

3.6. Análisis Ultraestructural del Nervio Ciático.

Al realizar el análisis de los cortes finos, durante la etapa *Control* (Figura 17) se observó la ultraestructura normal del nervio que se caracteriza por la forma semicircular regular de los axones mielinizados, así como un grosor uniforme de la vaina de mielina proporcional al diámetro del axón, además los axones mielinizados y amielínicos se observaron con una electrodensidad uniforme. Posterior a la intoxicación, durante la etapa de *Paresia* (Figura 18), al igual que en microscopía de luz, se hacen presentes alteraciones ultraestructurales manifestadas principalmente en la vaina de mielina que se observan como un aumento en el grosor y espacios dentro de esta a manera de deshilachamientos, así como un cambio en la morfología normal de los axones mielinizados, además llama la atención el cambio de electrodensidad presente principalmente en los axones amielínicos. 48 días después de la intoxicación, etapa designada como *Paresia* (Figura 19), los cambios se acentuaron más, en esta etapa se observa que en algunos axones mielinizados, la vaina de mielina presenta alteraciones manifestadas como deshilachamientos más marcados que en la etapa anterior, así como un grosor que no correspondía al diámetro del axón. Es en la etapa de *Parálisis* (Figura 20), en donde se presenta el mayor grado de alteración de la vaina de mielina, que además de observarse con un grosor aumentado, también muestra una mayor cantidad espacios dentro de esta vaina y en el citoplasma de las células de Schwann. En la etapa de *Recuperados* (Figura 21) se observa que el grosor de la vaina de mielina se hace mas regular en la circunferencia en los axones mielinizados, con zonas en donde ocurre remielinización y por otra parte persistiendo las alteraciones en cuanto a la electrodensidad en los axones amielínicos.

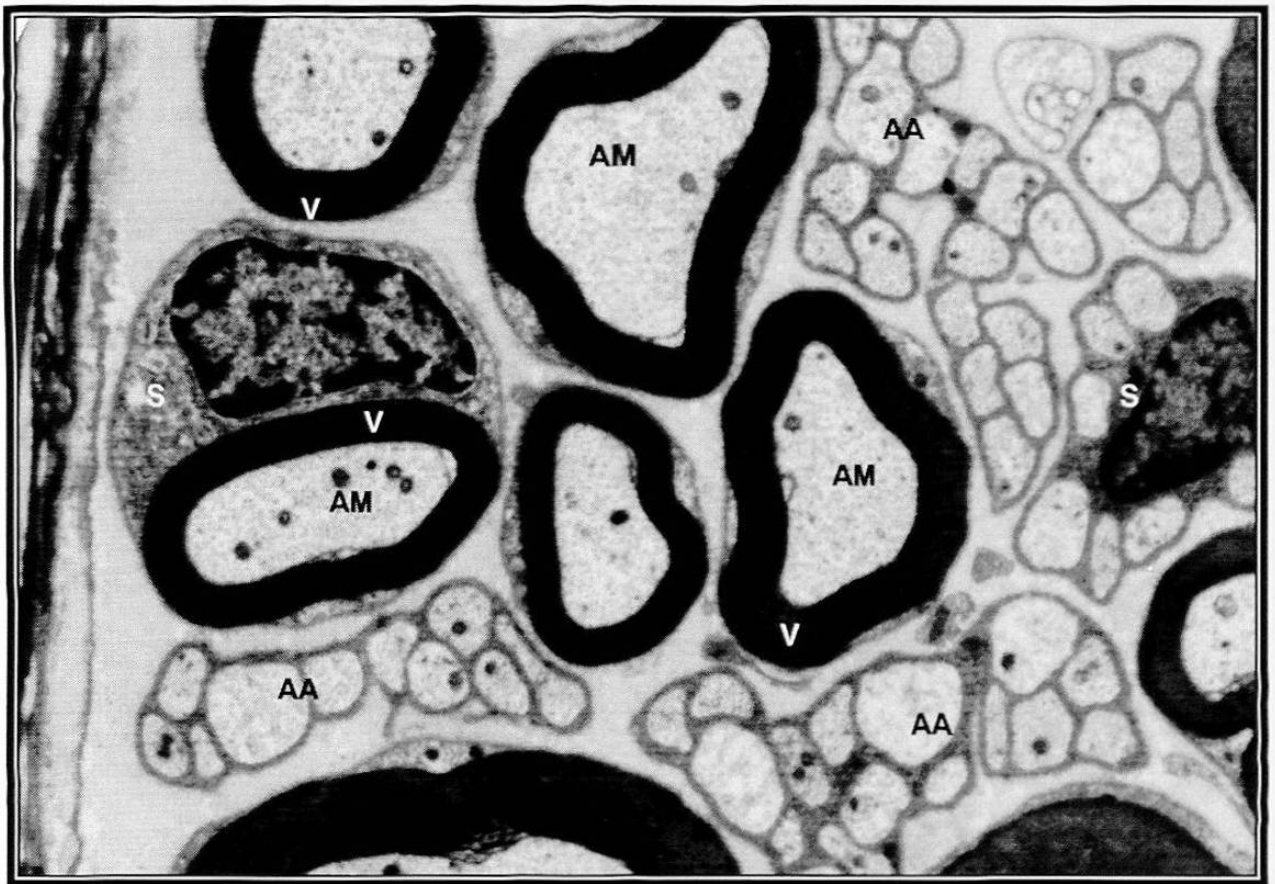


Figura 17. Nervio ciático de rata. **Etapa Control**. Se muestran tanto axones (AM) mielinizados envueltos por una vaina de mielina (V), así como varios grupos de axones amielínicos (AA) con una morfología semicircular y cubiertos por las células de Schwann (S) íntegras. Microscopía electrónica de transmisión. Inclusión en resinas epóxicas. Contrastado con acetato de uranilo y citrato de plomo. 3150x.



Figura 18. Nervio ciático de rata. **Etapa Sin Neuropatía**. Se muestran algunas alteraciones en los axones mielinizados (AM) como cambios en su morfología semicircular regular, además la vaina que los rodea presenta hinchamientos (\Rightarrow) y regiones deshilachadas (\rightarrow). Nótese en los grupos de axones amielínicos (AA) las variaciones de electrondensidad. \star : muestra vestigios del lugar que ocupaban gránulos de secreción de una célula cebada. Microscopía electrónica de transmisión. Inclusión en resinas epóxicas. Contrastado con acetato de uranilo y citrato de plomo. 2000X.



Figura 19. Nervio ciático de rata. **Etapa Paresia**. Se observa en los axones mielinizados (AM), zonas con una oclusión parcial (→), desprendimientos de membranas (⇨) en algunas regiones de la vaina de mielina. Además nótese los cambios de electrondensidad en los axones amielínicos (AA). Se muestra una estructura que al parecer representa un macrófago (M). Microscopía electrónica de transmisión. Inclusión en resinas epóxicas. Contrastado con acetato de uranilo y citrato de plomo. 2000X.



Figura 20. Nervio ciático de rata. **Etapa Parálisis**. Obsérvese los múltiples espacios (→) dentro del citoplasma de la célula de Schwann, engrosamiento de la vaina de mielina (◄), además desprendimientos de esta (⇒) así como alteraciones a manera de deshilachamiento (▷). Microscopía electrónica de transmisión. Inclusión en resinas epóxicas. Contrastado con acetato de uranilo y citrato de plomo. 2500X.



Figura 21. Nervio ciático de rata. **Etapa Recuperados**. Se observan axones mielinizados (AM) con diferentes electrondensidades, la vaina aun presenta alteraciones (\Rightarrow), así como vainas de un calibre muy delgado (∇); además nótese en los axones amielínicos (AA) los cambios de electrondensidad dentro de una misma célula de Schwann. Microscopía electrónica de transmisión. Inclusión en resinas epóxicas. Contrastado con acetato de uranilo y citrato de plomo. 3150X.

3.6.1. Descripción Ultraestructural de Células Asociadas al Nervio Ciático.

Al analizar los gránulos de secreción de las células cebadas a nivel ultraestructural, se observó que en las etapas *Control*, *Sin Neuropatía*, *Paresia* y *Recuperados*, presentaban una electrondensidad de baja a moderada (Figura 22 A); al hacer la comparación con las células cebadas de la etapa *Parálisis* (Figura 22 B) que es en donde los gránulos de estas células disminuyen su metacromasia, estos se observan con una electrondensidad mayor, un tamaño heterogéneo y al parecer agrupados en regiones dentro de las células cebadas. Por otra parte, observamos células mononucleares, al parecer linfocitos, que ya habían sido identificados por Salazar³¹ por medio de inmunohistoquímica como linfocitos T (Figura 23).

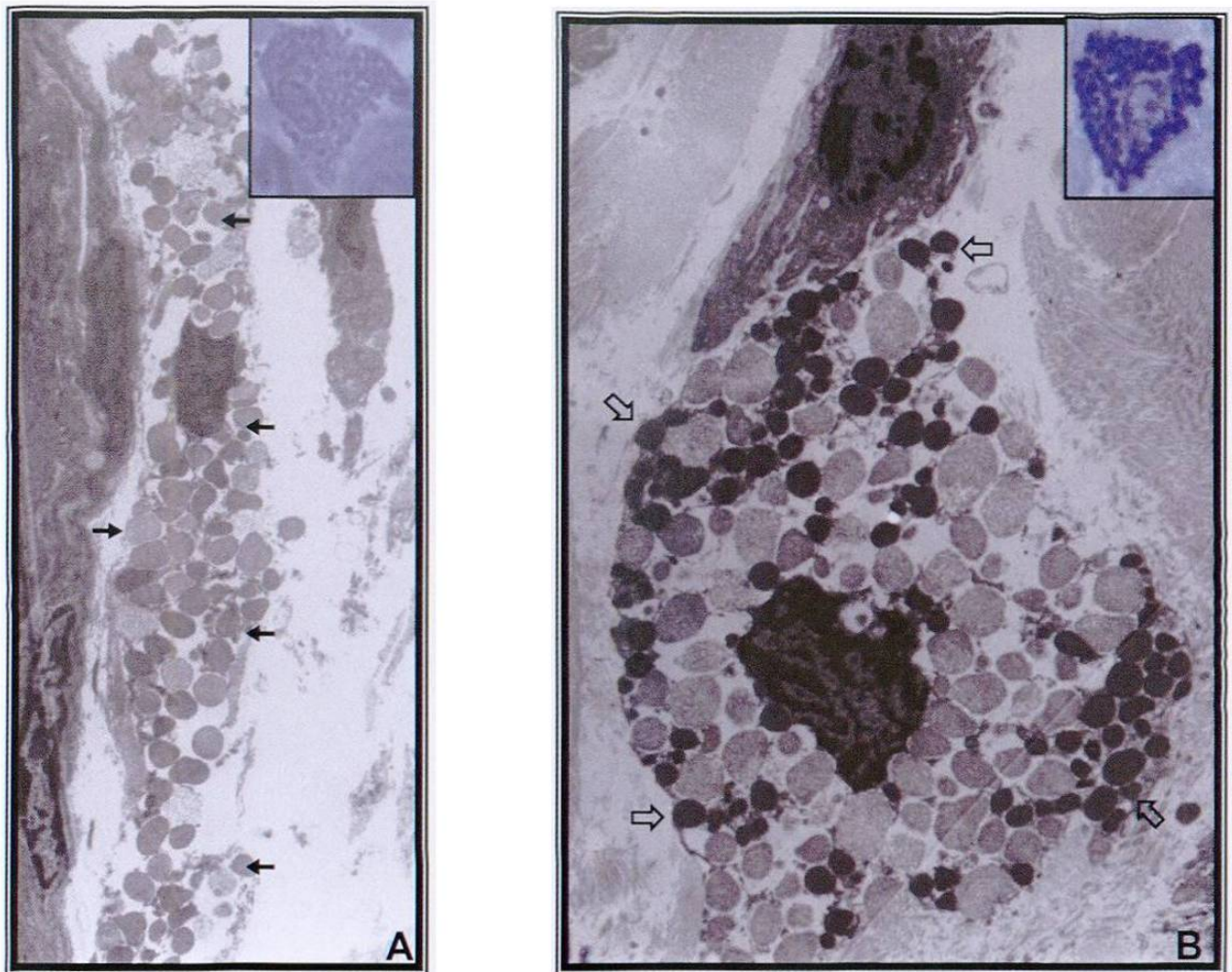


Figura 22. Nervio ciático de rata. **Células cebadas en diferentes etapas. A) Paresia:** se observa una célula cebada con gránulos metacromáticos (recuadro), que a nivel ultraestructural se observan los gránulos de un tamaño homogéneo con electrondensidad ligera y moderada (→). **B) Parálisis:** se observa una célula cebada con pérdida de la metacromasia en sus gránulos (recuadro), estos gránulos, tienen menor tamaño, pero con una electrondensidad mayor (⇨) y al parecer agrupados en ciertas regiones. Microscopía electrónica de transmisión. Inclusión en resinas epóxicas. Contrastado con acetato de uranilo y citrato de plomo. A: 2000X, B: 2500X, recuadros 100X.



Figura 23. Nervio ciático de rata. **Etapa Paresia**. Se observa una célula mononucleada con características morfológicas similares a un linfocito (⇨). Además, se puede observar una célula de Schwann (↑) conteniendo axones amielínicos con diferentes patrones de electrondensidad (➤). Microscopía electrónica de transmisión. Inclusión en resinas epóxicas. Contrastado con acetato de uranilo y citrato de plomo. 4000X.

CAPITULO 4

DISCUSIÓN

Las alteraciones en el sistema nervioso periférico han sido estudiadas extensivamente. Sin embargo, las interrogantes sobre cuales mediadores y/o células están involucradas o son responsables de los mecanismos de degeneración y regeneración después de una alteración aún son controversiales. Aún cuando se ha reportado ampliamente que los macrófagos y las células de Schwann juegan un papel importante en la degradación y remoción de la mielina⁴⁹, algunos datos han reportado la participación de las células cebadas durante la degeneración Walleriana, estos estudios realizados por Olsson et al.^{37,38} y Latker et al.³⁹ mencionan que, después de un insulto las células cebadas se acumulan y se desgranulan en el nervio periférico.

Así mismo, se ha reportado en otras investigaciones un aumento en la cantidad de células cebadas endoneurales en diferentes neuropatías y en enfermedades neurodegenerativas del SNC por ejemplo: la neuropatía diabética, esclerosis múltiple, el síndrome de Guillain-Barré, Alzheimer y degeneración Walleriana entre otras^{36-38,40}.

Mediante la tinción con AT en este estudio observamos, que las células cebadas se encuentran presentes en el nervio ciático como residentes normales, tanto íntegras como en proceso de desgranulación. Posterior a la intoxicación con el fruto de *K. humboldtiana*, su número aumenta y es en la etapa de *Paresia (Día 48)* donde se observa el primer incremento significativo, este permanece casi constante hasta la etapa de *Parálisis (Día 58)* y durante la etapa de recuperación la cantidad de estas células aumenta nuevamente. Cabe mencionar que durante cada una de las etapas se detectaron células cebadas con la misma morfología que la presentada en el grupo *Control (Día 0)*, es decir, tanto íntegras como desgranuladas o en proceso de desgranulación. Esta

tendencia de las células cebadas en el modelo animal, ya había sido reportada por Salazar³¹; de tal forma que este incremento podría ser explicado como una migración de las células cebadas hacia el área afectada, donde puede ser necesaria una participación activa de mediadores biológicos, proporcionados por los gránulos de este tipo celular.

Las células cebadas contienen en los gránulos de secreción, una gran cantidad de mediadores químicos preformados (primarios) almacenados en gránulos, al ser activadas las células mediante un estímulo adecuado, son capaces de liberarlos al micro ambiente. Entre los mediadores químicos primarios se encuentran: aminas vasoactivas (histamina, adrenalina, dopamina, serotonina), enzimas (arilsulfatasa, carboxipeptidasa A, quimasa, triptasa y fosfolipasa), factores de crecimiento (CSF, GM-CSF, β -FGF, NGF, BDNF), endorfinas, péptidos, factores quimiotácticos, cininas (bradicinina), factor liberador de corticotropina, somatostatina, sustancia P, proteoglicanos (heparina, condroitin sulfato, ácido hialurónico), etc. Además, son capaces de sintetizar *de novo* productos del ácido araquidónico como prostaglandinas y leucotrienos (LTB₄, FAP, PGD₂, PGE₂, LTC₄, NO), así como citocinas (IL1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 13, 16, INF- γ , MIF TNF- α)⁷⁰⁻⁷¹. 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 las células cebadas, por lo tanto se sugiere que son capaces de contribuir en el daño a la mielina⁷²⁻⁷⁵, sin embargo, no se puede descartar la participación de otros componentes.

La heparina (un mucopolisacárido), es conocida principalmente por su efecto anticoagulante, además, tiene otros efectos fisiológicos como agente anti-inflamatorio y estabilizador del factor de crecimiento neural (NGF). En forma general, en este trabajo detectamos esta molécula en cada una de las etapas, en las cuales se presentaban células con una positividad que iba de

media a baja (una a dos cruces). Llama la atención que en la etapa de *Paresia (Día 48)* donde detectamos la menor cantidad de células positivas comparadas con el resto de la etapas, posiblemente se deba a que previo a esta etapa o durante la misma, hay una desgranulación masiva y con ello una disminución en la cantidad de gránulos de secreción citoplasmáticos, lo que reduce la detección de mucopolisacáridos con esta técnica; además, es la etapa en donde los gránulos presentan una positividad muy marcada al PAS, lo que nos indica que existen células que durante esta etapa contienen una producción de gránulos con una concentración elevada principalmente de heparina. Estos hallazgos nos sugieren que puede existir una nueva producción de gránulos de heparina o que exista una liberación selectiva de gránulos, es decir que se liberen otros componentes y se conserven aquellos gránulos con contenido de heparina.

Así, esto puede estar de acuerdo con otras investigaciones que han 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 esencialmente para el desarrollo y mantenimiento de las células nerviosas del SNP y del SNC^{42,81,82}. Además se considera que el SNC 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.

La técnica combinada de AA/PAS, prácticamente reveló un comportamiento muy similar en cuanto a la positividad de los gránulos al reactivo de Schiff. Por otra parte, se detectaron algunas mucinas ácidas en los gránulos (positivas al AA), al inicio y al final de la neuropatía, que no se detectaron durante la etapa de *Paresia (Día 48)*; por lo tanto, podríamos mencionar que estas mucinas (condroitin sulfato, heparan sulfato y queratan sulfato entre otros), se encuentran normalmente en poca cantidad en los gránulos de células cebadas endoneurales y que al haber una alteración en el

SNP podrían ser liberados durante las etapas iniciales (por su efecto estabilizador del NGF y angiogénico) y regenerarlos posteriormente. Podría ser la razón por la cual no se detectaron estas moléculas durante la etapa de *Paresia (Día 48)* y como ya se mencionó, hubo una desgranulación de estas células.

De los mediadores sintetizados por las células cebadas, la histamina es capaz de alterar la permeabilidad de la barrera hemato-nerviosa, lo que favorece la vasodilatación y por lo tanto, la migración celular⁸². Esta molécula, así como también adrenalina, dopamina y serotonina (involucradas en la neuromodulación, angiogénesis y mitogénesis) con positividad al AA, las detectamos en todas las etapas excepto durante la *Paresia (Día 48)*, su efecto podría estar permitiendo por una parte, la migración de células cebadas hacia el nervio ciático y por otro lado regenerando algunas estructuras celulares. De igual manera, ésta desgranulación en las primeras etapas, podría ser la causa de que no se detectan durante la etapa de *Paresia* y sí durante las etapas de *Parálisis (Día 58)* y *Recuperación (Día 112)*, en donde posiblemente sean re-sintetizadas o, que células que migran en estas etapas contengan las moléculas en sus gránulos. Por otra parte, la heparina, que es detectada por medio de la Safranina reveló una mayor sensibilidad para esta molécula, comparada con el PAS y el AA/PAS, pero es de nuevo en la etapa de *Paresia (Día 48)* en donde se detecta la menor cantidad de células cebadas. Esto nos sugiere que existe un proceso de desgranulación masiva o posiblemente selectiva para ciertos gránulos y además, la existencia de células cebadas con subpoblaciones de gránulos, los cuales, pueden ser detectados en su totalidad o como moléculas específicas para cada etapa mediante las técnicas histoquímicas utilizadas en esta investigación.

En estudios previos se demostró que la lesión primaria en los nervios periféricos al administrar el fruto de la *Karwinskia humboldtiana* en cabras, en las que se ha observado un incremento del grosor de la vaina de mielina en las

fibras más afectadas²⁶⁻²⁸. Nuestros resultados concuerdan con lo descrito por Charlton²⁶⁻²⁸, ya que encontramos a nivel de microscopia de luz en cortes semifinos, una alteración del grosor de la vaina de mielina, esta alteración se hizo presente desde las primeras etapas de la neuropatía posteriores a la intoxicación y su incremento continuó hasta la etapa de *Parálisis (Día 58)*; es durante la etapa de *Recuperación (Día 112)* donde estas alteraciones empiezan a disminuir.

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 mamíferos⁵⁵. Trabajos recientes, empleando una tecnología más avanzada en microscopía, han demostrado que existe una comunicación funcional "directa" entre axones y células cebadas⁶². En nuestra investigación encontramos a nivel de microscopia electrónica de transmisión, una actividad constante entre células cebadas y nervio periférico, ya que al observar la ultraestructura de algunas de las células cebadas, confirmamos que los gránulos de secreción presentan diferencias de electrondensidad, que concuerdan con lo descrito para estas células en los cortes semifinos. Por otra parte, encontramos alteraciones en la vaina de mielina que se manifiesta como hinchazón y deshilachamiento de las membranas, estas alteraciones se hacían más visibles conforme se llegaba a la etapa de *Parálisis (Día 58)*, que daban la impresión de poder llegar a ocluir algunos axones involucrados en estas alteraciones, y que parecían revertirse en forma leve durante la etapa de *Recuperados (Día 112)*. Estas alteraciones concuerdan con lo reportado por Charlton²⁶⁻²⁸, así como también con los resultados obtenidos mediante los microscopía de luz en los cortes semifinos.

Las alteraciones histológicas en este modelo, son similares a las descritas en el humano y en otras especies animales. Aunque ya se había reportado la presencia de infiltrados celulares en otros tejidos como pulmón,

astas anteriores de la médula espinal y piel^{45,66-69}, adicionalmente al proceso de desmielinización y remielinización, también se observó la presencia de infiltrado celular del sistema inmune, incluyendo células cebadas, probables linfocitos y macrófagos, además de inmunoglobulinas anti-mielina³¹.

Por otra parte, existen reportes en la literatura sobre los efectos agudos de *Karwinskia humboldtiana* en ratas, que indican que el fruto de esta planta produce una contracción de la neurona, aumento del núcleo y muerte celular en hipocampo y núcleo caudado, así como aumento de los espacios de Virchow-Robin en la corteza motora⁸⁴. En esta investigación observamos mediante microscopía electrónica de transmisión, alteraciones manifestadas como cambios de electrondensidad y forma en los axones amielínicos (sensitivos), estos datos podrían relacionarse con el daño a nivel neuronal mencionados anteriormente, aún cuando los cambios reportados aquí se presentan en una intoxicación crónica, a diferencia de la descrita previamente que es una intoxicación aguda. Hasta la fecha, las investigaciones solo se habían enfocado en las alteraciones de los axones mielinizados (motores). Por lo tanto, estos hallazgos ultraestructurales reportados por primera vez en la presente investigación, nos sugieren que pudiera existir tanto a nivel de los ganglios raquídeos, como a nivel de médula espinal y encéfalo una alteración neuronal en este proceso neurodegenerativo.

CAPITULO 5

CONCLUSIONES

1. 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. humoldtiana*, durante las diferentes etapas de la polineuropatía. Esto sugiere la participación activa de estas células en el proceso de desmielinización y mielinización del nervio ciático.

2. 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.

PERSPECTIVAS

En el mismo modelo animal:

1. Evaluar la presencia de cambios en sistema nervioso central (médula espinal y encéfalo) mediante técnicas especiales para estos tejidos.

2. Identificar por medio de inmunocitoquímica los patrones de moléculas presentes en los gránulos de células cebadas, en cada una de las etapas descritas en el modelo animal.

3. Buscar el mecanismo mediante el cual las células cebadas activan o inhiben la liberación de sus gránulos durante la degeneración y regeneración en este modelo animal.

4. Extrapolar las bases de esta investigación para la comprensión de este y otros tipos de neuropatías, y así tratar de obtener un posible tratamiento que sea viable para revertir estos procesos patológicos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Harrison. (1982) Medicina interna 5ª Edición. Ediciones Científicas La Prensa Médica Mexicana S.A. México 2147-2150.
2. Robbins. (1984) Patología Estructural y Funcional. 2ª Edición. Nueva Editorial Interamericana México D.F. 1420-1424.
3. Garbay, B.; Heape, A.M.; Sargueil, F.; Cassagne, C. (2000) Myelin Synthesis in the peripheral nervous system. Prog Neurobiol 61(3): 267-304.
4. Geneser, F. (2000) Histología. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 327-353.
5. Stevens, A.; Lowe, J. (1998) Histología Humana. 2ª Edición. Editorial Harcourt Brace. Madrid, España. 82-97.
6. Morell, P.; Toews, A.D. (1996) Schwann cells as targets for neurotoxicants. Neurotoxicology. 17(3-4): 685-695.
7. Diccionario de Terminologías de Ciencias Médicas. (1999) 13ª Ed. Editorial Masson S.A. Barcelona, España.
8. El Manual Merck de Diagnóstico y Terapéutica. (1986) 7ª Ed. Nueva Editorial Interamericana S.A. de C.V. México, D.F. 1265-1274.
9. Stein, J.H. Internal Medicine 2ª Ed. (1987) Little, Brown and Company Inc. Boston/Toronto. pp 2231-2236.
10. Del Pozo, E.C. (1965) Los efectos paralizantes de la "tullidora", estudios clínicos y experimentales. Gaceta Médica de México. 95:179-182.
11. Escobar, A., Nieto, D. (1965) Aspectos neuropatológicos de la intoxicación con *Karwinskia humboldtiana*. Estudio experimental. Gac. Med. Mex. 95: 163-177.
12. Puértolas, M.M.; Nava, J.o.; Medina, L.H.; López, O.F.; Oyervides, P.J. (1984). Polirradiculoneuritis por *Karwinskia humboldtiana*. Informe de seis casos. Rev. Med. IMSS. (Mex). 22: 22-27
13. Bermúdez, M.V.; Lozano Meléndez, F.E.; Salazar Leal, M.E.; Waksman, N.; y Piñeyro, A. (1995) Intoxicación de una familia con *Karwinskia humboldtiana* (tullidora). Gac. Méd. Mex. 131:100-106.

14. Fernández R. Waksman N. Una especie nueva de *Karwinskia* (Rhamnaceae) de Tehuacan, Puebla, México. *Phytologia* 1992; 73: 435-438.
15. Fernández-Nava, R. (1992) Nombres comunes, usos y distribución geográfica del género *Karwinskia* (Rhamnaceae) de México. *Anales Inst. Biol. Univ. Nacional Autónoma, México. Ser. Bot.*; 63: 1-23.
16. Fernández-Nava, R. (1998) Tres especies nuevas de *Karwinskia* (Rhamnaceae) de México. *Acta Bot Mex*; 21: 11:22.
17. Padrón, F. (1951) Estudio clínico experimental de la parálisis por *Karwinskia humboldtiana* "tullidora" en niños. *Gaceta Médica de México*. 81: 299-311.
18. Rivas, V.; Torres, R.; Waksman, N. (1990) Dimeric anthracenones from *Karwinskia* species. *J. Med. Plant. Res.* 56: 562-564.
19. Clavijero, F.J. (1982) Historia de la antigua Baja California. Tercera edición. México, D.F.: Edit. Porrúa, S.A.
20. Castillo-Nájera, F. (1920) Contribución al estudio de las parálisis tóxicas. Un caso de envenenamiento colectivo por tullidora. En *Memorias del Quinto Congreso Médico Mexicano* (Puebla, 1918); vol. 1, 240-244.
21. Segovia, A.P. y Fernando, Z.P. (1972) Polirradiculoneuritis tóxica por *Karwinskia humboldtiana*. *Bol. Med. Hosp. Infant.* Vol XXIX. 1: 89-90.
22. Bustamante, S.; Olvera, R. y Correa, N. (1978) Intoxicación fatal por tullidora (*Karwinskia humboldtiana*). *Gaceta médica de México*. Vol.114: 241-244.
23. Mitchell, R.O., Weller, H., Evans, I., Arai and Daves, G.D. (1978) Buckthorn neuropathy: Effects of intraneural injection of *Karwinskia humboldtiana* toxins. *Neuropathology and applied neurobiology*. 4: 85-97.
24. Muñoz, M.E. and Chavez, B. (1979) Conduction block and functional denervation caused by tullidora (*Karwinskia humboldtiana*). *Experimental neurology*. 65: 255-270.
25. Bermúdez, M.V.; González-Spencer, D.; Guerrero, M.; Waksman, N.; and Piñeyro, A. (1986) Experimental intoxication with fruit and purified toxins of buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*). *Toxicon*. 24: 1091-1097.

26. Charlton, K.M. and Pierce, K.R. (1970) A neuropathy in goats caused by experimental coyotillo (*Karwinskia humboldtiana*) poisoning. IV. Light and electron microscopic lesions in peripheral nerves. *J. Path. Vet.* 7: 420-434.
27. Charlton, K.M. and Pierce, K.R.: (1969) A neuropathy in experimental collotillo poisoning in goats. *Texas Rep. Biol. Med.* 27: 389-399.
28. Charlton, K.M. and Pierce, K.R.: (1970) A neuropathy in goats caused by experimental collotillo (*Karwinskia humboldtiana*) poisoning. II. Lesions in the peripheral nervous system-teased fiber and acid phosphatase studies. *Path. vet.* 7: 385-407.
29. Muñoz, M.; Julio, E. (1979). Disfunción temprana de los propioceptores musculares en gatos intoxicados con tullidora (*Karwinskia humboldtiana*). *Memorias del XXVII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas.* p.p. 107.
30. Kazuko, A. and Muñoz, M.E. (1981). Quantitative changes in myelin proteins in a peripheral neuropathy caused by tullidora (*Karwinskia humboldtiana*). *Journal of Neurochemistry* VERIFICAR EL JOURNAL
31. Salazar, L.M.; Bermúdez, M.V.; Flores, G.M. y Sepúlveda, S.J. (2003). Búsqueda de componentes del sistema inmune en un modelo de polineuropatía en ratas con el fruto de la *Karwinskia humboldtiana* por vía oral. Tesis de doctorado. Depto. Farmacología. Facultad de Medicina, U.A.N.L.
32. Chiu, H. and Lagunoff, D. (1972). Histochemical comparison of vertebrate mast cell. *Histochem. J.* 4: 135-144.
33. Galli, S. J. (1990). Biology of disease. New insights into "the riddle of the mast cells": micro environmental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity. *Lab. Invest.* 62: 5-33.
34. Ehrlich, P. (1878). Beitrage zur kenntnis der anilinfarben und ihrer verwendung in der mikroskopischen technik. *Archiv für Mikroskopische Anatomie (Bonn)* 13: 263. En *Collected papers of Paul Ehrlich.* Ed. Por Himmelweit, F.; Pergamon Press, London & New York, 1956 pp 114-116.
35. Schwartz, L.B. (1994). Mast cells: function and contents. *Curr. Opin. Immunol.* 6: 91-97.

36. Bienestock, J.; MacQueen, G.; Sestini, P.; Marshall, J.S.; Stead, R.H.; Perdue, M.H.; (1991) Am. Rev. Respir. Dis. 143 (3 pt 2): S55-58.
37. Olsson, Y. (1968). Mast cell in the nervous sistem. Int. Rev. Cytol. 24: 27-70.
38. Olsson, Y; Sjotrand, J. (1969). Proliferación of mast cell in periphereal nerves during Wallerian degeneración: a radioautographic study. Acta Neurophatol. 13: 11-122.
39. Latker, C.H.; Wadhvani, K.C.; Balbo, A.; Rapoport, S.I. (1991) Blood-nervebarrier in the frog during Wallerian degeneración: are axons necessary for maintenance of barrier function?. J. Comp. Neurol. 309: 650-664.
40. Esposito, B.; De Santis, A.; Monteforte, R.; and Chieffi, B. G. (2002). Mast cell in Wallerian degeneration: Morphologic and ultrastructural changes. The journal of comparative neurology. 445: 199-210.
41. Cuitly, C. (1890) Breve estudio sobre el capulincillo de Querétaro. (Tesis de 1887). El Estudio. Vol. 3, Monografias pp.123-130
42. Leon, A.; Buriani, A.; Dal Toso, R.; Fabris, M.;Romanello, S.; Aloe, L. and Levi-Montalcini, R. (1994). Mast cells synthesize, store, and release nerve growth factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 3739-3743.
43. Sosa, S. E. (1890) Tullidora o capulincillo. El Estudio, 2: 35-37.
44. Rivero, M.D. (1948) Contribución al conocimiento de las propiedades farmacodinámicas de la "tullidora" *K. humboldtiana* (Roem y Schl). Zucc., Medicina, 28: 1-16.
45. Padrón, F. y Velázquez, T. (1956) Patología experimental y clínica de la parálisis por *Karwinskia humboldtiana*. Rev. Mex. de Pediatría. 25: 225-237.
46. Kiefer, R.; Kieseier, B.C.; Stoll, G.; Hartung, H. (2001). The role of macrophages in inmuno-mediated damage to the periphereal nervous sistem. Prog. Neurobiol. 64: 109-127.
47. Dreyer, D.L, Arai, I.; Bachman, C.D.; Anderson, W.R.; Jr., Smith, R.G. and Daves G.D.(1975) Jr. Toxins causing noninflamatory paralytic neuropathy. Isolation and structure elucidation. J. Am. Chem. Soc. 97: 4895-4990.
48. SAS Institute, Inc. 1988. Sas user guide: Statistics, 6TH Ed. SAS Institute, Inc., Caray N.Y. USA.

49. Raposo, G.; Tenza, D.; Mecheri, S; Peronet, R.; Bonnerot, C. and Desaymard, C. (1997). Accumulation of major histocompatibility complex class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation. *Mol. Biol. Cell.* 8: 2631-2645.
50. Vincent-Schneider, H.; Théry, C.; Mazzeo, D.; Tenza, D.; Rapozo, G. and Bennerot, C. (2001). Secretory granules of mast cells accumulate mature and immature MHC class II molecules. *J. Cell. Sci.* 114: 329-334.
51. Paulis, A.; Minopoli, G.; Arbustini, E.; de Crescenzo, G.; Dal Piaz, F.; Pucci, P.; Russo, T and Marone, G. (1999). Stem cell factor is localized in, released from, and cleaved by human mast cells. *J. Immunol.* 163: 2799-2808.
52. Paulis, A.; Minopoli, G.; Dal Piaz, F.; Pucci, P.; Russo, T and Marone, G. (1999). Novel autocrine and paracrine loops of the stem cell factor / chimase network. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 118: 422-425
53. Dvorak, A.M. and Morgan, E.S. (2000). Ultrastructuralcytochemical, immunocytochemical and in situ hybridization methods with polyuridine probes detect mRNA I human mast cell granules. *Histochem. J.* 32: 423-438.
54. Dvorak, A.M. and Morgan, E.S.; Lichtenstein, L.M.; Weller, P.F. And Schleimer, R.P. (2000). RNA is closely associated with human mast cell secretory granules suggesting a role (s) for granules in synthetic processes. *J. Histochem. Cytochem.* 48: 1-12.
55. Arizono, N.; Matsuda, S.; Hattori, T.; Kojima, Y.; Maeda, T. and Galli, S. (1990). Anatomical variation in mast cell nerve associations in the rat small intestine, hert, lung, and skin. *Lab. Invest.* 62: 626-634.
56. Blennerhassett, M.G.; Tomioka, M. and Bienenstock, J. (1999). Formation of contacts between mast cells and sympathetic neurons in vitro. *Cell Tissue Res.* 256: 121-128.
57. Chapman, G.B. (1999). Occurrence of mast cells within bundles of myelinated and unmyelinated nerves in the rat tongue. *Anat. Rec.* 256: 347-353.

58. Ceivellato, E.; Damián, D.; Mallardi, F. and Travan, L. (1991). Suggestive evidence for a microanatomical relationship between mast cells and nerve fibres containing Substance P, Calcitonin Gene Related Peptide, Vasoactive Intestinal Polypeptide, and Somatostatin in the rat mesentery. *Acta Anat.* 141: 127-131.
59. Keith, I.M.; Jin, J. and Saban, R. (1995). Nerve-Mast cell interaction in normal guinea pig urinary bladder. *J. Comp. Neurol.* 363: 28-36.
60. Matsuda, H.; Kawakita, K.; Kiso, Y.; Nakano, T. and Kitamura, Y. (1989). Substance P induces granulocyte infiltration through degranulation of mast cells. *J. Immunol.* 142: 927-931.
61. Newson, B.; Dahlström, A.; Enerbäck, L. and Ahlman, H. (1983). Suggestive evidence for a direct innervation of mucosal mast cells: An electron microscopic study. *Neuroscience.* 10: 565-570.
62. Ohshiro, H.; Suzuki, R.; Furuno, T. and Nakanishi, M. (2000). Atomic force microscopy to study direct neurite-mast cell (RBL) communication in vitro. *J. Immunol. Lett.* 74: 211-214.
63. Stead, R.H.; Tomioka, M.; Quinonez, G.; Simon, T.; Felten, S.Y. and Bienenstock, J. (1987). Intestinal mucosal mast cells in normal and nematode-infected rat intestines are in intimate contact with peptidergic nerves. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 84: 2975-2979.
64. Stead, R.H.; Dixon, M.F.; Bramwell, N.H.; Riddell, R.H. and Bienenstock, J. (1989). Mast cells are closely apposed to nerves in the human gastrointestinal mucosa. *Gastroenterology.* 97: 575-585.
65. Williams, R.M.; Berthoud, H.R. and Stead, R.H. (1997). Vagalaferent nerve fibres contact mast cells in rat small intestinal mucosa. *Neuroimmunomodulation.* 4: 266-270.
66. Bermúdez, M.V.; (1989). Toxicidad aguda de la *Karwinskia humboldtiana* en diferentes especies animales. Disertación doctoral. U.A.N.L. Monterrey, N.L.

67. Sepúlveda, S.J.; González, C.B.; Tamez, R.V.; Bermúdez, M.V.; Piñeyro, L.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.
68. Ballesteros, E. R. (2000). Factor de necrosis tumoral α y granulocitos neutrofilos en la producción del síndrome de insuficiencia respiratoria del adulto causado por peroxisomicina A-1. Disertación doctoral. U.A.N.L. Monterrey, N.L. México.
69. Tamez, R.V. (2001). Estudios de la toxicidad dérmica de la T-514 (Peroxisomicina A-1) aislada del género *Karwinskia* en conejos de Nueva Zelanda. Disertación doctoral. U.A.N.L. Monterrey, N.L. México.
70. Theoharides, T.C. (2002). Mast cells and stress. A psychoneuroimmunological perspective. *J. Clin. Psychopharmacol.* 22 (2) : 103-108.
71. Marshall, J.S. ; Gomi, K. ; Blenneshasset, M.G. ; Bienestock, J. (1999). Nerve growth factor modifies the expression of inflammatory cytokines by mast cells via a prostanoid-dependent mechanism. *J. Immunol.* 162: 4271-4276.
72. Brosnan, C.F. (1985). Quantitation of mast cells in experimental allergic neuritis. *J. Neurophatol. Exp. Neurol.* 44 (2): 196-203.
73. Dines, K.C.; Powell, H.C. (1997). Mast cells interactions with nervous system: Relationship to mechanism of disease. *J. Neurophatol. Exp. Neurol.* 56 (6): 627-640.
74. Johnson, D.; Seeldrayers, P.A.; Weiner, H.L. (1988). 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.
75. Kalichman, M.W.; Powell, H.C.; Calcutt, N.A.; Mizisin, A.P. (1995). Mast cell degranulation and blood-nerve barrier permeability in rat sciatic nerve after 7 days of hyperglycemia. *A. J. Physiol.* 268(2): 740-748.

76. Aarli, J.A. (2003). Role of cytokines in neurological disorders. *Curr. Med. Chem.* 10(19): 1931-1937.
77. Johnson, D.; Yasui, D.B.; Seeldrayers, P. (1991). 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. Neurophatol. Exp. Neurol.* 50(3): 227-234.
78. Krishnaswamy, G.; Kelly, J.; Johnson, D.; Youngberg, G.; Stone, W.; Huang, s.; Bieber, J.; Chi, D. (2001). The human mast cell: functions in physiology and disease. *Front Biosci.* 6:D1109-1127.
79. Gómez, S.M. (2000). 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.
80. Garza, O.L.;Zanatta, C.M.; Acosta, D.; Torres, A.O.; Piñeyro, L.A. (2003). Production of reactive oxygen species by toxin T-514 of genus *Karwinskia* *in vitro*. *Toxicology in vitro.* 17: 19-25.
81. Otten, U.; Scully, J.L.; Ehrhard, P.B.; Gadiant, R.A. (1994). Neurotrophins: signals between the nervous and immune sustems. *Prog. Brain Res.* 103: 293-305.
82. Purcell, W.M.; Atterwill, C.K. (1994). Mast cells in neuroimmune function: neurotoxic and neuropharmacological perspectives. *Neurochem. Res.* 20(5): 521-532.
83. Sobue, G. (1990). The role of Schwann cells in periphereal nerve degeneration and regeneration NGF-NGF receptor system. *Rinsho Shinkeigaku.* 30(12): 1358-1360.

APÉNDICE

A. Preparación del fijador glutaraldehído al 2.5%.

1. 90 mL de buffer de cacodilatos al 0.1 M y a pH de 7.2-7.4 (Apéndice B).
2. Agregar 10 mL de glutaraldehído al 25%.
3. Mezclar vigorosamente.
4. Se almacena a 4°C en un frasco de vidrio ámbar.

B. Preparación de buffer de cacodilatos.

Solución A.

1. 200 mL de agua ultrapura.
2. Agregar 8.56 g de cacodilato de sodio y mezclar.

Solución B.

1. 25 mL de agua ultrapura.
2. Agregar 0.5 mL de ácido clorhídrico.

Preparación del buffer.

Se utilizan os 200 mL de la **solución A** y se le adicionan 10.8 mL de la **solución B**, se afora a 400 mL con agua ultrapura y se ajusta el pH a 7.4 con hidróxido de sodio.

C. Preparación de resinas epóxicas (consistencia suave).

Mezclar cuidadosamente lo siguiente:

- | | |
|-----------|---------|
| 1. Resina | 22.2 g. |
| 2. DDSA | 21.5 g. |
| 3. NMA | 6.90 g. |
| 4. DMP30 | 1.00 g. |

D. Técnica de inclusión en resinas epóxicas.

1. Obtener fragmentos de nervio ciático y colocarlo en solución fijadora.
2. Sumergir en solución fijadora de Karnovsky-Ito (Apéndice A) por 1-1.5 horas a temperatura ambiente.
3. Lavar en buffer de cacodilatos al 0.1 M por 5 minutos, 3 veces.
4. Postfijar en tetraóxido de osmio al 2% por 30 minutos.
5. Lavar en buffer de cacodilatos al 0.1 M por 5 minutos, 3 veces.
6. Contrastar con nitrato de uranilo acuoso al 1% por 30 minutos.
7. Lavar en buffer de cacodilatos al 0.1 M por 5 minutos, 3 veces.
8. Deshidratar en acetona al 30, 50, 70, 90 y 100% tres veces por 5 minutos cada vez.
9. Preincluir en acetona-epon 1:1 por 12-18 horas.
10. Dejar evaporar bajo campana de extracción hasta que la resina se vuelva más viscosa (aproximadamente 5 horas).
11. Incluir en epon puro (Apéndice D) por 1 hora.
12. Colocar las muestras en moldes y polimerizar a 60 °C por 12-72 horas.

E. Preparación de paraformaldehído al 4%.

1. Pesar 20 g de paraformaldehído.
2. Adicionar a 450 mL de agua destilada.
3. Calentar a 60°C por 30 minutos.
4. Adicionar 50 mL de PBS 10X.
5. Ajustar pH a 7.2
6. Aforar a un volumen de 500 mL.

F. Técnica de inclusión en parafina.

1. Obtener fragmentos de nervio ciático y colocarlo en paraformaldehído al 4% (Apéndice E) por 2 horas.
2. Lavar en agua corriente.
3. Deshidratar en alcoholes graduales

Alcohol etílico al 60%	60 minutos
Alcohol etílico al 70%	60 minutos
Alcohol etílico al 80%	60 minutos
Alcohol etílico al 96%	60 minutos
Alcohol etílico al 96%	60 minutos
Alcohol etílico absoluto	60 minutos
Alcohol etílico absoluto	60 minutos
4. Colocar los fragmentos en alcohol etílico-xilol 1:1 por 60 minutos.
5. Colocar los fragmentos en xilol 60 minutos dos veces.
6. Preincluir los fragmentos en parafina líquida a 60°C.
7. Inclusión definitiva de los fragmentos con parafina y dejar solidificar.

G. Desparafinado de laminillas.

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

H. Técnica de tinción con azul de toluidina.

Reactivos:

Buffer Wallpole pH 4.2:
 Ácido acético 0.01 M 37.5 mL
 Acetato de sodio 0.01 M 12.5 mL

Solución de trabajo:

Isopropanol 50 mL
 Buffer Walpole pH 4.2 50 mL
 Azul de toluidina 1 g

Ajustar pH a 4.2

Procedimiento:

1. Desparafinar las laminillas (Apéndice G).
2. Colocar las laminillas en la solución de trabajo durante 30 min. a 37°C.
3. Escurrir las laminillas y eliminar lo más posible el colorante.
4. Colocar las laminillas en isopropanol absoluto durante 1 minuto.
5. Deshidratar y montar las laminillas (Apéndice L).

I. Técnica de tinción con ácido per-iódico de Schiff (PAS).

Reactivos:

Reactivo de Schiff (Sigma).

Hematoxilina de Gill:

Solución de ácido periódico al 5%:

Ácido periódico (cristales) 0.5 g
 Agua destilada 50 mL

Agua destilada 730 mL
 Etilenglico 250 mL
 Hematoxilina anhidra 2.0 g
 Yodato de sodio 0.2 g
 Sulfato de amonio 17.6 g
 Ácido acético glacial 2.0 mL

Solución enjuagadota sulfurosa:

Agua destilada 300 mL
 Ácido clorhídrico 1N 15 mL
 Metabisulfito de Na 10% 18 mL

Alcohol ácido:

Alcohol 70° 99 mL
 HCl concentrado 1.0 mL

Agua amoniacal:

Agua destilada 99 mL
 Hidróxido de amonio 1.0 mL

Procedimiento:

1. Desparafinar las laminillas (Apéndice G).
2. Colocar las laminillas en solución acuosa de ácido periódico por 7.5 min. aproximadamente.
3. Enjuagar con agua destilada varias veces.
4. Colocar las laminillas en el reactivo de Schiff de 13-15 minutos.
5. Diferenciar en solución enjuagadota: dos cambios de 2 minutos cada uno.
6. Lavar en agua corriente 3-5 minutos.
7. Enjuagar en agua destilada.
8. Contrastar con hematoxilina de Gill de 1-2 minutos.
9. Lavar en agua corriente.
10. Decolorar en alcohol ácido y posteriormente lavar en agua destilada.
11. Virar con agua amoniaca y lavar en agua corriente y enseguida con agua destilada.
12. Deshidratar y montar las laminillas (Apéndice L).

J. Técnica de tinción con azul alciano / PAS.

Reactivos:

Azul alciano al 1%:

Azul alciano	1 g
Ácido acético al 3%	3 mL
Agua destilada	100 mL

Hematoxilina de Gill:

Agua destilada	730 mL
Etilenglicol	250 mL
Hematoxilina anhidra	2.0 g
Yodato de sodio	0.2 g
Sulfato de amonio	17.6 g
Ácido acético glacial	2.0 mL

Reactivo de Schiff (Sigma).

Procedimiento:

1. Desparafinar las laminillas (Apéndice G).
2. Colocarlas en azul alciano por 5 minutos.
3. Lavar en agua corriente y enseguida en agua destilada.
4. Colocar las laminillas en el reactivo de Schiff por 15 minutos.

5. Lavar en agua corriente de 5-10 minutos.
6. Teñir ligeramente los núcleos con hematoxilina de Gill por 1 minuto.
7. Lavar en agua destilada.
8. Deshidratar y montar las laminillas (Apéndice L).

K. Técnica de tinción con azul alciano / safranina.

Reactivo:

<i>Buffer de acetatos pH 1.42:</i>		<i>Solución de trabajo:</i>	
Ácido clorhídrico 1N	60 mL	Azul alciano	900 mg
Acetato de sodio 1M	50 mL	Safranina	45 mg
Agua destilada	140 mL	Sulfato de amonio férrico	1.2 g
		Buffer de acetatos	250 mL

Procedimiento:

1. Desparafinar las laminillas (Apéndice G).
2. Colocar las laminillas en la solución de trabajo por 15 minutos.
3. Lavar en agua corriente.
4. Deshidratar y montar las laminillas (Apéndice L).

L. Deshidratación y montaje de laminillas.

1. Realizar aproximadamente 20 inmersiones rápidas de las laminillas ya teñidas en etanol 96°.
2. Realizar el mismo procedimiento en etanol absoluto.
3. Realizar el mismo procedimiento en xilol-etanol.
4. Transferir las laminillas a xilol.
5. Añadir una gota de entellan sobre la muestra en la laminilla y colocar un cubreobjetos, procurando no dejar burbujas entre el corte.

M. Contrastación de cortes semifinos.

Reactivos:

Azul de toluidina:

Borato de sodio 5 g
 Agua ultrapura 100 mL
 Calentar hasta disolver
 Azul de toluidina 1g

Disolver y filtrar.

Procedimiento:

1. Colocar los cortes de aproximadamente 300 nm obtenidos por ultramicrotomía sobre un portaobjetos.
2. Pegar los cortes al portaobjetos usando una placa caliente.
3. Colocar una gota de azul de toluidina sobre los cortes y dejarlos sobre la placa caliente por 1 min aproximadamente.
4. Lavar cuidadosamente la laminilla con agua ultrapura.
5. Secar suavemente el portaobjetos con una gasa.

N. Contrastación de cortes finos.

Reactivos:

Acetato de uranilo al 5%:

Acetato de uranilo 0.5 g
 Alcohol etílico 50% 10 mL

Citrato de plomo al 0.04%:

Citrato de plomo 0.04 g
 Agua ultrapura 10 mL
 NaOH 3 gotas

Procedimiento:

1. Colocar los cortes de aproximadamente 70 nm obtenidos por ultramicrotomía sobre una rejilla de cobre.
2. Colocar las rejillas sobre una gota de acetato de uranilo por 5 min con la cara que contiene los cortes hacia la gota en una caja de Petri.
3. Lavar cada rejilla sobre una gota de agua ultrapura por 1 min y dejar secar.

4. Colocar cada rejilla sobre una gota de citrato de plomo por 5 min.
5. Lavar cada rejilla sobre una gota de agua ultrapura por 1 min y dejar secar sobre papel filtro en una caja de Petri cerrada y etiquetada.



