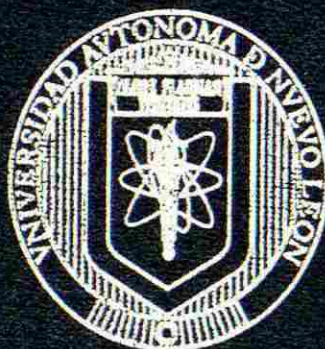


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



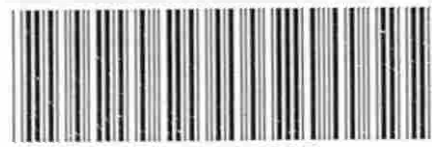
**CAMBIOS HISTOQUIMICOS Y ULTRAESTRUCTURALES DEL
NERVIO CIATICO DE LA RATA CON INTOXICACION
CRONICA CON FRUTO MOLIDO DE *Karwinskia humboldtiana*
POR VIA ORAL**

POR

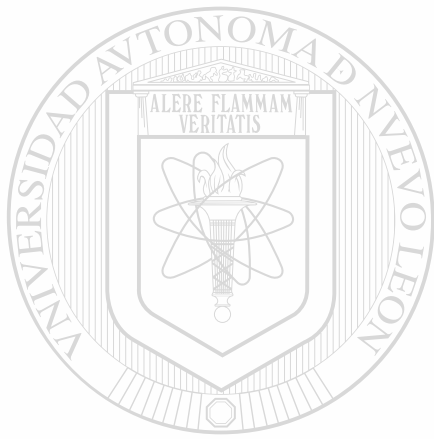
Q.F.B. EDUARDO MENDELEEV BECERRA VERDIN

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

Agosto 2005



1080127597



UANL

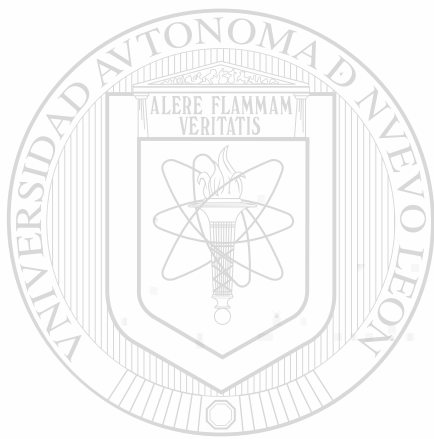
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

UNIVERSITY OF NEW LEÓN



UANE

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

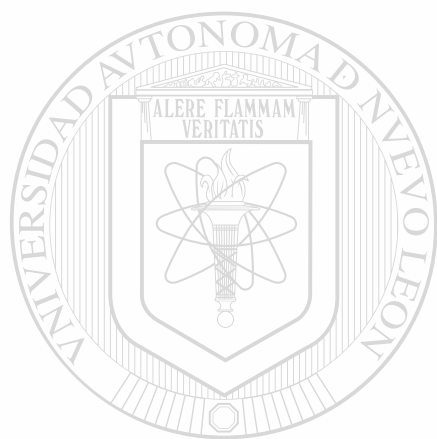
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
MORFOLOGÍA

Año 2023





UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

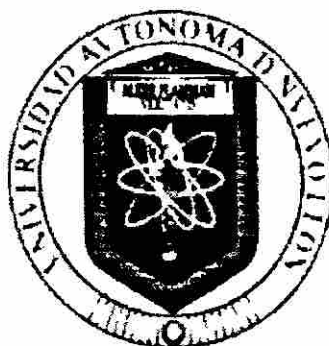
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



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**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

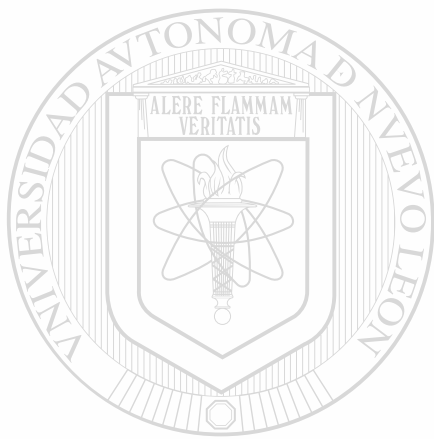
TM

QP981

.K37

B43

2005



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAMBIOS HISTOQUÍMICOS Y ULTRAESTRUCTURALES DEL NERVIPO 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

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



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

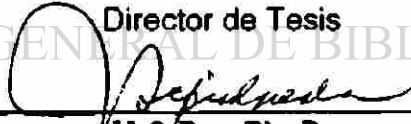
Este trabajo se realizó en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Bajo la dirección del Dr. Julio Sepúlveda Saavedra y la co-dirección de la Dra. Raquel Guadalupe Ballesteros Elizondo y la Dra. María Victoria Bermúdez Barba.

FIRMAS


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
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.

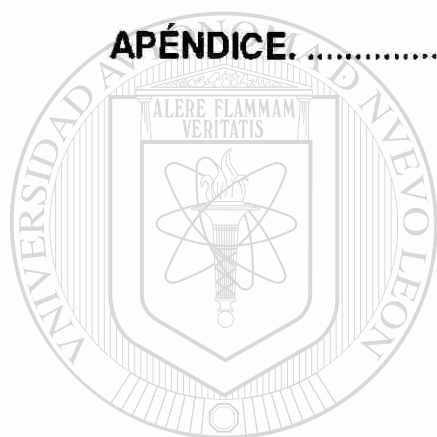
GRACIAS

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



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE FIGURAS

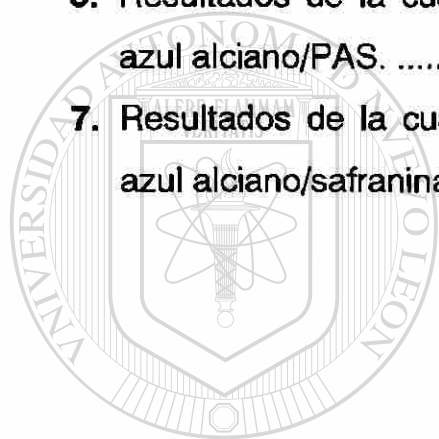
FIGURA

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



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE GRÁFICAS

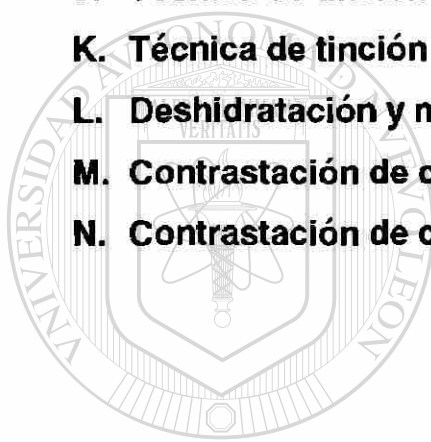
GRÁFICA

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

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



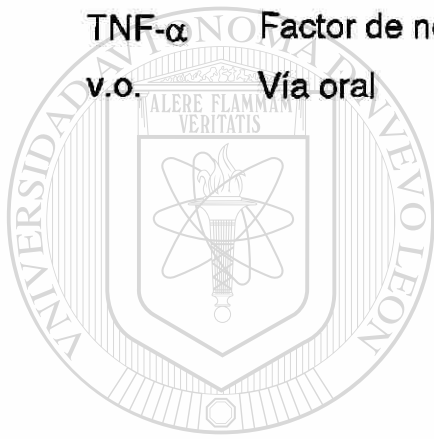
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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>
<hr/>	
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



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN

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

Título

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

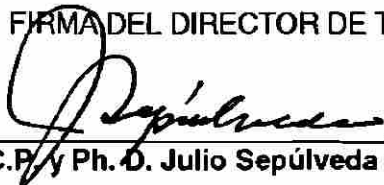
Área de estudio: Morfología

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).

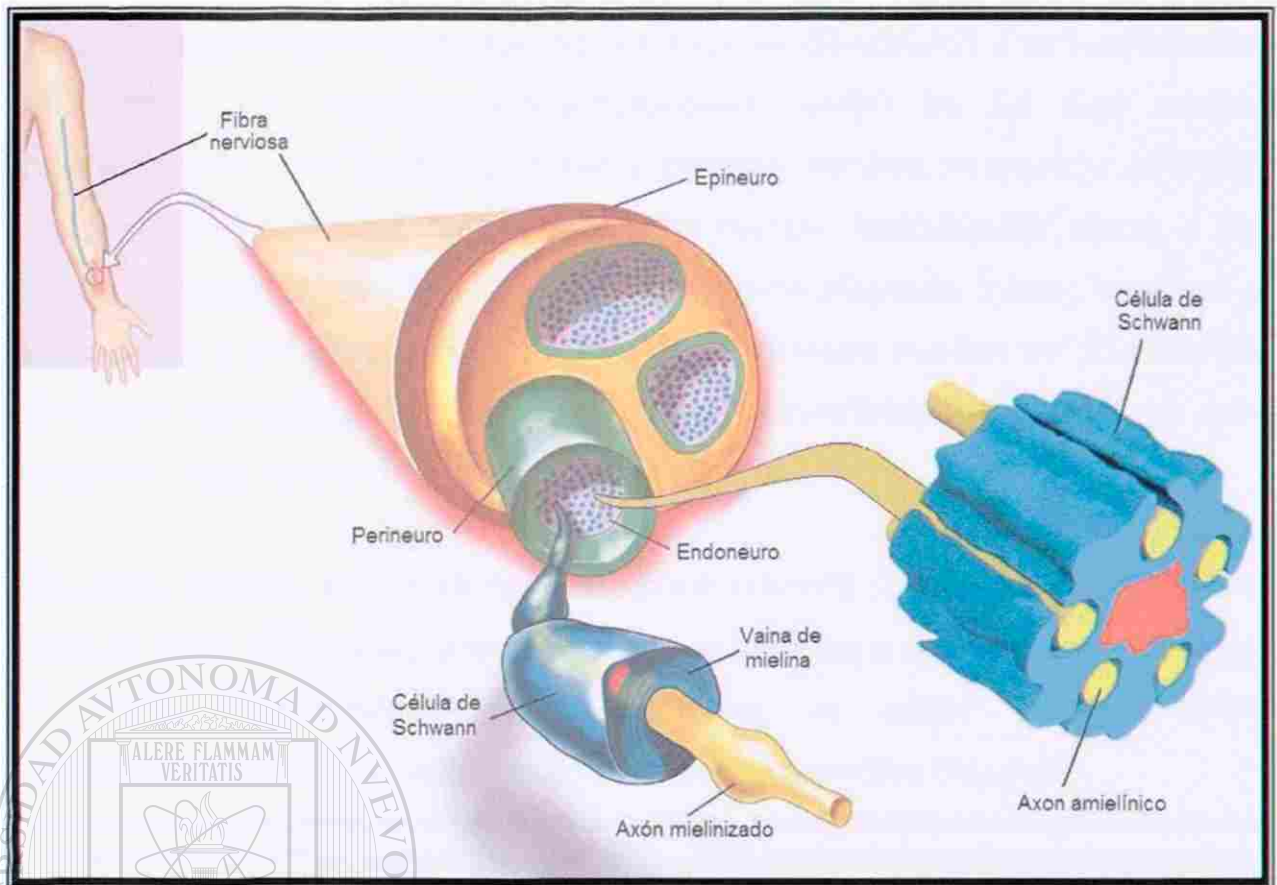


Figura 1. Esquema que muestra la morfología de los axones mielinizados y amielínicos.

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).

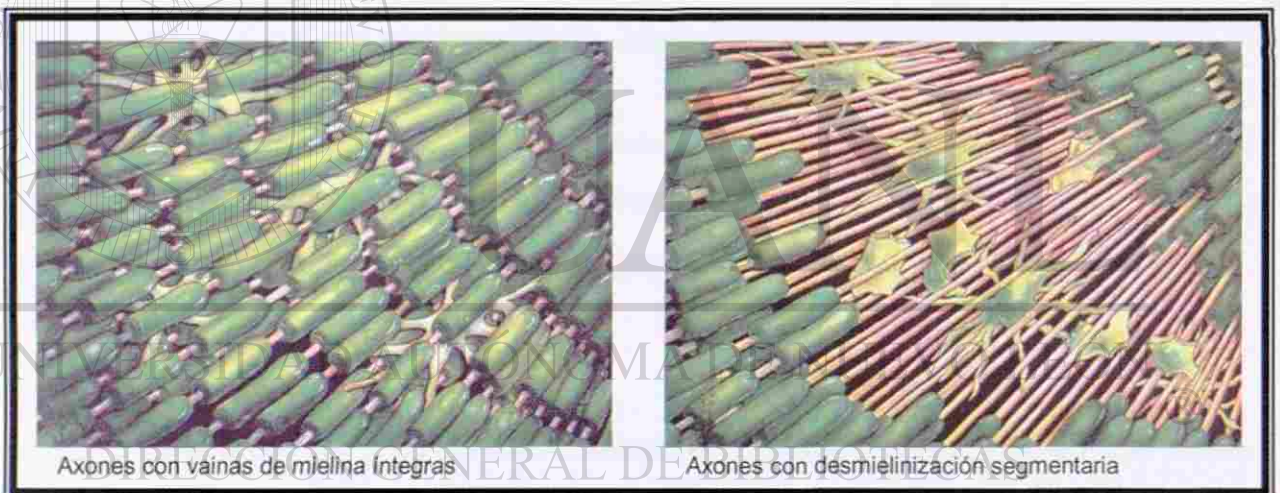


Figura 2. Esquema que muestra la apariencia de una fibra nerviosa íntegra (izquierda) y una con desmielinización segmentaria (derecha).

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

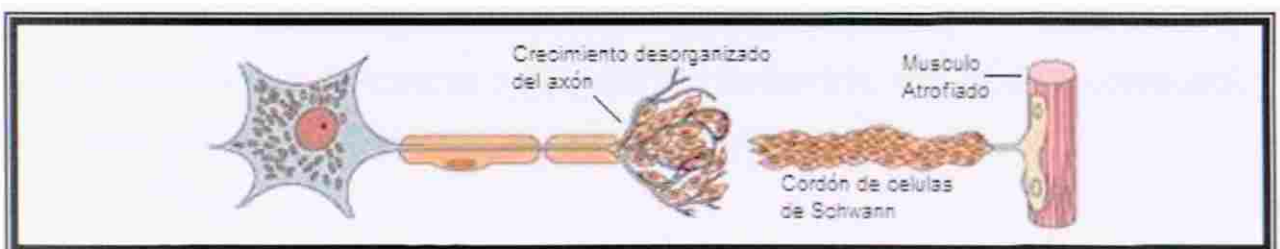


Figura 3. Esquema que muestra la degeneración axonal retrógrada

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).

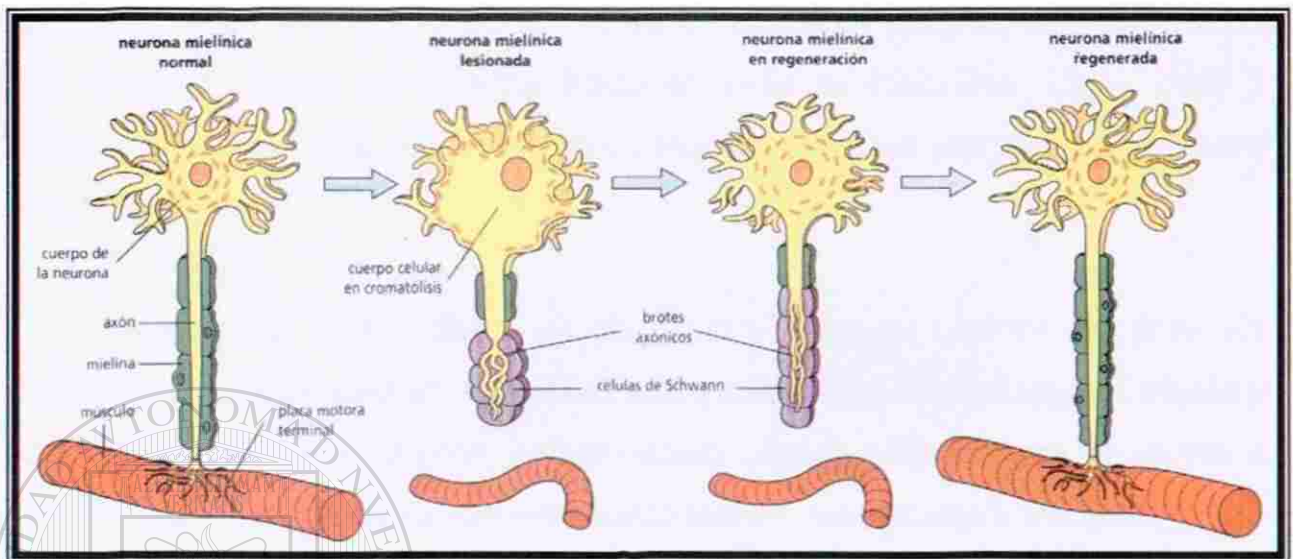


Figura 4. Esquema que muestra el proceso de degeneración y regeneración Walleriana.

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 Guillain-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 poliomielitis, 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).

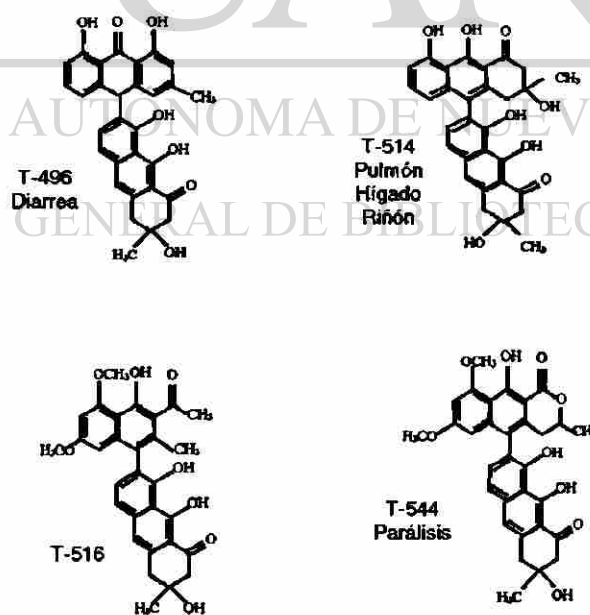


Figura 6. Estructuras químicas de las diferentes toxinas extraídas del fruto de *Karwinskia humboldtiana*, su efecto y/u órgano en que causa alteraciones.

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

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

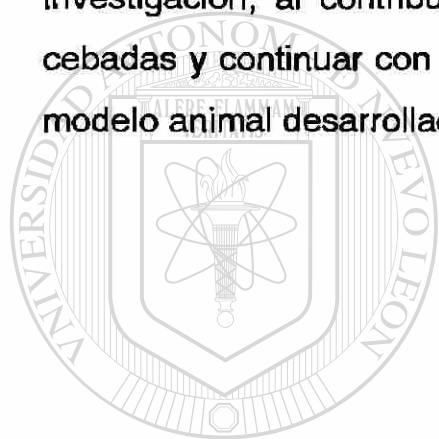
1.5. Experimentos en Neuropatías por otras Causas.

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.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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 milli-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).

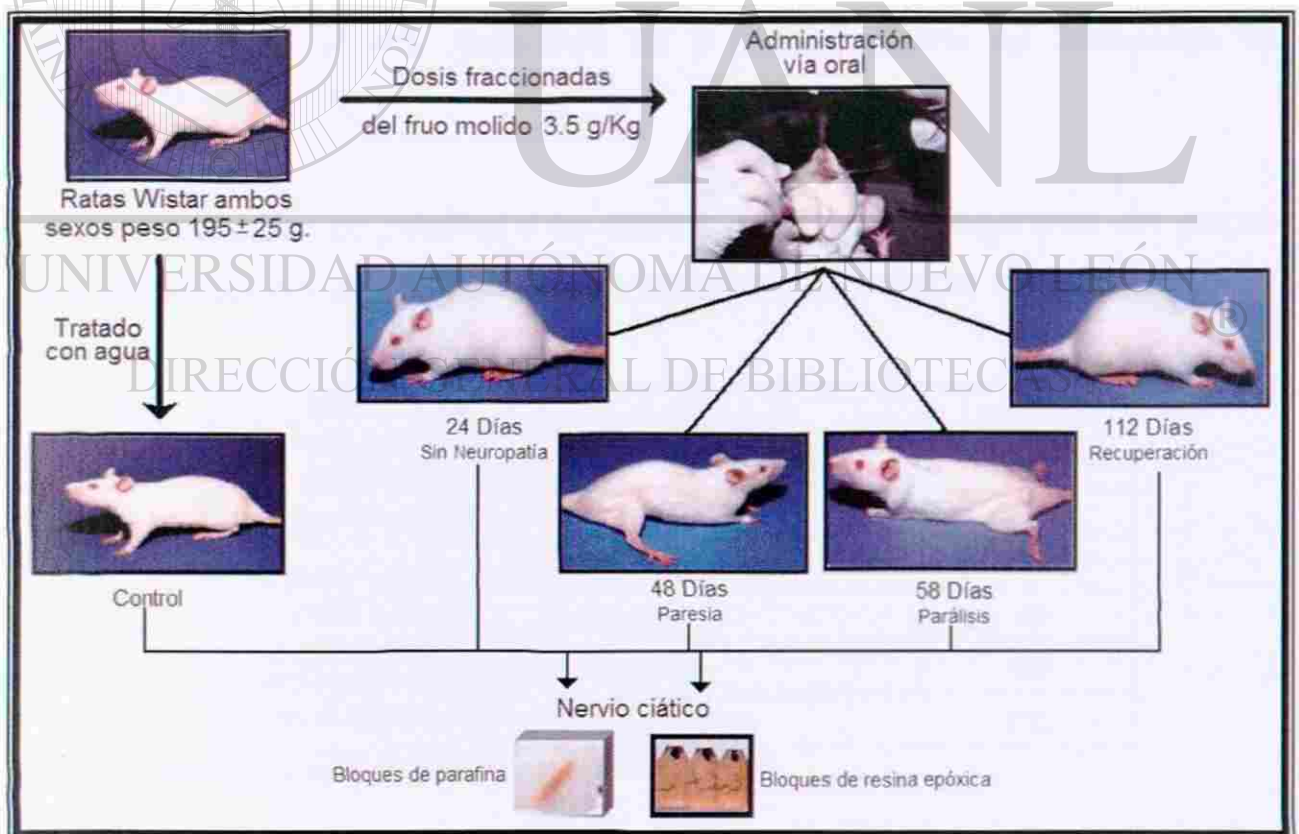


Figura 7. Desarrollo del modelo animal realizado por Salazar³¹.

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 secretorios, 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.

C) Variable CC/mm² con contenido de mucinas ácidas o neutras: para la evaluación de esta variable se utilizó la técnica histoquímica de **azul alciano/PAS (AA/PAS)**, la cual es una técnica que combina por una parte el azul anciano que detecta mucinas ácidas como el condroitin sulfato (A, B, C), heparan sulfato, queratan sulfato, entre otros y por otra parte utiliza la técnica de PAS para detectar las mucinas neutras como hexosaminas asociadas con grupo de hexosas libres (Apéndice J).

D) Variable CC/mm² jóvenes o maduras: para la evaluación de esta variable se utilizó la técnica histoquímica de **azul alciano/safranina (AA/S)**, con esta técnica histoquímica (Apéndice K) se pueden identificar aminas biogénicas como adrenalina, dopamina, histamina y serotonina, además de heparina en los gránulos de células cebadas, también es capaz diferenciar entre los gránulos maduros (viejos, CC en color azul) de los que aun se encuentran en este proceso (jóvenes, CC en color rojo).

Enseguida, las laminillas con los cortes de nervio ciático teñidas histoquímicamente con cada tratamiento fueron deshidratadas, montadas con resina sintética (Apéndice L) y observadas bajo un microscopio de luz de campo claro a un aumento de 100X.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2.6.2. Muestras en Resinas Epóxicas.

Los cortes semifinos y finos obtenidos de los bloques de resinas epóxicas se utilizaron para su observación a microscopía de luz y microscopía electrónica de transmisión respectivamente, las cuales fueron variables de observación que no fueron sometidas a ningún análisis estadístico, pero sí se utilizaron para describir la morfología del nervio ciático en el modelo animal.

Los cortes semifinos fueron contrastados con azul de toluidina (Apéndice M), en estos se describieron las características morfológicas del nervio ciático, para su estudio comparativo entre las ratas *Control* (día 0) y con las etapas: *Sin Neuropatía* (24 días), *Paresia* (48 días), *Parálisis* (58 días) y *Recuperados* (112 días)

Los cortes finos se contrastaron con sales de metales pesados como se indica en el Apéndice N y posteriormente se utilizaron para analizar las características ultraestructurales de los axones, vaina de mielina, células de Schwann y elementos celulares asociados al nervio ciático, de ratas *Control* y de cada una de las etapas desarrolladas en el modelo animal.

2.7. Análisis Estadístico.

Una vez obtenidos los datos experimentales se desarrollo el análisis de varianza para la estimación de parámetros y/o prueba de hipótesis; así como la prueba de comparaciones múltiples según el procedimiento Tukey ($\alpha = 0.05$), analizados mediante el paquete estadístico SAS⁴⁸.

CAPITULO 3

RESULTADOS

3.1. Análisis Morfológico Mediante Microscopía de Luz.

3.1.1. Análisis con Azul de Toluidina (AT).

Todos los resultados obtenidos de la población de las células cebadas, a partir del análisis de cortes de nervios ciáticos incluidos en parafina, de todos los tiempos y condiciones experimentales, fueron comparados con los resultados obtenidos en el *Control*. Al analizar las células cebadas con la tinción de AT, no encontramos patrones distintivos de estas células en cuanto a su morfología, es decir, observamos tanto células íntegras, bien delimitadas, con gránulos de secreción metacromáticos (Figura 8 A,D), así como también células en proceso de desgranulación o desgranuladas por completo (Figura 8 B,C) en cada una de las etapas desarrolladas en el modelo animal.

3.1.2. Análisis con Ácido Per-lódico de Schiff (PAS).

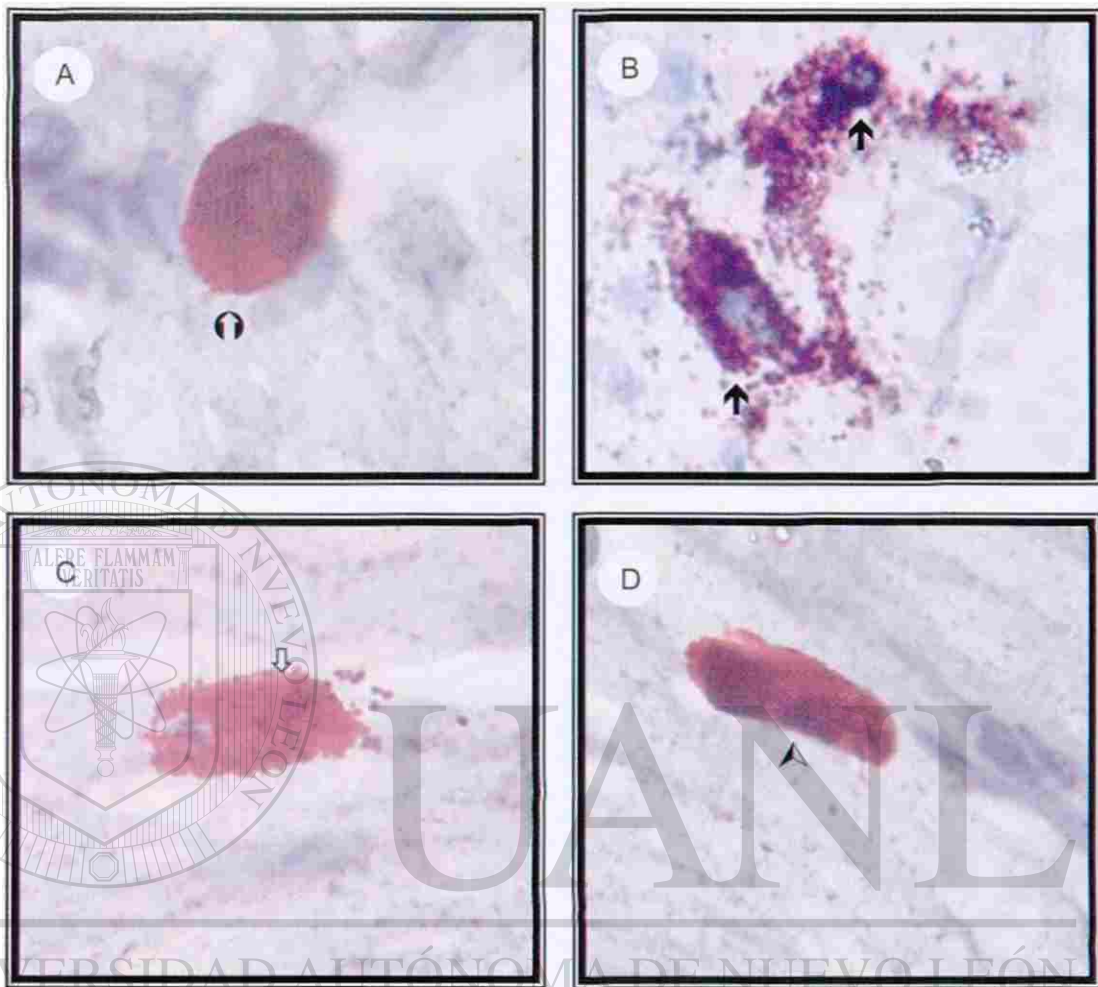
La tinción de PAS nos mostró la presencia de mucopolisacáridos, específicamente heparina y solo reveló células cebadas con una morfología íntegra; aún cuando la positividad estuvo presente en cada una de las etapas desarrolladas en el modelo animal (Figura 9 A,C,D), existió una diferencia de tinción clara durante la etapa de *Paresia* (Figura 9 B) en donde se presentaba la mayor positividad comparada con el resto de las etapas y al parecer un menor tamaño de estas células.

3.1.3. Análisis con Azul Alciano/PAS (AA/PAS).

Al identificar en los gránulos de secreción de células cebadas mucinas ácidas y neutras con la combinación de AA/PAS, se observaron solo células íntegras, con positividad ligera al PAS (Figura 10 C) o células con gránulos positivos para ambas tinciones (Figura 10 A,D), esta característica de tinción fue observada durante las etapas *Control*, *Sin Neuropatía*, *Parálisis* y *Recuperados*. Durante la etapa de *Paresia* (Figura 10 B) se observaron únicamente células cebadas negativas al AA y con una positividad al PAS muy marcada, incluso mayor a la presentada en el resto de las etapas.

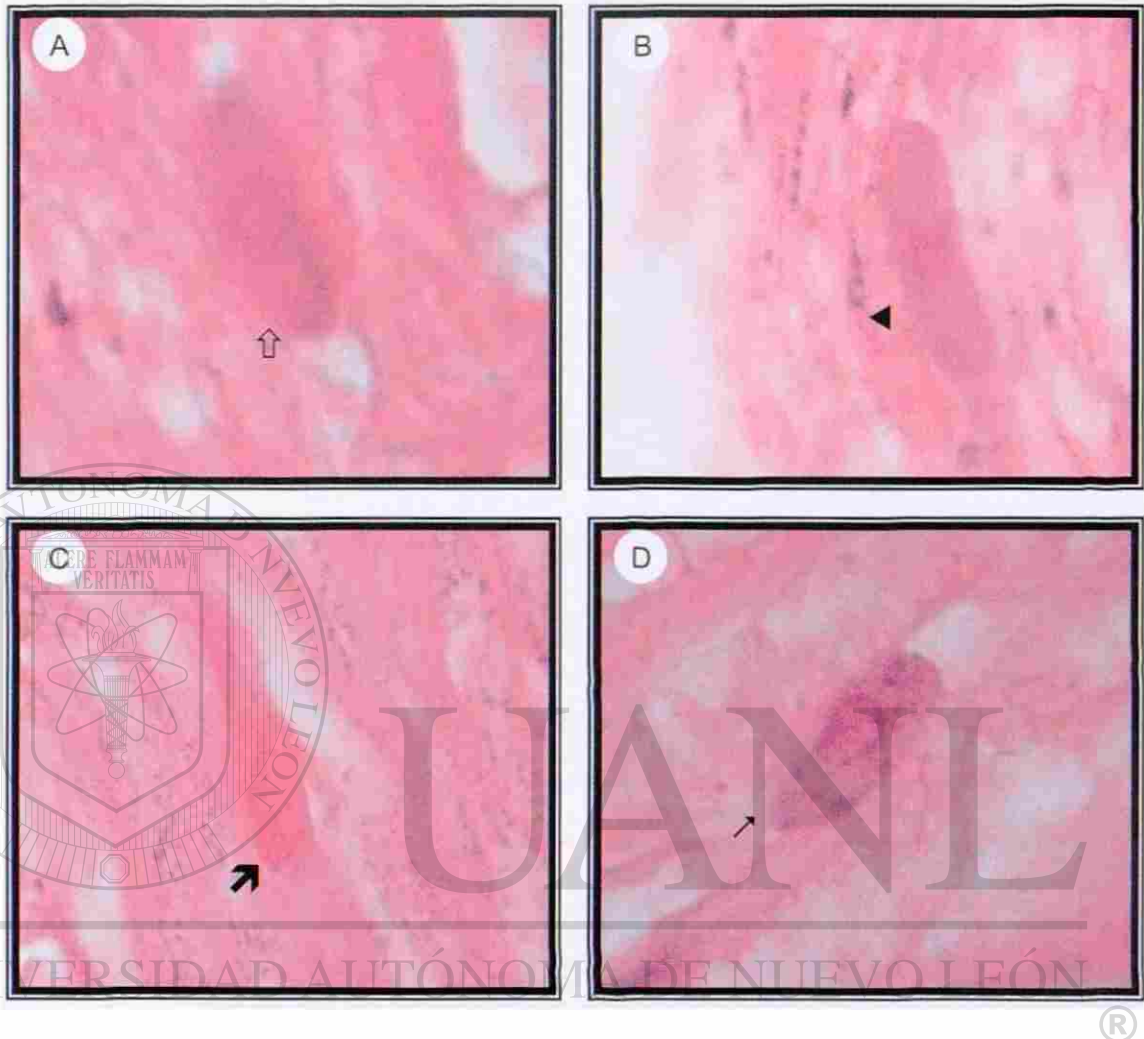
3.1.4. Análisis con Azul Alciano/Safranina (AA/S).

Al utilizar la combinación de AA/S, se facilitó la identificación de aminas biogénicas y heparina respectivamente en los gránulos de las células cebadas, en las etapas *Control*, *Sin Neuropatía*, *Parálisis* y *Recuperados*, en las cuales se observaron células íntegras que van desde ovals hasta alargadas, bien delineadas, en las que se pueden distinguir diferentes patrones histoquímicos en sus gránulos, por ejemplo se presentan gránulos (Figura 11 A,B) con positividad para ambos colorantes pero con diferentes patrones de organización intracitoplasmática; también se observaron células cebadas que únicamente contenían gránulos positivos a la safranina (Figura 10 C). La diferencia se presenta durante la etapa de *Paresia* (Figura 10 D), en donde las células cebadas se observan con una morfología poliédrica y que dan la apariencia de un menor contenido citoplasmático comparado con las anteriores fotomicrografías y es en esta etapa en donde solo se observaron células con positividad a la safranina.



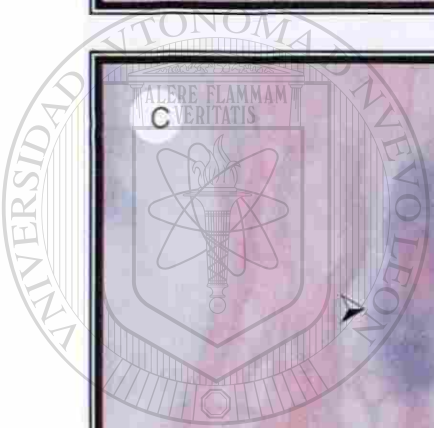
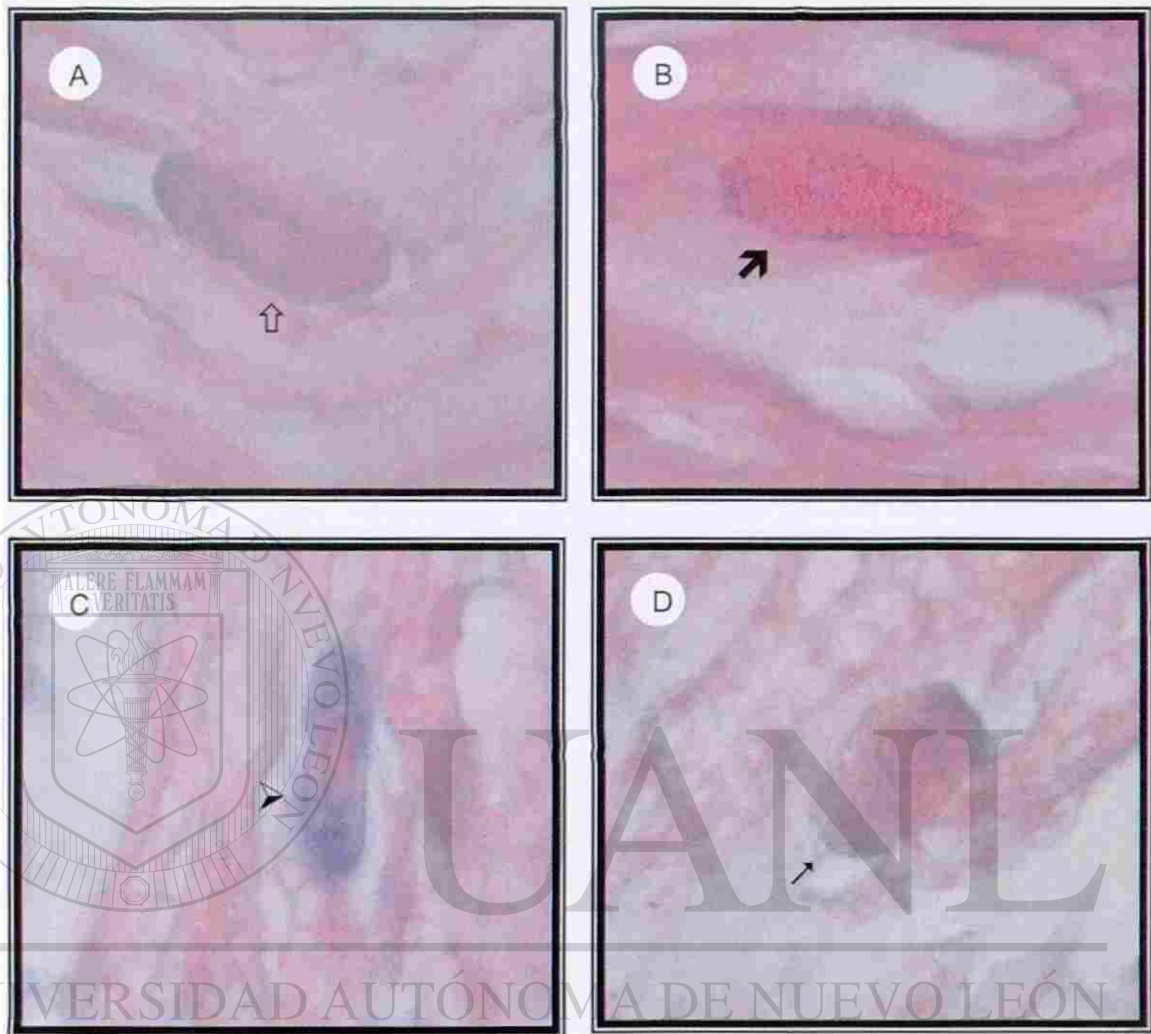
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figura 8. Nervio ciático de rata. Se muestran células cebadas de la etapa *Control*, en **A)** una célula íntegra, bien delimitada y de forma redonda (○); y en **B)** dos células desgranuladas por completo a manera de estallamiento (↑). **C)** Célula en etapa de *Paresia* iniciando el proceso de desgranulación (⇩). **D)** Célula en etapa de *Recuperados* íntegra y de forma ovalada (↑). Fotomicrografía de luz. Inclusión en parafina. Tinción con AT. 1000X.



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

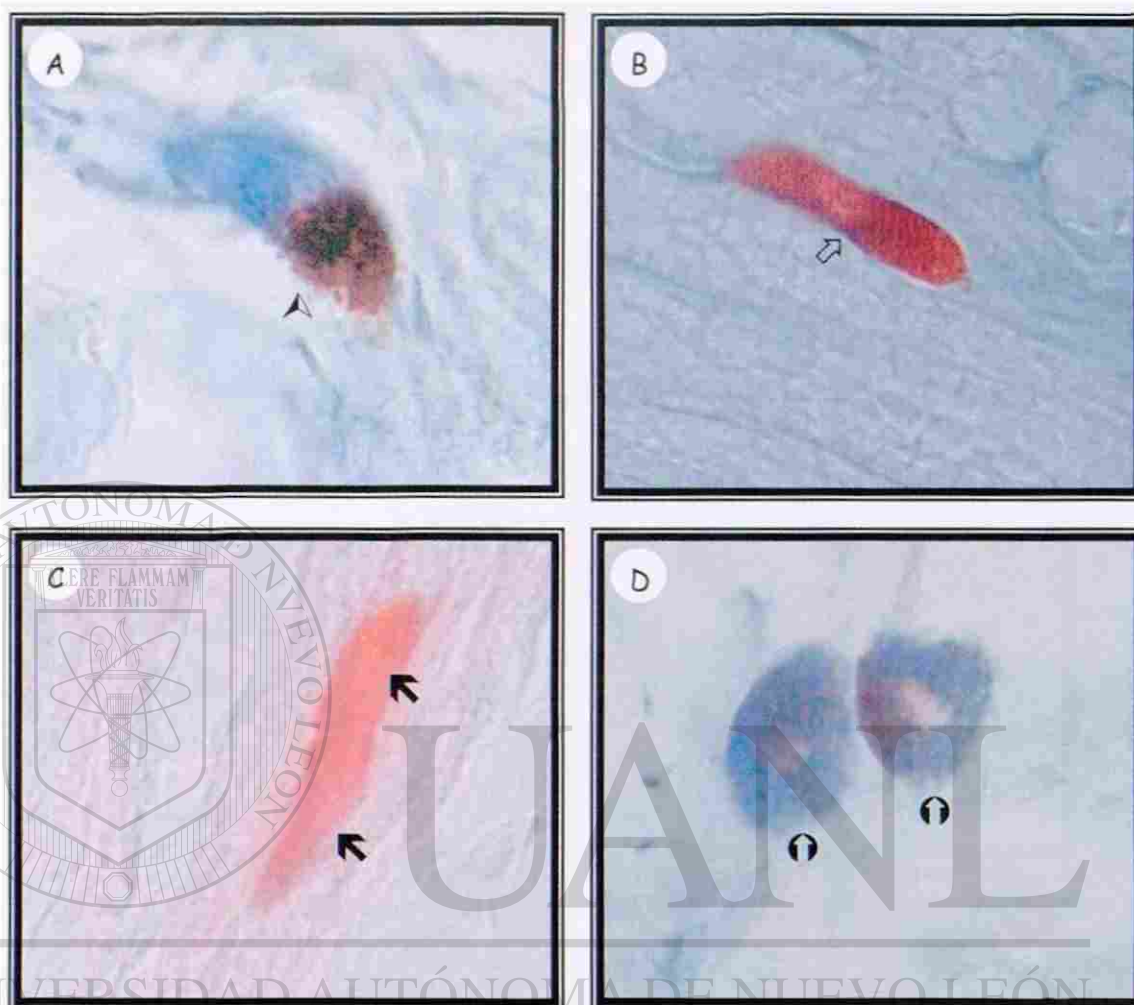
Figura 9. Nervio ciático de rata. A) Control: se observa una célula cebada (↑) íntegra, ovalada ligeramente positiva (+). **B) Sin Neuropatía:** célula cebada (◄) íntegra, ovalada con positividad regular(++). **C) Paresia:** célula cebada (↗) de morfología poliédrica con una elevada positividad (+++), así como una aparente disminución de volumen. **D) Parálisis:** célula cebada (↖) íntegra, ovalada ligeramente positiva (+). Fotomicrografía de luz. Inclusión en parafina. Tinción con PAS. 1000X.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figura 10. Nervio ciático de rata. **A) Control:** se observa una célula cebada íntegra (↑) con positividad al AA y al PAS . **B) Paresia:** célula cebada (↗) con una elevada positividad al PAS. **C) Parálisis:** se aprecia una célula cebada (➤) con positividad marcada al AA y ligera al PAS. **D) Recuperados:** muestra una célula cebada (↘) con positividad ligera al AA y al PAS (,). Fotomicrografía de luz. Inclusión en parafina. Tinción con AAVPAS. 1000x.



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figura 11. Nervio ciático de rata. Se muestran células cebadas de la etapa *Control*, en A) una célula (↖) positiva para ambos colorantes y con gránulos de secreción polarizados; y en B) una célula (↗) con positividad solo para safranina. C) Células en etapa de *Paresia* solo positivas a la safranina (↔). D) *Parálisis*: células íntegras (↖) con gránulos positivos a ambos colorante, con una organización citoplasmática heterogénea. Fotomicrografía de luz. Inclusión en parafina. Tinción con AA/S. 1000X.

3.2. Cuantificación de las Poblaciones de Células Cebadas.

A partir de los cortes de nervios ciáticos incluidos en bloques de parafina se cuantificaron y se valoraron los cambios histoquímicos de los gránulos en células cebadas. Una vez obtenidos los datos experimentales se desarrollo el análisis de varianza para la estimación de parámetros y/o prueba de hipótesis; así como la prueba de comparaciones múltiples según el procedimiento Tukey ($\alpha = 0.05$). El primer paso fue verificar cual de las técnicas histoquímicas detectaba la mayor cantidad de células cebadas por mm^2 (CC/ mm^2), comparada con los otros procedimientos, se realizó un análisis estadístico (Tabla 2).

Prueba de Medias		
Azul de toluidina	10.467	a
Azul Alciano/Safranina	8.34	ab
PAS	3.959	bb
Azul Alciano/PAS	3.546	b

Misma literal significa que son estadísticamente iguales al 0.05 en la prueba de Tukey

Tabla 3. Comparación entre las diferentes técnicas utilizando una prueba de medias.

Esto nos indicó que el AT es la técnica que detectó el mayor número de células debido a que en la prueba de medias es estadísticamente superior al 95% con respecto a los otros métodos con la prueba de Tukey, ya que el valor de su media (10.467a) es estadísticamente diferente al resto de las técnicas. Las técnicas de AA/S (8.34ab) y PAS (3.959bb), no mostraron diferencias significativas. La tinción con AA/PAS fue en la que se detectó una menor cantidad de células cebadas (3.546b), esto también nos indica que es estadísticamente diferente al resto de las técnicas.

Una vez que identificamos que con el AT se cuantificaba la población total de células cebadas endoneurales, tanto desgranuladas como las no desgranuladas (Tabla 3), evaluamos los resultados obteniendo el promedio y la desviación estándar de las variables de interés para cada técnica histoquímica (Tablas 4, 5 y 6).

Variables de interés		Etapas de la neuropatía.				
		Control (Día 0)	Sin Neuropatía (Día 24)	Paresia (Día 48)	Parálisis (Día 58)	Recuperados (Día 112)
Valor promedio de CC/mm ²	Totales	6.12	6.59	8.88	9.05	11.6
	No Desgranuladas	3.94	4.27	5.88	6.10	8.43
	Desgranuladas	2.18	2.32	3.00	2.95	3.17
	Desviación estándar de CC totales	0.98	2.38	2.33	1.93	0.82

Tabla 4. Resultados de la cuantificación de las células cebadas totales endoneurales teñidas con AT.

Etapas de la neuropatía		Porcentaje de positividad en células cebadas			Total de CC /mm ²
		+	++	+++	
Día 0	Control	67.0 %	33.0 %	---	3.14 ± 1.02
Día 24	Sin Neuropatía	74.2 %	25.8 %	---	3.03 ± 1.14
Día 48	Paresia	24.4 %	32.5 %	43.1 %	1.84 ± 0.64
Día 58	Parálisis	63.3 %	36.7 %	---	4.54 ± 0.93
Día 112	Recuperados	71.0 %	27.8 %	1.2 %	6.00 ± 0.67

Intensidad de la reacción: + = Rosa pálido, +++ = Fucsia

Tabla 5. Resultados de la cuantificación de las células cebadas teñidas con PAS.



Etapas de la neuropatía		Porcentaje de células cebadas		Total de CC /mm ²
		 Púrpuras	 Azules	
Día 0	Control	96.1 %	3.9 %	3.67 ± 1.39
Día 24	Sin Neuropatía	98.9 %	1.1 %	3.47 ± 0.64
Día 48	Paresia	100 %	---	1.93 ± 1.03
Día 58	Parálisis	95 %	5.0 %	3.77 ± 0.88
Día 112	Recuperados	99.4 %	0.6 %	4.87 ± 1.14

Tabla 6. Resultados de la cuantificación de las células cebadas teñidas con azul alciano/PAS.



Etapas de la neuropatía		Porcentaje de células cebadas		Total de CC /mm ² ®
		 Rojas	 Azules	
Día 0	Control	91.3 %	8.8 %	6.28 ± 1.92
Día 24	Sin Neuropatía	89.6 %	10.4 %	6.06 ± 1.88
Día 48	Paresia	100 %	---	1.34 ± 0.87
Día 58	Parálisis	82.1 %	17.9 %	7.75 ± 1.08
Día 112	Recuperados	91.1 %	8.9 %	11.5 ± 1.54

Tabla 7. Resultados de la cuantificación de las células cebadas teñidas con azul alciano/safranina.

3.3. Representación Gráfica de las Poblaciones de Células Cebadas.

Posteriormente se graficó el valor medio de los datos obtenidos en la cuantificación de células cebadas, en donde se tomó como punto de comparación el AT (Gráfica 1), ya que fue la técnica con la que se detectó el mayor número de células cebadas por mm^2 . Encontrando células cebadas como residentes normales tanto íntegras como en proceso de desgranulación o desgranuladas completamente; este mismo patrón se mantiene en la etapa *Sin Neuropatía* sin existir alguna diferencia significativa; conforme la neuropatía avanza a la etapa de *Paresia*, aumenta el número de CC/mm^2 , el cual se mantiene sin diferencia hasta la etapa de *Parálisis*. Durante la etapa de *Recuperación* se observa nuevamente un incremento en el número de células cebadas.

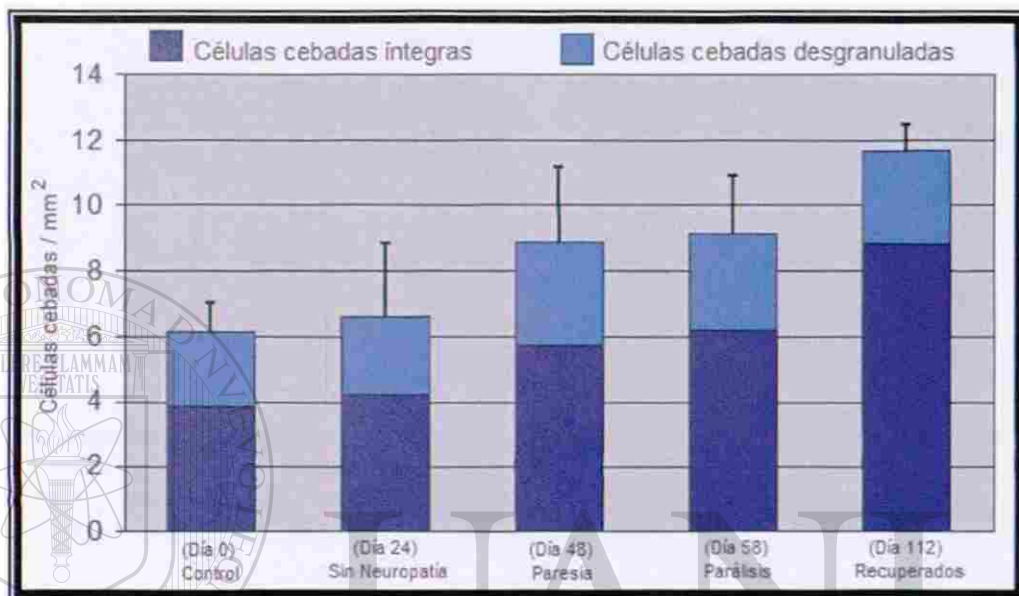
Al utilizar la tinción con PAS (Gráfica 2), prácticamente la tendencia es la misma a la de la población total observada con AT, solo con una menor cantidad de CC/mm^2 ; la otra diferencia y que es la que más llama la atención es que al analizar la etapa de *Paresia*, en lugar de existir un aumento del número de células como se muestran con el AT, la detección de esas mismas células con PAS disminuye.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

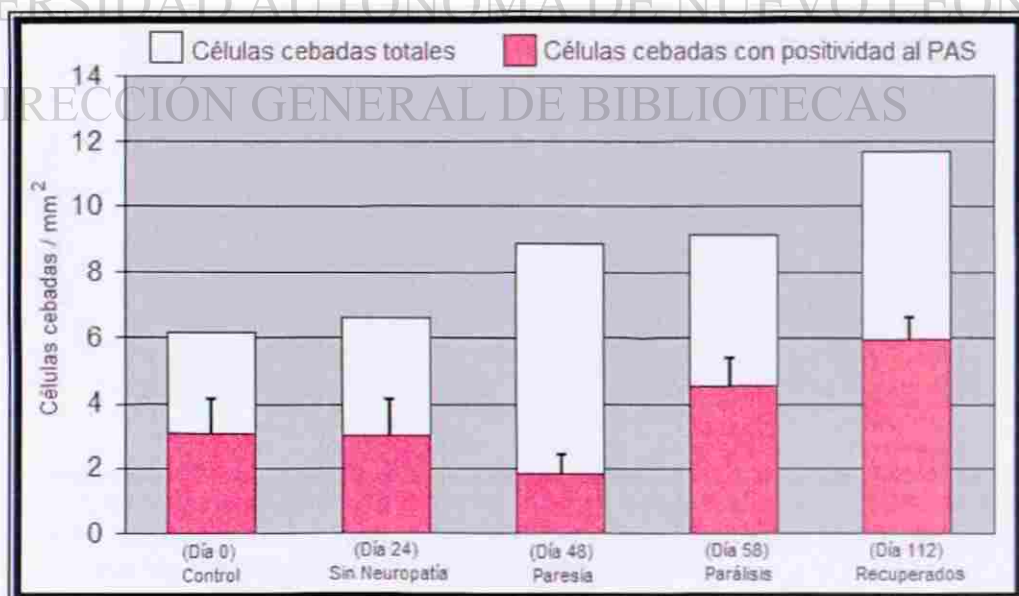
Con la tinción de AA/PAS (Gráfica 3) también se detectó una menor cantidad de células cebadas comparadas con las detectadas con AT. Durante la etapa *Control y Sin Neuropatía* la mayoría de las células cebadas endoneurales mostraban positividad al PAS y muy pocas al AA (Tabla 5) *. Además, se puede observar que es durante la etapa de *Paresia* en donde se cuantifica la menor cantidad de CC/mm^2 y que estas únicamente son positivas al PAS.

* Se observó una gran cantidad de células cebadas positivas al AA fuera de los límites del nervio ciático, en todas las etapas, excepto durante la *Paresia (Día 48)*. Estas células que no se cuantificaron.

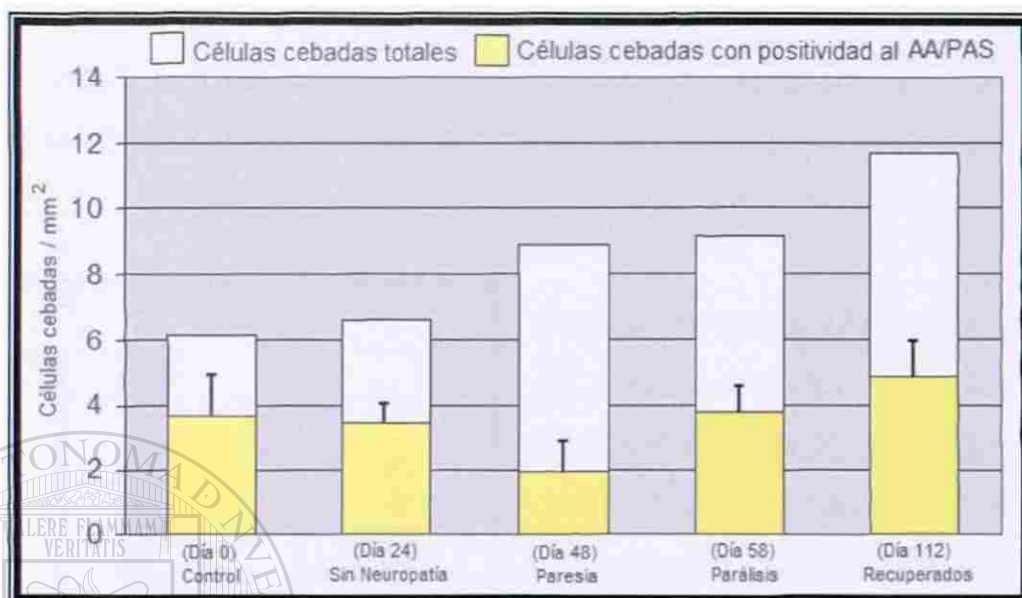
Con AAS (Gráfica 4) no se observó una diferencia en cuanto al las CC/mm² al compararla con las que se detectaron con AT. Con excepción de la etapa de *Paresia* que es en donde se cuantificó la menor cantidad de CC/mm² y que de nuevo estas resultaron ser positivas únicamente a la tinción con PAS.



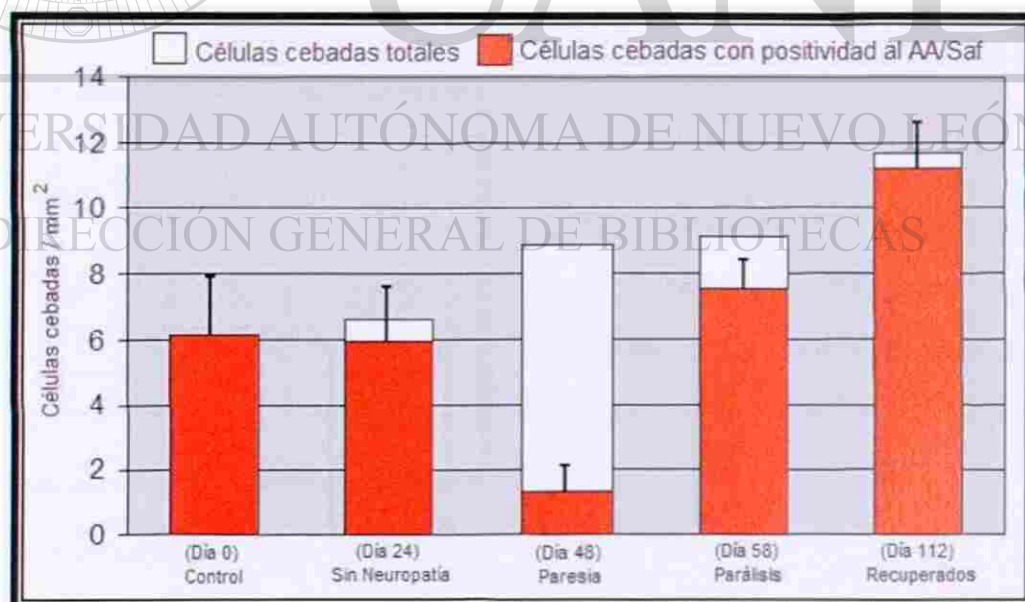
Gráfica 1. Representación gráfica del número total de células cebadas endoneurales por mm² cuantificadas en cada etapa en cortes de parafina teñidos con AT. Los valores representan el promedio \pm desviación estándar del total de la población celular.



Gráfica 2. Representación gráfica del número total de células cebadas endoneurales por mm² cuantificadas en cada etapa en cortes de parafina teñidos con PAS. Los valores representan el promedio \pm desviación estándar del total de la población celular.



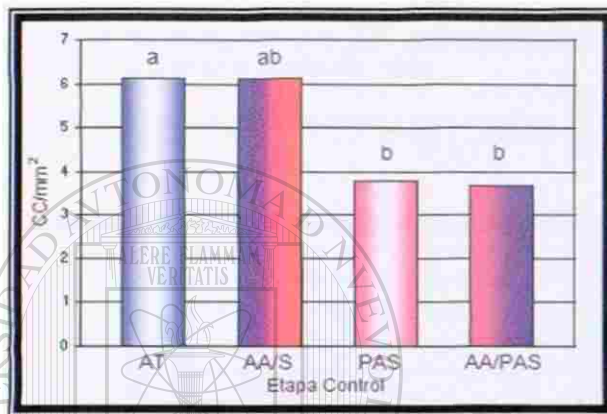
Gráfica 3. Representación gráfica del número total de células cebadas endoneurales por mm² cuantificadas en cada etapa en cortes de parafina teñidos con AA/PAS. Los valores representan el promedio \pm desviación estándar del total de la población celular.



Gráfica 4. Representación gráfica del número total de células cebadas endoneurales por mm² cuantificadas en cada etapa en cortes de parafina teñidos con AAS. Los valores representan el promedio \pm desviación estándar del total de la población celular.

3.4. Análisis Estadístico por Etapas.

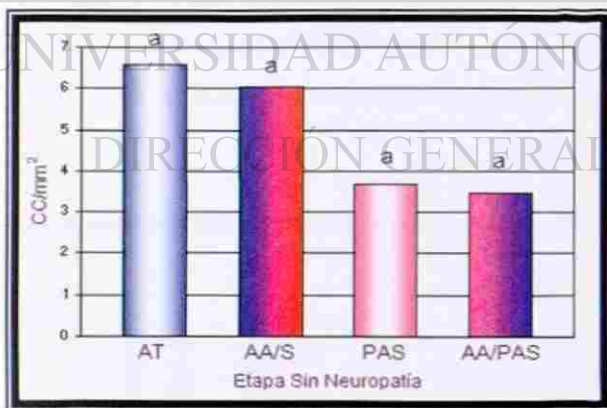
También se realizó una prueba de medias para comparar cada una de las cinco etapas de la neuropatía (*Control, Sin Neuropatía, Paresia, Parálisis y Recuperados*), con las cuatro técnicas histoquímicas (Azul de toluidina, PAS, Azul alciano/PAS y Azul alciano/Safranina)



Misma literal significa que son estadísticamente iguales al 0.05 en la prueba de Tukey

Durante la etapa *Control* la tinción con AT resultó significativamente diferente respecto a la de PAS y AAPAS, estas dos últimas no tuvieron diferencia entre sí. La tinción con AA/S estadísticamente es igual al resto de las tinciones (Gráfica 5).

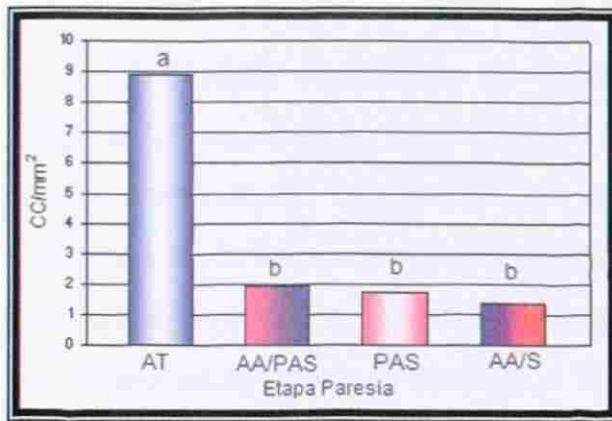
Gráfica 5. Análisis estadístico en el grupo *Control* con las diferentes técnicas histoquímicas.



Misma literal significa que son estadísticamente iguales al 0.05 en la prueba de Tukey

Durante la etapa *Sin Neuropatía* no se observó ninguna diferencia significativa en las técnicas histoquímicas. AT, AA/S, PAS y Azul alciano/PAS (Gráfica 6).

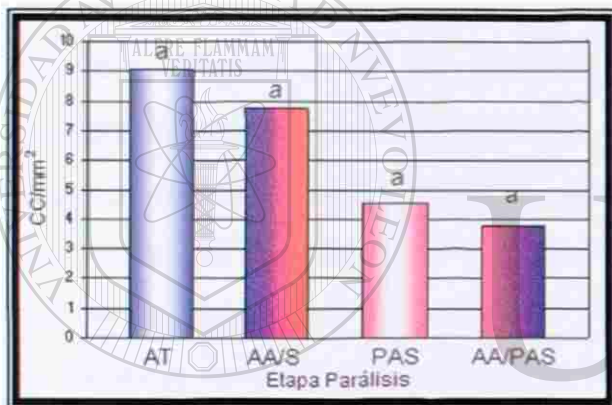
Gráfica 6. Análisis estadístico en el grupo *Sin Neuropatía* con las diferentes técnicas histoquímicas.



Misma literal significa que son estadísticamente iguales al 0.05 en la prueba de Tukey

Durante la etapa de *Paresia* la tinción con la técnica de AT resultó significativamente diferente respecto al resto de las tinciones, o explicado de otra forma, las técnicas histoquímicas de AA/PAS, AA/S y PAS son estadísticamente iguales entre sí pero diferentes al AT (Gráfica 7).

Gráfica 7. Análisis estadístico en el grupo *Paresia* con las diferentes técnicas histoquímicas.



Misma literal significa que son estadísticamente iguales al 0.05 en la prueba de Tukey

Durante la etapa *Parálisis* no se observó ninguna diferencia significativa en las técnicas histoquímicas. AT, AA/S, PAS y AA/PAS (Gráfica 8).

Gráfica 8. Análisis estadístico en el grupo *Parálisis* con las diferentes técnicas histoquímicas.



Misma literal significa que son estadísticamente iguales al 0.05 en la prueba de Tukey

Durante la etapa de *Recuperados* la tinción con AT y AA/S, resultaron estadísticamente iguales entre sí pero significativamente diferentes al PAS y AA/PAS (Gráfica 9).

Gráfica 9. Análisis estadístico en el grupo *Recuperados* con las diferentes técnicas histoquímicas.

3.5. Análisis Morfológico del Nervio Ciático .

Al realizar el análisis de los cortes semifinos, durante la etapa *Control* (Figura 12) se observó la morfología 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 de la presencia de células cebadas con gránulos metacromáticos y macrófagos cerca de vasos sanguíneos. Posterior a la intoxicación, durante la etapa de *Paresia* (Figura 13), se hacen presentes alteraciones manifestadas principalmente en la vaina de mielina que se observan como un aumento en el grosor y espacios dentro de esta, con ello un cambio en la morfología normal de los axones mielinizados. 48 días después de la intoxicación, etapa designada como *Paresia* (Figura 14), la alteración se acentuó más con las mismas características de la etapa anterior, además, en esta etapa se observó que en algunos axones mielinizados, la vaina de mielina presentaba un grosor que no correspondía al diámetro del axón. En la etapa de *Parálisis* (Figura 15), es en donde se observa el mayor grado de alteración en los axones mielinizados, en la mayoría de ellos el grosor de la vaina de mielina se observa aumentado, así como también aumento de los espacios que se presentan dentro de esta; además los gránulos de secreción de las células cebadas no presentan su típica metacromasia. Es durante la etapa de *Recuperados* (Figura 16) en donde se observa que el grosor de la vaina de mielina es mas regular en toda la circunferencia en los axones mielinizados, además, las células de Schwann presentan de nuevo metacromasia en sus gránulos.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

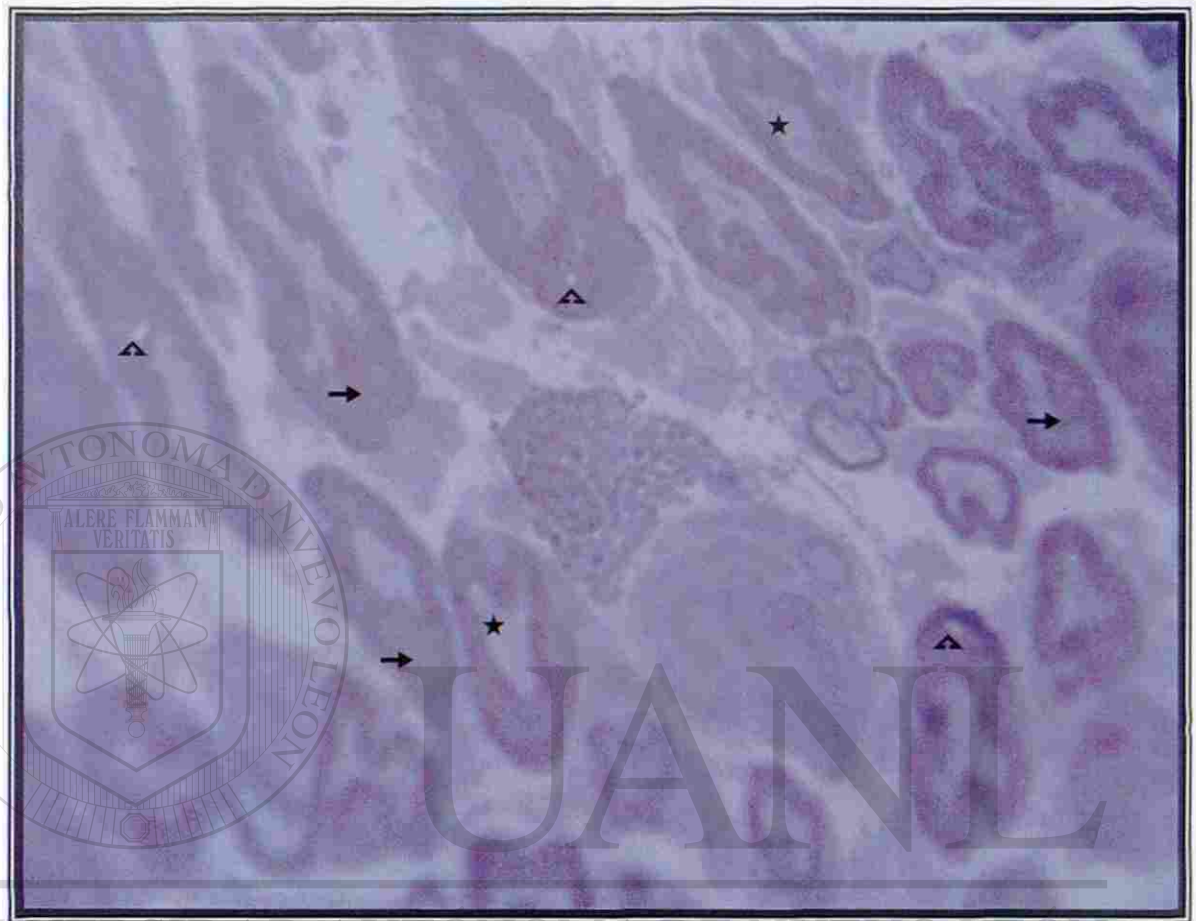
®

Figura 12. Nervio ciático de rata. **Etapa Control.** Se muestra la morfología normal en donde se aprecian grupos de axones amielínicos (◇) y así como axones mielinizados (★), envueltos por una vaina de mielina (←) originada por las células de Schwann (⇒). Además, se observa una sección de una célula cebada íntegra (▷), con gran cantidad de gránulos metacromáticos (color magenta); así como un vaso sanguíneo (↪) con un eritrocito (▶) y muy cercano a este al parecer un macrófago (▷). Fotomicrografía de luz. Inclusión en resina epóxica. Azul de toluidina. 1000x.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Figura 13. Nervio ciático de rata. Etapa *Sin Neuropatía*. Se observan axones mielinizados (★) con alteraciones de su forma normal circular a una irregular, así como también son visibles alteraciones en el grosor de la vaina de mielina (→), obsérvese los espacios dentro de estas vainas (▲). Fotomicrografía de luz. Inclusión en resina epóxica. Azul de toluidina. 1000x.

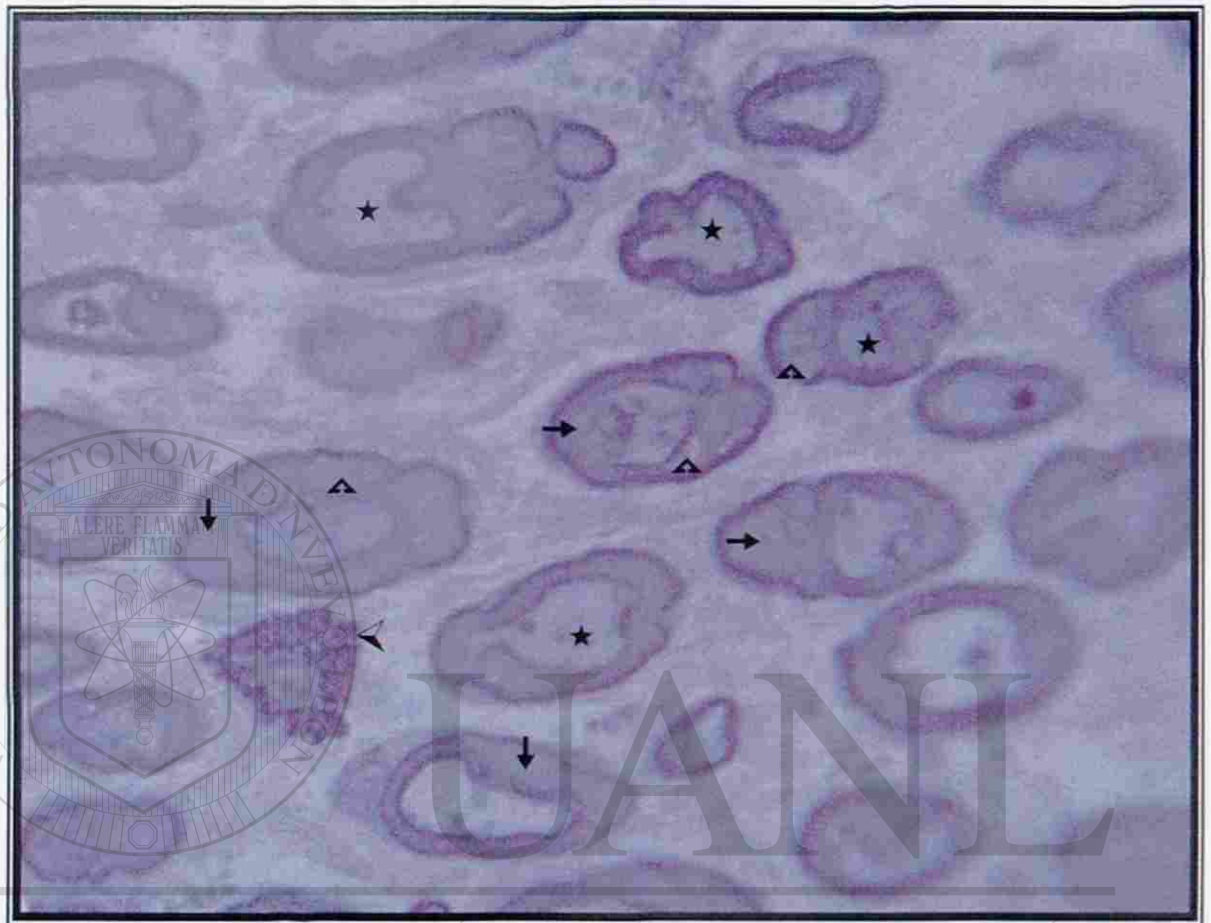


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figura 14. Nervio ciático de rata. **Etapa Paresia**. Se aprecian alteraciones de la morfología normal del nervio ciático, en la mayoría de los axones mielinizados (★), presentándose en un mayor número de células el engrosamiento de la vaina de mielina (→) y los espacios dentro de estas (▲). Fotomicrografía de luz. Inclusión en resina epóxica. Azul de toluidina. 1000X.

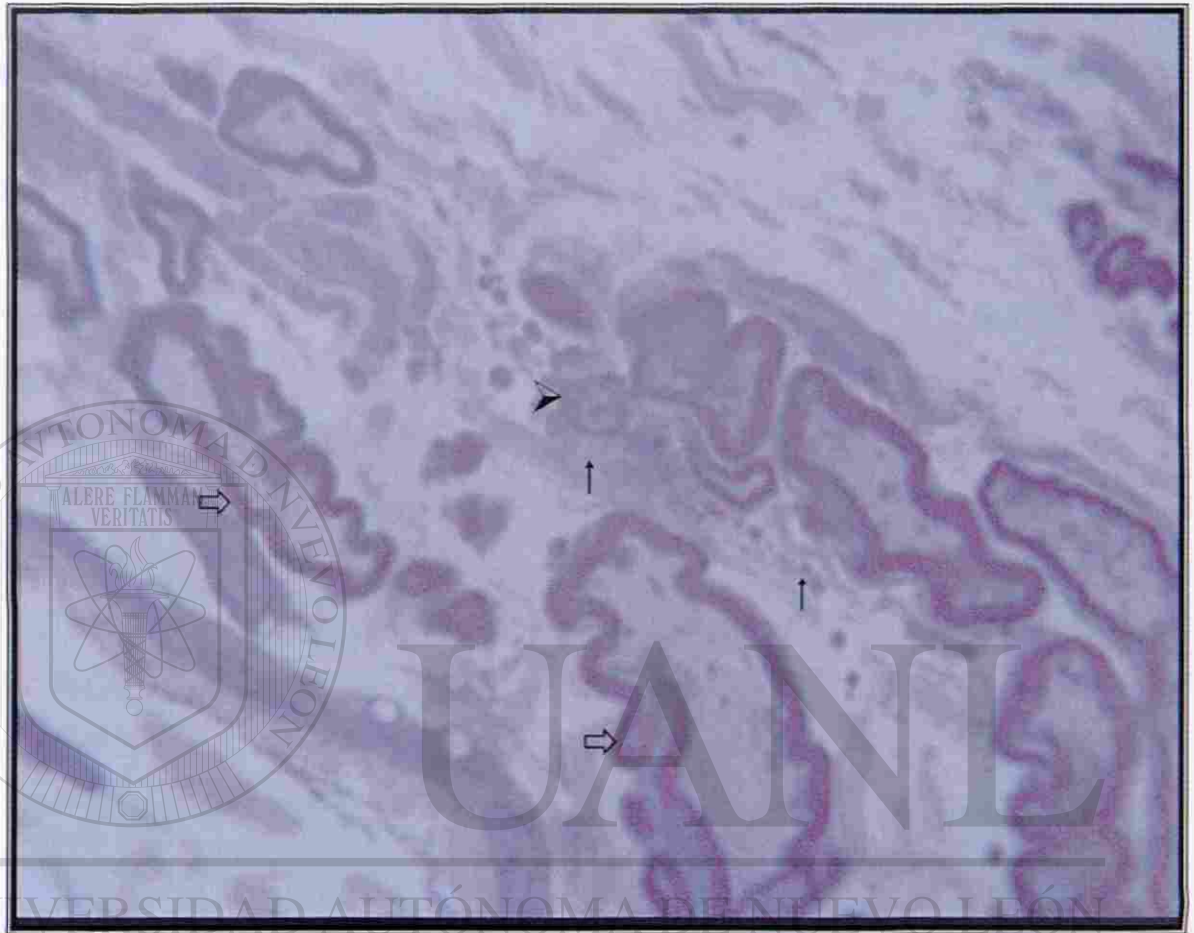


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figura 15. Nervio ciático de rata. **Etapa Parálisis**. Se acentúa las alteraciones de la morfología normal del nervio ciático, en casi la totalidad de los axones mielinizados (★), así como el engrosamiento de la vaina de mielina (→) y los espacios dentro de estas (▲); Nótese la pérdida de la metacromasia (color azul) en los gránulos de secreción en la célula cebada (▶). Fotomicrografía de luz. Inclusión en resina epóxica. Azul de toluidina. 1000X.

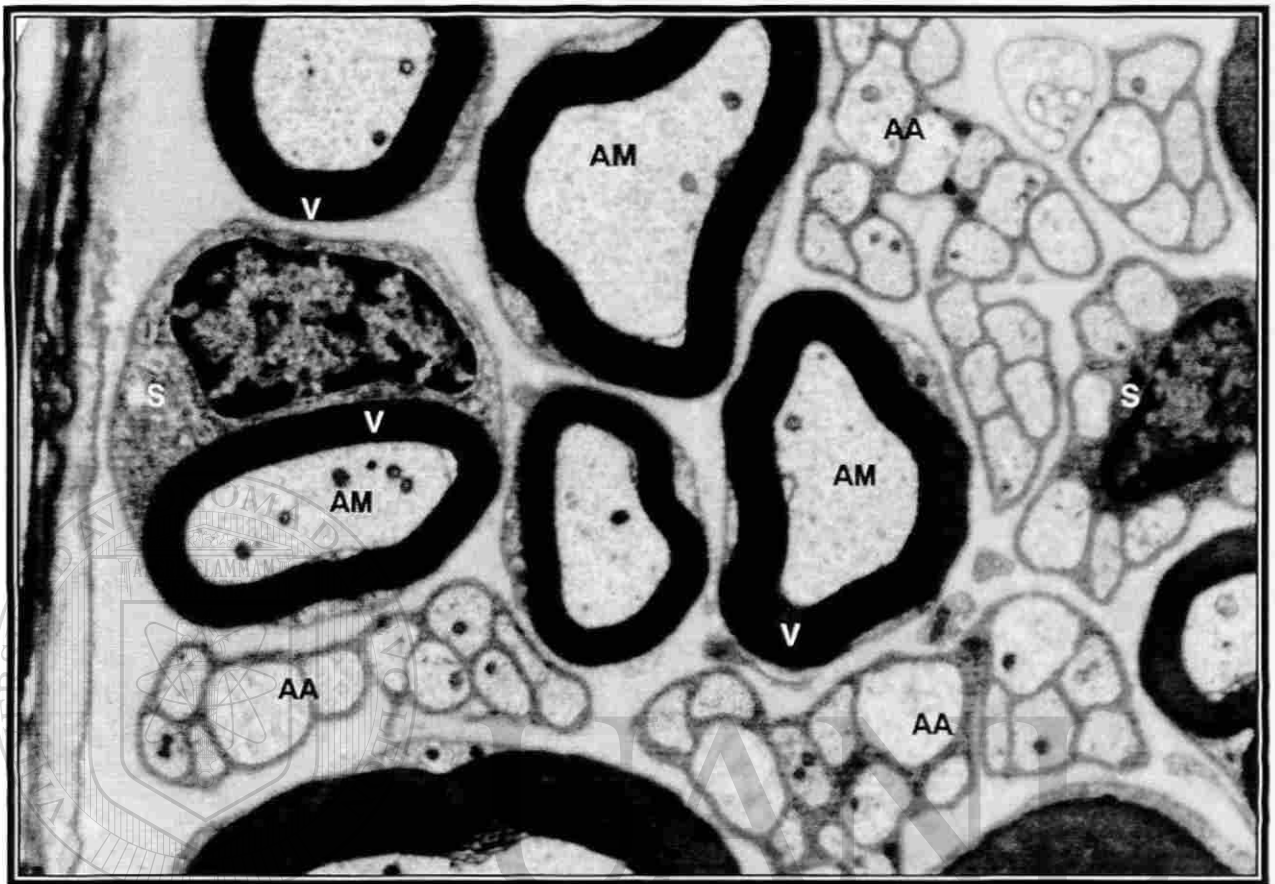


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figura 16. Nervio ciático de rata. **Etapa *Recuperados***. Se observa como el engrosamiento de la vaina de mielina (⇨) se ha restablecido casi por completo. Obsérvese en la célula cebada (➤) en proceso de desgranulación como los gránulos presentan de nuevo su típica metacromasia (↑:color magenta). Fotomicrografía de luz. Inclusión en resina epóxica. Azul de toluidina. 1000X.

3.6. Análisis Ultraestructural del Nervio Ciático.

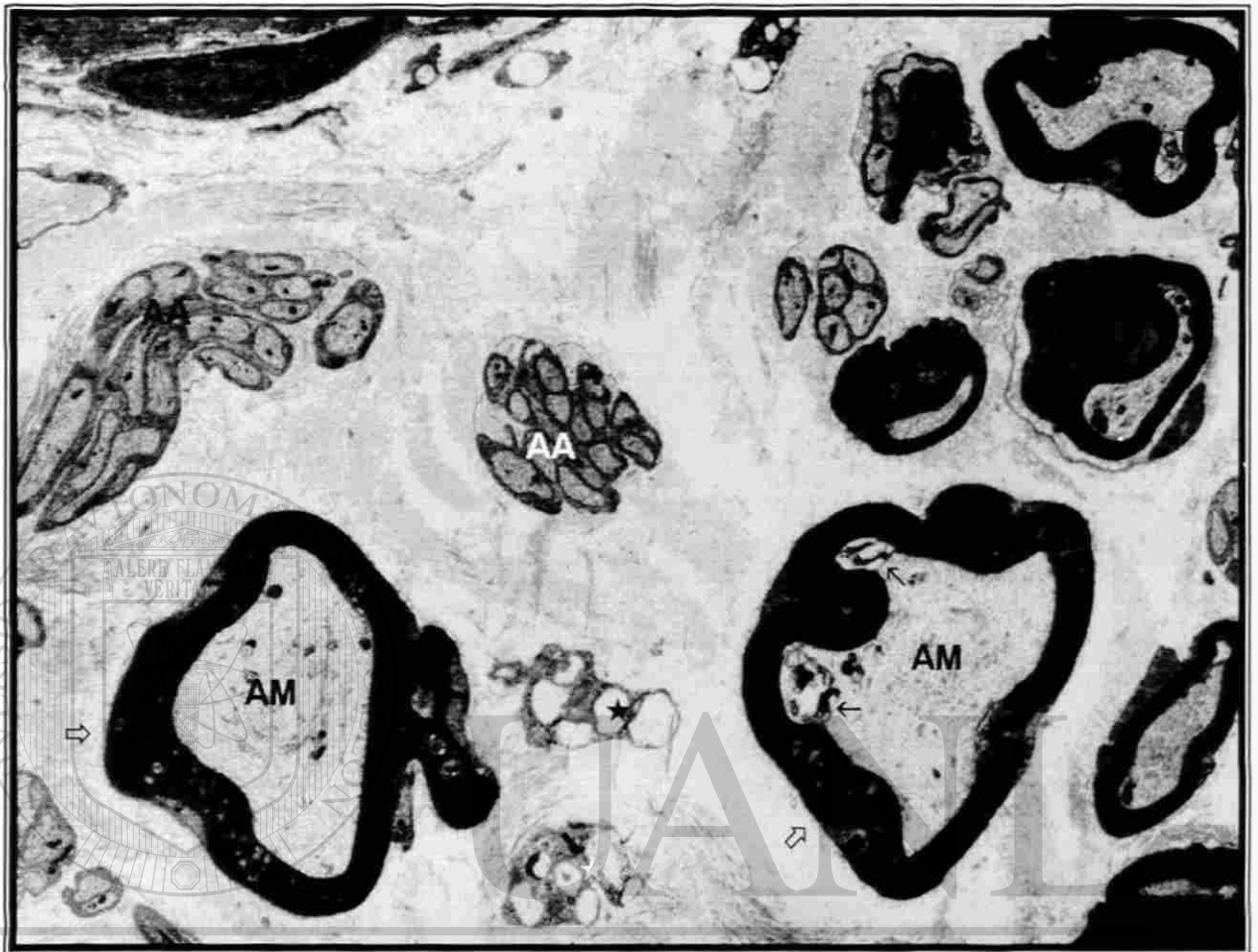
Al realizar el análisis de los cortes finos, durante la etapa *Control* (Figura 17) se observó la ultraestructura normal del nervio que se caracteriza por la forma semicircular regular de los axones mielinizados, así como un grosor uniforme de la vaina de mielina proporcional al diámetro del axón, además los axones mielinizados y amielínicos se observaron con una electrondensidad 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 electrondensidad 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 electrondensidad en los axones amielínicos.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

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.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

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. *: 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.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

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.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

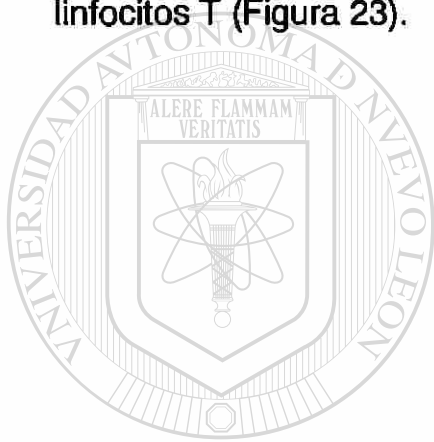
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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).

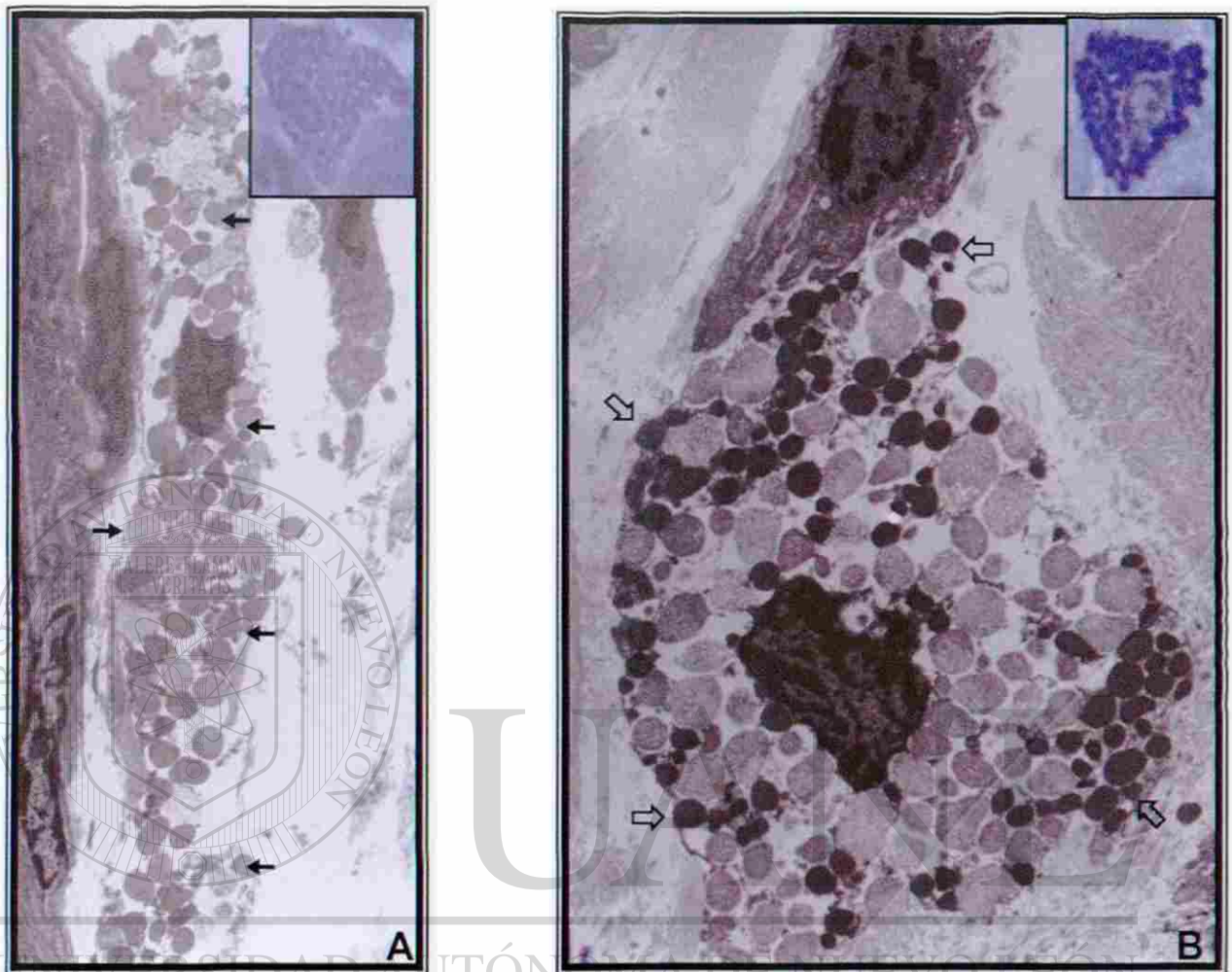


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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 (\rightarrow). **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 (\Rightarrow) 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}.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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 resintetizadas 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.

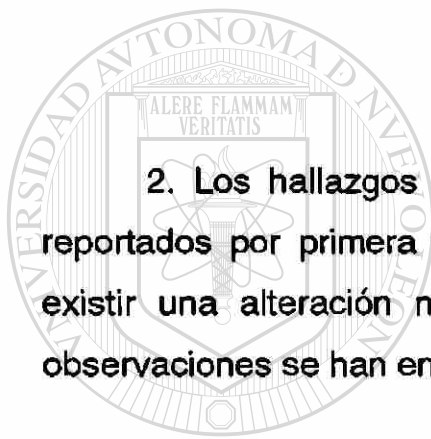
Por otra parte, existen reportes en la literatura sobre los efectos agudos de *Karwinskia humboldtiana* en ratas, que indican que el fruto de esta planta produce una contracción de la neurona, aumento del núcleo y muerte celular en hipocampo y núcleo caudado, así como aumento de los espacios de Virchow-Robin 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.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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 periphereal 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 Hardcourt 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 Editoial 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 tullidota. 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 system. *Int. Rev. Cytol.* 24: 27-70.
38. Olsson, Y; Sjostrand, J. (1969). Proliferation of mast cell in peripheral nerves during Wallerian degeneration: a radioautographic study. *Acta Neuropathol.* 13: 11-122.
39. Latker, C.H.; Wadhvani, K.C.; Balbo, A.; Rapoport, S.I. (1991) Blood-nerve barrier in the frog during Wallerian degeneration: 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, Monografías 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 immuno-mediated damage to the peripheral nervous system. *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 noninflammatory 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., Cary 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). Ultrastructural cytochemical, 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, heart, 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 systems. *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 peripheral 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:

<i>Buffer Wallpole pH 4.2:</i>	
Ácido acético 0.01 M	37.5 mL
Acetato de sodio 0.01 M	12.5 mL

Ajustar pH a 4.2

Solución de trabajo:

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

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:

Agua destilada	730 mL
Etilenglico	250 mL

Solución de ácido periódico al 5%:

Ácido periódico (cristales) 0.5 g

Agua destilada 50 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 amoniacal 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:

Buffer de acetatos pH 1.42:

Ácido clorhídrico 1N	60 mL
Acetato de sodio 1M	50 mL
Agua destilada	140 mL

Solución de trabajo:

Azul alciano	900 mg
Safranina	45 mg
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

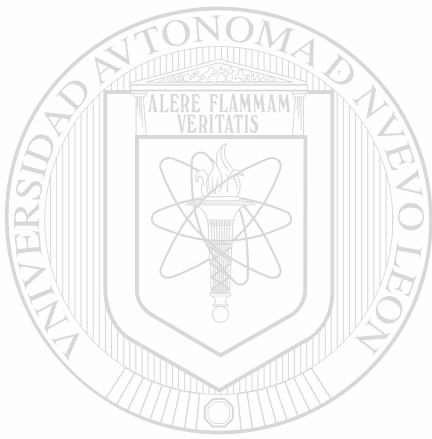
Citrato de plomo al 0.04%:

- 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.

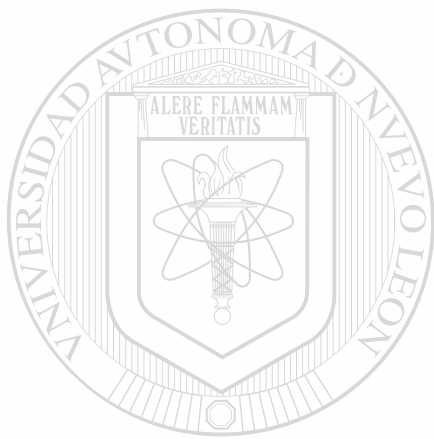


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



