido de sodio para quitar la turbidez.

Solución de trabajo:

Solución madre	400 mL
Buffer de cacodilatos 0.1 M pH 7.4	400 mL
Glutaraldehido 25 %	32 mL
Ácido pícrico	0.08 grs.

B. 1.4 Glutaraldehído 2.5 %

Glutaraldehído 25 %		10 mL
Buffer de cacodilatos	0.1 M pH 7.4	90 mL

B. 1.5 Buffer de Cacodilatos 0.1 M pH 7.4

Solución A		
Cacodilato de Sodio		4.28 grs.
Agua destilada		100 mL

Solución B		
Ácido Clorhídrico		0.5 mL
Agua destilada		25 mL

<u>Solución de trabajo</u>		
Solución A		100 mL
Solución B		5.4 mL

Aforar a 200 mL con agua destilada.

B. 1.6 Tetraóxido de osmio 2 %

Tetraóxido de osmio		1 gr.
Buffer de cacodilatos	0.1 M pH 7.4	50 mL

B 1.7 Nitrato de uranilo acuoso 1%

Nitrato de uranilo		1 grs.
Aforara a 100 mL		

B. 1.8 Resina epóxica

En este estudio se preparó resina epóxica MEDIA

Resina		23.8 mL (29 gr)
DDSA		16.0 mL(16 gr)
NMA		11.5 mL (14.3 gr).
DMP 30		1 mL (1 gr).

B. 1.9 Azul de Toluidina 5 %

Borato de sodio (Borax)		5 grs.
Agua destilada		100 mL

* Se calienta hasta que se disuelva completamente

Azul de toluidina 1 grs.

* Se agrega la solución de borato de sodio, se agita para disolver y se filtra.

B. 1.10 Acetato de uranilo 5 % en alcohol etílico 50 %

Acetato de uranilo 0.5 grs.

Alcohol etílico 50 % 10 mL

* Se guarda en refrigeración y se protege de la luz con papel aluminio.

B. 1.11 Citrato de plomo 0.4 %

Citrato de plomo 0.04 grs.

Agua destilada 10 mL

Se añaden unas gotas de hidróxido de sodio 1N hasta disolver.

B. 1.12 Hematoxilina de Gill.

Agua destilada 730 mL

Etilenglicol 250 mL

Hematoxilina anhidra (polvo) 2.0 grs.

* Si está en cristales pesar 2.36 grs.

Yodato de Sodio 0.2 grs.

Sulfato de aluminio 17.6 grs.

Ácido acético glacial 2.0 mL

* Para la preparación se debe seguir el orden, en agitación, a temperatura ambiente por 1 hora, filtrar antes de usar por primera vez.

B. 1.13 Eosina.

Solución stock (concentrada):

Eosina amarillenta 1.0 grs.

Agua destilada 20 mL

Alcohol del 96° 80 mL

Solución de trabajo:

Tomar una parte de la solución stock y agregarla en tres parte de alcohol de 80°. Antes de usar agregar 0.5 mL de ácido acético glacial, por cada 100 mL de colorante preparado y agitar.

B. 1.14 Solución de Alcohol-Ácido (Diferenciador o decolorante).

Alcohol de 70°	99 mL
Ácido Clorhídrico (HCl)	1 mL

B. 1.15 Solución de Agua Amoniacal (Virador).

Agua destilada	99 mL
Hidróxido de Amonio	1 mL

B. 1.16 Hematoxilina Férrica de Weigert

Solución A

Hematoxilina (anhidra)	1 gr.
Alcohol de 96°	100 mL

Solución B

Cloruro férrico acuoso al 29 %	4 mL
Agua destilada	95 mL
Ácido clorhídrico conc.	1 mL

Solución de trabajo:

Mezclar partes iguales de las soluciones A y B. (Debe renovarse periódicamente dependiendo del uso y de consistencia, con el tiempo suele precipitarse).

*** Solución acuosa de Cloruro Férrico**

Cloruro férrico	14.5 grs.
Agua destilada	50 mL

B. 1.17 Solución de Fucsina ácida y Escarlata de Biebrich.

Escarlata de Biebrich acuosa al 1 %	90 mL
Fucsina ácida acuosa al 1 %	10 mL
Ácido acético glacial	1 mL

*** Solución acuosa de escarlata de Biebrich**

Escarlata de Biebrich	1 gr
-----------------------	------

Agua destilada	100 mL
* Solución acuosa de Fucsina ácida	
Fucsina ácida	1 gr
Agua destilada	100 mL

B.1.18 Solución de Ácidos Fosfomolibdico y Fosfotúngstico.

Ácido Fosfomolibdico	5 grs
Ácido Fosfotúngstico.	5 grs.
Agua destilada	200 mL

B 1.19 Solución de Azul de Anilina

Azul de anilina	2.5 grs
Agua destilada	100 mL
Ácido acético glacial	2 mL

B.1.20 Solución acuosa de Ácido Acético al 1%.

Ácido acético glacial	1 mL
Agua destilada	99 mL

B. 1.21 Solución Fijadora de Bouin

Solución acuosa saturada de ácido pícrico	75 mL
Formaldehído (36-38 %)	25 mL
Ácido acético glacial	5 mL

B. 2 INMUNOHISTOQUÍMICA (TUNEL).

La técnica de TUNEL se determinó utilizando el kit de Trevigen®, las soluciones marcadas con * se deben preparar no más de 30 minutos antes de usarse.

*** B. 2.1 Solución de proteinasa K.**

	2 muestras	4 muestras	10 muestras
Agua desionizada	100 µL	200 µL	500 µL
Proteinasa K	2 µL	4µL	10 µL

*** B. 2.2 Solución bloqueadora:**

Metanol	45 mL
Peróxido de Hidrógeno 30%	5 mL

B. 2.3 Solución de Buffer de marcaje TdT 1 X

- Diluir el buffer TdT 10 X utilizando agua destilada.
- Use 50 mL de Buffer TdT 1 X para procesar de 1 a 10 muestras
- Separe una alícuota de 50 µL por muestra para preparar la mezcla de reacción de marcaje (paso 7), y almacenar en hielo

*** B. 2.4 Mezcla de Reacción de Marcaje**

- Descongele la mezcla de TdT y dNTP a TA, colóquela en hielo
- Para mantener la actividad óptima de la enzima saque del refrigerador el tubo de la enzima solo el tiempo necesario para tomar el volumen.
- Mantenga la mezcla en hielo.
- Prepare 50 µL por muestra de la manera siguiente:

	2 muestras	4 muestras	10 muestras
Mezcla de TdT dNTP	2 µL	4 µL	10 µL
Stock Catiónica 50 X	2 µL	4µL	10 µL
Enzima TdT	2 µL	4µL	10 µL
Buffer de marcaje TdT 1X	100µL	200µL	500 µL

B. 2.5 Buffer Stop TdT 1X

- Diluir el buffer stop TdT 10 X utilizando agua destilada, almacenar a temperatura ambiente.
- Use 50 mL de buffer stop TdT 1 X para procesar de 1 a 10 muestras.

Buffer Stop TdT 1X	5 mL
Agua desionizada	45 mL

*** B. 2.6 Solución Strep-HRP**

- Use 50 µL Solución Strep-HRP por muestra
- Almacene la solución a temperatura ambiente.
- Para preparar añada:

	2 muestras	4 muestras	10 muestras	
PBS 1 X	100 µL	200 µL	500 µL	
Strep-HRP	2 µL	4µL	10 µL	

*** B. 2.7 Solución de DAB .**

- Descongele DAB a 37 °C. Almacene a temperatura ambiente **NO** en hielo, precipita la solución DAB.
- Prepare la solución no más de 30 minutos antes de usarla.
- Use 50 mL de solución DAB para procesar de 1 a 10 muestras.
- Para preparar añada:

PBS 1 X	50 mL
DAB	250 µL
H ₂ O ₂ 30%	50 µL

B. 2.8 Verde de metilo 1 %

- Esta listo para usarse, Puede re-usarse, almacene en recipiente cerrado, si precipita, filtre.

B. 2.9 CONTROL POSITIVO:

TACS-Nucleasa y Buffer

Buffer de marcaje TdT 1X	50 µL
Mezcla de TdT dNTP	1 µL
Stock Catiónica 50 X	1 µL
Enzima TdT	2 µL
TACS-Nucleasa	1 µL

B. 2.10 CONTROL NEGATIVO:

- Sustituir la enzima TdT de la mezcla por agua milliq.

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).

* Preparar 50 mL

NaHPO ₄ (1M)	2.5 mL
NaH ₂ PO ₄ (1M)	2.5 mL
NaCl (1M)	6 mL
EDTA (0.5M)	1 mL

Aforar a 50 mL con Agua milliq.

B.3.2 SEVAGE

Cloroformo	24 mL
Alcohol isoamílico	1 mL

B.3.3 RNAsa libre de DNAsa (a concentración de 200 µg/mL).

A partir de una solución de trabajo de 10 µg/µL, adicionar 20 µL.

B.3.4 Buffer Tris-EDTA 1 X (Tris-HCl 10 mM/L, pH 8.0 y EDTA 1 mM/L) a 4 °C.

* Preparar 50 mL

Tris-HCl 1 M pH 7.5	500 µL
EDTA 0.5 M pH 8.0	100 µL
Agua milliq.	49.4 mL

B.3.5 Buffer de carga (jugo azul).

Xilencianol	30 mg
Bromofenol	30 mg
Agua milliq	12 mL
Glicerol	3.6 mL

B.3.6 Buffer TBE 10 X (Tris 89 mM/L, Borato 89 mM/L y EDTA 2 mM/L, pH 8.0)

Trizma base	108 grs.
Acido bórico	55 grs.
EDTA 0.5 M pH 8.0	40 mL

* Ajustar pH a 8.0 y aforar a 1000 mL

B.3.7 Ácido Perclórico (HClO₄) 10 N.

*Preparar 25 mL

P.M. 88 u.m.a	
HClO ₄	2.840 mL
Aforar a 25 mL con agua milliq.	

B.3.8 Reactivo de Difenilamina (DPA).

*Preparar 100 mL, almacenar en oscuridad y frasco ámbar.

Difenilamina	1.5 grs.
Acido Acético glacial	100 mL
Acido Sulfúrico	1.5 mL

* 1 mL de stock de acetaldehído, 16 mg/mL, es añadido a 100 mL de la solución de difenilamina antes del ensayo.

B. 3.9 Stock de acetaldehído (C₂H₄O) 16 mg/mL

*Preparar 25 mL, almacenar en oscuridad y frasco ámbar.

P.M. 44.05 u.m.a

I= 0.788 gr/mL

C₂H₄O

0.507 mL

Aforar a 25 mL con agua milliq.

B.3.10 Hidróxido de Sodio (NaOH) 1M

*Preparar 25 mL

P.M. 40 u.m.a

NaOH

1 gr.

Aforar a 25 mL con agua milliq.

B.4 CURVA DE CALIBRACIÓN

A partir de una solución patrón concentrada de 11.475 µg/mL de DNA se preparó la siguiente curva de calibración.

Tabla 2 Volúmenes, lecturas de absorbancia y diferencias de la curva de calibración

Conc. DNA (µg)	Stock DNA µL	DPA+Acet. µL	Agua µL	595 nm	650 nm	Diferencia
0.06	5.228	10.456	984.31	0.001	0.004	-0.003
0.08	6.971	13.942	979.0	0.03	0.026	0.004
0.1	8.714	17.429	973.85	0.038	0.032	0.006
0.12	10.457	20.914	968.62	0.249	0.241	0.008
0.14	12.200	24.400	963.39	0.07	0.059	0.011
0.18	15.686	31.372	952.94	0.464	0.448	0.016
BLANCO		10	990			

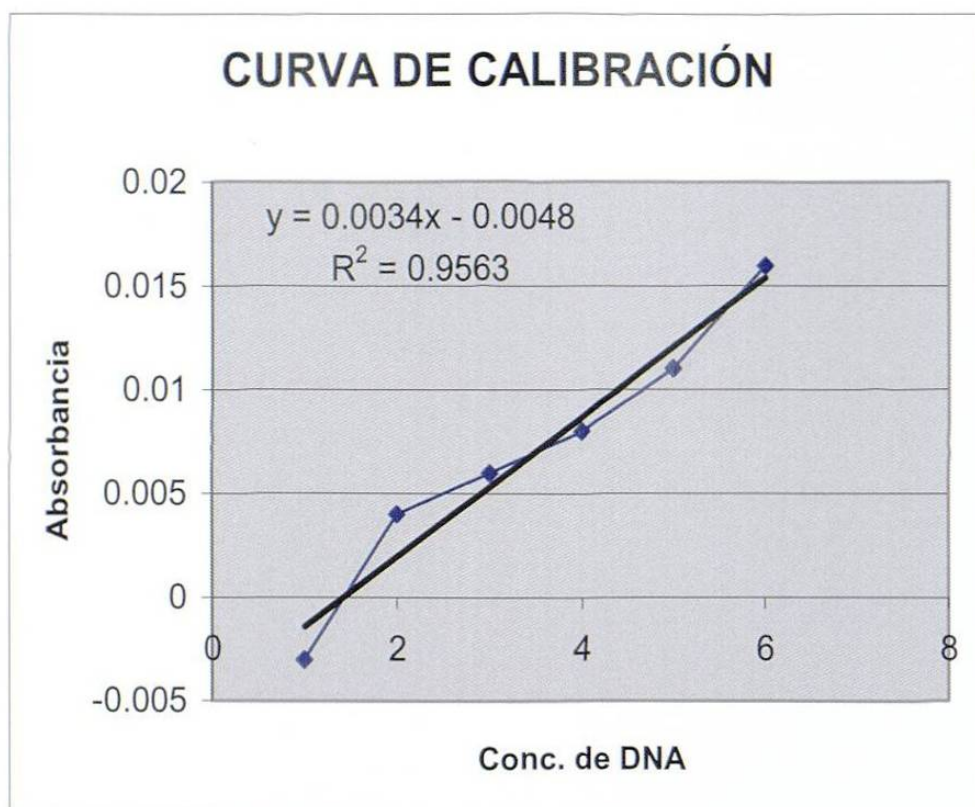


FIGURA 38. Curva de calibración para la cuantificación del DNA fragmentado empleando un método espectrofotométrico (595 nm- 650 nm).

Tabla 3 Resultados y análisis estadístico de la cuantificación de DNA fragmentado (proporción de DNA fragmentado).

ORGANOS	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Promedio	Prom. Final
HIGADO	32,0	31,5	30,9	31,5	32.8 % ± 1.2 *
	31,1	24,9	45,6	33,9	
	31,5	23,8	43,7	33,0	
RIÑÓN	21,8	25,4	33,0	26,7	27.2 % ± 0.7 *
	22,8	22,8	35,5	27,0	
	27,6	20,6	35,7	28,0	
PULMÓN	6,2	12,2	14,8	11,1	12.0 % ± 1.9 *
	9,1	10,1	13,1	10,8	
	8,7	16,6	17,4	14,2	

*p<0.01



