

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE MEDICINA**



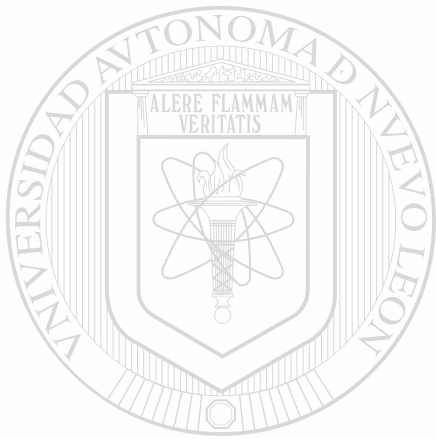
**BUSQUEDA DE COMPONENTES DEL SISTEMA  
INMUNE EN UN MODELO DE POLINEUROPATIA EN  
RATAS CON EL FRUTO DE LA KARWINSKIA  
HUMBOLDTIANA POR VIA ORAL**

**POR**

**D.C.B. MARTHA ELIZABETH SALAZAR LEAL**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL  
GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS  
CON ESPECIALIDAD EN FARMACOLOGIA Y TOXICOLOGIA**

**DICIEMBRE DEL 2003**



ANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

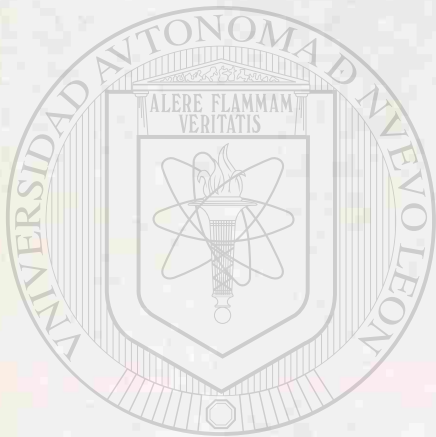


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TD  
QP981  
.K37  
S25  
2003  
c.1



1080123148



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA**



**BÚSQUEDA DE COMPONENTES DEL SISTEMA  
INMUNE EN UN MODELO DE POLINEUROPATÍA EN  
RATAS CON EL FRUTO DE LA *Karwinskia humboldtiana*  
POR VÍA ORAL.**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

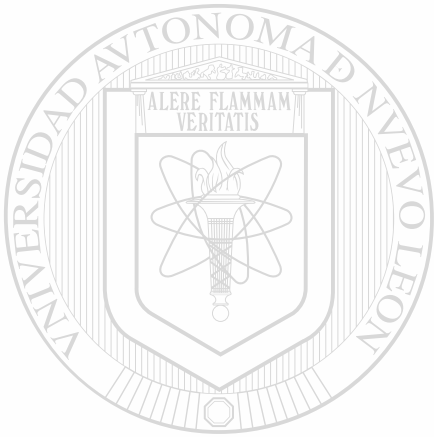
**POR**  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS  
**Q.C.B. MARTHA ELIZABETH SALAZAR LEAL**



**Como requisito parcial para obtener el Grado de DOCTOR  
EN CIENCIAS con Especialidad en Farmacología y  
Toxicología**

**Diciembre del 2003**

FD  
DP981  
.K37  
S25  
2003



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

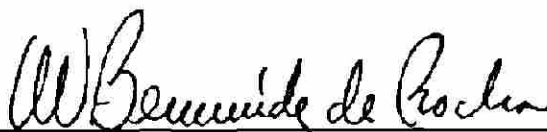
®



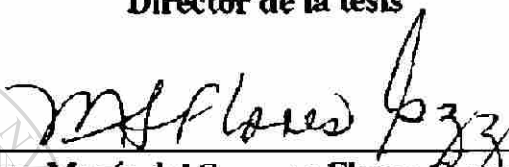
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**BÚSQUEDA DE COMPONENTES DEL SISTEMA INMUNE EN UN  
MODELO DE POLINEUROPATÍA EN RATAS CON EL FRUTO DE  
LA *Karwinskia humboldtiana* POR VÍA ORAL.**

**Aprobación de la Tesis:**



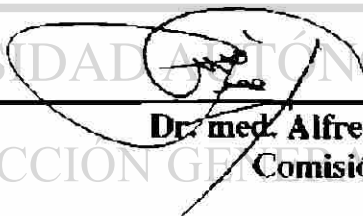
**Dr. med. María Victoria Bermúdez de Rocha**  
Director de la tesis



**Dra. María del Socorro Flores González**  
Codirector de la tesis



**Ph.D. Julio Sepúlveda Saavedra**  
Codirector de la tesis



**Dr. med. Alfredo Piñeyro López**  
Comisión de Tesis



**Dr. Héctor Ramón Martínez Rodríguez**  
Comisión de Tesis



**Dr. Dionicio A. Galarza Delgado**  
Subdirector  
de Investigación y Estudios de Posgrado

**BÚSQUEDA DE COMPONENTES DEL SISTEMA INMUNE EN UN  
MODELO DE POLINEUROPATÍA EN RATAS CON EL FRUTO DE  
LA *Karwinskia humboldtiana* POR VÍA ORAL.**

Presentado por

Q.C.B. Martha Elizabeth Salazar Leal

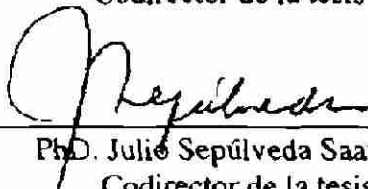
Este trabajo fue realizado en el Departamento de Farmacología y Toxicología,  
Departamento de Microbiología y en el Departamento de Histología de la Facultad de  
Medicina de la U.A.N.L. bajo la dirección de la Dr. med. María Victoria Bermúdez de  
Rocha y la codirección de la Dra. María del Socorro Flores González y del PhD. Julio  
Sepúlveda Saavedra.



Dr. med. María Victoria Bermúdez de Rocha  
Director de la tesis



Dra. María del Socorro Flores González  
Codirector de la tesis



PhD. Julio Sepúlveda Saavedra  
Codirector de la tesis

Martha Elizabeth Salazar Leal

Fecha de graduación: diciembre del 2003

Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Medicina

Título del Estudio:

BÚSQUEDA DE COMPONENTES DEL SISTEMA INMUNE EN UN MODELO DE POLINEUROPATÍA EN RATAS CON EL FRUTO DE LA *Karwinskia humboldtiana*.

Número de páginas: 140

Candidato para la obtención del Grado de Doctor en Ciencias con Especialidad en Farmacología y Toxicología.

Área de Estudio: Farmacología y Toxicología

**Propósito y Método de Estudio:** La *K. humboldtiana* es un arbusto venenoso, cuyo fruto al ser ingerido, es capaz de producir una parálisis flácida simétrica y ascendente que se confunde fácilmente con Síndrome de Guillain-Barré, lo que frecuentemente conduce a diagnósticos erróneos. Histológicamente la lesión se describe como desmielinización segmentaria acompañada de degeneración Walleriana, sin que se conozca el mecanismo que la produce. Llama la atención que la literatura no menciona la presencia de infiltrado celular en esta lesión, ni tampoco se ha reportado la presencia de inmunoglobulinas séricas dirigidas contra alguno de los componentes de la mielina. Por lo anterior, se consideró muy importante realizar una investigación sistemática, para buscar la presencia de infiltrado celular en nervio ciático y de inmunoglobulinas séricas dirigidas contra proteínas de la mielina, en ratas intoxicadas por VO con el fruto de la *K. humboldtiana*. Por lo tanto, se generó un modelo de polineuropatía inducida con *K. humboldtiana* en ratas en el que se reproducen las etapas de la polineuropatía: sin neuropatía (24 días), paresia (48 días), parálisis (58 días) y recuperación (112 días) y en ratas sin tratar. Los nervios ciáticos se tuvieron con técnicas de rutina y técnicas especiales. Se investigó por Wester Blot la presencia de IgM e IgG sérica dirigida contra proteínas de la mielina en ratas tratadas.

**Contribuciones y Conclusiones:** Las contribuciones importantes fueron el desarrollo del modelo de neuropatía, la presencia de infiltrado celular y la presencia de inmunoglobulinas séricas dirigidas contra proteínas de la mielina resultados que no habían sido reportados hasta ahora. Con base en los resultados se concluye que los mastocitos, linfocitos T CD4<sup>+</sup> e inmunoglobulinas participan en el proceso de desmielinización, por lo que se confirma la intervención de componentes del sistema inmune en las diferentes etapas de la polineuropatía causada por el fruto de la *K. humboldtiana*.

FIRMA DEL DIRECTOR DE TESIS



Dr. med. María Victoria Bermúdez de Rocha



## **AGRADECIMIENTOS**

**A Dios** por darme la vida, la salud y las bendiciones recibidas para concluir hoy esta etapa.

**A mis Padres** que me dieron la oportunidad de vivir, crecer y la formación y educación necesaria para luchar en la vida. Y muy especialmente a **Mi Madre**, que es sido el pilar más grande de mi vida para apoyarme y refugiarme. Siempre ha estado ahí cuando la he necesitado.

**A mis hermanos (Saúl y Hugo)** por su cariño y sólo por el hecho de estar siempre ahí apoyándome.

**A mi esposo Marco Antonio** por su amor incondicional, por apoyarme siempre en los buenos y en los no tan buenos momentos que fueron muchos. Por su ayuda con este trabajo y las noches de desvelo.

**A mis hijos (Omar y Diana)** que son una bendición de Dios, gracias por su paciencia en todo aquel tiempo que no pude estar con ellos, por su cariño incondicional que en todo momento me lo demuestran.

**A la Dr. med. María Victoria Bermúdez de Rocha (Dra. Vicky)** con todo mi cariño respeto y admiración, por su amistad y por tener siempre una palabra de apoyo en el momento oportuno.

**Al Dr. med. Alfredo Piñeyro López** porque gracias a sus enseñanzas, su apoyo y su acertada crítica este trabajo llegó a su fin.

**A la Dra. María del Socorro Flores de Castañeda** le agradezco su guía, sus consejos y crítica oportuna, sus enseñanzas, su paciencia para conmigo y sobre todo su amistad.

**Al Dr. Julio Sepúlveda Saavedra** por sus valiosos consejos, apoyo y enseñanza.

**Al Dr. Hector Ramón Martínez** del que siempre recibí palabras de aliento y apoyo.

**Al Dr. Salvador Borrego** por su asesoría en la realización del análisis estadístico de los resultados de este trabajo, gracias.

**Al Dr. Victor Armando Tamez Rodríguez** por su valiosa amistad, consejo y que sin su ayuda hubiera sido difícil concluir esta etapa de mi vida.

**A la Q.C.B. Ma. del Rosario Torres Sepúlveda** por ser una gran amiga y con la que he recorrido una buena parte de este camino, todo mi cariño.

**Al PhD. José Pisanty Ovadia** con toda mi admiración y respeto por saber escuchar y tener siempre un comentario alentador, ser una persona que tiene amplio conocimiento y experiencia en la vida.

**Al M.V.Z. Gilberto Arévalo Martínez** por haber estado ahí cuando lo necesite y por su amistad.

**Al Biol. Viktor J. Romero Díaz** por su disposición, ganas de compartir sus conocimientos conmigo y por su amistad.

**A mis compañeros** por los momentos que hemos pasado juntos y por su amistad.

**Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por la beca proporcionada.

**A mis amigos y a todos aquellos** quienes me acompañaron y animaron constantemente a seguir adelante, para concluir hoy este trabajo.

# TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
<b>1 INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2 MATERIAL Y MÉTODOS</b>	18
<b>2.1 Material</b>	18
<b>2.1.1 Material biológico</b>	18
2.1.1.1 Fruto maduro de la <i>K. humboldtiana</i> .	18
2.1.1.2 Ratas Wistar.	18
<b>2.1.2 Equipo y material general.</b>	19
<b>2.1.3 Reactivos para aislamiento de la mielina, electroforesis de proteínas, Western Blot e inmunohistoquímica.</b>	20
<b>2.1.4 Reactivos para tinciones de rutina y especiales.</b>	21
<b>2.2 Métodos.</b>	23
<b>2.2.1 Procesamiento del fruto maduro de la <i>K. humboldtiana</i>.</b>	23
2.2.1.1 Cuantificación de las toxinas del fruto de la <i>K. humboldtiana</i> por CLAR-FR.	23

## Capítulo

## Página

<b>2.2.2 Determinación del esquema de dosificación del fruto de la <i>K. humboldtiana</i> para el desarrollo del modelo experimental de polineuropatía.</b>	<b>24</b>
2.2.2.1 Registro del peso corporal.	26
2.2.2.2 Evaluación clínica.	26
2.2.2.3 Obtención de las muestras séricas.	26
2.2.2.4 Obtención de los nervios ciáticos.	26
<b>2.2.3 Aislamiento de la mielina del nervio ciático.</b>	<b>27</b>
<b>2.2.3.1 Determinación de proteínas por el método de Bradford.</b>	<b>28</b>
2.2.3.1.1 Solución estándar de albúmina.	28
2.2.3.1.2 Reactivo de Bradford.	29
2.2.3.1.3 Curva de calibración.	29
2.2.3.1.4 Preparación y dilución de la muestra.	29
2.2.3.1.5 Cálculos.	30
<b>2.2.4 Estudio histológico.</b>	<b>30</b>
2.2.4.1 Tinción de hematoxilina y eosina.	30
2.2.4.2 Método de Klüver-Barrera.	30
2.2.4.3 Tinción de azul de toluidina.	31
2.2.4.4 Método de Marsland-Glees y Erickson.	31
<b>2.2.5 Estudio morfométrico</b>	<b>31</b>
2.2.5.1 Cuantificación de mastocitos.	31
2.2.5.2 Cuantificación de linfocitos.	32

<b>Capítulo</b>	<b>Página</b>
<b>2.2.6 Identificación de linfocitos por inmunohistoquímica.</b>	32
<b>2.2.7 Western Blot</b>	33
2.2.7.1 Electroforesis de la mielina de nervio ciático.	33
2.2.7.1.1 Preparación de las muestras.	33
Marcadores de peso molecular.	
Proteína básica de la mielina de conejo.	
Mielina de nervio ciático.	
2.2.7.1.2 Preparación de los geles de poliacrilamida-SDS.	34
2.2.7.1.3 Condiciones de la electroforesis de proteínas.	35
2.2.7.2 Electrotransferencia.	35
2.2.7.3 Determinación por WB de inmunoglobulinas séricas dirigidas contra la mielina del nervio ciático.	37
2.2.7.4 Determinación por WB de inmunoglobulinas séricas dirigidas contra la PBM de conejo.	38
<b>2.3 Análisis estadístico</b>	40
2.3.1 Prueba de ANOVA.	40
2.3.2 Prueba de Kolmogorov-Smirnov .	40
2.3.3 Prueba de Fisher de comparaciones múltiples de diferencia mínima significativa (LSD).	40

<b>Capítulo</b>	<b>Página</b>
<b>3 RESULTADOS</b>	41
<b>3.1 Determinación de la concentración de toxinas en el fruto de la <i>K. humboldtiana</i> por CLAR</b>	41
<b>3.2 Obtención de la mielina de nervio ciático</b>	42
<b>3.2.1 Rendimiento de la mielina de nervio ciático.</b>	42
3.2.1.1 Concentración de proteínas en la mielina de nervio ciático.	43
<b>3.3 Modelo experimental de polineuropatía con el fruto maduro de la <i>K. humboldtiana</i>.</b>	43
<b>3.3.1 Manifestaciones clínicas de intoxicación.</b>	45
3.3.1.1 Etapa sin neuropatía (24 días ddi).	45
3.3.1.2 Etapa de paresia (48 días ddi).	45
3.3.1.3 Etapa de parálisis (58 días ddi).	46
3.3.1.4 Etapa de recuperación (112 días ddi).	46
3.3.1.5. Grupo control.	46
<b>3.3.2 Registro el peso corporal</b>	48
3.3.2.1 Etapa sin neuropatía (24 días ddi).	48
3.3.2.2 Etapa de paresia (48 días ddi).	49
3.3.2.3 Etapa de parálisis (58 días ddi).	50
3.3.2.4 Etapa de recuperación (112 días ddi).	51

<b>Capítulo</b>	<b>Página</b>
<b>3.4 Resultados histológicos.</b>	<b>52</b>
<b>3.4.1 Grupo Control</b>	<b>52</b>
3.4.1.1 Tinción hematoxilina y eosina.	52
3.4.1.2 Método de Klüver-Barrera.	52
3.4.1.3 Tinción de azul de toluidina.	52
3.4.1.4 Método de Marsland-Glees y Erickson.	52
<b>3.4.2 Etapa sin neuropatía (grupo 24 días ddi).</b>	<b>54</b>
3.4.2.1 Tinción hematoxilina y eosina.	54
3.4.2.2 Método de Klüver-Barrera.	54
3.4.2.3 Tinción de azul de toluidina.	54
3.4.2.4 Método de Marsland-Glees y Erickson.	55
<b>3.4.3 Etapa de Paresia (grupo 48 días ddi).</b>	<b>56</b>
3.4.3.1 Tinción hematoxilina y eosina.	56
3.4.3.2 Método de Klüver-Barrera.	56
3.4.3.3 Tinción de azul de toluidina.	56
3.4.3.4 Método de Marsland-Glees y Erickson.	56
<b>3.4.4 Etapa de Parálisis (grupo 58 días ddi).</b>	<b>58</b>
3.4.4.1 Tinción hematoxilina y eosina.	58
3.4.4.2 Método de Klüver-Barrera	58
3.4.4.3 Tinción de azul de toluidina.	58
3.4.4.4 Método de Marsland-Glees y Erickson.	58

## Capítulo

## Página

### **3.4.5 Etapa de recuperación (grupo 112 días ddi).** 60

3.4.5.1 Tinción hematoxilina y eosina. 60

3.4.5.2 Método de Klüver-Barrera. 60

3.4.5.3 Tinción de Azul de toluidina. 60

3.4.5.4 Método de Marsland-Glees y Erickson. 60

### **3.5 Cuantificación de mastocitos y análisis estadístico de los resultados.** 62

3.5.1 Grupo Control. 62

3.5.2 Etapa Sin Neuropatía (24 días ddi). 64

3.5.3 Etapa de Paresia (48 días ddi). 66

3.5.4 Etapa de Parálisis (58 días ddi). 68

3.5.5 Etapa de Recuperación (112 días ddi). 70

3.5.6 Resumen de los resultados de la cuantificación de mastocitos durante las diferentes etapas de la polineuropatía y de las ratas control sin tratar. 72

### **3.6 Cuantificación de linfocitos y análisis estadístico de los resultados.** 75

3.6.1 Grupo Control . 75

3.6.2 Etapa Sin Neuropatía (grupo 24 días ddi). 76

3.6.3 Etapa de Paresia (grupo 48 días ddi). 78

3.6.4 Etapa de Parálisis (grupo 58 días ddi). 80

3.6.5 Etapa de recuperación (grupo 112 días ddi). 82

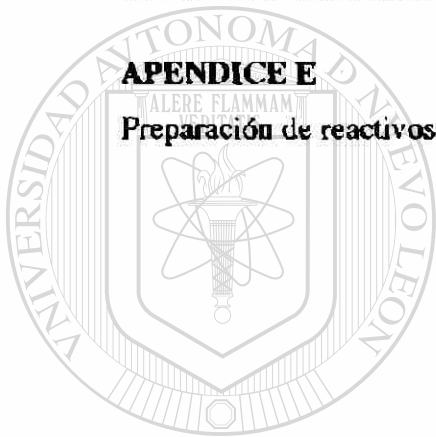
3.6.6 Resumen de los resultados de la cuantificación de linfocitos en las diferentes etapas de la polineuropatía y de las ratas control sin tratar. 83



<b>Capítulo</b>	<b>Página</b>
<b>3.6.7</b> Relación de mastocitos y linfocitos por mm <sup>2</sup> en nervio ciático durante las diferentes etapas de la polineuropatía.	85
<b>3.7</b> Identificación de linfocitos por inmunohistoquímica	85
<b>3.8</b> Búsqueda por WB de inmunoglobulinas séricas de ratas tratadas dirigidas contra las proteínas de la mielina de nervio ciático.	86
3.8.1. Mielina de nervio ciático y electroforesis de proteínas.	86
3.8.2. Búsqueda de IgM sérica dirigida contra proteínas de la mielina de nervio ciático en ratas tratadas.	87
3.8.2.1. Mezcla de sueros.	88
3.8.3. Búsqueda de IgG sérica dirigida contra proteínas de la mielina de nervio ciático en ratas tratadas.	89
3.8.3.1. Mezcla de sueros y sueros individuales.	89
<b>3.9</b> Búsqueda por WB de inmunoglobulinas séricas dirigidas contra la PBM, en ratas tratadas.	91
3.9.1 Patrón electroforético de la PBM de conejo de fabricación comercial.	91

<b>Capítulo</b>	<b>Página</b>
3.9.2 Búsqueda por WB de IgM sérica dirigida contra la PBM de conejo, en ratas tratadas.	92
3.9.2.1. Mezcla de sueros y sueros individuales.	92
3.9.2.2. Búsqueda de IgM sérica dirigida contra la PBM de conejo, en ratas Wistar sin tratar.	93
3.9.3 Búsqueda por WB de IgG sérica dirigida contra la PBM de conejo, en ratas tratadas.	94
3.9.3.1. Mezcla de sueros y sueros individuales	94
<b>4 DISCUSIÓN</b>	96
<b>5 CONCLUSION</b>	111
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	112
<b>APENDICE A</b>	122
Preparación de reactivos para el aislamiento de la mielina de nervio ciático de ratas no tratadas.	123
<b>APENDICE B: Técnicas histológicas y preparación de reactivos</b>	124
Desparafinización y Montaje de cortes tenidos	125
Tinción de Hematoxilina y Eosina	126
Preparación de reactivos para tinción de Hematoxilina y Eosina	127
Método de Klüver-Barrera	128
Preparación de reactivos para el método de Klüver-Barrera	129
Tinción de azul de toluidina	130
Preparación de azul de toluidina	130
Método de Marsland-Glees y Erickson	131

<b>Capítulo</b>	<b>Página</b>
Preparación de reactivos para el método de Marsland-Glees y Erickson	132
<b>APENDICE C</b>	133
Técnica inmunohistoquímica	134
<b>APENDICE D</b>	135
Preparación de reactivos para electroforesis de proteínas de la mielina de nervio ciático	136
<b>APENDICE E</b>	138
Preparación de reactivos para Western Blot	139



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

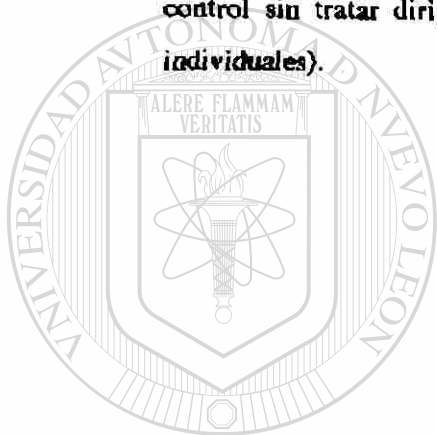
## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Arbusto, fruto y distribución de la <i>K. humboldtiana</i> .	5
2. Toxinas de las toxinas aisladas del fruto de la <i>K. humboldtiana</i> (tullidora) y sus efectos en diferentes especies de animales.	7
3. Método de administración de las dosis únicas y dosis fraccionada del fruto maduro de la <i>K. humboldtiana</i> administración V.O.	24
4. Representación esquemática de la preparación del gel de poiacrilamida y la membrana de nitrocelulosa para la transferencia	36
5. Cromatograma de los diferentes compuestos contenidos en el fruto maduro de la <i>K. humboldtiana</i> .	42
6. Ratas Wistar representativas de las diferentes etapas de la polineuropatía causada por el fruto de la <i>K. humboldtiana</i> y del grupo de ratas sin tratar.	47
7. Representación gráfica del peso corporal promedio del grupo de ratas durante la etapa sin neuropatía (24 días ddi) y del grupo control sin tratar.	48
8. Representación gráfica del peso corporal promedio del grupo de ratas durante la etapa de paresia (48 días ddi) y del grupo de ratas sin tratar.	49
9. Representación gráfica del peso corporal promedio del grupo de ratas durante la etapa de parálisis (58 días ddi) y del grupo control sin tratar	50

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
10. Representación gráfica del peso corporal promedio del grupo de ratas durante la etapa de recuperación (112 días ddi) y del grupo control sin tratar.	51
11. Cortes de nervio ciático normal de rata Wistar 40X.	53
12. Cortes de nervio ciático de ratas durante la etapa sin neuropatía (grupo 24 días ddi).	55
13. Cortes de nervio ciático de ratas durante la etapa de paresia (grupo 48 días ddi).	57
14. Cortes de nervio ciático de ratas durante la etapa de parálisis (grupo de 58 días ddi).	59
15. Cortes de nervio ciático de ratas durante la etapa de recuperación (112 días ddi).	61
16. Representación gráfica de la cantidad de mastocitos totales por mm <sup>2</sup> en el nervio ciático de ratas tratadas en las diferentes etapas de la neuropatía y en las ratas control sin tratar.	73
17. Relación de mastocitos no desgranulados y desgranulados por mm <sup>2</sup> en las diferentes etapas de la polineuropatía causada por el fruto de la <i>K. humboldtiana</i> y en las ratas del grupo control sin tratar.	74
18. Representación gráfica de la cantidad de linfocitos por mm <sup>2</sup> en el nervio ciático durante las diferentes etapas de la polineuropatía causada por el fruto de la <i>K. humboldtiana</i> y en las ratas del grupo control sin tratar.	84

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
19. Relación de mastocitos y linfocitos por mm <sup>2</sup> en las diferentes etapas de la polineuropatía causada por el fruto de la K. humboldtiana y en las ratas del grupo control sin tratar.	85
20. Inmunohistoquímica Linfocitos T-CD4 <sup>+</sup> en nervio ciático de ratas en los diferentes grupos de estudio, control negativo y amígdala de rata Wistar como control positivo.	86
21. Patrón electroforético y pesos moleculares en KDa de las proteínas de la mielina del nervio ciático de ratas Wistar en gel de poliacrilamida-SDS 12%.	87
22. Detección por WB de IgM sérica de ratas tratadas dirigida contra proteínas de la mielina de nervio ciático (mezcla de sueros).	88
23. Detección por WB de IgG sérica de ratas tratadas dirigida contra proteínas de la mielina de nervio ciático, (mezcla de sueros).	90
24. Detección por WB de IgG sérica de ratas tratadas dirigida contra proteínas de la mielina de nervio ciático, (sueros individuales).	90
25. Patrón electroforético y peso molecular en KDa de la PBM de conejo.	91
26. Detección por WB de IgM sérica de ratas tratadas y ratas control sin tratar dirigida contra PBM de conejo (mezcla de sueros).	92
27. Detección por WB de IgM sérica de ratas tratadas y ratas control sin tratar dirigida contra PBM de conejo (sueros individuales).	98

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
28. Detección por WB de IgM sérica de dos cepas de ratas control sin tratar dirigida contra la PBM de conejo (mezcla de sueros)	94
29. Detección por WB de IgG sérica de ratas tratadas y ratas control sin tratar dirigida contra PBM de conejo (mezcla de sueros).	95
30. Detección por WB de IgG sérica de ratas tratadas y ratas control sin tratar dirigida contra PBM de conejo (sueros individuales).	95



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Esquema de dosificación fraccionada V.O. del fruto de la <i>K. humboldtiana</i> .	25
II. Esquema simplificado de dosificación fraccionada V.O. del fruto de la <i>K. humboldtiana</i> .	25
III. Concentraciones de proteínas para la realización de la curva de calibración.	29
IV. Preparación del gel concentrador de poliacrilamida SDS 5%.	34
V. Preparación del gel separador de poliacrilamida-SDS al 12% y 14%.	34
VI. Cuantificación de las toxinas contenidas en el fruto maduro de la <i>K. humboldtiana</i> por CLAR-FR.	42
VII. Relación de las dosis únicas empleadas para la elección del esquema de dosificación para el desarrollo del modelo experimental de polineuropatía.	43
VIII. Resultados después de la administración del esquema de dosis fraccionada (3.5 g/Kg) VO del fruto de la <i>K. humboldtiana</i> .	44
IX. Cuantificación y relación de mastocitos endoneurales no desgranulados y desgranulados por mm <sup>2</sup> en el nervio ciático de ratas control sin tratar.	63



**Tabla****Página**

<b>IXa.</b> Distribución de los resultados del grupo de ratas control sin tratar, de acuerdo con la prueba de Kolmogorov y Smirnov para una muestra.	64
<b>X.</b> Cuantificación y relación de mastocitos endoneurales no desgranulados y desgranulados por mm <sup>2</sup> en el nervio ciático de ratas durante la etapa sin neuropatía (24 días ddi).	65
<b>Xa.</b> Distribución de los resultados de la etapa sin neuropatía (24 días ddi), de acuerdo con la prueba de Kolmogorov y Smirnov para una muestra.	66
<b>XI.</b> Cuantificación y relación de mastocitos endoneurales no desgranulados y desgranulados por mm <sup>2</sup> en el nervio ciático de ratas durante la etapa de paresia (48 días ddi).	67
<b>XIa.</b> Distribución de los resultados de la etapa con paresia (48 días ddi), de acuerdo con la prueba de Kolmogorov y Smirnov para una muestra.	68
<b>XII.</b> Cuantificación y relación de mastocitos endoneurales no desgranulados y desgranulados por mm <sup>2</sup> en el nervio ciático de ratas durante la etapa de parálisis (58 días ddi).	69
<b>XIIa.</b> Distribución de los resultados de la etapa con parálisis (58 días ddi), de acuerdo con la prueba de Kolmogorov y Smirnov para una muestra.	70
<b>XIII.</b> Cuantificación y relación de mastocitos endoneurales no desgranulados y desgranulados por mm <sup>2</sup> en el nervio ciático de ratas durante la etapa de recuperación (112 días ddi).	71

**Tabla****Página**

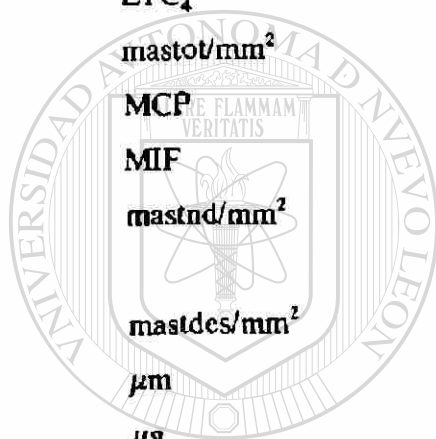
<b>XIIIa.</b> Distribución de los resultados de la etapa de recuperación (112 días ddi), de acuerdo con la prueba de Kolmogorov y Smirnov para una muestra.	72
<b>XIV.</b> Relación entre el porcentaje y el total de mastocitos no desgranulados y desgranulados por $\text{mm}^2$ en el nervio ciático del grupo control sin tratar y las diferentes etapas de la polineuropatía.	73
<b>XV.</b> Prueba de ANOVA para determinar la influencia del género de las ratas sobre la cantidad de mastocitos totales y mastocitos desgranulados por $\text{mm}^2$ variables de interés durante las diferentes etapas de la neuropatía.	74
<b>XVI.</b> Cuantificación de linfocitos por $\text{mm}^2$ en el nervio ciático de ratas control sin tratar.	76
<b>XVII.</b> Cuantificación de linfocitos por $\text{mm}^2$ en el nervio ciático de ratas durante la etapa sin neuropatía (24 días ddi).	77
<b>XVIIa.</b> Distribución de los resultados (linfocitos/ $\text{mm}^2$ ) de la etapa sin neuropatía (24 días ddi), de acuerdo con la prueba de Kolmogorov y Smirnov para una muestra.	78
<b>XVIII.</b> Cuantificación de linfocitos por $\text{mm}^2$ en el nervio ciático de ratas durante la etapa de paresia (48 días ddi).	79
<b>XVIIIa.</b> Distribución de los resultados (linfocitos/ $\text{mm}^2$ ) de la etapa de paresia (48 días ddi), de acuerdo con la prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra.	80
<b>IXX.</b> Cuantificación de linfocitos por $\text{mm}^2$ en el nervio ciático de ratas durante la etapa de parálisis (58 días ddi).	81

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
<b>LXXa.</b> Distribución de los resultados (linfocitos/mm <sup>2</sup> ) de la etapa de parálisis (58 días ddi), de acuerdo con la prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra.	82
<b>XX.</b> Cuantificación de linfocitos por mm <sup>2</sup> en el nervio ciático de ratas durante la etapa de recuperación (112 días ddi).	82
<b>XXa.</b> Distribución de los resultados (linfocitos/mm <sup>2</sup> ) de la etapa de recuperación (112 días ddi), de acuerdo con la prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra.	83
<b>XXI.</b> Relación de linfocitos por mm <sup>2</sup> en el nervio ciático del grupo control sin tratar y las diferentes etapas de la polineuropatía.	83
<b>XXII.</b> Prueba de ANOVA para establecer si el género de las ratas influye en sobre la cantidad de linfocitos por mm <sup>2</sup> durante las diferentes etapas de la neuropatía.	84

## NOMENCLATURA

Å	Amstrong
ANOVA	Análisis de varianza entre grupos
BDNF	Factor neurotrófico derivado de cerebro
°C	Grados Celsius
CD4	Linfocitos cooperadores
CLAR-FR	Cromatografía de líquidos de alta resolución fase reversa
cm	Centímetro
cm <sup>2</sup>	Centímetro cuadrado
cols.	Colaboradores
c/u	Cada uno
ddi	Después de la dosis inicial
2X	El doble de la concentración original
EAN	Neuritis experimental aguda
FAP	Factor activador plaquetario
β-FGF	Factor de crecimiento angiogénico básico de fibroblastos
g	gravedades
GM-SCF	Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos
H y E	Hematoxilina y eosina
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular uno
hs	horas
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M

<b>IL</b>	<b>Interleucina</b>
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	<b>Interferón gama</b>
<b>IV</b>	<b>Intravenosa</b>
<b>K.</b>	<b><i>Karwinskia</i></b>
<b>KDa</b>	<b>Kilodaltones</b>
<b>Kg</b>	<b>Kilogramo</b>
<b>LCR</b>	<b>Líquido cefalorraquídeo</b>
<b>LSD</b>	<b>Diferencia significativa mínima</b>
<b>LTB<sub>4</sub></b>	<b>Leucotrieno B cuatro</b>
<b>LTC<sub>4</sub></b>	<b>Leucotrieno C cuatro</b>
<b>mastot/mm<sup>2</sup></b>	<b>Mastocitos totales por milímetro cuadrado</b>
<b>MCP</b>	<b>Péptido quimioattractante de monocitos</b>
<b>MIF</b>	<b>Factor inhibitorio de la migración</b>
<b>mastnd/mm<sup>2</sup></b>	<b>Mastocitos no desgranulados por milímetro cuadrado</b>
<b>mastdes/mm<sup>2</sup></b>	<b>Mastocitos desgranulados por milímetro cuadrado</b>
<b><math>\mu</math>m</b>	<b>Micrómetros</b>
<b><math>\mu</math>g</b>	<b>Microgramos</b>
<b><math>\mu</math>L</b>	<b>Microlitros</b>
<b>mg</b>	<b>Miligramos</b>
<b>mL</b>	<b>Mililitros</b>
<b>mm</b>	<b>Milímetros</b>
<b>mm<sup>2</sup></b>	<b>Milímetros cuadrados</b>
<b>min</b>	<b>Minuto</b>
<b>M</b>	<b>Molar</b>
<b>n</b>	<b>Número de muestra</b>
<b>NGF</b>	<b>Factor de crecimiento nervioso</b>
<b>NO</b>	<b>Óxido nítrico</b>
<b>nm</b>	<b>Nanómetros</b>
<b>OCT</b>	<b>Medio para conservar y procesar muestras de tejido en congelación</b>

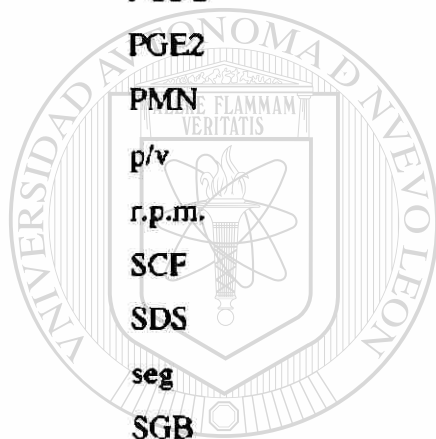


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



<b>p</b>	<b>probabilidad</b>
<b>P<sub>1</sub></b>	<b>Proteína básica de la mielina</b>
<b>P<sub>2</sub></b>	<b>Proteína básica de la mielina dos</b>
<b>PA<sub>1</sub></b>	<b>T-514</b>
<b>PA<sub>2</sub></b>	<b>Diastoisómero de la T-514</b>
<b>PA<sub>3</sub></b>	<b>Diastoisómero de la T-514</b>
<b>pH</b>	<b>- Log [H]</b>
<b>PBM</b>	<b>Proteína básica de la mielina</b>
<b>PBS</b>	<b>Buffer de fosfatos y salina</b>
<b>PGD2</b>	<b>Prostaglandina D dos</b>
<b>PGE2</b>	<b>Prostaglandina E dos</b>
<b>PMN</b>	<b>Polimorfonucleares</b>
<b>p/v</b>	<b>Peso volumen</b>
<b>r.p.m.</b>	<b>Revoluciones por minuto</b>
<b>SCF</b>	<b>Factor de células madre</b>
<b>SDS</b>	<b>Lauril sulfato de sodio</b>
<b>seg</b>	<b>Segundos</b>
<b>SGB</b>	<b>Síndrome de Guillain-Barré</b>
<b>Std</b>	<b>Estándar</b>
<b>T</b>	<b>Toxina</b>
<b>Th</b>	<b>Células T cooperadoras</b>
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	<b>Factor de necrosis tumoral alfa</b>
<b>V.O.</b>	<b>Vía oral</b>
<b>WB</b>	<b>Western Blot</b>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
 DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN



El sistema nervioso periférico (SNP) está formado por ganglios y un conjunto de nervios motores y nervios sensitivos que en la cara ventral y dorsal de la médula espinal, establecen la red de comunicación entre el sistema nervioso central (SNC) y las diferentes estructuras en el organismo.

### DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

El SNP se divide en **somático** que controla las actividades voluntarias y en **autónomo** que se encarga de regular las actividades involuntarias. Por lo tanto, la función principal del SNP es la conducción de información sensorial al SNC y de órdenes motoras a través de fibras nerviosas a los órganos efectores como el músculo. <sup>(1, 2)</sup>

Los nervios periféricos son haces de fibras nerviosas que transmiten la información como impulsos nerviosos en un sentido por medio de los axones, que a partir de  $0.7 \mu\text{m}$  de diámetro están rodeados por vainas de mielina producidas por diferenciación y enrollamiento de la membrana plasmática de la célula de Schwann sobre un segmento del axón<sup>(3)</sup>. La vaina de mielina permite la propagación rápida de los potenciales de acción a lo largo de los axones que rodea, la vaina de mielina depende de interacciones intercelulares no sólo durante su formación, sino también a través de toda la vida y durante los procesos patológicos que afectan al axón o a la célula de Schwann<sup>(4)</sup>. Además, se propone que la vaina de mielina participa en el mantenimiento de la homeostasis iónica, en la protección y posiblemente en apoyo metabólico de los axones<sup>(5)</sup>.

Una de las características bioquímicas que distingue a la mielina de otras membranas biológicas es que en ella se encuentran representadas todas las clases principales de lípidos en mayor proporción que las proteínas<sup>(6)</sup>. Es importante mencionar que las células de Schwann son vulnerables a daños por neurotóxicos durante el máximo estrés metabólico, ya que sintetizan grandes cantidades de proteínas de la mielina y lípidos en periodos muy cortos ya programados. Así mismo, el carácter hidrofóbico de la mielina le permite actuar como reservorio de sustancias tóxicas liposolubles y es posible que los mecanismos de mantenimiento que requieran energía, sean puntos vulnerables en la vaina de mielina madura<sup>(7)</sup>.



Por lo tanto, la alteración en cualesquiera de los componentes que forman las fibras nerviosas puede modificar su función y conducir al desarrollo de neuropatía periférica, la cual un término que designa a la afección nerviosa del nervio periférico. En sentido estricto, la neuropatía periférica incluye sólo a las formas de lesión no inflamatorias, sin embargo, en sentido amplio se aplica a todo tipo de daño que afecte al nervio.

A la neuropatía periférica también se le ha descrito como una neuritis sin que este término se relacione específicamente con inflamación, en ella se presentan en forma aislada o conjunta síntomas motores, sensitivos, reflejos o vasomotores, no obstante, la neuritis se define como un proceso o afección inflamatoria y degenerativa de uno o varios nervios. Otro de los términos utilizados, es el de polineuritis que se refiere como un síndrome que afecta al sistema nervioso periférico que tiende a ser simétrico, bilateral y de predominio distal<sup>(6,7)</sup>.

La neuropatía periférica puede ser clasificada de acuerdo al tipo de nervio<sup>®</sup> afectado (motor, sensitivo o autónomo), a la localización anatómica como mononeuropatía si la lesión ocurre en un solo nervio, polineuropatía si ocurre en varias áreas y principalmente en varios nervios, neuropatía simétrica si afecta áreas iguales a ambos lados del cuerpo, radiculopatía si afecta a las raíces nerviosas y finalmente según la etiología (diabetes, nutricional o idiopática)<sup>®</sup>.

Aunque son muchos los procesos patológicos que pueden lesionar al nervio periférico, se observan solamente tres clases de daño en esta estructura.

**Desmielinización segmentaria** si existe destrucción primaria de la vaina de mielina, sin daño al axón lo que resulta en una disminución o bloqueo de la conducción nerviosa. Sin embargo, puede ocurrir remielinización y la recuperación completa. El término de **desmielinización secundaria** se utiliza para describir desmielinización en presencia de anomalías axonales. La **degeneración Walleriana** ocurre cuando se secciona el axón o cuando se destruye a la neurona. Las células de Schwann proliferan distalmente al corte y puede producirse regeneración axonal. **Degeneración axonal retrograda** implica una alteración metabólica de la neurona que se manifiesta como muerte de la porción distal del axón. Adicionalmente, puede presentarse desmielinización secundaria proximal a la porción intacta del axón atrófico<sup>(2)</sup>.

En resumen, los términos polineuropatía, neuritis, polineuritis y polirradiculoneuritis se emplean para describir una serie de procesos inflamatorios, no inflamatorios y/o degenerativos que afectan al sistema nervioso periférico de formas muy diversas.

Las causas de estos procesos desmielinizantes son múltiples y van desde, estados carenciales y trastornos metabólicos como el alcoholismo y la diabetes; estados infecciosos e inflamatorios como la difteria, polio, lepra y el síndrome de Guillain-Barré hasta intoxicaciones por metales (arsénico, plomo, talio, etc.), medicamentos (vincristina, isoniacida, etc.), sustancias orgánicas (acrilamida y monóxido de carbono, etc.) y por plantas como la *K. humboldtiana* (coyotillo o tullidora)<sup>(1, 6, 8-12)</sup>.

La *Karwinskia humboldtiana* comúnmente conocida como tullidora, coyotillo, capulín tullidor, cacachila, cacatsin y capulincillo entre otros nombres <sup>(13)</sup>, es un arbusto venenoso de la familia de las ramnáceas, que se encuentra ampliamente distribuido en la República Mexicana, sur de los Estados Unidos y Centro América <sup>(14)</sup> (Figura 1).



**Figura 1.** a) Arbusto de la *K. humboldtiana*. b) Distribución en la República Mexicana. c) fruto en diferentes etapas de maduración verde, semimaduro y maduro.

El fruto maduro de la tullidora es de color violeta oscuro, de sabor dulce, que al ser consumido es capaz de producir una parálisis, flácida simétrica, progresiva y ascendente que en los casos graves puede ocurrir la muerte por parálisis bulbar<sup>(9-11)</sup>. No obstante, se han reportado pacientes con parálisis de miembros inferiores que desarrollan insuficiencia respiratoria que pone en peligro la vida e incluso provoca la muerte antes de que aparezca la parálisis de los músculos intercostales<sup>(12)</sup>.

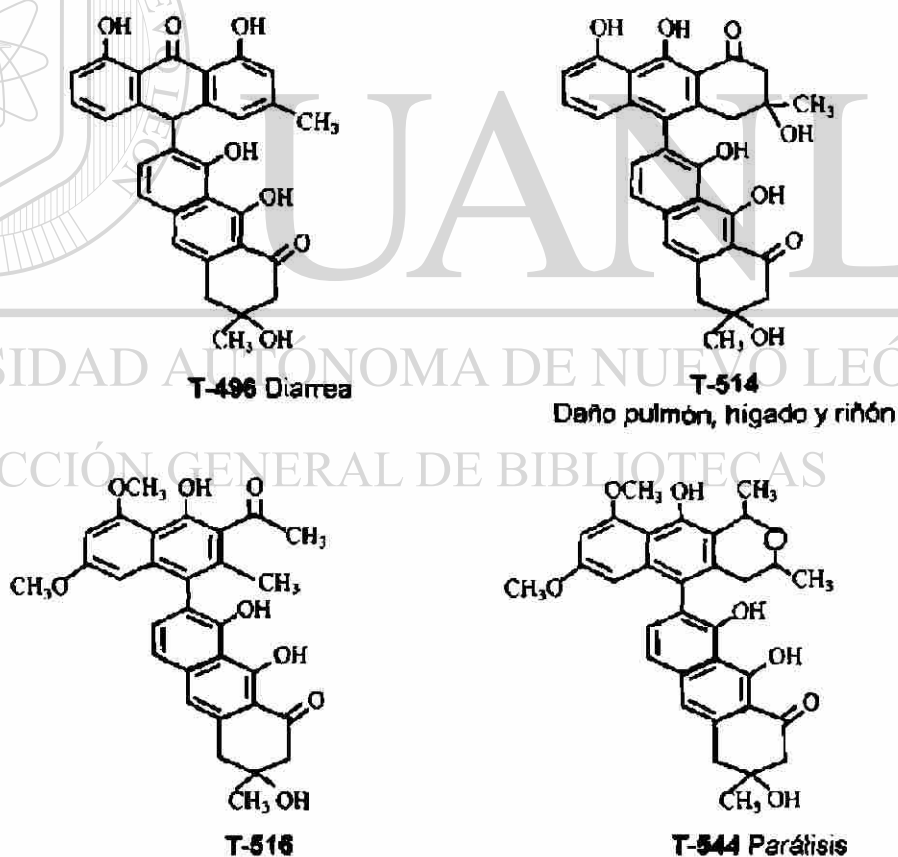
Es importante destacar que, cuando se ingieren grandes cantidades del fruto, la muerte puede ocurrir por daño pulmonar y hepático grave en un lapso de 24 a 48 h<sup>(13)</sup>, sin que se presente el cuadro neurológico característico de esta intoxicación<sup>(11, 16-19)</sup>.

Los efectos tóxicos de esta planta fueron descritos por primera vez por el historiador jesuita Francisco Xavier Clavijero en su libro de la Historia de la Antigua o Baja California en 1789, en el libro se menciona que los indios pericúes no sufrían daño si consumían el fruto sin semillas, ya que es allí donde se localiza el tóxico<sup>(20)</sup>.

Otras citas datan de finales del siglo XIX por los doctores Secundino Sosa y Carlos Culty en 1887 y por el doctor Manuel Godoy y Álvarez en 1890<sup>(17, 18, 21)</sup>. Tal era la importancia de esta intoxicación que en 1895 el poeta Potosino Manuel José Othón describió los efectos paralizantes de la *K. humboldtiana* en su cuento intitulado “El Pastor Gorydon”.

Uno de los reportes que contribuyó en forma importante a la clínica fue hecho por el Dr. Castillo Nájera en 1918, donde describe la intoxicación que sufrieron 106 soldados de la División del Norte en Guaymas Sonora y en donde murieron más del 20%, él practicó tres autopsias y encontró únicamente daño en los nervios periférico<sup>(16)</sup>.

El principio tóxico de la *K. humboldtiana* se encuentra contenido principalmente en las semillas de donde se aislaron originalmente cuatro antracenas diméricas que se clasificaron según su peso molecular como: T-496, T-514, T-516 y T-544, a las que se les consideró como neurotoxinas<sup>(22)</sup> (Figura 2).



**Figura 2.** Toxinas aisladas del fruto de la *K. humboldtiana* (tullidora) y sus efectos en diferentes especies de animales. Dreyer D.L. y cols. *J. Am. Soc.* 97:4985-4990. 1975<sup>(22)</sup>. Bermúdez y cols. *Toxicon* 30:1493-1493. 1992<sup>(27)</sup>

El contenido de las toxinas en el fruto varía según la región geográfica de la que procedan, el tiempo en que se recolecta el fruto, las condiciones de humedad, del tipo de suelo, de la temperatura, de la luz, etc.,<sup>(19)</sup>.

Recientemente, se han aislado de otras plantas del género *Karwinskia* compuestos estructuralmente similares a estas toxinas, como dos diastereoisómeros de la T-514 (PA<sub>2</sub> y PA<sub>3</sub>) que se obtuvieron de la *K. parvifolia*, de la *K. umbellata* se aisló un isómero de la T-514 y de la *K. affin humboldtiana* la T-510, compuestos a los que también se les ha considerado como tóxicos<sup>(24-26)</sup>.

En estudios de toxicidad aguda realizados con el fruto de la *K. humboldtiana* en diferentes especies animales se encontraron lesiones severas, principalmente en hígado y pulmón y de menor magnitud en el riñón.

Cabe destacar, que en el pulmón se observaron diferentes grados de congestión venocapilar intersticial, edema, hemorragia e infiltrado celular consistente en polimorfonucleares y linfocitos. Las lesiones características en el hígado fueron necrosis centrilobulillar, esteatosis de gota fina y congestión venocapilar y sinusoidal. Además, en el riñón se presentó degeneración hidrópica tubular y en algunos casos tumefacción turbia, mientras que en el nervio periférico no se encontró daño. Por lo tanto, se consideró a las toxinas contenidas en el fruto como las responsables de la muerte en estos casos<sup>(27, 28)</sup>.

Por otra parte, en estudios con las toxinas aisladas realizados en roedores se reportó que la T-496 produjo diarrea intensa pocas horas después de su administración, la T-514 causó daño severo en hígado y pulmón y la T-544 fue la responsable del cuadro neurológico, aunque a altas dosis también causó lesión pulmonar y hepática similar a la observada con la T-514 <sup>(28, 29)</sup>.

En el humano la intoxicación con el fruto ocurre en forma accidental principalmente en niños entre los tres y los once años de edad y puede presentarse en cualquier época del año ya que la fructificación depende de la zona geográfica donde se localice la planta. En cuanto a la frecuencia de la intoxicación, se ha reportado que se presentan anualmente de 20 a 30 casos en por lo menos 18 estados de la República Mexicana <sup>(30)</sup>.

El cuadro neurológico de la intoxicación se caracteriza por parálisis flácida, progresiva, simétrica y ascendente, la parálisis al principio es espástica y después flácida, se presenta hiporreflexia tendinosa, generalmente no es dolorosa y si se presenta dolor es de poca intensidad. Se conserva la sensibilidad al dolor, al tacto y la temperatura. Ocasionalmente se presentan vómitos, diarrea y signos de infección en las vías respiratorias superiores. La severidad del cuadro es proporcional a la cantidad y a la actividad del fruto ingerido, si el paciente sobrevive, la recuperación es lenta, la parálisis se vuelve regresiva, en sentido inverso a como se presentó y el tiempo de evolución puede ser de 6 meses a un año <sup>(17, 31, 32)</sup>.

No existe hasta la fecha un tratamiento específico y el manejo de los pacientes es similar al de otras polineuropatías como el Síndrome de Guillain-Barré (SGB), es decir sintomático, de sostén y rehabilitación<sup>(19, 32)</sup>. Si el paciente no recibe rehabilitación se producen deformidades debidas a la atrofia muscular por inactividad, que depende de la extensión y gravedad del ataque inicial <sup>(10,11,18,21,33)</sup>.

Histológicamente la lesión neurológica ha sido identificada como desmielinización segmentaria primaria acompañada de degeneración Walleriana, en la que puede observarse micro y macrovacuolización en las vainas de mielina, así como restos de mielina fagocitados por las células de Schwann<sup>(10, 29,34,36)</sup>.

Se han realizado diferentes trabajos encaminados al esclarecimiento de las alteraciones observadas en los nervios motores en esta polineuropatía, lo cuales se resumirán en forma breve en los párrafos siguientes.

En diversos estudios neurofisiológicos en animales, se han reportado alteraciones en la velocidad e incluso bloqueo en la conducción nerviosa así como, denervación muscular. Se sugiere que estos cambios pudieran ser los responsables de la parálisis <sup>(9, 37-41)</sup>. Por microscopía electrónica se corroboró el daño al nervio ya observado por microscopía de luz y además se encontró lesión en las células de Schwann, degeneración mitocondrial y depleción de glucógeno<sup>(42)</sup>.

En estudios bioquímicos *in vitro*, se reportaron modificaciones en la fosforilación oxidativa que quizá sean resultado de la alteración en la función



mitocondrial, debido a la acción de las toxinas obtenidas después de la extracción del fruto de la *K. humboldtiana* con éter de petróleo <sup>(43)</sup>.

Por otra parte, se cuantificaron por densitometría las proteínas de la mielina de nervios motores y cutáneos de gatos tratados con extracto etéreo del fruto de la *K. humboldtiana*. En este estudio las proteínas específicas la mielina disminuyeron en un 50% en los nervios motores y en los nervios cutáneos la disminución fue menor del 25%. Dichos cambios se presentaron principalmente en las regiones más distales, además, se presentó un aumento en la proteína de 68 KDa que corresponde a los neurofilamentos de 100 Å. A raíz de estos resultados se sugiere que las toxinas son captadas por las terminales nerviosas motoras por endocitosis<sup>(39, 44)</sup>. En gatos se reportó alteración en el transporte axonal de proteínas después de la administración intraneural de la T-544 (tullidinol), esto también se observó después de la administración por V.O.<sup>(41)</sup>.

De los diferentes trabajos de investigación realizados se han planteado una serie de hipótesis que pretenden explicar como ocurre la desmielinización, así se propuso que las toxinas de esta planta pudieran actuar de manera similar al plomo, es decir, por competencia con los iones de calcio o como la toxina diftérica por depresión en la síntesis de proteínas básicas y proteolípidos de la mielina<sup>(23, 45, 46)</sup>.

También se ha propuesto que el daño inicia en la célula de Schwann por cambios metabólicos y alteración de las enzimas lisosomales<sup>(31)</sup>, otra de las hipótesis sugirió que la parálisis resulta del bloqueo total del impulso nervioso y denervación muscular.

Además, también se ha reportado que las toxinas de este arbusto afectan selectivamente a las fibras motoras gruesas, lo que hace improbable que las células de Schwann sean primariamente afectadas<sup>(39, 42)</sup>. A pesar de la información obtenida hasta ahora, aún se desconoce el mecanismo por el cual las toxinas de la *K. humboldtiana* causan desmielinización.

La semejanza que guarda el cuadro clínico de esta intoxicación con el presentado por otras enfermedades desmielinizantes como la poliomielitis y particularmente el Síndrome de Guillain-Barré, dificultan el establecimiento de un diagnóstico diferencial correcto, sobre todo en las etapas tempranas ya que son prácticamente indistinguibles entre sí. Por lo tanto, muchos de los casos de intoxicación son diagnosticados erróneamente como SGB, incluso se ha considerado a esta intoxicación como una de las etiologías del SGB<sup>(30-32)</sup>.

En el SGB y en la intoxicación por *K. humboldtiana* se presenta un cuadro prodrómico caracterizado por afección de vías respiratorias superiores similar a una gripe, también puede presentarse diarrea e incluso vómito<sup>(43, 47)</sup>. Posteriormente, el problema neurológico inicia con debilidad de miembros inferiores que progresa hasta el desarrollo de parálisis flácida simétrica y ascendente, pueden cursar con compromiso respiratorio de leve a severo y en muchos de los casos puede requerirse de respiración asistida. Además, en ambas enfermedades se conserva el control de esfínteres, la sensibilidad al tacto, al dolor y a la temperatura. También se observa pérdida de los reflejos osteotendinosos profundos, disfonía y disfagia<sup>(31, 32, 47-49)</sup>.

Frecuentemente, en el SGB se encuentran afectados los pares craneales, situación que no es común observarla en la intoxicación con la *K. humboldtiana*, no obstante, se han reportado casos de intoxicación en los que se ven afectados los pares craneales<sup>(50, 51)</sup>. Se tiene conocimiento del caso de una paciente intoxicada con la *K. humboldtiana* que desarrolló parálisis descendente, asimétrica y paresia facial bilateral, además de dos niños intoxicados con la *K. johnstonii* Fernández que también presentaron afección de pares craneales<sup>(19, 31, 32)</sup>.

Las diferencias entre éstos dos padecimientos radican principalmente en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y en el nervio periférico; en el LCR de pacientes con el SGB se presenta una disociación albúmino-citológica<sup>(50, 51)</sup>, en cambio en la intoxicación por la *K. humboldtiana* el LCR se reporta como normal<sup>(18, 32, 33, 36)</sup>.

En cortes de nervio periférico se observa infiltrado celular caracterizado por células mononucleares, linfocitos T y macrófagos en el SGB<sup>(50, 52, 53)</sup>. No obstante, existe un solo reporte sobre la presencia de macrófagos en el nervio periférico de cabras principalmente cuando existe desmielinización severa.

Sin embargo, Charlton y Pierce sugirieron que los macrófagos no participan en la generación del daño a la mielina, sino que solamente se encargan de la remoción de los detritos celulares<sup>(34)</sup>. Además, únicamente Padrón-Poyou y Velázquez han reportado en conejos intoxicados la presencia infiltrado de linfocitos en las astas anteriores de la médula espinal<sup>(18)</sup>. Por su parte, Dreyer y cols. reportaron que las toxinas de la *K. humboldtiana* producían una neuropatía paralítica no inflamatoria<sup>(22)</sup>.

En estudios realizados en animales con el fruto de la *K. humboldtiana* y con la T-514 (PA<sub>1</sub>) se ha reportado la presencia de infiltrado de polimorfonucleares (PMN), linfocitos y macrófagos en pulmón. Además se encontró un aumento del TNF $\alpha$  sérico y en el homogenizado pulmonar de ratones intoxicados con la PA<sub>1</sub>. En estudios de toxicidad dérmica en conejos, se reportó en cortes piel infiltrado celular consiste en células mononucleares y linfocitos<sup>(27, 54-56)</sup>.

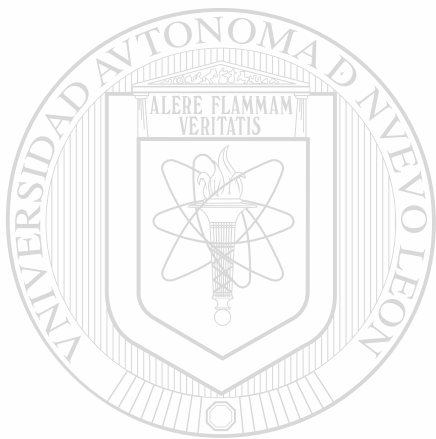
En la fase aguda del SGB, se ha reportado la presencia de títulos altos de IgM dirigida contra la mielina del nervio periférico, capaz de fijar complemento<sup>(52, 57-59)</sup>. No obstante, en la intoxicación por *K. humboldtiana* no se tiene conocimiento de la participación de anticuerpos dirigidos contra componentes de la mielina del nervio periférico.

En la neuritis experimental aguda (EAN), que es el modelo animal del SGB,

Brosnan y cols. reportaron un aumento en la cantidad de mastocitos desgranulados<sup>(60)</sup> y posteriormente Johnson y cols. se sugirieron su participación en la patogénesis de esta enfermedad experimental desmielinizante autoinmune<sup>(61)</sup>. En la intoxicación con el fruto de la *K. humboldtiana* no se ha reportado la presencia de dichas células.

Tomando en cuenta que aún se desconoce del mecanismo de acción, por el cual las toxinas del fruto de la *K. humboldtiana* producen desmielinización en los nervios motores y que además, falta información acerca de la participación del

sistema inmune en esta polineuropatía, se consideró muy importante realizar una investigación sistemática, para buscar la presencia de infiltrado celular e inmunoglobulinas dirigidas contra proteínas de la mielina, en nervios ciáticos de ratas intoxicadas con el fruto de la *K. humboldtiana*.



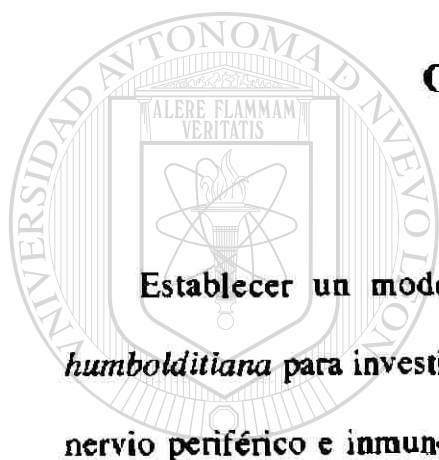
# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



## **OBJETIVO GENERAL**

**Establecer un modelo de neuropatía tóxica con el fruto de la *K. humboldtiana* para investigar la participación de células del sistema inmune en nervio periférico e inmunoglobulinas contra proteínas de la mielina de nervio**

**ciático de ratas Wistar.**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- **Cuantificar la concentración de toxinas presentes en el fruto de la *K. humboldtiana* por CLAR-FR.**
- 2.- **Establecer el esquema de dosificación del fruto de la *K. humboldtiana*, que administrado por vía oral, sea capaz de inducir paresia, parálisis y recuperación en ratas Wistar.**
- 3.- **Evaluar la histología del nervio ciático de ratas tratadas y controles sin tratar, mediante técnicas de rutina y técnicas especiales.**

---

- 4.- **Cuantificar mediante estudio morfométrico el infiltrado celular que estuviese presente en el nervio ciático de ratas tratadas y control sin tratar. Realizar el análisis estadístico de los resultados obtenidos.**
- 5.- **Buscar anticuerpos IgM e IgG dirigidos contra proteínas de la mielina del nervio ciático, en el suero de las ratas Wistar intoxicadas y ratas control sin tratar.**

## CAPÍTULO 2

### MATERIAL Y MÉTODOS

#### 2.1 MATERIAL

##### 2.1.1 Material biológico

##### 2.1.1.1 Fruto maduro de la *K. humboldtiana*

Se utilizó en este estudio fruto maduro y seco de *K. humboldtiana* recolectado

en el municipio de Hidalgo, N. L., en el año de 1997 por el Ing. M.C. Rubén Luján.

##### 2.1.1.2 Ratas Wistar

Se utilizaron ratas Wistar de ambos sexos, con un peso promedio de  $195 \pm 25$  g y fueron distribuidas en lotes de 7 animales como mínimo. Todos los animales se mantuvieron bajo condiciones estándar de laboratorio, ciclo luz-obscuridad de 12 horas, temperatura 22 °C y recibieron agua y alimento completo, balanceado y libre de antibióticos *ad libitum*.



## 2.1.2 Equipo y material general

Agitador de vaivén

Agitador magnético con placa de calentamiento Corning PC101

Balanza analítica Mettler-Toledo AB204.

Balanza granataria Mettler-Toledo PB3001.

Bomba peristáltica de velocidad variable BioRad

Cámara para electroforesis mini-PROTEAN II BioRad

Cámara para electrotransferencia BioRad

Centrífuga Beckman Spinchrone.

Congelador White-Westinghouse -20 °C

Criostato Tissue Tek

Cromatógrafo Hewlett-Packard, modelo 1090 con detector de arreglo de diodos

Cubeta de cuarzo con un trayecto óptico de 1 cm.

Cubreobjetos de vidrio

Espectrofotómetro UV-VIS Beckman, modelo DU-7500, con arreglo de diodos con controlador de temperatura Peltier (variación en la temperatura de  $\pm 0.1$  °C).

Fuente de Poder PowerPac 200 BioRad

Microscopio Binocular Carl Zeiss®

Histoembedder Leica® R134

Histoquimette Leica® TP 1010

Homogeneizador Potter-Elvehjem con pistilo de vidrio y pistilo de teflón.

Jaulas de acrílico y tapas

Jeringas desechables de 10 mL con aguja 20 x 32 mm

Liofilizador VIRTIS mod 6211-0120

Mallas circulares de 30, 50 y 100  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro.

Microcentrífuga Eppendorff modelo 5415C

Microtomo Leica® RM 2025.

Molino Thomas-WILEY, LABORATORY MILL, modelo 4, malla 2 mm.

Papel filtro 3mm de espesor por pliegos

Papel filtro Whatman número 1

Pipetas automáticas y puntillas 0.5-10  $\mu\text{L}$ , 10-100  $\mu\text{L}$  y de 100-1000  $\mu\text{L}$  Eppendorff

Pipetas lineales de diferentes capacidades

Pipeteador automático sigma P5925

Portaobjetos de vidrio

Potenciómetro Beckman Ø 50pHmeter

Probetas de diferentes capacidades

Rotavapor Büchii 461

Rotor de columpio Beckman SW-28, para 28,000 r.p.m.

Tubos para ultracentrifuga de polialómero Beckman.

Ultracentrifuga Beckman L8-M.

Vasos de precipitados diferentes capacidades

### 2.1.3 Reactivos para aislamiento de la mielina de nervio periférico, electroforesis de proteínas, Western Blot e Inmunohistoquímica

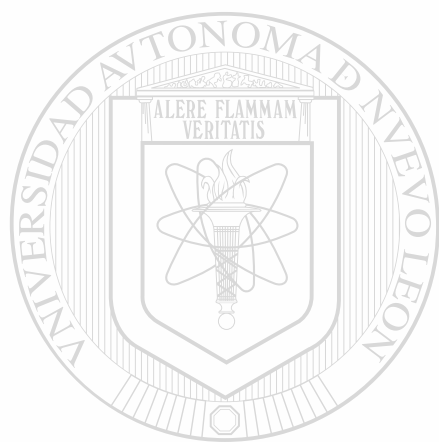
Acrilamida	Sigma	A-3553
Albúmina sérica bovina	Sigma	A-7888
Alcohol metílico	Merck	grado reactivo
Anticuerpo Anti-CD4 de rata	RD	RDI-RTCD4abm-PEPE
Anticuerpo Anti-IgG de Rata conjugada con Peroxidasa hecho en conejo	Sigma	A-5795
Anticuerpo Anti-IgM de Rata conjugada con Peroxidasa hecho en cabra	Pierce	31476
Anticuerpo Anti-IgM de ratón conjugado con Peroxidasa hecho en cabra	Sigma	A8786
Anticuerpo monoclonal Anti-mielina de nervio periférico humano hecho en ratón	ICN	10700
Azul Brillante R	Sigma	B-7290
Azul de Bromofenol	Sigma	B-8026
Bloqueador de Proteínas	DAKO	X-0909
Cloruro de sodio (NaCl)	PQM	grado reactivo
Cloruro de potasio (KCl)	PQM	grado reactivo
Diaminobencidina líquida	DAKO	K-3466
Fosfato de sodio dibásico anhidro (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck	grado reactivo

Fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Merck	grado reactivo
Glicerol	Sigma	G-5516
Glicina	Sigma	G-4392
Lauril Sulfato de Sodio	Sigma	L-4390
Leche en polvo sin grasa	Santa Cruz	SC2325
Marcador de PM Rango amplio	Sigma	M-4038
Medio para montar tejido para congelación O.C.T.	Tissue Tek	4583
Membranas de Nitrocelulosa	Sigma	N-8017
2- Mercaptoetanol	Sigma	M-6250
N'N'-Metilen-bis-acrilamida	Sigma	M-2022
PBS (Buffer de Fosfatos)	Sigma	P-7059
Persulfato de Amonio	Sigma	A-9164
Proteína Básica de la Mielina de Conejo	Sigma	M-2016
Sacarosa	Sigma	S9378
Sistema LSAB(R)2 inmunotinción peroxidasa	Dako	K-0609
Sistema para detección de proteínas	BioRad	500-0002
TEMED	Sigma	T-7024
Trizma Base (Biología Molecular)	Sigma	T-8524
Trizma Base (Grado reactivo)	Sigma	T-1503

#### 2.1.4 Reactivos para tinciones histológicas de rutina y especiales

Ácido acético glacial	ANALYTYKA	Grado reactivo
Ácido clorhídrico (HCl 12N)	ANALYTYKA	Grado reactivo
Alcohol etílico absoluto	ANALYTYKA	Grado reactivo
Alcohol etílico 96°	ANALYTYKA	Grado reactivo
Alcohol isopropílico	ANALYTYKA	Grado reactivo
Azul luxol	Sigma	S 6140
Azul de Toluidina	Merck	115930
Carbonato de litio ( $\text{Li}_2\text{CO}_3$ )	Merck	105670
Entellan (resina de montaje)	Merck	107960
Eosina amarilla	ANALYTYKA	

Etilenglicol	Quimik especializada	
Formalina 10%	ANALYTYKA	
Hematoxilina anhidra	ANALYTYKA	
Hidróxido de amonio	ANALYTYKA	Grado reactivo
Nitrato de plata $\text{AgNO}_3$	Merck	
Sulfato de aluminio ( $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ )	ANALYTYKA	
Thiosulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) anhidro	Merck	106512
Violeta de crecilo	Merck	105235
Xilol	ANALYTYKA	Grado reactivo
Yodato de sodio ( $\text{NaIO}_3$ )	ANALYTYKA	S4050SR



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



## 2.2 MÉTODOS

### 2.2.1 Procesamiento del fruto maduro de la *K. humboldtiana*

Para este estudio se utilizó fruto maduro y seco de la tullidora procedente del municipio de Hidalgo, N. L. recolectado en 1997 por el Ing. Mc. Rubén Luján. Posteriormente, se molió el fruto en un molino Thomas-WILEY, LABORATORY MILL, modelo 4, malla 2 mm y se cribó primeramente en una malla de 30  $\mu\text{m}$ , el fruto así obtenido se cribó nuevamente en una malla de 50 y 100  $\mu\text{m}$  respectivamente. El fruto ya cribado se almacenó a 4 °C en un recipiente de vidrio protegido de la luz hasta su uso.

#### 2.2.1.1 Cuantificación de las de toxinas del fruto de la *K. humboldtiana* por CLAR-FR

A 0.5 g del fruto molido y cribado se le realizaron tres extracciones con 5 mL de acetato de etilo, se recuperó cada una de las fases orgánicas se mezclaron y después se evaporó el solvente en un rotavapor Büchi 461 a 35°C. El residuo se disolvió en 0.5 mL de cloroformo. El extracto se analizó por CLAR en fase reversa C18 con arreglo de diodos de acuerdo con el método reportado por Salazar, M. L. y cols. 1996<sup>(62)</sup>. Se obtuvo del cromatograma el área bajo la curva en porcentaje para el diastereoisómero de la T-514 (PA<sub>2</sub>), la T-514 (PA<sub>1</sub>), la mezcla de T-544 y la T-496 de acuerdo con el método de normalización de Poole & Poole 1991<sup>(63)</sup>.

### 2.2.2 Determinación del esquema de dosificación del fruto de la *K. humboldtiana* para el desarrollo del modelo experimental de polineuropatía

Para este estudio se utilizaron ratas Wistar de ambos sexos ( $n \geq 7$ ), las cuales previo ayuno de 6 hs recibieron por V.O. mediante una sonda esofágica, dosis únicas de 1.25, 1.5, 1.75, 1.76, 1.77, 1.8 y 1.9 g/Kg y una dosis de 3.5 g/Kg fraccionada en 5 o 7 dosis del fruto maduro de la *K. humboldtiana* en suspensión acuosa, el grupo control solo recibió el vehículo (Figura 3). Las ratas se mantuvieron bajo condiciones estándar de laboratorio como ya se describió previamente y recibieron agua y alimento *ad libitum*. El esquema de dosificación fraccionada se muestra en las tablas I y II.



**Figura 3.** Método de administración de las dosis únicas y dosis fraccionada del fruto de la *K. humboldtiana* V.O.

Dosis total fraccionada g/Kg	No. de dosis	Periodo en días
3.5	7	28

Dosis	g/Kg	Intervalo de administración
1	1.0	Cada 4 días*
2 - 4	0.25	
		Descanso de 10 días
5	0.25	Cada 4 días* *administradas en dosis individuales
6	0.5	
7	1.0	

**Tabla I.** Esquema de dosificación fraccionada por V.O. del fruto de la *K. humboldtiana*

Dosis total fraccionada g/Kg	No. de dosis	Periodo en días
3.5	5	14

Dosis	g/Kg	Intervalo de administración
1	1.5	2 veces por semana administradas en dosis individuales
2 - 5	0.5	

**Tabla II.** Esquema simplificado de dosificación fraccionada por V.O. del fruto de la *K. humboldtiana*.

La concentración de la suspensión acuosa del fruto fue de 0.2 g/mL y se administró un volumen de  $1.52 \pm 0.27$  mL a las ratas que recibieron las dosis comprendidas entre 1.25 y 1.9 g/Kg, para las dosis de 0.25 g/Kg el volumen fue de  $0.22 \pm 0.024$  mL y para la dosis de 0.5 g/Kg se administraron  $0.47 \pm 0.052$  mL.

### **2.2.2.1 Registro del peso corporal**

Se hizo un registro diario del peso de todos los animales en una balanza granataria digital Mettler-Toledo PB3001 durante las primeras dos semanas después de la administración de la dosis inicial del fruto. Posteriormente, se registró el peso cada tercer día hasta el día 58 después de la dosis inicial y finalmente se registró una vez por semana hasta el día 112 después de la dosis inicial.

### **2.2.2.2 Evaluación clínica**

Durante todo el experimento se evaluaron los siguientes manifestaciones de intoxicación: piloerección, cambios en la actividad espontánea, alteraciones en los reflejos osteotendinosos, tono muscular, debilidad, jiba, función respiratoria, alopecia, alteraciones en la marcha, parálisis de miembros posteriores y/o anteriores.

### **2.2.2.3 Obtención de las muestras séricas**

Se obtuvo la sangre de las ratas tratadas y ratas control por punción cardíaca, posteriormente esta se centrifugó a 3000 r.p.m. por 5 min. Se separó el suero y se almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  en alícuotas de  $150\text{ }\mu\text{L}$ .

### **2.2.2.4 Obtención de los nervios ciáticos**

Se disecaron los nervios ciáticos de ambas extremidades posteriores desde su salida de la columna vertebral hasta las ramas peroneal y tibial a nivel de la rodilla de las ratas tratadas y de las ratas control. El nervio derecho se fijó en formalina al 10% amortiguada con sales de fosfatos. El nervio izquierdo se colocó en OCT y se guardó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



### 2.2.3 Aislamiento de la mielina del nervio ciático

Se obtuvieron por disección los nervios ciáticos de 55 ratas Wistar normales de ambos sexos de forma similar a la descrita en la sección 2.2.2.4. Los nervios se cortaron en trozos pequeños, se liofilizaron, se pesaron y se almacenaron al vacío a -20 °C.

La mielina se obtuvo mediante la técnica de Wiggins y cols., 1975<sup>(64)</sup> donde, el aislamiento de la mielina se realizó a través de ultracentrifugación por gradiente de densidad discontinuo en sacarosa. Todas las soluciones utilizadas y el procedimiento seguido se realizó a una temperatura de entre 4 °C y 8 °C. Ver apéndice A para preparación de reactivos pagina 124.

Los nervios liofilizados se procesaron en fracciones de 250 mg como se describe a continuación. Se homogeneizaron 250 mg de nervio ciático liofilizado en 50 mL de sacarosa 0.29 M en un homogeneizador Potter-Elvehjem con pistilo de vidrio esmerilado.

Una vez homogeneizado el nervio se llevó a un volumen de 100 mL con sacarosa 0.29 M. Un sexto del homogeneizado (16.7 mL) se colocó sobre 15.0 mL de sacarosa 0.85 M en tubos de ensayo de polialómero Beckman. Posteriormente se colocaron en un rotor de columpio Beckman SW28 y se centrifugaron a 25,000 r.p.m. (82,000 g) durante 45 min. en una ultracentrífuga Beckman L8-M. Una vez transcurrido este tiempo se recuperó la capa de mielina cruda de la interfase con una pipeta pasteur y se descartó el resto de la solución.

La mielina recuperada de cada uno de los tubos se colocó en un matraz Erlen-Meyer de 250 mL y se llevó a un volumen final de 150 mL con agua bidestilada. La suspensión se centrifugó a 25,000 r.p.m. (82,000 g) por 15 min. Se recuperó la mielina por decantación y se eliminó el sobrenadante.

La mielina que se recuperó en el paso anterior se resuspendió nuevamente en 60 mL de agua bidestilada, se dejó reposar en hielo por 20 min. y se centrifugó a 10,000 r.p.m. (13,200 g) por 10 min. Se recuperó la mielina por decantación y se eliminó el sobrenadante. Finalmente, se resuspendió la mielina en 60 mL de agua bidestilada y se centrifugó a 15,000 r.p.m. (30,000 g) por 15 min. La mielina obtenida se liofilizó y se almacenó al vacío a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### **2.2.3.1 Determinación de proteínas por el método de Bradford**

Para la determinación del contenido de proteínas en la mielina de nervio se siguió el método de Bradford, en donde la absorbancia máxima de una solución ácida de azul brillante de Coomassie G-250 cambia de 465 nm a 595 nm cuando se une a la proteína. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de la proteína.

**2.2.3.1.1 Solución estándar de albúmina.** Se preparó una solución de albúmina bovina a una concentración de 1000  $\mu\text{g/mL}$ . La albúmina bovina se disolvió en agua bidestilada.

**2.2.3.1.2 Reactivo de Bradford.** El reactivo concentrado de Bradford (BioRad) se diluye 1:5 con agua destilada y se filtró en un papel Whatman 1 antes de su uso.

**2.2.3.1.3 Curva de calibración.** Se determinó por triplicado el cambio de absorbancia a 595 nm de cada uno de los estándares de albúmina. El promedio de estos valores fue utilizado para graficar la curva de calibración.

Las concentraciones de los estándares empleadas para la realización de la curva de calibración se describen en la tabla III.

Proteínas (µg/mL)	Albúmina µL	Agua bidestilada µL	Reactivo de Bradford (µL)
0.0	---	200.0	800
2.5	2.5	197.5	800
5.0	5.0	195.0	800
7.5	7.5	192.5	800
10.0	10.0	190.0	800
15.0	15.0	185.0	800
20.0	20.0	180.0	800

**Tabla III.** Concentraciones de proteína empleadas para la realización de la curva de calibración.

**2.2.3.1.4 Preparación y dilución de la mielina.** Se pesó 1mg de la mielina liofilizada y se disolvió en 500 µL de buffer de muestra y se llevó a ebullición durante 3 minutos. La concentración de proteínas se realizó sin dilución y con dilución 1:10 en el buffer de muestra 2x.

**2.2.3.1.5 Cálculos.** La concentración de proteínas de la mielina fue interpolada en la curva de calibración obtenida al graficar el valor de absorbancia contra la concentración de proteína de los estándares, los valores fueron ajustados con el método de mínimos cuadrados (programa estadístico del espectrofotómetro UV-VIS Beckman DU-7500).

## **2.2.4 Estudio histológico**

### **2.2.4.1 Tinción de hematoxilina y eosina**

Se hicieron cortes del nervio ciático incluido en parafina de un espesor de  $6\ \mu\text{m}$  con un microtomo Leica, se desparafinizaron y posteriormente se tiñeron con la técnica estándar de H y E. La evaluación morfológica del tejido se realizó por microscopía de luz a 10X y 40X en un microscopio binocular Carl Zeiss®. Ver apéndice B páginas 125 a 127 para descripción detallada de la técnica y preparación de reactivos.

### **2.2.4.2 Método de Klüver-Barrera**

Se hicieron cortes de  $6\ \mu\text{m}$  de espesor del nervio ciático incluido en parafina tanto de las ratas intoxicadas como de las ratas control. Las muestras posteriormente se tiñeron mediante el método descrito por Klüver-Barrera en 1960, para el estudio de la mielina y la observación de células<sup>(65)</sup>. La evaluación morfológica se realizó por microscopía de luz como se mencionó en la sección 2.2.4.1. Ver apéndice B páginas 128 y 129.

### **2.2.4.3 Tinción de azul de toluidina**

Este método es específico para la detección de mastocitos del tejido conectivo presentes en nervio ciático. Para esta tinción se hicieron cortes de  $6\ \mu\text{m}$  de espesor del nervio ciático incluido en parafina, posteriormente se tificaron según el método estándar de azul de toluidina<sup>(66)</sup>, la evaluación de los cortes se realizó por microscopía de luz como ya se describió previamente. La técnica se describe en el apéndice B página 130.

### **2.2.4.4 Método de Marsland-Glees y Erickson**

Técnica especial de impregnación con plata para la identificación y evaluación de la integridad axonal en el nervio periférico. Se hicieron cortes de  $9\ \mu\text{m}$  de espesor del nervio ciático incluido en parafina tanto de las ratas tratadas como de las ratas control. Previa desparafinización se procedió a teñir las muestras según el método descrito por Marsland<sup>(67)</sup>. La evaluación de los cortes se realizó por microscopía de luz. La técnica se describe en el apéndice B páginas 125, 131 y 132.

## **2.2.5 Estudio morfométrico**

### **2.2.5.1 Cuantificación de mastocitos**

La cuenta de mastocitos endoneurales se realizó a un aumento de 40x por microscopía de luz, en cortes de nervio ciático teñidos con azul de toluidina y con el método de Klüver-Barrera. Se observó un área de  $5.74\ \text{mm}^2$  ( $2.87\ \text{mm}^2$  para cada una

de las tinciones) que se determinó después de medir el ancho y el largo del nervio ciático en mm, con una escala montada en el ocular. Finalmente, se expresó el promedio del número de mastocitos por  $\text{mm}^2$ , del porcentaje de mastocitos no desgranulados y desgranulados, así como el promedio de mastocitos no desgranulados y desgranulados por  $\text{mm}^2$  de cada una de las etapas de la polineuropatía y del grupo control sin tratar.

#### **2.2.5.2 Cuantificación de linfocitos**

La cuenta de linfocitos endoneurales se realizó por microscopía de luz a un aumento de 40x, en cortes del nervio ciático teñidos con el método de Klüver-Barrera. El área observada fue de 2.0 a 3.0  $\text{mm}^2$  de nervio ciático y se determinó después de medir el ancho y el largo del nervio ciático en mm con una escala montada en el ocular. Finalmente, se expresó el valor promedio de linfocitos por  $\text{mm}^2$  en cada una de las etapas de la neuropatía y en el grupo control sin tratar.

#### **2.2.6 Identificación de linfocitos por inmunohistoquímica**

La inmunotinción con peroxidasa se realizó con un anticuerpo monoclonal anti CD-4 comercial específico para tejido de rata, como control positivo se utilizó amígdala de rata y como control negativo, se omitió el primer anticuerpo. El procedimiento se detalla en el apéndice C página 134.

## 2.2.7 Western Blot

### 2.2.7.1 Electroforesis de la mielina del nervio ciático

Ver apéndice D página 136 para la preparación de reactivos.

**2.2.7.1.1 Preparación de las muestras. Marcadores de Peso molecular** A una alícuota de 10  $\mu\text{L}$  del marcador de peso molecular de 205,000 a 6,500 KDa se le adicionaron 20  $\mu\text{L}$  del buffer de muestra 2X y se llevó a ebullición en baño de agua por 2 minutos. Se aplicaron 10  $\mu\text{L}$  del marcador de peso molecular a un carril de 5 mm de ancho por 12 mm de alto (0.6  $\text{cm}^2$ ).

**Proteína básica de la mielina de conejo (P<sub>1</sub>).** La PBM de conejo se reconstituyó con 150  $\mu\text{L}$  de buffer de muestra 2X (1 mg/150  $\mu\text{L}$ ), se hicieron alícuotas de 30  $\mu\text{L}$ , se colocaron en tubos Eppendorff de 100  $\mu\text{L}$  y se congelaron a  $-70^\circ\text{C}$  hasta su uso. A 30  $\mu\text{L}$  de la PBM se le adicionó un 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol y se llevó a ebullición en baño de agua por 4 min. Se aplicaron de 150 a 200  $\mu\text{g}$  de la PBM en un volumen de 25 a 30  $\mu\text{L}$  a un carril de 5.7 cm de ancho por 1.2 cm de alto (6.84  $\text{cm}^2$ ).

### **Mielina de nervio ciático**

Un mg. de la mielina liofilizada se disolvió en 40  $\mu\text{L}$  del buffer de muestra 2X y se le agregó un 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol, se agitó en un agitador mecánico y se llevó a ebullición en baño de agua por 4 min. Se aplicaron 1.25 mg de la mielina de nervio ciático en un volumen de 50 a 55  $\mu\text{L}$  a un carril de 5.7 cm de ancho por 1.2 cm de alto (6.84  $\text{cm}^2$ ).

**2.2.7.1.2 Preparación de los geles de poliacrilamida-SDS.** Se preparó el gel concentrador de poliacrilamida-SDS al 5% y los geles separadores al 12 y 14% según se muestra en las tablas IV y V. Las medidas finales del gel fueron, de 2.5 cm de alto por 8.3 cm de ancho para el gel concentrador y de 4.8 cm de alto por 8.3 cm de ancho para el gel separador.

Reactivo	Cantidad
Acrilamida/bis-acrilamida 30%	500 $\mu$ L
Buffer Tris/HCl pH 6.8	300 $\mu$ L
Agua desionizada	2.16 mL
SDS 20%	15 $\mu$ L
PSA 10 %	15 $\mu$ L
TEMED	2 $\mu$ L

Tabla IV. Preparación del Gel Concentrador de Poliacrilamida al 5%

Reactivo	12%	14%
Acrilamida/bis-acrilamida 30%	1.99 mL.	2.3 mL
Buffer Tris/HCl pH 6.8	915 $\mu$ L	1.1 mL
Glicerol 50%	336 $\mu$ L	392 $\mu$ L
Agua desionizada	1.6 mL	630 $\mu$ L
SDS 20%	25 $\mu$ L	25 $\mu$ L
PSA 10 %	18 $\mu$ L	24 $\mu$ L
TEMED	3.5 $\mu$ L	5 $\mu$ L

Tabla V. Preparación del gel separador de poliacrilamida al 12% y 14%

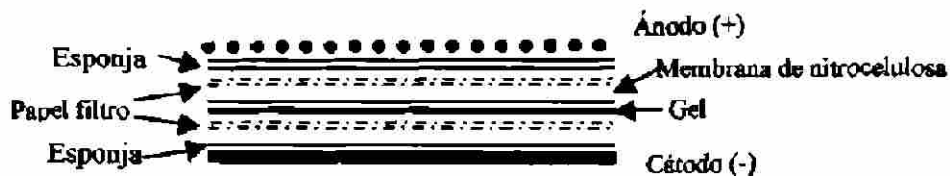


### **2.2.7.1.3. Condiciones de la electroforesis de proteínas.**

La electroforesis se realizó en una cámara para electroforesis mini PROTEAN marca BioRad y como fuente de poder Power Pac 200 de Bio Rad. Tanto para la mielina del nervio ciático como para la PBM de conejo, el corrimiento en el gel concentrador se realizó a 30 volts con amperaje libre, y del corrimiento en el gel separador llevó a cabo a 60 volts y el amperaje se dejó libre. Una vez concluida la electroforesis se obtuvo el gel y se cortó una tira de aproximadamente 1.5 cm de ancho de la parte derecha, en donde se localizaron los marcadores de peso molecular y parte de la muestra de mielina del nervio ciático o de la PBM de conejo y se colocó en azul de Coomassie por 16 hs, el resto del gel se preparó para su electrotransferencia.

### **2.2.7.2 Electrotransferencia**

Antes de finalizar la electroforesis se colocaron en buffer de transferencia frío durante 45 min, 4 papeles filtro de 3 mm de espesor y una pieza de la membrana de nitrocelulosa del tamaño del gel. Una vez que se tiene el gel se colocan 2 de los papeles filtro sobre una esponja de fibra impregnada con el buffer de transferencia, se retiran muy bien las burbujas con un agitador de vidrio, esta operación se realizó cada vez que se colocó una nueva capa del emparedado, después, se colocó el gel sobre el papel filtro, sobre el gel se colocó la membrana de nitrocelulosa y finalmente otros dos pedazos de papel filtro y la otra esponja de fibra, por último se cerró bien el dispositivo, el procedimiento se muestra en la figura 4.



**Figura 4.** Representación esquemática de la preparación del gel de poliacrilamida y la membrana de nitrocelulosa para la transferencia.

Se colocó el dispositivo dentro de la cámara de transferencia de forma que la membrana de nitrocelulosa quedara del lado del ánodo. La transferencia se realizó en frío, con agitación constante, a 100 volts y amperaje libre por 1.0 h, una vez transcurrido este tiempo se recuperó la membrana de nitrocelulosa y se tiñó con solución de Ponceau por 10 min. en agitación y a temperatura ambiente, se lavó con PBS IX para quitar el exceso del colorante, se colocó sobre un papel filtro y se dejó secar.

Se recuperó el gel y se tiñó en azul de Coomassie por 16 hs. Los geles que se pusieron a teñir en el azul de Coomassie se destiñeron por agitación con solución decolorante en repetidas ocasiones hasta eliminar el exceso del colorante lo que permitió la visualización del patrón característico de las bandas de proteína de cada una de las muestras analizadas. Ver apéndice D página 137.

### **2.2.7.3 Detección por WB de inmunoglobulinas séricas contra la mielina del nervio ciático**

Se cortaron tiras del papel de nitrocelulosa previamente transferido de 3 mm de ancho y cada una se bloqueó con 1.5 mL de solución albúmina sérica bovina al 1% en PBS 1X pH 7.4 por 30 min a temperatura ambiente y agitación en vaivén. Una vez transcurridos los 30 min se retiró la solución de bloqueo y se procedió a hacer tres lavados con PBS 1X pH 7.4 durante 10 min cada uno en agitación en vaivén y a temperatura ambiente.

Después del último lavado se incubaron las tirillas por 2 hs a temperatura ambiente y agitación ligera con un combinado de ocho sueros de ratas de cada una de las etapas de la neuropatía, excepto en la etapa de recuperación en que solo se emplearon 7, así como del grupo de ratas control sin tratar, posteriormente, se probaron individualmente cinco sueros de cada una de las etapas de la polineuropatía para la detección de IgG. La dilución del suero en todos los casos fue de 1:20 y se diluyó en solución de albúmina sérica bovina al 0.1% en PBS 1X pH 7.4.

Como control positivo se utilizó anticuerpo monoclonal comercial contra mielina del nervio periférico a una dilución de 1:120. El volumen utilizado por tirilla fue de 1.5 mL. Posteriormente, se incubaron las tirillas durante toda la noche a 4°C.

Se retiraron las tirillas del refrigerador y se dejaron a temperatura ambiente por espacio de 1.0 hs, después se procedió a retirar cada uno de los sueros y se hicieron tres lavados con PBS 1X pH 7.4 como se describió anteriormente.

Después del tercer lavado se procedió a incubar las tirillas con el segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa contra IgG de rata a una dilución de 1:1,500, contra IgM de rata a una dilución de 1:1,500 y contra IgM de ratón a una dilución de 1:1000 para el control positivo, por 2 hs a temperatura ambiente y agitación ligera.

Al terminó de las 2 hs se realizaron tres lavados con PBS 1X pH 7.4 como ya se describió. Finalmente se procedió a revelar cada una de las tirillas en una solución de 3'3 diaminobencidina comercial, el tiempo de revelado fue 3 a 5 min. De detiene la reacción al colocar las tirillas en agua bidestilada y luego en PBS 1X pH 7.4.

#### **2.2.7.4 Detección por WB de inmunoglobulinas séricas contra la PBM de conejo**

Se cortaron tiras del papel de nitrocelulosa previamente transferido de 3 mm de ancho y cada una se bloqueó con 1.5 mL de solución de leche en polvo sin grasa al 0.1% en PBS 1X pH 7.4 durante 1hs a temperatura ambiente y agitación en vaivén.

Una vez transcurridos los 30 min se retiró la solución de bloqueo y se procedió a hacer tres lavados con PBS 1X pH 7.4 durante 10 min cada uno en agitación en vaivén a temperatura ambiente.

Después del último lavado se incubaron las tirillas por 2 hs a temperatura ambiente y agitación ligera con una mezcla de ocho sueros de ratas de cada una de la etapas de la neuropatía, excepto en la etapa de recuperación en que solo se emplearon 7, así como del grupo de ratas control sin tratar, posteriormente, se probaron individualmente cinco sueros de cada una de las etapas de la polineuropatía.

La dilución del suero en todos los casos fue de 1:20 y se diluyó en solución de leche en polvo al 0.01% en PBS 1X pH 7.4. Posteriormente, se incubaron las tirillas durante toda la noche a 4°C.

Se retiraron las tirillas del refrigerador y se dejaron a temperatura ambiente por espacio de 1.0 h, después se procedió a retirar cada uno de los sueros y se hicieron tres lavados con PBS 1X pH 7.4 como se describió anteriormente.

Después del tercer lavado se procedió a incubar las tirillas con el segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa contra IgG de rata hecho en conejo a una dilución de 1:2,500, contra IgM de rata hecho en cabra a una dilución de 1: 5000 y contra IgM de ratón a una dilución de 1:1000 para el control positivo, por 2 hs a temperatura ambiente y agitación ligera.

Al terminó de las 2 hs se realizaron tres lavados con PBS 1X pH 7.4 como ya se describió. Finalmente se procedió a revelar cada una de las tirillas en una solución de 3'3 diaminobencidina comercial, el tiempo de revelado fue 3 a 5 min. De detiene la reacción al colocar las tirillas en agua bidestilada y luego en PBS 1X pH 7.4.

Adicionalmente se realizó la detección IgM dirigida contra la PBM en una mezcla de 8 sueros de ratas Wistar de nuestro bioterio y en una mezcla de 8 sueros de ratas Sprague-Dawley sin tratar, procedentes del bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL. Ver apéndice E página 139 para la preparación de reactivos.

## **2.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

### **2.3.1 Análisis de Varianza (ANOVA)**

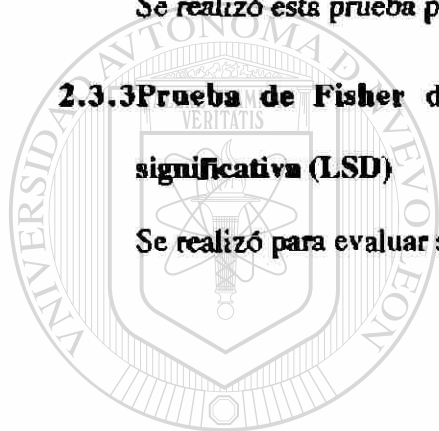
Se utilizó para la evaluación de los resultados morfométricos de mastocitos y linfocitos, así como, para determinar si influye o no el género de las ratas en las variables bajo estudio.

### **2.3.2 Prueba de Kolmogorov-Smirnov**

Se realizó esta prueba para evaluar el tipo de distribución de los resultados.

### **2.3.3 Prueba de Fisher de comparaciones múltiples de diferencia mínima significativa (LSD)**

Se realizó para evaluar si hubo diferencia significativa entre los grupos de estudio.



UANL

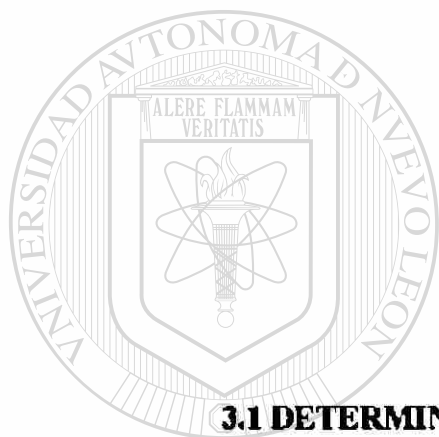
---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## CAPÍTULO 3



### RESULTADOS

#### 3.1 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE

#### TOXINAS EN EL FRUTO DE LA *K. humboldtiana* POR CLAR- FR

La cuantificación de las toxinas se realizó por cromatografía de líquidos de alta resolución después de la extracción de 0.5 gr del fruto de la *K. humboldtiana* con acetato de etilo. En el cromatograma se observan los tiempos de retención en minutos de las toxinas y el área bajo la curva de la T-514 y de la mezcla de la T-544 como se muestra en la figura 4 y en la tabla VI se muestran las concentraciones en porcentaje de cada una de estas toxinas.

Data File C:\EPCHEN\1\DATA\SEPT2A\022-0301.D

Page 1 of 1

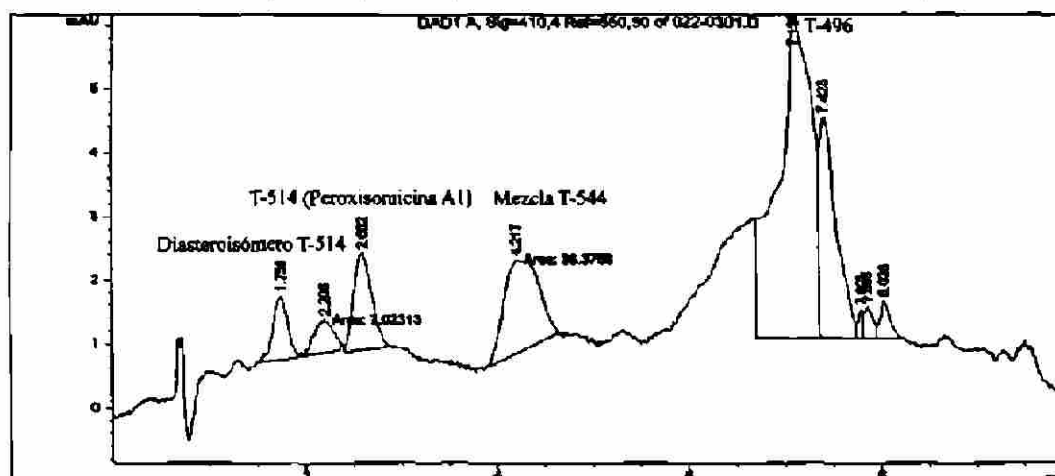


Figura 5. Cromatograma de las toxinas del fruto maduro de la *K. humboldtiana* por CLAR-FR

Compuesto	%
Diastereoisómero de la T-514	4.2
Peroxisomicina A1 (T-514)	7.9
Complejo T-544	14.6
T-496	50.3

Tabla VI.- Relación del porcentaje de área en el cromatograma de cada una de las toxinas del fruto maduro de la *K. humboldtiana*. (Método de normalización Poole & Poole 1991)<sup>(63)</sup>.

## DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

### 3.2 OBTENCIÓN DE LA MIELINA DE NERVIOS CIÁTICOS

#### 3.2.1 Rendimiento de la mielina de nervio ciático

A partir de 500 mg de nervio ciático liofilizado y homogeneizado procedente de ratas Wistar normales, se obtuvo un total de 32.7 mg de mielina por ultracentrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa, siendo el rendimiento en este proceso del 6.54%.



### 3.2.1.1 Concentración de proteínas en la mielina de nervio ciático

La concentración de proteínas en la mielina de nervio ciático obtenida en el punto anterior fue de 68.17  $\mu\text{g}/\text{mg}$ . según el método de Bradford.

## 3.3 MODELO EXPERIMENTAL DE POLINEUROPATÍA

### CON EL FRUTO DE LA *K. humboldtiana*

Para este estudio se probaron por V.O. diferentes dosis únicas y una dosis de 3.5 g/Kg del fruto maduro de la *K. humboldtiana* que se administró fraccionada en cinco dosis, los resultados se muestran en las tablas VII y VIII respectivamente.

Dosis Única g/Kg	Mortalidad		Desarrollo de Paresia Parálisis
	n = 8	%	
1.25	0/8	0	Ninguna
1.50	1/8	12.5	Ninguna
1.75	3/8	37.5	Paresia severa
1.76	5/8	62.5	Parálisis
1.77	7/8	87.5	Parálisis
1.80	7/8	87.5	Parálisis
1.90	8/8	100	—

**Tabla VII** Relación de dosis únicas empleadas para la elección del esquema de dosificación para el desarrollo del modelo experimental de polineuropatía.

En esta tabla se puede observar que con las dosis de 1.76, 1.77 y 1.8 g/Kg las ratas que no murieron desarrollaron parálisis, sin embargo, se descartó el uso de este esquema de dosificación por no obtenerse el número de muestra suficiente, debido a la alta mortalidad que se presentó a estas dosis.

Por lo tanto, se procedió a la administración del esquema de dosificación fraccionada como se muestra en la tabla VIII.

Dosis total fraccionada g/Kg	No. de dosis	Periodo en días	Mortalidad	
			n = 8	%
3.5	5	14	1/8	12.5

Dosis	g/Kg	Intervalo
1	1.5	2 veces por semana administradas en forma individual
2 - 5	0.5	

Desarrollo de paresia (32 días ddi\*)  
parálisis (52 días ddi) y recuperación  
a partir del día 65 ddi.  
\*ddi después de la dosis inicial

**Tabla VIII.** Resultados después de la administración del esquema de dosis fraccionada (3.5g/Kg) V.O del fruto de la *K. humboldtiana*.

En esta tabla se puede observar que se administraron un total de 5 dosis del fruto maduro de la *K. humboldtiana* en un periodo de 14 días, con este esquema se observó el desarrollo de paresia (32 días ddi) que progresó hasta parálisis (52 días ddi) respectivamente. Seguida de la parálisis se presentó la recuperación de las ratas a partir del día 65 ddi. Con este modelo, el 87.5 % de las ratas tratadas desarrolló el cuadro neurológico tradicionalmente descrito para esta intoxicación.

### **3.3.1 Manifestaciones clínicas de intoxicación**

Todas las ratas tratadas con el fruto de la *K. humboldtiana* se revisaron a diario y se registro la aparición de los parámetros clínicos de intoxicación mencionados en el capítulo 2 sección 2.2.2.2.

#### **3.3.1.1 Etapa sin neuropatía (Grupo 24 días ddi)**

Las principales manifestaciones clínicas de intoxicación se presentaron en la primera semana después de la administración de la dosis inicial del fruto. Estos animales mostraron pérdida de peso importante, debilidad, piloerección, disminución en la actividad espontánea y como signo constante de la intoxicación se presentó disnea desde ligera hasta severa que en algunos casos, culminó en la muerte de la rata. Durante la segunda y tercera semana se observó una recuperación aparente que se caracterizó principalmente por aumento de peso corporal, disminución de la disnea, sin embargo, durante este periodo las ratas presentaron alopecia en el área frontal de la cara y en la región dorsal. En la figura 6a se puede observar una rata representativa de la etapa sin neuropatía .

#### **3.3.1.2 Etapa de paresia (Grupo 48 días ddi)**

En este grupo de animales además de los signos ya mencionados para el grupo sin neuropatía (24 días ddi), se observó adelgazamiento e hiperextensión del tren posterior, jiba, hiporreflexia y dificultad en la marcha. Nuevamente se observó pérdida de peso que coincide con la instalación de la paresia  $36 \pm 4$  días. Además, se presentó dificultad respiratoria de moderada a severa (Figura 6b).

### **3.3.1.3 Etapa de parálisis (Grupo 58 días)**

En estos animales además de los signos de intoxicación ya mencionados, el adelgazamiento del tren posterior se hizo más evidente, la paresia progresó hasta el desarrollo de la parálisis flácida bilateral y arrastre del tren posterior.

El peso corporal permanece bajo sin variaciones significativas, en algunos animales se observaron las manos en garra o en gota. La alopecia se hizo más evidente y en algunos casos se presentó aumento de la frecuencia respiratoria, principalmente en aquellas ratas que mostraron un mayor deterioro (Figura 6d).

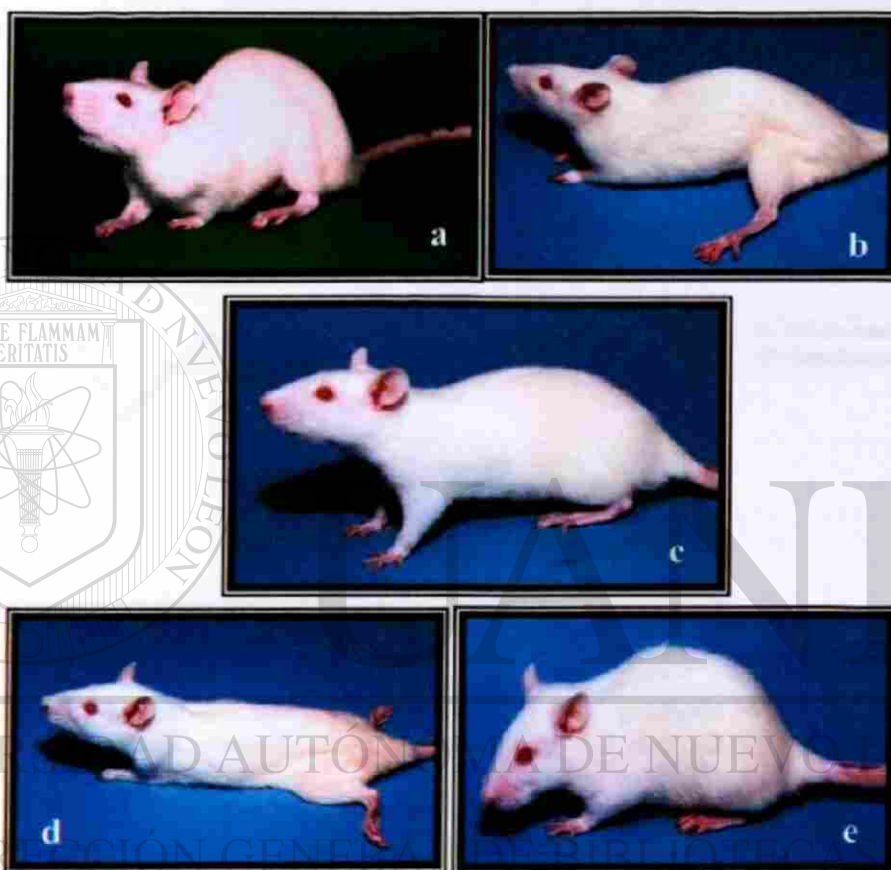
### **3.3.1.4 Etapa de recuperación (Grupo 112 días)**

Este grupo de ratas presentó todos los signos de intoxicación antes mencionados, sin embargo, a partir de la sexta y séptima semana los animales iniciaron su recuperación, con aumento de peso sostenido, aumento progresivo de la actividad espontánea, disminución de la debilidad y mejoramiento de la apariencia general. Hasta que ninguno de los signos de la polineuropatía fue evidente (Figura

6e).

### **3.3.1.5 Grupo control**

Este grupo no presentó durante todo el estudio ninguno de los signos (Figura 6c).



**Figura 6.** Ratas Wistar representativas de cada una de la etapas de la polineuropatía causada por el fruto de la *K. humboldtiana* y grupo control sin tratar. **a)** Rata intoxicada sin neuropatía (24 días ddi), **b)** Rata intoxicada con paresia (48 días ddi), **c)** Rata control normal, **d)** Rata intoxicada con parálisis (58 días ddi) y **e)** Rata intoxicada recuperada de la neuropatía (112 días ddi).

### 3.3.2 Registro del peso corporal

#### 3.3.2.1 Etapa sin neuropatía (Grupo 24 días ddi)

En la figura 7 se muestra el comportamiento del peso corporal promedio de las ratas durante los primeros 24 días de la intoxicación.

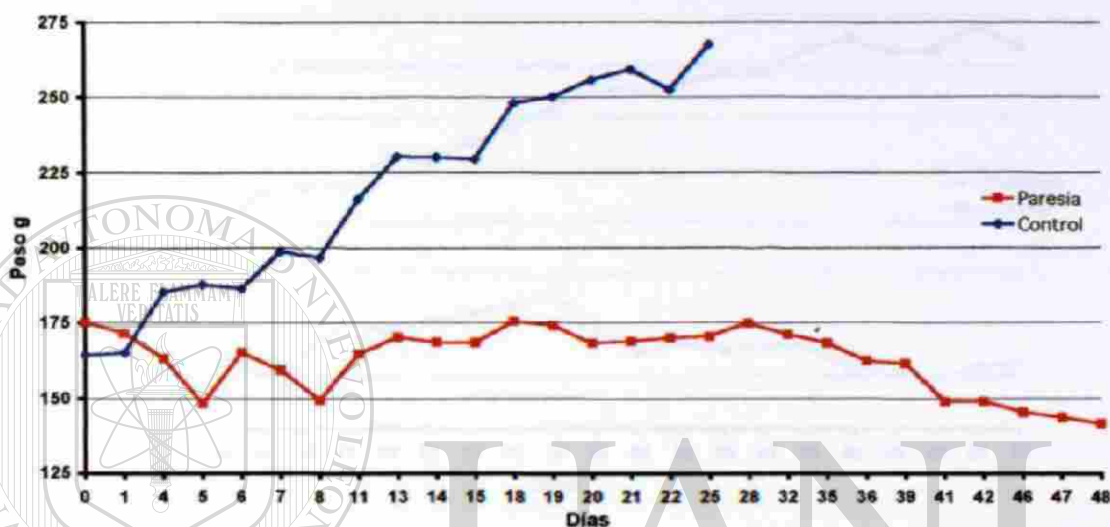


**Figura 7.** Representación gráfica del peso corporal promedio del grupo de ratas durante la etapa sin neuropatía (24 días ddi) y del grupo control sin tratar.

En esta gráfica se observa en esta etapa una pérdida importante de peso del  $19.45 \pm 4.83\%$  al séptimo día de la intoxicación, mientras que el grupo control presentó un aumento del  $8.37 \pm 1.52\%$ . A partir de la segunda semana del tratamiento hasta el día en que los animales fueron sacrificados hubo un aumento de peso del  $5.17 \pm 5.1\%$ .

### 3.3.2.2 Etapa de paresia (Grupo 48 días ddi)

En la figura 8 se muestra el comportamiento del peso corporal promedio de las ratas con paresia.



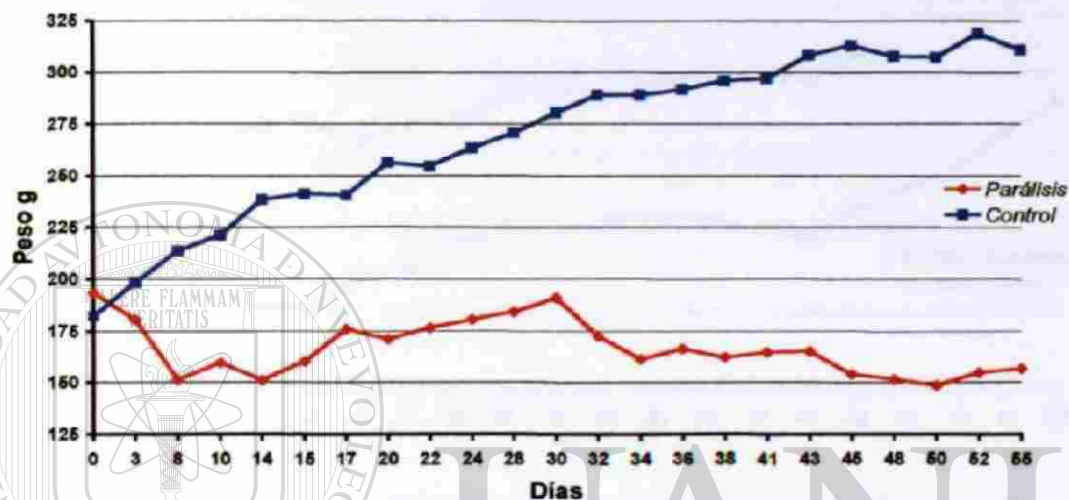
**Figura 8.** Representación gráfica de peso corporal promedio del grupo de ratas durante la etapa de paresia (48 días ddi) y del grupo control sin tratar.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

En esta gráfica se observa una pérdida importante de peso del  $14.7 \pm 5.74\%$  al séptimo día de la intoxicación, mientras que el grupo control presentó un aumento del  $8.32 \pm 1.65\%$ . Del día 9 al 32 hubo un aumento de peso del  $15.0 \pm 12.45\%$ . Sin embargo, del día 32 hasta el día 48 en que fueron sacrificadas, se presentó nuevamente pérdida de peso del  $20.0 \pm 6.22\%$ .

### 3.3.2.3 Etapa de parálisis (Grupo 58 días)

En la figura 9 se muestra el comportamiento del peso corporal promedio del grupo de ratas con parálisis.



**Figura 9.** Representación gráfica de peso corporal promedio del grupo de ratas durante la etapa de parálisis (58 días ddi) y del grupo control sin tratar.

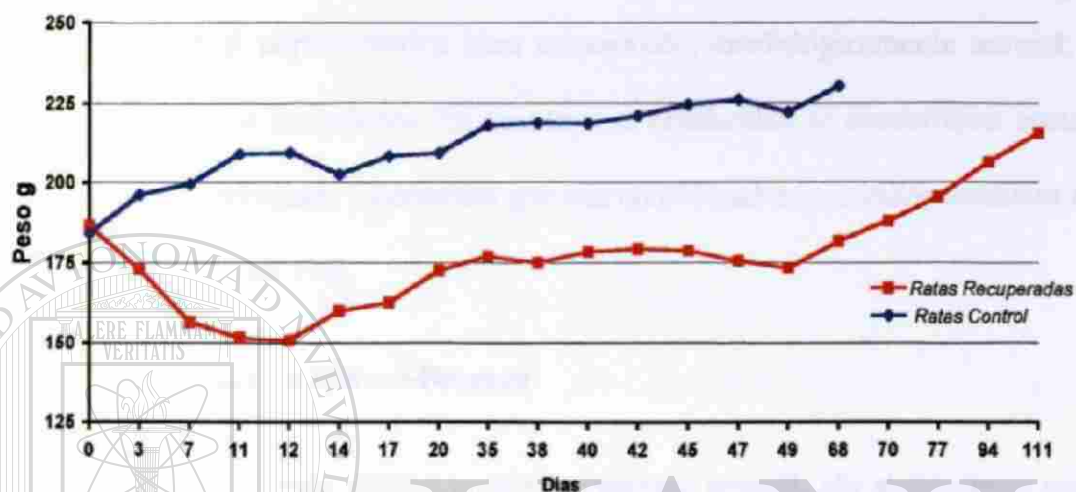
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

En esta gráfica se observa una pérdida importante de peso del  $21.57 \pm 8.08\%$  al séptimo día de la intoxicación, mientras que el grupo control presentó un aumento del  $17.22 \pm 3.97\%$ . Del día 9 al 32 hubo un aumento de peso del  $8.73 \pm 4.0\%$ . Sin embargo, del día 32 hasta el día 58 en que fueron sacrificadas, se observó nuevamente pérdida de peso del  $15.02 \pm 5.88\%$ .



### 3.3.2.4 Etapa de recuperación (Grupo 112 días)

En la figura 10 se muestra el comportamiento del peso corporal promedio del grupo de ratas recuperadas de la neuropatía.



**Figura 10.** Representación gráfica del peso corporal promedio del grupo de ratas durante la etapa de recuperación (112 días ddi) y del grupo control sin tratar.

En esta gráfica se observa una pérdida de peso del  $19.35 \pm 11.82\%$  al séptimo día de la intoxicación, mientras que el grupo control que presentó un aumento del  $13.58 \pm 1.47\%$ . Del día 9 al 32 hubo un aumento de peso del  $15.62 \pm 11.3\%$ . Sin embargo, del día 32 hasta el día 55 lapso en que se presentó la parálisis, se observó nuevamente pérdida de peso del  $10.25 \pm 1.8\%$ . Finalmente, a partir del día 65 hasta el día 112 en que fueron sacrificadas presentaron un aumento de peso del  $16.4 \pm 3.5\%$ .

## 3.4 RESULTADOS HISTOLÓGICOS

### 3.4.1 Grupo Control

#### 3.4.1.1 Tinción con hematoxilina y eosina

Se observó el nervio ciático bien conservado, morfológicamente normal, lo mismo que los vasos sanguíneos. En cuanto a su celularidad se encontraron escasos mastocitos en el endoneuro y perineuro que son considerados residentes normales del tejido nervioso (Figura 11a).

#### 3.4.1.2 Método de Kliver-Barrera

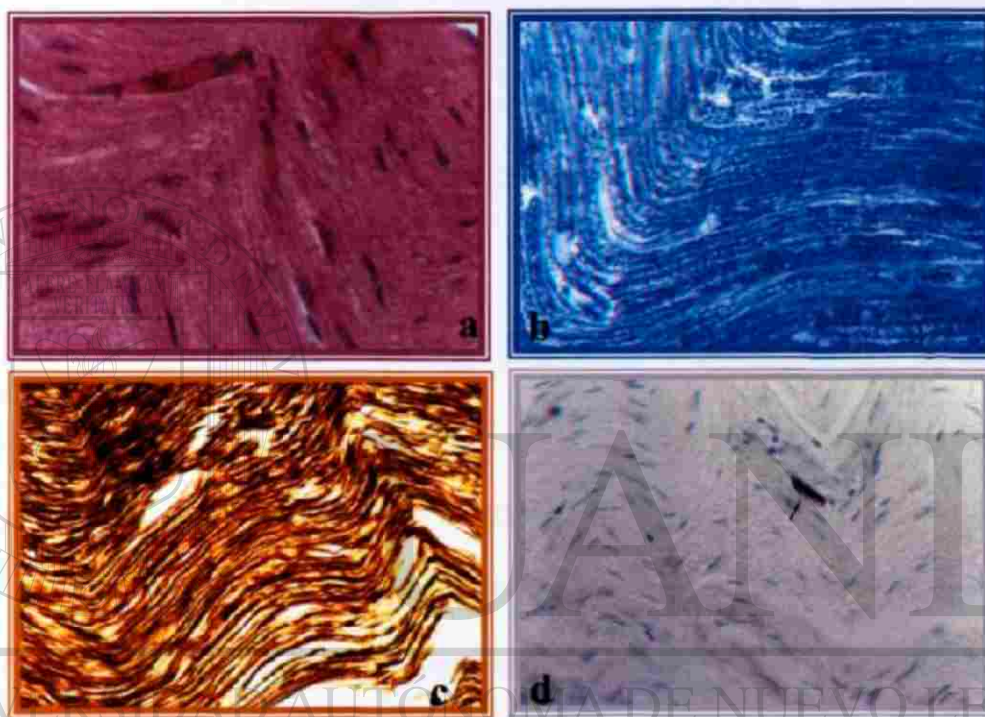
Se observó el nervio ciático morfológicamente normal, sin alteraciones en la vaina de mielina, fibras nerviosas íntegras y bien definidas (Figura 11b), además de algunos mastocitos no desgranulados y desgranulados tanto en el endoneuro como en el perineuro, principalmente a nivel perivascular.

#### 3.4.1.3 Tinción de Azul de toluidina

Se confirmó e identificó la presencia de mastocitos perivasculares tanto desgranulados como no desgranulados en endoneuro y perineuro del nervio ciático, (Figura 11d).

#### 3.4.1.4 Método de Marsland-Glees y Erickson

Con esta tinción se observó la presencia de axones bien conservados sin alteraciones morfológicas, (Figura 11c).



**Figura 11.** Cortes de nervio ciático de rata Wistar control sin tratar. **a)** Tinción H y E se observó la morfología normal del nervio. **b)** Método de Klüver-Barrera, se apreció la mielina bien conservada. **c)** Método de Marsland-Glees y Erickson se observaron axones normales. **d)** Tinción de azul de toluidina se observó un mastocito perivascular residente del tejido nervioso (→). **40x.**

### **3.4.2 Etapa sin neuropatía (Grupo 24 días ddi)**

#### **3.4.2.1 Tinción hematoxilina y eosina**

En el estudio histológico se encontraron alteraciones en la morfología del nervio ciático, consistentes en vacuolización intersticial de la vaina de mielina y dentro de las fibras nerviosas, vasodilatación y congestión vascular. Así como, la presencia de infiltrado de mastocitos tanto en el endoneuro como en el perineuro, en cantidad superior al observado en el grupo control, (Figura 12a).

#### **3.4.2.2 Método de Klüver-Barrera**

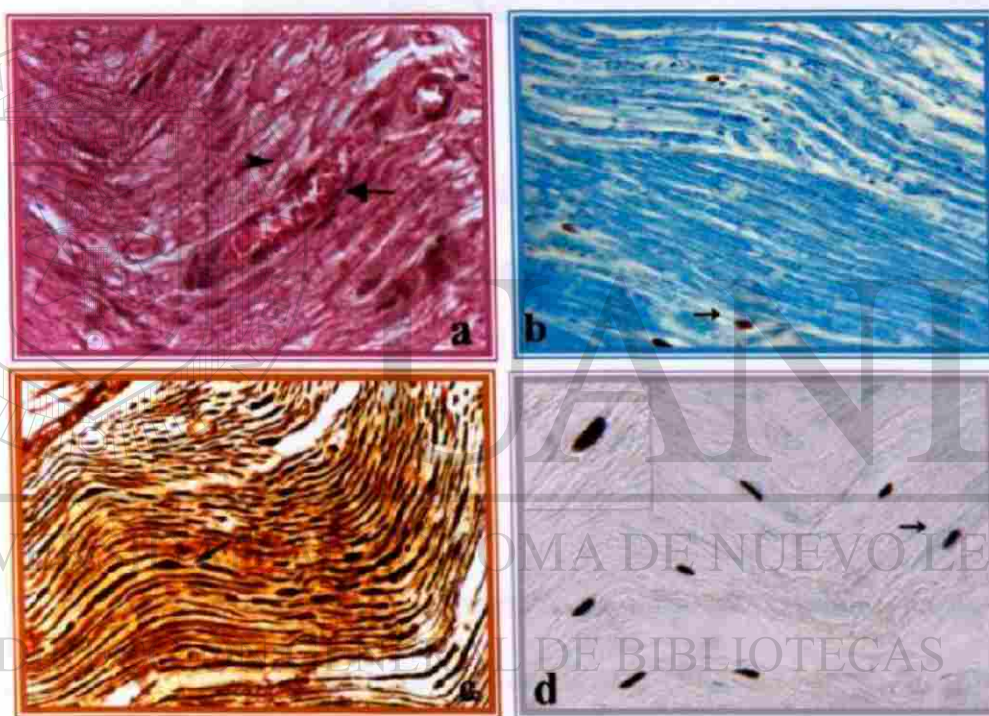
Con esta tinción se pudo apreciar desmielinización segmentaria de algunas fibras nerviosas, micro y macrovacuolización entre y dentro de las vainas de mielina, separación de las fibras nerviosas, vasodilatación y congestión vascular. También fue evidente la presencia de numerosos mastocitos con bordes bien definidos y con gránulos metacromáticos color púrpura en su interior (Figura 12b). Además se observaron numerosos linfocitos a nivel vascular.

#### **3.4.2.3 Tinción de azul de toluidina**

Con esta tinción fue posible la identificación y confirmación de la presencia de numerosos mastocitos endoneurales íntegros en el nervio ciático, (Figura 12d).

### 3.4.2.4 Método de Marsland-Glees y Erickson

El método de impregnación con plata permitió observar las alteraciones presentes a nivel axonal en el nervio ciático. Se observaron alteraciones axonales que consistieron en zonas de adelgazamiento alternadas con abultamientos del axón dando la apariencia de cuentas de un rosario, (Figura 12c).



**Figura 12.** Cortes de nervio ciático de ratas Wistar sin neuropatía (24 días ddi). **a)** Tinción H y E se observa vacuolización (►) en las vainas de mielina, vasodilatación y congestión vascular (→). **b)** Método de Klüver-Barrera se aprecia desmielinización segmentaria ligera e infiltrado de mastocitos íntegros principalmente (→). **c)** Método Marsland-Glees y Erickson se presentan alteraciones en algunos axones (→). **d)** Tinción de azul de toluidina se aprecia un aumento en la cantidad de mastocitos endoneurales íntegros (→). **40x.**

### **3.4.3 Etapa de Paresia (Grupo 48 días ddi)**

#### **3.4.3.1 Tinción con hematoxilina y eosina**

En esta etapa de la intoxicación, la alteración en la morfología normal del nervio ciático fue evidente y consistió en vacuolización endoneural, vasodilatación, congestión vascular y la presencia de abundantes mastocitos endoneurales desgranulados. Además, se encontró infiltrado de linfocitos en el endoneuro y adheridos al endotelio vascular, (Figura 13a).

#### **3.4.3.2 Método de Klüver-Barrera**

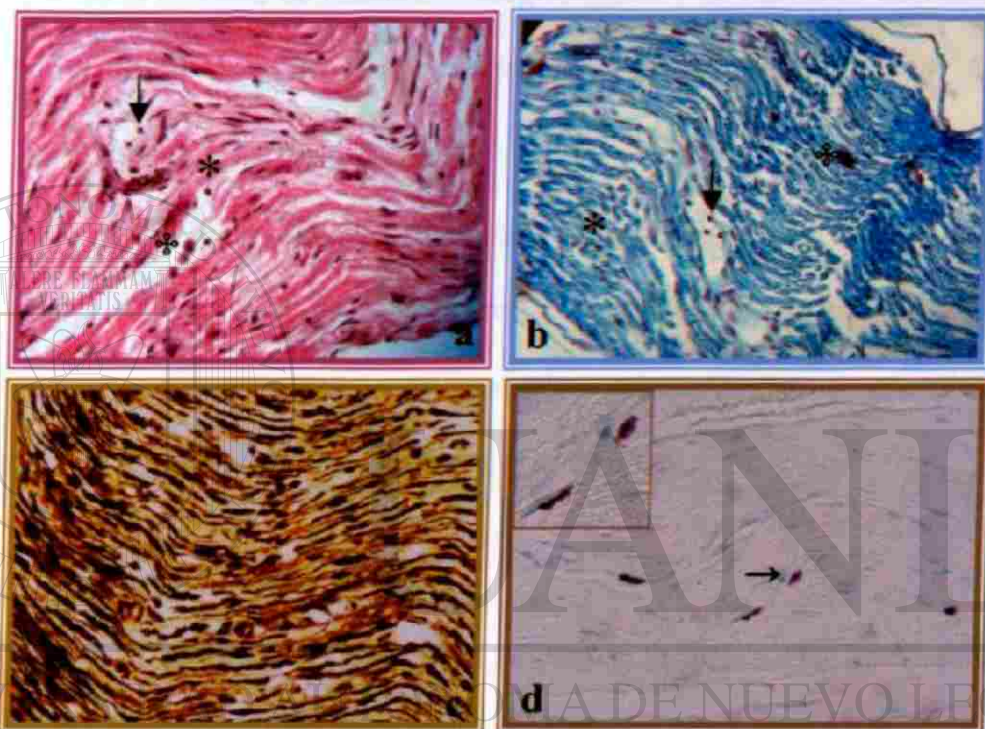
Con esta tinción se observó desmielinización segmentaria, separación y pérdida de fibras nerviosas, vasodilatación y congestión vascular, además, de la presencia de mastocitos desgranulados y linfocitos en el endoneuro, sobre todo en aquellas áreas donde el daño fue más importante, (Figura 13b).

#### **3.4.3.3 Tinción de azul de toluidina**

En estos cortes se observó la presencia de infiltrado celular consistente en abundantes mastocitos desgranulados en el endoneuro, (Figura 13d).

#### **3.4.3.4 Método de Marsland-Glees y Erickson**

En estos cortes se observó daño axonal moderado consistente en zonas de adelgazamiento alternadas con zonas abultadas y tortuosas incluso se observaron axones interrumpidos. En otras áreas se observó la pérdida de los axones, (Figura 13c).



**Figura 13.** Cortes de nervio ciático de ratas Wistar con paresia (48 días ddi). **a)** Tinción H y E se observa infiltrado de mastocitos (♣) y linfocitos en el endoneuro (\*), además de linfocitos adheridos al endotelio vascular (→). **b)** Método de Klüver-Barrera se aprecia desmielinización segmentaria e infiltrado de mastocitos (♣) y linfocitos en el endoneuro (\*), además, de linfocitos adheridos al endotelio vascular (→). **c)** Método de Marsland-Glees y Erickson se advierte daño axonal que se manifiesta por la presencia de axones tortuosos. **d)** Tinción de azul de toluidina, se observa infiltrado de mastocitos principalmente desgranulados en el endoneuro (→). 40x.

### **3.4.4 Etapa de Parálisis (Grupo 58 días ddi)**

#### **3.4.4.1 Tinción hematoxilina y eosina**

En esta etapa el daño morfológico en el nervio ciático fue severo y consistió en pérdida importante de las fibras nerviosas y vasodilatación. Además, se observó un incremento en la cantidad de mastocitos desgranulados y de linfocitos endoneurales, sobre todo en aquellas áreas que mostraron más daño, (Figura 14a).

#### **3.4.4.2 Método de Klüver-Barrera**

Se observó desmielinización segmentaria en grandes áreas del nervio, pérdida importante de fibras nerviosas, macrovacuolización y vasodilatación. También se apreció la presencia de infiltrado de mastocitos principalmente desgranulados y linfocitos en el endoneuro y en el perineuro, (Figura 14b).

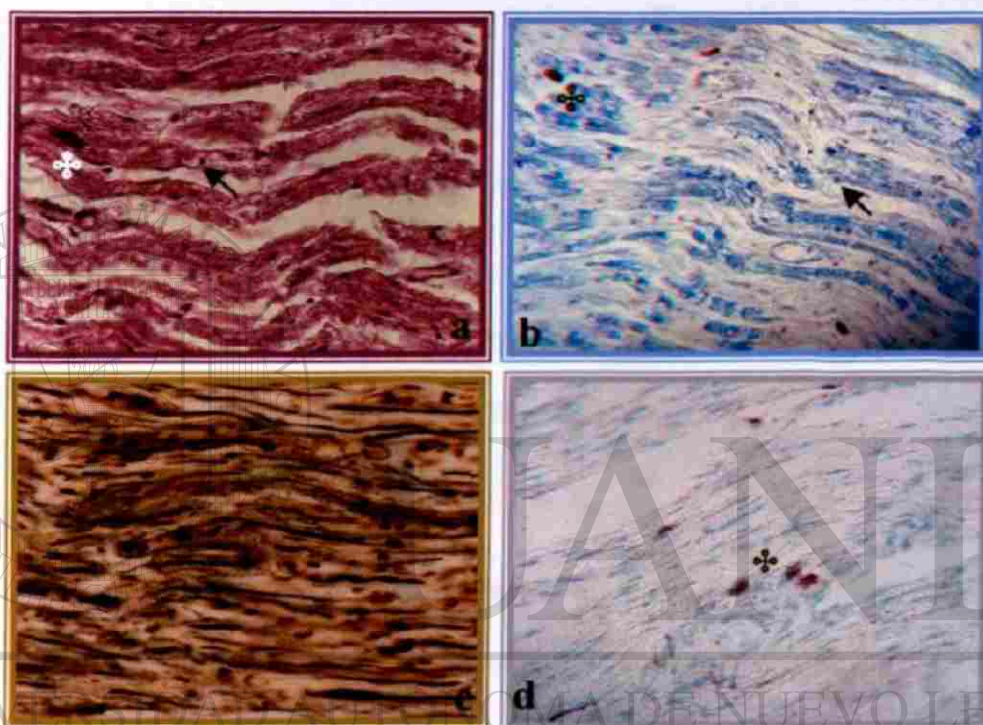
#### **3.4.4.3 Tinción de azul de toluidina**

En estos cortes se identificó y confirmó la presencia de mastocitos desgranulados, tanto en el endoneuro como en el perineuro del nervio ciático, (Figura 14d).

#### **3.4.4.4 Método de Marsland-Glees y Erickson**

Se observó pérdida axonal muy importante, los axones presentes mostraron grandes zonas de adelgazamiento con tendencia a desaparecer, en otros sitios se observan tramos de axón contraídos, también se observaron axones tortuosos y gruesos, (Figura 14c).





**Figura 14.** Cortes de nervio ciático de ratas Wistar con parálisis (58 días ddi). **a)** Tinción H y E se aprecia infiltrado de mastocitos (♣) y linfocitos (→). **b)** Método de Klüver-Barrera se observa desmielinización severa e infiltrado de mastocitos (♣) y linfocitos (→). **c)** Método Marsland-Glees y Erickson, se advierte daño axonal severo. **d)** Tinción de azul de toluidina se nota un aumento en la cantidad de mastocitos desgranulados en el endoneuro (♣). **40x**

### **3.4.5 Etapa de Recuperación (Grupo 112 días ddi)**

#### **3.4.5.1 Tinción hematoxilina y eosina**

Se observó recuperación de la morfología normal del nervio, sin embargo, persistió la vasodilatación y la presencia de abundantes mastocitos desgranulados. Es importante mencionar que no se encontraron linfocitos, (Figura 15a).

#### **3.4.5.2 Método de Klüver-Barrera**

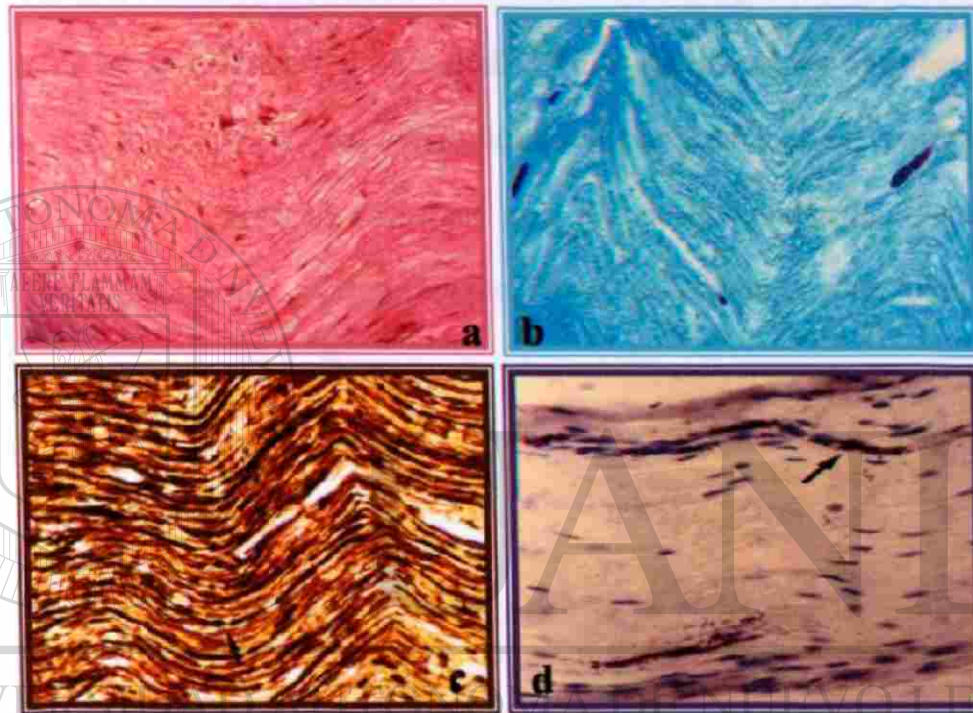
Se observó remielinización de las fibras nerviosas a tal grado que son casi indistinguibles del nervio ciático control sin tratar. Persistió la vasodilatación y la presencia de abundantes mastocitos desgranulados en el endoneuro y perineuro del nervio ciático, no así la presencia linfocitos, (Figura 15b).

#### **3.4.5.3 Tinción de azul de toluidina**

Con esta tinción se identificó la presencia de abundantes mastocitos principalmente desgranulados tanto en el endoneuro como en el perineuro del nervio ciático, (Figura 15d).

#### **3.4.5.4 Método de Marsland-Glees y Erickson**

Se observó recuperación axonal de los nervios ciáticos, sin embargo se presentaron en algunas zonas daño residual caracterizado por áreas de adelgazamiento axonal, (Figura 15c).



**Figura 15.** Cortes de nervio ciático de ratas Wistar en la etapa de recuperación (112 días pidi). **a)** Tinción H y E se observa recuperación de la morfología normal del nervio ciático. **b)** método de Klüver-Barrera, se aprecia remielinización e infiltrado de mastocitos (\*). **c)** Método Marsland-Glees y Erickson se advierte regeneración axonal y daño residual en algunas zonas (→). **d)** Tinción de azul de toluidina se observan mastocitos desgranulados principalmente (→). 40X

### 3.5 CUANTIFICACIÓN DE MASTOCITOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

La cuenta de mastocitos se realizó en los cortes de nervio ciático teñidos con azul de toluidina, así como, con el método de Klüver-Barrera, para esto se estableció un área de tejido de  $2.87 \text{ mm}^2$  que fue similar para cada una de las tinciones. Los resultados obtenidos se evaluaron estadísticamente por medio de las pruebas de ANOVA, la prueba Kolmogorov-Smirnov para una muestra, además de pruebas post-hoc de comparación múltiple según en el procedimiento de diferencia significativa mínima (LSD) de Fisher.

#### 3.5.1 Grupo Control

La cuenta de mastocitos endoneurales en este grupo de ratas se realizó bajo condiciones ya descritas en el punto 3.5. Ya finalizado el conteo de mastocitos endoneurales no desgranulados y desgranulados, se obtuvo la cantidad de mastocitos totales por  $\text{mm}^2$  (mastot/ $\text{mm}^2$ ), así como la cantidad de mastocitos desgranulados por  $\text{mm}^2$  (mastdes/ $\text{mm}^2$ ) y su porcentaje en relación con la cantidad de mastot/ $\text{mm}^2$  de cada una de las muestras de nervio ciático. Para la evaluación de los resultados se obtuvo el promedio y la desviación estándar de las tres variables de interés como se muestra en la tabla IX.

Rata	Área observada mm <sup>2</sup>	Mastocitos Endoneurales desgranulados		Total	mastot/mm <sup>2</sup>	Mastocitos Desgranulados	
		No	Si			%	mastdes/mm <sup>2</sup>
1	5.73	49	42	91	15.88	46.15	7.33
2	5.74	48	23	71	12.37	32.39	4.01
3	5.77	35	70	105	18.20	66.67	12.13
4	5.76	25	37	62	10.76	59.68	6.42
5	5.74	32	48	80	13.94	60.00	8.36
6	5.72	5	28	33	5.77	84.85	4.9
7	5.77	36	38	74	12.82	51.35	6.59
8	5.74	47	56	103	17.94	54.37	9.76
<b>Promedio</b>					<b>13.46</b>	<b>56.93</b>	<b>7.44</b>
<b>Desviación std</b>					<b>4.08</b>	<b>15.34</b>	<b>2.63</b>

**Tabla IX.** Cuantificación y relación de mastocitos endoneurales no desgranulados y desgranulados por mm<sup>3</sup> en el nervio ciático de ratas control sin tratar.

En la tabla se pueden observar los resultados obtenidos para cada una de las muestras analizadas, después de realizar los cálculos antes descritos se obtuvo un promedio de  $13.46 \pm 4.08$  mastot/mm<sup>2</sup>, de estas células el  $56.93 \pm 15.34$  % presentaron desgranulación, que corresponde a  $7.44 \pm 2.63$  mastdes/mm<sup>2</sup>, el error estándar de la media que es la medida de la variabilidad en el muestreo para estas variables fue de 1.44 y de 0.928 respectivamente. El rango alrededor de la media para los mastot/mm<sup>2</sup> fue de 10.05 – 16.87 y para los mastdes/mm<sup>2</sup> fue de 5.24 – 9.63 con un intervalo de confianza del 95%.

El análisis estadístico que muestra la distribución de los resultados se resume en la tabla IXa.

	mastot/mm <sup>2</sup>	<sup>c</sup> mastdes/mm <sup>2</sup>
N	8	8
Parámetros Normales <sup>ab</sup> Media	13.4610	7.4364
Desviación Estándar	4.0823	2.6252
Extremo Mayor	.145	.141
Diferencias		
Absoluto	.123	.141
Positiva	-.145	-.100
Negativa		
Kolmogorov-Smirnov Z	.409	.399
Sig. Asymp. (2 colas)	.996	.997

- a. La prueba de distribución es normal
- b. Calculada a partir de los datos
- c. Mastocitos desgranulados

Tabla IXa. Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra.

### 3.5.2 Etapa Sin Neuropatía (Grupo 24 días ddi)

La cuenta de mastocitos endoneurales en este grupo de ratas se realizó de acuerdo a las condiciones descritas en el punto 3.5 y 3.5.1. Se contaron los mastocitos endoneurales tanto no desgranulados como desgranulados y los resultados se muestran en la tabla X.

Rata	Área observada mm <sup>2</sup>	Mastocitos Endoneurales desgranulados		Total	mastot/mm <sup>2</sup>	Mastocitos Desgranulados	
		No	Si			%	mastdes/mm <sup>2</sup>
1	5.74	223	42	265	46.17	15.84	7.32
2	5.75	165	74	239	41.57	30.96	12.87
3	5.74	162	42	204	35.54	20.59	7.32
4	5.67	66	52	118	20.81	44.07	9.17
5	5.66	67	100	167	29.51	59.88	17.67
6	5.70	155	85	240	42.08	35.42	14.91
7	5.74	163	67	230	40.07	29.13	11.67
8	5.71	123	116	239	41.86	48.53	20.31
9	5.67	75	85	160	28.22	53.12	14.99
10	5.71	85	54	139	24.34	38.84	9.46
11	4.96	66	61	127	25.60	48.03	12.30
12	5.71	90	60	150	26.27	40.00	10.51
13	5.60	100	85	185	33.03	45.95	15.18
<b>Promedio</b>					<b>33.47</b>	<b>39.29</b>	<b>12.60</b>
<b>Desviación std</b>					<b>8.27</b>	<b>12.70</b>	<b>3.93</b>

**Tabla X.** Cuantificación y relación de mastocitos endoneurales no desgranulados y desgranulados en el nervio ciático de ratas durante la etapa sin neuropatía (24 días ddi).

En la tabla se observa la en la cantidad promedio de mastocitos totales es de  $33.47 \pm 8.27$  mastot/mm<sup>2</sup>, donde el  $39.29 \pm 12.70$  % de estas células se encuentran desgranuladas lo que es igual a  $12.6 \pm 3.93$  mastdes/mm<sup>2</sup>. Además puede observarse que el  $60.71 \pm 12.7$  % de estas células se encuentran no desgranuladas lo que corresponde a  $20.87 \pm 8.61$  mastnd/mm<sup>2</sup>.

El error estándar de la media para los mastot/mm<sup>2</sup> fue de 2.29 y para los mastdes/mm<sup>2</sup> de 1.09. El rango alrededor de la media para mastot/mm<sup>2</sup> fue de 28.47 – 38.46 y para los mastdes/mm<sup>2</sup> fue de 10.22 – 14.97 con un intervalo de confianza del 95%. El análisis estadístico de distribución de los resultados se resume en la tabla Xa.

	mastot/mm <sup>2</sup>	mastdes/mm <sup>2</sup>
N	13	13
Parámetros Normales <sup>a,b</sup> Media	33.4666	12.5970
Desviación Estándar	8.2660	3.9327
Extremo Mayor Absoluto	.172	.108
Diferencias Positiva	.142	.102
Negativa	-.172	-.108
Kolmogorov-Smirnov Z	.622	.390
Sig. Asymp. (2 colas)	.834	.998

- a. La prueba de distribución es normal  
 b. Calculada a partir de los datos  
 c. Mastocitos desgranulados

Tabla Xa. Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra.

### 3.5.3 Etapa de Paresia (Grupo 48 días ddi)

La cuenta de mastocitos endoneurales en este grupo de ratas se realizó de acuerdo a las condiciones descritas en el punto 3.5 y 3.5.1. Los resultados para esta etapa se resumen en la tabla XI.



Rata	Área observada mm <sup>2</sup>	Mastocitos Endoneurales desgranulados		Total	mastot/mm <sup>2</sup>	Mastocitos Desgranulados	
		No	Si			%	mastdes/mm <sup>2</sup>
1	5.73	91	99	190	33.14	52.11	17.27
2	5.73	98	107	205	35.77	52.19	18.67
3	5.75	102	104	206	35.83	50.48	18.08
4	4.95	56	115	171	34.55	67.25	23.23
5	4.98	53	91	144	28.92	63.19	18.27
6	5.74	52	94	146	25.44	64.38	16.38
7	5.74	39	141	180	31.36	78.33	24.56
8	4.70	24	111	135	28.72	82.22	23.61
9	5.76	61	125	186	32.29	67.20	21.70
10	5.74	76	140	216	37.63	64.81	24.39
11	5.71	130	116	246	43.08	47.15	20.31
12	5.71	33	59	92	16.11	64.13	10.33
Promedio					31.90	62.71	19.73
Desviación std					6.79	10.82	4.15

**Tabla XI.** Cuantificación y relación de mastocitos endoneurales no desgranulados y desgranulados en el nervio ciático de ratas durante la etapa de paresia (48 días ddi).

En la tabla puede observarse la cantidad promedio de mastocitos endoneurales es de  $31.9 \pm 6.79$  mastot/mm<sup>2</sup> donde el  $62.71 \pm 10.82$  % de los mastot/mm<sup>2</sup> se encuentran desgranulados lo que corresponde a  $19.73 \pm 4.15$  mastdes/mm<sup>2</sup>. El error estándar de la media para mastot/mm<sup>2</sup> y para mastdes/mm<sup>2</sup> fue de 1.96 y de 1.2 respectivamente, así mismo, el rango alrededor de la media para mastot/mm<sup>2</sup> fue de 27.58 – 36.22 y para los mastdes/mm<sup>2</sup> fue de 17.09 - 22.37 con un intervalo de confianza del 95%.

El análisis estadístico de distribución de los resultados se resume en la tabla **XIa**.

	mastot/mm <sup>2</sup>	mastdeg/mm <sup>2</sup>
N	12	12
Parámetros Normales <sup>a,b</sup> Media	31.9023	19.7334
Desviación Estándar	6.7953	4.1536
Extremo Mayor Absoluto	.153	.134
Diferencias Positiva	.116	.122
Negativa	-.153	-.134
Kolmogorov-Smirnov Z	.531	.463
Sig. Asymp. (2 colas)	.941	.983

a. La prueba de distribución es normal

b. Calculada a partir de los datos

c. Mastocitos desgranulados

**Tabla XIa.** Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra.

### 3.5.4 Etapa de Parálisis (Grupo 58 días ddi)

La cuenta de mastocitos endoneurales en este grupo de ratas se realizó bajo las condiciones descritas en el punto 3.5 y 3.5.1 Los resultados para esta etapa se resumen en la tabla XII.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Rata	Área observada mm <sup>2</sup>	Mastocitos Endoneurales desgranulados		Total	mastot/mm <sup>2</sup>	Mastocitos Desgranulados	
		No	Si			%	mastdes/mm <sup>2</sup>
1	5.75	75	93	168	29.22	52.11	16.17
2	5.75	19	71	90	15.65	52.19	12.35
3	5.74	69	99	168	29.27	50.48	17.25
4	5.77	57	77	134	23.22	67.25	13.34
5	5.86	104	141	245	41.81	68.19	24.06
6	5.76	100	181	281	48.78	64.38	31.42
7	5.82	46	101	147	25.26	78.33	17.35
8	4.30	45	60	105	28.72	24.42	13.95
9	5.68	106	140	246	43.31	67.20	24.64
10	4.32	47	127	174	40.28	64.81	29.40
11	3.51	11	131	142	43.08	47.15	37.32
<b>Promedio</b>					<b>32.88</b>	<b>65.51</b>	<b>21.57</b>
<b>Desviación std</b>					<b>10.49</b>	<b>11.75</b>	<b>8.36</b>

**Tabla XII.** Cuantificación y relación de mastocitos endoneurales no desgranulados y desgranulados por mm<sup>2</sup> en el nervio ciático de ratas durante la etapa de parálisis (58 días dci).

## DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

En la tabla puede observarse que la cantidad de mastocitos endoneurales es de  $32.88 \pm 10.49$  mastot/mm<sup>2</sup>, donde el  $65.51 \pm 11.75\%$  de los mastocitos se encuentran desgranulados lo que es igual a  $21.57 \pm 8.36$  mastdes/mm<sup>2</sup>. El error estándar de la media para mastot/mm<sup>2</sup> y para mastdes/mm<sup>2</sup> fue de 3.16 y de 2.52 respectivamente. El rango alrededor de la media para los mastot/mm<sup>2</sup> fue de 25.83 - 39.92 y para los mastdes/mm<sup>2</sup> fue de 15.96 - 27.19 con un intervalo de confianza del 95%.

El análisis estadístico de distribución de los datos se resume en la tabla XIIIa.

	mastot/mm <sup>2</sup>	mastdes/mm <sup>2</sup>
N	11	11
Parámetros Normales <sup>a,b</sup>		
Media	32.8795	21.5704
Desviación Estándar	10.48	8.3574
Extremo Mayor	.214	.239
Diferencias	.180	.239
	Negativa	-.135
Kolmogorov-Smirnov Z	.711	.791
Sig. Asymp. (2 colas)	.693	.559

- a. La prueba de distribución es normal
- b. Calculada a partir de los datos
- c. Mastocitos desgranulados

**Tabla XIIIa.** Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra.

### 3.5.5 Etapa de Recuperación (Grupo 112 días ddi)

La cuenta de mastocitos endoneurales en este grupo de ratas se realizó bajo las condiciones descritas en el punto 3.5 y 3.5.1. Los resultados encontrados en este grupo se resumen en la tabla XIII.

Rata	Área observada mm <sup>2</sup>	Mastocitos Endoneurales desgranulados		Total	mastot/mm <sup>2</sup>	Mastocitos Desgranulados	
		No	Si			%	mastdes/mm <sup>2</sup>
1	3.5	22	74	96	27.43	77.08	21.14
2	5.34	90	108	198	37.08	54.55	20.22
3	5.74	72	213	285	49.65	74.74	37.11
4	5.74	48	203	251	43.73	80.88	35.37
5	5.74	111	134	245	42.68	54.69	23.34
6	5.71	53	144	197	36.41	73.10	26.62
7	5.74	76	191	267	46.52	71.54	33.28
<b>Promedio</b>					<b>40.50</b>	<b>65.51</b>	<b>28.15</b>
<b>Desviación std</b>					<b>7.47</b>	<b>10.60</b>	<b>7.02</b>

**Tabla XIII.** Cuantificación y relación de mastocitos endoneurales no desgranulados y desgranulados por mm<sup>2</sup> en el nervio ciático de ratas durante la etapa de recuperación (112 días ddi).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

En la tabla puede observarse que la cantidad de mastocitos endoneurales es de  $40.5 \pm 7.47$  mastot/mm<sup>2</sup>, donde el  $65.51 \pm 10.6\%$  de los mastocitos totales se encuentran desgranulados lo que es igual a  $28.15 \pm 7.02$  mastdes/mm<sup>2</sup>. El error estándar de la media fue de 2.82 y de 2.65 para mastot/mm<sup>2</sup> y para mastdes/mm<sup>2</sup> respectivamente. El rango alrededor de la media para los mastot/mm<sup>2</sup> fue de 33.6 – 47.4 y de 21.66 – 34.65 para los mastdes/mm<sup>2</sup> con un 95% de confianza. El análisis estadístico de distribución de los datos se resume en la tabla XIIIa.

	mastot/mm <sup>2</sup>	mastdes/mm <sup>2</sup>
N	7	7
Parámetros Normales <sup>a,b</sup>		
Media	40.5000	28.1541
Desviación Estándar	7.4654	7.0229
Extremo Mayor		
Absoluto	.186	.196
Diferencias		
Positiva	.110	.182
Negativa	-.186	-.196
Kolmogorov-Smirnov Z	.493	.518
Sig. Asymp. (2 colas)	.968	.952

- a. La prueba de distribución es normal
- b. Calculada a partir de los datos
- c. Mastocitos desgranulados

**Tabla XIIIa.** Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra.

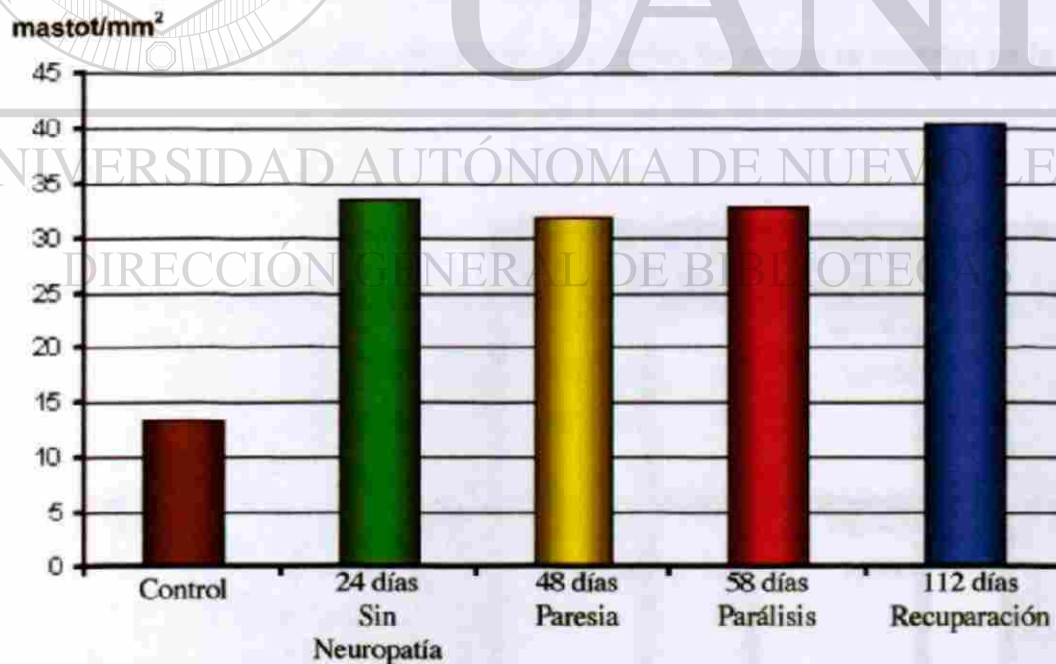
### **3.5.6 Resumen de resultados de la cuantificación de mastocitos en nervio de ratas durante las diferentes etapas de la polineuropatía y de las ratas control sin tratar**

En la tabla XIV se muestran la cantidad promedio por etapa de mastocitos endoneurales totales, no desgranulados y desgranulados por mm<sup>2</sup>, así como también sus respectivos porcentajes con respecto del promedio total de estas células.

	Mastocitos				mastot/mm <sup>2</sup>
	mastnd/mm <sup>2</sup>	(%)	mastdes/mm <sup>2</sup>	(%)	
<b>Control</b>	6.02 ± 2.57	43.07 ± 15.34	7.44 ± 2.63	56.93 ± 15.34	13.46 ± 4.08
<b>24 Días</b>	<b>20.87 ± 8.61</b>	<b>60.71 ± 12.69</b>	<b>12.6 ± 3.93</b>	39.29 ± 16.69	<b>33.47 ± 8.26</b>
<b>48 Días</b>	12.17 ± 5.36	37.29 ± 10.82	<b>19.73 ± 4.15</b>	<b>62.71 ± 10.82</b>	<b>31.9 ± 6.79</b>
<b>58 Días</b>	11.31 ± 5.3	34.49 ± 11.75	<b>21.57 ± 8.36</b>	<b>65.51 ± 11.75</b>	<b>32.88 ± 10.5</b>
<b>112 Días</b>	12.35 ± 4.64	30.49 ± 10.60	<b>28.15 ± 7.02</b>	<b>69.51 ± 10.60</b>	<b>40.5 ± 7.47</b>

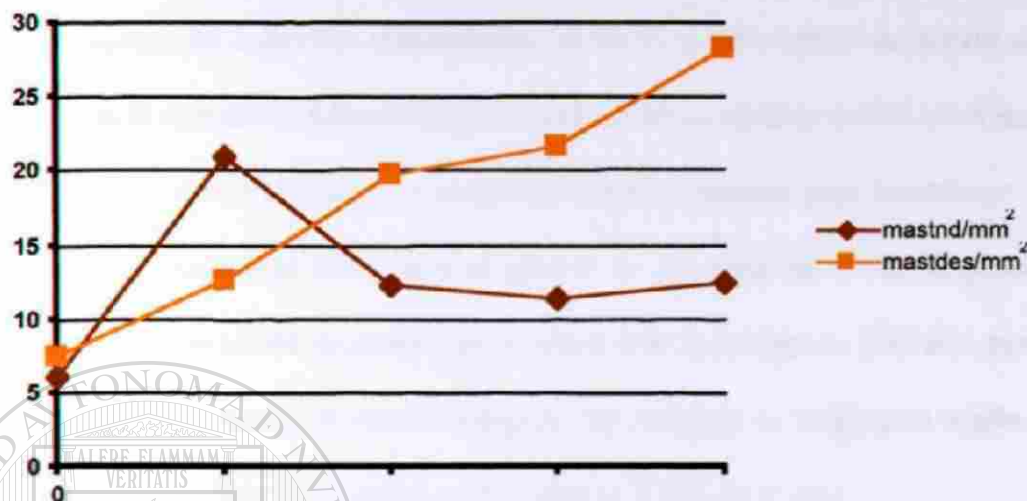
**Tabla XIV.** Resumen de los resultados de la cuantificación de mastocitos en las diferentes etapas de la polineuropatía por *K. humboldtiana*.

La representación gráfica de estos resultados se muestra en la figura 16.



**Figura 16.** Representación gráfica de la cantidad de mastocitos totales por mm<sup>2</sup> en nervio ciático de ratas tratadas en las diferentes etapas de la neuropatía y en las ratas control sin tratar.

En la figura 17 se comparan los mastocitos no desgranulados y desgranulados por  $\text{mm}^2$  en las diferentes etapas de polineuropatía y en el grupo control sin tratar.



**Figura 17.** Relación de mastocitos no desgranulados y desgranulados/ $\text{mm}^2$  en las diferentes etapas de la polineuropatía causada por el fruto de la *K. humboldtiana* y en las ratas del grupo control sin tratar.

El análisis estadístico para determinar la influencia del género de las ratas sobre los resultados de las variables de interés para todas las etapas se muestra en la tabla

XV.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS		Suma de cuadrados	DF	Cuadrado de la media	F	Sig.
<b>mastot/mm<sup>2</sup></b>	Entre los grupos	307.957	1	307.957	2.607	.113
	Dentro de los grupos	5789.087	49	118.45		
	Total	6097.044	50			
<b>mastdes/mm<sup>2</sup></b>	Entre los grupos	102.942	1	102.942	1.452	.234
	Dentro de los grupos	3474.407	49	70.906		
	Total		50			

**Tabla XV.** Prueba de ANOVA para determinar la influencia del género de las ratas sobre los resultados.



### **3.6 CUANTIFICACIÓN DE LINFOCITOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS**

La cuenta de linfocitos endoneurales se llevó a cabo cortes de nervio ciático teñidos con el método de Klüver-Barrera (azul luxol) en un área de 2.0 a 3.0 mm<sup>2</sup> del tejido. Los resultados obtenidos se evaluaron estadísticamente para determinar si hay diferencia de resultados atribuibles al género de las ratas mediante la prueba de ANOVA, su distribución se evaluó por la prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra y las pruebas post-hoc de comparación múltiple se realizaron según en el procedimiento de diferencia significativa mínima (LSD) de Fisher.

#### **3.6.1 Grupo Control**

La cuantificación de linfocitos endoneurales en este grupo de ratas se realizó bajo las condiciones descritas en el punto 3.6. Ya finalizado el conteo de linfocitos endoneurales, se obtuvo la cantidad de linfocitos totales por mm<sup>2</sup> de cada una de las muestras analizadas, posteriormente se obtuvo el promedio y la desviación estándar como se muestra en la tabla XVI.

Rata	Área Observada $\mu\text{m}^2$	Linfocitos Totales	Linfocitos/ $\text{mm}^2$
1	2.0	0	---
2	2.2	0	---
3	2.0	0	---
4	2.0	0	---
5	2.1	0	---
6	2.0	0	---
7	2.2	0	---
8	2.0	0	---
Promedio			0.00
Desviación Std.			0.00

**Tabla XVI.** Cuantificación de linfocitos endoneurales en el nervio ciático de ratas control sin tratar.

Como se aprecia en la tabla en este grupo no se encontraron linfocitos en el nervio ciático y por esta razón no fue posible la realización de la prueba de distribución.

### 3.6.2 Etapa Sin Neuropatía (Grupo 24 días ddi)

La cuantificación de linfocitos endoneurales en este grupo de ratas se realizó bajo las condiciones descritas en el punto 3.6 y 3.6.1. En la tabla XVII se presentan los resultados para este grupo.

Rata	Área Observada mm <sup>2</sup>	Linfocitos Totales	Linfocitos/mm <sup>2</sup>
1	2.56	41	16.02
2	2.10	59	28.10
3	2.55	14	5.49
4	2.95	7	2.37
5	2.52	11	4.37
6	2.10	10	4.76
7	2.80	21	7.50
8	2.34	1	0.43
9	2.31	30	12.99
10	2.69	30	11.15
11	2.35	27	11.49
12	2.19	28	12.77
13	2.04	28	13.73
Promedio		10.09	
Desviación Std.		7.26	

**Tabla XVII.** Cuantificación de linfocitos endoneurales en el nervio ciático de ratas durante la etapa sin neuropatía (24 días ddi).

En la tabla se muestra que la cantidad de linfocitos presentes en el endoneuro es de  $10.09 \pm 7.36$ . El error estándar de la media fue de 2.01 y el intervalo para la media fue de 5.7–14.48 linfocitos/mm<sup>2</sup> con un 95% de confianza. El análisis estadístico de la distribución de los resultados se resumen en la tabla XVIIa.

		Linfocitos/mm <sup>2</sup>
N		13
Parámetros Normales <sup>a,b</sup>	Media	10.0880
	Desviación Estándar	7.2639
Extremo Mayor	Absoluto	.154
	Positiva	.154
	Negativa	-.097
Kolmogorov-Smirnov Z		.557
Sig. Asymp. (2 colas)		.916

a. La prueba de distribución es normal

b. Calculada a partir de los datos

**Tabla XVIIa.** Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra.

### 3.6.3 Etapa con Paresia (Grupo 48 días ddi)

La cuenta de linfocitos endoneurales en este grupo de ratas se realizó bajo las mismas condiciones ya descritas en el punto 3.6 y 3.6.1. Los resultados para esta etapa se muestran en la tabla XVIII.

Rata	Area Observada mm <sup>2</sup>	Linfocitos Totales	Linfocitos/mm <sup>2</sup>
1	3.0	108	36.78
2	2.9	94	32.41
3	2.88	34	11.81
4	2.52	42	16.67
5	2.11	87	4.28
6	2.45	68	27.76
7	2.22	87	39.19
8	2.31	31	13.42
9	3.1	48	15.58
10	2.4	110	44.35
11	2.4	14	11.38
12	2.1	28	13.66
		<b>Promedio</b>	<b>25.32</b>
		<b>Desviación Std.</b>	<b>12.96</b>

**Tabla XVIII.** Cuantificación de linfocitos endoneurales en el nervio ciático de ratas durante la etapa de paresia (48 días ddi).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

En la tabla puede observarse que la cantidad de linfocitos endoneurales es de  $25.32 \pm 12.96$  linfocitos/mm<sup>2</sup>. El error estándar de la media fue de 3.74 y el intervalo alrededor de la media de  $17.09 - 33.56$  linfocitos/mm<sup>2</sup> con un intervalo de confianza del 95%. El análisis estadístico de distribución de los datos se resume en la tabla XVIIIa.

		Linfocitos/mm <sup>2</sup>
<b>N</b>		12
<b>Parámetros Normales <sup>a,b</sup></b>	<b>Media</b>	25.3270
	<b>Desviación Estándar</b>	12.9656
<b>Extremo Mayor Diferencias</b>	<b>Absoluto</b>	.248
	<b>Positiva</b>	.248
	<b>Negativa</b>	-.146
<b>Kolmogorov-Smirnov Z</b>		.859
<b>Sig. Asymp. (2 colas)</b>		.452

- a. La prueba de distribución es normal  
b. Calculada a partir de los datos.

**Tabla XVIIIa.** Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra.

### 3.6.4 Etapa de Parálisis (Grupo 58 días)

La cuenta de linfocitos endoneurales en este grupo de ratas se realizó bajo las mismas condiciones ya descritas en el punto 3.6 y 3.6.1. Los resultados para esta

etapa se muestran en la tabla IXX.

Rata	Área Observada mm <sup>2</sup>	Linfocitos Totales	Linfocitos/mm <sup>2</sup>
1	2.53	32	12.65
2	2.45	77	31.43
3	2.50	240	97.96
4	2.21	303	137.10
5	2.60	133	51.15
6	2.50	165	66.00
7	2.40	234	97.50
8	2.85	76	26.71
9	2.36	51	21.61
10	2.00	56	28.00
11	2.10	114	54.81
		Promedio	56.19
		Desviación Std.	38.51

**Tabla IXX.** Cuantificación de linfocitos endoneurales en el nervio ciático de ratas durante la etapa de parálisis (58 días ddi).

### DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

En la tabla puede observarse la cantidad de linfocitos presentes en el endoneuro del nervio ciático el cual es de  $56.19 \pm 38.51$  linfocitos/mm<sup>2</sup>. El error estándar de la media fue de 11.61 y el intervalo de la media con un 95% confianza fue de 30.32 - 82.06 linfocitos/mm<sup>2</sup>. El análisis estadístico de distribución de los datos se resume en la tabla IXXa.

		Linfocitos/mm <sup>3</sup>
N		11
Parámetros Normales <sup>a,b</sup>	Media	56.1898
	Desviación Estándar	38.5101
Extremo Mayor Diferencias	Absoluto	.194
	Positiva	.194
	Negativa	-.130
Kolmogorov-Smirnov Z		.645
Sig. Asymp. (2 colas)		.800

- a. La prueba de distribución es normal  
b. Calculada a partir de los datos

**Tabla DXXa.** Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra.

### 3.6.5 Etapa de Recuperación (Grupo 112 días)

La cuenta de linfocitos endoneurales en este grupo de ratas se realizó bajo las mismas condiciones ya descritas en el punto 3.6 y 3.6.1. Los resultados para esta etapa se muestran en la tabla XX.

Rata	Area Observada mm <sup>2</sup>	Linfocitos Totales	Linfocitos/mm <sup>3</sup>
1	2.25	4	1.78
2	2.44	7	2.87
3	2.06	0	---
4	2.30	0	---
5	2.31	0	---
6	2.00	0	---
7	2.7	7	2.59
Promedio			1.03
Desviación Std.			1.33

**Tabla XX.** Cuantificación de linfocitos endoneurales en el nervio ciático de ratas durante la etapa de recuperación (112 días ddi).



En la tabla puede observarse que la cantidad de linfocitos presentes en el endoneuro del nervio ciático fue de  $1.03 \pm 1.33$  linfocitos/mm<sup>2</sup>. El análisis estadístico de distribución de los datos se resume en la tabla XXa.

		Linfocitos/mm <sup>2</sup>
N		7
Parámetros Normales <sup>ab</sup>	Media	1.0342
	Desviación Estándar	1.3308
Extremo Mayor	Absoluto	.353
Diferencias	Positiva	.353
	Negativa	-.219
Kolmogorov-Smirnov Z		.959
Sig. Asymp. (2 colas)		.348

- a. La prueba de distribución es normal  
b. Calculada a partir de los datos

**Tabla XXa.** Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra.

### 3.6.6 Resumen de los resultados de la cuantificación de linfocitos en nervio de ratas durante las diferentes etapas de la polineuropatía y de las

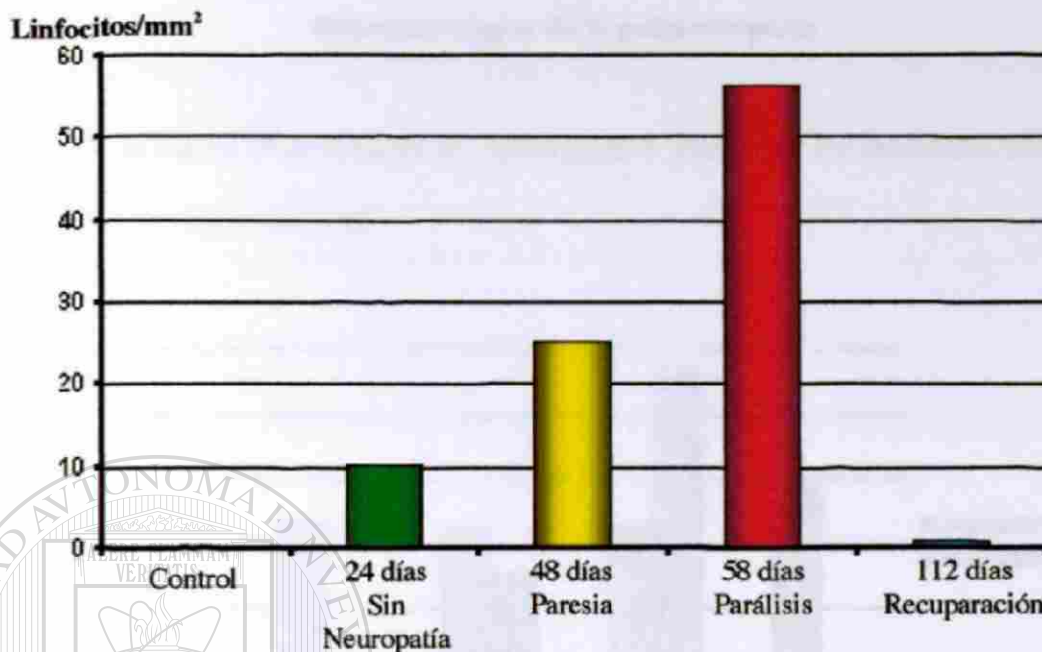
ratas control sin tratar

En la tabla XXI se muestra la cantidad promedio por etapa de linfocitos endoneurales por mm<sup>2</sup>.

	Linfocitos/mm <sup>2</sup>
Control	0.00
Etapas sin neuropatía (24 días ddi)	$10.09 \pm 7.26$
Etapas de paresia (48 días ddi)	$25.32 \pm 12.96$
Etapas de parálisis (58 días ddi)	$56.19 \pm 38.51$
Etapas de recuperación (112 días ddi)	$1.03 \pm 1.33$

**Tabla XXI.** Resumen de la cuantificación de linfocitos en las diferentes etapas de la polineuropatía por *K. humboldtiana*.

La representación gráfica de los resultados se puede observar en la figura 18.



**Figura 18.** Representación gráfica de la cantidad de linfocitos/mm<sup>2</sup> en el nervio ciático de ratas tratadas durante las diferentes etapas de la polineuropatía causada por la *K. humboldtiana*.

El análisis estadístico para determinar la influencia del género de las ratas sobre

los resultados de las variables de interés para todas las etapas se muestra en la tabla XXII.

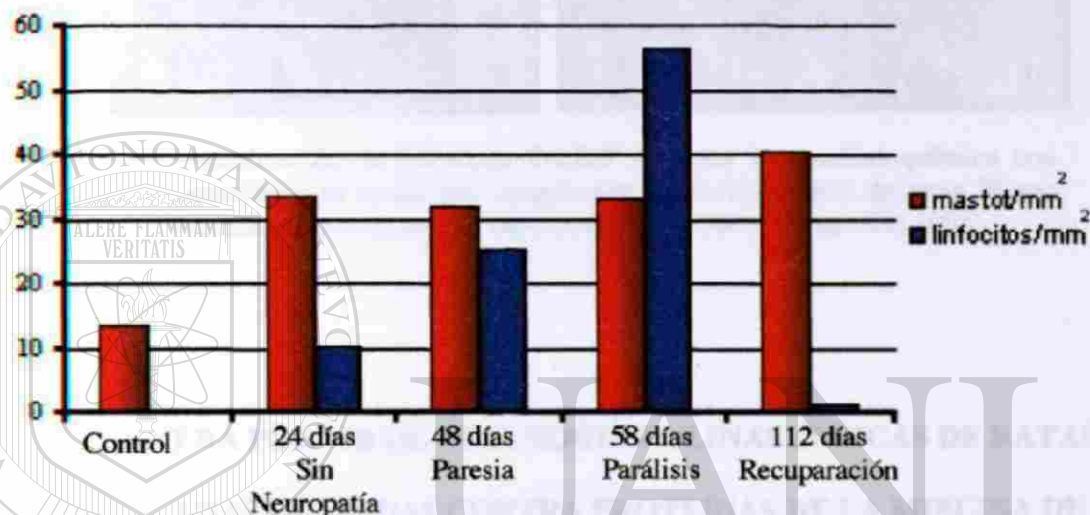
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

	Suma de cuadrados	df	Cuadrado de la media	F	Sig.
Linfocitos/mm <sup>2</sup> Entre los grupos	407.116	1	407.116	.516	.476
Dentro de los grupos	38626.519	49	788.296		
Total	39033.635	50			

**Tabla XXII.** Prueba de ANOVA para establecer si el género de las ratas influyen en los resultados obtenidos.

### 3.6.7 Relación de mastocitos y linfocitos por $\text{mm}^2$ en nervio ciático durante las diferentes etapas de la polineuropatía

En la figura 19 se muestra la representación gráfica de los resultados obtenidos para estos dos tipos celulares.

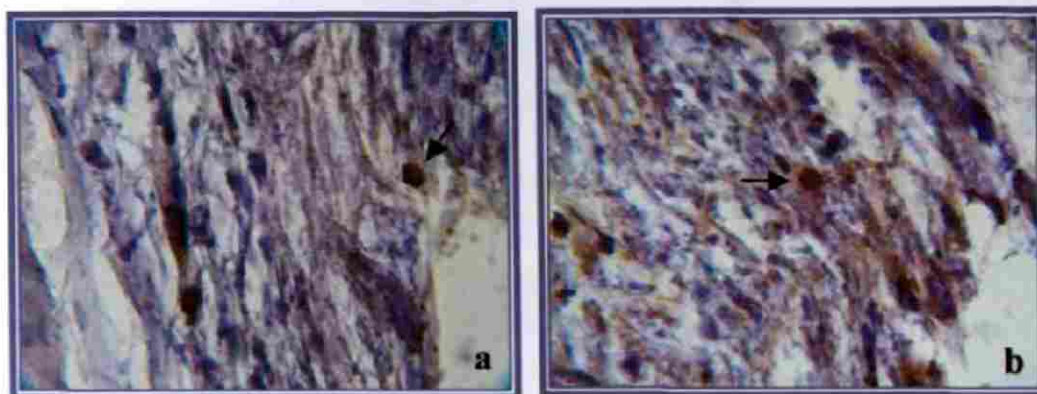


**Figura 19.** Relación de Mastocitos/ $\text{mm}^2$  y Linfocitos/ $\text{mm}^2$  en las diferentes etapas de la polineuropatía causada por la *K. humboldtiana* en ratas Wistar.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

### 3.7 IDENTIFICACIÓN DE LINFOCITOS POR INMUNOHISTOQUÍMICA

Se realizó la identificación de linfocitos presentes en el nervio ciático de ratas tratadas en las diferentes etapas de la polineuropatía por inmunohistoquímica con peroxidasa, de acuerdo al método previamente descrito en la sección 2.2.6, se observó que estas células expresan la molécula CD4 en su superficie. Los resultados se muestran en la figura 20.



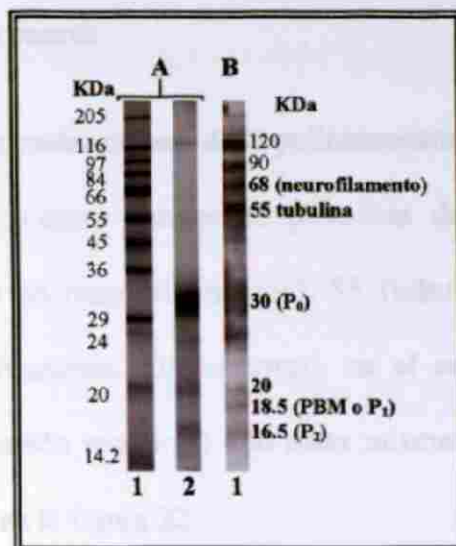
**Figura 20.** Identificación de linfocitos T-CD4<sup>+</sup> (→) por inmunohistoquímica con peroxidasa en cortes por congelación de nervio ciático de ratas Wistar durante la etapa de paresia (a) y parálisis (b) (48 y 58 días ddi) 100X.

**3.8 BÚSQUEDA POR WB DE INMUNOGLOBULINAS SÉRICAS DE RATAS  
TRATADAS DIRIGIDAS CONTRA PROTEÍNAS DE LA MIELINA DE  
NERVIO CIÁTICO**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**3.8.1 Mielina de nervio ciático y electroforesis de proteínas**

Una vez aislada la mielina del nervio ciático se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 12% en condiciones desnaturalizantes, posteriormente se electrotransfirió a una membrana de nitrocelulosa, finalmente se realizó la prueba de WB para detectar la presencia IgM y/o IgG séricas de ratas intoxicadas dirigidas contra alguno(s) de los componentes de la mielina. El patrón electroforético de la mielina y los pesos moleculares de las proteínas que la constituyen se pueden observar en la figura 21.



**Figura 21.** Patrón electroforético de las proteínas de la mielina de nervio ciático de ratas Wistar en gel de poliacrilamida-SDS al 12%. A) Electroforesis de proteínas tinción de Coomassie. 1) Marcadores de Peso Molecular en KDa. 2) Patrón electroforético de las proteínas de la mielina. B) Western blot positivo. 1) mielina más un anticuerpo dirigido contra proteínas de la mielina (dil 1:120).

En la sección A2 se puede apreciar el patrón electroforético de las proteínas de la mielina después de teñir el gel de poliacrilamida con el azul de Coomassie, además, en la sección B1 se observa el WB positivo para la mielina, donde se muestra la

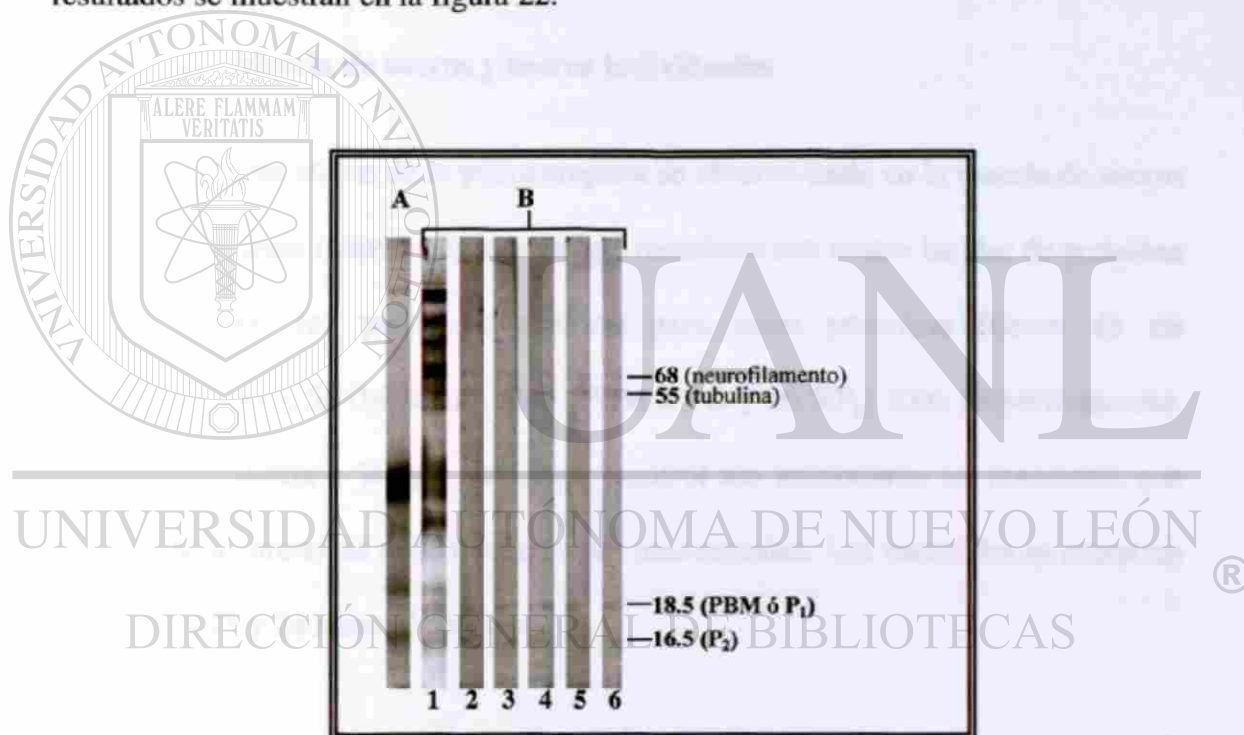
presencia de bandas de proteínas adicionales que no se observaron en el gel, debido a que la tinción del gel no tiene tanta sensibilidad, como la amplificación obtenida con la reacción antígeno anticuerpo.

### 3.8.2 Búsqueda de IgM sérica dirigida contra proteínas de la mielina de nervio ciático en ratas tratadas

Se manejó una mezcla de ocho sueros de ratas pertenecientes a cada una de la etapas de la neuropatía, excepto en la etapa de recuperación en que solo se emplearon 7 sueros, para estudiarlos por WB.

### 3.8.2.1. Mezcla de sueros

En cada una de las cuatro etapas de la polineuropatía estudiadas se observó que la IgM reaccionó con cuatro bandas de proteínas de la mielina cuyos pesos moleculares fueron de 68 (neurofilamentos), 55 (tubulina), 18.5 (PBM ó P<sub>1</sub>) y 16.5(P<sub>2</sub>) KDa respectivamente. Sin embargo, en el caso del grupo control sin tratamiento la IgM también reaccionó con estas mismas bandas de proteínas. Los resultados se muestran en la figura 22.



**Figura 22.** Detección por WB de IgM sérica dirigida contra proteínas de la mielina de nervio ciático, en ratas tratadas y control sin tratar. Mezcla de sueros. **A)** Patrón electroforético de la mielina nervio ciático en gel de poliacrilamida-SDS 12% tinción azul de Coomasie. **B)** WB (mezcla de sueros) 1) control positivo para mielina (anticuerpo monoclonal contra mielina SNP). 2) Control sin tratar. 3) Etapa sin neuropatía (24 días ddi). 4) Etapa de paresia (48 días ddi). 5) Etapa de parálisis (58 días ddi). 6) Etapa de recuperación (112 días ddi).

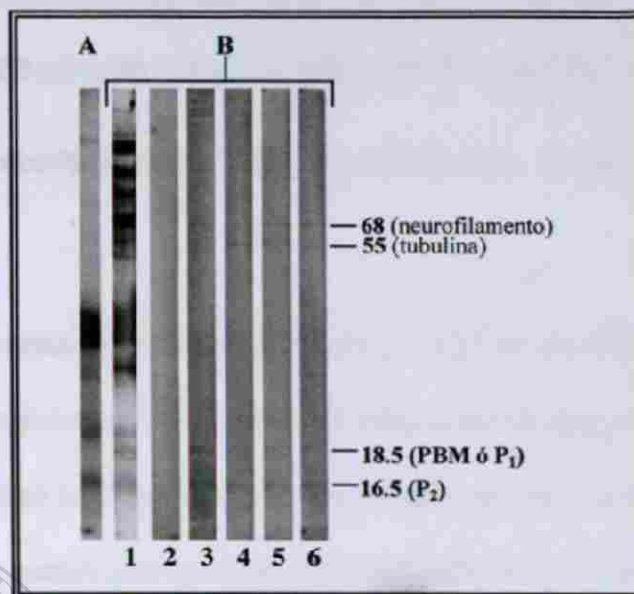
### **3.8.3 Búsqueda de IgG sérica dirigida contra proteínas de la mielina de nervio ciático en ratas tratadas**

Se estudiaron por WB una mezcla de ocho sueros de ratas pertenecientes a cada una de las etapas de la neuropatía, excepto en la etapa de recuperación en que solo se emplearon 7 sueros, posteriormente cinco de estos sueros se probaron individualmente para cada etapa de la polineuropatía.

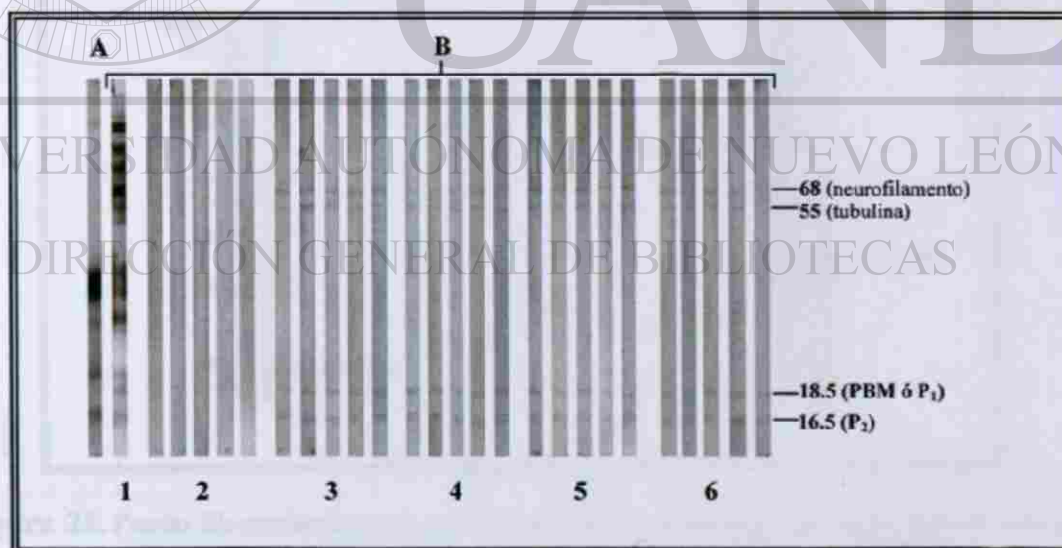
#### **3.8.3.1. Mezcla de sueros y sueros individuales**

En todas las etapas de la polineuropatía se observó tanto en la mezcla de sueros como en los sueros individuales que la IgG reaccionó con cuatro bandas de proteínas de la mielina, los pesos moleculares para estas proteínas fueron de 68 (neurofilamentos), 55 (tubulina), 18.5 (PBM ó P<sub>1</sub>) y 16.5(P<sub>2</sub>) KDa respectivamente.

En lo que respecta a la IgG del grupo control sin tratamiento no reaccionó con ninguna de las proteínas de la mielina antes mencionadas. Los resultados se muestran en la figura 23 y 24 respectivamente.



**Figura 23.** Detección por WB de IgG sérica dirigida contra proteínas de la mielina de nervio ciático, en ratas tratadas y control, sin tratar. Mezcla de sueros. **A)** Patrón electroforético de la mielina nervio ciático en gel de poliacrilamida-SDS 12% tinción azul de Coomasie. **B)** WB (mezcla de sueros). 1) control positivo mielina (anticuerpo monoclonal contra mielina SNP). 2) Control sin tratar. 3) Etapa sin neuropatía (24 días ddi). 4) Etapa de paresia (48 días ddi). 5) Etapa de parálisis (58 días ddi). 6) Etapa de recuperación (112 días ddi).



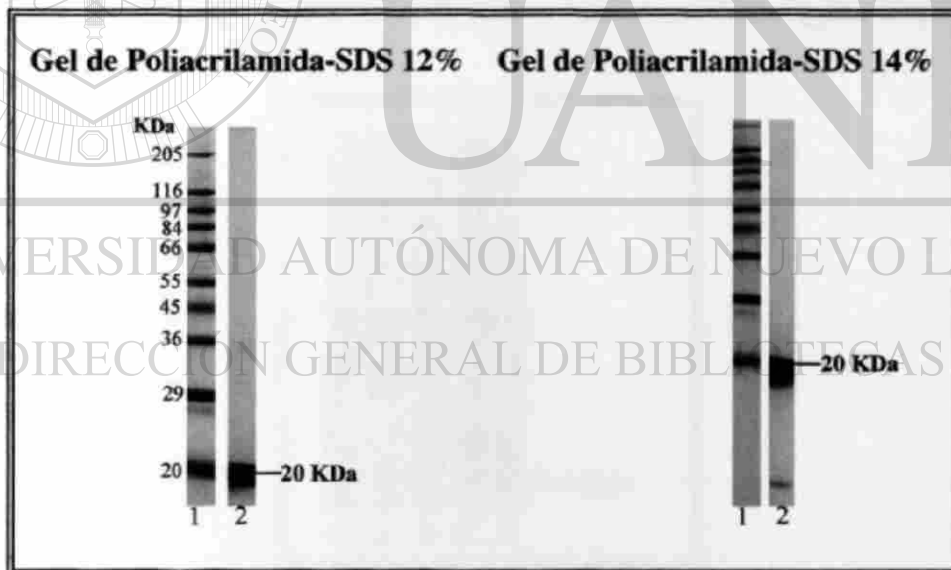
**Figura 24.** Detección por WB de IgG sérica dirigida contra proteínas de la mielina de nervio ciático, en ratas tratadas y control sin tratar. **A)** Patrón electroforético de la mielina nervio ciático en gel de poliacrilamida-SDS 12% tinción azul de Coomasie. **B)** WB 1) control positivo mielina (anticuerpo monoclonal contra mielina SNP). 2) Control sin tratar. 3) Etapa sin neuropatía (24 días ddi). 4) Etapa de paresia (48 días ddi). 5) Etapa de parálisis (58 días ddi). 6) Etapa de recuperación (112 días ddi).



### 3.9 BÚSQUEDA POR WB DE INMUNOGLOBULINAS SÉRICAS DIRIGIDAS CONTRA LA PBM, EN RATAS TRATADAS

#### 3.9.1 Patrón electroforético de la PBM de cerebro de conejo de fabricación comercial

Previa electroforesis de la PBM en gel de poliacrilamida-SDS de 12% y 14% en condiciones desnaturalizantes y posterior electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa, se realizó la detección por WB de IgM y/o IgG en el suero de ratas intoxicadas dirigidas contra esta proteína. El patrón electroforético de la PBM y su peso molecular se puede observar en la figura 25.



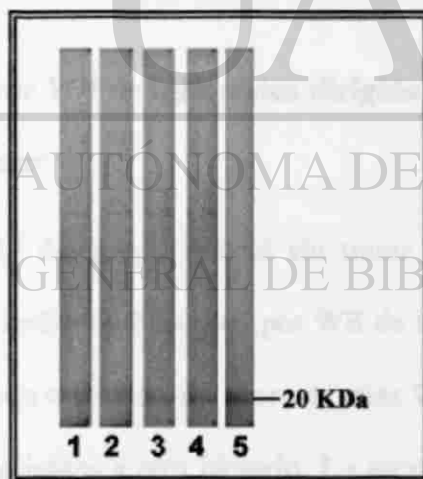
**Figura 25.** Patrón Electroforético de la PBM de conejo. 1 Marcadores de peso molecular en KDa. 2 Proteína básica de la mielina de conejo (20 KDa). Geles teñidos con azul de Coomassie.

### 3.9.2 Búsqueda por WB de IgM sérica dirigida contra PBM de conejo, en ratas tratadas

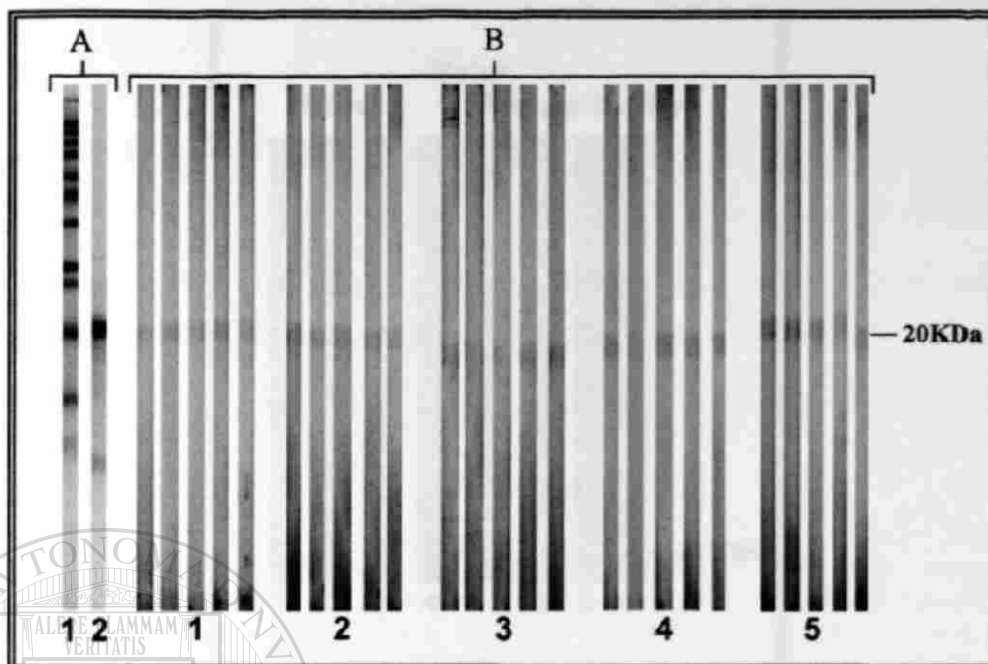
Para la realización de los WB donde se buscó la presencia de IgM sérica dirigida contra PBM de conejo, se utilizó una mezcla de ocho sueros de ratas de cada una de la etapas de la neuropatía, excepto en la etapa de recuperación en que solo se emplearon 7 sueros, posteriormente cinco de estos sueros se probaron individualmente para cada etapa.

#### 3.9.2.1. Mezcla de sueros y sueros individuales

Tanto con la mezcla de sueros como con los sueros individuales de las ratas intoxicadas y ratas control sin tratar se observó que la presencia de IgM que reaccionó con la PBM de conejo (20 KDa). Los resultados se muestran en las figuras 26 y 27.



**Figura 26.** Detección por WB de IgM sérica dirigida contra PBM de conejo, en ratas tratadas y ratas control sin tratar. Mezcla de sueros. 1) Grupo ratas control sin tratar. 2) etapa sin neuropatía (24 días ddi). 3) Etapa de paresia (48 días ddi). 4) Etapa de parálisis 858 días ddi). 5) Etapa de recuperación (112 días ddi). Dilución de la mezcla de sueros 1:20, dilución del conjugado con peroxidasa 1:2500. Gel de poliacrilamida-SDS 12%.

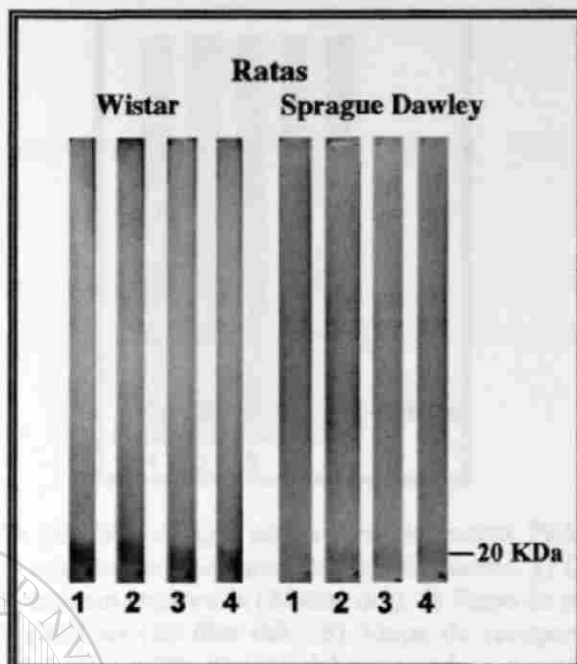


**Figura 27.** Detección por WB de IgM sérica dirigidas contra PBM de conejo, en ratas tratadas y ratas control sin tratar. A) Gel de poliacrilamida-SDS al 14% tinción azul de Coomasie. 1) marcadores de peso molecular. 2) Patrón electroforético de la PBM de conejo 20KDa. B) WB 1) Grupo ratas control sin tratar. 2) Etapa sin neuropatía (24 días ddi) 3) Etapa de paresia (48 días ddi). 4) Etapa de parálisis (58 días ddi). 5) Etapa de recuperación (112 días ddi).

### 3.9.2.2. Búsqueda por WB de IgM sérica dirigida contra PBM de conejo en

#### ratas sin tratar

Debido a que la IgM del grupo control sin tratar también reaccionó con las proteínas de la mielina, se realizó la búsqueda por WB de IgM sérica dirigida contra la PBM de conejo, en diluciones crecientes del suero de ratas Wistar y Sprague Dawley sin tratar estas últimas pertenecientes a otro bioterio. Lo anterior para descartar que esta positividad se debiera a la dilución del suero o a un problema con las ratas de nuestro bioterio. Se observó que la IgM reaccionó con la PBM de conejo (20 KDa), esto se presentó en todas las diluciones probadas del suero y en ambas cepas de ratas se observó que la IgM reaccionó con la PBM. Los resultados se muestran en las figura 28.



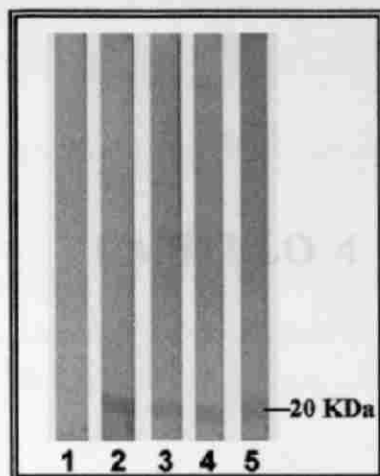
**Figura 28.** Detección por WB de IgM sérica de ratas control sin tratar dirigidas contra PBM de conejo. 1) dilución del suero 1:20, 2) dilución 1:40, 3) dilución 1:60, 4) dilución 1:100.

### 3.9.3 Búsqueda de IgG sérica dirigida contra PBM de conejo, en ratas tratadas

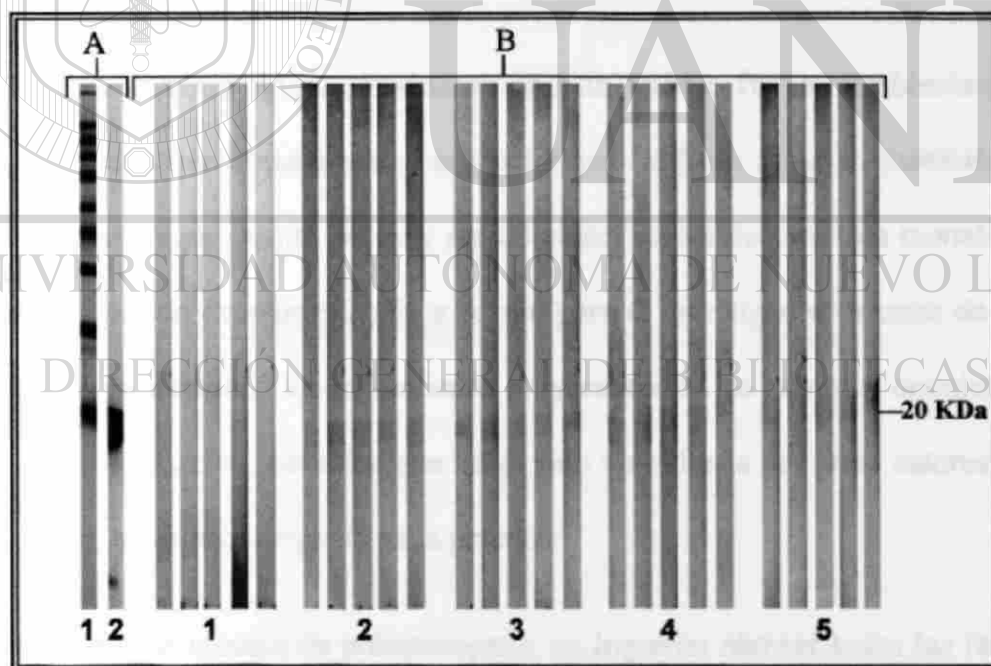
Para la realización del WB se utilizó una mezcla de ocho sueros de ratas de cada una de la etapas de la neuropatía, excepto en la etapa de recuperación en que solo se emplearon 7 sueros, posteriormente cinco de estos sueros se probaron individualmente para cada etapa de la polineuropatía.

#### 3.9.3.1. Mezcla de sueros y sueros individuales

Tanto con la mezcla de sueros como con los sueros individuales de las ratas intoxicadas, se observó que la IgM reaccionó con la PBM de conejo (20 KDa), excepto en el grupo de ratas control sin tratar donde no se observó reacción. Los resultados se muestran en las figuras 29 y 30.



**Figura 29.** Detección por WB de IgG sérica dirigida contra PBM de conejo, en ratas tratadas y ratas control sin tratar. Mezcla de sueros. 1) Grupo ratas control sin tratar. 2) etapa sin neuropatía (24 días ddi). 3) Etapa de paresia (48 días ddi). 4) Etapa de parálisis (58 días ddi). 5) Etapa de recuperación (112 días ddi). Dilución del suero 1:20, dilución del conjugado con peroxidasa 1:2500. Gel de poliacrilamida-SDS 12%.



**Figura 30.** Detección por WB de IgG sérica contra PBM de conejo, en ratas tratadas y ratas control sin tratar dirigidas. Mezcla de sueros. A) Gel de poliacrilamida-SDS al 14% tinción azul de Coomassie 1) Grupo ratas control sin tratar. 2) etapa sin neuropatía (24 días ddi). 3) Etapa de paresia (48 días ddi). 4) Etapa de parálisis (58 días ddi). 5) Etapa de recuperación (112 días ddi). Dilución del suero 1:20, dilución del conjugado con peroxidasa 1:2500. Gel de poliacrilamida-SDS 12%.

## CAPÍTULO 4

### DISCUSIÓN

#### 4.1 MODELO EXPERIMENTAL DE POLINEUROPATÍA

**POR *K. kumboldtiana***

Como primer logro importante de este trabajo fue el establecimiento del modelo de polineuropatía tóxica producido con el fruto de la *K. kumboldtiana* en ratas. Modelo que resultó ser muy reproducible, económico, de baja mortalidad para los animales de experimentación y seguro para el investigador, además de que será muy útil para estudiar los mecanismos subyacentes de los procesos desmielinizantes de esta intoxicación, situación que había sido visualizada por otros autores<sup>(34, 46)</sup>, sin embargo, no se había logrado en la práctica.

Con este modelo de polineuropatía, se lograron obtener todas las fases de la lesión en nervio motor que se presentan en forma natural durante la intoxicación que sufren tanto el humano como los animales, por lo tanto, es posible investigar en forma específica la etapa de interés.

## 4.2 ESTUDIO HISTOLÓGICO DEL NERVIPO CIÁTICO

### Y CUANTIFICACIÓN DE MASTOCITOS

### Y LINFOCITOS

En este modelo las alteraciones histológicas en el nervio ciático de las ratas intoxicadas son similares a los descritos en el humano y en otras especies animales. Adicionalmente a la desmielinización y a la degeneración Walleriana, se observó, la presencia de infiltrado celular del sistema inmune caracterizado por mastocitos y linfocitos.

Hay que destacar que hasta este momento no había sido reportada la presencia de infiltrado celular en el nervio periférico en esta intoxicación, sin embargo ya se había reportado la presencia de infiltrados en otros tejidos como pulmón, astas anteriores de la médula espinal y en piel<sup>(18, 27, 54-56)</sup>.

Es importante mencionar, que se encontró un aumento significativo en la cantidad de mastocitos endoneurales en todas las etapas de la polineuropatía estudiada ( $p < 0.00001$  ANOVA) de 2.3 a 3 veces por arriba de los valores presentados por el grupo de ratas control sin tratar. Este aumento se presentó a partir de la etapa sin neuropatía y permaneció prácticamente constante hasta la etapa de parálisis, sin embargo durante la etapa de recuperación la cantidad de estas células aumentó nuevamente.

Además, durante la **etapa sin neuropatía** se presentaron en su mayoría mastocitos no desgranulados, sin embargo, a partir de la **etapa de paresia y hasta la etapa de recuperación**, predominaron los mastocitos desgranulados. Al realizar el análisis estadístico, se encontró diferencia significativa en la cantidad de mastocitos/mm<sup>2</sup> en las diferentes etapas de la neuropatía con respecto del grupo control ( $p < 0.00001$  ANOVA). Además, no se observó diferencia significativa en el porcentaje de desgranulación entre el grupo control y los grupos de 48, 58, y 112 días, sin embargo, se encontró diferencia significativa con el grupo de 24 días (ANOVA  $p < 0.0001$ ). También se encontró diferencia significativa en la cantidad de mastocitos/mm<sup>2</sup> ( $p < 0.05$  Fisher) entre la etapa de paresia (48 días ddi) y la etapa sin neuropatía, de parálisis y recuperación 24, 58 y 112 días ddi respectivamente.

La prueba estadística de Kolmogorov-Smirnov para las variables mastocitos/mm<sup>2</sup> y mastocitos desgranulados/mm<sup>2</sup> mostró valores superiores al nivel de significancia de 0.1 en todas las etapas de esta polineuropatía y en el grupo control sin tratar lo que permitió asumir la condición de normalidad para las variables de interés. Finalmente, el análisis estadístico ANOVA para determinar la influencia del género de las ratas sobre los resultados, mostró niveles de significancia superiores al 0.1 en cada una de las etapas lo que indicó que el género de las ratas no influyó en las variables bajo estudio.

Junto con la presencia de los mastocitos se presentó un aumento significativo y progresivo en la cantidad de linfocitos endoneurales por mm<sup>2</sup>, que se presentó a partir de la etapa sin neuropatía y continuó hasta la etapa de parálisis ( $p < 0.00001$  ANOVA), esto en relación directa con la severidad del daño en el nervio ciático.



Sin embargo, en la etapa de recuperación estas células se encontraron prácticamente ausentes, además no se observó diferencia significativa entre el grupo de ratas durante la etapa de recuperación y el grupo control sin tratar.

Es importante señalar, que en la etapa de paresia se presentó un incremento en la cantidad de estas células del 150% con respecto de la etapa sin neuropatía y que en la etapa de parálisis se observó otro aumento de igual magnitud al que se presentó en la etapa de paresia. No obstante, durante la etapa de recuperación la cantidad de linfocitos disminuyó casi hasta alcanzar nuevamente el cero.

El análisis estadístico de comparación múltiple por la prueba de LSD de Fisher mostró diferencia significativa ( $p < 0.005$ ) entre el grupos control sin tratar y durante la etapa de recuperación con respecto de los grupos durante la etapa de paresia y parálisis (48 y 58 días ddi), también se observó diferencia significativa durante la etapa de parálisis con respecto del resto de todas las etapas y grupo control sin tratar ( $p < 0.0001$ ).

#### DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

La prueba estadística de Kolmogorov-Smirnov mostró valores superiores al nivel de significancia de 0.1 en todas las etapas de esta polineuropatía lo que permitió asumir la condición de normalidad para las variables de interés. Finalmente, el análisis estadístico ANOVA para determinar la influencia del género de las ratas sobre los resultados, mostró niveles de significancia superiores al 0.1 en cada una de las etapas lo que indicó que el género de las ratas no influyó en las variables bajo estudio.

Los linfocitos se caracterizaron por inmunohistoquímica y resultaron ser linfocitos T-CD4<sup>+</sup>, sin embargo, no se puede descartar la presencia de otros tipos de linfocitos.

Es importante señalar a manera de resumen, que los mastocitos fueron el primer tipo celular que aumentó en forma significativa a partir de la etapa sin neuropatía y permaneció prácticamente sin cambio hasta la etapa de parálisis, seguido por un aumento progresivo de la cantidad de linfocitos en estas tres mismas etapas conforme aumentó el daño en el nervio ciático. También se pudo observar que los mastocitos aumentan nuevamente y los linfocitos prácticamente desaparecieron en la etapa de recuperación.

Como se mencionó anteriormente, en las diferentes etapas de la polineuropatía inducida por *K. humboldtiana* no había sido reportada hasta ahora la presencia de

linfocitos y mastocitos en el endoneuro de los nervios ciáticos de las ratas intoxicadas.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

### **4.3 DETECCIÓN DE INMUNOGLOBULINAS SÉRICAS DE RATAS TRATADAS DIRIGIDAS CONTRA PROTEÍNAS DE LA MIELINA DEL NERVI0 CIÁTICO**

Otra contribución importante de este trabajo y que tampoco había sido reportada, fue la detección de inmunoglobulinas séricas IgM e IgG, dirigidas contra neurofilamentos (68 KDa), tubulina (55 KDa), PBM o P<sub>1</sub> (18.5 KDa) y P<sub>2</sub> (16.5 KDa) en las ratas intoxicadas con *K. humboldtiana* durante las diferentes etapas de esta polineuropatía. Sin embargo, llamó la atención que la inmunoglobulina sérica IgM del grupo de ratas control sin tratar también reconoció a estas proteínas. Este mismo resultado se observó después de hacer varias diluciones del suero de ratas Wistar y Sprague Dawley sin tratar, lo que hace suponer que se trate de un autoanticuerpo natural.

Ante los resultados obtenidos en este trabajo y al hecho de que ellos no habían sido reportados previamente, surgen una serie de interrogantes. Las preguntas y su posible respuesta se plantearon individualmente como se muestra a continuación.

En este trabajo se encontró un aumento significativo en la cantidad de los mastocitos endoneurales en las diferentes etapas de la polineuropatía estudiada, pero ¿cuál es el papel de los mastocitos en la desmielinización producida por el fruto de la *K. humboldtiana*?

Se sugiere que los mastocitos tienen una función neuroinmunomoduladora ya que participan en procesos neurofisiológicos y neuropatológicos y se les ha considerado como células parácrinas<sup>(60, 68-71)</sup>.

Se ha reportado un aumento en la cantidad de mastocitos endoneurales en diferentes neuropatías del SNP y en enfermedades neurodegenerativas del SNC a manera de ejemplo tenemos a la neuropatía diabética, la intoxicación por galactosa, la esclerosis múltiple, la EAE, el SGB, EAN, la neurofibromatosis, sección por neuroma, enfermedad de Alzheimer, degeneración Walleriana y en neuropatías hereditarias. Además, se reportó que en la desmielinización primaria se presentó un incremento importante en la cantidad de mastocitos en procesos inmunes, no inmunes, inflamatorios y no inflamatorios<sup>(60, 68, 72-74)</sup>.

Los mastocitos son células que contienen una gran cantidad de mediadores químicos preformados (primarios) en forma de gránulos, que al ser activados mediante un estímulo adecuado son capaces de liberarlos al microambiente donde se encuentren presentes. Entre los mediadores químicos primarios tenemos: **aminas vasoactivas** (histamina, adrenalina, dopamina, serotonina), **quimoquinas** (IL-8, MCP-1, MCP-3, MCP-4, RANTES), **enzimas** (arilsulfatasas, carboxipeptidasa A, quimasa, fosfolipasas y triptasas), **factores de crecimiento** (CSF, GM-CSF b-FGF, NGF, BDNF), péptidos, factores quimiotácticos, factor liberador de corticotropina (CRH), endorfinas, cininas (bradisinina), somatostatina, sustancia P, péptido intestinal vasoactivo (VIP), **proteoglicanos**, (heparina, condroitin sulfato, ácido hialurónico).

Además, son capaces de sintetizar *de novo* citocinas (IL1,2,3,4,5,6,9,10,13,16, IFN- $\gamma$ , MIF y TNF- $\alpha$ ) y productos del ácido araquidónico como prostaglandinas y leucitrienos (LTB4, FAP, PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, LTC4, NO)<sup>(73-76)</sup>.

De los mediadores antes mencionados la histamina es capaz de alterar la permeabilidad de la barrera hematonerviosa, lo que favorece la vasodilatación y por lo tanto, la migración celular. También se tiene conocimiento de que las proteasas (quimasa y tripsasa) son capaces de degradar a las proteínas de la mielina, específicamente a la P<sub>0</sub> y a la PBM o P<sub>1</sub>, además, se ha reportado que la P<sub>2</sub> y la PBM son capaces de favorecer la desgranulación de los mastocitos, por lo tanto se sugiere que son capaces de contribuir en el daño a la mielina<sup>(60, 73, 77-79)</sup>, sin embargo, no se puede descartar la participación de otras enzimas.

Otra de las incógnitas que surgió de este trabajo fue **¿qué factor o factores pueden desencadenar la migración y estimulación de los mastocitos ?**

Se han reportado una serie de estímulos que son capaces de inducir la activación de los mastocitos con la subsiguiente desgranulación de estos, cabe mencionar algunos de ellos, después se hará hincapié en los que estén estrechamente relacionados con este trabajo, así tenemos que la presencia de componentes del complemento (C3a y C5a), bacterias, sustancias químicas, citocinas (IL1,2,4, TNF- $\alpha$ ), radicales libres (superóxido), factores de crecimiento (NGF, SCF), IgE y antígenos, neuropéptidos, condiciones físicas, la presencia de toxinas (bacterias, insectos, medusas, plantas (hiedra venenosa). También las proteínas básicas de la mielina (P<sub>1</sub> y P<sub>2</sub>) inducen su desgranulación<sup>(61, 75, 80)</sup>.

En estudios de hepatotoxicidad *in vitro* con la T-514 (PA<sub>1</sub>) aislada de plantas del género *Karwinskia*, se demostró que esta toxina es capaz de generar radicales libres, presumiblemente peróxido de hidrógeno y anión superóxido, donde se sugiere que el estrés oxidativo pudiera ser el mecanismo potencial de citotoxicidad de esta toxina<sup>(81-83)</sup>. Por analogía con otros compuestos antracenónicos, se ha propuesto que estas toxinas al ser metabolizadas pudieran generar radicales semiquinona, los cuales son capaces de difundir directamente a través de la membrana plasmática y reducir el oxígeno y producir anión superóxido extracelular<sup>(81, 84, 85)</sup>.

Por lo anterior, se propone que estos radicales libres podrían inducir la activación de los mastocitos y con la acción de las enzimas se favorecería la degradación de la mielina, lo conduciría a la exposición y liberación de PBM y P<sub>2</sub>, que a su vez incrementaría la activación y desgranulación de más mastocitos.

Por otra parte, se sabe que los mastocitos son células residentes del SNP y del SNC y que se encuentran en mayor cantidad en las regiones distales del SNP, hecho que pudiera explicar el porque de la polineuropatía ascendente<sup>(68)</sup>.

Con la información anterior se puede asumir que los mastocitos a través de la liberación de mediadores químicos pueden lesionar a la mielina del nervio periférico e incluso del SNC, y favorecer la acumulación y activación de linfocitos.

Sin embargo, dado que los animales recuperados presentaban una mayor cantidad de mastocitos ¿cuál sería el papel de los mastocitos durante la remielinización del nervio ciático?

Se ha demostrado que los mastocitos sintetizan almacenan y liberan el factor de crecimiento nervioso (NGF) y el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) que son considerados esenciales para el desarrollo y mantenimiento de las células nerviosas del SNP y del SNC <sup>(71, 86, 87)</sup>. Además, se considera que el NGF ejerce una función inmunomoduladora, ya que participa en el mantenimiento de la homeostasis neuronal como mediador de la comunicación recíproca entre neuronas, mastocitos y linfocitos. También, se ha reportado que la PGE<sub>2</sub> sintetizada por los mastocitos participa en la regulación de la respuesta inflamatoria y en la regeneración neuronal al regular la producción de NGF. Por su parte, las células de Schwann también secretan NGF y presentan un aumento en la expresión del receptor para NGF durante el inicio de la remielinización <sup>(76, 88, 89)</sup>.

Por lo tanto, se puede proponer que el mayor número de mastocitos desgranulados encontrados en las ratas recuperadas se debe a que intervienen en el proceso de remielinización, probablemente al liberar factores diferentes a los que son secretados durante el proceso de desmielinización, a través de otros mecanismos de regulación, puesto que los mastocitos son capaces de producir diversas sustancias bajo estímulos diferentes.

Después de proponer el papel que podrían jugar los mastocitos en esta polineuropatía, la siguiente pregunta fue: **¿qué clase de linfocitos se encuentran presentes en esta lesión y cual sería su papel?**

Se ha observado la acumulación de linfocitos TCD4<sup>+</sup> en tejidos donde se encuentran mastocitos activados y se cree que ellos juegan un papel crítico en la generación de eventos celulares posteriores, como los que se observan en la fase tardía de la respuesta alérgica o en las respuestas de hipersensibilidad retardada.

Los mastocitos por su parte pueden favorecer la migración de los linfocitos T hacia las áreas de inflamación, ya sea a través de la síntesis y liberación de factores quimiotácticos como la IL-16 o por inducción de moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 sobre las células endoteliales. Se ha sugerido, que los linfocitos T-CD4<sup>+</sup> amplifican la respuesta inmune y mantienen el proceso patológico, tal situación podría suceder en esta polineuropatía ya que se presentó un aumento en la cantidad de linfocitos progresivo y en relación directa con la severidad de la desmielinización<sup>(90-94)</sup>.

Por inmunohistoquímica se determinó que los linfocitos presentes en esta desmielinización eran linfocitos T-CD4<sup>+</sup>, sin embargo, no se descarta la posibilidad de que se presenten otras clases de linfocitos.

Por otra parte, los mastocitos de rata, ratón y de los humanos son células fagocíticas y presentadoras de antígeno que expresan el complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC II) e inducen la activación de células T-CD4 antígeno específicas. Así mismo, los mastocitos sintetizan y liberan IL-4 e IFN- $\gamma$  que inducen células Th<sub>1</sub> y Th<sub>2</sub>.



Se ha observado que células T reactivas para la proteína P<sub>2</sub> son capaces de transferir la neuritis experimental aguda (EAN) a ratas Lewis sin tratar, no obstante se desconoce el mecanismo por el cual estas células causan la desmielinización<sup>(92, 95-98)</sup>.

Con lo expuesto aquí podría suponer que los mastocitos a través de la síntesis de citocinas que inducen moléculas de adhesión que favorecen la migración de linfocitos TCD4<sup>+</sup> a los nervios periféricos, además, también se puede sugerir que los linfocitos amplifican la respuesta inmune y mantienen el proceso patológico.

Debido a que se encontraron anticuerpos IgG dirigidos contra proteínas de la mielina en los animales con polineuropatía, se propone que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> encontrados en este estudio son Th<sub>1</sub>, aunque no se descarta la posibilidad de que también se activen Th<sub>2</sub> y se produzca IgE.

Entonces ¿cómo se explica la presencia de anticuerpos IgM dirigidos contra proteínas de la mielina en todas las ratas? Se sabe que prácticamente todos los vertebrados cuentan con autoanticuerpos naturales, que en el humano corresponden a IgM polireactivas e IgG de baja afinidad las cuales reaccionan con tubulina, albúmina, transferrina, actina, fetuina, citocromo c, mioglobulina, colágeno, y tiroglobulina. Se ha sugerido que la función principal de los autoanticuerpos es su participación en la homeostasis del sistema inmune en el control de la producción anticuerpos, así como en la eliminación de antígenos externos o autoantígenos viejos y en el desencadenamiento de la respuesta inmune específica<sup>(99-102)</sup>.

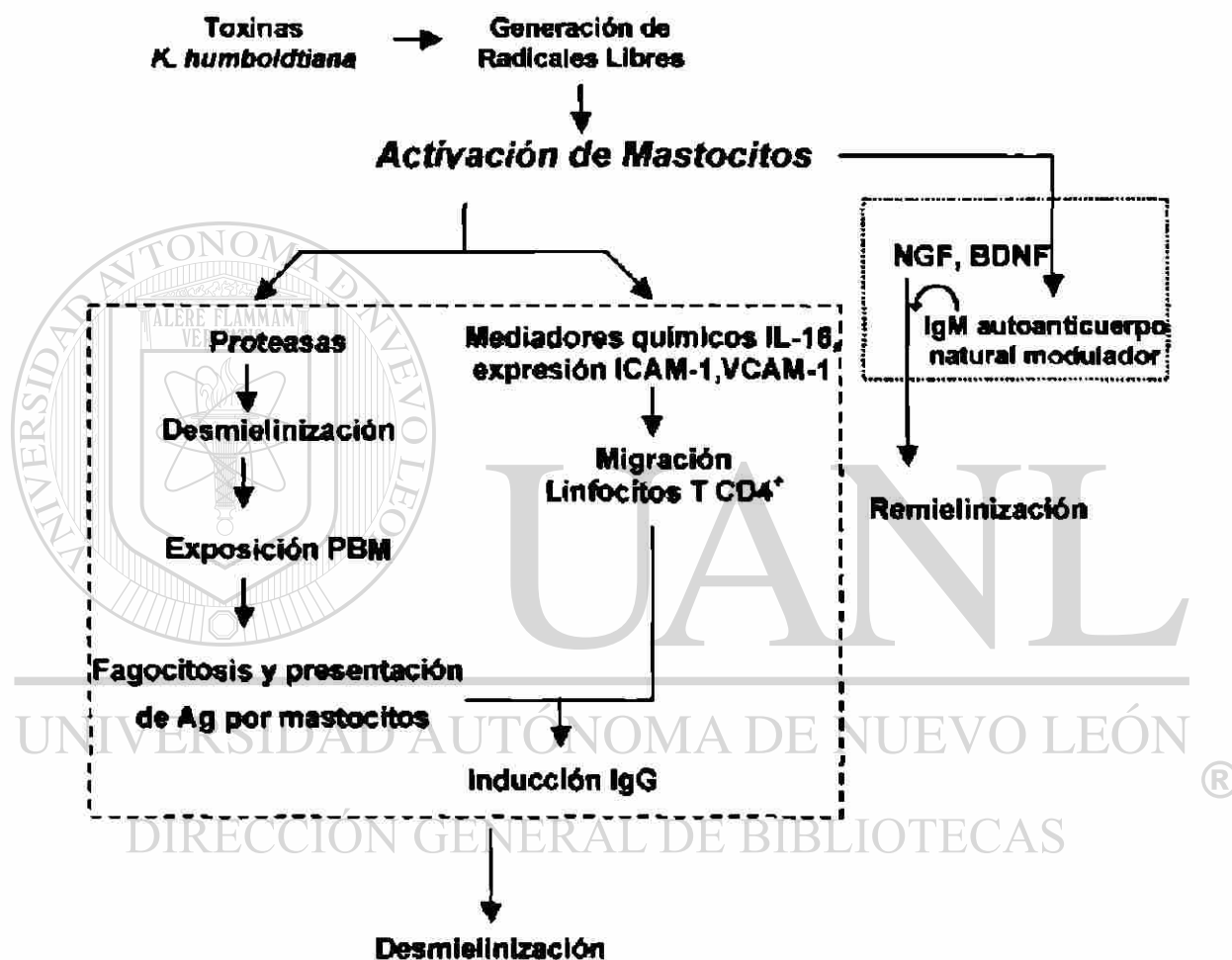
En humanos y en roedores se ha mostrado la presencia de autoanticuerpos naturales IgMk dirigidos contra la PBM y contra oligodendrocitos y se ha observado que favorecen el proceso de remielinización en el modelo murino de encefalomiелitis viral de Theiler y en la desmielinización no inmune causada por lisolecitina<sup>(103, 105)</sup>. Con esta información se propone que los anticuerpos IgM encontrados en el suero de las ratas intoxicadas y sin tratar correspondan a autoanticuerpos naturales que pudieran estar opsonizando los restos de mielina y así favorecer el proceso de remielinización y de recambio y homeostasis de la mielina del nervio.

La información aquí mostrada quizá explique el papel de las inmunoglobulinas IgM, sin embargo, ¿qué papel juegan los anticuerpos IgG dirigidos contra las proteínas de la mielina, encontrados en este modelo de polineuropatía?

Puesto que la IgG dirigida contra proteínas de la mielina, solamente se presenta en animales que presentaron la polineuropatía y no en las ratas sin tratar. Se propone que la IgG presente en los animales intoxicados con la *K. humboldtiana* contribuye al proceso de desmielinización, probablemente a través de la activación de complemento, lo cual deberá investigarse.

De acuerdo a los resultados aquí mostrados se proponen los siguientes mecanismos de desmielinización y remielinización.

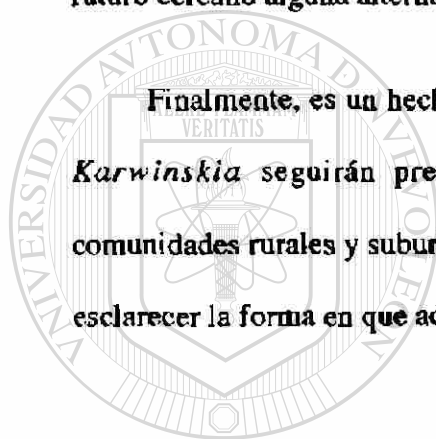
**Probable Mecanismo de Desmielinización y Remielinización en la  
intoxicación por *K. humboldtiana***



Con el conocimiento de que los mastocitos son células residentes del SNP y del SNC y que se encuentran en mayor cantidad en las regiones distales del SNP, este hecho pudiera explicar el porque de la polineuropatía ascendente<sup>(69)</sup>.

Con los resultados de este trabajo y que hasta hoy no habían sido reportados, contamos con una herramienta más que nos ayudará a comprender mejor el mecanismo de acción de las toxinas de la *K. humboldiana* y de esta forma ofrecer quizá en un futuro cercano alguna alternativa para el tratamiento de los pacientes intoxicados.

Finalmente, es un hecho que mientras existan en nuestro país arbustos del género *Karwinskia* seguirán presentándose casos de parálisis, particularmente en las comunidades rurales y suburbanas, por lo tanto se hace necesario el continuar intentando esclarecer la forma en que actúan estas toxinas.



UANL

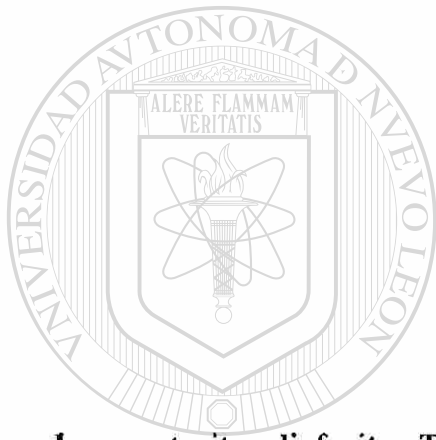
---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



## CAPÍTULO 5



### CONCLUSIÓN

UANL

Los mastocitos, linfocitos T CD4<sup>+</sup> e inmunoglobulinas participan en el proceso de

desmielinización, por lo que se confirma la intervención de componentes del sistema

inmune en las diferentes etapas de la polineuropatía causada por el fruto de la *K.*

*humboldtiana*.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Harrison. Medicina Interna 5ª Edición. Ediciones Científicas La Prensa Médica Mexicana S. A. México 2147-2150 (1982).
2. Robbins. Patología Estructural y Funcional. 2ª Edición. Nueva Editorial Interamericana México D. F. 1420-1424. (1984).
3. Garbay, B., Heape, A. M., Sargueil, F., Cassagne, C. Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol* 61(3): 267-304 (2000)
4. Rosenbluth, J. A. Brief history of myelinated nerve fibers: one hundred and fifty years of controversy. *J Neurocytol* 28(4-5):251-262 (1999)
5. Morell, P., Toews, A. D. Schwann cells as targets for neurotoxicants. *Neurotoxicology* 17(3-4):685-695 (1996).

---

6. Diccionario Terminologías de Ciencias Médicas 13ª Ed. Editora Masson S. A. Barcelona España (1999).
7. El Manual Merck de Diagnóstico y Terapéutica 7ª Edición. Nueva Editorial Interamericana S. A de C. V. México D. F. 1265-1274 (1986)
8. Stein, J. H. Internal Medicine 2ª Edición. Little, Brown and Company Inc. Boston/Toronto pp 2231-2236. (1987).
9. Del Pozo, E. C. Los efectos paralizantes de la tullidora. Estudios clínicos y experimentales. *Gac. Méd. Méx.* 95:179-182. (1965).
10. Escobar, A., Nieto, D. Aspectos Neuropatológicos de la intoxicación con *Karwinskia humboldtiana*. Estudio experimental. *Gac. Méd. Méx.* 95: 163-177. (1965).

11. Puértolas-Márquez, M. A., Nava-Jimenez, O., Medina-López, H. A., López-Orozco, F. X., Oyervides-Pinales, J. F. Polirradiculoneuritis por *Karwinskia humboldtiana*. Informe de seis casos. Rev Med IMSS (México) 22-25. (1984).
12. Bermúdez, M. V. Lozano-Meléndez, F. E., Salazar-Leal, M. E., Waksman-Torres, N., Piñeyro-López, A. Intoxicación de una familia por *Karwinskia humboldtiana* (Tullidora). Gac. Méd. Méx.; 131: 100-106. (1995).
13. Martínez, M. Tullidora. Las Plantas Medicinales de México 1ª Edición. Ed. Botas. 501-504. (1944).
14. Fernández-Nava R. Nombres comunes, usos y distribución geográfica del género *Karwinskia* (*Rhamnaceae*) en México. Anales Inst. Biol. Univ. Nac. Autón. México, Ser. Bot. 63(1):1-23. (1992).
15. Bermúdez, M. V., González-Spencer, D., Guerrero, M., Waksman, N., Piñeyro, A. Experimental Intoxication with Fruit and Purified Toxins of Buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*). Toxicol; 24: 1091-1097. (1986).
16. Castillo-Nájera, F. Contribución al estudio de la parálisis tóxica. Un envenenamiento colectivo con tullidora. En: Memoria del V Congreso Médico Mexicano. México, D. F.: Dirección de Talleres Gráficos, 240-244. (1920).
17. Padrón-Puyou, F. Estudio clínico-experimental de la parálisis por *Karwinskia humboldtiana* (tullidora) en niños. Gac. Méd. Méx.; 8:299-311. (1951).
18. Padrón, F., Velázquez, T. Patología experimental y clínica de la parálisis por *Karwinskia humboldtiana*. Rev Méx Ped; 25:225-237. (1956).
19. Carrada-Bravo, T., López-Leal, H., Vázquez-Arias, G., Ley- López, A. Brote epidémico de polirradiculoneuritis por tullidora *Karwinskia humboldtiana*. Bol Méd Hosp Inf Méx; 3: 139-146. (1983).
20. Clavijero, F. X. Historia de la Antigua o Baja California. 1ª Edición. Ed. Porrúa México. 31-36. (1982).
21. Segovia-Philip, A., Zermeño- Phóls, F. Polirradiculoneuritis tóxica por *Karwinskia humboldtiana*. A propósito de un caso. Bol. Med. Hosp. Infant; 29(1):98-90. (1972).

22. Dreyer DL, Arai I, Bachman CD, Anderson WR Jr, Smith RG, Daves GD. Toxins causing noninflammatory paralytic neuropathy. Isolation and structure elucidation. *J Am Chem Soc* 1975;97: 4985-4990
23. Domínguez, XA., Temblador, D., Cedillo-L, E. Estudio químico de la raíz de la tullidora (*Karwinskia humboldtiana* Zucc). *Rev. Latinoamer. Quím.*; 7 :46-48. (1976).
24. Waksman de Torres, N., Ramírez-Durón, R. Isolation of a New Dimeric anthracenone from *Karwinskia parvifolia*. *Rev. Latinoam. Quím.* 23/1 y 22/4; 25-27. (1992).
25. Rivas, V., Torres, R., Waksman, N. Dimeric anthracenones from *Karwinskia species*. *Planta Med.*; 56:562-564. (1990).
26. Rivas-G, Verónica. Estudio químico de los extractos semipolares del fruto de la *K. parvifolia* y *K. johnstonii*. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina, U. A. N. L. Monterrey, N. L. (1995).
27. Bermúdez-Barba, M. V. Toxicidad aguda de la *Karwinskia humboldtiana* en diferentes especies de animales. Disertación Doctoral. U. A. N. L. Monterrey, N. L. (1989).
28. Bermúdez, M. V., Martínez, F. J., Salazar, M. E., Waksman, N., Piñeyro, A. Experimental Acute Intoxication with Ripe Fruit of *Karwinskia humboldtiana* (Tullidora) in Rat, Guinea Pig, Hamster and Dog. *Toxicon*; 30: 1493-1496.. (1992).
29. Bermúdez, M. V., González-Spencer, D., Guerrero, M., Waksman, N., Piñeyro, A. Experimental Intoxication with Fruit and Purified Toxins of Buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*). *Toxicon*; 24: 1091-1097. (1986)
30. Bermúdez, M. V., Lozano-Meléndez, F. E., Tamez-Rodríguez, V. A., Díaz-Cuello, G., Piñeyro-López, A. Frecuencia de la intoxicación con *Karwinskia humboldtiana* en México. *Salud Pública de Méx* 1995; 37: 57-62.
31. Bustamante-Sarabia, Olvera-Rabiela, j. E., Correa Nieto-Cañedo L. Intoxicación fatal por (*Karwinskia humboldtiana*) comunicación de un caso. *Gac. Méd. Méx.*; 3(5):241-244. (1978).
32. Arellano-Cervantes, E., Mendoza-Cruz J. F., Domínguez-Chavez, F. J. Intoxicación por *Karwinskia johnstonii* Fernández: Estudio de 12 pacientes. *Bol Med Hosp. Infant Mex*; 51(2):105-112. (1994).



33. Montoya-Cabrera, M. A., López-Martín, G., Hernández-Zamora, A. Intoxicación por *Karwinskia humboldtiana*. Conceptos actuales. Rev. Med. IMSS (México); 20(6):707-710. (1982).
34. Charlton KM, Pierce KR. A neuropathy in goats caused by experimental coyotillo (*Karwinskia humboldtiana*) poisoning. II. Lesions in the peripheral nervous system-teased fiber and phosphatase acid studies. Path Vet; 7:385-407. (1970)
35. Mitchell, J., Weller, R. O., Evans, H., Arai, I., Daves, G. D. Jr. Buckthorn neuropathy: effects of intraneural injection of *Karwinskia humboldtiana* toxins. Neuropathol Appl Neurobiol; 4:85-97. (1978).
36. Martínez, H. R., Bermúdez, M. V., Rangel-Guerra, R. A., de León-Flores, L. Clinical diagnosis in *Karwinskia humboldtiana* polyneuropathy. J Neurol Sci. 154(1):49-54. (1998).
37. Charlton, K. M., Claborn, L. D., Pierce, K. R. A Neuropathy in Goats Caused by Experimental Coyotillo (*Karwinskia humboldtiana*) Poisoning: Clinical and Neurophysiologic Studies. Am. J. Vet. Res. 32(9):1381-1389. (1971).
38. Muñoz-Martínez E. J., Chavez B. Conduction block and functional denervation caused by tullidora ((*Karwinskia humboldtiana*). Exp Neurol. 65:255-270. (1979).
39. Muñoz-Martínez E. J. Cueva, J., Joseph-Nathan, P. Denervation caused by Tullidora (*Karwinskia humboldtiana*). Neuropathol Appl Neurobiol 9:121-134. (1983).
40. Hernández-Cruz, A., Muñoz-Martínez, E. J. Distal Reduction of the Conduction Velocity of  $\alpha$ -Axons in Tullidora (Buckthorn) Neuropathy. Exp Neurol. 82: 335-343. (1983).
41. Muñoz-Martínez, E. J., Cuellar-Pedroza, H., Rubio-Franchini, C., Jáuregui-Rincón J., Joseph-Nathan, P. Depression of fast axonal transport in axons demyelinated by intraneural injection of neurotoxin from *K. humboldtiana*. Neurochem Res. 19(11):1341-1348. (1994).
42. Charlton, K. M., Pierce, K. R. A Neuropathy in goats caused by experimental coyotillo (*Karwinskia humboldtiana*) poisoning. IV. Light and electron microscopy lesions in peripheral nerves. Path Vet; 7:420-434. (1970)

43. Wheeler, M. H., Camp, E. J. Inhibitory and uncoupling actions of extracts from *Karwinskia humboldtiana* on respiration and oxidative phosphorylation. *Life Sciences* 10(ptII):41-51. (1971).
44. Aoki, K., Muñoz-Martínez, E. J. Quantitative changes in myelin proteins in peripheral neuropathy caused by tullidora (*Karwinskia humboldtiana*). *J Neurochem.* 36(1):1-8. (1981).
45. Robbins. *Patología Estructural y Funcional*. 6ª Edición. Ed. McGraw-Hill Interamericana. 1320-1322 (2000).
46. Weeler, R. O., Mitchell, J., Daves, G. D. Jr. Buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*) Toxins. En: Spencer P. Schaumburg H. Ed. *Experimental and clinical neurotoxicology*. Baltimore: Williams and Wilkins, 336-347. (1980).
47. McKhann, G. M. Guillain-Barré Syndrome: Clinical and Therapeutic Observations. *Ann Neurol* 27suppl:S13-S16. (1990).
48. Asbury, A. K., Cornblath D. R. Assessment of current Diagnostic Criteria for Guillain-Barré Syndrome. *Ann Neurol* 27 suppl:S21-S24. (1990).
49. Bermúdez de Rocha, M. V., Lozano-Meléndez, F. E., Salazar-Leal, M.E., Waksman de Torres, N., Piñeyro-López, A. Intoxicación de una familia por *Karwinskia humboldtiana* (Tullidora). *Gac Méd Méx.* 131(1): 100-106. (1995).
- 
50. Asbury, A. K. Guillain-Barré syndrome: historical aspects. *Ann Neurol* 27 suppl:S2-S6. (1990).
51. Rostami, A. M. Pathogenesis of Immune-Mediated neuropathies. *Ped Res* 33 suppl 1:S90-S94. (1993).
52. Koski, C.L. Characterization of complement-fixing antibodies to peripheral nerve myelin in Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol* 27 suppl: S44-S47.. (1990).
53. Koski, C.L. Mechanisms of Schwann cell damage in inflammatory neuropathy. *J Infect Dis* 176 suppl 2:S169-172. (1997).

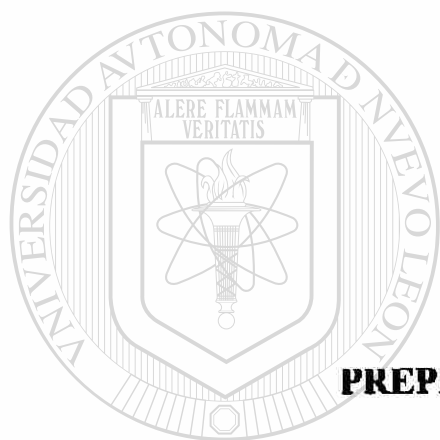
54. Sepúlveda-Saavedra, J., González-Corona, B., Tamez Rodríguez, V. A., Bermúdez de Rocha, M. V., Piñeyro-Lopez, A. Ultrastructure of the lesion induced by toxin T-514 isolated from *Karwinskia humboldtiana* in the alveolar region of the lung. *Ed: Proceedings Fiftieth Annual Meeting Electron Microscopy Society of America*. Ed. Bailey, Bentley Small. San Francisco Press Inc.
55. Ballesteros-Elizondo, R. G. Factor de necrosis tumoral  $\alpha$  y granulocitos neutrofilos en la producción del síndrome de insuficiencia respiratoria del adulto causado por peroxisomicina A-1. Tesis Doctoral. U. A. N. L. Monterrey, N. L., México. (2000).
56. Tamez Rodríguez, V. A. Estudios de toxicidad dérmica de la T-514 (Peroxisomicina A1) aislada del género *Karwinskia* en conejos Nueva Zelanda. Disertación Doctoral. U. A. N. L. Monterrey, N. L. (2001).
57. Koski, C.L., Vanguri, P., Shin, M. L. Activation of the alternative pathway of complement by human peripheral nerve myelin. *J Immunol.* **134**(3):1810-1814. (1985).
58. Koski, C.L., Gratz, E., Sutherland, J., Mayer, R. F. Clinical correlation with antiperipheral-nerve myelin antibodies in Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol.* **19**: 573-577. (1986).
59. Koski, C.L., Sanders, M. E., Swoveland, T. J., Lawley M. L., Shin, M. L., Frank, M. M., Joiner, K. A. Activation of terminal components of complement in patients with Guillain-Barré syndrome and other demyelinating neuropathies. *J Clin Invest.* **80**:1492-1497. (1987).
60. Brosnan, C. F. Quantitation of mast cells in experimental allergic neuritis. *J Neuropathol Exp Neurol.* **44**(2):196-203. (1985).
61. Johnson, D. , Yasui, D., B. S., Seeldrayers, P. An analysis of mast cell frequency in the rodent nervous system: numbers vary between different strains and can be reconstituted in mast cell-deficient mice. *J Neuropathol Exp Neurol.* **50**(3):227-234. (1991).
62. Salazar ML, Piñeyro A, Waksman N. A reverse phase HPLC method for quantification of peroxisomicine and other anthracenonic compounds. *J Liq Chrom & Rel Tech* **19**(9):1391-1403. (1996).
63. Poole, C. F., Poole, S. K. *Chromatography Today*. Elsevier Science Publishing Co. Inc. pp 92. (1991).

64. Wiggins, R. C., Benjamins, J. A., Morell, P. Appearance of myelin proteins in sciatic nerve during development. *Brain Res* 89:99-106. (1975).
65. Klüver, H., Barrera, E. In: *Metodos Histotecnológicos*. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los EUA. Editorial ARP (Registro de Patología de los EUA) Washington, D. C., p.p 96-97. (1995).
66. Sheehan, D. C., Hrapchak, B. B. En: *Theory and Practice of histotechnology*. 2ª Edición. The C. V. Mosby Company, St. Louis, Toronto, London pp 481. (1980).
67. Marsland, T. H., Glees, P., Erickson, L. B. Modification of the Gleys silver impregnation for paraffin sections. *J Neuropathol Exp Neurol* 13, 587. (1954).
68. Olsson, Y. Mast cells in the nervous system. *Int Rev Cytol* 24:27-70. (1968).
69. Bienenstock, J., MacQueen G., Sestini, P., Marshall, J. S., Stead, R. H., Perdue, M. H. *Am Rev Respir Dis* 143(3 pt 2):S55-58. (1991).
70. Johnson, D., Krenger, W. Interactions of mast cells with the nervous system-recent advances. *Neurochem Res* 17(9):939-951. (1992).
71. León, A., Buriani, A., Dal Toso, R., Fabris, M., Romanello, S., Aloe, L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3739-3743. (1994).
72. Knorr-Held, S., Meier, C. Mast cells in human polyneuropathies: their density and regional distribution. *Clin Neuropathol* 9(3):121-124. (1990).
73. Dines, K. C., Powell, H. C. Mast cell interactions with nervous System: Relationship to mechanisms of disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 56(6):627-640. (1997).
74. Esposito, B., De Santis, A., Monteforte, R., Chieffi-Baccari, G. Mast cells in Wallerian degeneration: Morphologic and ultrastructural changes. *J Com Neurol* 445:199-210. (2002).
75. Theoharides, T. C. Mast cells and stress- A psychoneuroimmunological perspective. *J Clin Psychopharmacol* 22(2):103-108. (2002).
76. Marshall, J. S., Gorni, K., Blennerhassett, M. G., Bienestock, J. Nerve growth factor modifies the expression of inflammatory cytokines by mast cells via a prostanoid-dependent mechanism. *J Immunol* 162:4271-4276. (1999).

77. Johnson, D., Seeldrayers, P. A., Weiner, H. L. The role of mast cells in demyelination. I. Myelin proteins are degraded by mast cell proteases and myelin basic protein and P2 can stimulate mast cell degranulation. *Brain Res* **444**(1):195-198. (1988).
78. Kalichman, M.W., Powell, H. C., Calcutt, N. A., Mizisin, A. P. Mast cell degranulation and blood-nerve barrier permeability in rat sciatic nerve after 7 days of hyperglycemia. *Am J physiol* **268**(2 pt 2): h740-748. (1995).
79. Aarli, J. A. Role of cytokines in neurological disorders. *Curr med Chem* **10**(19):1931-1937. (2003).
80. Krishnaswamy, G., Kelley, J., Johnson, D., Youngberg, G., Stone, W., Huang, S. K., Bieber, J., Chi, D. S. The human mast cell: functions in physiology and disease. *Front Biosci* **6**:D1109-1127. (2001).
81. Gómez-Silva, M. Detección e identificación de metabolitos de la T-514 del género *Karwinskia* in vivo e in vitro. Tesis Doctoral. U. A. N. L., Monterrey, N. L., México. (2000).
82. Zanatta-Calderón, M. T. Generación de radicales libres y efectos *in vitro* de la peroxisomicina A1 sobre las enzimas microsomales hepáticas de *Macaca mulata* y ratas Wistar. Tesis Doctoral. U. A. N. L., Monterrey, N. L., México. (2000).
83. Garza-Ocañas, L., Zanatta-Calderón, M. T., Acosta, D., Torres-Alanís, O., Piñeyro-López, A. Production of reactive oxygen species by toxin T-514 of genus *Karwinskia* in vitro. *Toxicology in vitro* **17**: 19-25. (2003).
84. Hess, M. L., Manson, N. H. Molecular Oxygen: friend and foe. *J Mol Cell Card* **16**: 969-985. (1984).
85. Komiyama, T., Kikuch, T., Sugiura, T. Generation of hydroxyl radical by anticancer quinone drugs, carbazilquinone, mitomycin C, alcaicinomycin, and adriamycin, in the presence of NADPH cytochrome P-450 reductase. *Biochem Pharmacol* **31**:3651-3656. (1982).
86. Otten, U., Scully, J. L., Ehrhard, P. B., Gadiant, R. A. Neurotrophins: signals between the nervous and immune systems. *Prog Brain Res* **103**:293-305. (1994).
87. Purcell, W. M., Atterwill, C. K. Mast cells in neuroimmune function: neurotoxicological and neuropharmacological Perspectives. *Neurochem Res* **20**(5): 521-532. (1994).

88. Sobue, G. The role of Schwann cells in peripheral nerve degeneration and regeneration -NGF-NGF receptor system. *Rinsho Shinkeigaku*. 30(12):1358-1360. (1990).
89. Fan, X., Gelman, B. B. Schwann del Nerve Growth Factor Receptor expression during initiation of remyelination. *J Neurosci Res* 31(1):58-67. (1992).
90. Meng, H., Tonnensen, M. G., Marchese, M. J., Clark, R. A., Bahou, W. F., Gruber, B.L. Mast cells are potent regulators of endothelial cell adhesion cell molecule ICAM-1 and VCAM-1 expression. *J Cell physiol* 165(1):40-53. (1995).
91. Rumsaeng, V., Cruikshank, W. W., Foster, B., Prussin C., Kirshenbaum, A. S., Davis, T. A., Kornfeld, H., Center, D. M., Metcalfe, D. D. Human mast cell produce the CD4+ T lymphocyte chemoattractant factor, IL-16. *J Immunol* 159(6):2904-2910. (1997).
92. Mekori, Y. A., Metcalfe, D. D. Molecular mechanisms in allergy and clinical immunology. Mast cell-T cell interactions. *J Allergy Clin Immunol* 104(83):517-523: (1999).
93. McNeil, H. P., Gotis-Graham, I. Commentary human mast cell subsets-distinct functions in inflammation? *Inflamm res* 49:3-7. (2000).
94. Krug, N., Cruikshank, W. W., Tschering, T., Erpenbeck, V. J., Balke, K., Hohlfeld, J. M., Center, D. M., Fabel, H. Interleukin 16 and T-cell chemoattractant activity in broncoalveolar lavage 24 hours after allergen challenge in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 162(1):105-111. (2000).
95. Fox, C.C., Jewell, S.D., Whitacre, C.C. at peritoneal mast cells present antigen to a PPD-specific T cell line. *Cell Immunol* 158(1):253-64. (1994).
96. Frandji, P., Oskeritzian, C., Cacaraci, F., Lapeyre, J., Peronet, R., David B, Guillet, J. G., Mecheri, S. Antigen-dependent stimulation by bone marrow-derived mast cells of MHC class II-restricted T cell hybridoma. *J Immunol.* 151(11):6318-28. (1993).
97. Rostami, A. M. P2-reactive T cells in inflammatory demyelination of the peripheral nerve. *J Infect Dis* 176 suppl 2: S160-163. (1997).
98. Poncet, P., Arock ,M., David, B. MHC class II-dependent activation of CD4+ T cell hybridomas by human mast cells through superantigen presentation. *Leukoc Biol.* 66(1):105-12. (1999).

99. Guilbert, B., Dighiero, G., Avrameas, S. Naturally occurring antibodies against nine common antigens in human sera. *J Immunol* 128(6):2779-2787. (1982).
100. Temynek, T., Druet, P., Avrameas, S. Physiological autoimmunity. *Rev Prat* 44(1):36-38. (1994).
101. Bouvet, J., P., Dighiero, G. From natural polyreactive autoantibodies to À La Carte monoreactive antibodies to infectious agents: Is it a small world after all? Minireview. *Inf Immun* 66(1):1-4.(1998).
102. Lacroix-Desmazes, S., Kaveri, S.V., Mouthon, L., Ayoub, A., Malanchere, E., Coutinho, A., Kazatchkine, M. D. Self-reactive antibodies (natural autoantibodies) in healthy individuals. *J Immunol Methods* 216(1-2):117-137. (1998).
103. Miller, D. J., Sanborn, K. S., Katzmann, J. A., Rodríguez, M. Monoclonal autoantibodies promote central nervous system repair in an animal model of multiple sclerosis. *J Neurosci* 14(10):6230-6238. (1994).
104. Asakura, K., Miller, D. J., Pease L. R., Rodríguez, M. Targeting of IgMκ antibodies to oligodendrocytes promotes CNS remyelination. *J Neurosci* 18(19):7700-7708. (1998).
105. Pavelko, K. D., van Engelen B. G. M., Rodríguez, M. Acceleration in the rate of CNS remyelination in lyssolecithin-induced demyelination. *J Neurosci* 18(7):2498-2505. (1998).



**APENDICE A**

**PREPARACIÓN DE REACTIVOS**

**AISLAMIENTO DE LA MIELINA DEL NERVO CIÁTICO DE**

**RATAS WISTAR NO TRATADAS**

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



## APÉNDICE A

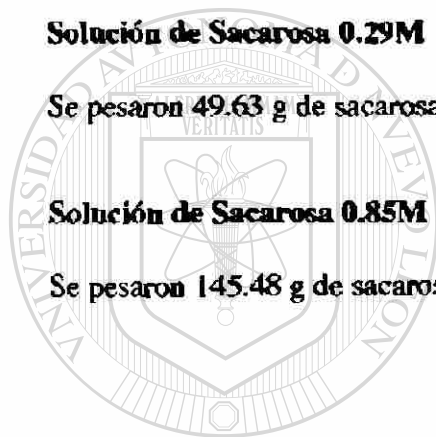
### PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA EL AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LA MIELINA DE NERVIOS PERIFÉRICOS

#### Solución de Sacarosa 0.29M

Se pesaron 49.63 g de sacarosa y se llevó a 500 mL con agua bidestilada.

#### Solución de Sacarosa 0.85M

Se pesaron 145.48 g de sacarosa y se llevó a 500 mL con agua bidestilada.

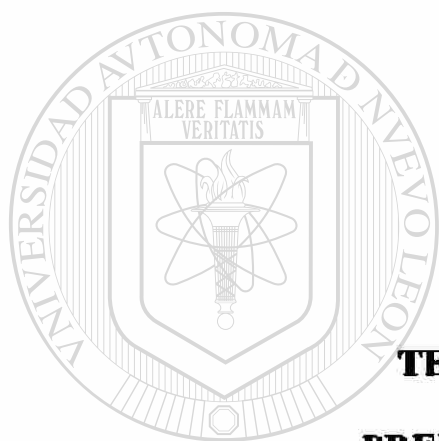


# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS





**APENDICE B**

**TECNICAS HISTOLÓGICAS**

**PREPARACIÓN DE REACTIVOS**

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



## APÉNDICE B

### DESPARAFINIZACIÓN Y MONTAJE

#### **Desparafinización e hidratación de cortes incluidos en parafina**

- 1.- Colocar los cortes en la estufa a 60°C por 10 min.
- 2.- Colocar los cortes en xilol por 5 min.
- 3.- Pasar los cortes a una mezcla de xilol-etanol por 5 min.
- 4.- Transferir a etanol absoluto por 2 min.
- 5.- Transferir a etanol 96° por 2 min.
- 6.- Enjuague lento en agua destilada.

---

#### **Deshidratación y montaje de los cortes ya teñidos**

- 1.- Colocar los cortes ya teñidos en etanol 96° de 10 a 20 seg (20 inmersiones<sup>®</sup> rápidas).
- 2.- Transferir los cortes a etanol absoluto de 10 a 20 seg (20 inmersiones rápidas).
- 3.- Colocar los cortes en mezcla de xilol-etanol de 10 a 20 seg (20 inmersiones rápidas).
- 4.- Transferir los cortes a xilol.
- 5.- Se colocó una gota de entelan sobre el portaobjetos y sobre esta se coloca el cubreobjetos, procurando no dejar burbujas entre ellos.

## APÉNDICE B

### TINCIÓN DE HEMATOXILINA Y EOSINA (H-E)

1.- Desparafinizar e hidratar los cortes incluidos en parafina.

2.- Colocar los cortes en la hematoxilina por 3 min.

3.- Enjuagar en agua de la llave (2 lavados) enjuague lento.

4.- Colocar los cortes en alcohol-ácido inmersión rápida

5.- Enjuagar en agua de la llave (2 lavados) enjuague lento.

---

6.- Transferir las laminillas a agua amoniacal 2 inmersiones rápidas.

7.- Enjuagar con agua de la llave (2 lavados) enjuague lento.

8.- Enjuague lento en agua destilada.

9.- Colocar las laminillas en eosina 6 inmersiones.

10.- Deshidratar, aclarar y montar.

## APÉNDICE B

### PREPARACIÓN DE REATIVOS PARA TINCIÓN DE HAMATOXILINA Y EOSINA (H- E)

#### Solución de Hematoxilina de Gil

Agua destilada 730 mL + 250 mL de etilenglicol + 2.0 g de hematoxilina anhidra en polvo + 0.2 g de yodato de sodio + 17.6 g de sulfato de aluminio y 2.0 mL de ácido acético glacial. La mezcla se hace según el orden indicado arriba y se disuelve con un agitador magnético por 1 h a temperatura ambiente. La solución se filtra antes de usarse y es estable por varios meses.

#### Solución concentrada de Eosina

Eosina amarilla 1.0 g + 20 mL de agua destilada y 80 mL de etanol 96°. Se hace una dilución de 1:4, 1 parte de solución concentrada + 3 partes de etanol al 80%. Antes de usar se le agregan 0.5 mL de ácido acético glacial por cada 100 mL de colorante.

## APÉNDICE B

### MÉTODO DE KLÜVER-BARRERA PARA MIELINA Y CÉLULAS INFLAMATORIAS

- 1.- Desparafinizar e hidratar el tejido.
- 2.- Dejar el corte en azul de luxol toda la noche entre 50 a 60°C en la estufa.
- 3.- Enjuagar en etanol 96° (elimina el exceso del colorante).
- 4.- Enjuagar en agua destilada.
- 5.- Inmersión rápida en carbonato de litio ( $\text{Li}_2\text{CO}_3$ ) 0.05% (p/v) para que se produzca diferenciación.
- 6.- Colocar en etanol al 70% continua con la diferenciación del tejido hasta un matiz gris y blanco.
- 7.- Enjuagar en agua destilada.
- 8.- Enjuagar brevemente en  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  para terminar la diferenciación.
  - 8.1 Pasar por varios cambios de etanol 70% hasta que tome un color azul verdoso la parte más teñida y gris la menos teñida.
- 9.- Enjuagar en agua destilada
- 10.- Colocar en violeta de creylo por 10 min
- 11.- Colocar en varios cambios de etanol 96° para diferenciación.
- 12.- Deshidratar, aclarar y montar.

## PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA EL MÉTODO DE KLÜVER-BARRERA

### **Solución de Azul Luxol 0.1% (solución alcohólica ácida)**

Azul Luxol 0.1g en 100 mL de etanol 96° + 0.5 mL de ácido acético al 10% (solución estable).

### **Solución de Violeta de crecilo 0.1%**

Se pesan 0.1 g de violeta de crecilo y se disuelve en 100 mL de agua destilada. Antes de usarse se filtra y se le agregan 15 gotas de ácido acético al 10%.

### **Solución de Carbonato de Litio ( $\text{Li}_2\text{CO}_3$ ) 0.05% p/v**

Se pesan 0.05 g de  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  y se lleva a 100 mL con agua destilada

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## APÉNDICE B

### TINCIÓN DE AZUL DE TOLUIDINA

- 1.- Desparafinizar e hidratar los cortes en parafina
- 2.- Colocar la laminillas en baño de solución de azul de toluidina por 30 min a 37°C.
- 3.- Escurrir y desmanchar las laminillas cuidadosamente con una gasa.
- 4.- Enjuagar en agua destilada para eliminar el exceso del colorante.
- 5.- Enjuagar en agua destilada limpia.
- 6.- Colocar las laminillas en isopropanol absoluto por 1 min.
- 7.- Deshidratar, aclarar y montar en resina.

---

#### PREPARACIÓN DE AZUL DE TOLUIDINA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

##### Solución de Azul de Toluidina 1%

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Se pesa 1g de azul de toluidina se disolvió en 50 mL de isopropanol + 50 mL de agua destilada. La solución se filtra antes de ser usada.



## APÉNDICE B

### MÉTODO DE MARSLAND GLEES Y ERICKSON

- 1.- Desparafinizar los cortes con:

Xilol por 20 min, Xilol por 10 min y alcohol isopropílico por 5 min

- 2.- Lavar en etanol al 96° por 3 min.

- 3.- Lavar en agua desionizada (2 cambios de 3 min c/u).

- 4.- Colocar las laminillas en nitrato del plata ( $\text{AgNO}_3$ ) por 45 min a 37°C (laminillas adquieren una coloración amarillenta).

- 5.- Lavar los cortes en formalina aproximadamente 15 seg (laminillas adquieren una coloración café).

- 6.- Colocar las laminillas en  $\text{AgNO}_3$  amoniacal por 30 seg.

- 7.- Colocar las laminillas en formalina de 1 a 2 min.

- 8.- Examinar el contraste en el microscopio si es necesario repita pasos 6 y 7.

- 9.- Lavar las laminillas en agua desionizada.

- 10.- Fijar la reacción con tiosulfato de sodio al 5% de 1 a 5 min.

- 11.- Lavar las laminillas en agua desionizada.

- 12.- Deshidratar, aclarar y montar en resina.

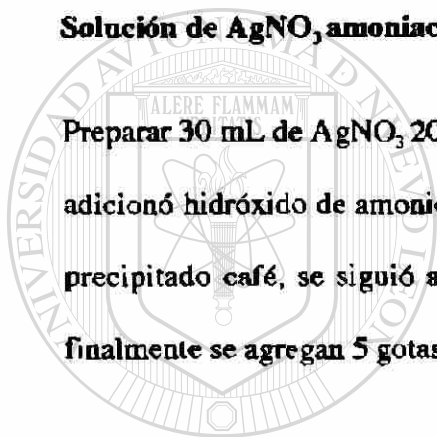
## PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA EL MÉTODO MARSLAND GLEES Y ERICKSON

### **Solución de Nitrato de Plata ( $\text{AgNO}_3$ ) 20% (30 mL)**

Pesar 6 g de  $\text{AgNO}_3$  y disolver en 30 mL de agua desionizada para evitar la formación de precipitados de plata. Hay que protegerla de la luz.

### **Solución de $\text{AgNO}_3$ amoniacal**

Preparar 30 mL de  $\text{AgNO}_3$  20% + 20 mL de etanol absoluto. A la solución anterior se le adicionó hidróxido de amonio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) concentrado gota a gota hasta que se formó un precipitado café, se siguió agregando  $\text{NH}_4\text{OH}$  hasta que se disolvió el precipitado y finalmente se agregan 5 gotas más del  $\text{NH}_4\text{OH}$  concentrado.

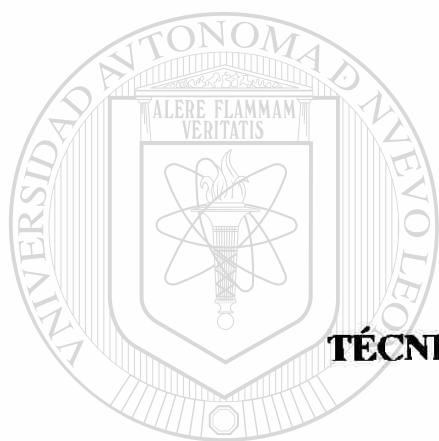


# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**APENDICE C**

**TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA**

UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

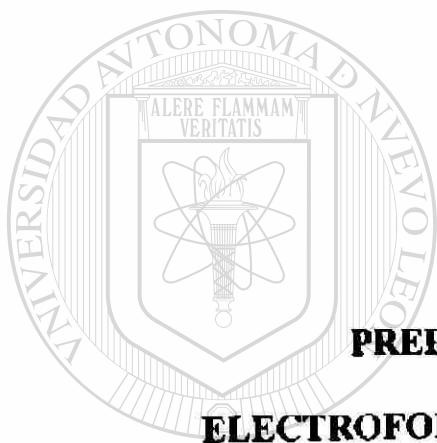
## APÉNDICE C

Se hicieron cortes en congelación de 6  $\mu\text{m}$  de espesor, se montaron en un cubreobjetos, se dejaron secar y se fijaron con acetona por 5 min. Se incubaron en buffer PBS por 5 min, se eliminó el buffer y se bloqueo la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 3% por 10 min, se lavó con agua bidestilada y se dejó en buffer PBS por 5 min se tiró y se secó el exceso.

Se hizo el bloqueo de proteínas con suero comercial por 30 min, se tiró el suero, se secó el exceso y se incubó con el anticuerpo monoclonal contra la molécula CD4 de rata a una dilución de 1:100 durante 1 hs, en cámara húmeda y a temperatura ambiente.

Posteriormente, se retiró el anticuerpo, se lavó con el buffer PBS y se dejó en incubación con el buffer por 5 min, se tiró el buffer y se secó el exceso. Se incubó por 20 min. con el anticuerpo biotinilado, se lavó en forma similar a la descrita para el anticuerpo CD4.

Se incubó por 20 min. con la estreptavidina, y se lavó de igual forma a la descrita en el paso anterior. Finalmente se reveló con la DAB líquida por 3 min., se lavó con agua destilada y se tiño con hematoxilina de Harris por 30 seg, se lavó con agua corriente. Se deshidrató, aclaró y montó con entellan.



## **APENDICE D**

### **PREPARACIÓN DE REACTIVOS**

### **ELECTROFORESIS Y ELECTROTRANSFERENCIA**

---

### **DE PROTEÍNAS DE LA MIELINA DE NERVIO CIÁTICO**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## APÉNDICE D

### PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS DE LA MIELINA DE NERVIIO CIÁTICO

#### **Solución de Acrilamida/bis-acrilamida 30% p/v**

Acrilamida 29.2 g + N-N' Metilen-bis-acrilamida 0.8 g + 50 ml de agua desionizada, se desgasificó con bomba de vacío y trampa de agua durante 2 hs, durante este tiempo se agitó con agitador magnético. Finalmente se aforó a 100 mL se filtró y se almacenó en un recipiente protegido de la luz a 4°C. Para la manipulación de las sustancias sólidas se realizó con guantes, cubre bocas y lentes ya que son carcinogénicas.

#### **Solución Amortiguadora Tris/HCl 3.02 M pH 8.8 para preparar Gel de Separación**

Tris base 36.56g + EDTA 0.39g + 50 mL agua desionizada. Se ajustó el pH con HCl 12 N antes de aforar a 100 mL y se almacenó a 4°C.

#### **Solución Amortiguadora Tris/HCl 1.25 M pH 6.8 para preparar el Gel Concentrador**

Tris base 15.12g + 50 mL agua desionizada. Se ajustó el pH con HCl 12 N antes de aforar a 100 mL y se almacenó a 4°C.

#### **Solución Amortiguadora de Corrimiento 5X pH 8.3**

Tris base (0.124M) 15.0 g + glicina (0.96M) 72g + SDS (0.052M) 15.0g + agua desionizada hasta 1L. Se almacenó a 4°C.

**Solución Amortiguadora de Muestra 2X**

Solución amortiguadora Tris/HCl 1.25M pH 6.8 **6.5 mL** se le adicionó 1 ml de SDS al 20%, 3.3 ml de glicerol al 50% y 54 mg de azul de bromofenol.

**Solución Amortiguadora de Transferencia pH 8.3**

Tris base (25mM) 3.03 g + Glicina 192(mM) 14.4g+ Metanol (20%) 200 mL + agua bidestilada hasta 1 L. Se almacenó a 4°C.

**Glicerol al 50 %**

Glicerol 12.5 mL + 12.5 mL de agua desionizada, se almacenó a 4°C.

**Dodecilsulfato de sodio (SDS) al 20%**

SDS 5g + agua desionizada hasta 25 mL

**Persulfato de amonio (PSA) 10%**

PSA 50 mg + 500 $\mu$ L de agua desionizada, se prepara al momento de utilizarse.

**Colorante de Coomassie al 0.1% (Tinción de geles)**

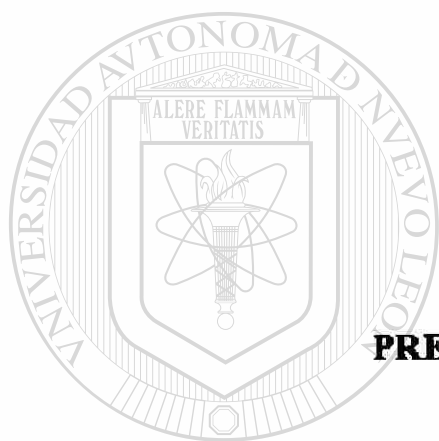
Azul brillante de Coomassie R-250 250 mg +metanol (40%) 100 mL + Ácido acético (10%) 25 mL + 125 mL de agua bidestilada.

**Solución Decolorante para Gel**

Metanol 40% (400 mL), ácido acético 10% (100 mL.) + agua bidestilada 500 mL. Esta solución puede reutilizarse si se filtra en carbón activado.

**Solución de Ponceau**

Preparar una solución concentrada de Ponceau S ácido 3-hidroxi-4[2-sulfo-4-(sulfofenilazo) fenilzo] 2,7-naftaleno disulfónico disuelto en ácido tricloroacético al 30% y ácido sulfosalicílico al 30%. Para la tinción se hace una dilución de 1:10 con agua bidestilada.



**APENDICE E**

**PREPARACIÓN DE REACTIVOS**

**WESTERN BLOT**

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS





## APÉNDICE E

### PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA WESTERN BLOT

#### **Solución Amortiguadora de Salina y Fosfatos (PBS) 0.15M pH 7.4**

Cloruro de sodio (NaCl) 8g, fosfato dibásico de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 1.2g, fosfato monobásico de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0.2g, cloruro de potasio 0.2g + agua bidestilada hasta 1000 mL.

#### **Solución de Bloqueo Albúmina 1%.**

Albúmina sérica bovina 1g + 100 mL PBS 1X se calienta a 37°C para facilitar la disolución de la albúmina. Se prepara la cantidad que se vaya a necesitar según el número de muestras a analizar.

#### **Solución de Bloqueo leche en polvo sin grasa 0.1%.**

Leche en polvo 0.1g + 100 mL PBS 1X se calienta a 37°C para facilitar la disolución de la leche. Se prepara la cantidad que se vaya a necesitar según el número de muestras a analizar.

#### **Solución Diluyente**

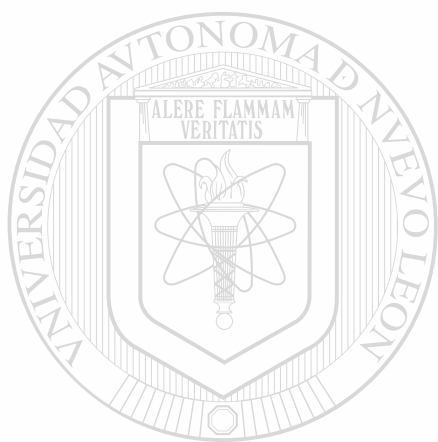
Se hace una dilución 1:10 de la solución de bloqueo con PBS 1X pH 7.4 para tener una concentración final de 0.1% o 0.01%

**Solución de Lavado**

PBS 1X pH 7.4

**Solución de Revelado DAB (3,3' diaminobencidina) 0.05%**

DAB 10 mg, 20 mL de PBS pH 7.4 + 10  $\mu$ L de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) 30%. Se trabaja con guantes, se disuelve la DAB en el PBS y finalmente se adicionó el  $H_2O_2$  30%.



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



## RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Martha Elizabeth Salazar Leal

Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con  
Especialidad en Farmacología y Toxicología

**Título de la Tesis:** Búsqueda de componentes del sistema inmune en un modelo de polineuropatía en ratas con el fruto de la *Karwinskia humboldtiana* por vía oral.

**Área de Estudio:** Farmacología y Toxicología

### Biografía:

**Datos Personales:** Lugar y Fecha de Nacimiento: Monterrey, N. L. México el 22 de marzo de 1963. Estado Civil: Casada.

**Escolaridad:** Químico Clínico Biólogo por la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León en 1985.

**Experiencia Profesional:** Decario del departamento de Farmacología y Toxicología de 1983 a 1984. Participación como maestro de laboratorio de Química Orgánica I de 1983 a 1985 que se imparte en la Carrera de Químico Clínico Biólogo de la Fac. de Medicina de la U.A.N.L. Participación como maestro de laboratorio de Química Inorgánica de 1982 a 1990 que se imparte en la Carrera de Químico Clínico Biólogo de la Fac. de Medicina de la U.A.N.L. Participación como maestro de laboratorio de Farmacología y Toxicología desde 1992 a la fecha, que se imparte a los alumnos del tercer año de la carrera de Médico Cirujano y Partero. Presentación de trabajos de investigación en 26 Congresos Nacionales e Internacionales desde 1987 a la fecha. Publicaciones: Experimental acute intoxication with ripe fruit of *Karwinskia humboldtiana* (Tullidora) in rat, guinea pig, hamster and dog. *Toxicon*, Vol 30, No 11, pp 1493 - 1496, 1992; Intoxicación de una familia por *Karwinskia humboldtiana* (Tullidora) *Gaceta Médica de México* vol 131 No. 1. Reconocimiento al Mejor Estudiante del Doctorado en Ciencias con Especialidad en Farmacología y Toxicología por la Fac. de Medicina de la U.A.N.L. durante el ciclo escolar 1994 - 1995 y 1999-2000.

# XXXI

Congreso Nacional de Investigación Biomédica  
La Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León  
através de la Subdirección de Investigación y Estudios de Posgrado

Otorga la presente

## CONSTANCIA

a:


Q.C.B. Martha Elizabeth Salazar Leal

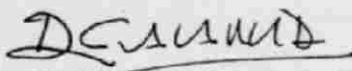
Por su trabajo de Investigación:

Presencia de inmunoglobulinas contra  
proteínas de la Mielina de nervio ciñático  
en suero de ratas tratadas con el fruto de la  
*Karwinskia humboldtiana* (Tullidora)  
presentado en el

**XXI Congreso Nacional de Investigación Biomédica**  
llevado a cabo del 22 al 24 de Octubre del 2003

"Alere Flammam Veritatis"  
Monterrey, N.L. Octubre del 2003

  
Dr. Jesús Ancer Rodríguez  
Director

  
Dr. Dionicio A. Galarza Delgado  
Subdirector de Investigación  
y Estudios de Posgrado

  
Dr. Francisco J. Bosques Padilla  
Secretario de Investigación



  
Dr. José Carlos Jaime Pérez  
Coordinador de Investigación

**70**  
1933-2003



**XI CONGRESO NACIONAL DE HISTOLOGÍA  
VII REUNIÓN DE LA SOCIEDAD ANDALUZA DE HISTOLOGÍA MÉDICA**

La Rábida (Huelva), del 12 al 14 de Septiembre de 2001



Dña. **INÉS MARTÍN LACAVE**, Presidenta del Comité Organizador del XI Congreso Nacional de Histología y de la VII Reunión de la Sociedad Andaluza de Histología Médica,

CERTIFICA: que la COMUNICACIÓN (POSTER) titulada

**ESTUDIO MORFOLÓGICO Y MORFOMÉTRICO EN LA NEUROPATÍA INDUCIDA EN RATAS WISTAR CON FRUTO DE LA TULLIDORA (Karwinskia humboldtiana).**

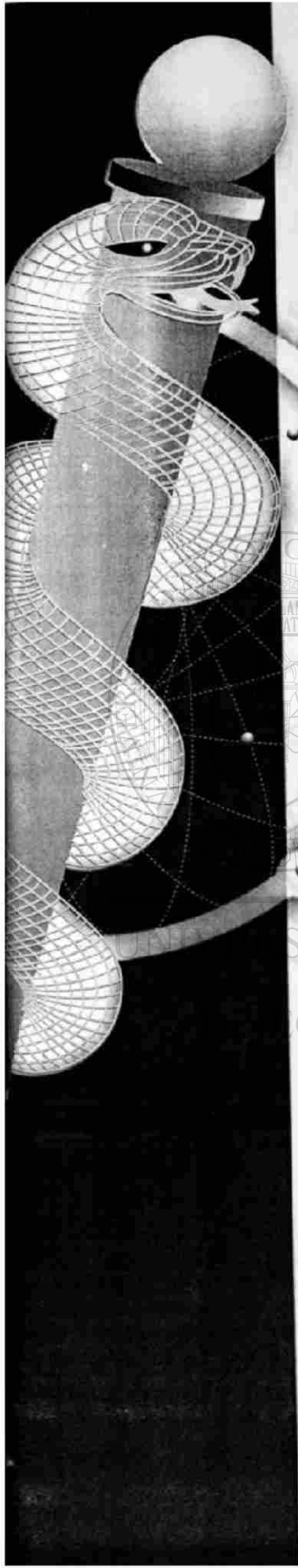
ha sido presentada por

**Salazar-Leal M.E, Sepúlveda-Saavedra J, Flores-Castañeda M.S, Romero-Díaz V.J, Piñeyro-López A, Bermúdez-Rocha M.V.**

en el XI Congreso Nacional de Histología y VII Reunión de la Sociedad Andaluza de Histología Médica celebrados en La Rábida del 11 al 14 de septiembre de 2001.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente certificado en La Rábida (Huelva), a catorce de septiembre de 2001.

Fdo: Inés Martín Lacave  
Presidenta del Comité Organizador



# XVIII



## Congreso Nacional de Investigación Biomédica

La Subdirección de Investigación y Estudios de Posgrado  
de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León

Otorga la Presente

### CONSTANCIA

a

Martha Elizabeth Salazar Leal Q.C.B.,  
Julio Sepúlveda Saavedra PhD.,  
María del Socorro Flores Castañeda Dra.,  
Viktor Javier Romero Díaz Biol., Alfredo Piñeyro López Dr. med.  
y María Victoria Bermúdez Rocha Dr. med.

Por su trabajo de Investigación:

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DE MASTOCITOS EN  
LA NEUROPATÍA INDUCIDA EN RATAS WISTAR  
CON FRUTO DE LA TULLIDORA (*Karwinskia humboldtiana*)


Presentado en el

**XVIII Congreso Nacional de Investigación Biomédica**

llevado a cabo del 23 al 27 de Octubre del 2000

*"Alere Flammam Veritatis"*

Monterrey, N.L. Octubre del 2000



Dr. Francisco Javier Bosques Padilla  
Secretario de Investigación

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE CHIAPAS**

**ASOCIACIÓN MEXICANA DE  
FARMACOLOGÍA, A.C.**



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**XXIII CONGRESO NACIONAL  
DE FARMACOLOGÍA**

**Tuxtla Gutiérrez, Chiapas  
5 al 9 de marzo de 2000**

MA-25

**BUSQUEDA DE CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE EN LA LESIÓN INDUCIDA EN EL NERVIIO CIÁTICO DE RATAS WISTAR, POR LA ADMINISTRACIÓN ORAL DE *K. HOMBOLDTIANA* (TULLIDORA).** Martha E. Salazar<sup>1</sup>, Ma. del Socorro Flores-Castañeda<sup>2</sup>, Viktor Romero-Díaz<sup>3</sup>, Julio Sepúlveda-Saavedra<sup>3</sup> Alfredo Piñeyro-López<sup>1</sup>, Ma. Victoria Bernúdez-Rocha<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Depto de Farmacología y Toxicología, <sup>2</sup>Depto. de Microbiología y <sup>3</sup>Depto de Histología de la Fac. de Medicina de la U. A. N. L.

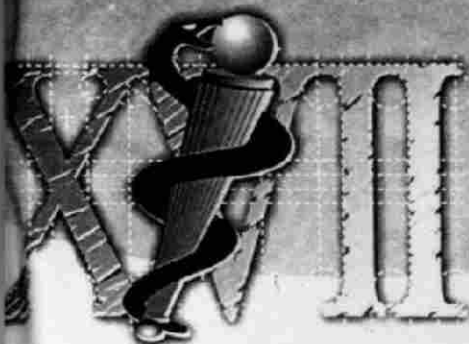
La ingestión del fruto de la tullidora puede causar parálisis flácida ascendente que se confunde con el Síndrome de Guillian-Barré. En este estudio se evaluó la presencia de células del sistema inmune en el nervio ciático de ratas intoxicadas con el fruto de la tullidora en diferentes etapas del desarrollo de la parálisis. Ratas Wistar de ambos sexos recibieron por VO una dosis fraccionada de 3.5 g/kg del fruto de la tullidora, el grupo control (n=10) sólo recibió agua. Se realizó un registro del peso y de los signos clínicos de intoxicación de los siguientes grupos de ratas n=10-, (1) sin neuropatía; (2) con paresia; (3) con parálisis y (4) recuperadas de la parálisis. Los nervios ciáticos se tiñeron con HyE, método de Kiüver-Barrera, método de Marsian-Glees y Erikson y azul de toluidina. La microscopía de luz mostró un aumento en el número de mastocitos en los cuatro grupos de ratas intoxicadas y de linfocitos sobre todo en los grupos 2 y 3 que no habían sido reportados en la literatura, además de las alteraciones ya descritas en la vaina de mielina. Lo anterior puede ser el inicio para establecer el futuro tratamiento para esta intoxicación.

MA-26

**EFFECTO DE PROGESTERONA Y 5BETA-PREGNAN-3ALFA-OH-20-ONA EN DOS MODELOS DE ANSIEDAD EXPERIMENTAL.** Claudia Gómez, J. Alfredo Saldivar-González y Rodolfo Rodríguez. Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, UNAM. Apdo. 70-297, CP 04510, D.F.

Se ha demostrado que algunos esteroides neuroactivos de estructura pregnano poseen propiedades ansiolíticas en varios modelos animales. En el presente trabajo nos propusimos explorar el posible efecto ansiolítico de progesterona y 5beta-pregnan-3alfa-OH-20-ona en ratas macho intactas en dos modelos de ansiedad experimental. Se utilizaron ratas Wistar macho. Los niveles de ansiedad experimental se determinaron 30 min después de la administración de los fármacos en los modelos de conducta defensiva de enterramiento y laberinto elevado en cruz. La inyección i.p. de ambas moléculas (1, 3, 10 y 30 mg/kg), pero no de vehículo, disminuyó significativamente la conducta defensiva de enterramiento. El tiempo de permanencia en la sección abierta del laberinto aumentó de manera dosis- dependiente con respecto a los grupos control después de la administración de ambos esteroides (1, 3, 10 y 30 mg/kg). No se observaron modificaciones en la actividad locomotora a las dosis probadas. Los efectos observados en ambos modelos de ansiedad experimental sugieren que ambos esteroides neuroactivos poseen propiedades ansiolíticas que apoyan la posibilidad de un efecto no genómico de estas moléculas.





# Congreso Nacional de Investigación Biomédica



La Subdirección de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León

Otorga la presente

## CONSTANCIA

a

Martha Elizabeth Salazar Leal Q.C.B., Viktor Romero Díaz Biol., Julio Sepúlveda Saavedra PhD., María del Socorro Flores Castañeda Dra., María Victoria Bermúdez de Rocha Dr. med., Alfredo Piñeyro López Dr. med.

Por su trabajo de Investigación:

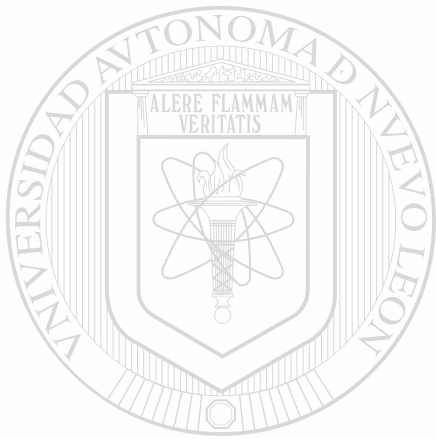
**ESTUDIO HISTOLOGICO DE LA LESION INDUCIDA EN EL NERVI  
CIATICO DE RATAS WISTAR POR LA ADMINISTRACION CRONICA  
DEL FRUTO DE LA Karwinskia humboldtiana POR VIA ORAL**

presentado en el  
**XVII Congreso Nacional de Investigación Biomédica**  
llevado del 18 al 22 de Octubre de 1999

"Alere Flammam Veritatis"  
Monterrey, N.L. Octubre de 1999

Dr. Francisco Javier Bosques Padilla  
Secretario de Investigación





# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



