

126  
2ej.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**EFEECTO DEL TULLIDINOL SOBRE EL DESARROLLO DE  
CELULAS NEURALES DE EMBRION DE POLLO**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**B I O L O G O**

**P R E S E N T A**

**CAROLINA MIRANDA BRITO**

México, D. F.

1987



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE

### I.- INTRODUCCION

- 1.- Descripción y Distribución de Karwinskia humboldtiana.
- 2.- Principios Activos de las Toxinas.
- 3.- Experimentos con partes de la planta.
- 4.- Experimentos con los Principios Activos
- 5.- Estudios en Modelos in vitro.
  1. Cultivo de Tejidos.
    - a) Breve Reseña Histórica.
    - b) Tipos de Cultivo.
  2. Medios de Cultivo.
  3. Suero Utilizado en el Cultivo
  4. Substratos.
- 6.- Generalidades de la Función Cerebral.
  1. Generalidades.
  2. Cuantificación de la Actividad Metabólica.
    - a) Autorradiografía.
    - b) Desoxiglucosa.
- 7.- Objetivos.

### II.- MATERIAL Y METODOS.

- 1.- Cultivo de Células.
  - a) Población Mixta de Neuronas y Glia.
  - b) Población Enriquecida en Células Neuronales.
  - c) Población Enriquecida en Células Gliales.
- 2.- Técnica de Desoxiglucosa
  - a) Técnica de Captación de Desoxiglucosa Tritiada (2-DG\*).
  - b) Cuantificación de la (2-DG\*) Captada por las Células.
  - c) Soluciones Utilizadas

### III.- Resultados.

- 1.- Obtención de Cultivos y Observación Morfológica.
  - a) Población Mixta de Neuronas y Glia.
  - b) Población Enriquecida en Células Neuronales.
  - c) Población Enriquecida en Células Gliales.
- 2.- Aspectos Bioquímicos.
  - a) Población Mixta de Neuronas y Glia.
  - b) Población Enriquecida en Células Neuronales.
  - c) Población Enriquecida en Células Gliales.

### IV.- DISCUSION.

### V.- CONCLUSIONES.

### VI.- BIBLIOGRAFIA.

I.-

## INTRODUCCION

El género *Karwinskia* cuenta con varias especies de interés farmacológico, con particular importancia en la economía agropecuaria, ya que algunas especies, como la *Karwinskia humboldtiana*, son tóxicas y ocasionan constantes mermas en la ganadería (Brefia, 1971). Se tiene referencia histórica de su toxicidad aún antes de ser clasificada por F.X. Clavijero, 1789 (Padrón, 1956), reportó que los indígenas ya conocían que era nociva y evitaban comerla ya que de hacerlo se tullían o podían hasta morir. En el reporte de la Flora Mexicano-Texana, comenta Havard en 1885 (Padrón, 1956) que los frutos de la planta son venenosos, que el principio activo reside en las semillas, mientras que la pulpa es inocua. Los síntomas que se presentan son de parálisis espinal, que afectan promordialmente la locomoción..."

Por otra parte, Rose J. N. en 1899 (1951), dice "... Las hojas de ésta planta, remojadas y comprimidas en agua, proporcionan una infusión fría que se usa en México para curar casos de fiebre."

En la bibliografía reportada consideran a ésta planta venenosa tanto para el hombre como para diversos animales, aún cuando también se le dan diferentes usos medicinales.

## I.- 1.- Descripción y Distribución

El género *Karwinskia* fue incorporado por Zuccarini en 1832 (Brefia, 1971) y el propio investigador instituyó la especie dedicada al Barón de Humboldt, quien la recolectó un año antes en las inmediaciones de Actopan, Hidalgo. Brefia en 1971 reporta "...se encuentra en áreas accesibles al ganado como planta semiarborescente de un metro de altura

y en lugares boscosos alcanza unos 8 metros con tallos de 20 a 30 cm de diámetro. Las hojas son simples, enteras, ovales o elípticas, pecioladas, con ápice redondeado y limbo peninerve que presentan pequeñas manchas glandulares, oscuras y translúcidas en el envés, siguiendo el trayecto de las nervaduras; miden de 6 a 6.5 cm de largo por 4 a 4.5 de anchura; en la inserción de los peciolo hay pequeñas estípulas caducas. Las flores son blancas o blanquecino-verdosas, con el cáliz mejor desarrollado que la corola, formando un perigonio; los pétalos poco conspicuos y atróficos, se hacen ligeramente coriácios al iniciarse el desarrollo del fruto. En los 5 sépalos y 5 pétalos del perianto se notan nuevamente las pequeñas manchas glandulosas oscuras. El ovario es súpero, biloculado y contiene 2 óvulos, con frecuencia uno de ellos es atrófico o abortivo. El estilo es pequeño y el estigma lobulado o trilobulado. Por lo común la floración coincide con los meses de abril y mayo, pero puede haber algunas variantes regionales en las zonas semidesérticas. El fruto, de color rojo oscuro, es una drúpa esférica que mide 1.5 cm de diámetro, de endocarpio delgado, mesocarpio pulposo de sabor dulce y endocarpio formando un "huecesillo" que encierra dos semillas..." (fig. 1).

Se encuentra en las zonas áridas, desde Baja California hasta Tamaulipas, en Veracruz y Michoacán; se le dan diferentes nombres: en Tamaulipas, coyotillo; en Coahuila, tullidora; en Nuevo León, Querétaro y Oaxaca, capulincillo cimarrón; en Nayarit, Jalisco, Colima, Sinaloa y Durango, capulin, margarita, palo negro, cacachila china, cacachila silvestre. También se encuentra al Suroeste de Texas, Nuevo México, USA. (Sperry, 1955).

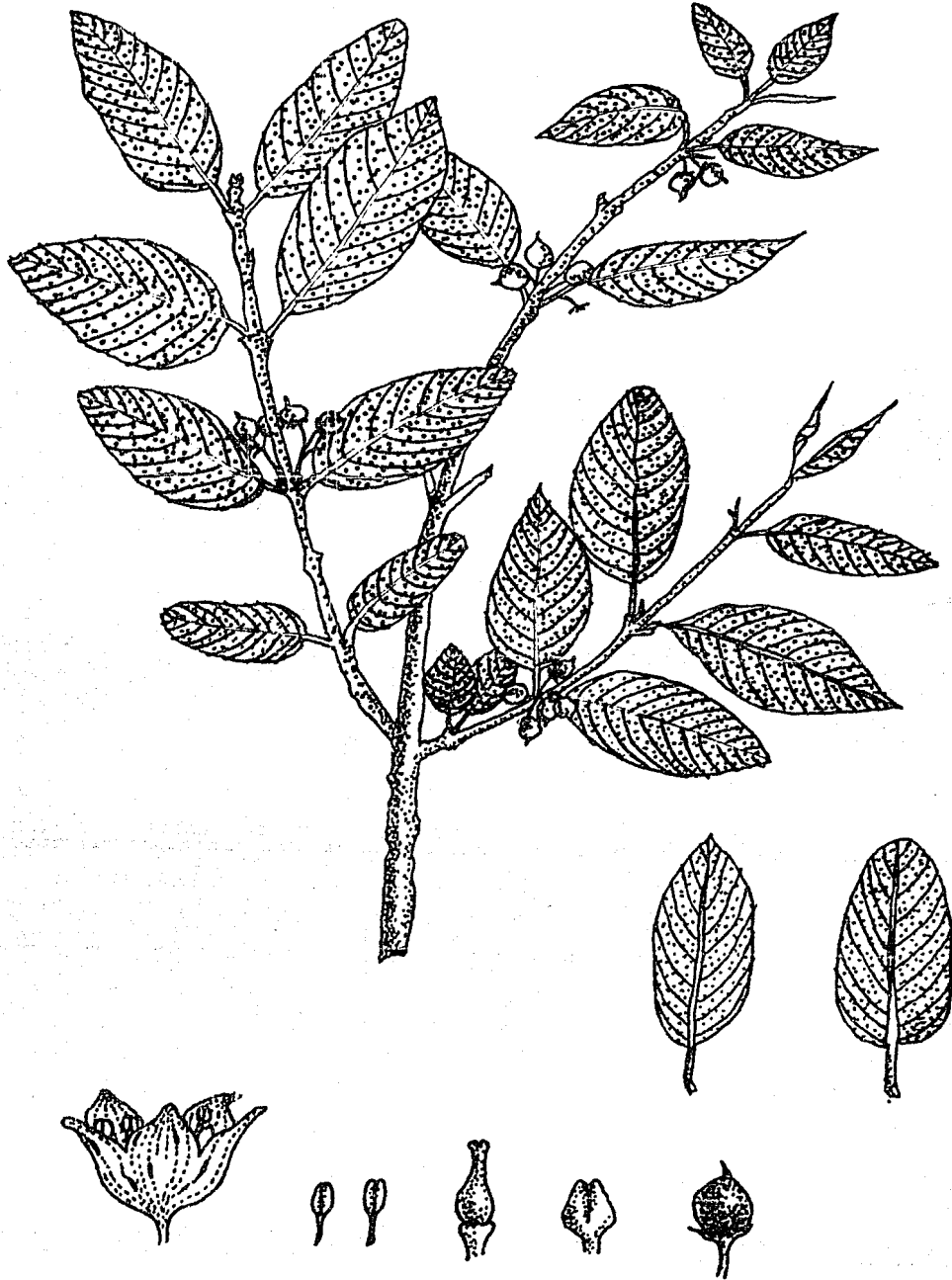


Fig. I. Karwinskia humboldtiana Zucc. (Rhamnaceae), Breña 1971.

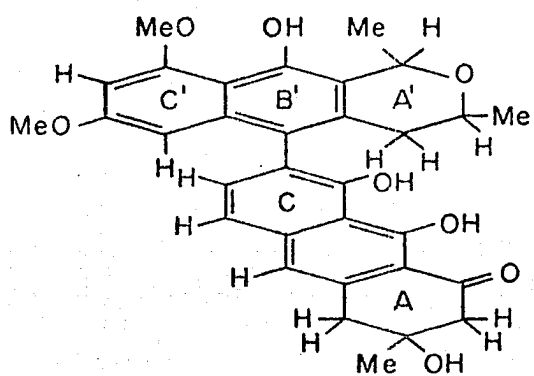
## I.-2.- Principios Activos de las Toxinas

De las semillas de Karwinskia humboldtiana, se obtuvo un extracto amorfo, que contiene la toxina. Con cloroformo se fraccionó por cromatografía en gel de sílice. Después de varios pasos, se obtuvo por recromatografías, de las fracciones iniciales, la composición elemental de cuatro componentes importantes, que contienen el principio activo de la toxina (Dreyer. et. al., 1975).

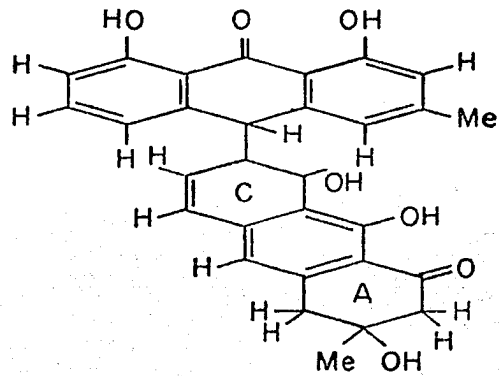
Arai I. et.al (1978), continúan el estudio sobre el aislamiento y dilucidación de diferentes compuestos polifenólicos de K. humboldtiana Zucc. (Rhamnaceae) que también incluye 4 dímeros de  $C_{18}$  que habían sido aislados desde la raíz por Dominguez y col. (1976). Y al igual que Weller et. al. (1980) reportan que la toxina es un dímero polifenólico que se presenta como una mezcla de 2 isómeros conformacionales del tipo bifenil, reportando la formación de 2 productos de oxidación (ver fig. II) y que es el principal componente del extracto neurotóxico, que es el mismo reportado por Colín, (1981).

Dreyer y col. (1975) encontraron también 4 principales compuestos en concentraciones similares y juntos son aproximadamente el 2% de la semilla de la fruta secada al aire. Los compuestos obtenidos del fruto se denominaron con el nombre de T-544, T-516, T-496 y T-514. Estos dos últimos no aparecen en la raíz, en las hojas se presentan tres de los compuestos neurotóxicos (Dominguez, 1976).

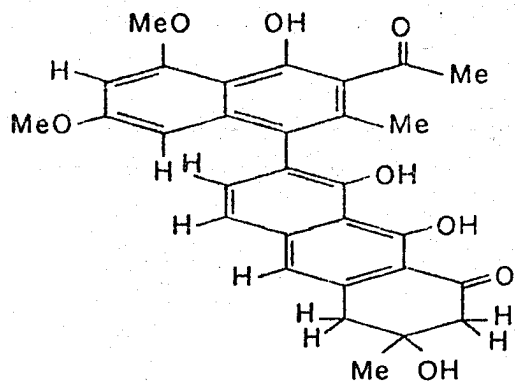
La toxina es estable en forma sólida; pero en solución se descompone fácilmente, dando como resultado productos anhidro y oxidado. Bajo condiciones básicas ocurren ambos efectos rápidamente y las toxinas son particularmente inestables. En condiciones neutras ó ligeramente básicas



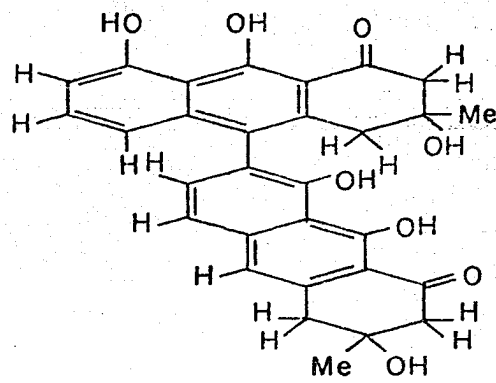
T-544



T-496



T-516



T-514

Fig. II

CUATRO DE LAS NEUROTOXINAS DE *Karwinskia humboldtiana* ENCONTRADAS EN EL FRUTO. (Weller, R. O. et al 1980)



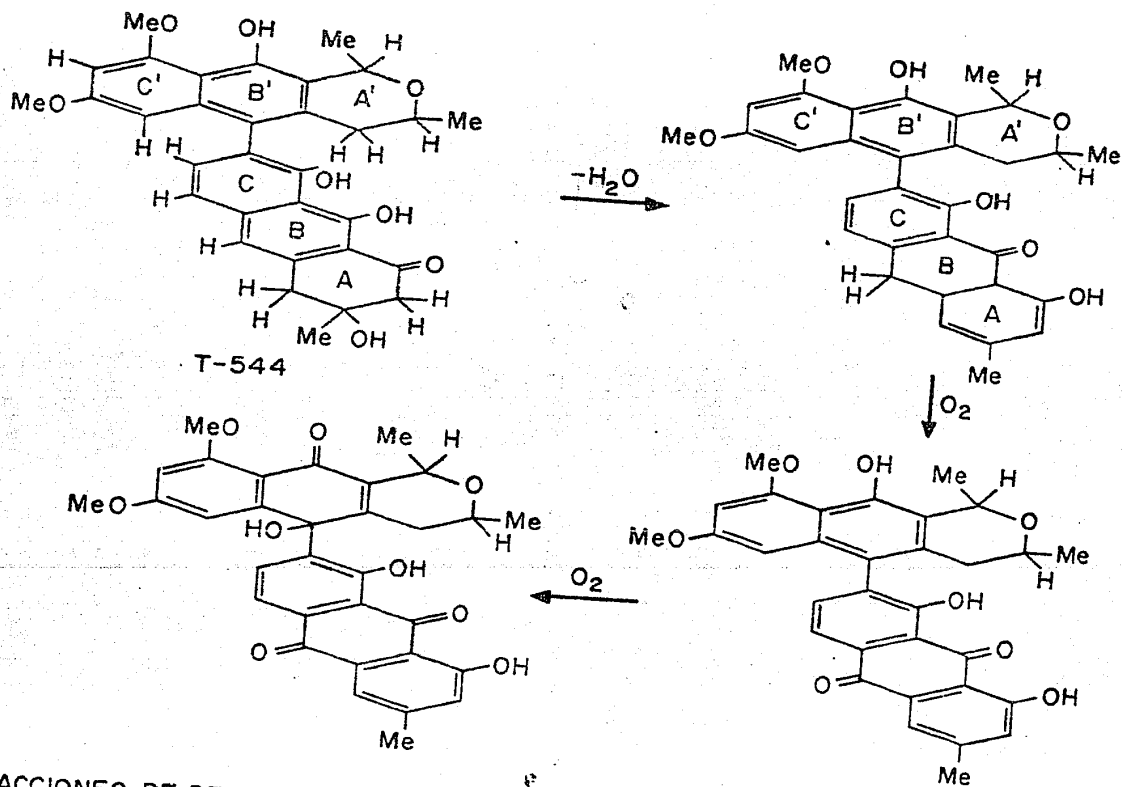


Fig. III. REACCIONES DE DESHIDRATACION Y OXIDACION DE LAS NEUROXINAS DE *Karwinskia humboldtiana*; SE ILUSTR A PARA T-544 (Weller, R. O. 1980).

se llevan a cabo los cambios ilustrados en la fig. III (Weller, 1980).

Hay extractos de la E. humboldtiana que no presentan neurotoxicidad. Y se supone que la toxicidad ésta asociada, de alguna manera, con la configuración geométrica más compleja del gran sistema del biantraceno (Weller et al, 1980).

### I.- 3.- Experimentos con Partes de la Planta

La mayoría de los reportes clínicos, patológicos y experimentales que se han realizado, se concentran en el Sistema Nervioso Periférico (SNP) y Sistema Nervioso Central (SNC) (Weller 1980).

Sin embargo se han reportado también necrosis del músculo esquelético y cardíaco que se describen en cabras que habían ingerido semillas trituradas, incluyendo el endocarpio. Las cabras fueron sacrificadas cuando desarrollaron signos neurológicos de ataxia e incoordinación, histológicamente se encuentra necrosis en el hígado, inflamación de las membranas mucosas del estómago, además de la necrosis por un lado y degeneración de fibras musculares esqueléticas y cardíacas. Weller en 1980 reporta daños a los nervios Periféricos en pacientes que habían muerto. Se ha estimado que en México hay más de una docena de casos de intoxicación al año, principalmente en niños, y centenares de cabezas de ganado (Dominguez, 1976). Un caso dramático de intoxicación colectiva en humanos es descrito por Castillo y Nájera, 1918.

En 1965 aparece una publicación del Dr. E. del Pozo, donde hace mención a diferentes trabajos realizados y comenta: que ninguno de los estudios anteriores ha logrado precisar el mecanismo de acciones de la toxina, y que esto es debido a la falta de continuidad de los trabajos, a las diferentes metodologías empleadas, que la variabilidad de las

dosis ingeridas y formas de administrarlas así como la forma de evaluar los daños. Padrón y Velázquez en 1956, señalan como efecto primordial las alteraciones medulares, pero aparentemente no revisaron los nervios periféricos. Padrón no observó fiebre, ni síntomas sensoriales en los niños que estudió; en cambio Castillo Nájera menciona fiebre, calambres, cefalea y diarrea en muchos de sus casos. Y el Dr. Gallardo, encontró fiebre, pero no dolores (Padrón, 1956).

Padrón y Velázquez ( 1956 ), reportan que una sola dosis es suficiente para producir daño y realizan una descripción comparativa entre la Poliomiелitis y la Parálisis Flácida producida por la intoxicación con la K. humboldtiana, describiéndola como una nueva entidad nosológica.

La severidad de la intoxicación es proporcional a la cantidad ingerida de la toxina, ya que algunos organismos mueren sin siquiera llegar a presentar antes los signos de los daños neurológicos, mientras que otros sobreviven. No se pierden las sensaciones de dolor y tacto, los reflejos tendinosos se ven reducidos. La recuperación ocurre de 3 a 12 meses, en el sentido inverso de como se fueron presentando los síntomas. No se ha dilucidado un tratamiento para la intoxicación, (Dreyer, 1975).

En 1960 A. S. Berain, concluyó que la intoxicación reside en las semillas de la planta, y que afecta el sistema nervioso de una manera selectiva, sobre todo a los nervios motores, causando la muerte en las cabras en experimentación, al sobrepasar una dosis del 0.2% de su peso.

Por estudios experimentales se ha visto que son afectados por la toxina: serpientes, ranas, cerdos, cabras, borregos, reses, pollos,

conejillo de indias, caballos, gatos, ratas, conejos, monos y el hombre, según datos registrados R. O. Weller, et. al. , 1980.

Cuando se intoxicaba a los animales con el fruto se pudo ver que el SNP se encontraba con desmielinización segmentaria, hinchamiento y degeneración del axón, en el momento de presentar parálisis de los miembros posteriores en ratas y gatos (Izquierdo, 1965, y Weller, 1980). Los cambios se encontraron irregularmente distribuidos, pero afectan tanto a la zona proximal como distal de los nervios; el daño fue más severo en animales con mayor grado de parálisis. La cromatolisis fue más marcada en las neuronas de las astas anteriores de la cuerda espinal, que en las células de la raíz dorsal (Weller, 1980).

Charlton y Pierce (1970) realizaron experimentos en función del tiempo, con la administración oral en cabras con el endocarpio y evaluaron el daño con Microscopía de Luz; encontraron que a los 13 días los animales estaban debilitados y presentaban gran cantidad de Células de Schwann hinchadas y rotas las láminas de mielina en las líneas de interperíodo, con formación de vacuólas de mielina, y una desmielinización segmentaria. Posteriormente la desmielinización fue ampliándose y haciéndose mayor que la degeneración axonal. Se observó que las fibras motoras de mayor diámetro y longitud se veían más afectadas que las fibras de menor diámetro y más cortas (Hernández-Cruz, 1984). Se demostró también que las porciones distales eran más afectadas que las porciones proximales. La remielinización y regeneración axonal fue observada en 1 animal a los 3 meses de haber sido intoxicado.

Sobre el S.N. Central, los cambios fueron menos prominentes, que en los nervios periféricos. La cromatolisis fue observada en las células de las astas anteriores en ratas, gatos y cabras (Weller 1980); había

hinchazón en los axones de la materia blanca del cerebelo en chivos que ya presentaban signos clínicos de daño cerebelar ( Charlton y Pierce, 1970).

#### 1.-4.- Experimentación con los Principios Activos

La siguiente etapa de estudio de la toxina se llevó acabo con la administración de los principios activos de la toxina; se encontró que una dosis acumulativa de 260 mg produce cuadriplejia seguida por la muerte de los monos capuchinos de 1.43 Kg de peso ( Kim y Camp, 1972)

Dreyer (1975) reporta que al aplicar la toxina a través de una inyección intraperitoneal en ratones, en una sola dosis. El primer síntoma es la incapacidad de mantenerse en una postura horizontal sobre una barra de 4 mm. Todos los ratones tuvieron extensión de las patas posteriores, de 12 a 18 horas antes de morir, presentaron una casi total carencia de respuesta a la luz. Todos murieron entre el 1 ° y el 7 ° día después de la inyección .

Weller, et.al 1978 aplicó intraneuralmente fracciones de la toxina disuelta en aceite de sésamo, en el nervio ciático de la rata. Probó que las fracción T-496 y T-544, producen parálisis en la extremidad inferior donde se aplicaron entre los 5 y 7 días, agudizandose al máximo entre los 10 y 20 días. Los animales que sobrevivieron presentaron a los 25 días signos de recuperación.

La desmielinización de los nervios periféricos fue provocada en gatos con administración oral de una dosis única de extractos etéreos de la toxina, Tullidinol (J.E. Muñoz-Martínez et.al. 1983). Se demostró en este trabajo que los nervios cutáneos no se afectan; los axones sufren desmielinización y alteraciones estructurales, como aumento en el número de neurofilamentos. Estos daños son mayores en la porción

distal que en la proximal y se sugiere que la toxina se absorbe preferentemente por la zona de las terminales nerviosas. Estos datos apoyan a los que se reportan con la administración del endocarpio. Además concluye que las proteínas de la mielina se redujeron en un 50 % en los nervios motores y menos del 25 % en axones cutáneos de gatos tratados con tullidinol, que presentaron afecciones motoras severas (K. Aoki y E. J. Muñoz-Martínez, 1981).

Por otro lado Heath y col. (1982) con estudios en microscopía electrónica, encuentra marcados cambios estructurales que son consistentes con la enfermedad, plantea que el daño es sobre el axón, se da una ampliación del espacio periaxonal y redistribución de los elementos del citoesqueleto en el axoplasma. La redistribución de constituyentes axoplásmicos puede reflejar el déficit axoplásmico (Hernández-Cruz, 1984). Muñoz-Martínez et.al. (1983) propone que la parálisis producida por la toxina de la tullidora es el resultado tanto del bloqueo del impulso nervioso como de la desnervación muscular. Se postula por éstos autores que la toxina causaría una neuropatía distal o retrodistal, debido a alteraciones en la síntesis y/o en el transporte axonal rápido de proteínas (Hernández-Cruz, et. al., 1984).

Se ha reportado que la toxina de la Tullidora desacopla la respiración mitocondrial in vitro (Wheeller and Camp, 1971); además Edostrom and Hanson, 1973, sugieren que actúa como los agentes desacoplantes del tipo del dinitrofenol que bloquean el transporte axonal.

En su trabajo Muñoz-Martínez (1984), opina que los efectos de la Tullidora sobre el transporte axonal podrían estar relacionados con una respiración mitocondrial desacoplada y una glicólisis disminuida.

## I.- 5.- Estudios en Modelos in vitro.

El uso de embriones de pollo para la investigación se ha popularizado desde hace mucho tiempo; Fisher los utilizó haciendo explantes sobre coágulos, en la primera mitad de éste siglo; Dulbecco al investigar sobre virus, utilizó células dispersas de embrión de pollo en 1952. La obtención y manejo de los embriones es muy conveniente por que no es necesario sacrificar a la madre y se puede disponer del número de embriones que se necesite, ésto ha hecho que como modelo de trabajo en investigación sea exitoso.

Como ya se mencionó las aves de corral también se ven afectadas por la toxina Tullidinol. Se hizo referencia anteriormente a los trabajos que se han realizado con animales in vivo, y dados los resultados obtenidos se hizo obvia la necesidad de una metodología que permitiera estudiar en forma directa el efecto de la toxina en un medio controlado y utilizando poblaciones celulares enriquecidas.

### I.-5.-1. Cultivo de Tejidos.

#### a) Breve Reseña Histórica de Células Nerviosas

Basado en un trabajo de C. Waymouth (1977), que contiene citas difíciles de obtener. Así en el año de 1953 aparece " The Bibliography of Tissue Culture, 1884-1950 " por Murray and Kopech, pero muestra poca atención en los aspectos de nutrición de las células nerviosas ( Waymouth, 1977 ) Se encuentran reportes del desarrollo de una fibra nerviosa in vitro por Ross y Harrison en 1906-1907. Estos autores usaron células embrionarias de pollo tomando como substratos físico un coágulo formado de plasma de pollo y extracto embrionario que al mismo tiempo sería una fuente de nutrientes y estimulador del crecimiento,

por Carrel y Burrows.

La composición del Plasma Sanguíneo fue el punto de referencia para la formulación de la base de las soluciones y componentes del medio de cultivo. Así Ringer, Lockey y Tyrode, diseñaron soluciones salinas fisiológicas, que funcionan para un intervalo corto de sobrevivencia y funcionamiento de los órganos. En 1911 se usaron medios más complejos al agregar plasma, suero y extracto embrionario.

Hasta 1920 con los estudios realizados in vivo se inició el aislamiento e identificación de los diversos compuestos que tienen importancia en el metabolismo celular, pudiéndose incorporar éstos hallazgos a los primeros medios de cultivo, que se preparaban libres de suero (Vogelaar y Erlichman, 1933), se incluyó la Tiroxina, Insulina y vitamina B.

Entre 1930 y 1940 se diseñaron para cultivo las Soluciones Salinas Balanceadas, por Earle en 1943 y Hanks y Wallace, en 1949. Muchos de los medios definidos que se usan actualmente son mezclas de sales basadas en estas soluciones salinas patrón. En 1943 Stanford y col. realizaron los primeros intentos exitosos al usar medios definidos para cultivo con éxito.

Los medios utilizados para el cultivo de neuronas, con pocas excepciones, se diseñaron para otro uso. Chary Waymouth (1977), incluye en su trabajo una tabla con los medios definidos más comunmente usados.

El interés en el estudio de los medios de cultivo específicos se orientó hacia la búsqueda de medios más definidos que posibilitaran el crecimiento y diferenciación de diversos tipos celulares. La composición de los medios de cultivo definidos, es particular para cada especie biológica, así como para cada tipo de célula, debiendo satisfacer las neces-



sidades celulares para alcanzar un correcto desarrollo y diferenciación, (Waymouth, 1967). La información acerca de los medios de cultivo se amplía en el siguiente inciso.

#### I.- 5.- 1. b) Tipos de Cultivo.

Se han desarrollado diferentes sistemas de cultivo; La clasificación más general es (McMillians, 1979.):

- a) Cultivos que se desarrollan adheridos a un sustrato.
- b) Cultivos que se desarrollan en suspensión.

Cualquiera que sea el método que se elija afectará significativamente la morfología y requerimientos nutricionales en el desarrollo de las células.

En el caso a) son células que para sobrevivir, desarrollarse y diferenciarse necesitan adherirse a un sustrato. Los recipientes pueden ser de vidrio, plástico, ya sea en cajas de Petri, y/o en botellas giratorias que poseen una mayor área; en este sistema se proporciona un baño intermitente de medio nutritivo (McMillians, 1979).

En b) las células no se adhieren al sustrato, manteniéndose en continua agitación, lo que permite usar recipientes de diversos tamaños, hasta de escala industrial. Se tiene la ventaja de que al manejarlas para resembrar no es necesario utilizar enzimas, que como sabemos afectan a las membranas celulares.

Los cultivos pueden realizarse con diferentes niveles de organización (Reid L.D. 1979):

Cultivo de Organos ; ( sobre todo de órganos embrionarios intactos), con el objeto de mantener la arquitectura del tejido y tratar de obtener un desarrollo lo más similar posible a los experimentos in vivo, el

manejo de este tipo de cultivo es complejo.

Cultivo de Tejidos ; con objetivos similares al anterior, se obtienen pequeños fragmentos, de un tamaño tal que permitan una apropiada difusión de gases y nutrientes.

Cultivo de Células; Del tejido intacto se hace una suspensión celular a través de diferentes técnicas de disociación:

- 1) Mecánica ; por corte, agitación, pasaje continuo por pipetas de diámetro cada vez menor etc.
- 2) Química ; a.- por omisión de cationes divalentes, o por la presencia de agentes quelantes.  
b.- Enzimática con el uso de enzimas, tales como la tripsina, colagenasa, etc.

Casi todas las técnicas para obtener una suspensión celular, mezclan la técnica mecánica con por lo menos una o las dos técnicas químicas. Esta técnica es para obtener cultivos primarios. Pero ya se dispone de Líneas Celulares en compañías como American Type Culture Collection, Institute for Medical Research. Son células bien caracterizadas, en general de origen tumoral por ejemplo: " C1300 neuroblastoma", que se originó de neuronas de roedores.

#### I.- 5.- 2. Medios de Cultivo.

El éxito en el cultivo de células depende de múltiples factores que afectan la forma, proliferación y diferenciación celular, entre estos pueden mencionarse; factores fisico-químicos, y bioquímicos por ejem. nutrientes, hormonas, las proteínas que se unen y modulan la acción de nutrientes y las proteínas extracelulares que enlazan a las células al

substrato donde se desarrollan (Hay, 1981., Barnes y Sato, 1980).

A través de los diferentes medios de cultivo que se han diseñado, se trata de proporcionar a las células un ambiente similar a su medio natural, para evitar en lo posible cambios o traumatismos violentos. Siendo además los requerimientos particulares para cada tipo de célula, cuando no han sido bien caracterizados, se hace necesario utilizar mezclas de proteínas de sueros para complementar los medios, y obtener así resultados satisfactorios.

El típico medio de cultivo contiene: una mezcla definida de nutrientes de bajo peso molecular, disuelta en una solución amortiguadora salina fisiológica. Este medio debe proporcionar todos los nutrientes esenciales, incluyendo todos los materiales crudos necesarios para la síntesis de nuevas células, substratos para el metabolismo energético, vitaminas, trazas minerales, las cuales sirven principalmente como catalizadores, la concentración adecuada de iones inorgánicos, los cuales tienen una función tanto catalítica como fisiológica, además de ser precursores de diversos compuestos.

El término nutriente es generalmente restringido a sustancias que entran en las células y son utilizadas; ya sea como substrato para biosíntesis o catalizadores que entran en los diferentes procesos del metabolismo. La mayoría de los medios contienen además de éstos nutrientes diversos compuestos que no lo son, como lo es el Rojo de Fenol que es un indicador de pH y amortiguadores por ejem. el (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) HEPES.

El pH adecuado para crecimiento óptimo es estrecho (7.15 - 7.45), para obtenerlo se trabaja con un sistema de bicarbonato-ácido carbónico que es equilibrado con los niveles de  $CO_2$ , estos son mantenidos con in-

cubadoras especiales que inyectan  $CO_2$ . La mayoría de los medios son diseñados para usar  $CO_2$  al 5% , el cual es un valor cercano al de los fluidos corporales. Es importante mantener una humedad cercana a la saturación, para evitar la evaporación, manteniendo la osmolaridad constante (Ham et. al. 1979).

### I.- 5.- 3. Suero Utilizado en el Cultivo.

El Suero Total que se agrega muy frecuentemente al Medio químicamente definido, contiene la mayoría de nutrientes de bajo peso molecular, que necesita la célula para desarrollarse, reproducirse y mantenerse por mucho tiempo. El suero dializado puede reducir el efecto inhibitorio de contaminantes, del tipo de nutrientes esenciales cuando se encuentran en exceso, también neutraliza el efecto de la tripsina y algunas otras proteasas, que son utilizadas al obtener las células.

En el Suero existen sustancias que interactúan con las células y el sustrato. Además de proveer de factores de crecimiento macromoleculares, que son esenciales para la multiplicación de muchos tipos de células (Ham y col. 1979).

### I.- 5.- 4. Substratos.

El explorar in vitro las complicadas relaciones entre el sustrato-célula, fue posible hasta poco tiempo. Ahora sabemos que;

1) El suero que complementa el medio cultivo tiene factores (proteínas), que interactúan con la célula y el sustrato, para facilitar la adhesión celular. 2) Las células en cultivo sintetizan y depositan sobre el sustrato componentes de la matriz extracelular. 3) La pérdida de algunas interrelaciones entre células y sustrato, son afectadas por la inter-

acción de las células con entidades moleculares discretas presentes en el medio de cultivo (Barnes, 1984).

La adhesión a un sustrato es un paso crítico que permite la sobrevivencia in vitro de algunas células. Para lo cual es importante la carga eléctrica neta de la superficie en donde se va a cultivar, así como la humectancia para la adsorción de proteínas, que promueve una reorganización general del citoesqueleto, producción de filopodios con los que se adhiere la célula para producir el aplanamiento progresivo.

El Sustrato debe ser, idealmente, una superficie no tóxica, biológicamente inerte, transparente ópticamente, perfectamente homogénea y lisa. Debe permitir que las células se adhieran y al mismo tiempo se puedan mover, y así poder migrar y/o replicarse durante su desarrollo.

Se han usado como sustrato diferentes materiales: tales como el vidrio, diversos plásticos, célofan, silicon, filtros de ésteres de celulosa policarbonados (Millipore), etc. En el caso del vidrio se utiliza el de boro-silicato y los recipientes de plástico son de poliestireno. El vidrio posee una superficie de carga negativa; en las cajas de plástico común hay un des plazamiento selectivo de protones que genera también una carga neta negativa en la superficie. El plástico especial para cultivo de células en monocapa es manufacturado con un tratamiento que vuelve hidrofílica la superficie, lo cual permite aumentar la adhesión celular, éste plástico es llamado "Calidad Cultivo de Tejido" a diferencia de las cajas de plástico "Grado Bacteriológico" por que éstas no facilitan el cultivo de células.

Además si las cajas calidad cultivo de tejido, son tratadas con un policación (ejem. poli-l-lisina, poli-l-ornitina.) se produce mayor adhesión y al mismo tiempo se favorece diferencialmente el crecimiento

de determinados tipos celulares (Ham, et.al., 1979).

Las neuronas simpáticas se adhieren a superficies tratadas con por-  
liornitina en cultivos a corto plazo (menos de 14 días) (Sensembrener  
1978) encuentra que el crecimiento de las neuronas embrionarias del SNC  
es mejor cuando se utiliza este tratamiento. Si las cajas calidad  
cultivo de tejido son tratadas con una capa de Colágeno, se favorece el  
desarrollo de células no-neuronales.

El colágeno es la proteína más abundante el estroma o membrana  
basal por lo que es un obvio candidato para actuar como substrato. Se  
han clasificado 4 ó 5 tipos diferentes de colágeno (Barnes, 1984).  
Virtualmente todas las preparaciones de colágeno usadas en cultivo de  
células, son de tipo intersticial, aisladas de piel, tendón o músculo.  
El colágeno media la adhesión del cultivo de dos formas: Mecanismo  
directo, que involucra una adhesión no covalente de la membrana celular  
a la matriz de colágeno extracelular. Mecanismo Indirecto: que implica  
la adhesión de las células a través de la interacción con proteínas de  
adhesión semejantes a la fibronectina, laminina y condronectina, que son  
enlazadas en forma no-covalente a la matriz de colágeno, éstos factores  
de adhesión al colágeno presentan sitios específicos.

#### **I.- 6.- Generalidades de la Función Cerebral.**

La interrelación entre el metabolismo energético y el flujo san-  
guíneo fue postulada por primera vez en 1914 por Joseph Barcroft, según  
Lassen, 1981 basa en el hecho de que el flujo sanguíneo a través de los  
tejidos del cuerpo varía con la intensidad del metabolismo y el grado  
actividad funcional de los mismos; así se señaló que sólo puede mante-

tenerse en un tejido un nivel funcional más elevado a expensas de un aumento en la intensidad de consumo de oxígeno. La mayor parte de energía utilizable por el organismo proviene del desdoblamiento de la molécula de ATP,  $ADP+P_i$ . El ATP se reconstituye mediante una reacción que requiere Oxígeno y Glucosa (Fosforilación Oxidativa). Se mantiene una proporción constante entre el número de moléculas de ATP regenerados y el número de moléculas de Oxígeno utilizadas en el proceso: la intensidad del funcionamiento de un tejido está estrechamente asociada a su consumo de oxígeno.

En el Cerebro, la interrelación entre la actividad funcional, metabolismo y flujo sanguíneo, se sugirió por primera vez en 1890 por Ray y Sherrington (según Lassen, 1981) quienes trabajando en el laboratorio de Patología de Cambridge, observaron que segundos después de un ataque de Epilepsia se producía una turgencia del cerebro; ello sugería que se daba una elevación masiva en el suministro de sangre. Investigaciones posteriores han revelado que el metabolismo cerebral aumenta también durante la activación normal de las regiones de la corteza cerebral que intervienen en el desarrollo de las funciones específicas. Esto nos habla de un cambio a nivel de las células nerviosas (Lassen, 1981)) y, consecuentemente, de la actividad metabólica, que a su vez da lugar a un incremento del flujo sanguíneo en la región activada. Este descubrimiento ha permitido la localización de funciones cerebrales por medio del estudio de las variaciones regionales del flujo circulatorio. Puede obtenerse la misma información estudiando la distribución de los cambios metabólicos midiendo el consumo de oxígeno o de glucosa. (Lassen, et. al. 1981).

Las Neuronas poseen la maquinaria bioquímica común a todas las cé-

lulas vivas, son capaces de producir energía química mediante oxidación de nutrientes y pueden autorrepararse y mantenerse. Dado que las neuronas de cerebros adultos no son reemplazadas deben durar toda la vida del organismo, por lo que han de existir mecanismos de renovación de todos sus componentes, la síntesis de éstos se realiza en el soma, de donde deben transportarse a grandes distancias. Este mecanismo fue descubierto hace más de 30 años por Paul A. Weiss y colaboradores, este transporte es bidireccional, habiendo dos tipos de transporte, el Lento y el Rápido.

En contraposición a los demás órganos que son capaces de utilizar alternativamente diferentes combustibles, como pueden ser azúcares, grasas y aminoácidos, las neuronas solo pueden servirse de la glucosa sanguínea, el cerebro depende enteramente del metabolismo oxidativo. Si se interrumpe el suministro de sangre oxigenada al cerebro, se pierde el el conocimiento en 10 seg, produciéndose en unos pocos minutos una lesión permanente en el cerebro.

Las neuronas absorben glucosa a una velocidad que se ajusta en cada momento a sus necesidades metabólicas.

Otras características de especialización que presentan las neuronas se refieren a la transmisión de impulsos nerviosos manutención de gradientes iónicos, síntesis y liberación de neurotransmisores, formación de sinápsis que pueden ser inhibitoras y/o excitadoras, ya que son más de 30 compuestos diferentes a los que se le conoce una función transmisora, con efectos de alta especificidad.

## I.- 6.- 2. Cuantificación de la Actividad Metabólica



#### a) Autorradiografía

Los avances en la comprensión de la fisiología y el mejoramiento de las herramientas químicas permitió el desarrollo de la Autorradiografía de Transporte. Para realizar ésta técnica se inyecta un producto químico radiactivo en una estructura cerebral; las células lo toman transportándolo a lo largo de sus axones; Se coloca luego una emulsión fotográfica en contacto con el tejido y se examinan al microscopio los granos de plata de la emulsión, que revela el destino de el isótopo en la célula.

#### b) Desoxiglucosa

Un avance importante es la técnica de Desoxiglucosa, inventada por Louis Sokoloff, (1977). Se basa en que la glucosa es el combustible de las neuronas, y éstas consumen más combustible cuando están más activas que cuando se hallan en reposo. Las células absorben desoxiglucosa marcada radiactivamente como si se tratara de Glucosa. La metabolizan hasta desoxiglucosa-6-fosfato, pero a partir de este punto no puede seguir siendo metabolizada. Puesto que tampoco se le permite salir de la célula, se acumula allí; la cantidad del isótopo atrapado informa sobre el sitio de acumulación y la intensidad de actividad que han mostrado las células.

Cuando se inyecta en el torrente sanguíneo, éste isótopo se acumula dentro de las neuronas y la velocidad a la cual se produce dicha acumulación es un índice de la actividad metabólica de las células. Esta se puede observar y medir realizando cortes finos de cerebro congelado y colocándolos sobre una película sensible a las radiaciones. Al revelar la película, las áreas ricas en material radiactivo aparecen oscuras.

Esto apoya y abre nuevos campos en la investigación del funcionamiento del cerebro ya que permite detectar cuales son las células del cerebro que estan mas activas durante un determinado proceso experimental (Iversen, 1981) o en la patología. Esta técnica es muy útil, por lo que se usa muy profusamente ( Sokoloff,et. al, 1977; R. A. Hawkins y A. L. Miller, 1978; M. Saji y K. Obata, 1981; R. Sutherland, M. J. Martin, J. K. McQueen y G. Fink, 1983; entre otros trabajos.

Otros autores trabajaron con la desoxiglucosa como indicador de la actividad de ciertas áreas cerebrales, tomando la zona afectada y cuantificando con un contador de liquido de centelleo, la desoxiglucosa captada (D. H. R. Blackwood, V. Kapoor y M. J. Martin, 1981; S. D. Skaper y S. Varon, 1979 ).

En el trabajo que presentamos a continuación, se usó la captación de desoxiglucosa tritiada para evaluar el estado metabólico de células neurales en cultivo, tratadas con la toxina de la "Tullidora".

El presente estudio se realizó con poblaciones enriquecidas de células, neuronales y gliales

## I.- 7.- OBJETIVOS:

- Desarrollar un modelo "in vitro" de cultivo de células neurales en el cual pudiera evaluarse el efecto de la toxina de la Karwinskia humboldtiana
- Estudiar en este modelo el efecto del tullidinol sobre el crecimiento de células neurales embrionarias del sistema nervioso central.
- Conocer el efecto del tullidinol sobre el metabolismo celular, a través del estudio de la captación de Desoxiglucosa tritiada (2-DG\*).
- Diferenciar el efecto del tullidinol sobre poblaciones celulares enriquecidas en neuronas, y aquellas donde predominan las células gliales.

## II.-

## MATERIAL Y METODO

Para evaluar el efecto de la toxina "Tullidinol" sobre el desarrollo de las células neurales se implementó un modelo "in vitro" que consistió en una modificación de la técnica descrita por M. Sensenbrenner, et.al. 1971. Consiste en obtener Cultivos Primarios de telencefalo de embrión de pollo de 8 días de incubación (línea Rodhe Island).

Se estudiaron los siguientes grupos:

- a) Población Mixta de Células Neuronales y Gliales.
- b) Población Enriquecida de Células Neuronales.
- c) Población Enriquecida de Células Gliales.

El efecto del Tullidinol se evaluó de la siguiente manera:

- i) Observación de la Morfología en Microscopía de Luz con la técnica de Contraste de Fases ( 16x y 40x ).
- ii) Cuantificación de la Desoxiglucosa tritiada captada por las diferentes poblaciones celulares.
- iii) Cuantificación de las Proteínas Totales, por el método de Lowry.

Las concentraciones de la toxina utilizadas fueron: 1, 10 y 20 $\mu$ M/ml. Se elaboró una Curva Temporal de captación de la Desoxiglucosa. Con base en esta se eligió 8 min como el tiempo adecuado de captación, utilizándose éste para los experimentos subsiguientes.

En el caso de las poblaciones enriquecidas en neuronas y en la de población mixta, se agregó la toxina a las 24 horas de cultivo, evaluándose el efecto de ésta un día después, en el caso de las poblaciones mixtas también se estudió el efecto de la toxina a las 48 horas de tratamiento. En cuanto a las poblaciones enriquecidas en células gliales

se aplicó el tullidinol a los 14 días de cultivo, durante 24 horas cuantificándose el efecto.

## II.- 1.- Cultivo de Células

### Obtención de la Suspensión Celular :

Se usaron telencéfalos de embrión de pollo Rodhe Island de 8 días de edad. Se obtuvieron los embriones en condiciones de esterilidad y se depositaron en una solución salina balanceada libre de  $Ca^{++}$  y  $Mg^{++}$ . Se disecaron los telencéfalos lavándolos repetidamente con la solución salina balanceada a la cual ya nos referimos anteriormente, la que afloja la unión de las células permitiendo que el tejido se disgregue fácilmente. Los telencéfalos se colocaron en Medio de Cultivo Completo, en proporción de 4 telencéfalos por 1 ml. Se disgregaron mecánicamente mediante repetidos pasajes a través de una pipeta Pasteur. Una vez lograda una suspensión de células, en forma de esferas aisladas, se tomaron alícuotas que se sembraron en las cajas de Petri previamente preparadas, como se indica más adelante en el texto.

#### a) Cultivo de Población Mixta de Neuronas y Glia:

Se utilizaron cajas de Petri de plástico calidad cultivo de tejido de 35mm de diámetro. Las cajas se cubrieron con una solución de colágeno que al secarse produce una película transparente sobre el piso de la caja, se esterilizaron luego con luz Ultra Violeta durante 30 min. Posteriormente se lavaron 3 veces con agua bidestilada estéril con un intervalo de 10 min entre cada paso. En el momento de sembrar se agregaron 2 ml de medio de cultivo completo y 100  $\mu$ l de suspensión celular de aproximadamente  $10^6$  células.

**b) Población Enriquecida en Células Neuronales:**

Las cajas Petri de plástico de 35mm de diámetro, calidad cultivo de tejido se incubaron 24 horas con una solución de poli-L-lisina en amortiguador de boratos a una concentración de 1mg/100ml. Posteriormente las cajas recibieron 3 lavados de 10 min cada uno con agua bidestilada estéril. Se agregó 2 ml de medio de cultivo completo y 100 ul de la suspensión celular aproximadamente  $10^5$  células. Cuando el cultivo tenía 48 horas de edad se agregó la toxina "Tullidinol" a diferentes concentraciones, se realizaron 2 grupos control, uno con el solvente de la toxina y otro que no recibió nada. 24 horas después se evaluó el efecto de la toxina, por medio de las técnicas mencionadas.

**c) Población Enriquecida en Células Gliales:**

Las cajas se trataron de igual forma al de la población mixta. Pero en este caso se cambió el medio nutritivo cada 4 días, hasta obtener cultivos de 14 días de edad en los cuales se ha formado una monocapa de células no neuronales, siendo la cantidad de neuronas menor al 5% aproximadamente de la población total. A la edad de 15 días se agregó la toxina de la misma forma que se refirió más arriba para las otras poblaciones.

## II.- 2.- Técnica de Desoxiglucosa

### a) Técnica de Captación de Desoxiglucosa Tritiada (2-DG\*)

- Se desechó el medio de cultivo.
  - Se lavaron las cajas 2 veces con 1 ml de solución de Lavado\*.
  - El tercer lavado se dejó reposar durante 8 min , para eliminar en lo posible todo rastro de medio nutritivo.
  - Se agregó 1 ml de solución de Incubación\*, dejandose en contacto con las células durante 8 + 1 min.
  - Se lavaron las cajas 3 veces con sol. de Lavado, para eliminar toda la sol. de Incubación no captada por las células.
  - Se aspiró exhaustivamente todo resto de solución y se dejó secar la caja.
  - A cada caja se agregó 1 ml de solución de NaOH al 0.5 N.
  - Se tomó una alícuota para cuantificar la (2-DG\*) captada por la población celular, en un contador de centelleo.
  - Se tomó otra alícuota para cuantificar la concentración de Proteínas totales por la técnica de Lowry (1952).
- \* Ver apéndice de soluciones.

## b) Cuantificación de la Desoxiglucosa Tritiada Captada por las Células

Cálculo De Nanomolas De Desoxiglucosa:

$$[ \text{nM 2-DG*} ] = \frac{ ( \text{nM DG} ) ( \text{dpm} )}{ ( C )}$$

En donde:

[ nM 2-DG\* ] = nanomolas de desoxiglucosa tritiada captadas por las células.

( nM DG ) = nanomolas de desoxiglucosa fria presentes en la solución de Incubación por mililitro.

( dpm ) = desintegraciones por minuto de cada muestra. Esta se obtiene como se indica:

$$( \text{dpm} ) = \text{cpm} \times E$$

En donde:

cpm = cuentas por minuto.

E = Eficiencia del contador de Centelleo utilizado.

( C ) = Cuentas por minuto en 1 ml en el medio de incubacion.



## II.- 3.- SOLUCIONES UTILIZADAS

### - O-Syl.

Solución desinfectante y detergente, por cada 100ml:

O-bencil p-clorofenol	4.293	4.393 gr.
Para-ter-butilfenol		3.000 gr.
Tetraacetato de etilendiamina tetresódico		3.800 gr.
Dodecil bencensulfonato sódico		0.500 gr.
Alcohol isopropílico		1.862 gr.
Vehículo c.b.p.		100 ml.

Para la desinfección de mobiliario, pisos y campana de flujo laminar en una proporción de 1:128 en agua. En la desinfección de instrumental quirúrgico en 1:33 en agua estéril de preferencia.

### - Solución Salina Balanceada Libre de $Ca^{++}$ y $Mg^{++}$ :

NaCl	2.0 gr
KCl	0.1 gr
$NaHCO_3$	0.087 gr
Glucosa	0.25 gr
Sol. Rojo de Fenol	0.005 ml

Llevar con agua bidestilada a 250 ml.

### - Solución de Rojo Fenol

Rojo Fenol 0.4%

Solución de NaOH 1.0 N

Se disuelve el Rojo Fenol en 2 ó 3 gotas de NaOH y se lleva con agua bidestilada a la cantidad deseada.

- Medio Nutritivo

31

(Minimum Essential Medium) Eagle, Gibco. No. catálogo 410-1600

Eagle 2.675 gr

NaHCO<sub>3</sub> 0.0875 gr

Glucosa 1.25 gr

Llevar con agua bidestilada a 250 ml.

- Medio Completo

Solución de Medio Nutritivo de Eagle 85%

Suero Bovino Fetal GIBCO 15%

Antibiótico-Antimicótico 1.0 ml/100 ml

-Poli-DL- Ornitina

Solución de Poly-DL-Ornithine hydrobromide. Sigma F-8638.

Poliornitina 1 mg / 100 ml de Amortiguador de Boratos, pH de 8.4.

- Amortiguador de Boratos

Sol. A = 6.2 gr de Ac. Bórico + 7.46 gr Cloruro de Potasio.

Se lleva a 1 lt. con agua destilada.

Sol. B = Hidróxido de Sodio 0.1 N

Solución Final = 50 ml de Sol. A + 8.5 Sol. B. Llevar a 100ml con agua destilada. pH ajustado a 8.4

-Solución de Lavado

NaCl 120 mM

MgCl<sub>2</sub> 1 mM

KCl 1 mM

CaCl<sub>2</sub> 0.1 mM

NaOHs 40 mM

-Solución de Incubación

A la solución de Lavado se le agrega:

NaOH<sub>3</sub>/ Hepes        40 mM

Albúmina bovina    1 %

-Solución de Desoxiglucosa Fria

Desoxiglucosa 1 mM

2-Deoxy-D-Glucosa    Sigma No. 6375

-Solución de desoxiglucosa Tritiada ( 2-DG\* )

Deoxy-D-Glucose. New England Nuclear NET- 328

Desoxiglucosa tritiada (2-DG\*) 10 ul en 30 ml de Sol. de desoxiglucosa Fria.

-Solución de Tullidinol

Tullidinol 1 mg /1 ml de etanol absoluto, se lleva a la concentración deseada (1, 10 y 20 mM) con agua bidestilada estéril.

La toxina fue proporcionada por el Dr. Muñoz-Martínez, su obtención en Muñoz-Martínez et. al. 1983.

-Solución de Líquido de Centelleo de Bray

POPOP            200 gr

Naftaleno        60 gr

PPD                4 gr

Metanol           100 ml

Etilenglicol    20 ml

con Paradioxano 1-4 llevar a 1 lt.

### III.- RESULTADOS

Los resultados obtenidos se presentan en el siguiente orden:

#### 1.- Obtención de Cultivos y Observación Morfológica

- a) Población Mixta de Neuronas y Glia:  
Control, Control-Solvente y Tullidinol 10  $\mu\text{M}$  con tratamiento de 24 y 48 horas.
- b) Población Enriquecida en Células Neuronales:  
Control, Tullidinol 1, 10 y 20  $\mu\text{M}$ .
- c) Población Enriquecida en Células Gliales:  
Control, Tullidinol 1, 10 y 20  $\mu\text{M}$ .

#### 2.- Aspectos Bioquímicos

Quantificación de Proteínas Totales.  
Quantificación de Desoxiglucosa.

##### a) Población Mixta de Neuronas y Glia:

- i) Proteínas Totales: Control y tullidinol 10  $\mu\text{M}$  de 24 y 48 horas de tratamiento [mg Prot/ml].
- ii) Curva Temporal de Captación de Desoxiglucosa [nM/ml (2-DG\*)] 24 y 48 horas de tratamiento: grupo Control y Tullidinol 10  $\mu\text{M}$ .
- iii) Curva Temporal de Captación de Desoxiglucosa/ Proteínas Totales [nM/ml (2-DG\*)/ mg Prot.]

##### b) Población Enriquecida en Células Neuronales:

- i) Proteínas Totales [mg Prot/ml]: Control, tullidinol 1, 10 y 20  $\mu\text{M}$ .
- ii) Captación de Desoxiglucosa [nM/ml (2-DG\*)] a Diferentes Dosis de Tullidinol [1, 10 y 20  $\mu\text{M}$ ].
- iii) Captación de Desoxiglucosa/ Proteínas Totales [nM/ml (2-DG\*)/mg Prot] a Diferentes Dosis de Tullidinol [1,

10 y 20  $\mu$ M].

c) Población Enriquecida en Células Gliales;

- i) Proteínas Totales [mg Prot]: Control, Tullidinol 1, 10 y 20  $\mu$ M.
- ii) Captación de Desoxiglucosa [nM/ml (2-DG\*)] a Diferentes Dosis de Tullidinol [1, 10 y 20  $\mu$ M]
- iii) Captación de Desoxiglucosa/Proteínas Totales [nM/ml (2-DG\*)/mg Prot]

### III.-1.- Obtención de Cultivos y Observación Morfológica:

Para la obtención de los diferentes poblaciones celulares se implementó la técnica descrita por Booher y Sensenbrenner (1971), las modificaciones realizadas son descritas en el capítulo de Método (Cultivo de Células).

#### a) Población Mixta de Neuronas y Glia:

Grupo Control; Al momento de sembrar las células de embrión de pollo que fueron disociadas mecánicamente, se observó que tienen una forma esférica y se encuentran ya sea en forma aislada o formando pequeños "acúmulos" (fig. 1). Estas células fueron sembradas sobre un substrato de colágeno y dieron origen a células con características correspondientes a células gliales y neuronales, que se diferenciaron a lo largo del cultivo, a las que llamaremos solamente células neuronales o gliales según sea el caso.

Las células gliales fueron las primeras en desarrollarse y se extendieron formando una capa en el fondo de la caja sobre la cual se depositaron los acúmulos. A partir de ellos las células neuronales emitieron prolongaciones que comunicaban un cúmulo con otro (fig. 2a y 3a).

A los cuatro días de cultivo, las células gliales continuaron creciendo y se notó un aumento tanto del número como del tamaño de las prolongaciones que comunican los acúmulos entre sí.

#### Grupo Control-Solvente:

No se observaron diferencias entre éste grupo de estudio y el grupo anterior.

Grupo Tullidinol 10  $\mu$ M: En éste grupo a las 24 horas de tratamiento (fig. 2b y 3b) se puede apreciar una ligera disminución en el número

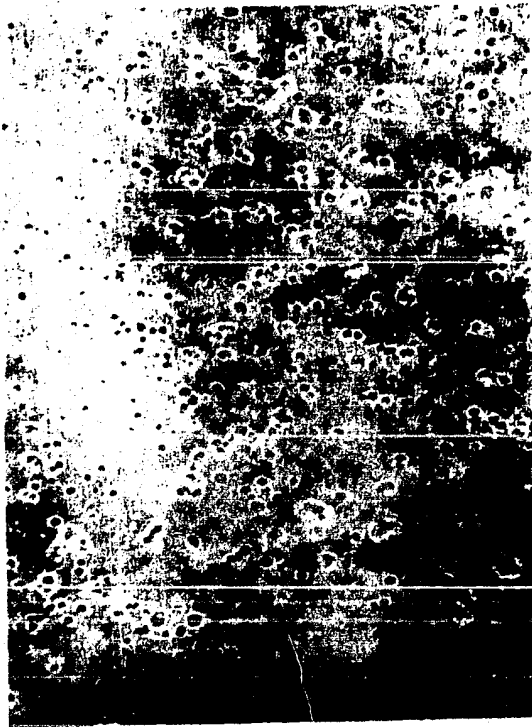


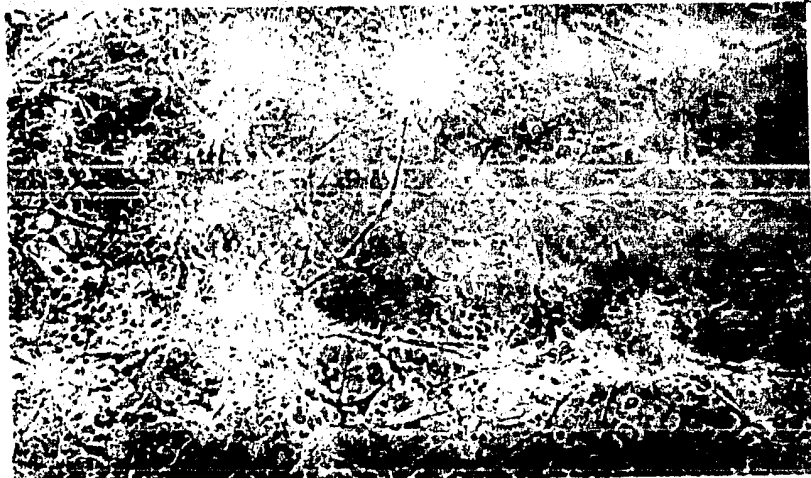
FIG. 1 CELULAS DE TELENCEFALO DE EMBRION DE POLLO  
AL MOMENTO DE SEMBRAR. Contraste de fases 160A.

de prolongaciones entre los acúmulos. Sin embargo, a las 48 horas de tratamiento el pH del medio de cultivo llega a ser menor de 5; el estado morfológico de las células es malo y se desprenden del substrato (fig. 2c y 3c).



FIG. 2

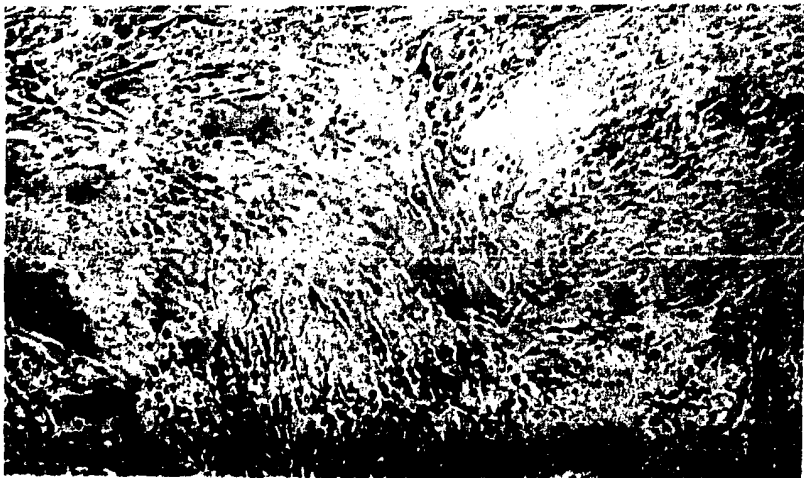
POBLACION  
MIXTA DE  
NEURONAS  
Y GLIA  
16X



a. CONTROL



b. TULLIDINOL 10  $\mu$ M  
24 Horas



c. TULLIDINOL 10  $\mu$ M  
48 Horas

FIG. 3

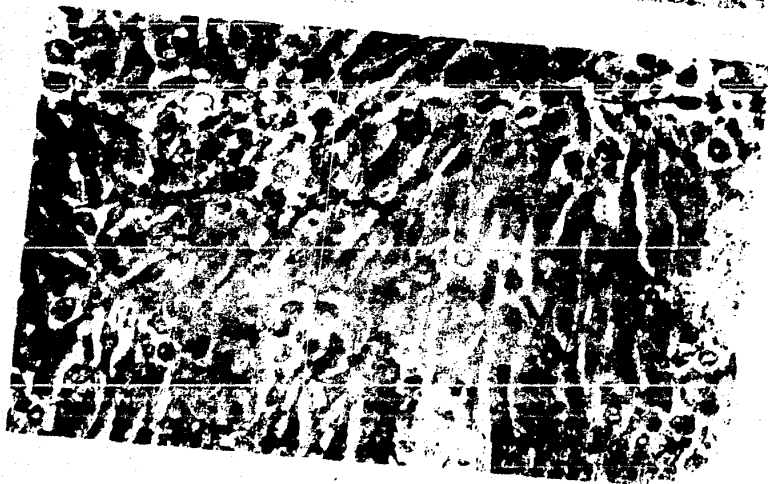
POBLACION  
MIXTA DE  
NEURONAS  
Y GLIA  
40X

a. CONTROL

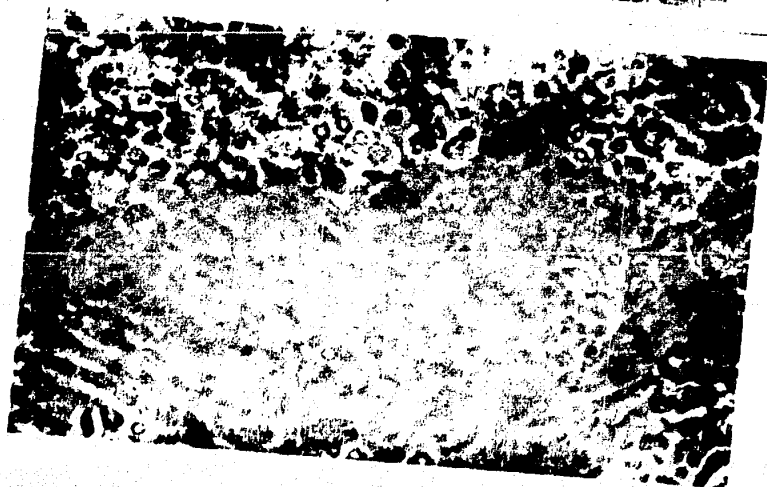


39

b. TULLIDINOL 10 µM  
24 horas



c. TULLIDINOL 10 µM  
48 horas



**b) Población Enriquecida en Células Neuronales:**

Al igual que la población anterior, en el momento de sembrar las células eran esferas que en su mayoría estaban aisladas encontrándose algunos acúmulos de 3 a 5 células. Las células se adherieron al fondo de la caja que fue previamente tratada con un polication, que favorece la adhesión al substrato y su posterior desarrollo. A las 24 horas de edad del cultivo se observó un desarrollo más lento comparado con el cultivo de población de células neuronales y gliales. Las células neuronales emitían incipientes y escasas prolongaciones, siendo evidente la ausencia casi total de células gliales. A la edad de 48 horas del cultivo, se observó un aumento considerable del número de neuritas, persistiendo el escaso desarrollo glial (fig. 4a y 5a).

Grupo Tullidinol 1  $\mu$ M : A este grupo se le agregó 1  $\mu$ M de la toxina, y no se encontró ninguna diferencia morfológica con respecto al grupo Control, al menos en microscopía de luz, a aumentos de 160 y 400

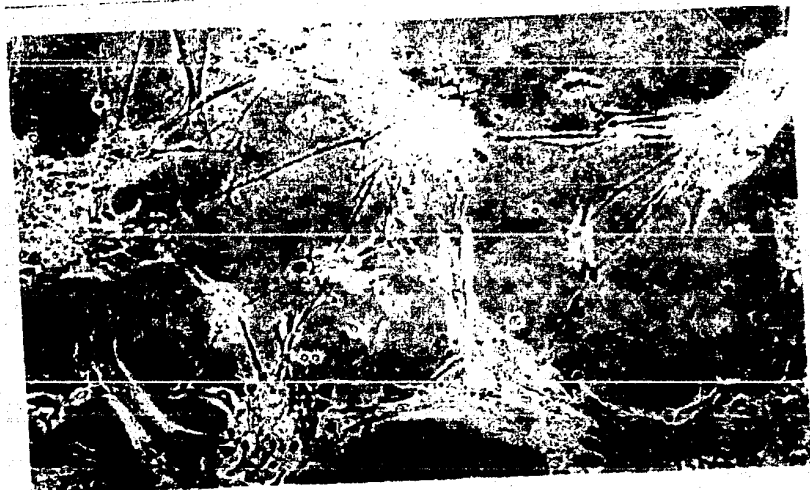
Grupo Tullidinol 10  $\mu$ M : Con esta dosis fue evidente una alteración del desarrollo neuronal evidenciado por la disminución del número de prolongaciones celulares (fig. 4b y 5b). Grupo Tullidinol 20  $\mu$ M : Se observó la desaparición casi total de las prolongaciones neuronales, y la vacuolización de los somas (fig. 4c y 5c).

FIG. 4

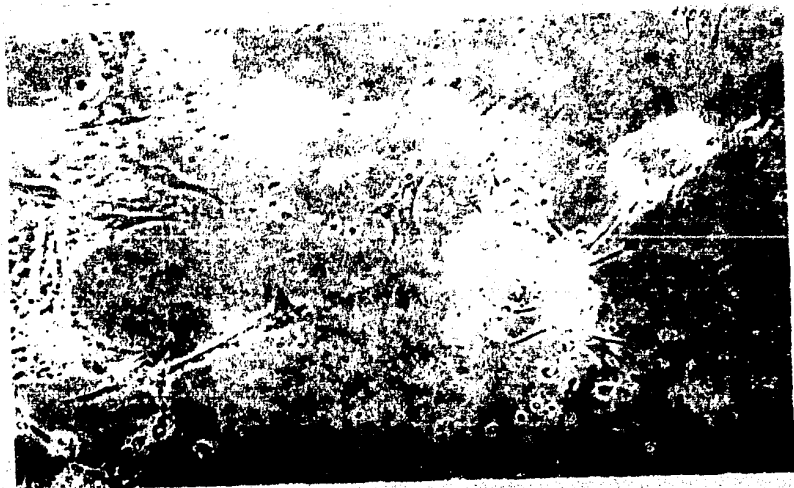
POBLACION  
ENRIQUECIDA  
EN CELULAS  
NEURONALES  
16X



a. CONTROL



b. TULLIDINOL 10 μM

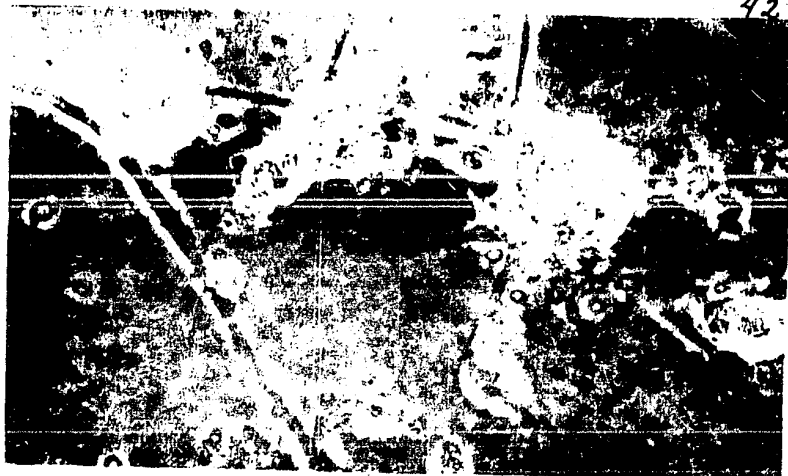


c. TULLIDINOL 20 μM

FIG. 5

POBLACION  
ENRIQUECIDA  
EN CELULAS  
NEURONALES  
40X

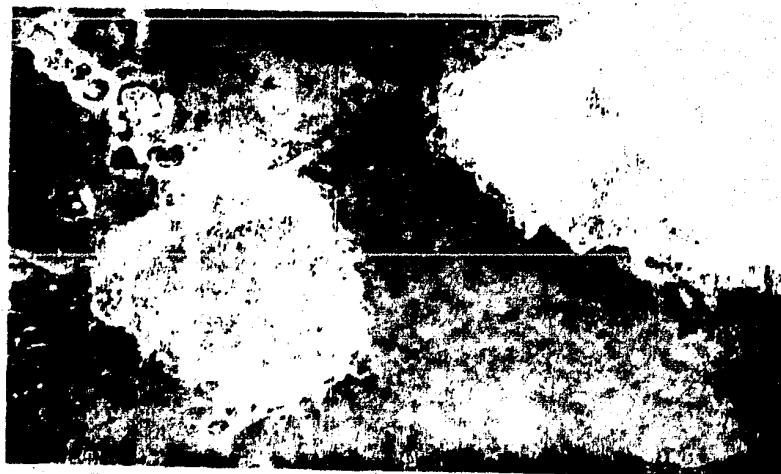
A. CONTROL



B. TULLIDINOL 10  $\mu$ M



C. TULLIDINOL 20  $\mu$ M



### c) Población Enriquecida en Células Gliales :

Para obtener ésta población, se prolongó durante 14 días la edad de los cultivos de células neuronales y gliales. Encontrándose que a los 6 días de edad en el cultivo se ha reducido el número de acúmulos y las células gliales continúan con un crecimiento acelerado, multiplicándose y formando sobre el fondo de la caja un tapete de células poligonales. Se observó una proprogresiva desaparición de las células con características neuronales.

A los 15 días de edad del cultivo, las células gliales formaron una monocapa totalmente en confluencia, y muy escasas células con características neuronales, ( 5% aproximadamente) descansan sobre ésta monocapa. Grupos de oligodendrocitos caracterizados por su pequeño tamaño y forma típica, se podían observar entre el resto de la glía en la que predominaban los astroblastos y astrocitos.

Grupo Tullidinol 1  $\mu\text{M}$ : No se observaron diferencias con el grupo control, al menos en microscopía de luz (fig. 6a).

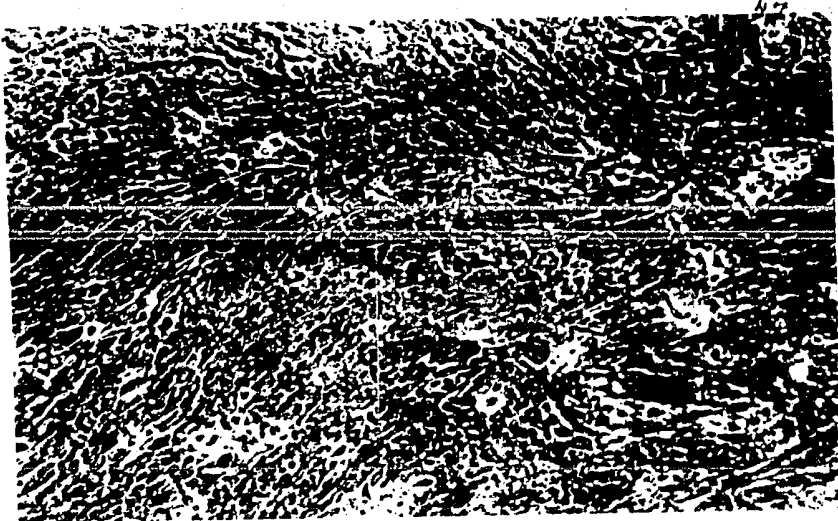
Grupo Tullidinol 10  $\mu\text{M}$ : En las células gliales se observó una ligera vacuolización y las pocas células con características neuronales presentes disminuyeron aún más en número (fig. 6b).

Grupo Tullidinol 20  $\mu\text{M}$ : A ésta concentración las células gliales presentaron retracción y vacuolización del citoplasma. Desaparecieron por completo las prolongaciones de las escasas neuronas, presentes en este tipo de cultivo. Si el tullidinol se dejaba en el medio durante 48 horas, se producía el desprendimiento de la monocapa celular (fig. 6c).

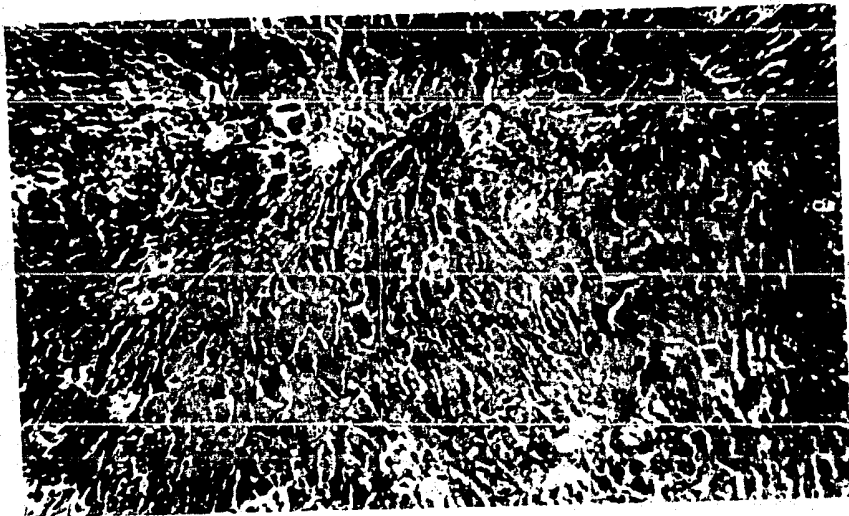
FIG. 6

POBLACION  
ENRIQUECIDA  
EN CELULAS  
GLIALES  
16X

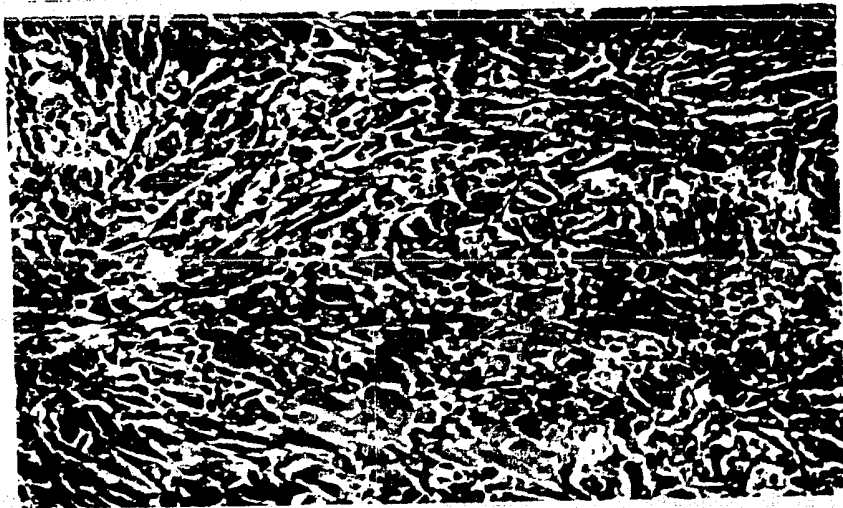
a. CONTROL



b. TULLIDINOL 10  $\mu$ M



c. TULLIDINOL 20  $\mu$ M



### III.- 2.- Aspectos Bioquímicos :

TODOS LOS RESULTADOS SE EXPRESAN COMO EL VALOR PROMEDIO+ERROR ESTANDAR  
( $\bar{X}$ +E.S.)

#### a) Población Mixta de Neuronas y Glia:

##### i) Proteínas Totales:

Se puede observar que no hay diferencia entre los valores de proteínas del grupo control ( $1.315 \pm 0.033$ ) y el tratado con tuldinol  $10 \mu\text{M}$  durante 24 horas de exposición ( $1.399 \pm 0.039$ ), en miligramos/mililitro [mg/ml].

##### ii) Curva temporal de Captación de Desoxiglucosa 24 horas (fig.7a):

Se Observó en el grupo control que la captación de [2-DG\*] aumenta en el tiempo. A los 2 min de captación no hay diferencias entre el grupo control y el tratado con tuldinol  $10 \mu\text{M}$ , durante 24 horas, (siendo sus valores respectivos de  $1.095 \pm 0.215$  y  $1.460 \pm 0.106$ ). [nM 2DG\*]. A los 8 min de tiempo de exposición al isótopo en ambos grupos, se observa una tendencia a ser mayor en el tratado, siendo los valores obtenidos:  $2.551 \pm 0.286$  y  $2.981 \pm 0.401$  [nM 2-DG\*]. Esta tendencia se hizo significativa a los 15 min, ya que entonces el grupo tratado captó mayor cantidad de desoxiglucosa que el control respectivo ( $5.262 \pm 0.378$  y  $8.197 \pm 0.823$  [nM 2DG\*]).

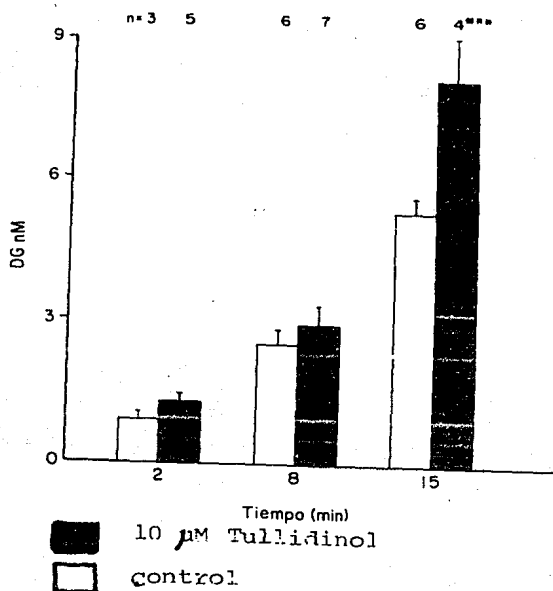
Curva Temporal de Captación de Desoxiglucosa 48 horas: En los casos en que el tuldinol  $10 \mu\text{M}$  se incubó durante 48 horas, se observó una marcada disminución de la desoxiglucosa en el grupo Control, que fue evidente desde los 2 min (siendo sus valores  $1.990 \pm 0.195$  y  $0.821 \pm 0.220$ ). A los 8 min se mantiene el mismo comportamiento ( $4.531 \pm 0.184$  y



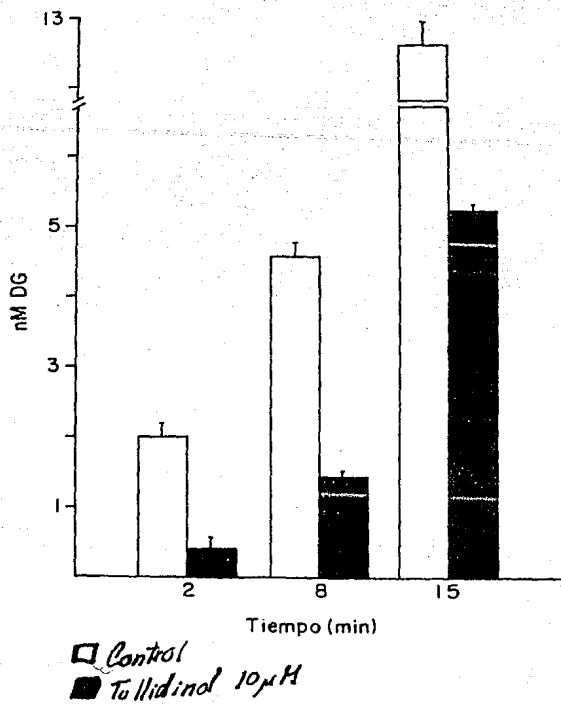
FIG. 7

POBLACION MIXTA DE  
NEURONAS Y GLIA

a. Curva Temporal de Captación de  
Desoxiglucosa (nM). 24 Horas.



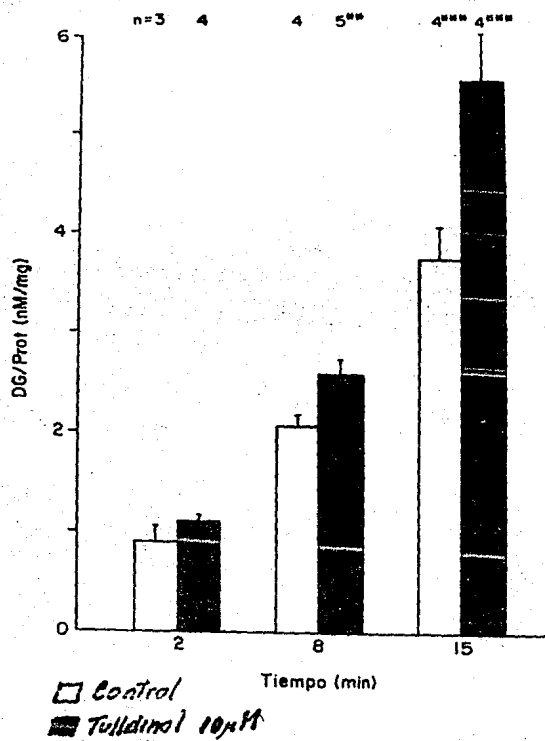
b. Curva Temporal de Captación de  
Desoxiglucosa (nM). 48 Horas.



1.784±0.244). en la incubación de 15 min la diferencia se hace aún mayor (12.262±0.551 y 2.978±1.141 [nM 2 DG\* ])(fig. 7b).

iii) Curva Temporal de Captación de Desoxiglucosa/Proteínas Totales

Se observa que a los 2 min de incubación no hubo diferencias entre el grupo Control y Tratado (siendo sus valores respectivos 0.942±0.146 y 1.114±0.066 [nM 2DG\*/mg Prot.]. Sin embargo, a medida que se aumentó el tiempo de incubación, se hizo evidente un incremento significativo en la captación de las células tratadas con la toxina (a los 8 min; 2.094±0.132 y 2.639±0.161) y los valores a los 15 min fueron; 3.777±0.299 y 5.626±0.524)(fig. 8).



**FIG. 8.** Población Mixta de Glia y Neuronas  
Curva temporal de Captación de Desoxiglucosa/  
Proteínas totales (nM/mg) a las 24 horas.

### b) Población Enriquecida en Células Neuronales:

i) **Proteínas Totales:** Se encontró que entre el grupo control y en el tratado con tullidinol  $1 \mu\text{M}$  no hay diferencias significativas, siendo sus valores respectivos  $1.263 \pm 0.039$  y  $1.152 \pm 0.055$ . (fig.9).

En cambio en el grupo tratado con  $10 \mu\text{M}$  de la toxina se observa una ligera disminución del contenido de proteínas, que se encuentra en el límite de significancia estadística con respecto al control ( $1.134 \pm 0.068$ )

A la dosis de  $20 \mu\text{M}$  la diferencia con el grupo control alcanza ya significado estadístico ( $0.906 \pm 0.085$ ).

#### ii) Captación de Desoxiglucosa a diferentes dosis de tullidinol:

Cuando se realizó una curva dosis-respuesta al Tullidinol se observó que la captación de Desoxiglucosa no difería del control a la dosis de  $1 \mu\text{M}$  ( $42.58 \pm 1.74$  y  $44.10 \pm 3.66$  nM 2-DG\*) (fig. 10a).

Sin embargo a la concentración de  $10 \mu\text{M}$  hay una diferencia altamente significativa al aumentar la captación a  $110.55 \pm 5.17$ .

La concentración de Desoxiglucosa captada cae bruscamente cuando se aplica tullidinol al  $20 \mu\text{M}$  ( $55.53 \pm 3.76$ ) aunque éste valor es todavía ligeramente mayor al del grupo control.

iii) **Captación de Desoxiglucosa/ Proteínas Totales a diferentes dosis de Tullidinol:** Cuando se corrige la cantidad de Desoxiglucosa captada por las células por el contenido de Proteínas Totales se vuelve a presentar el mismo fenómeno que en la gráfica anterior, en donde no hay diferencias entre el grupo control y  $1 \mu\text{M}$  de toxina ( $34.60 \pm 1.31$  y  $34.29 \pm 1.27$  nM 2-DG\*/mg Prot. ). A concentración de  $10 \mu\text{M}$  de toxina se eleva significativamente el cociente a un valor de  $95.10 \pm 4.07$  Con el Tu-

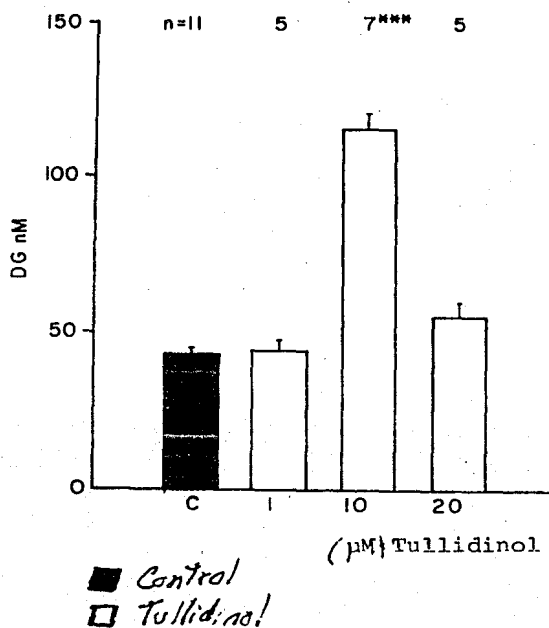
Proteínas en Células Neuronales

Proteínas Totales (mg/ml) a diferentes dosis de  
Tullidinol (uM).

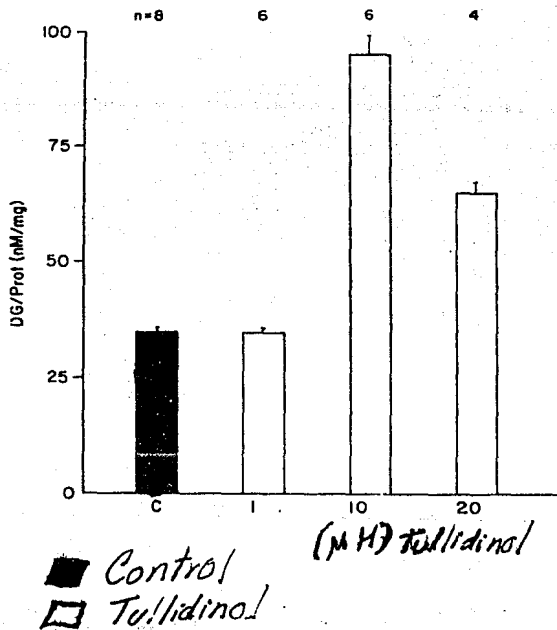
**FIG. 10.**

**POBLACION ENRIQUECIDA  
EN CELULAS NEURONALES**

a. Captación de Desoxiglucosa a  
diferentes dosis de Tullidinol  
( $\mu\text{M}$ ).



b. Captación de Desoxiglucosa/  
Proteínas Totales (nM/mg) a  
diferentes dosis de Tullidinol  
( $\mu\text{M}$ ).



**c) Población Enriquecida en Células Gliales:**

i) Proteínas Totales: Observamos que la concentración de Proteínas Totales (mg/ml) del grupo control y del tratado con la toxina a  $1 \mu\text{M}$  no se diferencian significativamente (los valores correspondientes son  $1.432 \pm 0.045$  y  $1.487 \pm 0.023$  mg/ml). Con  $10 \mu\text{M}$  de Tullidinol hay una tendencia a la disminución de las Proteínas Totales ( $1.366 \pm 0.036$  mg/ml). La diferencia se hace significativa estadísticamente con respecto al Control, cuando se usa la concentración de  $20 \mu\text{M}$  ( $1.265 \pm 0.020$ ) (fig. 11a).

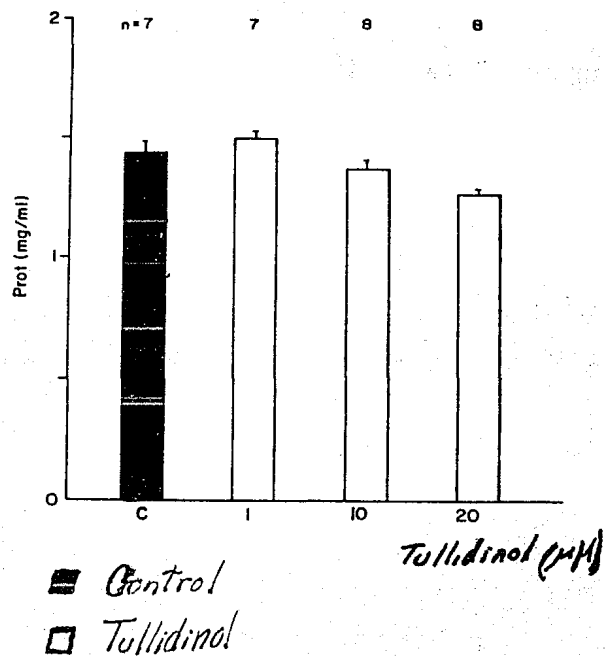
ii) Captación de Desoxiglucosa a diferentes dosis de Tullidinol: se observó un aumento gradual en la captación de desoxiglucosa (fig. 11b) en presencia de la toxina  $1 \mu\text{M}$ . Los valores obtenidos fueron: Control:  $19.276 \pm 4.539$ ; tullidinol  $1 \mu\text{M}$ :  $36.432 \pm 3.651$ ; tullidinol  $10 \mu\text{M}$ :  $74.557 \pm 3.297$ ; Tullidinol  $20 \mu\text{M}$ :  $89.692 \pm 2.749$  de nM de (2-DG\*).

iii) Captación de Desoxiglucosa/Proteínas Totales a diferentes dosis de tullidinol: Al corregir la captación de Desoxiglucosa por las Proteínas Totales el comportamiento y efecto de la toxina se hizo aún más evidente. En el grupo Control el valor fue de  $12.208 \pm 2.695$ . A concentración de  $1 \mu\text{M}$  de Tullidinol  $28.53 \pm 2.34$ ; con  $10 \mu\text{M}$  de tullidinol  $54.933 \pm 1.981$ . Alcanzándose el valor de  $85.357 \pm 14.580$  nM 2DG\*/mg Proteínas totales cuando se agregó tullidinol  $20 \mu\text{M}$  (fig. 12).

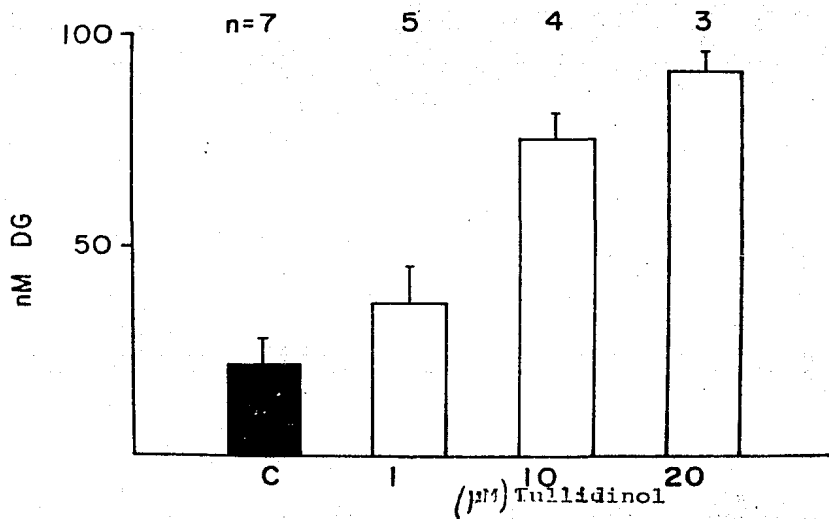
FIG. 11.

POBLACION ENRIQUECIDA  
EN CELULAS GLIALES

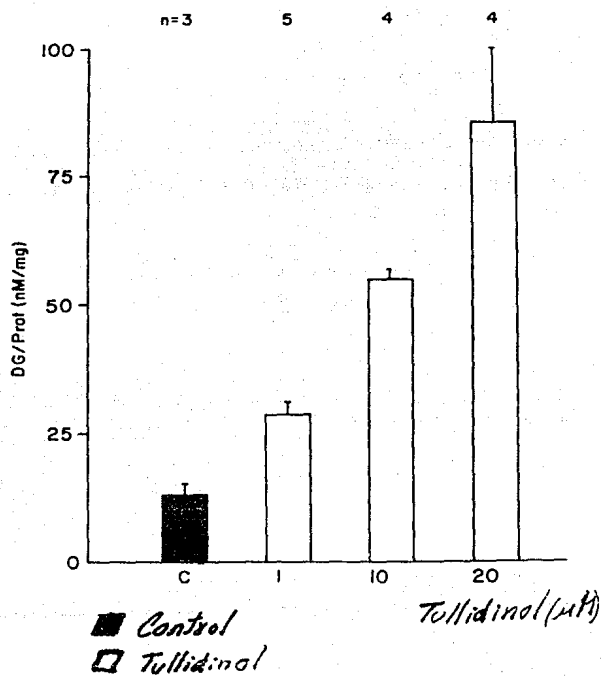
a. Proteínas Totales (mg/ml) a diferentes dosis de Tullidinol ( $\mu\text{M}$ ).



b. Captación de Desoxiglucosa (nM) a diferentes dosis de Tullidinol ( $\mu\text{M}$ ).







**FIG. 12. Población enriquecida en Células Gliales**  
**Captación de Desoxiglucosa/Proteínas Totales**  
**(nM/mg) a diferentes dosis de Tullidinol ( $\mu\text{M}$ ).**

E.-

## DISCUSION

El estudio de los efectos de la toxina de Karwinskia humboldtiana tullidora, que están bien definidos como una entidad nosológica, es importante, ya que se reportan (Dominguez y col. 1976) más de una docena de casos de intoxicaciones en humanos por año. Produce además importantes mermas en la industria agropecuaria (Breaña 1971 y Padrón 1956). La intoxicación por tullidora representa un problema de salud que necesita resolverse, mediante un enfoque multidisciplinario, como educación sanitaria de la población, estudio del mecanismo de acción de la toxina y el posible abordaje terapéutico.

Se presenta en éste trabajo un modelo que permite estudiar el efecto in vitro de la toxina de la Tullidora, sobre células del SNC en desarrollo. Este modelo permite observar, los cambios morfológicos y funcionales que ocurren en diferentes poblaciones celulares en presencia de la toxina.

Se implementó un modelo in vitro, de cultivo de tejidos eligiéndose el embrión de pollo, ya que las aves al igual que otros grupos de vertebrados se ven afectadas por la toxina Karwinskia humboldtiana, el tullidinol. El embrión de pollo presenta varias ventajas para su uso, ya que es de fácil obtención, no es necesario sacrificar a la madre, se puede disponer de ellos en número suficiente, en condiciones controladas, y es sencilla su manipulación en el laboratorio.

Se usaron embriones de 8 días de edad, ya que de acuerdo con Sensenbrenner, et. al. (1978), entre los cinco y siete días de edad el telencefalo del embrión de pollo contiene casi exclusivamente

neuroblastos, ocurriendo la gliogenesis después de los ocho días de edad del embrión de pollo in vivo. Los neuroblastos tienen además en ésta etapa un grado de diferenciación adecuada.

La poliornitina que se usó como sustrato, favorece el desarrollo de células neuronales, ya que produce un efecto inhibitor de la proliferación de glioblastos, sin ser tóxica para los neuroblastos (Sensenbrenner et.al, 1978).

Se ha comunicado que entre el primero y séptimo día de edad del cultivo el cuerpo celular de los neuroblastos aumenta de tamaño y aumenta también el número de prolongaciones que emiten estas células. Las neuritas se esparcen progresivamente, ramificándose. A los 3 días de edad del cultivo se encuentra la máxima concentración de DNA y RNA y las proteínas continúan en aumento (Sensenbrenner y col., 1979). Este fue el momento que se eligió para evaluar el daño producido por la toxina en la población enriquecida de células neuronales.

El aspecto morfológico que muestran las células tratadas con tullidinol en este trabajo indica que la exposición prolongada a la toxina altera tanto a las células neuronales como a las gliales (figs de la 2 a la 6) Existen reportes de microscopia electrónica, en raíz de ganglio dorsal in vitro (Heath J. W. 1982) en donde se muestra que la toxina afecta el arreglo de microtúbulos y otros organelos, tales como las mitocondrias, las que se encuentran amontonadas. Por otra parte se ha publicado que la toxina produce desacople de la fosforilación oxidativa (Ednostro et.al 1973). Esta alteración haría que la célula no tenga un suministro adecuado de energía lo que coadyubaría a presentar el efecto de intoxicación por el tullidinol.

Se decidió en el presente trabajo utilizar Desoxiglucosa tritiada

(2-DG\*) como una herramienta adecuada para valorar el estado metabólico de las células intoxicadas. Dado que las neuronas solo pueden servirse de la glucosa como fuente de energía, el uso de la (2-DG\*) como indicador de la cantidad de energía utilizada, está refiriendo de una manera global el estado metabólico de la célula. Las neuronas consumen la (2-DG\*) como si se tratara de glucosa, y la metabolizan hasta desoxiglucosa-6-fosfato, paso en el cual se detiene el procesamiento celular de éste compuesto. Como tampoco puede salir de la célula, se acumula en el interior celular. La cantidad de isótopo atrapado, da cuenta de la intensidad de la actividad celular desarrollada.

La toxina en solución es inestable y los reportes indican que en un medio alcalino sufre diferentes cambios (fig. III) (Weller, R. O. et. al., 1980), no habiendo referencias sobre lo que ocurre en un medio ácido o neutro, que es el caso en que nos encontramos. La toxina en solución es de un color amarillo intenso, cuando se agrega al medio de cultivo no cambia el color de éste, ni su pH (el medio de cultivo posee rojo fenol, que es un indicador del pH, que vira hacia el amarillo en condiciones ácidas y hacia el violeta cuando básico).

Después de 24 horas de cultivo, el medio de las células tratadas con la toxina, comienza a acidificarse (observación visual) y éste fenómeno está relacionado con la concentración de la toxina aplicada. Nosotros suponemos que la acidificación del medio que observamos en las células intoxicadas con tullidinol, es causada por la acumulación de los ácidos orgánicos del ciclo de Krebs, que no logran completar el proceso normal para la obtención de energía. Por lo tanto las células consumen una mayor cantidad de (2-DG\*), como se puede observar en la fig. 7 y 8 de la población de células neuronales y gliales. A las 48

horas de tratamiento con la toxina, la acidez del medio aumenta todavía más. Suponemos que este cambio del pH por si sólo daña a las células, al grado que se desorganiza el cultivo y las células se desprenden del substrato.

Por otra parte, Heath y cols.(1982). trabajando con cultivos de ganglio de raíz dorsal de embrión de "Swiss mouse" intoxicados con la toxina, encuentran que se produce la desorganización de microtúbulos y alteración en las mitocondrias, referida anteriormente, lo cual señalaría disfunciones en el transporte y suministro de requerimientos para los nervios en su zona distal. Además Edstrom et.al. (1973) y Wheeler y col.(1971), estiman que la fosforilación oxidativa no se realiza normalmente.

En las poblaciones enriquecidas en células gliales y en la de neuronas (fig.9 y 11a) la concentración de proteínas no difiere significativamente del grupo control a dosis de 1  $\mu$ M de tullidinol, y asimismo no hay diferencia significativa estadísticamente a los 10  $\mu$ M en 24 horas de aplicación, lo cual indica que la toxina no altera éste parámetro en tratamientos cortos y a dosis relativamente bajas. Cuando se aumenta la dosis, aún en tratamiento de 24 horas, se hace evidente que la toxina causa disminución marcada del contenido proteínas totales del cultivo; este efecto podría deberse pequeñas pérdidas de material ocasionadas por la lesión que la acidez del medio provoca a las células, o bien por las alteraciones metabólicas, que inhibirían el crecimiento celular.

En 24 horas de tratamiento con tullidinol (fig. 7a), se observa que la desoxiglucosa captada por la población mixta de glía y neuronas tratada con la toxina 10  $\mu$ M, siempre es mayor que la del grupo control.

En cambio a las 48 horas de tratamiento (fig. 7b), en el grupo tullidinol 10  $\mu\text{M}$  se detecta una caída importante en la captación de (2-DG\*), que es debida muy posiblemente a lo que ya señalabamos antes, de que el efecto de la toxina sobre el metabolismo celular bloquea la glicólisis (Ednostron et.al. 1973. y Wheeler et.al. 1971), liberandose al medio productos ácidos, que bajan el pH del mismo. Y es ésta acidez la que daña a las células y promueve que se desprendan de la caja en el momento de procesarlas, por la mismas técnicas que a los otros grupos. Por lo que basandose en esto, se eligió para los siguientes experimentos el tiempo de incubación de las células con la toxina de 24 horas. Etapa en la que la acidez no es tan marcada y cuando no se detectan alteraciones morfológicas tan severas, ni pérdida de células en el procesamiento de las cajas para la cuantificación de (2-DG\*).

La población enriquecida de células gliales, responde con un aumento de la captación de la desoxiglucosa desde la concentración de 1  $\mu\text{M}$  de toxina (fig. 11b), a diferencia de que la población enriquecida de neuronas (fig. 10a) a la misma concentración, no se observa cambios, sino hasta la concentración de 10 $\mu\text{M}$  donde se presenta un brusco aumento de la captación de (2-DG\*). Estos resultados indican que las neuronas y células gliales en desarrollo son sensibles a la toxina alterando su metabolismo, posiblemente a través de desacoplamiento de la fosforilación oxidativa.

En la población enriquecida de células gliales (fig. 11b), la captación (2-DG\*) en presencia de dosis crecientes de tullidinol, se incrementa gradualmente, siendo significativa la diferencia ya desde las dosis más bajas de la toxina (1  $\mu\text{M}$ ); el efecto se sigue observando hasta

los 20  $\mu\text{M}$ . Los resultados sugieren que éstas células presentan un umbral de respuesta a la toxina más bajo que la población enriquecida en neuronas, pero que a diferencia de éstas, la población glial soporta concentraciones mayores de la toxina, ya que aún a los 20  $\mu\text{M}$  continúa aumentando la captación de (2-DG\*).

Los datos obtenidos en éste trabajo sugieren que los mecanismos de toma de la glucosa pudieran ser distintos para las diferentes poblaciones. En un trabajo de L. M. Roeder y cols. (1985) se estudia el transporte de glucosa hacia el interior de células disociadas de cerebro de rata, neuronales y no-neuronales, y se obtiene una función curvilínea en el transporte neto de (1,2- $^3\text{H}$ )2-DG a diferentes concentraciones; la curva de Lineweaver-Burk revela claramente una cinética bifásica, característica de dos diferentes poblaciones. Además Lange y cols. (1982) trabajando con líneas celulares cancerosas, encontró una marcada diferencia en la tasa de influjo de glucosa entre células del neuroblastoma y del glioma. Apoyándonos en éstas dos evidencias podemos suponer que las poblaciones gliales y neuronales del telencéfalo de embrión de pollo presentan diferentes características cinéticas, en cuanto a la captación de desoxiglucosa, lo cual podría explicar las diferencias encontradas por nosotros en la captación de (2-DG\*) en cultivos enriquecidos en células neuronales y gliales en presencia de tullidinol.

Si además tenemos en cuenta que los neuroblastos se encuentran en mayor cantidad a los siete días de edad del embrión (Sensenbrenner, 1978), y que sólo a partir del octavo día empiezan a encontrarse glioblastos, de modo que la diferenciación de las neuronas empieza antes del de las células gliales, podríamos pensar que la población enriquecida en células neuronales a los tres días de edad del cultivo

tiene un grado mayor de diferenciación que la población glial. Este hecho podría incidir en la interpretación de un comportamiento diferente en ambas poblaciones frente a la toxina. Pero dado que las condiciones experimentales no son las mismas para ambas poblaciones (ejem. se utiliza diferente substrato y edad del cultivo) no sería adecuado una comparación estricta. Es necesario realizar otro tipo de diseño experimental para arribar a conclusiones más firmes al respecto.

Se cuantificó la concentración de proteínas totales por el método de Lowry (1951). Aoki y col. (1981), encuentran diferencias entre los grupos tratados con la toxina y control, nuestro método no detecta estas variaciones finas, por lo que se observa que las proteínas totales es un parámetro que a corto plazo (en las primeras 24 horas) no se ve afectado por el tullidinol; por otra parte la demanda de energía de las células está relacionada con la cantidad de tejido presente. Por lo tanto la normalización de los resultados de captación de (2-DG\*) teniendo en cuenta las proteínas en las diferentes poblaciones, es adecuada. Por ejemplo en el caso de la población enriquecida en células neuronales (fig.10b) vemos que sí se normaliza por la concentración de proteínas respectivas, el efecto de la toxina sobre la captación de (2-DG\*) se hace aún más evidente. Este mismo comportamiento se observa en el caso de la población mixta de glia y neuronas (fig. 8) y en la población enriquecida de células gliales (fig. 12b).

Los datos obtenidos en éste trabajo permiten afirmar que en el SNC en desarrollo, la toxina de la tullidora afecta morfológica y funcionalmente a las células del tipo glial y a las del tipo neuronal, desde las primeras 24 horas de tratamiento, produciéndose una profunda



desorganización celular en tratamientos más prolongados.

Pensamos que es importante continuar los estudios sobre la toxina de la tullidora ya que es una sustancia interesante desde el punto de vista bioquímico, capaz de alterar el metabolismo celular, y que podría utilizarse como una herramienta para investigar la bioenergetica celular en el SNC en desarrollo. Por otra parte, sería interesante continuar la investigación del efecto de la toxina en el modelo que presentamos, estudiando por ejemplo la producción de ácidos orgánicos, la síntesis de proteínas, la ultraestructura, etc.

Por último los hallazgos del presente trabajo de tesis, pueden aportar elementos para la comprensión del mecanismo por el cual la toxina de la Tullidora produce alteraciones del SNC que conforman el cuadro clínico de una enfermedad que continúa siendo un problema de salud pública.

## V.- Conclusiones

- El modelo "in vitro" que se implementó es adecuado para estudiar el efecto directo de la toxina sobre el sistema nervioso. Además permite obtener por separado poblaciones enriquecidas de neuronas o de células gliales, haciendo posible el estudio del efecto del tullidinol sobre poblaciones específicas.
- La toxina afecta a las células neurales tanto en condiciones de cultivo mixto de neuronas y glía, como en los cultivos enriquecidos en Neuronas o en células Gliales.
- A las 24 horas de tratamiento con tullidinol 10  $\mu\text{M}$ , se afecta el metabolismo celular, produciéndose un aumento en la captación de desoxiglucosa en los tres tipos de poblaciones estudiadas, aún antes de que sea evidente el daño morfológico.
- La captación de Desoxiglucosa aumenta de acuerdo con la concentración de la toxina.
- La concentración de proteínas totales en los grupos tratados con tullidinol 1 y 10  $\mu\text{M}$  no varía en forma importante las primeras 24 horas de tratamiento.
- Con 48 horas de tratamiento con tullidinol las células se dañan severamente, observándose daño morfológico, caída del contenido de proteínas y de la captación de desoxiglucosa, sumada a una marcada acidificación del medio de cultivo de las células.

## BIBLIOGRAFIA

- 1 .- Aoki K. and E.J. Muñoz-Martínez., (1981). Quantitative Changes in Myelin Proteins in Peripheral in Neuropathy Caused by Tullidora (Karwinskia humboldtiana). J. Neurochem. 36: 1-8
- 2 .- Arai I. David I. Dreyer, Williams R. Anderson, Jr., and G. Doyle Daves, Jr., (1978). Neurotoxins of Karwinskia humboldtiana Atropisomerism and Diastereomeric Oxidation Products. J. Org. Chem. 43: 6, 1253-1254 pp.
- 3 .- Barnes D., (1984). Attachment factors in cell culture. Mammalian Cell Culture. Ed. Jennie P. Mather. Plenum Press, New York, USA.
- 4 .- Barnes, D., Sato G., (1980). Serum-free medium. A Review, Cell 22: 649-655.
- 5 .- Blackwood D.H.R., V. Kapoor and M.J. Martin., (1981). Regional changes in cerebral glucose utilization associated with amygdaloid kindling and electroshock in the rat. Brain Research, 224:204-208.
- 6 .- Breña Villaseñor., (197 ). Contribución al Conocimiento de las Plantas Venenosas para el Ganado en México. Ciencia Veterinaria.
- 7 .- Castillo N. F., (1920). Contribución al Estudio de las Parálisis Tóxicas. Un Envenenamiento Colectivo por la "Tullidora". Memoria del V Congreso Médico Mexicano. México D.F.
- 8 .- Charlton K.M., Pierce K.R., (1970) A neuropathy in goats caused by experimental coyotillo (Karwinskia humboldtiana) poisoning; II. Lesions in the peripheral nervous system-- teased fiber and acid phosphatase studies. Pathologia Veterinaria 7, 385.
- 9 .- Charlton K.M., Pierce K.R., (1970) A neuropathy in goats caused by experimental coyotillo (Karwinskia humboldtiana) poisoning; IV. Light and electron microscopic lesions in peripheral nerves. Pathologia Veterinaria 7,420.
- 10.- Colin B. L., (1981). Cuantificación de los Receptores a la Acetilcolina en Músculos de Animales Intoxicados con Tullidora (Karwinskia humboldtiana). Tesis de Licenciatura. Biología. ENEP Iztacala México D.F.
- 11.- Del Pozo E., (1965). Los Efectos Paralizantes de la Tullidora " Estudios Clínicos y Experimentales. Gaceta Médica de México. Tomo XCV No. 2. pág. 179 - 182.
- 12.- Domínguez, X. A., S. Temblador y M. E. Cedillo. (1976). Estudio Químico de la Raíz Tullidora. (Karwinskia humboldtiana, Zucc.).

Rev. Latinoamer. Quim. 7:46-48.

- 13.- Dreyer D.L., Isamu Arai., Craig D. Bachman., William R. Anderson., Ronald G. Smith., and G. Doyle Daves, Jr. (1975). Toxins Causing Noninflammatory Paralytic Neuronopathy. Isolation and Structure Elucidation. *Journal of the American Chemical Society*. 97: 17,4985-4990 pp.
- 14.- Edstrom, A., Hanson, M., (1973). Retrograde axonal transport of proteins in vitro in frog sciatic nerves. *Brain Res.* 61: 311-320
- 15.- Edstrom A., M. Kanje and E. Walum., (1976). Density-dependent Inhibition of 2-Deoxy-D-Glucose Uptake into Glioma and Neuroblastoma Cell in Culture. *Experimental Brain Research.* 97: 6-14
- 16.- Ham R., and McKeehan, W., (1979). Media and growth requirements. *Methods in Enzymology*, 58: 44-93.
- 17.- Hawkins R.A., A.L. Miller., (1978). Loss of radioactive 2-deoxy-d-glucose-6-phosphate from brains of conscious rats: implications for quantitative autoradiographic determination of regional glucose utilization. *Neuroscience*, 3: 251-258.
- 18.- Hay, E., (1981). Extracellular Matrix. *J. Cell Biol.* 91: 205-223.
- 19.- Heath J.W., S. Ueda., M.B. Bornsif., G.D. Daves., and C.S. Raine., (1982). Buckthorn Neuropathy in vitro: Evidence for a Primary Neuronal Effect. *J. Neuropathol Exp Neurol.* 41: 204- 220.
- 20.- Hernández-Cruz and E.J. Muñoz-Martínez., (1984). Tullidora (Karwinskia humboldtiana) Toxin Mainly Affects Fast Conducting Axons. *Neuropathology and Applied Neurobiology.* 10: 11-24.
- 21.- Hubel D.H., (1981) El Cerebro. *El Cerebro. Libros de Investigación y Ciencia.* pág: 10-21. Ed. Labor, Barcelona, España.
- 22.- Iversen L.L., (1981). Química del Cerebro. *El Cerebro, Libros de Investigación y ciencia.* pág: 84-96. Ed. Labor. Barcelona España.
- 23.- Izquierdo A.E., Nieto D., (1965). Aspectos neuropatológicos de la intoxicación con Karwinskia humboldtiana. *Estudio experimental.* *Gaceta Médica de México* 95: 163
- 24.- Kim H.L., Camp B.J., (1972). Isolation of neurotoxic substance from Karwinskia humoldtiana Zucc. (Rhamnaceae). *Toxicon* 10:83
- 25.- Lowry O.H., Rosebrough N.G., Farr A.L., and Randall R.J., (1951). Protein measurement with the Folin phenol red reagent. *J. biol. Chem.* 193: 265-275.
- 26.- Lange K., K. Keller., W. Ludwig., I. Moden., I. Reinsch., and U. Brandt., (1982). Rapid Cellular Regulation of D-Glucose Transport in Cultured Neural Cells. *J. Neurochem.*, Vol.39 No.6:1594-1600.

- 27.- McLimans W.F., (1979). Mass Culture of Mammalian Cells. *Methodos in Enzymology*. 58: 194-211.
- 28.- Muñoz-Martínez E.J., J. Cueva and P. Joseph-Nathan., (1983). Denervation Caused by Tullidora (Karwinskia humboldtiana). *Neuropathology and Applied Neurology*. 9: 121-134.
- 29.- Niels L. A., D. H. Ingvar y Erik Skinhoj., (1981). *Función Cerebral y Flujo Sanguíneo. El Cerebro. Libros de Investigación y Ciencia*. pág: 194- 204. Ed. Labor, Barcelona, España.
- 30.- Padrón F. y T. Velázquez., (1956). *Patología Experimental y Clínica por Karwinskia humboldtiana*. *Revista Mexicana de Pediatría*. pág: 225-237.
- 31.- Pettman B, J. C. Louis and M. Sensenbrenner., (1979). Morphological and Biochemical Maturation of Neurons Cultured in the Absence of Glial Cells. *Nature Vol.* 281: 378-381.
- 32.- Reid L. M. and D. M. Jefferson., (1984). *Cell Culture Studies Using Extracts of Extracellular Matrix to Study Growth and Differentiation in Mammalian Cells*. *Mammalian Cell Culture*. Jennie P. Mather Plenum Press. New York. USA.
- 33.- Reid L.M. and M. Rojkind., (1979). New techniques for culturing differentiated cells: Reconstituted basement Membrane Rafts. *Methods in Enzymology*, 58: 263-278.
- 34.- Roeder L. M., J. T. Tildon and I. B. Williams., (1985). Transport 2-Deoxy-D-Glucose by Dissociated Brain Cells. *Brain Research*, 345: 298-305.
- 35.- Saji M., and K. Obata., (1981). Stimulus-dependent labeling of cultured ganglionic cell with [<sup>14</sup>C]2-deoxyglucose. *Brain Research*, 212: 435-446.
- 36.- Sensenbrenner M., J. Booher and F. Mandel., (1971). Cultivation and Growth of Dissociated Neurons from Chick Embryo Cerebral Cortex in the Presence of Different Substrates. *Z. Zellforsch*, 117, 559-569.
- 37.- Sensenbrenner M., K. Maderspach, L. Latzkovits and G.G. Jaros., (1978). Cultivated on Polylysine-Coated Surfaces. *Dev. Neurosci.* 1: 90-101.
- 38.- Siller B.A., (1969). *Investigación Clínica de la Intoxicación por Karwinskia humboldtiana (Roem. & Schult.) Zucc. (Tullidora) en el Ganado de la Región del Norte de Coahuila*. Tesis. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.
- 39.- Skaper S.D., and S. Varon., (1979). Sodium dependence of the nerve growth factor-regulated hexose uptake in chick embryo ganglionic

- cells. Brain Research, 172: 303-313.
- 40.- Sokoloff L., M. Revich. C. Kennedy, M.H. Des Rosiers, C.S. Patla, K.D. Pettigrew, O. Sakurada and M. Shinohara., (1977). The [<sup>14</sup>C] Deoxyglucose Method for the Measurement of Local Cerebral Glucose Utilization: Theory, Procedure, and Anesthetized Albino Rat. J.
  - 41.- Sperry O.E., (1955). Range plant poisonous to animals. Texas Agric. Exp. Act. Bull. 796:23-24.
  - 42.- Sutherland R.C., M.J. Martin., J.K. McQueen., and G. Fink., (1983). Brain Research, 271: 101-108.
  - 43.- Waymouth C., (1967). Somatic cells in vitro: their relationship to progenitive cells and to artificial milieux. Nat. Cancer Inst. Monogr, 26: 1-21.
  - 44.- Waymouth C., (1977). Nutritional requeriments of cells in cell culture, whith special reference to neural cells. cell, tissue, and organ cultures in neurobiology. 631-648. Eds. Federoff S., Hertz L., Academic Press, Inc. New York. USA.
  - 45.- Weller, R.O., J. Mitchell and G. D. Daves, Jr., (1980). Buckthorn (Karwinskia humboldtiana) toxins. In: Spencer P.S., Schaumburg H.H. eds. Experimental and clinical neurotoxicology. Balfimore: Williams and Wlikins. 336-347.
  - 46.- Wheeler M.H., Camp B.J., (1971). Inhibitory and uncoupling actions of extracts from Karwinskia huboldtiana on respiration and oxidative phosphorylation. Life Sci. 10:41-51