

**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**

TD  
QP981  
.K37  
S25  
2003  
c.1



1080123148



**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.**

**POR  
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  
2P981  
K37  
S25  
2003



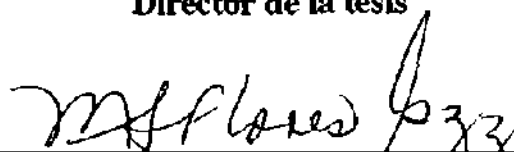
**BÚSQUEDA DE COMPONENTES DEL SISTEMA INMUNE EN UN  
MODELO DE POLINEUROPATÍA EN RATAS CON EL FRUTO DE  
LA *Karwinskia humboldtiana* POR VÍA ORAL.**

**Aprobación de la Tesis:**



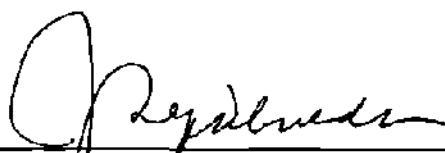
---

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



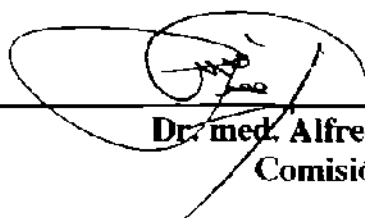
---

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



---

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



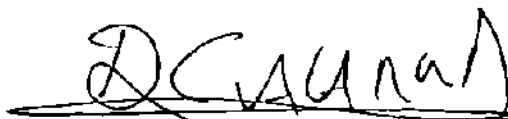
---

**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

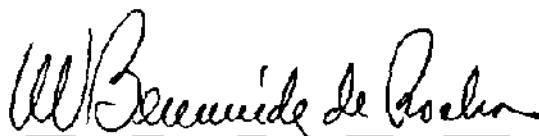
**BÚSQUEDA DE COMPONENTES DEL SISTEMA INMUNE EN UN  
MODELO DE POLINEUROPATÍA EN RATAS CON EL FRUTO DE  
LA *Karwinskia humboldtiana* POR VÍA ORAL.**

Presentado por

Q.C.B. Martha Elizabeth Salazar Leal

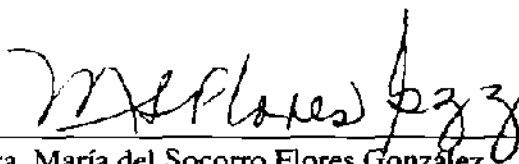
Este trabajo fue realizado en el Departamento de Farmacología y Toxicología,  
Departamento de Microbiología y en el Departamento de Histología de la Facultad de  
Medicina de la U.A.N.L. bajo la dirección de la Dr. med. María Victoria Bermúdez de  
Rocha y la codirección de la Dra. María del Socorro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

Sepúlveda Saavedra.



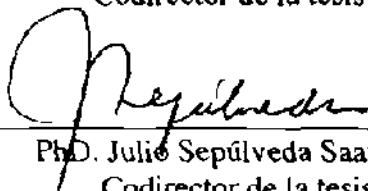
---

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

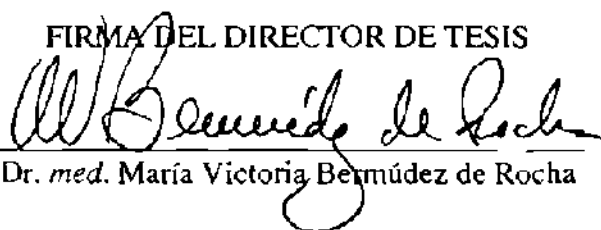
Candidato para la obtención del Grado de Doctor en Ciencias con Especialidad en Farmacología y Toxicología.

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 tiñeron 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

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

<b>Capítulo</b>	<b>Página</b>
<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

<b>Capítulo</b>	<b>Página</b>
<b>3.4.5 Etapa de recuperación (grupo 112 días ddi).</b>	<b>60</b>
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
<b>3.5 Cuantificación de mastocitos y análisis estadístico de los resultados.</b>	<b>62</b>
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
<b>3.6 Cuantificación de linfocitos y análisis estadístico de los resultados.</b>	<b>75</b>
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

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



## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
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

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
<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

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
<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>IXXa.</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	<i>Cromatografía de líquidos de alta resolución fase reversa</i>
cm	Centímetro
cm <sup>2</sup>	Centímetro cuadrado
cols.	Colaboradores
c/u	Cada uno
ddi	Después de la dosis inicial
2X	<i>El doble de la concentración original</i>
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



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

<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>Diastroisómero de la T-514</b>
<b>PA<sub>3</sub></b>	<b>Diastroisómero 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>