

---

---

*Universidad de Guadalajara*

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS



EFFECTO AGUDO DEL ROJO DE RUTENIO SOBRE EL  
RIÑÓN DE LA RATA ADULTA

---

---

**TESIS PROFESIONAL**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A

Héctor Gustavo Villagran Lorenzana

DIRECTOR Y ASESOR DE TESIS:

M. EN C. GENARO GABRIEL ORTIZ

GUADALAJARA, JALISCO SEPTIEMBRE 1988

---

---

## AGRADECIMENTOS

A mi madre, como una culminación a su esfuerzo.

A mis hermanos Ma. Eugenia y Adrian, personas estudiosas que sabrán valorar este trabajo.

A V.C.P por su apoyo incondicional y confianza de siempre.

Al M. en C. Genaro Gabriel Ortiz por su apoyo y paciencia.

Un agradecimiento muy particular al Q.F.B Adolfo Cárdenas por su asesoría en la realización del presente trabajo y su gran calidad humana, así como al personal a su digno cargo.

A Martha por su amistad y cariño.

A todos aquellos que de alguna manera han cooperado conmigo

A esos individuos que pensaron que no podría ser

Al mundo, nada.

"CONDENAR UN PUNTO DE VISTA QUE SE  
DESCONOCE, CONSTITUYE UNA FALTA DE  
HONRADEZ INTELECTUAL".

Isaac Asimov.

Este trabajo fué realizado en el laboratorio de Morfología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Guadalajara y los laboratorios de Neuropatología y Cirugía experimental de la Unidad de Investigaciones Biomédicas de Occidente del IMSS, bajo la asesoría y dirección del M. en C - Genaro Gabriel Ortiz.

## INDICE

CONTENIDO	PAGINA
Introducción.....	8
Planteamiento del problema.....	18
Justificación.....	20
Hipótesis.....	22
Objetivos.....	24
Material y metodología.....	26
Resultados bioquímicos.....	29
Resultados histopatológicos.....	31
Comportamiento de los animales experimentales y testigo... 35	
Discusión.....	37
Conclusiones.....	40
Tablas y figuras.....	42
Bibliografía.....	63
Carta de aceptación de tesis.....	67
Carta de terminación de tesis.....	68

## INTRODUCCION



El rojo de rutenio es un colorante inorgánico formado de varios compuestos a base de este elemento. Es de naturaleza semisintética y la presencia de varios grupos amino le confiere propiedades fuertemente electropositivas.

Este colorante ha sido utilizado por los botánicos para teñir semiespecíficamente pectinas de las paredes celulares de vegetales (18). Debido a sus propiedades electropositivas, se emplea como marcador del glucocalix ya que puede unirse a mucopolisacáridos polianiónicos de la superficie celular externa, y determina con esto el posible papel que juega con la propia membrana y su unión con las células circundantes (28). Además se utiliza como ligando del tetróxido de osmio en muestras biológicas que no requieren un recubrimiento metálico para ser observadas a nivel de microscopía electrónica de barrido (7,8,25). El RR combinado con tetróxido de osmio forma un material electrodenso en la capa superficial externa de las células epiteliales intestinales fácilmente observable bajo el microscopio electrónico (18). Parece ser que el tetróxido de osmio amplifica, junto con el RR, una reacción de reducción a productos insolubles, ya que una de las características de este colorante es que precipita los mucopolisacáridos, como el condroitín sulfato, heparina y soluciones de pectinas, así como moléculas polianiónicas no mucopolisacáridas como el ácido poliacrílico y el ácido poliglutámico (18). Una desventaja importante del método es que el RR tiene un poder de penetración muy pobre en tejidos sólidos, limitándose a dos o tres de las capas celulares más superficiales (18).

Algunos investigadores han utilizado el RR para teñir tejidos que se considera contienen mucopolisacáridos ácidos, como serían el mixofibroma de piel humana, tejido subcutáneo de rata adulta y recién nacida, granuloma de Carrageenin (13), y de la fibra elástica aórtica en ratas neonatales (25). Además con este colorante se han podido identificar algunos carbohidratos de la superficie de células de hepatoma ascíticas (AH-130) como la hexosamina, el ácido urónico y ácido siálico. Estas células al ser tratadas con papaína liberan sustancias de unión con el RR a partir de su superficie e impiden su adsorción a la misma (28).

Tanto el RR como la neuraminidasa tienen como blanco común la misma molécula que es el ácido siálico, el cual forma parte de algunos sustratos localizados sobre la superficie interna de la terminal presináptica y que se presume están implicados en la liberación de algún transmisor lo que indicaría una disminución en la eficacia sináptica (4).

En otro trabajo se ha reportado que el efecto convulsivo del RR inyectado intracranealmente a gatos se previene o disminuye por acción de la androsterona, así mismo el efecto depresivo sobre las neuronas de este animal provocado por esta hormona, es antagonizado por el colorante al ser inyectado intaventricularmente (15).

Parte de lo que se conoce actualmente sobre el comportamiento del calcio a nivel celular y mitocondrial en varias especies animales, se debe a la aplicación del RR. El calcio afecta en mucho al metabolismo celular, y su transporte por la mitocondria es un factor determinante en la regulación de la distribución intracelular de este ión (14). El RR actúa directamente sobre los sistemas de transporte del calcio inhibiéndolos, específicamente el calcio mitocondrial (17,19), y en menor proporción en la membrana celular (3). Los estudios realizados concuerdan en que el RR tiene un efecto sobre el ingreso, retención y salida del calcio en la mitocondria. Bajo condiciones fisiológicas normales la redistribución del calcio por la célula, controla y determina la compartimentalización de metabolitos aniónicos, lo cual depende del estado de sus mitocondrias (14). El RR tiene un efecto sobre el movimiento del calcio debido probablemente a cambios provocados sobre la estructura de las membranas mitocondriales (22), ya que reacciona específicamente con el centro activo de los sitios de mediación del transporte de calcio mitocondrial (mucopolisacáridos o glicolípidos) (19), o porque compite con éste por los sitios que lo unen (23). En otros estudios se ha demostrado que la concentración de RR es determinante en la inhibición de el sistema de transporte del calcio en las mitocondrias del hígado (3) y en la concentración intracelular de calcio en el huso muscular de la rana (9). La liberación de neurotransmisores dependientes de calcio en los ganglios bucal y cerebral de *Aplysia californica* y en sinaptosomas de ratón adulto

también es inhibida por el RR (4). Por otro lado, parece ser que los efectos de carga superficiales no son específicos por lo que no tienen una participación importante en el mecanismo de inhibición del transporte de calcio mitocondrial por el RR (20), además la membrana interna de la mitocondria contiene sitios de alta y baja afinidad por este colorante, así como sitios insensibles a él (6). En resumen, el RR tiene la capacidad de bloquear la unión y transporte en células íntegras y elementos subcelulares, así como también la liberación de neurotransmisores dependientes de calcio.

Inyectado intracranealmente a gatos y ratones provoca actividad convulsiva (27) y por vía intraperitoneal (ip) produce parálisis flácida e hipotonía muscular en la rata adulta (1). La administración intraperitoneal de RR a diferentes concentraciones provoca desde una actividad motora atípica con recuperación del individuo (dosis de 10 mg. RR/Kg de peso), hasta una etapa que se caracteriza por un periodo preconvulsivo y otro convulsivo que culmina con la muerte de los animales (dosis de 20 mg. RR/Kg de peso). Debido a estos efectos se ha propuesto que el RR administrado por vía intraperitoneal actúa también sobre el sistema nervioso central por lo que se sugiere que el fenómeno de barrera hematoencefálica no se cumple para esta molécula en la rata adulta. Probablemente el RR llegue al sistema nervioso central a través de sitios que carecen de barrera hematoencefálica (1).

La adsorción de RR a la superficie externa de la membrana celular (25,28), sirve como base para explicar la capacidad de esta molécula para inducir la aglutinación de eritrocitos de rata tanto *in vivo* como *in vitro* (2). En los estudios *in vivo* se observa aglutinación de eritrocitos que aumenta con el tiempo a partir de la administración del colorante, con la consecuente alteración de la actividad motora ya descrita (1). La morfología de las células también se ve afectada con el transcurso del tiempo. En los estudios *in vitro* la proporción de aglutinación de eritrocitos es paralela a la concentración de RR, y los cambios morfológicos son leves. Debido a las características policatiónicas de RR y a que en la superficie del glucocálix predominan cargas electronegativas dadas por la presencia de residuos de ácido siálico, es probable

que este colorante actúe como un ligando entre el glucocálix de los eritrocitos vecinos provocándose su aglutinación (2).

Por otro lado, hay estudios que sugieren que el RR podría tener un efecto tóxico directo sobre las células (2,21). Ortiz et al han reportado alteraciones patológicas de tipo histológico y bioquímico, provocadas por este colorante sobre tejido hepático, así como en algunos parámetros de la coagulación.

Ahora bien, debido a que este trabajo se centra en el estudio del riñón de la rata, se hace necesaria una revisión muy general de este órgano.

Los roedores como el conejo y la rata poseen, a diferencia del humano y otros mamíferos superiores, un riñón de un solo lóbulo, lo cual permite hacer preparaciones del órgano en toda su extensión, facilitándose mucho su interpretación (11). Macroscópicamente el riñón unilobular semeja su forma a la de un frijol, con un borde convexo y uno cóncavo en el que se localiza una región llamada hilio, la cual habitualmente contiene grasa. A través del hilio llegan al riñón el uréter, la arteria y vena renales y el plexo nervioso que inerva todo el órgano.

Microscópicamente, en un corte longitudinal, presenta un parénquima en el que se distinguen dos partes: la corteza y la médula. La corteza es de color pardo rojizo y se localiza en la porción más externa en dirección del borde convexo y tiene un aspecto granuloso debido a que en ella se encuentran los glomérulos y los túbulos contorneados. La médula tiene forma piramidal; su vértice apunta hacia el hilio y su base sirve para delimitar la corteza de la médula, es de un color más claro y tiene un aspecto estriado debido a la presencia de las asas de Henle y los túbulos colectores (11). El riñón unipiramidal a su vez está dividido en lobulillos, los que no se distinguen claramente ya que no existen tabiques de tejido conectivo que los delinien perfectamente, por lo que se toma como núcleo central del lobulillo una prolongación de sustancia medular llamada rayo medular que penetra en la corteza, y como sus lados la luz de las arterias interlobulillares localizadas en la corteza (11,12).

La unidad funcional y estructural del riñón es la nefrona, la

cual consta de tres porciones: glomérulo, túbulos contorneados proximal y distal y el asa de Henle. El glomérulo es una estructura formada por un ovillo de capilares que son surtidos por una arteriola aferente y drenados por una arteriola eferente. A este nivel la porción ciega del tubo contorneado proximal se ensancha y en él se invagina el glomérulo para constituir el corpúsculo renal o de Malpighi; todos los glomérulos se localizan a nivel de la corteza (11,12). En el corpúsculo renal se observa de fuera hacia dentro la cápsula de Bowman, formada por una membrana basal capsular y un epitelio capsular o capa parietal de la cápsula de Bowman. Estas membranas se continúan hacia la porción invaginada y recubren parcialmente los capilares; aquí reciben el nombre de membrana basal glomerular y epitelio glomerular o capa visceral de la cápsula de Bowman. En la zona del capilar que queda desnuda se localizan un tipo de células llamadas mesangiales (11), cuya función parece ser la de sostén. Las arteriolas aferentes poseen un diámetro externo del doble de las arteriolas eferentes, además en las primeras se localizan las células yuxtaglomerulares en su porción proximal a la raíz glomerular, y se reconocen por sus núcleos redondos y citoplasma granular y porque a este nivel carecen de la lámina elástica interna (11).

El túbulo contorneado proximal parte desde el corpúsculo renal plegándose sobre sí mismo antes de salir del parénquima cortical para entrar en la médula, en donde constituye la porción descendente del asa de Henle, se curva y asciende a través de la médula para ingresar nuevamente en la corteza y formar el túbulo contorneado distal. En un corte teñido con hematoxilina y eosina el túbulo sinuoso proximal es el que se observa en mayor cantidad y sus células poseen un citoplasma más acidófilo (rosado) y granuloso que el del túbulo sinuoso distal, además su superficie luminal presenta un borde estriado y las alteraciones consecuentes de la degeneración *post mortem* son más rápidas (11).

El asa de Henle es más delgada que los túbulos sinuosos y en su parte terminal se pone en contacto con el glomérulo entre la zona donde entran y salen las arteriolas aferente y eferente para dar origen a la mácula densa. Entre la mácula densa y el corpús-

culo renal se encuentran unas células llamadas de *polquinssen* o *cojinete polar*. La *mácula densa* se reconoce fácilmente porque presenta gran cantidad de núcleos y se localiza en la raíz glomerular. A partir de este momento el asa de Henle constituye el túbulo contorneado distal que se continúa en una rama lateral del túbulo colector, el cual desembocará en el vertice de la pirámide medular en donde se localiza la papila renal. donde junto con otros túbulos se continuarán a la pelvis renal y el uréter (11,12). Su epitelio es algo más bajo y la luz mayor que en el contorneado proximal. Ni la estructura ni la ultraestructura permiten establecer una clara diferencia entre la porción gruesa del asa de Henle y el sinuoso distal, por lo que algunos autores designan al conjunto de ambos tubo de *Schweigger-Seidel*. Las figuras 5 y 6 nos muestran fotografías de un corte de riñón normal de rata.

Los riñones eliminan productos tóxicos que resultan del metabolismo, principalmente de las proteínas, así mismo mantiene el equilibrio interno de líquidos y electrolitos (10,11,26). Las sustancias de deshecho son disueltas en un líquido tisular modificado llamado orina, la cual es eliminada a través de una serie de conductos que comunican con el exterior del organismo. El riñón además reabsorbe sustancias útiles al organismo como agua, iones y otros metabolitos importantes. Por otro lado resulta ser una glándula de tipo endocrino que secreta renina y el factor eritropoyético renal (10,11). Son por lo tanto funciones del riñón las siguientes:

- 1) Función desintoxicante.
- 2) Tiene participación en la regulación de líquidos corporales.
- 3) Ayuda a mantener el equilibrio electrolítico de la sangre y líquidos tisulares.
- 4) Esta relacionado con el control de la presión arterial.

Los riñones, el sistema nervioso central y el hígado, son los órganos más atacados por compuestos a base de elementos como mercurio y bismuto y algunos solventes orgánicos (24,26). El grado de toxicidad de los agentes químicos sobre el organismo depende de tres factores (24):

- A) Suceptibilidad de células y tejidos a un tipo específico de le-

sión química.

B) El mecanismo de acción del tóxico, es decir, si actuará localmente o será absorbido y producirá un daño general.

C) La concentración del tóxico, el cual solo actúa si excede el umbral de tolerancia específico para cada organismo.

Además de esto, la gravedad de la lesión depende de la severidad del ataque y el tiempo de exposición de la célula al tóxico.

De acuerdo a estos tres factores, una intoxicación presenta, por lo regular, dos fases: una aguda y una crónica. La fase aguda generalmente culmina con la muerte del organismo en poco tiempo, mientras que en la fase crónica tarda más en morir o puede no llegar a ser mortal (24).

Debido a sus funciones, los riñones constituyen un órgano blanco para la mayoría de las sustancias tóxicas que ingresan al organismo. Las estructuras que son principalmente lesionadas por agentes químicos son los túbulos contorneados, mientras que los glomérulos y los túbulos colectores son más resistentes a la mayoría de los tóxicos (24). Algunos de los tóxicos que afectan a los riñones son el monóxido de carbono, fenol y cresol, tetracloruro de carbono, cianuro, iones mercurícos, sales arseniales, fósforo y bismuto (2,24).

Las células de los riñones, como las del resto del organismo, sufren alteraciones de tipo morfológico provocadas por lesiones celulares llamadas degeneraciones. De acuerdo a la magnitud del daño se distinguen al microscopio de luz tres tipos principales de degeneración (24):

A) TUMEFACCION TURBIA: La célula se ve aumentada (edematizada) por la captación de agua extracelular debido a que los mecanismos de permeabilidad están alterados. Esta lesión es de naturaleza regresiva y benigna. Se observa principalmente en túbulos renales en los que sus células presentan un citoplasma granuloso y turbio.

B) DEGENERACION HIDROPICA O VACUOLAR: Forma más grave de el proceso edematizante anterior, causada por los mismos factores pero que actúan más tiempo y con mayor intensidad. El citoplasma se observa con vacuolas pequeñas y transparentes; en casos más gra

ves se puede apreciar desplazamiento del núcleo por una sola vacuola grande.

C) METAMORFOSIS GRASA: Resulta de una acumulación anormal de grasa en el interior de las células del parenquima del órgano, precedida generalmente de tumefacción turbia. Es indicio de lesión celular grave que puede anunciar la muerte de la célula, aunque en si misma es reversible. En los casos mas graves también hay daño en los túbulos sinuosos distales y colectores.

Si los factores que producen las lesiones mencionadas persisten o son mas intensos sobreviene la muerte celular o necrosis, la que se manifiesta por cambios morfológicos muy específicos (24).

Generalmente se acepta que niveles elevados de urea y creatinina son manifestación de disfunción renal. Existen varias pruebas de laboratorio para determinar estas sustancias en suero, plasma y sangre total. Para la urea el metodo más común es el de la diacetilmilmonoxamina y para la creatinina se han descrito varios metodos (5,16). La urea resulta del metabolismo del nitrógeno de los aminoácidos, como un medio para eliminar el exceso este gas en el organismo. Se sintetiza en el hígado y se elimina a través del riñón. La urea se expresa como nitrógeno ureico. La determinación de nitrógeno uréico en suero es uno de los analisis eliminatorios más popularizados para la evaluación de la función renal. Su análisis se hace simultaneamente con creatinina, lo que ayuda en un diagnóstico diferencial de hiperuremia prerenal, renal y posrenal (16). El aumento de los niveles de urea sérica debidos a causas prerenales son descompensación cardiaca, deshidratación, aumento del catabolismo de las proteínas y alteración del riego sanguineo renal. Como causas renales glomerulonefritis aguda con aumentos moderados de urea, nefritis crónica y necrosis tubular entre otras. Las causas posrenales pueden ser cualquier tipo de obstrucción del tracto urinario, tumores en la vejiga, etc (16).

La creatinina es el anhídrido de creatina, sustancia sintetizada en el riñón a partir de los aminoácidos glicina, arginina y metionina y complementada en el hígado. La creatina normalmente se encuentra como fosfocreatina y funciona como un donador de grupos fosfato de alta energía durante la contracción muscular. La creati-



nina es eliminada del plasma por filtración glomerular y luego excretada en la orina por los riñones (5,16).

La determinación de creatinina se hace preferentemente en suero o plasma que en sangre, ya que los eritrocitos contienen cromógenos que pueden interferir, es por esta razón que se debe tener cuidado de no utilizar muestras hemolizadas.

Por último, ya que los riñones son órganos de una reserva funcional considerable, se debe tener en cuenta que estas pruebas a pesar de la solidez de sus fundamentos fisiológicos y bioquímicos, tienen una utilidad limitada, por la capacidad fisiológica de los riñones de llevar a cabo sus funciones aun después de lesiones graves (16).

Existen muchos compuestos que son potencialmente tóxicos para los riñones y que provocan alguno de los cambios degenerativos ya mencionados, reflejados por un aumento inmoderado de las sustancias que evalúan la función y estado renales. Por lo tanto el propósito de este trabajo es estudiar el efecto del KR sobre el riñón puesto que es el órgano encargado de la excreción.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De los antecedentes anteriormente expuestos podemos inferir que el rojo de rutenio es una sustancia tóxica sistémica por lo que se plantea el problema de determinar hasta que grado afecta al riñón.

## JUSTIFICACION

Este trabajo aumentará los conocimientos sobre los efectos que las sustancias tóxicas policationicas tienen sobre los distintos modelos biológicos ensayados.

## HIPOTESIS

El rojo de rutenio es un tóxico que actúa sistémicamente.  
Sobre el tejido renal provocará un proceso degenerativo.

## OBJETIVOS



Estudiar el efecto tóxico del rojo de rutenio sobre el riñón de la rata adulta.

Hacer un estudio macroscópico e histopatológico del riñón afectado y normal.

Hacer un estudio bioquímico:

- a) determinación de creatinina sérica.
- b) determinación de urea sérica.
- c) depuración sérica del rojo de rutenio .

## MATERIAL Y METODOLOGIA

Se utilizaron ratas (250-300 grs.) adultas del sexo masculino de la cepa Wistar. Todos los animales se mantuvieron controlados bajo condiciones de bioterio (temperatura, período de luz-oscuridad de 12/12 hrs., alimento Purina (nutricubos) y agua *ad-libitum*.

Se formaron 10 grupos de 5 ratas cada uno tomándose como testigo 5 de ellos

A los animales experimentales se les administró por vía intraperitoneal (i.p.) 20 mg. de RR por Kg. de peso a partir una solución al 0.3 % de RR en dosis única y los animales testigo recibieron dosis proporcionales a su peso de solución salina fisiológica. Todos los animales fueron sacrificados a los 30, 60, 120 y 480 minutos después del tratamiento. Se efectuó una toracotomía, previa anestesia de los animales con éter etílico y se tomaron del ventrículo izquierdo las muestras de sangre para las pruebas bioquímicas mediante punción cardíaca con aguja del No. 20. Se dejó coagular la sangre por espacio de 10 minutos y se centrifugó por un tiempo mínimo de 10 minutos a 3,500 R.P.M. en una centrífuga BHG modelo óptima II.

Inmediatamente después de extraídas las muestras de sangre, las ratas fueron perfundidas por vía intracardiaca mediante un catéter al ventrículo izquierdo y un corte a nivel de la aurícula derecha para infundir una solución lavadora de fosfatos (soln. "A") (tabla 1) por espacio de 2 a 3 minutos y una solución fijadora (soln. "B") (tabla 2) de 10 a 15 minutos. La presión de perfusión fue de 1.40 mts., según el método de Feria Velasco-Karnovsky.

Después de la perfusión se extrajeron los riñones y se sometieron a una posfijación en la solución "B" por espacio de 1.30 hrs. Se describió el aspecto macroscópico que presentan los riñones en cada uno de los tiempos de sacrificio y se practicó un corte longitudinal en el órgano. Posteriormente las muestras de tejido renal fueron sometidas a un proceso de deshidratación en soluciones crecientes de etanol (70 %, 80 %, 90 % y absoluto dos veces por 20 minutos) y se aclararon en xilol (etanol/xilol 1 vez 15/20 minutos y xilol 15 minutos).

Las muestras deshidratadas fueron embebidas e incluidas en paraplast/plus fundido en una estufa a 60-62 grados centígrados

máximo.

Los cortes se hicieron en un microtomo rotatorio 820 de la AO Scientific Instruments. La tinción de los cortes se hizo mediante la técnica de Hematoxilina-Eosina (HE). Las fotomicrografías se tomaron en un microscópio Microstar IV equipado con un control de disparo expostart AO Scientific Instrument.

La prueba bioquímica de creatinina se hizo de acuerdo al instructivo anexo al kit para creatinina a cargo de Boehringer Mannheim GmbH, y la prueba de urea como se especifica en la referencia bibliográfica.

La depuración del RR se estableció de la siguiente manera:

El espectro de absorción se efectuó en un espectrofotómetro UV-240 Shimatzu, y se encontró el pico óptimo de absorción a 530 nm (figura 1). Se utilizó una solución de RR al 0.3 % en dilución de 1:100. El estándar se preparó con una solución de RR al 0.3 % en diluciones en solución salina fisiológica de 1:100 y de 1:1000. Se decidió que la dilución óptima es la de 1:100 debido a que la intensidad del color es la más semejante a la que se observa en las muestras de suero problema. El blanco empleado fué el suero de los animales testigo, ya que las sustancias propias del suero proporcionan un valor que puede restarse del obtenido en cada problema. No se usó un blanco absoluto porque las lecturas de los sueros problema salían de la escala del aparato debido a la intensidad del color.

Los resultados obtenidos se calcularon de dos formas:

- A) usando un disco calculador de química clínica para determinar concentración en base a % de transmitancia.
- B) empleando la siguiente fórmula:

$$[RR] = \frac{(\text{absorban. prob.})(\text{valor. St.})}{\text{absorban. St.}}$$

Se optó por utilizar la fórmula, ya que proporciona datos más exactos que el disco. La desventaja del disco es que no se puede determinar una concentración menor a 10 mg/dl.

Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante pruebas paramétricas e inferenciales ("T" de Student).

## RESULTADOS BIOQUIMICOS

## CREATININA

A los 30 minutos los animales experimentales mostraron niveles séricos aumentados en más del 200 % al compararlos con las ratas testigo ( $1.60 \pm 0.393$  mg/dl y  $0.55 \pm 0.007$  mg/dl respectivamente) lo que resultó significativamente diferente ( $p \leq 0.0003$ ). A los 60 minutos los resultados obtenidos de los animales experimentales ( $1.14 \pm 0.42$  mg/dl) no tuvieron diferencia significativa con respecto a los testigos ( $0.82 \pm 0.058$  mg/dl) ( $p = 0.13$ ). A los 120 minutos la creatinina del grupo experimental se encontró aumentada en un 70 % en relación al grupo testigo ( $0.84 \pm 0.09$  mg/dl y  $0.52 \pm 0.01$  mg/dl respectivamente) con una diferencia bastante significativa ( $p \leq 0.00007$ ). A los 480 minutos los resultados obtenidos de las ratas experimentales tuvieron una diferencia en concentración de casi el 100 % en comparación con los testigos ( $1.19 \pm 0.73$  mg/dl y  $0.61 \pm 0.007$  mg/dl respectivamente), sin embargo estos datos no resultaron significativos ( $p = 0.11$ ) (figura 2).

## UREA

A los 30 y 480 minutos el grupo experimental mostró concentraciones más elevadas de urea al compararlos con el grupo testigo ( $63.3 \pm 5.2$  mg/dl -  $76.9 \pm 0.96$  mg/dl y  $54.4 \pm 1.9$  mg/dl -  $55.1 \pm 1.3$  mg/dl respectivamente) y la diferencia entre ellos fue significativa ( $p \leq 0.007$  a los 30 minutos y  $p \leq 0.000001$  a los 480 minutos). A los 60 minutos no hubo diferencia significativa en los datos obtenidos entre los animales experimentales y los testigo ( $56.0 \pm 2.4$  mg/dl y  $57.9 \pm 2.17$  mg/dl respectivamente) ( $p = 0.23$ ). Los valores obtenidos del grupo experimental de 120 minutos tampoco tuvieron diferencia significativa en cuanto al grupo testigo ( $62.2 \pm 7.2$  mg/dl y  $56.2 \pm 2.3$  mg/dl respectivamente) ( $p = 0.12$ ) (figura 3).

## DEPURACION DEL ROJO DE RUTENIO.

A los 30 minutos la concentración de RR sérico detectado fue de  $1.9 \pm 0.9$  mg/dl. La máxima concentración ( $4.3 \pm 3.8$  grs/ml) se detectó a los 60 minutos. A partir de este momento comenzó a disminuir ( $3.0 \pm 0.52$  mg/dl a los 120 minutos). A los 480 minutos la concentración de RR sérico fue mínima ( $0.54 \pm 0.21$  mg/dl) (figura 4).

## RESULTADOS HISTOPATOLÓGICOS

#### DESCRIPCION MACROSCOPICA.

A los 30 minutos los riñones de los animales experimentales se observaron congestionados y ligeramente más pálidos que los testigos. La corteza se observa bien delimitada e íntegra y no existe evidencia de infarto. La médula aparece teñida por el RR (XX).

A los 60 minutos los riñones se observaron congestionados y abultados y con un aspecto granuloso, la grasa periférica se ha teñido por el colorante, se observan manchas café oscuro en la parte más superficial. La corteza muestra zonas teñidas por el RR en forma triangular; no hay evidencia macroscópica de infarto. Persiste la tinción del colorante en la médula, no se observa otro signo patológico (XXXX).

A los 120 minutos los riñones se observan edematizados y granulosos, la grasa periférica tiene una consistencia muy friable y se encuentra teñida por el RR. La zona más externa de la región cortical muestra manchas café oscuro y se puede apreciar la filtración del RR puesto que el lóbulo muestra figuras triangulares en cada lobulillo y no se observan evidencias de infarto. La médula permanece teñida por el RR y no hay otros datos patológicos (XXX).

A los 480 minutos el proceso edematoso ha disminuido así como la granulosis superficial. En la corteza no se observan tan grandes las manchas café oscuro y en general se circunscriben al borde externo. La médula se observa teñida por el colorante pero la tonalidades menor (el color se ha vuelto más pálido). No hay datos de infarto o necrosis (XX).

El grado de impregnación de los órganos con el colorante fue valorado cualitativamente por cruces, donde una cruz nos indica tinción periférica (grasa y fasceas) pero respeta el órgano. Dos cruces indica tinción cortical que abarca hasta la zona córticomédular. Tres cruces indica tinción tanto cortical como medular de un tono rojo claro. Cuatro cruces indica tinción cortical y medular de un tono rojo muy oscuro. Cinco cruces indicaría una tinción total del órgano de un color rojo oscuro.

#### DESCRIPCION MICROSCOPICA.

A los 30 minutos en algunos corpúsculos renales se observó



ruptura de la cápsula de Bowman manifestada por la dilución de la membrana basal y el desprendimiento de la lámina parietal (epitelial) lo que provocó que se estableciera una continuidad entre el espacio capsular y los intersticios tubulares. Los núcleos de las células de la lámina epitelial se encontraron hipercromáticos y perdieron su aspecto plano típico; no se aprecia granulocidad citoplásmica (figura 5). Las células del glomérulo presentan núcleos hipercromáticos y en menor proporción que en el testigo, no se aprecian datos de necrosis (figura 5). El lumen de los túbulos contorneados proximales y distales se encuentra disminuido y se observa la presencia de células y material precipitado. Los intersticios tubulares presentan abundantes células con núcleos hipercromáticos. Las células tubulares presentan un proceso de tumefacción turbia manifestado por hipercromaticidad nuclear y un citoplasma granuloso. Algunos túbulos sinuosos proximales y distales presentan un adelgazamiento, y en los más severamente dañados se observa pérdida de la integridad tubular y se observan imágenes necróticas (figura 7 y 8).

A los 60 minutos el patrón de organización del órgano fué muy semejante al tiempo anterior. La membrana basal de la cápsula de Bowman ha perdido su integridad y la lámina parietal se observa desprendida, los núcleos de sus células aparecen hipercromáticos y no se aprecia granulocidad citoplásmica. El glomérulo aparece más condensado que a los 30 minutos y sus células tienen los núcleos hipercromáticos y en el espacio capsular hay material precipitado y no hay evidencias necróticas observables (figura 9). La luz de los túbulos proximales y distales se ve disminuida, y en algunos de ellos prácticamente ha desaparecido. Hay desprendimiento celular hacia el lumen en algunos túbulos proximales y distales y en muchos de ellos se aprecia material precipitado. En general las células tubulares padecen un proceso de tumefacción turbia al cual se ha aunado un proceso de degeneración hidrópica caracterizada por un citoplasma vacuolizado, además se observan imágenes necróticas francas en diferentes estadios. En los espacios intersticiales de los túbulos se observa la presencia de células con núcleos hipercromáticos (figura 10).

A los 120 minutos la membrana basal de la cápsula de Bowman y la lámina parietal, en la mayoría de los corpusculos renales a perdido su aspecto clásico y sus núcleos se encuentran hiper cromáticos y en una cantidad menor que en los tiempos anteriores. Se observa una condensación generalizada del glomérulo por lo que el espacio capsular se encuentra muy aumentado, los núcleos de sus células se hayan hiper cromáticos y dan la apariencia de fusionarse unos con otros, el citoplasma no se observa granuloso pero si más oscuro en relación a los tiempos anteriores (figura 11). Los túbulos contorneados proximales y distales perdieron su patrón de organización tisular y los núcleos de sus células se observan hiper cromáticos y han emigrado hacia la parte media del túbulo. El lumen ha desaparecido en muchos túbulos, así como los espacios intersticiales entre estos debido al proceso degenerativo que va desde la tumefacción turbia hasta la degeneración hidrópica (vacuolar); Las imágenes necróticas son abundantes, hay bastante material precipitado y la destrucción tubular es evidente. Algunos túbulos parecen haberse fusionado entre si por lo que no se distingue con claridad si son proximales o distales (figura 12).

A los 480 minutos el daño a la cápsula de Bowman persiste; la membrana basal y la lámina parietal se han diluido en algunos corpusculos renales y sus células se observan desprendidas en algunas zonas (figura 13). El glomérulo se encuentra disgregado y los núcleos de sus células parecen haberse fusionado entre si. El daño tubular es generalizado; tanto los túbulos distales como los proximales han perdido su integridad y las imágenes degenerativas y necróticas son abundantes. En algunas zonas se observan masas de tejido aglomerado y el lumen prácticamente ha desaparecido de los túbulos. Llama la atención que los núcleos de las células ya no se observan tan hiper cromáticos; probablemente el órgano tiende a recuperarse (figura 14), aunque se observan imágenes sugestivas de un proceso incipiente de fibrosis (flecha).

## COMPORTAMIENTO DE LOS ANIMALES TESTIGO Y EXPERIMENTALES

Las ratas que recibieron solución salina fisiológica se comportaron normalmente (ascicalamiento, buen apetito y activas). Las ratas tratadas con RR tuvieron un comportamiento como el ya descrito en trabajos anteriores. Todos los animales mostraron actividad motora atípica y sufrieron parálisis flácida. Una rata del cuarto grupo (480 minutos) se mostró prácticamente normal en su comportamiento, aunque se detectó hemorragia renal en ella. En todos los animales se observó restos de colorante en la orina.

## DISCUSSION

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que el RR es una sustancia tóxica para el riñón.

Tanto la creatinina como la urea tuvieron un comportamiento muy semejante (figuras 2 y 3) La concentración de creatinina sérica se encontró muy aumentada a los 30 minutos, y comenzó a eliminarse progresivamente para posteriormente aumentar a los 480 minutos. La urea aun cuando no alcanzó en ningún momento la magnitud de la creatinina, si se encontró aumentada desde un inicio (30 minutos), disminuyó y aumentó de nuevo (480 minutos). Por otro lado la curva de depuración del RR tuvo un comportamiento totalmente opuesto (figura 4); mientras que la concentración de colorante aumentaba la de urea y creatinina disminuía. A los 30 minutos la urea y la creatinina se encontraron muy altos en relación al RR lo cual indica un efecto tóxico casi inmediato del colorante manifestado por el aumento temprano de estas sustancias.

Ahora bien, Ortiz et. al., han demostrado un efecto tóxico del RR a nivel hepático y Arauz et. al., han provocado aglutinación eritrocítica con este colorante y reportado áreas de infarto renal en ratas. En este estudio se observó evidencia macroscópica y microscópica de alteración degenerativa pero no de infarto.

Con lo anterior se corrobora que el RR resulta un tóxico sistémico.

Aunque morfológicamente, el proceso patológico ya se había detectado desde los 30 minutos (figura 7 y 8), el máximo efecto del RR sobre el riñón se observó alrededor de los 120 minutos (figura 11 y 12). Resulta claro que el riñón, a pesar de haber sufrido un daño casi inmediato no pierde su funcionalidad y es hasta los 120 minutos que su eficiencia se ve afectada, lo cual se manifiesta por una nueva acumulación de urea y creatinina. Lo que no es claramente explicable es la rápida acumulación de estas sustancias, principalmente de creatinina, dentro de los primeros 30 minutos después de la administración del RR. Probablemente el colorante induce una aceleración en el metabolismo de las proteínas y esto aumente rápidamente la concentración de creatinina sérica a partir de su precursor la creatina, la cual proviene de la degradación de algunos aminoácidos.

Por otro lado, se sabe que una redistribución de calcio puede controlar y determinar la compartimentalización de metabolitos aniónicos y en una célula viva se sabe que esto depende del estado de sus mitocondrias (14). Los mucopolisacáridos o los glucolípidos son el centro activo de los sitios de mediación del transporte de calcio mitocondrial (19). El RR no puede penetrar a la célula para unirse a estas moléculas sobre la mitocondria, por lo que al unirse a la membrana externa de la célula es probable que la modifique alterándose de alguna manera los mecanismos de transporte del calcio que indirectamente afecten el movimiento de este ión a nivel mitocondrial, lo cual traería alteraciones de las estructuras dependientes de calcio y se provocaría un proceso degenerativo.

Por último, ya que el RR es una mezcla de compuestos que hace difícil la interpretación de resultados y por lo anteriormente expuesto se puede ver que su efecto es altamente inespecífico. Al utilizar este colorante como modelo de epilepsia se debe pensar como afecta el RR a otros órganos, y que estos a su vez en forma secundaria (indirecta) también afecten al sistema nervioso. Esto ha propiciado que se hayan hecho estudios sobre hígado, riñón, pulmón y corazón (estos dos últimos se encuentran en fase experimental), órganos indispensables para mantener la homeostasis de un individuo. Resulta claro que el RR provoca un efecto general sobre el animal experimental, el cual manifiesta un efecto convulsivo y flácido que depende de la dosis y vía de administración. Pero, cual es el grado de daño general causado en este modelo?, cual de todos los compuestos del RR (café, violeta, u otras aminas de rutenio) es el directamente involucrado sobre sus efectos convulsivos y degenerativos?. Faltan muchas preguntas por aclarar, por lo que se comienza a elaborar trabajos para tratar de responder a las siguientes : 1) el efecto del RR sobre el endotelio vascular cerebral y su fenómeno de barrera y 2) se tratará de separar por cromatografía los distintos compuestos de rutenio y se probará su efecto fisiológico y morfológico sobre el sistema nervioso central (SN) y otras áreas involucradas.

## CONCLUSIONES



El rojo de rutenio (RR) es una sustancia que ejerce un efecto tóxico agudo sobre los riñones, de tipo degenerativo inespecífico manifestado por las alteraciones morfológicas y las variaciones en las cifras de los estudios bioquímicos realizados.

## TABLAS Y FIGURAS

TABLA 1

SOLUCION "A" (solución lavadora).

Amortiguador de fosfatos de sodio 0.1 M.

Heparina 1000 U.I./1000 ml. de solución.

Procaina 1 gr./1000 ml. de solución.

Cloruro de calcio 0.001 M, 1 gota/10 ml. de solución.

TABLA 2

SOLUCION "B" (solución fijadora al 10 %).

Amortiguador de fosfatos 0.1 M.

Formaldehído al 37 %.

Figura 1. Corrimiento espectrofotométrico de una muestra de RR a partir de una solución 0.3 % del colorante en dilución 1:100. El pico óptimo de absorción del RR se estableció a 530 nm.

Figura 2. Determinación de creatinina sérica en ratas tratadas con solución salina fisiológica (barras oscuras) y con rojo de rutenio (barras claras) por vía intraperitoneal. La gráfica muestra los niveles de creatinina con respecto al tiempo. A los 30 y 120 minutos los datos obtenidos de los animales experimentales fueron significativamente diferentes al compararlos con los testigos, aún así la concentración de creatinina en las ratas experimentales se mantuvo siempre por encima de los testigos.

Figura 3. Determinación de urea sérica en ratas tratadas con solución salina fisiológica (barras oscuras) y con rojo de rutenio (barras claras) por vía intraperitoneal. La gráfica muestra los niveles de urea con respecto al tiempo. Los tiempos con diferencia significativa entre animales experimentales y testigo se observaron a los 30 y 480 minutos.

Figura 4. Curva de depuración sérica del rojo de rutenio en ratas tratadas con este colorante por vía intraperitoneal. La concentración máxima se detectó hacia los 60 minutos y la mínima a los 480 minutos.

Figura 5. Fotomicrografía a nivel de corteza de un corte longitudinal de riñón de rata normal tratada con solución salina fisiológica por vía intraperitoneal. Corpúsculo de Malpighi en el cual se observan un glomérulo (G), la cápsula de Bowman (CB) con su capa epitelial y membrana basal íntegras, así como un típico túbulo contorneado proximal con su borde luminal en cepillo. El espacio capsular (EC) se localiza entre el glomérulo y la cápsula de Bowman (H-E. 220x).

Figura 6. Fotomicrografía a nivel de corteza de un corte longitudinal de riñón de rata normal tratada con solución salina fisiológica

gica por vía intraperitoneal. Túbulos contorneados proximales (TP) y distales (TD), porción gruesa del asa de Henle (AHD), y vasos capilares (VC) Todas las estructuras tubulares presentan núcleos celulares con un aspecto granuloso claro y un citoplasma estriado. (H-E. 220x).

Figura 7. Fotomicrografía de un corte longitudinal de corteza de riñón de rata tratada con rojo de rutenio por vía intraperitoneal a los 30 minutos posteriores a la administración del colorante. Corpúsculo renal en el que se observa ruptura y desprendimiento de la cápsula de Bowman (CB) y condensación del glomérulo. Las células tubulares se encuentran tumefactas y en la luz de algunos túbulos se observa material precipitado (flecha). Los núcleos de todas las células se observan hipercromáticos. (H-E. 220x).

Figura 8. Fotomicrografía de un corte longitudinal de corteza de riñón de rata tratada con rojo de rutenio por vía intraperitoneal a los 30 minutos posteriores a la administración del colorante. Túbulo sinuoso proximal (TP) en el que se observa desprendimiento de material de la pared luminal así como la presencia de células en la luz de algunos de ellos. Las imágenes necróticas son evidentes (flecha). El citoplasma de todas las células se observa granuloso y los núcleos hipercromáticos. El proceso degenerativo dificulta la identificación de los túbulos en proximales y distales en algunas zonas. (H-E. 220x).

Figura 9. Fotomicrografía de un corte longitudinal de corteza de riñón de rata tratada con rojo de rutenio por vía intraperitoneal a los 60 minutos posteriores a la administración del colorante. La membrana basal de la cápsula de Bowman (CB) y los núcleos de las células de la capa epitelial se encuentran hipercromáticos, así como los de las células del glomérulo (G), éste se observa más condensado con respecto al testigo (fig. 5 y 6). (H-E. 220x).

Figura 10. Fotomicrografía de un corte longitudinal de corteza de riñón de rata tratada con rojo de rutenio por vía intraperitoneal

a los 60 minutos después de la administración del colorante. Túbulos sinuosos proximales (TP) y distales (TD) que presentan procesos degenerativos en diferentes estadios así como imágenes necróticas numerosas (flechas). La hipercromaticidad nuclear persiste. (H-E. 220x).

Figura 11. Fotomicrografía de un corte longitudinal de corteza de riñón de rata tratada con rojo de rutenio por vía intraperitoneal a los 120 minutos posteriores a la administración del colorante. Los núcleos de las células de la lámina parietal de la cápsula de Bowman (CB) se encuentran aumentados de volumen y el glomérulo (G) sumamente condensado por lo que el espacio capsular (EC) parece aumentado. La mayor parte de los túbulos han perdido su luz debido al proceso degenerativo. La hipercromaticidad nuclear parece tender a disminuir. (H-E. 220x).

Figura 12. Fotomicrografía de un corte longitudinal de corteza de riñón de rata tratada con rojo de rutenio por vía intraperitoneal a los 120 minutos después de la administración del colorante. Se observa un proceso degenerativo generalizado por lo que no se distingue con claridad que tipo de túbulos sinuosos se trata, la hipercromaticidad nuclear ha disminuido en muchas células y las imágenes necróticas son numerosas (flechas). (H-E. 220x).

Figura 13. Fotomicrografía de un corte longitudinal de zona cortical de riñón de rata tratada con rojo de rutenio por vía intraperitoneal a los 480 minutos posteriores a la administración del colorante. El glomérulo (G) no aparece tan condensado como en los tiempos anteriores, pero el daño en la cápsula de Bowman (CB) persiste. las estructuras tubulares adyacentes han perdido su fisonomía clásica y no se distingue con exactitud que tipo de túbulo se trata, se observa rompimiento de las paredes de algunos de ellos e imágenes necróticas (flechas). (H-E. 220x).

Figura 14. Fotomicrografía de un corte longitudinal de zona cortical de riñón de rata tratada con rojo de rutenio por vía intrape-

ritoneal a los 480 minutos posteriores a la administración del colorante. No se distinguen los túbulos proximales de los distales y solamente se observa una masa de tejido aglomerado. Llama la atención que la hipercromaticidad nuclear ha disminuido. (H-E. 220).



FIGURA 1

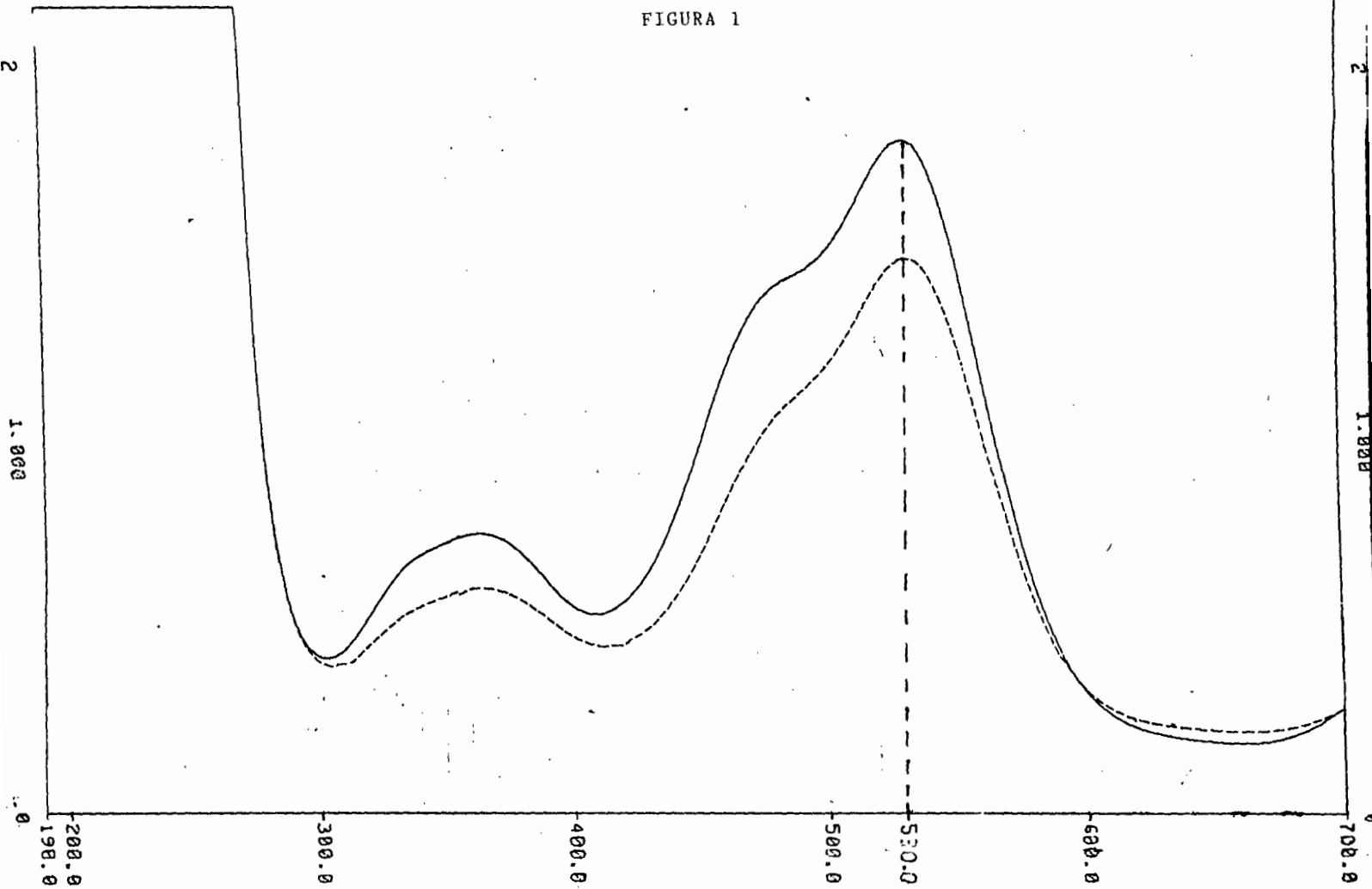


FIGURA 2

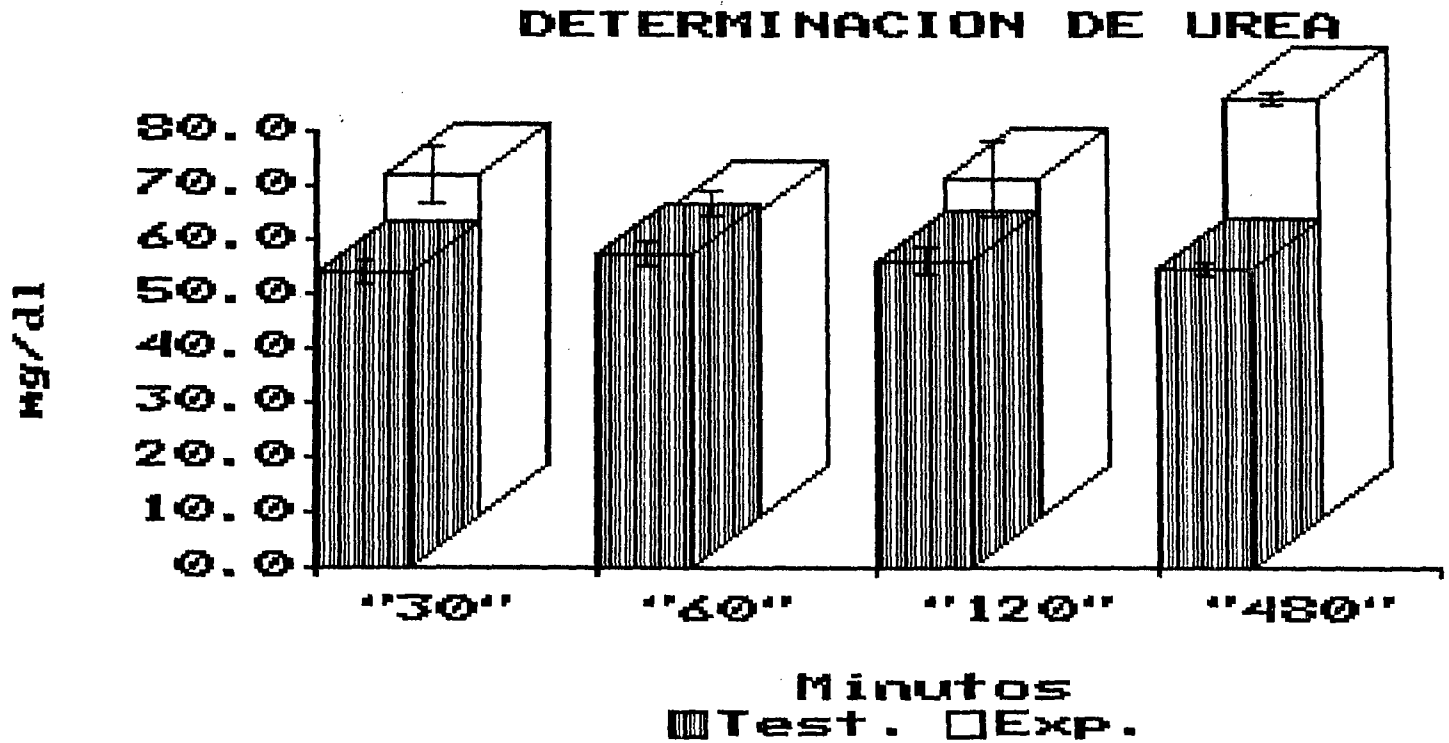


FIGURA 3

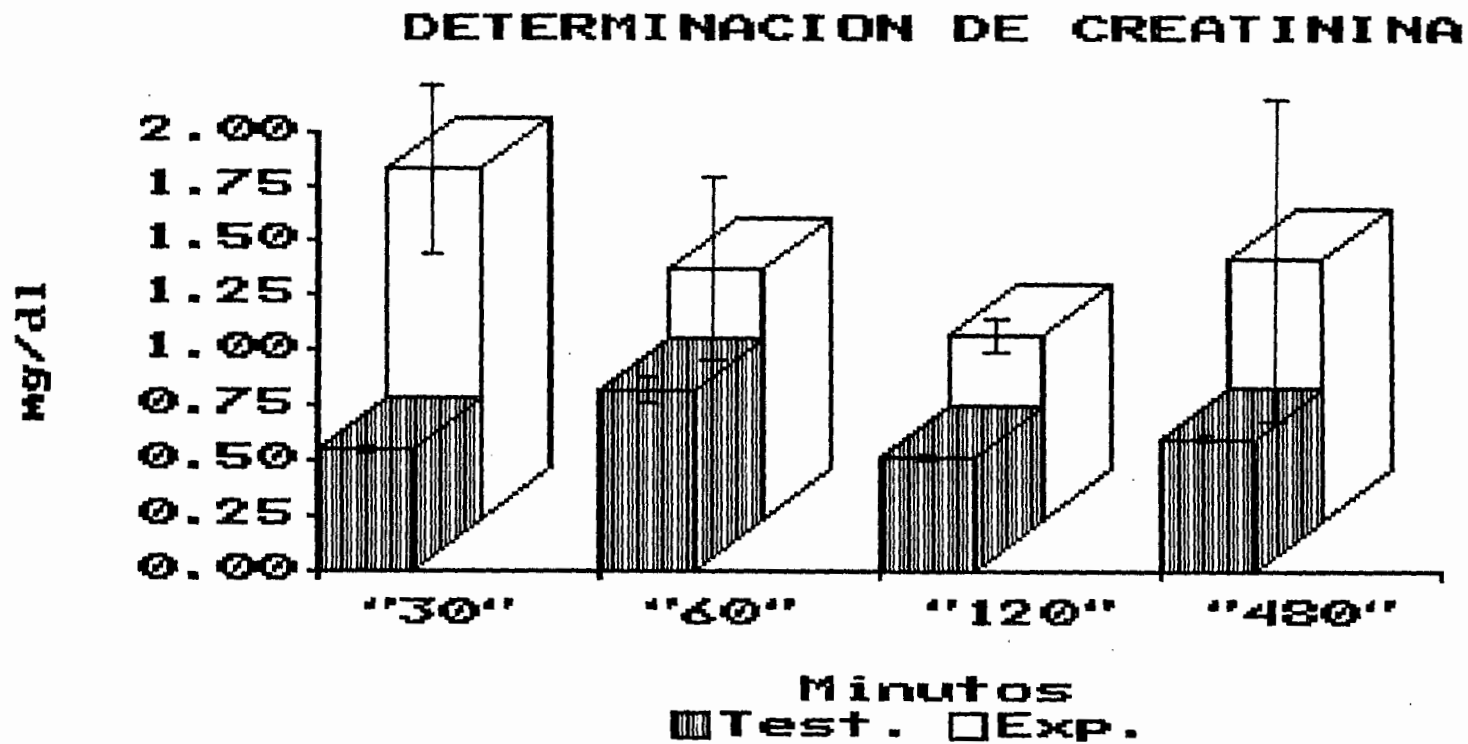
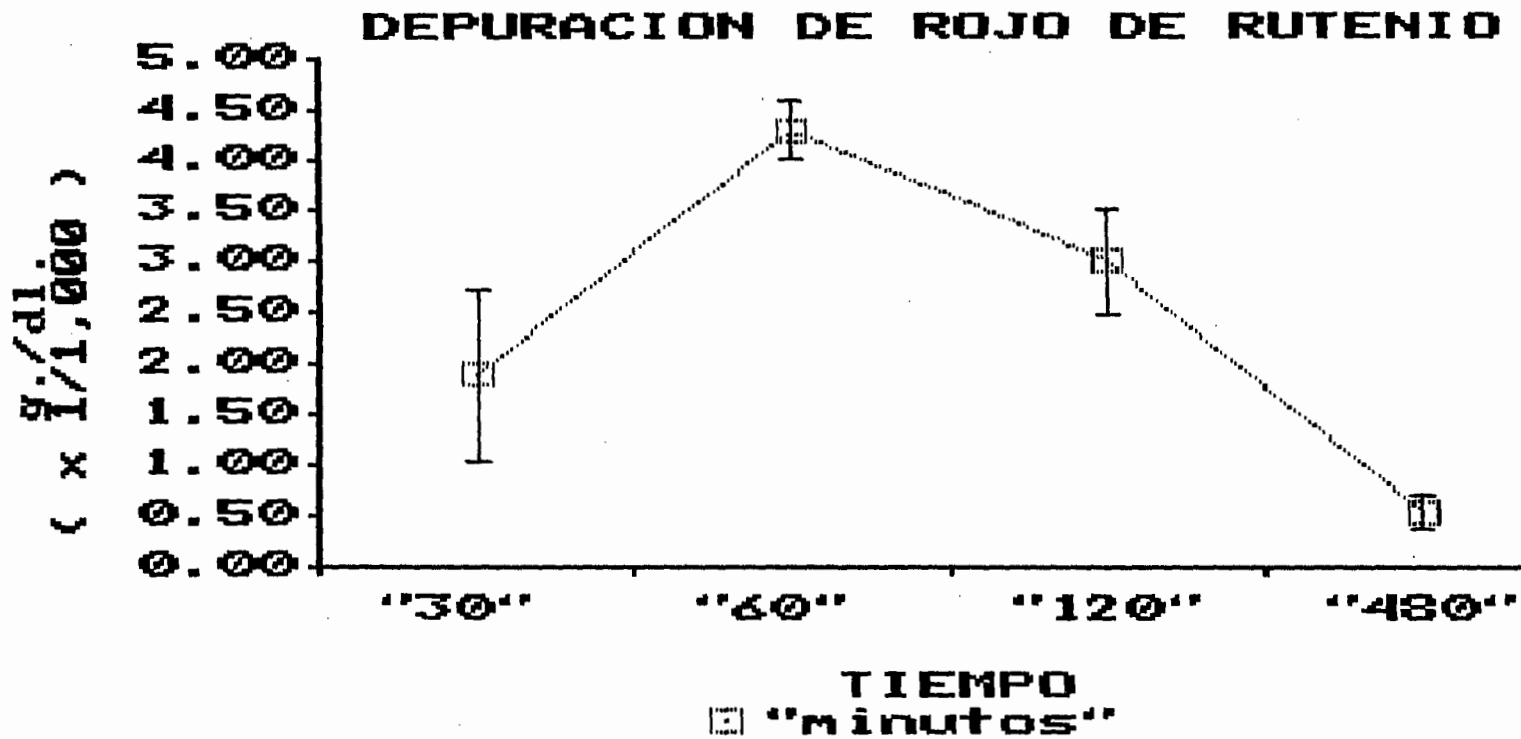


FIGURA 4



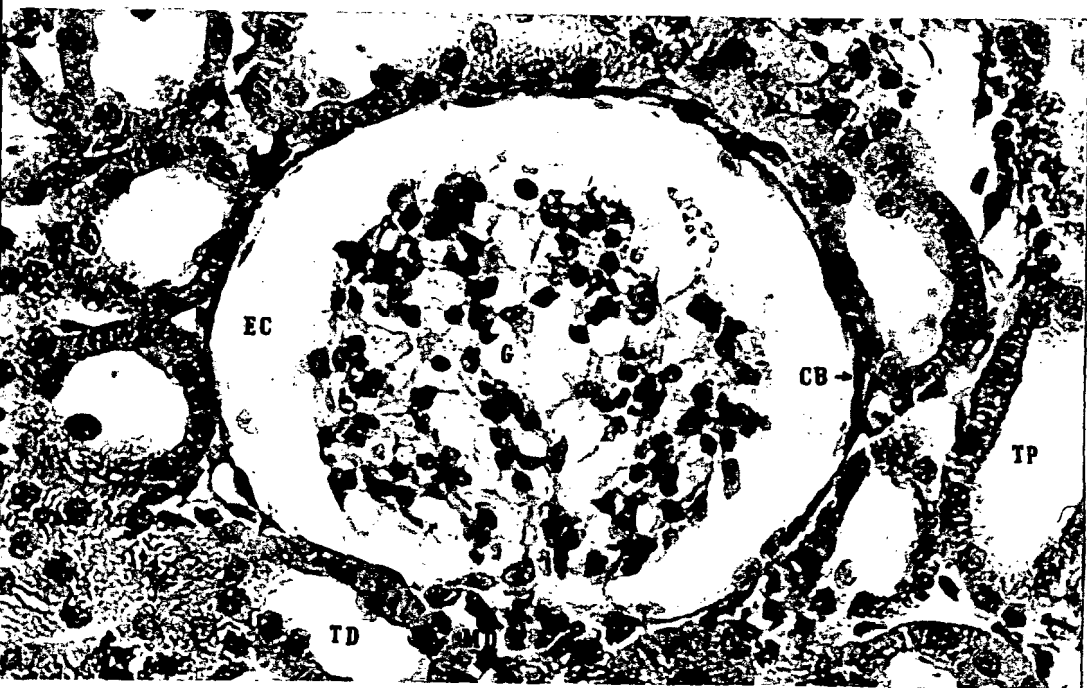


FIGURA 5.

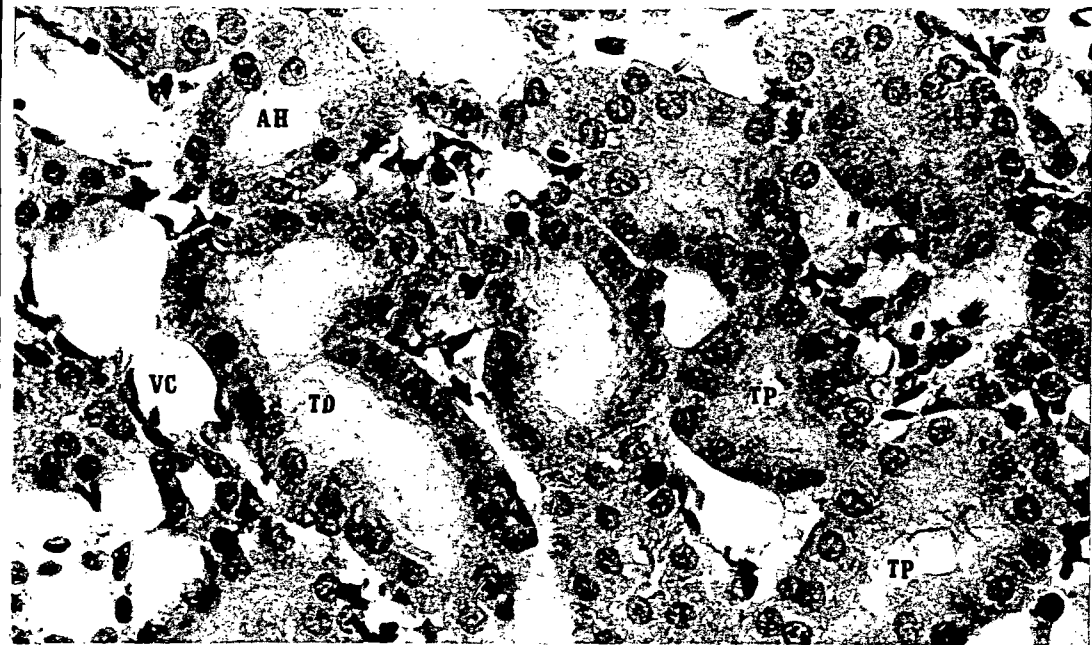


FIGURA 6

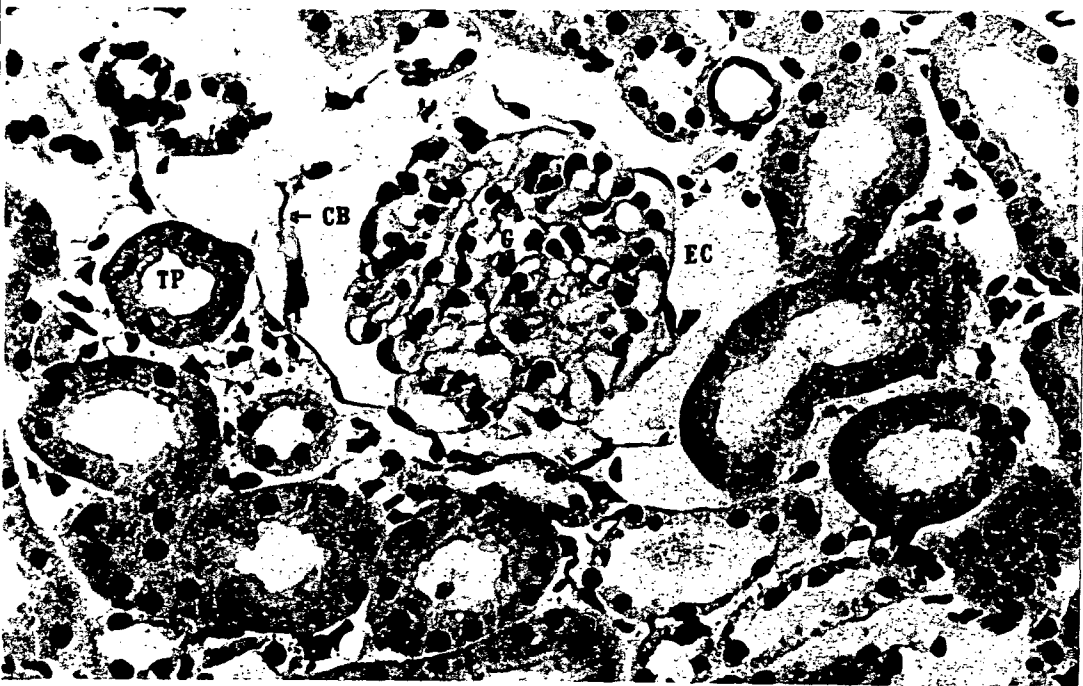


FIGURA 7.

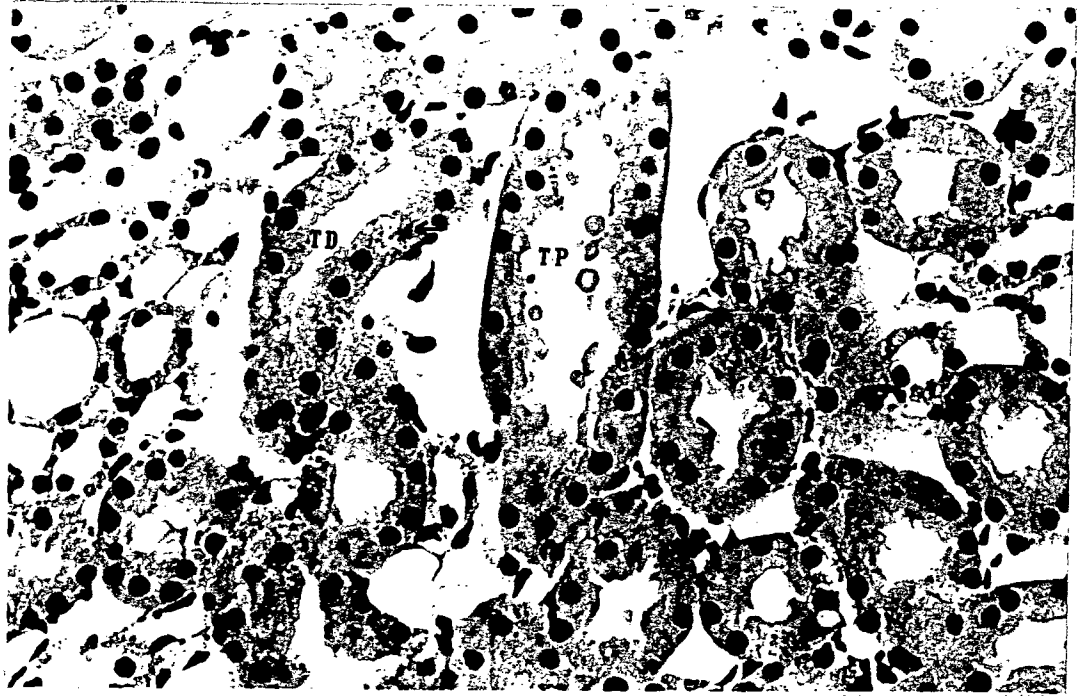


FIGURA 8.



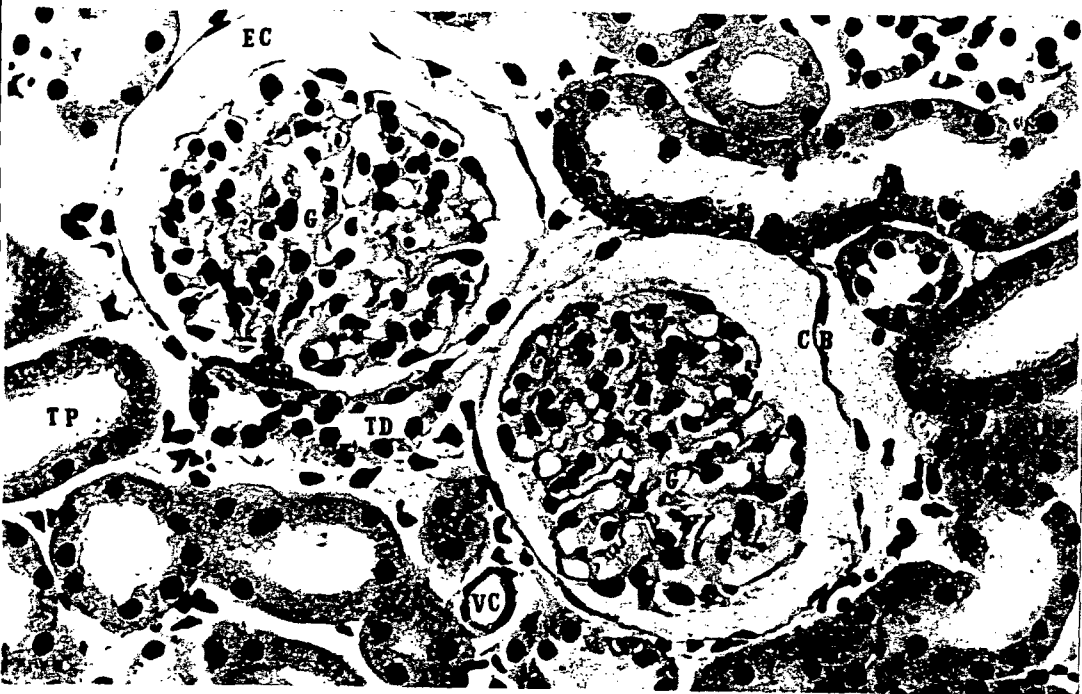


FIGURA 9.

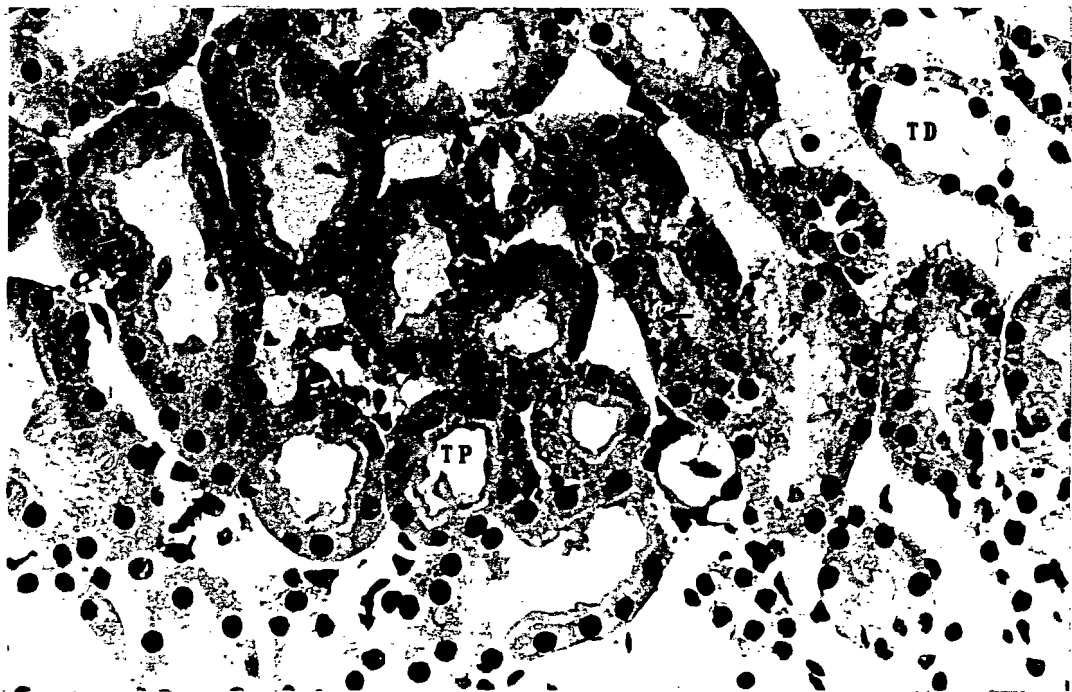


FIGURA 10

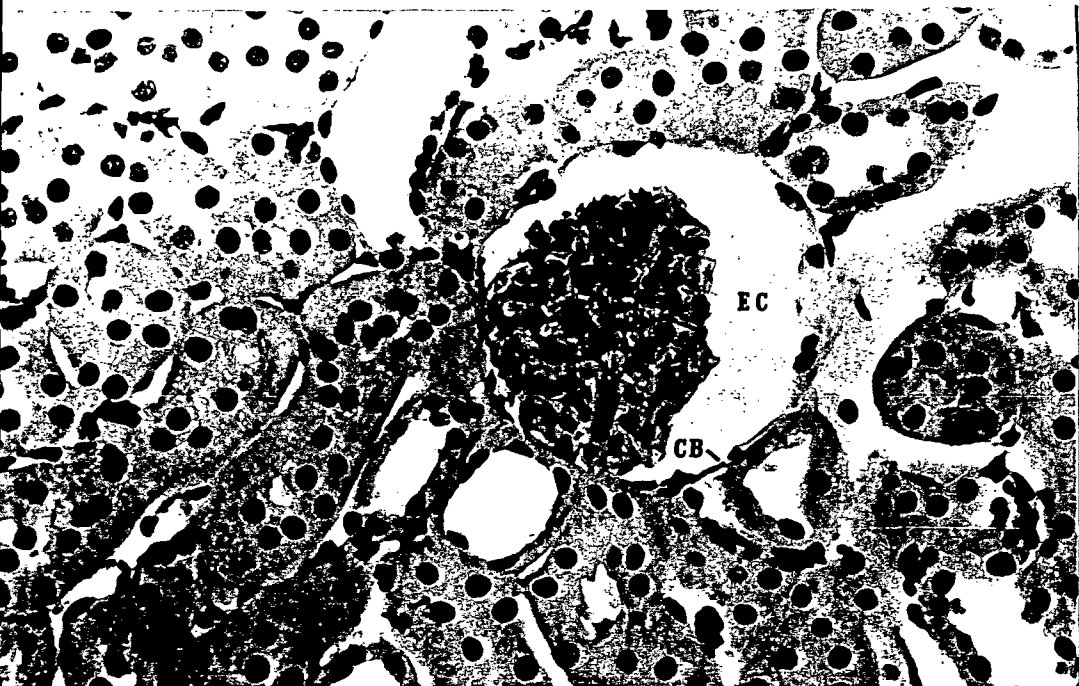


FIGURA 11.

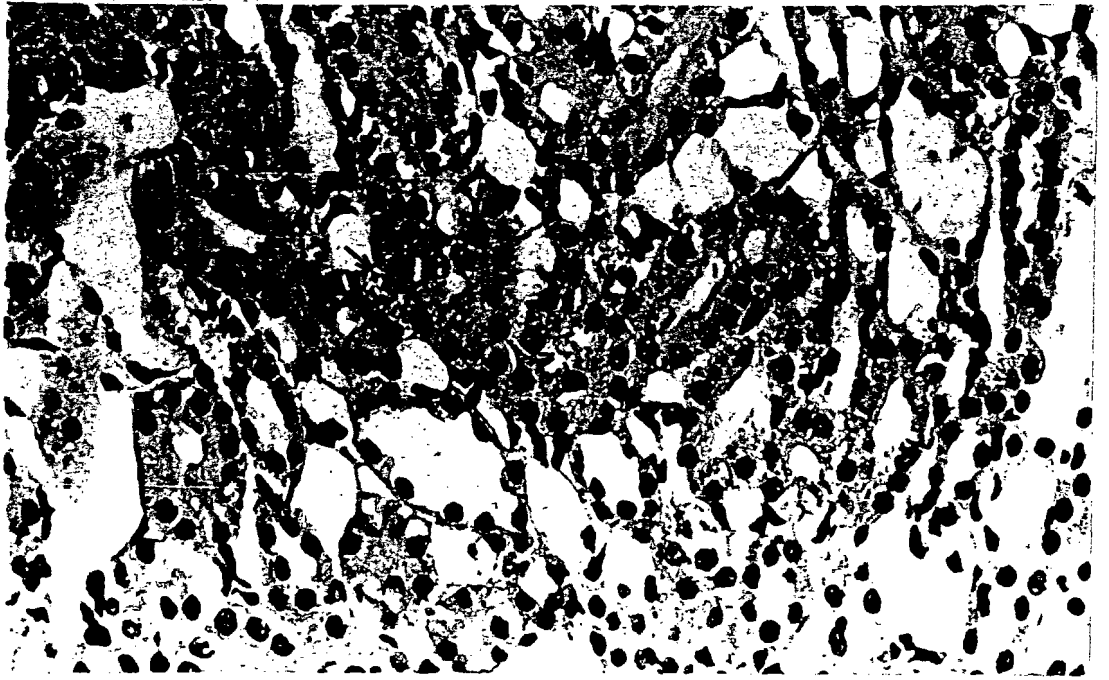


FIGURA 12.

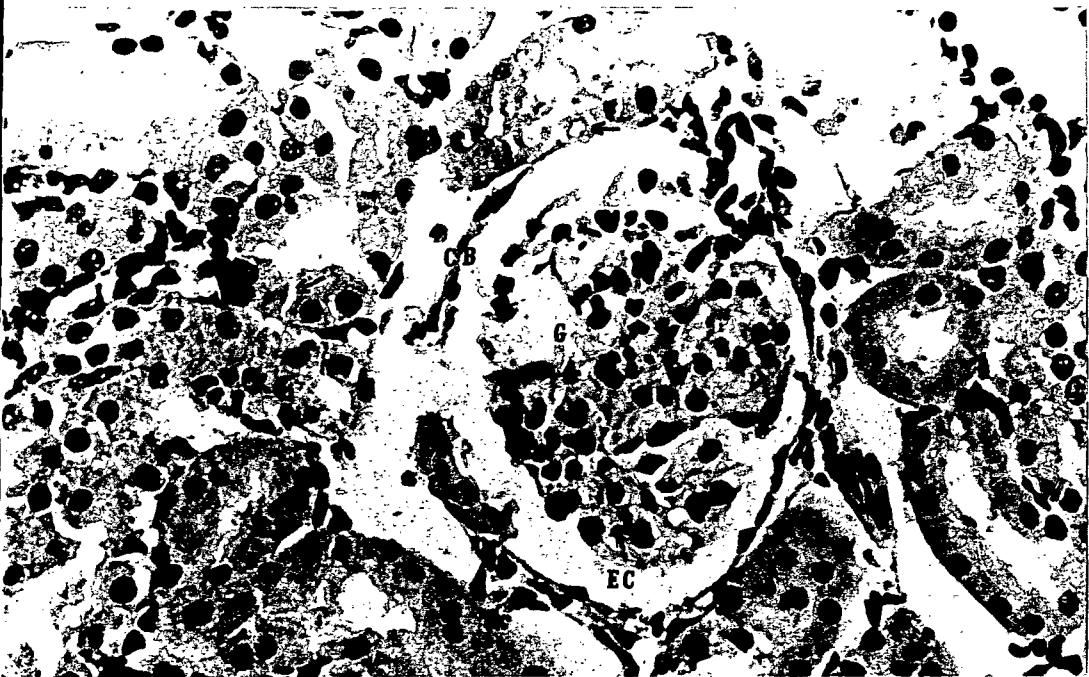


FIGURA 13.

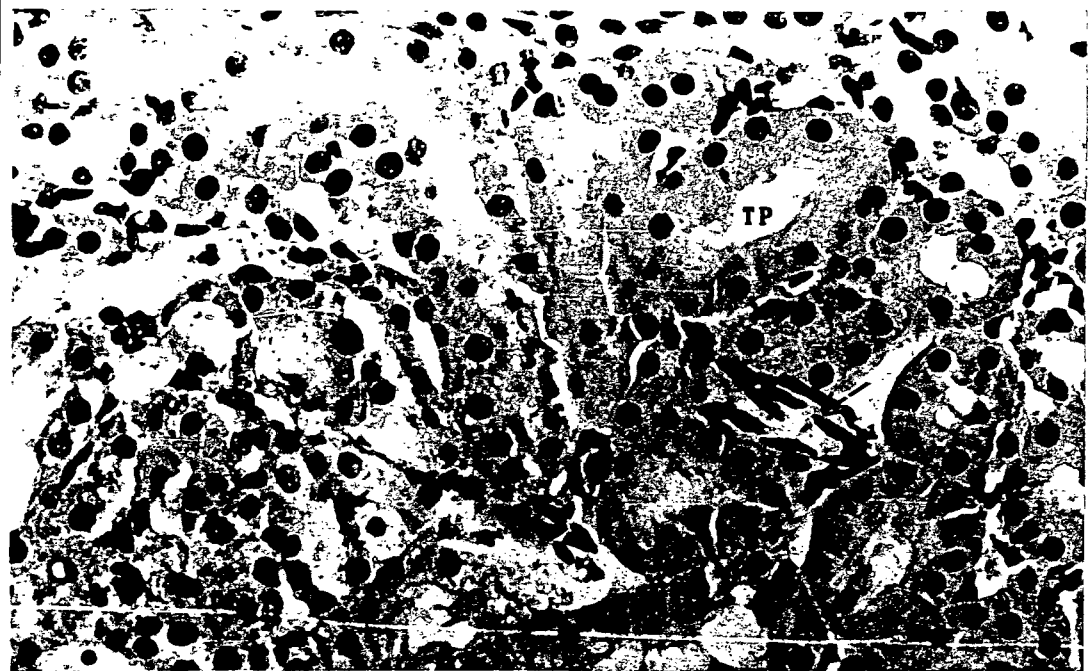


FIGURA 14

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Arauz Contreras J., Gómez Plascencia J., Feria Velasco A.  
Induction of flaccid paralysis followed by seizure activity by means of general administration of ruthenium red to adult rats. Arch. invest. med. (Mex.) 1982., 13; 271.
- 2) Arauz Contreras J., Ortiz G.G., Feria Velasco A.  
Aglutinación de eritrocitos inducida por rojo de rutenio en la rata. Estudios *in vivo* e *in vitro*. Arch. invest. med. (Mex.) 1985., 16; 157.
- 3) Ash, G.R., Bigrave, F.L.  
Ruthenium red as a probe in assessing the potential of mitochondria to control intracellular calcium in liver. FEBS Letters. 1977, Vol.78; 166-168.
- 4) Baux, M., Simoneau, M., Tauc.  
Blocking action of ruthenium red on cholinergic and non-cholinergic synaptosomes: possible involvement of sialic acid containing substrates in neurotransmission. Brain research. 1978. Vol. 152 : 633-638.
- 5) Bayardo P. E. Profa. de la materia en la Fac. de C. Químicas.  
Apuntes de análisis clínicos. 5a edición U. de G.
- 6) Carafoli, E., y Sacktor, B.  
The effects of ruthenium red on blowfly flyght muscle mitochondria with calcium. Biochem. Biophys. Res. Comm., 1972, Vol. 49; 1498-1502.
- 7) Feria Velasco A., and Arauz Contreras J. Ruthenium red as a ligand of osmium for examining uncoated biological material in the scanning electron microscope. 35th Ann. Proc. Electron Microscopy Soc. Amer. Boston Mass. 1977., G.W. Bailey (Ed).
- 8) Feria Velasco A., and Arauz Contreras J.  
Ruthenium red mediated osmium binding for examining uncoated biological material under the scanning electron microscope. Stain Technology 1981. Vol. 56 No. 2.
- 9) Fujitsuka, F.I.N., and Komatsu, Y.  
Effects of the ruthenium red on the sensory terminals discharges of the frog muscle spindle. Brain research. 1983.. Vol. 276 : 277-288.



- 10) Guyton A.C.  
Fisiología y fisiopatología básicas.  
2a Edición 1979 Ed. Interamericana.
- 11) Ham A.W.  
Tratado de histología  
7a edición 1975. Ed. Interamericana.
- 12) Hammersen F.  
Histología: atlas en color.  
2a edición. Ed. Salvat.
- 13) Kajikawa, K., Nakanishi, I., Hori, I., Matsuda, Y., Kondo, K.  
Electron microscopic observation on connective tissues using  
ruthenium red staining.  
Journal of Electron Microscopic. 1970., Vol. 19 ; 347-354.
- 14) Kleineke, J., y Stratman, F.  
Calcium transport in isolated rat hepatocytes.  
FEBS Letters. 1974., Vol. 43 ; 75-80.
- 15) Kubli-Garfias, C., Canchola, E., and Feria Velasco, A.  
Depresant effect of androgens on the cat brain activity and  
its antagonims by ruthenium red.  
Neuroscience. 1982., Vol. 7 ; 277-282.
- 16) Linch, Raphael, Mellor, Spare, Inwood.  
Metodos de laboratorio.  
2a edición 1972. Ed. Interamericana.
- 17) Luthra, R., and Olson, M.S.  
The inhibition of calcium uptake and release by rat liver  
mitochondria by ruthenium red.  
FEBS Letters. 1977., Vol. 1 ; 142-146.
- 18) Martínez Palomo, A.  
Surface coats of animal cells.  
Int. Rev. Cytol., 1970, Vol. 29 ; 29-75. ,
- 19) Moore, C.L.  
Specific inhibition of mithochondrial calcium transport by  
ruthenium red.  
Biochemical and biophysical Res. Com. 1971. Vol 42. 2; 298-305

- 20) Niggli, V., Gazzoti, P., y Carafoli, E.  
Experiments on the mechanisms of the inhibition of mitochondrial calcium transport by lanthanum and ruthenium red.  
*Experientia*. 1978, Vol, 34, 9; 1136-1137.
- 21) Ortiz G.G., De la Mora Rivas G., Cardenas Ortega A., Feria Velasco A.  
Efecto agudo del rojo de rutenio sobre el hígado y algunos parametros enzimáticos y de la coagulación en la rata adulta.  
Mem. Cong. Nal. Cien. Fisiol. (XXX). Univer. Verac. Jalapa Ver. 26-30 de Julio 1987.
- 22) Rigoni, F., Mathien-Shire, Y., and Deana, R.  
Effect ruthenium red on calcium e flux from rat liver mitochondrial.  
*FEBS Letters*. 1980., Vol 120, 2; 255-258.
- 23) Rossi, C.S., Vasington, F.D., and Carafoli, E.  
The effect of ruthenium red on the uptake and release of calcium by mitochondria.  
*Biochemical and biophysical Res. Commun.* 1973., Vol 50, 3; 846-852.
- 24) Robbins S.L.  
Patologia estructural y funcional.  
1a edición, 1975, Ed. interamericana.
- 25) Shiu Ye Yu., and Shiu Eng Lai.  
Structure of aortic elastic fiber: an electron microscopy study with special reference to staining by ruthenium red.  
*Journal of Electron Microscopy*. 1970. Vol, 19, 4; 362-370.
- 26) Spörri, H., Stünzi, H.  
*Fisiologia veterinaria*.  
1a edición, 1977. Ed. Acribia.
- 27) Tapia, R., Mesa-Ruiz, G Duran, L., Druker-Colin, R.R.  
Convulsions or flaccid paralysis induced by ruthenium red depending on route of administration.  
*Brain res.*, 1978, Vol 116; 101-109.
- 28) Utsumi, K., and Oda, T.  
Ruthenium -red-induced cell agglutination and surface glycoprotein and mucopolysaccharide.  
*J.Cell. Sci.* 1973, Vol 13 : 901-911.



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
FACULTAD DE CIENCIAS

Expediente.....

Número...405/88.....

SR. HECTOR GUSTAVO VILLAGRAN LORENZANA  
P R E S E N T E . -

Manifiesto a usted que con esta fecha ha sido --  
aprobado el tema de Tesis "EFECTO AGUDO DEL ROJO DE RUTENIO  
SOBRE EL RIÑON DE LA RATA ADULTA" para obtener la Licencia\_  
tura en Biología.

Al mismo tiempo informamos a usted que ha sido --  
aceptado como Director de dicha Tesis el M.en C. Genaro Ga\_  
briel Ortíz.



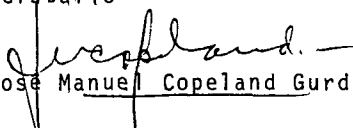
FACULTAD DE CIENCIAS

A T E N T A M E N T E  
"AÑO ENRIQUE DIAZ DE LEON"  
"PIENSA Y TRABAJA"  
Guadalajara, Jal., Abril 13 de 1988

El Director

Dr. Carlos Astengo Osuna

El Secretario

  
Dr. José Manuel Copeland Gurdíel.

c.c.p. El M.en C. Genaro Gabriel Ortiz, Director de Tesis.-Pte.  
c.c.p. El expediente del alumno.

'mjsd

Septiembre 23 de 1988.

DR. CARLOS ASTENGO OSUNA.  
Director de la Facultad de Ciencias  
Universidad de Guadalajara  
P r e s e n t e .

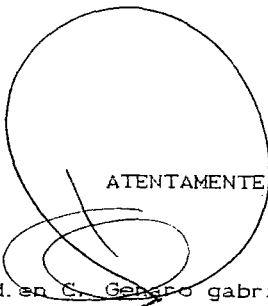
Estimado Dr. Astengo Osuna:

Por este medio comunico a usted que el C. Héctor Gustavo Villagrán Lorenzana, pasante de la Licenciatura en Biología con el número de registro 81112054 ha concluido satisfactoriamente el trabajo de tesis titulado: EFECTO TOXICO DEL ROJO DE RUTENIO SOBRE EL RINON DE LA RATA ADULTA. Estudio histopatológico y bioquímico efectuado en la Facultad de Ciencias y la Unidad de Investigaciones Biomédicas de Occidente del IMSS.

Asimismo le informo que he revisado el manuscrito de la tesis y considero que cumple con los requisitos establecidos por la Facultad a su digno cargo.

Sin más por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE



M. en C. ~~Gabriel~~ gabriel Ortiz.  
Director de tesis.

Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas



XXXI  
Congreso Nacional de  
Ciencias Fisiológicas

Programa general  
y resúmenes

Universidad Autónoma de Querétaro

Querétaro, Qro. Del 24 al 28 de agosto

EFFECTO AGUDO DEL ROJO DE RUTENIO SOBRE EL RIÑON DE LA RATA ADULTA. Ortiz, G.G., Villalón-Lorenzana, H.G., Cárdenas Ortega, A.\* y Feria-Velazco, F. de Ciencias, Universidad de Guadalajara y Unidad de Investigación Biomédica de Occidente, I.M.S.S. Guadalajara, Jal.

Previamente se ha demostrado que el rojo de rutenio (RR) tiene efecto aglutinante sobre las células sanguíneas de rata adulta (Arauz-Contreras y col., 1985), además de un efecto tóxico agudo sobre el riñón, demostrado por el incremento de la transaminasa glutámico-oxalacética y presencia de esteatosis hepática difusa (Ortiz y col., 1987). En base a esto, el objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto tóxico agudo del RR sobre riñón en rata adulta. Se inyectaron ratas Wistar con 20 mg/Kg de RR intraperitoneal (i.p.) y se dividieron en 3 grupos. En el 1º (n=20) se tomó suero sanguíneo a los 30, 60, 120 y 480 min postinyección, para medir actividad de creatinín-fosfoquinasa (CPK) y niveles séricos de urea y creatinina. De este mismo grupo de animales se obtuvieron los riñones a los tiempos señalados, después de fijación por perfusión intracarotídea para su estudio histopatológico. En el 2º (n=20), bajo las mismas condiciones experimentales del grupo anterior, se compararon las concentraciones séricas de RR contra una solución de RR a concentración idéntica, para obtener una curva de depuración del colorante. En el último grupo (n=12) se realizaron los mismos estudios séricos e histológicos empleados para el primero, en animales inyectados i.p. con solución salina fisiológica.

La CPK aumentó a los 30, 120 y 480 min después de la inyección de RR, la urea se elevó los 30 y 480 min y la creatinina se observó elevada a los 30 y 120 min. Los riñones macroscópicamente se vieron edematosos y finamente granulares, de color rojizo. Desde los 30 min se observaron datos de tumefacción turbia y degeneración vacuolar en túbulos renales, con paquetes de células epiteliales e eritrocitos en el interior de vasos capilares contorneados distales y colectores. No se observó necrosis cortical. Se concluye que el RR tiene un efecto tóxico agudo sobre los riñones, de tipo degenerativo inespecífico, manifestado por las alteraciones morfológicas y las variaciones en las cifras de estudios de laboratorio realizados.

Efecto nefrotóxico del acetaminofén\*. Méndez E. y Cortés E. Depto. de Farmacia, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I.M.S.S.

El acetaminofén es un antipirético y analgésico utilizado para el tratamiento de fiebres, dolores de tipo muscular y articular. En pocos los estudios sobre los efectos del fármaco en mamíferos jóvenes y dado que su eliminación es renal se decidió estudiar el efecto del acetaminofén sobre la capacidad de concentración urinaria y la secreción tubular de aniones orgánicos en ratas de 21 días de edad y compararlo con la adulta. Se utilizaron ratas Wistar de 21 días de edad y adultas. Se formaron tres grupos para cada edad, un control al que se le administró únicamente el vehículo (agua-etanol) y 2 tratados con acetaminofén (10 y 100 mg/kg) durante 3 y 10 días. Se obtuvieron muestras de sangre y orina antes y después de someter a los animales a deshidratación, para la determinación de la osmolaridad urinaria, osmolaridad plasmática, volumen urinario y osmatocrito. Se calcularon la relación osmolaridad urinaria/osmolaridad plasmática (U/P) y las depuraciones osmolar y de agua libre. El día del sacrificio se obtuvieron rebanadas de corteza renal en las que se midió la captación del ácido p-aminohipúrico (PAH) para obtener la relación tejido-medio y hacer una estimación de la secreción de aniones orgánicos. La captación del PAH fue mayor en la rata adulta que en la de 21 días de edad ( $1.87 \pm 0.05$ ) y ( $1.57 \pm 0.02$ ) respectivamente. Se observó que la relación tejido-medio disminuye en la rata adulta a los 21 días de edad aumentó dicha relación ( $p < 0.001$ ). En las ratas de 21 días de edad aumentó dicha relación ( $p < 0.05$ ). El volumen minuto aumentó al mismo tiempo que la osmolaridad urinaria disminuyó en las ratas de 21 días de edad para ambas dosis a los 10 días de tratamiento, para las ratas adultas se observó una respuesta opuesta en las mismas condiciones experimentales. La relación U/P aumentó en las ratas de 21 días de edad a las dosis de 10 y 100 mg/kg, en las ratas adultas disminuyó. La depuración osmolar en las ratas de 21 días de edad disminuyó significativamente en los dos tratamientos, las ratas adultas no presentaron cambios consistentes. La depuración de agua libre en la rata de 21 días de edad se hizo menos negativa en presencia de acetaminofén. En estos resultados se puede suponer que el acetaminofén altera la función renal y que el efecto es dependiente de la edad. La secreción tubular del PAH es menor en la rata recién deshidratada que en la adulta.

Proyecto apoyado por DEPI 87-0757 y CONSET 547/86.

TOXICIDAD AGUDA DEL CISPLATINO Y LA CASIOPEINA EN EL RATON. García, Y.E.T. Medina, J.M.T. Rojas, M.Y.T. Ramírez, S.R.T. Luján, M., Ostrosky, P.T., Ruiz, A.L.T. Rodríguez, R. Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Instituto de Investigaciones Biomédicas y Facultad de Química, U.N.A.M.

Con el propósito de obtener sustancias químicas con propiedades antineoplásicas, se sintetizaron numerosos compuestos de coordinación con distinto centro metálico. El análisis biológico inicial determinó que varios miembros de la serie tenían propiedades citotóxicas. Uno de ellos, la casiopeína, inhibió la proliferación celular en forma semejante al cisplatino, uno de los antineoplásicos más eficaces en la clínica. En este trabajo se reportan los estudios de toxicidad aguda con dicho producto. Se utilizaron ratones macho de la cepa Taconic de 20 a 30 g de peso corporal que se mantuvieron en jaulas individuales durante 10 días en condiciones ambientales constantes y con acceso libre al agua y alimento. Los fármacos en estudio se administraron por vía i.p. a 7 niveles de dosis: 2.5, 5, 10, 20, 40, 60 y 160 mg/kg en el caso del cisplatino, y 5, 7, 10, 14, 20, 28 y 40 mg/kg en el caso de la casiopeína. En ambas situaciones, se utilizaron 10 ratones por dosis y un grupo control de 10 animales. La DL50 se calculó con el número de animales por dosis que sobrevivieron hasta el día 14. Se tomaron muestras de varios órganos para su estudio histopatológico. La DL50, calculada por el método de Litchfield y Wilcoxon, fue de 5.64 (2-38-13.36) mg/kg para el cisplatino y de 12.30 (8.21-18.43) mg/kg para la casiopeína. Es de interés señalar que con el cisplatino la letalidad fue aumentando paulatinamente a lo largo del experimento. En contraste, con la casiopeína la letalidad fue prácticamente máxima a las 24 horas. Estos resultados señalan que la toxicidad aguda de la casiopeína es ligeramente inferior a la del cisplatino. El curso temporal del efecto letal permite suponer la ausencia de lesión orgánica en el caso de la casiopeína; sin embargo, es necesario conocer los resultados de los estudios histopatológicos para verificar esta posibilidad.

CAMBIO ULTRAESTRUCTURALES DE LA RETINA DE FETOS DE RATON DE MADRES TRATADAS CON DIAZEPAM (VALIUM) DURANTE LA GESTACION. Márquez-Orozco, Ma. Cristina, Márquez-Orozco, Amalia y Gazca-Ramírez, Verónica. Departamento de Embriología, Facultad de Medicina, UNAM, 04510 México, D.F. MEXICO.

Estudios con diazepam marcado con C<sup>14</sup> han demostrado que se acumula en la retina de fetos de ratón de madres tratadas durante la gestación y por estudios histológicos en fetos de hembras que recibieron dosis únicas de dicho fármaco de 0.04, 0.1, 0.67, 1.3 y 2.7 mg/kg de peso corporal, administradas por vía intraperitoneal durante la preñez, se demostró la presencia de alteraciones en la migración de las células de las capas neuroblásticas y en el espesor de la capa ganglionar; el efecto se observó en los animales expuestos a dosis bajas y fué más evidente con las más altas. El propósito de este trabajo es investigar si la retina de los fetos de ratón de madres tratadas con diazepam durante la gestación presentan alteraciones ultraestructurales de la retina. Hembras de ratón de la cepa CD-1, se aparearon con machos de la misma cepa en una proporción de 3:1, las que presentaron tapón vaginal se distribuyeron al azar en 3 grupos, que fueron inyectados del 6º al 15º día de la gestación, el primero con dosis únicas de diazepam de 2.7 mg/kg de peso corporal, administrado por vía intraperitoneal, el segundo con solución salina al 0.9% y el tercero con el disolvente del diazepam. El 16º día las hembras se anestesiaron con éter, se hizo perfusión intracarotídea de los fetos con formaldehído al 1% y glutaraldehído al 2.5%, se extrajeron los globos oculares, se postfijaron en OsO<sub>4</sub> al 1% y se incluyeron en resina epóxica. Los cortes fueron contrastados con acetato de uranio y citrato de plomo y observados con un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM-10. En la retina de los fetos expuestos al diazepam, se observó que los fotorreceptores presentaban zonas en las que el retículo endoplásmico rugoso tenía cisternas discontiguas, había acúmulos de polirribosomas más abundantes que en los testigos, se observaron elementos membranosos atípicos, pequeños cuerpos electroléctricos, mitocondrias muy abundantes y el núcleo volutinoso, con la cromatina en grupos muy densos dispersos entre la cariolina. Alteraciones similares se observaron en las células de la capa neuroblástica. No se encontraron cambios en los fetos de madres a las que se les administró el disolvente del diazepam. Las modificaciones de la ultraestructura de las células de la retina, probablemente están relacionadas con la migración anormal de las células de la retina de los animales del grupo experimental.