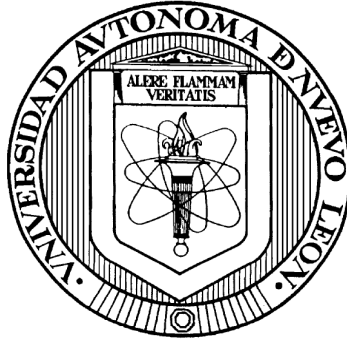


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE MEDICINA

**Evaluación del efecto de la intoxicación aguda
por *Karwinskia humboldtiana* en el páncreas
de la rata Wistar**

Por:

M.C. KATYA CARCAÑO DÍAZ

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Orientación en Morfología**

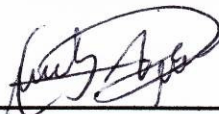
Noviembre de 2015

Evaluación del efecto de la intoxicación aguda por *Karwinskia humboldtiana* en el páncreas de la rata Wistar.

Aprobación de Tesis:



Dr. C. Jaime García Juárez
Director de Tesis



Dra. C. Aracely García García
Co-directora de Tesis



Dra. C. Martha Elizabeth Salazar Leal
Comisión de Tesis



Dr. C. Juan Carlos Segoviano Ramírez
Comisión de Tesis



Dr. C. Adolfo Soto Domínguez
Comisión de Tesis

Dr. Med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado
Subdirector de Estudios de Posgrado

Evaluación del efecto de la intoxicación aguda por *Karwinskia humboldtiana* en el páncreas de la rata Wistar.

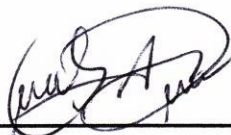
Presentado por:

M. C. Katya Carcaño Díaz

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina y en la Unidad de Bioimagen del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. C. Jaime García Juárez y la co-dirección de la Dra. C. Aracely García García.



Dr. C. Jaime García Juárez
Director de Tesis



Dra. C. Aracely García García
Co-directora de Tesis

DEDICATORIA

A Tí, el que eres, como quiera que sea tu nombre, donde quiera que estés. Gracias por encontrarme antes de yo buscarte.

A ustedes, Salo y Sofi, con todo mi amor.

Salo, gracias por acompañarme no sólo en este período de mi vida, sino en todos estos años desde que nos conocimos en esa tarde de domingo... hemos caminado muchos pasajes juntos, y aunque hemos pasado de todo, siempre me devuelves a la vida con una sonrisa... y con más fuerza que antes. Tengo todo que agradecerte. Te quiero mucho. Tú has hecho esta tesis conmigo. Así que también es tuya. Y..... are you talking to me??

Sofi, eres el más bello regalo de la vida. Eres inspiración y bendición en la vida de los que te rodeamos. No he conocido a una persona tan profunda como tú, ni que tenga tu sensibilidad. Nada es igual a ver tu sonrisa y saberte y escucharte feliz. Gracias por llegar a nuestras vidas, para transformarlas para siempre... es un honor para mí ser tu mamá. Te adoro.

A mi familia, la de aquí, la de allá, la que está y ha estado siempre a mi lado, a pesar del tiempo, la distancia y las circunstancias. Ustedes han sido un caleidoscopio de luz y dicha. Gracias por hacerme feliz... la más feliz de las hijas y de las hermanas. Los quiero mucho, por siempre.

A la vida misma, que me da una y otra vez, mil y un oportunidades de buscarla, encontrarla y entender a pedacitos su significado, tan hermoso y tan simple, y que está aquí dentro de mí y dentro de cada uno de ustedes.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jaime García (Jimmy), antes que nada, mi amigo, mi mentor, consejero y director de tesis. Te agradezco infinitamente todas tus enseñanzas y tu ejemplo. Gracias por no perder la fe en mí y por ayudarme en todo. Gracias por ponerte los guantes (no los de box... bueno, casi...) y trabajar conmigo en cada paso, por no dejarme sola. Ha sido una grata experiencia trabajar a tu lado. ¡Mil gracias! Créeme que lo que he aprendido ha sido en gran parte gracias a ti.

Al Dr. Roberto Montes de Oca, le agradezco todo su apoyo, sus enseñanzas y su manera tan sencilla de hacerme pensar y cuestionarme más allá de lo que creo que sé. Eso es en general, y respecto a este trabajo, le agradezco toda su asesoría y su apoyo para haberlo podido realizar.

De manera especial agradezco al Dr. Julio Sepúlveda porque, a pesar de no haber participado en este estudio, sin duda, fue alguien que me brindó valiosas enseñanzas.

De manera especial agradezco al Dr. Carlos Medina de la Garza, por facilitarnos las instalaciones del CIDICS y por su apoyo en la realización de este trabajo y al MVZ José Herrera de la Rosa, por su valiosa ayuda con el manejo de los animales en el bioterio del CIDICS.

Muchas gracias a mi prima, la Profra. Dorina Garza Leonard y al Dr. Sergio Lozano Rodríguez, por su invaluable ayuda en la traducción de este trabajo para su publicación, así como al Dr. Neri Álvarez Villalobos, por su gran ayuda en la revisión estadística.

A los miembros de la comisión de tesis:

Dra. Aracely García, muchas gracias por tus enseñanzas, tus correcciones, tu ayuda y tu paciencia, pero más, por tu amistad.

Dra. Martha Salazar, muchas gracias por sus revisiones, enseñanzas y apoyo incondicional para la realización de este trabajo. Gracias por los consejos y sus palabras de ánimo en los momentos más críticos.

Dr. Juan Carlos Segoviano, le agradezco mucho todas sus enseñanzas, su paciencia y por ayudarme con todos los retos que se presentaban en el camino.

Dr. Adolfo Soto, muchas gracias por tus consejos y enseñanzas, en la realización de este trabajo.

A los amigos y compañeros del laboratorio de Histología:

A la Dra. Nelly Díaz, mi amiga y compañera de risas y lágrimas... Gracias por estar a mi lado en todo momento, para cosas del doctorado, pero sobre todo, para las cosas de la vida. Te quiero con todo el corazón, comadre. Estaremos siempre la una para la otra, toda la vida.

Mtro. Víktor Romero, a usted todo mi agradecimiento, porque, más allá de sus valiosas enseñanzas, usted me ha brindado todo el apoyo, consejos, y sobre todo su amistad.

Dr. Humberto Rocha, te agradezco infinitamente tus enseñanzas, tus consejos, tus preguntas que siempre me hacían pensar el problema desde otra perspectiva. Aracely y tú son personas muy importantes para mí en el laboratorio.

Dra. Marichú Loera, muchas gracias por tu apoyo en el manejo del material del laboratorio, y más aún por tu amistad y confianza a lo largo de todos estos años.

De manera muy especial quiero decirles a mis amigos del laboratorio, que los quiero muchísimo: Dr. Arnulfo, Oli, Sheyla, José Juan, Juan Antonio, Elvis, Marce... para donde la vida nos lleve, espero siempre estar presente con y para ustedes. Ha sido divertido y emocionante compartir con ustedes estos laboratorios, salones y pasillos. Gracias por todo.

Con mucho cariño y agradecimiento a mis amigas y amigos Nora Frías, Rosy Leal, Juani Soto, Alice Aguilar, Don Lorenzo Rada, Luis Botello, Don Panchito, Iván, gracias por hacer de estos años, momentos felices a su lado. Los quiero mucho. Gracias por todo su apoyo.

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO 1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Aspectos botánicos de <i>Karwinskia humboldtiana</i>	1
1.2	Toxinas de las plantas del género <i>Karwinskia</i>	5
1.3	Reseña histórica de Kh	9
1.4	Epidemiología de la intoxicación por Kh	12
1.5	Cuadro clínico en la intoxicación accidental por Kh	13
1.6	Intoxicación experimental con el fruto de Kh	16
1.6.1	Datos clínicos	16
1.6.2	Hallazgos histológicos	17
1.6.2.1	Alteraciones histológicas en sistema nervioso	17
1.6.2.2	Alteraciones histológicas en otros órganos	18
1.7	Páncreas	19
1.7.1	Histología del páncreas exocrino	22
1.7.2	Histología del páncreas endocrino	22
1.8	Lesión y muerte celular	23
1.8.1	Apoptosis	23
1.8.1.1	Apoptosis mediada por la mitocondria	25
1.8.2	Autofagia	26
1.8.3	Necrosis	28
1.9	Amilasa pancreática	29
CAPÍTULO 2	JUSTIFICACIÓN	30
CAPÍTULO 3	HIPÓTESIS	31

CAPÍTULO 4	OBJETIVO GENERAL	32
CAPÍTULO 5	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
CAPÍTULO 6	MATERIAL Y MÉTODO	34
6.1	Material	34
6.1.1	Material Biológico	34
6.1.1.1	Colecta de fruto de Kh	34
6.1.1.2	Animales de experimentación	34
6.1.2	Material no biológico	35
6.1.2.1	Reactivos	35
6.1.2.2	Cristalería y material diverso	38
6.1.2.3	Equipo	39
6.1.2.3.1	Equipo del Departamento de Histología de la UANL	39
6.1.2.3.2	Equipo de la Unidad de Bioimagen del CIDICS de la UANL	40
6.2	Metodología	42
6.2.1	Preparación del fruto de Kh	42
6.2.2	Manejo de los animales de experimentación	42
6.2.3	Grupos experimentales	43
6.2.4	Administración del fruto de Kh	44
6.2.5	Sacrificio de los animales	44
6.2.6	Fotodocumentación del aspecto macroscópico del páncreas	45
6.2.7	Toma de las muestras	45
6.2.8	Análisis microscópico y cuantificación del daño pancreático	46
6.2.9	Ensayo de inmunofluorescencia para la identificación de la proteína pro-caspasa-3 activa	49

6.2.10	Ensayo de TUNEL para la determinación de fragmentación de la cromatina	50
6.2.11	Análisis molecular por Western Blot para la determinación de las proteínas caspasa-3 activada, LC3-I y LC3-II . . .	50
6.2.12	Ensayo de histoquímica enzimática para la determinación de la actividad enzimática de citocromo c oxidasa . . .	51
6.2.13	Ensayo bioquímico para el análisis de la actividad de amilasa sérica	52
6.2.14	Análisis estadístico	53
6.2.15	Registro y aprobación del Proyecto por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la UANL	53
CAPÍTULO 7 RESULTADOS		54
7.1	Efecto de la intoxicación aguda con Kh sobre el peso corporal de la rata Wistar.	54
7.2	Evaluación de las características macroscópicas del páncreas .	56
7.3	Evaluación histológica del páncreas exocrino	59
7.4	Evaluación histológica del páncreas endocrino (islotas de Langerhans)	65
7.5	Calificación del daño histológico en el páncreas exocrino . . .	68
7.6	Determinación de los mecanismos de muerte celular en el páncreas durante la intoxicación aguda con Kh	71
7.6.1	Ensayo de TUNEL.	71
7.6.2	Ensayo de inmunofluorescencia con anticuerpo anti-caspasa-3 activada	73
7.6.3	Ensayo de Western Blot para detectar la expresión de las proteínas caspasa-3 activada, LC3-I y LC3-II	75
7.7	Evaluación de alteraciones en la morfología y localización de las mitocondrias de las células acinares del páncreas	77
7.8	Determinación de los niveles de amilasa pancreática en suero .	80

CAPÍTULO 8	DISCUSIÓN	83
CAPÍTULO 9	CONCLUSIÓN	92
CAPÍTULO 10	BIBLIOGRAFÍA	93
ANEXO A	TÉCNICA DE INCLUSIÓN EN PARAFINA LIBRE DE XILOL	108
ANEXO B	PREPARACIÓN DE LAMINILLAS SILANIZADAS.	109
ANEXO C	TÉCNICA DE TINCIÓN CON HEMATOXILINA Y EOSINA.	110
ANEXO D	ENSAYO DE INMUNOFLUORESCENCIA.	112
ANEXO E	ENSAYO DE TUNEL	114
ANEXO F	HOMOGENIZACIÓN DE LAS MUESTRAS DE PÁNCREAS.	117
ANEXO G	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.	119
ANEXO H	ENSAYO DE WESTERN BLOT.	121
ANEXO I	REVELADO	125
ANEXO J	ENSAYO DE CITOCROMO OXIDASA C	126
ANEXO K	ENSAYO DE AMILASA PANCREÁTICA SÉRICA.	128

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mapa de la distribución de plantas del género <i>Karwinskia</i> , en la República Mexicana	2
Figura 2	Planta <i>Karwinskia humboldtiana</i>	4
Figura 3	Algunas de las toxinas aisladas de las plantas del género <i>Karwinskia</i>	8
Figura 4	Esquema que muestra las porciones endocrina y exocrina del páncreas	21
Figura 5	Curva de peso de las ratas de los grupos control e intoxicadas con fruto de <i>Karwinskia humboldtiana</i>	55
Figura 6	Aspecto macroscópico de los páncreas de los grupos control y experimentales intoxicados con el fruto de <i>Karwinskia humboldtiana</i> , durante la disección abdominal	57
Figura 7	Microfotografías de páncreas exocrino de rata Wistar.	61
Figura 8	Detalle de las microfotografías de páncreas exocrino de rata Wistar	63
Figura 9	Microfotografías del páncreas endocrino (Islotes de Langerhans) de rata Wistar	66
Figura 10	Gráfica que muestra la calificación total del daño del páncreas exocrino en los grupos control y experimentales intoxicados con <i>Karwinskia humboldtiana</i>	70
Figura 11	Ensayo de TUNEL	72
Figura 12	Ensayo de inmunofluorescencia con anticuerpo anti-caspasa-3 activada	74
Figura 13	Ensayo de Western Blot de homogenizado de páncreas de los grupos control y experimentales intoxicados con el fruto de <i>Karwinskia humboldtiana</i>	76

Figura 14	Ensayo de histoquímica enzimática para citocromo oxidasa c, en los grupos control y experimentales intoxicados con <i>Karwinskia humboldtiana</i>	78
Figura 15	Ensayo bioquímico de la actividad de amilasa pancreática del grupo control y de los grupos experimentales intoxicados con <i>Karwinskia humboldtiana</i> a las 24, 48, 72, 96 y 120 h respectivamente	81
Figura 16	Ensayo bioquímico de la actividad de amilasa pancreática del grupo control y de los grupos experimentales intoxicados con <i>Karwinskia humboldtiana</i> a las 6, 12 y 18 h respectivamente .	82
Figura 17	Cronología ilustrada del daño pancreático durante la intoxicación aguda con fruto de <i>Karwinskia humboldtiana</i> en la rata Wistar.	91
Figura 18	Curva de calibración de proteínas y fórmula para calcular e igualar la carga de proteínas de cada muestra en el gel . .	120

LISTA DE TABLAS

Tabla I	Porcentaje de toxinas en las diferentes especies de <i>Karwinskia</i>	7
Tabla II	Signos y síntomas de intoxicación por <i>Karwinskia humboldtiana</i>	15
Tabla III	Plantilla de calificaciones para edema, infiltrado inflamatorio, hemorragia y necrosis, de acuerdo a modelos establecidos de daño pancreático	48
Tabla IV	Calificaciones del daño en la porción exocrina del páncreas en los grupos control y experimentales intoxicados con <i>Karwinskia humboldtiana</i>	69

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

#	número
%	por ciento
+	más
-	menos
=	igual
<	menor que
>	mayor que
±	más/menos
©	copyright
®	marca registrada
°	grado(s)
°C	grados centígrados
α	alfa
μg/mL	microgramos por mililitro
μL	microlitro(s)
μL/mg	microlitros por miligramo
μm	micrómetros (micras)
ADN	ácido desoxirribonucleico
ARDS	Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo (siglas en inglés)
Art.	artículo
ATP	adenosín trifosfato
Bak	proteína asesina antagonista de Bcl-2, proapoptótica
Bax	proteína X asociada a Bcl-2
Bcl-2	proteína 2 de linfoma de células B
Bcl-xL	proteína de linfoma de células B extra grande
BSA	albúmina sérica bovina (siglas en inglés)
c/u	cada uno
cc	centímetros cúbicos

CIDICS	Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud
cm	centímetros
cols.	colaboradores
CTR	Control Técnico y Representaciones
DAB	diaminobencidina
DAPI	diamidinofenilindol
DE	desviación estándar
DEQ	Desarrollo de Especialidades Químicas
dNTP	deoxinucleósido trifosfato (siglas en inglés)
DO	densidad(es) óptica(s)
DTT	DL-ditiotreitol
Dr. C.	Doctor en Ciencias
Dra. C.	Doctora en Ciencias
Dr. Med.	Doctor en Medicina
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
etc.	etcétera
FR	unidades French
g	gramo(s)
g/Kg	gramos por kilogramo
h	hora(s)
H ₂ O	agua
H ₃ PO ₄	ácido fosfórico
HCl	ácido clorhídrico
HE	hematoxilina y eosina
HRP	Horseradish Peroxidase
Hz	Hertzios
IBM SPSS	International Business Machines Statistical Package for the Social Sciences
IgG	inmunoglobulina G
in	pulgadas
Inc.	Incorporation

ITESM	Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey
K	<i>Karwinskia</i>
KCl	cloruro de potasio
Kh	<i>Karwinskia humboldtiana</i>
KH ₂ PO ₄	fosfato de potasio
L	litro(s)
LC3-I	proteína asociada a los microtúbulos de cadena ligera 3-I, no lipidada, marcadora de autofagia
LC3-II	proteína asociada a los microtúbulos de cadena ligera 3-II, lipidada, marcadora de autofagia
m	metro(s)
M	Molar
mA	miliamperios
M. C.	Maestro(a) en Ciencias
Mcl-1	proteína 1 de leucemia de células mieloides
MET	Microscopía Electrónica de Transmisión
mg	miligramo(s)
mg/Kg	miligramos por kilogramo
mg/mL	miligramos por mililitro
MiliQ	agua ultrapura
min	minuto(s)
mL	mililitro(s)
mm	milímetro(s)
Mn ²⁺	manganeso
MODS	Síndrome de Disfunción Orgánica Múltiple (siglas en inglés)
MOMP	Permeabilización de la Membrana Mitocondrial Externa (siglas en inglés)
<i>n</i>	tamaño de la muestra
NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O	fosfato de sodio monobásico dihidratado
NaOH	hidróxido de sodio
Na ₂ HPO ₄	fosfato de sodio dibásico

NaCl	cloruro de sodio
nm	nanómetro(s)
NOM	Norma Oficial Mexicana
OCT	Optimal Cutting Temperature
Omi/HtrA2	Serina proteasa HtrA2 mitocondrial
p	valor p
PBS	Buffer Salino de Fosfatos (siglas en inglés)
pH	logaritmo negativo de la concentración de iones de hidrógeno
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
Prom	promedio
PSA	persulfato de amonio
PVDF	fluoruro de polivinilideno o difluoruro de polivinilideno
Reg.	Registro
RER	Retículo Endoplásmico Rugoso
RIPA	Radioimmunoprecipitation Assay
rpm	revoluciones por minuto
Rx	Radiografía
SA de CV	Sociedad Anónima de Capital Variable
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SDS	sodio dodecil sulfato
seg	segundo(s)
SIRS	Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (siglas en inglés)
Smac/DIABLO	Segundo activador de caspasas derivado de la mitocondria, proteína de unión directa a proteínas inhibidoras de apoptosis con bajo punto isoeléctrico
SNC	Sistema Nervioso Central
T-496	Toxina 496
T-514	Toxina 514
T-516	Toxina 516

T-544	Toxina 544
TACS-nucleasa	endonucleasa de patente
TdT	terminal deoxynucleotidyl transferase
TEMED	tetrametiletilendiamina
™	Trade Mark
TUNEL	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase d-UTP Nick End Labeling
U/L	Unidades por litro
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
V	voltios
WB	Western Blot
x	veces por

RESUMEN

M. C. Katya Carcaño Díaz
Universidad Autónoma de Nuevo León
Título:

Fecha de graduación: Noviembre 2015
Facultad de Medicina
Evaluación del efecto de la
intoxicación aguda por *Karwinskia
humboldtiana* en el páncreas de la
rata Wistar
Candidato para el grado de Doctor
en Ciencias con Orientación Terminal
en Morfología
Morfología

Número de páginas: 129

Área de estudio:

Propósito y método del estudio: Cuando se ingieren grandes cantidades de fruto de *Karwinskia humboldtiana* se produce una intoxicación aguda, que ocasiona daño en múltiples órganos, falla respiratoria y muerte en pocos días. En la intoxicación accidental y experimental con este fruto, se ha reportado daño histológico en pulmones, hígado y riñones. Se sabe que el daño histológico a estos órganos, además de la falla multiorgánica, son situaciones comunes cuando existe daño pancreático, sin embargo, hasta la fecha, el páncreas no ha sido estudiado en esta intoxicación. En este trabajo examinamos el efecto que ocasiona la intoxicación aguda con el fruto de *Karwinskia humboldtiana* en el páncreas en la rata Wistar.

Contribuciones y conclusiones: En este trabajo se encontró daño progresivo confinado a la porción exocrina del páncreas, iniciando con reducción en el tamaño de los acinos pancreáticos, así como del número de gránulos de zimógeno, presencia de vesículas de apariencia autofágica y apoptosis, seguidos de edema, infiltrado inflamatorio, necrosis y pérdida completa de la arquitectura acinar. Cabe señalar que la morfología de los islotes de Langerhans se mantuvo conservada en todos los tiempos evaluados en este trabajo. Mediante las técnicas Western Blot e inmunofluorescencia, analizamos la expresión y localización de proteínas implicadas en la autofagia (LC3-I y LC3-II) y en la apoptosis (caspasa-3). Observamos que las proteínas LC3-I y LC3-II se encuentran expresadas en todos los tiempos experimentales, mientras que la proteína caspasa-3 se expresó únicamente a las 48 h de la intoxicación con *Karwinskia humboldtiana*. Mediante ensayos de histoquímica enzimática para la citocromo oxidasa c, comprobamos que desde las 24 h de intoxicación, existen cambios en la forma, tamaño y localización de las mitocondrias, organelos implicados en la muerte celular. Asimismo, realizamos la evaluación de la función pancreática mediante la determinación de la actividad de la amilasa sérica, sin encontrar diferencia significativa entre los grupos estudiados. Todos estos datos indican que el daño inducido por una dosis alta de fruto de *Karwinskia humboldtiana* en la rata Wistar, es consistente con una pancreatitis aguda necrotizante que afecta exclusivamente el páncreas exocrino. Este modelo de pancreatitis puede ser útil para el estudio de los mecanismos celulares y moleculares implicados en este padecimiento, así como para el ensayo de posibles tratamientos para esta y otras enfermedades pancreáticas.

FIRMA DEL DIRECTOR DE TESIS



Dr. C. Jaime García Juárez

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Aspectos botánicos de *Karwinskia humboldtiana*

Las plantas del género *Karwinskia* pertenecen a la familia *Rhamnaceae*, que incluye 15 especies en América, cuyo hábitat natural comprende las regiones áridas del sur de los Estados Unidos, México, Centroamérica, Colombia, Cuba, Haití y República Dominicana (**Fernández, 1993**). México es reconocido como el centro de distribución y posible centro de origen de las plantas del género *Karwinskia* (**Rzedowski, 1998**), donde se encuentran 11 de estas especies, de las cuales, 10 son endémicas.

De todas ellas, *Karwinskia humboldtiana* (Kh) es la especie más resistente a los diferentes factores climáticos, geográficos y de hábitat (**Fernández, 1992**), por lo que se encuentra prácticamente distribuida en todo el territorio nacional, desde Baja California hasta Yucatán (**Figura 1**). Se le conoce con varios nombres comunes, dependiendo de la región geográfica en donde se encuentre, como por ejemplo caracochila, cacachila, capulincillo, coyotillo, tullidora o zarabullo (**Fernández, 1992**).

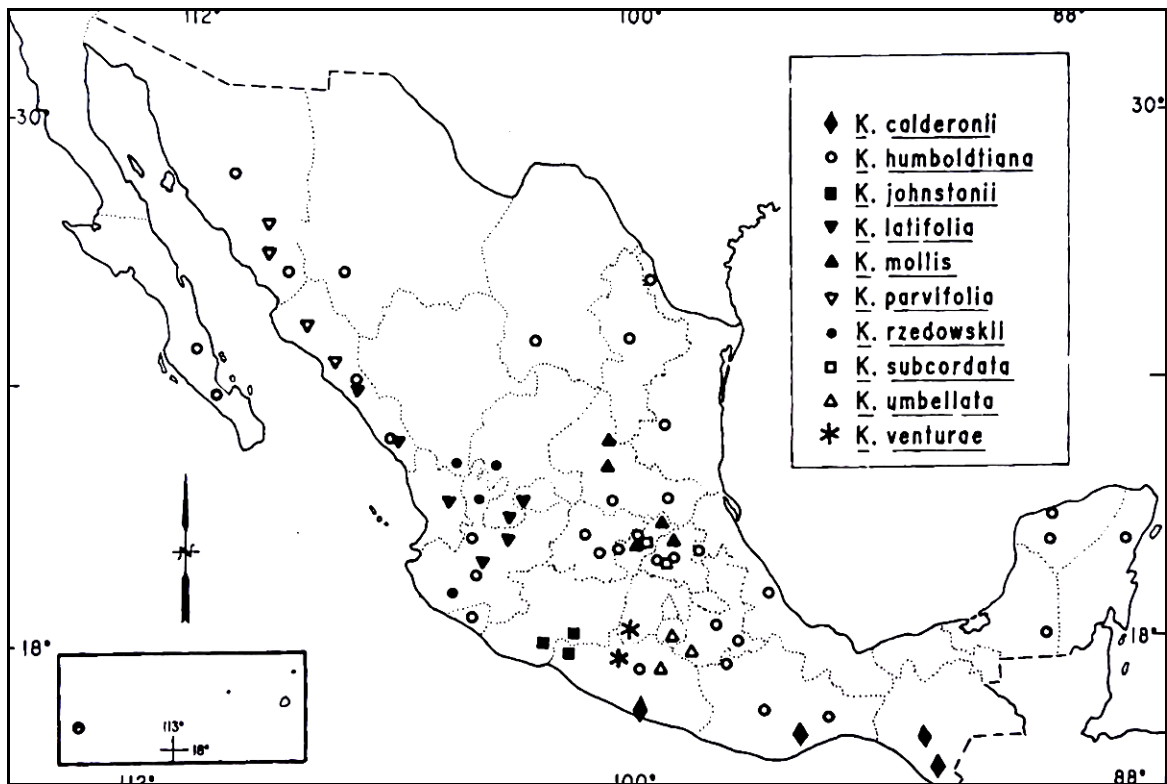


Figura 1. Mapa de la distribución de plantas del género *Karwinskia*, en la República Mexicana (Tomado de Fernández, 1992).

Crece desde los cero, hasta los 2,200 m de altura sobre el nivel del mar. Prospera principalmente en las zonas áridas y semiáridas del norte y centro del país, sin embargo también se le encuentra en los bosques tropicales caducifolio y perennifolio, en pastizales y zonas ecotonales de encinares y matorrales xerófilos, lo que la hace la especie del género que presenta no sólo mayor área de distribución y tolerancia ecológica, sino la que muestra poblaciones más numerosas. También es la especie con mayor dificultad para clasificar taxonómicamente, ya que presenta polimorfismo en hojas, flores y frutos **(Fernández, 1992)**.

Estas plantas **(Figura 2)** pueden medir desde uno hasta ocho metros de altura, son perennifolias, pues presentan hojas en cualquier época del año. Las hojas presentan el envés glabro con motas negras sobre las nervaduras secundarias, su forma es ovoide y miden más de 2.5 cm de largo, por 2.0 cm de ancho aproximadamente. Su fruto mide entre 1.0 y 1.5 cm de diámetro y cuando está maduro presenta un color violeta oscuro, de sabor agradable **(Fernández, 1992)**.



Figura 2. Planta *Karwinskia humboldtiana*. Fruto colectado en los meses julio y agosto en Potrero Chico, Hidalgo, Nuevo León.

1.2 Toxinas de las plantas del género *Karwinskia*

Todas las especies del género *Karwinskia* en México, se caracterizan por la presencia de compuestos antracénicos diméricos que se encuentran en el interior de sus semillas y son responsables de la toxicidad sobre quienes ingieren los frutos.

Asimismo, se ha demostrado que existe diferencia en el contenido de toxinas (**Tabla I**) entre las diferentes especies de esta planta (**Waksman y cols., 1989**). Kh contiene diversas toxinas, entre las cuales se encuentran la T-496, T-514, T-516 y T-544 (**Figura 3**), designadas de acuerdo a su peso molecular (**Dreyer y cols., 1975; Waksman y cols., 1989**). Estos compuestos son fotosensibles y termolábiles. Se encuentran estables en su forma sólida, sin embargo, en solución son inestables, formando productos anhidros y oxidados, particularmente en condiciones básicas (**Piñeyro y Waksman, 2000**).

Inicialmente estos compuestos se consideraron neurotoxinas, pero en la actualidad se sabe que la T-544 es responsable de los efectos neurológicos, la T-514 de la lesión pulmonar, hepática y del miocardio, y la T-496 produce diarrea (**Waksman y cols., 1989; Bermúdez y cols., 1986**).

En 1995, Bermúdez de Rocha y colaboradores, reportaron la detección de la toxina T-544 en sangre periférica, mediante cromatografía de capa fina **(Bermúdez de Rocha y cols., 1995)**. En 1998, se reportó la detección de la toxina T-514 de igual manera **(Martínez y cols., 1998)**. A partir de entonces, se pudo establecer el diagnóstico preciso de intoxicación por Kh. Lamentablemente, ya no se realiza la detección de estas toxinas en pacientes con este tipo de parálisis, lo que causa que no se reconozca la intoxicación y permanezca subdiagnosticada.

Especie	Porcentaje		
	T – 544	T – 496	T – 514
<i>K. humboldtiana</i> ¹	1.60	0.80	0.70
<i>K. humboldtiana</i> ²	0.70	0.58	0.36
<i>K. mollis</i>	1.33	1.08	0.95
<i>K. umbellata</i>	0.75	0.50	0.05
<i>K. subcordata</i>	1.51	0.98	1.07
<i>K. latifolia</i>	-	1.10	-
<i>K. parvifolia</i>	-	1.58	1.04
<i>K. calderonii</i>	0.75	2.00	0.70
<i>K. rzedowskii</i>	-	1.60	-
<i>K. venturae</i>	-	0.11	-
<i>K. tehuacana</i>	0.83	0.40	0.33
<i>K. johnstonii</i>	2.10	0.70	-

¹ Villa de García, Nuevo León, México.

² Linares, Nuevo León, México.

Tabla I. Porcentaje de toxinas en las diferentes especies de *Karwinskia* (tomada de Piñeyro y Waksman, 2000).

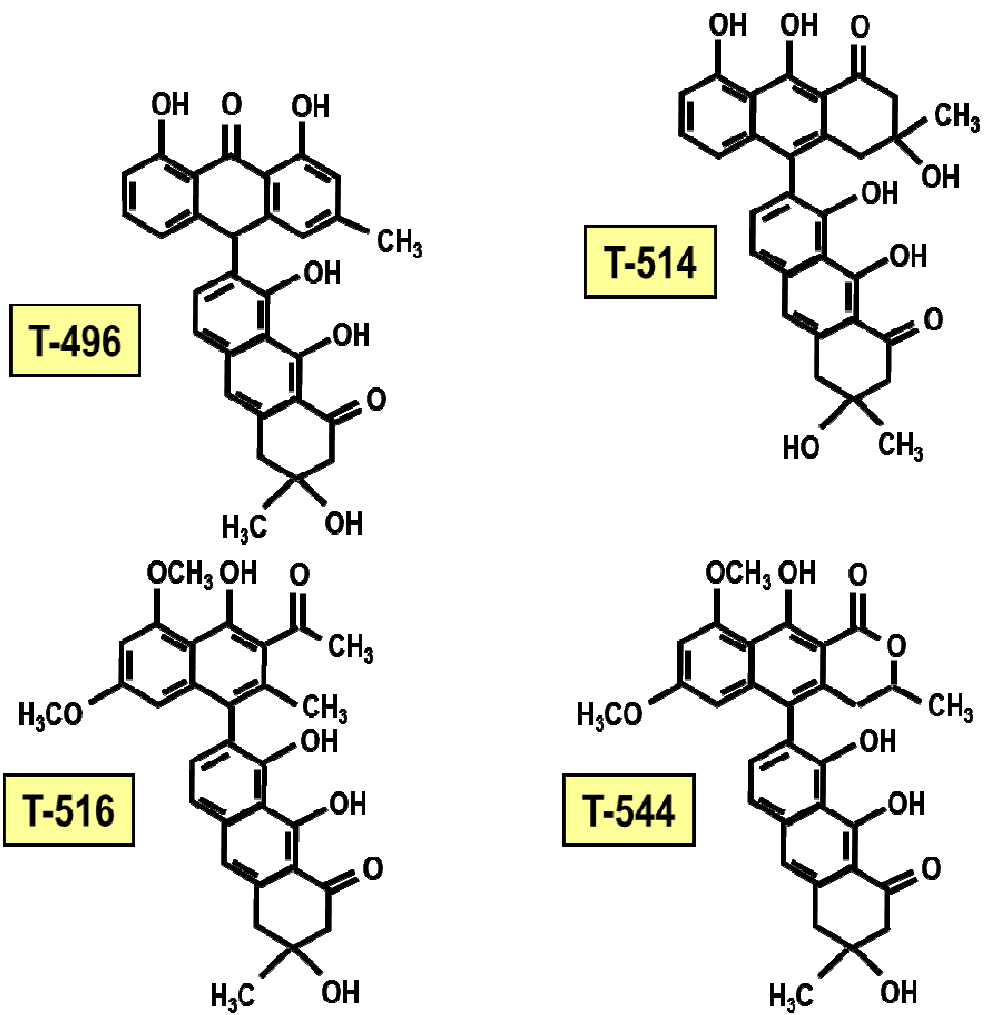


Figura 3. Algunas de las toxinas aisladas de las plantas del género *Karwinskia*.

1.3 Reseña histórica de Kh

Desde hace mucho tiempo en comunidades rurales del país, a las plantas del género *Karwinskia* se les han atribuido propiedades curativas, por ejemplo como anticonvulsivo contra el tétanos y la rabia, como laxante, analgésico, anestésico y antibiótico (**Fernández, 1992**). Sin embargo, también es conocida por sus efectos tóxicos. El primer reporte escrito que se tiene sobre la toxicidad de esta planta, data del siglo XVIII cuando fue descrita por el sacerdote jesuita Francisco Xavier Clavijero, en su "Historia de la Antigua o Baja California" (**Clavijero, 1933**).

Los primeros trabajos en México sobre plantas de este género fueron de índole botánica, química y toxicológica (**Cuilty, 1887; Godoy 1890**). Posterior a esto hubo reportes aislados de intoxicaciones accidentales con Kh en nuestro país y en el extranjero, tanto en seres humanos, principalmente niños, así como en diferentes especies animales, en donde el síntoma principal descrito es una parálisis principalmente de miembros inferiores (**Havard, 1885; Cuilty, 1887; Sosa, 1890; Armendáriz, 1913; Standley 1923**). Los casos de intoxicación colectiva más importantes por la ingesta del fruto de Kh en nuestro país, han sido reportados por Castillo en 1918 (**Castillo, 1920**) y Ramírez en 1919 (**Padrón, 1951**), con 106 casos y 10% de mortalidad el primero, y en miembros del ejército con mortalidad de 20% el segundo.

Instados por estas observaciones, diversos autores, principalmente norteamericanos, continuaron los estudios de tipo botánico, químico y toxicológico sobre Kh. Entre los principales trabajos de índole toxicológica destaca el trabajo de Marsh, en 1928, quien describió los síntomas, las dosis tóxica y letal en varias especies animales, tanto con el fruto como con las semillas y las hojas de Kh **(Marsh, 1928)**.

Por otra parte, Dreyer y colaboradores en 1975 lograron aislar y determinar la estructura química de algunos compuestos responsables de la alta toxicidad del fruto de Kh **(Dreyer y cols., 1975)**. Al mismo tiempo, se reportaban cada vez más casos de intoxicación accidental por este fruto en el ser humano, hasta que en 1951, Padrón en nuestro país escribió el primer reporte de intoxicación accidental en niños, y que incluyó además un primer estudio experimental de carácter científico, en el que logró reproducir la parálisis en la rata y el conejo **(Padrón, 1951)**. En este trabajo y más tarde con López y colaboradores en 1960, se describieron de manera precisa las características clínicas que presentaban los niños intoxicados con el fruto de Kh **(López y cols., 1960)**.

A partir de entonces, y a pesar de la gran cantidad de estudios con Kh en México y en el extranjero, no había un consenso que unificara criterios metodológicos entre ellos. Así, varios estudios se condujeron con el fruto completo de Kh, mientras que en otros, se utilizaron las toxinas aisladas; algunos trabajos usaron el fruto

maduro, y otros el fruto verde; se utilizaron diferentes preparaciones de Kh: macerada, pulverizada, la pulpa, etc. También, se utilizaron diversas especies animales, distintas vías de administración y dosificación.

No es sino hasta 1992, que se logró desarrollar un modelo de intoxicación aguda con el fruto completo de Kh por vía oral, en la rata y en otras especies animales **(Bermúdez y cols., 1992)**, en las que se produjeron lesiones compatibles con las presentadas por el ser humano (pérdida de peso, debilidad, disnea, etc.), así como daño histológico en pulmón, hígado y riñón, sin llegar a presentar parálisis en ninguno de los casos. Interesantemente, de todas las especies estudiadas (ratón, rata, conejillo de indias, hámster y perro), en este último no se presentó sintomatología alguna, coincidiendo con la creencia popular de que los frutos de Kh son ingeridos por el coyote (*Canis lactrans*), sin presentar la intoxicación, y de ahí uno de los nombres populares de la planta: coyotillo.

Posteriormente en 2006, con el objeto de estudiar la neuropatía, se logró desarrollar un modelo experimental reproducible y sistemático, de intoxicación crónica en la rata, con el fruto completo de Kh por vía oral **(Salazar y cols., 2006)**. En este modelo, se lograron reproducir todas las etapas de la parálisis que presenta el ser humano cuando ocurre la intoxicación crónica, incluso hasta la etapa de recuperación clínica.

1.4 Epidemiología de la intoxicación por Kh

Entre 1980 y 1989 la Dirección General de Epidemiología registró 94 brotes (9.4 casos por año) de intoxicación por plantas del género *Karwinskia* (**Arreola y cols., 2000**), siendo este último año cuando se da a conocer que Kh se encuentra distribuida en todo el territorio nacional (**Fernández, 1988**).

A partir de 1990, se reportaron más casos aislados y brotes de pequeña magnitud, por el Sistema de Vigilancia de Parálisis Flácidas Agudas (**Arreola y cols., 2000**).

Durante muchos años se pensó que la frecuencia de intoxicación por Kh era poco frecuente y limitada al norte del país. Sin embargo, a partir de 1995, la cifra de casos registrados de intoxicación por Kh subió a 20 casos al año, dato que parecía inferior a lo que se esperaba (**Bermúdez de Rocha y cols., 1995**). A este respecto, se debe señalar, que el extraordinario parecido que guarda la intoxicación por Kh con otras polineuropatías, propició que se pensara que muchos casos de parálisis, pudieron haber sido erróneamente diagnosticados como Síndrome de Guillain-Barré, poliomiелitis, etc., por lo que no se podía garantizar un número exacto de casos reales de intoxicación por Kh.

El número cada vez más creciente de reportes de intoxicación fatal en seres humanos tanto niños como adultos (**Bustamante y cols., 1978; Puértolas y**

cols., 1984), la dificultad de realizar un diagnóstico preciso, la falta de datos estadísticos certeros y el no contar con ningún tratamiento específico, apuraron a publicar el primer reporte estadístico en el país, en 1995 por Bermúdez de Rocha y colaboradores. La mayoría de los casos coincidían con la distribución de las 11 especies reportadas de *Karwinskia* a lo largo del país, en comunidades rurales, con niveles de educación subóptimo y en condiciones socioeconómicas de pobreza (**Bermúdez de Rocha y cols., 1995; Arreola y cols., 2000**).

1.5 Cuadro clínico en la intoxicación accidental por Kh

Cuando la ingesta del fruto es copiosa, aunque sea en una sola ocasión, se presenta un cuadro clínico respiratorio agudo que evoluciona rápidamente a dificultad respiratoria grave, ocurriendo la muerte en el transcurso de 2 a 3 días sin que se desarrollen signos ni síntomas neurológicos (**Padrón, 1951**). Además de este cuadro, se han reportado otros datos clínicos en pacientes hospitalizados, como son un cuadro intestinal grave, astenia, adinamia y desequilibrio hidroelectrolítico (**Calderón y Rizzi 1967; Bustamante y cols., 1978; Puértolas y cols., 1984; Ocampo y cols., 2007**).

Por otro lado, cuando la ingesta es moderada o escasa y en repetidas ocasiones, se produce un cuadro clínico crónico caracterizado por un síndrome neurológico, que se presenta de 4 a 6 semanas posteriores a la ingesta del fruto y consiste en

una parálisis flácida, simétrica, ascendente y progresiva, similar al síndrome de Guillain-Barré (**García y Cacho, 2005**), con el cual se confunde. Puede evolucionar con la muerte del paciente en cualquier momento del padecimiento o puede haber una recuperación lenta, que puede llevar desde los 6 meses hasta un año aproximadamente (**Bustamante y cols., 1978; Aguilar y Zolla, 1982; Ocampo y cols., 2007**).

Dado que se desconoce la fisiopatología de esta intoxicación, no ha sido posible establecer un tratamiento específico. Sólo se cuenta con medidas de soporte dependiendo de la gravedad de la intoxicación. En un modelo de intoxicación crónica *in vivo*, se administró un potente agente antioxidante (ácido α -lipoico), sin que se obtuvieran resultados clínicos o histológicos favorables (**García y cols., 2012**).

En la **Tabla II** se enlistan los principales signos y síntomas presentados por los enfermos intoxicados con Kh, según lo ya reportado (**Padrón, 1951; López y cols., 1960**).

SIGNO/SÍNTOMA	Padrón (1951) 5 a 15 días posteriores a la ingesta de <i>Kh</i>	López y cols. (1960)
Previo a la parálisis:		
Pródromos	Sí	Sí
Síntomas gripales		Sí
Fiebre	No	Sí
Irritabilidad nerviosa	Sí	
Postración	Sí	
Parestesias de miembros inferiores		Sí (a los 6 días del consumo de <i>Kh</i>)
Parestesias de miembros superiores		Sí (a los 7 días del consumo de <i>Kh</i>)
Disminución de reflejos		Sí
Trastornos de la marcha	Sí	Sí
Flacidez de cuello y cabeza		Sí
Durante la parálisis:	Desde las 72 h.	Aparece a los 16 días.
Primero parálisis espástica	Sí	
Posteriormente parálisis flácida	Sí	Sí
Primero reflejos exaltados	Sí	
Después reflejos abolidos	Sí	
Mejoría espontánea en reflejos y fuerza muscular	Sí	
Mejoría en sentido contrario a la instalación de la parálisis	Sí	Sí
Regresión del cuadro clínico	Sí, (máxima entre los 3 y los 12 meses)	Sí, (a los 2 meses)
Sensibilidad normal	Sí	Sí
Atrofia muscular	Si	
Simetría de la parálisis	Sí	Sí
Hipotermia en los miembros lesionados	Sí	
Deja deformidades	Sí	
Otros síntomas asociados:		
Disfagia	Sí	
Dificultad/Insuficiencia respiratoria	Sí	Sí
Infiltrado bronconeumónico bilateral (Rx de tórax)		Sí
Disminución de movimientos respiratorios	Sí	Sí
Polipnea	Sí	Sí

Tabla II. Signos y síntomas de intoxicación por *Karwinskia humboldtiana*. (Tomado de los trabajos de Padrón,1951 y López y cols., 1960). Las celdas en blanco corresponden a datos no reportados por uno u otro autor.

1.6 Intoxicación experimental con el fruto de Kh

Aunque la mayoría de los trabajos con Kh se enfocaron en el estudio de la parálisis, hubo otros autores interesados en estudiar el daño sistémico. Por tanto, como se mencionó anteriormente, se desarrollaron dos metodologías para administrar el fruto de Kh: la primera, para el estudio del daño sistémico **(Bermúdez y cols., 1992)** conocida como “modelo de intoxicación aguda”, y la segunda, para el estudio de la neuropatía **(Salazar y cols., 2006)**, conocida como “modelo de intoxicación crónica”.

1.6.1 Datos clínicos

Un dato comúnmente observado tanto en casos de intoxicación accidental, como en trabajos experimentales, ha sido la pérdida de peso que ocurre desde los primeros días de la intoxicación, acompañada o no de anorexia **(Padrón, 1951; Bermúdez y cols., 1986; Salazar y cols., 2006; García y cols., 2012)**. Además, se suman debilidad importante, hiporreflexia, pérdida de la actividad espontánea, pérdida de tono muscular, pilo-erección, ptosis palpebral, secreción conjuntival, deformidad espinal y atrofia muscular **(Bermúdez y cols., 1986; Salazar y cols., 2006)**.

También existen reportes de alteraciones renales y alteraciones en el metabolismo del ATP en corteza renal, sangre y hemoglobina (**Jaramillo y cols., 1995; Jaramillo y cols., 2005**), así como insuficiencia respiratoria grave que ocasiona la muerte en 12.5% de los animales (**Salazar y cols., 2006; García y cols., 2012**).

1.6.2 Hallazgos histológicos

La mayoría de los estudios experimentales en esta intoxicación están enfocados principalmente en la caracterización de la parálisis; sin embargo, existen algunos reportes sobre el daño histológico observado en el SNC (cerebro, cerebelo, médula espinal), así como en otros órganos, como el corazón, colon, músculo esquelético, hígado, riñón y pulmón.

1.6.2.1 Alteraciones histológicas en sistema nervioso

Al ser la parálisis el síntoma más llamativo cuando ocurre intoxicación accidental, muchos de los estudios experimentales con el fruto de Kh, estuvieron enfocados en el nervio periférico, en donde el daño se describe como una desmielinización segmentaria de la vaina de mielina y degeneración axonal (**Escobar y Nieto, 1965; Charlton y Pierce, 1970 a; Charlton y Pierce, 1970 b; Salazar y cols., 2006**).

Sin embargo, también se ha reportado daño a otros niveles del sistema nervioso. Por ejemplo, en el SNC de cabras y ratas se reporta hipercromasia, cromatólisis, gliosis, picnosis y pérdida de células de Purkinje (**Charlton y Pierce, 1970 c; Ortiz y cols., 1991; Becerra y cols., 2009**).

1.6.2.2 Alteraciones histológicas en otros órganos

En pulmón se ha descrito congestión, edema, atelectasia, hemorragia, fibrosis, engrosamiento de tabiques alveolares con acúmulo de células cebadas y necrosis. En hígado, se reporta congestión, edema y focos de necrosis centrolobulillar. En riñón, hay disminución del número de glomérulos normales, congestión vascular, desprendimiento de microvellosidades, necrosis tubular focal, fibrosis de la membrana basal de la cápsula de Bowman, daño en la barrera de filtración y en los túbulos contorneados (**Marsh, 1928; Bustamante y cols., 1978; Weller y cols., 1980; Bermúdez y cols., 1992; García y cols., 2013**).

Todo lo anterior indica que Kh produce efectos tóxicos a nivel sistémico (**Bustamante y cols., 1978; Puértolas y cols., 1984; Padrón, 1951; García y cols., 2012 y García y cols., 2013**), y no exclusivamente en sistema nervioso, como se pensaba inicialmente.

Llama la atención que el cuadro clínico de la intoxicación por Kh es compatible con patologías que involucran daño pancreático; sin embargo, el páncreas nunca ha sido estudiado en esta intoxicación. Sólo se ha reportado congestión, en la descripción macroscópica realizada en autopsias de cabras y ganado vacuno **(Marsh, 1928)**.

Está bien documentado que en las lesiones pancreáticas ocurre pérdida de peso y daño a órganos distantes, y que en casos graves se presenta dificultad respiratoria grave que conduce a la muerte.

Se sabe que cuando ocurre inflamación del páncreas, se puede desencadenar un Síndrome de *Respuesta Inflamatoria Sistémica* (SIRS, por sus siglas en inglés), que cuando se exagera, da lugar al Síndrome de *Disfunción Orgánica Múltiple* (MODS), con mayor probabilidad de causar la muerte, que en la mayoría de los casos se debe a falla respiratoria **(Bathia y cols., 2005; Sánchez y cols., 2005 a; Pandol y cols., 2007; Akbarshahi y cols., 2012)**.

1.7 Páncreas

El páncreas es un órgano alargado y transversal que se encuentra en la cavidad abdominal, y que participa de forma fundamental en los procesos digestivos. El páncreas de rata es muy lobulado, de color rosa pálido, de consistencia blanda,

similar a la que tiene el tejido adiposo. Se extiende desde el duodeno y yeyuno hasta el bazo.

Es una glándula formada por dos tipos de tejido: endocrino y exocrino. El páncreas endocrino, está formado por los islotes de Langerhans. Este tejido se conforma de varios tipos celulares, encargados de la síntesis de hormonas metabólicas, que se vierten al torrente sanguíneo (**Figura 4**). Ejemplos de ellas son las hormonas glucagon e insulina, que regulan el equilibrio de glucosa en los compartimentos sanguíneo y celular. Otras actúan a nivel del sistema digestivo, inhibiendo otras enzimas digestivas y funciones del tracto gastrointestinal.

El páncreas exocrino se compone de células acinares y estructuras ductales. La célula acinar es responsable de producir, almacenar y secretar las enzimas digestivas, que se colectan mediante un sistema de conductos, para finalmente verterse hacia la luz duodenal, sitio en donde se activan para llevar a cabo sus funciones (**Figura 4**). El páncreas exocrino tiene un papel fundamental en la digestión de alimentos. Para esto, secreta gran cantidad de enzimas, entre las cuales se encuentran proteasas, carbohidrasas y lipasas, entre otras, para actuar en el duodeno, específicamente con cada sustrato y de acuerdo a lo requerido según la dieta (**Welsch, 2014**).

Algunas de estas enzimas, como las proteasas, se producen como zimógenos, es decir, como moléculas inactivas. Además, están recubiertas por membranas

formando compartimientos cerrados (gránulos de zimógeno). Éstos constituyen algunos de los mecanismos de autoprotección contra el daño que pueda producirse en la misma célula acinar (**Logsdon y Ji, 2013**).

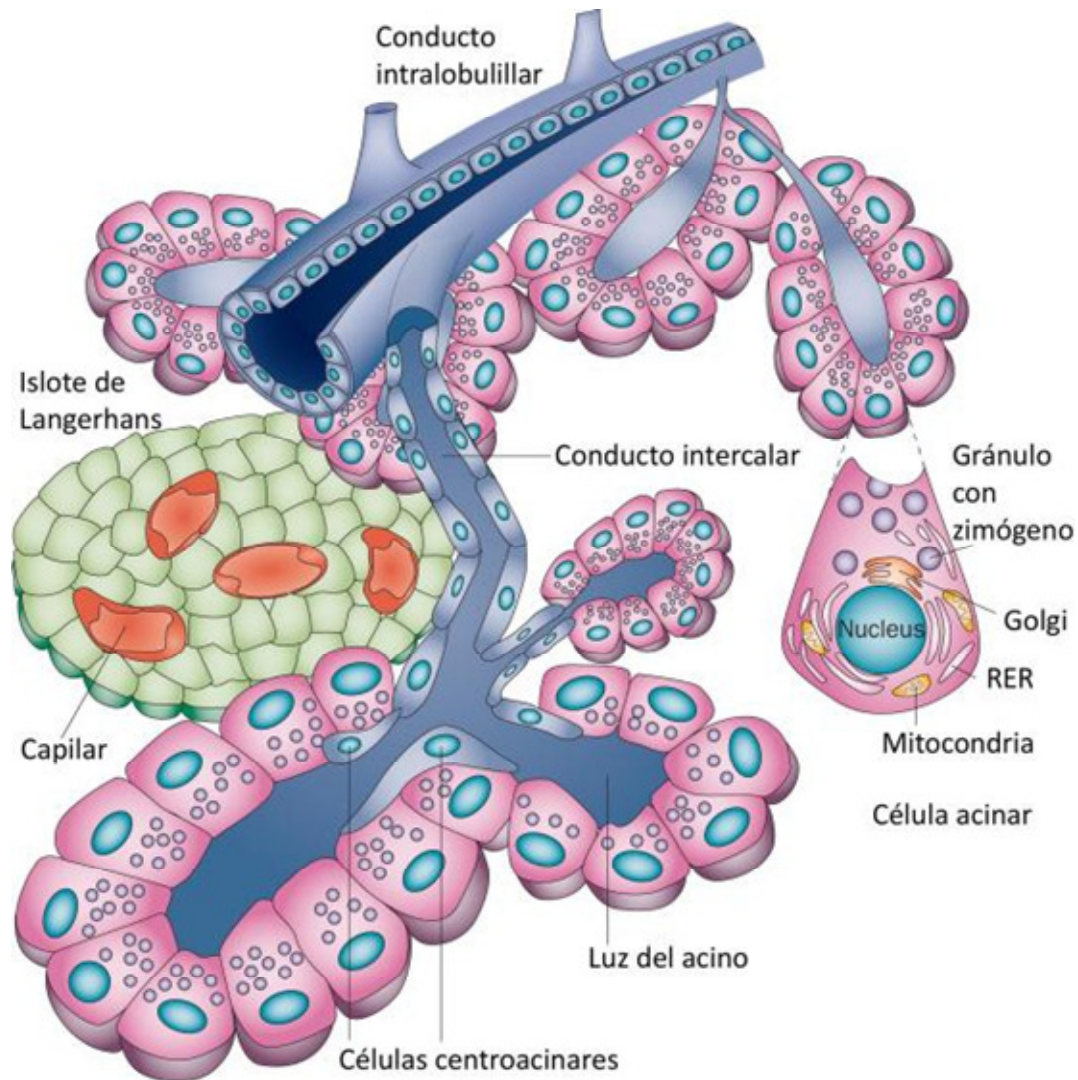


Figura 4. Esquema que muestra las porciones endocrina y exocrina del páncreas (Tomado de Logsdon y Ji, 2013).

1.7.1 Histología del páncreas exocrino

La porción exocrina está formada por células secretoras dispuestas en acinos. La célula acinar es de forma piramidal, con núcleo redondo y basófilo, situado en la porción basal. Su citoplasma se encuentra ocupado por gránulos acidófilos en la porción apical, que corresponden a gránulos de zimógeno, y contienen las enzimas digestivas en estado inactivo **(Welsch, 2014)**.

1.7.2 Histología del páncreas endocrino

La porción endocrina del páncreas está formada por los islotes de Langerhans, que son agrupaciones de células generalmente bien delimitadas, que miden aproximadamente 50 a 280 μm de diámetro. Estas agrupaciones celulares están conformadas por diferentes tipos de células: A, B, D y PP, cada una de las cuales produce un tipo especial de hormona. Observadas mediante microscopía de luz con la técnica de rutina, todas estas células son muy parecidas, y se requiere el uso de métodos inmunohistoquímicos para identificarlas. Sin embargo, en general se caracterizan por ser redondas, levemente eosinófilas, con núcleos de cromatina dispersa **(Welsch, 2014)**.

Cuando un órgano se lesiona, como en este caso el páncreas, puede ocurrir pérdida de su arquitectura histológica y muerte celular. En modelos de daño pancreático, se ha reportado muerte de las células acinares por necrosis y apoptosis (**Kaiser y cols., 1996; Gukovskaya y cols., 1996**).

1.8 Lesión y muerte celular

La muerte celular se clasifica según criterios morfológicos y bioquímicos como apoptosis, autofagia y necrosis.

1.8.1 Apoptosis

La apoptosis, llamada también muerte celular programada tipo I, es una vía terminal para células de organismos multicelulares. La apoptosis permite que ocurran los eventos necesarios para el correcto funcionamiento del organismo, tales como proliferación/homeostasis, diferenciación, desarrollo y eliminación de células dañinas, como son las células infectadas o con errores en su genoma (**Elmore, 2007**).

Morfológicamente, la apoptosis se caracteriza por reducción del volumen celular (picnosis), condensación del núcleo, fragmentación del mismo (cariorraxis), vesiculación de la membrana plasmática, y pérdida de su adhesión a la matriz extracelular y a células vecinas. Bioquímicamente, ocurre fragmentación del ADN cromosómico en fragmentos internucleosomales, externalización de fosfatidilserina y activación de diversas proteasas conocidas como caspasas **(Ouyang y cols., 2012)**. Los restos celulares, producto de la fragmentación de la célula, en pequeños cuerpos apoptóticos, son removidos por células fagocíticas vecinas.

La apoptosis es regulada por varios grupos diferentes de moléculas: unas “reguladoras” y otras “ejecutoras” **(Mukhopadhyay y cols., 2014)**. A su vez, las caspasas se clasifican en iniciadoras (caspasas-8 y -9) y efectoras o ejecutoras (caspasas-3, -6 y -7), según su posición en la cascada de señalización apoptótica **(Hu y cols., 2013)**. Las caspasas iniciadoras se activan mediante su autoescisión, y subsecuentemente, escinden y activan a las ejecutoras. Posteriormente, las caspasas ejecutoras escinden componentes celulares que propician la destrucción proteolítica de la célula **(Green y Evan, 2002)**. Un marcador bioquímico útil de apoptosis, es la activación de una de estas proteasas, específicamente de la caspasa-3.

1.8.1.1 Apoptosis mediada por la mitocondria

En los mamíferos, existen dos vías principales de apoptosis: la vía extrínseca (mediada por receptor) y la vía intrínseca (mediada por la mitocondria) **(Hassen y cols., 2012)**. En ambas, las proteínas reguladoras son las caspasas, mediante las cuales, ambas vías culminan en un fin terminal común: la muerte celular **(Jin y El-Deiry, 2005)**.

Opuesto a lo que ocurre en la vía extrínseca, en la apoptosis mediada por la mitocondria, o vía intrínseca, los estímulos que conllevan a la muerte celular, provienen del interior de la célula. Estos “estresores” son reconocidos por diferentes proteínas intracelulares, cuyos mensajes conducen a una *Permeabilización de la Membrana Mitocondrial Externa* o MOMP, por sus siglas en inglés **(Chipuk y cols., 2006)**.

En la mitocondria, la permeabilización de la membrana mitocondrial es el disparador tanto para la apoptosis como para la necrosis, y es considerada el “punto de no retorno” en la cadena de eventos que conllevan a la muerte celular **(Gukovsky y cols., 2011)**. Esta permeabilización membranal es resultado de la interacción de varias proteínas de una misma familia: la familia de proteínas 2 de

células de linfoma B (Bcl-2). Esta familia de proteínas Bcl-2, se compone de 25 miembros, tanto proapoptóticos (Bax y Bak), como antiapoptóticos (Bcl-2, Mcl-1 y Bcl-xL).

Cuando por algún estímulo interno se pierde el equilibrio entre proteínas proapoptóticas y anti-apoptóticas, se produce la permeabilización: Bax y Bak se activan e insertan en la membrana mitocondrial externa, causando el flujo del citocromo c y otras proteínas mitocondriales hacia el citoplasma (**Chipuk y cols., 2006**). Posteriormente, mediante interacciones con otras proteínas apoptóticas, conducen a la activación de la caspasa iniciadora (usualmente la caspasa-9), que en turno media la activación de la caspasa-3 (ejecutora), iniciando una cascada de eventos que culmina en la destrucción celular (**Jin y El-Deiry, 2005**). Otros mecanismos de activación de caspasas, son producidos por otras proteínas mitocondriales que se liberan hacia el citoplasma, como son las Smac/DIABLO y Omi/HtrA2 (**Gustafsson y Gottlieb, 2008**).

1.8.2 Autofagia

La autofagia es un sistema catabólico que utiliza la célula eucariota para renovar sus componentes viejos o defectuosos y reemplazarlos por nuevos. De esta manera actúa como un mecanismo de control de calidad, que permite la

sobrevivencia y adaptación celular en condiciones extremas, como la falta de nutrientes, estrés, agentes tóxicos, daño al ADN, etc. **(Rodríguez y cols., 2011)**.

Sin embargo, dependiendo de las condiciones, la autofagia también puede conducir a la muerte celular por sí misma e incluso inducir apoptosis o necrosis.

La autofagia es un proceso de múltiples pasos. Comienza con la formación de un autofagosoma, compartimiento de doble membrana que secuestra organelos y proteínas destinadas a degradación. Los autofagosomas se fusionan con endosomas y luego con lisosomas, generando un compartimiento de membrana única: el autolisosoma. Aquí, el material secuestrado es degradado por hidrolasas lisosomales, cuyos productos de degradación son reciclados al citoplasma **(Rodríguez y cols., 2011; Gukovskaya y Gukovsky, 2012)**.

La disfunción de la autofagia puede ocurrir por defectos en la formación del autofagosoma (etapa temprana), por la inhibición de la fusión del autofagosoma con el lisosoma, o la inhibición de las enzimas lisosomales (etapa tardía). Alteraciones en la etapa tardía, prolongan la vida media de las vesículas autofágicas, las cuales se fusionan entre sí, llegando a ser tan grandes como el núcleo, ocupando gran parte del citoplasma. En cambio, cuando el flujo autofágico es eficiente, el recambio de vesículas autofágicas es alto, ya que su vida media en células de mamíferos es menor a 10 min y son pequeñas **(Gukovskaya y Gukovsky, 2012)**.

Los estándares de oro para evaluar autofagia son la Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) para analizar las características ultraestructurales (autofagosomas y autolisosomas) y la proteína marcadora de autofagia LC3-II. La proteína LC3 existe en dos formas: LC3-I y LC3-II. La proteína LC3-I es citosólica; cuando se lipida se conoce como LC3-II, que es incorporada al autofagosoma. La proteína LC3-II migra más rápido que la proteína LC3-I en una electroforesis, por lo que es fácilmente distinguida mediante Western Blot (**Gukovskaya y Gukovsky, 2012**).

1.8.3 Necrosis

La necrosis es un proceso de muerte celular pasivo, sin requerimiento de energía y con pérdida de las funciones celulares. Esto conlleva a un proceso osmótico desmesurado, que finaliza con la lisis de la membrana celular, liberando el contenido intracelular hacia el espacio extracelular, generando una respuesta inflamatoria. Por lo tanto también conduce a las células vecinas hacia la muerte, atrayendo al mismo tiempo, a más células inflamatorias (**Kuida y cols., 1996; Vercammen y cols., 1998**).

Recientemente, se ha reportado que la necrosis, que por lo general es catalogada como un proceso de muerte celular accidental, también puede ser programada. Se

ha demostrado que la mitocondria también juega un papel importante en la muerte celular por necrosis, ya que puede ocurrir despolarización de la membrana mitocondrial, que conduce a la depleción de ATP y por último a necrosis (**Baines, 2010; Gukovsky y cols., 2011**).

1.9 Amilasa pancreática

La amilasa es una enzima hidrolasa producida principalmente en glándulas salivales y el páncreas. Cataliza la reacción de hidrólisis de los enlaces 1-4 del componente α -amilasa al digerir el glucógeno y el almidón para formar azúcares simples.

Cuando ocurre inflamación de alguna de estas glándulas, los niveles séricos de amilasa se elevan (**Kumar y cols., 2010**).

CAPÍTULO 2

JUSTIFICACIÓN

En la intoxicación aguda por fruto de Kh se produce daño multiorgánico y la muerte debido a insuficiencia respiratoria grave. Estas condiciones, también se desarrollan cuando ocurre daño pancreático.

Sin embargo, no hay reportes en la literatura que describan daño histológico, molecular, y/o funcional en el páncreas en esta intoxicación, por lo que se considera importante determinar si existe compromiso de este órgano en la intoxicación aguda por este fruto, para contribuir al mejor entendimiento de la misma.

CAPÍTULO 3

HIPÓTESIS

La intoxicación aguda con fruto de Kh produce daño celular y tisular en el páncreas de la rata Wistar.

CAPÍTULO 4

OBJETIVO GENERAL

Determinar cuál es el efecto de la intoxicación aguda por fruto de Kh en el páncreas de la rata Wistar, a nivel macroscópico, histológico y molecular.

CAPÍTULO 5
OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En un modelo de intoxicación aguda por fruto de Kh, en la rata Wistar:

1. Evaluar las características macroscópicas del páncreas.
2. Identificar la presencia de alteraciones histológicas en el páncreas.
3. Determinar si existe activación de los mecanismos de muerte celular.
4. Evaluar la existencia de alteraciones morfológicas en las mitocondrias de las células acinares.
5. Determinar si los niveles séricos de amilasa pancreática resultan afectados.

CAPÍTULO 6

MATERIAL Y MÉTODO

6.1 Material

6.1.1 Material Biológico

6.1.1.1 Colecta de fruto de Kh

Se colectó el fruto maduro de Kh en Hidalgo, Nuevo León, durante los meses de Julio y Agosto. Para identificar la planta, se tomó en cuenta que la forma de las hojas fuera la característica de esta especie (**Fernández, 1992**).

6.1.1.2 Animales de experimentación

Se usaron 18 ratas Wistar hembras obtenidas del bioterio del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey (ITESM). Todos los animales contaron con su certificado de salud correspondiente. El peso promedio de las 18 ratas Wistar fue de 225.0 ± 25.0 g.

6.1.2 Material no biológico

6.1.2.1. Reactivos

Preparación de la suspensión del fruto de Kh: se usó agua purificada Bonafont®.

Anestesia: se usaron clorhidrato de xilazina (Procin® Pisa, Reg. SAGARPA Q-7833-099) y pentobarbital sódico (Pisabental® Pisa, Reg. SAGARPA Q-7833-215).

Preparación de todos los reactivos: se utilizó agua ultra purificada (miliQ).

Preparación de las soluciones amortiguadoras de Sörensen y PBS: se usaron fosfato de sodio dibásico anhidro (Na_2HPO_4 , Sigma-Aldrich, V000317), fosfato de sodio monobásico dihidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich, 71500), fosfato de potasio (KH_2PO_4 , Sigma-Aldrich P-8416), cloruro de sodio (NaCl , CTR-02228), cloruro de potasio (KCl , DEQ), hidróxido de sodio (NaOH , Merck, Art. 6498), ácido clorhídrico (HCl , CTR-00656).

Preparación de portaobjetos: fueron tratados con 3-aminopropyltriethoxysilane (Sigma-Aldrich, A3648) y acetona (CTR-00420).

Fijación de muestras: se usó formalina amortiguada neutra al 10% (Thermo Scientific, 5705EXL). Para la fijación por frío se utilizó el compuesto Optimal Cutting Temperature (OCT, Tissue Tek®, 62550-01).

Procesamiento de muestras y tinción de rutina con Hematoxilina-Eosina (HE): se utilizaron agua destilada Alpe's (Laboratorios Monterrey SA de CV), alcohol isopropílico (CTR-01244), parafina (Histoplast IM, Thermo Scientific # 8331), xileno (CTR-156222), alcohol etílico absoluto (CTR-01160), alcohol etílico de 96° (CTR-144531), hidróxido de amonio (CTR-02996), hematoxilina (Richard-Allan Scientific 7212L), eosina Y (Richard-Allan Scientific 7111L) y Entellan® (Merck KGaA, 1079610500).

Técnica de inmunofluorescencia: para llevar a cabo la exposición de antígenos se utilizó buffer Dewax and Hier Buffer H, (Thermo Scientific, TA-100-DHBH). Para blanqueamiento de autofluorescencia se utilizó borohidruro de sodio (Sigma-Aldrich, 452882). Para preparar la solución bloqueadora se usó tritón X-100 (Sigma, T9284) y leche en polvo Total Digest Deslactosada Light (Nestlé). Anticuerpos utilizados: anticuerpo primario de conejo anti-actina + pro caspasa-3 de rata (Abcam ab13847), anticuerpo secundario de cabra anti-conejo IgG H&L (Alexa Fluor® 488) pre-adsorbido (Abcam ab150081) y medio de montaje con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, Vectashield, Hard Set, H1500).

Ensayo de TUNEL: se utilizó el Kit HT Titer TACS™ Assay (Trevigen, 4822-96-K), peróxido de hidrógeno al 30% (Merck Millipore 107209), metanol (J.T. Baker 9070-03) y ácido fosfórico (H₃PO₄, J.T. Baker, 0260-05).

Análisis molecular por Western-Blot: Para homogenizar las muestras se usó: Tris base (Sigma-Aldrich 93352), Nonidet-P40 (NP40, USBiological N3500), SDS (USBiological S5010), deoxicolato de sodio (Sigma-Aldrich D6750) y PMSF (Sigma-Aldrich P7626). Para la cuantificación de proteínas, se utilizó el Kit Pierce® BCA Protein Assay (Thermo Scientific, #23225). Para la separación de proteínas, se usaron: solución 29:1 de acrilamida/bis (BioRad #1610146), glicerol (CTR-02860), glicina (Sigma-Aldrich G8898), azul de bromofenol (Sigma-Aldrich B-8026), DTT (Sigma-Aldrich D0632), PSA (Sigma-Aldrich A3678), TEMED (Sigma-Aldrich T7024) y Tween 20 (Sigma-Aldrich P1379). Anticuerpos utilizados: anticuerpo primario de conejo anti-LC3B (Sigma-Aldrich L7543), anticuerpo primario policlonal de conejo anti-caspasa-3 activa de rata (Abcam® ab2302) y para marcar la carga de proteínas, se usó el anticuerpo primario monoclonal de conejo anti-actina (Sigma-Aldrich A5441). El anticuerpo secundario utilizado, fue el de cabra anti-conejo IgG-HRP (Sigma-Aldrich A9044). Para el revelado de la membrana de transferencia se usó el substrato quimioluminiscente SuperSignal™ West Pico (Thermo Scientific, #34080), solución reveladora GBX (#1900943) y solución fijadora GBX Fixer (#1901875).

Histoquímica enzimática: se usó la enzima citocromo c de corazón de caballo (Sigma-Aldrich C2506) y DAB (3,3'-diaminobencidina tetrahidroclorada, Sigma-Aldrich, D5637).

Determinación de actividad de amilasa en suero: se usó el Kit colorimétrico QuantiChrom™ α -Amylase Assay (DAMY-100).

6.1.2.2 Cristalería y material diverso

Cribas 30 y 50x (U.S.Standard Sieve Series, Dual Manufacturing Co.).

Sonda de alimentación infantil 8FR K-31 (AMA).

Jeringas de 1, 3, 5 y 10 mL con aguja (Plastipak®).

Cristalería diversa (Pyrex®).

Guantes de látex (Supreno® EC, SEC-375-S, SEC-375-M).

Estuche de disección (Hergom®).

Hojas de bisturí (Hergom®, 15 y 20).

Navajas para microtomo 34 ½/30 mm (Thermo Scientific MX35 Premier+, 3052835).

Portaobjetos de espesor 0.8 - 1.1 mm (Corning, 2947BC).

Cubreobjetos 24 x 50 mm (Corning, 2935).

Puntillas para micropipetas de 1 a 200 μ L (Sorenson BioScience Inc., 10590) y de 100 a 1000 μ L (Corning Inc. 4846).

Pipetas Pasteur.

Tubos Falcon de 15 y 50 mL (Corning).

Tubos estériles de 1.5 y 2.0 mL (Eppendorf).

Microplacas de 96 pocillos (Corning 3595).

Moldes para la inclusión de diverso tamaño (Tissue-Tek®).

Membrana de PVDF (GVS #1214726).

Film radiográfico T-MAT G/RA (Kodak # 6031835).

Cassette de exposición FourSquare Spectroline 8x10in (Spectronics Corporation).

6.1.2.3 Equipo

6.1.2.3.1 Equipo del Departamento de Histología de la UANL

- Agitador Daigger Vortex Genie 2® (A. Daigger & Co. Inc.).
- Agitador VX100 (Labnet International Inc.).
- Balanza digital (AND GR-120).
- Cámara de electroforesis (Bio-RAD Mini-PROTEAN® Tetra System).
- Cámara de transferencia (Bio-RAD Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell).
- Centrífuga con sistema de enfriamiento (SIGMA 1-15K).
- Homogenizador de tejidos de 30-1,100 rpm, 110 V y 50/60 Hz (Bellco), con émbolo de teflón y vaso de vidrio (Potter-Elvehjem).

- Lector de placas iMark™ Microplate Reader (Bio-RAD).
- Potenciómetro Ultra Basic UB-10 (Denver Instrument).
- Power Station 300 Plus (Labnet International Inc.).
- Ultracongelador Revco Value Plus (Thermo Scientific).
- Ultrapurificador de agua Barnstead Easy Pure II (Thermo Scientific).

6.1.2.3.2 Equipo de la Unidad de Bioimagen del CIDICS de la UANL

- Balanza digital AND, GR-200.
- Balanza digital AND, GX-2000.
- Cámara de teléfono celular iPhone 3®.
- Campana de flujo laminar Biosafety Changing Station (Techniplast, BS48).
- Centrífuga con sistema de enfriamiento (Eppendorf Centrifuge 5417R).
- Centro de inclusión HistoStar (Thermo Scientific).
- Criostato Microm HM 550 (Thermo Scientific).
- Horno Drying Oven DVS402C (Yamato).
- Microscopio Confocal LSM 710 (Carl Zeiss).
- Microtomo Microm HM 355S (Thermo Scientific).
- Módulo para la exposición de antígenos PT Module (Thermo Scientific).
- Molino Diet Food Procesor (Maxim, VJ-753).
- Pipetas automáticas de 10, 200 y 1000 µL (Thermo Scientific).

- Potenciómetro SevenMulti (Mettler Toledo).
- Placa térmica Cimarec (Thermo Scientific).
- Procesador de Tejidos Excelsior ES (Thermo Scientific).
- Rack ventilado con Jaulas selladas e Inyector de aire tipo Slim (Techniplast).
- Refrigerador (General Electric, GSMF6PGXEW).
- Refrigerador (Sanyo, SR-3721MM).
- Teñidor automático Varistain Gemini ES (Thermo Scientific).
- Ultracongelador REVCO Ultima Plus (ULT2586-10-A43, Thermo Fisher Scientific).
- Ultrapurificador de agua (Millipore Milli-Q Advantage A10).
- Incubadora Max-Q 4000 (Thermo Scientific).

6.2 Metodología

6.2.1 Preparación del fruto de Kh

El fruto fue secado al aire libre y se protegió de la luz, tal como se ha descrito previamente (**Bermúdez y cols., 1986**). Posteriormente fue molido y tamizado en cribas de 50x (300 μm de diámetro). Con el fruto molido se realizó una suspensión acuosa para ser administrada a los animales de acuerdo a su peso corporal.

6.2.2 Manejo de los animales de experimentación

Las ratas Wistar fueron alojadas en la Unidad de Modelos Animales del CIDICS de la UANL, con ciclos de luz-oscuridad de 12 h cada uno. Estos animales fueron supervisados por el personal técnico veterinario de la unidad y manejados exclusivamente por ellos y por el personal responsable de este proyecto. Las ratas fueron colocadas en grupos de 3, dentro de jaulas con capacidad para 4 ratas, fabricadas en policarbonato, con reja de acero inoxidable y con bebedero de 500 mL. Se les colocó una cama de aserrín de pino, misma que fue cambiada cada tercer día.

El alimento (LabDiet # 5 P14-Prolab RMH 2500) y agua de beber purificada se proporcionaron a libre demanda. El alimento fue retirado 8 h previas a la administración del fruto de Kh.

Los pesos de todos los animales fueron registrados diariamente por el personal responsable del proyecto, a la misma hora del día, antes de los sacrificios. Para registrar los pesos se utilizó una balanza digital (AND GX-2000).

6.2.3 Grupos experimentales

Se establecieron cinco grupos experimentales y un grupo control, tal y como sigue:

Grupo 1) 24 h posteriores a la administración del fruto de Kh ($n=3$)

Grupo 2) 48 h posteriores a la administración del fruto de Kh ($n=3$)

Grupo 3) 72 h posteriores a la administración del fruto de Kh ($n=3$)

Grupo 4) 96 h posteriores a la administración del fruto de Kh ($n=3$)

Grupo 5) 120 h posteriores a la administración del fruto de Kh ($n=3$)

Grupo 6) control, sin la administración del fruto de Kh ($n=3$)

A las ratas de los grupos experimentales, se les administró la suspensión con el fruto molido de Kh, mientras que a las ratas del grupo control únicamente se les administró agua de beber.

6.2.4 Administración del fruto de Kh

La suspensión acuosa de fruto de Kh se administró vía oral mediante una sonda orogástrica flexible, en una sola dosis de 5 g/Kg de peso corporal, en 5 mL de agua (**Bermúdez y cols., 1992**). Se aseguró de que en todos los casos fuera colocada adecuadamente y de que fuera administrada la dosis total calculada.

6.2.5 Sacrificio de los animales

Todos los animales se sacrificaron según los grupos anteriormente descritos, a las 24, 48, 72, 96 o 120 h posteriores a la administración de Kh, respectivamente y dentro de una campana de flujo laminar. Los animales fueron sacrificados bajo anestesia general, aplicando primero xilazina intramuscular a una dosis de 10 mg/Kg como tranquilizante, seguido de una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico como anestésico, a una dosis de 88 mg/Kg.

Para asegurarse de que el animal estuviera completamente anestesiado, se comprobó la ausencia de los reflejos corneal (al estímulo táctil suave), y podálico (a la presión en el espacio interdigital de las patas posteriores).

6.2.6 Fotodocumentación del aspecto macroscópico del páncreas

Una vez obtenido el efecto anestésico, se procedió a la disección abdominal. Se realizó la evaluación de la apariencia macroscópica del páncreas *in situ*. Se registró el color, aspecto, vascularidad y estado hemorrágico del páncreas, y se fotodocumentó con cámara de teléfono celular iPhone 3®.

6.2.7 Toma de las muestras

Primero se extrajeron de 2 a 3 mL de sangre a través del ventrículo derecho para su posterior análisis bioquímico. Luego, se disecó el páncreas en bloque desde el duodeno hasta el bazo. Después fueron lavados brevemente en buffer de fosfatos a pH 7.3. La mitad derecha del páncreas fue disecada e inmediatamente fijada por inmersión en formalina amortiguada al 10%, a pH 7.3 para realizar el análisis microscópico y los ensayos inmunohistoquímico y de TUNEL. Una cuarta parte del páncreas fue colocada en compuesto OCT y congelado a -25°C, para su posterior corte por congelación para el ensayo de histoquímica enzimática. La última cuarta parte fue envuelta en papel aluminio y congelada a -80°C para su análisis molecular por Western Blot.

6.2.8 Análisis microscópico y cuantificación del daño pancreático

Las muestras de tejido previamente fijadas en formalina se procesaron en el CIDICS de la UANL, con el procesador de tejidos Excelsior™ AS Tissue Processor, usando concentraciones graduales de alcohol isopropílico, hasta llegar a la preinclusión en parafina (Histoplast IM Thermo-Scientific # 8331). La inclusión de las muestras de tejido en bloques de parafina se realizó en el centro de inclusión HistoStar™ (**ANEXO A**). Una vez obtenidos los bloques con el tejido, se obtuvieron secciones histológicas de 5 µm de espesor, con el microtomo automático HM 355S.

Las laminillas con las muestras de tejido se desparafinaron en horno (Yamato DVS402C) a 60°C y luego con xileno, para posteriormente hidratarlas gradualmente. La tinción con HE (**ANEXO C**) se realizó en un teñidor automático Varistain Gemini ES. Las laminillas se deshidrataron gradualmente, fueron clarificadas y montadas con Entellan® para su observación al microscopio de luz de campo claro (Primo Star, Carl Zeiss) desde el objetivo panorámico hasta el de inmersión en aceite de 100x. Las laminillas fueron fotodocumentadas en un microscopio de luz (Nikon Eclipse 50i), utilizando los objetivos 40x y 100x, con factor de tubo de 1x.

La severidad del daño pancreático se evaluó tomando 6 campos aleatorios con el objetivo 40x, con base en una plantilla de calificaciones para edema, infiltrado inflamatorio, hemorragia y necrosis, de acuerdo a reportes previos de varios modelos experimentales de daño pancreático (**Spormann y cols., 1989; Nakamichi y cols., 2005; Laukkarinen y cols., 2007; Ning y cols., 2013**).

Las laminillas se examinaron en condiciones triple ciego, por tres examinadores utilizando las calificaciones que aparecen en la **Tabla III**. Las plantillas de calificaciones de los tres observadores se procesaron en el software Microsoft Excel 2010, donde se calcularon los valores promedio y desviación estándar. El grado de daño pancreático se estableció mediante la sumatoria de todas las calificaciones obtenidas para cada parámetro individual, en donde la calificación para el mayor daño corresponde a 20.0 puntos (**Ning y cols., 2013**).

Una vez obtenido el promedio y desviación estándar, los resultados fueron analizados estadísticamente y graficados.

Tabla de calificaciones para:			
Edema	Infiltrado inflamatorio	Hemorragia	Necrosis
Ausente..... 0	Ausente..... 0	Ausente..... 0	Ausente..... 0
Leve..... 1	Leve..... 1	< 2 focos..... 3	< 5%..... 3
Moderado..... 2	Moderado..... 2	3 a 5 focos..... 5	5 a 20%..... 5
Severo..... 3	Severo..... 3	> 5 focos..... 7	> 20%..... 7

Tabla III. Plantilla de calificaciones para edema, infiltrado inflamatorio, hemorragia y necrosis, de acuerdo a modelos establecidos de daño pancreático. Tomado de Spormann y cols., 1989; Nakamichi y cols., 2005; Laukkarinen y cols., 2007 y Ning y cols., 2013.

6.2.9 Ensayo de inmunofluorescencia para la identificación de la proteína pro-caspasa-3 activa

Se usaron laminillas silanizadas (**ANEXO B**) con secciones de tejido pancreático de 5 µm de espesor, que fueron incubadas durante 5 min con borohidruro de sodio (45,288-2 Sigma-Aldrich) a una concentración de 10 mg/mL, para la supresión de la autofluorescencia y de la fluorescencia inducida por el fijador.

Después, las laminillas se lavaron dos veces en PBS y se incubaron en una solución de bloqueo conteniendo leche en polvo deslactosada sin grasa (Nestlé total digest) al 5% y Tritón al 0.1% durante una hora. Después, las laminillas se lavaron 4 veces en PBS, 5 min por lavado.

La inmunotinción (**ANEXO D**), se realizó manualmente con los siguientes anticuerpos: el anticuerpo primario policlonal de conejo anti-activa + pro-caspasa-3 (2.5 µg/mL, Abcam, ab13847). El anticuerpo secundario policlonal de cabra anti-conejo IgG H&L (Alexa Fluor® 488) pre-adsorbido (1:5000, Abcam, ab150081). Una vez terminada la inmunorreacción, las laminillas se montaron con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, Vectashield, Hard Set, H1500) y fueron observadas y fotodocumentadas en un microscopio confocal LSM 710 (Carl Zeiss).

6.2.10 Ensayo de TUNEL para la determinación de fragmentación de la cromatina

Para la detección de la fragmentación de la cromatina, fenómeno que ocurre en la muerte celular como la apoptosis, se realizó un ensayo colorimétrico cuantitativo de fragmentación del ADN cromosómico, con el método TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling*), que se realizó con el Kit HT Titer TACSTM Assay (Trevigen, 4822-96-K) de acuerdo a las instrucciones del fabricante (**ANEXO E**).

6.2.11 Análisis molecular por Western Blot para la determinación de las proteínas caspasa-3 activada, LC3-I y LC3-II

A partir del páncreas congelado a -80°C , se tomó un fragmento de 20 mg de tejido, que fue macerado con un homogenizador de tejidos Bellco a una velocidad de 1,100 rpm, e incubado en $10\ \mu\text{L}/\text{mg}$ de buffer de lisis durante 30 min en hielo, mezclando con vórtex cada 10 min (**ANEXO F**). A partir del sobrenadante, se realizó la cuantificación de proteínas con el Kit PierceTM BCA Protein Assay (**ANEXO G**).

Posteriormente, se utilizaron estas muestras para realizar una electroforesis en gel de poliacrilamida para la detección de las proteínas LC3-I y LC3-II, implicadas en la autofagia, y para la detección de la proteína caspasa-3 activada, involucrada en la apoptosis (**ANEXO H**).

Se utilizaron los anticuerpos primarios anti-LC3, anti-caspasa-3 activada y anti-actina a una dilución de 1:1000. Los anticuerpos secundarios anti-conejo y anti-ratón conjugados con HRP, se utilizaron a una dilución 1:3000 (**ANEXO H**). La membrana de PVDF se reveló por quimioluminiscencia (**ANEXO I**).

6.2.12 Ensayo de histoquímica enzimática para la determinación de la actividad enzimática de citocromo c oxidasa

A partir de los fragmentos de páncreas congelados a -25°C , se realizaron cortes por congelación de $16\ \mu\text{m}$ de espesor en un criostato Microm HM 550. Las laminillas con los cortes se colocaron en cajas de Coplin para ser sumergidas en medio de incubación con la enzima citocromo c oxidasa (Sigma-Aldrich, C2506) y DAB (3,3'-diaminobencidina) en Buffer de fosfatos 0.1 M, pH 7.3, a 37°C durante 3 h, protegidas de la luz. Posteriormente fueron lavadas en buffer de fosfatos, deshidratadas, aclaradas y montadas con Entellan® (**ANEXO J**). La prueba se considera positiva si las mitocondrias adquieren una tonalidad marrón. De este

modo fueron identificadas las mitocondrias para evaluar su distribución y localización dentro de la célula acinar mediante microscopía de luz de campo claro (Primo Star, Carl Zeiss), desde el objetivo panorámico hasta el de 100x, luego fueron fotodocumentadas en un microscopio de luz (Nikkon Eclipse 50i), utilizando los objetivos 40x y 100x con factor de tubo de 1x.

6.2.13 Ensayo bioquímico para el análisis de la actividad de amilasa sérica

La sangre venosa extraída del ventrículo derecho fue colocada en hielo hasta su coagulación. Posteriormente fue centrifugada a 14,000 rpm, a 4°C, durante 10 min, para obtener el suero, el cual fue procesado mediante el Kit colorimétrico QuantiChrom™ α -Amylase Assay (DAMY-100) para cuantificación de la actividad de amilasa sérica en cajas de 96 pocillos, por triplicado (**ANEXO K**).

Se determinaron las densidades ópticas de cada pocillo por medio de un análisis espectrofotométrico en un lector de placas de ELISA (iMark™ Microplate Reader) a una longitud de onda de 595 nm.

Con las lecturas obtenidas se realizaron los cálculos correspondientes, usando la fórmula proporcionada por el fabricante, para obtener la actividad enzimática de las muestras (U/L), las cuales se promediaron y graficaron, al igual que su desviación estándar, para ser analizadas mediante la prueba *t* de Student.

6.2.14 Análisis estadístico

Posterior a la comparación de la distribución normal con la prueba Kolmogorov-Smirnov, todos los datos fueron analizados con la prueba *t* de Student para muestras independientes de distribución normal. Los datos se procesaron mediante el programa IBM SPSS versión 20 (SPSS, Inc. Armon, NY). El valor de significancia estadística se asignó a valores de $p < 0.05$ para la pérdida de peso de los animales y $p < 0.001$ para las calificaciones de daño histológico del páncreas.

6.2.15 Registro y aprobación del Proyecto por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la UANL

Todos los experimentos se condujeron de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999 (**De Aluja, 2002**), para la guía de cuidados y uso de animales de laboratorio. El protocolo de este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la UANL bajo el número de registro **HT14-004**.

CAPÍTULO 7

RESULTADOS

7.1 Efecto de la intoxicación aguda con Kh sobre el peso corporal de la rata Wistar

El promedio de peso de las ratas fue de 226.7 ± 2.9 g para el grupo control y 227.9 ± 9.3 g para el grupo intoxicado con Kh. A las 24 h el promedio de peso de las ratas del grupo control fue 229.0 ± 8.7 g y el del grupo Kh fue 228.3 ± 12.7 g. A las 48 h el promedio de peso de las ratas del grupo control fue de 229.7 ± 10.8 g y el del grupo Kh fue de 222.8 ± 13.5 g, lo cual corresponde a una disminución del 3% del peso corporal en las ratas intoxicadas. A las 72 h el promedio de peso de las ratas del grupo control fue de 228.3 ± 8.5 g y el de las ratas del grupo Kh fue de 216.9 ± 12.5 g. A las 96 h el promedio del peso de las ratas del grupo control fue de 230.0 ± 7.8 g, mientras que el promedio de peso de las ratas del grupo Kh fue de 211.8 ± 13.0 g. Finalmente, a las 120 h el peso promedio del grupo control fue 230.7 ± 9.0 g y el del grupo Kh fue de 200.3 ± 8.1 g, lo que corresponde a una pérdida de peso corporal del 12.9%.

Con estos datos se realizó un análisis estadístico como previamente se describió, encontrándose una $p < 0.05$ en el último tiempo estudiado (**Figura 5**).

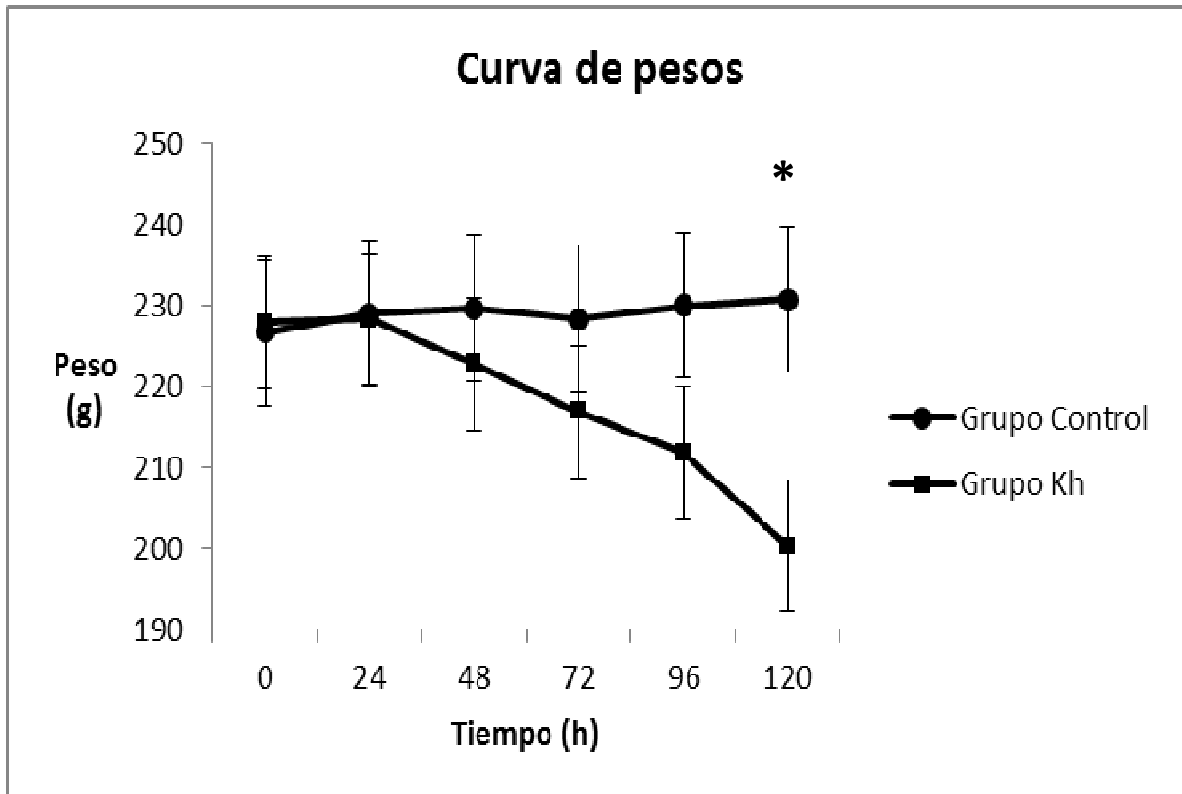


Figura 5. Curva de peso de las ratas de los grupos control e intoxicadas con fruto de *Karwinskia humboldtiana*. Desde las 48 h posteriores a la intoxicación, se observa una disminución de peso progresiva en comparación a las ratas del grupo control. Esta diferencia es estadísticamente significativa a las 120 h (* $p < 0.05$).

7.2 Evaluación de las características macroscópicas del páncreas

Macroscópicamente, los páncreas de las ratas control presentaron características normales, como color rosa pálido, de apariencia homogénea, consistencia suave y vascularidad normal, sin evidencia de hemorragia (**Figura 6**).

Por otro lado, a las 24 h posteriores a la administración de Kh, los páncreas presentaron un color ligeramente violáceo, edema leve, consistencia suave y congestión vascular. A las 48 h de exposición, los páncreas presentaron un color rojizo, edema leve, consistencia suave y hemorragia leve. A las 72 h de exposición, los páncreas presentaron color rojo-violáceo, edema, consistencia suave y congestión vascular marcada. A las 96 y 120 h de exposición, los páncreas presentaron un color rojo, marcado edema, consistencia mucinosa y aspecto hemorrágico (**Figura 6**).

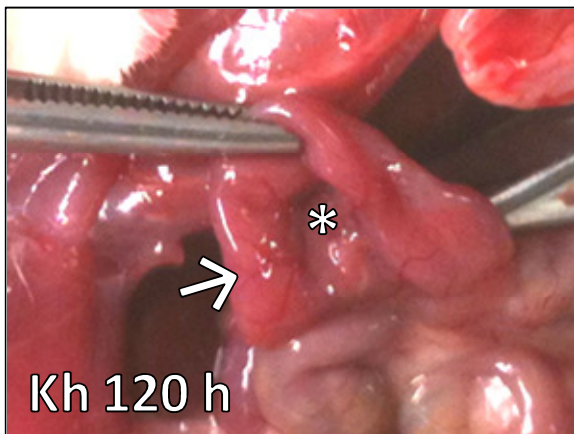
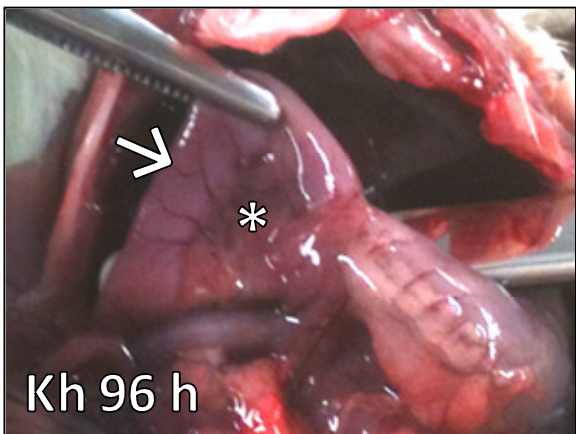
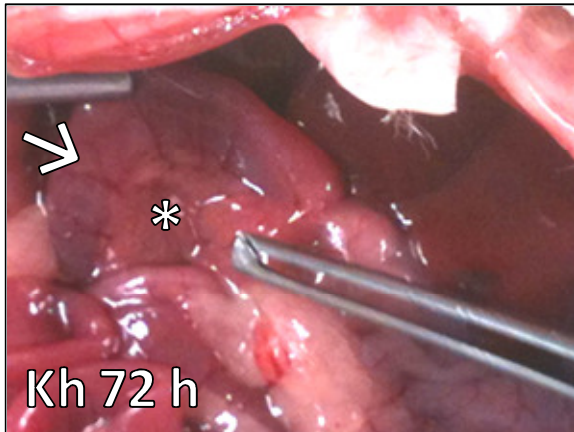
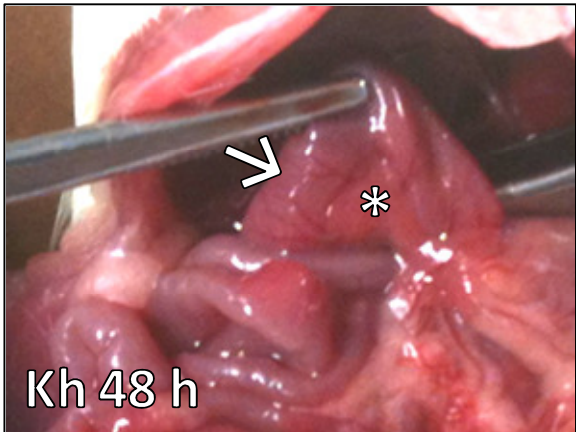
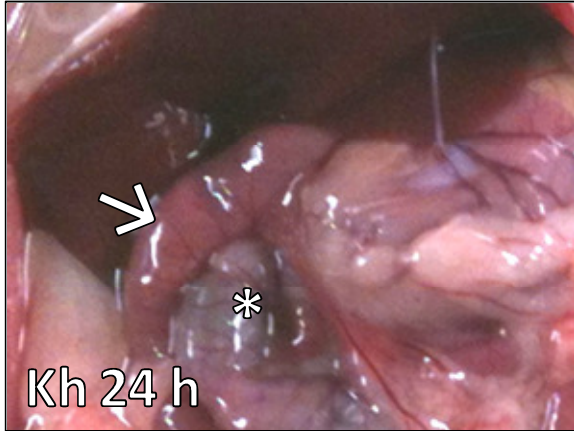
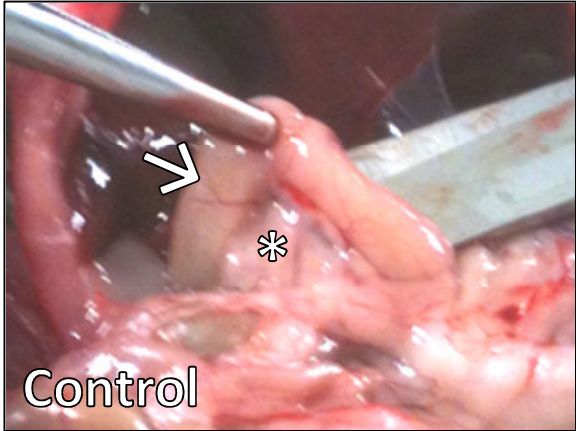


Figura 6. Aspecto macroscópico de los páncreas de los grupos control y experimentales intoxicados con el fruto de *Karwinskia humboldtiana*, durante la disección abdominal. Es evidente la congestión vascular y el aspecto hemorrágico que presentaron los páncreas (*) de las ratas intoxicadas con fruto de Kh, en comparación con el páncreas de la rata control. Nótese que el duodeno (flechas), presenta una coloración rojo-violácea con marcada congestión vascular.

7.3 Evaluación histológica del páncreas exocrino

Las ratas del grupo control (**Figuras 7A y 8A**), muestran la morfología normal del páncreas. La porción exocrina presenta acinos pancreáticos (**a**) con células acinares de forma piramidal, con núcleos redondos, basófilos, localizados en la porción basal, y con citoplasma ocupado por gránulos acidófilos apicales que corresponden a los gránulos de zimógeno. La porción endocrina presenta los islotes de Langerhans (**L**) con células poliédricas de núcleos centrales, redondos, ligeramente basófilos y citoplasma claro.

A las 24 h de exposición al fruto de Kh (**Figuras 7B y 8B**), los páncreas de las ratas presentaron una disminución en el tamaño de los acinos pancreáticos, así como de los gránulos de zimógeno de las células acinares. Además, se observaron vesículas en el citoplasma basal de algunas células acinares, hallazgo que fue evidente a lo largo de todos los tiempos de la evaluación.

A las 48 h de exposición al fruto de Kh (**Figuras 7C y 8C**), los páncreas mostraron una evidente disminución del tamaño de las células acinares, en las que prácticamente no se observaron gránulos de zimógeno en su citoplasma y una disminución en el tamaño de los núcleos. Sin embargo, los datos más característicos fueron la condensación y fragmentación de la cromatina y la

aparición de numerosas vesículas intracitoplasmáticas de diferentes tamaños, conteniendo estructuras semejantes a cuerpos apoptóticos (**flechas**).

A las 72 h posteriores a la intoxicación (**Figuras 7D y 8D**), el hallazgo más característico fue la necrosis en áreas extensas (*). También se observaron escasas estructuras semejantes a cuerpos apoptóticos en el citoplasma de los pocos acinos remanentes (**flechas**), los cuales presentaron un aspecto vesiculoso. El tejido intersticial presentó edema e infiltrado de células inflamatorias de morfología compatible con macrófagos, neutrófilos y linfocitos. En general, se observó una franca destrucción de la arquitectura lobulillar.

A las 96 h posteriores a la intoxicación (**Figuras 7E y 8E**), los páncreas presentaron escasos acinos preservados (**flechas**), inmersos en extensas áreas con desorganización de la arquitectura lobulillar. En el intersticio se observó necrosis y marcado edema, con infiltrado inflamatorio de células polimorfo y mononucleares (*).

A las 120 h posteriores a la intoxicación (**Figuras 7F y 8F**), los páncreas presentaron pérdida completa de la arquitectura lobulillar. El intersticio presentó marcado edema y numerosas células inflamatorias (*). El epitelio del sistema de conductos no mostró alteraciones (**c**).

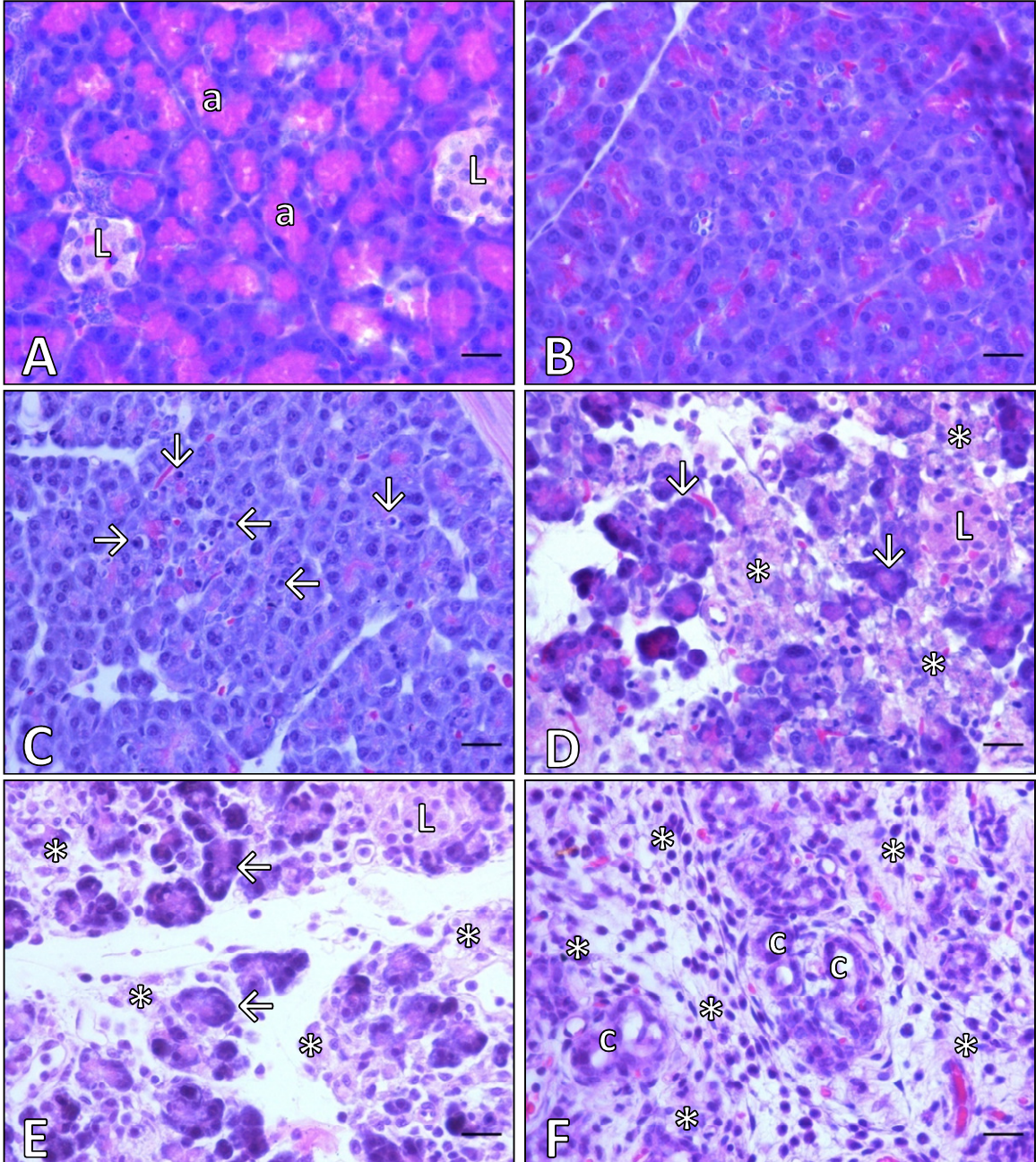


Figura 7. Microfotografías de páncreas exocrino de rata Wistar. **A)** Grupo control. Se observa principalmente la porción exocrina del páncreas formada por acinos (**a**) de aspecto normal con células piramidales de citoplasma basal de tinción basófila y núcleo redondeado y basófilo. El citoplasma de la región apical se observa acidófilo debido a la presencia de numerosos gránulos de zimógeno. Islotes de Langerhans (**L**) de aspecto normal. **B)** A las 24 h posteriores a la administración de fruto de Kh se observa una marcada reducción del tamaño de los acinos así como del contenido de gránulos de zimógeno. **C)** A las 48 h posteriores a la intoxicación, se observan estructuras morfológicamente compatibles con cuerpos apoptóticos (**flechas**), además de lo anteriormente descrito. **D)** A las 72 h se aprecian acinos remanentes dañados (**flechas**) y la presencia de un marcado edema intersticial, infiltrado inflamatorio y necrosis (*). **E, F)** Las alteraciones descritas son más evidentes a las 96 y 120 h, en donde el edema, infiltrado inflamatorio y necrosis (*) son más marcados. Además, se reduce la cantidad de acinos (**flechas**), y al final solamente persisten algunas estructuras que recuerdan la porción conductora (**c**) del páncreas exocrino. Cortes histológicos de 5 µm de espesor, teñidos con HE, 400x, barra 20 µm.

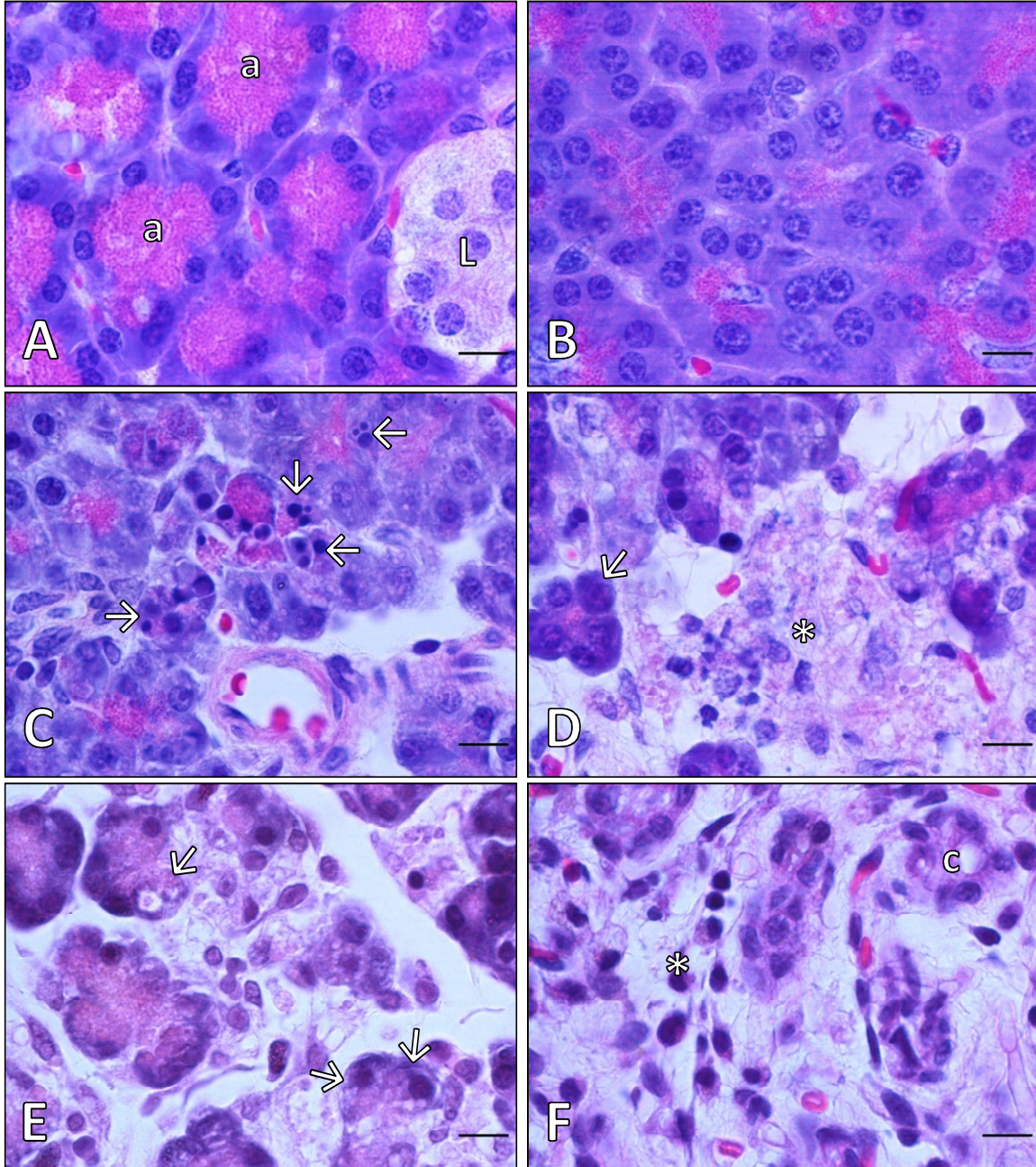


Figura 8. Detalle de las microfotografías de páncreas exocrino de rata Wistar. **A)** Grupo control que muestra el aspecto normal de los acinos (**a**) y una pequeña porción de un islote de Langerhans (**L**). **B)** A las 24 h posteriores a la administración de fruto de Kh, se observa reducción en el tamaño de los acinos y del contenido de gránulos de zimógeno. **C)** A las 48 h posteriores a la intoxicación con Kh se aprecian los núcleos con cromatina condensada y fragmentada (**flechas**), semejando cuerpos apoptóticos. **D)** A las 72 h se observa desorganización de la arquitectura lobulillar, edema en el tejido conectivo intersticial, infiltrado inflamatorio y necrosis (*). **E)** A las 96 h posteriores a la intoxicación con Kh, se aprecian algunas células acinares remanentes de aspecto degenerado y con presencia de vesículas (**flechas**). **F)** A las 120 h se observan áreas extensas de edema, infiltrado inflamatorio y necrosis (*), y algunos conductos intercalados (**c**) de aspecto conservado. Cortes histológicos de 5 µm de espesor, teñidos con HE, 1000x, barra 10 µm.

7.4 Evaluación histológica del páncreas endocrino (islotos de Langerhans)

Los páncreas de las ratas del grupo control (**Figura 9A**) presentaron islotes de Langerhans (**L**) formados por agrupaciones de células epiteliales poliédricas de citoplasma acidófilo pálido y núcleo redondeado, central y basófilo. Estas agrupaciones celulares se encuentran atravesadas por numerosos capilares (**c**) de aspecto normal con algunos eritrocitos en su interior.

A las 24 y 48 h posteriores a la intoxicación (**Figura 9B y C**), los islotes de Langerhans (**L**) presentaron un aspecto histológico conservado y similar al del grupo control, prácticamente sin alteraciones.

A las 72 y 96 h posteriores a la intoxicación (**Figura 9D y E**) sólo se observó leve reducción del tamaño celular y nuclear (**flechas**), así como un leve incremento de la eosinofilia citoplásmica y de la basofilia de los núcleos (hipercromasia), características que se acentuaron hacia las 120 h posteriores a la intoxicación (**Figura 9F**).

Cabe destacar que a pesar de la extensa destrucción observada en la porción exocrina, en los islotes de Langerhans, no se observaron signos de apoptosis ni de necrosis en ninguno de los tiempos experimentales estudiados.

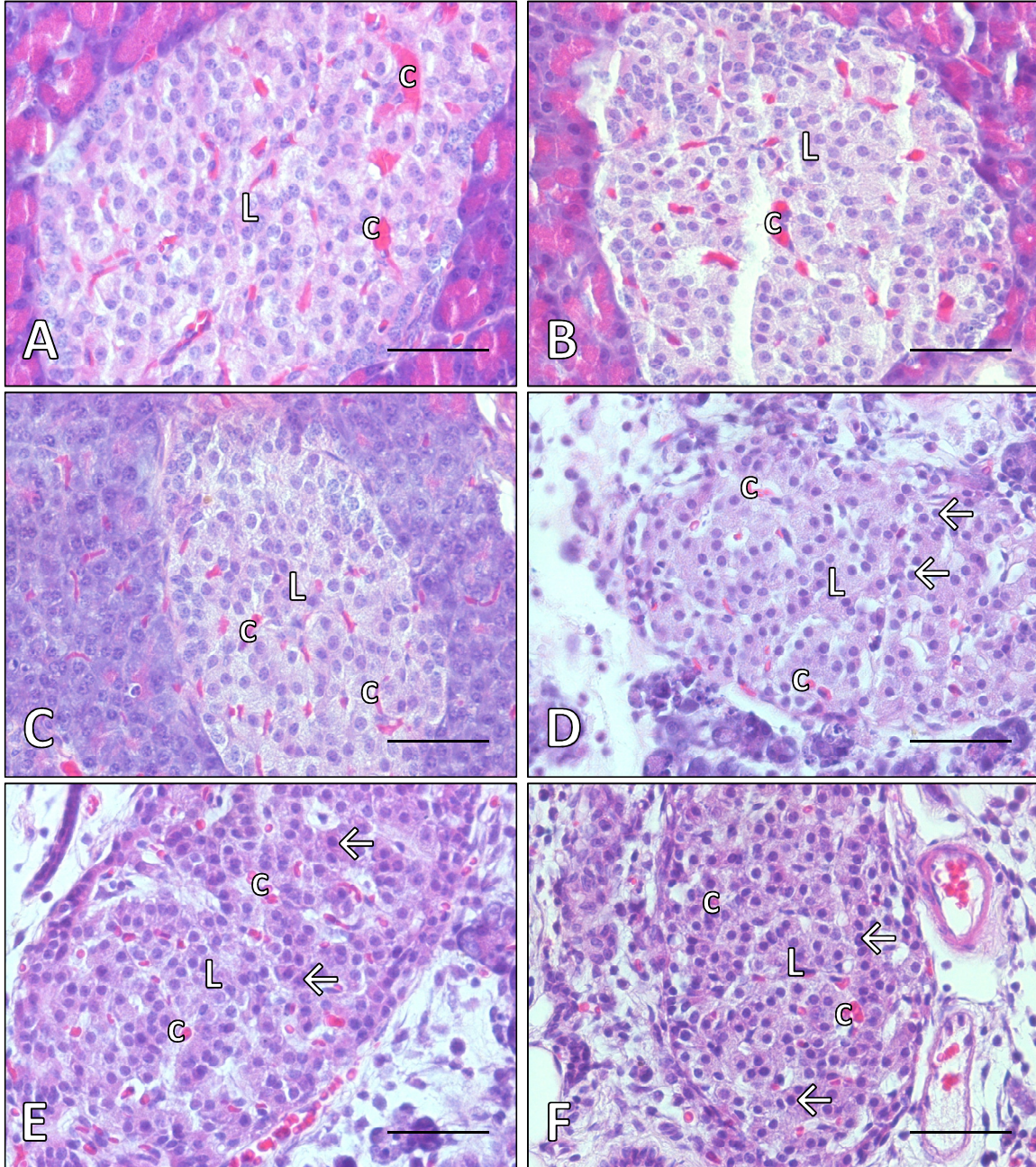


Figura 9. Microfotografías del páncreas endocrino (Islotes de Langerhans) de rata Wistar. **A)** Páncreas del grupo control. Se observa un islote de Langerhans (**L**) atravesado por numerosos capilares (**c**) de apariencia normal. **B y C)** Páncreas de ratas intoxicadas con Kh a las 24 y 48 h posteriores a la administración del fruto respectivamente, con islotes de Langerhans (**L**) de apariencia similar al control. **D y E)** Páncreas de ratas intoxicadas con fruto de Kh, a las 72 y 96 h posteriores a la administración del fruto respectivamente, con islotes de Langerhans (**L**) de arquitectura conservada, cuyas células muestran una leve reducción de su tamaño, así como del núcleo, y leve hipercromasia. **F)** A las 120 h posteriores a la administración del fruto, se acentúan las características descritas anteriormente. Nótese que en ninguno de los tiempos experimentales estudiados hay signos de apoptosis o necrosis a pesar del daño evidente en la porción exocrina. Cortes histológicos de 5 µm de espesor, teñidos con HE, 400x, barra 50 µm.

7.5 Calificación del daño histológico en el páncreas exocrino

En el grupo control, las calificaciones para edema, infiltrado inflamatorio y hemorragia, fueron de 0.0 ± 0.00 puntos para cada una de ellas. Para el parámetro necrosis, la calificación fue de 0.06 ± 0.17 puntos.

Para el parámetro edema, las calificaciones obtenidas en cada uno de los grupos experimentales fueron: 0.35 ± 0.39 , 1.04 ± 0.61 , 2.35 ± 0.39 , 2.69 ± 0.61 y 2.81 ± 0.26 puntos, a las 24, 48, 72, 96 y 120 h, respectivamente.

Para el parámetro infiltrado inflamatorio, las calificaciones para cada uno de los grupos experimentales fueron: 0.52 ± 0.34 , 1.52 ± 0.77 , 2.67 ± 0.50 , 3.00 ± 0.00 y 3.00 ± 0.00 puntos, a las 24, 48, 72, 96 y 120 h, respectivamente.

Para el parámetro hemorragia, las calificaciones para cada uno de los grupos experimentales fueron: 1.39 ± 0.86 , 3.35 ± 1.13 , 3.09 ± 1.56 , 4.63 ± 2.34 y 5.26 ± 1.43 puntos, a las 24, 48, 72, 96 y 120 h, respectivamente.

Para la necrosis, las calificaciones para cada uno de los grupos fueron: 0.70 ± 0.25 , 1.22 ± 0.76 , 5.31 ± 0.84 , 6.74 ± 0.57 y 6.35 ± 1.20 puntos a las 24, 48, 72, 96 y 120 h, respectivamente. Todas estas calificaciones se encuentran en la **Tabla IV** y están graficadas en la **Figura 10**.

Parámetros evaluados	Control	Grupos experimentales (tiempo posterior a la administración de Kh)				
		24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
	Prom DE	Prom DE	Prom DE	Prom DE	Prom DE	Prom DE
Edema	0.00 ± 0.00	0.35 ± 0.39	1.04 ± 0.61	2.35 ± 0.39	2.69 ± 0.61	2.81 ± 0.26
Infiltrado inflamatorio	0.00 ± 0.00	0.52 ± 0.34	1.52 ± 0.77	2.67 ± 0.50	3.00 ± 0.00	3.00 ± 0.00
Hemorragia	0.00 ± 0.00	1.39 ± 0.86	3.35 ± 1.13	3.09 ± 1.56	4.63 ± 2.34	5.26 ± 1.43
Necrosis	0.06 ± 0.17	0.70 ± 0.25	1.22 ± 0.76	5.31 ± 0.84	6.74 ± 0.57	6.35 ± 1.20
Calificación	0.06 ± 0.10	2.96 ± 0.80	7.13 ± 1.09	13.43 ± 0.45	17.06 ± 1.06	17.43 ± 0.27

Tabla IV. Calificaciones del daño en la porción exocrina del páncreas en los grupos control y experimentales intoxicados con *Karwinskia humboldtiana*. Cada valor representa el promedio de las puntuaciones de 3 revisores independientes y su desviación estándar. En la última fila aparece la suma de todas las calificaciones para obtener la calificación total de cada grupo con su desviación estándar.

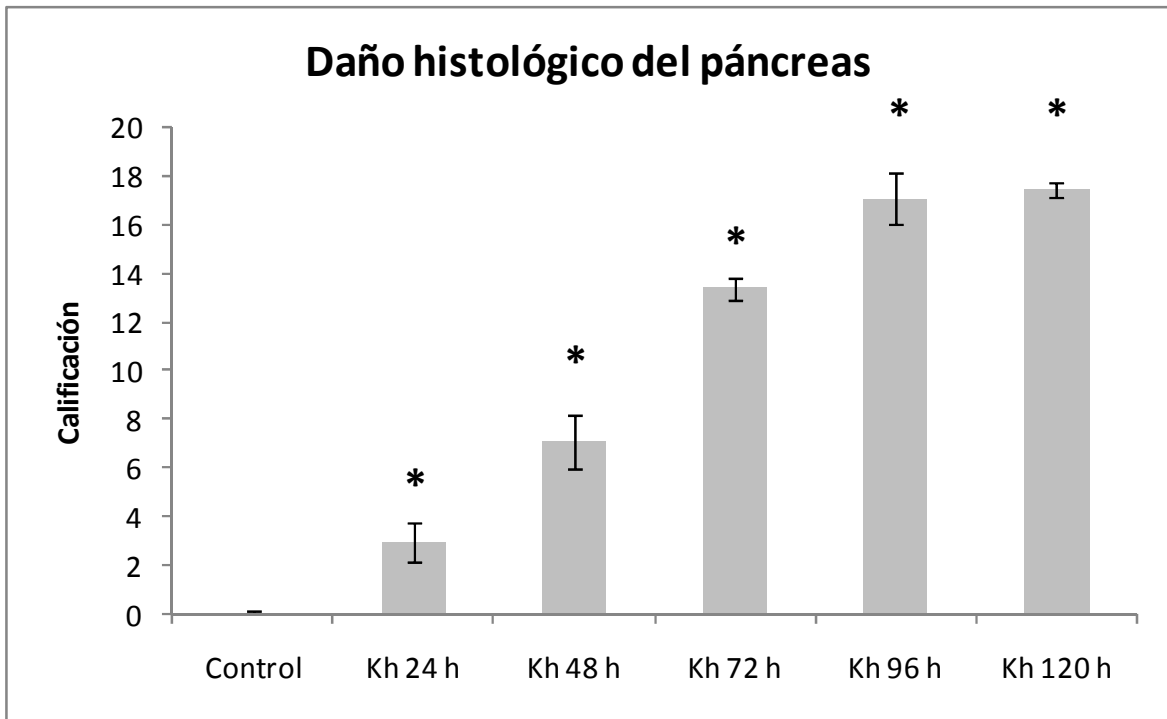


Figura 10. Gráfica que muestra la calificación total del daño del páncreas exocrino en los grupos control y experimentales intoxicados con *Karwinskia humboldtiana*. Cada barra representa el promedio de las calificaciones otorgadas por 3 evaluadores independientes y su desviación estándar. La máxima calificación para el daño pancreático es 20. Nótese el incremento del daño en función del tiempo, (* $p < 0.001$, con respecto al grupo control).

7.6 Determinación de los mecanismos de muerte celular en el páncreas durante la intoxicación aguda con Kh

7.6.1 Ensayo de TUNEL

Debido a que en la evaluación histológica se observaron estructuras semejantes a cuerpos apoptóticos y que principalmente fueron evidentes a las 48 h posteriores a la administración del fruto de Kh, se decidió realizar el ensayo de TUNEL en muestras de este tiempo experimental, encontrándose intensa positividad al marcaje en los núcleos de las células acinares, mientras que en el grupo control no se observaron las marcas positivas en los núcleos (**Figura 11**).

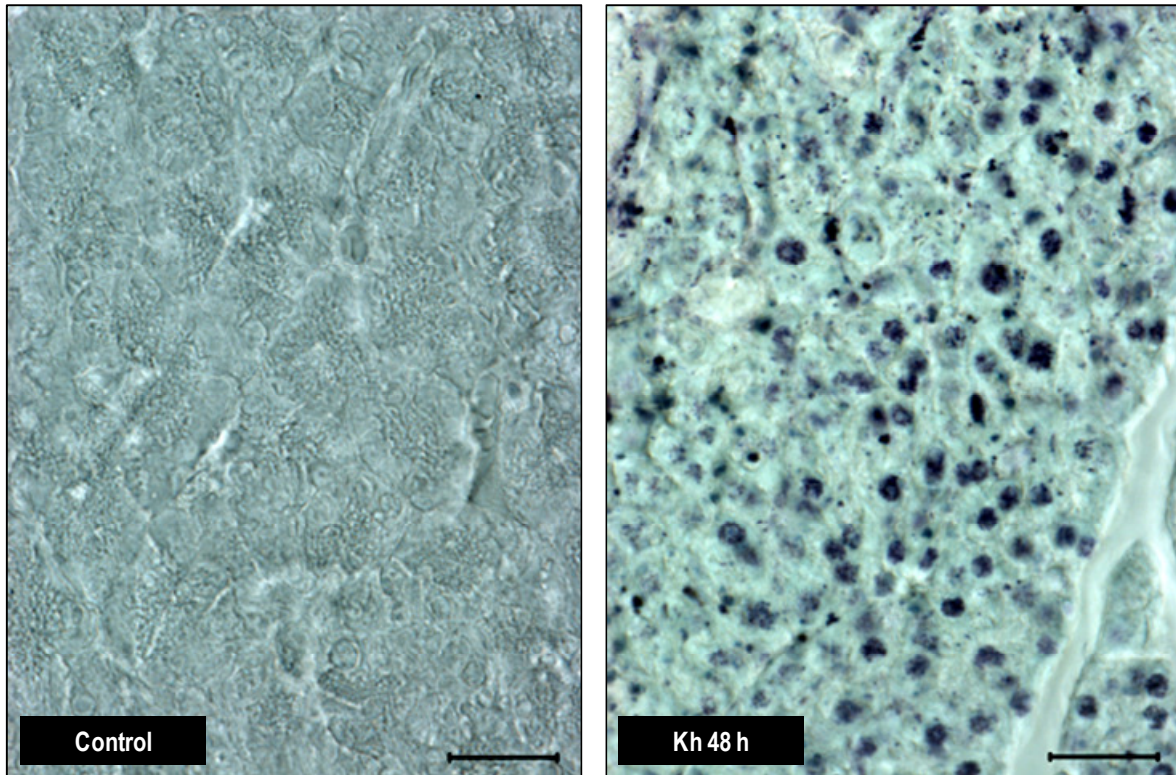


Figura 11. Ensayo de TUNEL. Páncreas de los grupos control y experimental a las 48 h posteriores a la administración de fruto de *Karwinskia humboldtiana*. En el grupo control no se observó señal positiva; por el contrario, en el grupo experimental se observa la marca positiva sobre los núcleos de las células acinares. Cortes histológicos de 5 μm de espesor. Campo claro, 630x, barra de 20 μm .

7.6.2 Ensayo de inmunofluorescencia con anticuerpo anti-caspasa-3 activada

De igual manera, se utilizaron cortes histológicos del páncreas de los grupos control y del grupo experimental de 48 h posteriores a la administración del fruto de Kh, para la realización del ensayo inmunohistoquímico contra la proteína caspasa-3.

Una vez realizado el ensayo, las muestras fueron analizadas mediante microscopía confocal láser. En el grupo control no se encontró señal, mientras que en las muestras del grupo de las 48 h posteriores a la administración de Kh, se encontró positividad citoplásmica al inmunomarcaje. La señal positiva se localizó en células que presentaron el núcleo fragmentado (**Figura 12**).

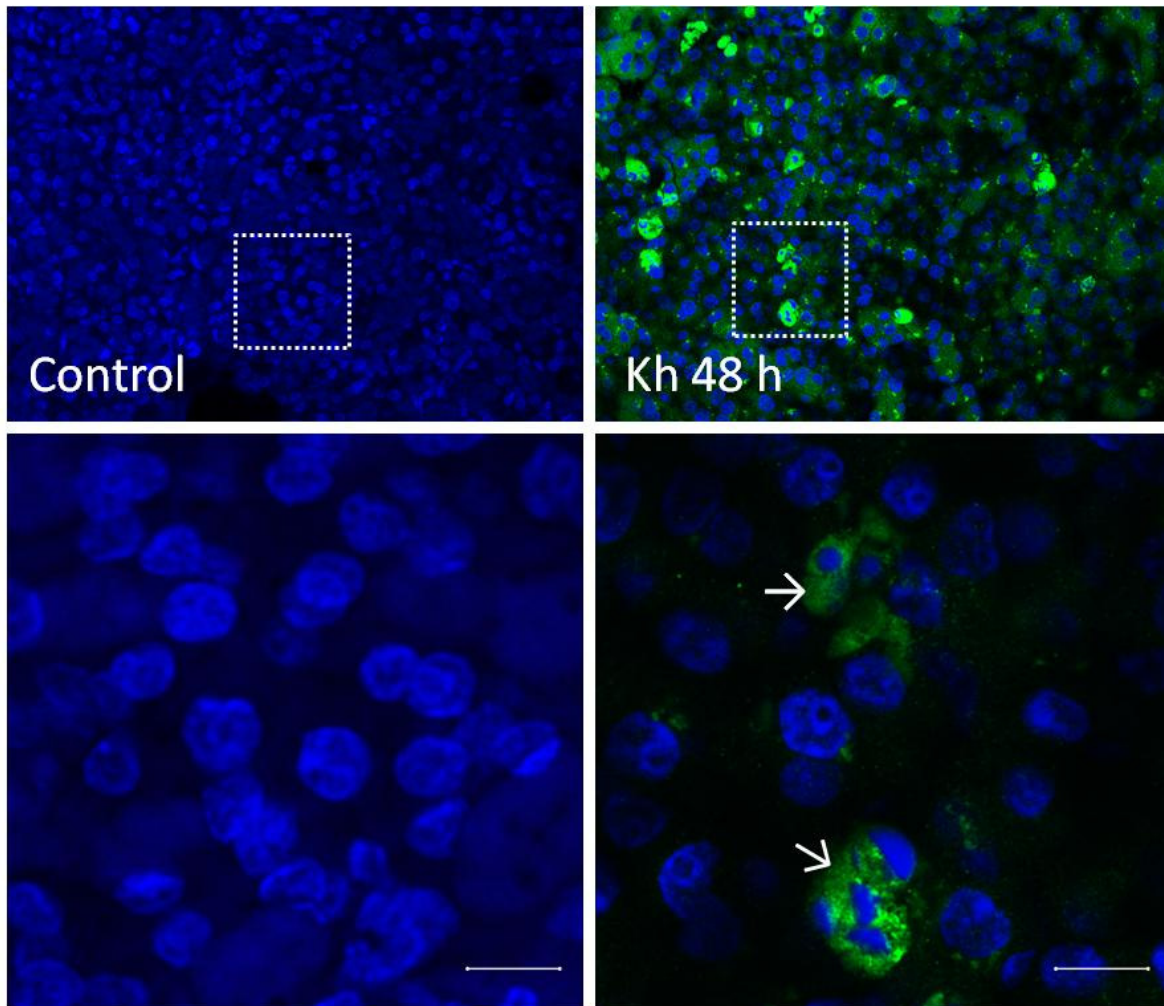


Figura 12. Ensayo de inmunofluorescencia con anticuerpo anti-caspasa-3 activada. Páncreas de los grupos control y experimental a las 48 h posteriores a la administración de fruto de *Karwinskia humboldtiana*. En el grupo control no se observa señal positiva al inmunomarcaje. En cambio, el grupo experimental a las 48 h posteriores a la administración de *Karwinskia humboldtiana*, muestra positividad al inmunomarcaje. En el cuadro inferior derecho se puede observar que las marcas positivas están presentes en células que tienen el núcleo condensado y fragmentado (flechas). Microscopía confocal láser. En azul, los núcleos marcados con DAPI excitado con láser a 405 nm. En verde, la señal del anticuerpo secundario marcado con Alexa Fluor 488 y unido al anticuerpo primario anti-pro-caspasa-3 activada, excitado con el láser a 488 nm, 400x, barra de 10 μ m.

7.6.3 Ensayo de Western Blot para detectar la expresión de las proteínas caspasa-3 activada, LC3-I y LC3-II

Mediante la técnica de Western Blot, se analizó la expresión de las proteínas caspasa-3 activada, LC3-I y LC3-II en todos los grupos experimentales y en el grupo control.

Únicamente los páncreas de las ratas intoxicadas con fruto de Kh a las 48 h, presentaron expresión de la proteína caspasa-3 activada. En el resto de los grupos experimentales, así como en el grupo control, no se encontró señal positiva para la expresión de esta proteína (**Figura 13**).

En cuanto a la proteína LC3, se observó que hay una marcada expresión de sus dos isoformas (LC3-I y LC3-II) en todos los grupos experimentales, es decir, desde las 24 h de exposición a Kh (**Figura 13**), mientras que en el grupo control, no se observó su expresión.

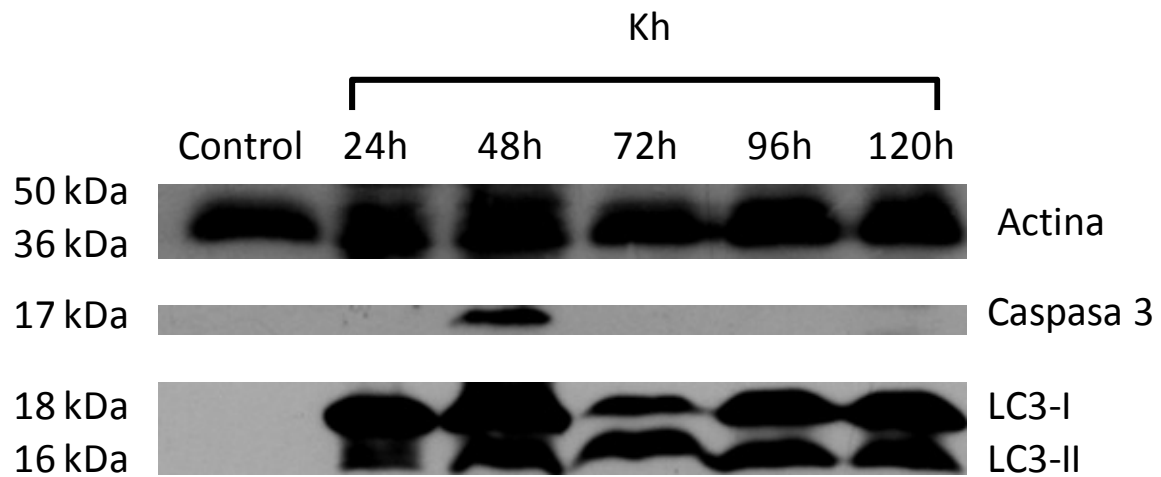


Figura 13. Ensayo de Western Blot de homogenizado de páncreas de los grupos control y experimentales intoxicados con el fruto de *Karwinskia humboldtiana*. La expresión de la proteína caspasa-3, se observó únicamente en el grupo de las 48 h posteriores a la intoxicación. Por otra parte, ambas isoformas de la proteína LC3, se expresaron en todos los grupos experimentales (24 a 120 h), mientras que en el grupo control no se observó la expresión de ninguna de éstas. Como marcador de carga se utilizó el anticuerpo anti-actina.

7.7 Evaluación de alteraciones en la morfología y localización de las mitocondrias de las células acinares del páncreas

Mediante el ensayo de histoquímica enzimática para citocromo oxidasa c se lograron observar y analizar por medio de microscopía de luz de campo claro, las mitocondrias de las células acinares en color marrón **(Figura 14)**.

En el grupo control, las mitocondrias de las células acinares presentaron una forma ovalada, un tamaño regular de aproximadamente 2 a 3 μm de diámetro y se encontraron distribuidas uniformemente por todo el citoplasma.

En las ratas de los grupos de 24 y 48 h posteriores a la intoxicación por Kh se observaron alteraciones en la forma, tornándose delgadas y aplanadas, con una aparente disminución del número y tamaño (aproximadamente de 1 a 2 μm de diámetro). Además, se observó desplazamiento de las mismas hacia la periferia de la célula acinar, remarcando sus bordes.

De las 72 a las 120 h posteriores a la intoxicación, se apreció una coloración marrón, difusa y amorfa que no permitió diferenciar las mitocondrias.

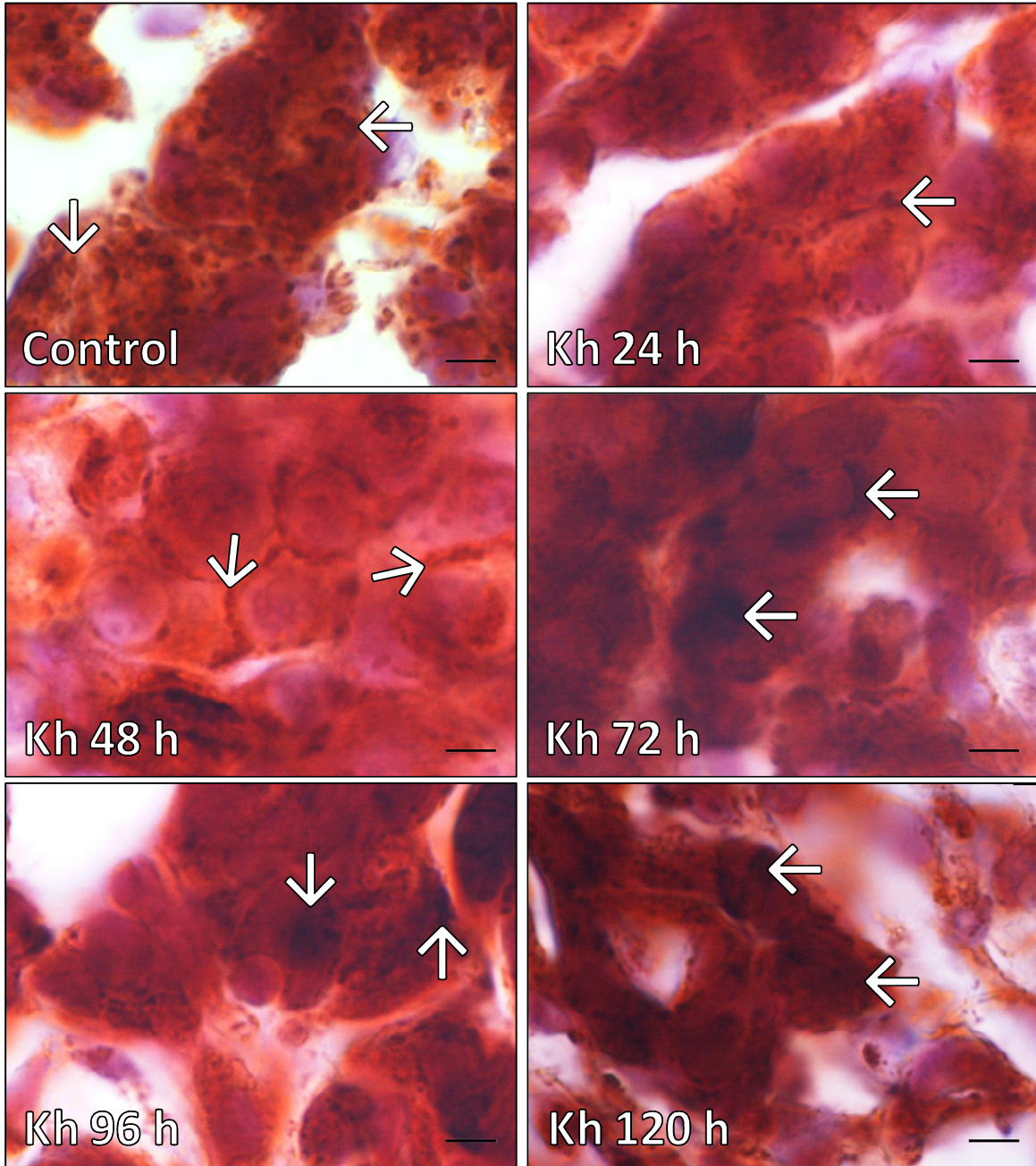


Figura 14. Ensayo de histoquímica enzimática para citocromo oxidasa c, en los grupos control y experimentales intoxicados con *Karwinskia humboldtiana*. En el grupo control, las mitocondrias de las células acinares se observan en color marrón (**flechas**) y se localizan distribuidas uniformemente por todo el citoplasma. A las 24 y 48 h posteriores a la intoxicación, las células acinares de los páncreas presentan una aparente disminución de tamaño de las mitocondrias, las cuales se localizan desplazadas hacia la periferia de la célula (**flechas**), enfatizando el contorno de las mismas. Desde las 72 h y en adelante, se pueden apreciar agrupaciones amorfas de mitocondrias (**flechas**), que no permiten establecer su distribución en las células acinares. Cortes histológicos de 16 μm de espesor. Microscopía de luz de campo claro, 1000x, barra de 5 μm .

7.8 Determinación de los niveles de amilasa pancreática en suero

Se realizó el análisis de la amilasa pancreática en los grupos control y experimentales (24, 48, 72, 96 y 120 h posteriores a la intoxicación con Kh).

Los resultados de la determinación de amilasa sérica fueron: para el grupo control 161.00 ± 12.91 U/L, y para los grupos experimentales fueron: 156.00 ± 34.25 , 128.00 ± 17.89 , 168.00 ± 68.45 , 135.00 ± 27.56 , 164.00 ± 25.20 U/L a las 24, 48, 72, 96 y 120 h posteriores a la intoxicación con Kh, respectivamente. No se encontró diferencia significativa entre los grupos ($p > 0.05$). Estos resultados se encuentran en la **Figura 15**.

Dados los datos anteriores, se procedió a realizar el ensayo a tiempos más tempranos de la intoxicación con Kh, a las 6, 12 y 18 h. Los resultados fueron: para el grupo control 242.99 ± 45.27 U/L, y para los grupos experimentales fueron: 157.09 ± 33.72 , 174.94 ± 12.43 y 224.27 ± 20.71 U/L a las 6, 12, y 18 h posteriores a la intoxicación con Kh, respectivamente. Tampoco se encontró diferencia significativa entre los grupos ($p > 0.05$). Estos resultados se encuentran en la **Figura 16**.

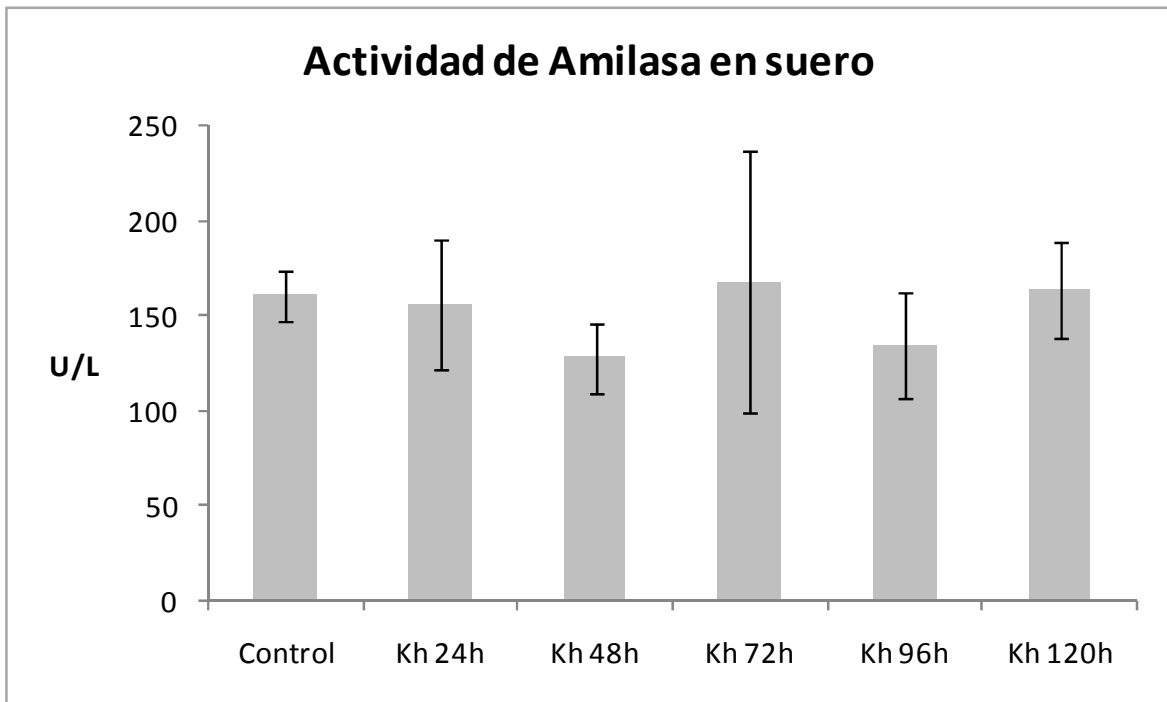


Figura 15. Ensayo bioquímico de la actividad de amilasa pancreática del grupo control y de los grupos experimentales intoxicados con *Karwinskia humboldtiana* a las 24, 48, 72, 96 y 120 h respectivamente. Cada barra representa el promedio de 3 determinaciones con su desviación estándar ($p > 0.05$).

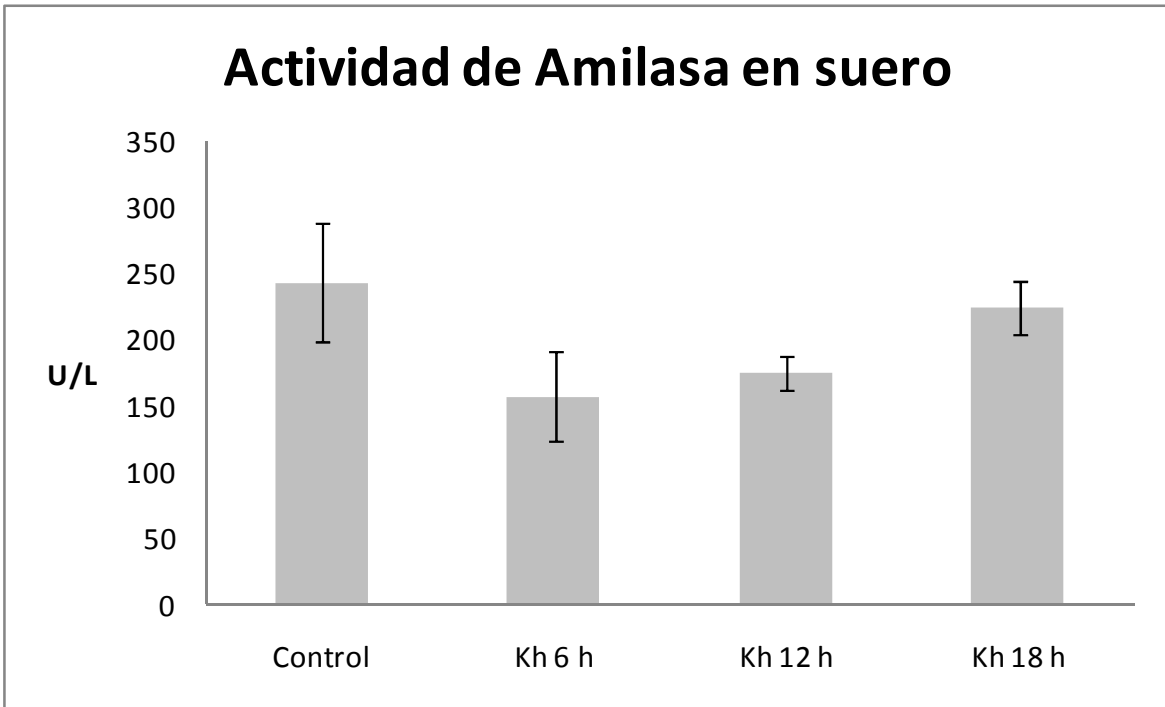


Figura 16. Ensayo bioquímico de la actividad de amilasa pancreática del grupo control y de los grupos experimentales intoxicados con *Karwinskia humboldtiana* a las 6, 12 y 18 h respectivamente. Cada barra representa el promedio de 3 determinaciones con su desviación estándar ($p > 0.05$).

CAPÍTULO 8

DISCUSIÓN

Desde hace décadas, se sabe que la intoxicación accidental y experimental con el fruto de Kh conduce a la muerte, la cual podría ser consecuencia del daño producido por las toxinas a nivel sistémico. Existe evidencia de daño histológico en órganos como pulmón, hígado y riñón, así como en otros órganos y estructuras del sistema nervioso que ya han sido estudiados (**Marsh, 1928; Bustamante y cols., 1978; Weller y cols., 1980; Bermúdez y cols., 1992; Salazar y cols., 2006; Becerra y cols., 2009; García y cols., 2013**). Sin embargo, hasta ahora el páncreas no ha sido estudiado en esta intoxicación. Puesto que la vía de entrada de este fruto tóxico es por vía oral, es probable que el tubo digestivo y sus glándulas sean de los primeros órganos afectados en esta intoxicación.

Por lo tanto, es de gran interés investigar si en la intoxicación aguda por Kh existen alteraciones que afecten directamente al páncreas, de tal forma que pueda relacionarse con el daño sistémico observado por clínica y morfología, en la intoxicación accidental y/o experimental con este fruto.

La pérdida de peso presentada en las ratas intoxicadas con el fruto de Kh, es congruente con la pérdida de peso reportada previamente, en trabajos en los que se administraron el fruto completo y/o las toxinas aisladas (**Bermúdez y cols., 1986; Salazar y cols., 2006; García y cols., 2012**). La pérdida de peso también

ha sido reportada en casos de intoxicación accidental en humanos (**Padrón, 1951; Bustamante y cols., 1978**).

Los primeros signos de daño histológico en nuestro modelo experimental se observaron desde las 24 h posteriores a la administración de Kh, y permanecieron durante todos los tiempos estudiados. Las alteraciones ocurrieron únicamente en la porción exocrina del páncreas e incluyeron: reducción del tamaño de las células acinares y de los gránulos de zimógeno, presencia de pequeñas vesículas de tipo autofágico en el citoplasma, cuerpos apoptóticos, edema, infiltrado de células inflamatorias y necrosis, dando por resultado la pérdida completa de la arquitectura lobulillar (**Figuras 7, 8 y 17**).

Los hallazgos encontrados en nuestro trabajo fueron similares a los descritos en otros modelos de pancreatitis aguda en roedores (**Ziegler y cols., 2011; Cao and Liu 2013; Zhang y cols., 2013**).

Por ejemplo, la autofagia, apoptosis y necrosis con daño progresivo al páncreas encontradas en nuestro trabajo, fueron similares a las que se presentan en otro modelo inducido por ceruleína, un análogo de la colecistoquinina (**Zhang and Rouse, 2014**), en el que el daño también fue dependiente del tiempo de exposición. A diferencia de los resultados reportados por estos autores, en nuestro trabajo no se observó desgranulación de mastocitos, ni eosinofilia intersticial.

La progresión del daño pancreático con edema, inflamación y disminución de gránulos de zimógeno encontrados en nuestro trabajo, coincide con lo reportado en otro estudio de pancreatitis inducida por ceruleína (**Usborne y cols., 2014**).

A diferencia de nuestro trabajo, en el que la necrosis se observó hasta las 72 h posteriores a la administración de Kh (**Figuras 7D y 8D**), en otro modelo de pancreatitis mediante la infusión retrógrada de taurocolato sódico a través del conducto pancreático, el daño se observó desde los primeros 10 min, con edema, inflamación y necrosis (**Laukkarinen y cols., 2007**).

En un modelo de pancreatitis inducida por la ligadura del conducto pancreático (**Zhang y Rouse, 2014**), se observó necrosis y hemorragia, similar a lo encontrado en nuestro trabajo.

En otro modelo de pancreatitis por inyección intraperitoneal de arginina (**Zhang y Rouse, 2014**), se indujo, similar a lo encontrado en nuestro trabajo, edema, inflamación, fibrosis, datos de autofagia, apoptosis y necrosis, con atrofia de células acinares. En ese estudio se observaron cambios ductales (dilatación, fibrosis e inflamación) e hiperplasia de células centroacinares en estadíos tardíos, a diferencia de nuestro trabajo, en donde no se observaron estas alteraciones.

En otro estudio de daño pancreático inducido por cianohidroxibuteno (**Usborne y cols., 2014**), al igual que en nuestro trabajo, se produjo daño pancreático con edema intersticial, inflamación, formación de vesículas, degeneración celular y/o necrosis.

En nuestro trabajo encontramos la presencia de vesículas intracitoplásmicas de tipo autofágico desde las 24 h posteriores a la administración de Kh, lo cual coincidió con la disminución del tamaño celular y de los gránulos de zimógeno (**Figura 7B y 8B**). Esta morfología y la expresión de las proteínas LC3-I y LC3-II durante todos los tiempos estudiados (**Figura 13**), sugieren que la autofagia, un mecanismo bien conocido de sobrevivencia celular, podría ser un mecanismo de defensa celular contra la intoxicación inducida por Kh, inclusive antes de presentarse la apoptosis.

Por otra parte, la expresión de caspasa-3 a las 48 h observada en nuestro trabajo (**Figura 13**), nos hace pensar que la apoptosis dependiente de caspasas juega un papel importante en esta intoxicación. Algunos reportes sugieren que la apoptosis puede ser un mecanismo de defensa mediante el cual las células acinares dañadas son eliminadas, previniendo así que la inflamación y necrosis se propaguen hacia el espacio extracelular (**Logsdon y Ji, 2013**). Probablemente, la apoptosis representa otro mecanismo de protección durante las primeras horas en

la intoxicación por Kh, lo cual requiere de abordarse mediante otras técnicas para poder confirmarse.

La muerte de las células acinares pancreáticas es una respuesta característica de la pancreatitis **(Kaiser y cols., 1996; Gukovskaya y Gukovsky, 2012)**. Se ha reportado que las altas concentraciones intracelulares de tripsina activa en las células acinares induce la muerte celular vía apoptosis **(Ji y cols., 2009)**, pero cuando hay sobreproducción masiva o crónica de tripsina activa, se induce la apoptosis a gran escala, lo cual resulta en necrosis **(Gaiser y cols., 2011)**. Nosotros observamos una rápida progresión desde la aparición de cuerpos apoptóticos hasta la necrosis y edema extensos.

El daño pancreático ocurre cuando los mecanismos compensatorios al estrés celular son superados por el incremento al estrés fisiológico, como ocurre en el caso de las dietas altas en grasa y alcohol, que conllevan al daño pancreático **(Logsdon y Ji, 2013)**.

Aunque los mecanismos de daño por Kh no han sido elucidados, es claro que los cambios patológicos que ocurren en la célula acinar durante la intoxicación por Kh, sobrepasan su capacidad homeostática. La administración de altas dosis del fruto de Kh pudo haber excedido la capacidad autofágica y de apoptosis que normalmente sirven de protección al páncreas, lo que pudo haber llevado a un rápido deterioro hacia el edema y la necrosis. Esto debe ser estudiado a futuro

para comprobar que durante la intoxicación con Kh, la autofagia y la apoptosis ejercen una función protectora en el páncreas.

El hecho de no haber visto diferencia significativa en la actividad de la enzima amilasa pancreática, podría deberse a la activación de los mecanismos de defensa abordados anteriormente, en la célula acinar. Es posible que los gránulos de zimógeno hayan quedado contenidos en vesículas autofágicas, impidiendo su activación y salida al exterior para tratar de contener el daño **(Logsdon y Ji, 2013)**. Esto podría explicar por qué no encontramos elevación de la amilasa sérica aún en los tiempos en el que el daño pancreático fue más extenso.

Uno de los principales indicadores del pronóstico en pacientes con pancreatitis aguda es la necrosis. Grandes áreas de necrosis se correlacionan con un peor pronóstico: cuando 50% del páncreas se encuentra necrótico, la tasa de mortalidad puede alcanzar 20%. De manera similar en modelos experimentales, la severidad de la pancreatitis se correlaciona directamente con la extensión de la necrosis, e inversamente a la de la apoptosis **(Kaiser y cols., 1995; Saluja y cols., 1996; Bhatia, 2004; Mareninova y cols., 2006)**.

Para evaluar la severidad de la pancreatitis aguda, también se necesita considerar la evaluación del resto de los órganos, puesto que aunque la necrosis pancreática y la falla orgánica múltiple pueden coexistir, no son condiciones necesariamente simultáneas **(Sanchez-Lozada y cols., 2005 b)**.

La pancreatitis generalmente se acompaña de un Síndrome de *Respuesta Inflamatoria Sistémica* (SIRS) **(Schepers y cols., 2013)**, situación en la que aproximadamente 30% de los pacientes la desarrollan a las 48 h posteriores a la admisión hospitalaria **(Modifi y cols., 2006)**. Un SIRS excesivo puede llevar a un Síndrome de *Disfunción Orgánica Múltiple* (MODS), principal causa de morbimortalidad en los pacientes con pancreatitis aguda **(Bhatia, 2005; Gaisano y Gorelick, 2009; Kylänpää y cols., 2012; Gukovskaya y Gukovsky, 2012)**, siendo la falla respiratoria, una de las causas más importantes de muerte **(Sánchez, 2005 a; Pandol y cols., 2007; Akbarshahi y cols., 2012)**. Lo anterior es muy similar a lo que ocurre en la intoxicación aguda con el fruto de Kh, en la que ocurre falla renal y hepática, así como un Síndrome de *Distrés Respiratorio Agudo* (ARDS, por sus siglas en inglés).

Antes de nuestro trabajo, no se sabía si el páncreas resultaba dañado en esta intoxicación. Más aún, hasta el momento no se conoce la relación entre el daño pancreático y el producido en el resto de los órganos en esta intoxicación; tampoco se sabe cómo progresa este daño a tal grado de severidad en la intoxicación aguda. Nosotros suponemos que el páncreas es uno de los primeros órganos dañados con el fruto de Kh, y que esto puede conducir al SIRS que finalmente culmina en el MODS y la muerte.

Según los modelos revisados, nuestros resultados indican que el daño inducido con altas dosis del fruto de Kh, es compatible con pancreatitis aguda necrotizante.

Este trabajo puede ser establecido como un modelo animal para el estudio de esta intoxicación o para el ensayo de tratamientos contra la pancreatitis.

Finalmente, es importante puntualizar que una de las toxinas derivadas de las plantas del género *Karwinskia* (la T-514 o Peroxisomicina), ha demostrado tener una actividad citotóxica y selectiva hacia células de origen tumoral (**Piñeyro y cols., 1994**). Por tanto, pensamos que también sería de gran interés investigar su probable uso como agente antineoplásico en tumores pancreáticos.

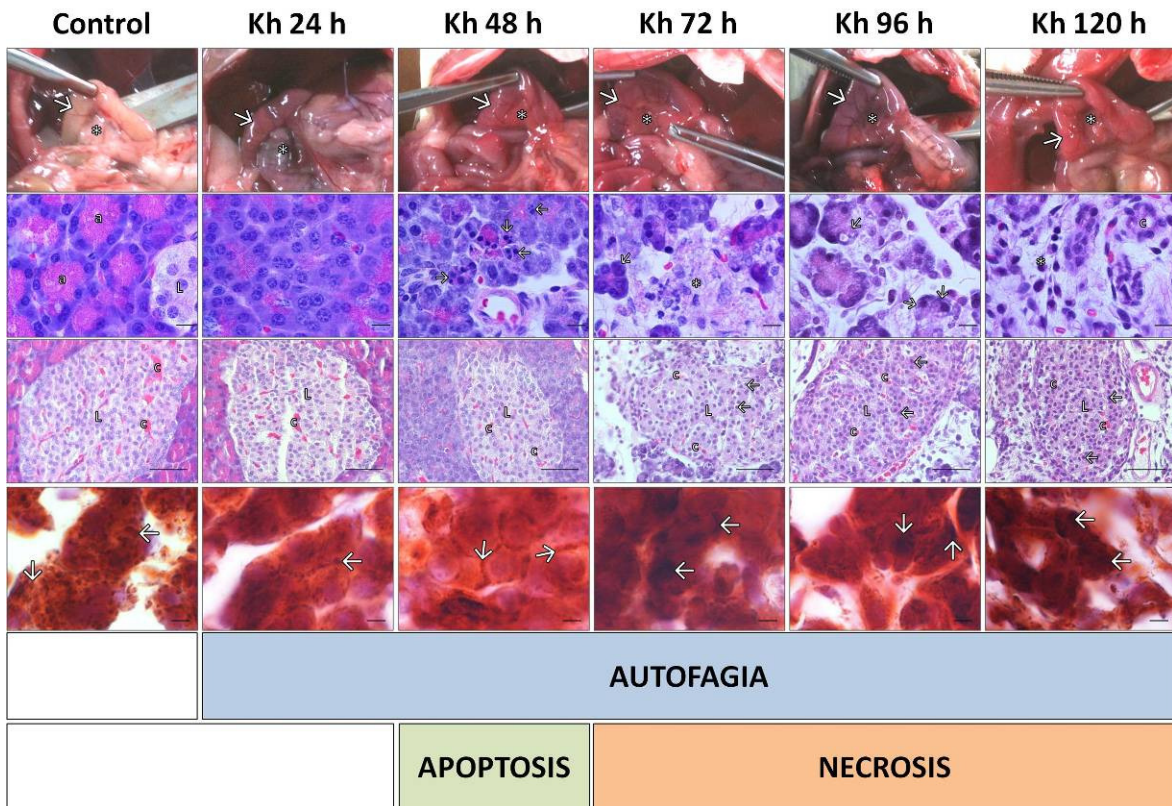


Figura 17. Cronología ilustrada del daño pancreático durante la intoxicación aguda con fruto de *Karwinskia humboldtiana* en la rata Wistar.

CAPÍTULO 9

CONCLUSIÓN

La administración de una dosis alta del fruto de Kh en la rata Wistar, causa la destrucción de las estructuras acinares pancreáticas (porción exocrina) en la rata Wistar, con la preservación de los islotes de Langerhans (porción endocrina), al menos hasta el momento revisado en este trabajo. El daño histológico es compatible con pancreatitis aguda necrótica.

El páncreas podría ser el primero, o uno de los primeros órganos diana perturbados por el envenenamiento con el fruto de Kh, contribuyendo al SIRS que en última instancia conduce al MODS en la rata Wistar intoxicada con este fruto.

La intoxicación aguda con el fruto de Kh en la rata Wistar, podría ser un modelo experimental útil para el estudio de los primeros eventos que ocurren en la célula acinar cuando se expone a agentes tóxicos, así como también como un modelo animal para el estudio del tratamiento de las enfermedades pancreáticas humanas.

CAPÍTULO 10

BIBLIOGRAFÍA

Aguilar A, Zolla C. 1982. Plantas tóxicas de México. Instituto Mexicano del Seguro Social. México. 126-127.

Akbarshahi H, Rosendahl AH, Westergren-Thorsson G, Andersson R. 2012. Acute lung injury in acute pancreatitis – awaiting the big leap. *Respir Med.* 106(9):1199-1210.

Armendáriz E. 1913. Capulincillo. *Anales de la Escuela Nacional de Medicina.* 2ª Época. 11:480.

Arreola-Nava ME, Vázquez-Castellanos JL, y González-Castañeda ME. 2000. Geographical factors in the epidemiology of intoxication by *Karwinskia* (tullidora) in Mexico. *Cad. Saude Publica, Rio de Janeiro.* 16(1):255-260.

Baines CP. 2010. Role of the mitochondrion in programmed necrosis. *Front Physiol.* 29:(1):156.

Becerra-Verdín EM, Bermúdez-Barba MV, Salazar-Leal ME, et al. 2009. *Karwinskia humboldtiana* (buckthorn) fruit causes Central Nervous System damage during chronic intoxication in the rat. *Toxicon.* 53 (6): 645-51.

Bermúdez de Rocha MV, Lozano-Meléendez FE, Tamez-Rodríguez VA, Díaz-Cuello G, Piñeyro-López A. 1995. The incidence of poisoning by *Karwinskia humboldtiana* in México. *Salud Publica Mex.* 37(1):57-62.

Bermudez MV, Gonzalez-Spencer D, Guerrero M, Waksman N, Pineyro, A. 1986. Experimental intoxication with fruit and purified toxins of buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*). *Toxicon.* 24(11-12):1091-7.

Bermudez MV, Martínez FJ, Salazar ME, Waksman N, Piñeyro-Lopez A. 1992. Experimental acute intoxication with ripe fruit of *Karwinskia humboldtiana* (Tullidora) in rat, guinea-pig, hamster and dog. *Toxicon.* 30, 1493-1496.

Bhatia M. 2004. Apoptosis versus necrosis in acute pancreatitis. Review. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 286:189-196.

Bhatia M, Wong FL, Cao Y, Lau HY, Huang J, Puneet P, Chevali L. 2005. Pathophysiology of acute pancreatitis. *Pancreatology.* 5(2-3):132-44. Epub

Bustamante-Sarabia J, Olvera-Rabiela JE, Correa Nieto-Canedo L. 1978. Fatal poisoning caused by tullidora (*Karwinskia humboldtiana*) Report of a case. *Gac Med Mex.* 114(5):241-4.

Calderon-Gonzalez R, Rizzi-Hernandez H. 1967. Buckthorn polyneuropathy. New England Journal of Medicine. 277 (2); 69-71.

Cao J. and Liu Q. 2013. Protective effects of Sivelestat in a Caerulein-induced rat acute pancreatitis model. Inflammation. 36(6):1348-1356

Castillo-Nájera F. 1920. Contribución al estudio de las parálisis tóxicas. Un envenenamiento colectivo por Tullidora. Memoria del V Congreso Médico Mexicano, México D.F. Dirección de Talleres Gráficos. 240-244.

Charlton KM, Pierce KR. 1970. a) A neuropathy in goats caused by experimental coyotillo (*Karwinskia humboldtiana*) poisoning III: Distribution of lesions in peripheral nerves. Pathol Vet. 7(5):408-19.

Charlton, KM, Pierce KR. 1970. b) A neuropathy in goats caused by experimental coyotillo (*Karwinskia humboldtiana*) poisoning IV: Light and electron microscopic lesions in peripheral nerves. Pathol Vet. 7(5):420-34.

Charlton KM, Pierce KR. 1970. c) A Neuropathy in Goats Caused by Experimental Coyotillo (*Karwinskia humboldtiana*) Poisoning Part V Lesions in the Central Nervous System. Pathol. Vet. 7: 435-47.

Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Green DR 2006. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death Differ.* 13, 1396-1402.

Clavijero FX. 1933. *Historia de la Antigua o Baja California.* (Traducción). México. Imprenta del Museo Nacional de Arqueología, Historia y Etnografía.

Cuilty C. 1887. Breve estudio sobre el Capulincillo de Querétaro. *El Estudio.* Vol. 3, Monografías. México, pp. 123-130, Tesis.

De Aluja AS. 2002. [Laboratory animals and official Mexican norms (NOM-062-ZOO-1999)]. *Gac Med Mex.* 138(3):295-298.

Dreyer DL, Arai I, Bachman CD, Anderson WR Jr, Smith RG, Daves GD Jr. 1975. Toxins causing noninflammatory paralytic neuropathy. Isolation and structure elucidation. *J Am Chem Soc.* 97:4985-4990.

Elmore S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 35, 495-516.

Escobar-Izquierdo A, Nieto D. 1965. Neuropathological aspects of *Karwinskia humboldtiana* intoxication. Experimental study. *Gac Med Mex.* 95(2):163-82.

Fernández-Nava R. 1988. Tres especies nuevas de *Karwinskia* (*Rhamnaceae*) de México. Acta Botánica Mexicana. 2:11-20.

Fernández-Nava R. 1992. Nombres comunes, usos y distribución geográfica del género *Karwinskia* (*Rhamnaceae*) en México. An de Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Serie Botánica. 63:1-23.

Fernández-Nava R. 1993. La familia *Rhamnaceae* en México. Tesis de Doctorado, México, DF. Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.

Gaisano HY, Gorelick FS. 2009. New insights into the mechanisms of pancreatitis. Gastroenterology. 136(7):2040-2044.

Gaiser S, Daniluk J, Liu Y, Tsou L, Chu J, Lee W, Longnecker DS, Logsdon CD, Ji B. 2011. Intracellular activation of trypsinogen in transgenic mice induces acute but not chronic pancreatitis. Gut. 60:1379–1388.

García-Garza R, Salazar-Leal ME, Romero-Díaz V, García-Juárez J, Soto-Domínguez A, Juárez-Rodríguez OA, Sepúlveda-Saavedra J. 2013. Chronic Intoxication with Ripe Fruit of *Karwinskia humboldtiana* in Wistar Rats: Renal Damage. Int. J. Morphol. 31(4):1449-1454.

García-Juárez J, Salazar-Leal ME, Guzmán-López S, Romero-Díaz VJ, Ramírez-Durón R, Sepúlveda-Saavedra J. 2012. Evaluación del efecto del tratamiento con ácido lipoico administrado a la rata Wistar intoxicada con el fruto de *Karwinskia humboldtiana*. Int J Morphol. 30(2):572-578.

García-Ramos GS, Cacho Díaz B. 2005. Síndrome de Guillain-Barré (SGB). Diagnóstico diferencial. Rev Mex Neuroci. 6(5):448-54.

Godoy AM. 1890. El *Rhamnus humboldtianus*. Apuntes para su historia natural médica. Escuela Nacional de Medicina. México. p. 49.

Green DR, Evan GI. 2002. A matter of life and death. Cancer Cell. 1, 19-30.

Gukovskaya AS, Perkins P, Zaninovic V, Sandoval D, Rutherford R, Fitzsimmons T, Pandol SJ, and Poucell-Hatton S. 1996. Mechanisms of cell death after pancreatic duct obstruction in the opossum and the rat. Gastroenterology. 110: 875-884.

Gukovsky I, Pandol SJ, and Gukovskaya AS. 2011. Organellar Dysfunction in the Pathogenesis of Pancreatitis. Antiox and Redox Signaling. 15(10).

Gukovskaya AS, Gukovsky I. 2012. Autophagy and pancreatitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 303(9):993-1003.

Gustafsson AB, Gottlieb RA. 2008. Heart mitochondria: gates of life and death. *Cardiovasc Res.* 77, 334-43.

Hassen S, Ali N, Chowdhury P. 2012. Molecular signaling mechanisms of apoptosis in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *World J Gastrointest Pathophysiol.* 3, 71-9.

Havard V. 1885. Report on the flora of western and southern Texas. Part II. Economic notes on the texano-mexican flora. *US Natl Mus Proc.* 8:497-533.

Hu Q, Wu D, Chen W, et al. 2013. Proteolytic processing of the caspase-9 zymogen is required for apoptosome-mediated activation of caspase-9. *J Biol Chem.* 288, 15142-7.

Jaramillo-Juarez F, Ortiz G, Rodriguez-Vazquez ML, Falcon-Franco MA, Feria-Velasco A. 1995. Renal Failure During Acute Toxicity Produced by Tullidora Ingestion (*Karwinskia humboldtiana*). *Gen Pharmac.* 26(3):649-653.

Jaramillo-Juárez F, Rodríguez-Vázquez ML, Muñoz-Martínez J, Quezada-Tristán T, Posadas del Río FA, Llamas-Viramontes J, Ortiz GG, Feria-Velasco A, Reyes JL. 2005. The ATP levels in kidneys and blood are mainly decreased by acute ingestion of tullidora (*Karwinskia humboldtiana*). *Toxicon.* 46(1):99-103.

Ji B, Gaiser S, Chen X, Ernst SA, and Logsdon CD. 2009. Intracellular trypsin induces pancreatic acinar cell death but not NF- κ B activation. *J. Biol. Chem.* 284:17488-17498

Jin Z, El-Deiry WS. 2005. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther.* 4, 139-63.

Kaiser AM, Saluja AK, Lu L, Yamanaka K, Yamaguchi Y, Steer ML. 1996. Effects of cycloheximide on pancreatic endonuclease activity, apoptosis, and severity of acute pancreatitis. *Am J Physiol.* Sep;27.

Kaiser AM, Saluja AK, Sengupta A, Saluja M, Steer ML. 1995. Relationship between severity, necrosis, and apoptosis in five models of experimental acute pancreatitis. *Am J Physiol.* 269(5 Pt 1):1295-304.

Kuida K, Zheng TS, Na S, Kuan C, Yang D, Karasuyama H, Rakic, P, Flavell, RA. 1996. Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature.* 384, 368-372.

Kumar VA. Abbas K, Fausto N, Aster JC. 2010. *Robbins y Cotran - Patología estructural y funcional.* Ed. Elsevier, 8^a ed.

Kylänpää L, Rakonczay Z Jr, O'Reilly DA. 2012. The clinical course of acute pancreatitis and the inflammatory mediators that drive it. *Int J Inflamm.* 360685.

Laukkarinen JM, Van Acker GJD, Weiss ER, Steer ML, Perides G. 2007. A mouse model of acute biliary pancreatitis induced by retrograde pancreatic duct infusion of Na-taurocholate *Gut.* 56(11): 1590–8.

Logsdon CD, Ji B. 2013. The role of protein synthesis and digestive enzymes in acinar cell injury. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 10(6):362-70.

López-Clares F, Ocampo-Campos A, Guiza G. 1960. Two cases of ascending paralysis caused by the ingestion of berries of *Karwinskia humboldtiana*. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 17:889-98.

Mareninova OA, Sung KF, Hong P, Lugea A, Pandol SJ, Gukovsky I y Gukovskaya AS. 2006. Cell Death in Pancreatitis: Caspases protect from necrotizing pancreatitis. *J Biol Chem.* 281(6):3370-81.

Marsh CD. 1928. Coyotillo (*Karwinskia humboldtiana*) as a poisonous plant. Technical Bulletin No. 29 US. Department of Agriculture, Washington, D.C.

Martínez HR, Bermúdez MV, Rangel-Guerra RA, De León-Flores L. 1998. Clinical diagnosis in *Karwinskia humboldtiana* polyneuropathy. J Neurol Sci. 21; 154(1):49-54.

Modifi R, Duff MD, Wigmore SJ, Madhavan KK, Garden OJ, Parks RW. 2006. Association between early systemic inflammatory response, severity of multiorgan dysfunction and death in acute pancreatitis. British Journal of Surgery. 93:738-744.

Mukhopadhyay S, Panda PK, Sinha N, et al. 2014. Autophagy and apoptosis: where do they meet? Apoptosis. 19, 555-66.

Nakamichi I, Habtezion A, Zhong B, Contag CH, Butcher EC y Omary MB. 2005. Hemin-activated macrophages home to the pancreas and protect from acute pancreatitis via heme oxygenase-1 induction. J Clin Invest. 115(11): 3007–14.

Ning W, Wang Y, Zhang F, Wang H, Wang F, Wang X, Tang H, Liang S, Shi X, Liu Z. 2013. Beneficial effects of trypsin inhibitors derived from a spider venom peptide in Larginine-induced severe acute pancreatitis in mice. Plos One. 15;8(4)e61049.

Ocampo-Roosens LV, Ontiveros-Nevarés PG, Fernández-Lucio O. 2007. Intoxication with buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*): report of three siblings. Pediatr Dev Pathol. 10(1):66-8.

Ortíz GG, González BJ, Feria VA. 1991. Structural study of the acute effect of *Karwinskia humboldtiana* on cerebral motor cortex, hippocampus and caudate nucleus of the rat. *Gen. Pharmacol.* 23 (3), 543-547.

Ouyang L, Shi Z, Zhao S, et al. 2012. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif.* 45, 487-98.

Padrón-Puyou F. 1951. Clinical and experimental studies on paralysis in children due to *Karwinskia humboldtiana*. *Gac Med Mex.* 81(2-3-4):299-311.

Pandol SJ, Saluja AK, Imrie CW, Banks PA. 2007. Acute pancreatitis: bench to the bedside. *Gastroenterology.* 132(3):1127-1151.

Piñeyro A, Martínez L, González R. 1994. In vitro selective toxicity T-514 from *Karwinskia humboldtiana* (buckthorn) plant on various human tumor cell lines. *Toxicology.* 92:217-227.

Piñeyro A, Waksman N. 2000. Chemistry, structure and biological activity of anthracenones of the *Karwinskia* genus. Atta-ur-Rahman (Ed.) *Studies in Natural Products Chemistry*, Vol. 22, Elsevier Science B.V.

Puértolas MM, Nava JO, Medina LH, López OF, Oyervides PJ. 1984. Polirradiculoneuritis por *Karwinskia humboldtiana*: informe de seis casos. Revista Médica del IMSS. 22:25-27.

Rodriguez-Rocha H, Garcia-Garcia A, Panayiotidis MI, Franco R. 2011. DNA damage and autophagy. Review. Mutat Res. 711(1-2):158-66.

Rzedowski J. 1998. Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. In: T.P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot y J. Fa (Comps.). Diversidad Biológica de México: orígenes y distribución. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. 129-145.

Salazar-Leal ME, Flores MS, Sepúlveda-Saavedra J, Romero-Diaz VJ, Becerra-Verdín EM, Tamez-Rodriguez VA, Martínez HR, Piñeyro-Lopez A, Bermudez MV. 2006. An experimental model of peripheral neuropathy induced in rats by *Karwinskia humboldtiana* (buckthorn) fruit. J Peripher Nerv Syst. 11(3):253-61.

Saluja A, Hofbauer B, Yamaguchi Y, Yamanaka K, Steer M. 1996. Induction of apoptosis reduces the severity of caerulein-induced pancreatitis in mice. Biochem Biophys Res Commun. 220(3):875-8.

Sánchez-Lozada R., Camacho-Hernández MI., Vega-Chavaje RG., Garza-Flores JH., Campos-Castillo C., Gutiérrez-Vega, R. 2005. a) Pancreatitis aguda: experiencia de cinco años en el Hospital General de México. *Gac Med Mex* 141(2) 123-127.

Sánchez-Lozada R., Chapa-Azuela O., Vega-Chavaje RG., Garza-Flores JH., Campos-Castillo C. and Gutiérrez-Vega R. 2005. b) Frecuencia de falla orgánica en la pancreatitis aguda necrótica. *Gac Med Mex.* 141(3) 175-179.

Schepers NJ., Besselink MGH., Van Santvoort HC., Bakker OJ., Bruno MJ. 2013. Early management of acute pancreatitis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology.* 27:727-743.

Sosa S. 1890. Tullidora o capulincillo. *El Estudio.* México. 2:35-37.

Spormann H, Sokolowski A, Letko G. 1989. Effect of temporary ischemia upon development and histological patterns of acute pancreatitis in the rat. *Pathol Res Pract.* 184(5):507-13.

Standley PC. 1923. *Rhamnaceae*. In: Trees and shrubs of Mexico. *Contr. U.S. Natl. Herb.* Washington, D.C., Smithsonian Institute. 23(3). 715-717.

Usborne AL, Smith AT, Engle SK, Watson DE, Sullivan JM, Walgren JL. 2014. Biomarkers of exocrine pancreatic injury in 2 rat acute pancreatitis models. *Toxicol Pathol.* 42(1):195-203.

Vercammen D, Beyaert R, Denecker G, Goossens V, Van Loo G, Declercq W, Grooten J, Fiers W, Vandenabeele PJ. 1998. Inhibition of Caspases Increases the Sensitivity of L929 Cells to Necrosis Mediated by Tumor Necrosis Factor. *Exp. Med.* 187, 1477-1485.

Waksman N, Martínez L, Fernández R. 1989. Chemical and toxicological screening in genres *Karwinskia* (Mexico). *Rev Latinoam Quim.* 20:27-32.

Weller RO, Mitchell J, Davies D. 1980. Buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*) toxins. In: *Experimental and Clinical Neurotoxicology*. Spencer PS, Schaumburg HH (Eds). Williams & Wilkins, Baltimore. 336-347.

Welsch U. 2014. Sobotta, Histología. Editorial Médica Panamericana, 3^a edición. México. 374-377.

Zhang D, Feng H, Chen W. 2013. Effects of hydrogen-rich saline on Taurocholate-induced acute pancreatitis in rat. *Evidence-based Complementary and alternative medicine.* Vol 2013:1-6.

Zhang J. and Rouse RL. 2014. Histopathology and pathogenesis of caerulein-, duct ligation-, and arginine-induced acute pancreatitis in Sprague-Dawley rats and C57BL6 mice. *Histol Histopathol.* 29:1135-1152.

Ziegler KM, Wade TE, Wang S, Swartz-Basile DA, Pitt HA, Zyromski NJ. 2011. Validation of a novel, physiologic model of experimental acute pancreatitis in the mouse. *Am J Transl Res.* 3(2):159-165.

ANEXO A
TÉCNICA DE INCLUSIÓN EN PARAFINA LIBRE DE XILOL

Procedimiento:

1. Fijar las muestras en formalina amortiguada a pH 7.4 durante 48 h.
2. Lavar con agua destilada durante 1 h.
3. Deshidratar con alcohol isopropílico al 70% durante 1 h.
4. Deshidratar con alcohol isopropílico al 80% durante 1 h.
5. Deshidratar con alcohol isopropílico al 90% durante 1 h, 2 cambios.
6. Deshidratar con alcohol isopropílico absoluto durante 1 h, 2 cambios.
7. Preincluir en parafina fundida a 60 °C durante 1 h, 2 cambios.

ANEXO B

PREPARACIÓN DE LAMINILLAS SILANIZADAS

Preparación de los reactivos:

Silano al 2%:

Acetona	100 mL
Silano (3-aminopropyltriethoxysilane)	2 mL

La solución se prepara inmediatamente antes de usar y es estable durante 8 h. Se deben usar pipetas, probetas, vasos de precipitados y cajas de Coplin de plástico, porque el silano se adhiere al vidrio.

Procedimiento:

1. Lavar los portaobjetos por inmersión en acetona durante 2 min.
2. Secar al aire libre.
3. Sumergir en la solución de silano al 2% durante 2 min.
4. Lavar en agua destilada durante 1 min, 2 cambios.
5. Secar en horno a 60 °C.
6. Almacenar en cajas para laminillas, evitando que se friccionen las superficies silanizadas entre ellas.

ANEXO C

TÉCNICA DE TINCIÓN CON HEMATOXILINA Y EOSINA

Preparación de los reactivos:

Solución de alcohol ácido (diferenciador o decolorante):

Alcohol al 70%	99.0 mL
Ácido clorhídrico concentrado	1.0 mL

Solución de agua amoniacal (virador):

Agua destilada	99.0 mL
Hidróxido de amonio	1.0 mL

Obtención de cortes de tejidos incluidos en bloques de parafina:

1. Enfriar los bloques de tejido (preferentemente a -20°C).
2. Cortar en microtomo a $5\ \mu\text{m}$ de espesor.
3. Adherir los cortes en laminillas silanizadas.
4. Colocar los cortes en una canastilla metálica en horno a 60°C durante 1 h.

Procedimiento:

1. Desparafinar con xilol durante 5 min.
2. Sumergir en etanol/xilol durante 5 min.
3. Sumergir en etanol absoluto durante 2 min.
4. Sumergir en etanol de 96° durante 2 min.
5. Hidratar con agua destilada durante 2 min.
6. Teñir con hematoxilina (Richard-Allan Scientific 7212L) durante 2 min.
7. Enjuagar con agua destilada durante 2 min.
8. Diferenciar con alcohol ácido durante 5 seg.

9. Enjuagar con agua destilada durante 2 min.
10. Virar a color azul con agua amoniacal durante 5 seg.
11. Enjuagar con agua destilada durante 2 min.
12. Teñir con eosina durante 30 seg.
13. Enjuagar con etanol de 96° durante 1 min.
14. Deshidratar con etanol de 96° durante 2 min.
15. Deshidratar con etanol absoluto durante 3 min.
16. Sumergir en etanol/xilol durante 3 min.
17. Aclarar en xilol durante 5 min.
18. Montar el cubreobjetos aplicando una gota de Entellan®.

Resultados:

Núcleo: en color azul a oscuro.

Citoplasma, tejido fibroso o fondo de los componentes tisulares: en color rosa pálido a rosa intenso, anaranjado o en tonos rojizos.

ANEXO D
ENSAYO DE INMUNOFLUORESCENCIA

Preparación de los reactivos:

Buffer salino de fosfatos (PBS) a pH 7.4:

H ₂ O miliQ	2 L
NaCl	16 g
KCl	0.4 g
Na ₂ HPO ₄	2.88 g
KH ₂ PO ₄	0.48 g

Ajustar el pH a 7.4 con HCl 1 M o NaOH 10 M (según sea el caso) y esterilizar en autoclave.

Solución de boro-hidruro de sodio al 1%:

PBS a pH 7.4	1 mL.
Boro-hidruro de sodio	10 mg.

Esta solución se prepara inmediatamente antes de usar.

Solución bloqueadora:

PBS a pH 7.4	10 mL
Tritón X-100	10 µL
Leche deslactosada en polvo	0.5 g

Almacenar a 4°C.

Procedimiento:

1. Obtener cortes de 5 µm de espesor del tejido pancreático incluido en parafina y colocarlos en laminillas previamente silanizadas.

2. Suprimir la autofluorescencia inducida mediante la incubación con borohidruro de sodio al 1% (200 μ L por laminilla) durante 5 min.
3. Lavar con PBS durante 5 min, 2 veces.
4. Bloquear la unión no específica con la solución bloqueadora de leche deslactosada al 5% y Tritón al 0.1% (500 μ L por laminilla) durante 90 min.
5. Eliminar el sobrenadante de la solución bloqueadora y no lavar.
6. Agregar el anticuerpo primario Anti-activa + pro-Caspasa-3 a concentración de 2.5 μ g/mL (200 μ L por laminilla), e incubar toda la noche a 4°C en cámara húmeda.
7. Atemperar los cortes, sacándolos del refrigerador y dejándolos a temperatura ambiente durante unos 10 a 20 min.
8. Lavar con PBS durante 5 min, 4 veces.
9. Agregar el anticuerpo secundario policlonal Anti-conejo IgG H&L de cabra (Alexa Fluor® 488) pre-adsorbido, en dilución 1:5000 (200 μ L por laminilla), e incubar durante 2 h a temperatura ambiente y en oscuridad.
10. Lavar con PBS durante 5 min, 4 veces.
11. Montar con DAPI (15 μ L por laminilla) y colocar el cubreobjetos. El DAPI es altamente tóxico, no se debe manejar sin guantes.
12. Observar con el microscopio confocal usando el láser a 405 nm para lograr la excitación de DAPI y el láser a 488 nm para lograr la excitación del fluorocromo Alexa Fluor 488.

Resultados:

Una vez obtenidas las imágenes se le asignó al DAPI el color azul y a la señal positiva del anticuerpo secundario se le asignó el color verde.

ANEXO E ENSAYO DE TUNEL

Preparación de los reactivos:

Proteinasa K:

PBS 1x	400 µL
Proteinasa K	8 µL

Solución TACS nucleasa:

PBS	150 µL
TACS nucleasa	3 µL

Peróxido de hidrógeno al 3% en metanol:

Metanol	360 µl
Peróxido de hidrógeno al 30%	40 µl

Buffer de marcaje TdT 1x:

Agua miliQ	1350 µL
Buffer de marcaje TdT 10x	150 µL

Solución de reacción de marcaje:

Buffer de marcaje	300 µL
Mezcla TdT dNTP	2.1 µL
Mn ²⁺	6 µL
Enzima TdT	2.1 µL

Buffer TdT Stop:

Agua miliQ	1080 μ L
Buffer TdT Stop 10x	120 μ L

Solución Strep-HRP:

Diluyente Blue Strep	400 μ L
Strep-HRP	0.32 μ L

Procedimiento:

1. Colocar las laminillas en cámara húmeda y lavar con PBS 1x durante 2 min.
2. Incubar con 50 μ L de solución de proteinasa K durante 15 min, a temperatura ambiente.
3. Lavar una vez con 200 μ L de agua miliQ durante 1 min.
4. Generar el control positivo, agregando 50 μ L de solución de TACS nucleasa e incubar a 37°C durante 60 min; mientras, las muestras restantes son cubiertas con PBS.
5. Lavar con 200 μ L PBS durante 2 min.
6. Suprimir la peroxidasa endógena con 50 μ L de peróxido de hidrógeno al 3% durante 5 min (no exceder el tiempo).
7. Lavar una vez con 200 μ L de agua miliQ durante 1 min.
8. Añadir 150 μ L de Buffer de marcaje TdT 1x, dejar durante 5 min.
9. Escurrir la solución y no lavar.
10. Incubar con 50 μ L de solución de reacción de marcaje a 37°C, en cámara húmeda, durante 60 min.
11. Detener la reacción con 150 μ L de buffer TdT Stop.
12. Lavar con PBS 1X, 2 veces.
13. Incubar con 50 μ L de solución Strep-HRP a temperatura ambiente, durante 10 min.
14. Lavar con 200 μ L de PBS, 0.1% Tween 20, 4 veces.

15. Incubar con 100 μL de TACS-Sapphire™ por laminilla durante 60 min a temperatura ambiente y en oscuridad.
16. Detener la reacción con 100 μL de ácido fosfórico al 5% por laminilla.
17. Fotodocumentar.

ANEXO F

HOMOGENIZACIÓN DE LAS MUESTRAS DE PÁNCREAS

Preparación de los reactivos:

Buffer Tris 1 M a pH 8.0:

Tris base	172.8 g
Agua destilada	1,000 mL
HCl concentrado	42 mL

Cloruro de sodio 5 M:

Agua miliQ	100 mL
Cloruro de sodio (NaCl)	29.2 g

Deoxicolato de sodio al 2%:

Agua miliQ	10 mL
Deoxicolato de sodio	0.2 g

SDS al 10%:

Agua miliQ	80 mL
SDS	10 g

Calentar a 68 °C para facilitar la disolución. Ajustar pH a 7.2 con HCL concentrado (gota a gota). Aforar a 100 mL y alicuotar.

Buffer RIPA 1x:

Tris 1 M a pH 8.0	1.25 mL
NaCl 5 M	750 µL
NP40	250 µL
Deoxicolato de sodio al 2%	6.25 mL
SDS al 10%	250 µL

PMSF 100 mM (inhibidor de proteasas):

Fluoruro de fenilmetilsulfonilo	17.4 mg
Isopropanol	1 mL

Buffer de lisis:

Buffer RIPA 1x	990 μ L
PMSF 100 mM (inhibidor de proteasas)	10 μ L

Se ocupan 200 μ L por cada 20 mg de tejido.

Procedimiento:

1. Tomar un fragmento de 20 mg del páncreas congelado a -80°C y colocarlo en el vaso de Potter Elvehjem del homogenizador.
2. Agregar 200 μ L de Buffer de lisis.
3. Homogenizar a 1,100 rpm (velocidad 10), dando 10 golpes suaves con el pistón de teflón. Evitar que se caliente manteniendo el vaso en hielo frapé.
4. Vaciar el homogenizado en un tubo Eppendorf de 1.5 mL.
5. Centrifugar a 14,000 rpm a 4°C durante 10 minutos.
6. Obtener con cuidado el sobrenadante de cada muestra y congelar a -80°C hasta su utilización.

ANEXO G

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Preparación de los reactivos:

Preparación de los estándares de albúmina:

Según las indicaciones del fabricante.

Preparación del reactivo de trabajo BCA:

Según las indicaciones del fabricante.

Procedimiento:

1. Colocar 5 μL de cada estándar de albúmina y 1 μL de cada muestra, por separado, en pocillos de placas de lectura de 96 pocillos.
2. Agregar a cada pocillo 200 μL de reactivo de trabajo BCA.
3. Incubar a 37 °C durante 30 min.
4. Realizar la lectura de la placa a 595 nm.
5. Obtener la curva de calibración.
6. Calcular e igualar la concentración de proteínas que se cargan en el gel con los resultados obtenidos en la curva de calibración, tomando en cuenta para las muestras problema, un factor de dilución de 5.

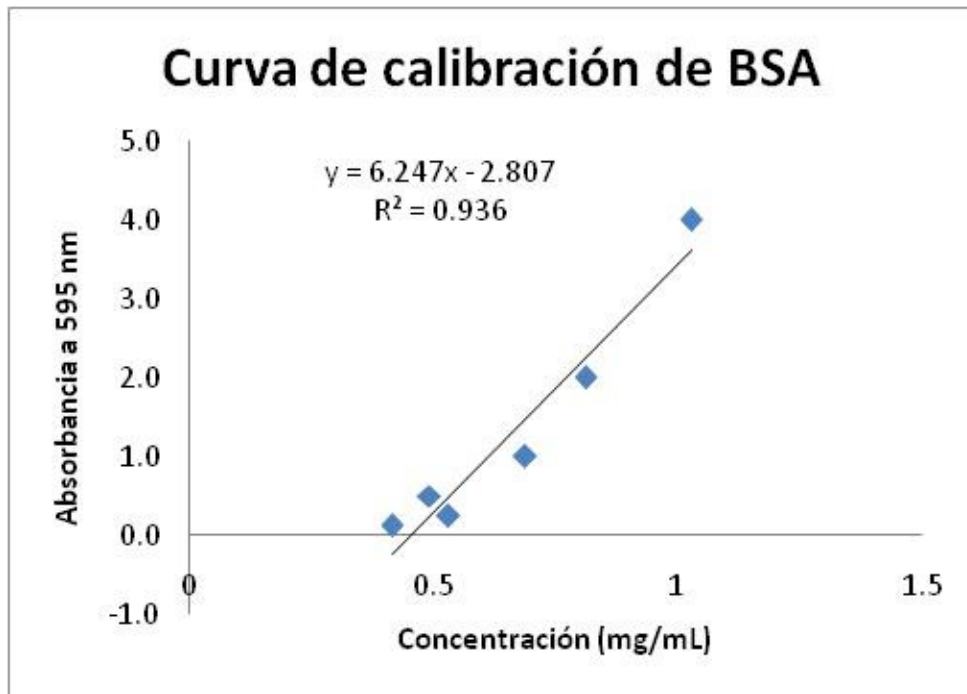


Figura 18. Curva de calibración de proteínas y fórmula para calcular e igualar la carga de proteínas de cada muestra en el gel.

ANEXO H

ENSAYO DE WESTERN BLOT

Preparación de los reactivos:

Tris-HCl 1 M a pH 6.8:

Tris base	60.5 g
Agua miliQ	900 mL

Ajustar el pH a 6.8 con HCl concentrado.

Aforar a 1 L.

Filtrar con filtro millipore de 0.45 μ m.

Buffer de muestras SDS-PAGE 5x:

Tris-HCl 1 M a pH 6.8	2.25 mL
Glicerol	5 mL
SDS	0.5 g
Azul de bromofenol	5 mg
DTT	2.5 mL

El DTT se agrega antes de usarse.

Llevar a 1x antes de usar.

Calentar 1 min a baño María antes de usar para que el buffer no esté muy espeso.

Buffer de corrida Tris Glicina SDS 10x:

Agua miliQ	1 L
Tris base	30.3 g
Glicina	144.0 g
SDS	10 g

Llevar a 1x antes de usar.

Buffer de transferencia:

Tris base	6.05 g
Glicina	28.7 g
Metanol	200 mL
SDS	1 g

Aforar con agua destilada a 1,000 mL.

TBS Tween 20 (TBST) 10x:

Tris 1 M a pH 7.5	200 mL
NaCl 5 M	274 mL
Tween 20	50 mL

Llevar a 1x antes de usar.

PSA al 10%:

Agua miliQ	10 mL
Persulfato de amonio	1 g

Tris 1.5 M a pH 6.8:

Tris base	181.65 g
Agua miliQ	700 mL

Ajustar el pH a 6.8 con HCl concentrado y aforar a 1 L.

Asegurarse que la solución se enfríe a temperatura ambiente antes de llevar a su pH final.

Preparación de geles SDS-PAGE:

Gel de carga al 4% (2.5 mL):

Acrilamida al 40%	0.25 mL
Tris 1.5 M a pH 6.8	0.63 mL
Agua miliQ	1.59 mL
SDS al 10%	25.00 µL
PSA al 10%	12.50 µL
TEMED	2.50 µL

Gel de corrida al 15% (10 mL):

Acrilamida al 40%	3.50 mL
Tris 1.5 M a pH 6.8	2.50 mL
Agua miliQ	3.60 mL
SDS al 10%	100.00 µL
PSA al 10%	50.00 µL
TEMED	5.00 µL

Procedimiento:

1. Preparar los geles de corrida y de carga de poliacrilamida.
2. Desnaturalizar las proteínas de las muestras en tubos Eppendorf con tapa perforada y con buffer de muestra SDS-PAGE a baño María (100°C) durante 5 min.
3. Colocar las muestras y marcadores en hielo frapé de 3 a 5 min.
4. Centrifugar levemente dando un pulso a 14,000 rpm a 4°C.
5. Colocar cada una de las muestras en cada carril del gel de electroforesis, llenar la cámara con buffer de corrida Tris Glicina SDS al 1x y correr las muestras durante 2 h a un voltaje de 90 V.

6. Retirar el gel de corrida de su estructura.
7. Preparar y activar la membrana de transferencia de PVDF, humedeciéndola con metanol.
8. Humedecer la membrana de PVDF con buffer de transferencia 1x.
9. Colocar en la cámara de transferencia, en orden y en dirección de cátodo a ánodo: la primera almohadilla, filtro, gel de poliacrilamida, membrana de PVDF, filtro y la segunda almohadilla. Quitar con el rodillo las burbujas que se puedan generar.
10. Realizar la transferencia a la membrana, a 120 mA durante 1 h.
11. Retirar la membrana y lavar con agua destilada.
12. Incubar con solución de bloqueo a temperatura ambiente durante 1 h y en agitación suave y continua.
13. Incubar con el anticuerpo primario (1:1000), a 4°C, en agitación suave, durante toda la noche.
14. Lavar con TBST 1x durante 10 min, 3 cambios.
15. Incubar con el anticuerpo secundario (1:3000), a temperatura ambiente, en agitación suave, durante 1 h.
16. Lavar con TBST 1x durante 10 min, 3 cambios.
17. Revelar por quimioluminiscencia usando 1 mL de solución de trabajo del substrato quimioluminiscente SuperSignal® West Pico, con una exposición de 1 min, para obtener una señal clara.

Notas:

Se corrieron geles con 50 y con 100 µg de proteína por muestra. La mejor señal se obtuvo con 100 µg de carga. Se realizó la detección de caspasa-3 en primer lugar, después la de LC3-I y II, finalmente la de actina.

ANEXO I REVELADO

Preparación de los reactivos:

Solución reveladora:

Agua miliQ	78.2 mL
Solución reveladora concentrada	21.8 mL

Solución fijadora:

Agua miliQ	78.2 mL
Solución fijadora concentrada	21.8 mL

Procedimiento:

Se realiza en cuarto oscuro y bajo luz roja, una vez que ha sido aplicado el substrato quimioluminiscente sobre la membrana de PVDF:

1. Colocar la membrana de PVDF en el cassette de exposición.
2. Colocar el film encima de la membrana de PVDF y cerrar el cassette durante 5 seg.
3. Abrir el cassette y retirar el film.
4. Colocar el film en la solución reveladora diluida hasta que las bandas sean visibles.
5. Lavar con agua corriente.
6. Colocar el film en la solución fijadora.
7. Lavar con agua corriente.
8. Secar el film a temperatura ambiente.
9. Digitalizar o fotodocumentar el film.

ANEXO J
ENSAYO DE CITOCROMO OXIDASA C

Preparación de los reactivos:

Buffer de fosfatos (solución Sörensen) 0.1 M:

Agua miliQ	1 L
Na ₂ HPO ₄	3.15 g
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	3.9 g

Solución de Incubación:

Buffer de fosfatos (Sörensen) 0.1 M	60 mL
Diaminobencidina (Sigma-Aldrich, D5637)	60 mg
Enzima citocromo c (Sigma-Aldrich C2506)	60 mg

Hematoxilina de Gill:

Agua destilada	730.0 mL
Etilenglicol	250.0 mL
Hematoxilina anhidra (polvo)	2.0 g
Yodato de Sodio	0.2 g
Sulfato de amonio	17.6 g
Ácido acético glacial	2.1 mL

Procedimiento:

1. Realizar cortes del tejido pancreático de 16 µm de espesor por congelación.
2. Lavar las laminillas 3 veces con solución Sörensen 0.1 M.
3. Incubar en la solución de incubación, durante 3 h en horno a 37°C y protegido de la luz.
4. Lavar con solución Sörensen 0.1 M durante 5 min.

5. Lavar con agua destilada, inmersión rápida.
6. Contrateñir con Hematoxilina de Gill durante 1 min.
7. Lavar con agua destilada, 1 inmersión lenta.
8. Deshidratar con alcohol gradualmente (96° y absoluto), 2 min en c/u.
9. Aclarar con alcohol/xilol (1:1) y luego con xilol, 5 min en c/u.
10. Montar el cubreobjetos con Entellan®.

Resultados:

Las mitocondrias se tiñen en color marrón intenso, mientras que los núcleos se observan en tonos azules y violetas.

ANEXO K

ENSAYO DE AMILASA PANCREÁTICA SÉRICA

Preparación de las muestras:

1. Dejar coagular la sangre venosa en tubo Eppendorf sobre hielo frapé.
2. Centrifugar a 14,000 rpm a 4°C por 10 min.
3. Separar con cuidado el suero en tubos Eppendorf y congelar a -80°C hasta que sean utilizados.

Procedimiento:

1. Descongelar los sueros y colocar sobre hielo frapé.
2. Transferir 10 µL de agua miliQ a un tubo Eppendorf (control blanco), agregar 190 µL del sustrato y 80 µL del agente para detener la reacción (Stop Reagent).
3. Transferir 10 µL de los sueros a tubos Eppendorf bien etiquetados.
4. Añadir 190 µL del sustrato, agitar con vórtex brevemente e incubar durante 5 min. Es importante invertir la botella del sustrato unas 10 veces para mantenerlo en suspensión, antes de ser añadido a los tubos. El sustrato debe precalentarse a 37°C antes de usarse.
5. Añadir 80 µL del Stop Reagent a cada tubo para terminar la reacción. Agitar con vórtex y centrifugar a 14,000 rpm durante 5 min.
6. Transferir 200 µL del sobrenadante de cada tubo (con cuidado) a cada pocillo de una caja de 96 pocillos de fondo claro.
7. Transferir 200 µL de agua miliQ a un pocillo y 200 µL del calibrador a otro pocillo.
8. Realizar la lectura de las densidades ópticas (DO) en un lector de placas a 595 nm (580 a 600 nm).

9. Calcular la actividad de la α -amilasa con la fórmula proporcionada por el fabricante, tal como sigue:

$$\text{Actividad} = \frac{\text{DO de la muestra} - \text{DO del blanco} \times n \times 550 \text{ (U/L)}}{\text{DO del calibrador} - \text{DO del H}_2\text{O}}$$

En donde, la DO de la muestra y la DO del blanco son los valores de la DO a 595 nm de la muestra y del blanco, respectivamente. La DO calibrador y la DO del H₂O son los valores de la DO a 595 nm, del calibrador proporcionado en el Kit y la DO del agua miliQ, respectivamente. El valor de n es el factor de dilución (en el caso de que se hubiera diluido la muestra). La constante 550 es la cantidad equivalente en U/L del calibrador bajo las condiciones del ensayo. Cuando la actividad calculada resulta mayor de las 300 U/L, se diluyen las muestras en agua y se repite el ensayo, multiplicando los resultados por el factor de dilución (n).

ARTÍCULOS

Artículo publicado en la Revista Histol Histopathol. 2015 Nov 5:11681. [Epub ahead of print]
Histopathological alterations in the striatum caused by *Karwinskia humboldtiana* (Buckthorn) fruit in an experimental model of peripheral neuropathy.

Díaz-Pérez RN¹, Castillo-González JA¹, Carcaño-Díaz K¹, García-Juárez J¹, Salazar-Leal ME², Muñoz-Maldonado GE³, Montes-de-Oca-Luna R¹, Saucedo-Cárdenas O⁴, Soto Domínguez A⁵.

Artículo enviado a la Revista Histol Histopathol. 2015 Jul. Reference: B-5554.

Damage to pancreatic acinar cells and preservation of islets of Langerhans in a rat model of acute pancreatitis induced by *Karwinskia humboldtiana* (buckthorn).

Katya Carcano-Díaz¹, Aracely Garcia-Garcia¹, Juan Carlos Segoviano-Ramirez^{1,2}, Humberto Rodríguez-Rocha¹, Maria de Jesus Loera-Arias¹, *Jaime Garcia-Juarez^{1,2}.

CONGRESOS

XXVII Congreso Nacional de Investigación en Medicina. Octubre 2013.

XXXVI Congreso Nacional de Histología. Octubre 2013.

XXV Congreso Nacional de Anatomía, 1er Encuentro Nacional de Neuromorfología. Octubre 2014.

XXXVII Congreso Nacional de Histología y 1er Congreso Iberoamericano de Histología. Octubre 2014.

XXII Encuentro Nacional y XIII Congreso Iberoamericano de Investigación en Odontología. Noviembre 2014.

XVIII Congreso de la Sociedad Española de Histología e Ingeniería Tisular, 6th International Congress of Histology and Tissue Engineering, II Congreso Iberoamericano de Histología. Septiembre 2015.

Histol Histopathol. 2015 Nov 5:11681. [Epub ahead of print]

Histopathological alterations in the striatum caused by *Karwinskia humboldtiana* (Buckthorn) fruit in an experimental model of peripheral neuropathy.

Díaz-Pérez RN¹, Castillo-González JA¹, Carcaño-Díaz K¹, García-Juárez J¹, Salazar-Leal ME², Muñoz-Maldonado GE³, Montes-de-Oca-Luna R¹, Saucedo-Cárdenas O⁴, Soto Domínguez A⁵.

Abstract

The accidental ingestion of *Karwinskia humboldtiana* (Kh) fruit in humans and animals causes chronic or acute intoxication. Acute poisoning induces respiratory failure that progresses rapidly to death. Studies in animals intoxicated with Kh describe lesions in cerebral cortex, cerebellum, spinal cord, hippocampus and caudate nucleus. Kh intoxication in Wistar rats models the sub-lethal clinical phase observed in humans. Considering these reports, the present study analyzed the histopathological alterations within the striatum following experimental Kh intoxication. Twenty Wistar rats were divided into three groups (n =5) and were intoxicated with Kh fruit. A control group (n =5) was included. Animals were euthanized at several time points (48, 58 and 170 days post-intoxication). The brain was collected, divided and processed for conventional histology or electron microscopy. Sections were stained with hematoxylin and eosin, cresyl violet, Klüver-Barrera, and toluidine blue. Immunolabeling was performed for glial cells in the striatum, and the samples were analyzed with light microscopy. Morphometric and statistical analyses were performed. In control group, neurons, axon bundles and neuropil had a normal appearance. At 48 days, hyperchromic neurons with apparent decreased size were observed interspersed among the normal neurons. At 58 days, we observed an increased number of hyperchromic neurons and disorganization of the myelin sheath and neuropil. At 170 days, these alterations persisted in the paralysis group. In treated groups, we observed signs of gliosis and increased axonal diameters. This study is the first report that describes the histopathological alterations within the striatum caused by chronic intoxication with Kh fruit in the Wistar rat.

PMID:

26544757

[PubMed - as supplied by publisher]

Damage to pancreatic acinar cells and preservation of islets of Langerhans in a rat model of acute pancreatitis induced by *Karwinskia humboldtiana* (buckthorn)

Katya Carcano-Diaz¹, Aracely Garcia-Garcia¹, Juan Carlos Segoviano-Ramirez^{1,2}, Humberto Rodriguez-Rocha¹, Maria de Jesus Loera-Arias¹, *Jaime Garcia-Juarez^{1,2}.

¹Departamento de Histología, Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL). Ave. Madero y E. Aguirre Pequeño, A.P. 1563, Monterrey, NL., Mexico.

²Unidad de Bioimagen, Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, UANL. Av. Carlos Canseco s/n esquina con Av. Gonzalitos, Mutualismo, Mitras Centro, 64460 Monterrey, NL., Mexico.

***Corresponding Author: jaimgarc1970@hotmail.com**

Running title: Pancreatic damage by *Karwinskia humboldtiana*

SUMMARY

Karwinskia humboldtiana (Kh) is a poisonous plant that grows in some regions of the American continent. Consuming large amounts of Kh fruit results in acute intoxication leading to respiratory failure, culminating in death within days. There is evidence of histological damage to the lungs, liver, and kidneys following accidental and experimental Kh intoxication. To date, the microscopic effect of Kh consumption on the pancreas has not been described. We examined the early effects of Kh fruit on pancreatic tissue at different stages of acute intoxication in the Wistar rat. We found progressive damage confined to the exocrine pancreas, starting with a reduction in the number of zymogen granules, loss of acinar architecture, the presence of autophagy-like vesicles, apoptosis and inflammatory infiltrate. The pancreatic pathology culminated in damaged acini characterized by necrosis and edema, with a complete loss of lobular architecture. Interestingly, the morphology of the islets of Langerhans was conserved throughout our evaluations. Taken together, our results indicate the damage induced by a high dose of Kh fruit in the Wistar rat is consistent with an early acute necrotizing pancreatitis that exclusively affects the exocrine pancreas. Therefore, this system might be useful as an animal model to study the treatment of pancreatic diseases. More importantly, as the islets of Langerhans were preserved, the active compounds of Kh fruit could be utilized for the treatment of acinar pancreatic cancer. Further studies might provide insight into the severity of acute Kh intoxication in humans and influence the design of treatments for pancreatic diseases and acinar pancreatic cancer.

KEY WORDS

Acute pancreatitis, necrotizing pancreatitis, pancreatic acini, acute intoxication, *Karwinskia humboldtiana*

La Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León
a través de la Subdirección de Investigación
otorga la presente

CONSTANCIA

a:
Dr. C. Juan Carlos Segoviano Ramírez, MC Katya Carcaño Díaz,
Dr. C. Jaime García Juárez

por la presentación **ORAL** del trabajo titulado:

"AUTO-FLUORESCENCIA INDUCIDA POR FIJADORES EN NERVIOS PERIFÉRICOS DE RATA WISTAR, ANÁLISIS ESPECTRAL"



Llevado a cabo del 10 al 12 de Octubre de 2013
en Monterrey, NL, México
"Alere Flammam Veritatis"




Dr. med. Santos Guzmán López
Director



Dr. med. José Gerardo González González
Subdirector de Investigación



Dr. C. Guillermo Elizondo Riojas
Secretario de Fomento a la Investigación



Dra. med. Consuelo Treviño Garza
Coordinadora XXVII Congreso Nacional
de Investigación en Medicina

XXXVI
CONGRESO NACIONAL
DE HISTOLOGÍA

"PROCESOS QUE DAN VIDA"


LA SOCIEDAD MEXICANA DE HISTOLOGÍA A. C. Y
LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
A TRAVÉS DE LA SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN

OTORGAN LA PRESENTE CONSTANCIA A:

**Segoviano Ramírez Juan Carlos, Carcaño
Díaz Katya y García Juárez Jaime**

Por su presentación en Cartel en la temática de Histotecnología y
Análisis de Imagen con el trabajo Intitulado:

**"AUTO-FLUORESCENCIA INDUCIDA POR FIJADORES EN NERVIOS
PERIFÉRICOS DE RATA WISTAR, ANÁLISIS ESPECTRAL"**



Dra. Claudia Sierra Castillo
Presidenta de la Sociedad Mexicana de
Histología A. C.

Cuernavaca, Morelos del 16 al 18 de Octubre del 2013





XXV

CONGRESO NACIONAL DE ANATOMÍA
"Mtra. Concepción Rugerio y Vargas"
1ER. ENCUENTRO NACIONAL DE NEUROMORFOLOGÍA



Se otorga la presente:

CONSTANCIA

a Díaz Pérez R, Carcaño Díaz K, García Juárez J, Montes de Oca Luna R, Saucedo Cárdenas O, Soto Domínguez A

por haber presentado el trabajo titulado

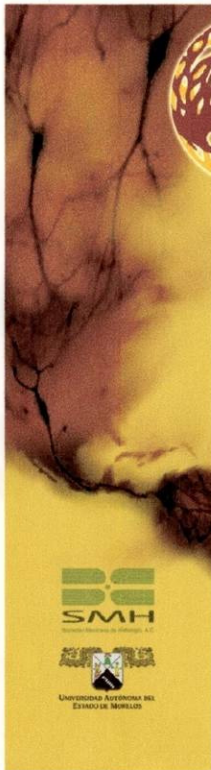
Evaluación morfológica de estriado en la intoxicación crónica con *Karwinskia humboldtiana* en rata Wistar

en el 1er ENCUENTRO NACIONAL DE NEUROMORFOLOGÍA
XXV CONGRESO NACIONAL DE ANATOMÍA y
realizados del 1 al 4 de octubre de 2014 en Durango, Dgo.




Dra. Ma. Isabel García Peñáz
Presidenta Ejecutiva
Sociedad Mexicana de Anatomía


Dr. Carlos Castillo Rangel
Presidente
Encuentro Nacional de Neuromorfología



XXXVII CONGRESO NACIONAL DE HISTOLOGÍA y
1er CONGRESO IBEROAMERICANO DE HISTOLOGÍA
"Sinapsis del Conocimiento"
LA SOCIEDAD MEXICANA DE HISTOLOGÍA A. C. ,
EL COMITÉ IBEROAMERICANO DE HISTOLOGÍA Y
EL CUERPO ACADÉMICO "MANEJO BIOTECNOLÓGICO DE RECURSOS
ACUÁTICOS" DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS


OTORGAN LA PRESENTE CONSTANCIA A:


Carcaño Díaz Katya, García García Aracely,
Rodríguez Rocha Humberto, Segoviano Ramírez
Juan C. y García Juárez Jaime

Por su presentación en Cartel en la temática de
Histopatología Experimental con el trabajo Intitulado:

"PANCREATITIS AGUDA OCASIONADA POR FRUTO DE
Karwinskia humboldtiana EN LA RATA WISTAR"

Cuernavaca, Morelos del 29 al 31 de Octubre del 2014


Dra. Claudia Sierra Castillo
Presidenta
Sociedad Mexicana de
Histología A. C.


Dr. Juan Francisco Madrid Cuevas
Presidente
Comité Iberoamericano
de Histología





**XXXVII CONGRESO NACIONAL DE HISTOLOGÍA y
1er CONGRESO IBEROAMERICANO DE HISTOLOGÍA**
"Sinapsis del Conocimiento"
LA SOCIEDAD MEXICANA DE HISTOLOGÍA A. C. ,
EL COMITÉ IBEROAMERICANO DE HISTOLOGÍA Y
EL CUERPO ACADÉMICO "MANEJO BIOTECNOLÓGICO DE RECURSOS
ACUÁTICOS" DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS


OTORGAN LA PRESENTE CONSTANCIA A:


**Díaz Pérez Rosa N., Carcaño Díaz K., García
Juárez J., Montes de Oca Luna R., Saucedo
Cárdenas O. y Soto Domínguez A.**

Por su presentación en Cartel en la temática de Histopatología
Experimental con el trabajo Intitulado:

**"EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DE ESTRIADO EN LA INTOXICACIÓN
CRÓNICA CON *Karwinskia humboldtiana* EN RATA WISTAR"**

Cuernavaca, Morelos del 29 al 31 de Octubre del 2014


Dra. Claudia Sierra Castillo
Presidenta
Sociedad Mexicana de
Histología A. C.


Dr. Juan Francisco Madrid Cuevas
Presidente
Comité Iberoamericano
de Histología




UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
Facultad de Odontología
Subdirección de Educación Continúa

Otorga la presente:

Constancia

A:

**Rosa Nelly Díaz Pérez, Kathya Carcaño Díaz, Jaime García Juárez,
Roberto Montes de Oca Luna, Odila Saucedo Cárdenas, Adolfo Soto Domínguez**

Por la presentación del trabajo: EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DE ESTRIADO EN LA
INTOXICACIÓN CRÓNICA CON *Karwinskia humboldtiana* EN RATA WISTAR

En el **XXII Encuentro Nacional y XIII Congreso Iberoamericano
de Investigación en Odontología** efectuado los días 27, 28 y 29 de noviembre
del presente, en nuestra Institución.


DRA. ROSA ISELA SÁNCHEZ NÁJERA
DIRECTORA DE LA FACULTAD DE
ODONTOLOGÍA DE LA UANL


DR. JORGE ALANÍS TAVIRA
SOCIEDAD NACIONAL DE INVESTIGADORES
EN ODONTOLOGÍA


"Educación de clase mundial,
un compromiso social"

Monterrey, N.L., noviembre de 2014



XVIII CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE HISTOLOGÍA E INGENIERÍA TISULAR
8th INTERNATIONAL CONGRESS OF HISTOLOGY AND TISSUE ENGINEERING
II CONGRESO IBEROAMERICANO DE HISTOLOGÍA

BILBAO 16-18 SEPTIEMBRE 2015

CERTIFICADO DE PRESENTACIÓN DE COMUNICACIONES

SEGOVIANO-RAMÍREZ, J.C.; GARCÍA-JUÁREZ, J.; CARCAÑO-DÍAZ, K.; CÁRDENAS-VEGA, R.;
LÓPEZ-ALTAMIRANO; MEDINA-DE LA GARZA, C.E.

han presentado

CONTROL OF NATURAL AND FORMALDEHYDE INDUCED AUTOFLUORESCENCE BY NaBH₄ IN SKIN BIOPSIES

En formato póster, durante el **XVIII Congreso de la Sociedad Española de Histología e Ingeniería Tisular, VI Internacional Congress of Histology and Tissue Engineering y II Congreso Iberoamericano de Histología**, celebrado en Bilbao del 16 al 18 de Septiembre de 2015

ENRIQUE HILARIO RODRÍGUEZ

ANTONIA ALVAREZ DÍAZ

FRANCISCO JOSÉ SAEZ CRESPO

PRESIDENTES DEL COMITÉ ORGANIZADOR

PRESIDENTE DEL COMITÉ CIENTÍFICO



HISTOLOGY AND HISTOPATHOLOGY

Cellular and Molecular Biology
Volume 30 (Supplement 1), 2015
<http://www.thum.es>



128 HISTOPATOLOGÍA EXPERIMENTAL KARWINSKIA HUMBOLDTIANA INDUCES PANCREATIC ACINAR DESTRUCTION WITH ISLETS OF LANGERHANS PRESERVATION IN A RAT MODEL

(1) Carcaño Díaz, K.; (1) García García, A.; (1,2) Segoviano Ramírez, J.C.; (1) Rodríguez Rocha, H.; (1) Loera Arias, M.J.; (1) Salazar Leal, M.E .; (1,2) García Juárez, J.

(1)Unit of Bioimage, Center for Research and Development in Health Sciences (CIDICS), UANL (Monterrey, Nuevo León, México); (2)Histology Department, Faculty of Medicine, UANL, (Monterrey, Nuevo León, México); (3) Immunology Department, Faculty of Medicine, UANL, (Monterrey, Nuevo León, México).

INTRODUCTION: Accidental ingestion of fruit *Karwinskia humboldtiana* (Kh) induces systemic damage, that causes severe respiratory failure and death. There is evidence of histological lesions in the lung, liver and kidney; in addition to those already described in the nervous system. However, the pancreas has not been studied. Acute inflammatory damage of the pancreas is closely related to systemic inflammatory response syndrome (SIRS), which may then lead to multiple organ dysfunction syndrome (MODS), the most common cause of mortality in acute pancreatitis. The objective of this work is to find histological evidence of damage to the pancreas in an animal model of acute intoxication for the purpose of correlate it with the severity of the poisoning. **METHODS AND MATERIALS:** It was administered an aqueous suspension of dry, ground and sieved fruit Kh, in a single dose of 5 g / kg weight to 15 Wistar rats of 225 ± 25 g, by oral catheter. The rats in the control group (n = 5) received only water. All animals were sacrificed under general anesthesia. Pancreas samples were obtained from three intoxicated and one untreated rats every 24 hours for 5 days. Pancreas samples, were fixed in 4% formaldehyde and processed to paraffin embedding. Sections of 5 micron thick were obtained and then stained with hematoxylin-eosin. It was recorded the weight of animals every 24 hours from the administration of Kh. This work has the approval of the Ethics Committee of the Faculty of Medicine of the UANL (Registration HT14-004). **RESULTS:** The average weight of the control group was maintained between $226,7 \pm 2,9$ and $230,7 \pm 9,0$ g during all treatment. At 48 h the mean weight of control group was $229,7 \pm 10,8$ g, while Kh

105

group was $222,8 \pm 13,5$ g. At 120 h after administration of Kh the mean weight of control group was $230,7 \pm 9,0$ g, and the mean weight of the Kh group was $200,3 \pm 8,1$ g, representing a significative difference of 12,9% .

106

129 CONTROL OF NATURAL AND FORMALDEHYDE INDUCED AUTOFLUORESCENCE BY NaBH₄ IN SKIN BIOPSIES

(1 y 2)Segoviano-Ramírez, J.C., (1 y 2)García-Juárez, J., (2)Carcaño-Díaz, K., (2)Cárdenas-Vega, R., (2)López-Altamirano, D.F., (1 y 3)Medina-de la Garza, C.E.

(1)Unit of Bioimage, Center for Research and Development in Health Sciences (CIDICS), UANL (Monterrey, Nuevo León, México); (2)Histology Department, Faculty of Medicine, UANL, (Monterrey, Nuevo León, México); (3) Immunology Department, Faculty of Medicine, UANL, (Monterrey, Nuevo León, México).

INTRODUCTION. Use of formaldehyde for tissue fixation is a worldwide standard. The ever-growing use of fluochrome-conjugated antibodies for diagnostic immunofluorescence of autoimmune and neoplastic diseases demands high levels of sensibility and specificity, for histopathological analysis will determine not only diagnosis but staging and further therapeutics. In many cases, after morphological analysis of slides stained with H & E, pathologists decide to perform an immunofluorescent stain, with biopsy tissue fixed with formaldehyde and processed by routine protocols. Tissues may show natural fluorescence when stimulated with ultraviolet light or with laser with specific wavelength. Furthermore, aldehyde fixation induce autofluorescence of tissue. To avoid possible "cross-talk" of signals it is necessary to sting both natural and induced auto- fluorescence, without damaging epitopes against which immunostaining is directed. **MATERIAL AND METHODS.** Four micrometers thick histological sections, from human skin biopsies fixed with formaldehyde and processed in paraffin, were obtained. The slides were deparaffinized and then incubated in darkness to test Sodium Borohydride (NaBH₄) at three different concentrations: 0.1%, 0.5% and 1.0% incubated 4 minutes. Slides were incubated in distilled water pH5 as negative control. Another series of slides were processed identically but then were stained with indirect immunofluorescent technique, using Cy3-conjugated antibodies. Slides were mounted with glycerol and analyzed by multiphoton confocal microscopy. Using a Plan-apochromatic 20x/0.8 M27 objective, samples were put into focus and a spectral scanning from 417 to 719 nm, using simultaneously as excitation source three lasers (458 nm, 488 nm and 514 nm) was performed. A 32-channel spectral detector was used to record images. Also we acquired five images in stack from six random fields, to quantify remaining fluorescent intensity and signal from conjugated antibodies. Calibration of lasers and photomultiplier was done with a smear of FITC-conjugated microbeads. ZEN software for spectral analysis of image and quantification of signal from fixative-induced autofluorescence and from Cy3 was used. **RESULTS.** Slides incubated with distilled water showed high levels of induced autofluorescence. This native and induced autofluorescent signal was reduced in 70% with NaBH₄ 0.1%. This signal decreased almost totally (95%) with NaBH₄ 1.0%. **CONCLUSIONS.** 1. NaBH₄ 1.0% reduces almost totally autofluorescence induced by formaldehyde in skin slides. 2. In skin slides, treatment with NaBH₄ does not affect antigenic sites nor interfere with signal from fluorochromes used in immunofluorescent stains.