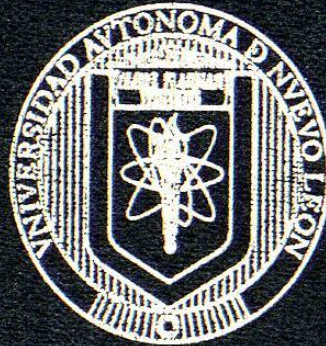


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**CAMBIOS HISTOQUIMICOS Y ULTRAESTRUCTURALES DEL
NERVIO CIATICO DE LA RATA CON INTOXICACION
CRONICA CON FRUTO MOLIDO DE *Karwinskia humboldtiana*
POR VIA ORAL**

POR

Q.F.B. EDUARDO MENDELEEV BECERRA VERDIN

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
DE MAESTRIA EN CIENCIAS CON ORIENTACION
EN MORFOLOGIA**

Agosto 2005

2005

AGOSTO

Q.F.B. EDUJARDO MENDIETHEV BECERRA VERDIN

TM
QP981
K37
B43
2005
c.1



1080127597

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL NUEVO LEÓN

RECTORÍA GENERAL

FACULTAD DE MEDICINA



SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO TECNOLÓGICO DEL
NUEVO LEÓN
CARRILLO DE LA ROSA S/N. CARRILLO DE LA ROSA, NUEVO LEÓN
C.P. 66400
TEL. 81 281 1000
POR VIA CORREO

POE

QUE: EDUARDO MENDIOLA Y GEORGINA VERDELLI

POR

EL REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
LA MAESTRIA EN CIENCIAS CON ORIENTACION
EN MORFOLOGIA SIEMPRE EL GRADO DE
LA MAESTRIA EN CIENCIAS CON ORIENTACION
EN MORFOLOGIA

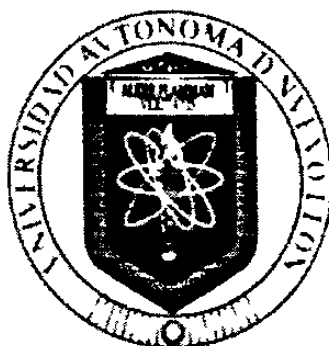
Agosto 2009





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**CAMBIOS HISTOQUÍMICOS Y ULTRAESTRUCTURALES DEL
NERVIO CIÁTICO DE LA RATA CON INTOXICACIÓN CRÓNICA
CON FRUTO MOLIDO DE *Karwinskia humboldtiana*
POR VÍA ORAL**

POR

Q.F.B. EDUARDO MENDELEEV BECERRA VERDÍN

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS CON ORIENTACION
EN MORFOLOGIA**

AGOSTO 2005

TM

QPQ81

.K37

B43

2005

**CAMBIOS HISTOQUÍMICOS Y ULTRAESTRUCTURALES DEL
NERVIO CIÁTICO DE LA RATA CON INTOXICACIÓN CRÓNICA
CON FRUTO MOLIDO DE *Karwinskia humboldtiana* POR VÍA
ORAL**

Aprobación de la tesis



DR. JULIO SEPÚLVEDA SAAVEDRA

Director de Tesis



DR. MED. MARÍA VICTORIA BERMÚDEZ BARBA

Comisión de Tesis



DRA. RAQUEL GUADALUPE BALLESTEROS ELIZONDO

Comisión de Tesis



DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO

Subdirector
de Estudios de Posgrado

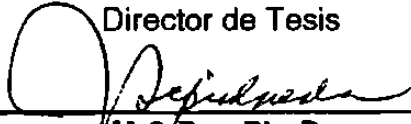
**CAMBIOS HISTOQUÍMICOS Y ULTRAESTRUCTURALES DEL NERVI
CIÁTICO DE LA RATA CON INTOXICACIÓN CRÓNICA CON FRUTO
MOLIDO DE *Karwinskia humboldtiana*
POR VÍA ORAL**

Presentado por:

Q.F.B. Eduardo Mendeleev Becerra Verdín

Este trabajo se realizó en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Bajo la dirección del Dr. Julio Sepúlveda Saavedra y la co-dirección de la Dra. Raquel Guadalupe Ballesteros Elizondo y la Dra. María Victoria Bermúdez Barba.

FIRMAS

Director de Tesis

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

Co-Directora de Tesis

**Dra. Raquel Guadalupe
Ballesteros Elizondo**

Co-Directora de Tesis

**Dra. María Victoria
Bermúdez Barba**

DEDICATORIA

A mis padres

A quienes les debo todo lo que soy y a quienes no me alcanzaría la vida para agradecerles lo mucho que de ellos he recibido.

A mi Nucita

Mi inseparable compañera a quien agradezco por todo el apoyo que me ha brindado. Este logro también es tuyo.

A mis hermanos

Indira y Cesar por estimularme a salir adelante y brindarme su apoyo.

A mi familia

Muchas gracias.

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá, Ma. del Carmen Verdín de Becerra, agradezco todo su apoyo, consejos, preocupaciones y el compartir mis sueños.

A mi papá, Everardo Becerra Bernal, de quien aun estoy aprendiendo que todo cuanto sea en la vida se puede lograr con esfuerzo y tenacidad.

Al Dr. Julio Sepúlveda Saavedra, por aceptarme en el postgrado y sobre todo por la confianza que ha depositado en mí y el apoyo brindado para sacar adelante este trabajo.

A la Dra. María Victoria Bermúdez, por sus valiosos comentarios y por formar parte de mi comisión de tesis.

A la Dra. Raquel Ballesteros Elizondo, por todo lo que de ella he aprendido, con este trabajo.

Al Biol. Viktor Romero, por su ayuda en las diferentes etapas de la realización de este trabajo.

A la Familia Rodríguez Aguayo, por sus atenciones, excelentes consejos y por brindarme su confianza.

A mis amigos de la maestría, Adolfo, Diana, Blanca, Jaime, Humberto, Cristian, Arnulfo, Cecilia, Pilar, Viviana y Martha, por sus críticas y buenos consejos para mejorar mi trabajo y por los buenos momentos que pasamos.

A mis amigos: Batito, Pato, Chino, Médico, Rafail, George, Caballo, y Paletón, porque siempre es posible contar con un buen consejo y/o apoyo de ellos.

Al CONACYT por la beca No. 171908 otorgada para el desarrollo de este trabajo.

Al COCYTEN por la beca-tesis otorgada para la conclusión de este proyecto de investigación.

Al personal del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la UANL, por facilitarme sus instalaciones para la realización de este proyecto.

GRACIAS

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Sistema Nervioso Periférico.	1
1.2. Neuropatías Periféricas.	2
1.3. <i>Karwinskia humboldtiana</i>.	5
1.3.1. Reportes Clínicos de Intoxicaciones.	7
1.3.2. Experimentos Realizados con Toxinas Purificadas.	8
1.3.3. Experimentos Realizados con el Fruto Completo.	8
1.4. Las Células Cebadas.	11
1.5. Experimentos en Neuropatías por otras Causas.	12
1.6. JUSTIFICACIÓN.	14
1.7. OBJETIVO GENERAL.	14
1.8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	15
2. MATERIALES Y MÉTODOS.	16
2.1. Equipo Utilizado.	16
2.2. Reactivos Utilizados.	16
2.3. Material Biológico Utilizado.	17
2.4. Diseño Experimental.	19
2.5. Distribución de Grupos Experimentales.	19
2.6. Variables a Evaluar y Procesamiento de Muestras.	20
2.6.1. Muestras en Bloques de Parafina.	20
2.6.2. Muestras en Resinas Epóxicas.	21
2.7. Análisis Estadístico.	22
3. RESULTADOS.....	23
3.1. Análisis Morfológico Mediante Microscopía de Luz.	23
3.1.1. Análisis con Azul de Toluidina.	23
3.1.2. Análisis con Ácido Per-lódico de Schiff.	23
3.1.3. Análisis con Azul Alciano/PAS.	24
3.1.4. Análisis con Azul Alciano/Safranina.	24
3.2. Cuantificación de las Poblaciones de Células Cebadas.	29

3.3. Representación Gráfica de las Poblaciones de Células Cebadas.	32
3.4. Análisis Estadístico por Etapas.	35
3.5. Análisis Morfológico del Nervio Ciático.	37
3.6. Análisis Ultraestructural del Nervio Ciático.	43
3.6.1. Descripción Ultraestructural de Células Asociadas al Nervio Ciático.	49
4. DISCUSIÓN.	52
5. CONCLUSIONES.	58
PERSPECTIVAS.	59
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	60
APÉNDICE.	68

LISTA DE FIGURAS

FIGURA

1.	Axones mielinizados y axones amielínicos.	2
2.	Desmielinización segmentaria.	3
3.	Degeneración axonal retrógrada.	3
4.	Degeneración Walleriana.	4
5.	Arbusto y fruto de <i>Karwinskia humboldtiana</i>	5
6.	Estructura química de toxinas aisladas de <i>K. humboldtiana</i>	6
7.	Desarrollo del modelo animal realizado por Salazar.	17
8.	Fotomicrografía de células cebadas teñidas con azul de toluidina. ...	25
9.	Fotomicrografía de células cebadas teñidas con PAS.	26
10.	Fotomicrografía de células cebadas teñidas con azul alciano/PAS. ...	27
11.	Fotomicrografía de células cebadas teñidas con azul alciano/Safranina.	28
12.	Fotomicrografía de un corte semifino: Etapa Control.	38
13.	Fotomicrografía de un corte semifino: Etapa Sin Neuropatía.	39
14.	Fotomicrografía de un corte semifino: Etapa Paresia.	40
15.	Fotomicrografía de un corte semifino: Etapa Parálisis.	41
16.	Fotomicrografía de un corte semifino: Etapa Recuperados.	42
17.	Electromicrografías de un corte fino: Etapa Control.	44
18.	Electromicrografías de un corte fino: Etapa Sin Neuropatía.	45
19.	Electromicrografía de un corte fino: Etapa Paresia.	46
20.	Electromicrografía de un corte fino: Etapa Parálisis.	47
21.	Electromicrografías de un corte fino: Etapa Recuperados.	48
22.	Electromicrografías de cortes finos: comparación De células cebadas en diferentes etapas de la neuropatía.	50
23.	Electromicrografías de cortes finos: Axones amielínicos y linfocito. ...	51

LISTA DE TABLAS

TABLA

1. Mediadores secretados por células cebadas.	11
2. Tratamiento de los grupos experimentales.	18
3. Comparación entre las diferentes técnicas utilizando una prueba de medias teñidas con azul de toluidina.	29
4. Resultados de la cuantificación de las células cebadas totales endoneurales.	30
5. Resultados de la cuantificación de las células cebadas teñidas con PAS.	30
6. Resultados de la cuantificación de las células cebadas teñidas con azul alciano/PAS.	31
7. Resultados de la cuantificación de las células cebadas teñidas con azul alciano/safranina.	31

LISTA DE GRÁFICAS

GRÁFICA

1. Representación gráfica del número de células cebadas totales por mm² teñidas con azul de toluidina. 33
2. Representación gráfica del número de células cebadas por mm² teñidas con PAS. 33
3. Representación gráfica del número de células cebadas por mm² teñidas con azul alciano/PAS. 34
4. Representación gráfica del número de células cebadas por mm² teñidas con azul alciano/Safranina. 34
5. Análisis estadístico en el grupo *Control* con las diferentes técnicas histoquímicas. 35
6. Análisis estadístico en el grupo *Sin Neuropatía* con las diferentes técnicas histoquímicas. 35
7. Análisis estadístico en el grupo *Paresia* con las diferentes técnicas histoquímicas. 36
8. Análisis estadístico en el grupo *Parálisis* con las diferentes técnicas histoquímicas. 36
9. Análisis estadístico en el grupo *Recuperado* con las diferentes técnicas histoquímicas. 36

APÉNDICE

A. Preparación del fijador Glutaraldehído al 2.5%.	68
B. Preparación de buffer de cacodilatos.	68
C. Preparación de resinas epóxicas (consistencia suave).	68
D. Técnica de inclusión en resinas epóxicas.	69
E. Preparación de paraformaldehído al 4%.	69
F. Técnica de inclusión en parafina.	70
G. Desparafinado de laminillas.	70
H. Técnica de tinción con azul de toluidina.	71
I. Técnica de tinción con ácido per-iódico de Schiff (PAS).	71
J. Técnica de tinción con azul alciano / PAS.	72
K. Técnica de tinción con azul alciano / safranina.	73
L. Deshidratación y montaje de laminillas.	73
M. Contrastación de cortes semifinos.	74
N. Contrastación de cortes finos.	74

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

AA/PAS	Azul alciano / Ácido per-iódico de Schiff
AA/S	Azul alciano / Safranina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AT	Azul de Toluidina
BDNF	Factor neurotrófico derivado de cerebro
β -FGF	Factor de crecimiento angiogénico básico de fibroblastos
CC	Células cebadas
CSF	Factor estimulante de colonias
Ej	Ejemplo
FAP	Factor activador de plaquetas
Fig	Figura
g	Gramos
GAG's	Glucosaminoglucanos sulfatados
GM-CSF	CSF de granulocitos y monocitos
IgE	Inmunoglobulina E
INF- γ	Interferon gamma
<i>K.</i>	<i>Karwinskia</i>
Kg	Kilogramo
LTB ₄	Leucotrieno B4
LTC ₄	Leucotrieno C4
MHC II	Complejo mayor de histocompatibilidad clase II
MIF	Factor inhibidor de migración
min	Minutos
mL	Mililitro
μ m	Micrómetro
mm	Milímetro
NGF	Factor de crecimiento neuronal
NGF	Factor de crecimiento nervioso
nm	Nanómetro
NO	Óxido nítrico

P1	Proteína básica de la mielina 1
P2	Proteína básica de la mielina 2
PAS	Ácido per-iódico de Schiff
PBM	Proteína básica de la mielina
PBS	Buffer de fosfatos
PGD ₂	Prostaglandina D2
PGE ₂	Prostaglandina E2
SCF	Factor de células madre
SGB	Síndrome de Guillian-Barré
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
v.o.	Vía oral

RESUMEN

Eduardo Mendeleev Becerra Verdín
Universidad Autónoma de Nuevo León.
Facultad de Medicina.

Título

CAMBIOS HISTOQUÍMICOS Y
ULTRAESTRUCTURALES DEL NERVIJO
CIÁTICO DE LA RATA CON INTOXICACIÓN
CRÓNICA CON FRUTO MOLIDO DE
Karwinskia humboldtiana POR VÍA ORAL

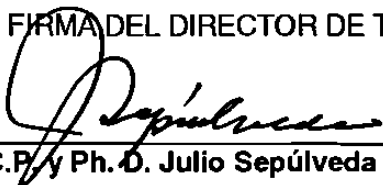
Área de estudio: Morfología

Candidato para el grado de Maestro en
Ciencias con Orientación en Morfología.

Propósito y Método de Estudio: La intoxicación con el fruto de *Karwinskia humboldtiana* es capaz de producir un cuadro clínico similar al de Guillain-Barré, que puede ser regresivo o causar la muerte dependiendo de la cantidad ingerida. En estudios recientes se estableció un modelo de polineuropatía tóxica producido por este fruto, que reproduce todas las fases de la lesión del nervio ciático, en el cual se demostró la presencia de células cebadas (CC) y linfocitos. En el modelo se intoxicaron ratas Wistar con el fruto de *K. humboldtiana* (dosis fraccionada 3.5 g/Kg y controles tratados con agua), a diferentes tiempos (control; 24, 48, 58 y 112 días), un total de 5 animales/grupo. Segmentos de nervios ciáticos se fijaron en parafina para cuantificar CC/mm² y valorar los cambios histoquímicos mediante Azul de Toluidina (AT), Azul Alciano/Safranina (AA/S), Ácido Per-iodico Schiff (PAS) y Azul Alciano/PAS (AA/PAS), así como embebidas en Epon para su evaluación ultraestructural. La cuantificación con AT mostró un aumento progresivo a partir del día 48 post-intoxicación. La prueba de Tukey reveló una diferencia significativa para la detección de CC/mm² comparando el AT (10.46a) con AA/S (8.34ab), PAS (3.95b) y AA/PAS (3.54b); con estas tinciones detectamos aminas biógenas/heparina, mucopolisacáridos y mucinas ácidas/neutras a los 0, 24, 58 y 112 días. En el día 48 el AT reveló un incremento de CC, con positividad a la heparina solamente. Al evaluar la ultraestructura, observamos alteraciones en axones motores y vainas de mielina ya descritos, además cambios de electrondensidad en axones sensitivos a partir del día 24.

Contribuciones y Conclusiones: . En este estudio mostramos por primera vez los cambios histoquímicos observados en los gránulos de las células cebadas endoneurales, en esta neuropatía periférica causada por *K. humboldtiana*, durante las diferentes etapas de la polineuropatía. Esto sugiere la participación activa de estas células en el proceso de desmielinización y remielinización del nervio ciático. Además, los hallazgos ultraestructurales observados en axones amielínicos, reportados por primera vez en esta investigación, nos sugieren que pudiera existir una alteración neuronal en este proceso, ya que hasta ahora, las observaciones se han enfocado a la vaina de mielina y a los axones motores.

FIRMA DEL DIRECTOR DE TESIS



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

CAPÍTULO 1

INTRODUCCION

1.1. Sistema Nervioso Periférico.

El sistema nervioso periférico (SNP) comprende todo el tejido nervioso fuera del encéfalo y la médula espinal, esta formado por: grupos de células nerviosas o ganglios, entrecruzamientos de fibras nerviosas o plexos y haces de fibras nerviosas de recorrido paralelo bajo la forma de nervios motores y sensitivos que están conectados a la medula espinal, los cuales establecen la red de comunicación entre el sistema nervioso central y las diferentes estructuras del organismo.

El SNP se divide en somático que controla las actividades voluntarias y en autónomo que se encarga de la regulación de las actividades involuntarias; por lo tanto, su función principal es la de conducción de información sensorial al sistema nervioso central y de órdenes motoras a través de fibras nerviosas a los órganos efectores como el músculo^{1,2}.

Cada nervio periférico se encuentra formado por haces de fibras nerviosas que transmiten información como impulsos nerviosos por medio de axones de neuronas, los cuales a partir de 0.7 μm de diámetro están rodeados por una vaina producida por diferenciación y enrollamiento de la membrana plasmática de células especializadas, conocidas como células de Schwann y forman una estructura denominada vaina de mielina^{3,4}, que ultraestructuralmente se observa como una membrana enrollada alrededor del axón, su función es la de aumentar la velocidad de conducción, además, también se encuentran axones que carecen de vaina denominados amielínicos, los cuales están incluidos en el citoplasma de la célula de Schwann⁵ sin la formación de una vaina (Figura 1).

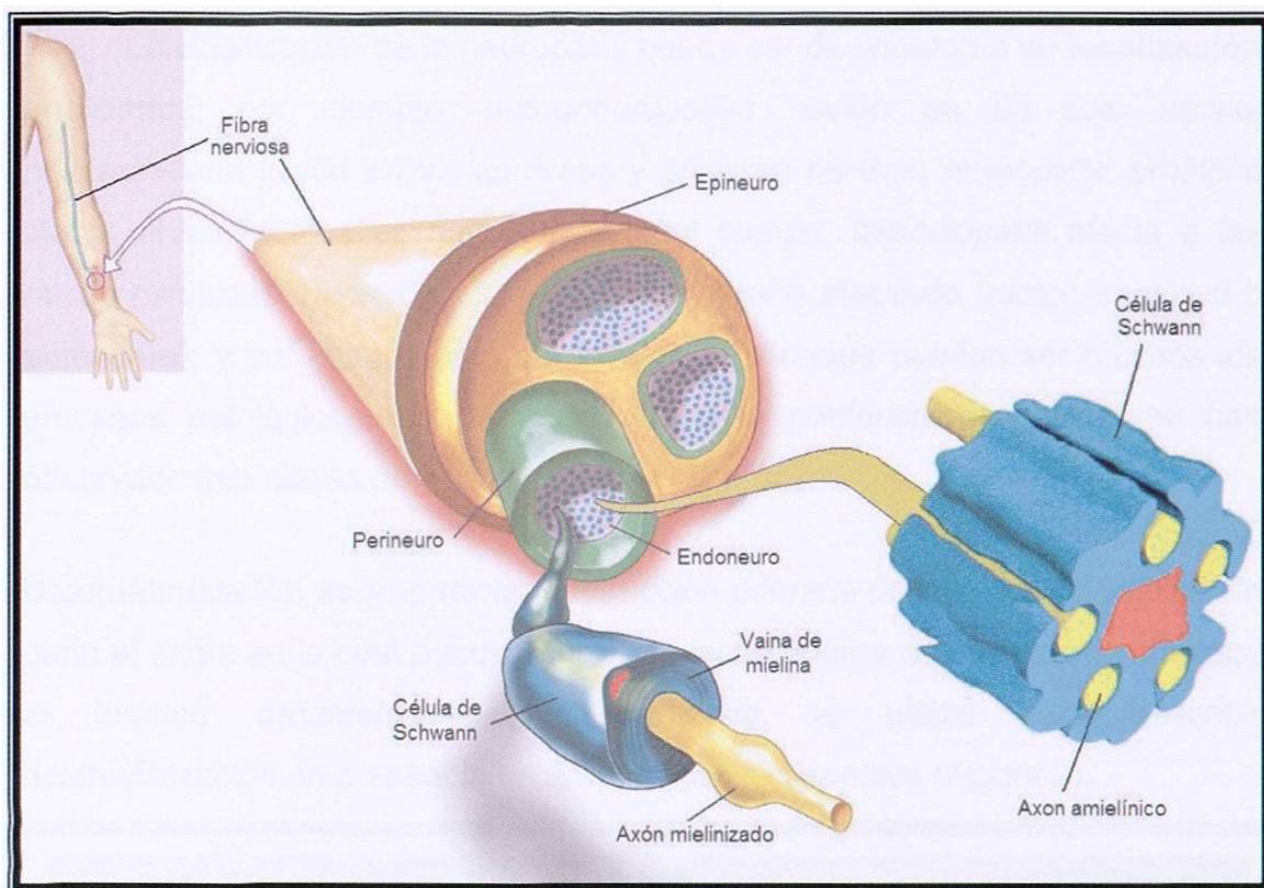


Figura 1. Esquema que muestra la morfología de los axones mielinizados y amielínicos.

1.2. Neuropatías Periféricas.

El término neuropatía se refiere a un proceso o afección inflamatoria y degenerativa de uno o varios nervios, otro término utilizado en este tipo de alteraciones es el de polineuritis, que se refiere a un síndrome que afecta al sistema nervioso periférico, que tiende a ser simétrico, bilateral y de predominio distal^{7,8}.

Cabe mencionar que las células de Schwann son vulnerables a daños por agentes químicos y/o tóxicos, entre otros⁶. Por lo tanto, cualquier alteración de la vaina de mielina puede conducir al desarrollo de una neuropatía periférica. En sentido estricto, la neuropatía periférica incluye solo las formas de lesión no inflamatorias, sin embargo, en sentido amplio se aplica a todo tipo de daño que afecte al nervio.

La clasificación de la neuropatía puede ser de acuerdo a su **localización anatómica**, por ejemplo: *mononeuropatías*, lesión en un solo nervio; *polineuropatía* lesión en varias áreas y diversos nervios; *neuropatía simétrica* afecta áreas iguales en ambos lados del cuerpo; *radiculopatía* afecta a las raíces nerviosas; dependiendo del **tipo de nervio afectado** (motor, sensitivo o autónomo); y por último según su **etiología**⁸. Aunque pueden ser muchos los procesos patológicos que lesionan al nervio periférico, solamente se han observado tres clases de daño^{2,4}.

Desmielinización segmentaria: destrucción primaria de la vaina de mielina sin daño al axón, en la cual puede ocurrir remielinización y recuperación completa; el termino **desmielinización secundaria** se utiliza para describir desmielinización en presencia de anomalías axonales (Figura 2).

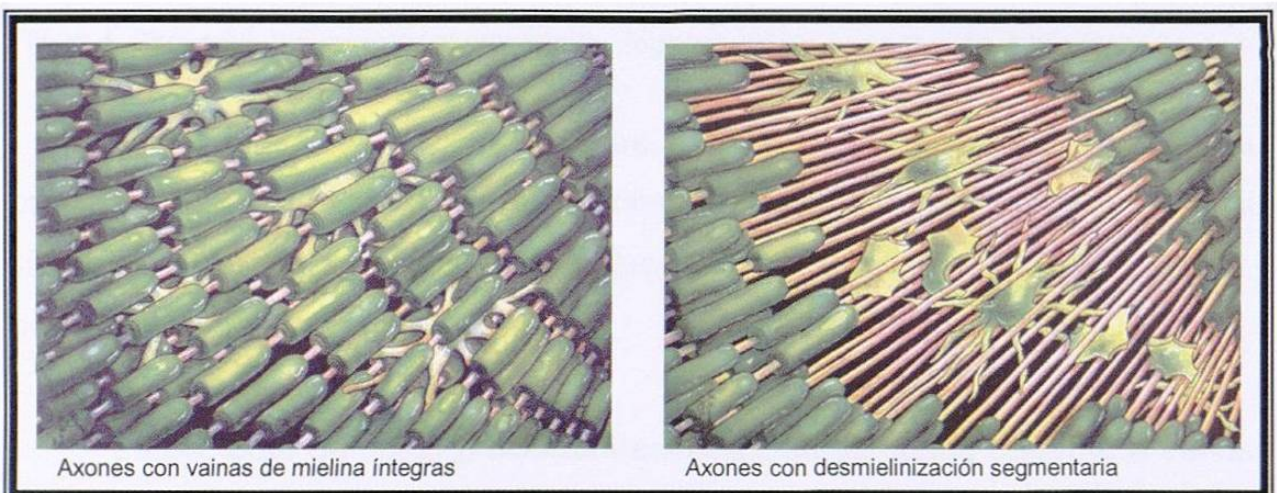


Figura 2. Esquema que muestra la apariencia de una fibra nerviosa íntegra (izquierda) y una con desmielinización segmentaria (derecha).

Degeneración axonal retrógrada: implica una alteración metabólica de la neurona que se manifiesta como muerte de la porción distal del axón (Figura 3).

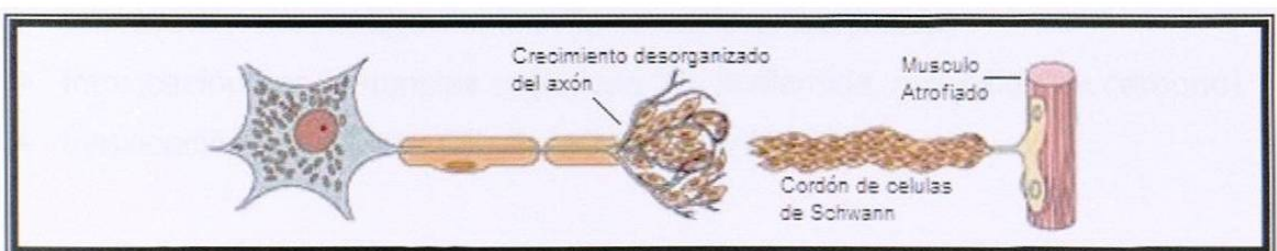


Figura 3. Esquema que muestra la degeneración axonal retrógrada

Degeneración Walleriana: son modificaciones degenerativas del segmento distal, ocurre cuando se secciona el axón o se destruye la neurona; las células de Schwann pueden proliferar y puede producirse regeneración axonal (Figura 4).

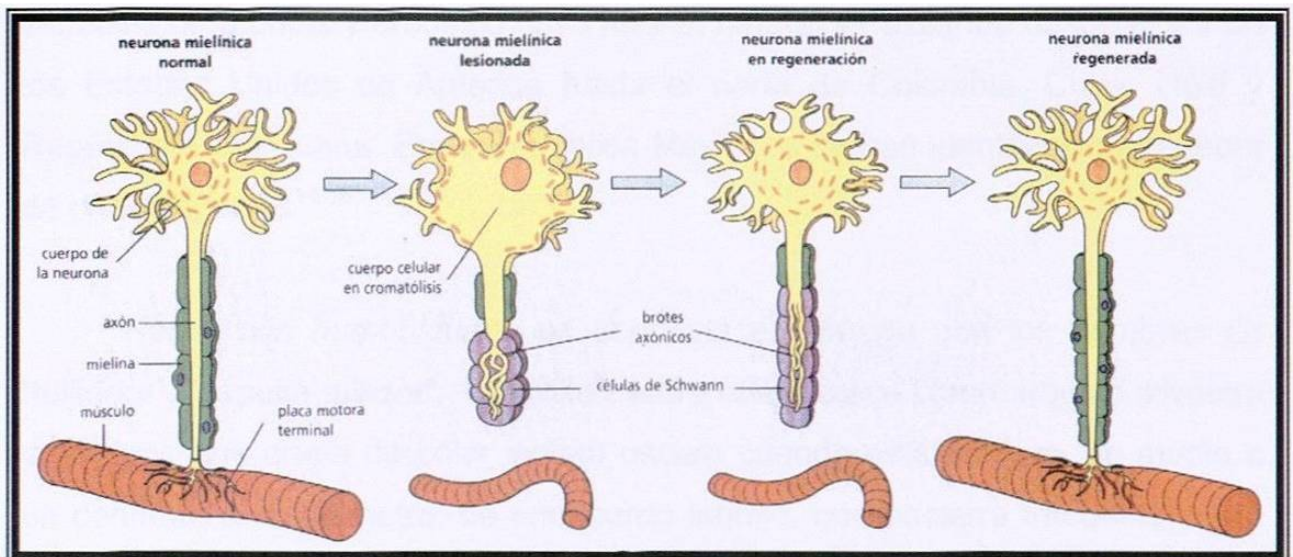


Figura 4. Esquema que muestra el proceso de degeneración y regeneración Walleriana.

Por lo tanto, los términos que se emplean para describir una serie de procesos inflamatorios, no inflamatorios y/o degenerativos que afectan al sistema nervioso periférico de formas muy diversas son: polineuropatía, neuritis, polineuritis o poliradiculoneuritis.

La etiología de estos procesos desmielinizantes puede deberse a varios factores^{1,6,9-13} como:

- Estados carenciales y trastornos metabólicos (Ej. alcoholismo, diabetes).
- Estados infecciosos e inflamatorios (Ej. Síndrome de Guillian-Barre, difteria, lepra, polio).
- Intoxicación por metales (Ej. plomo, arsénico, talio).
- Intoxicación por medicamentos (Ej. vincristina, isoniacida).
- Intoxicación por sustancias orgánicas (Ej. acrilamida, monóxido de carbono).
- Intoxicación por plantas (Ej. *Karwinskia humboldtiana*).

1.3. *Karwinskia humboldtiana*.

El género *Karwinskia* es un arbusto venenoso que pertenece a la familia de las *Ramnáceas*, está constituido por arbustos y árboles pequeños que crecen en zonas tropicales y en áreas desérticas, incluye alrededor de 15 especies de árboles y arbustos cuyo hábitat natural se extiende desde el sur de los Estados Unidos de América hasta el norte de Colombia, Cuba, Haití y República Dominicana. En la República Mexicana se han identificado alrededor de once especies¹⁴⁻¹⁶.

Karwinskia humboldtiana es conocida en México con los nombres de “tullidora”, “capulín tullidor”, “coyotillo”, entre otros; crece como arbusto silvestre y produce una drupa de color violeta oscuro cuando está maduro, de medio a un centímetro de diámetro, de endocarpo leñoso, que encierra frecuentemente dos semillas fértiles y dos abortadas, contiene una sustancia amarilla, soluble en agua y un sabor dulce debido a su contenido de glucosa (Figura 5).



Figura 5. Fotografías que muestran el arbusto de *Karwinskia humboldtiana* y su fruto en diferentes estados de maduración.

El fruto de *Karwinskia humboldtiana* es capaz de provocar parálisis en individuos que la ingieren. El cuadro clínico de la intoxicación con esta planta ha sido tradicionalmente descrito como una parálisis flácida, simétrica, progresiva y ascendente, se presenta dos a tres semanas después de la ingestión del fruto de la “tullidora”, iniciándose en las extremidades inferiores de donde asciende progresivamente afectando a los segmentos superiores del cuerpo, hasta presentarse parálisis bulbar que puede ocasionar la muerte^{12,17}. Si el Individuo

presentarse parálisis bulbar que puede ocasionar la muerte^{12,17}. Si el Individuo afectado sobrevive, la recuperación se hace paulatinamente, en forma espontánea, desapareciendo la parálisis en orden inverso al de aparición, lentamente hasta obtenerse recuperación funcional completa; en promedio el periodo de recuperación es de un año, existen variaciones individuales entre los diferentes casos en lo que se refiere a duración, gravedad y extensión de la parálisis. El cuadro clínico presenta cierta similitud con el de la poliomieltitis, Guillain-Barré y los cuadros de poliradiculoneuritis debidos a otras causas, ya que la parálisis por "tullidora" además es flácida, pero realizando un análisis clínico cuidadoso permite establecer el diagnóstico diferencial.

El principio tóxico se localiza principalmente en la semilla del fruto, de donde se han extraído diversas toxinas denominadas en base a su peso molecular como: T-496, T-514, T-516 y T-544, de las cuales se ha observado que es la T-544 la que produce parálisis y recientemente se ha descrito que la T-514 también tiene este efecto a largo plazo después de ser administrada^{18,47} (Figura 6).

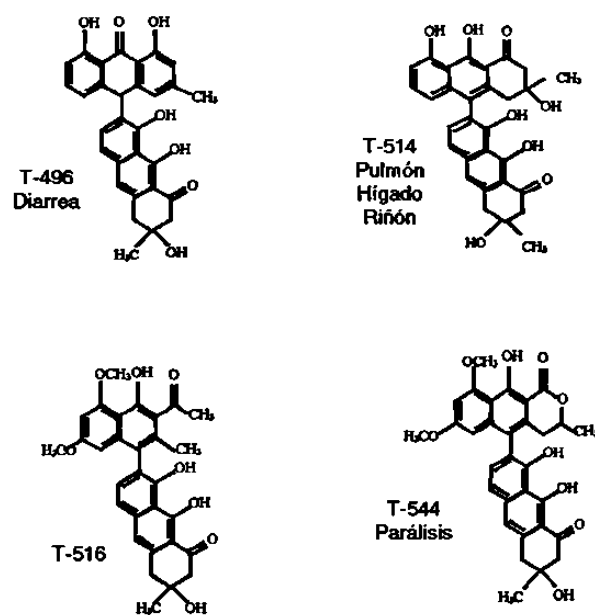


Figura 6. Estructuras químicas de las diferentes toxinas extraídas del fruto de *Karwinskia humboldtiana*, su efecto y/u órgano en que causa alteraciones.

1.3.1. Reportes Clínicos de Intoxicaciones.

Los efectos tóxicos de esta planta los describió por primera vez Francisco Xavier Clavijero¹⁹. En México se han publicado diversos trabajos en donde se describen observaciones clínicas o experimentales sobre los efectos paralizantes de la *Karwinskia humboldtiana*. Entre esas publicaciones destaca el excepcional trabajo clínico de Castillo²⁰, los estudios del Instituto Médico Nacional⁴¹⁻⁴³, las investigaciones experimentales de Eliseo Ramírez y la Dra. Rivero en el Instituto de Salud y Enfermedades Tropicales⁴⁴ y los trabajos de Padrón y Velásquez en San Luis Potosí.^{17,45}

Castillo²⁰ describe la intoxicación de 106 soldados en donde menciona haber practicado tres autopsias en las que al realizar el examen macroscópico menciona solo ligera disminución del volumen de algunos nervios periféricos” sin haber encontrado “lesiones visibles en la médula, meninges o cerebro y concluyó, basándose en el estudio clínico, que seguramente se trataba de una *polineuritis tóxica* y no de lesiones de la médula espinal, ya que los enfermos que se curaban mostraban una recuperación funcional completa y los muy graves fallecían debido a lesiones de los nervios de origen bulbotuberancial, como sucede en otras polineuritis. Por otra parte, Segovia²¹ reportó el caso de un paciente en el cual el diagnóstico de polineuritis se efectuó por el antecedente de la ingestión de la fruta de *Karwinskia humboldtiana*, así como por el cuadro típico de parálisis simétrica, progresiva, ascendente y por el estudio del líquido cefalorraquídeo, siendo corroborada la lesión del nervio periférico mediante el estudio electromiográfico,. Bustamante²² reporta otro caso de intoxicación por el mismo fruto, a este paciente se le diagnosticó cuadriparesia flácida con arreflexia global, paresia de los músculos intercostales y diafragmáticos. En otro caso, Bermúdez¹³ la intoxicación de una familia en donde 10 de sus 13 miembros murieron, se diagnosticó una polirradiculoreuritis por desmielinización segmentaria.

1.3.2. Experimentos Realizados con Toxinas Purificadas.

En estudios experimentales realizados con la toxina purificada, Mitchell²³ realizó un estudio con las toxinas T-496 y T-544 aisladas del endocarpo del fruto del coyotillo e inyectadas en el nervio ciático de ratas; reportó que ambas producían una neuropatía periférica en la que predominaba una desmielinización segmental y en cortes histológicos mencionó que había fagocitosis no solo por macrófagos sino también por las células de Schwann.

Muñoz²⁴ en otro experimento realizado en gatos con extractos de la semilla, concluye que la parálisis producida por las toxinas de la "tullidora" es el resultado tanto del bloqueo de la conducción de los impulsos nerviosos como de la denervación muscular; por otra parte sugiere que la implicación de los nervios motores en la neuropatía experimental por tullidora y la preservación de sensación somática en cuadriplejía de niños intoxicados accidentalmente, están relacionados con la distribución de los diámetros axonales en nervios periféricos.

Bermúdez²⁵ al intoxicar ratones con la T-544 describió alteraciones en nervios periféricos, además en los animales que sobrevivieron cinco días o más, presentaban alteraciones de las láminas de mielina, sin infiltrado inflamatorio en este tejido.

1.3.3. Experimentos Realizados con el Fruto Completo.

Por otra parte en estudios experimentales pero en intoxicaciones con el fruto completo se han descrito alteraciones diferentes a la realizadas con las toxinas aisladas. Del Pozo¹⁰, llevó a cabo una serie de estudios fisiológicos que le permitieron comprobar que en los animales paralizados existían alteraciones claras en la conducción de los nervios periféricos; inició un estudio sistemático

de los diferentes aspectos de la intoxicación por *Karwinskia humboldtiana*, así como aspectos neuropatológicos, los cuales se continuaron por Alfonso Escobar y Dionisio Nieto¹¹ que describen una incoordinación motora del tren posterior a los seis u ocho días de administrada la semilla a gatos y ratas, los cuales rápidamente presentaban una parálisis flácida, que ascendió progresivamente hasta afectar las extremidades anteriores en aproximadamente 48 a 72 horas; en el estudio microscópico de nervios periféricos reportaron áreas de degeneración miélnica, abundantes e irregularmente distribuidas entre los haces de fibras, localizadas en uno o varios segmentos internodales en una misma fibra nerviosa, alternando con tramos de mielina normal, las células de Schwann mostraban proliferación y en ocasiones, la vaina de mielina estaba totalmente desintegrada.

Charlton²⁶⁻²⁸ también reportó las lesiones observadas en las fibras de nervios periféricos de cabras intoxicadas experimentalmente con el mismo fruto; la neuropatía periférica observada la describió como una desmielinización segmental y degeneración Walleriana con lesiones que ocurren primero y mas frecuentemente en las células de Schwann; la degeneración Walleriana se observó mas marcada en cabras con altas dosis y los sitios de estas observaciones fueron sobre nervios mas distales a la medula espinal; el análisis con ultraestructura demostró hinchazón de las células de Schwann, degeneración mitocondrial, depleción de glucógeno, deshilachamiento de la vaina de mielina, desmielinización segmental y degeneración Walleriana; además de que esos resultados sugieren primero un daño mitocondrial en las células de Schwann, perjudicado el transporte activo.

Por otra parte Muñoz²⁹ reportó un estudio con gatos intoxicados con una dosis única de fruto molido administrado directamente en el tubo gástrico, encontró daño motor entre tres y seis semanas después de intoxicados, a nivel ultraestructural describió una intensa desmielinización de los axones motores, rodeados por células de Schwann alteradas, las cuales frecuentemente

mostraban la membrana basal engrosada; además Muñoz, al compararse con los controles, las células de Schwann mostraban un citoplasma más electrodenso e hinchado; también encontró que algunas células de Schwann mostraban un citoplasma con abundantes vesículas envueltas con membrana que contenían estructuras parecidas a mielina; los axones al desmielinizarse mostraban algunos cuerpos electrodensos y mitocondrias alteradas. Estas alteraciones fueron reportadas también por Kazuko³⁰ en un experimento similar.

Por otra parte Salazar³¹ en su tesis doctoral, realizó una contribución importante al desarrollar un modelo animal de polineuropatía, intoxicando ratas Wistar con una dosis fraccionada del fruto completo de *K. humboldtiana*, logrando reproducir las alteraciones similares a las desarrolladas en humanos y que denominó como: sin neuropatía, paresia, parálisis y recuperación a los 24, 48, 58 y 112 días pos-intoxicación respectivamente. En cortes histológicos de nervio ciático describió una desmielinización segmentaria, alteraciones en el axón, participación de anticuerpos IgG contra proteínas de la mielina, presencia de infiltrado inflamatorio que correspondía a linfocitos y células cebadas; estas células presentaban un comportamiento particular en donde los linfocitos se presentaban después de la intoxicación, aumentaban progresivamente hasta la etapa de parálisis y disminuían drásticamente en el período de recuperación, a diferencia de las células cebadas que se encontraban como residentes normales del nervio ciático y posterior a la intoxicación su número se incrementaba y mantenía hasta la etapa de parálisis, durante la recuperación la cantidad de células incrementaba nuevamente; además, reportó desgranulación de células cebadas durante cada una de las etapas desarrolladas en el modelo animal y con esto propuso la intervención del sistema inmune en este proceso patológico.

1.4. Las Células Cebadas.

Las células cebadas son un tipo celular presente en todos los vertebrados,^{32,33} originalmente fueron identificados debido a la propiedad metacromática que muestran sus gránulos frente a colorantes básicos³⁴, propiedad que se debe a que los gránulos de estas células almacenan glucosaminoglucanos sulfatados (GAG's)³⁵. Estas células son mejor conocidas por su papel en la hipersensibilidad, participan en las reacciones alérgicas o anafilácticas, y cuentan con receptores con una alta afinidad para las inmunoglobulinas IgE. Al activarse y desgranularse pueden liberar diversas sustancias mediadoras vasoactivas y proinflamatorias además de GAG's como aminas biogénicas, quimiocinas, enzimas, factores de crecimiento, péptidos, proteoglicanos^{4,5} (Tabla 1).

Tabla 1. Muestra algunos mediadores y su efecto fisiológico secretados por células cebadas.

Mediadores primarios	Efectos fisiológicos	Mediadores primarios	Efectos fisiológicos
<u>Aminas biógenas</u> Adrenalina. Dopamina Histamina Serotonina	<ul style="list-style-type: none"> • Neuromodulación • Vasodilatación, angiogénesis, mitogénesis y dolor. • Vasoconstricción y dolor. 	<u>Fact. de crecimiento</u> CSF, GM-CSF, b-FGF, NGF <u>Péptidos</u> Fact. Quimiotácticos Fact. Lib. de Corticot.	<ul style="list-style-type: none"> • Crecimiento celular. Infiltración de leucocitos. • Vasodilatación e inflamación. • Analgesia. • Vasodilatación y dolor • Antiinflamatorio. • Inflamación y dolor. Vasodilatación
<u>Enzimas</u> Arilsulfatasas Carboxipeptidasa A Quimasa	<ul style="list-style-type: none"> • Hidrólisis de lípidos y proteoglicanos. • Procesamiento de péptidos. • Daño tisular, dolor, síntesis de angiotensina II. 	Endorfinas Cininas Somatostatina Sustancia P Péptido intestinal vasoactivo	<ul style="list-style-type: none"> • Anticoagulante. • Antiinflamatorio. • estabilizador NGF. • Angiogénesis y estabilizador NGF. • Síntesis de tejido conectivo
Fosfolipasas Triptasas <u>Quimiocinas</u> IL-8, MCP-1, MCP-3, MCP-4, RANTES	<ul style="list-style-type: none"> • Generación de ácido araquidónico. • Daño tisular, inflamación y dolor. • Quimioatracción 	Heparina Condrotin sulfato Ácido hialurónico	

Recientemente se han reportado nuevas moléculas a la lista de compuestos presentes en los gránulos de las células cebadas: el Factor de crecimiento Neuronal (NGF)⁴²; el Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase II (MHC-II)^{49,50}; el factor de células madre (SCF),^{51,52} además de ARN y ARNm,^{53,54} lo que confirma la inmensa complejidad funcional de estas células.

Otros autores⁷³⁻⁷⁵ reportan que las proteasas (quimasa y triptasa) son capaces de degradar las proteínas de la mielina, además, que la proteína básica de la mielina (PBM) es capaz de favorecer la desgranulación de las células cebadas, sugiriendo que son capaces de contribuir en el daño a la mielina.

Existen reportes en donde ya se había encontrado asociación de las células cebadas con las terminaciones nerviosas³⁶. Por otra parte, algunos reportes que describen las evidencias anatómicas de la asociación entre células cebadas y nervios en mamíferos, especialmente en tracto digestivo, respiratorio, genital y en la piel.⁵⁵⁻⁶⁵

1.5. Experimentos en Neuropatías por otras Causas.

Estudios experimentales de neuropatías por otras causas, han señalado que los macrófagos y las células de Schwann juegan un papel importante en la degradación y remoción de la mielina; algunos datos que han sido reportados relacionan a las células cebadas con la degeneración Walleriana⁴⁶. Olson^{37,38} y Latker³⁹, revelaron que después de un daño, las células cebadas se acumulan y desgranulan en el nervio periférico.

Esposito⁴⁰ reporta la presencia de células cebadas en una neuropatía provocada al seccionar el nervio braquial de ranas; en esta investigación además de determinar el tamaño y el número total de estas células, también utilizó diferentes técnicas histoquímicas para la detección de algunos

mediadores en estas células. En sus resultados describe un aumento del número de células cebadas/mm², aumento de tamaño y desgranulación, eventos seguidos a la sección del nervio, además, diferentes características histoquímicas en los gránulos de estas células cebadas durante el transcurso de la degeneración Walleriana y regeneración del nervio; con estos resultados sugirió que las células cebadas podrían jugar un papel importante en el mecanismo de degeneración y regeneración por medio de la secreción de moléculas que se difunden.

Por lo tanto, con la información obtenida se pretende en esta investigación, al contribuir al conocimiento de la participación de las células cebadas y continuar con la caracterización de este tipo de polineuropatía en el modelo animal desarrollado por Salazar³¹.

1.6. JUSTIFICACIÓN.

Se considera de gran importancia analizar mediante técnicas histoquímicas la participación de las células cebadas en cada etapa de la neuropatía desarrollada en el modelo animal, así como también, llevar a cabo un estudio ultraestructural del axón, células de Schwann, vaina de mielina y elementos celulares asociados; para contribuir a la caracterización de este tipo de neuropatía.

1.7. OBJETIVO GENERAL.

Contribuir al conocimiento de la participación de las células cebadas en la neuropatía causada por el fruto de las plantas del género *Karwinskia*, y a la descripción de los cambios ultraestructurales de vainas de mielina, axones y células de Schwann y elementos celulares asociados, en el modelo animal desarrollado por Salazar (2003).

1.8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Evaluar la participación de las células cebadas en las distintas etapas de la neuropatía tóxica causada por *K. humboldtiana*, por medio de técnicas histoquímicas, así como cuantificar los cambios observados y compararlos estadísticamente entre los grupos y el control.
2. Describir y comparar los cambios histológicos presentes en el nervio ciático en cortes semifinos, en las etapas desarrolladas en el modelo animal de neuropatía tóxica (control, sin neuropatía, paresia, parálisis y recuperados).
3. Evaluar mediante microscopía electrónica de transmisión los cambios presentes en los axones, vainas de mielina, células de Schwann y elementos celulares asociados a nervio ciático, en cada una de las etapas desarrolladas en el modelo animal de neuropatía tóxica.

CAPÍTULO 2

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Equipo Utilizado.

Balanza analítica OHAUS.

Potenciómetro Orion Research modelo 601 A / digital ionalyzer.

Placa caliente Corning Hot Plate Stirrer PC-351.

Estufa eléctrica Equiphos S.A.

Refrigerador supermatic® modelo 0803.

Campana de extracción.

Microtomo American Optical Corporation.

Baño de flotación con control de temperatura Lipshaw MFG. CO.

Centro de inclusión Tissue Embedding Center Tissue Tek II.

Ultramicrotomo RMC MT-X.

Cuchilla de diamante Diatome.

Preparador de cuchillas LKB BROMMA 7800 KnifeMaker.

Microscopio estereoscópico American Optical Corp. modelo 569.

Microscopio de luz de campo claro EAGLE modelo CM240.

Estuche de disección.

Microscopio electrónico de transmisión modelo EM109 de Carl Zeiss.

Sistema Millipore® desionizador y purificador de agua mili-Q, con cartuchos de intercambio iónico de carbón y filtros de ésteres de celulosa (poro 0.22 μm) biológicamente inertes.

Cámara digital Sony Cybershot DSC-P72.

Computadora personal.

2.2. Reactivos Utilizados.

Reactivos utilizados para microscopía de luz: paraformaldehído, PBS, alcohol etílico, xilol, parafina, isopropanol, azul de toluidina, ácido acético,

acetato de sodio, ácido clorhídrico, ácido per-iódico de Schiff, metabisulfito de sodio, hematoxilina, azul alciano, safranina, sulfato de amonio férrico y resina sintética (entellan).

Reactivos utilizados para microscopía electrónica de transmisión: glutaraldehído, hidróxido de sodio, cacodilato de sodio, tetraóxido de osmio, nitrato de uranilo, resinas epóxicas, azul de toluidina, borato de sodio, acetato de uranilo, citrato de plomo, ácido pícrico, paraformaldehído y ácido clorhídrico.

2.3. Material Biológico Utilizado.

El material para esta investigación se obtuvo del modelo animal con neuropatía tóxica inducida experimentalmente por *Karwinskia humboldtiana* desarrollado por Salazar³¹ (Figura 7).

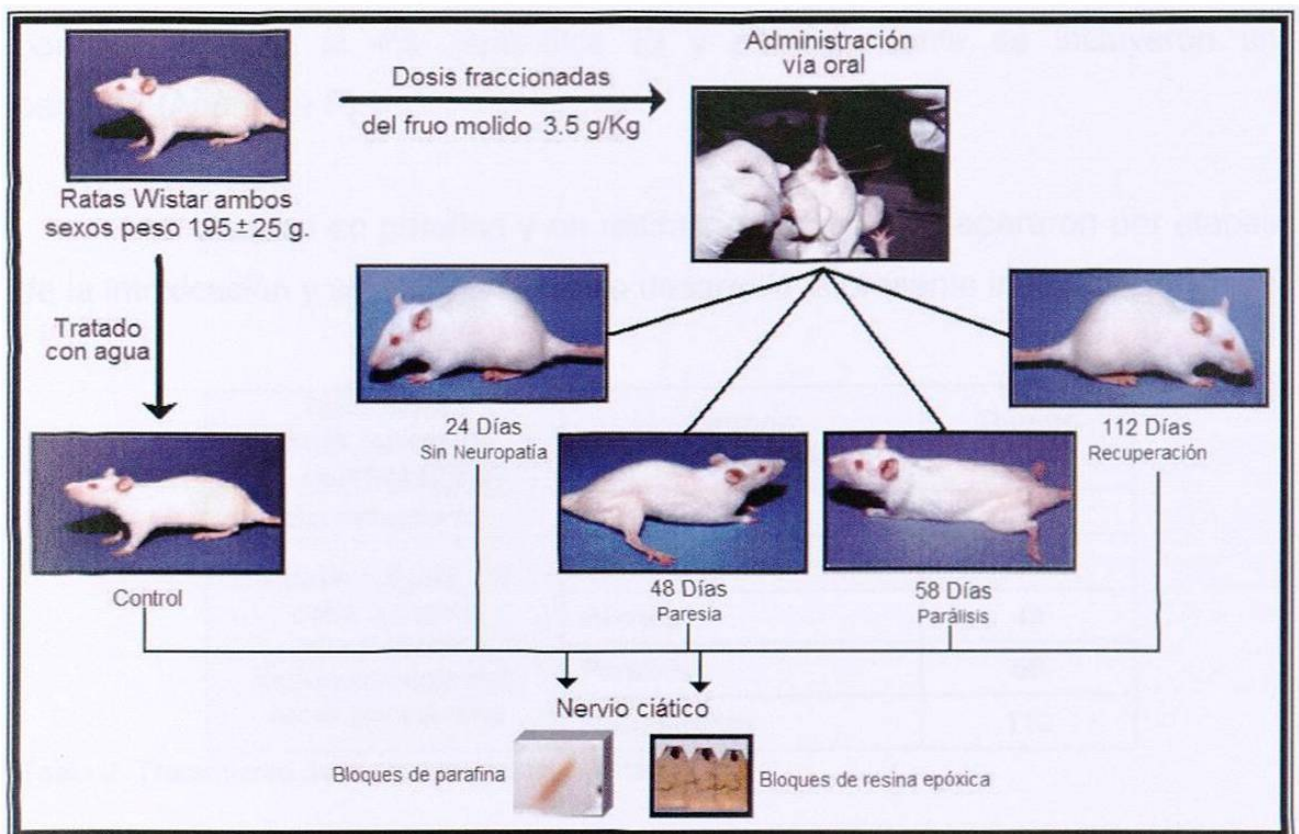


Figura 7. Desarrollo del modelo animal realizado por Salazar³¹.

El modelo animal se desarrolló de la siguiente manera. Se utilizaron ratas Wistar de ambos sexos, con un peso promedio de 195 ± 25 g y fueron distribuidas en lotes de cinco animales como mínimo ($n = 5$), los cuales previo ayuno de seis horas recibieron por v.o. mediante una sonda esofágica, una dosis fraccionada del fruto molido de 3.5 g/Kg (1 dosis 1.5g/Kg + 4 dosis 0.5 g/Kg administradas individualmente dos veces por semana) en suspensión acuosa de concentración 0.2 g/mL. Todos los animales se mantuvieron bajo condiciones estándar de laboratorio, ciclo luz-oscuridad de 12 horas, temperatura 22 °C y recibieron agua y alimento completo, balanceado y libre de antibióticos *ad libitum*. En total se formaron 5 grupos experimentales (Tabla 2) incluyendo el tratamiento *Control* al cual no se le administró el fruto: *Control* (día 0), *Sin Neuropatía* (24 días), *Paresia* (48 días), *Parálisis* (58 días) y *Recuperados* (112 días). Los nervios ciáticos se disecaron y una parte de los fragmentos fueron fijados en glutaraldehído (Apéndice A) y se incluyeron en resinas epóxicas (Apéndice D); la otra parte de los fragmentos se fijaron en paraformaldehído al 4% (Apéndice E) y posteriormente se incluyeron en parafina (Apéndice F).

Los bloques en parafina y en resinas epóxicas, se separaron por etapas de la intoxicación y a partir de estos se desarrolló la presente investigación.

Tratamiento (fruto molido de <i>K. humboldtiana</i>)	Grupos experimentales	Tiempo (días)
Sin tratamiento	Control	0
1 dosis 1.5g/Kg + 4 dosis 0.5 g/Kg administradas individualmente dos veces por semana	Sin Neuropatía	24
	Paresia	48
	Parálisis	58
	Recuperados	112

Tabla 2. Tratamiento de los grupos experimentales.

2.4. Diseño Experimental.

El diseño empleado en este experimento fue el denominado completamente al azar, en donde los tratamientos (tiempo 0, 24, 48, 58 y 112 días de transcurso de la neuropatía), con 5 repeticiones cada tratamiento dieron un total de 35 unidades experimentales (ratas Wistar). En el que las observaciones pueden ser representadas por el modelo estadístico lineal

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde: μ : es el efecto medio verdadero
 τ : es el efecto verdadero del i -ésimo tratamiento
 ε : es el efecto verdadero de la j -ésima unidad experimental sujeta al i -ésimo tratamiento.

2.5. Distribución de Grupos Experimentales.

Los grupos experimentales se distribuyeron de la siguiente manera:

- Bloques de parafina: Se utilizaron en total 25 bloques de parafina, 5 bloques por grupo para cada una de las siguientes etapas: *Control* (día 0), *Sin Neuropatía* (24 días), *Paresia* (48 días), *Parálisis* (58 días) y *Recuperados* (112 días). Se obtuvieron cortes mediante microtomía, 5 laminillas/bloque teniendo un total de 100 laminillas.
- Bloques de resinas epóxicas: Se utilizaron en total 15 bloques de resinas epóxicas, de los cuales por una parte se obtuvieron cortes semifinos (3 laminillas/bloque) y cortes finos (2 rejillas/bloque) mediante ultramicrotomía, en cada una de las etapas, teniendo un total de 45 laminillas y 30 rejillas.

2.6. Variables a Evaluar y Procesamiento de Muestras.

Las variables a evaluar y los procesos que se realizaron a los cortes obtenidos de los bloques de parafina y a los cortes obtenidos de la inclusión en resinas epóxicas, se realizaron como se describen a continuación.

2.6.1. Muestras en Bloques de Parafina.

Los cortes obtenidos de los bloques de parafina se utilizaron para cuantificar las células cebadas y valorar los cambios histoquímicos de sus gránulos de secreción durante el transcurso de la degeneración y regeneración del nervio ciático en las etapas ya mencionadas.

Los cortes se desparafinaron (Apéndice G) y posteriormente se les realizaron las siguientes técnicas histoquímicas para la evaluación de variables:

A) Variable CC/mm² completas o desgranuladas: para la evaluación de esta variable se utilizó la técnica histoquímica de **azul de toluidina (AT)**, que identifica la población total de células cebadas endoneurales completas o desgranuladas en base a su típica metacromasia de los gránulos secretores, la cual contrasta a las células con un color azul oscuro (Apéndice H).

B) Variable CC/mm² con contenido de mucopolisacáridos: para la evaluación de esta variable se utilizó la técnica histoquímica de **ácido periódico de Schiff (PAS)**, que identifica con diferentes tonalidades de color magenta a los mucopolisacáridos en los gránulos de las células cebadas, específicamente la heparina (Apéndice I), la cual es una molécula que tiene efecto anti-inflamatorio y es un estabilizador del factor de crecimiento neural.