

Figura 20. Identificación de linfocitos T-CD4⁺ (→) 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

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.

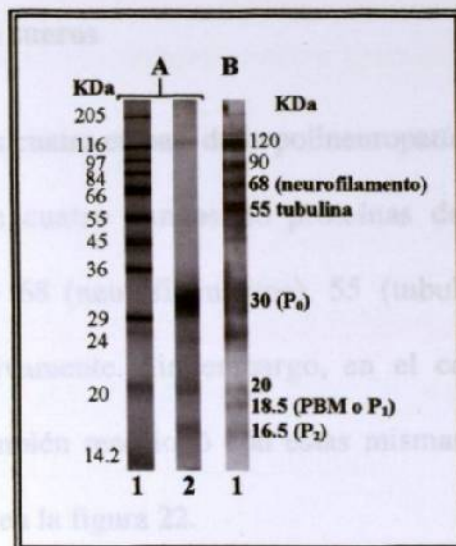


Figura 21. Patrón electroforético de las proteínas de la mielina de nervio ciático de ratas Wistar en gel de poliacrilamida-SDS al 12%. A) Electroforesis de proteínas tinción de Coomasie. 1) Marcadores de Peso Molecular en KDa. 2) Patrón electroforético de las proteínas de la mielina. B) Western blot 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 Coomasie, 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 las 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 P₁) y 16.5(P₂) 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.

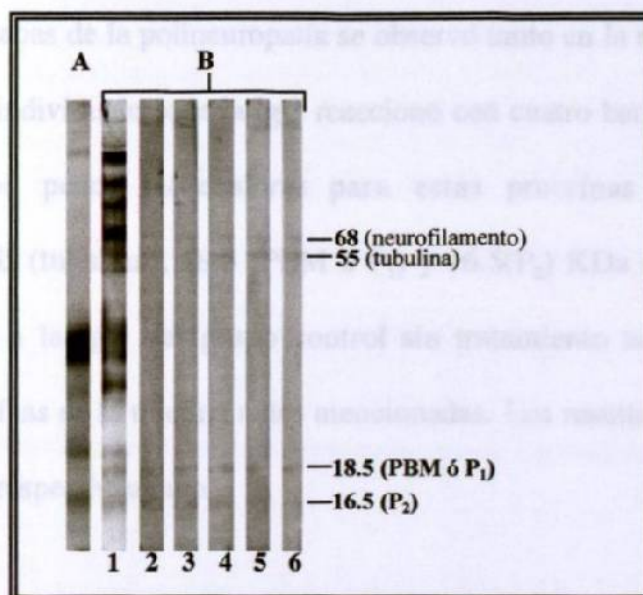


Figura 22. Detección por WB de IgM sérica dirigida contra proteínas de la mielina de nervio ciático, en ratas tratadas y control sin tratar. Mezcla de sueros. **A)** Patrón electroforético de la mielina nervio ciático en gel de poliacrilamida-SDS 12% tinción azul de Coomasie. **B)** WB (mezcla de sueros) 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 P₁) y 16.5(P₂) 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.

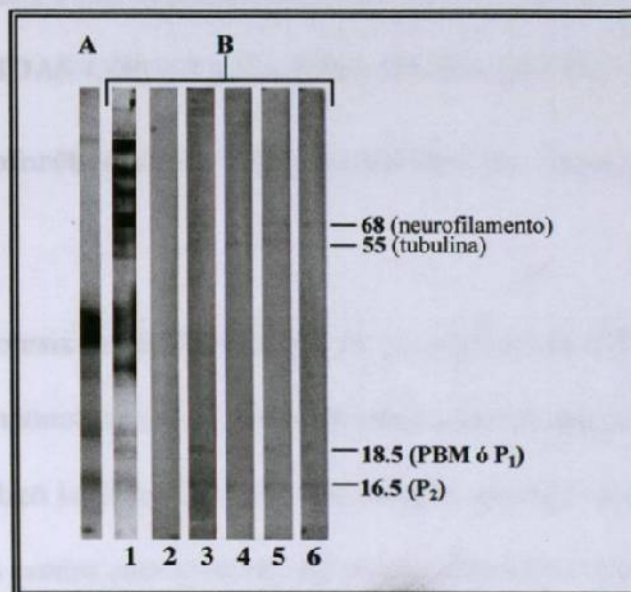


Figura 23. Detección por WB de IgG sérica dirigida contra proteínas de la mielina de nervio ciático, en ratas tratadas y control, sin tratar. Mezcla de sueros. **A)** Patrón electroforético de la mielina nervio ciático en gel de poliacrilamida-SDS 12% tinción azul de Coomassie. **B)** WB (mezcla de sueros). **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).

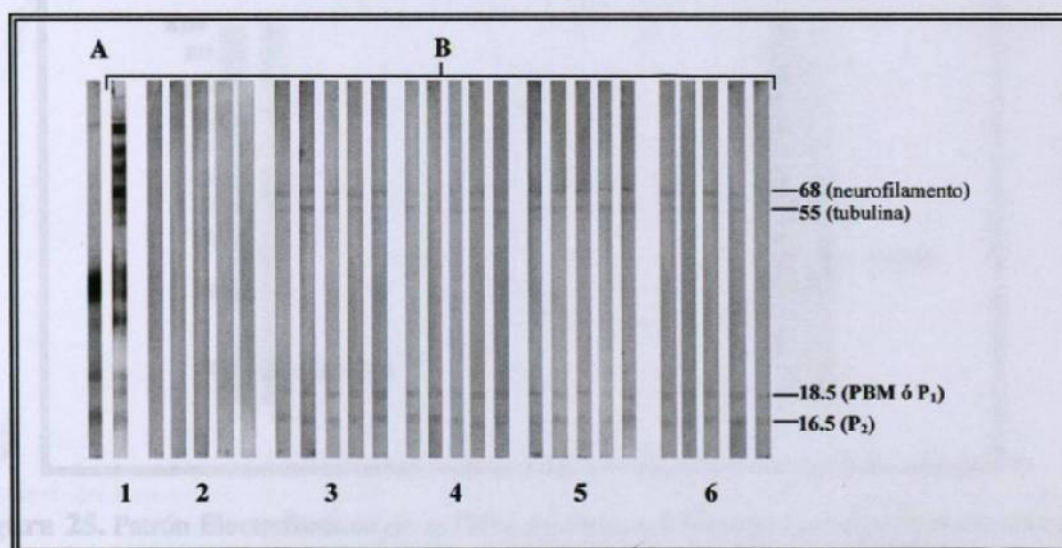


Figura 24. Detección por WB de IgG sérica dirigida contra proteínas de la mielina de nervio ciático, en ratas tratadas y control sin tratar. **A)** Patrón electroforético de la mielina nervio ciático en gel de poliacrilamida-SDS 12% tinción azul de Coomassie. **B)** WB **1)** control positivo mielina (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.

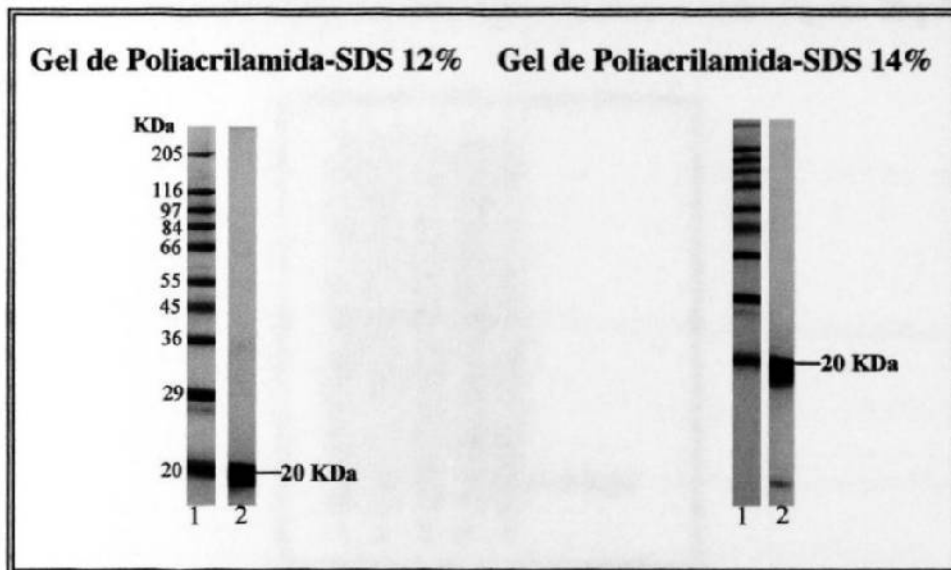


Figura 25. Patrón Electroforético de la PBM de conejo. 1 Marcadores de peso molecular en KDa. 2 Proteína básica de la mielina de conejo (20 KDa). Geles teñidos con azul de Coomassie.

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 se 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.

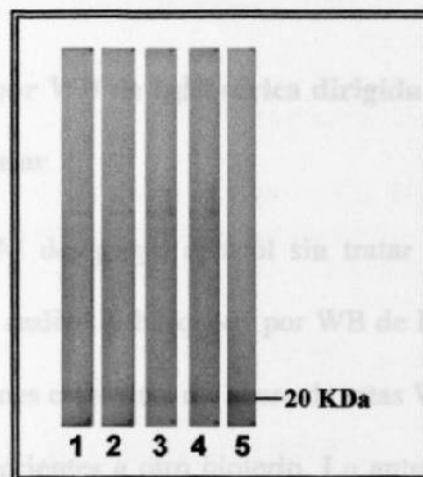


Figura 26. Detección por WB de IgM sérica dirigida contra PBM de conejo, en ratas tratadas y ratas control sin tratar. Mezcla de sueros. 1) Grupo ratas control sin tratar. 2) etapa sin neuropatía (24 días ddi). 3) Etapa de paresia (48 días ddi). 4) Etapa de parálisis 858 días ddi). 5) Etapa de recuperación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

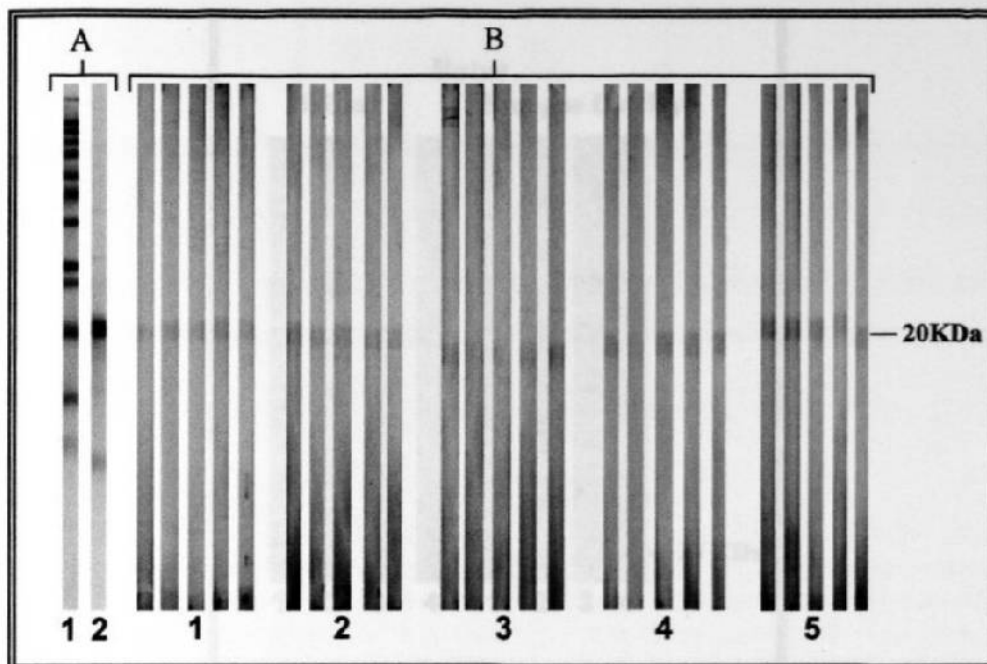


Figura 27. Detección por WB de IgM sérica dirigidas contra PBM de conejo, en ratas tratadas y ratas control sin tratar. A) Gel de poliacrilamida-SDS al 14% tinción azul de Coomasie. 1) marcadores de peso molecular. 2) Patrón electroforético de la PBM de conejo 20KDa. B) WB 1) Grupo ratas control sin 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.

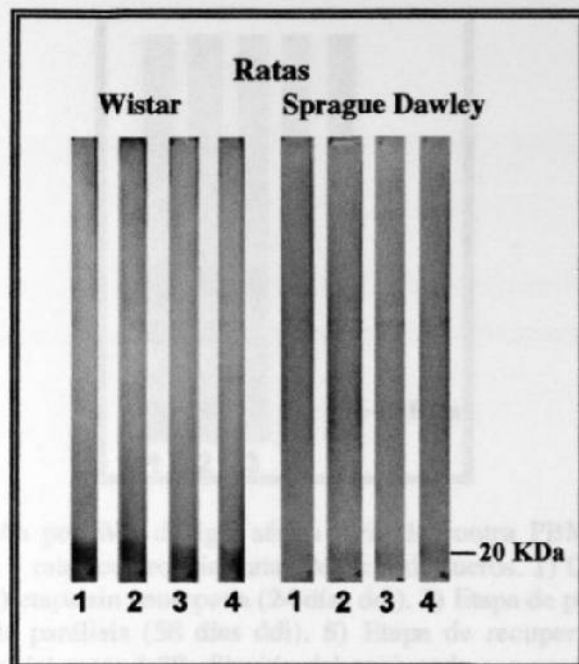


Figura 28. Detección por WB de IgM sérica de ratas control sin tratar dirigidas contra PBM de conejo. 1) dilución del suero 1:20, 2) dilución 1:40, 3) dilución 1:60, 4) dilución 1:100.

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.

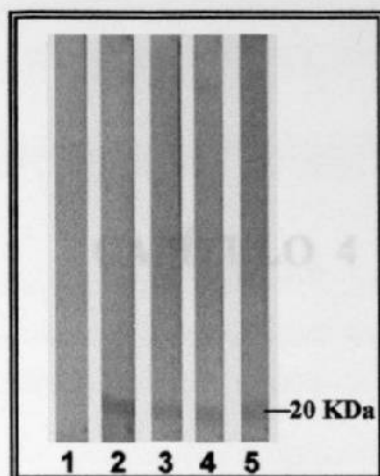


Figura 29. Detección por WB de IgG sérica dirigida contra PBM de conejo, en ratas tratadas y ratas control sin tratar. Mezcla de sueros. 1) Grupo ratas control sin tratar. 2) etapa sin neuropatía (24 días ddi). 3) Etapa de paresia (48 días ddi). 4) Etapa de parálisis (58 días ddi). 5) Etapa de recuperación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

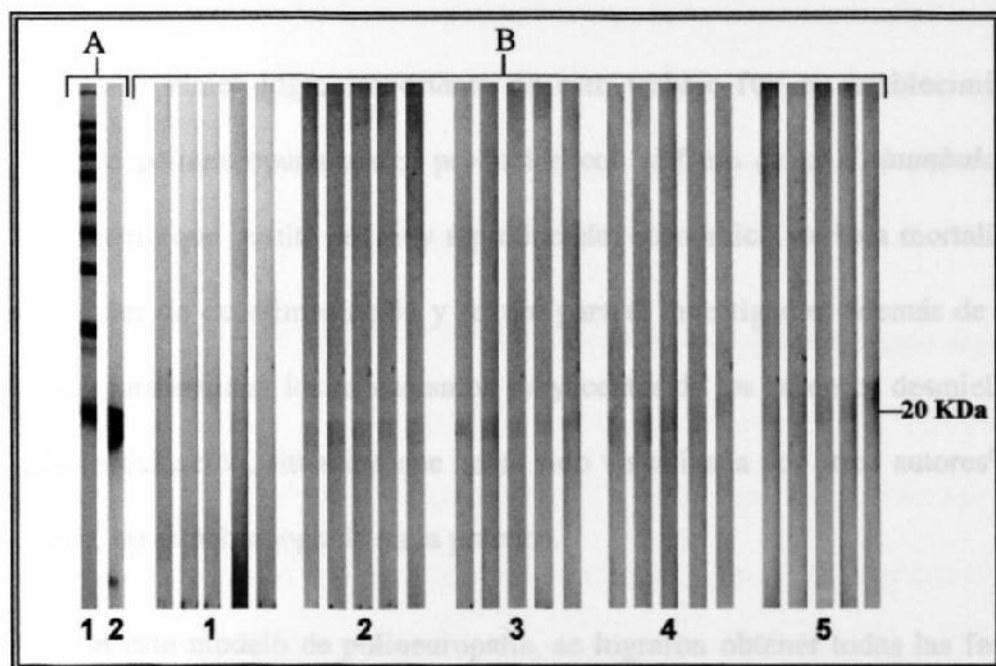


Figura 30. Detección por WB de IgG sérica contra PBM de conejo, en ratas tratadas y ratas control sin tratar dirigidas. Mezcla de sueros. A) Gel de poliacrilamida-SDS al 14% tinción azul de Coomassie 1) Grupo ratas control sin tratar. 2) etapa sin neuropatía (24 días ddi). 3) Etapa de paresia (48 días 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^(34, 46), 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^(18, 27, 54-56).

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.

Ademas, 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 mastdes/mm² 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 mastot/mm² ($p < 0.05$ 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 mastot/mm² y mastdes/mm² 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 mm², 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 ($p < 0.0001$).

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⁺, 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.

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 P₁ (18.5 KDa) y P₂ (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^(60, 68-71).

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^(60, 68, 72-74).

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 (bradicinina), 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- γ , MIF y TNF- α) y productos del ácido araquidónico como prostaglandinas y leucitrienos (LTB4, FAP, PGD₂, PGE₂, LTC4, NO)⁽⁷³⁻⁷⁶⁾.

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 triptasa) son capaces de degradar a las proteínas de la mielina, específicamente a la P₀ y a la PBM o P₁, además, se ha reportado que la P₂ 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^(60, 73, 77-79), 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- α), **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 (P₁ y P₂) inducen su desgranulación^(61, 75, 80).

En estudios de hepatotoxicidad *in vitro* con la T-514 (PA₁) 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⁽⁸¹⁻⁸³⁾. Por analogía con otros compuestos antracénicos, 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^(81, 84, 85).

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 P₂, 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⁽⁶⁸⁾.

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 ^(71, 86, 87). 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 PGE₂ 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 ^(76, 88, 89).

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⁺ 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⁺ 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⁽⁹⁰⁻⁹⁴⁾.

Por inmunohistoquímica se determinó que los linfocitos presentes en esta desmielinización eran linfocitos T-CD4⁺, 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- γ que inducen células Th₁ y Th₂.

Se ha observado que células T reactivas para la proteína P₂ 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^(92, 95-98).

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⁺ 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⁺ encontrados en este estudio son Th₁, aunque no se descarta la posibilidad de que también se activen Th₂ 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⁽⁹⁹⁻¹⁰²⁾.

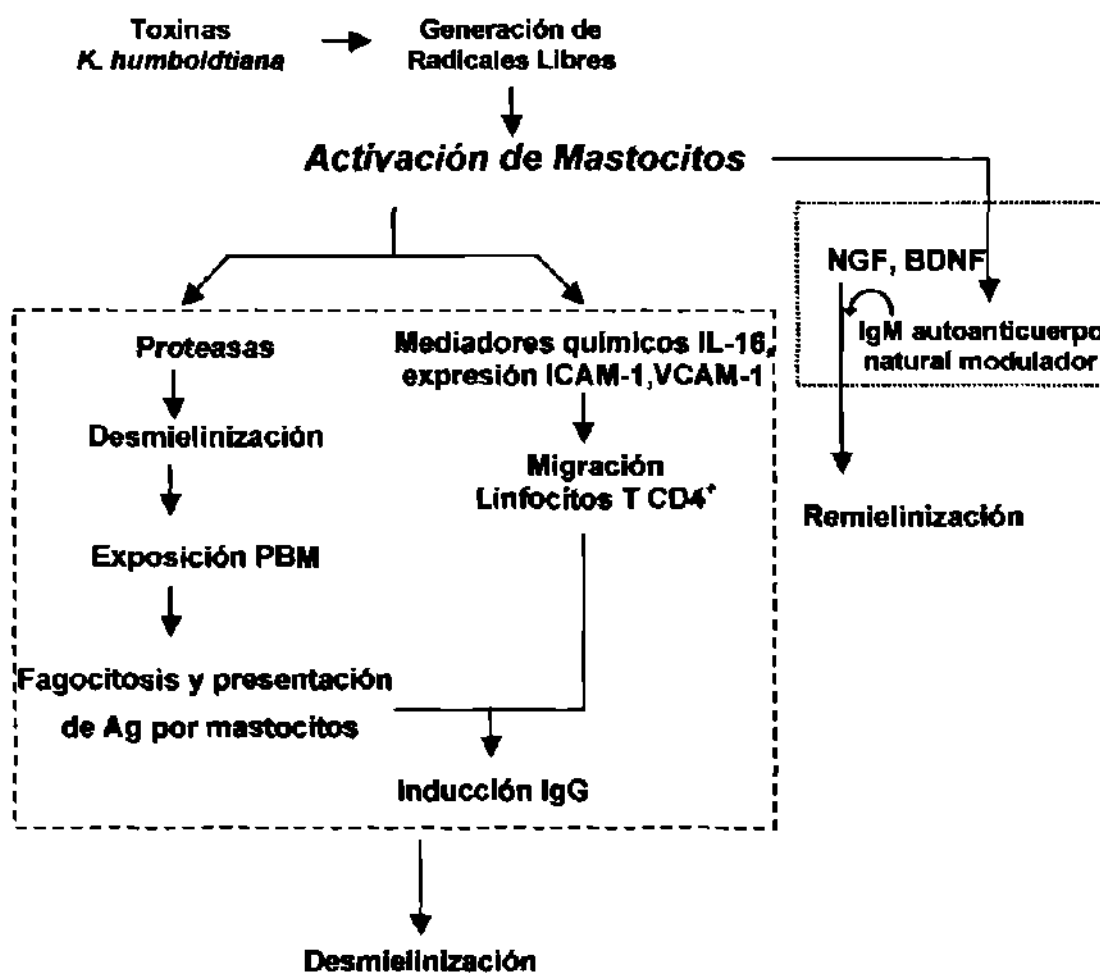
En humanos y en roedores se ha mostrado la presencia de autoanticuerpos naturales IgMk dirigidos contra la PBM y contra oligodendrocitos y se ha observado que favorecen el proceso de remielinización en el modelo murino de encefalomiелitis viral de Theiler y en la desmielinización no inmune causada por lisolecitina^(103, 105). 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⁽⁶⁹⁾.

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. humboldtiana* 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.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIÓN

Los mastocitos, linfocitos T CD4⁺ 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. Editorial 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- Phöls, 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., Diaz-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 α -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. En: 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 α 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 Glee's 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., Bienenstock, 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. 1. 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, alcalcinomycin, 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. Teynck, 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).