

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DE HÍGADO, RIÑÓN Y PULMÓN EN UN
MODELO DE INTOXICACIÓN CRÓNICA CON EL FRUTO MADURO DE
Karwinskia humboldtiana EN LA RATA WISTAR.**

Por

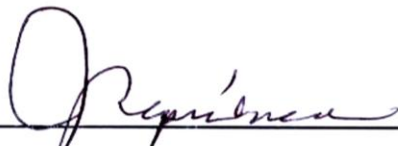
M.C.P. RUBÉN GARCÍA GARZA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MORFOLOGÍA**

FEBRERO 2013

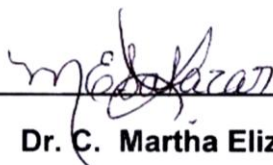
**EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DE HÍGADO, RIÑÓN Y PULMÓN EN UN
MODELO DE INTOXICACIÓN CRÓNICA CON EL FRUTO MADURO DE
Karwinskia humboldtiana EN LA RATA WISTAR.**

Aprobación de tesis.



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

Director de tesis



Dr. C. Martha Elizabeth Salazar Leal

Co-director de tesis



M.C. y Dr. C. Adolfo Soto Domínguez

Co-director de tesis



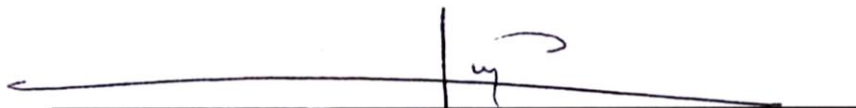
Dr. C. Odila Saucedo Cárdenas

Comisión de tesis



Dr. C. Rosalba Ramírez Durón

Comisión de tesis



Dr. med. Gerardo Muñoz Maldonado

Subdirector de Estudios de Posgrado

**EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DE HÍGADO, RIÑÓN Y PULMÓN EN UN
MODELO DE INTOXICACIÓN CRÓNICA CON EL FRUTO MADURO DE
Karwinskia humboldtiana EN LA RATA WISTAR.**

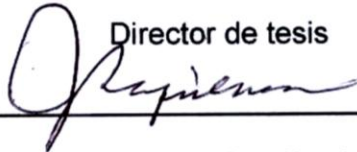
Presentado por:

M.C.P. Rubén García Garza

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 Ph. D. Julio Sepúlveda Saavedra y la Co-dirección de la Dra. Martha Elizabeth Salazar Leal y el Dr. Adolfo Soto Domínguez.

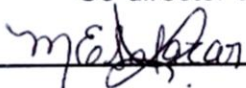
FIRMAS

Director de tesis



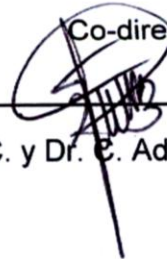
M.C.P. y Ph. D. Julio Sepúlveda Saavedra

Co-director de tesis



Dr. C. Martha Elizabeth Salazar Leal

Co-director de tesis



M.C. y Dr. C. Adolfo Soto Domínguez

AGRADECIMIENTOS

Al Señor Jesucristo por estar siempre a mi lado y ayudarme en todo momento.

A mi familia: Mi esposa Selene, mi hijo Jonathan y a mi hermosa niña que viene en camino, por su amor y apoyo incondicional.

A mis padres Rubén García y Esther Garza que sin sus oraciones y sacrificio nada de esto habría sido posible.

A mis hermanos Mirna y David por estar siempre conmigo

A mí cuñado Liu y sobrinos Nahúm y Joel por enriquecer nuestra familia.

Al templo Nueva Vida por sus oraciones y apoyo a nuestra familia.

Al Ph. D. Julio Sepúlveda Saavedra por darme la oportunidad de pertenecer al departamento de Histología, muchas gracias por compartir su gran experiencia conmigo.

A la comisión de tesis por sus comentarios acertados y oportunos para este trabajo

A mis compañeros de posgrado, que privilegio tenerlos a mi lado.

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO	Página
CAPÍTULO 1.	
INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.	
1.1. <i>Karwinskia humboldtiana</i> .	1
1.2. Reportes de intoxicación.	2
1.3. Frecuencia de la intoxicación en México.	2
1.4. Cuadro clínico.	3
1.5. Alteraciones en SNC y SNP.	3
1.6. Alteraciones en hígado, riñón y pulmón.	4
1.7. Células cebadas.	5
1.8. Justificación.	6
1.9. Hipótesis.	6
1.10. Objetivo general.	6
1.11. Objetivos específicos.	7

CAPÍTULO 2.

MATERIAL Y MÉTODOS.

2.1. Equipo.	8
2.2. Material biológico.	9
2.3. Intoxicación.	9
2.4. Evaluación clínica.	9
2.5. Sacrificio y recolección de las muestras.	10
2.6. Microscopia de luz.	10
2.7. Análisis morfométrico de células cebadas.	11
2.8. Análisis estadístico.	12
2.9. Microscopia electrónica de transmisión (MET).	12

CAPÍTULO 3.

RESULTADOS.

3.1. Hígado. Hematoxilina y Eosina (HyE).	14
3.2. Hígado. Tricrómico de Massón.	14
3.3. Hígado. Retículo de Wilder.	15
3.4. Hígado. Rojo Oleoso.	15
3.5. Riñón. Hematoxilina y Eosina.	16
3.6. Riñón. Tricrómico de Massón.	16

3.7. Riñón. Ácido peryódico de Shiff (PAS) con diastasa.	17
3.8. Pulmón. Hematoxilina y Eosina.	18
3.9. Pulmón. Tricrómico de Massón.	18
3.10. Pulmón. Tinción con azul de toluidina (AT).	19
3.11. Pulmón. Reacciones histoquímicas.	19
3.12. Pulmón. Inmunohistoquímica.	20
3.13. Pulmón. Estudio morfométrico.	21
3.14. Microscopia electrónica de transmisión.	22
3.15. Correlación de los hallazgos histopatológicos.	24

CAPÍTULO 4.

DISCUSIÓN.

4.1. Discusión.	38
-----------------	----

CAPÍTULO 5.

CONCLUSIÓN, CONTRIBUCIONES Y PERSPECTIVAS.

5.1. Conclusión.	43
5.2. Contribuciones.	43
5.3. Perspectivas.	44

CAPÍTULO 6.

BIBLIOGRAFÍA

6.1. Bibliografía.	45
CAPÍTULO 7.	
APÉNDICE.	
7.1. Apéndice.	51
CAPÍTULO 8.	
RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO.	
8.1. Resumen autobiográfico.	75

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURA	Página
Figura 1. Estrategia experimental.	13
Figura 2. Microfotografías de hígado teñido con HyE (100x).	25
Figura 3. Microfotografías de hígado teñido con HyE (100x).	25
Figura 4. Microfotografías de hígado teñido con Tricrómico de Masson (40x).	26
Figura 5. Microfotografías de hígado con impregnación argéntica de Wilder (100x).	26
Figura 6. Microfotografías de hígado. Reacción histoquímica de rojo oleoso (100x).	27
Figura 7. Microfotografías de riñón teñido con HyE. (40x).	27
Figura 8. Microfotografías de túbulos renales (corteza) teñidos con HyE (100x).	28
Figura 9. Microfotografías de riñón (corteza) teñido con Tricrómico de Masson (100x).	28
Figura 10. Microfotografías de riñón (corteza) con la reacción histoquímica de PAS con diastasa (100x).	29
Figura 11. Microfotografías de pulmón (región peribronquial)	29

teñido con HyE (40x).

Figura 12. Microfotografías de pulmón (tabiques) teñido con HyE (40x). 30

Figura 13. Microfotografías de pulmón (tabiques) teñido con Tricómico de Masson (40x). 30

Figura 14. Microfotografías de pulmón con Azul de toluidina (AT), PAS, Azul Alciano/PAS y Azul alciano/Safranina. (40x). 31

Figura 15. Microfotografías de pulmón con inmunohistoquímica (IHQ) para CD3+, CD20+, CD15+ y CD56+. (40x). 31

Figura 16. Microfotografías de pulmón con IHQ para Triptasa+ y CD 117+. 32

Figura 17. Micrografías de Hígado. Microscopía electrónica de transmisión. 32

Figura 18. Micrografías de Riñón. Microscopía electrónica de transmisión. 33

Figura 19. Micrografías de Pulmón. Microscopía electrónica de transmisión. 33

TABLAS

Tabla 1. Promedio de células cebadas totales en pulmón con la tinción de azul de toluidina y promedio de células cebadas con gránulos PAS, AA/PAS y AA/SAF positivos.	34
Tabla 2. Análisis de varianza (ANOVA) de las muestras de pulmón.	34
Tabla 3. Prueba de Tukey en muestras de pulmón.	35
Tabla 4. Correlación de los hallazgos en hígado, riñón, pulmón, Sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP) con el cuadro clínico de la intoxicación crónica con <i>Kh</i>.	37
Tabla 5. Correlación de los hallazgos histopatológicos en hígado, riñón, pulmón, SNC y SNP durante la intoxicación crónica con <i>Kh</i>.	37
Grafica 1. Grafica de células cebadas en pulmón.	36

APÉNDICE

	Página
A.1 Fijación y Técnica histológica.	51
A.2. Desparafinado de laminillas.	53
A.3. Técnica de tinción con Hematoxilina y Eosina (HyE).	53
A.4. Técnica de tinción con el método tricrómico de Masson.	55
A.5. Técnica de impregnación argéntica de Wilder.	58
A.6. Técnica histoquímica de PAS con diastasa.	60
A.7. Técnica histoquímica de rojo oleoso.	62
A.8. Técnica de tinción con azul de toluidina.	64
A.9. Técnica histoquímica de azul alciano/PAS (AA/PAS).	65
A.10. Técnica histoquímica de azul alciano/safranina (AA/SAF).	66
A.11. Deshidratación y montaje de laminillas.	67
A.12. Cubierta de portaobjetos con solución adhesiva de Poli-L-lisina.	67
A.13. Método inmunohistoquímico para CD3+, CD15+, CD20+ y CD56+, triptasa+ y CD117+.	68
A.14. Técnica de preparación de muestras para Microscopía electrónica de transmisión (MET).	70

ABREVIATURAS

%	Porcentaje
®	Marca registrada
°C	Grado centígrado
AA/PAS	Azul alciano / PAS
AA/SAF	Azul alciano / Safranina
AT	Azul de toluidina
C/u	Cada uno
CD	Diferenciadores de grupo
Cols.	Colaboradores
DAB	Diaminobencidina
DDSA	Dodecenil anhídrido succínico
DMP	30 [2,4,6-Tris dimetilaminometil] fenol
Fig.	Figura
g	Gramo
H y E	Hematoxilina y Eosina
HCl	Ácido clorhídrico
IHQ	Inmunohistoquímica
<i>Kh</i>	<i>Karwinskia humboldtiana</i>
M	Mol
MET	Microscopía electrónica de transmisión
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro

mm ²	Milímetro cuadrado
n	Número de datos
Na ₂ HPO ₄	Fosfato ácido de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido e sodio
nm	Nanómetro
PAS	Ácido Peryódico de Schiff
PBS	Amortiguador Salino de Fosfatos
pH	Potencial de hidrógeno
SD	Desviación estándar
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
TA	Temperatura Ambiente
TBS	Tris- Amortiguador Salino
TBST	Tween 20 – Tris – Amortiguador Salino
TRS	Solución Recuperadora de Antígenos
™	Marca registrada
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
α	Significancia estadística
μL	Microlitro
μm	Micrómetro

RESUMEN

M.C.P. RUBÉN GARCÍA GARZA

Fecha de graduación: febrero del 2013

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

TITULO: EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DE HÍGADO, RIÑÓN Y PULMÓN EN UN MODELO DE INTOXICACIÓN CRÓNICA CON EL FRUTO MADURO DE *KARWINSKIA HUMBOLDTIANA* EN LA RATA WISTAR.

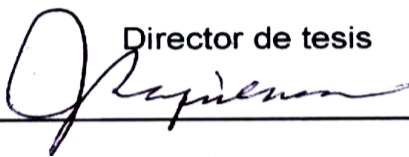
Número de páginas 80

Área de estudio: MORFOLOGÍA

CANDIDATO PARA EL GRADO DE: DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MORFOLOGÍA

Karwinskia humboldtiana (*Kh*) es un arbusto venenoso de amplia distribución en México, cuyo fruto contiene 4 sustancias conocidas como T-496, T-514, T-516 y T-544 que son las principales responsables de la toxicidad. Los casos de intoxicación accidental por *Kh* en humanos se caracterizan por un cuadro clínico de parálisis flácida ascendente que puede conducir a la muerte. Los pacientes que sobreviven se recuperan de forma lenta. Esta intoxicación se ha definido como una polineuropatía sin describir la existencia de alteraciones en órganos distintos al Sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP). El objetivo de este trabajo fue evaluar la morfología del hígado, riñón y pulmón en un modelo de intoxicación crónica con *Kh*. Para este estudio se utilizaron 30 ratas Wistar (ambos sexos) de las que 6 sólo recibieron agua por vía oral (Grupo I) y 24 fueron intoxicadas con el fruto seco y molido de *Kh* en 5 dosis, la primera de 1.5 y 4 de 0.5g/kg de peso los días 0, 3, 7, 10 y 14 respectivamente. Se dividieron en cuatro grupos (n=6) y se sacrificaron los días 24, 48, 58 y 112 (Grupos II-V). Después de analizar las muestras se observó necrosis y esteatosis hepática en los grupos II-IV. En el grupo V se observó una reversión de estas alteraciones. En el riñón se observó necrosis tubular, engrosamiento de la membrana basal de la cápsula de Bowman, barrera de filtración y túbulos contorneados de los grupos intoxicados (II-V). En pulmón se observó un engrosamiento de los tabiques interalveolares con depósitos de matriz extracelular y abundantes infiltrados de células cebadas alrededor de los tabiques y regiones peribronquiales. Se observó un incremento progresivo en el número de células cebadas, alcanzando su máximo en el grupo V. Por histoquímica se encontraron variaciones en la composición de los gránulos de las células cebadas. En el grupo I no se encontraron alteraciones. En conclusión la administración crónica del fruto completo de *Kh* produce una intoxicación sistémica y no es exclusiva del SNC y SNP.

Director de tesis



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

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. *Karwinskia humboldtiana*

Las plantas del genero *Karwinskia* son arbustos de la familia *Rhamnaceae*. Se conocen 19 especies y se distribuyen desde el sur de Estados Unidos de América hasta el norte de Colombia. En México se encuentran 11 especies, 9 son endémicas y de estas *Karwinskia humboldtiana* (*Kh*) comúnmente conocida como tullidora, coyotillo, capulín tullidór, entre otros y es la que alcanza mayor distribución y tolerancia ecológica⁽¹⁻³⁾.

Los efectos tóxicos derivados de la ingesta del fruto de *Kh* fueron descritos por primera vez en 1787 por Clavijero en su libro titulado “Historia de la Antigua o Baja California”, en donde se menciona que no se sufría daño si se consumía el fruto sin semillas, ya que en estas es en donde radica el tóxico⁽⁴⁾.

En 1975 se obtuvieron del endocarpio de *Kh* cuatro sustancias tóxicas denominadas por su peso molecular como T-496, T- 514, T- 516 y T-544⁽⁵⁾, posteriormente se aislaron de otras plantas del género *Karwinskia* compuestos estructuralmente similares a la T-514, como lo son dos diastereoisómeros denominados peroxisomicina A₂ y peroxisomicina A₃, y un isómero denominado Iso PA₁⁽⁶⁻⁷⁾.

1.2. Reportes de intoxicación

A través del tiempo se han reportado diversos casos de intoxicación tanto únicos como múltiples por la ingesta del fruto de *Karwinskia* en humanos⁽⁸⁻¹⁴⁾ sin embargo, estos no representan la incidencia real de esta intoxicación ya que al confundirse con otras enfermedades que también cursan con parálisis flácida de los miembros inferiores como el Síndrome de Guillain-Barré la mayoría de los casos de intoxicación no son diagnosticados⁽¹⁴⁾.

1.3. Frecuencia de la intoxicación en México

Debido a que no existían reportes de la frecuencia de la intoxicación por *Karwinskia* en México, Bermúdez y cols. realizaron un estudio en donde analizaron 154 muestras séricas de pacientes que cursaban con un cuadro clínico de paresia o parálisis flácida de los miembros inferiores, estos pacientes provenían de alrededor de 18 estados de la República Mexicana y dichos casos se presentaron de enero de 1991 a diciembre de 1993. A estas muestras se les realizó una cromatografía en capa fina con el fin de identificar la presencia de las toxinas de *Kh* en suero. Los resultados demostraron la presencia de 50 casos positivos para la intoxicación por *Kh*, todos ellos con el antecedente de haber ingerido el fruto de esta planta⁽¹⁵⁾.

Por otro lado, Arreola y cols. (2000) reportaron que la mayor incidencia de casos de intoxicación por *Karwinskia* ocurridos entre 1990 y 1994 se presentó en el centro y norte de la República Mexicana, y que estos predominaron en los meses de febrero y marzo coincidiendo con la fructificación de esta planta⁽¹⁶⁾.

1.4. Cuadro clínico

El cuadro clínico característico de esta intoxicación inicia con la presencia de una paresia (debilidad) de miembros inferiores que progresa hasta convertirse en una parálisis flácida, bilateral, simétrica y ascendente que puede progresar a una cuadriplejía y producir la muerte. En los casos en donde no ocurre la muerte, la recuperación del cuadro paralítico es lenta y se presenta alrededor de los 6 meses a un año. El diagnóstico diferencial más importante de esta intoxicación es con el Síndrome de Guillain-Barré cuyo cuadro clínico es similar al de la intoxicación con *Karwinskia* ⁽⁹⁻¹⁴⁾.

1.5. Alteraciones en SNC y SNP

Debido a que la intoxicación por *Karwinskia* cursa con un cuadro clínico de neuropatía periférica, la mayoría de los estudios tanto morfológicos como fisiológicos de ésta se han centrado en la búsqueda de alteraciones en el nervio periférico, reportando la presencia de áreas de desmielinización segmentaria y daño axonal ⁽¹⁷⁻²⁰⁾. En los estudios fisiológicos se ha reportado una disminución e incluso bloqueo de la conducción nerviosa así como datos de denervación muscular ⁽²¹⁻²²⁾.

En 2006 Salazar y cols. ⁽²³⁾ reportaron un modelo de intoxicación crónica con *Kh* administrando dosis fraccionadas del fruto maduro de esta planta. En este estudio

se lograron reproducir los datos clínicos presentados en humanos cuando no mueren por esta intoxicación. Se reportó la existencia de áreas de desmielinización segmentaria en nervio periférico, alteraciones en el trayecto y grosor axonal antes de la aparición de la paresia, los que persistieron hasta la etapa de parálisis. En la etapa clínica de recuperación de la parálisis se presentó una reversión de los daños histopatológicos previamente descritos.

En estas mismas muestras se identificó la presencia de un incremento de células cebadas en el endoneurio durante todas las etapas de este modelo llegando a su pico máximo durante la etapa de recuperación; las células cebadas presentaban variaciones en cuanto a la composición histoquímica de sus gránulos dependiendo de la etapa analizada ²⁴.

En nuestro laboratorio con este modelo de intoxicación Becerra y cols.⁽²⁵⁾ reportaron alteraciones morfológicas en cerebro, cerebelo, puente y médula espinal (vía motora del SNC) caracterizadas por cambios tintoriales en las neuronas, cromatólisis, retracción neuronal, gliosis e irregularidades en el trayecto y grosor axonal. Estas alteraciones se presentaron en todos los órganos y en todos los grupos analizados.

1.6. Alteraciones en Hígado, Riñón y Pulmón

Es importante mencionar que en la literatura existen escasos estudios en donde se analicen órganos distintos al sistema nervioso, uno de ellos es el realizado por Bermúdez y cols. ⁽²⁶⁾ en un modelo de intoxicación aguda con *Kh*, en donde se

utilizaron distintas especies animales a las que se les administró una dosis única de 5g/kg de peso del fruto seco y molido de esta planta. En este estudio la muerte se presentó alrededor de las 58 horas posteriores a la intoxicación y se demostró la presencia de diversas alteraciones en hígado, riñón y pulmón: consistentes con necrosis masiva, edema, y congestión en hígado, necrosis tubular y congestión en riñón y necrosis, edema, congestión y atelectasia en pulmón. Es importante señalar que en este estudio no se presentó la parálisis.

Por otro lado otros estudios experimentales *in vivo* en los que se administró una dosis alta del fruto completo de *Kh* han reportado un incremento significativo en las transaminasas hepáticas, tiempo de sangrado y de protrombina, disminución en la actividad de los factores de coagulación II, V, VII y X ⁽²⁷⁾, así como insuficiencia renal aguda ⁽²⁸⁻²⁹⁾. De la misma manera estudios *in vitro* utilizando las toxinas T-514 y T-544 han reportado hepatotoxicidad y daño renal. ⁽²⁹⁾

1.7. Células cebadas

Las células cebadas son un tipo celular derivado de precursores hematopoyéticos en la médula ósea ⁽³⁰⁻³¹⁾, y son mejor conocidas por su papel en las reacciones anafilácticas ⁽³²⁻³³⁾. Estas células presentan receptores con una alta afinidad para las inmunoglobulinas IgE que al activarse favorecen la expulsión de sus gránulos de secreción liberando histamina, prostaglandinas, leucotrienos, proteasas, citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento neuronal (NGF)⁽³⁴⁾, el Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase II (MHC-II)⁽³⁵⁻³⁶⁾, el factor de células madre (SCF)⁽³⁷⁾, entre otros ⁽³⁸⁾, lo que confirma la inmensa complejidad funcional de estas

células, sin embargo también se ha reportado un incremento de estas en nervio periférico durante distintas neuropatías ⁽³⁹⁻⁴¹⁾, así como en pulmón durante distintos modelos experimentales de intoxicación química ⁽⁴²⁻⁴⁶⁾.

1.8. Justificación

Actualmente no existen en la literatura reportes que evalúen la morfología de hígado, riñón y pulmón durante las diferentes etapas del modelo de intoxicación crónica con *Karwinskia humboldtiana* en ratas Wistar, así como su correlación con el cuadro clínico y los hallazgos histopatológicos en nervio periférico y SNC.

1.9. Hipótesis

La ingesta crónica del fruto completo de *Karwinskia humboldtiana* produce una intoxicación sistémica y no exclusivamente del SNC y SNP.

1.10. Objetivo general

Evaluar la histología, histoquímica y ultraestructura del hígado, riñón y pulmón durante las diferentes etapas del modelo de intoxicación crónica con *Karwinskia humboldtiana* y correlacionar los resultados con el cuadro clínico observado y las alteraciones en nervio periférico y sistema nervioso central.

1.11. Objetivos específicos

1. Evaluar la histología del hígado, riñón y pulmón durante las diferentes etapas del modelo de intoxicación crónica con *Karwinskia humboldtiana* empleando distintas tinciones histológicas y métodos histoquímicos.
2. Identificar por medios inmunohistoquímicos la composición celular de infiltrados inflamatorios observados en hígado, riñón y pulmón.
3. Evaluar la ultraestructura del hígado, riñón y pulmón durante las diferentes etapas del modelo de intoxicación crónica con *Karwinskia humboldtiana*.
4. Correlacionar los hallazgos vistos en hígado, riñón y pulmón, con el cuadro clínico observado, alteraciones en nervio periférico y sistema nervioso central durante las diferentes etapas del modelo de intoxicación crónica con *Karwinskia humboldtiana*.

CAPÍTULO 2

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Equipo

Balanza analítica.

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

Cámara digital Sony Cybershot.

Campana de extracción.

Centro de inclusión Tissue Embedding Center Tissue Tek II.

Computadora personal.

Criostato.

Cuchilla de diamante Diatome.

Cuchillas desechables.

Estuche de disección.

Estufa eléctrica Equiphos S.A.

Microscopio de luz de campo claro Carl Zeiss.

Microscopio electrónico de transmisión de Carl Zeiss.

Microscopio estereoscópico American Optical Corp. modelo 569.

Microtomo American Optical Corporation.

Placa caliente Corning Hot Plate Stirrer PC-351.

Preparador de cuchillas LKB BROMMA 7800 KnifeMaker.

Refrigerador para conservación de reactivos.

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

Ultramicrotomo RMC MT-X.

2.2. Material biológico

Se utilizaron 30 machos y hembras de ratas Wistar de las que seis sólo recibieron agua de beber (Grupo I) y 24 fueron intoxicadas siendo distribuidas en 4 grupos (Grupo II-V).

2.3. Intoxicación

Después de un periodo de 6 horas de ayuno, las ratas a intoxicar recibieron por vía oral y por medio de sonda orogástrica, 5 dosis del fruto seco, molido y cribado de *Kh* en suspensión acuosa. La primera dosis fue de 1.5 gr/kg (día 0) seguida por 4 dosis de 0.5 gr/kg los días 3, 7, 10 y 14 posteriores a la primera dosis (dosis total de 3.5 gr/kg). Las ratas control solamente recibieron agua.

2.4. Evaluación clínica

Todas las ratas fueron evaluadas clínicamente y se registró el peso diariamente durante las primeras dos semanas, cada tercer día de la semana 3 a la 8 y semanalmente a partir de la semana 8 hasta el final del estudio al día 112. La evaluación clínica incluyó la apariencia del pelo, movilidad espontánea, tono muscular, anomalías de la marcha, frecuencia respiratoria, pérdida de pelo, debilidad de extremidades y parálisis.

2.5. Sacrificio y recolección de las muestras

Las ratas se sacrificaron por dislocación cervical a diferentes tiempos junto con sus ratas control (Grupo I). El segundo grupo se sacrificó antes de la aparición de la paresia en el día 24 (Grupo II). El tercer grupo se sacrificó cuando las ratas presentaban paresia de las extremidades posteriores al día 48 (Grupo III). El cuarto grupo se sacrificó cuando las ratas presentaban parálisis al día 58 (Grupo IV). Finalmente el quinto grupo (Grupo V) se sacrificó cuando las ratas presentaron una recuperación completa de la parálisis al día 112.

2.6. Microscopia de luz

Histología

Las muestras de tejido para microscopia de luz se fijaron en paraformaldehído al 4%, se procesaron por la técnica histológica de rutina y se incluyeron en bloques de parafina (Apéndice A.1). La evaluación histológica se realizó en cortes de entre 5-7 μ m. A todas las muestras se les realizó la tinción de HyE (Apéndice A.2 y A.3.) con el fin de observar la histología general de los órganos e identificar posibles alteraciones, tricrómico de Masson (Apéndice A.4) para diferenciar los componentes epiteliales de los mesenquimatosos y retículo de Wilder (Apéndice A.5) para la identificación de fibras reticulares.

Histoquímica

Se realizaron las reacciones histoquímicas de PAS con diastasa (Apéndice A.6) para la identificación de los componentes de las membranas basales, rojo oleoso (Apéndice A.7) en las muestras de hígado (cortes por congelación) para la identificación de grasas y Azul de toluidina al 2% (Apéndice A.8) para la identificación de las células cebadas. Al identificar a las células cebadas se diferenciaron histoquímicamente los componentes de sus gránulos con la reacción de PAS para gránulos con mucopolisacáridos (Apéndice A.6.), Azul alciano/PAS (Apéndice A.9) para gránulos con mucinas ácidas y neutras y Azul alciano / Safranina (Apéndice A.10) para aminas biogénicas.

Inmunohistoquímica

Se realizó inmunohistoquímica (Apéndice A.13) con el fin de identificar células T (CD3+), células B (CD20+), macrófagos (CD15+), células NK (CD56+), células cebadas (CD117+) y gránulos de triptasa+.

2.7. Análisis morfométrico de células cebadas

Se analizaron seis cortes de pulmón por cada grupo de ratas intoxicadas con *Kh* y su grupo control. De cada corte se seleccionaron 8 campos al azar en donde se cuantificaron todas las células diferenciando a las células cebadas de los demás tipos celulares presentes. Esta cuantificación se realizó en muestras con AT, así

como con las reacciones histoquímicas de PAS, AA/PAS y AA/SAF. Los resultados se expresaron en porcentaje (%).

2.8. Análisis estadístico

Los resultados de la cuantificación de células cebadas se contrastaron por medio de la prueba *t de Student* para identificar diferencias significativas en relación a su grupo control, análisis de varianza (ANOVA) para la identificación de diferencias de las varianzas inter-grupos y la prueba de Tukey para identificar de cual o de cuales tipos de gránulos dependían las diferencias de las varianzas inter-grupo en caso de presentarse. Se utilizó el programa estadístico SPSS 15.0 para Windows con una significancia de $P \leq 0.05$.

2.9. Microscopía electrónica de transmisión

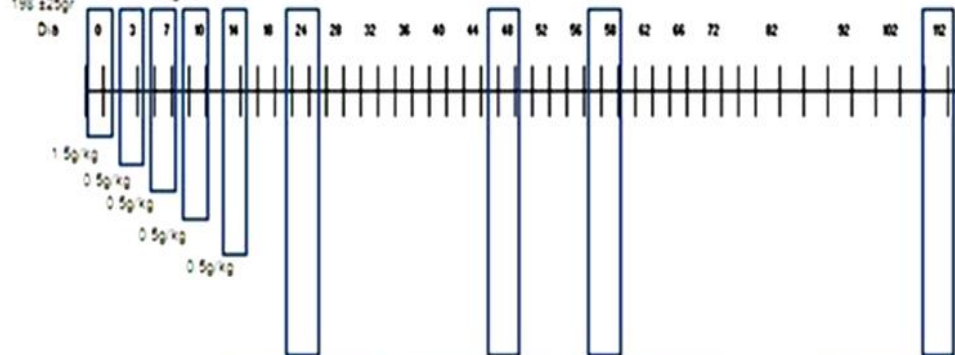
De forma paralela a la recolección de muestras para microscopia de luz, fragmentos de hígado, riñón y pulmón de aproximadamente 1mm^3 se fijaron en solución de Karnovsky-Ito, postfijadas en tetraóxido de osmio y procesadas hasta incluirse en bloques de resinas epóxicas. Se obtuvieron cortes semifinos, se contrastaron con azul de toluidina y se analizaron con el microscopio óptico para identificar áreas de interés. A partir de dichas áreas se obtuvieron cortes finos, que se contrastaron con citrato de plomo y acetato de uranilo para su evaluación ultraestructural con el microscopio electrónico de transmisión (Apéndice A.14).



Estrategia experimental

Fruto completo, molido y tamizado de kh administrado por medio de sonda orogástrica.

n=30
190 ± 25gr



Grupo control (Grupo I)



Grupo de pareda (Grupo II)



Grupo de pareda (Grupo III)



Grupo de pareda (Grupo IV)



Grupo de recuperación (Grupo V)

Dislocación cervical



Evaluación histológica, histoquímica, inmunohistoquímica y ultraestructural



Fig. 1 Esquema que muestra la estrategia experimental del estudio.

CAPÍTULO 3.

RESULTADOS

HÍGADO

3.1. Hematoxilina y eosina

En las muestras del grupo control (I) se observaron los hepatocitos, triadas portales, sinusoides y venas centrales de características histológicas normales (fig. 2 A y 3 A). En los grupos sin paresia y paresia (II y III) se observó congestión vascular, pequeñas vacuolas citoplasmáticas en la mayoría de los hepatocitos (fig. 2 B-C), además de focos aislados de hepatocitos con citoplasma extraído y núcleo hipercromático característico de necrosis (fig. 3 B-C). En el grupo de parálisis (IV) se observó congestión vascular generalizada, grandes vacuolas citoplasmáticas en la mayoría de los hepatocitos (fig. 2 D), así como una mayor cantidad de focos de necrosis hepática (fig. 3 D). En el grupo de recuperación (V) no se observaron las alteraciones morfológicas anteriormente mencionadas a excepción de la congestión vascular (fig. 2 E y 3 E).

3.2. Tricrómico de Massón

En las muestras del grupo I se observaron escasas fibras de colágena en color azul alrededor de las triadas portales y venas centrales (fig. 4 A). En los grupos experimentales II-V no se observaron alteraciones en la cantidad de fibras de colágena (fig. 4 B-E).

3.3. Retículo de Wilder

En las muestras del grupo I se observaron escasas fibras reticulares (fig. 5 A). En los grupos experimentales II-V no se observaron alteraciones en relación con la cantidad de fibras reticulares (fig. 5 B-E).

3.4. Rojo Oleoso

En las muestras del grupo I no se observaron lípidos en el citoplasma de los hepatocitos que demuestra la falta de positividad a esta reacción histoquímica (fig. 6 A). En los grupos II y III se observó una positividad difusa a esta reacción en el citoplasma de la mayoría de los hepatocitos (fig. 6 B-C) siendo más evidente en las muestras del grupo IV en donde se observó una intensa coloración rojo brillante en todo el citoplasma de la mayoría de los hepatocitos (fig. 6 D). En el grupo V a diferencia de los grupos experimentales II-IV no se observaron lípidos en el citoplasma de los hepatocitos (fig. 6 E).

RIÑÓN

3.5. Hematoxilina y eosina

En las muestras de los grupos I y II se observaron los glomérulos, el espacio urinario, la cápsula de Bowman y túbulos contorneados proximales y distales de características histológicas normales (fig. 7 A y 8 A). En el grupo III se observaron áreas de congestión vascular glomerular (fig. 7 B-C), células epiteliales tubulares con extracción del citoplasma y núcleo hiper cromático característico de necrosis, así como desprendimiento de las microvellosidades en las células epiteliales de los túbulos contorneados proximales (fig. 8 B-C). En el grupo IV se observó un escaso depósito de material fibroso de tinción eosinófila alrededor de la cápsula de Bowman de algunos glomérulos (fig. 7 D), intensa congestión vascular y extensas áreas de necrosis del epitelio tubular (fig. 8 D). En el grupo V se hicieron todavía más evidentes las alteraciones tubulares previamente descritas (fig. 7 E), así como los depósitos de material fibroso alrededor de la cápsula de Bowman (fig. 8 E).

3.7. Tricrómico de Massón

En las muestras del grupo I se observaron escasas fibras de colágena en color azul alrededor de los vasos sanguíneos, túbulos contorneados y cápsula de Bowman de características histológicas normales (fig. 9 A). En los grupos II-IV se observó un incremento progresivo de las fibras de colágena alrededor de la cápsula de Bowman de algunos glomérulos y túbulos contorneados adyacentes a estos, lo que coincide con los hallazgos vistos con el HyE (fig. 9 C-D). En el grupo V los

hallazgos previamente descritos se observaron en una mayor cantidad de glomérulos y túbulos contorneados adyacentes a estos (Fig. 9 E).

3.8. Reacción histoquímica de PAS

En las muestras del grupo I se observaron las membranas basales delgadas y continuas en color magenta alrededor de la cápsula de Bowman, capilares glomerulares y túbulos contorneados proximales y distales de características histológicas normales (fig. 10 A). En los grupos II y III se observó pérdida de la continuidad de las membranas basales de los túbulos contorneados que presentaban necrosis, así como un ligero incremento en el grosor de la membrana basal de la cápsula de Bowman (fig. B-C). En los grupos IV y V se observó un engrosamiento cada vez más evidente de la membrana basal de la cápsula de Bowman de algunos glomérulos así como de la de algunos túbulos contorneados adyacentes (Fig. 10 D-E).

PULMÓN

3.9. Hematoxilina y eosina

En las muestras del grupo I se observaron bronquios, bronquiolos y tabiques alveolares de características histológicas normales (fig. 11 A y 12 A). En los grupos II y III se observaron abundantes acúmulos de células mononucleares en la mucosa de algunos bronquiolos (Fig. 11 B-C), así como un ligero engrosamiento de los tabiques interalveolares y congestión vascular (Fig. 12 B-C). En los grupos IV y V los acúmulos de células mononucleares fueron aún más evidentes, ya que la gran cantidad de células mononucleares modificaba la luz del bronquiolo los que presentaron una pérdida de su disposición estrellada normal (Fig. 11 D-E), y además se observó un evidente engrosamiento en la gran mayoría de los tabiques interalveolares (Fig. 12 D-E).

3.10. Tricrómico de Massón

En las muestras del grupo I se observaron células epiteliales con citoplasma rojo brillante, núcleos café oscuro y escasas fibras de colágena en color azul brillante alrededor de los vasos sanguíneos y en la mucosa de los bronquiolos de características histológicas normales (fig. 13 A). En los grupos II y III se observó un ligero incremento en la cantidad de fibras de colágena y acúmulos de infiltrados mononucleares en la mucosa de los bronquiolos, así como en algunos tabiques interalveolares adyacentes a estos (fig. 13 B-C). En los grupos IV y V se observó un evidente incremento de las fibras de colágena tanto alrededor como dentro de

los acúmulos de infiltrados mononucleares en la mucosa de los bronquiolos así como en la mayoría de los tabiques interalveolares (Fig. 13 D-E).

3.11. Azul de toluidina

En las muestras del grupo I se observaron escasas y aisladas células cebadas tanto en las regiones peribronquiales como en los tabiques interalveolares. En los grupos II-IV se determinó que los acúmulos de células mononucleares presentes en la mucosa de los bronquiolos y en los tabiques interalveolares descritos anteriormente correspondían en su gran mayoría a células cebadas, ya que estas presentaron grados variables de positividad a esta reacción. La cantidad de células cebadas, así como su positividad a esta reacción histoquímica fue más evidente en las muestras del grupo V (Fig. 14 A).

3.12. Reacciones histoquímicas de PAS, AA/PAS y AA/SAF.

Con estas reacciones histoquímicas fue posible identificar que tanto en el grupo I como en los grupos intoxicados (II-V) existió una cantidad variable de células cebadas con gránulos positivos a las reacciones de PAS (fig. 14 B), AA/PAS (fig. 14 C) y AA/SAF (fig. 14 D) lo cual fue confirmado por medio de un estudio morfométrico (ver punto 3.14).

3.13. Inmunohistoquímica

Se realizaron reacciones inmunohistoquímicas con anticuerpos específicos anti Linfocitos T (CD3+), Macrófagos (CD15+), Linfocitos B (CD 20+) y células NK (CD56+). Para cada uno de estos anticuerpos, tanto en el grupo I como en los grupos intoxicados (II-V), se observaron células positivas en forma aislada (Fig. 15 A-D).

Adicionalmente se realizó una reacción inmunohistoquímica con anticuerpos específicos anti CD117+ con el fin de identificar la presencia de células cebadas positivas a este marcador. Se observó en todos los grupos experimentales (grupos II-V) abundantes células positivas a CD117 que mostraron el patrón de expresión normal o membranoso, además de un patrón citoplasmático focalizado en el que además de la membrana se observaban pequeños focos de positividad en el citoplasma y un patrón citoplasmático generalizado, en donde la totalidad del citoplasma presentaba positividad a este anticuerpo.

Por último se realizó la reacción inmunohistoquímica con anticuerpos específicos anti triptasa de células cebadas con el fin de corroborar sin lugar a dudas la presencia de estas células. Se observó que todos los grupos experimentales (grupos II-V) presentaron abundantes células positivas a triptasa.

3.14. Estudio morfométrico

El estudio morfométrico de las células cebadas de pulmón con AT reveló que las células cebadas son residentes normales de pulmón (8.9%). A partir del grupo II se observó un incremento estadísticamente significativo en el número de éstas células (37.25%) con respecto al grupo I el cual aumenta de forma progresiva hasta llegar a su pico máximo en el grupo V (59.88%).

Por otro lado, el estudio morfométrico de las células cebadas con las reacciones histoquímicas de PAS, AA/PAS y AA/SAF reveló que en el grupo I existe una cantidad muy similar de células cebadas con gránulos positivos al PAS (7.43%) y AA/PAS (5.43%), y que las células con gránulos positivos al AA/SAF se encuentran prácticamente ausentes. En las muestras del grupo II se observó que existe un incremento significativo de las células con gránulos PAS positivos (18.08%), y no así del resto de los gránulos. En el grupo III se observó un incremento significativo de las células con gránulos AA/PAS positivos (14.26%), y posteriormente se presentó un decremento significativo de las células con gránulos PAS positivos del grupo IV (13.28%), y un nuevo incremento significativo en el grupo V (31.99%) en donde por primera vez se observó un ligero pero significativo incremento de las células con gránulos AA/SAF positivos (3%) (Tabla 1).

Con la prueba estadísticas de análisis de la varianza (ANOVA) se determinó que en todos los grupos de estudio (grupos I-V), existen diferencias significativas en las varianzas inter-grupos de las células con gránulos positivos para las reacciones de, PAS, AA/PAS y AA/SAF (Tabla 2).

Con la prueba estadística de Tukey se determinó que las diferencias en las varianzas inter-grupo dependían principalmente de una escasa cantidad de células cebadas con gránulos AA/SAF positivos en todos los grupos analizados (grupo I-V). En el grupo I se observó que las células con gránulos PAS y AA/PAS no presentaban diferencias entre sus varianzas, sin embargo a partir de las muestras del grupo II se observó que a diferencia del grupo I en este predominan las células con gránulos PAS positivos en comparación con las células AA/PAS positivas, esta relación se estabiliza en el grupo III, posteriormente se invierte significativamente en el grupo IV y finalmente se estabiliza en el grupo V (Tabla 3 y Gráfica 1).

3.15. Microscopia electrónica de transmisión de hígado, riñón y pulmón.

En las muestras de hígado del grupo I se observaron hepatocitos con su membrana celular, organelos y núcleo de características ultraestructurales normales. En las muestras de los grupos II y III se observaron sinusoides con congestión vascular, además de algunos hepatocitos con pérdida de la continuidad de la membrana celular y extracción del citoplasma, y otros con pequeños espacios en su citoplasma correspondientes a lípidos extraídos. En el grupo IV se observó una mayor cantidad de células con pérdida de la continuidad de su membrana citoplasmática, extracción del citoplasma y grandes vacuolas citoplasmáticas. En las muestras del grupo V no se observaron las alteraciones previamente descritas persistiendo solamente la congestión vascular, así como escasas y pequeñas vacuolas citoplasmáticas (Fig. 17 A-D)

En las muestras de riñón del grupo I los túbulos contorneados proximales y distales, además de los glomérulos presentaron características ultraestructurales normales. En los grupos II y III se observaron células tubulares con pérdida de microvellosidades, extracción de citoplasma y núcleo hipercromático, así como congestión en los vasos capilares sinusoidales. En los grupos IV y V se presentaron las alteraciones previamente descritas además de un engrosamiento evidente de la membrana basal de la cápsula de Bowman con abundantes depósitos de matriz extracelular, y un evidente engrosamiento de la membrana basal de la barrera de filtración glomerular acompañada de pedicelos fusionados alrededor de esta (fig. 18 A-F).

Las muestras de pulmón del grupo I mostraron regiones peribronquiales, tabiques alveolares y barrera alveolocapilar de características ultraestructurales normales. En los grupos II y III se observaron abundantes células mononucleares con gránulos de tamaños y electrodensidades variables en su interior, escasas células identificadas como macrófagos, células plasmáticas, neutrófilos entre otras, así como escasos depósitos de matriz extracelular en los tabiques interalveolares y áreas de congestión vascular. En los grupos IV y V se observó un engrosamiento más evidente de los tabiques interalveolares así como de la membrana basal de la barrera alveolocapilar (fig. 19 A-B).

3.16. Correlación de los hallazgos histopatológicos.

Al obtener los resultados se correlacionaron los hallazgos en hígado, riñón y pulmón, SNC y SNP con el cuadro clínico observando que los primeros datos clínicos en aparecer son la disnea y la pérdida de peso en el grupo II seguido de paresia que progresa hasta convertirse en parálisis (grupos III y IV). En el grupo V se observó una recuperación de peso sostenida y reversión de la parálisis. En esta correlación se identificó al hígado, pulmón y nervio periférico como los principales órganos relacionados con este cuadro clínico (Tabla 4).

Al hacer una correlación de las alteraciones histopatológicas observadas en los distintos grupos de estudio (grupo II-V) se observó que la congestión vascular es uno de los principales datos histopatológicos en la mayoría de los órganos analizados, también que los infiltrados de células cebadas solamente se presentan en nervio periférico y pulmón, y que la recuperación histopatológica solo ha sido reportada en hígado, nervio periférico y puentes en los que al final del estudio solamente persiste algo de congestión vascular. (Tabla 5).

IMAGENES

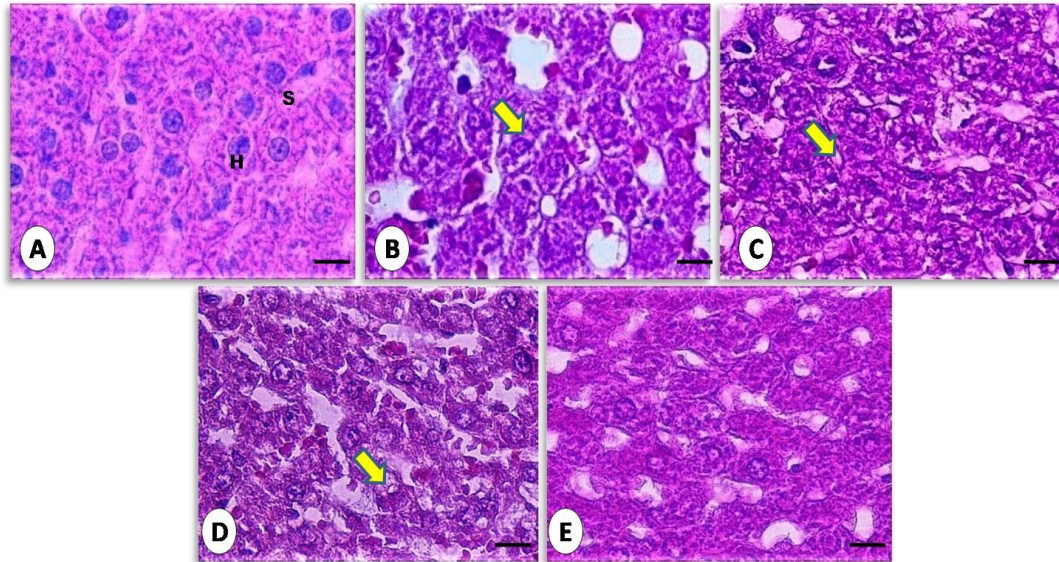


Fig. 2. Hígado de rata intoxicada con *Kh*. En el grupo I **A**) se observa la histología normal de hepatocitos (H) y sinusoides (S). En el grupo II **B**) se observan áreas de congestión y dilatación sinusoidal (flechas amarillas) y en los grupos III y IV **C-D**) se observan vacuolas citoplasmáticas (flechas amarillas) las que desaparecen en el grupo V **E**). Inclusión en parafina. HyE, 100x.

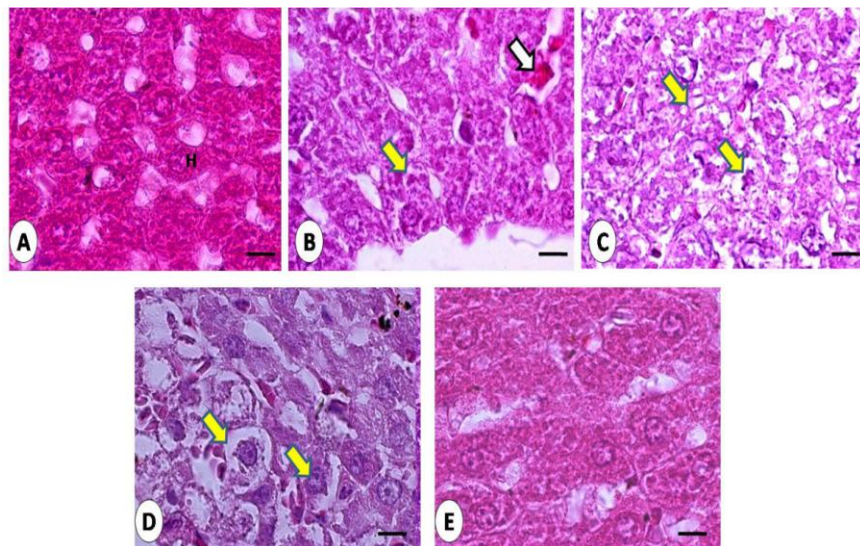


Fig. 3. Hígado de rata intoxicada con *Kh*. En el grupo I **A**) se observa la histología normal de los hepatocitos (H). En los grupos II-IV **B-D**) se observa congestión sinusoidal (flecha blanca), así como necrosis hepática (flechas amarillas). En el grupo V **E**) se observa nuevamente la histología normal. Inclusión en parafina. HyE, 100x.

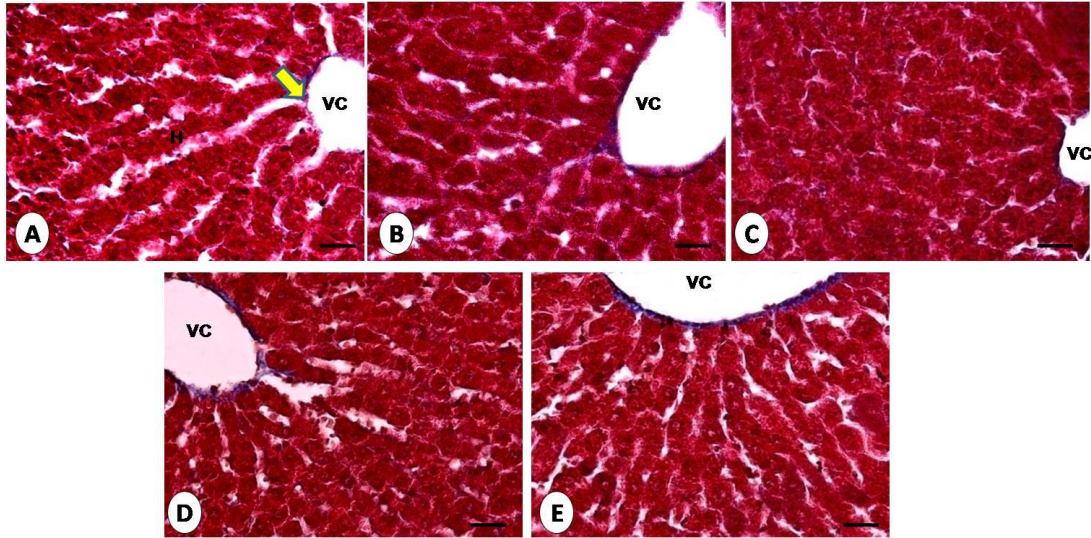


Fig. 4. Hígado de rata intoxicada con *Kh*. En el grupo **A**) se observa la histología normal de hepatocitos (H), vena central (VC) y fibras de colágeno (flecha amarilla). En los grupos II.V **B-E**) no se observaron alteraciones en cuanto a la cantidad de fibras de colágeno. Inclusión en parafina. Tricrómico de Massón, 40x.

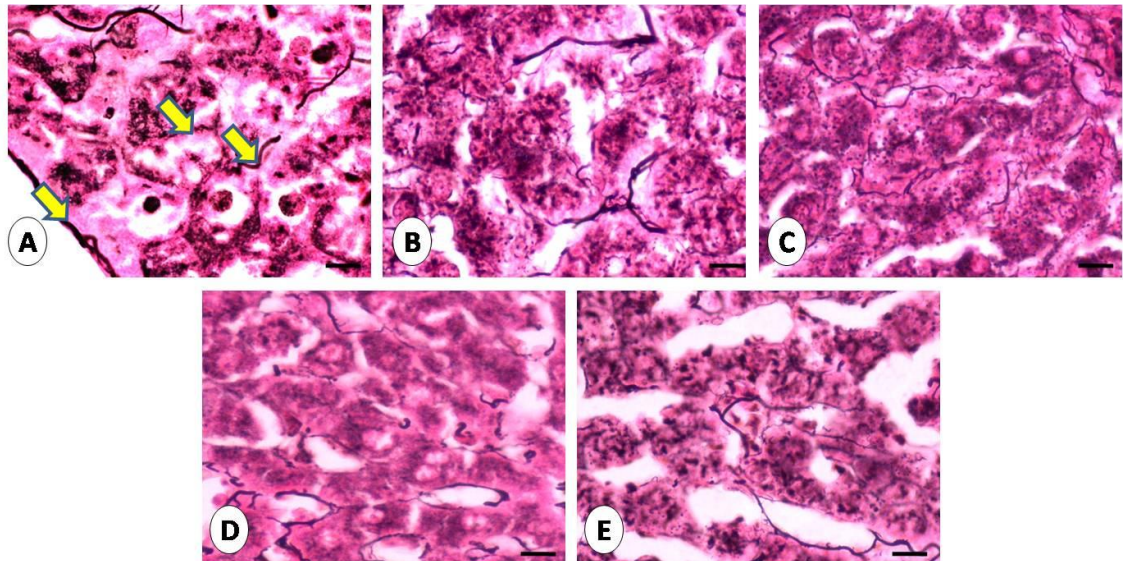


Fig. 5. Hígado de rata intoxicada con *Kh*. En el grupo **A**) se observa la histología normal de las fibras reticulares (flechas amarillas). En los grupos II.V **B-E**) no se observaron alteraciones. Inclusión en parafina. Reticulo de Wilder, 40x.

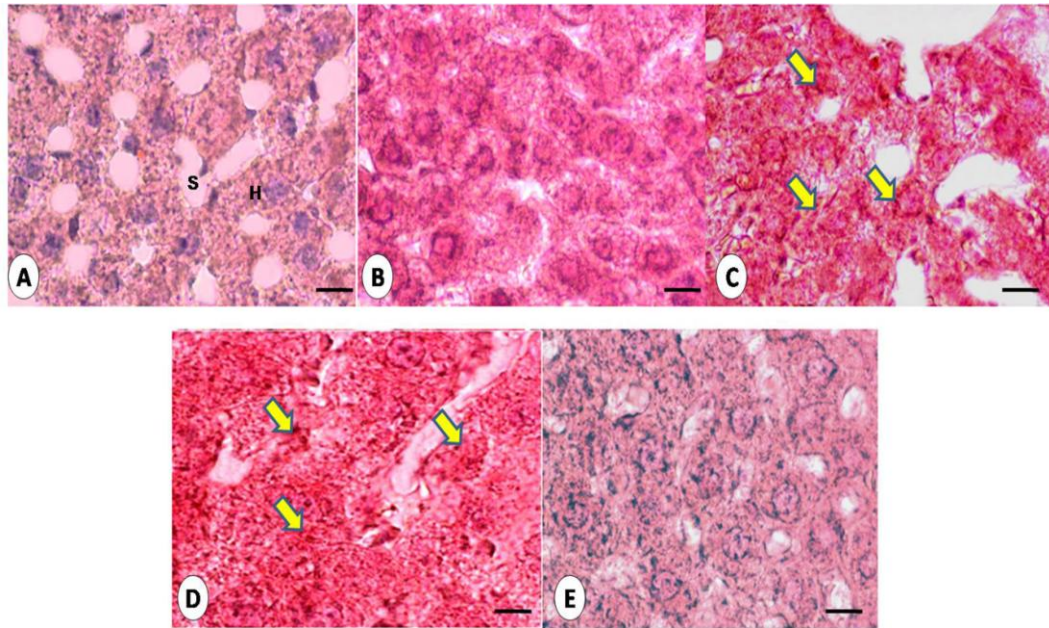


Fig. 6. Hígado de rata intoxicada con *Kh*. En el grupo I **A**) se observa la histología normal de hepatocitos (H) sin positividad al rojo oleoso, la que se hace evidente (flechas amarillas) en los grupos II-IV **B-D**) y desaparece en el grupo V **E**). Cortes por congelación, Rojo oleoso, 100x.

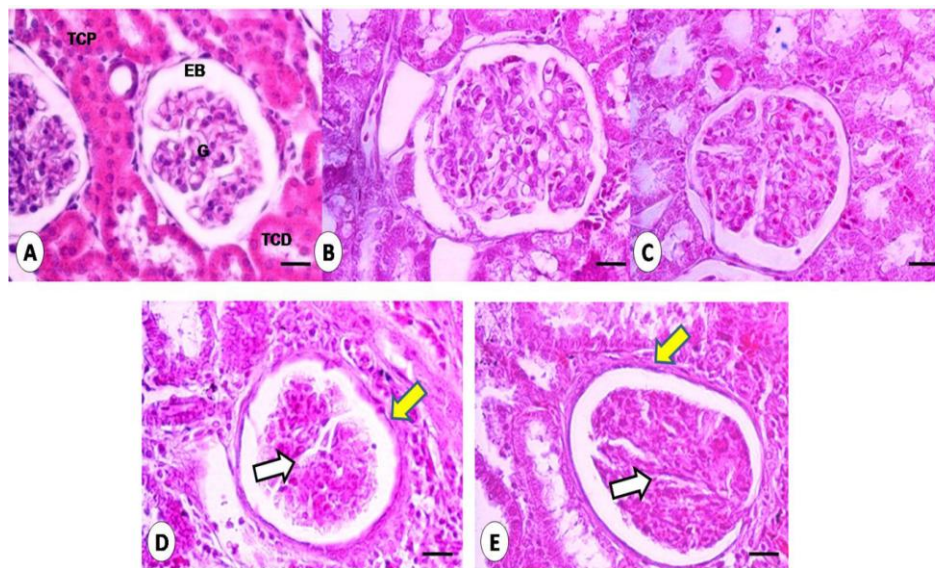


Fig. 7. Riñón de rata intoxicada con *Kh*. En el grupo I **A**) se observan túbulos contorneados proximales (TCP) y distales (TCD), así como de glomerulos (G) y espacio de Bowman (EB) de características histológicas normales. En los grupos II-V **B-E**) se observa congestión vascular glomerular (flechas blancas) además de áreas de engrosamiento de la cápsula de Bowman (flechas amarillas). Inclusión en parafina. HyE, 40x.

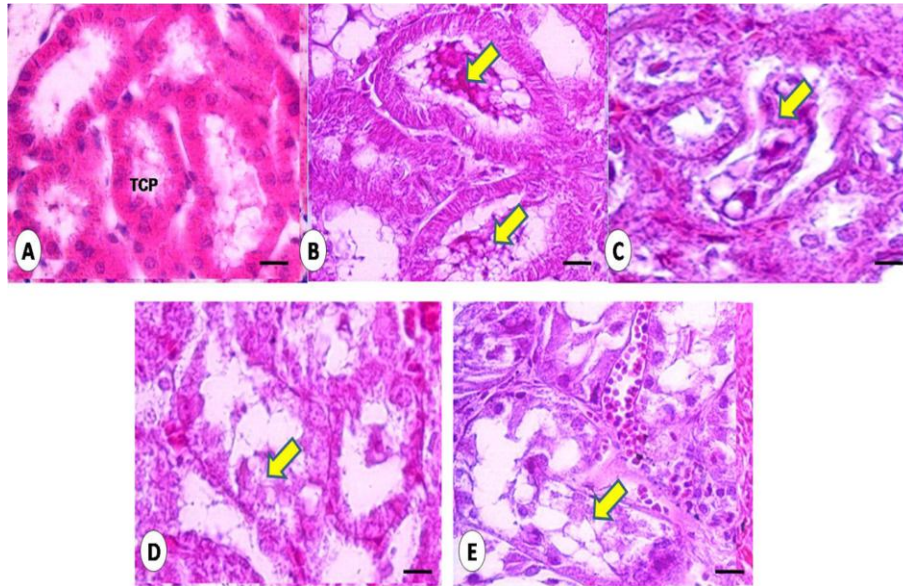


Fig. 8. Riñón de rata intoxicada con *Kh*. En el grupo I **A**) se observa la histología normal de los túbulos contorneados proximales (TCP). En los grupos II-V **B**) se observa necrosis tubular (flechas amarillas). Inclusión en parafina. HyE, 100x.

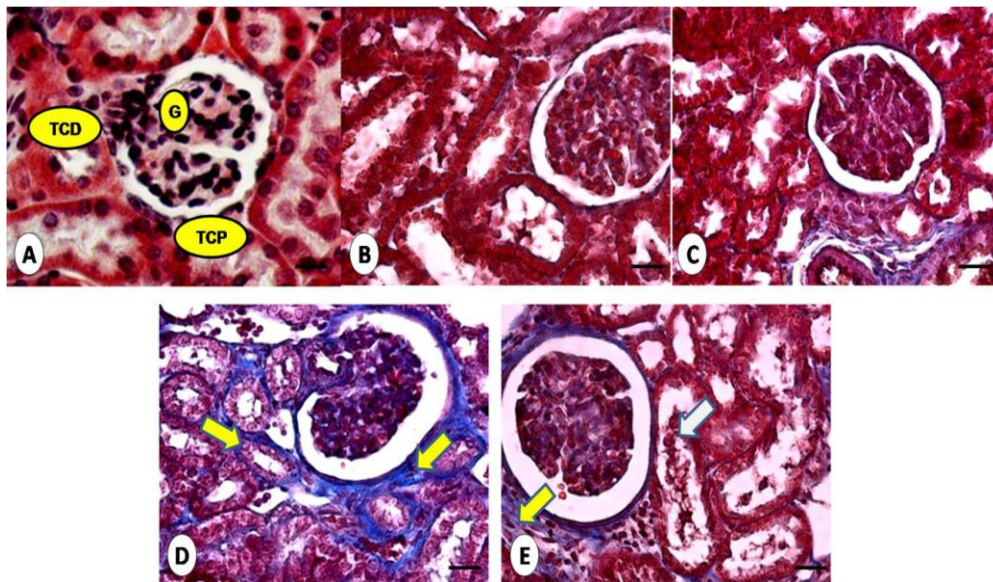


Fig. 9. Riñón de rata intoxicada con *Kh*. En el grupo I **A**) se observan túbulos contorneados proximales (TCP) y distales (TCD), así como glomérulos (G) de características histológicas normales. En los grupos II-V **B-E**) se observa un incremento de fibras de colágena en color azul, tanto alrededor del glomérulo, (G) como de los túbulos contorneados (TC) (flechas amarillas). Inclusión en parafina. Tricrómico de Massón, 40x.

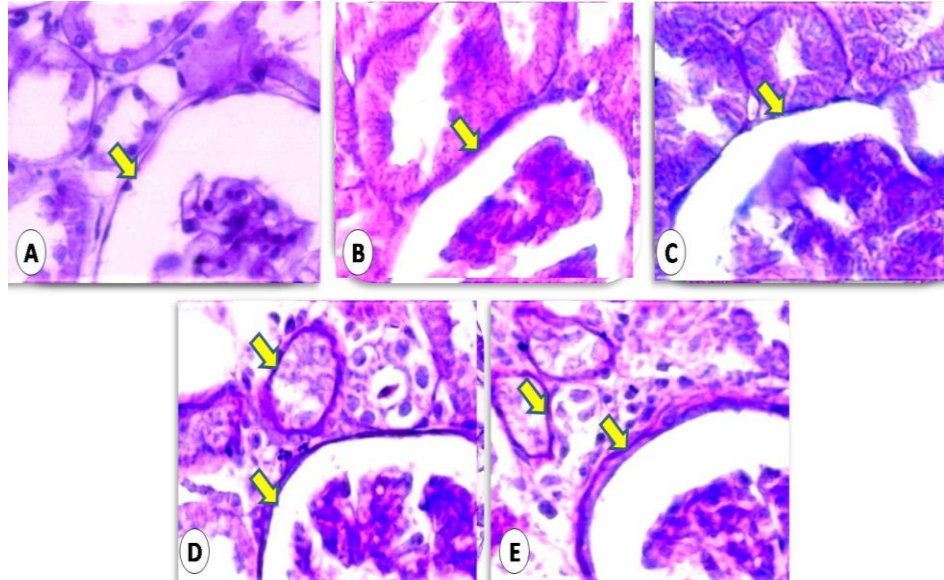


Fig. 10. Riñón de rata intoxicada con *Kh*. En el grupo I **A**) se observan las membranas basales como líneas delgadas y continuas en color magenta (flecha amarilla) de características histológicas normales. En los grupos II-V **B-E**) se observa un engrosamiento cada vez más evidente de las mismas (flechas amarillas). Inclusión en parafina. PAS con diastasa.

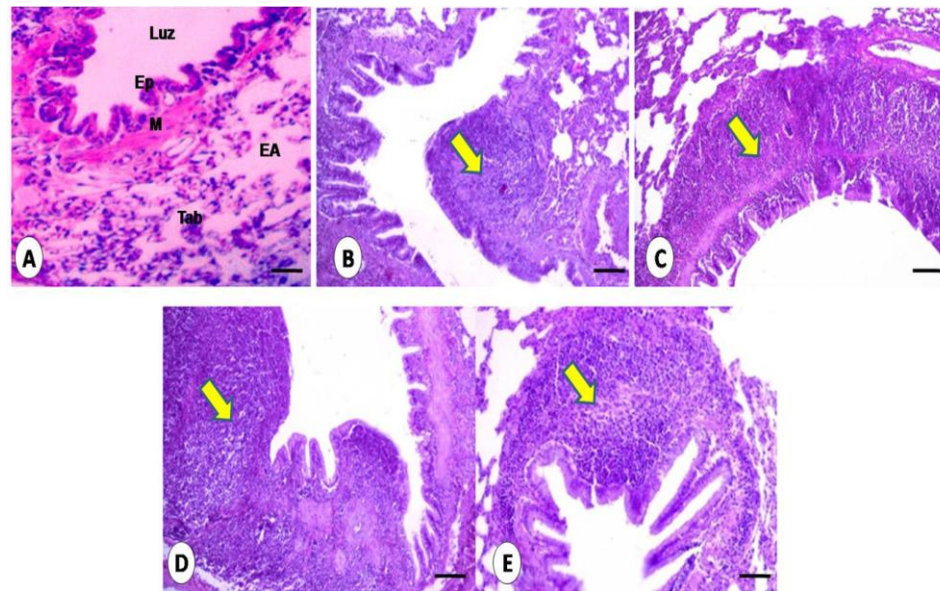


Fig. 11. Pulmón de rata intoxicada con *Kh*. En el grupo I **A**) se observa un bronquiolo recubierto por epitelio (Ep), y musculo liso (M) de características histológicas normales. En los grupos II-V **B-E**) se observan grandes acúmulos de células mononucleares en la pared del bronquiolo con invasión al musculo liso y epitelio (flechas amarillas). Inclusión en parafina. HyE, 40x.

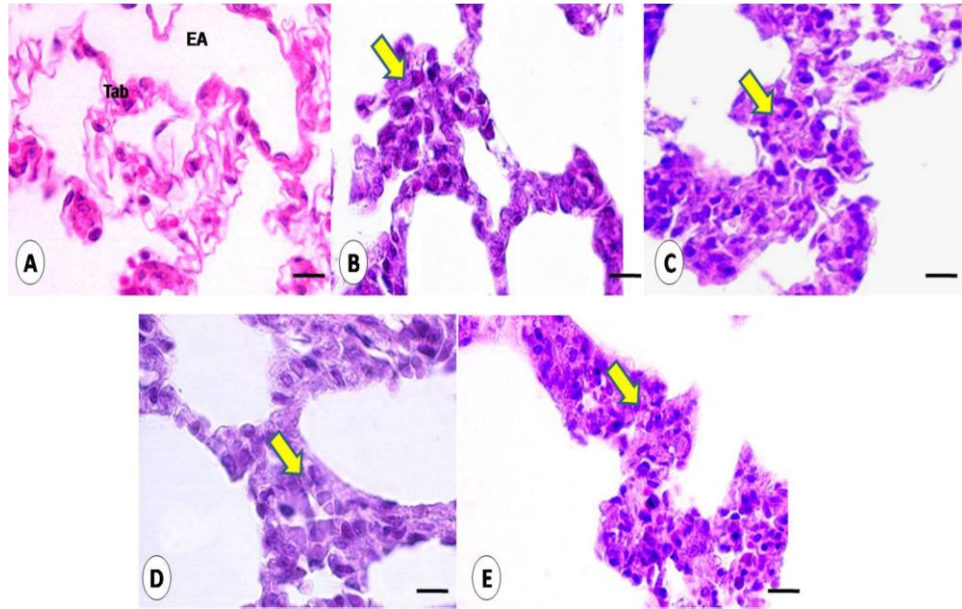


Fig. 12. Pulmón de rata intoxicada con *Kh*. En el grupo I **A**) se observa la histología normal de los tabiques interalveolares (tab). En los grupos II-V **B-E**) se observa un engrosamiento cada vez más evidente de los tabiques interalveolares (flechas amarillas). Inclusión en parafina. HyE, 40x.

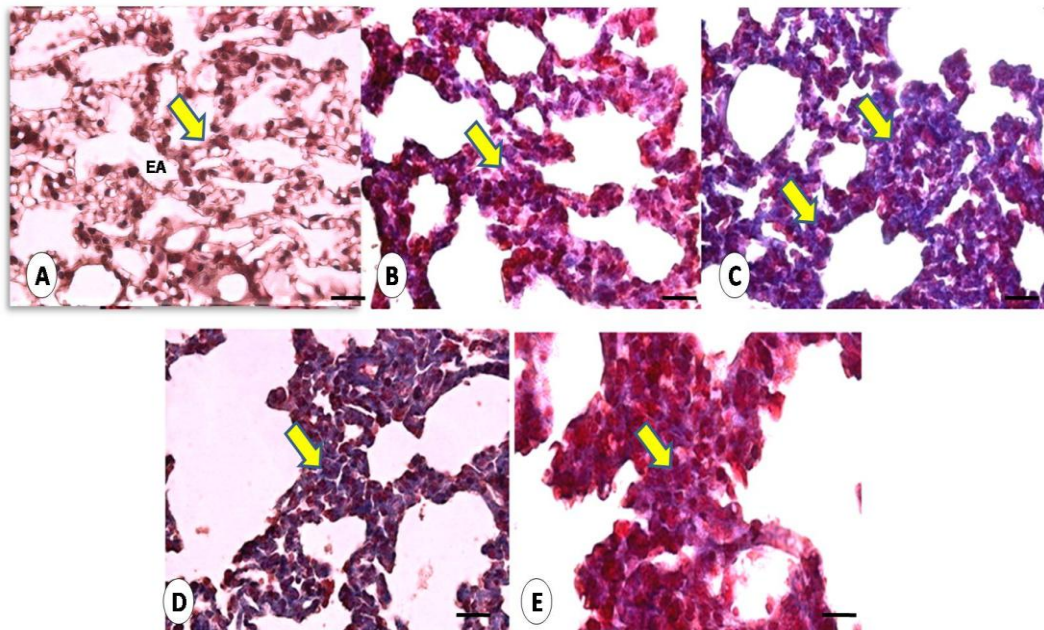


Fig. 13. Pulmón de rata intoxicada con *Kh*. En el grupo I **A**) se observa la histología normal de los tabiques interalveolares (flecha amarilla) y espacios alveolares (EA). En los grupos II-V **B-E**) se observa un incremento cada vez más evidente de las fibras de colágena en color azul (flechas amarillas). Inclusión en parafina. Tricrómico de Massón, 40x.

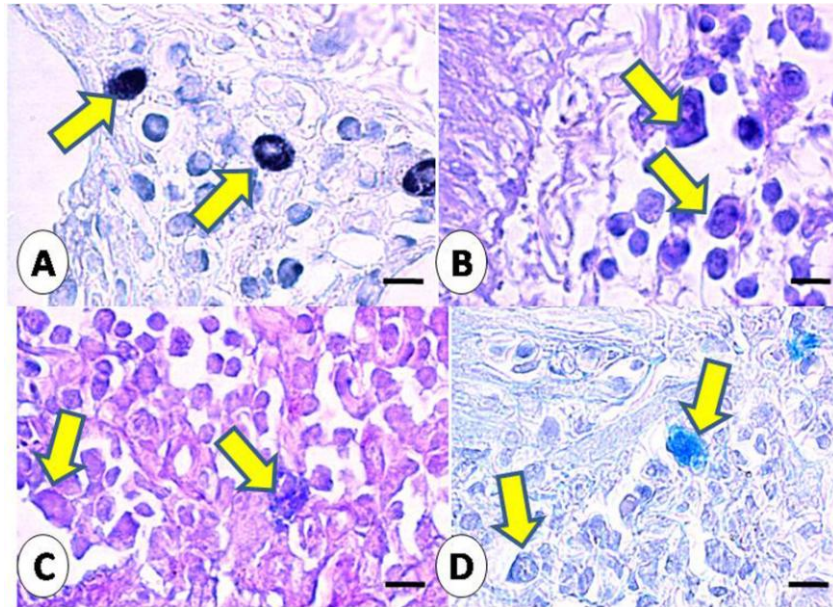


Fig. 14. Pulmón de rata intoxicada con *Kh*. **A)** Células cebadas teñidas con azul de toluidina (flechas amarillas). **B)** Células cebadas con gránulos PAS, **C)** AA/PAS, **D)** y AA/SAF positivos (flechas amarillas). Inclusión en parafina. 40x.

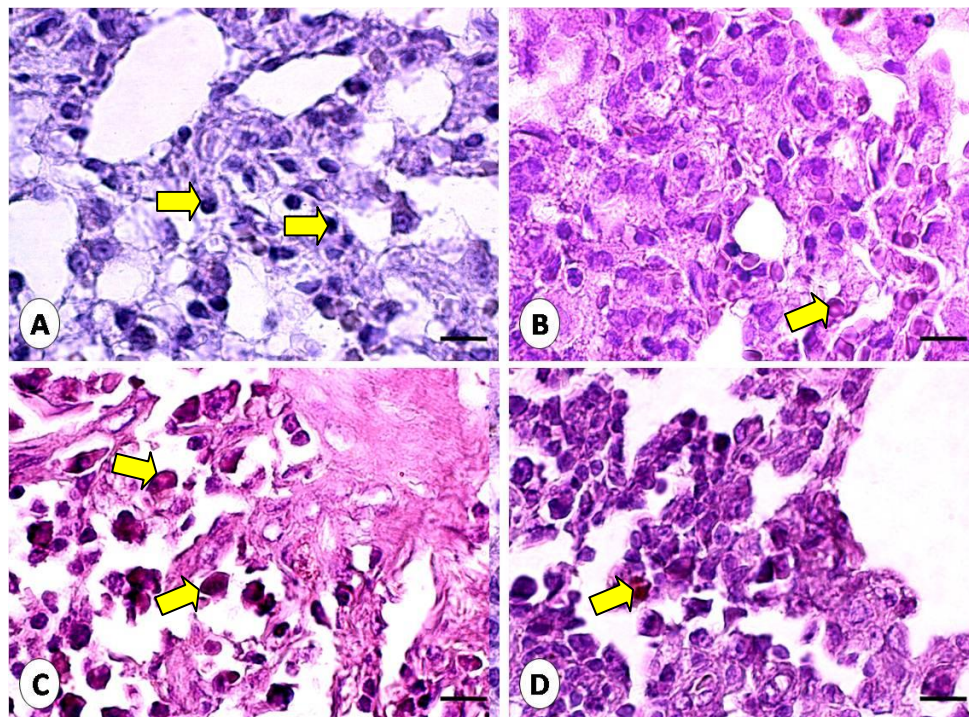


Fig. 15. Pulmón de rata intoxicada con *Kh*. En todos los grupos experimentales se observaron escasas células con positividad a los marcadores: **A)** CD3. **B)** CD20. **C)** CD15 y **D)** CD56 (flechas amarillas). Inclusión en parafina. Inmunohistoquímica, 40x.

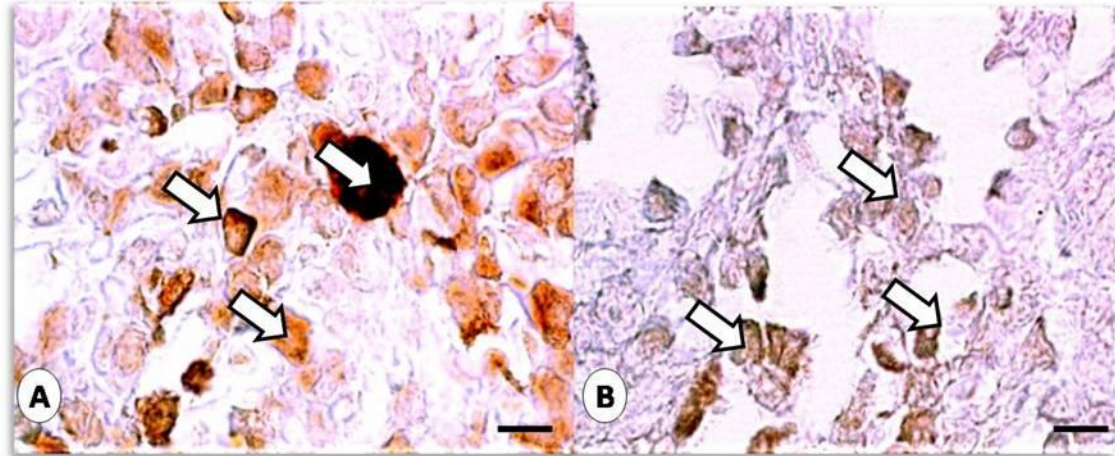


Fig. 16. Pulmón de rata intoxicada con *Kh*. Células cebadas marcadas con anticuerpos anti **A)** triptasa+ y **B)** CD117+ (flechas blancas). Inclusión en parafina. Inmunohistoquímica.40x.

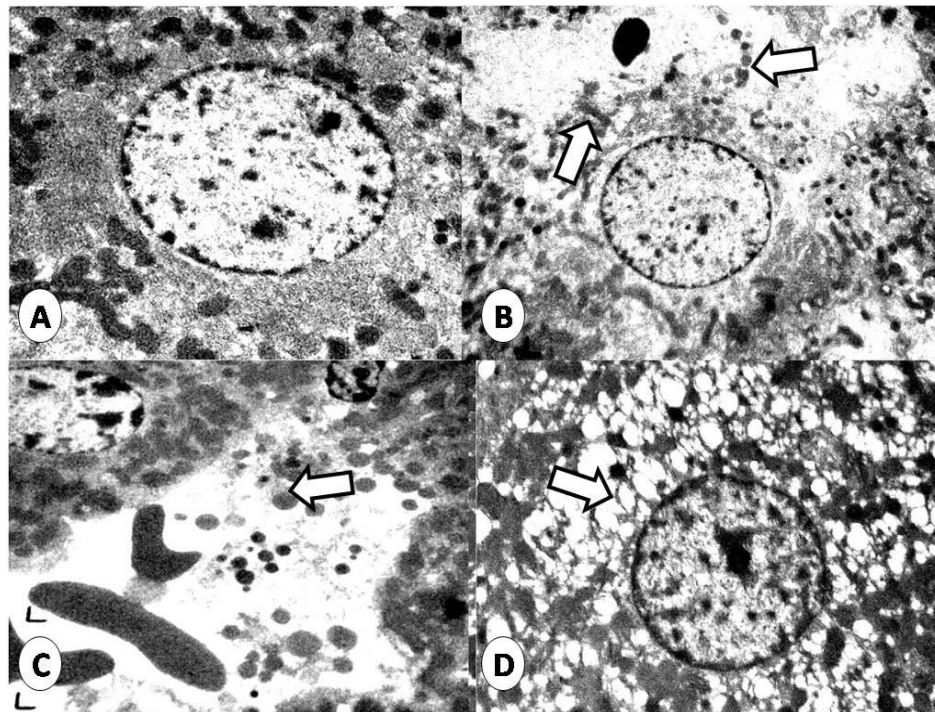


Fig. 17. Hígado de rata intoxicada con *Kh*. En el grupo I **A)** Se observa la ultraestructura normal. En los grupos intoxicados II-IV se observó **B)** necrosis hepática, **C)** congestión vascular y **D)** vacuolización del citoplasma (flechas blancas). Inclusión en resinas epóxicas. Microscopio electrónico de transmisión.

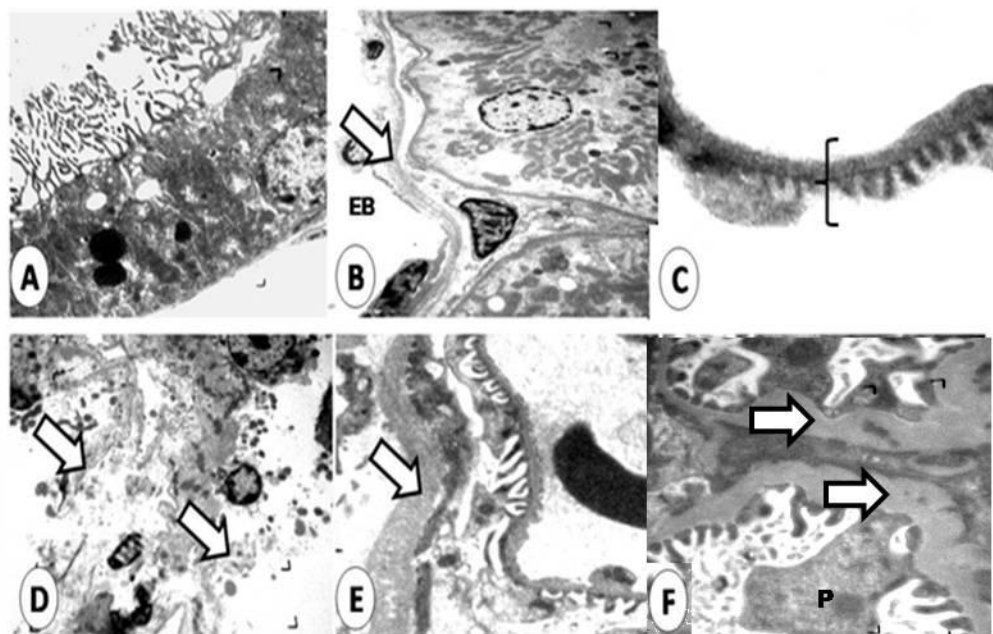


Fig. 18. Riñón de rata intoxicada con *Kh*. Ultraestructura normal de un **A)** túbulo contorneado proximal, **B)** cápsula de Bowman (flecha blanca), y **C)** barrera de filtración (llave). En los grupos intoxicados se observa **D)** necrosis tubular, **E)** engrosamiento de la cápsula de Bowman y **F)** barrera de filtración (Flechas blancas). Inclusión en resinas epóxicas. Microscopio electrónico de transmisión.

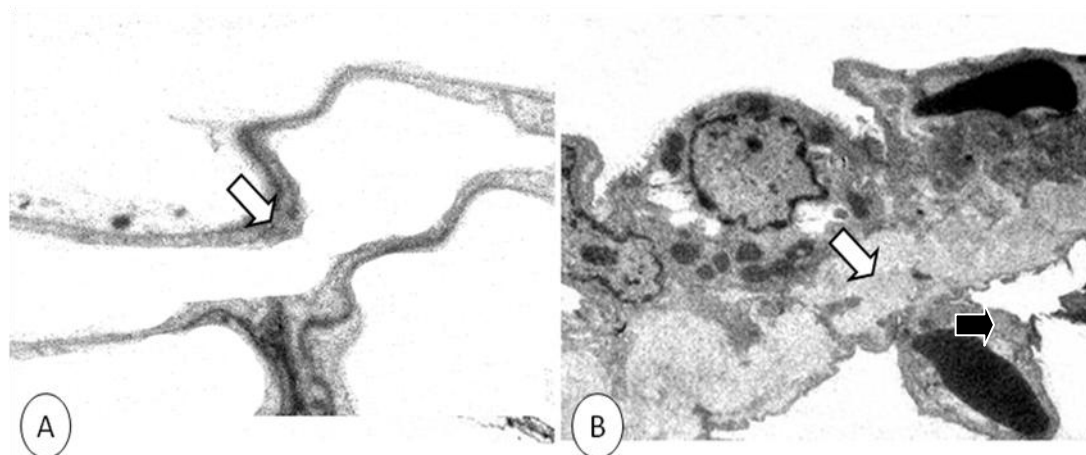


Fig. 19. Pulmón de rata intoxicada con *Kh*. **A)** Ultraestructura normal del tabique alveolar (flecha blanca) **B)** En los grupos intoxicados se observan abundantes depósitos de matriz extracelular en la membrana basal de los tabiques (flecha blanca) y capilares alveolares (flecha negra). Inclusión en resinas epóxicas. Microscopio electrónico de transmisión

Tabla 1. Promedio de células cebadas totales en pulmón con la tinción de azul de toluidina y promedio de células cebadas con gránulos PAS, AA/PAS y AA/SAF positivos.

<u>Pulmón</u>								
Grupo	AT (%)	Desv.		Desv.		Desv.		Desv.
		típica	PAS (%)	típica	AA/PAS (%)	típica	AA/SAF (%)	
Grupo I	8.29	±0.57	7.43	±1.48	5.43	±1.17	.08	±0.00
Grupo II	37.25(*)	±3.98	18.08(*)	±1.41	7.32	±1.56	0.45	±0.25
Grupo III	47.13(*)	±3.26	21.59(*)	2.54	14.26(*)	±2.41	1.16(*)	±0.84
Grupo IV	52.82(*)	±1.64	13.28(*)	1.28	30.79(*)	±2.08	0.16(*)	±0.24
Grupo V	59.88(*)	±2.46	31.99(*)	0.68	35.65(*)	±4.27	3.00(*)	±1.85

(*) Muestra que existe diferencia estadísticamente significativa en relación a su respectivo grupo control.

P≤0.05

Tabla 2. Análisis de varianza (ANOVA) de las muestras de pulmón.

ANOVA		
Pulmón		
Grupo	F	Sig.
Grupo I	8.748(*)	.017
Grupo II	8.462(*)	.018
Grupo III	7.166(*)	.026
Grupo IV	588.176(*)	.000
Grupo V	167.873(*)	.000

(*) Muestra que existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto a las varianzas inter-grupos PAS, AA/PAS y AA/SAF.

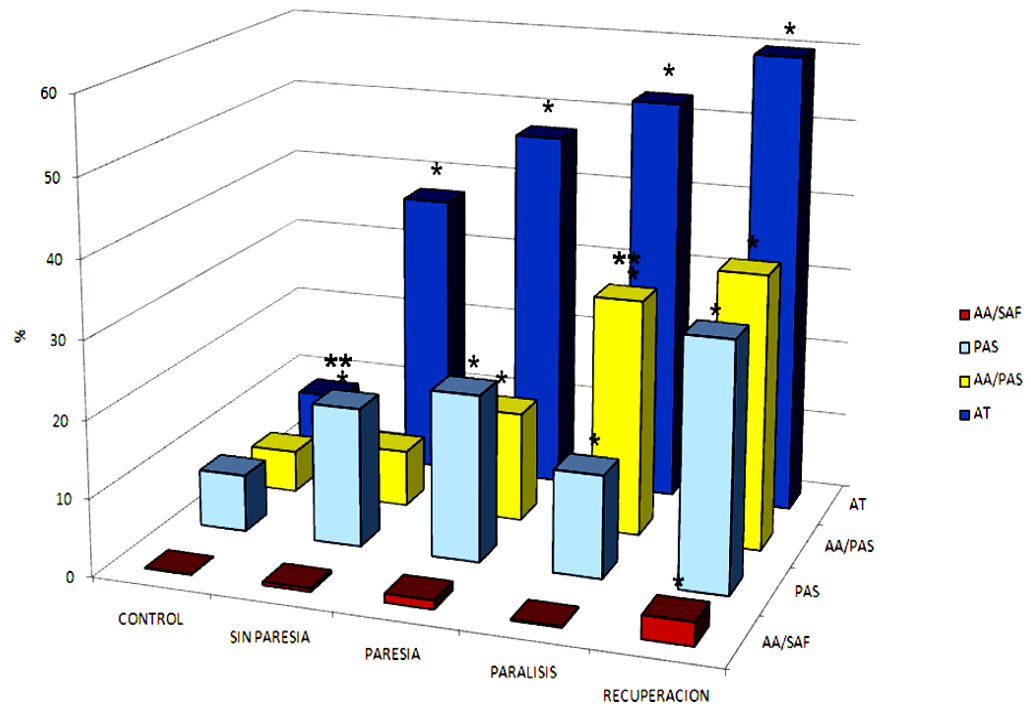
P≤0.05

Tabla 3. Prueba de Tukey en muestras de pulmón.

Diferencias					
Grupo	A	B	de medias A-B	Error típico	sig.
	PAS	AA/PAS	281333,00	168423,00	.290
Grupo I	PAS	AA/SAF	7.00000(*)	168423,00	.014
	AA/PAS	AA/SAF	418667,00	168423,00	.104
	PAS	AA/PAS	968833,00	452822,00	.162
Grupo II	PAS	AA/SAF	18.62333(*)	452822,00	.015
	AA/PAS	AA/SAF	893500,00	452822,00	.200
	PAS	AA/PAS	987667,00	860175,00	.522
Grupo III	PAS	AA/SAF	31.81167(*)	860175,00	.024
	AA/PAS	AA/SAF	2193500,00	860175,00	.096
	PAS	AA/PAS	-17.50167(*)	.89599	.000
Grupo IV	PAS	AA/SAF	13.12500(*)	.89599	.000
	AA/PAS	AA/SAF	30.62667(*)	.89599	.000
	PAS	AA/PAS	-366667,00	203818,00	.248
Grupo V	PAS	AA/SAF	30.35333(*)	203818,00	.000
	AA/PAS	AA/SAF	34.02000(*)	203818,00	.000

(*) Muestra que existen diferencias estadísticamente significativas entre células positivas a diferentes tipos de gránulos.

$P \leq 0.05$



Gráfica 1. Porcentaje de células cebadas de pulmón.

(*) Muestra que existe diferencia significativa en relación a su grupo control. Prueba t de Student.

(**) Muestra que existen diferencias significativas inter-grupos PAS y AA/PAS. Prueba de Tukey $P \leq 0.05$

Tabla 4. . Correlación de los hallazgos en hígado, riñón, pulmón, SNC y SNP con el cuadro clínico observado en las diferentes etapas del modelo de intoxicación crónica con *Kh*.

Etapa	Disnea	Perdida de peso	Alteraciones de la marcha	Parálisis flácida	Incremento de peso sostenido	Reversión de la parálisis
Sin paresia	+	+				
Paresia	++	+	++			
Parálisis	+++	+	+++	+++		
Recuperación	+				+	+
Órgano(s) relacionado(s)	Pulmón	Hígado	Nervio periférico Cerebro Cerebelo	Nervio periférico	Hígado	Nervio periférico
Hallazgos histopatológicos	•Fibrosis de los tabiques •Células cebadas	Esteatosis Necrosis	•Desmielinización •Perdida de células de Purkinje	•Desmielinización •Irregularidades en el trayecto axonal	•Reversión de esteatosis •Ausencia de necrosis	•Remielinización de

+ Leve ++ Moderada +++ Severa

Tabla 5. Correlación de los hallazgos en hígado, riñón, pulmón, SNC y SNP en las diferentes etapas del modelo de intoxicación crónica con *Kh*.

Etapa	Congestión vascular	Infiltrado de células cebadas	Irregularidades en el trayecto axonal	Cambios en la morfología neuronal	Morfología muy similar al grupo control
Sin paresia	+	+	+	+	
Paresia	+	++	+	+	
Parálisis	+	++	+	+	
Recuperación	+	+++		+	+
Órgano(s) afectado(s)	Hígado, pulmón y nervio periférico	riñón y pulmón y nervio periférico	Nervio periférico Tractos Nerviosos	Cerebro, cerebelo, medula espinal	Hígado, y nervio periférico y puente

+ Leve ++ Moderada +++ Severa

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio se acepta la hipótesis de trabajo. "La ingesta crónica del fruto completo de *Kh* produce una intoxicación sistémica y no exclusivamente del sistema nervioso central y periférico".

En este estudio se ha descrito por primera vez la morfología del hígado, riñón y pulmón en los diferentes grupos del modelo de intoxicación crónica con *Kh*.

En la literatura existen estudios que han evaluado la morfología de estos órganos durante la intoxicación con *Kh*, tanto con el fruto completo en modelos *in vivo* ⁽²⁶⁾ como con las toxinas aisladas tanto en modelos *in vivo*, como *in vitro* ⁽⁴⁷⁾ sin embargo, estos estudios se han enfocado en la intoxicación aguda con la administración de una sola dosis alta del fruto o de la toxina aislada. En estos estudios la muerte se presenta alrededor de las 58 horas y no se observan las etapas clínicas de neuropatía presentes en los pacientes intoxicados con *Kh* y que no mueren por la ingesta de este fruto; por otro lado, en nuestro modelo si se reproducen dichas etapas lo que resulta de vital importancia en el estudio clínico e histopatológico de esta intoxicación.

En el hígado se identificó la presencia de focos aislados de necrosis a diferencia de la necrosis generalizada vista en el modelo de intoxicación aguda con *Kh* en diferentes especies animales⁽²⁶⁾ lo que se ha confirmado con la identificación de un incremento en las transaminasas hepáticas AST y ALT⁽²⁷⁾ siendo esto indicativo de necrosis.

Por otro lado también se observó una esteatosis progresiva en los grupos II-IV, la esteatosis no ha sido reportada para la intoxicación crónica con *Kh* sin embargo, otros estudios han demostrado la aparición de la misma posterior a la intoxicación aguda con diversos compuestos químicos⁽⁴⁸⁻⁴⁹⁾ y se ha propuesto que es causada por una inhibición en el sistema transportador de lípidos hepáticos.⁽⁵⁰⁻⁵²⁾

La recuperación hepática no ha sido descrita para la intoxicación con *Kh*, sin embargo en otros estudios se ha demostrado que se presenta posterior a la inhibición del estímulo tóxico causal⁽⁵³⁾, lo que pudiera sugerir que en el grupo V (grupo de recuperación) de este estudio existe una disminución o ausencia del estímulo tóxico lo que a su vez permita la recuperación de este órgano.

En el riñón se observó necrosis tubular (lesión irreversible) lo que difiere de la vacuolización citoplasmática tubular (lesión reversible) reportada en un estudio de intoxicación aguda con *Kh*⁽²⁶⁾, por otro lado en otros estudios de intoxicación con esta planta se ha descrito la presencia de insuficiencia renal aguda⁽²⁸⁾, y

disminución del ATP tubular ⁽²⁹⁾, así como necrosis tubular en la intoxicación crónica con cadmio ⁽⁵⁴⁾ y aguda con veneno de serpiente ⁽⁵⁵⁾. En estos estudios se sugiere que el elevado gasto cardiaco de este órgano pueda favorecer el daño producido por los compuestos tóxicos.

Los depósitos de matriz extracelular en la membrana basal tubular, cápsula de Bowman y barrera de filtración no han sido descritos previamente para la intoxicación crónica con *Kh*, sin embargo estas alteraciones ya han sido descritas en otros modelos de intoxicación química con plantas y venenos ⁽⁵⁵⁻⁵⁶⁾ y se han relacionado con la estimulación de diversas citocinas fibrogénicas tales como TFN, IL1, IL6, TGF α y TFG β por distintos agentes químicos ⁽⁵⁷⁾, lo que sugiere que en la intoxicación crónica por *Kh* alguno o algunos de los compuestos químicos de esta planta pudieran estimular la liberación de citocinas fibrogénicas y favorecer la fibrosis.

En pulmón se presentó un importante incremento de células cebadas lo cual ha sido reportado en las muestra de nervio periférico con este mismo modelo de intoxicación, otros estudios también han reportado la aparición de células cebadas en pulmón posterior a la intoxicación con diversos agentes químicos ⁽⁴¹⁻⁴²⁾ lo que sugiere que alguno o algunos de los compuestos químicos de esta planta favorezca el incremento de dichas células en estos órganos y posterior liberación de mediadores químicos.

Al realizar los conteos de células cebadas con las distintas reacciones histoquímicas logramos identificar la expresión y liberación diferencial de mediadores en estas células. En otros estudios se ha demostrado que existen mediadores en los gránulos de células cebadas cuya liberación es regulada por distintas proteínas SNARE (Soluble NSF Attachment Protein) Receptor) ⁽⁵⁸⁾ las cuales pudieran ser estimuladas a diferentes tiempos por uno o múltiples mediadores explicando esta liberación diferencial.

Asimismo, se propone que estas variaciones en la liberación de los gránulos están relacionadas con los distintos roles de las células cebadas, ya sea de daño, recuperación o ambos durante esta intoxicación.

No existen en la literatura reportes acerca de los abundantes depósitos de matriz extracelular en los tabiques interalveolares y la barrera alveolocapilar posterior a la intoxicación con *Kh*, sin embargo otros estudios han demostrado que la triptasa de las células cebadas es capaz de estimular la síntesis de colágena por los fibroblastos pulmonares en modelos *in vitro* ⁽⁵⁹⁾, lo que podría explicar estos depósitos en pulmón ya que en este estudio fue posible identificar una gran cantidad de células cebadas en pulmón positivas a triptasa.

Al comparar estos resultados con los anteriormente reportados en SNC y SNP encontramos que la congestión es uno de los hallazgos más comunes en todos los

órganos. Un estudio previo de intoxicación con *Kh*⁽²⁷⁾ demostró la presencia de incrementos en el tiempo de sangrado y de protrombina además de una disminución en la actividad plasmática de los factores de coagulación II, V, VII y X lo que podría explicar la congestión generalizada.

Otro hallazgo interesante es que de todos los órganos analizados sólo el nervio periférico, el puerco ⁽²³⁻²⁵⁾ y el hígado presentaron una recuperación morfológica, a diferencia de los demás órganos analizados, lo que sugiere que no todos los órganos tienen la misma capacidad de recuperación por lo que es probable que el daño aunque severo sea reversible y que al disminuir o desaparecer el estímulo tóxico estos tengan la oportunidad de presentar una recuperación morfológica.

Por último, las alteraciones en hígado, riñón y pulmón son de aparición temprana y de tal intensidad que por sí solas pudieran ocasionar las diversas alteraciones en sistema nervioso central e incluso producir la muerte.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIÓN, CONTRIBUCIONES Y PERSPECTIVAS

5.1. Conclusión

Con estos resultados obtenidos podemos concluir lo siguiente:

La administración fraccionada del fruto completo de *Kh* produce una intoxicación sistémica y no exclusivamente del SNC y SNP, ya que afecta severamente al hígado, riñón y pulmón de los cuales sólo el hígado se recupera en la etapa clínica de recuperación de la parálisis (grupo V).

5.2. Contribuciones

Se describe por primera vez la histología, histoquímica y ultraestructura del hígado, riñón y pulmón en los distintos grupos del modelo de intoxicación crónica con el fruto maduro de *Karwinskia humboldtiana*.

Se describe por primera vez la probable participación de las células cebadas en el pulmón así como los cambios histoquímicos observados en los gránulos de las mismas.

5.3. Perspectivas

Evaluar por métodos fisiológicos el hígado, riñón y pulmón en los distintos grupos del modelo de intoxicación crónica.

Analizar morfológicamente el riñón y pulmón a tiempos mayores al del grupo de recuperación (112 días) para monitorear su evolución y determinar si existe o no recuperación morfológica.

Identificar el origen y factores de proliferación de las células cebadas.

Evaluar por medios inmunohistoquímicos la composición específica de los gránulos de las células cebadas.

Evaluar la posible participación de las células cebadas en la intoxicación con *Kh* administrando inhibidores de la desgranulación de las mismas.

.

BIBLIOGRAFÍA

1. Fernández, N. R. (1992) Nombres comunes uso y distribución del género *Karwinskia* (*Rhamnaceae*) en México. Anales Inst Biol Univ Auton Mex Set Bot.; 63(1):1-23
2. Flores, M, H, Linding-Cisneros, R. (2005) The list of common and botanical names of trees and strubs suitable for restoration of the woods of the republic by Fernando Altamirano and José Ramírez, more than 110 years after its publication. Rev. Mex. de Biod.;76:11-35
3. Tapia, P., Fernández, N., Gómez, A. (2004) Estudio Cromosómico de tres Especies de *Karwinskia* (*Rhamnaceae*) endémicas de México. Anales Inst Biol Univ Nal Aut Mex.; 75(1):1-10
4. Clavijero, F.X. (1982) Historia de la Antigua o Baja California. 1 Edición. Ed. Porrúa de Mex. 31-36.
5. Dreyer, D.L., Arai, I., Bachman, C.D., Anderson, W. R., Smith, R.G., Daves, G.D. (1975) Toxins Causing no Inflammatory Paralytic Neuropathy Isolation and Structure Elutidation. J. Am. Chem. Soc.;97: 4895-990
6. Waksman, N., Ramírez, R. (1992) Isolation of a new Dymeric anthracenone from *Karwinskia parvifolia*. Rev. Latinoam. Quim. 23/1 y 22/4 25-27
7. Rivas, V., Torres, R., Waksman, N. (1990) Dymeric anthracenones from *Karwinskia* species. Planta med. 56 562-564.
8. Castillo – Nájera, F. (1920) Contribución al estudio de la parálisis tóxica. Un envenenamiento colectivo con tullidora. En Memoria del V Congreso Médico Dirección de talleres gráficos Mex. 240-244.
9. Segovia- Philip, A., Zermeño, F. (1972) Polirradiculoneuritis tóxica por *Karwinskia humboldtiana*. A propósito de un caso. Biol. Med. Hosp. Infant. 29(1) 98-90.
10. Bustamante, S., Olvera, R., Correa, N. (1978) Intoxicación fatal por tullidora (*Karwinskia humboldtiana*). Gac. Méd. Méx.; 114, 241-244.
11. 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.
12. Arellano, E.C., Mendoza, J.C., Domínguez, F.C. (1994) Intoxicación por

- Karwinskia johnstonii*: Estudio de 12 pacientes. Bol. Méd. Hosp. Inf. Méx. 51 (2), 105-112.
13. Bermúdez, M.V., Lozano, F.E., Salazar, M.E., Waksman, N., Piñeyro, A. (1995) Intoxicación de una familia con *Karwinskia humboldtiana* (tullidora). Gac. Méd. Mex. (131),100-106.
 14. Ocampo, R.L., Ontiveros, N.O., Fernández, L.O. (2007) Intoxication with buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*): report of three siblings. Pediatr. Dev. Pathol. 10 (1), 66-68.
 15. Bermúdez, M.V., Lozano, F.E., Tamez, V.A., Díaz, C.G., Pineyro, A. (1995) Frecuencia de la intoxicación con *Karwinskia humboldtiana* en México. Salud Pública de Mex. (37) 57-62
 16. Arreola, M., Vázquez, J., González, M. (2000) Geographical factors in the epidemiology of intoxication by *Karwinskia* (tullidora) in México. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 16(1):255-260,
 17. 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.
 18. Charlton, K.M. and Pierce, K.R. (1969) A neuropathy in experimental coyotillo poisoning in goats. Texas Rep. Biol. Med. 27: 389-399.
 19. Charlton, K.M. and Pierce, K.R. (1970) A neuropathy in goats caused by experimental coyotillo (*Karwinskia humboldtiana*) poisoning. II. Lesions in the peripheral nervous system-teased fiber and acid phosphatase studies. Path. vet. 7: 385-407.
 20. 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.
 21. Muñoz, M.E. and Chávez, B. (1979) Conduction block and functional denervation caused by tullidora (*Karwinskia humboldtiana*). Exp. Neurol. 65: 255- 270.
 22. Escobar, A., Nieto, D. (1965). Aspectos neuropatológicos de la intoxicación con *Karwinskia humboldtiana*. Estudio experimental. Gac. Med. Mex. (2), 163-177.
 23. Salazar, M.E., Flores, M.S., Sepúlveda, J., Romero, V., Becerra, E., Tamez, V., Martínez, H.R., Piñeyro, A., Bermudez, M.V. (2006) An experimental model of peripheral neuropathy induced in rats by *Karwinskia humboldtiana*(buckthorn) fruit. J. Peripher. Nerv. Syst.11 253-261.

24. Becerra, E. Ballesteros, R., Bermúdez, M.V., Sepúlveda, J. (2005) Cambios histoquímicos y ultraestructurales del nervio ciático de la rata con intoxicación crónica con fruto molido de *Karwinskia humboldtiana* por vía oral. Tesis de maestría U.A.N.L.
25. Becerra, E., Bermúdez, M.V., Salazar M.E., Ancer, J., Romero, V., Soto, A., Ballesteros, R., Saucedo, O., Piñeyro, A., Sepúlveda, J. (2009) *Karwinskia humboldtiana* (buckthorn) fruit causes central nervous system damage during chronic intoxication in the rat. *Toxicol* 53 645–651
26. Bermúdez, M.V., Martínez, F.J., Salazar, M.E. Waksman, N., Piñeyro, A. (1992) A experimental acute intoxication with Ripe Fruit of *Karwinskia humboldtiana* (tullidora) in Rat, Guinea pig, Hamster and Dog. *Toxicol*. 30 1493-1496
27. Jaramillo, J., Rodríguez, V., Castillo, C., Quezada, T., Cerda, G., Posadas, F., Taboada, C. (2009) Daño hepático y en la coagulación de la sangre producido por la administración de los frutos maduros de la planta tullidora (*Karwinskia humboldtiana*) en la rata. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* 40 (1): 28-34.
28. Jaramillo-Juárez, F., Ortiz, G. G., Rodríguez-Vázquez, M. L., Falcón-Franco, M. A., Feria-Velasco, A. (1995). Renal failure during acute toxicity produced by tullidora ingestión (*Karwinskia humboldtiana*). *Gen. Pharm: Vasc. Syst.* 26(3): 649-653.
29. Jaramillo-Juárez, F., Rodríguez-Vázquez, M.L., Muñoz-Martínez. J., Quezada-Tristán, T., Posadas del Río, F.A., Llamas-Viramontes, J., Ortíz, G.G., Feria-Velasco, A., Reyes, J.L. (2005). The ATP levels in kidneys and blood are mainly decreased by acute ingestion of tullidora (*Karwinskia humboldtiana*). *Toxicol* 46(1): 99-103.
30. Kitamura, Y., Kanakura Y. (1987). Differentiation and Transdifferentiation of Mast Cells; a Unique Member of the Hematopoietic Cell Family. *Int. J. Cell Cloning* 5(2): 108-121.
31. Metcalfe, D. D., Baram, D. (1997). Mast cells. *Physiol. Rev.* 77(4): 1033-1079.
32. Takeoka, O., Angevine, D. M., Lalich, J. (1968) Stimulation of Mast Cells in Rats Fed Various Chemicals. *Am. J. Pathol.* 40, 545-554.
33. Esposito, P., Chandler, N., Kandere, K., Basu, S., Jacobson, S., Connolly, R., Tutor D., Theoharides, T. C. (2002). Corticotropin-Releasing Hormone and Brain Mast Cells Regulate Blood-Brain-Barrier Permeability Induced by Acute Stress. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303(3): 1061-1066.
34. León, Buriani. (1994) Mast cells synthesize, store, and release nerve

growth factor. Proc. Natl. Acad. Sci. .91 (9) 3739-3743.

35. Raposo, G., Tenza, D. (1997). Accumulation of Major Histocompatibility Complex Class II Molecules in Mast Cell Secretory Granules and Their Release upon Degranulation. Mol. Biol. Cell 8(12): 2631-2645.
36. Vincent-Schneider, H., Thery, C. (2001). Secretory granules of mast cells accumulate mature and immature MHC class II molecules. J. Cell Sci. 114(2): 323-334.
37. De Paulis, A., Minopoli, G. (1999). Stem Cell Factor Is Localized in, Released from, and Cleaved by Human Mast Cells. J. Immunol 163(5): 2799-2808.
38. Dvorak, M. E., Lichtenstein, L.M., Weller, P.F., 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.
39. Olson, Y. (1968). Mast cell in the nervous sistem. Int. Rev. Cytol. 24: 27-70.
40. Olson, Y., J. Sjöstrand (1969). Proliferati3n of mast cell in periphereal nerves during Wallerian degenerati3n: a radioautographic study. Acta Neurophatol 13: 111-122.
41. Kay, J.M., Gillund (1967) Mast cells in the lungs of rats fed on *Crotalaria spectabilis* seeds. Am J Pathol. 51(6) 1031-1044
42. Doebler, J. A., Martin, L. J. (1992). Mesenteric mast cell degranulation in acute T-2 toxin poisoning. Toxicol. Lett. 62(1): 33-38.
43. Jaćević, V., Bokonjić, D. (2007) Morphometric changes of cardiac mast cells in rats acutely poisoned by T-2 toxin, Acta. Vet. 57, 47-57.
44. Taylor, J. W., Bidard, J. N.(1984). The characterization of high-affinity binding sites in rat brain for the mast cell-degranulating peptide from bee venom using the purified monoiodinated peptide. J. Biol. Chem. 259(22): 13957-13967.
45. Okano, Y., Takagi, H. (1985). A wasp venom mastoparan-induced polyphosphoinositide breakdown in rat peritoneal mast cells. FEBS Lett. 188(2): 363-366.
46. De-Matos, I. M., Talvani, A. (2001). Evidence for a role of mast cells in the lung edema induced by *Tityus serrulatus* venom in rats. Toxicon 39(6): 863-867.

47. Garza-Ocañas, L., Hsieh, G. C., Acosta, D., Torres-Alanís, O., Piñeyro, A. (1992). Toxicity assessment of toxins T-514 and T-544 of buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*) in primary skin and liver cell cultures. *Toxicology*. 73(3): 259-267.
48. Riet-Correa, F., Schield, A. L., Méndez, M. C., Pinheiro, M. H. (1986). Intoxicação por *Cestrum parqui* (Solanaceae) em bovinos no Ríó Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 6: 111-115.
49. Islas, A. (1991). Intoxicación con palqui (*Cestrum parqui*) en bovinos. *Patología Animal*. Vol. 5 (1): 32-33
50. Xu, A., Wang, Y., Keshaw, H., Xu, L. Y., Lam, K. S. L., Cooper G. J. S. (2003). The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J. Clin. Inv.* 112(1): 91-100.
51. Jaeschke, H., Gores, G. J., Cederbaum, A. I., Hinson, J. A., Pessayre D., Lemasters, J. J. (2002). Mechanisms of Hepatotoxicity. *Toxicol. Sci.* 65(2): 166-176.
52. Fromenty, B., Pessayre, D. (1995). Inhibition of mitochondrial beta-oxidation as a mechanism of hepatotoxicity. *Pharmacol. Ther.* 67(1): 101-154.
53. Fausto, N. (2000). Liver regeneration. *J. Hepatol.* 32: 19-31.
54. Brzóska, M. M., Kamiński, M., Supernak-Bobko, D., Zwierz K., Moniuszko-Jakoniuk J. (2003). Changes in the structure and function of the kidney of rats chronically exposed to cadmium. I. Biochemical and histopathological studies. *Arch. Toxicol.* 77(6): 344-352.
55. Reyes, A., Aguilar, L., Vargas, C., Peinado Á. (2009) Histological injuries in rat's kidneys induced to low dose of snake's poison *Bothrops asper*. *Rev. Electrón. Vet.* Vol 10 no 9
56. Kimmelstiel, P., Wilson, C. (1936). Intercapillary lesions in the glomeruli of the kidney. *Am J Pathol.* ;12:83-98.
57. Ortiz, A., Gómez-Chiari, M., Alonso, J., Serón, D., Condom, E., González, E., Egido, J. (1992) La participación de citoquinas y matriz extracelular en la progresión del daño renal. *Nefrología* 12 (5): 22-32.
58. Puri, N., Roche, P. A. (2008). Mast cells possess distinct secretory granule subsets whose exocytosis is regulated by different SNARE isoforms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105(7): 2580-2585.

59. Cairns, J. A., Walls, A. F. (1997). Mast cell tryptase stimulates the synthesis of type I collagen in human lung fibroblasts. *J. Clin. Invest.* 99(6): 1313-1321.

APÉNDICE

A.1. FIJACIÓN Y TÉCNICA HISTOLÓGICA

Fijación

Paraformaldehído al 4%.

Reactivos:

Paraformaldehído 20 gr.

Agua destilada 450 mL

Procedimiento:

1. Calentar a 60°C por 30 min.
2. Adicionar 50 mL de PBS 10X.
3. Ajustar pH a 7.2 con un potenciómetro.
4. Aforar a un volumen de 500 mL.

Técnica histológica

Reactivos:

Etanol

Xilol

Parafina

Agua destilada

1. Obtener fragmentos de hígado, riñón y pulmón y sumergir en paraformaldehído al 4% mínimo 12 horas.
2. Lavar en agua corriente.
3. Deshidratar en alcoholes graduales
 - Etanol al 60% 60 min.
 - Etanol al 70% 60 min.
 - Etanol al 80% 60 min.
 - Etanol al 96% 60 min.
 - Etanol al 96% 60 min.
 - Etanol absoluto 60 min.
 - Etanol absoluto 60 min.
4. Colocar los fragmentos en etanol-xilol 1:1 por 60 min.
5. Colocar los fragmentos en xilol 60 min. dos veces.
6. Preincluir los fragmentos en parafina líquida a 60°C.
7. Inclusión definitiva de los fragmentos con parafina y dejar solidificar.

A.2. 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.

A.3. TÉCNICA DE TINCIÓN CON HEMATOXILINA Y EOSINA (HyE)

Reactivos:

Xilol

Etanol absoluto

Agua destilada

Hematoxilina de Gill *

Agua destilada	730 mL	Yodato de sodio	0.2 g
Etilenglicol	250 mL	Sulfato de aluminio	17.6 g
Hematoxilina (polvo)	anhidra 2.0 g	Ácido glacial	acético 2.0 mL

* Si está en cristales pesar 2.36 g

* Para preparar se debe seguir el orden, agitar a temperatura ambiente (TA) por 1 hr., filtrar la primera vez antes de usar.

Solución de alcohol-ácido.		Solución de agua amoniacal 1% v/v	
Etanol de 70°	99 mL	Hidróxido de amonio	1 mL
Ácido clorhídrico	(HCl) 1 mL	Agua destilada	99 mL

Eosina (Solución stock):

Eosina amarillenta	1.0 g
Agua destilada	20 mL
Etanol de 96°	80 mL

Solución de trabajo:

Tomar una parte de la solución stock y agregar en tres partes de alcohol de 80 °C. Antes de usar agregar 0.5 mL de ácido acético glacial, por cada 100 mL de colorante preparado y agitar.

Procedimiento:

- 1.- Desparafinar los cortes con xilol por 5 min.
- 2.- Hidratar con etanol-xilol por 5 min.
- 3.- Hidratar con etanol absoluto y etanol de 96° por 2 min c/u.
- 4.- Enjuagar lentamente con agua destilada.

- 5.- Sumergir los cortes en hematoxilina de Gill, 2 min.
- 6.- Enjuagar lentamente en agua de la llave (2 lavados).
- 7.- Sumergir rápidamente en alcohol ácido (1 inmersión).
- 8.- Enjuagar lentamente con agua de la llave (2 lavados).
- 9.- Sumergir rápidamente en agua amoniacal (2 inmersiones).
- 10.- Enjuagar lentamente con agua de la llave (2 lavados).
- 11.- Enjuagar lentamente con agua destilada.
- 12.- Sumergir los cortes en eosina (6 inmersiones).
- 13.- Deshidratar con etanol de 96° (2 cambios) 2 min c/u.
- 14.- Sumergir en etanol absoluto (2 cambios) 2 min c/u.
- 15.- Sumergir en etanol-xilol 3 min.
- 16.- Sumergir en xilol (2 cambios) 2 min c/u.
- 17.- Montar con resina sintética.

A.4. MÉTODO DE TRICRÓMICO DE MASSON.

Reactivos.

Solución de fucsina ácida		Solución de escarlata de Biebrich	
Fucsina ácida	1 g	Escarlata de Biebrich	1 g
Agua destilada	100 mL	Agua destilada	100 mL

Solución de fucsina ácida y escarlata de Biebrich.

Escarlata de Biebrich al 1 %	90 mL
Fucsina ácida al 1 %	10 mL
Ácido acético glacial	1 mL

Solución de ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico.

Ácido fosfomolibdico	5 g
Ácido fosfotúngstico.	5 g
Agua destilada	200 mL

* Se recomienda disolver primero el Ac. fosfotúngstico y luego agregar poco a poco el Ac. fosfomolibdico.

Solución acuosa de ácido acético 1%

Ácido acético glacial	1 mL
Agua destilada	99 mL

Solución fijadora de Bouin

Solución acuosa sat. de ácido pícrico	75 mL
Formaldehído (36-38 %)	25 mL
Ácido acético glacial	5 mL

Solución enjuagadura sulfurosa

Agua	300 mL
Ác. clorhídrico 1 N	15 mL
Metabisulfito de sodio 10 %	18 mL

Solución metabisulfito de sodio 10 %

Metabisulfito de sodio 10 %	10 g
Agua	100 mL

Hematoxilina férrica de Weigert

Solución A

Hematoxilina (anhidra)	1g
Etanol de 96°	100 mL

Solución B

Cloruro férrico acuoso al 29%	4 mL
Agua destilada	95 mL
Ácido clorhídrico conc.	1 mL

Solución de trabajo:

Mezclar partes iguales de la solución A y B. (Debe renovarse periódicamente dependiendo del uso y consistencia, precipita con el tiempo)

Fijar los tejidos con solución acuosa de formalina.

Incluir en parafina.

Usar cortes histológicos de 6 µm.

Procedimiento:

- 1.- Desparafinar con xilol e hidratar pasando por etanol absoluto hasta agua destilada.
- 2.- Usar como "mordente" el fijador de Bouin por 60 min a 56 °C.
- 3.- Lavar en agua corriente hasta que el color amarillo desaparezca.

- 4.- Enjuagar los cortes en agua destilada.
- 5.- Pasar los cortes a la hematoxilina férrica de Weigert durante 10 min.
- 6.- Lavar en agua corriente por 5 min.
- 7.- Enjuagar en agua destilada.
- 8.- Teñir con la solución de fucsina-escarlata por 1 min.
- 9.- Lavar varias veces en agua destilada hasta que ésta deje de teñirse.
- 10.- Pasar los cortes a la solución de ácidos fosfomolibdico-fosfotúngstico durante 10 min. Enjuagar brevemente con agua destilada.
- 11.- Teñir con la solución de azul de anilina durante 1 min.
- 12.- Lavar con agua destilada hasta eliminar el exceso del colorante.
- 13.- Pasar al ácido acético por 2 min.
- 14.- Deshidratar en etanol de 96° por unos seg. (cuidar que no se decolore).
- 15.- Continuar con el etanol absoluto hasta aclarar en xilol y montar en resina.

A.5. TÉCNICA DE IMPREGNACIÓN ARGÉNTICA DE WILDER.

Reactivos:

Plata amoniacal para reticulina

1. Solución de nitrato de plata al 10%
2. Solución de hidróxido de sodio al 3 %
3. Solución de hidróxido de amonio al 28%

A 5 mL de la solución de nitrato de plata se le agrega hidróxido de amonio gota a gota hasta que el precipitado que se forma en un principio se disuelva y vuelva a tener un color claro. Luego se agregan 5 mL de hidróxido de sodio (se precipita nuevamente), entonces se vuelve a disolver hidróxido de amonio gota a gota. Finalmente se completa la solución formada con agua bidestilada hasta completar 50 mL. El reactivo se debe de preparar antes de utilizar.

Solución reductora

Agua bidestilada	48 mL
Formaldehído 38%	0.5 mL
Nitrato de uranilo al 1%	1.5 mL

Nitrato de uranilo al 1%

Nitrato de uranilo	1g
Agua bidestilada	100 mL

NaOH al 3%

NaOH	3g
Agua destilada	100 mL

Procedimiento:

1. Desparafinar con xilol e hidratar hasta agua destilada
2. Oxidar en ácido fosfomobíldico por 1 min.
3. Lavar bien con agua corriente
4. Pasar a la solución de nitrato de uranilo por un min.
5. Enjuagar en agua destilada o bidestilada de 10 a 20 seg.
6. Pasar los cortes en la solución de plata amoniaca de 3 a 5 min.
7. Enjuagar en agua destilada
8. Pasar a la solución reductora por un min. (desecharla después)
9. Enjuagar bien en agua destilada o bidestilada (3 cambios)
10. Pasar a cloruro de oro por 2 min. hasta que los cortes pierdan su color amarillento
11. Enjuagar en agua destilada
12. Pasar los cortes a la solución de tiosulfato de sodio al 5% durante 2 a 3 min.
13. lavar bien en agua corriente
14. Contrastar si se desea con rojo rápido o con eosina
15. Enjuagar bien en agua estilada
16. Deshidratar con alcoholes, aclarar en xilol y montar.

A.6. TÉCNICA HISTOQUÍMICA DE ÁCIDO PERYÓDICO DE SCHIFF (PAS) CON DIASTASA

Reactivos:

Reactivo de Schiff (Sigma).

Solución de ácido peryódico al 5%:

Ácido peryódico (cristales)	2.5 g
Agua destilada	50 mL

Solución enjuagadora sulfurosa:

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

Alcohol ácido:

Etanol 70°	99 mL
HCl concentrado	1.0 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

Agua amoniacal:

Agua destilada	99 mL
Hidróxido de amonio	1.0 mL

Procedimiento:

1. Desparafinar las laminillas
2. Colocar las laminillas en solución acuosa de ácido peryódico por 7.5 min. aproximadamente.
3. Enjuagar con agua destilada varias veces.
4. Colocar las laminillas en el reactivo de Schiff de 13-15 min.
5. Diferenciar en solución enjuagadora: dos cambios de 2 min. cada uno.
6. Lavar en agua corriente 3-5 min.
7. Enjuagar en agua destilada.
8. Contrastar con hematoxilina de Gill de 1-2 min.
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

A.7. TÉCNICA HISTOQUÍMICA DE ROJO OLEOSO.

Reactivos:

Isopropanol al 60% v/v

Alcohol Isopropílico o isopropanol 60 mL

Agua destilada 40 mL

Isopropanol al 99 % v/v

Alcohol Isopropilico o isopropanol 99 mL

Agua destilada 1 mL

Solución saturada de rojo oleoso

Se adiciona poco a poco el polvo del colorante de rojo oleoso al isopropanol al 99% hasta que se forme un sedimento que ya no se disuelva.

Solución de trabajo

La solución de trabajo se debe de preparar una hora antes de utilizarla y se realiza mezclando 3 partes de una solución saturada de rojo oleoso con dos partes de agua destilada y filtrarlo justo antes de usar.

Gelatina glicerinada (medio de montaje acuoso)

Gelatina pura en polvo 7g.

Agua destilada 42 mL

Glicerina 50 mL

Ácido fenico o fenol 1g.

Se disuelve la gelatina en el agua lentamente sin formar grumos, luego agregar la glicerina y calentar en baño maría y agitando se añade el fenol, por último se filtra en caliente. Si no se usará inmediatamente conviene refrigerar y al momento de usarse se calienta levemente para licuar la gelatina.

Procedimiento:

1. Los cortes por congelación ya secos se sumergen en isopropanol al 60%
2. Teñir por 15 min. en la solución de trabajo
3. Diferenciar en isopropanol al 60% hasta que un corte de control de lípidos aparezca coloreado
4. Lavar en agua y luego contrastar los núcleos con hematoxilina de Gill por 2 a 3 min.
5. Lavar bien en agua corriente
6. Enjuagar en agua destilada y montar en gelatina-glicerina

A.8. TÉCNICA DE TINCIÓN CON AZUL DE TOLUIDINA.

Reactivos:

Buffer	Wallpole	pH	<u>Solución de trabajo:</u>	
4.2:				
Ácido acético 0.01 M	37.5 mL		Isopropanol	50 mL
Acetato de sodio 0.01 M	12.5 mL		Buffer Walpole pH 4.2	50 mL

Ajustar pH a 4.2

Azul de toluidina

1 g

Procedimiento:

1. Desparafinar las laminillas.
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 min.
5. Deshidratar y montar las laminillas.

A.9. 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

Reactivo de Schiff
(Sigma).

Hematoxilina de

Gill:

Agua destilada	730 mL
Etilenglicol	250 mL
Hematoxilina anhidra	2 g
Yodato de sodio	0.2 g
Sulfato de amonio	17.6 g
Ácido acético glacial	2 mL

Procedimiento:

1. Desparafinar las laminillas (Apéndice G).
2. Colocarlas en azul alciano por 5 min.
3. Lavar en agua corriente y enseguida en agua destilada.
4. Colocar las laminillas en el reactivo de Schiff por 15 min.
5. Lavar en agua corriente de 5-10 min.
6. Teñir ligeramente los núcleos con hematoxilina de Gill por 1 min.
7. Lavar en agua destilada.
8. Deshidratar y montar las laminillas

A.10. 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.
2. Colocar las laminillas en la solución de trabajo por 15 min.
3. Lavar en agua corriente.
4. Deshidratar y montar las laminillas.

A.11. 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.

A.12. CUBIERTA DE PORTAOBJETOS CON SOLUCIÓN ADHESIVA DE POLI-L-LISINA

Solución de trabajo:

Poli-L-lysine solution (Sigma-Aldrich®) 5 mL

Agua ultra-purificada 45 mL

* En la preparación y el uso de esta solución se deben usar contenedores de plástico.

Procedimiento:

Sumergir los portaobjetos en la solución de trabajo de Poli-L-lisina en un contenedor de plástico por lo menos por 5 min. y después dejar secar a TA.

A.13. MÉTODO DE INMUNOHISTOQUÍMICA

Solución tween 20-tris-buffer salino (TBST)		Solución recuperadora de antígenos (TRS)	
Envision™ Flex Wash Buffer 20x	25 mL	Dako® Target Retrieval Solution High pH 10x concentrate	10 mL
Agua ultra-purificada	475 mL	Agua ultra-purificada	90 mL

Solución de sustrato-cromógeno

Envision™ Flex Substrate Buffer	1 mL
Envision™ Flex DAB+Chromogen	50 µL

Fijar los tejidos con solución amortiguada de formalina.

Incluir en parafina.

Usar cortes histológicos de 4 µm. montados en laminillas cubiertas con solución adhesiva.

Procedimiento:

1. Desparafinar e hidratar los cortes:
2. Xilol (2 cambios) 5 min.
3. Etanol absoluto 3 min.
4. Etanol al 95 % 3 min.
5. Etanol al 70 % 3 min.
6. Agua destilada 3 min.
7. Solución Tween Tris-buffer salino (TBST) 3 min.
8. Recuperar los antígenos con solución (TRS) 20 min. a 100 °C.
9. Bloquear la peroxidasa endógena con H₂O₂ al 3 % 10 min.
10. Lavar en solución buffer TBST 3-5 min.
11. Añadir el anticuerpo primario 40 min.
12. Lavar en TBST 3-5 min.
13. Añadir el anticuerpo secundario 40 min.
14. Lavar en TBST 3-5 min.
15. Revelar con solución de sustrato-cromógeno 10 min.
16. Lavar en TBST 3-5 min.
17. Contrateñir:
 - Lavar en agua destilada por 2 min (3 veces).
 - Contrastar con hematoxilina de Harris o verde de metilo por 1 a 2 min.
 - Lavar en agua corriente.
 - Enjuagar en agua destilada.
18. Deshidratar gradualmente con:

- Etanol al 70 %, 2 cambios de 3 min. c/u.
- Etanol al 95 %, 2 cambios de 3 min. c/u.
- Etanol absoluto, 2 cambios de 3 min. c/u.
- Xilol 2 cambios de 5 min. c/u.

19. Limpiar el exceso de xilol.

20. Montar y almacenar en oscuridad.

A.14. TÉCNICA DE PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Solución A.

Agua ultra pura 200 mL

Cacodilato de sodio 8.56 g

Solución B.

Agua ultra pura 25 mL

Ácido clorhídrico 0.5 mL

Procedimiento:

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

Glutaraldehído al 2.5%.

Buffer de cacodilatos al 0.1 M y a pH de 7.2- 90 mL

7.4

Glutaraldehído al 25%. 10 mL

Se almacena a 4°C en un frasco de vidrio
ámbar.

Resina epóxica (consistencia suave).

Reactivos:

Resina	22.2 g.
DDSA	21.5 g.
NMA	6.90 g.
DMP30	1.00 g.

Contraste de cortes semifinos.

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 ultra pura.
5. Secar suavemente el portaobjetos con una gasa.

Contraste de cortes finos.

Reactivos:

Acetato de uranilo al

5%:

Acetato de uranilo	0.5 g
Etanol 50%	10 mL

Citrato de plomo al

0.04%:

Citrato de plomo	0.04 g
Agua ultrapura	100 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 ultra pura 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 ultra pura por 1 min y dejar secar sobre papel filtro en una caja de Petri cerrada y etiquetada.

Inclusión en resinas epóxicas.

1. Obtener fragmentos de hígado, riñón y pulmón y colocarlos en solución fijadora.
2. Sumergir en solución fijadora de Karnovsky-Ito por 1-1.5 horas a TA.
3. Lavar en buffer de cacodilatos al 0.1 M por 5 min. 3 veces.
4. Postfijar en tetraóxido de osmio al 2% por 30 min.
5. Lavar en buffer de cacodilatos al 0.1 M por 5 min. 3 veces.
6. Contrastar con nitrato de uranilo acuoso al 1% por 30 min.
7. Lavar en buffer de cacodilatos al 0.1 M por 5 min. 3 veces.
8. Deshidratar en acetona al 30, 50, 70, 90 y 100% tres veces por 5 min. 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 epón puro por 1 hora.
12. Colocar las muestras en moldes y polimerizar a 60 °C por 12-72 horas.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Rubén García Garza **Candidato para el Grado de Doctor en Ciencias con Orientación en Morfología**

Título de Tesis:

EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DEL HÍGADO, RIÑÓN Y PULMÓN EN UN MODELO DE INTOXICACIÓN CRÓNICA CON EL FRUTO MADURO DE *Karwinskia humboldtiana* EN LA RATA WISTAR.

Área de Estudio

Orientación en Morfología.

Datos Personales

Lugar de nacimiento: Monterrey, Nuevo León, México el 18 de Diciembre de 1981.

Estado civil: Casado con Selene Sarahi García Hernández, Hijo: Jonathan Isaac García García.

Formación Académica

2000- 2006 **Médico Cirujano y Partero.** Facultad de Medicina UANL.

2009- 2013 **Doctorado en Ciencias** con Orientación Terminal en Morfología. Departamento de Histología. Facultad de Medicina UANL.

Participación en la Docencia

Pregrado

Agosto 2001 – Enero 2006.

Instructor de la materia de **Histología** en la carrera de Médico Cirujano y Partero. Facultad de Medicina, UANL.

Agosto 2007 – Enero 2008

Maestro participante en el curso de **Biología Celular y Tisular** en la Carrera de Médico Cirujano y Partero. Facultad de Medicina, UANL.

Agosto 2008 a la fecha.

Maestro participante en el curso de **Biología Celular y Tisular** en la Carrera de Médico Cirujano y Partero. Facultad de Medicina UANL.

Posgrado

Febrero – Julio 2010.

Instructor del curso de **Temas Selectos en Biología Celular y Tisular** para estudiantes del Programa de Maestría en Ciencias con Orientación Terminal en Morfología. Facultad de Medicina, UANL.

Agosto 2011 – Enero 2012.

Instructor del curso de **Marcaje de Células y Tejidos** para estudiantes del Programa de Doctorado en Ciencias con Orientación Terminal en Morfología. Facultad de Medicina, UANL

Febrero – Julio 2012.

Instructor del curso de **Biología Celular y Tisular** para estudiantes del Programa de Maestría en Ciencias con Orientación Terminal en Morfología. Facultad de Medicina, UANL.

Febrero 2010 a la fecha.

Maestro participante en el curso de **Histología** para estudiantes del Programa de Especialidad en Anatomía Patológica. UMAE 25, IMSS.

Febrero 2011 a la fecha.

Maestro participante en el curso de **Biología Molecular de la Célula** para estudiantes del Programa de Especialidad en Anatomía Patológica. UMAE 25, IMSS.

Artículos de Investigación publicados en revistas con arbitraje e indexadas (4)

1. Comparación histológica e inmunohistoquímica de muestras de tejido procesadas por la técnica convencional o por la técnica simplificada de acetonas.

Pablo Giovanni Martínez Rivera, Ana Karina Piña Osuna, Adolfo Soto Domínguez, **Rubén García Garza**. Int. J. Morphol. 29 (2): 575-580, 2011.

2. El extracto acuoso de orégano (*Lippia graveolens*) del norte de México tiene actividad antioxidante sin mostrar un efecto tóxico *in vitro* e *in vivo*.

Adolfo Soto Domínguez, **Rubén García Garza**, Yolanda Ramírez Casas, Javier Morán Martínez, Luis Benjamín Serrano Gallardo. Int. J. Morphol. 30

(3) , 2012. En imprenta.

3. Quick and Inexpensive Method to Elaborate Tissue Punches Useful in Paraffin Tissue Microarrays.

Rubén García Garza, Edgar Paolo Rodríguez Vidales, Adolfo Soto Domínguez. Aceptado en el Int. J. Morphol.

4. Morphologic Alterations in the Respiratory Tract of Wistar Rats Induced by Steams of the Root of Hierba del Zorrillo (*Petiveria alliacea* L.) from Southwest of Mexico

Víctor M. Fletes-Arjona, Adolfo Soto-Domínguez, **Rubén García-Garza**, Javier Morán-Martínez y Eduardo M. Becerra-Verdín.
Aceptado en el Int. J. Morphol.

Artículos enviados o en elaboración (5)

1. Células cebadas de pulmón y nervio periférico en la intoxicación crónica con el fruto maduro de *Karwinskia humboldtiana* en la rata Wistar: Estudio Histológico e Histoquímico.

Ruben García Garza, Martha Salazar Leal, Eduardo Becerra Verdin, Viktor Romero Diaz, Adolfo Soto Dominguez, Jaime García Juárez y Julio Sepulveda Saavedra.
Enviado al Int. J. Morphol.

2. Células cebadas y sus patrones de expresión del receptor de c-Kit como probables indicadores de metástasis en el adenocarcinoma en humanos.

Oscar Hernández Alvidrez, Eduardo Alfredo González Murillo, Edmundo Erbey Castelán Maldonado, David García Garza, Adolfo Soto Domínguez y **Rubén García Garza**.
Enviado al Int. J. Morphol.

3. El extracto acuoso de *R. graveolens* del norte de México causa apoptosis y muestra efecto antiproliferativo sobre el hígado de rata Wistar: Evidencia morfológica.

Adolfo Soto-Domínguez, Luis B. Serrano-Gallardo, Rubén García-Garza, Pablo Ruiz-Flores, Javier Morán-Martínez, Martha P. Nava-Hernández y Edith F. Martínez-Pérez
Enviado al Int. J. Morphol.

4. Daño hepático producido por la intoxicación crónica con el fruto maduro de *Karwisnkia humboldtiana* en la rata Wistar.

En elaboración.

5. Daño renal producido por la intoxicación crónica con el fruto maduro de *Karwinskia humboldtiana* en la rata Wistar.

En elaboración.

Capítulos en libros (4)

Colaboración en 4 capítulos del libro titulado: “**Texto Atlas de Histología Biología Celular y Tisular**”, Autor: Dr. Julio Sepúlveda Saavedra. Primera Edición, Editorial Mc Graw Hill Interamericana. 2012.

1. Importancia de la biología celular y tisular y técnicas de estudios de células y tejidos (Imágenes).

2. La célula (Apartado de Mitosis y Meiosis).

6. Cartílago y Hueso

12. Sistema Respiratorio

Cursos (2)

1. 2009- Asistente al curso-taller “**Estadística: Bioestadística aplicada al cálculo del tamaño muestral. Test de supervivencia. Aplicaciones y ventajas del programa R en Bioestadística**”. Impartido en la Facultad de Medicina de la UANL.

2. 2011- Asistente al curso teórico de **Microdissección laser, microscopia de fluorescencia con el sistema Apotome y microscopia confocal laser**. Impartido en el Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud de la UANL, en conjunto con Carl Zeiss México

Presentación de trabajos en congresos Nacionales (9)

1. 2011- Presentación de cartel titulado “**Evaluación histológica e histoquímica de pulmón en un modelo de intoxicación crónica con el fruto maduro de *Karwinskia humboldtiana* en ratas Wistar**” en el primer Congreso de Cuerpos Académicos de Ciencias de la Salud. Facultad de Odontología, UANL.

2. 2011- Presentación del cartel titulado “**Comparación histológica e inmunohistoquímica de muestras de tejido procesadas por la técnica convencional o por el método simplificado de acetonas**” en el XXXIV Congreso Nacional de Histología. Sociedad Mexicana de Histología A.C.

3. 2011- Presentación del cartel titulado “**Comparación histológica e inmunohistoquímica de muestras de tejido procesadas por la técnica**

convencional o por el método simplificado de acetonas” en el XXXVI Congreso Nacional de Investigación en Medicina, Facultad de Medicina, UANL.

4. 2011- Presentación del cartel titulado **“Evaluación histológica e histoquímica de pulmón en un modelo de intoxicación crónica con el fruto maduro de *Karwinskia humboldtiana* en ratas Wistar”** en el XXXIV Congreso Nacional de Histología. Sociedad Mexicana de Histología A.C.

5. 2012- Presentación de cartel titulado **“Daño hepático producido por la intoxicación crónica con el fruto de *Karwinskia humboldtiana* en ratas Wistar”** en el segundo Congreso de Cuerpos Académicos de Ciencias de la Salud. Facultad de Odontología, UANL.

6. 2012- Presentación de cartel titulado **“Daño renal producido por la intoxicación crónica con el fruto de *Karwinskia humboldtiana* en ratas Wistar”** en el segundo Congreso de Cuerpos Académicos de Ciencias de la Salud. Facultad de Odontología, UANL.

7. 2012- Presentación de cartel titulado **“Daño renal producido por la intoxicación crónica con el fruto de *Karwinskia humboldtiana* en ratas Wistar”** en el XXXV Congreso Nacional de Histología. Sociedad Mexicana de Histología A.C.

8. 2012- Presentación de cartel titulado **“Daño hepático producido por la intoxicación crónica con el fruto de *Karwinskia humboldtiana* en ratas Wistar”** en el XXXV Congreso Nacional de Histología. Sociedad Mexicana de Histología A.C.

9. 2012- Presentación de cartel titulado **“Cambios histoquímicos en células cebadas de pulmón y nervio periférico presentes durante la intoxicación crónica con el fruto maduro de *Karwinskia humboldtiana* en ratas Wistar”** en el XXXV Congreso Nacional de Histología. Sociedad Mexicana de Histología A.C.

Idiomas

Diploma de **Competencia suficiente en el idioma inglés**. Universidad Autónoma de Nuevo León, 2005.

Premios y distinciones recibidas (5)

- 1. Carta al mérito** en el Servicio Social de la Carrera de Enfermería General, SSA. Periodo Agosto 1999 - Julio 2000.
- 2. Mención honorífica** en la carrera de Médico Cirujano y Partero de la Facultad de Medicina, UANL.
- 3. Carta al mérito** en el Servicio Social de la Carrera de Médico Cirujano Y Partero, SSA. Periodo Agosto 2006 – Julio 2007.
- 4. Estudiante distinguido** del Doctorado en Ciencias con Orientación Terminal en Morfología. Facultad de Medicina, UANL. (2012).
- 5. Primer lugar** en la presentación del cartel “Daño renal producido por la intoxicación crónica con el fruto de *Karwinskia humboldtiana* en ratas Wistar” presentado en el XXXV Congreso Nacional de Histología. Sociedad Mexicana de Histología A.C.

Asesor en tesis de especialidad (3)

- 1. Evaluación histológica de tejidos procesados por la técnica histológica convencional en comparación con los procesados por la técnica rápida de acetonas.** Especialidad en Anatomía Patológica, UMAE 25. 2011. (Concluida)
- 2. Evaluación histopatológica, histoquímica e inmunohistoquímica de glándulas endocrinas procesadas por la técnica de acetonas.** Especialidad en Anatomía Patológica. UMAE 25. (En desarrollo)
- 3. Evaluación de los patrones de expresión de c-kit en células cebadas de adenocarcinoma ductal infiltrante moderadamente diferenciado de mama.** Especialidad en Anatomía Patológica. UMAE 25. (Concluida)