



EFFECTO DEL DIMETIL SULFOXIDO SOBRE LA
ULTRAESTRUCTURA DE LOS DEPOSITOS DE
AMILOIDE EN LA AMILOIDOSIS CUTANEA
PRIMARIA. ESTUDIO "IN VITRO"

TESIS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA LA OBTENCION DEL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MORFOLOGIA

PRESENTA:

M.C.P. MARIA GUADALUPE MORENO TREVIÑO

MONTERREY, N. L. AGOSTO DE 1994

**EFEECTO DEL DIMETIL SULFOXIDO SOBRE LA
ULTRAESTRUCTURA DE LOS DEPOSITOS DE
AMILOIDE EN LA AMILOIDOSIS CUTANEA
PRIMARIA. ESTUDIO "IN VITRO".**

POR

M.C.P. MARIA GUADALUPE MORENO TREVIÑO

TESIS PRESENTADA A LA

FACULTAD DE MEDICINA

DE LA

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

COMO REQUISITO PARCIAL PARA

LA OBTENCION DEL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

CON ESPECIALIDAD EN MORFOLOGIA

MONTERREY N.L.

AGOSTO 1994

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

M.C.P. y Dr. med. Oliverio Welsh Lozano
COASESOR

L.C.B. y D.C. Myrthala Moreno Sepúlveda
COASESOR

Este trabajo se desarrolló en el Departamento de
Histología de la Facultad de Medicina U.A.N.L.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, por guiar mi camino y trabajo.

A mis hijos Raúl y Fátima, que son el centro de mi mundo y el motor de mi vida.

A mi esposo Raúl Rubio que con ternura, lealtad y confianza me motivó a superarme.

A mi padre, guerrero incansable que, con su ejemplo me enseñó a entender que "la verdad me hará libre".

A mi madre, que con amor y apoyo se convirtió en el pilar más fuerte y sin el cual hubiera sido imposible seguir adelante.

A mis hermanos, por su cariño y comprensión incondicional.

A la Comisión de Tesis, por sus valiosas sugerencias y experiencias para el desarrollo de esta tesis.

Gracias a todos mis compañeros de ayer, hoy y siempre, por los momentos que compartimos.

Al personal del laboratorio que de una forma u otra colaboró, en la realización de esta tesis y al estudiante Mario Alberto Valdez por su ayuda para la presentación del trabajo.

Dedico esta tesis al Dr. Julio Sepúlveda Saavedra, quién con su confianza, honestidad y conocimiento, me enseñó la gran responsabilidad que entraña el ser investigador.

INDICE

CAPITULOS	PAGINAS
1. -INTRODUCCION.	1
2. -MATERIAL Y METODOS.	19
3. -RESULTADOS.	26
4. -DISCUSION Y CONCLUSIONES.	51
5. -RESUMEN.	58
6. -BIBLIOGRAFIA.	60
7.-APENDICE.	

INTRODUCCION

La amiloidosis es una enfermedad caracterizada por el depósito anormal de proteínas extracelulares denominado amiloide (1).

Los primeros reportes sobre la amiloidosis sistémica, fueron hechos en 1700 por Bonet, quién describió un grupo de pacientes que presentaron múltiples abscesos hepáticos y esplénicos que aumentaban el tamaño de los órganos y los endurecían, citado por Klye y Bayard (2). Rokytansky en las autopsias de enfermos de sífilis y tuberculosis, encontró que los órganos se presentaban aumentados y con cierta firmeza, por lo que denominó a esta entidad "degeneración cérea o grasa", citado por Coehn (3).

Fue hasta 1854, cuando Virchow en busca de la naturaleza química de estos infiltrados, utilizó una prueba para la demostración de carbohidratos como el almidón y celulosa y, al pincelar la superficie de los depósitos con yodo y ácido sulfhídrico, éstos reaccionaron presentando un color violeta igual a la positividad del almidón. A la infiltración la llamó "degeneración amiloidea" y al depósito le denominó "amiloide", citado por Bancroft y Stevens (4).

En la actualidad se conoce que el amiloide está compuesto por un grupo heterogéneo de proteínas entre las que se encuentran: la sustancia P, la proteína fibrilar, cadenas ligeras de inmunoglobulinas y algunas de las fracciones del complemento (5).

La substancia P es una glucoproteína que forma del 10% al 14% del complejo amiloideo (6), es una proteína globular del suero (SAP) antigénicamente igual a una alfa globulina, presente en la sangre de individuos normales (7); que está unida covalentemente al calcio (8) y se encuentra como constituyente integral de la vaina microfibrilar de las fibras elásticas normales (9).

El componente fibrilar o proteína fibrilar del amiloide es otra de las proteínas del complejo amiloideo, que por técnicas de cristalografía de rayos X, Friederich y Kekule en 1959, demostraron que su estructura terciaria es de hoja beta plegada antiparalela, citado por Salter y col.(10).

Breatnach (11) reportó que la naturaleza bioquímica del componente fibrilar del amiloide puede variar según la presentación clínica de la amiloidosis (cuadro 1).

En la variedad de amiloidosis primaria sistémica y en la amiloidosis asociada a mieloma, el componente fibrilar está formado por cadenas ligeras de inmunoglobulinas y se denomina AL (12). En la variedad de amiloidosis secundaria y en la amiloidosis heredofamiliar el componente fibrilar esta formado por una proteína circulante del suero, denominada AA (13). En la amiloidosis senil asociada a órganos, entre las que se encuentra la amiloidosis cerebral del tipo de Alzheimer, el material fibrilar del depósito se denomina ASc1 (14). En la amiloidosis cutánea primaria limitada a la piel en su variedad liquenoide o macular se ha propuesto que el componente fibrilar del amiloide sea una glucoproteína de 90 KD (proteína K) sintetizada por los queratinocitos basales y siendo el material fibrilar el amiloide de tipo AD o AK (15).

Las cadenas ligeras de inmunoglobulinas de tipo de IgA, IgG e IgM (16,17) son detectadas como parte de las proteínas que forman el complejo amiloideo.

CUADRO 1

Proteína Fibrilar Amiloide	Tipo Clínico
AA	Amiloidosis Secundaria
AA	Amiloidosis Heredofamiliar
AL	Amiloidosis Primaria Sistémica
AL	Amiloidosis Asociada a Mieloma
ASc1	Amiloidosis Senil Limitada a Organos
AD o AK	Liquen Amiloide o Amiloidosis Macular

Cuadro 1.- Clasificación en base al tipo clínico y la naturaleza bioquímica del Componente Fibrilar del Amiloide.

Las fracciones del complemento C1, C3 y C9 (18,19,20) forman parte de los constituyentes proteicos del amiloide y tanto las cadenas ligeras de inmunoglobulinas como las fracciones del complemento son detectados con marcadores fluorescentes. Existe evidencia de que estos componentes se encuentran adsorbidos sobre el material fibrilar del amiloide (21).

La sustancia P y la proteína fibrilar, son los elementos más constantes en todos los tipos de amiloidosis.

La clasificación clínica de la amiloidosis reportada por Malak y Smith (22) es: a) la amiloidosis primaria que no se asocia a otra enfermedad, y que puede presentarse en forma localizada o sistémica, b) la amiloidosis secundaria, que se asocia a una enfermedad de base infecciosa, metabólica o mieloproliferativa y su presentación puede ser localizada o sistémica.

La amiloidosis primaria localizada en piel, también denominada "amiloidosis primaria cutánea", en donde los depósitos de amiloide se localizan en las papilas dérmicas, sin afectar a otros órganos. La amiloidosis cutánea se presenta más comúnmente en los orientales, afectando con mayor frecuencia al sexo femenino, sin predilección específica por la edad.

Clasificación clínica (23) de la amiloidosis primaria cutánea :

I) .-Formas comunes de presentación:

- a) .-papular.
- b) .-macular.
- c) .-bifásica

II) .- Formas raras de presentación :

- a) .-nodular.
- b) .-anosacra.
- c) .-bulosa .
- d) .-parecida a poiquilodermia.
- e) .- vitiligoide.

La variedad liquenoide o papular (Figura 1); fue descrita en 1930 por Freudenthal y afecta a las superficies expuestas de las extremidades presentando pápulas aplanadas, formando placas que dan un aspecto en empedrado a la superficie de la piel (24).

La variedad macular fue descrita en 1952 por Palitz y Peck, se localiza en la parte superior del tronco, espalda, cuello, clavícula, escápula, región vertebral y extremidades. Las lesiones son manchas hiperocrómicas poco delimitadas, citado por Black y Jones (25) y por Wolf (26). El síntoma principal de ambas variedades de presentación es el prurito (27).

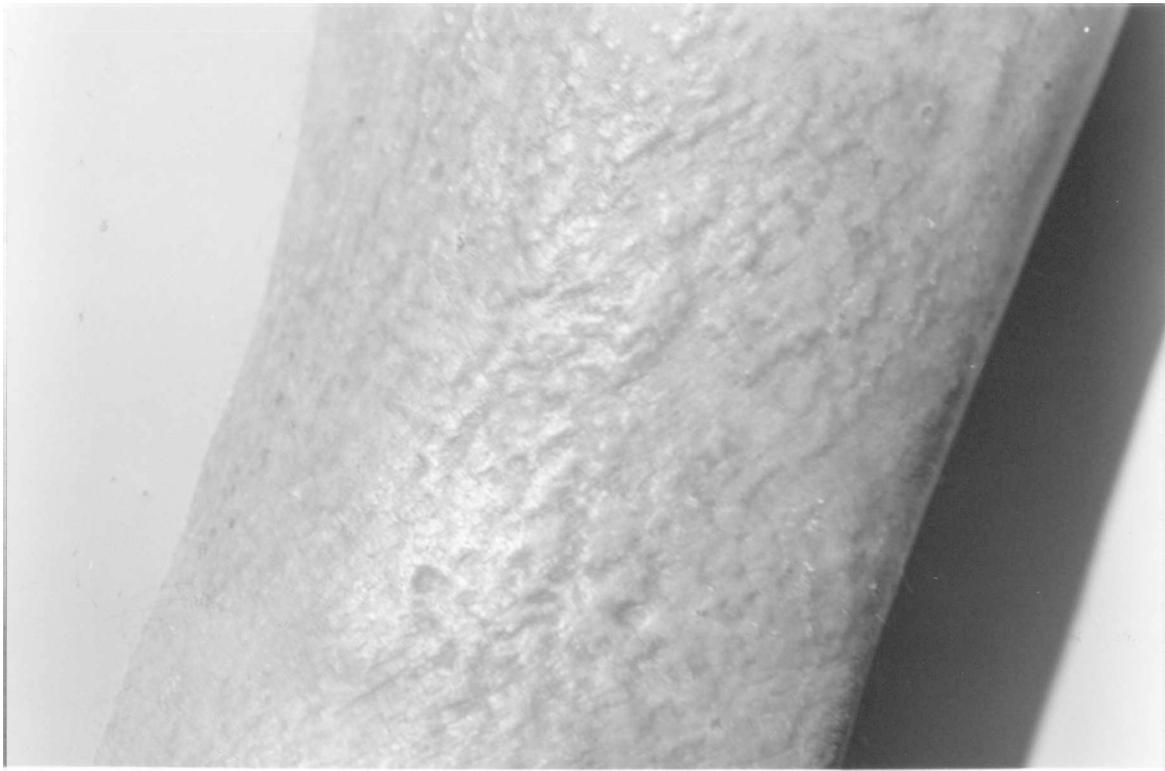


Figura 1. - Amiloidosis Cutánea Primaria variedad papular o liquen amiloide .

En los primeros reportes de la literatura se encontraron datos que muestran la participación de diferentes elementos celulares que podrían participar en la génesis del amiloide. Ishihara (28) resaltó la importante participación de células plasmáticas anormales en la patogenia la amiloidosis asociada al mieloma.

Con respecto a la intervención de células como los macrófagos en la amiloidosis sistémica, donde existe evidencia ultraestructural de la presencia de las fibras de amiloide en el citoplasma de la célula, Takahnash (29) propone, que éstas endocitan a las fibras de la matriz extracelular y posteriormente por efecto de la acción lisosomal, son modificadas, y al ser exocitadas, formarían el componente fibrilar del amiloide (29).

En la amiloidosis cutánea primaria se ha propuesto la participación de los fibroblastos, basados en la presencia ultraestructural de fibrillas de amiloide en su interior, se ha propuesto que por algún estímulo desconocido, se inicia la síntesis de proteínas anormales del complejo amiloideo (30,31,32).

Otros reportes involucran en la amiloidosis cutánea la participación de las células cebadas, que al desgranularse, podrían estar participando directamente en la formación de los componentes del amiloide (33). También se ha reportado la participación de las fibras elásticas y de colágena alteradas que por estar en estrecha relación con los depósitos de amiloide, se especula que podrían estar participando como sitio de formación de los depósitos de amiloide.

Recientemente Kumakari y Hashimoto (34), reportaron que en la amiloidosis cutánea primaria existe la participación de los queratinocitos basales. Esto fundamentado por el

fenómeno de apoptosis, donde los queratinocitos invierten su trayecto, atravesando la membrana basal y localizándose en las papilas dérmicas, donde a partir de los filamentos intermedios de citoqueratina, contribuyen a la formación del componente fibrilar del amiloide en un proceso postulado como "degeneración filamentosa" (35,36,37).

Wang y Lim (38) integran en un esquema (Figura 2) la serie de factores que pueden contribuir en la génesis de la amiloidosis cutánea. En esta teoría multifactorial proponen que el daño de los queratinocitos por fricción, ocasiona el daño de los filamentos intermedios de citoqueratina. Lo anterior, aunado a factores como: predisposición racial, factores dérmicos como el componente P, proteínas de la matriz extracelular, las fibras elásticas y colágenas en conjunto, todos ellos participan en la formación del depósito de amiloide, que se manifiesta como liquen amiloideo.

El daño de los queratinocitos por la fricción y la participación de factores raciales, pueden ocasionar un incremento de melanina epidérmica, e incontinencia de este pigmento, presentándose clínicamente como la amiloidosis macular, que puede transformarse eventualmente a la variedad papular o liquenoide (38).

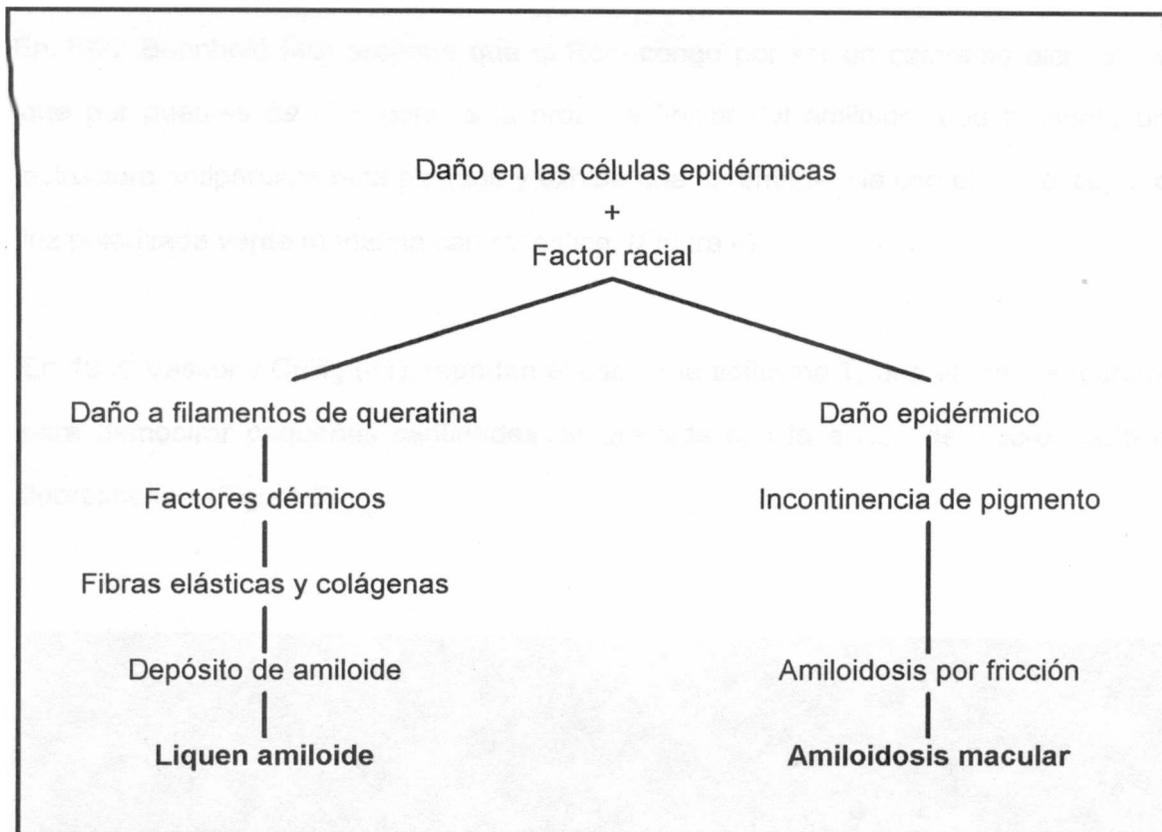


Figura 2.-Teoría multifactorial de la etiología de la Amiloidosis Cutánea propuesta por Wang y Lim.

Los métodos diagnósticos utilizados para la demostración de los depósitos de amiloide son: las reacciones histoquímicas de Rojo congo, violeta de metilo y Tioflavina T, las técnicas de inmunohistoquímica y los estudios ultraestructurales.

El primer método utilizado para la demostración del amiloide fue la reacción histoquímica de violeta de metilo específica para amiloide descrita en 1875 por Corneil (39), que por su propiedad policromática tiñe el amiloide de color rosa, al unirse a los polisacáridos del complejo amiloideo y de verde a los núcleos de las células (Figura 3).

En 1922 Bennhold (40) propone que el Rojo Congo por ser un colorante dicroico, se une por puentes de hidrógeno a la proteína fibrilar del amiloide, que presenta una estructura antiparalela beta plegada y exhibe una birrefringencia con el microscopio de luz polarizada verde manzana característica. (Figura 4).

En 1959 Vassor y Cullig (41), reportan el uso de la tioflavina T, que es un fluorocromo, para demostrar pequeñas cantidades de amiloide con la ayuda del microscopio de fluorescencia (Figura 5).

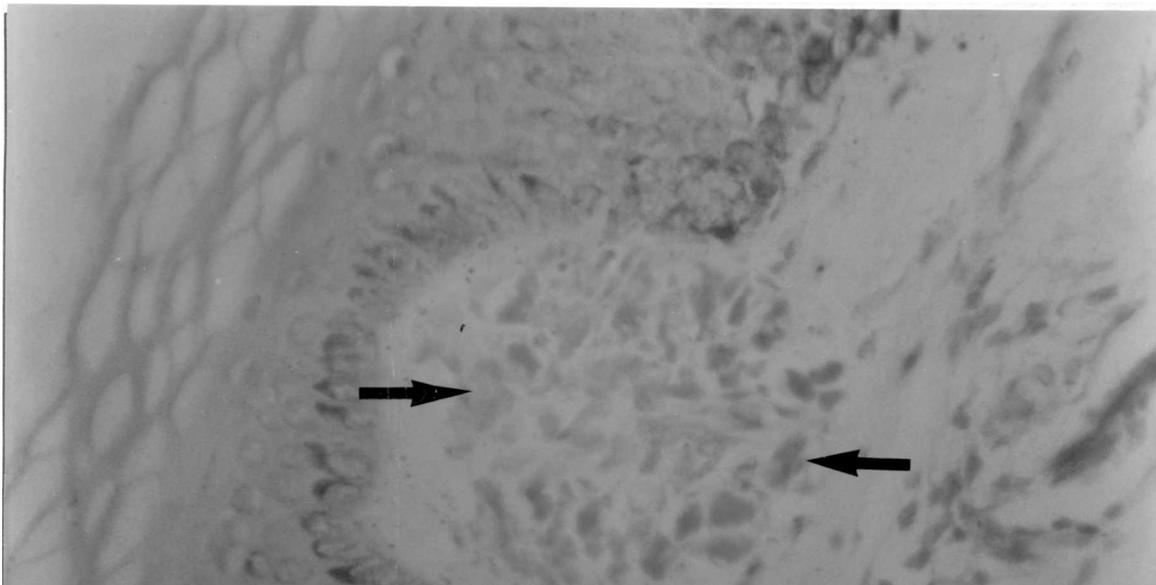


Figura 3.-Fotomicrografía de un depósito de amiloide en la dermis de la cola de un ratón. 787x.

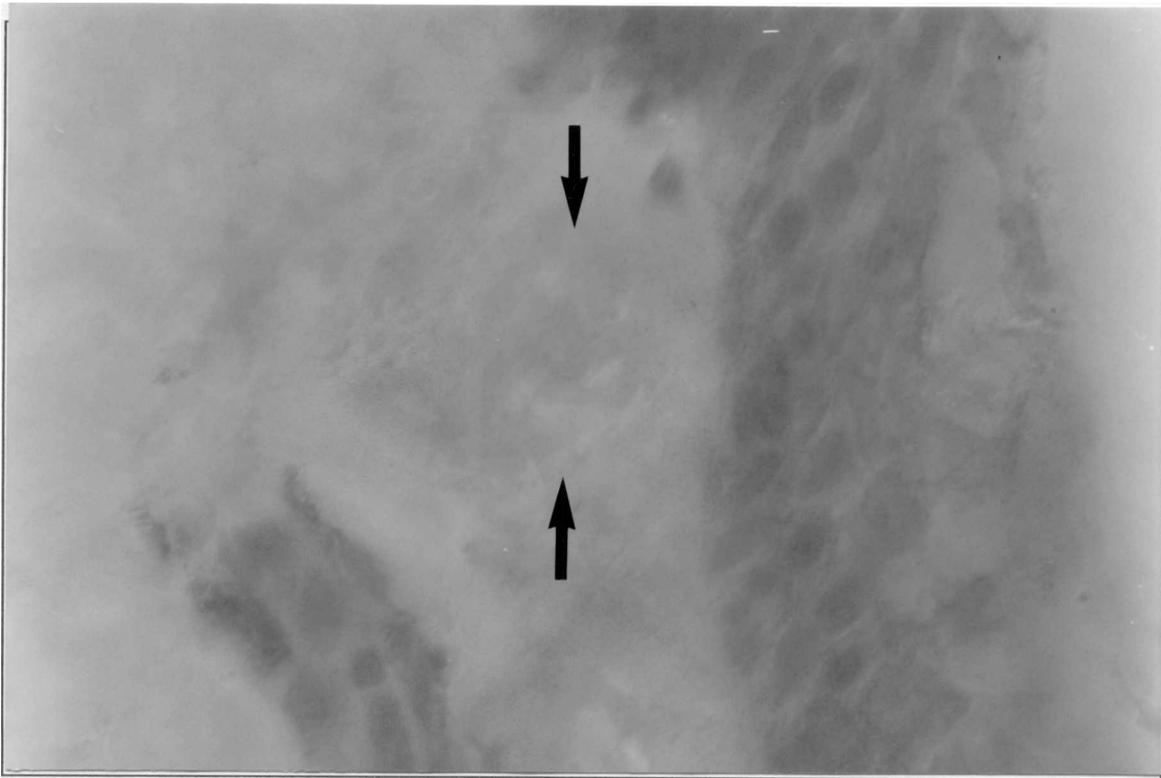


Figura 4.- Fotomicrografía de un depósito de amiloide en la dermis papilar Rojo congo. 787x.

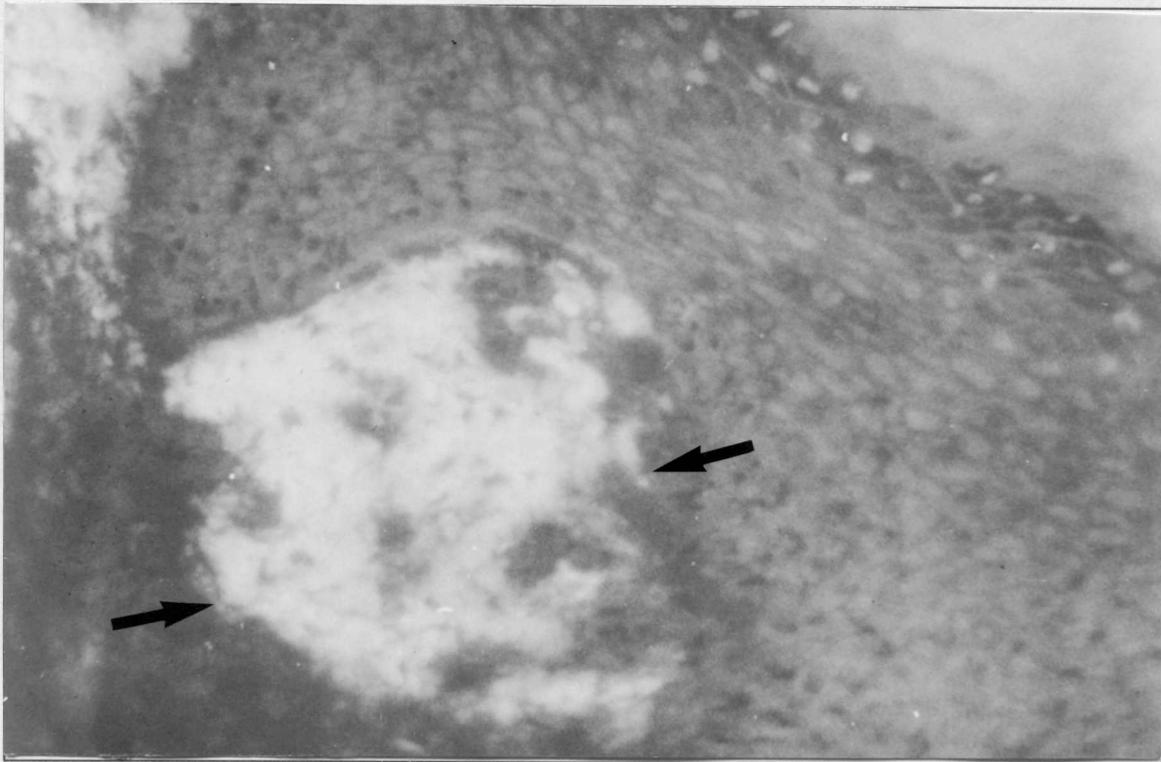


Figura 5.-Fotomicrografía de un depósito de amiloide en la dermis papilar Tioflavina T. 787x.

Hay que enfatizar que, ante la sospecha clínica de la amiloidosis las reacciones histoquímicas son indispensables para el diagnóstico por su alta especificidad. Los métodos inmunohistoquímicos son de utilidad para la localización precisa de algún componente del complejo amiloideo (42).

En el estudio ultraestructural (43), los depósitos de amiloide se caracterizan por, un patrón de fibras electrodensas de longitud indefinida, no ramificadas, no anastomosadas, dispuestas en todas direcciones, unidas por un material menos electrodensito localizado entre las fibras que parece cementarlas y ser el responsable de su compactación, por lo que este arreglo característico convierte a la microscopía electrónica en el método más fino para su diagnóstico (Figura 6).

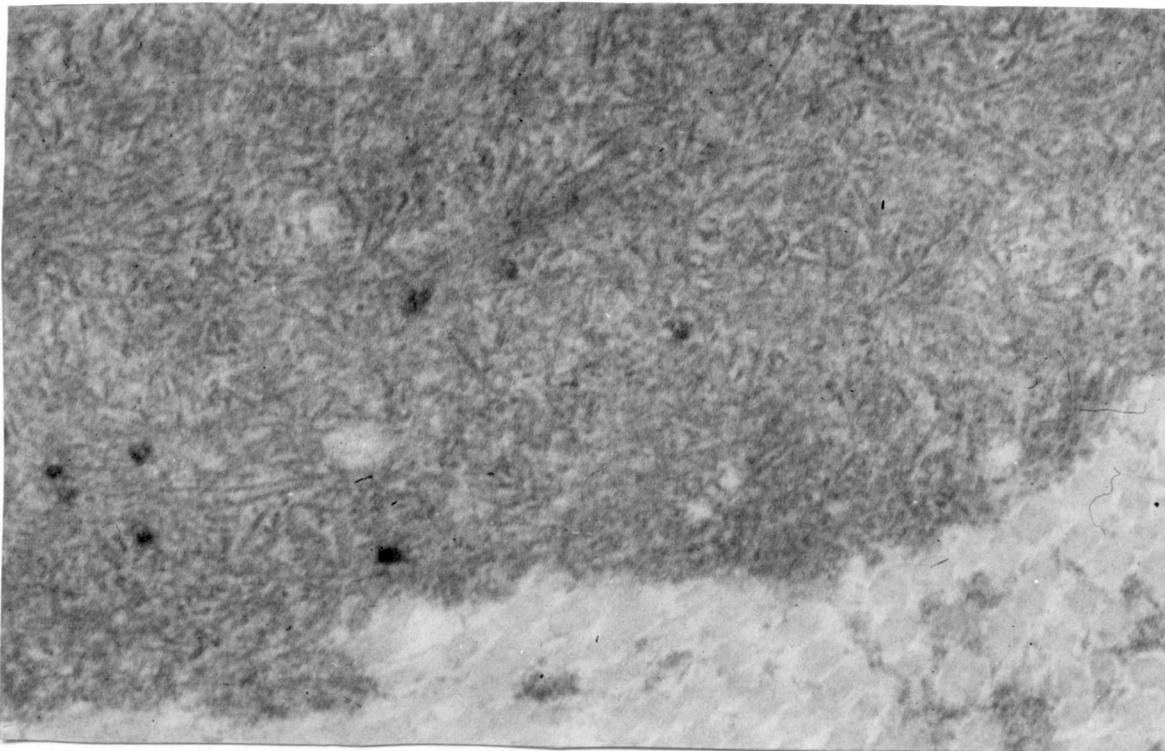


Figura.-6 Micrografía electrónica de transmisión donde se muestra el patrón ultraestructural del Amiloide. 20,000x.

Debido a que se desconoce el o los factores precisos que intervienen en la génesis de los depósitos de amiloide tanto en la amiloidosis sistémica, como de la amiloidosis cutánea, el establecimiento de un tratamiento específico no ha sido posible, y una gran variedad de sustancias han sido utilizadas. En la amiloidosis sistémica se ha utilizado con fines terapéuticos, el extracto de hígado (44), las drogas citotóxicas (45), la colchicina (46,47) y el dimetil sulfóxido (DMSO) (48,49, 50, 51,52).

Para el caso particular de la amiloidosis primaria cutánea, se han utilizado antihistamínicos, esteroides tópicos e intralesionales (53), etretinato (54,55), nitrógeno líquido y la dermabrasión como procedimiento quirúrgico (56,57), todos ellos con resultados variables.

El DMSO tópico ha sido empleado para el tratamiento de la amiloidosis cutánea, ya que es una de las drogas que presenta bajo índice de toxicidad y pocos efectos colaterales. Los pacientes tratados presentan una mejoría clínica considerable, que se manifiesta por disminución del prurito y aplanamiento de las lesiones (58).

Es de nuestro interés el conocer los efectos del DMSO, es un solvente bipolar que en 1810 se obtuvo de la manufactura del papel. Este producto pertenece al grupo químico de las alquilsulfonas y es un miembro homólogo de los sulfóxidos orgánicos (59). Es producido sintéticamente desde 1866 por la oxidación del dimetil sulfuro. Su estructura química se muestra en la (Figura 7). Entre sus propiedades físico-químicas destaca que es un líquido incoloro, de olor característico, altamente higroscópico puesto que absorbe el 70 % de su peso en agua presentando una humedad relativa del 65 % a una temperatura de 20°C (60).

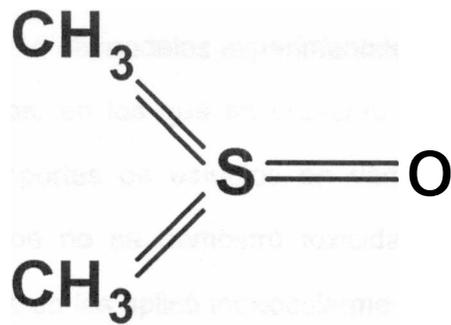


Figura 7.-Estructura química del DMSO (dimetil sulfóxido)

En 1965, Jacob (61) introdujo el DMSO como un solvente orgánico para uso farmacológico. A partir de esta fecha, diversos estudios se han realizado a nivel experimental para conocer sus efectos biológicos.

Se ha reportado que induce un aumento en la permeabilidad de la membrana celular (62), produce efectos bactericida, bacteriostático y antimicótico (63). Esta substancia que actúa como acarreador para el transporte de drogas (64), altera la sensibilidad y produce un efecto vasodilatador donde se aplica (65).

Otros reportes demuestran los efectos celulares que produce el DMSO "in vitro" en concentraciones de 3% y 5% en cultivo de fibroblastos. Se observó inhibición de la proliferación celular y alteración en la forma de las células, que se tornaron redondas. Este efecto es reversible al retirar el DMSO del medio de cultivo. En cultivo de células carcinomatosas de pulmón, el DMSO a una concentración del 5% induce en un lapso de 48 hrs. la expresión de proteínas específicas de la superficie celular relacionadas con la diferenciación, de la misma forma en las células de la Eritroleucemia de Friend en cultivo induce la diferenciación, siendo capaz de revertir su fenotipo maligno (66,67).

Existen reportes de toxicidad en modelos experimentales por el uso en dosis repetidas del DMSO tópico en perros, en los que se presentó opacifidad de la cornea. Sin embargo, existen otros reportes de estudios en varias especies animales, con la aplicación de DMSO donde no se demostró toxicidad; en un grupo de pacientes voluntarios sanos a los que se les aplicó intraocularmente el DMSO y a los que se les estudió por técnicas de laboratorio en forma exhaustiva, no mostraron efectos adversos de ninguna naturaleza (68). Es importante no pasar por alto que existe reportado en la literatura el caso de un paciente al que se le administró DMSO por vía endovenosa y le ocasiono toxicidad sistémica inducida por daño hepático (69).

Es importante enfatizar que estos reportes de los efectos tóxicos del DMSO son únicos y anecdóticos, y que actualmente la totalidad de los reportes del uso del DMSO, tanto en modelos experimentales en animales como en grupos de pacientes tratados por diferentes afecciones, confirman el efecto benéfico de la droga por su bajo índice de toxicidad (70).

El reporte efectuado por Isobe y Oserman (71) en 1976 es decisivo para el uso del DMSO como una droga útil para el tratamiento de la amiloidosis. Ellos realizaron la demostración "in vitro" del efecto solubilizador del DMSO sobre las fibras del amiloide. Keisman (72) confirma lo reportado por Isobe y Oserman repitiendo los resultados en un modelo "in vivo ". El aplicó por vía intraperitoneal el DMSO a ratones con amiloidosis sistémica inducida previamente por caseína, encontraron subunidades de amiloide en la orina de estos animales, a partir de las cuales se resintetizaron fibras de amiloide.

A raíz de este reporte, en 1982 Ravíd y Sapira (73) tratan un grupo de pacientes que presentaban amiloidosis sistémica con DMSO por vía oral, encontrando una mejoría en la función renal hasta de un 30 %.

Desde 1982 se ha utilizado el DMSO para el tratamiento de la amiloidosis secundaria o sistémica. Los resultados terapéuticos reportados son similares y todos los autores coinciden en que los pacientes presentaron mejoría clínica, reflejada por recuperación de la función renal y aumento de la sobrevida después del tratamiento (74).

El uso del DMSO en aplicación tópica, para lesiones dermatológicas fue descrito por Engel (75) en 1965, quien lo utilizó en un grupo de pacientes con diversas dermatosis, entre las que se incluyó el liquen amiloide. El les aplicó DMSO al 40% y 60% en solución acuosa diariamente y encontró una mejoría caracterizada por la disminución del prurito y el aplanamiento de las lesiones.

Sin embargo este reporte pasó inadvertido, y el DMSO se utilizó de nuevo en el tratamiento de la amiloidosis cutánea a partir de 1980 por Bonenblac (76), quien tomando en cuenta los hallazgos reportados por Isobe y Oserman, aplicó DMSO tópico a concentración de 50% a un grupo de pacientes con amiloidosis cutánea de variedad macular y encontró mejoría clínica .

Diversos autores como Ollage y Peña (77), Pravata (78), Palomares y Peñaloza (79) y Wong y col. (80) trataron la amiloidosis primaria cutánea con DMSO tópico en concentraciones que variaron del 50% al 100%, obteniendo todos resultados similares de mejoría clínica.

Lim en 1988 (81), reportó que el DMSO no producía la remoción de los depósitos de amiloide, ya que los resultados que obtiene son de una biopsia de piel con amiloidosis de la que se realizaron cortes por congelación, y se incubaron con DMSO al 50% a temperatura ambiente por 24 hrs. Encontró que las reacciones histoquímicas resultaron positivas para el amiloide aún después de la incubación, como antes de exponerlas al DMSO, por lo que concluye que "el DMSO falla en disolver los depósitos de amiloide". Sin embargo, la mayoría de los reportes clínicos, coinciden en enfatizar la mejoría clínica, de los pacientes con amiloidosis cutánea tratados con DMSO tópico.

Monfrecola y col. (82), además de la mejoría clínica, reportan la disminución de los depósitos de amiloide en una biopsia de piel postratamiento, sólo en un paciente. Son los únicos autores que consignan cambios histológicos en los depósitos de amiloide después del tratamiento con DMSO.

En 1989 Welsh y Assad (83) publicaron la casuística de 11 años de la amiloidosis cutánea y la mejoría clínica de pacientes tratados con diversas drogas, entre las que se incluye el DMSO.

En 1991 (84) se reportó el seguimiento histoquímico de un grupo de 10 pacientes con amiloidosis cutánea, tratados con DMSO tópico, a los que se les efectuaron biopsias pretratamiento y a los 3, 6 y 8 meses postratamiento en donde se encontró la negativización de las reacciones histoquímicas, en las muestras postratamiento. Concluimos que posiblemente el DMSO estuviera actuando sobre la estructura de los depósitos del amiloide removiéndolos, siendo ésta la causa de la negativización de las reacciones histoquímicas y posiblemente la base de la mejoría clínica reportada.

En 1992 se reportaron (85) los cambios ultraestructurales inducidos por el DMSO sobre los depósitos de amiloide en los pacientes que recibieron tratamiento durante 3, 6 y 8 meses, y que presentaron negativización de las reacciones histoquímicas. La ultraestructura general de los depósitos de amiloide se encontró modificada, ya que el componente fibrilar del amiloide mostró una separación entre las fibras, y el material de menor electrodensidad y de localización interfibrilar fue extraído. Esta modificación posiblemente ocasionó la falta de reactividad de los depósitos de amiloide a los colorantes, y por lo tanto la negativización de las reacciones histoquímicas.

Por la revisión de los antecedentes encontramos que existe un importante vacío en el conocimiento actual con respecto a:

- 1) .-Los cambios histológicos, histoquímicos y ultraestructurales inducidos por el uso del DMSO tópico en la amiloidosis cutánea.
- 2) .-El mecanismo de acción del DMSO tópico sobre la modificación de los depósitos de amiloide.
- 3.-La relación que existe entre la mejoría de los pacientes y la modificación de los depósitos de amiloide.

Tomando en cuenta los resultados de nuestros trabajos anteriores, del seguimiento histoquímico y ultraestructural, se propone la hipótesis de que el DMSO induce cambios morfológicos y bioquímicos en los depósitos de amiloide y en las células asociadas en la piel de pacientes con amiloidosis cutánea mantenida en cultivo de órgano.

Para comprobarla se plantean los siguientes objetivos:

- 1 .-Mantener piel de biopsias de pacientes con amiloidosis cutánea, así como piel normal de donadores voluntarios, en cultivo de órgano con DMSO en dos concentraciones 3% y 5% por 24, 48, 72, 96 y 120 hrs. y como control se incuban muestras de igual manera, sin DMSO.
2. -Evaluar la morfología de los explantes en cultivo, por microscopía de luz y electrónica, describiendo los cambios encontrados en los depósitos de amiloide, queratinocitos, células de la dermis y matriz extracelular.
3. -Determinar la concentración de proteínas que se encuentran en el medio de cultivo.
4. -Correlacionar los hallazgos bioquímicos con los morfológicos.

MATERIAL Y METODOS

Se obtuvieron biopsias de piel proveniente de 10 pacientes con diagnóstico clínico e histopatológico de amiloidosis cutánea primaria, provenientes del Servicio de Dermatología, del Hospital Universitario "José E. González" de la U.A.N.L., y 10 biopsias de piel de donadores voluntarios sanos, tomadas de un sitio equivalente a donde aparece la lesión en los pacientes. Se tomaron en como criterios de exclusión:

1. -Pacientes que hubieran recibido o estuvieran recibiendo DMSO u otro tratamiento tópico.
2. - Pacientes con embarazo o lactancia.
3. - Pacientes con patología sistémica intercurrente.

Previa asepsia y anestecia local con xilocaína y epinefrina, se tomaron biopsias de espesor total de la piel en forma de huso, de aproximadamente 6 mm. de largo y 4 mm. de ancho. Se colocaron en un medio nutriente que contenía Medio Esencial Mínimo de Eagle (E-MEM) más 100 U/lto. de penicilina, 100mg./lto. de estreptomycinina y 40mg./lto. de nistatina, se trasladaron al laboratorio de cultivo de tejidos del Departamento de Histología, de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L., y en una campana de flujo laminar, y bajo condiciones de esterilidad óptimas, se inició el proceso de las mismas.

Las biopsias se colocaron en un plato de Petri y se procedió a seccionarlas en dos fragmentos, de los cuales uno se destinó para la demostración histoquímica del amiloide y el otro para el cultivo. El fragmento de menor tamaño, se congeló y se

practicaron cortes de 6 micras con un criostato marca Harris, modelo CTD-1. Las secciones se tiñeron con Hematoxilina y Eosina para verificar la morfología general de la piel, y con reacciones histoquímicas específicas se demostraron los depósitos de amiloide (violeta de metilo, tío flavina T y rojo Congo). La positividad de estas reacciones fue un requisito para continuar con el procesamiento del resto de la biopsia.

I).- Cultivo de Organo

EL segundo fragmento se destinó para el cultivo de órgano. Utilizando el microscopio estereoscópico, se removió el exceso de grasa correspondiente a la hipodermis y se procedió a fragmentarla con ayuda de material de disección fino, que constó de dos bisturís con hojas planas y tres pinzas finas sin dientes. La biopsia se cortó en porciones de 1 mm aproximadamente, controlando el tamaño de los fragmentos con una escala graduada en milímetros. De la fragmentación se obtuvieron aproximadamente 20 explantes. Se procedió a lavar los explantes por precipitación en solución salina de Hanks por tres ocasiones. De la totalidad de los fragmentos, tres que no se cultivaron correspondieron al tiempo cero, se procesaron para microscopía electrónica de transmisión hasta su inclusión en resinas epóxicas (86). Para el cultivo del resto de los explantes se utilizó una cámara marca Chamber Slide Lab-Tek de 8 fosetas con una capacidad de 500 microlitros por foseta. Esta cámara habitualmente es utilizada para cultivo de células en monocapa, y se usó de acuerdo al método descrito por Sepúlveda y col. (87) para cultivo de órgano. Se colocaron dos explantes mínimo por foseta (Figura 8).

E-MEM + AB + DMSO

E-MEM + AB

Explante

Figura 8.- Esquema de una cámara de cultivo Chamber Slide Lab Tek de 8 foseas con una capacidad de 500 microlitros por fosea E-MEM, DMSO y AB (antibiótico).

La cámara de cultivo con los explantes fue colocada en una incubadora marca HOTPAK a una temperatura de 37°C, con una humedad relativa de 95% y una concentración de CO² de 5%, durante 30 minutos, para que se adhirieran al piso de la cámara. Posteriormente se les agregó el medio de cultivo E-MEM + antibiótico (penicilina, estreptomycin y nistatina) + DMSO. La concentración del DMSO fue 3% en 4 foseas y de 0% a las otras 4. La concentración de 3% de DMSO se usó para 5 pacientes con amiloidosis y 5 donadores de piel normal. Este mismo procedimiento se repitió para otros dos grupos, un grupo de piel normal y otro de piel con amiloide sólo que a una concentración de 5% de DMSO.

II).- Técnicas para microscopía de luz y electrónica

Los tiempos que permanecieron los explantes en cultivo fueron de 24, 48, 72, 96 y 120 hrs. Se colectaron tanto los explantes como el medio de cultivo. Los explantes se fijaron en glutaraldehído al 2.5% en buffer de cacodilatos y se postfijaron en tetraóxido de osmio al 2%, para posteriormente procesarlos hasta inclusión en resinas epóxicas. Se obtuvieron cortes semifinos, a los que se les realizaron 2 técnicas; la coloración con Azul de Toluidina a una concentración de 1% (88) y la técnica de impregnación con Metenamina de plata (tablal). Esta última habitualmente utilizada para la demostración

de la colágena (89,90) y que en este trabajo se adaptó para demostrar la presencia de los depósitos de amiloide en cortes incluidos en resinas epóxicas por contrastación con la colágena, utilizando un microscopio de contraste de fases (91).

TABLA 1
TECNICA DE METENAMINA DE PLATA

Solución A	Acido Peryódico 1 %
Solución B	Metenamina-Hexametenamina 3%
Solución C	Nitrato de plata 10%
Solución D	Borato de sodio 2%
Solución E	Tiosulfato de sodio 2%

Solución de Trabajo de Metenamina de Plata

Solución B.	40 mi.
Solución C.	10 mi.
Solución D.	10 mi.

Procedimiento

Se obtuvieron los cortes semifinos con un ultramicrotomo marca LKB Ultratome V.

Con asas de Marinosi se levantaron del reservorio de la cuchilla y se pasaron a:

Solución A	30min.
Agua destilada	10min.
Solución de Trabajo de Metenamina de Plata a 60°C	60min.
Agua destilada .	5min.

Tiosulfato de sodio 2%

30 seg.

Finalmente se adhirieron por calor al portaobjetos y se montaron con bálsamo de Canadá.

Nota: Siempre deben agregarse los reactivos en este orden, se dejan reposar 30 minutos y debe prepararse inmediatamente antes de usarse.

Después de revisar los cortes semifinos, se seleccionaron los bloques para cortes finos, contrastándose éstos con citrato de plomo y acetato de uranilo, según la técnica de Reynolds (92).

Los cortes finos se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 109. Se tomaron fotografías a 3,000x, 4,400x, 7,000x, 12,000x y 20,000x.

III).- Determinación de la concentración de proteínas por medio del método de Bradford.

Este método, se basa en que el colorante Azul de Comassie G, del reactivo de Bradford, forma un complejo con proteínas. Este complejo presenta un color de rojo a azul, y la intensidad del color es directamente proporcional a la cantidad de proteínas presentes, por lo que la intensidad puede variar, ya que será proporcional a la cantidad de proteínas.(93).

El protocolo para la determinación de la concentración de proteínas, se inició con la preparación de una solución de trabajo del reactivo de Bradford a una dilución de 1:5 en agua destilada. Posteriormente se realizaron las curvas de calibración con una solución estándar de albúmina de suero bovino (BSA) a diferentes concentraciones.

Con los valores de las concentraciones conocidas, se obtuvo un rango de absorbancias, para extrapolar los valores de las absorbancias problemas y obtener así su concentración.

Los estándares se prepararon en un rango de concentración de 0.5pgr. a 6.0pgr. con intervalos de 0.5pgr. para las curvas de calibración, éstos se aforaron con agua destilada hasta completar 200 pl., posteriormente se le agregó 1ml. de la solución de trabajo del reactivo de Bradford. Los estándares se prepararon por triplicado y por duplicado las muestras.

Las muestras problemas se congelaron a -22°C , para efectuarles posteriormente la determinación de proteínas totales por el método colorimétrico de Bradford. Se utilizaron 100pl. del medio provenientes de los cultivos en las distintas modalidades y se aforaron a 200pl. totales con 100pl. de agua destilada, más 1ml. de reactivo de Bradford.

Los estándares y las muestras se agitaron en un vórtex y se dejaron reposar a temperatura ambiente de 25°C por 30 minutos. Para la lectura se utilizó un espectrofotómetro marca Beckman, que se calibró con una solución blanco de 200pl. de agua destilada más 1ml. del reactivo de Bradford. Se efectuaron las lecturas a una longitud de onda de 595 nm.

Para calcular las concentraciones, los valores de las absorbancias de los estándares y de los problemas se pasaron a una hoja de cálculo del programa Symphony, y con la fórmula de los mínimos cuadrados se analizaron los datos para obtener las

concentraciones corregidas, las cuales fueron expresadas en pgr contenidos en 200pl. Para reportar los valores en microgramos por mililitros se multiplicó por un factor de 5 el valor obtenido se dividió entre el número de explantes presentes en cada foseetas por lo que la concentración final se expresó en pg./ml./explante.

Se realizaron un total de 24 curvas de calibración: 10 para los controles de piel normal, 10 para la piel con amiloidosis y 4 en el medio nutriente solo.

El análisis estadístico que se realizó fue el de varianza de Fisher (94).

RESULTADOS

En los cortes de las biopsias antes de procesarse, las reacciones histoquímicas fueron negativas para la piel normal y positivas por la presencia de depósitos en la dermis papilar, además de hiperqueratosis y acantosis marcada en la piel con amiloidosis (Lámina 1).

a) Morfología de la piel normal.

En los cortes semifinos de la piel normal (Lámina 2), teñidos con Azul de Toluidina se encontró que en el tiempo cero los queratinocitos, la unión dermoepidérmica, los componentes de la dermis como células y matriz extracelular, eran normales.(Figural). En los cortes contrastados con la técnica de Metenamina de Plata los queratinocitos de todos los estratos presentaron una marcada definición de los contornos celulares. En la dermis, la colágena se impregnó de un color café oscuro a negro, y al observarlos con el microscopio de contraste de fases se delimitaron claramente las fibras de colágena de los componentes celulares de la dermis (Figura 2).

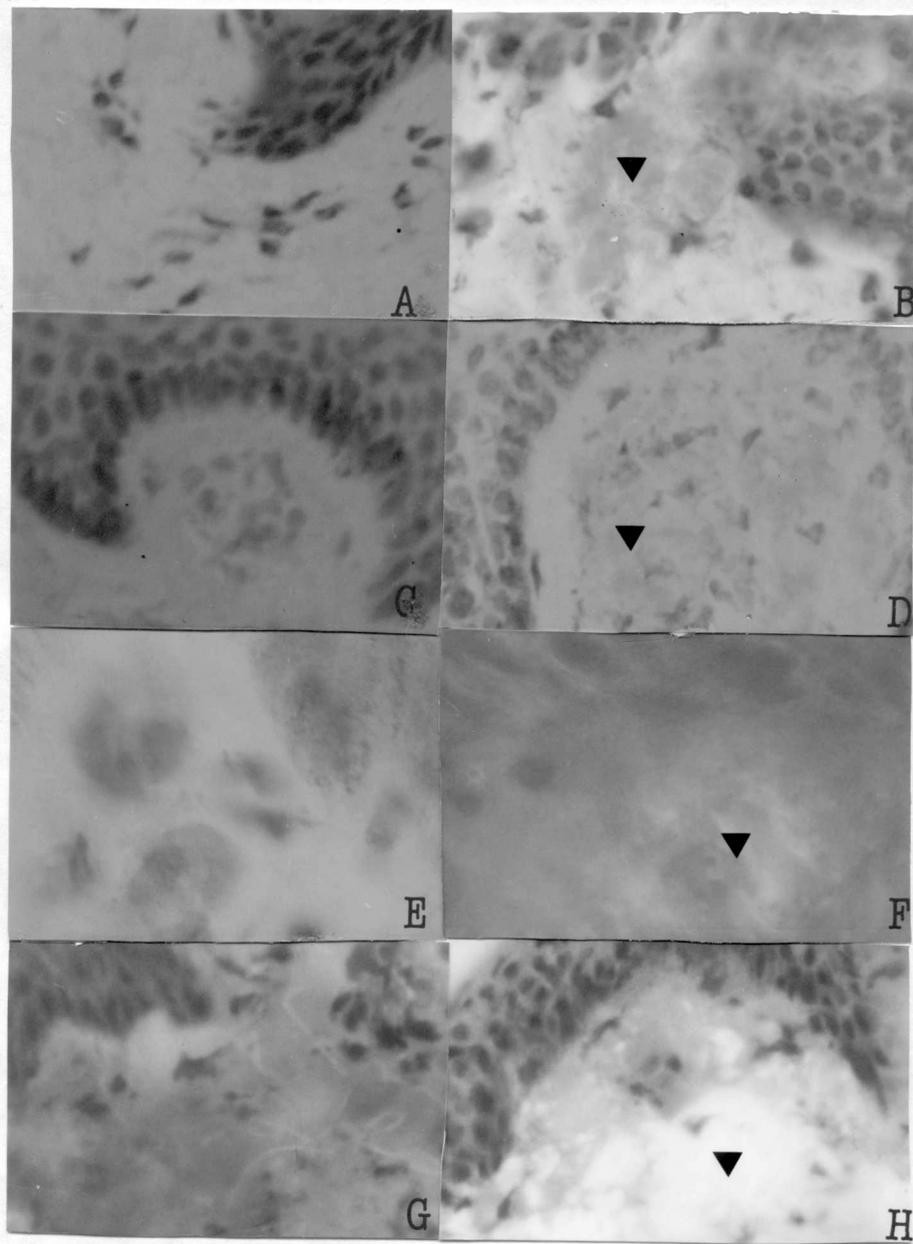


Lámina 1.-Fotomicrografías de cortes por congelación de 5 μ m. de piel normal y con amiloidosis cutánea (A,B) teñidos con Hematoxilina y Eosina 312.5x ; (C,D) verde de metilo 312.5x ; (E,F) Rojo Congo 7874x ; (G,H). tioflavina T 312 x.

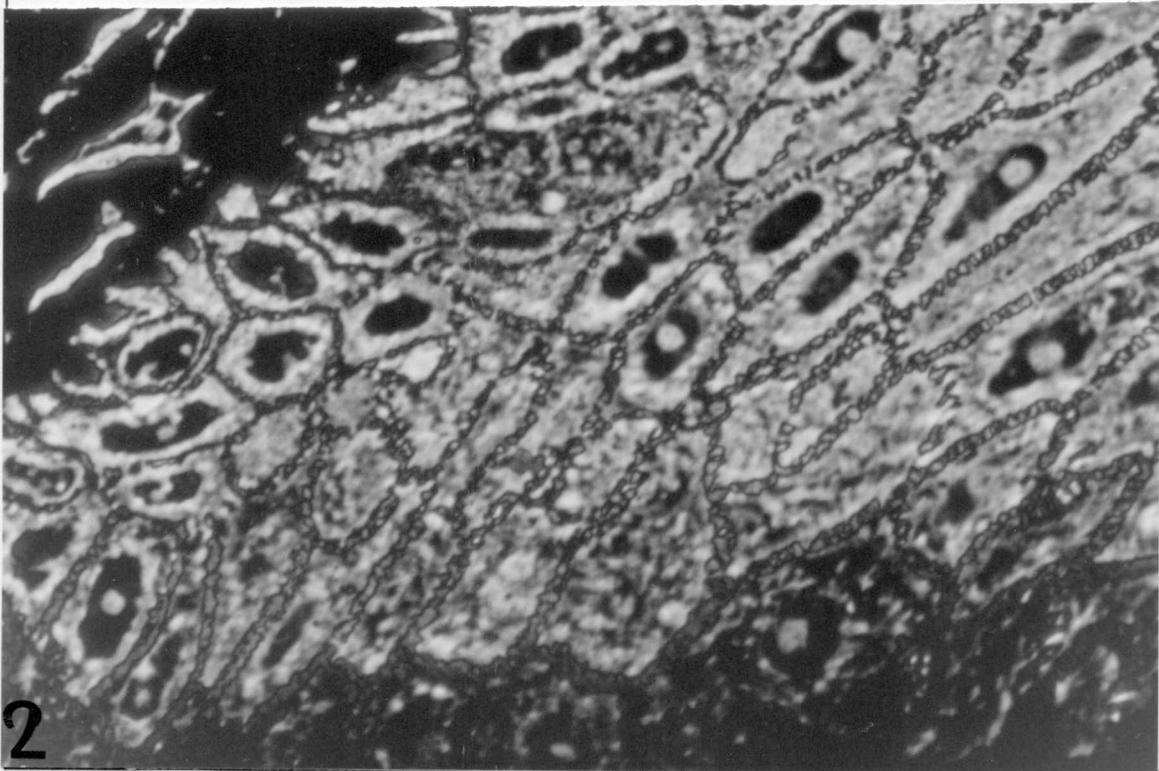
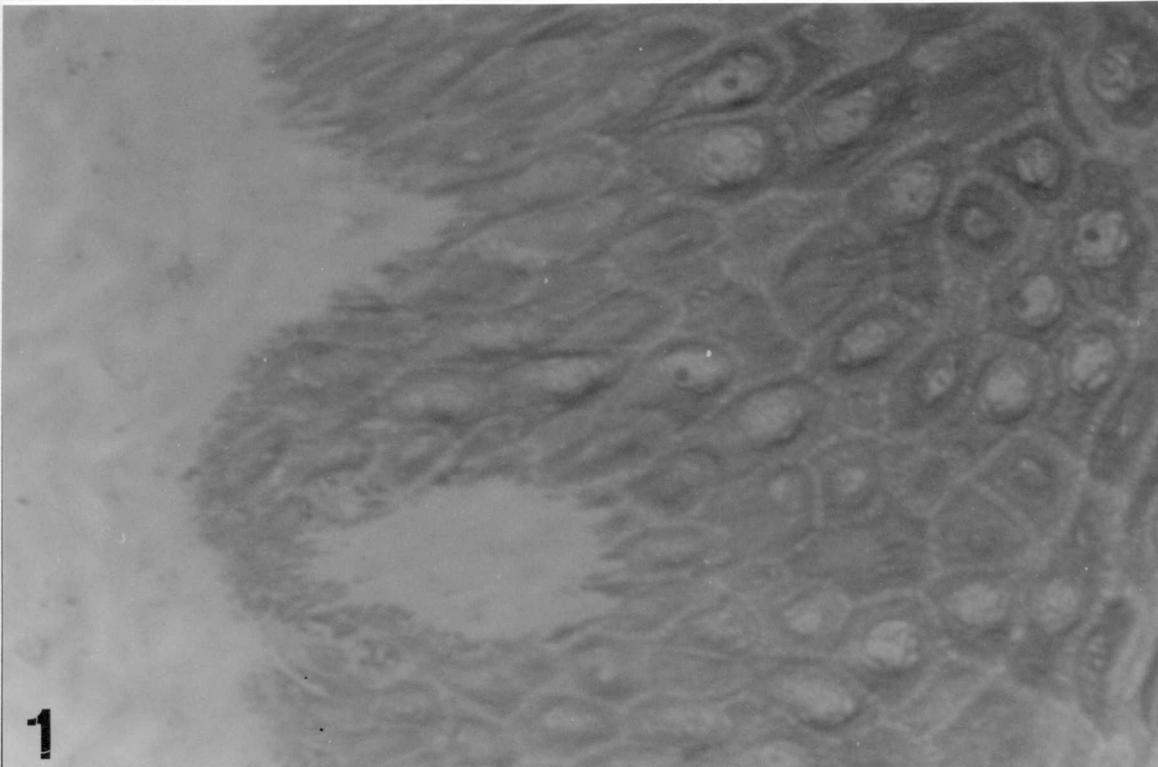


Lámina 2.-Fotomicrografías de cortes semifinos de piel normal Figura 1) Azul de Toluidina, Figura 2) Metenamina de Plata y observado en contraste de fases 787x.

b) Morfología de la piel normal en cultivo

En la piel normal (Lámina 3), se observó que en comparación con el tiempo cero (Figura 1), los explantes de piel normal incubada sin DMSO presentaron aumento del número de las células de los estratos, epidérmicos. En la dermis las fibras de colágena y la matriz extracelular se encontraron normales (Figura 2). Los explantes de piel normal incubada con medio adicionado con DMSO no mostraron aumento del número de las células de los estratos y en la dermis se observó separación de los haces de colágena desde las 24 horas de incubación (Figura 3).

En las imágenes ultraestructurales de la piel normal (Lámina 4), en el tiempo cero se encontró que los queratinocitos basales presentaron en sus núcleos un patrón de heterocromatina (1), en el citoplasma encontramos los filamentos de citoqueratina en relación con los gránulos de melanina (2), así como gotas de lípidos (3). En la dermis los fibroblastos (4) presentaron un patrón de cromatina igual al de los queratinocitos en el que se distingue con claridad el nucléolo y la cisterna perinuclear, la colágena se encontró en un arreglo de fibras paralelas con una trayectoria ondulante con la presencia de estriaciones transversales características (5) y las fibras elásticas presentaron el componente fibrilar periférico y el amorfo central (6).

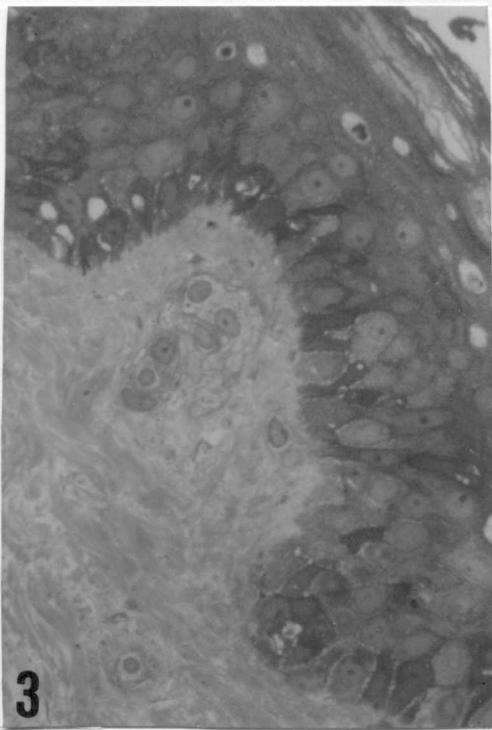
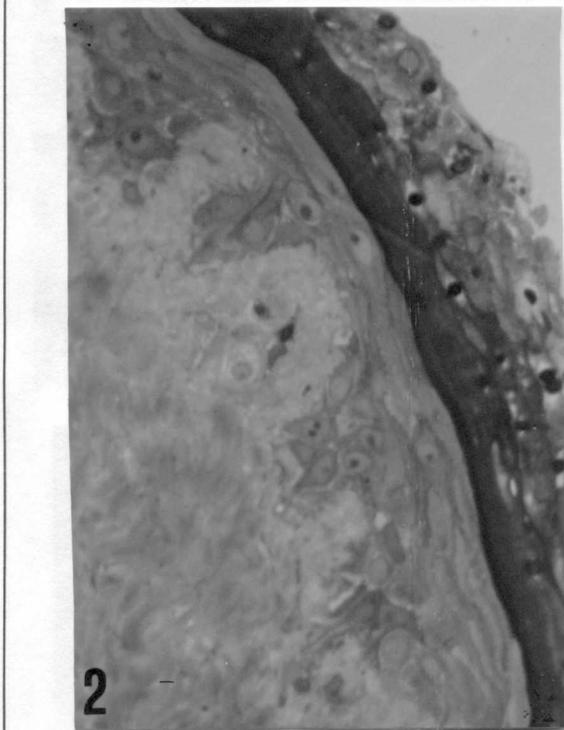
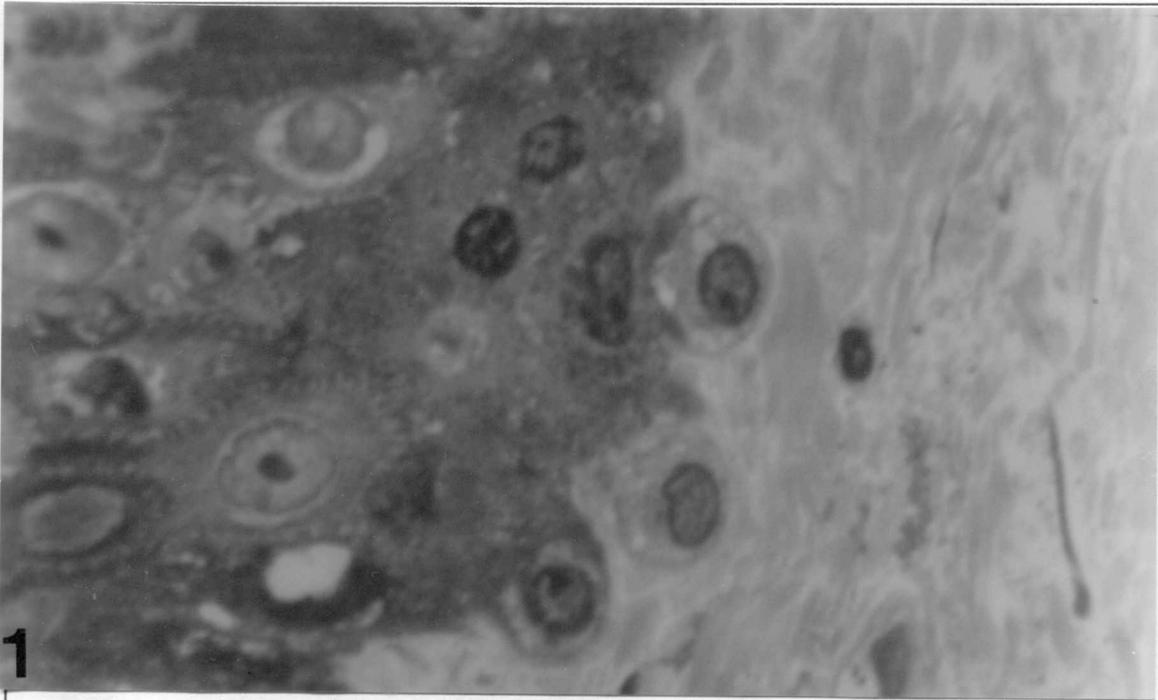


Lámina 3.-Fotomicrografía de cortes semifinos teñidos con Azul de Toluidina de piel normal
Figura 1)Tiempo cero 787x, Figura 2) 72 hrs. de incubación sin DMSO 500x, Figura3) 72hrs. con
3% de DMSO.500X.

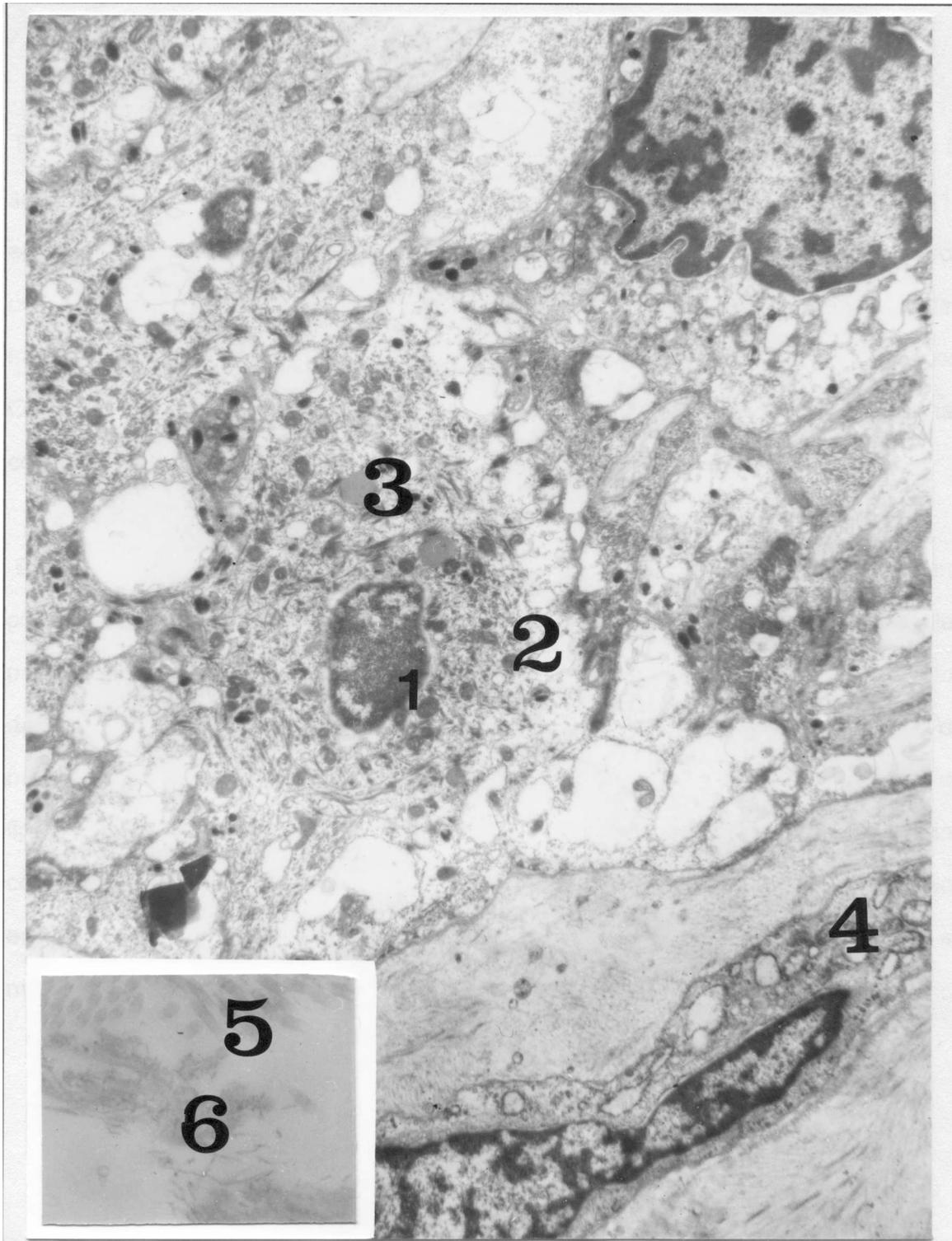


Lámina 4.-Micrografías electrónicas de transmisión de piel normal del tiempo cero
1)queratinocitos basales, 2) gránulos de melanina, 3) gotas de lípidos, 4)fibroblasto 3,000x.
Recuadro : 5) fibras colágenas, 6) fibras elásticas 20,000x.

En la ultraestructura de los explantes de la piel normal incubada sin DMSO (Lámina 5) se encontró que los queratinocitos basales presentaron núcleos heterocromáticos (1), en el citoplasma los filamentos de citoqueratina y los gránulos de melanina mostraron una disposición normal (2), gotas de lípidos (3), la unión dermoepidérmica se encontró íntegra (4). En la dermis los fibroblastos (5) presentaron sus núcleos heterocromáticos. Otros componentes como las fibrillas de tropocolágena (6) y las fibras colágenas conservaron su morfología normal (7).

En la ultraestructura de los explantes de la piel normal, incubada con DMSO a una concentración de 3% (Lámina 6), se encontró que los queratinocitos basales presentaron un patrón de eucromatina que permite ver el nucléolo (1), los filamentos de citoqueratina se distribuyeron en el citoplasma en haces delgados y los gránulos de melanina se presentaban en menor cantidad (2), se demostró la presencia de gotas de lípidos (3). La unión dermoepidérmica se encontró íntegra (4). En la dermis las células como los fibroblastos (5) presentaron igual que los queratinocitos, núcleos eucromáticos. El patrón de empaquetamiento normal de las fibras colágenas se modificó, se encontró una marcada separación entre ellas (6).

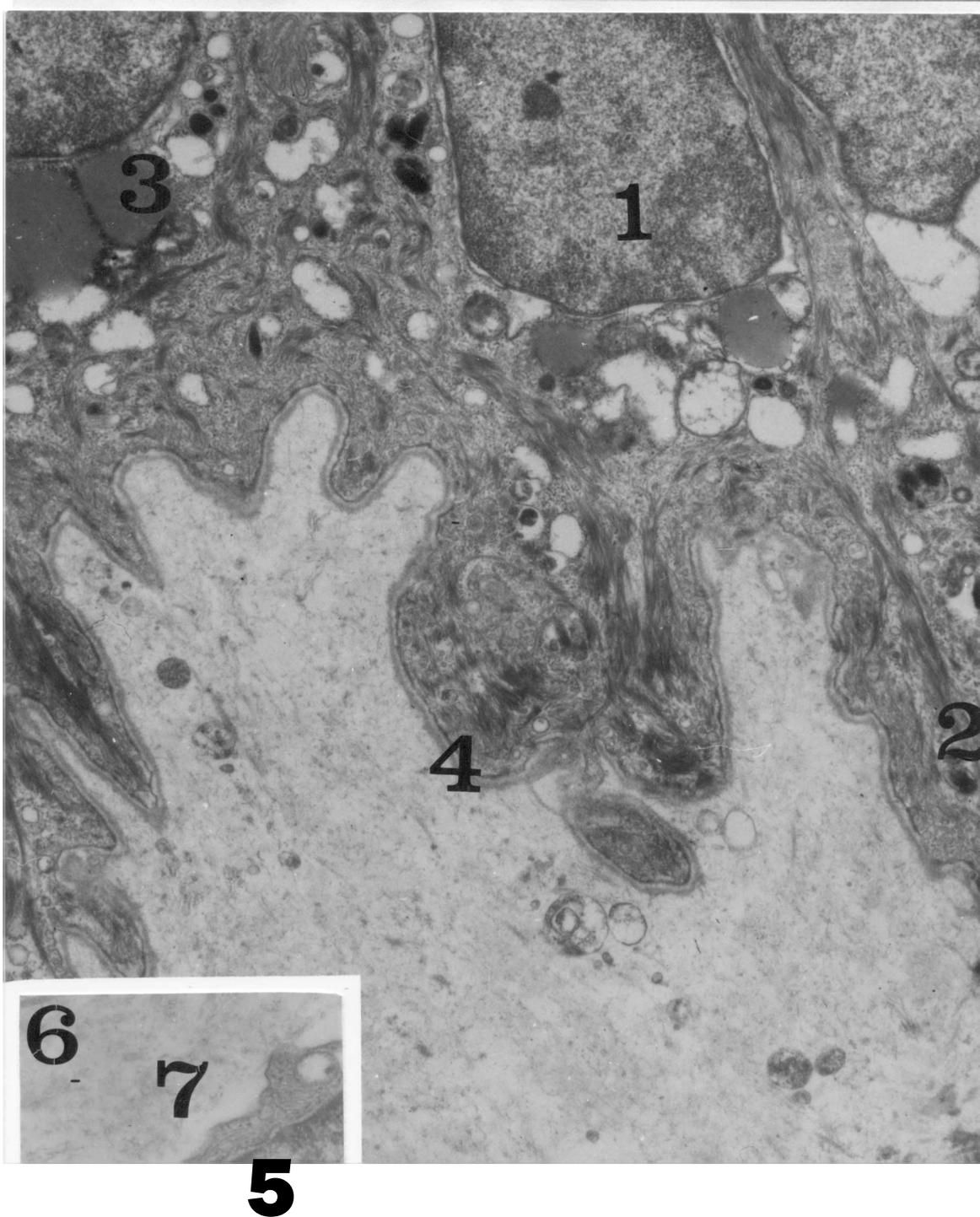


Lámina 5.-Micrografías electrónicas de transmisión de piel normal cultivada sin DMSO 1) núcleo de un queratinocito basal, 2) filamento de citoqueratina y gránulos de melanina, 3) gotas de lípidos, 4) unión dermoepidérmica 7,000x. Recuadro: 5) núcleo de fibroblasto y 6) fibras de colágena 20,000x.

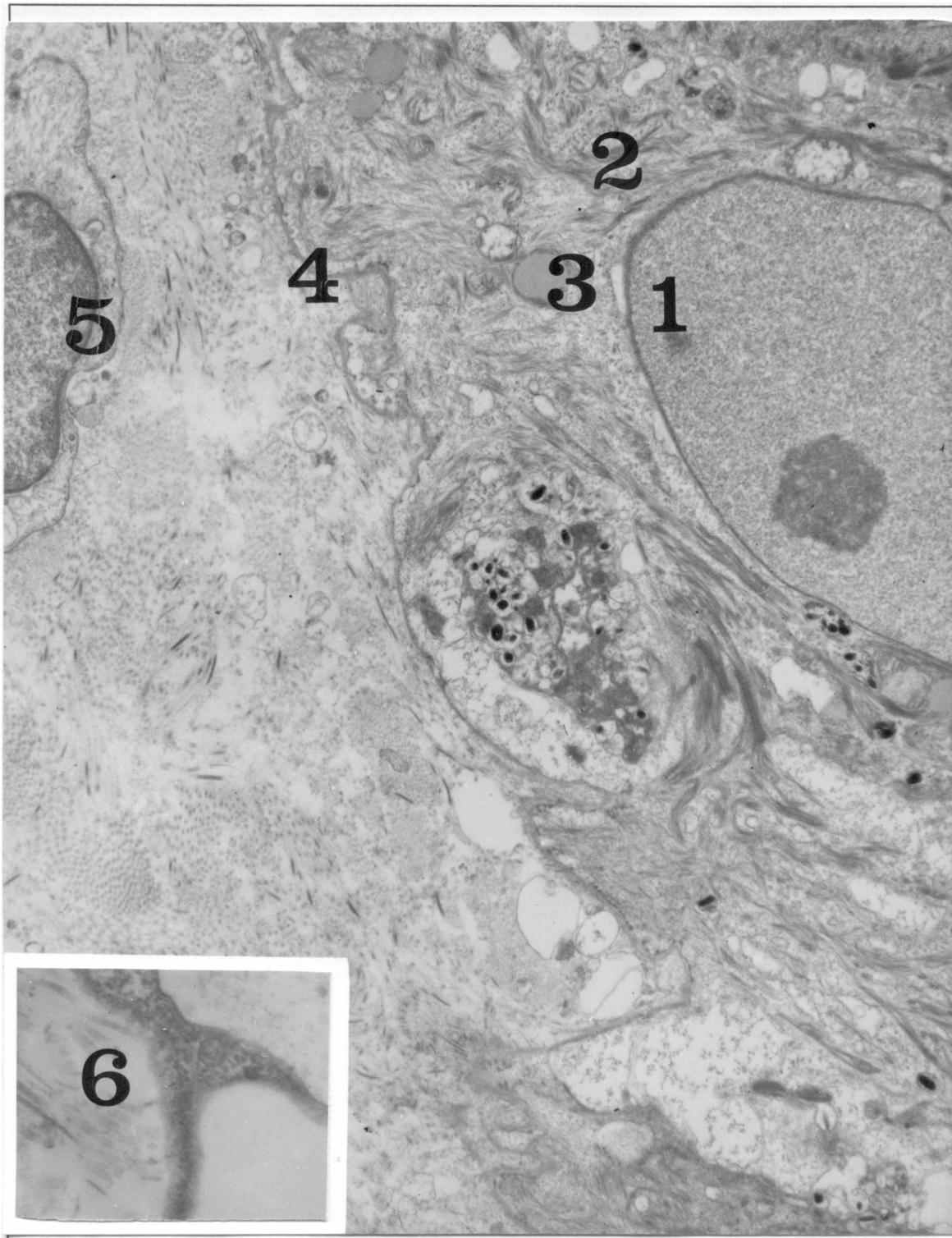


Lámina 6.-Micrografías electrónicas de transmisión de piel normal cultivada con DIVISO al 3%
1)queratinocitos basales, 2) filamentos de citoqueratina y gránulos de melanina, 3) gotas de lípidos, 4) unión dermoepidérmico 7,000x. Recuadro: 5) núcleo de un fibroblasto 6) fibras de colágena 20,000x.

c) Morfología de la piel con amiloidosis.

En los cortes semifinos de piel con amiloidosis del tiempo cero (Lámina 7) teñidos con Azul de toluidina se encontró que, a diferencia de la piel normal, la epidermis mostró una hiperqueratosis y acantosis características de la enfermedad. En la dermis papilar se demostraron masas basófilas irregulares que corresponden a los depósitos de amiloide asociados frecuentemente a una gran cantidad de células cebadas. Los depósitos ensanchaban las pápilas dérmicas, la dimensión del depósito varió de un paciente a otro e incluso de una papila a otra (Figura 1). En los cortes semifinos de piel con amiloidosis impregnados con Metenammina de Plata se observó una clara contrastación entre la colágena que se impregnó de color negro, y los depósitos de amiloide presentaron un color de amarillo a café pálido. Esta contrastación se acentuó al utilizar el microscopio de contraste de fases con el que se delimitó precisamente la localización de los depósitos del amiloide(Figura 2).

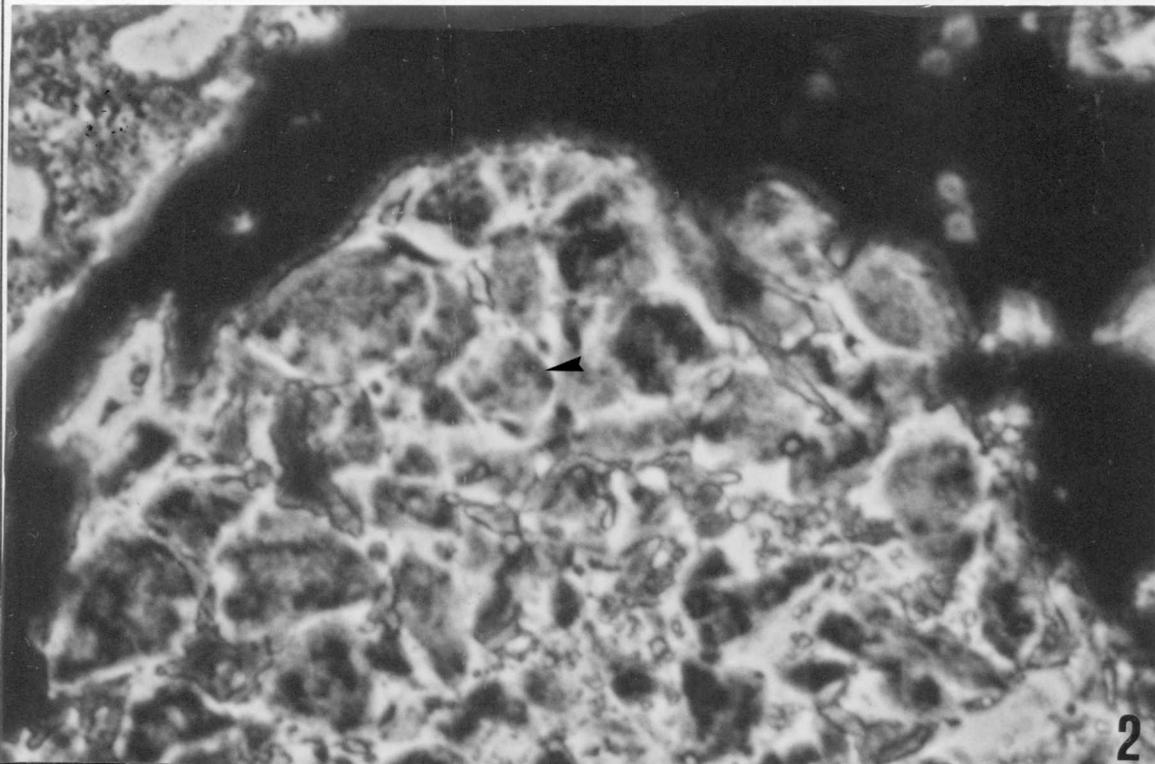
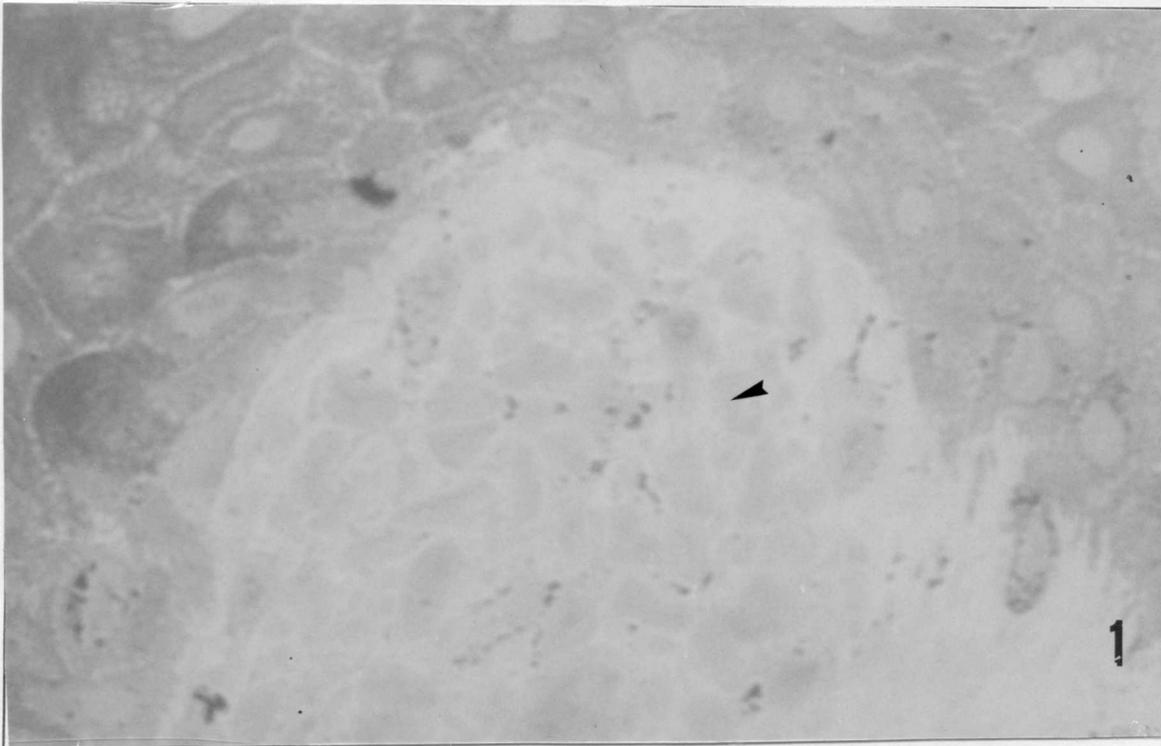


Lámina 7.-Fotomicrograffas de cortes semifinos de piel con Amiloidosis. Figura 1) Azul de toluidina, Figura 2) Metenamina de Plata, con contraste de fases 787x.

d) Morfología de la piel con amiloidosis en cultivo.

En la piel con amiloidosis en los cortes semifinos (Lámina 8), en comparación con el tiempo cero (Figura 1) los explantes incubados sin DMSO mostraron en la epidermis aumento del número de las células en los estratos. En la dermis los depósitos de amiloide y las fibras de colágena mostraron un empaquetamiento característico (Figura2). En la piel incubada con DMSO, a las dos concentraciones que se utilizaron, se encontró que la epidermis no presentó aumento del número de las células, y en la dermis, tanto los depósitos de amiloide como fibras de colágena mostraron cambios en el patrón estructural y de distribución, por la separación entre las fibras de amiloide y disminución del tamaño de los depósitos de amiloide (Figura 3).

En la ultraestructura de la piel con amiloidosis del tiempo cero (Lámina 9), se encontró en la epidermis algunos queratinocitos basales con vacuolización del citoplasma (1) una gran cantidad de filamentos intermedios formando haces engrosados relacionados con los gránulos de melanina (2). En la unión dermoepidérmica, fueron evidentes áreas en donde se perdió la continuidad con la separación de las láminas densa y rara de la membrana basal (3). En la dermis los depósitos de amiloide se presentaron de forma y tamaño irregular, localizados en la dermis papilar y, en algunas de las muestras, en la parte superior de la dermis reticular. Estos se encontraron en asociación estrecha con células de características anormales como fibroblastos (4) y con las fibras de colágena (5) y tropocolágena (6).

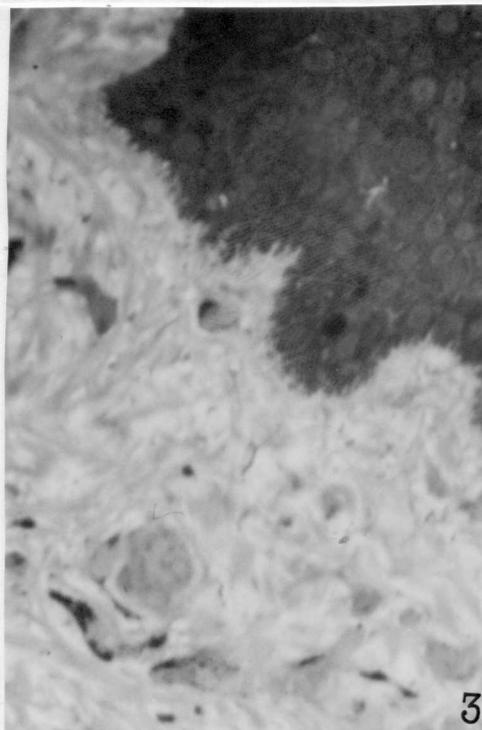
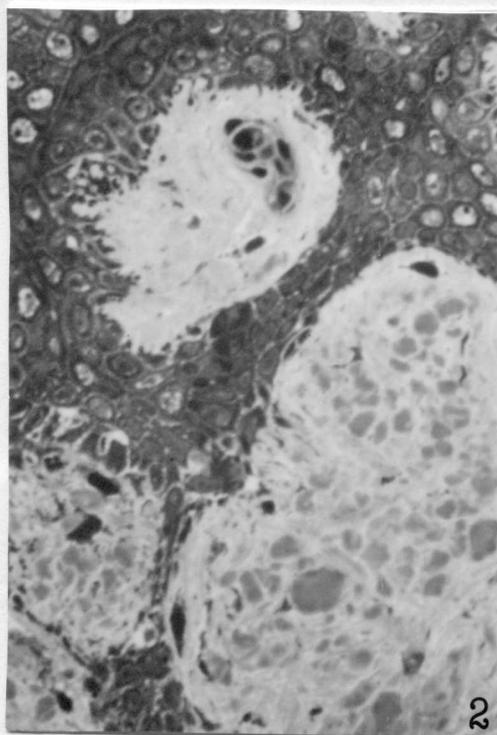
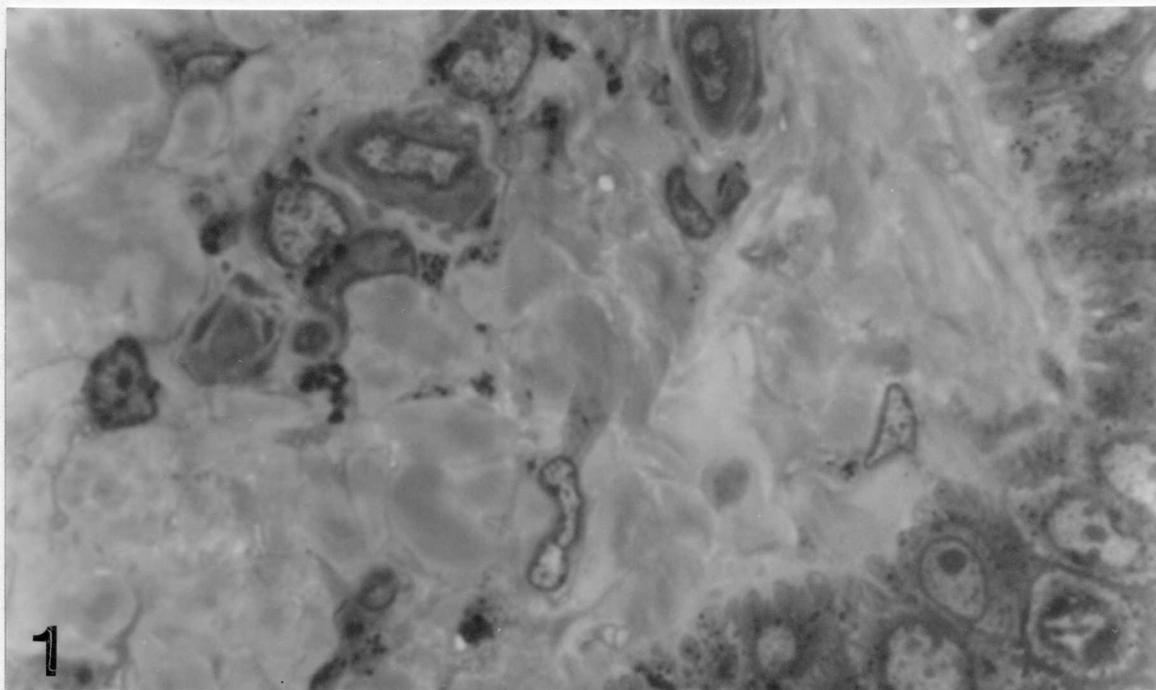


Lámina 8.-Microfotografías de cortes semifinos de piel con amiloidosis teñidos con azul de toluidina Figura 1) tiempo cero 787x, Figura 2) 72 hrs. de incubación sin DMSO, Figura 3) 72hrs. de incubación con DMSO 5% 500x.

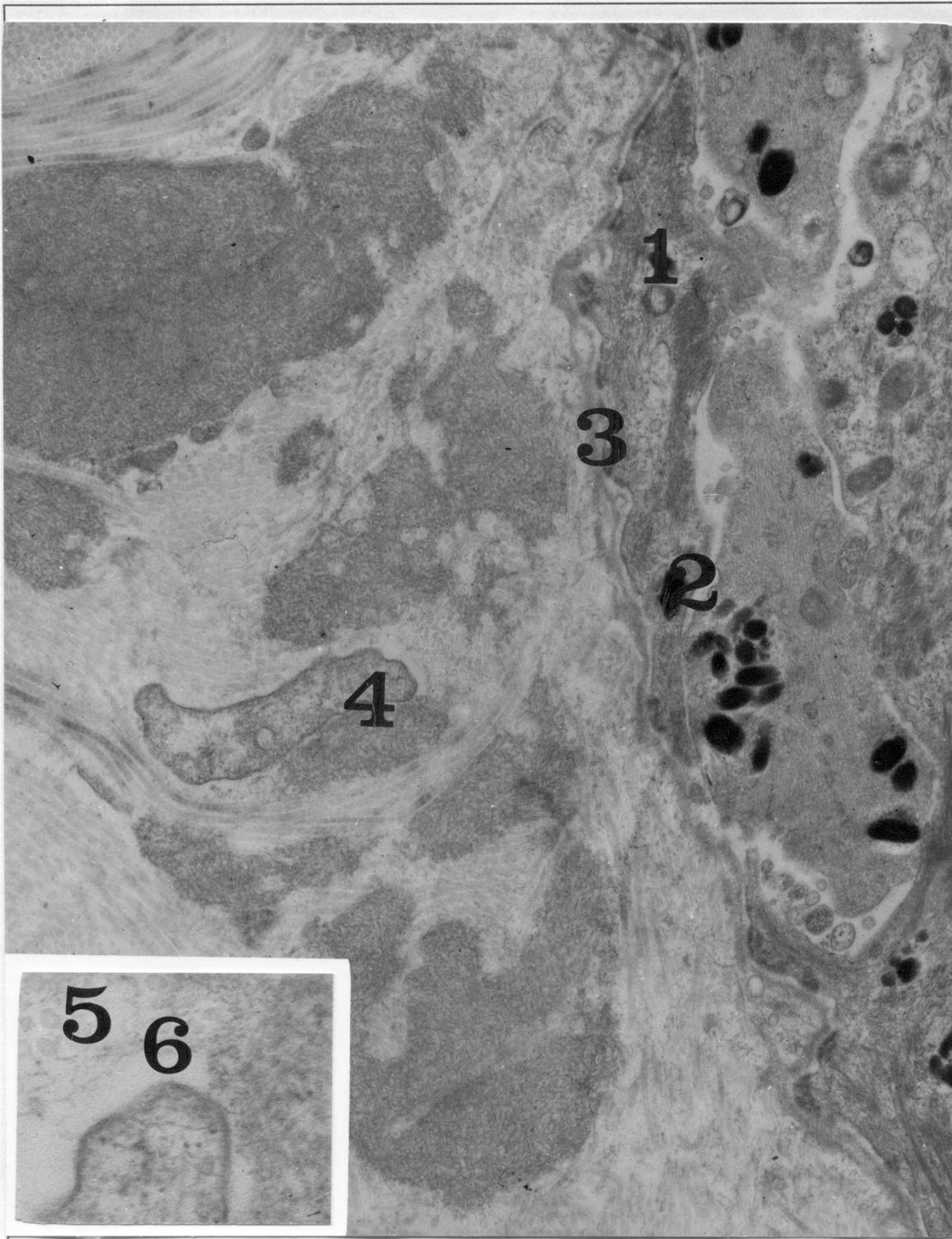


Lámina 9.-Micrografías electrónicas de transmisión de piel con amiloidosis del tiempo cero:
1)queratinocito basal con filamentos de citoqueratina, 2) gránulos de melanina, 3) unión dermoepidérmica 1,800x. Recuadro: 4) fibroblasto en relación a un depósitos de amiloide 5) fibras de colágena, 6) fibras de tropocolágena 20,000 x.

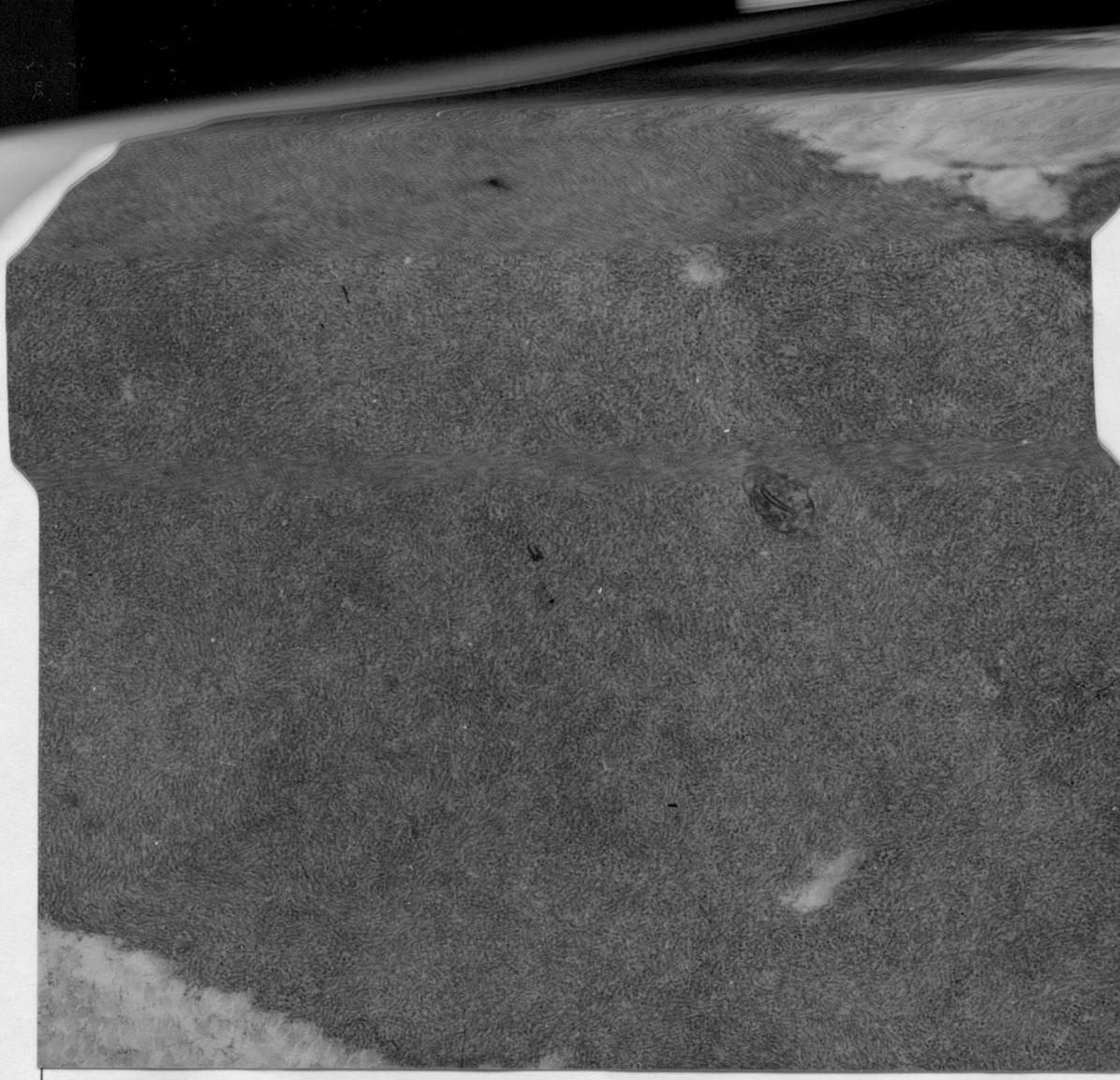


Lámina 10.-Micrografía electrónica de transmisión de piel con amiloide tiempo cero 12,000x.

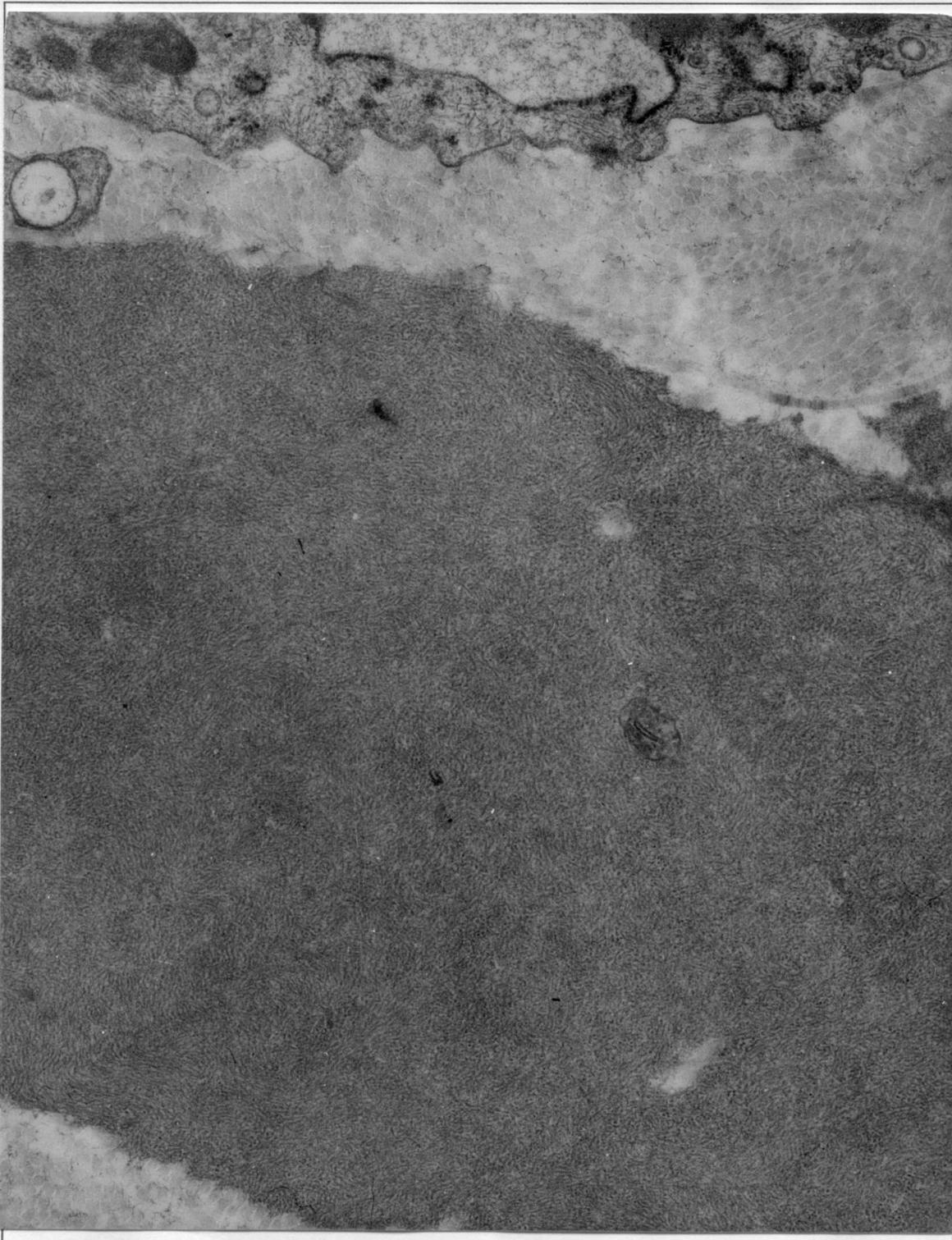


Lámina 10.-Micrografía electrónica de transmisión de piel con amiloide tiempo cero 12,000x.

La imagen ultraestructural característica, (Lámina 10) que se encontró en el tiempo cero de los depósitos de amiloide, fue de un patrón de fibras electrodensas de longitud indefinida, no ramificadas, no anastomosadas, dispuestas en todas direcciones unidas por un material menos electrodensito interfibrilar, mostrando los depósitos uniformidad en el empaquetamiento general de las fibras.

En las imágenes de los explantes de la piel con amiloidosis cultivados sin DMSO (Lámina 11), además de los cambios morfológicos descritos en el tiempo cero, las células de la epidermis y la dermis presentaron núcleos heterocromáticos. Los depósitos de amiloide (1), las fibras de colágenas (2) y elásticas no se modificaron en relación al tiempo cero, en relación a los depósitos de amiloide se observaron restos celulares como parte de los cambios antes descritos que acompañan a la amiloidosis (3). Se aprecia la compactación general de las fibras en el depósito (4) y la presencia del material interfibrilar (5).

En la piel con amiloidosis incubada con DMSO (Lámina 12), las células de la epidermis y la dermis presentaron núcleos eucromáticos. En la dermis encontramos los depósitos de amiloide con las siguientes características: (1), la modificación del empaquetamiento de las fibras de colágena (2), con franca separación entre ellas y la aparición de espacios en la matriz extracelular (3) entre las fibras, y los depósitos se encontró restos celulares (4). Además de éstos cambios se observó en la periferia de los depósitos la separación entre las fibras de amiloide (5) así como en las fibras de colágena.

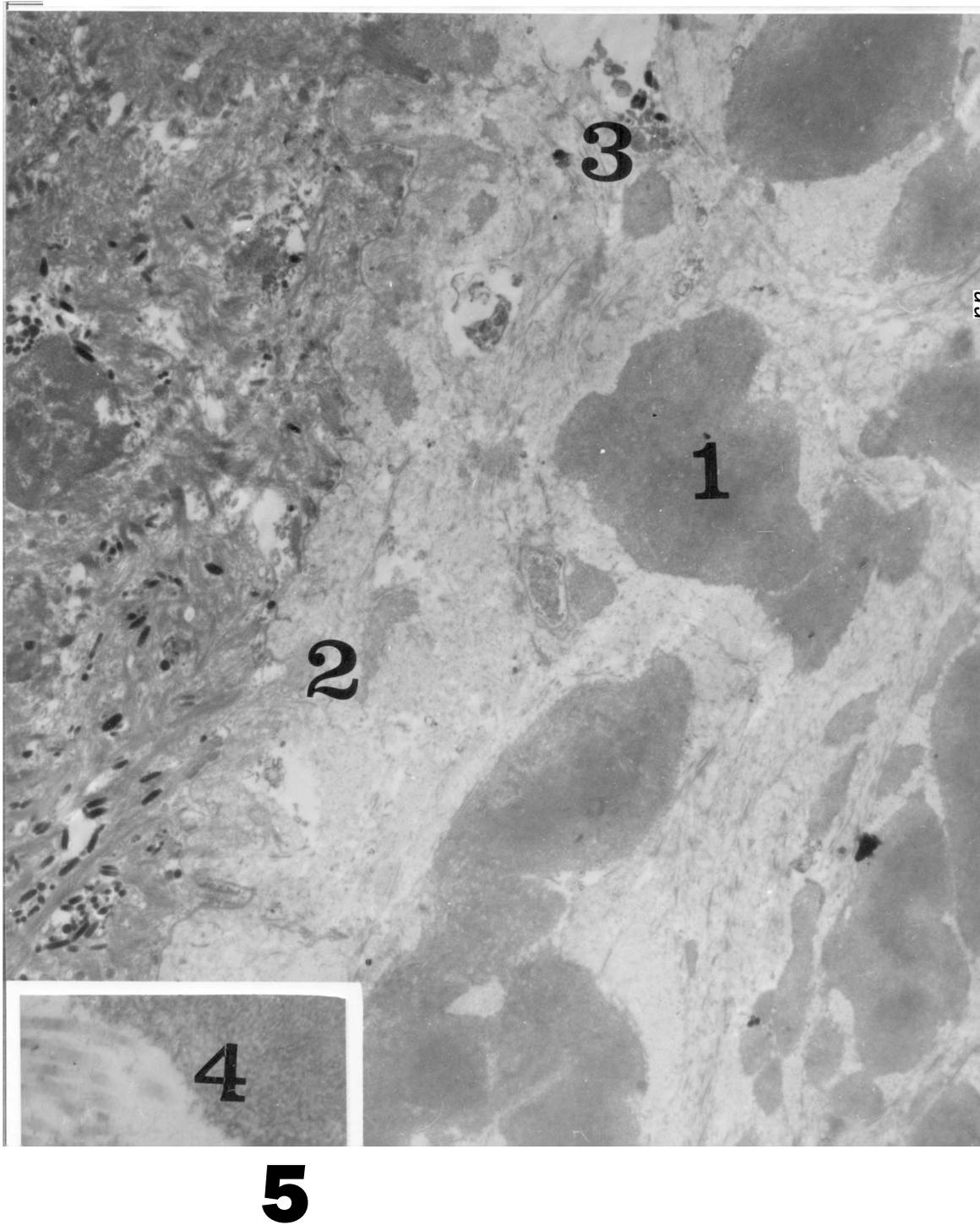


Lámina 11.-Micrografías electrónicas de transmisión de la piel con amiloide incubada 24hrs. sin DMSO 1)depósitos de amiloide, 2)fibras de colágena, 3)restos celulares 1,800x. Recuadro: 4)fibras de amiloide, 5)material interfibrilar 20,000x.

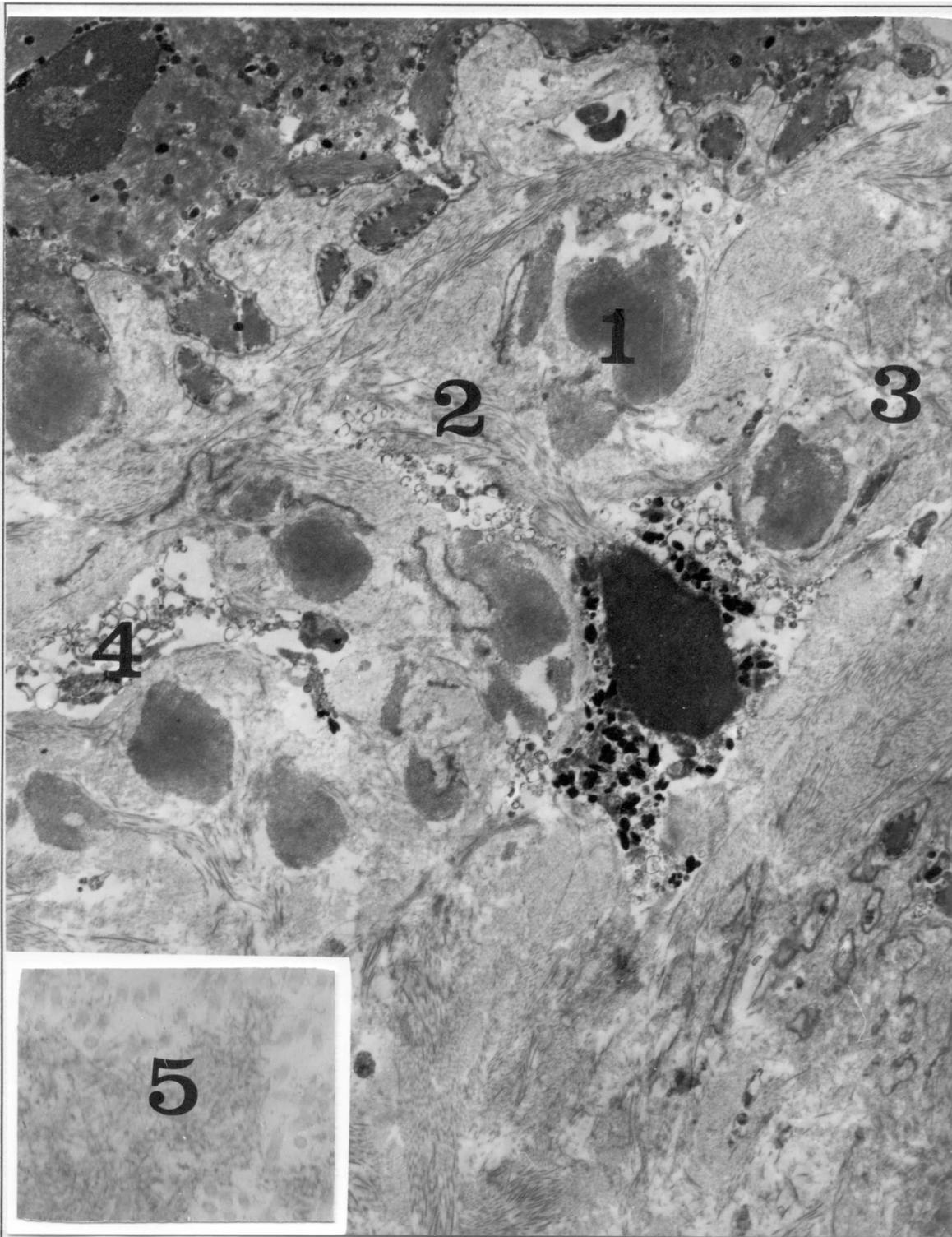


Lámina 12.-Micrografías electrónicas de transmisión de la piel con amiloide incubada 24hrs. con DMSO 5% 1)depósitos de amiloide, 2)fibras de colágena y elásticas, 3) espacios en la matriz, 4)restos celulares 1,800x. Recuadro: 5) observamos la separación de las fibras amiloide en la perifería del depósito y fibras de colágena. 20,000x.

En los explantes incubados sin DMSO (Lámina 13) se observó que los depósitos de amiloide no presentaron pérdida del arreglo fibrilar característico y mostraron uniformidad en la compactación, y la regularidad en el empaquetamiento de las fibras de amiloide en el depósito. Se encontró que el material interfibrilar (1) presentó estrecha asociación con las fibras de amiloide (2), el cual no se modificó en relación al tiempo de incubación. Figura A a las 72hrs. de incubado sin DMSO. Figura B a las 120 hrs. de incubado sin DMSO.

En comparación con las micrografías electrónicas a 20,000x en los explantes incubados con DMSO (Lámina 14) donde se observó que los depósitos presentaron separación entre las fibras de amiloide (1), esta dispersión hace evidente la modificación del material que une a las fibras (2). La separación entre ellas fue más notoria en la periferia del depósito, se mostro pérdida de la compactación general. Esta modificación fue progresiva en relación al tiempo de incubación y a la dosis utilizada. .Se encontró separación franca a las 72hrs. en la Figura A, y el máximo efecto de separación entre las fibras de amiloide se observó a las 120hrs. de incubación con una concentración de 5% de DMSO Figura B.

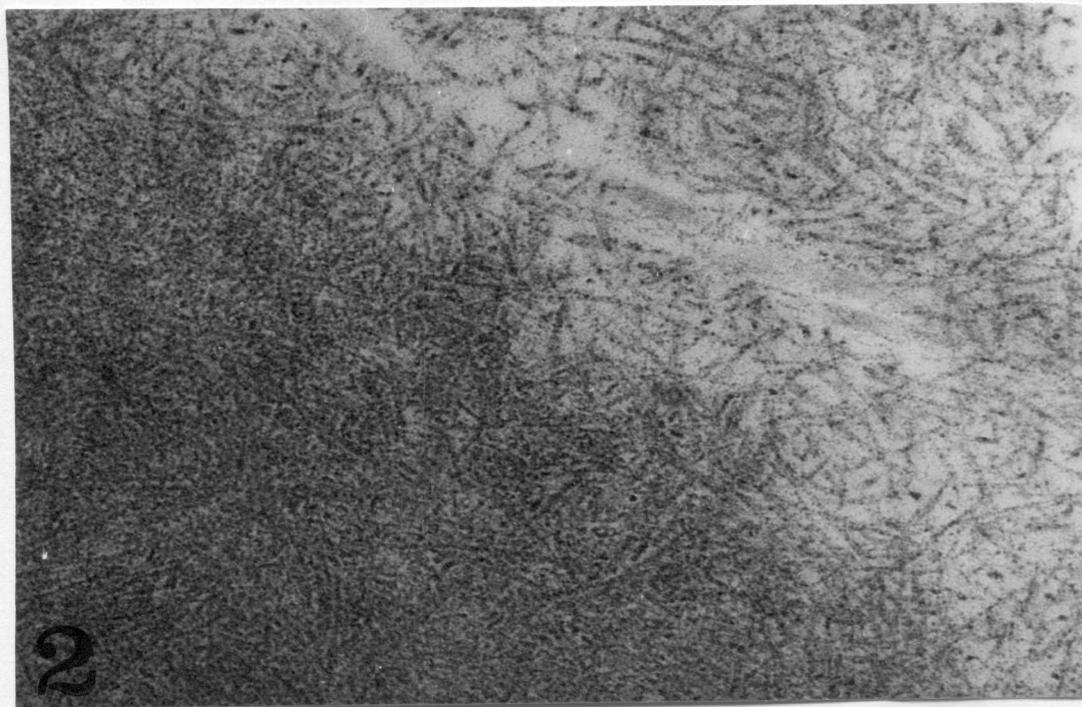
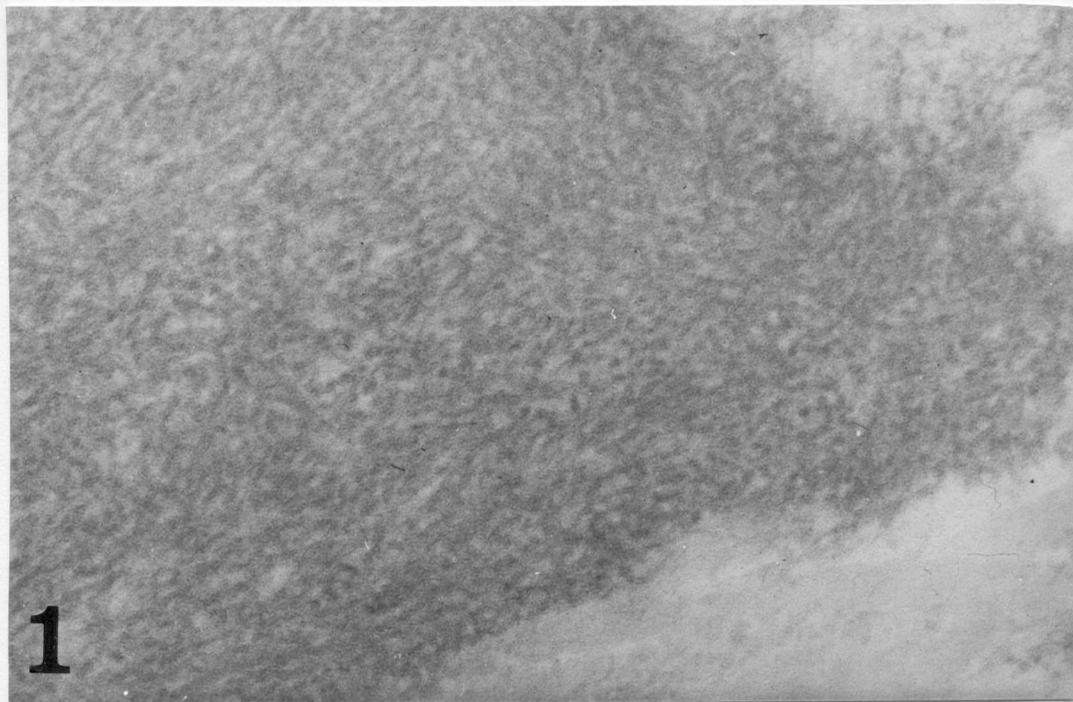
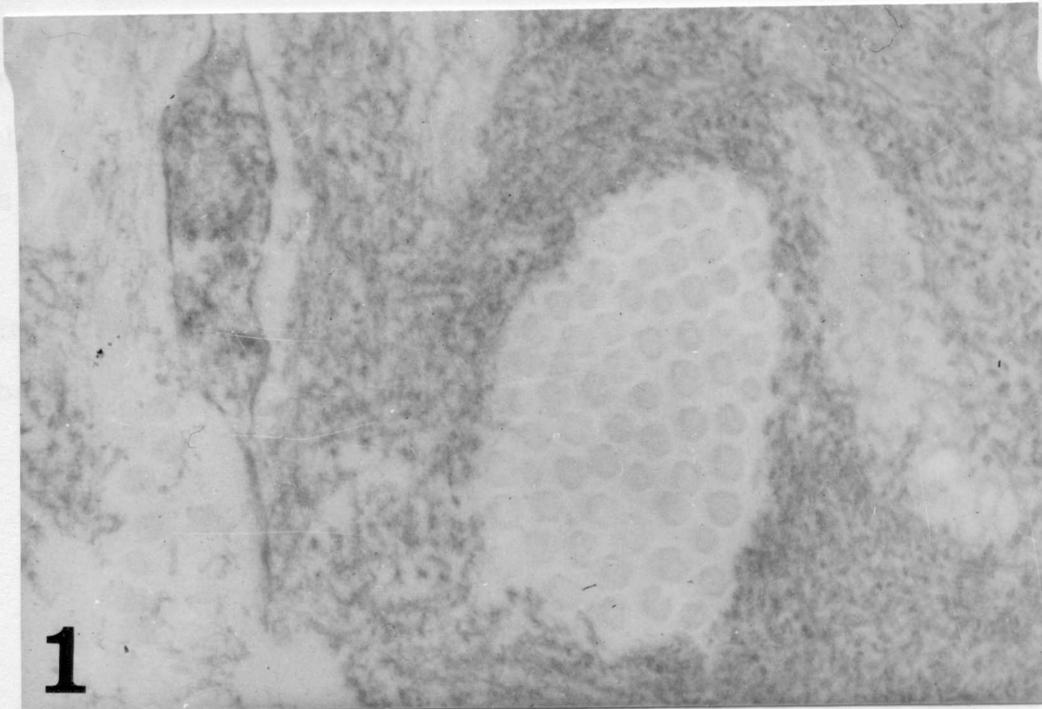
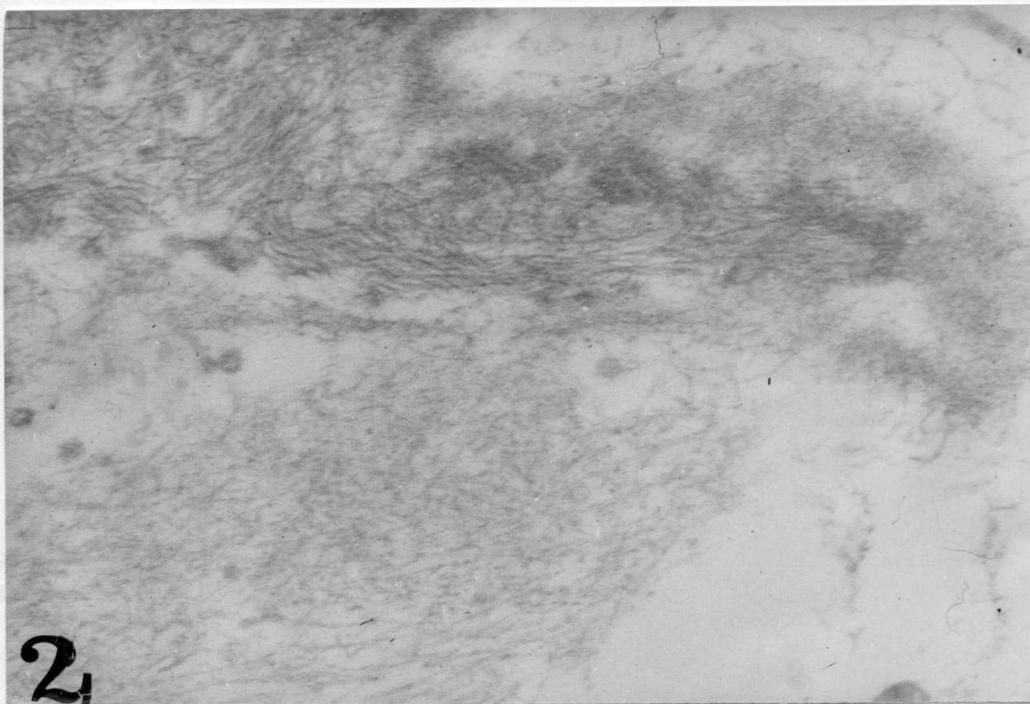


Lámina 13.-Micrograffas electrónicas de transmisión de los depósitos de amiloide de piel cultivada sin DMSO 1) material interfibrilar, 2) fibras de amiloide. Figura 1)72hrs. Figura 2)120hrs. 20,000x.



1



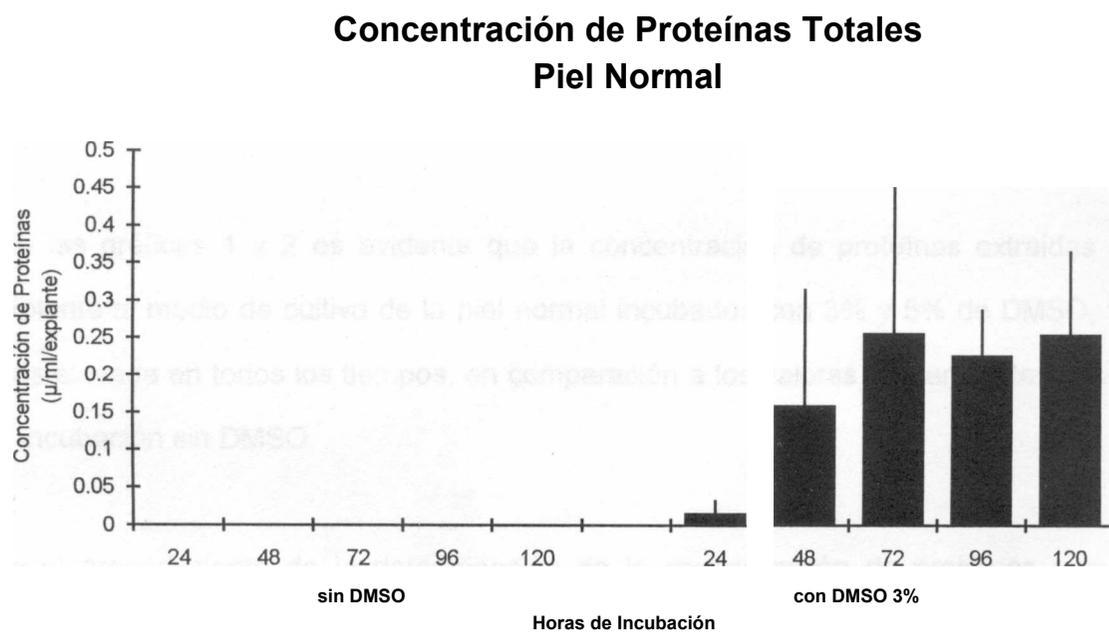
2

Lámina 14.-Micrografías electrónicas de transmisión a de los depósitos de amiloide de piel cultivada con DMSO al 5% 1) fibras de amiloide, 2) material interfibrilar, Figura 1) 72hrs. Figura 2) 120 hrs. 20,000x.

e).- Determinación de proteínas totales.

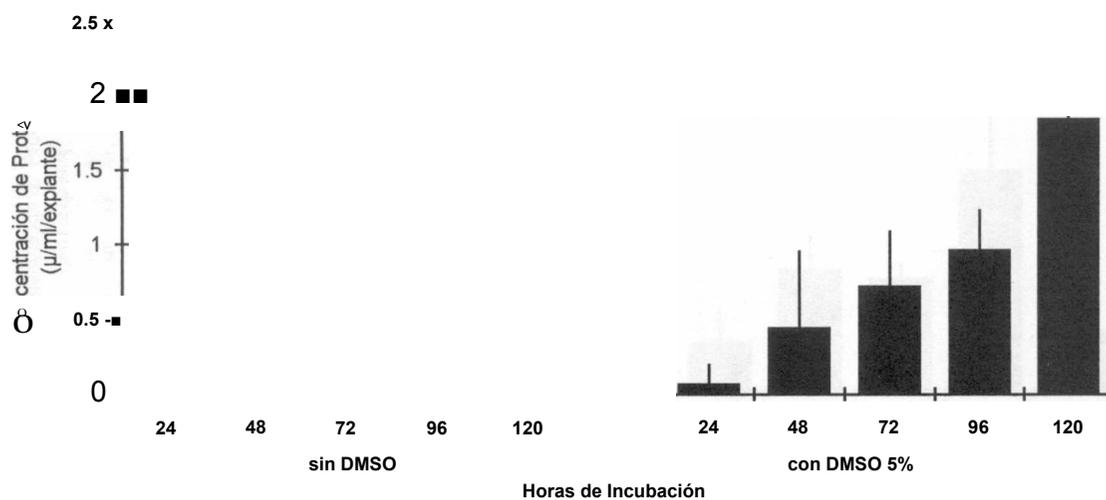
Al medio nutriente en donde se cultivaron los explantes en las distintas modalidades se les determinó la concentración de proteínas totales por el método de Bradford.

En la gráfica 1 y 2 se muestra la concentración promedio de proteínas totales, liberadas al medio por los explantes de piel normal.



Gráfica 1.- Concentración de proteínas totales en el medio de cultivo de piel normal después de 24, 48, 72, 96 y 120 hrs. de incubación sin y con DMSO 3%, barras de error de ± 1 D.E.

Concentración de Proteínas Totales Piel Normal



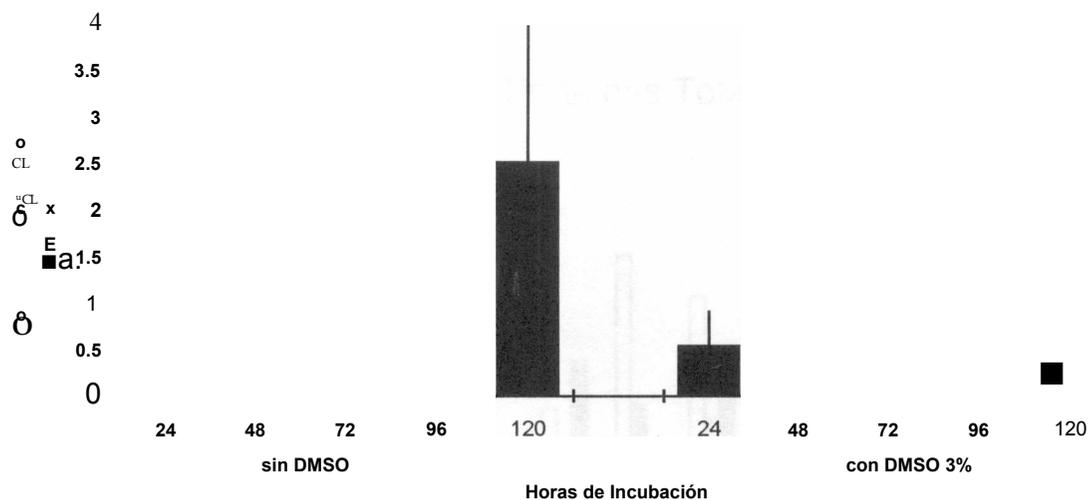
Gráfica 2.- Concentración de proteínas totales en el medio de cultivo de la piel normal después de 24, 48, 72, 96 y 120 hrs.de incubación, sin y con DMSO al 5% barras de error de ± 1 D.E.

En las gráficas 1 y 2 es evidente que la concentración de proteínas extraídas del explante al medio de cultivo de la piel normal incubados con 3% y 5% de DMSO, fue más elevada en todos los tiempos, en comparación a los valores de cero obtenidos en la incubación sin DMSO.

En el procedimiento de la determinación de la concentración de proteínas que se efectuó para los explantes la piel con amiloidosis incubada sin y con DMSO.

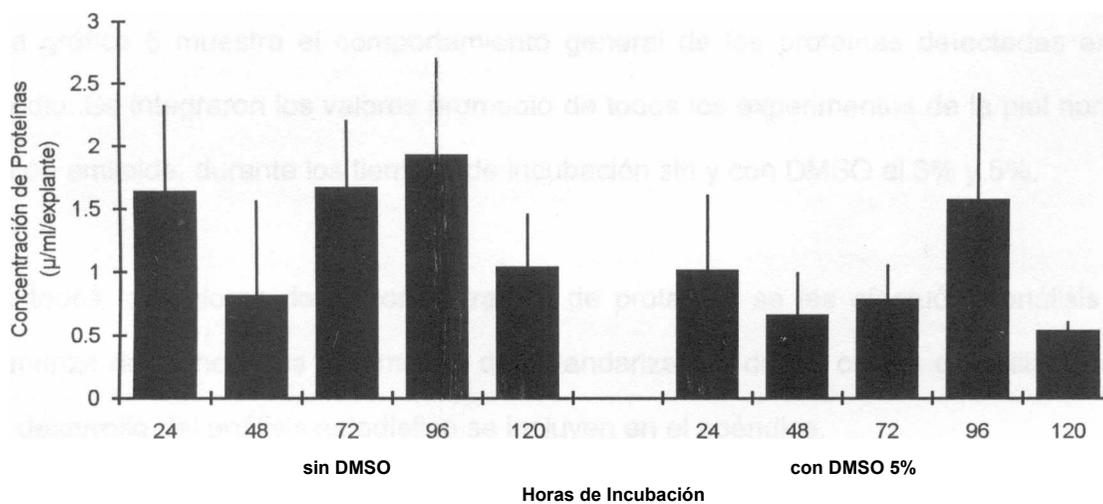
En la gráfica 3 se muestran los valores promedios de la concentración de proteínas totales en la piel con amiloide incubada sin y con DMSO al 3%.

Concentración de Proteínas Piel con Amiloide



Gráfica 3.- Concentración promedio de proteínas totales en el medio de cultivo de piel con amiloidosis después de 24, 48, 72, 96 y 120hrs. incubación sin y con DMSO al 3% barras de error ± 1 D.E.

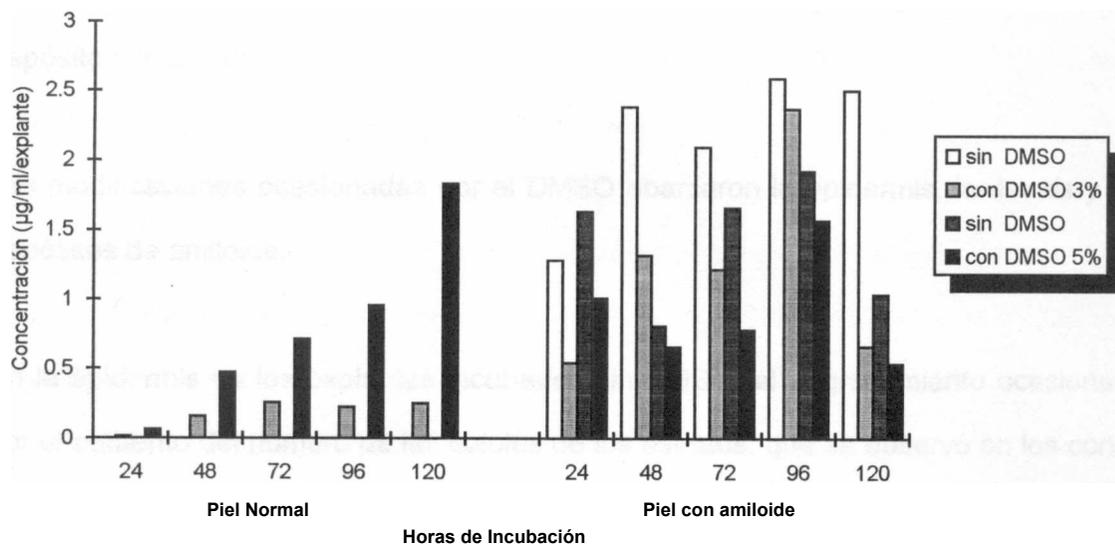
Concentración de Proteínas Totales Piel con Amiloide



Gráfica 4.- Concentración promedio de las proteínas totales en el medio de cultivo de la piel con amiloidosis incubada sin y con 5% de DMSO, barras de error de ± 1 D.E.

En la gráfica 4 se ilustran los valores promedio de la concentración de proteínas en el medio de cultivo de la piel con amiloidosis incubada sin y con DMSO al 5%.

Concentración de Proteínas Totales



Gráfica 5.- Concentración promedio de las proteínas totales tanto de piel normal y piel con amiloide después de 24, 48, 72, 96 y 120 hrs. de incubación sin y con DMSO al 3% y 5%.

La gráfica 5 muestra el comportamiento general de las proteínas detectadas en el medio. Se integraron los valores promedio de todos los experimentos de la piel normal y con amiloide, durante los tiempos de incubación sin y con DMSO al 3% y 5%.

A todos los valores de la concentración de proteínas se les efectuó el análisis de varianza de Fisher. Los parámetros de estandarización de las curvas de calibración y el desarrollo del análisis estadístico se incluyen en el apéndice.

DISCUSION.

Los resultados obtenidos con el modelo experimental propuesto, confirman la hipótesis de que el DMSO induce cambios morfológicos y bioquímicos sobre los depósitos de amiloide.

Las modificaciones ocasionadas por el DMSO abarcaron la epidermis, la dermis y los depósitos de amiloide.

En la epidermis de los explantes incubados sin DMSO, el engrosamiento ocasionado por el aumento del número de las células de los estratos, que se observó en los cortes semifinos y el patrón de heterocromatina encontrados en la ultraestructura, sugieren la proliferación de los queratinocitos basales, aunque solo se observaron mitosis ocasionales. Tanto la proliferación como la conservación de las características morfológicas del resto de la epidermis en el cultivo de órgano, coinciden con los reportes de Russo y col. (95).

Por el contrario, los explantes incubados con DMSO no presentaron el engrosamiento de la epidermis en los cortes semifinos, lo que coincide con los hallazgos de Berlinge y Ruhmann (96) quienes reportan el efecto del DMSO en la inhibición de la proliferación celular y el mantenimiento del estado diferenciado de la células. En la ultraestructura se encontró un patrón de eucromatina en los queratinocitos basales y en algunas células de la dermis , posiblemente ocasionado por acción del DMSO.

1020091078

En los explantes incubados con DMSO la dermis de la piel normal presentó alteración en el empaquetamiento de las fibras de colágena. En la piel con amiloidosis, además de los cambios en el patrón de la colágena, se encontró la modificación de los depósitos de amiloide.

Los cambios en la morfología general de los explantes incubados con DMSO fueron consistentes para la piel normal y con amiloidosis.

La decisión de no suplementar el medio nutriente para evitar la interferencia en la determinación de las proteínas nos permite asegurar que, las modificaciones morfológicas observadas en los explantes, incubados sin DMSO no fueron ocasionados por suplementos del medio de incubación.

En los depósitos de amiloide encontramos los hallazgos más interesantes de la modificación morfológica, ocasionados por el DMSO, que consistieron en la separación del componente fibrilar del amiloide lo cual coincide con lo reportado por Lin y Chu (97). Posiblemente, este efecto se debe a la remoción o modificación del material cementante interfibrilar responsable de la compactación general de los depósitos de amiloide.

Henderson (98) documentó ampliamente el efecto desnaturalizante del DMSO sobre algunas proteínas, entre las que se incluye la colágena. En concentraciones mayores al 3% y a temperatura superior a 36.5°C, esta substancia actúa sobre las interacciones hidrófobas de las proteínas, lo que explicaría la modificación en el empaquetamiento de las fibras de colágena que observamos en la piel normal.

En este contexto consideramos que el DMSO posiblemente actuó alterando la ultraestructura de los depósitos de amiloide, por la modificación en la estructura terciaria y cuaternaria de algunas proteínas del complejo amiloideo. Probablemente esto permitió el acceso a las proteasas tisulares para una remoción proteolítica. Otra posibilidad es que, al modificarse los componentes protéicos de los depósitos, éstos componentes quedarían localizados en la vecindad de los depósitos en la matriz extracelular, donde estarían expuestos a la acción proteolítica directa.

Por su efecto desnaturizante, se hipotetiza que el DMSO participa ocasionando la extracción de algunos de los componentes moleculares del complejo amiloideo. Proponemos que la sustancia P, que es una glucoproteína normalmente localizada en la vaina microfibrilar periférica de las fibras elásticas y, que participa en los fenómenos de adhesión interfibrilar, podría corresponder al elemento cementante en los depósitos de amiloide, removido por efecto del DMSO. Esto explicaría la modificación de la morfología en los depósitos del amiloide en nuestros resultados.

La concentración de proteínas de la piel normal incubada con DMSO, al ser analizada con la prueba de la varianza de Fisher, demostró que los valores crecientes encontrados en relación al tiempo de incubación son debidos al efecto desnaturizante del DMSO, en comparación a los valores de cero encontrados en el medio sin DMSO.

Por la consistencia en los cambios en la ultraestructura por efecto del DMSO, en los explantes cultivados, esperábamos que las concentraciones de proteínas de la piel con

amiloidosis sin y con DIVISO, presentara un comportamiento similar y que fueran mayores a las encontradas en la piel normal sin y con DMSO.

Encontramos que las concentraciones de proteínas de la piel con amiloide efectivamente fueron mayores que en la piel normal. Sin embargo la piel con amiloide incubada con DMSO presentó un comportamiento que no esperábamos, ya que los valores de las proteínas fueron menores.

Esto motivó la revisión exhaustiva y meticulosa de la metodología, para comprobar que los resultados no eran productos de errores en el procesamiento de las muestras, y la reproducibilidad de las 24 curvas de calibración nos permitió asegurar que no existieron fallas técnicas.

La concentración de las proteínas de la piel con amiloidosis incubada con DMSO fue muy variable de un tiempo de incubación a otro, por lo que es imposible compararlos. Con estos valores y con desviaciones estándar tan grandes, el análisis de varianza de Fisher reveló que es necesario aumentar el número de muestra para obtener resultados que sean concluyentes.

La variabilidad de los resultados puede ser ocasionada por la distribución de los depósitos de amiloide, ya que no se presentan de manera uniforme en todas las papilas de la dermis, así como a la variación en las dimensiones de los depósitos en un mismo paciente y de un paciente a otro. Este patrón de distribución es un factor que no podemos controlar ya que es inherente a la amiloidosis y es una variable que debemos



tomar en cuenta para analizar nuestros resultados, aún si se aumenta el número de muestras.

Podemos especular que los valores de las concentraciones de proteínas extraídas de la piel con amiloidosis cultivadas sin DMSO, corresponden a componentes de la matriz extracelular dañada por la presencia de los depósitos de amiloide, así como algunos de los componentes del amiloide que podrían difundir al medio de incubación por sí solos, sin efecto del DMSO, lo que explicaría los valores mayores de proteínas que encontramos con DMSO, en donde su efecto desnaturalizante y solubilizador posiblemente actuó sobre las proteínas de la matriz extracelular y sobre alguno de los elementos del complejo amiloideo, ocasionando modificaciones en su estructura terciaria y cuaternaria facilitando el acceso a las proteasas tisulares para degradarlas.

Esta modificación posiblemente impida que sean detectadas como un valor extra en el medio de cultivo por el método de Bradford y por ésto los valores son menores, ya que como requisito del método para detectar las proteínas debe estar conservada cierto grado de su estructura original.

La confirmación de estas especulaciones requerirá de investigaciones futuras.

Si bien no podemos concluir estadísticamente que valores de proteínas de la piel con amiloidosis sean ocasionados por efecto del DMSO, es indiscutible que están sucediendo cambios bioquímicos que es necesario caracterizar, y que son los responsables de los cambios morfológicos observados.

tomar en cuenta para analizar nuestros resultados, aún si se aumenta el número de muestras.

Podemos especular que los valores de las concentraciones de proteínas extraídas de la piel con amiloidosis cultivadas sin DMSO, corresponden a componentes de la matriz extracelular dañada por la presencia de los depósitos de amiloide, así como algunos de los componentes del amiloide que podrían difundir al medio de incubación por sí solos, sin efecto del DMSO, lo que explicaría los valores mayores de proteínas que encontramos con DMSO, en donde su efecto desnaturalizante y solubilizador posiblemente actuó sobre las proteínas de la matriz extracelular y sobre alguno de los elementos del complejo amiloideo, ocasionando modificaciones en su estructura terciaria y cuaternaria facilitando el acceso a las proteasas tisulares para degradarlas.

Esta modificación posiblemente impida que sean detectadas como un valor extra en el medio de cultivo por el método de Bradford y por ésto los valores son menores, ya que como requisito del método para detectar las proteínas debe estar conservada cierto grado de su estructura original.

La confirmación de estas especulaciones requerirá de investigaciones futuras.

Si bien no podemos concluir estadísticamente que valores de proteínas de la piel con amiloidosis sean ocasionados por efecto del DMSO, es indiscutible que están sucediendo cambios bioquímicos que es necesario caracterizar, y que son los responsables de los cambios morfológicos observados.

El objetivo central de este trabajo fue demostrar el efecto del DMSO sobre los depósitos de amiloide a nivel ultraestructural y correlacionarlos con los cambios bioquímicos en un sistema de cultivo de órgano.

Es importante señalar que éste es el primer estudio en que se intentó correlacionar los hallazgos bioquímicos con los morfológicos, a la fecha y una aportación técnica del trabajo fue, que se demostró la utilidad de la impregnación con Metenamina de Plata para la contrastación entre los depósitos de amiloide de la colágena, en cortes incluidos en resinas.

Concluimos que, indiscutiblemente el DMSO ocasiona cambios ultraestructurales en los depósitos de amiloide, aunque los resultados de la concentración de proteínas no sean concluyentes para correlacionar ambos aspectos.

En pacientes con amiloidosis cutánea tratados con DMSO tópico, éstos cambios morfológicos que encontramos en la ultraestructura del amiloide podrían explicar la mejoría clínica que presentan los pacientes que se aplican DMSO.

El objetivo central de este trabajo fue demostrar el efecto del DMSO sobre los depósitos de amiloide a nivel ultraestructural y correlacionarlos con los cambios bioquímicos en un sistema de cultivo de órgano.

Es importante señalar que éste es el primer estudio en que se intentó correlacionar los hallazgos bioquímicos con los morfológicos, a la fecha y una aportación técnica del trabajo fue, que se demostró la utilidad de la impregnación con Metenamina de Plata para la contrastación entre los depósitos de amiloide de la colágena, en cortes incluidos en resinas.

Concluimos que, indiscutiblemente el DMSO ocasiona cambios ultraestructurales en los depósitos de amiloide, aunque los resultados de la concentración de proteínas no sean concluyentes para correlacionar ambos aspectos.

En pacientes con amiloidosis cutánea tratados con DMSO tópico, éstos cambios morfológicos que encontramos en la ultraestructura del amiloide podrían explicar la mejoría clínica que presentan los pacientes que se aplican DMSO.

PERSPECTIVAS

Utilizando esta metodología con algunas modificaciones podemos efectuar, con la implementación de métodos bioquímicos, la caracterización de las proteínas liberadas al medio de cultivo. Por medio de la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) combinado con la técnica de Inmunoblot será posible identificar los componentes proteicos del amiloide. La posible participación de proteasas tisulares en la degradación del depósito amiloide, a través de su acción proteolítica sobre algunos componentes amiloideos ó proteínas adyacentes, podrá ser determinado agregando inhibidores específicos de proteasas en el medio de cultivo.

Para correlacionar los resultados bioquímicos obtenidos con los cambios en la ultraestructura de los explantes se identificará él o los componentes del amiloide en la piel de pacientes con amiloidosis cultivada sin y con DMSO, los cuales están siendo removidos o modificados por acción del DMSO. La identificación de estos componentes del amiloide se realizará por medio de técnicas de Inmunoelectromicroscopía.

RESUMEN

El presente trabajo tiene como finalidad el reproducir los hallazgos encontrados en los pacientes con amiloidosis cutánea utilizando un modelo "in vitro". Se utilizaron biopsias de 10 pacientes con amiloidosis cutánea cultivada con 3% y 5% de DMSO.

Los explantes fueron incubados hasta por 120 hrs. a 37°C en una mezcla de aire CO₂ al 5%, fueron cultivados sin y con DMSO, se colectaron cada 24 hrs. Se tomaron de las biopsias de piel fragmentos sin incubar que fueron usados como tiempo cero. Se fijaron en glutaraldehído y se procesaron hasta su inclusión en resinas epóxicas. Se les practicó la coloración de Azul de Toluidina y la técnica de Metenamina de Plata para contrastar el amiloide de la colágena. Se obtuvieron cortes finos y se observaron en un microscopio electrónico Zeiss EM-109. El medio de cultivo se congeló y se le practicó determinación de proteínas totales por el método de Bradford.

En todas las muestras tratadas encontramos cambios en la ultraestructura en los depósitos, principalmente la dispersión de las fibras de los depósitos de amiloide. y dispersión de las fibras de colágena. Estos cambios se han relacionado con un posible efecto solubilizador del DMSO sobre algunos componentes moleculares del amiloide que posiblemente sean extraídos y modificados por las proteasas tisulares, para la posterior degradación de los depósitos de amiloide .

En la determinación de proteínas en el medio por el método de Bradford encontramos que son más altas las concentraciones de proteínas sin DMSO, que en las muestras

con DMSO. El análisis estadístico de la varianza de Fisher demostró que entre los grupos existía una diferencia estadísticamente significativa por lo que los valores entre los grupos no son comparables y de aquí la necesidad de aumentar el número de la muestra para definir el comportamiento de la extracción de las proteínas, por efecto del DMSO. Por esto, los resultados no son concluyentes para efectuar una correlación morfológica y bioquímica.

BIBLIOGRAFIA

1. -Robbins SL, Cotran RS. Amiloidosis en :Patología Estructural y Funcional 2ed. México D.F. Interamericana, 1984:333-349.
2. -Kyle RA, Bayard ED. Amvloidosis:Review of 236 cases. Med.1975;54:271-291.
3. -Coehn AS. Amyloidosis. N Eng J Med.1967;277:522-529.
4. -Bancroff JD, Stevens A. Amyloidosis.Theroy and Practice Histological Techniques. Churchill Livingston 2ed. Edinburgh London Melbourne and New York .1982:155-180.
5. -Breatnach SM. Amvloid and Amiloidosis. J Am Acad Dermatol. 1988;18:1-16.
6. -Sepp N, Pichler E, Breathnach P, Fritsch H, Hinter A. Amvloid Elastosis:Analysis of the role of Amvloid P Component. J Am Acd Dermatol. 1990;22:27-34.
7. -Hinter H, Breathanach SM. Pie Amyloid-P-Komponente in normal und lasionaer mesnschlicher Haut. Hautarzt.1988;39:712-716.
8. -Breatnach SM, Booker J, Asnwozth J. Amiloid P component is non-covalently associated with elastic tissue microfibrils.in normal dermis. J Invest Dermatol. 1989;92:53-58.

BIBLIOGRAFIA

1. -Robbins SL, Cotran RS. Amiloidosis en Patología Estructural y Funcional 2ed. México D.F. Interamericana, 1984:333-349.
2. -Kyle RA, Bayard ED. Amvloidosis:Review of 236 cases. Med.1975;54:271-291.
3. -Coehn AS. Amyloidosis. N Eng J Med.1967;277:522-529.
4. -Bancroff JD, Stevens A. Amyloidosis.Theroy and Practice Histological Techniques. Churchill Livingston 2ed. Edinburgh London Melbourne and New York .1982:155-180.
5. -Breatnach SM. Amvloid and Amiloidosis. J Am Acad Dermatol.1988;18:1-16.
6. -Sepp N, Pichler E, Breathnach P, Fritsch H, Hinter A. Amvloid Elastosis:Analysis of the role of Amvloid P Component. J Am Acd Dermatol. 1990;22:27-34.
7. -Hinter H, Breathanach SM. Pie Amyloid-P-Komponente in normal und lasionaer mesnschlicher Haut. Hautarzt. 1988;39:712-716.
8. -Breatnach SM, Booker J, Asnwozth J. Amiloid P component is non-covalently associated with elastic tissue microfibrils.in normal dermis. J Invest Dermatol. 1989;92:53-58.

- 9.-Makoto Y, Yoneda K, Morí S. Elastic Fiber and Cutaneous Amyloidoses. Clin Dermatol. 1990; 10:66-71.
- 10,-Salter I. Lichen Amvloidosis and the Nature Amyloid. Br J Dermatol.1968;98:331-335.
- 11 .-Breathnach SM. Amyloid and Amvloidosis. J Am Acad Dermatol.1988;18:1-16.
- 12, - Boxbanum J. Amvloidosis of the AL type. Am J Med.1967;67:867-877.
- 13, -Breatnach SM, Black M. Sistemic Amvloidosis and the Skin :a review special emphasis in clinical features and therapy. J Am Acad Dermatol. 1979;4:517-536.
- 14, -Wynngaarden JB, Smith LI. Cecil Tratado de Medicina Interna: Enfermedades Sistémicas de Etiología Desconocida. Enfermedades Amiloideas 16ed. Madrid. Interamericana. 1985:1990-1996.
- 15, -Ito K, Hashimoto K. Antikeratin antibodies in amvloidosis and macular amvloidosis. Arch Dermatol. 1984;281:377-382.
- 16, -Ito K, Hashimoto K, Kambe N. Role of Inmunoglobulins in amvloidogenesis in cutaneous nodular amvloidosis. J Inves Dermatol. 1987;89:415-428.

- 9.-Makoto Y, Yoneda K, Mori S. Elastic Fiber and Cutaneous Amyloidoses. Clin Dermatol. 1990; 10:66-71.
- 10,-Salter I. Lichen Amyloidosis and the Nature Amyloid. Br J Dermatol.1968;98:331-335.
- 11 ,-Breathnach SM. Amyloid and Amyloidosis. J Am Acad Dermatol.1988;18:1-16.
12. - Boxbanum J. Amyloidosis of the AL type. Am J Med. 1967;67:867-877.
13. -Breathnach SM, Black M. Sistemic Amyloidosis and the Skin :a review special emphasis in clinical features and therapy. J Am Acad Dermatol. 1979;4:517-536.
14. -Wyngaarden JB, Smith LI. Cecil Tratado de Medicina Interna: Enfermedades Sistémicas de Etiología Desconocida. Enfermedades Amiloideas 16ed. Madrid. Interamericana. 1985:1990-1996.
15. -Ito K, Hashimoto K. Antikeratin antibodies in amyloidosis and macular amyloidosis. Arch Dermatol. 1984;281:377-382.
16. -Ito K, Hashimoto K, Kambe N. Role of Immunoglobulins in amyloidogenesis in cutaneous nodular amyloidosis. J Inves Dermatol. 1987;89:415-428.

17. - MacDonald D, Black M, Ramnarin N. Immunofluorescence studies in primary localized cutaneous amyloidosis. Br J Dermatol. 1977;96:635-640.
18. -Danno K, Imamura S. Deposit of component C19 in primary localized cutaneous amyloidosis. Br J Dermatol. 1982; 106:129-133.
19. -Sudo S. Amyloidosis. Acta Derm Venereol (stockh). 1981;62:16-19.
20. -Danno K, Horio T. Deposit of component C9 in primary localized cutaneous amyloidosis. Br J Dermatol. 1975; 106:129-133.
21. -Glenner GG. Amyloid deposit and amyloidosis. N Eng J Med. 1980;23:1233-1243.
22. - Malak A, Smith EW. Secondary localized cutaneous amyloidosis. Arch Dermatol. 1962;86:125-137.
23. -Wong Ch K. Cutaneous Amyloidoses. Clin Dermatol. 1990;2:1-5.
24. -Hasimoto K. Lichen Amyloidosis. J Invest Dermatol 1965;45:204-218.
25. -Black MG, Jones W. Macular Amyloidosis. Br J Dermatol. 1971 ;84:199-208.
26. -Wolf MM. Macular Amyloidosis. Arch Dermatol. 1967;29:373-374.

17. - MacDonald D, Black M, Ramnarin N. Immunofluorescence studies in primary localized cutaneous amyloidosis. Br J Dermatol. 1977;96:635-640.
18. -Danno K, Imamura S. Deposit of component C19 in primary localized cutaneous amyloidosis. Br J Dermatol. 1982; 106:129-133.
19. -Sudo S. Amyloidosis. Acta Derm Venereol (stockh).1981;62:16-19.
20. -Danno K, Horio T. Deposit of component C9 in primary localized cutaneous amyloidosis. Br J Dermatol. 1975; 106:129-133.
21. -Glenner GG. Amyloid deposit and amyloidosis. N Eng J Med. 1980;23:1233-1243.
22. - Malak A, Smith EW. Secondary localized cutaneous amyloidosis. Arch Dermatol.1962;86:125-137.
23. -Wong Ch K. Cutaneous Amyloidoses. Clin Dermatol.1990;2:1-5.
- 24.-Hasimoto K. Lichen Amyloidosis. J Invest Dermatol 1965;45:204-218.
25. -Black MG, Jones W. Macular Amyloidosis. BrJ Dermatol.1971;84:199-208.
26. -Wolf MM. Macular Amyloidosis. Arch Dermatol. 1967;29:373-374.

- 27.-Brownstein MH, Helig EB. Amyloidosis: link between macular and lichenoid forms.
Br J Dermatol. 1972;88:25-29.
- 28, -Ishihara T. Amyloid fibril formation in the rough endoplasmic reticulum of plasmatic cell from a patient with localized AL Amyloidosis. Lab Inves. 1991 ;64;2:265-270.
- 29, -Takahashi M. Ultrastructural evidence for intracellular formation of amyloid fibrils in macrophages. Arch Virchows.1989;415:411-419.
- 30, -Runne VC, Orfanus E. Amyloid production by dermal fibroblast. Br J Dermatol. 1977;97:153-166.
- 31 .-Ishii M, Tearto Y, Asa Y. High Melanosome enzymic activity of cutaneous fibroblast in macular amyloidosis: An electron Microscopic study. J Cutan Pathol. 1981;8:421-428.
- 32.-Ishii M, Tearto Y, Asa Y. High melanosome enzymic activity of cutaneous fibroblast in macular amyloidosis: A microscopic study II. J Cutan Pathol. 1984; 11:476-484.
- 33 .-Danielsen L, Kobayasi M. A Ultrastructural study of cutaneous amyloidosis. Acta Dermatol Venereol (Stockh).1973;53:13-21.
- 34,-Kumakiri K, Hashimoto K. Histogenesis of primary localized cutaneous amyloidosis sequential changes of epidermal keratinocytes to amyloid filaments degenerated. J Invest Dermatol. 1979;73:150-162.

- 27.-Brownstein MH, Helig EB. Amyloidosis: link between macular and lichenoid forms.
Br J Dermatol. 1972;88:25-29.
- 28, -Ishihara T. Amyloid fibril formation in the rough endoplasmic reticulum of plasmatic cell from a patient with localized AL Amyloidosis. Lab Invest. 1991 ;64;2:265-270.
- 29, -Takahashi M. Ultrastructural evidence for intracellular formation of amyloid fibrils in macrophages. Arch Virchows.1989;415:411-419.
- 30, -Runne VC, Orfanus E. Amyloid production by dermal fibroblast. Br J Dermatol. 1977;97:153-166.
- 31 .-Ishii M, Tearto Y, Asa Y. High Melanosome enzymic activity of cutaneous fibroblast in macular amyloidosis: An electron Microscopic study. J Cutan Pathol.1981;8:421-428.
- 32.-Ishii M, Tearto Y, Asa Y. High melanosome enzymic activity of cutaneous fibroblast in macular amyloidosis: A microscopic study II. J Cutan Pathol. 1984; 11:476-484.
- 33 .-Danielsen L, Kobayasi M. A Ultrastructural study of cutaneous amyloidosis. Acta Dermatol Venereol (Stockh).1973;53:13-21.
- 34,-Kumakiri K, Hashimoto K. Histogenesis of primary localized cutaneous amyloidosis sequential changes of epidermal keratinocytes to amyloid filaments degenerated. J Invest Dermatol. 1979;73:150-162.

- 35, -Masu S, Sato A, Seiji M. Amvloid in localized cutaneus amvloidosis immunofluoresece studies with antikeratin antiserum especially concentring the diferece beetwen and localized cutaneus amvloidosis. Acta Derm Venereol(Stockh). 1981 ;61:381-389.
- 36, -Kumakiri M, Hashimoto K.Tsukinaga L. Presence of basal lamina-like substance with anchoring fibrils within the amvloid deposits of primarv localized. J Invest Dermatol. 1983;2:153-157.
- 37, -Wong CK ,Lin CS. Friction Melanosis. Int J Dermatol. 1988;27:302-307.
38. -Hashimoto K, Ito K, Kumakari I. Nylon Brush and Macular Amvloidosis. Arch Dermatol. 1987; 123:633-637.
39. -Black MM. The nature, pathogenesis and staining properties of amvloid. Br J Dermatol.1981;105:115-124.
40. -Pluchter H, Seweat F, Levine M. On the binding of Congo red by amvloid. J Histochem Cytochem. 1962; 10:355-356.
- 41, -Vassor P. Amvliod Medical Proqress. N Eng J Med. 1959; 18:522-529.
42. -Noren P, Westermak P, Cornwell GG. Inmunofluorescence and histochemical studies of localized cutaneus amvloidosis. Br J Dermatol. 1983; 108:277-285.

35. -Masu S, Sato A, Seiji M. Amyloid in localized cutaneous amyloidosis
immunofluorescence studies with antikeratin antiserum especially concentrating the
difference between and localized cutaneous amyloidosis. Acta Derm
Venereol(Stockh). 1981 ;61:381-389.
36. -Kumakiri M, Hashimoto K, Tsukinaga L. Presence of basal lamina-like substance with
anchoring fibrils within the amyloid deposits of primary localized. J Invest
Dermatol. 1983;2:153-157.
37. -Wong CK, Lin CS. Friction Melanosis. Int J Dermatol. 1988;27:302-307.
38. -Hashimoto K, Ito K, Kumakiri I. Nylon Brush and Macular Amyloidosis. Arch
Dermatol. 1987; 123:633-637.
39. -Black MM. The nature, pathogenesis and staining properties of amyloid. Br J
Dermatol. 1981;105:115-124.
40. -Pluchter H, Seweat F, Levine M. On the binding of Congo red by amyloid. J
Histochem Cytochem. 1962; 10:355-356.
41. -Vassor P. Amyloid Medical Progress. N Eng J Med. 1959; 18:522-529.
42. -Noren P, Westermak P, Cornwell GG. Immunofluorescence and histochemical
studies of localized cutaneous amyloidosis. Br J Dermatol. 1983; 108:277-285.

35. -Masu S, Sato A, Seiji M. Amyloid in localized cutaneous amyloidosis immunofluorescence studies with antikeratin antiserum especially concerning the difference between and localized cutaneous amyloidosis. Acta Derm Venereol(Stockh). 1981;61:381-389.
36. -Kumakiri M, Hashimoto K, Tsukinaga L. Presence of basal lamina-like substance with anchoring fibrils within the amyloid deposits of primary localized. J Invest Dermatol. 1983;2:153-157.
37. -Wong CK, Lin CS. Friction Melanosis. Int J Dermatol. 1988;27:302-307.
38. -Hashimoto K, Ito K, Kumakiri I. Nylon Brush and Macular Amyloidosis. Arch Dermatol. 1987; 123:633-637.
39. -Black MM. The nature, pathogenesis and staining properties of amyloid. Br J Dermatol. 1981; 105:115-124.
40. -Pluchter H, Seweat F, Levine M. On the binding of Congo red by amyloid. J Histochem Cytochem. 1962; 10:355-356.
41. -Vassor P. Amyloid Medical Progress. N Eng J Med. 1959; 18:522-529.
42. -Noren P, Westermak P, Comwell GG. Immunofluorescence and histochemical studies of localized cutaneous amyloidosis. Br J Dermatol. 1983; 108:277-285.

35. -Masu S, Sato A, Seiji M. Amyloid in localized cutaneous amyloidosis
immunofluorescence studies with antikeratin antiserum especially concentrating the
difference between and localized cutaneous amyloidosis. Acta Derm
Venereol(Stockh). 1981 ;61:381-389.
- 36, -Kumakiri M, Hashimoto K, Tsukinaga L. Presence of basal lamina-like substance with
anchoring fibrils within the amyloid deposits of primary localized. J Invest
Dermatol. 1983;2:153-157.
- 37, -Wong CK, Lin CS. Friction Melanosis. Int J Dermatol. 1988;27:302-307.
- 38, -Hashimoto K, Ito K, Kumakiri I. Nylon Brush and Macular Amyloidosis. Arch
Dermatol. 1987; 123:633-637.
- 39, -Black MM. The nature, pathogenesis and staining properties of amyloid. Br J
Dermatol. 1981;105:115-124.
- 40, -Pluchter H, Seweat F, Levine M. On the binding of Congo red by amyloid. J
Histochem Cytochem. 1962; 10:355-356.
- 41, -Vassor P. Amyloid Medical Progress. N Eng J Med. 1959; 18:522-529.
- 42, -Noren P, Westermak P, Cornwell GG. Immunofluorescence and histochemical
studies of localized cutaneous amyloidosis. Br J Dermatol. 1983; 108:277-285.

35. -Masu S, Sato A, Seiji M. Amvloid in localized cutaneus amvloidosis immunofluoresece studies with antikeratin antiserum especially concentring the diferece beetwen and localized cutaneus amvloidosis. Acta Derm Venereol(Stockh). 1981 ;61:381-389.
- 36, -Kumakiri M, Hashimoto K.Tsukinaga L. Presence of basal lamina-like substance with anchoring fibrils within the amvloid deposits of primarv localized. J Invest Dermatol. 1983;2:153-157.
- 37, -Wong CK ,Lin CS. Friction Melanosis. Int J Dermatol. 1988;27:302-307.
38. -Hashimoto K, Ito K, Kumakari I. Nylon Brush and Macular Amvloidosis. Arch Dermatol. 1987; 123:633-637.
39. -Black MM. The nature, pathogenesis and staining properties of amvloid. Br J Dermatol. 1981; 105:115-124.
- 40, -Pluchter H, Seweat F, Levine M. On the binding of Congo red by amvloid. J Histochem Cytochem. 1962; 10:355-356.
- 41, -Vassor P. Amvliod Medical Proqress. N Eng J Med. 1959; 18:522-529.
42. -Noren P, Westermak P, Cornwell GG. Inmunofluorescence and histochemical studies of localized cutaneus amvloidosis. Br J Dermatol. 1983; 108:277-285.

- 43,-Shirahama T, Skinner M,Sipee JD. High resolution electron microscopic analysis of the amyloid fibril. J Cell Biol.1967;33:679-705.
- 44, -Grayzen H, Jacobi M. Secondary Amyloidosis results of therapy with licuated whole liver powder. Ann Intern Med.1934;12:39-58.
- 45, -Kyle AG, Greipp R. Primary systemic amyloidosis comparison of melphalan and prednisone versus placebo. Blood.1987;52;4:818-827.
- 46, -Shirahama T, Cohen AS. Blockage of amyloid induced by colchicine in an animal model. J Exper Med.1974;140:1102-1107.
- 47, -Kisileusky R, Benson MD. Kinetic of Amyloid deposition. 1983;48:60-67.
- 48, -Scheinberg MA, Benditt M. DMSO and Colchicine therapy in amyloid disease. Ann Rheum Dis. 1984;43:421-423.
- 49, -Triger P,Joekes AM. Renal amyloidosis. a fourteen year follow-up. Q J Med. 1973;42:15-40.
- 50, -Wang WJ, Lin CS. Response of Systemic Amyloidosis to Dimethylsulfoxide. J Am Acad Dermatol. 1986; 15:402-405.
- 51 .-Jiménez A.H. Dimethyl Sulfoxide: a perspective in rheumatic diseases. J Lab Clin Med. 1982;25:489-500.

- 52, -VanRijswijk MH, Ruiner L, Donkaer AJ. Dimethyl Sulfoxide Treatment of AA Amyloidosis. Ann N Y Acad Sci. 1983;411:67-83.
- 53, -Breatnach MS. The cutaneous amyloidosis pathogenesis and therapy. Arch Dermatol. 1985;121:470-475.
- 54, -Helander I, Hopsu A, Hayu VK. Treatment of Lichen Amyloidosis by Etretinate. Br J Dermatol. 1986; 15:574-577.
- 55, -Ingber M. Effect of Etretinate on Lichen Amyloidosis. Br J Dermatol. 1987;87:123-128.
- 56, -Wong K, Li WM. Dermabrasion for Lichen Amyloidosis. Arch Dermatol. 1982; 118:302-303.
- 57, -Grattan CEH. Two cases of nodular cutaneous amyloid with positive organ specific antibodies treated by shave excision. Clin Exp Dermatol. 1988; 13:187-189.
- 58, -Breatnach S. Primary localized cutaneous amyloidosis. Br J Dermatol. 1982; 105:453-459.
- 59, -David NA. The Pharmacology of Dimethyl Sulfoxide. Ann Rev Pharm. 1972;12:353-375.

60,-Wood C. Pharmacological and Biochemical Considerations of Dymethyl Sulfoxide. Ann N Y Acad Sci. 1967:7-19.

61. - Jacob S. Dimethyl Sulfoxide: a New Concept in Pharma-Therapy. Curr Therap. 1964;6:134-135.

62. -Sample J.B, Bradnam. The vascular and dermal effects of DMSO. Ann N Y Acad Sci. 1964;3:205-230.

63. -Asent H. Dimetilsulfoxide a new concept in the treatment of ent diseases. Ann N Y Acad Sci. 1965;3:66-69.

64. -Goldman G. Investigative studies with DMSO in dermatology. Ann N Y Acad Sic. 1967:428-436.

65. -Sulzberger B. Some Effects of DMSO on Human Skin. Ann N Y Acad Sci. 1966;3:234-236.

66. -Klebe R. Enhancement of DMSO polyethvleneqlycol-mediated cell hybridization by inducers of ervthroleucemia cell difeferentiation somatic cell. Genetics.1982;8:6:723-730.

67. -Bahler WE, Lord M. Dimethyl Sulfoxide induces expression of H-2 on mouse lung carcinoma cell. J Inmunol.1984;4:2790-2799.

- 68, -Smith R. The single and repeated doses toxicity of DMSO. Ann N Y Acad Sci. 1965;3:1050-1053.
- 69, -Yellowlees P. Dimethyl Sulfoxide induces Toxicity. Lancet. 1980;29:1004-1006.
- 70, -Wong K.Ch. Cutaneous Amyloidosis Treatment. Clin Dermatol. 1990;2:108-111.
- 71, -Isobe T, Osserman EF. Treatment of experimental murine amyloidosis with dimethyl sulfoxide (DMSO) on Bence Jones proteins amyloid fibrils and casein-induced amyloidosis: In Wegelius O. Pasternack A ed. Amyloidosis. New York :Academic Press. 1976:402-406.
- 72, -Kedar (Keizman), Green I, Ravid M. Treatment of experimental murine amyloidosis with dimethyl sulfoxide. J Clin Invest.1977;7:149-152.
- 73, -Ravid M, Shapira J.Lang R. Prolonged dimethyl sulfoxide treatment in patients with systemic amyloidosis. Ann Rehum.Dis.1982;32:41-58.
- 74, -Kitamoto M. Amyloidosis review of 236 cases. Medicine.1985;54;4:271-291.
- 75, -Engel F. Indications and contraindications for the use of DMSO in clinical dermatology. Ann N Y Acad Sci. 1965;3:638-645.
- 76, -Bonnetblanc JM, Catazano G, Roux L .J Dimethyl Sulfoxide and Macular Amyloidosis. Acta Derm Venereol (Stockh). 1980;60:91-93.

- 77.- Ollague WL, Peña-Herrera SA. Amyloidosis Cutánea Primaria. IV Congreso Iberoamericano de Dermatología. Guayaquil Ecuador. Grafios Freud 1980:103-104.
- 78, -Pravata R. Unusual localizaron of lichen Amyloidosis. Acta Derm Venereol (Stockh). 1989;55:221 -226.
- 79, -Palomares M, Peñaloza A. Amiloidosis Cutánea Primaria. (memorias) IX Congreso Mexicano de Dermatología. México. D.F 1979:900-904.
- 80, -Wong CK. Cutaneous Amyloidoses. Int J Dermatol. 1987;5:273-277.
- 81, -Lim KB. Lack of effect of dimethyl sulphoxide (DMSO) on amyloid deposits. Br Jr Dermatol. 1988; 18:409-410.
- 82, -Monfrecola G, Iandoli R, Bruno G, Lichen Amyloidosis: a new therapeutic approach. Acta Derm Venereol (Stockh). 1985;65:453-455.
- 83, -Welsh O, Assad C. Amiloidosis Cutánea Primaria. VII Encuentro Regional de Investigación Biomédica (memorias). Monterrey N.L. México Facultad de Medicina UANL. Octubre 1989:42.

- 77.- Ollague WL, Peña-Herrera SA. Amyloidosis Cutánea Primaria. IV Congreso Iberoamericano de Dermatología. Guayaquil Ecuador. Grafics Freud 1980:103-104.
- 78, -Pravata R. Unusual localization of lichen Amyloidosis. Acta Derm Venereol (Stockh).1989;55:221-226.
- 79, -Palomares M, Peñaloza A. Amiloidosis Cutánea Primaria. (memorias) IX Congreso Mexicano de Dermatología. México. D.F 1979:900-904.
80. -Wong CK. Cutaneous Amyloidoses. Int J Dermatol. 1987;5:273-277.
81. -Lim KB. Lack of effect of dimethyl sulphoxide (DMSO) on amyloid deposits. Br Jr Dermatol. 1988; 18:409-410.
82. -Monfrecola G, Iandoli R, Bruno G, Lichen Amyloidosis: a new therapeutic approach. Acta Derm Venereol (Stockh). 1985;65:453-455.
- 83, -Welsh O, Assad C. Amiloidosis Cutánea Primaria. VII Encuentro Regional de Investigación Biomédica (memorias).Monterrey N.L. México Facultad de Medicina UANL. Octubre 1989:42.

- 84, -Moreno MG, Sepúlveda SJ. Efecto del Dimetilsulfóxido en la Amiloidosis Cutánea seguimiento histoquímico en biopsias de pacientes tratados. Seminario de Estudios Científico Educativo de Santiago Ramón y Cajal A.C. U.N.A.M. (memorias). México D.F. Octubre 1991:32.
85. -Moreno MG, Sepúlveda SJ. Efecto del Dimetilsulfóxido en la Amiloidosis Cútanea: Estudio Ultraestructural. XIV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Anatomía Pachuca, Hidalgo, México (memorias) Octubre 1992:23.
- 86, -Ladd MW. Specimen preparation and related laboratory in: The Electron Microscope Handbook. published by Ladd Research Industries Inc. USA. 1973:52-57.
87. -Sepúlveda S.J, Velázquez B, Quesada R, Nuñez A. "In vitro" organogénesis and differentiation of fetal lung rudiments grown in chamber slides. In vitro. 1986:22-27.
- 88, -Bancroft JD, Stevens A. Electron Microscopy II. In: Theory and practice of histological techniques. Edinburgh, London, Melbourne and New York. 2ed. Churchill Livingstone. 1982:482-486.
- 89, -DeMartino C, Zamboni L. Silver Methenamine Stain for Electron Microscopy, J Ultrastruc Res. 1967; 19:273-282.
90. -Merchant LH. Rat gonadal and ovarian organogénesis with and without germ cell an structural study. Devel Biol. 1974;44:273-282.

91. -Moreno MG, Sepúlveda SJ. Técnica de Metenamina de plata para la contrastacion entre el amiloide v la colágena. IX Encuentro de Investigación Biomédica Facultad de Medicina de la U.A.N.L(memorias) Monterrey N. L. México Octubre 1992:46.
92. -Mercer EH, Birbeck.SC. Técnica de Revnols: en Manual de Microscopía Electrónica ed. Blume Madrid.1972:113-115.
93. - Bredford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quanties of protein using the princpie of protein dve bindina. Ann Bioch. 1976:248-254.
94. -Wayne W, Daniel B. Análisis de varianza de Fisher en: Bioestadística. 3ed. México, Limusa. 1992:283-310.
95. -Russo J, Furmanski L, Bradley P. Differentiation of normal human mammarv ephithelial cells in culture;An Ultraestructural Study. Am J Anat.1976;145:57-78.
96. -Berliner LD, Ruhmann G. The Influence of Dimethyl Sulfoxide on fibroblastic proliferation. Ann N Y Acad Sci.1965;22:159-164.
97. -Lin L, Kwan W Chu. Tissue Culture and Cutaneous Amyloidoses. Clin Dermatol. 1990;2:80-86.
98. -Henderson RT. Effect of Dimethyl Sulfoxide on Subunit Proteins. Ann N Y Acad Sci. 1975;243:45-60.

APENDICE

En la tabla 1 se observan los valores para realizar las curvas de calibración de proteínas con estándares de albúmina de suero bovino, utilizando el programa Symphony^R, Lotus Corp. se calculó la regresión lineal y la concentración corregida de las proteínas totales .

TABLA 1							
E + BSA ugr/ul	AGUA + ul	R.B.= mi	1	2	3	P	CC
0.0 +	200.0 +	1 =	0.00	0.12	-0.009	0.007	0.030
0.5 +	199.5 +	1 =	-0.04	0.014	0.26	0.266	0.5797
0.1 +	199.0 +	1 =	0.048	0.042	0.044	0.044	1.064
1.5 +	198.5 +	1 =	0.054	0.059	0.032	0.048	1.185
2.0 +	198.0 +	1 =	0.078	0.072	0.051	0.067	1.707
2.5 +	197.5 +	1 =	0.092	0.104	0.089	0.095	2.489
3.0 +	197.0 +	1 =	0.121	0.127	0.124	0.124	3.300
3.5 +	196.5 +	1 =	0.124	0.151	0.149	0.141	3.784
4.0 +	196.0 +	1 =	0.154	0.158	0.166	0.159	4.288
4.5 +	195.5 +	1 =	0.164	0.161	0.159	0.161	4.343
5.0 +	195.0 +	1 =	0.189	0.164	0.172	0.175	4.725

SALIDA DE LA REGRESION

CONSTANTE -0.005924
 R CUADRADA 0.980389
 GRADOS DE LIBERTAD 9
 ERR STD DE Y 0.008844
 NUMERO DE OBSERVACIONES 11
 COEFICIENTE DE (X)0.035775
 ERR.STD DE COEFICIENTE 0.001686

Tabla 1.- Se muestran los valores para la curva de calibración de E=(estándares), R.B.=(Reactivo de Bradford) 1,2,3,=(lecturas), P=(Promedio), C.C.=(Concentración Corregida)

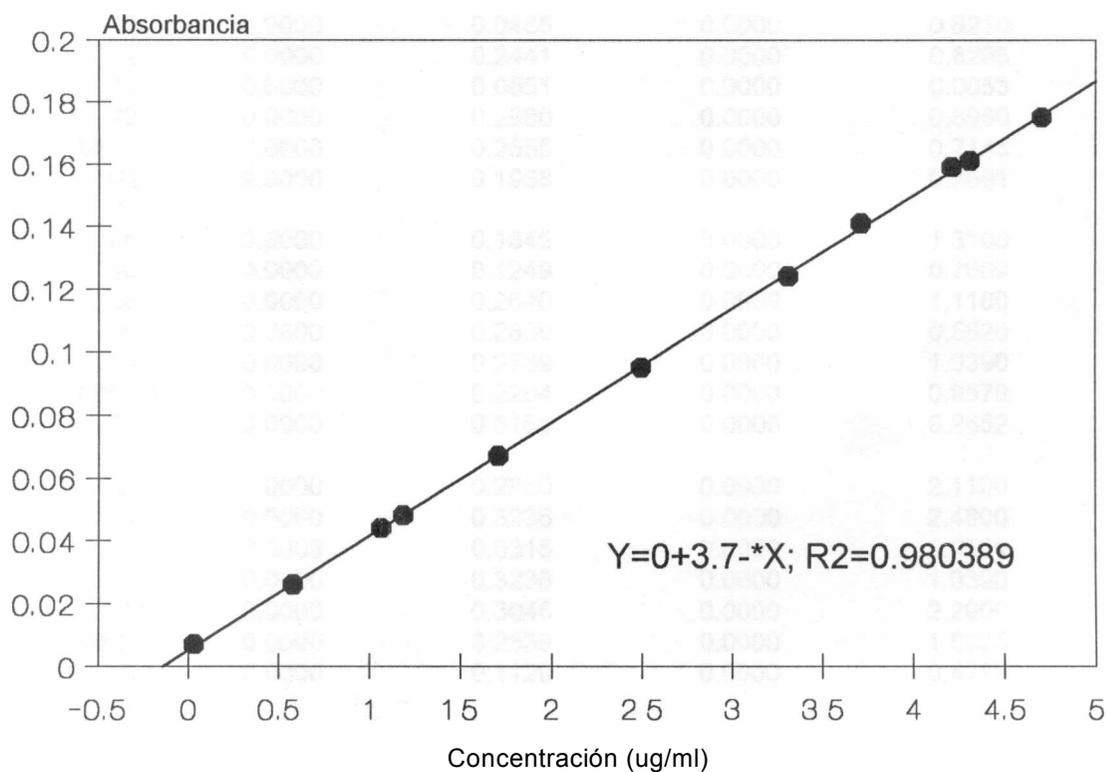
En la tabla 2 se muestran los valores de las absorbancias y su respectiva concentración que se obtuvo al probar, en los medios de cultivo, la reactividad al reactivo de Bradford.

PROBLEMAS + AGUA + R.B	TABLA 2					
	1	2	3	4	P	CC
100pl MEM + 100pl + 1ml	-0.05	-0.05	-0.05	-0.04	-0.05	-0.8
100pl MEM + AB+ 100pl+ 1ml	-0.06	-0.00	-0.01	-0.59	-0.03	-0.5
100pl MEM + AB + DMSO 3%+100pl+ 1ml	-0.07	-0.07	-0.06	-0.06	-0.06	-1.1
100pl MEM + AB+ DMSO 5%+100ul + 1ml	-0.04	-0.01	-0.00	-0.04	-0.02	-0.3

TABLA 2.- Muestra los valores de las absorbancias de los problemas: R.B. (Reactivo de Bradford) MEM, MEM+AB, MEM+AB+DMSO 3%, MEM+AB+DMSO 5%, P(Promedio) CC (Concentración Corregida)

En la gráfica 1 se muestran los valores promedio de las 24 curvas de calibración.

Curva de Calibración Promedio



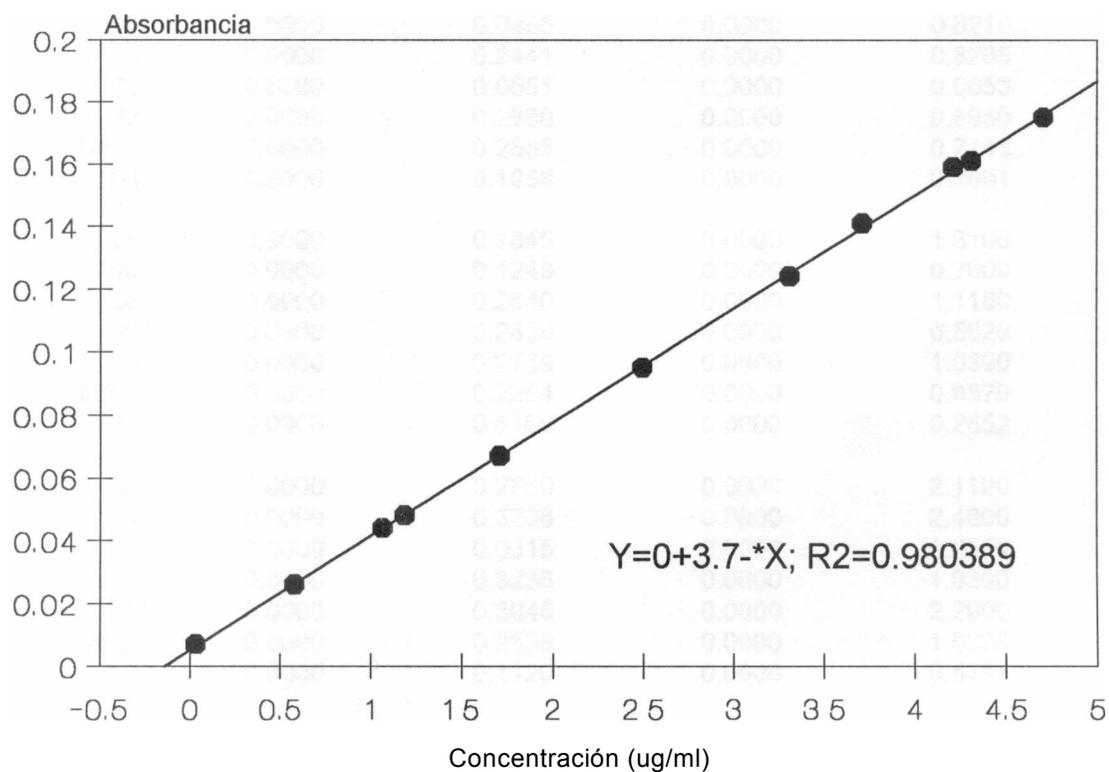
Gráfica 1.-Curva de calibración promedio de 24 curvas con un valor de R² de =0.980389

PROBLEMAS + AGUA + R.B	TABLA 2					
	1	2	3	4	P	CC
100pl MEM + 100pl + 1ml	-0.05	-0.05	-0.05	-0.04	-0.05	-0.8
100pl MEM + AB+ 100pl+ 1ml	-0.06	-0.00	-0.01	-0.59	-0.03	-0.5
100pl MEM + AB + DMSO 3%+100pl+ 1ml	-0.07	-0.07	-0.06	-0.06	-0.06	-1.1
100pl MEM + AB+ DMSO 5%+100ul + 1ml	-0.04	-0.01	-0.00	-0.04	-0.02	-0.3

TABLA 2.- Muestra los valores de las absorbancias de los problemas: R.B. (Reactivo de Bradford) MEM, MEM+AB, MEM+AB+DMSO 3%, MEM+AB+DMSO 5%, P(Promedio) CC (Concentración Corregida)

En la gráfica 1 se muestran los valores promedio de las 24 curvas de calibración.

Curva de Calibración Promedio



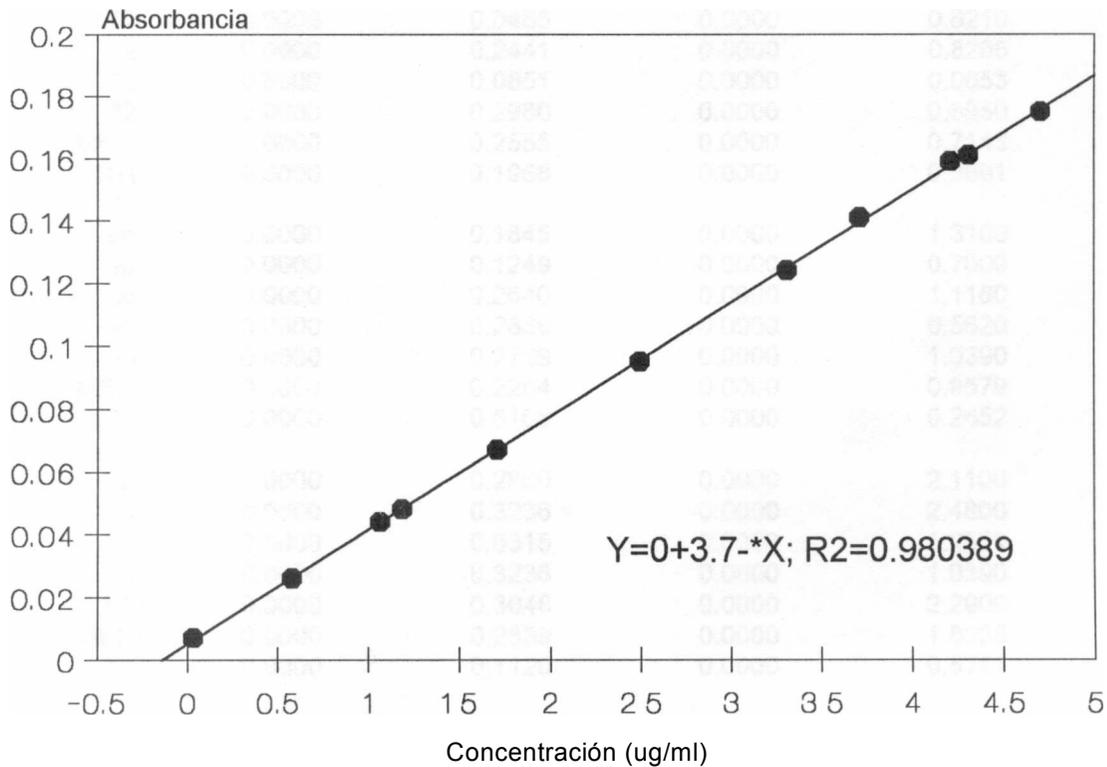
Gráfica 1.-Curva de calibración promedio de 24 curvas con un valor de R² de =0.980389

PROBLEMAS + AGUA + R.B	TABLA 2					
	1	2	3	4	P	CC
100pl MEM + 100pl + 1ml	-0.05	-0.05	-0.05	-0.04	-0.05	-0.8
100pl MEM + AB+ 100pl+ 1ml	-0.06	-0.00	-0.01	-0.59	-0.03	-0.5
100pl MEM + AB + DMSO 3%+100pl+ 1ml	-0.07	-0.07	-0.06	-0.06	-0.06	-1.1
100pl MEM + AB+ DMSO 5%+100ul + 1ml	-0.04	-0.01	-0.00	-0.04	-0.02	-0.3

TABLA 2.- Muestra los valores de las absorbancias de los problemas: R.B. (Reactivo de Bradford) MEM, MEM+AB, MEM+AB+DMSO 3%, MEM+AB+DMSO 5%, P(Promedio) CC (Concentración Corregida)

En la gráfica 1 se muestran los valores promedio de las 24 curvas de calibración.

Curva de Calibración Promedio



Gráfica 1.-Curva de calibración promedio de 24 curvas con un valor de R² de =0.980389

En la tabla 3 se muestran los valores de las proteínas totales en el medio de cultivo donde permanecieron los explantes de piel normal incubados sin y con DMSO al 3% y 5%.

HRS	TIEMPO PIEL NORMAL			CON DMSO 5% ugr/ml/explante
	SIN DMSO ugr/ml/explante	CON DMSO 3% ugr/ml/explante	SIN DMSO ugr/ml/explante	
24	0.0000	0.0448	0.0000	0.0000
24	0.0000	0.0000	0.0000	0.3236
24	0.0000	0.0056	0.0000	0.0000
24	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
24	0.0000	0.0252	0.0000	0.0000
MEDIA	0.0000	0.0151	0.0000	0.0647
STD	0.0000	0.0174	0.0000	0.1294
48	0.0000	0.4031	0.0000	0.0000
48	0.0000	0.0000	0.0000	0.8006
48	0.0000	0.1249	0.0000	1.2700
48	0.0000	0.1584	0.0000	0.0454
48	0.0000	0.2640	0.0000	0.0705
MEDIA	0.0000	0.1584	0.0000	0.4373
STD	0.0000	0.1564	0.0000	0.5108
72	0.0000	0.6019	0.0000	1.1700
72	0.0000	0.0485	0.0000	0.6210
72	0.0000	0.2441	0.0000	0.8205
72	0.0000	0.0851	0.0000	0.0653
72	0.0000	0.2980	0.0000	0.8950
MEDIA	0.0000	0.2555	0.0000	0.7143
STD	0.0000	0.1968	0.0000	0.3691
96	0.0000	0.1845	0.0000	1.3100
96	0.0000	0.1249	0.0000	0.7609
96	0.0000	0.2640	0.0000	1.1180
96	0.0000	0.2839	0.0000	0.5620
96	0.0000	0.2739	0.0000	1.0390
MEDIA	0.0000	0.2264	0.0000	0.9579
STD	0.0000	0.6166	0.0000	0.2652
120	0.0000	0.2860	0.0000	2.1100
120	0.0000	0.3236	0.0000	2.4800
120	0.0000	0.0315	0.0000	1.2500
120	0.0000	0.3236	0.0000	1.0390
120	0.0000	0.3048	0.0000	2.2900
MEDIA	0.0000	0.2539	0.0000	1.8338
STD	0.0000	0.1120	0.0000	0.5787

Tabla 3.-Muestra los valores de las concentraciones de proteínas en los medios de cultivo de la piel normal a las 24, 48, 72, 96 y 120 hrs. incubadas sin y con DMSO al 3 y 5 %, medias y las desviaciones estándar.

En la tabla 4 se muestra el análisis de varianza de Fisher de la piel normal cultivada con DMSO al 3% y 5% donde podemos observar las variaciones reales entre las medias y las desviaciones estándar de los grupos.

TABLA 4
ANOVA DE PIEL NORMAL CON DMSO

	G.L	SUM.CUAD.	MED.CUAD.	VALOR-F	VALOR-P
HORAS	4	2.78	0.70	3.06	0.0204
RESIDUAL	95	21	0.63	0.23	

TABLA DE MEDIAS

HORAS	#	MED.	D.E.	Err.Est.
24	20	2.00E-2	7.23E-2	1.62E-1
48	20	0.15	0.33	7.37E-2
72	20	24	0.37	8.24E-2
96	20	0.30	0.43	9.55E-2
120	20	0.52	0.84	0.19

ANALISIS DE VARIANZA DE FISHER NIVEL DE SIGNIFICANCIA DEL 5%

HORAS	DIFERENCIA MINIMA	DIFERENCIA CRITICA	VALOR DE P
24,48	-0.130	.300	0.3949
24,72	-0.220	.300	0.1436
24,96	-0.280	.300	0.0704
24,120	-0.500	.300	0.0013 S
48,72	-9.35E-2	.300	0.5368
48,96	-0.150	.300	0.3320
48,120	-0.370	.300	0.0152 S
72,96	-5.36E-2	.300	0.7233
72,120	-0.28	.300	0.0671
96,120	0.23	.300	0.1377

Tabla 4.-Musirá los valores del Análisis de Varianza de Fisher.

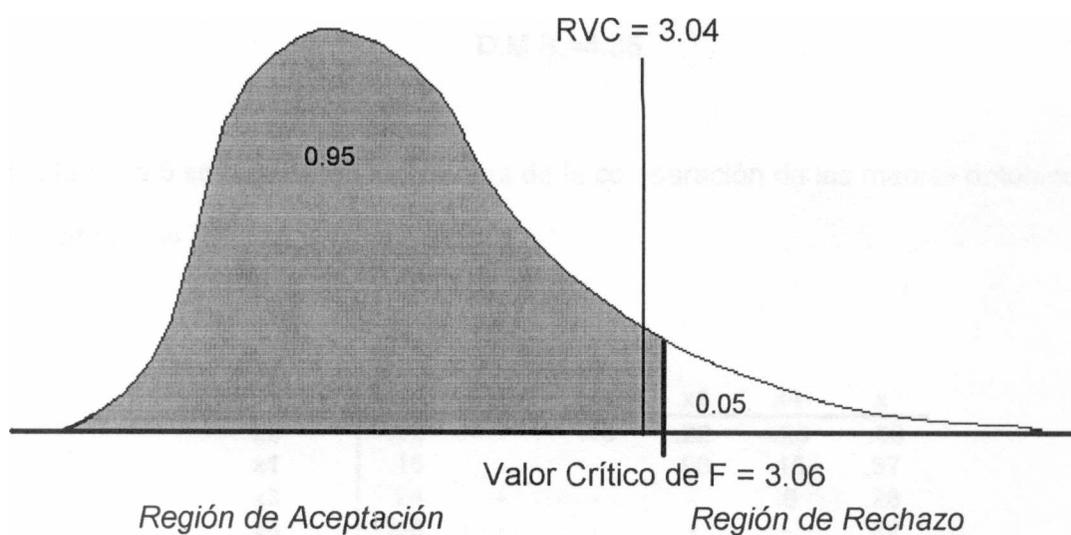
Con estos valores se obtiene la Razón de la Varianza Calculada R.V.C. dividiendo el valor de la media cuadrada entre grupo sobre la media cuadrada dentro de los grupos.

$$H y C - \frac{M.C. \text{ entre grupos}}{M.C. \text{ dentro de los grupos}}$$

substituyendo en esta fórmula los datos de la tabla 4 de la ANOVA de piel normal

$$R.V.C = .07/.23 = 3.04$$

El valor de la R.V.C. que fue de 3.04 se compara con el valor crítico de $F = (3.06)$, se puede obtener consultando la tabla J para los percentiles de la distribución de F , con 4 grados de libertad en el numerador y 95 grados de libertad en el denominador con un 0.05 de sensibilidad (gráfica 2).



Gráfica 2.-Curva de distribución de F para comparar los valores de la Razón de la Varianza Calculada con el valor crítico de F de piel normal incubada con DMSO.

El valor Crítico para F también se puede obtener directamente de la tabla 4 de ANOVA de piel normal que es de 3.06, este valor se compara en una gráfica de distribución de F y se ve la relación que guarda con el valor de R.V.C que previamente obtuvimos y que fue de 3.04. Es evidente que cae en la región de aceptación de la curva de distribución de F , y se acepta que todas las desviaciones estándar y por lo tanto todas las medias son iguales. Para constatar esta afirmación se realizó una segunda prueba

la de la Diferencia Mínima Significativa (D.M.S.) valora la variación entre pares de las medias.

$$D.M.S. = C[a, k, N-k] \frac{CM_{residual}}{n}$$

$$D.M.S. = 0.05, 10, 10-50 \sqrt{\frac{95}{5}}$$

$$D.M.S. = 4.35$$

En la la tabla 5 se reportaron los valores de la comparación de las medias obtenidos de la tabla 4 de ANOVA de piel normal.

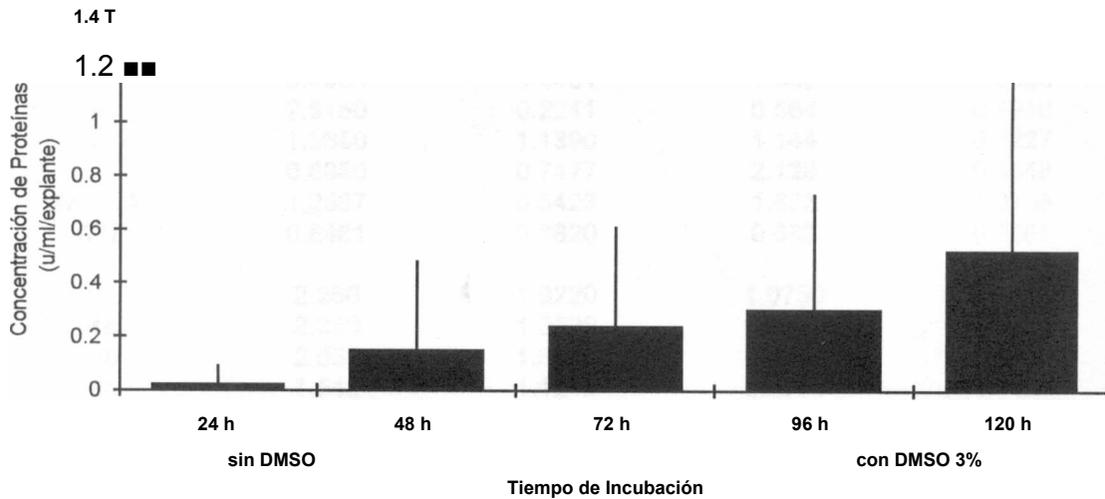
TABLA 5						
MEDIAS	x2	x1	x3	x4	x	
x2	.02	-	.13	.22	.28	.50
x1	.15	-	-	.90	.15	.37
x3	.24	-	-	-	.6	.28
x4	.30	-	-	-	-	.22
x5	.52	-	-	-	-	-

Tabla 5.-Muestra la comparación de los valores de las medias para contrastarlas con el valor que calculamos para D.M.S. y observamos que todos los valores de la tabla 5 son menores que el valor para la D.M.S., por lo que no existe diferencia entre las medias.

Todos los valores de la tabla 5, en comparación de las medias, fueron menores que el valor para la fórmula de D.M.S. que fue de 4.35, con lo que podemos asegurar que no hay diferencia entre las medias y se acepta de que las desviaciones estándar y las medias son iguales, por lo tanto podemos concluir que los valores de las proteínas liberadas al medio de cultivo fueron por efecto del DMSO.

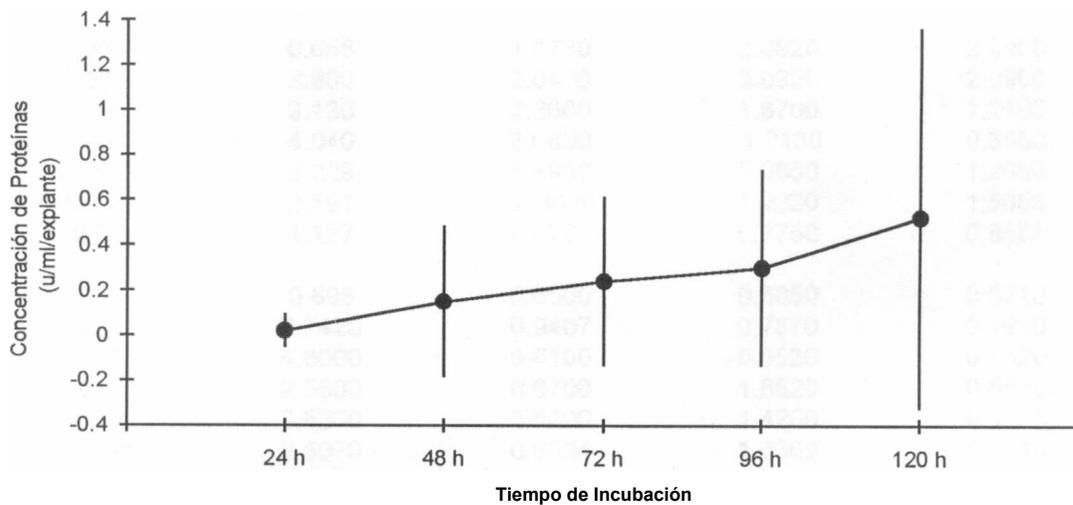
En la gráfica 3 v 4 se muestra el uso de DMSO en la piel normal incubada con DMSO en relación a las horas y con ± 1 D.E.

Valor Promedio de Proteínas Piel Normal con DMSO



Gráficas 3.-Se muestran los valores de las proteínas en relación al tiempo de incubación de la piel normal incubada con DMSO al 3%.

Valor Promedio de Proteínas Piel Normal con DMSO



Gráficas 4.-Valores de las proteínas en relación al tiempo de incubación de la piel normal incubada con DMSO al 3%.

En la tabla 6 se muestran las concentraciones de las proteínas encontradas en el medio de cultivo y detectadas por el método de Bradford de la piel con Amiloidosis sin y con DMSO al 3% y 5%.

TABLA 6

HRS	TIEMPO PIEL AMILOIDE			
	SIN DMSO ugr/ml/explante	CON DMSO 3% ugr/ml/explante	SIN DMSO ugr/ml/explante	CON DMSO 5% ugr/ml/explante
24	0.6747	0.1608	2.429	2.1030
24	0.4906	0.4401	1.890	1.0520
24	2.8150	0.2241	0.564	0.4918
24	1.5650	1.1390	1.144	0.5227
24	0.8886	0.7477	2.128	0.8848
MEDIA	1.2867	0.5423	1.633	1.0108
STD	0.8461	0.3620	0.683	0.5861
48	2.260	1.9220	1.0750	1.1300
48	2.380	1.3220	0.0206	0.1611
48	2.660	1.3790	0.5479	0.6630
48	1.540	1.1240	0.2860	0.4420
48	3.080	0.8162	2.1300	0.8848
MEDIA	2.385	1.3162	0.8119	0.6561
STD	0.504	0.3609	0.7445	0.3369
72	1.780 1	.1420	1.7300	0.6600
72	2.730	1.3200	0.7484	0.7611
72	1.980	1.4580	1.5420	0.9620
72	2.778	0.9300	2.3860	1.1640
72	1.190	1.1900	1.9130	0.3582
MEDIA	1.217	2.0616	0.7811	1.6638
STD	0.000	0.1960	0.2732	0.5368
96	0.658	1.8730	3.0920	2.8900
96	2.900	2.0400	3.0920	2.0900
96	3.130	2.3600	1.8700	1.2100
96	4.040	3.6800	1.9130	0.3580
96	2.229	1.8930	2.0850	1.2950
MEDIA	2.591	2.3690	1.9220	1.5686
STD	1.127	0.6781	0.7750	0.8586
120	0.895	0.6500	0.6850	0.5210
120	0.7420	0.9407	0.7870	0.4960
120	4.6000	0.6100	0.6530	0.4620
120	2.5800	0.6700	1.6520	0.6689
120	3.5200	0.6400	1.4200	0.5120
MEDIA	2.5070	0.6624	1.0309	0.5310
STD	1.4466	0.0442	0.4146	0.0713

Tabla 6.-Valores de las concentraciones de los medios de cultivo de la piel normal la 24,48,72,96 y 120 hrs. incubadas sin y con DMSO, medias y las desviaciones estándar.

En la tabla 7 se muestra los valores del análisis de varianza de Fisher para la piel con amiloide incubada sin y con DMSO al 3% y 5%.

TABLA 7
ANOVA DE PIEL CON AMILOIDE

	G.L.	SUMA DE MEDIA CUD. CUAD.	VALOR-F	VALOR-P
HORAS	4	12.85	3.210	3.98
RESIDUAL	95	76.65	0.081	0.0050

N	MEDIA	MEDIAS		Err.S.	
		D.S.			
24	20	1.12	0.78	0.17	
48	20	1.29	0.78	0.19	
72	20	1.44	0.78	0.15	
96	20	2.11	0.78	0.22	
120	20	1.19	0.78	0.2	

ANALISIS DE VARIANZA DE FISHER NIVEL DE SIGNIFICANCIA DEL 5%

	DIFERENCIA MINIMA	DIFERENCIA CRITICA	VALOR DE -P
24, 48 -	0.17	0.56	0.5411
24, 72	-0.32	0.56	0.2623
24, 96	-0.99	0.56	0.0007 S
24,120	-6.70E	0.56	0.8140
48, 72	-0.15	0.56	0.6082
48, 96	-0.82	0.56	0.0048 S
48,120	0.11	0.56	0.7067
72, 96	-0.67	0.56	0.0196
72,120	0.25	0.56	0.3747
96,120	0.93	0.56	0.0015 S

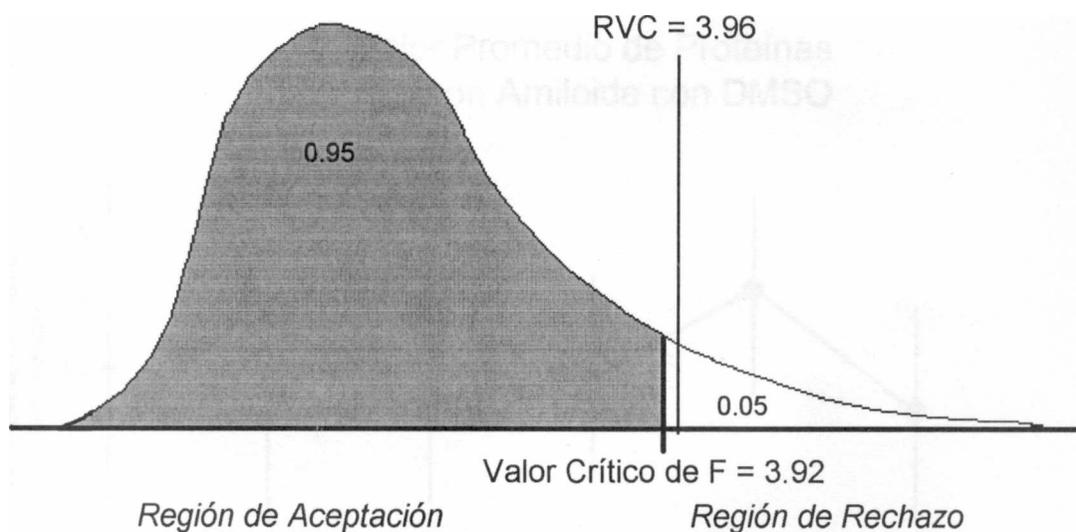
En la tabla 7 Análisis de Varianza de Fisher de la piel con amiloide con DMSO .

Con los valores de la tabla de la ANOVA de la piel con amiloide se efectuó la Razón de la Varianza Calculada con un nivel de significancia de 0.0005. El cálculo se obtiene substituyendo en la fórmula los datos de la tabla 5 de la ANOVA y obtenemos:

$$\text{D.M.S.} = \frac{3.21}{0.81} = 3.96$$

El valor obtenido fue de 3.96 este se comparó con el valor crítico para F que fue de 3.92 en una curva de distribución de F y observamos que cae en la región de rechazo de la curva, por lo que se aceptó que las desviaciones estándar y las medias no son todas iguales y por lo tanto no son comparables entre sí. Se acepta que son estimaciones de una varianza común, por lo que la probabilidad de obtener un valor de 3.9 es de 0.05 las diferencias que presentan son debidas al azar, ya que el valor de la R.V.C. está muy cercano al punto de la F crítica (gráfica 5).

GRAFICA 5

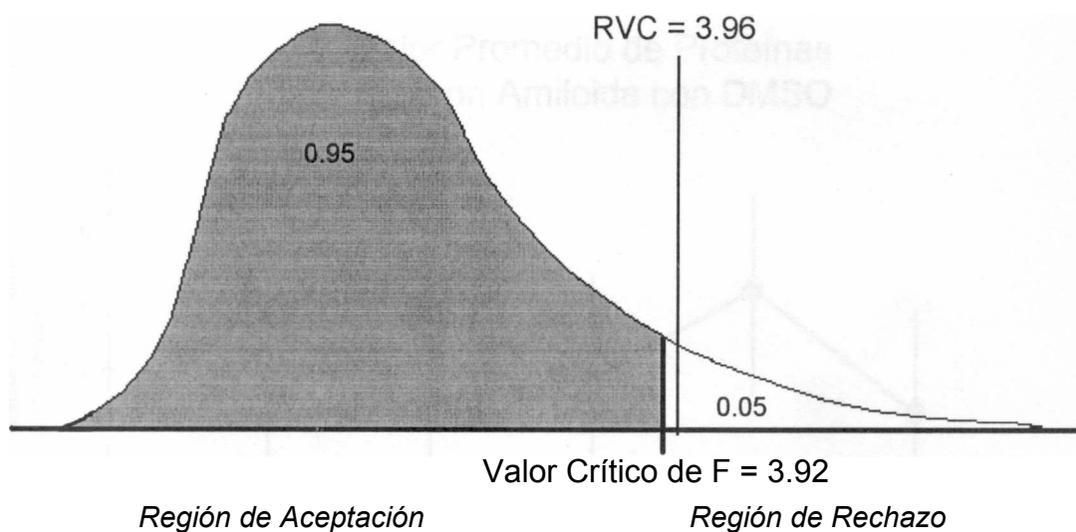


Gráfica 5.-Curva de distribución de F para comparar el valor de la Razón de la Varianza Calculada con el valor crítico de F, piel con amiloide incubada con DMSO.

$$\text{D.M.S.} = \frac{3.21}{0.81} = 3.96$$

El valor obtenido fue de 3.96 este se comparó con el valor crítico para F que fue de 3.92 en una curva de distribución de F y observamos que cae en la región de rechazo de la curva, por lo que se aceptó que las desviaciones estándar y las medias no son todas iguales y por lo tanto no son comparables entre sí. Se acepta que son estimaciones de un varianza común, por lo que la probabilidad de obtener un valor de 3.9 es de 0.05 las diferencias que presentan son debidas al azar, ya que el valor de la R.V.C. está muy cercano al punto de la F crítica (gráfica 5).

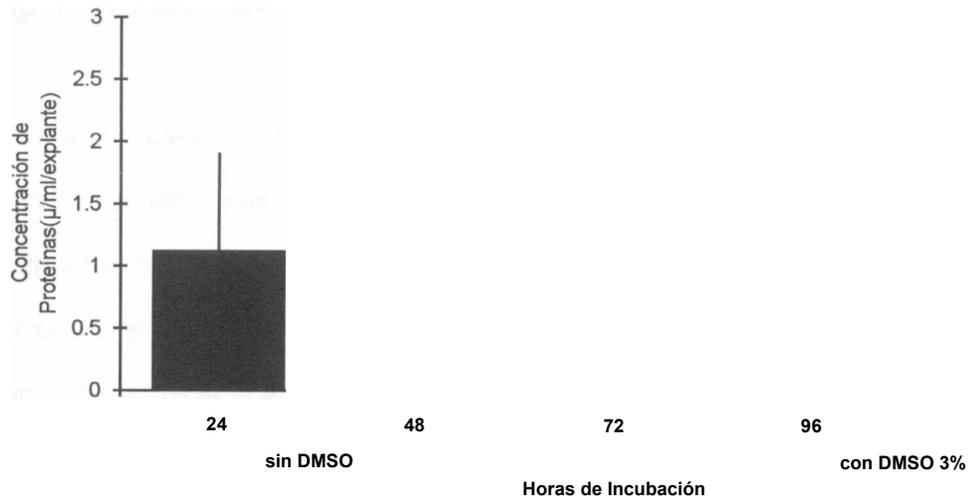
GRAFICA 5



Gráfica 5.-Curva de distribución de F para comparar el valor de la Razón de la Varianza Calculada con el valor crítico de F, piel con amiloide incubada con DMSO.

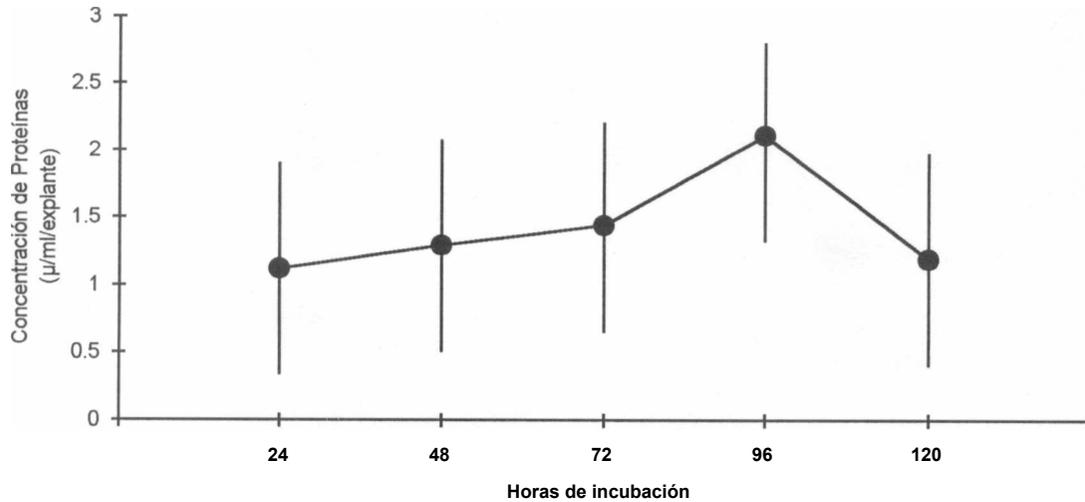
En la gráfica 6 y 7 se muestra la concentración promedio de proteínas en la piel con amiloide en relación a las horas de incubación.

Valor Promedio de Proteínas Piel con Amiloide con DMSO



Gráficas 6.- Se muestran los valores de las proteínas en relación al tiempo de incubación de la piel con amiloide incubada con DMSO.

Valor Promedio de Proteínas Piel con Amiloide con DMSO



Gráficas 7.- valores de las proteínas en relación al tiempo de incubación de la piel con amiloide incubada con DMSO. con barras de error de \pm D.E.

Cuando el valor de R.V.C. es mucho mayor que el valor que se obtiene para la la F crítica, que no es este el caso, puede ser ocasionado por que los valores de las varianzas son francamente diferentes y esto puede explicarse de dos formas: 1) que sea ocasionado por un fenómeno al azar que es lo menos probable o que 2) existe algún fenómeno particular que no es el azar y que está ocasionando estos valores.

En nuestro caso como los valores no son comparables entre sí, no podemos asegurar estadísticamente que el comportamiento de la extracción de las proteínas al medio de cultivo fue ocasionados por DMSO en la piel con amiloidosis y que no es un fenómeno repetitivo y comparable en relación al tiempo de cultivo. Además, los valores tan cercanos entre la R.V.C. y el valor de F nos indican que definitivamente es necesario aumentar el número de muestra para que se defina mejor el comportamiento de las proteínas liberadas al medio bajo efecto del DMSO.