

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



## **EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DEL EFECTO DE PEROXISOMICINA A1 SOBRE CÉLULAS TC-1 IMPLANTADAS EN UN MODELO MURINO.**

**POR**

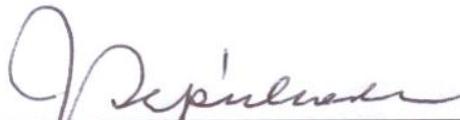
**M.C. ADOLFO SOTO DOMÍNGUEZ.**

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN TERMINAL  
EN MORFOLOGÍA

Enero 2010

EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DEL EFECTO DE PEROXISOMICINA A1  
SOBRE CÉLULAS TC-1 IMPLANTADAS EN UN MODELO MURINO.

Aprobación de la tesis:



---

Ph. D. Julio Sepúlveda Saavedra  
Director de Tesis



---

Dr. med. Lourdes Garza Ocañas  
co-Directora



---

Dra. C. Raquel Gpe. Ballesteros Elizondo  
co-Directora



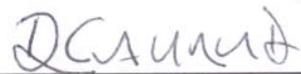
---

Dra. C. Odila Saucedo Cárdenas  
co-Directora



---

Dra. C. Rosalba Ramírez Durón  
Comisión de Tesis



---

Dr. med. Diónicio A. Gájarza Delgado  
Subdirector de Estudios de Posgrado

**EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DEL EFECTO DE  
PEROXISOMICINA A1 SOBRE CÉLULAS TC-1 IMPLANTADAS EN  
UN MODELO MURINO.**

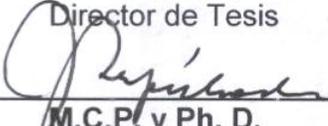
Presentado por:

**M.C. ADOLFO SOTO DOMÍNGUEZ.**

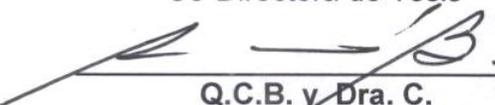
Este trabajo se realizó en los Departamentos de Histología y Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

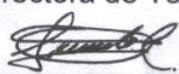
Bajo la dirección del Ph. D. Julio Sepúlveda Saavedra y la co-dirección de Dr. med. Lourdes Garza Ocañas, Dra. C. Raquel Guadalupe Ballesteros Elizondo y Dra. C. Odila Saucedo Cárdenas.

**FIRMAS**

Director de Tesis  
  
M.C.P. y Ph. D.  
Julio Sepúlveda Saavedra.

Co-Directora de Tesis  
  
M.C.P. y Dr. med.  
Lourdes Garza Ocañas

Co-Directora de Tesis  
  
Q.C.B. y Dra. C.  
Raquel Gpe. Ballesteros Elizondo.

Co-Directora de Tesis  
  
Biol. y Dra. C.  
Odila Saucedo Cárdenas.

# DEDICATORIA

*Para mi amada familia:*

*Mi esposa Flor y nuestros hijos: Diana, Gabriela y Abraham.*

*Por su amor incondicional, por acompañarme y apoyarme siempre en cada uno de los días de esta hermosa aventura llamada vida, este triunfo también es de ustedes.*

*"Yo y mi casa serviremos a Jehová."*

*Josué 24:15*

## AGRADECIMIENTOS

A ti **Señor Jesucristo** por ser darme la oportunidad de llegar a este momento de mi vida y hacer posible este trabajo, que cada uno de los días de mi vida honre tu nombre.

A mi **amada familia**: mi esposa **Flor**, chaparrita, bendito sea Dios por permitirme compartir la vida contigo...aún después de la muerte. Nuestros regalos de Dios: **Dianita, Gaby y Abraham**, mi vida por ustedes.

A mis padres: **Elías y Teresa**, mis hermanos: **Ma. Esther, Marco Antonio, Blanca Azucena y Abigail del Carmen**, por sus palabras de ánimo, muchas gracias.

A mis **sobrinos, cuñados y suegros** gracias por enriquecer nuestra familia.

Muy especialmente 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.

Al **Dr. med. Alfredo Piñeyro L.** (q.e.p.d.) por sus valiosos comentarios y su apoyo a esta tesis.

A la **comisión de tesis** por sus comentarios para este trabajo.

A **Nora Frías y Rosa María Leal** por la ultramicrotomía, **Martha Laura Hernández** por el cultivo de células, **Enrique Ramírez** por la microscopía electrónica, **Patricia Flores, Silvia M. García y Esaú García** del Depto. de Patología. ISSSTE, Nuevo León, por la inmunohistoquímica.

A mis **compañeros de posgrado**, que privilegio conocerlos.

La presente investigación fue financiada por **PAICYT 2006 SA1464-06**

A **CONACYT** por la beca 42018 para la realización de mis estudios de doctorado.

## CONTENIDO TEMÁTICO

	Pág.
<b>CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES</b> .....	<b>1</b>
1.1. T-514 o Peroxisomicina A1 (PA1).....	1
1.2. Justificación.....	3
1.3. Hipótesis de trabajo.....	3
1.4. Objetivos específicos.....	4
<b>CAPÍTULO 2 MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>5</b>
2.1 Células tumorales TC-1.....	5
2.2 Animales.....	6
2.3 T-514 o PA1.....	6
2.4 Grupos experimentales.....	6
2.5 Análisis morfológico.....	7
2.5.1 Microscopia de luz.....	7
2.5.2 Microscopia electrónica de transmisión.....	7
2.5.3 Inmunohistoquímica para identificar poblaciones de células infiltrantes mononucleares.....	7
2.5.4 Análisis cuantitativo de las células identificadas.....	8
2.5.5 TUNEL para la demostración de la fragmentación de la cromatina.....	8
2.6. Análisis del crecimiento tumoral.....	8
2.7. Análisis de la sobrevida.....	9
<b>CAPÍTULO 3 RESULTADOS</b> .....	<b>10</b>
3.1 Análisis morfológico de las muestras colectadas a 10 días post- implante.....	10
3.1.1 Histología del crecimiento de las células TC-1.....	10
3.1.2 Histoquímica para la demostración de polisacáridos complejos de la membrana basal mediante la técnica de PAS + diastasa ...	11
3.1.3 Inmunohistoquímica para la identificación de poblaciones infiltrantes mononucleares.....	11
3.1.4 Análisis cuantitativo de las células positivas.....	11

3.1.5 Histología de las células TC-1 en los grupos tratados con PA1..	12
3.1.6 Inmunohistoquímica para el análisis de la fragmentación de la cromatina utilizando la técnica de TUNEL.....	12
3.1.7 Histología y ultraestructura de los órganos blanco (pulmón, hígado y riñón) para PA1.....	13
3.2 Análisis morfológico de las muestras colectadas a 28-44 días post-implante.....	13
3.3 Evaluación del desarrollo tumoral.....	13
3.4 Evaluación de la sobrevida.....	14
<b>CAPÍTULO 4 DISCUSIÓN.....</b>	<b>21</b>
<b>CAPÍTULO 5 CONCLUSIONES, CONTRIBUCIONES Y PERSPECTIVAS.....</b>	<b>27</b>
5.1 Conclusiones.....	27
5.2 Contribuciones.....	27
5.3 Perspectivas.....	28
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>29</b>
<b>APÉNDICE A.....</b>	<b>36</b>
<b>APÉNDICE B.....</b>	<b>41</b>
<b>CAPÍTULO 6 RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO.....</b>	<b>48</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA</b>	<b>PÁG.</b>
1. Histología de las células TC-1 en el sitio del implante.....	<b>15</b>
2. Histoquímica para la demostración de polisacáridos complejos de la membrana basal mediante la técnica de PAS + diastasa.....	<b>16</b>
3. Inmunohistoquímica para la identificación de poblaciones infiltrantes mononucleares.....	<b>17</b>
4. Análisis cuantitativo de las células positivas.....	<b>17</b>
5. Histología de las células TC-1 en los grupos tratados con PA1.....	<b>18</b>
6. Inmunohistoquímica para el análisis de la fragmentación de la cromatina utilizando la técnica de TUNEL. ....	<b>18</b>
7. Histología y ultraestructura de los órganos blanco (pulmón, hígado y riñón) para PA1.....	<b>19</b>
8. Análisis morfológico de las muestras colectadas a 28-44 días post-implante.....	<b>20</b>
9. Evaluación del desarrollo tumoral y de la sobrevida.....	<b>20</b>
10. Curva dosis-respuesta para determinar la dosis letal 50 de PA1 en el ratón.....	<b>26</b>

## APÉNDICE A

### TÉCNICAS Y MÉTODOS.

<b>A.1 Técnica histológica.....</b>	<b>36</b>
<b>A.2 Técnica de tinción con Hematoxilina y Eosina (H y E).....</b>	<b>36</b>
<b>A.3 Técnica de tinción con el método tricrómico de Massón.....</b>	<b>36</b>
<b>A.4 Técnica histoquímica para la demostración de polisacáridos complejos con Ácido Peryódico de Schiff (PAS) + diastasa.....</b>	<b>37</b>
<b>A.5 Método inmunohistoquímico para detectar la fragmentación de la cromatina utilizando la técnica de TUNEL. ....</b>	<b>38</b>
<b>A.6 Método inmunohistoquímico para identificar las poblaciones de células infiltrantes mononucleares. ....</b>	<b>39</b>
<b>A.7 Técnica para microscopía electrónica.....</b>	<b>39</b>

## APÉNDICE B

### SOLUCIONES

#### B.1 ANALISIS MORFOLÓGICO.

B.1.1 Solución de formalina 4 %.....	41
B. 1.2 PBS 10 X.....	41
B. 1.3 PBS 1X.....	41
B. 1.4 Solución fijadora de Karnovsky- Ito.....	41
B. 1.5 Glutaraldehído 2.5 %.....	42
B. 1.6 Buffer de cacodilatos 0.1 M pH 7.2-7.4.....	42
B. 1.7 Tetraóxido de osmio 2 %.....	42
B 1.8 Nitrato de uranilo 1% .....	42
B. 1.9 Resina epóxica .....	42
B. 1.10 Azul de toluidina 5 %.....	43
B. 1.11 Acetato de uranilo 5 %.....	43
B. 1.12 Citrato de plomo 0.4 %.....	43
B. 1.13 Hematoxilina de Gill.....	43

<b>B. 1.14 Eosina.....</b>	<b>44</b>
<b>B. 1.15 Solución de alcohol-ácido.....</b>	<b>44</b>
<b>B. 1.16 Solución de agua amoniacal.....</b>	<b>44</b>
<b>B. 1.17 Hematoxilina férrica de Weigert.....</b>	<b>44</b>
<b>B. 1.18 Solución de fucsina ácida y escarlata de Biebrich.....</b>	<b>45</b>
<b>B.1.19 Solución de ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico...</b>	<b>45</b>
<b>B 1.20 Solución de azul de anilina.....</b>	<b>45</b>
<b>B.1.21 Solución de ácido acético al 1%.....</b>	<b>45</b>
<b>B. 1.22 Solución fijadora de Bouin.....</b>	<b>45</b>
<b>B. 1. 23 Solución enjuagadura sulfurosa.....</b>	<b>45</b>
<b>B. 1.24 Solución metabisulfito de sodio 10 %.....</b>	<b>45</b>
 <b>B. 2 INMUNOHISTOQUÍMICA (TUNEL).</b>	
<b>B. 2.1 Solución de proteinasa K.....</b>	<b>46</b>
<b>B. 2.2 Solución bloqueadora.....</b>	<b>46</b>
<b>B. 2.3 Solución de buffer de marcaje TDT 1 X.....</b>	<b>46</b>
<b>B. 2.4 Mezcla de reacción de marcaje .....</b>	<b>46</b>

<b>B. 2.5 Buffer stop TDT 1X.....</b>	<b>46</b>
<b>B. 2.6 Solución Strep-HRP.....</b>	<b>47</b>
<b>B. 2.7 Solución de DAB.....</b>	<b>47</b>
<b>B. 2.8 Verde de metilo 1 %.....</b>	<b>47</b>

## NOMENCLATURA

PA1	Peroxisomicina A1
cols.	Colaboradores
2DL <sub>50</sub>	Dos veces la dosis letal 50
hrs	Horas
mg	Miligramo
kg	Kilogramo
c/u	Cada una
ATCC	American Type Culture Collection
HPV-16	Virus del Papiloma Humano Tipo-16
°C	Grado centígrado
%	Porcentaje
PBS	Solución buffer de fosfatos
µL	Microlitro
rpm	Revoluciones por minuto
g	Gramo
IP	Intraperitoneal
SI	Sitio del implante de las células tumorales
VH	Vehículo (aceite de cártamo)
ST	Sin Tratamiento
H y E	Hematoxilina y Eosina
PAS	Ácido Peryódico de Schiff
CD	Molécula del grupo de diferenciación
π	Pi
Cm	Centímetro
fig.	Figura
µm	Micrómetros
TNFα	Factor de Necrosis Tumoral α
IL-6	Interleucina-6
min	Minuto
TA	Temperatura ambiente (37 ° C)
TDT	Deoxinucleotidil Transferasa Terminal
DAB	Diaminobenzidina
Strep	Estreptavidina
HRP	Peroxidasa del Rábano Picante.
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
TBS	Solución tris buffer salino
M	Molaridad
mL	Mililitro
N	Normalidad
nm	Nanómetros
dNTP's	Dinucleótido-trifosfato

## RESUMEN

ADOLFO SOTO DOMÍNGUEZ

Fecha de Graduación: Enero 2010

Universidad Autónoma de Nuevo León.  
Facultad de Medicina.

Título

**EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DEL EFECTO DE PEROXISOMICINA A1 SOBRE CÉLULAS TC-1 IMPLANTADAS EN UN MODELO MURINO.**

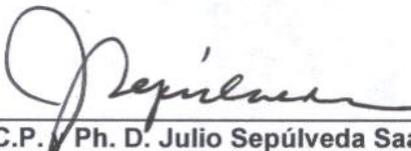
Área de estudio: Orientación Terminal en Morfología

Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con Orientación Terminal en Morfología.

**Propósito y Método del Estudio:** La toxina T-514 o Peroxisomicina A1 (PA1), es un compuesto aislado del fruto de *K. parvifolia*, cuyos órganos blanco son hígado, riñón y pulmón. Estudios *in vitro* con células neoplásicas han demostrado toxicidad selectiva. En pacientes se observó que PA1 causa aumento en la sobrevida. Estudios *in vitro* demostraron la inducción de apoptosis sobre líneas celulares transformadas. *In vivo*, se demostró que al administrar dosis tóxicas de PA1 a ratones se causa apoptosis en los órganos blanco. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la administración temprana (48 hrs) de 4 dosis de 1 mg de PA1/kg de peso c/u, sobre la morfología de las células tumorales TC-1 implantadas, órganos blanco a 10 días post-implante y el efecto sobre el desarrollo tumoral y sobre la sobrevida de los ratones, a 28 días post-implante. Las células TC-1 fueron cultivadas e inyectadas en 45 ratones cepa C57BL/6 divididos en 5 grupos. El día de la implantación de las células tumorales se consideró como día 0 y a los días 2, 4, 6 y 8 post-implante se administraron 4 dosis de 1 mg de PA1/ kg de peso c/u disuelta en aceite de cártamo administrada vía intraperitoneal (IP) o vía subcutánea en el sitio de implante (SI), grupos control vehículo y sin tratamiento. A los 10 días post-implante, el 50 % de los ratones de cada grupo se sacrificó y se obtuvo el tejido subcutáneo del sitio del implante de las células tumorales, pulmón, hígado y riñón. El otro 50 % de los ratones se sacrificó entre los días 28-44 post-implante y se colectaron muestras de la masa tumoral, pulmón, hígado y riñón. Las muestras se procesaron para su análisis morfológico a microscopia de luz y electrónica de transmisión, además se evaluó el desarrollo macroscópico tumoral y la sobrevida. En el análisis morfológico se observó a las células TC-1 entremezcladas con células infiltrantes mononucleares, las células tumorales infiltran el tejido conectivo e invaden a las fibras musculares que muestran pérdida de las estriaciones, disminución en diámetro y cambio en el patrón de tinción. En los grupos tratados con PA1, las células TC-1 mostraron necrosis a tiempos tempranos, mientras que en los grupos control no se observó daño en las células tumorales. Los órganos blanco no mostraron lesión. Se observó que los ratones tratados con PA1 tuvieron disminución en el desarrollo tumoral comparados con los grupos control, así como aumento en la sobrevida del grupo tratado.

**Conclusiones y Perspectivas:** Los resultados demostraron por primera vez un efecto tóxico selectivo de PA1 sobre las células TC-1 *in vivo*. PA1 causó disminución en el desarrollo tumoral y aumento en la sobrevida. Se propone el empleo de dosis mayores de PA1 que no afecten a los órganos blanco en los que los resultados benéficos serían más evidentes. No se observó la inducción de apoptosis por PA1 en este modelo murino *in vivo*.

FIRMA DEL DIRECTOR DE TESIS



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

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

### 1.1 T-514 o Peroxisomicina A1 (PA1).

La toxina T-514 o Peroxisomicina A1, es una de las toxinas aisladas del endocarpio del fruto de plantas del género *Karwinskia*. Dreyer y cols. (1975) las denominaron de acuerdo a su peso molecular como: T-496, T-514, T-516 y T-544.

En estudios de toxicidad de T-514, realizados en roedores por Bermúdez y cols. (1986) se estableció que los órganos blanco para este compuesto son pulmón, hígado y riñón.

Piñeyro y cols. (1994) describieron por primera vez la toxicidad selectiva de T-514 sobre líneas celulares tumorales humanas derivadas de hígado, pulmón y colon. En este mismo estudio se comparó el efecto *in vitro* de T-514 con el de antineoplásicos como vincristina, epidoxorubicina y 5-fluorouracilo entre otros y se observó que las líneas celulares normales fueron más sensibles a estos agentes que las líneas tumorales (Piñeyro y cols. 1993, 1994). Esto ha motivado a realizar otros estudios a fin de establecer a T-514 como un posible agente antineoplásico.

Martínez de Villarreal y cols. (1996) reportaron la presencia de enfermedad estable y aumento en la sobrevida de pacientes con cáncer cervical recurrente que recibieron tratamiento con T-514 durante un estudio de fase clínica I.

Debido a estos resultados, Piñeyro en 1995 y 1996 solicitó y obtuvo patentes para la utilización de la T-514 como potencial agente antineoplásico, siendo estas patentes otorgadas por la Comunidad Económica Europea, EUA, Japón, Corea, Canadá y México.

Estudios preliminares para evaluar el mecanismo de acción de la T-514, sugieren que el peroxisoma es el organelo blanco en levaduras metilotróficas (Sepúlveda y cols.1992, Salazar y cols.1998), ratón (Moreno y cols.1997) y rata (Sepúlveda y cols.1998), por lo que se renombró a la toxina T-514 como Peroxisomicina A1.

Existen reportes que describen que algunas células malignas contienen menos peroxisomas y menor actividad de catalasa comparadas con células normales (Lazarow, 1988). Esto pudiera estar relacionado con el mecanismo de acción de la T-514 como agente antineoplásico.

Además, se ha descrito *in vitro* la activación de apoptosis por PA1 en células de leucemia (Lansiaux y cols. 2001) así como en otras líneas celulares transformadas como hela, adenocarcinoma mamario, adenocarcinoma de colon y hepatoma (Martínez y cols. 2001).

*In vivo*, se ha demostrado que cuando se administran dosis tóxicas ( $2DL_{50}$ ) de PA1 a ratones normales, causa apoptosis en los órganos blanco (Soto y cols. 2005).

## **1.2 JUSTIFICACIÓN.**

El presente estudio contribuye a la continua búsqueda de agentes antineoplásicos y se tomaron en cuenta los estudios en los que se describe toxicidad selectiva de PA1 sobre líneas celulares malignas comparadas con líneas celulares normales, así como la observación de apoptosis *in vitro* sobre líneas tumorales e *in vivo* sobre los órganos blanco al administrar dosis tóxicas de PA1. Además de los estudios de fase clínica I, en los que se observó enfermedad estable y aumento en la sobrevida de pacientes con carcinoma cérvico uterino tratadas con PA1.

Por lo que se consideró importante el realizar estudios morfológicos en un modelo murino, que describan cambios en las células tumorales relacionados con la enfermedad estable, y el aumento en la sobrevida de las pacientes, además de evaluar el efecto de PA1 sobre pulmón, hígado y riñón.

En este estudio se evaluó el efecto de la administración temprana (48 hrs) de 4 dosis de 1 mg de PA1/kg de peso c/u, sobre las células tumorales TC-1 implantadas en ratones, así como de los órganos blanco a 10 días post-implante y su efecto sobre el desarrollo tumoral y la sobrevida, a 28 días post-implante.

## **1.3 HIPÓTESIS DE TRABAJO.**

La administración temprana de 1 mg de PA1/kg de peso a ratones tiene un efecto tóxico selectivo sobre células tumorales TC-1 implantadas sin afectar a los órganos blanco.

#### **1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

Para comprobar esta hipótesis se plantearon los siguientes objetivos específicos.

- Evaluación a los 10 días post-implante.

1.- Evaluar la histología de las células TC-1 y de los órganos blanco en ratones C57BL/6 tratados con PA1 y grupos control vehículo y control sin tratamiento.

2.- Evaluar la presencia de apoptosis en las células TC-1 y órganos blanco en ratones C57BL/6 tratados con PA1 y grupos control mediante el método de TUNEL.

3.- Evaluar la ultraestructura de las células TC-1 y órganos blanco en ratones C57BL/6 tratados con PA1 y grupos control.

- Evaluación a los 28-44 días post-implante.

(Además de los objetivos anteriores)

4.- Evaluar el efecto de PA1 sobre el desarrollo del tumor en ratones tratados comparándolo con los grupos control.

5.- Evaluar la sobrevida de los ratones tratados con PA1 comparándola con los grupos control.

## CAPÍTULO 2

### MATERIAL Y MÉTODOS

#### 2.1 Células tumorales TC-1.

La línea celular tumoral TC-1 se obtuvo de la ATCC (CRL-2785). De acuerdo con Lin y cols. (1996) esta línea celular se desarrolló a partir de un cultivo primario de células epiteliales de pulmón de ratón cepa C57BL/6 y las células fueron co-transformadas para expresar las proteínas E6 y E7 del HPV-16 y el oncogén c-Ha-ras (Lin y cols. 1996). Por lo que cuando se implantan estas células en ratones C57BL/6, no sufren rechazo inmunológico, utilizándose con éxito como un modelo murino de cáncer *in vivo*.

Las células se cultivaron en medio de Dulbecco modificado por Eagle y suplementado con suero bovino fetal al 10%, incubadas a 37 °C en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> y 95 % de humedad. Al observar la monocapa en confluencia, las células se cosecharon añadiendo 1 mL de tripsina al 0.25%, la suspensión celular se mantuvo en hielo y se lavó 2 veces con solución buffer de fosfatos (PBS), pH 7.2-7.4 centrifugando a 3,000 rpm entre cada lavado, el botón celular se resuspendió en PBS, se cuantificaron las células utilizando un hematocitómetro y se añadió el volumen necesario de PBS para tener una concentración de  $5 \times 10^4$  células en 100  $\mu$ L.

Las células se implantaron por vía subcutánea en la extremidad posterior derecha de ratones C57BL/6. Antes y después de realizar el implante se analizó la viabilidad de la suspensión celular  $\geq 95\%$  haciendo una mezcla 1:1 con azul de tripano.

## **2.2 Animales.**

Se emplearon 45 ratones cepa C57BL/6 de 5-6 semanas de edad, 25-30 gramos (Harlan México, UNAM), mantenidos a dieta estándar de laboratorio con ingesta de agua *ad libitum*, ciclos de luz/oscuridad de 12 hrs, en el bioterio del Depto. de Histología, Facultad de Medicina. UANL.

## **2.3 T-514 o PA1.**

Se empleó PA1 extraída del fruto de *Karwinskia parvifolia* de acuerdo con el método descrito por Guerrero y cols. (1987). El aislamiento, purificación y valoración de su actividad biológica se hizo en el Depto. de Farmacología y Toxicología, Facultad de Medicina, UANL.

## **2.4 Grupos experimentales.**

En la presente investigación se propuso iniciar el tratamiento en forma temprana posterior a la implantación de las células tumorales, que se consideró como día 0. A los días 2, 4, 6 y 8 post-implante se administraron 4 dosis de 1 mg de PA1/kg de peso c/u disuelta en aceite de cártamo administrada vía intraperitoneal (IP), o por vía subcutánea en el sitio de implante (SI), grupos control vehículo (VH IP o SI) y control sin tratamiento (ST).

También se evaluaron los cambios histopatológicos, histoquímicos, inmunohistoquímicos y ultraestructurales tempranos, por lo que a los 10 días post-implante, el 50 % de los ratones de cada grupo se sacrificó por dislocación cervical y se obtuvo el tejido subcutáneo del sitio del implante de las células tumorales, así como pulmón, hígado y riñón.

El otro 50 % de los ratones se sacrificó entre los días 28-44 post-implante y se colectaron muestras de la masa tumoral, pulmón, hígado y riñón.

Los experimentos se repitieron dos veces en la colecta a tiempos tempranos y una a tiempos tardíos.

## **2.5 Análisis morfológico.**

Después del sacrificio, los ratones se perfundieron por el ventrículo izquierdo con solución fijadora de glutaraldehído al 0.25 % en buffer de cacodilatos pH 7.2-7.4, y las muestras colectadas se dividieron para su análisis a microscopia de luz y electrónica de transmisión.

### **2.5.1 Microscopia de luz.**

Las muestras se fijaron durante 24 hrs en solución de formalina al 4% recién preparada a partir de paraformaldehído en PBS pH 7.2-7.4. Posteriormente se procesaron por la técnica histológica de rutina hasta su inclusión en parafina. Se obtuvieron cortes histológicos de 5  $\mu\text{m}$  y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H y E), con el método tricrómico de Massón y por método del Ácido Peryódico de Schiff (PAS) + diastasa, para la demostración de polisacáridos complejos (glucosaminoglucanos y proteoglicanos).

### **2.5.2 Microscopia electrónica de transmisión.**

El tejido se mantuvo 24 hrs en solución fijadora de Karnovsky-Ito (ácido pícrico, formaldehído, glutaraldehído en buffer de cacodilatos pH 7.2-7.4) de acuerdo con el método descrito por Ito y Karnovsky, (1968), procesado por la técnica para microscopia electrónica hasta su inclusión en resinas epóxicas usando la técnica de Luft (1961); de los bloques se prepararon cortes ultrafinos contrastados con acetato de uranilo (Watson, 1958) seguido de citrato de plomo (Venable y Coggeshall, 1965).

### **2.5.3 Inmunohistoquímica para identificar poblaciones de células infiltrantes mononucleares.**

Se utilizaron anticuerpos monoclonales primarios específicos para la identificación de linfocitos T CD3<sup>+</sup>, linfocitos B CD20<sup>+</sup>, macrófagos CD15<sup>+</sup> y células

asesinas naturales (NK) CD56<sup>+</sup>. Se utilizó la tecnología LSAB+System-HRP (Link-Streptavidin-Biotin+System-Horseradish Peroxidase) de DAKO<sup>®</sup> y los núcleos se contrastaron con hematoxilina. Se utilizaron como tejidos testigo cortes de timo, amígdala palatina, bazo y ganglio linfático, respectivamente. Como control negativo de la técnica se omitió la incubación con el anticuerpo primario.

#### **2.5.4 Análisis cuantitativo de las poblaciones identificadas.**

Después de identificar los tipos de células presentes en el infiltrado, se realizó un conteo en tres laminillas (una por cada ratón) de cada grupo de estudio. En 8 campos consecutivos por laminilla se contó el total de células/campo distinguiendo las células positivas y negativas, después se calculó el porcentaje, valor promedio, desviación estándar y error estándar de la desviación (desviación estándar/n de cada grupo) para cada uno de los grupos. Los datos se graficaron y se sometieron a la prueba estadística t de student con un grado de significancia de  $p \leq 0.05$

#### **2.5.5 Método de TUNEL para la demostración de la fragmentación de la cromatina.**

Para la técnica de TUNEL (Tdt-mediated dUTP-biotin Nick-End Labeling) (Gavrieli y cols. 1992), se usó el kit TACS<sup>™</sup> 2 TdT *in situ* Apoptosis Detection de Trevigen<sup>®</sup> y se incluyeron controles de técnica de acuerdo con las instrucciones del kit. Estas muestras se analizaron mediante microscopia de luz.

#### **2.6 Análisis del crecimiento tumoral.**

Los ratones de los grupos de tiempos tardíos, fueron monitoreados diariamente hasta detectar una masa tumoral de 5 a 7 mm de diámetro, después se realizaron mediciones de los diámetros mayor y menor, los datos se sustituyeron en la fórmula  $A \times B^2 \times \pi/6$ , donde A: diámetro mayor y B: diámetro

menor, para obtener el volumen tumoral/día de observación/grupo de estudio (Chen y cols. 2000).

Los valores promedio de estas mediciones se graficaron para determinar el patrón de desarrollo tumoral y se analizaron estadísticamente con la prueba t de student con un grado de significancia ajustado de  $p \leq 0.025$ . El ajuste si hizo con el método de Bonferroni.

## **2.7 Análisis de la sobrevida.**

Se realizó un análisis de sobrevida comparando el grupo tratado con PA1 con los grupos control.

El total de los animales de cada grupo se tomó como 100 %, y se restó el porcentaje correspondiente al día de la muerte o sacrificio de cada ratón. Para esto se consideraron los siguientes parámetros:

- 1) Cuando ocurrió la muerte espontánea del ratón,
- 2) Cuando el diámetro mayor del tumor alcanzó 2.5 cm,
- 3) Si el ratón se encontró en malas condiciones (pérdida de peso, dificultad para comer o moverse) y se registró como el día de su muerte.

Los datos se analizaron con el programa SPSS versión 16.0 para obtener la gráfica de Kaplan-Meier. También este programa permitió analizar estadísticamente los datos con un valor de significancia de  $p \leq 0.05$  y determinar si existen diferencias entre grupos.

## **CAPÍTULO 3**

### **RESULTADOS**

#### **3.1 ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE LAS MUESTRAS COLECTADAS A 10 DÍAS POST-IMPLANTE.**

##### **3.1.1 Histología de las células TC-1.**

A 10 días post-implante no se observó ninguna tumoración. Sin embargo, en el análisis histológico del tejido subcutáneo del sitio del implante de las células tumorales, se observó proliferación de las células TC-1, que mostraron integridad del citoplasma y núcleo, además entremezcladas con las células tumorales se encontraron células infiltrantes mononucleares que por su morfología corresponden a células linfoides y macrófagos. Los agregados de células tumorales en ocasiones formaron cavidades de diámetro variable (fig. 1A).

También se observó que las células TC-1 migran entre el tejido conectivo que rodea a las fibras musculares esqueléticas, en estrecha asociación con ellas. Destacó la notable disminución del diámetro de las fibras musculares en el sitio en que las células tumorales invaden al tejido conectivo (fig. 1B). Además algunas fibras musculares mostraron núcleos de localización central similares a los núcleos de las células TC-1 (fig. 1C).

Además hubo cambio en el patrón de tinción de las fibras musculares, las cuales se tiñeron de azul en lugar del rojo brillante característico de las células del músculo esquelético normal, teñidas con el método tricrómico de Massón (fig. 1D).

### **3.1.2 Histoquímica para la demostración de polisacáridos complejos de la membrana basal mediante la técnica de PAS con diastasa.**

Al analizar los cortes histológicos del sitio de implante de las células tumorales con la técnica de PAS + diastasa, se observaron fibras musculares con pérdida de la continuidad de la membrana basal que las rodea en el sitio en que fueron invadidas por las células tumorales (fig. 2B), las células tumorales también mostraron positividad en su citoplasma (fig. 2C). También se observó positividad en el espacio extracelular con presencia de células tumorales y material PAS positivo resistente a la diastasa entre las fibras musculares sin presencia de células tumorales (fig. 2D).

### **3.1.3 Inmunohistoquímica para la identificación de poblaciones infiltrantes mononucleares.**

En el sitio de implante de las células TC-1 y en los tumores desarrollados de los grupos control y tratados con PA1, se observó la presencia de infiltrado de células mononucleares, mediante inmunohistoquímica estas células fueron identificadas como linfocitos T CD3<sup>+</sup> (fig. 3A), linfocitos B CD20<sup>+</sup> (fig. 3B), macrófagos CD15<sup>+</sup> (fig. 3C) y células NK CD56<sup>+</sup> (fig. 3D).

### **3.1.4 Análisis cuantitativo de las células positivas.**

En el análisis cuantitativo se observó el mismo patrón para cada una de las poblaciones celulares identificadas en cada grupo de estudio, en los valores promedio obtenidos se observó un mayor porcentaje de linfocitos T CD3<sup>+</sup> (17.34% ±0.4%), seguido de macrófagos CD15<sup>+</sup> (13.04% ±0.3%), después linfocitos B CD20<sup>+</sup> (10.84% ±0.4%), y finalmente el porcentaje de células NK CD56<sup>+</sup> (10.33% ±0.3%).

En el análisis estadístico no se observó diferencia estadística significativa entre los grupos tratados con PA1 y grupos control (fig. 4).

### **3.1.5 Histología de las células TC-1 en los grupos tratados con PA1.**

En el análisis histológico de los grupos tratados con PA1 vía IP o SI, se observaron grandes áreas con signos de necrosis tales como: restos celulares y núcleos picnóticos de las células tumorales (fig. 5B).

También se observó la presencia de infiltrado de células mononucleares. El análisis cuantitativo de estas células no mostró ninguna diferencia respecto al grupo control (fig. 4).

En el análisis ultraestructural de las células TC-1 de los grupos control, se observaron células con prolongaciones citoplasmáticas, escasos organelos, núcleos y nucléolos de tamaño variable y con heterogeneidad en el arreglo de la cromatina (fig. 5C).

En los grupos tratados con PA1 vía IP o vía SI, se confirmaron los hallazgos de la necrosis de las células tumorales: ruptura de la membrana plasmática, pérdida del citoplasma, mitocondrias hinchadas con extracción parcial o total de la matriz, núcleos picnóticos o con cromatina extraída y ruptura de la envoltura nuclear (fig. 5D).

### **3.1.6 Inmunohistoquímica para el análisis de la fragmentación de la cromatina utilizando la técnica de TUNEL.**

Al analizar con la técnica de TUNEL las muestras del sitio del implante de las células tumorales (fig. 6C), tejido tumoral, pulmón, hígado (fig. 6D) y riñón de los grupos control y experimentales con PA1, no se observó positividad a la fragmentación de la cromatina, fenómeno que ocurre durante la apoptosis.

### **3.1.7 Histología y ultraestructura de los órganos blanco (pulmón, hígado y riñón) para PA1.**

En el análisis histológico y ultraestructural de las muestras de pulmón (fig. 7A y 7B), hígado (fig. 7C y 7D), y riñón (fig. 7E y 7F), colectadas a los 10 días post-implante así como entre los días 28-44 post-implante de los ratones de los grupos tratados con PA1, se observó que el tratamiento con este compuesto no tuvo un efecto tóxico sobre estos órganos, ya que presentaron una histología normal, similar a la observada en las muestras de los grupos control.

### **3.2 ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE LAS MUESTRAS COLECTADAS A 28-44 DÍAS POST-IMPLANTE.**

En el análisis morfológico de las muestras colectadas a tiempos tardíos no se observaron diferencias entre los grupos de estudio, respecto a lo descrito para los tiempos tempranos, excepto que todos los tumores mostraron necrosis de ubicación central, con escasa vascularización (fig. 8A y 8B).

### **3.3 EVALUACIÓN DEL DESARROLLO TUMORAL.**

En los ratones de los grupos de tiempos tardíos, la masa tumoral se detectó a partir del día 12 post-implante, y se realizaron mediciones hasta el día 35 post-implante.

En nuestro estudio se observó que los tumores tanto de los grupos control como de los tratados continuaron creciendo. Sin embargo se observó que el desarrollo tumoral fue mayor en los grupos control comparado con los tratados con PA1, los cuales mostraron una disminución significativa en el volumen tumoral además de diferencia estadísticamente significativa entre cada uno de los días de medición (fig. 9A).

### **3.4 EVALUACIÓN DE LA SOBREVIDA.**

En el análisis de supervivencia se observó que en los ratones tratados con PA1 aumentó la sobrevida, en comparación con los ratones de los grupos control.

Los ratones del grupo control sin tratamiento murieron entre los días 28-35 días post-implante, mientras que los de los grupos control vehículo IP o SI, murieron entre los 35-37 y 28-37 días post-implante, respectivamente.

Los ratones tratados con PA1 IP murieron entre los 33-44 y los de PA1 SI del 35-42 días post-implante, respectivamente. En el análisis estadístico observamos diferencia significativa entre los grupos tratados vs grupos control vehículo y control sin tratamiento (fig. 9B).

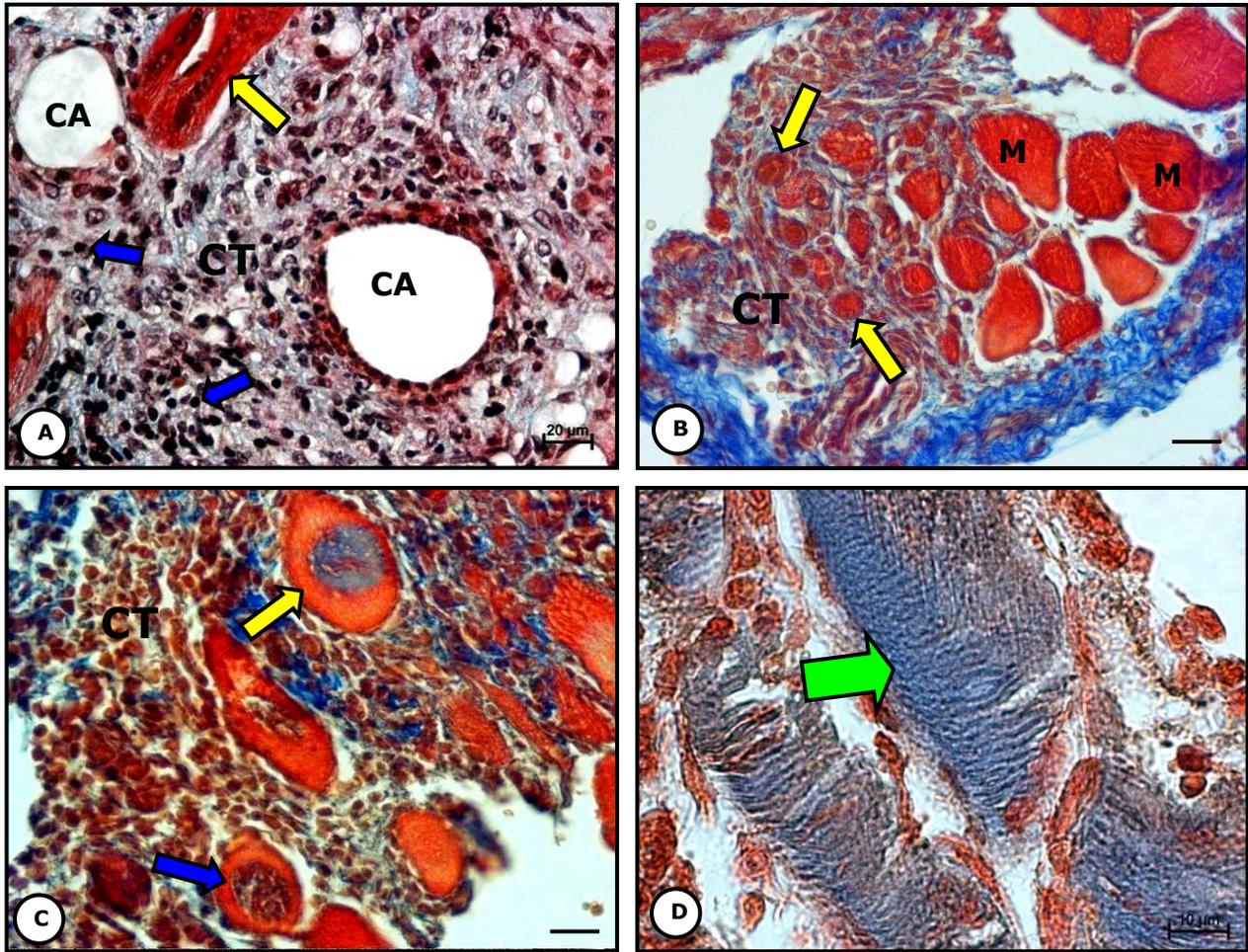


Fig. 1. Células TC-1 en el sitio de implante. Control sin tratamiento. Micrografía de luz. **A)** Células tumorales (CT) con formación de cavidades (CA), células infiltrantes mononucleares (flechas azules), fibras musculares cortadas de manera longitudinal con núcleos en el centro (flecha amarilla). **B)** Fibras musculares de diámetro normal (M), células tumorales que invaden el tejido conectivo (CT), fibras musculares esqueléticas con disminución en el diámetro (flechas amarillas). **C)** Células TC-1 (CT), fibras musculares esqueléticas con núcleos de localización central (flecha azul) y fibras con cambios en el patrón de tinción (flecha amarilla). **D)** Se muestra la variación en el color de las fibras musculares esqueléticas (flecha verde). Embebido en parafina, tricrómico de Massón. A, B y C: Barra 20  $\mu\text{m}$ , D: Barra 10  $\mu\text{m}$ .

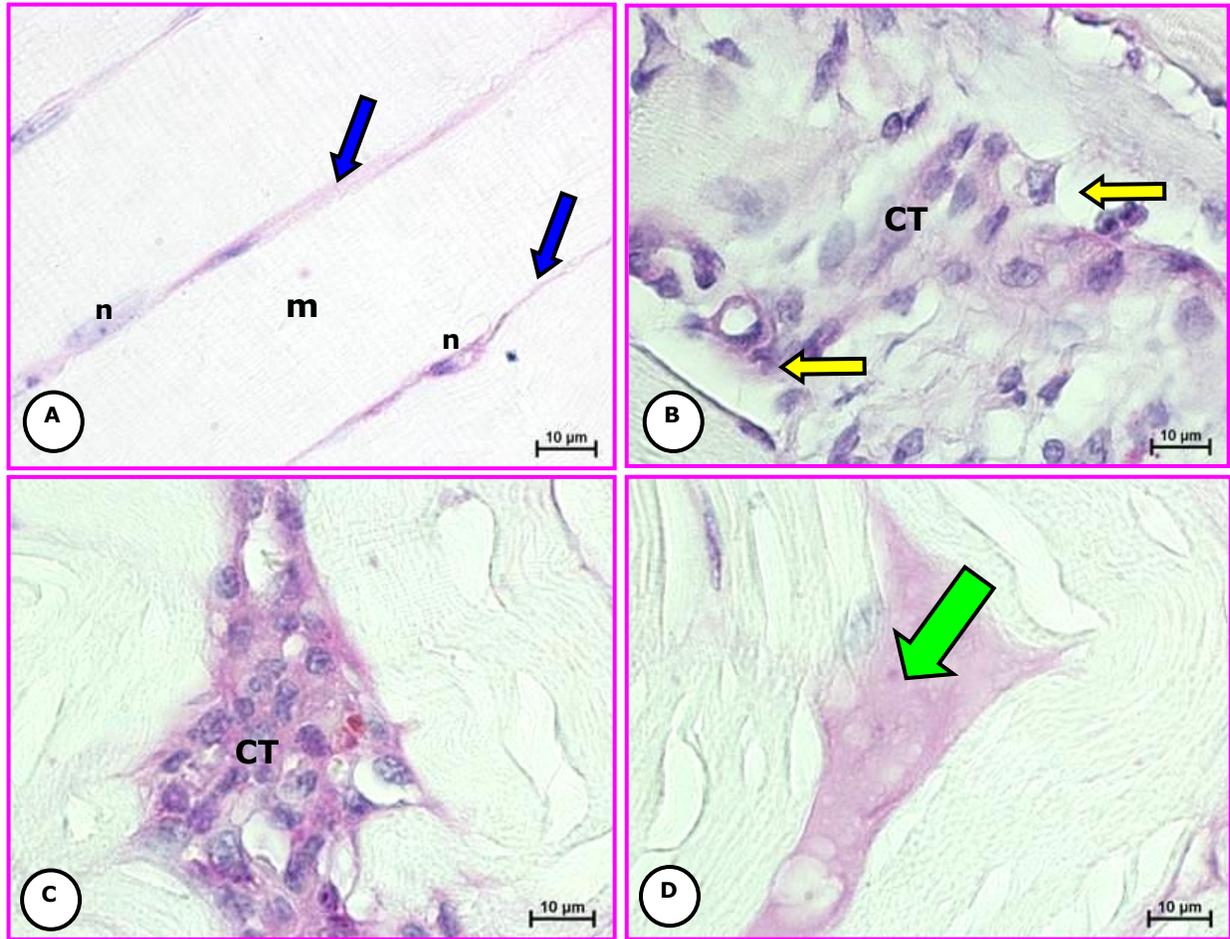


Fig. 2 **A)** Fibras musculares esqueléticas normales cortadas de manera longitudinal (m), núcleos en la periferia (n) y tinción en color magenta de la membrana basal (flechas azules). Células TC-1 en el sitio de implante. Control sin tratamiento. Micrografía de luz. **B)** Pérdida de la continuidad de la membrana basal de las fibras musculares cortadas de manera longitudinal (flechas amarillas), positividad en el citoplasma de las células tumorales (CT). **C)** Positividad en el citoplasma de células tumorales (CT) en el espacio extracelular. **D)** Material PAS positivo entre las fibras musculares sin presencia de células tumorales (flecha verde). Embebido en parafina. Pre-tratamiento con diastasa + PAS. Barra 10  $\mu\text{m}$ .

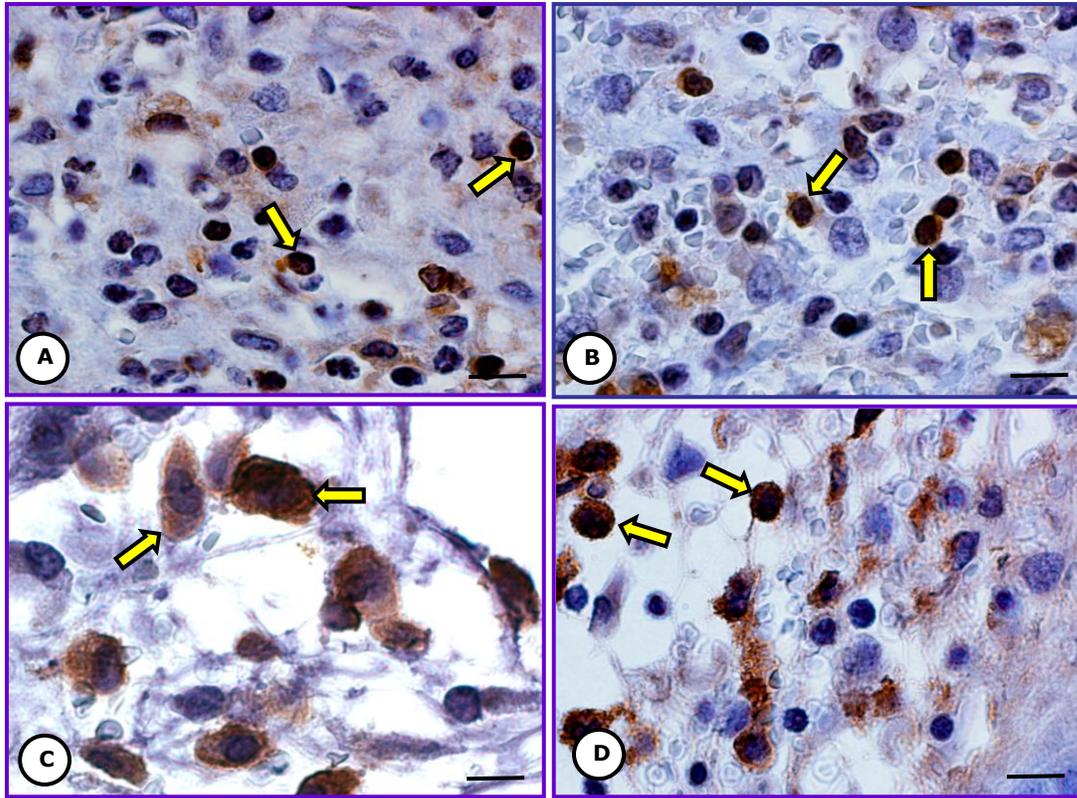


Fig. 3 Células TC-1 en el sitio de implante. Tratado con PA1. Micrografía de luz. **A)** Linfocitos T (flechas). **B)** Linfocitos B (flechas). **C)** Macrófagos (flechas). **D)** Células NK (flechas). Embebido en parafina. Inmunohistoquímica. Barra 10  $\mu$ m.

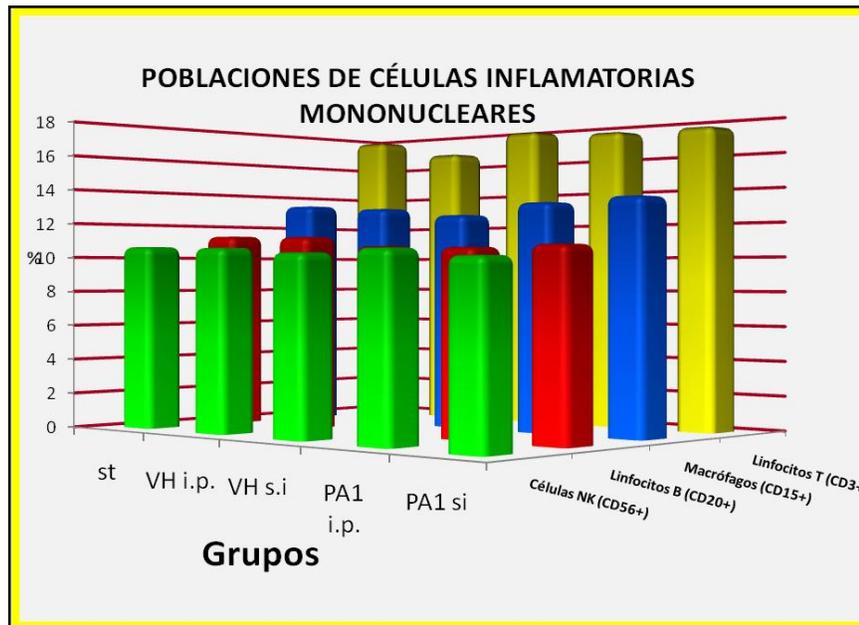


Fig. 4 Gráfica de cuantificación de células mononucleares: El conteo de células para cada tipo celular identificado en cada grupo de estudio, demuestra la presencia de un patrón donde el mayor porcentaje de las células infiltrantes son linfocitos T en todos los grupos. Los macrófagos fueron la segunda población más abundante, seguida de los linfocitos B y finalmente las células NK. Las cantidades de las células infiltrantes presentes en cada grupo de estudio no mostraron diferencias entre los grupos tratados con PA1 y controles.

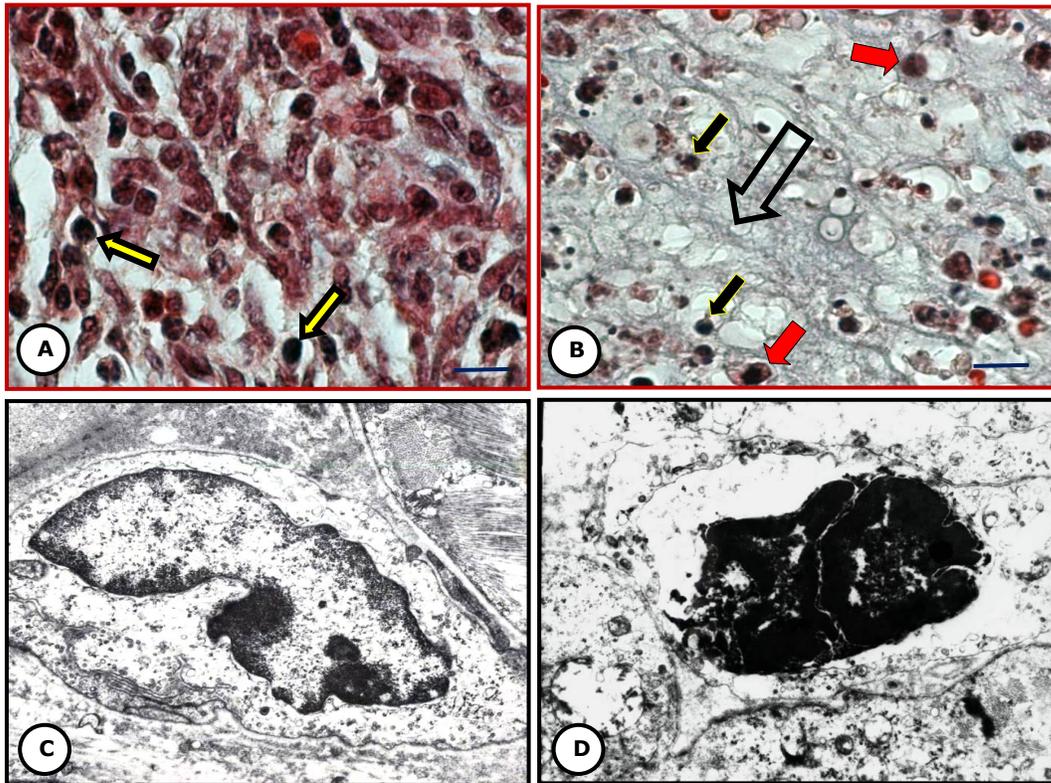


Fig. 5 Células TC-1 en el sitio de implante. Control sin tratamiento. Micrografía de luz. **A)** Células tumorales entremezcladas con células infiltrantes mononucleares (flechas amarillas). Células TC-1 en el sitio de implante. Tratado con PA1. Micrografía de luz: **B)** necrosis celular (flecha hueca), núcleos picnóticos (flechas negras) y células mononucleares (flechas rojas). Embebido en parafina, tricrómico de Massón. Barra 10  $\mu\text{m}$ . Células TC-1 en el sitio de implante. Control sin tratamiento. Micrografía electrónica. **C)** Ultraestructura de célula TC-1. 10,000 x. Células TC-1 en el sitio de implante. Tratado con PA1. Micrografía electrónica. **D)** Célula con signos de necrosis, observe el núcleo picnótico. 10,000 x

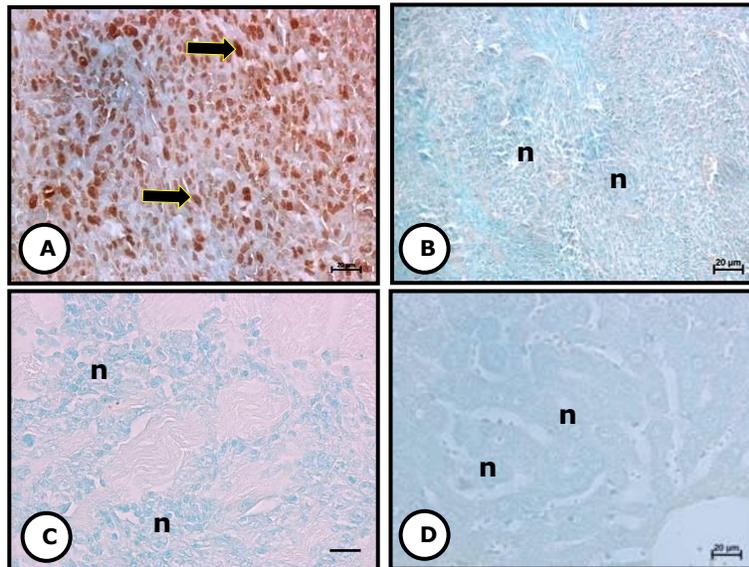


Fig. 6 Tejido tumoral de ratón. Control sin tratamiento. Micrografía de luz **A)** Control positivo: núcleos positivos a la fragmentación de la cromatina (flechas). **B)** Control negativo: núcleos negativos (n). Células TC-1 en el sitio de implante. Tratado con PA1. Micrografía de luz. **C)** núcleos negativos (n). Hígado. Tratado con PA1. Micrografía de luz. **D)** núcleos negativos (n). Embebido en parafina. TUNEL. Barra 20  $\mu\text{m}$ .

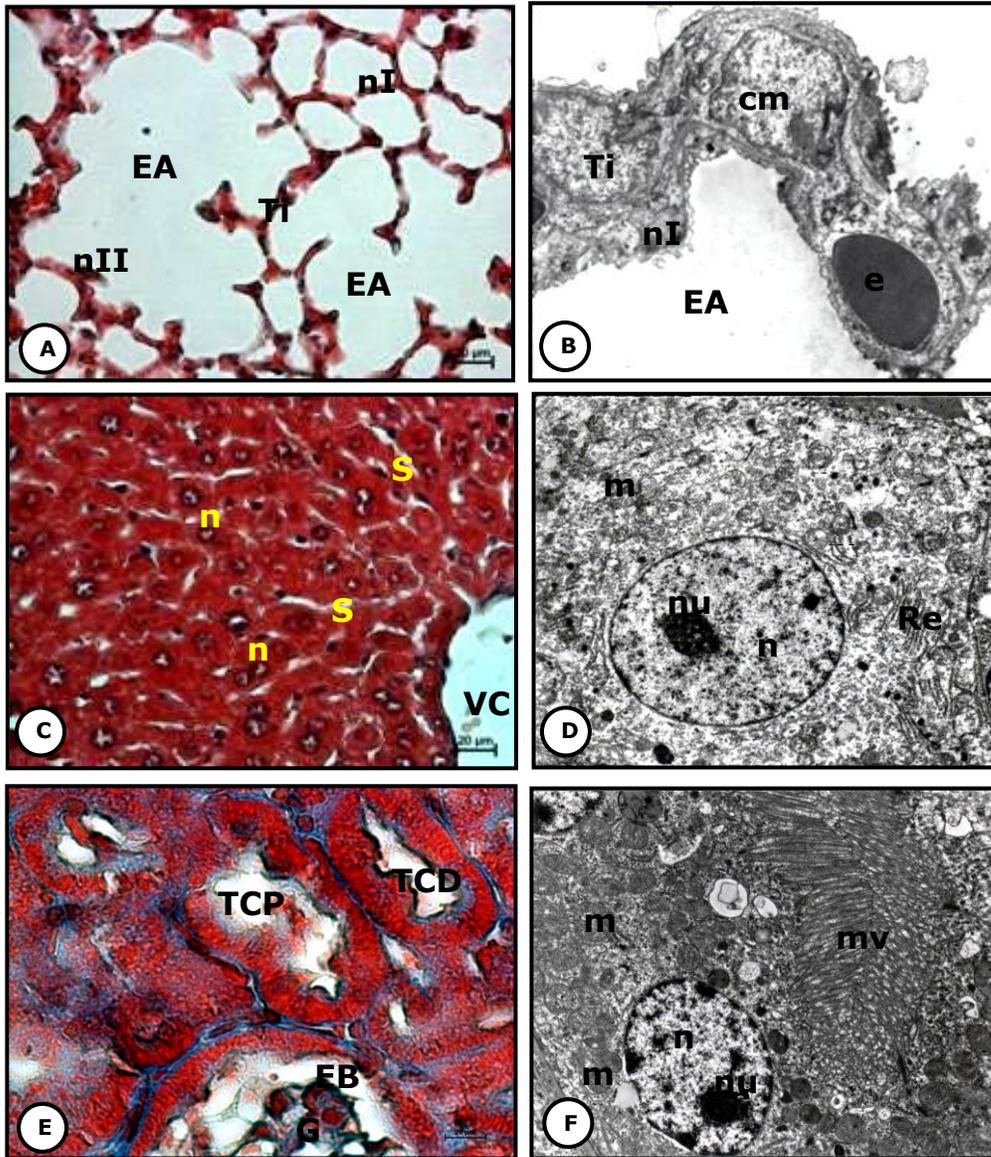


Fig. 7 Pulmón. Tratado con PA1. Micrografía de luz. **A)** Imagen de histología normal: espacios alveolares limpios (EA), tabiques interalveolares (Ti), neumocito tipo I (nI), neumocito tipo II (nII). Pulmón. Tratado con PA1. Micrografía electrónica. **B)** Se observa una ultraestructura normal: espacio alveolar (EA), tabique interalveolar (Ti), neumocito tipo I (nI), eritrocito (e) y célula mononuclear (cm) en el interior de un capilar. 3,150 X. Hígado. Tratado con PA1. Micrografía de luz. **C)** Observe una histología normal: núcleos de hepatocitos (n), capilares sinusoidales (S) y vena central (VC). Hígado. Tratado con PA1. Micrografía electrónica. **D)** No se observa la presencia de lesiones: núcleo eucromático (n), nucléolo (nu), retículo endoplásmico rugoso (Re), mitocondrias (m). 6,300 x. Corteza de riñón. Tratado con PA1. Micrografía de luz. **E)** Observe una histología normal: glomérulo (G), espacio de Bowman (EB), túbulo contorneado proximal (TCP), túbulo contorneado distal (TCD). Célula del epitelio de túbulo contorneado proximal de riñón. Tratado con PA1. Micrografía electrónica. **F)** No se observa la presencia de lesiones: núcleo (n), nucléolo (nu), mitocondrias (m), microvellosidades (mv). 6,300 x. A, C y E: Embebido en parafina, tricrómico de Massón. Barra 20  $\mu$ m.

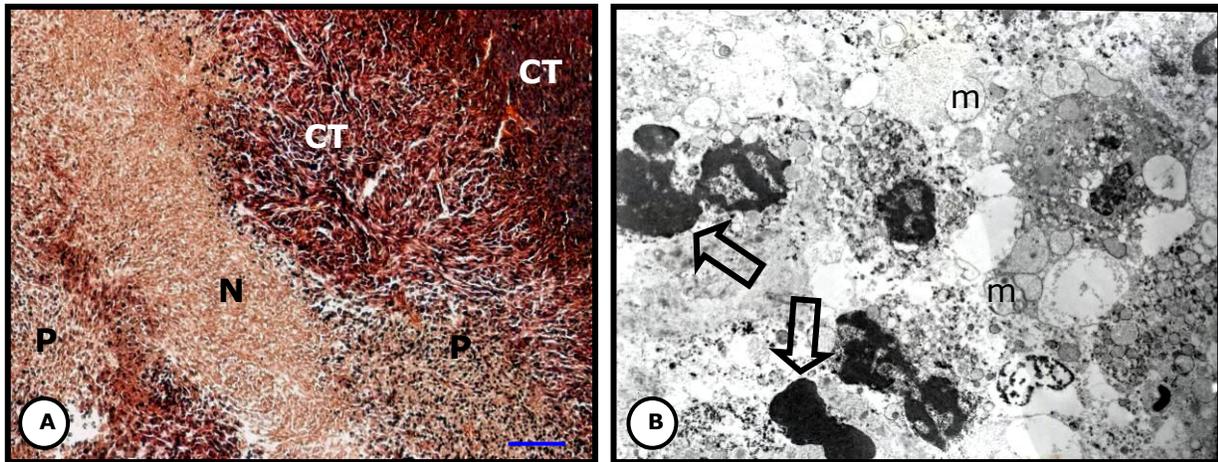


Fig. 8 Tejido tumoral de ratón. Tratado con PA1. Micrografía de luz. **A)** Se observa una amplia zona con células con signos de necrosis (N), células con núcleos picnóticos (P) y células de aspecto normal (CT). Embebido en parafina, tricrómico de Massón. Barra 100  $\mu$ m. Tejido tumoral de ratón. Tratado con PA1. Micrografía electrónica. **B)** Células con signos de necrosis: núcleos picnóticos (flechas huecas), mitocondrias hinchadas con pérdida de la matriz (m). 3150X.

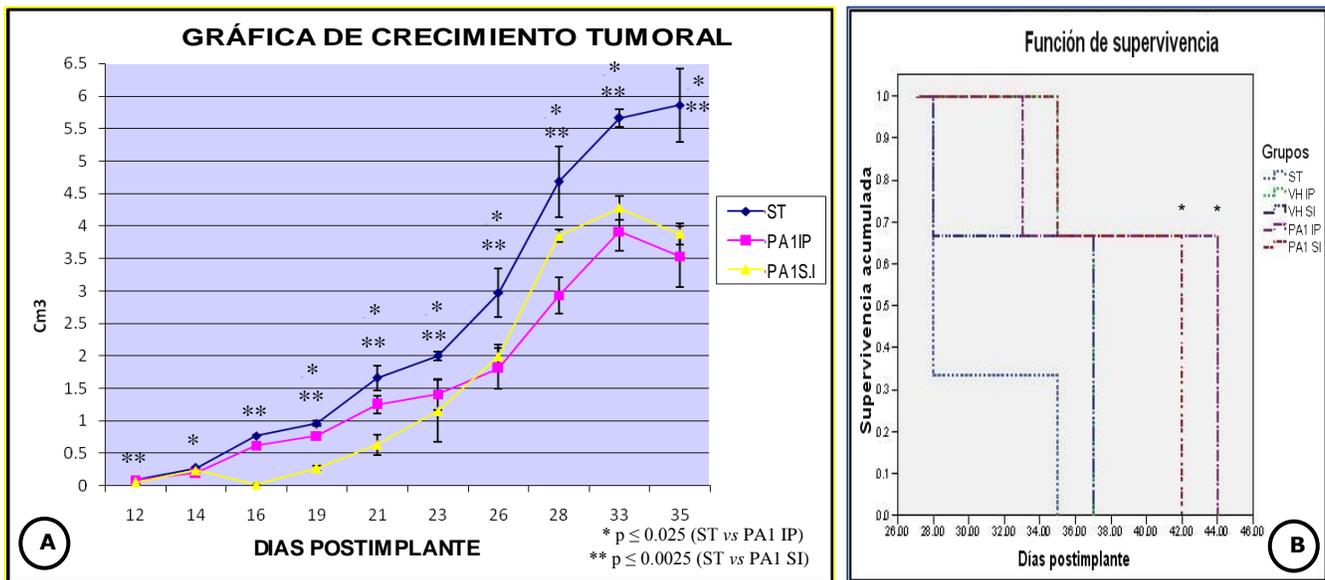


Fig. 9 **A)** Gráfica de desarrollo tumoral: La masa tumoral fue detectada a partir del día 12 post-implante y se realizaron mediciones hasta el día 35 post-implante. Observe que en los animales no tratados el tumor creció más rápido comparado con los animales tratados con PA1. En cada día de medición se observa diferencia estadística significativa. Al final del periodo de observación los tumores de los ratones de los grupos tratados fueron más pequeños que los de los grupos control. Método de Bonferroni y prueba t de student. \*\*  $p \leq 0.0025$  y \*  $p \leq 0.025$ . **B)** Análisis de sobrevivencia o de Kaplan-Meier: observe el tiempo de sobrevivencia en todos los grupos de estudio. Los grupos tratados con PA1 mostraron un incremento en el tiempo de sobrevivencia. El análisis estadístico muestra que hay diferencia estadística significativa entre los ratones de los grupos control vs ratones de los grupos tratados con PA1. Prueba t de student, \*  $p \leq 0.05$ .

## CAPÍTULO 4

### DISCUSIÓN

Con base a los resultados del presente estudio se acepta la hipótesis de trabajo: “La administración temprana de 1 mg de PA1/kg de peso a ratones tiene un efecto tóxico selectivo sobre células tumorales TC-1 implantadas sin afectar a los órganos blanco.”

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran por primera vez la existencia de toxicidad selectiva *in vivo* de PA1 sobre la línea celular TC-1, evaluada tempranamente, antes del desarrollo de una masa tumoral perceptible, ya que mientras estas células mostraron necrosis, los órganos blanco evaluados: pulmón, hígado y riñón no presentaron ninguna lesión.

En la literatura existen numerosos estudios en los que se utiliza el modelo tumoral murino con células TC-1 descrito por Lin y cols. (1996), sin embargo no describen desde el punto de vista morfológico el comportamiento de las células TC-1 en el sitio de implante, o su interacción con los tejidos circundantes, por lo que una de las primeras interrogantes que abordamos en el presente estudio, fue la de caracterizar la histología y la ultraestructura de las células TC-1 en el grupo control, a fin de poder comparar el efecto del tratamiento con PA1.

A 10 días post-implante aún no se observa ninguna tumoración. Sin embargo, en el análisis histológico del tejido subcutáneo del sitio del implante de las células tumorales, se observó proliferación de las células TC-1 que migran entre el tejido conectivo que rodea a las fibras musculares, en estrecha asociación con ellas. Destaca que en estos sitios las fibras musculares mostraron una notable disminución en su diámetro. También se observó que algunas fibras musculares mostraron núcleos de localización central similares a los núcleos de las células TC-1.

Estos hallazgos no han sido descritos en las células TC-1 implantadas, sin embargo consideramos que los resultados observados en nuestro estudio coinciden con lo reportado por Brandes y cols. (1967) en un estudio *in vivo* con células tumorales de leucemia L1210, donde se observó que las células tumorales invaden al tejido conectivo y a las fibras musculares esqueléticas. En este estudio se describe que la invasión de las células tumorales causa cambios en la morfología de las fibras musculares ya que muestran un aspecto ondulado además de desorganización de las miofibrillas.

En nuestro estudio también observamos zonas donde las fibras musculares mostraron una notable disminución en su diámetro cuando las células tumorales invaden al tejido conectivo que las rodea, estos resultados sugieren que las células tumorales TC-1 secretan factores paracrinos que contribuyen a la atrofia de las fibras musculares.

Cambios similares a lo anterior han sido descritos en estudios *in vivo* con células tumorales de adenocarcinoma de colon-26 que secretan citocinas como TNF $\alpha$ , IL-6 e Interferón  $\gamma$  (Strassmann y cols. 1993, García-Martínez y cols. 1994, Matthys y Billiau, 1997), además de factores humorales como el factor inductor de proteólisis (PIF) aislado de pacientes con cáncer y ratones con células tumorales de adenocarcinoma murino (MAC16) (Todorov y cols. 1996). Estos factores actúan directamente sobre las fibras musculares causando atrofia resultado de un incremento en un 50 % en el catabolismo de proteínas principalmente de los filamentos de actina y un decremento hasta de un 50 % en las síntesis de proteínas (Belizario y cols. 1991, Todorov y cols. 1996, Yano y cols. 2008). Ambos mecanismos pueden suceder de maneras simultánea (Strelkov y cols. 1989, Lorite y cols. 1997) y dar como resultado una intensa atrofia muscular que se ha relacionado con el estado de caquexia presente en animales de experimentación y en pacientes con cáncer (Fujiki y cols. 1997, Todorov y cols. 1999, Cabal-Manzano y cols. 2001)

Además, se observó que en los sitios en los que las células tumorales invaden a las fibras musculares hay cambio en el patrón de tinción de las fibras musculares: se tiñen de azul en lugar del rojo brillante característico de las células del músculo esquelético normal, teñidas con el método tricrómico de Massón. Estos cambios en el patrón tintorial pueden estar relacionados con cambios fisicoquímicos intracelulares en las fibras musculares aparentemente inducidos por la invasión de las células TC-1, ya que además de alterar el metabolismo de las proteínas, las células tumorales pueden inducir el aumento en la glicólisis y la acidificación del microambiente de los tejidos y células normales circundantes a las células tumorales, estos cambios también se han relacionado con la invasión a los tejidos cercanos o bien pueden favorecer a la generación de metástasis (Smallbone y cols. 2005,2007, Gatenby y cols. 2006, 2007).

Al observar los cortes analizados con PAS + diastasa, se observó positividad a la reacción en el citoplasma de las células tumorales que invaden a las fibras musculares, y en células tumorales que infiltran al tejido conectivo entre el tejido muscular, así como la presencia de material PAS positivo resistente a la diastasa en el espacio extracelular sin células tumorales. Estos resultados sugieren que las células TC-1 sintetizan y secretan componentes de la membrana basal, lo que favorece su migración. Este mecanismo ha sido descrito en tipos celulares como carcinoma pulmonar humano (Bolon y cols. 1995, Kikkawa y cols. 1998) y cáncer de mama (Yee y cols. 2007, Theodoro y cols. 2007) que al sintetizar componentes de la membrana basal pueden migrar e invadir tejidos y órganos distantes a su sitio de origen, causando así metástasis. En la literatura no encontramos reportes que describan este fenómeno para las células TC-1.

Al analizar la ultraestructura de las células TC-1 implantadas en los grupos control, se observaron células íntegras con prolongaciones citoplasmáticas, mitocondrias y ribosomas escasos, núcleos de tamaño variable y heterogeneidad en el arreglo de la cromatina, esto concuerda con lo descrito para las células neoplásicas que presentan escasos organelos por su alto índice de proliferación (Lin y cols. 1996) sin llevar a cabo alguna función de secreción.

Por otra parte, en el análisis histológico y ultraestructural de las células TC-1 en los grupos tratados con PA1, se observaron alteraciones celulares indicativas de necrosis, además de obtener resultados negativos a la fragmentación de la cromatina mediante la técnica de TUNEL, característica de la apoptosis.

Estos hallazgos son contrarios a lo reportado en estudios previos *in vitro* que describen la inducción de apoptosis por PA1 sobre células de leucemia (Lansiaux y cols. 2001), así como en otras líneas celulares transformadas como hela, adenocarcinoma mamario, adenocarcinoma de colon y hepatoma (Martínez y cols. 2001). Esto puede deberse a la concentración de PA1 que entra en contacto con las células tumorales, que en el sistema *in vitro* puede ser mayor que en el modelo *in vivo*. Se ha reportado que PA1 administrada a dosis tóxicas causa apoptosis en hígado, riñón y pulmón de ratones normales (Soto y cols. 2005).

Por otra parte, el efecto tóxico selectivo de PA1 observado *in vivo* sobre las células TC-1, sin mostrar efecto sobre las células de los órganos blanco puede estar relacionado con el hecho de que algunas células malignas contienen menos peroxisomas y menor actividad de catalasa comparado con células normales (Lazarow, 1988), lo que pudiera causar mayor sensibilidad de las células tumorales al tratamiento con PA1.

Es importante mencionar que en el presente estudio se observó que los ratones tratados con PA1 vía IP o SI, mostraron una disminución estadísticamente significativa en el desarrollo del volumen tumoral, comparado con los grupos control en cada uno de los días de medición, esto puede estar relacionado con la necrosis que se presenta durante el desarrollo temprano de los tumores, lo que conduce a la formación de tumores más pequeños.

Además, en los ratones tratados con PA1 vía IP o SI, se presentó un aumento estadísticamente significativo en la supervivencia comparados con los grupos

control. Estos resultados concuerdan con lo observado en pacientes con carcinoma cervical recurrente en los estudios de fase clínica I con PA1, en los que se observó enfermedad estable y aumento en la supervivencia (Martínez de Villarreal y cols. 1996).

En nuestro estudio al identificar y cuantificar a los linfocitos T, linfocitos B, macrófagos y células NK, no encontramos diferencia estadísticamente significativa entre los grupos control y los grupos tratados con PA1. Estos resultados sugieren que el tratamiento con PA1 no involucra a las células inmunológicas, y que la presencia de estas células infiltrantes tanto en los grupos control como en los tratados con PA1, puede estar relacionado con el reconocimiento de las oncoproteínas E6 y E7 del HPV-16 que las células TC-1 expresan en su membrana plasmática (Lin y cols. 1996).

Al cuantificar las poblaciones identificadas, el porcentaje mayor correspondió a los linfocitos T, seguido por los macrófagos, después los linfocitos B y finalmente las células NK. Esto sugiere que la respuesta inmunológica que se está presentando en el ratón es de tipo celular posiblemente dirigida contra los antígenos de membrana de las células tumorales.

Finalmente resaltamos que la dosis empleada no tuvo un efecto tóxico sobre pulmón, hígado y riñón, como ha sido descrito para la intoxicación experimental con PA1 con dosis de hasta dos veces la  $DL_{50}$  en varias especies animales, en las que causa daño severo (Bermúdez y cols. 1986,1992, Sepúlveda y cols. 1992, Soto y cols. 2005).

Estos hallazgos nos permiten sugerir la posibilidad de emplear dosis mayores de PA1, de acuerdo con la curva dosis-respuesta para determinar la dosis letal 50 en el ratón, considerando importante que la dosis de PA1 debe ser igual o inferior a 10 mg/kg de peso (fig. 10), ya que a dosis superiores a ésta aparece la mortalidad en los ratones. Además de evaluar la presencia de efectos tóxicos sobre los órganos blanco.

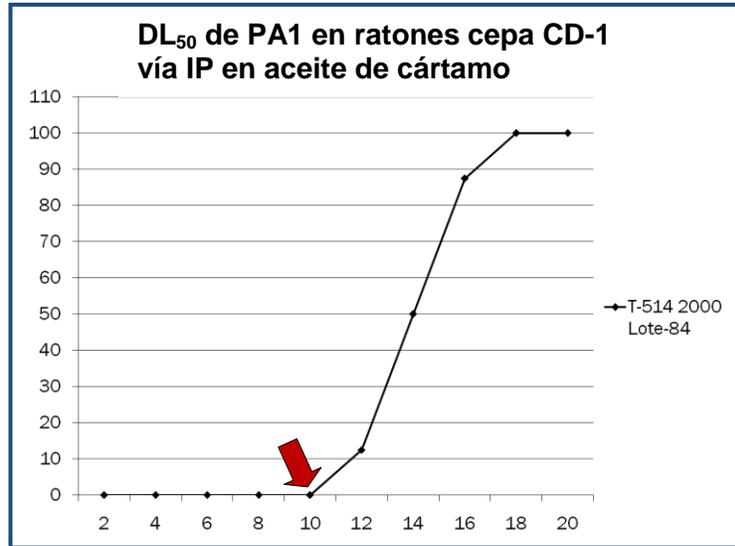


Fig. 10 Curva dosis-respuesta para determinar la dosis letal 50 de PA1 en el ratón, observe como a dosis inferiores a 10 mg de PA1/kg de peso la mortalidad es 0 (flecha), apareciendo a dosis superiores a esta. Cortesía Dra. Victoria Bermúdez de Rocha. Área de Bioensayos. Depto. de Farmacología y Toxicología, Facultad de Medicina, UANL.

Actualmente, en nuestro laboratorio se llevan a cabo estudios para evaluar el efecto de dosis mayores de PA1 y de su combinación con otros agentes antineoplásicos sobre este modelo tumoral murino.

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSIONES, CONTRIBUCIONES Y PERSPECTIVAS

#### 5.1 CONCLUSIONES

- PA1 administrada en 4 dosis de 1 mg/kg de peso, tiene un efecto tóxico selectivo sobre las células TC-1 implantadas, ya que presentan necrosis, mientras que los órganos blanco no presentaron lesión alguna.
- Se observó disminución significativa del volumen tumoral e incremento en la sobrevida de los ratones tratados con PA1.

#### 5.2 CONTRIBUCIONES

- Se describen las características histológicas y ultraestructurales en etapas tempranas de las células TC-1 implantadas en el modelo murino.
- En el análisis histológico y ultraestructural de las células TC-1 en los grupos tratados con PA1 se observó necrosis, contrario a la inducción de apoptosis por PA1 descrita en estudios *in vitro* con células de leucemia y líneas celulares transformadas como hela, adenocarcinoma mamario, adenocarcinoma de colon y hepatoma, además de lo reportado *in vivo* donde PA1 administrada a dosis tóxicas causa apoptosis en hígado, riñón y pulmón de ratones normales.
- La presencia de necrosis en las células TC-1 en etapas tempranas puede estar relacionada con la disminución significativa del volumen tumoral e incremento en la sobrevida de los ratones tratados.

### **5.3 PERSPECTIVAS**

- 1.- Se sientan las bases para evaluar el efecto de dosis mayores de PA1 en este modelo murino
- 2.- Dilucidar el mecanismo de acción del efecto tóxico selectivo de PA1.
- 3.- Investigar el efecto producido por la combinación de PA1 con otros antineoplásicos en el modelo empleado
- 4.- Evaluar el efecto de PA1 sobre otras líneas tumorales así como en otros modelos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. - Dreyer D. L., Arai I., Bachman C. D., Anderson W. R., Smith R. G., and Daves G.D., (1975). Toxins causing no inflammatory paralytic neuronopathy. Isolation and structure elucidation. J. Am. Chem. Soc. 97:4895-4990.
2. - Bermúdez M. V., Gonzalez Spencer D., Guerrero M., Waksman N. and Piñeyro A. (1986). Experimental intoxication with fruit and purified toxins of buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*). Toxicon 24:1091-1097.
3. - Piñeyro A., Martínez de Villarreal L., and González R. (1993). Potencial Efecto Antineoplásico de las Toxinas Extraídas del género *Karwinskia*. La Investigación Científica de la Herbolaria Medicinal Mexicana. Secretaría de Salud. p 209-231.
4. - Piñeyro A., Martínez de Villarreal L., and González R. (1994). *In vitro* selective toxicity of toxin T-514 from *Karwinskia humboldtiana* (buckthorn) plant on various human tumor cell lines. Toxicology 92: 217-227.
- 5.- Martínez de Villarreal, L., González J.F., Vidal O., y Piñeyro A. (1996). Clinical phase I study of peroxysomicine in patients with recurrent cervical cancer. VI World Conference of Clin, Pharmacol. and Ther. August 4-6, 1996. Buenos Aires, Argentina.
6. - Piñeyro A. (1995). European Patentblatt 95/48 (29.11.95) Patent number: 0467407.
- 7.- Piñeyro A. (1996). Bioscience patent "Pharmaceutically acceptable anthracene compounds number 5578646. Patent Japan: No 2651758, Korea 202320. Canada 2047550. Mexico 9100290.

8. - Sepúlveda-Saavedra J., Van der Klei I. J., Keiser I., Piñeyro-López A., Harder W., and Veenhuis M. (1992). Studies on the effect of toxin T 514 on the integrity of peroxisomes in methylotrophic yeasts FEMS Microbiol. Letts. 91: 207-212.

9.- Salazar-Aranda R; Sepúlveda-Saavedra J; Waksman de Torres N; Piñeyro-López A; Moreno-Sepúlveda M. (1998). Effect of peroxisomicine A2 and T 544 of the genus *Karwinskia* on peroxisomes of *Candida boidinii*. FEMS microbiology letters 1998; 158(2):255-60.

10.-Moreno-Sepúlveda, M., Vargas-Zapata, R., Ballesteros-Elizondo, R., Piñeyro-López, A., Sepúlveda-Saavedra, J., (1997). Studies on the effect of peroxisomicine on catalase activity in albino mice. Toxicon 35, 777–783.

11. - Sepúlveda-Saavedra J, Bermúdez de Rocha MV, Tamez-Rodríguez VA, Ballesteros-Elizondo RG, Moreno-Sepúlveda M, Piñeyro-López A. (1998). Quantitative analysis of liver peroxisomes in rats intoxicated with peroxisomicine-A1. Toxicol Lett Sep 1; 98 (1-2): 71-5.

12.- Lazarow, P.B. (1988) Peroxisomes. In: I.M. Arias, W.B. Jakoby, H. Popper, D. Schachter and D.A. Shafritz (Eds), The Liver: Biology and Pathology, 2nd edn., Raven Press Ltd., New York, pp. 241-254.

13. - Lansiaux A., Laine W., Baldeyrou B., Mahieu Ch., Wattez N., Vezin H., Martinez F., Piñeyro A., and Bailly Ch. (2001). DNA topoisomerase II Inhibition by Peroxisomicine A1 and its radical metabolite induces apoptotic cell death of HL-60/MX2 human Leukaemia cells. Chem. Res. Toxically. 14 (1): 16-24.

14. - Martinez F.J., Zeng G., Piñeyro A., Garza-Ocañas L., Tomei D. and Umansky S. (2001). Apoptosis induction and cell cycle perturbation in established cell lines by Peroxisomicine A1 (T 514). Drug and Chemical Toxicology, 24 (3): 287-299

- 15.- Soto-Domínguez. A, Ballesteros-Elizondo, R. G., Saucedo-Cárdenas, O., Piñeyro-López, A. and Sepúlveda-Saavedra, J. (2005). Peroxisomicine A1 Causes Apoptosis in Liver, Kidney and Lung: Biochemical and Morphological Evidence. *Mol.Biol.Cell*, A Suppl. to Volume 16 (12) 5465-5901.
16. - Lin K.-Y., Garnierite, F.G., Staveley-O'Carroll, K.F., Levistky, H.I., August, T., Pardoll, D.M. and Wu, T.C. (1996). Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. *Cancer Res.*, 56, 21-26
17. - Guerrero, M., Piñeyro, A. and Waskman, N. (1987). Extractions and Quantification of Toxins from *Karwinskia humboldtiana* (tullidora). *Toxicon*.25, 565-568.
- 18.- Ito, S. and Karnowsky M. (1968). Formaldehyde-glutaraldehyde fixative containing trinitro compounds, *J. Cell. Biol.*39: 168.
- 19.- Luft, J. (1961). Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9:409-414.
- 20.- Watson, M.L. (1958). Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. II. Applications of solutions containing lead and borium. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* , 4:475, 727-730.
- 21.- Venable, J.H. and Coggeshall, R. (1965). A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 25:407-408.
22. - Gavrieli, Y., Sherman, Y., and Ben-Sasson, S.A. 1992. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119 (3), 493-501.

23.- Chen, Chien-Hung, Kwang Wook Sub, Hongxiu Ji, Michael A. Choti, Drew M. Pardoll and T.C Wu (2000). Antigen-specific immunotherapy papillomavirus 16 E7-expressing tumors grown in the liver. *J. Hepatology* 33:91-98.

24.- David Brandes, Elsa Anton, and Brian Schofield. (1967). Invasion of skeletal and smooth muscle by 1210 leukemia. *Cancer research*. 27 part I, 2159-2178.

25.- Strassmann G, Fong M, Freter CE, Windsor S, D'Alessandro F, Nordan RP. (1993). Suramin interferes with interleukin-6 receptor binding *in vitro* and inhibits colon-26-mediated experimental cancer cachexia *in vivo*. *J Clin Invest* 925:2152-2159.

26.- Garcia-Martínez C, López-Soriano FJ, Argilés JM. (1994). Interleukin-6 does not active protein breakdown in rat skeletal muscle. *Cancer Lett*, 76:1-4.

27.- Matthys P, Billiau A. (1997). Cytokines and cachexia. *Nutrition*, 13:763-770.

28.- Todorov P., Cariuk P., mc Devitt T., Coles B, Fearon K.C. Tisdale M.J. (1996). Characterization of a cancer cachectic factor. *Nature*, 22:739-742.

29.- Belizario J.E., Kartz M., Chenker E. Raw I. (1991). Bioactivity of skeletal muscle proteolysis-inducing factors in the plasma protein from cancer patients with weight loss. *Br J Cancer*, 635:705-710.

30.- Yano, C.L., Ventrucchi, G., Field, W.N., Tisdale, M.J., and Gomes-Marcodes M.C.C. (2008). Metabolic and morphological alterations induced by proteolysis-inducing factor from Walker tumour-bearing rats in C2C12 myotubes. *BMC Cancer*, 8:24 doi:10.1186/1471-2407-8-24

31.- Strelkov A.B.C, Fields, A.L.A, Baracos, V.E. (1989). Effect of systemic inhibition of prostaglandin production on protein metabolism in tumor-bearing rats. *Am.J.Physiol.* 275:C261-269.

32.- Lorite M.J. Cariuk P., Tisdale, M.J. (1997). Induction of muscle protein degradation by a tumor factor. *Br. J. Cancer* 76:1035-1040.

33.-Fujiki F, Mukaida N, Hirose K, Ishida H, Harada A, Ohno S, Bluethmann H, Kawakami M, Akiyama M, Sone S, Matsushima K. (1997). Prevention of adenocarcinoma colon 26-induced cachexia by interleukin 10 gene transfer. *Cancer Res* , 57:94-99.

34.- Todorov, P.T., Field W.N., Tisdale M.J.(1999). Role of a proteolysis-inducing factor (PIF) in cachexia induced by a human melanoma (G361) *Br J Cancer*, 80:1734-1737.

35.- Cabal-Manzano R., Bhargava P., Torres-Duarte A., Marshall J., Bhargava P., Wainer I.W. (2001). Proteolysis-inducing factor is expressed in tumours of patients with gastrointestinal cancers and correlates with weight loss *Br J Cancer*, 84:1599-1601.

36.- Kieran Smallbone, David J. Cavaghan, Robert A. Gatenby, Philip K. Maini (2005). The role of acidity in solid tumour growth and invasion. *Journal of Theoretical Biology* 235: 476–484

37.- Robert A. Gatenby, Edward T. Gawlinski, Arthur F. Gmitro, Brant Kaylor, and Robert. J. Gillies (2006). Acid-Mediated Tumor Invasion: a Multidisciplinary Study. *Cancer Res*; 66: (10). 5216-5223

38.- R.A. Gatenby, K. Smallbone, P.K. Maini, F. Rose, J. Averill, R.B. Nagle, L. Worrall and R.J. Gillies. (2007). Cellular adaptations to hypoxia and acidosis during somatic evolution of breast cancer. *British Journal of Cancer* 97, 646-653

39.- Kieran Smallbone, Robert A. Gatenby, Robert. J. Gillies. Philip K. Maini and David J. Cavaghan (2007). Metabolic changes during carcinogenesis: Potential impact on invasiveness. *Journal of Theoretical Biology*. 244. 703-713.

40.- Bolon, I., Gouyer, V., Devouassoux, M., Vandebunder, B., Wernert, N., Moro, D., Brambilla, Ch. and Brambilla. E. (1995). Expression of c-ets-1, Collagenase 1, and Urokinase-Type Plasminogen Activator Genes in Lung Carcinomas. *American Journal of Pathology*, Vol. 147, No. 5, November.

41.- Kikkawa, Y., Sanzen, N and Sekiguchi, K. (1998). Isolation and Characterization of Laminin-10/11 Secreted by Human Lung Carcinoma Cells. Laminin-10/11 Mediates Cell Adhesion Through Integrin  $\alpha 3\beta 1$ . *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 273, No. 25, June 19, pp. 15854–15859, 1998

42.- Yee, A. JM, Akens, M., Yang, M.B., Finkelstein, J., Zheng, P.S., Deng, Z. and Yang, B. (2007). The effect of versican G3 domain on local breast cancer invasiveness and bony metastasis. *Breast Cancer Research*, 9:R47 (doi:10.1186/bcr1751).

43.- Theodoro, T.R., de Matos, L.L., Lambiasi-Sant Annay, A. V., Affonso-Fonseca, F.L., Smedoz, P., Martins, L.C., Bonciani-Nader, H., Del Giglio, A. and Maria da Silva-Pinhal.M.A. (2007). Heparanase Expression in Circulating Lymphocytes of Breast Cancer Patients Depends on the Presence of the Primary Tumor and/or Systemic Metastasis. *Neoplasia*. Vol. 9, No. 6, June, pp. 504 – 510.

44. - Bermúdez M.V., Martínez F.J., Salazar M.E., Waksman N. and Piñeyro A. (1992). Experimental acute intoxication with ripe fruit of *Karwinskia humboldtiana* (tullidora) in rat, guinea-pig, hamster, and dog. *Toxicol.* 30: 1493-1496.

45. - Sepúlveda-Saavedra J., González-Corona B., Tamez-Rodríguez V.A., Bermúdez de Rocha M.V. y Piñeyro-López A. (1992). Ultrastructure of the lesion induced by toxin T-514 isolated from *K.humboltiana* in the alveolar region of the lung. Proc. 50<sup>th</sup> Ann. Meet. EMSA. Bailey G.W., Bentley J., Small J.A. (Editors). Published by San Francisco press, Inc.pp 640-641.

## APÉNDICE A

### A.1 Técnica histológica.

- 1.- Obtener la muestra.
- 2.- Fijar con formalina al 4 %.
- 3.- Lavar en agua corriente.
- 4.- Deshidratar en alcoholes graduales del 60 al 100 %.
- 5.- Aclarar con xilol.
- 6.- Preincluir en parafina.
- 7.- Incluir en parafina.
- 8.- Obtener los cortes histológicos usando un microtomo.
- 9.- Adherir los cortes en el baño de flotación.
- 10.- Desparafinar e hidratar.
- 11.- Teñir.
- 12.- Deshidratar y aclarar.
- 13.- Montar el cubre objetos añadiendo resina sintética.

### A.2 Técnica de tinción con Hematoxilina y Eosina (H y E).

- 1.- Desparafinar los cortes con xilol por 5 min.
- 2.- Hidratar con etanol-xilol por 5 min.
- 3.- Hidratar con etanol absoluto y alcohol etílico 96° por 2 min c/u.
- 4.- Enjuagar lentamente con agua destilada.
- 5.- Sumergir los cortes en hematoxilina de Gill, 2 min.
- 6.- Enjuagar lentamente en agua de la llave (2 lavados).
- 7.- Sumergir rápidamente en alcohol ácido (1 inmersión).
- 8.- Enjuagar lentamente con agua de la llave (2 lavados).
- 9.- Sumergir rápidamente en agua amoniacal (2 inmersiones).
- 10.- Enjuagar lentamente con agua de la llave (2 lavados).
- 11.- Enjuagar lentamente con agua destilada.
- 12.- Sumergir los cortes en eosina (6 inmersiones).
- 13.- Deshidratar con alcohol etílico 96° (2 cambios) 2 min c/u.
- 14.- Sumergir en etanol absoluto (2 cambios) 2 min c/u.
- 15.- Sumergir en etanol-xilol 3 min.
- 16.- Sumergir en xilol (2 cambios) 2 min c/u.
- 17.- Montar con resina sintética.

### A.3 Técnica de tinción con el método tricrómico de Massón.

Fijar los tejidos con solución de formalina al 4 %  
Incluir en parafina  
Usar cortes histológicos de 5 µm.

- 1.- Desparafinar con xilol e hidratar pasando por alcohol 100 % 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.- Teñir 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 hasta eliminar el exceso del colorante.
- 13.- Pasar al ácido acético 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.4 Técnica histoquímica para la demostración de polisacáridos complejos con Ácido Peryódico de Schiff (PAS) + diastasa.**

Fijar los tejidos con solución de formalina al 4 %

Incluir en parafina

Usar cortes histológicos de 5 µm.

- 1.- Desparafinar con xilol e hidratar pasando por alcohol 100 y agua destilada.
  - \* Si se desea remover depósitos de glucógeno, incubar los cortes con diastasa por 30 min. a 37 °C.
  - Enjuagar en agua destilada 3 veces.
- 2.- Sumergir los cortes en la solución del ácido peryódico de 5 a 10 min.
- 3.- Enjuagar en agua destilada varias veces.
- 4.- Sumergir los cortes en el reactivo de Schiff por 20 min, revisar el color rosa pálido.
- 5.- Diferenciar los cortes en la solución enjuagadura sulfurosa, 2 cambios 2 min c/u.
- 6.- Enjuagar en agua destilada.
- 7.- Contrastar con hematoxilina de Harris o de Gill por 1 a 2 min.
- 8.- Lavar en agua corriente.
- 9.- Decolorar ligeramente en alcohol ácido y lavar en agua corriente.
- 10.- Virar con agua amoniaca, lavar en agua corriente y enjuagar en agua destilada.
- 11.- Deshidratar en alcoholes graduales hasta alcohol absoluto.
- 12.- Aclarar en xilol y montar en resina.

## **A.5 Método inmunohistoquímico para detectar la fragmentación de la cromatina utilizando la técnica de TUNEL.**

Fijar los tejidos con solución de formalina al 4 %  
Incluir en parafina  
Usar cortes histológicos de 6 µm.

### **I.- Desparafinar e hidratar:**

- 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 1X, 2 cambios de 5 min c/u.  
\* Evitar que los cortes se sequen.

### **II.- Instrucciones 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 de solución de proteinasa K /muestra e 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 solo 5 min 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 min. a TA
- 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.- Sumergir las muestras 10 veces en cada una de las siguientes soluciones:
  - Agua desionizada.
  - Etanol 70 %, 2 cambios.
  - Etanol 95 %, 2 cambios.
  - Etanol 100 %, 2 cambios.
  - Xilol 2 cambios.
- 4.- Limpiar el exceso de xilol
- 5.- Montar y almacenar en oscuridad.

## **A.6 Método inmunohistoquímico para identificar las poblaciones de células infiltrantes mononucleares.**

Fijar los tejidos con solución de formalina al 4 %  
Incluir en parafina  
Usar cortes histológicos de 4 µm.

1.- Desparafinar e hidratar los cortes en las siguientes soluciones:

- Xilol (2 cambios) 5 min.
- Etanol absoluto 3 min.
- Etanol 95 % 3 min.
- Etanol 70 % 3 min.
- Agua destilada 3 min.
- Solución Tris-buffer salino (TBS) 3 min.

- 2.- Recuperar los antígenos con solución (TRS) 40 min. a 100 °C.
- 3.- Bloquear la peroxidasa endógena con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3 % 5 min.
- 4.- Lavar en solución buffer TBS 3-5 min.
- 5.- Añadir el anticuerpo primario 15-30 min.
- 6.- Lavar en TBS 3-5 min.
- 7.- Añadir el anticuerpo secundario 15 min.
- 8.- Lavar en TBS 3-5 min.
- 9.- Añadir la solución de estreptavidina-HRP 15 min.
- 10.- Lavar en TBS 3-5 min.
- 11.- Revelar con solución de sustrato-cromógeno 10 min.

### **CONTRATINCIÓN:**

- 1.- Lavar en agua destilada por 2 min (3 veces).
- 2.- Contrastar con hematoxilina de Harris o de Gill por 1 a 2 min.
- 3.- Lavar en agua corriente.
- 4.- Enjuagar en agua destilada.
- 5 Deshidratar gradualmente con:
  - Etanol 70 %, 2 cambios.
  - Etanol 95 %, 2 cambios.
  - Etanol 100 %, 2 cambios.
  - Xilol 2 cambios.
- 4.- Limpiar el exceso de xilol
- 5.- Montar y almacenar en oscuridad.

## **A.7 Técnica para microscopia electrónica.**

- 1.- Fijar con solución de Karnovsky-Ito a TA de 30 min a 1 hora.
- 2.- Lavar en buffer de cacodilatos 0.1 M pH 7.2- 7.4, 3 veces 5 min c/u.
- 3.- Postifijar en tetraóxido de osmio 2% en buffer de cacodilatos por 30 min.

- 4.- Lavar en buffer de cacodilatos 3 veces 5 min c/u.
- 5.- Sumergir en nitrato de uranilo 1% 30 min.
- 6.- Lavar en buffer de cacodilatos 3 veces 5 min c/u.
- 7.- Deshidratar con acetona 30%, 50%, 70%, 90% 5 min c/u.
- 8.- Deshidratar con acetona 100% 3 veces por 5 min c/u.
- 9.- Preincluir con acetona-resina epóxica 1:1 por 1 hora o toda la noche.
- 10.- Dejar evaporar bajo campana de extracción por 4 hrs o hasta que la resina se vuelva mas viscosa.
- 11.- Incluir en resina epóxica por 1 hr.
- 12.- Incubar los bloques de 12 a 72 hrs a 60°C para su polimerización.

A partir de los bloques se preparan dos tipos de cortes:

A) Semifinos: de aprox. 1  $\mu\text{m}$  de grosor, estos se montan en portaobjetos y se tiñen con azul de toluidina para su analisis mediante microscopia de luz.

B) Ultrafinos: de aprox. 100 nm de grosor y se contrastan con soluciones de acetato de uranilo al 5% y citrato de plomo al 0.4% para su análisis mediante microscopia electrónica de transmisión.

## APÉNDICE B

### SOLUCIONES:

#### B.1 ANÁLISIS MORFOLÓGICO.

##### B.1.1 Solución de formalina 4 %

\* Para preparar 500 mL

Paraformaldehído

20 g

Agua destilada

450 mL

\* Calentar a 60 °C por 30 minutos

##### B. 1.2 PBS 10 X

\* Para preparar 100 mL

NaCl

8.0 g

KCl

0.20 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

1.44 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

0.24 g

Ajustar pH a 7.2

Almacenar a 4 °C.

##### B. 1.3 PBS 1X

\* Para preparar 500 mL

PBS 10X

50 mL

Agua destilada

450 mL

Ajustar pH a 7.2

Almacenar a 4 °C.

##### B. 1.4 Solución fijadora de Karnovsky- Ito.

Solución madre.

Paraformaldehído

16 g

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 7.2- 7.4	400 mL
Glutaraldehído 25 %	32 mL
Ácido pícrico	0.08 g

**B. 1.5 Glutaraldehído 2.5 %**

Glutaraldehído 25 %	10 mL
Buffer de cacodilatos 0.1 M pH 7.2- 7.4	90 mL

**B. 1.6 Buffer de cacodilatos 0.1 M pH 7.2- 7.4**

Solución A	
Cacodilato de sodio	4.28 g
Agua destilada	100 mL

Solución B	
Ácido clorhídrico	0.5 mL
Agua destilada	25 mL

Solución de trabajo

Solución A	100 mL
Solución B	5.4 mL

Aforar a 200 mL con agua destilada.  
Ajustar a pH 7.2- 7.4

**B. 1.7 Tetraóxido de osmio 2 %**

Tetraóxido de osmio	1 g
Buffer de cacodilatos 0.1 M pH 7.2- 7.4	50 mL

**B 1.8 Nitrato de uranilo 1%**

Nitrato de uranilo	1 g
Aforar a 100 mL con agua destilada	

**B. 1.9 Resina epóxica**

Se preparó resina epóxica de consistencia media

Resina	23.8 mL (29 g)
--------	----------------

DDSA	16.0 mL(16 g)
NMA	11.5 mL (14.3 g)
DMP 30	1 mL (1 g)

### **B. 1.10 Azul de toluidina 5 %**

Borato de sodio (Borax)	5 g
Agua destilada	100 mL

\* Calentar hasta que se disuelva completamente.

Azul de toluidina	1 g
-------------------	-----

\* Añadir a la solución de borato de sodio, agitar para disolver y después filtrar.

### **B. 1.11 Acetato de uranilo 5 %**

Acetato de uranilo	0.5 g
Alcohol etílico 50 %	10 mL

\* Almacenar en refrigeración y proteger de la luz con papel aluminio.

### **B. 1.12 Citrato de plomo 0.4 %**

Citrato de plomo	0.04 g
Agua destilada	10 mL

Añadir unas gotas de hidróxido de sodio 1N hasta disolver.

### **B. 1.13 Hematoxilina de Gill.**

Agua destilada	730 mL
Etilenglicol	250 mL
Hematoxilina anhidra (polvo)	2.0 g
* Si está en cristales pesar	2.36 g
Yodato de sodio	0.2 g
Sulfato de aluminio	17.6 g
Ácido acético glacial	2.0 mL

\* Para preparar se debe seguir el orden, agitar a TA por 1 hora, filtrar antes de usar por primera vez.

### **B. 1.14 Eosina.**

#### Solución stock (concentrada):

Eosina amarillenta	1.0 g
Agua destilada	20 mL
Alcohol del 96°	80 mL

#### Solución de trabajo:

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

### **B. 1.15 Solución de alcohol-ácido.**

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

### **B. 1.16 Solución de agua Amoniacal.**

Agua destilada	99 mL
Hidróxido de Amonio	1 mL

### **B. 1.17 Hematoxilina férrica de Weigert**

#### Solución A

Hematoxilina (anhidra)	1 g
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 consistencia, precipita con el tiempo).

#### Solución de Cloruro Férrico 29%

Cloruro férrico	14.5 g
Agua destilada	50 mL

### **B. 1.18 Solución de fucsina ácida y escarlata de Biebrich.**

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

#### **\* Solución de escarlata de Biebrich**

Escarlata de Biebrich	1 g
Agua destilada	100 mL

#### **\* Solución de fucsina ácida**

Fucsina ácida	1 g
Agua destilada	100 mL

### **B.1.19 Solución de ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico.**

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

### **B 1.20 Solución de azul de anilina.**

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

### **B.1.21 Solución acuosa de ácido acético al 1%.**

Ácido acético glacial	1 mL
Agua destilada	99 mL

### **B. 1.22 Solución fijadora de Bouin**

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

### **B. 1.23 Solución enjuagadura sulfurosa**

Agua	300 mL
Ac. Clorhídrico 1 N	15 mL
Metabisulfito de Sodio 10 %	18 mL

### **B. 1.24 Solución metabisulfito de sodio 10 %**

Metabisulfito de Sodio 10 %	10 g
Agua	100 mL

## B. 2 INMUNOHISTOQUÍMICA (TUNEL).

Se utilizó el kit TACS™ 2 TdT *In situ* Apoptosis Detection de Trevigen®

Las soluciones marcadas con \* se deben preparar menos 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.
- Usar 50 mL de Buffer TDT 1 X para procesar de 1 a 10 muestras
- Separar una alícuota de 50 µL/muestra para preparar la mezcla de reacción de marcaje (paso 7), y almacenar en hielo

### \* B. 2.4 Mezcla de reacción de marcaje

- Descongelar la mezcla de TDT y dNTP a TA, mantener 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).
- Mantener la mezcla de reacción de marcaje en hielo.
- Preparar 50 µL/muestra de la siguiente manera:

	2 muestras	4 muestras	10 muestras
Mezcla de TDT dNTP	2 µL	4 µL	10 µL
Stock catiónica 50 X	2 µL	4 µL	10 µL
Enzima TDT	2 µL	4 µL	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 TA.
- Usar 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**

- Usar 50 µL Solución Strep-HRP por muestra
- Almacenar la solución a TA.
- Para preparar añada:

	<b>2 muestras</b>	<b>4 muestras</b>	<b>10 muestras</b>
PBS 1 X	100 µL	200 µL	500 µL
Strep-HRP	2 µL	4µL	10 µL

**\* B. 2.7 Solución de DAB**

- Descongelar la solución de DAB a 37 °C. Almacenar a TA, NO en hielo ya que precipita la solución DAB.
- Preparar la solución no más de 30 minutos antes de usarla.
- Usar 50 mL de solución DAB para procesar de 1 a 10 muestras.
- Para preparar añada:

PBS 1 X	50 mL
DAB	250 µL
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%	50 µL
DAB enhancer	25 µL

**B. 2.8 Verde de metilo 1 %**

- Listo para usar, puede ser reutilizado, almacenar 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.

## CAPÍTULO 6

### RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

**Adolfo Soto Domínguez.**

**Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con  
Orientación Terminal en Morfología**

**Título de la Tesis:** Evaluación Morfológica del Efecto de Peroxisomicina A1 sobre Células TC-1 Implantadas en un Modelo Murino.

**Área de Estudio:** Orientación terminal en Morfología.

**Datos Personales:**

Lugar de nacimiento: San Pedro de las Colonias, Coahuila, México; el 14 de mayo de 1977.

Estado civil: Casado con Sonia Flor Mejía Mazariegos, hijos: Diana, Gabriela y Abraham.

**Escolaridad:**

- ◆ Ingeniero Bioquímico con especialidad en Fermentación, egresado de la Universidad Autónoma de Coahuila (2002).
- ◆ Maestría en Ciencias con Orientación Terminal en Morfología. Facultad de Medicina, UANL (2005).

**Reconocimientos:**

- 1<sup>er</sup> lugar de calificaciones durante el ciclo 1998-1999 de los estudios cursados en la Universidad Autónoma de Coahuila.
- Premio Estatal de la Juventud. Área: Actividades Académicas. Otorgado por el Gobierno del Estado de Coahuila y El Instituto Estatal del Deporte a través de Causa Joven. 2000
- Premio Juvenil del Agua 2001, otorgado por la Federación Mexicana de Ing. Sanitaria y Ciencias Ambientales A.C. (FEMISCA).
- Reconocimiento y Medalla: "Nazario S. Ortiz Garza" por destacada trayectoria en el campo de Investigación Bioquímica. Otorgados por el Gobierno del Estado de Coahuila y la SEP, en el programa "Jóvenes Destacados de Coahuila", Generación 2002.
- Estudiante Distinguido de la Maestría en Ciencias con Orientación Terminal en Morfología. Ciclo escolar 2003-2004. Otorgado por la Subdirección de Investigación y Estudios de Posgrado. Facultad de Medicina. UANL.
- VIII Premio Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. Otorgado por el IMSS y la CANACEM, 2003.
- Premio Estatal al Mejor Trabajo en el Área Médica. Otorgado por el Gobierno del Estado de Coahuila y el Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología (COECYT).
- Estudiante Distinguido del Doctorado en Ciencias con Orientación Terminal en Morfología. Ciclo escolar 2009-2010. Otorgado por la Subdirección de Investigación y Estudios de Posgrado. Facultad de Medicina. UANL.

**Participación en la docencia:**

- Maestro participante en los cursos de Histología (Septiembre de 2004-Agosto 2007) y Biología Celular y Tisular (Septiembre de 2007 a la fecha), en la carrera de Médico Cirujano y Partero. Fac. de Medicina, UANL.
- Maestro participante en el curso de Histología para estudiantes del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias con Orientación Terminal en Morfología. Fac. de Medicina. UANL. (Febrero-Julio 2008).
- Maestro participante en el curso de Biología Celular y Molecular con el tema: Ciclo Celular para estudiantes del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias. Fac. de Medicina. UANL. (Agosto 2009-Enero 2010)

**Cursos, Simposios y Estancias. 23**

**Presentación de trabajos de investigación desde el 2000 a la fecha.**

18 Congresos Nacionales y 8 Congresos Internacionales

**Artículos publicados en revistas de difusión: 4**

**1.- Diagnóstico de Leptospirosis en Sangre de Perros.**

**A. Soto-Domínguez**, B. Jiménez-Delgadillo y J. Zavala-Velázquez. Revista Perfiles. No. 19 y 20. Enero-Febrero y Marzo- Abril del 2001. Págs. 3-6.

**2.- Efecto del arsénico sobre la Calidad Espermática y Función Endocrina en Sujetos Endémicamente Expuestos.**

Javier Morán Martínez y **Adolfo Soto Domínguez**. Revista Enlace Químico Vol. 9 (11) 11-22.

**3.- Niveles de Plomo en Sangre y su Relación con la Presión Sanguínea y Niveles de Glucosa en Sujetos Ocupacionalmente Expuestos.**

Javier Morán-Martínez, Edgar Héctor Olivas Calderón, Cecilia Lizbeth Ramírez- Cueto, **Adolfo Soto-Domínguez**. Revista Salud Pública y Nutrición. No.17. 2007.

**4.- Evaluación de la Presión arterial y Concentración de Glucosa en Sangre en Hombres Expuestos Crónicamente a Arsénico.**

Javier Morán-Martínez, Edgar Héctor Olivas-Calderón, Cecilia Lizbeth Ramírez- Cueto, **Adolfo Soto-Domínguez**. Revista Salud Pública y Nutrición. No.17. 2007.

**Resúmenes publicados en revistas de circulación internacional: 7**

**1.- Chromatinic Descondentation in Human Spermatozoa in Endemic Hydroarsenicism Exposed Men.**

Javier Morán-Martínez, **Adolfo Soto-Domínguez**, Edgar Alonso Pazos-Mendoza, Susana Bassol-Mayagoitia, Ricardo Martín Cerda-Flores, José Antonio Heredia Rojas. Congreso Internacional: Aplicaciones Médicas de la Biotecnología, Biotecnología Habana 2003.

**2.- Peroxisomicine A1 Causes Apoptosis in Liver, Kidney and Lung: Biochemical and Morphological Evidence.**

**A. Soto-Domínguez**, R. G. Ballesteros-Elizondo, O. Saucedo-Cárdenas, A. Piñeyro-López and J.Sepúlveda-Saavedra. (2005). *Mol.Biol.Cell*, A Supplement to Volume 16 (12) 5465-5901

**3.- Peroxisomicine A1 Causes Apoptosis in Liver, Kidney and Lung: Biochemical and Morphological Evidence.**

Soto A, Ballesteros R.G, Saucedo O, Sepúlveda J. (2005). *Histology and Histopathology*, Supplement to Volume 1, pág. S106-S107.

**4.- Morphological and Functional Evaluation of Peritoneal Macrophage of Intoxicated Mouse with Peroxisomicine A1.**

S.E.Velázquez-Gauna, J.Sepúlveda-Saavedra, A. Soto-Dominguez, R. G. Ballesteros-Elizondo. (2007). *Mol. Biol. Cell*. A Supplement to Vol. 18 (12) 4691-5153

**5.- Histological Evaluation of Rat Brain and Spinal Cord in a Model of Peripheral Polyneuropathy caused by *Karwinskia humboldtiana*.**

E.M. Becerra-Verdín, M.V. Bermúdez-Barba, M.E. Salazar-Leal, V.J. Romero-Díaz, Raquel G. Ballesteros-Elizondo, A. Soto-Domínguez, J. Ancer Rodríguez, A. Piñeyro López, Julio Sepúlveda-Saavedra. *European Journal of Neurology* (2008) 15 (Suppl. 3.) 222-390. P2743.

**6.- Peroxisomicine A1 Shows Selective Toxicity Over TC-1 Cells in a Murine Model.**

A. Soto, R. Ballesteros, E. Becerra, O. Saucedo, L. Garza, A. Piñeyro, J. Sepúlveda (2008). *Mol. Biol. Cell* 19 (suppl), abstract W-L31

**7.- Peroxisomicine A1 Shows Selective Toxicity Over TC-1 Cells in a Murine Model.**

Soto-Domínguez, A., Garza-Ocañas, L., Saucedo-Cárdenas, O., Ramírez-Durón R., Piñeyro-López, A, and Sepúlveda-Saavedra, J. (2009). *Histology and Histopathology*, Supplement to Volume 24, pág. S122.

**Artículos publicados en revistas con arbitraje: 1**

**1.- *Karwinskia humboldtiana* (buckthorn) fruit causes Central Nervous System damage during chronic intoxication in the rat.**

Eduardo M. Becerra-Verdín, M.V. Bermúdez-Barba, Martha E. Salazar-Leal, J. Ancer Rodríguez, Víktor Romero-Díaz, Adolfo Soto-Domínguez, Raquel G. Ballesteros-Elizondo, Odila Saucedo-Cárdenas, Alfredo Piñeyro López, Julio Sepúlveda-Saavedra, *Toxicon* 53 (2009) 645–651.

**Artículos enviados (en revisión): 1**

**Early administration of peroxisomicine A1 (T-514 extracted from *K. parvifolia* seeds) causes necrosis of implanted TC-1 cells without affecting target organs in a murine model.**

Adolfo Soto-Domínguez, Alfredo Piñeyro-López, Odila Saucedo-Cárdenas, Lourdes Garza-Ocañas, Rosalba Ramírez-Durón, Noemi Waksman, Raquel Ballesteros-Elizondo, Julio Sepúlveda-Saavedra. Enviado a: *Toxicon*.