



UNQMA
CAMPUS
IZTACALA

Escuela Nacional de Estudios Superiores
IZTACALA

**CUANTIFICACION DE LOS RECEPTORES A LA ACETILCOLINA
EN MUSCULOS DE ANIMALES INTOXICADOS CON
TULLIDORA Karwinskia humboldtiana**

T E S I S

Que para obtener el título de:

B I O L O G O

presenta

LAURA COLIN BARENQUE



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

*ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL DEPARTAMENTO DE
FISIOLOGIA Y BIOFISICA DEL CENTRO DE INVESTIGACION Y
DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL IPN, BAJO LA DIRECCION DEL
DR. EMILIO JULIO MUÑOZ-MARTINEZ.*

*A mis familiares
y amigos*

Con todo mi cariño a mis padres:

Manuel Colín Guerrero

Carmen Barenque de Colín

*cuyo amor y confianza depositados en mí,
me han impulsado a superarme.*

A mis hermanos: Manuel y Nora

*Agradezco a todas las personas
que de alguna forma han contribu
buido a la realización de este
trabajo.*

A tñ ... - que lees esta tesis

INDICE

INTRODUCCION	1
OBJETIVOS GENERALES	13
METODOS	21
Intoxicación con homogenados crudos de la almendra de la Tullidora	21
Intoxicación con Tullidinol	21
Procedimientos quirúrgicos: desnervación y sección y espinal	24
Determinación de la unión de ^3H - α -bungarotoxina en musculos soleo y extensor <i>digitorum longus</i>	24
Determinación del peso molecular	28
Determinación de radioactividad	28
Preparación del tejido	30
RESULTADOS	33
Síndrome de intoxicación producido por la administración de la Tullidora o del Tullidinol en la rata.	33
Aumento de la densidad de receptores en músculos desnervados	34
Fijación de ^3H - α -bungarotoxina en músculos desnervados y en músculos inervados de un mismo animal después de la sección espinal	35
Fijación de ^3H - α -bungarotoxina en animales intoxicados con Tullidora	43
Fijación de ^3H - α -bungarotoxina en animales intoxicados con Tullidonol	50
Desnervación anatómica en músculos de animales intoxicados	50

DISCUSION Y CONCLUSIONES	53
Fijación de ³ H- α -bungarotoxina en músculos inactivos y en músculos desnervados	53
Aumento de la fijación de α - bungarotoxina en el músculo soleo de animales intoxicados	57
REFERENCIAS	60

INTRODUCCION

En el siglo XVIII Francisco Xavier Clavijero recogió el testimonio de dos tribus de la Baja California sobre la toxicidad del fruto de la *K. humboldtiana*. En su libro "Historia de la Antigua o Baja California", Clavijero escribió textualmente: "En varios lugares de la península hay otro arbus to cuyo fruto es redondo, del tamaño de un garbanzo y negro cuando está maduro. Los indios se abstienen de comerlo porque saben bien que es muy nocivo... El efecto que les causa es el de tullirse después de pocos días y de aquí sobrevienen otros accidentes que al fin les quitan la vida..." (Clavijero, 1933).

Esta planta pertenece al orden Rhamnales, familia Rhamnaceae, género y especie *Karwinskia humboldtiana*; en México recibe varios nombres, siendo el más frecuente el de Tullidora. Se trata de un arbusto caducifolio de invierno, de 1 a 8 m de altura, cuyo tronco puede alcanzar hasta 20 cm de diámetro, de hojas pecioladas y flores pequeñas que se encuentran en las axilas de las hojas; el fruto es drupáceo, negrozco cuando maduro, de 6 a 9 mm de diámetro. La planta se distribuye en las zonas áridas, sobre las estribaciones de las sierras de los estados de Baja California, Coahuila, Guanajuato, Hidalgo, Michoacán, Nuevo León, Querétaro, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas y Veracruz, así como los estados de Texas y California en los Estados Unidos (Padrón, 1951; Marsh, Clawson y Roe, 1958).

En 1918 Castillo Nájera informó sobre 106 casos de

soldados intoxicados por la ingestión del fruto de la Tullidora, de los cuales 10 murieron, y estableció el cuadro sintomático del envenenamiento, dividiéndolo en dos fases:

1) Aguda, cuando aparecen los síntomas alrededor de 48 h después de la ingestión del fruto, presentándose primero parálisis de los miembros inferiores, la que se establece bruscamente, y luego sobreviene la parálisis de las extremidades superiores; hay cefalea intensa, calambres en los brazos y en las piernas.

2) Crónica, que aparece cuando ceden los síntomas del envenenamiento agudo, En esta fase desaparecen tanto los calambres como la fiebre, pero persiste la parálisis; no hay incontinencia de la vejiga ni del recto y los reflejos cutáneos y tendinosos son normales al principio, pero disminuyen hasta abolirse en algunos casos; la sensibilidad cutánea no se altera. El autor compara este envenenamiento con la poli neuritis saturnina, ya que en ambos casos se afectan más intensamente los nervios motores, permaneciendo aparentemente indemnes los nervios sensitivos y los simpáticos.

El primer estudio experimental sobre la intoxicación por la Tullidora fue realizado por Marsh, Clawson y Roe (1928). Estos autores produjeron intoxicaciones experimentales en varias especies de animales: ganados bovino, caprino y vacuno, así como en pollos y cuyos. Después de la administración de una sola dosis de frutos molidos de Tullidora, los animales también desarrollaron parálisis flácida que comenzó afectando las extremidades posteriores y que después se fue generalizando.

Francisco Padrón Puyou (1951) realizó estudios clínicos y experimentales y logró reproducir el cuadro de parálisis al administrar endocarpio pulverizado del fruto de la Tullidora a ratas y a conejos. Padrón y Velázquez (1956) hacen una descripción anatomopatológica de conejos intoxicados, donde muestran alteraciones difusas en las células de Purkinje del cerebelo. En cuanto al cuadro clínico observado en humanos, establecieron el diagnóstico diferencial con la poliomielitis. También establecieron que el principio activo lo contiene el endocarpio solamente, el cual es hidrosoluble (sin embargo, como se verá posteriormente, la toxina es liposoluble).

Escobar y Nieto (1965) hicieron un estudio sobre los aspectos neuropatológicos en gatos y ratas tratadas con una sola dosis de Tullidora. Los animales tratados mostraron lesiones en los nervios periféricos; fundamentalmente, desmielinización segmentaria de los axones y alteraciones degenerativas en las neuronas de las astas anteriores de la médula espinal. Las lesiones del cuerpo celular fueron consideradas como secundarias a la degeneración de los axones periféricos.

Más recientemente Charlton y Pierce (1969 a, b, c, 1970) realizaron un extenso estudio en cabras intoxicadas con dosis repetidas de frutos molidos de Tullidora administrados oralmente, encontrando hinchamiento, depleción de glucógeno y mitocondrias degeneradas en las células de Schwann, así como desmielinización segmentaria y degeneración Walleriana de los axones, que fué mucho mayor en los sitios distales

de los nervios motores largos, que en los sitios proximales.

Muñoz-Martínez y Chávez (1979), basándose en los resultados obtenidos en gatos intoxicados con extractos etéreos de la almendra del fruto de la Tullidora, proponen que las alteraciones motoras observadas en los gatos intoxicados pueden explicarse, al menos parcialmente, por el bloqueo del impulso nervioso en los axones motores, como consecuencia de la desmielinización. Estos autores encontraron que el principio activo parece encontrarse únicamente en la cutícula que cubre a la almendra.

El cuadro clínico que aparece en ratas después de la administración intraesofágica de homogenados crudos de la almendra de Tullidora o de la cutícula (véase arriba), tiene varios aspectos interesantes. Inicialmente ocurre un cuadro de toxemia generalizada que se inicia un día después de la administración y que se caracteriza por hipoactividad y disminución en la ingestión de los alimentos que son ofrecidos *ad libitum*, lo que se acompaña de una disminución correspondiente del peso corporal. Este cuadro alcanza una intensidad máxima a los siete días después de la administración y durante este período los animales pueden morir aunque no aparezca parálisis flácida. Posteriormente el cuadro de toxemia generalizada cede, los animales recuperan peso y a las dos semanas después de la intoxicación parecen normales en cuanto a su conducta motora. Más tarde (entre tres y cinco semanas después de administrar la Tullidora), los animales manifiestan alteraciones en la marcha y parálisis flácida. Estas alteraciones aparecen inicialmente en las

extremidades posteriores y después en las anteriores, coincidiendo con las observaciones de otros autores. Finalmente, los animales pueden sucumbir debido a la parálisis respiratoria, o bien recuperarse en el transcurso de varios meses.

Recientemente se ha reproducido el cuadro de intoxicación mediante la administración de Tullidinol, compuesto polifenólico hexacíclico liposoluble que ha sido aislado de las cutículas del endocarpio de los frutos de la Tullidora, utilizando cromatografía en columnas de gel sílice; la estructura molecular de este compuesto se identificó mediante resonancia protónica magnética nuclear (Muñoz-Martínez, Cueva y Josephn-Nathan, 1979). Esta sustancia ya había sido aislada e identificada por Arai, Dreyer, Anderson y Daves (1978), pero estos autores no probaron si producía las alteraciones descritas. No obstante, Mitchell y col. (1978) encontraron que entre 2 y 5 días después de inyectar esta sustancia intraneuralmente en el nervio ciático del conejo, las células de Schwann mostraban el mismo tipo de alteraciones que encontraron Escobar y Nieto (1965) y Charlton y Pierce (1969 a, b; 1970) mediante la administración oral de los frutos molidos de la Tullidora.

Se ha encontrado que cuando los animales son estudiados durante la fase en que manifiestan trastornos motores, puede demostrarse desmielinización segmentaria, bloqueo del impulso nervioso en los nervios periféricos, disminución de la tensión desarrollada por los músculos, prolongación de los tiempos de contracción y de relajación musculares, disminución en el contenido de las proteínas específicas de la

mielina, aumento en el contenido de una proteína que pudiera ser constituyente de los neurofilamentos de 100 \AA , e hipersensibilidad a la acetilcolina en los músculos esqueléticos (Terán y Muñoz-Martínez, 1976; Muñoz-Martínez y Chávez, 1979; Cueva y Muñoz-Martínez, 1979; Muñoz-Martínez y Cueva, 1979, Muñoz-Martínez, Cueva y Joseph-Nathan, 1979; Aoki y Muñoz-Martínez, 1981). Sobre este último punto tratará la presente tesis (desarrollo e hipersensibilidad a la ACh en fibras musculares esqueléticas).

Como se mencionó, en las ratas intoxicadas con *Tullidora* aparece hipersensibilidad a la acetilcolina en los músculos esqueléticos (Cueva y Muñoz-Martínez, 1979; Muñoz-Martínez, Cueva y Joseph-Nathan, 1979; Cueva, 1979) fenómeno que también ocurre después de desnervación muscular por sección quirúrgica de los nervios motores en animales normales (véase abajo). En las fibras musculares normalmente inervadas, solamente la región de la placa motora, que es la que establece contacto con el axón correspondiente, es sensible a la acción de la acetilcolina, debido a que los receptores membranales que se combinan con el neurotransmisor se encuentran restringidos a dicha región (Del Castillo y Katz, 1955; Axelsson y Thesleff, 1959), 4 ó 5 días después de desnervar el músculo *Tenuissimus* del gato, toda la superficie de la fibra muscular puede ser despolarizada como consecuencia de la aplicación local (iontoforética) de acetilcolina; este fenómeno ha sido llamado "hipersensibilidad" a la ACh, y resulta de un aumento en la síntesis de receptores por las fibras musculares desnervadas (Brockes y Hall, 1975). Este

fenómeno también se encuentra en otras especies animales (véase, por ejemplo, Miledi, 1960).

En cuanto a los mecanismos que determinan la hipersensibilidad a la ACh se han postulado tres hipótesis:

(1) Que la hipersensibilidad resulta de la carencia de un factor neurotrófico hipotético que normalmente sería liberado por el nervio y que reprimiría la síntesis de los receptores a la ACh (Luco y Eyzaguirre, 1955; Miledi, 1960; Albuquerque, Warnick y Sansone, 1972; Johns y Thesleff, 1961; Hoffmann y Thesleff, 1972).

(2) Que la actividad muscular normal sea el factor responsable de que normalmente no existan receptores a la acetilcolina excepto en la región de la placa, y que la inactividad que resulta de la desnervación determinaría la aparición de receptores sobre toda la superficie membranal (Lømo y Rosenthal, 1972; Pestronk, Drachman y Griffin, 1976; Lavoie, Collier y Tenhouse, 1977).

(3) Que la hipersensibilidad sería causada por la degeneración de ramas axonales intramusculares (Jones y Vrbrová, 1974; Jones y Vyskocil, 1975).

En los animales (ratas) intoxicados con Tullidora aparece hipersensibilidad a la ACh en los músculos soleos de las extremidades posteriores (Cueva y Muñoz-Martínez, 1979; Cueva, 1979). Estos músculos mostraron un cierto grado de desnervación funcional (en promedio, 35%) pero también la hipersensibilidad puede aparecer en músculos que no están desnervados ni anatómicamente ni funcionalmente. En este último caso no puede postularse que la hipersensibilidad sea

causada por degeneración axonal, con lo cual se descarta la hipótesis 3, mencionada anteriormente. Ahora bien, la desnervación funcional se estimó comparando las tensiones máximas de las sacudidas musculares producidas por estimulación eléctrica del nervio (T_{sn}) y por estimulación directa del músculo (T_{sm}); en los músculos normales, la razón T_{sn}/T_{sm} es igual a la unidad, ya que el potencial de placa es supraumbrales en todas las fibras; cuando existe un grado de desnervación (anatómica o funcional) dicha razón es menor que 1, y al ser multiplicada por 100 se obtiene el porcentaje de desnervación funcional. La desnervación se califica como funcional porque el valor de T_{sn} corresponde al valor de una función: la transmisión neuromuscular de la excitación. Si esta transmisión está disminuída, ello puede deberse a desnervación anatómica (por ejemplo, degeneración de las fibras nerviosas motoras) o a disminución o abolición de la transmisión, aunque la terminal nerviosa se encuentre intacta y en contacto normal con la placa motora. En los animales intoxicados con Tullidora podría ocurrir desnervación funcional sin desnervación anatómica debido a bloqueo del impulso nervioso (véase arriba); Muñoz-Martínez y Chávez (1979) mostraron que la probabilidad de que ocurra bloqueo del impulso en los animales intoxicados con Tullidora, aumenta con la distancia. Así pues, la desnervación funcional estimada por la razón T_{sn}/T_{sm} puede resultar tanto de desnervación anatómica como del posible bloqueo del impulso nervioso. Consiguientemente, la hipersensibilidad a la ACh en los músculos de los animales intoxicados podría deberse

a desnervación anatómica con la consiguiente carencia del factor neurotrófico mencionado (véase hipótesis 1) o a inactividad muscular por bloqueo del impulso (hipótesis 2).

Como se mencionó, la hipersensibilidad a la ACh puede presentarse en músculos de animales intoxicados que no mostraron desnervación funcional aparente, con lo cual parecería que puede descartarse la hipótesis 2. Sin embargo, el valor de Tsn se encontró estimulando el nervio cerca de su entrada al músculo; en estas condiciones experimentales la distancia de conducción entre el punto estimulado y las terminaciones neuromusculares es relativamente corta comparada con la distancia de conducción normal en el animal íntegro, es decir entre la médula espinal y las terminales. Como se dijo, la probabilidad de que el impulso nervioso se bloquee en los axones desmielinizados, aumenta con la distancia. Por lo tanto, las probabilidades de bloqueo serían mayores en los animales íntegros que en la situación experimental mencionada, de tal manera que no se puede asegurar que en estos animales no haya existido desnervación funcional y la consiguiente inactividad muscular. En conclusión, la hipótesis 2 (la inactividad es causa de la hipersensibilidad) no puede ser descartada.

Por otra parte, el efecto de la Tullidora podría deberse a una acción directa sobre las fibras musculares. Este no parece ser el caso, ya que en un mismo músculo se encontraron fibras con hipersensibilidad a la ACh, en la vecindad de fibras con sensibilidad normal; además, mientras que en el músculo soleo (extremidad posterior) muestra hipersensi-

bilidad, en los músculos extensor común de los dedos de la extremidad anterior, la sensibilidad a la ACh es normal. Estas observaciones fueron hechas en ratas con parálisis flácida de las extremidades posteriores, pero que no mostraban parálisis en las extremidades anteriores. Se ha propuesto que la acción diferencial de la Tullidora sobre diferentes músculos, está relacionada con la longitud del nervio motor correspondiente, con el tamaño de la unidad motora y con ciertas peculiaridades del transporte intraaxoplásmico de proteínas proponiéndose que las terminales nerviosas de los axones motores asociados a unidades motoras grandes y distales, serían más lábiles a los agentes que interfiriesen con el transporte axoplásmico (Cueva, 1979; Muñoz-Martínez & Sanderson, 1981).

La sensibilidad a la ACh en ratas intoxicadas con Tullidora ha sido medida, en primer lugar, mediante el desarrollo de contracturas *in vitro*, producidas por soluciones con ACh a concentraciones que varían entre 10^{-2} y 10^{-7} g/ml. Los músculos de animales normales no desarrollan contracturas ante la ACh, debido a que los receptores se encuentran restringidos en la región de la placa motora (Fertuck y Salpeter, 1976), cuya superficie es de $150 \mu\text{m}^2$ (Hartzell y Frambrough, 1972), mientras que la superficie membranal total es de varios milímetros cuadrados. En los músculos previamente desnervados, aparecen receptores en toda la superficie de la fibra muscular (las fibras musculares del soleo de la rata miden entre 30 y 50μ de diámetro y tienen una longitud de 3 cm, aproximadamente) en estas condiciones, los músculos

desarrollan contracturas con concentraciones relativamente bajas (10^{-6} g/ml) de ACh (Cueva, 1979). Los músculos soleos de animales intoxicados, con parálisis de las extremidades posteriores, desarrollan contracturas a la ACh de magnitud similar a las obtenidas en los músculos desnervados. Por otra parte, la hipersensibilidad a la ACh también fue medida en estos animales mediante la aplicación iontoforética del neurotransmisor, donde el número de moléculas de ACh eyectadas de una micropipeta es proporcional a la intensidad de la carga anódica aplicada. Al colocar la micropipeta en la inmediata vecindad ($2 \mu\text{m}$, aproximadamente) de la fibra muscular, ésta responde con una despolarización local cuando se eyecta la ACh sobre un area membranaral que contiene receptores para el neurotransmisor. El registro de esta despolarización local se realiza mediante un microelectrodo situado intracelularmente en la fibra muscular. En los animales normales, cuando la eyección se hace sobre la región de la placa motora mediante una micropipeta localizada extracelularmente, pero a una distancia no mayor de $20 \mu\text{m}$ de la membrana muscular, se registra una despolarización con el electrodo intracelular. En los músculos desnervados o de animales intoxicados con Tullidora, la aplicación de ACh sobre cualquier región de la membrana muscular produce despolarización (hipersensibilidad a la ACh). En el caso de los músculos de animales intoxicados, la hipersensibilidad se presenta en un porcentaje variable de fibras aún cuando se encuentre totalmente inervado (véase arriba).

Con los métodos señalados (contracturas e iontoforésis)

se mide la respuesta a la ACh de músculos enteros o de fibras musculares individuales, pero no miden directamente ni la densidad promedio de receptores membranales para el neurotransmisor, ni tampoco son adecuados para detectar el inicio de la hipersensibilidad. Por un lado, con el registro de las contracturas no se mide la respuesta de todas las fibras del músculo, ya que éste es bañado por una solución con ACh durante intervalos inferiores a los 10 seg, y este intervalo no es suficiente para que la ACh alcance la superficie de todas las fibras musculares. La brevedad de este período es necesaria debido al fenómeno de desensibilización, v.gr. la despolarización que origina la contractura disminuye a lo largo del tiempo (Katz y Thesleff, 1957). De hecho, los músculos no se despolarizan si son bañados por soluciones que contengan ACh a concentraciones progresivamente crecientes; es decir, el receptor puede desensibilizarse antes de inducir despolarización. Estos hechos determinan que el método de las contracturas sea poco sensible para medir hipersensibilidades incipientes a la ACh. Por otro lado, las contracturas producidas por la ACh resultan de la suma de las contracturas unitarias de aquellas fibras que desarrollan hipersensibilidad. Así, la contractura de todo el músculo resulta de dos factores: el número de fibras con hipersensibilidad y el grado de hipersensibilidad de cada fibra (Cueva, 1979). Debe tenerse en cuenta que para que se desarrolle una contractura detectable, debe existir una densidad promedio mínima de receptores a la ACh; por ejemplo, los músculos normales no desarrollan contracturas aún cuando

son sensibles al neurotransmisor en la región de la placa.

El método de iontoforésis permite averiguar si en el músculo intoxicado existen fibras individuales sin o con hipersensibilidad a la ACh, y si entre estas últimas hay variaciones en los valores de sensibilidad, pero únicamente da información sobre las fibras que pueden ser exploradas durante un experimento (20 aproximadamente). Para poder detectar con este método el inicio de la hipersensibilidad, sería necesario explorar múltiples puntos de una misma fibra, ya que los receptores pueden encontrarse agrupados en mosaicos, como es el caso de las fibras hipersensibles de los músculos desnervados de la rana (Dreyer y Pepper, 1975), lo que restringiría el número de fibras que pueden ser estudiadas en un experimento. Por otra parte, con la micropipeta de iontoforésis solamente puede explorarse una fracción de la superficie de cada fibra muscular; por ejemplo, la porción inferior y gran parte de las porciones laterales son inaccesibles. En suma, con el método de iontoforésis sería muy difícil estimar de manera confiable la sensibilidad promedio en las fibras musculares de los animales intoxicados.

Un método más adecuado para estimar el número de receptores a la ACh y detectar aumentos de pequeña magnitud (al iniciarse la hipersensibilidad) podría ser mediante el uso de la α -bungarotoxina, que es un polipéptido neurotóxico aislado del veneno de la serpiente *Bungarus multicinctus* (Mebs y col., 1972). Esta toxina tiene la propiedad de ser un bloqueador de la transmisión sináptica, ya que se fija en forma específica e irreversible a los receptores a la

ACh (Chang y Lee, 1963), por lo que se utiliza para estimar el número de receptores a este neurotransmisor. Miledi y Potter (1971) confirman que al exponer el músculo sartorio de rana y el diafragma de la rata a bajas concentraciones de α -bungarotoxina (1 μ g/ml), la transmisión neuromuscular se abole en 5 min. Usando toxina radioactiva, estos autores pudieron medir un gran incremento en el número de moléculas de toxina unida a los receptores en músculos desnervados. Con el uso de la α -bungarotoxina radioactiva ha sido posible aislar, purificar y cuantificar los receptores colinérgicos de las fibras del músculo esquelético (Berg y Hall, 1974).

OBJETIVOS GENERALES

Al planear los experimentos que dieron motivo a esta tesis tuvieron dos propósitos fundamentales:

I) Investigar si la hipersensibilidad a la ACh ocurre después de la desnervación de las fibras musculares es o no un resultado de la inactividad muscular. La solución de este problema es indispensable para poder estudiar las causas que determinan la aparición de hipersensibilidad bajo el efecto de la neurotoxina de la Tullidora (véase a continuación).

El fenómeno de hipersensibilidad como consecuencia de la desnervación se conoce y ha sido estudiado desde hace 50 años, pero no se ha podido esclarecer cual es el mecanismo que lo causa. En cierto modo, el problema se encuentra estancado debido a que diferentes grupos de investigadores han encontrado evidencias contradictorias en cuanto a la posible participación de la actividad muscular en la regulación de la síntesis y distribución de los receptores a la ACh. Algunos investigadores encontraron que la inmovilización de músculos inervados no causa hipersensibilidad (Johns y Thesleff, 1961; Fischbach y Robbins, 1971). Sin embargo, se ha arguido que en esos experimentos los músculos pudieron haber tenido un cierto grado de actividad. Otros autores han encontrado que el período de latencia entre la desnervación y la aparición de hipersensibilidad es mayor cuanto mayor sea la distancia entre la sección nerviosa y las terminales axónicas (véase, por ejemplo, Miledi, 1960; Uchitel y

Robbins, 1978); es obvio que independientemente del lugar donde se haga la sección, la actividad muscular cesará instantáneamente en todos los casos y que la latencia para la aparición de la hipersensibilidad estará relacionada con la longitud del segmento nervioso distal a la sección. Este tipo de observaciones dió lugar a las hipótesis 1 y 3 mencionadas anteriormente. En el caso de la hipótesis 3, se postula que cuanto mayor sea la longitud del cabo nervioso distal, más tiempo tardaría en degenerar la terminal nerviosa y en que apareciesen los productos de degeneración que finalmente causarían -por medio de algún mecanismo desconocido- el aumento de receptores a la ACh. Como se mencionó anteriormente, esta hipótesis parece poco probable, ya que en el músculo soleo de ratas intoxicadas puede aparecer hipersensibilidad aunque la inervación sea completa. Así pues, la hipótesis 3 parece más plausible para explicar este tipo de observaciones.

Las evidencias en favor de que la inactividad muscular sea el factor responsable de la hipersensibilidad son abundantes (consúltese la revisión de Rosenthal, 1979) pero no están libres de crítica. Los resultados que más favorecen a esta hipótesis fueron los obtenidos por Berg y Hall (1974), quienes estudiaron en ratas la hipersensibilidad a la ACh en el hemidiafragma desnervado o en diafragmas inmovilizados durante cinco días mediante la administración de d-tubocurarina, succinilcolina o α -bungarotoxina. Al cabo de tres, cuatro o cinco días después de la desnervación o de la inmovilización por bloqueo postsináptico, las fibras musculares

diafragmáticas fueron igualmente hipersensibles; es decir, con este tipo de maniobra se logró reproducir en músculos inactivos pero inervados una hipersensibilidad de magnitud semejante a la producida por la desnervación. No obstante, se puede arguir que el factor que produjo la hipersensibilidad en los músculos inmovilizados, no fue la inmovilidad sino las toxinas utilizadas.

Aquí he mencionado solamente algunos de los resultados experimentales que han dado lugar a la prolongada controversia sobre el papel de la inactividad muscular en la producción de hipersensibilidad a la ACh. Para una documentación completa sobre este tema, puede consultarse la revisión de Rosenthal (1979).

Tratando de encontrar una respuesta clara a este problema, se decidió estudiar la fijación de α -bungarotoxina en músculos soleos de rata desnervados o inervados pero inmovilizados. Para producir la inmovilidad escogimos una maniobra que no requiere el uso de agentes químicos que por sí mismo podrían producir hipersensibilidad: esta maniobra fue la sección espinal. Como en los animales con choque espinal pudiera ocurrir que la inactividad muscular no fuese completa, debíamos contar con un método que nos permitiese juzgar si la inactividad de estos músculos es comparable a la de los músculos desnervados (totalmente inactivos). Para ello se desnervó ipsilateralmente el músculo soleo en las mismas ratas en las que se practicaba la sección medular. Así pues, el músculo de un lado es desnervado y el del otro lado permanece inervado pero inactivo; la inactividad de ambos

músculos se juzgó por la atrofia (véase METODOS Y RESULTADOS). Si el músculo inervado mostrase el mismo grado de atrofia que el desnervado, podríamos concluir que estuvo totalmente inactivo a pesar de la inervación.

Una de las tesis que sustentó como consecuencia de mis resultados es que la inactividad muscular no origina por sí misma hipersensibilidad a la ACh y que la hipersensibilidad que ocurre por desnervación o por la intoxicación con los principios activos de la Tullidora es manifestación de la carencia de un factor neurotrófico que normalmente regula la síntesis de receptores de acetilcolina en las fibras musculares. Esta carencia podría resultar de que la terminal nerviosa no liberase ese factor, o por degeneración o retracción de la terminal.

II) Buscar evidencias que indiquen si la hipersensibilidad a la ACh que ocurre como consecuencia de la intoxicación por Tullidora es resultado de desnervación anatómica o si dicha hipersensibilidad puede aparecer en músculos que no están desnervados. Como se mostrará (en los músculos de ratas intoxicadas existe), se puede detectar desnervación anatómica, aunque desconocemos si éste es el único factor.

Ya se ha mostrado que la toxina de la Tullidora causa hipersensibilidad (Cueva, Muñoz-Martínez, 1979; Muñoz-Martínez y Cueva, 1979; Cueva, 1979; Muñoz-Martínez, Cueva y Nathan, 1979) en músculos soleo de rata que presentaban un pequeño porcentaje de desnervación funcional (35% en promedio), y en un caso la hipersensibilidad se detectó en un músculo que aparentemente estaba totalmente inervado, lo

que podría ser una indicación de que la desnervación no es necesaria para que aparezca hipersensibilidad en las fibras musculares de los animales intoxicados. No obstante, en los experimentos referidos, los músculos utilizados fueron extraídos de animales que, en general, mostraron signos conductuales severos; esto es, que se encontraban en estadios avanzados de la intoxicación, existiendo la posibilidad de que en un estadio previo, todas las fibras musculares se encontrasen desnervadas, pero que en el momento de realizar el experimento agudo, algunas de estas fibras hubiesen sido reinervadas, posibilidad que se ve reforzada por el hecho de que las alteraciones clínicas características de la intoxicación por Tullidora son reversibles. Si este fuera el caso (que las fibras inervadas hubiesen estado previamente desnervadas), podría ocurrir que la hipersensibilidad a la ACh persistiese durante un período posterior a la reinervación. Para resolver este problema se hace necesario estudiar la latencia y el curso temporal de la hipersensibilidad. Como ya se ha mencionado, las alteraciones motoras comienzan a aparecer en la rata, entre 3 y 4 semanas después de la administración única de los principios activos de la Tullidora. En caso de que en estos animales apareciese hipersensibilidad a la ACh, ello no podría explicarse como consecuencia de una desnervación previa prolongada. Así pues, otro de los propósitos concretos al iniciar este trabajo de tesis fue el investigar la latencia de aparición de la hipersensibilidad y seguir su curso temporal en los músculos de animales intoxicados. Comparando los resultados

obtenidos en animales intoxicados con los obtenidos en músculos desnervados quirúrgicamente quizás pueda conocerse si la hipersensibilidad causada por la Tullidora resulta o no de la desnervación anatómica o funcional de las fibras musculares.

MÉTODOS

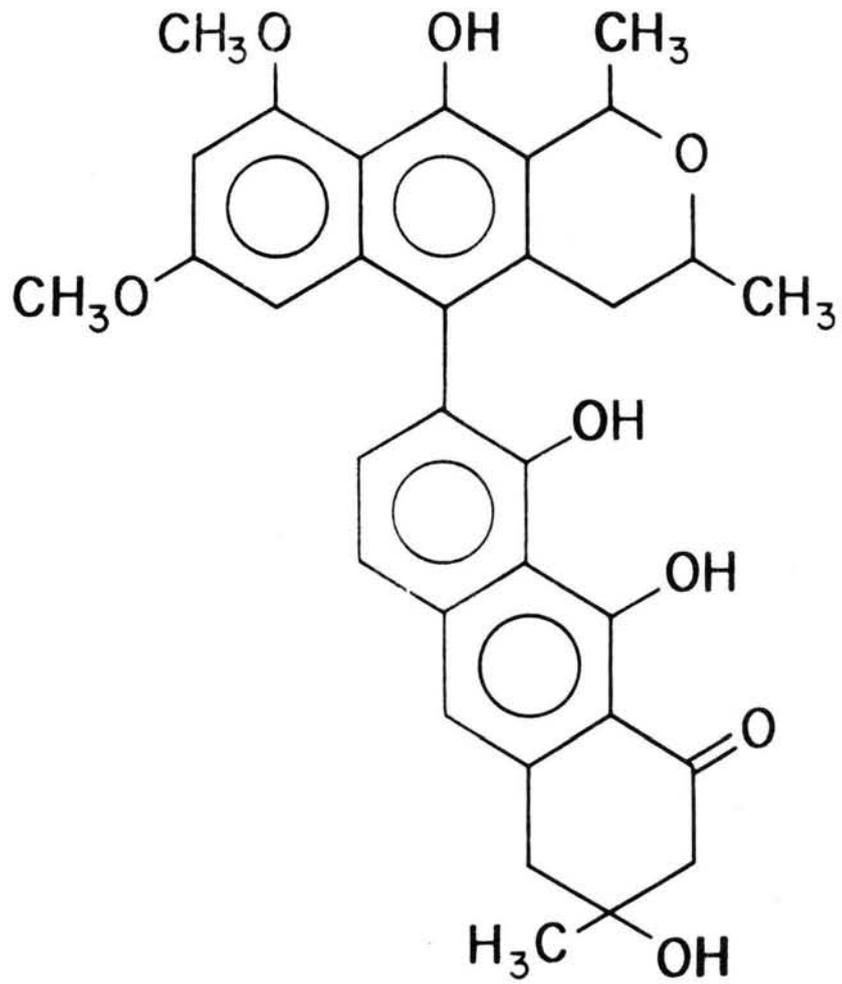
Intoxicación con homogenados crudos de la almendra de la Tullidora.

Se extrajeron las almendras del endocarpio leñoso de los frutos de la Tullidora, recolectada de la Sierra Madre Oriental, en las cercanías de Ciudad Victoria, Tamaulipas, y se preparó un machacado de almendras y de cutículas que las cubren. El machacado se mezcló con agua, hasta formar una pasta que se administró intraesofágicamente a razón de 1.3 g de machacado por kg de peso. Para la administración intraesofágica, las fauces de los animales fueron abiertas mediante una pinza, y se introdujo un catéter para verter la pasta en el límite del esófago y la boca del estómago. El machacado fue administrado en 100 ratas Wistar, machos, de 150 a 200 g de peso.

Intoxicación con Tullidinol

Se utilizaron 30 ratas Wistar, machos, con un peso corporal de 150-200 g para ser tratados, mediante la administración intraesofágica de una suspensión oleosa preparada con aceite de cacahuete y Tullidinol (Cueva, 1979; Fig. 1); la concentración de esta sustancia fue de 140 mg/kg, la que resultó adecuada comparada con diferentes dosis utilizadas (véase Tabla II).

Todos los animales tratados se mantuvieron en ayuno 24 h antes de ser intoxicados. Las ratas intoxicadas se sacrificaron entre 1 y 6 semanas después de la intoxicación para determinar la fijación de α -bungarotoxina.



TULLIDINOL

Figura 1.
Principio activo aislado del fruto de la Tullidora (véase el texto).

TABLA I. RATAS INTOXICADAS CON TULLIDORA

Dosis	2g/kg	1.7g/kg	1.5g/kg	1.3g/kg
Numero Total	7	30	10	55
Muertas	6	23	8	13
No Intoxicadas	—	3	1	28
Intoxicadas	1	4	1	14

TABLA II. RATAS INTOXICADAS CON TULLIDINOL

Dosis	300mg/kg	200mg/kg	190mg/kg	180mg/kg	160mg/kg	140mg/kg
Número Total	5	5	8	3	3	9
Muertas	5	5	6	3	3	3
No Intoxicadas	—	—	1	—	—	—
Intoxicadas	—	—	1	—	—	6

Procedimientos quirúrgicos: desnervación y sección espinal.

Se anestesiaron 20 ratas con pentobarbital sódico (35 mg/kg) inyección intraperitoneal, bajo condiciones de asepsia se les seccionó el nervio ciático a la altura del tercio superior del muslo a 1.5 cm del agujero ciático, aproximadamente, en el hoyo pélvico. La herida fue suturada y se permitió la recuperación de los animales, los cuales fueron sacrificados a los 5, 8, 15 y 23 días después para estudiar la fijación de α -bungarotoxina tanto en el músculo soleo desnervado como el inervado (véase abajo). En otro grupo de 25 animales, además de la sección unilateral del ciático, se practicó transección completa de la médula espinal; estos animales fueron sacrificados 3, 4 y 5 días después, para estudiar la fijación de bungarotoxina en ambos músculos soleos.

Determinación de la unión de ^3H - α -bungarotoxina en músculos soleo y extensor digitorum longus.

Se anesteriaron ratas normales, intoxicadas o previamente operadas, mediante la inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (35 mg/kg). Los músculos soleo y extensor largo de los dedos se expusieron, se disecaron y se reseccionaron cuidadosamente a fin de no dañar a las fibras. Inmediatamente después de la resección, los músculos se colocaron en una caja de Petri con una solución Krebs-Henseleit. La composición de esta solución fue: NaCl, 117 mM; KCl, 4.7 mM; CaCl_2 , 2.5 mM; MgSO_4 , 1.2 mM; NaHCO_3 , 24.8 mM; K_2HPO_4 , 1.2 mM y Dextrosa, 11.1 mM. La solución fue continuamente

oxigenada por burbujeo de una mezcla con 95% de O₂ y 5% de CO₂. En seguida los músculos se fijaron al fondo de la caja, que estaba cubierto por un material plástico (Sylgard), mediante alfileres, y se procedió a disecar haces de fibras musculares de los bordes del músculo, de aproximadamente 800 fibras por haz (véase Fig. 2), los cuales se montaron en unas placas de Sylgard (véase Fig. 3).

Los haces musculares fueron incubados durante 2 h en una solución Krebs-Henseleit con ³H- α -bungarotoxina, con una actividad específica de 8.1 mCi/mg, utilizando concentraciones crecientes desde 2.48×10^{-11} hasta 6.20×10^{-11} M, estas concentraciones son considerablemente menores que las utilizadas en estudios previos (véase, por ejemplo, Berg y Hall, 1974). Sin embargo, como se mostrará en la sección de RESULTADOS, la fijación de bungarotoxina por las fibras musculares fue ligeramente mayor en nuestros resultados, comparados con los resultados de otros autores. La incubación se prolongó durante 2 h, a fin de que la concentración de la toxina fuese homogénea en todo el tejido muscular (Frank et al., 1975). La solución se mantuvo continuamente oxigenada por burbujeo. Los frascos de incubación se sumergieron en un baño con temperatura constante de 37°C. En algunos casos, un mismo tubo de incubación contenía haces musculares de animales experimentales (intoxicados o previamente sometidos a cirugía) y de animales testigo.

Después de la incubación con la toxina, se inició el lavado de los músculos reemplazando la solución con toxina marcada por una solución Krebs-Henseleit sin bungarotoxina,

Figura 2.
Corte transversal de un haz muscular normal teñido con
H y E (X 150). (véase el texto).

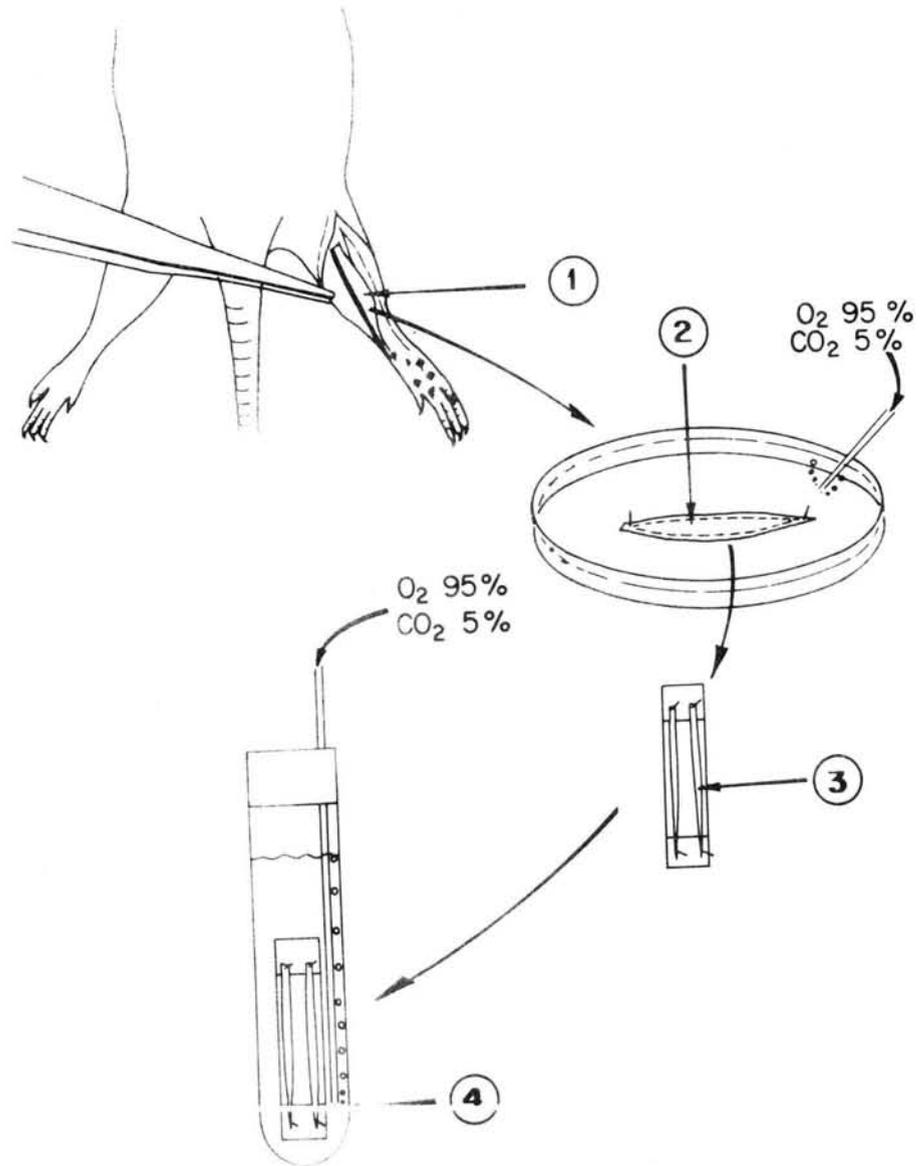


Figura 3.

Esquema para ilustrar el procedimiento utilizado: 1) localización del músculo soleo, 2) resección de dicho músculo, las líneas punteadas indican las fibras de los bordes (haces musculares), 3) placas Sylgard donde se montaron los haces musculares, 4) cámara de incubación. (véase el texto).

la cual fue, a su vez, reemplazada por solución fresca; esta operación se repitió cada 10 min, durante 2 h. A partir del momento en que se inició el lavado se tomaron alícuotas de 50 μ l cada 10 min, y se determinó la radioactividad, con el fin de averiguar cuando se había lavado toda la bungarotoxina del espacio extracelular (véase Fig. 4).

Determinación del peso molecular

Al concluir el lavado, se sacaron los haces musculares, se separaron los tendones, se removi6 el exceso de agua se pesaron (peso húmedo). En algunos casos, cada haz fue seccionado mediante dos cortes transversales para obtener tres fragmentos; uno central que contiene todas o la mayoría de las placas motoras (Albuquerque et al., 1970) y dos fragmentos de los extremos. La longitud del fragmento central (1 cm) era, aproximadamente, el doble de la longitud de cada uno de los fragmentos de los extremos. Esta división tuvo por objeto determinar la fijación atribuible a las placas y la fijación por parte de la membrana muscular que no tiene placas. Como se sabe, las fibras del músculo soleo de la rata tienen receptores en la membrana fuera de la región de la placa motora, aunque la densidad de receptores en la zona de la placa es mucho mayor. En seguida los haces de fibras se desecaron a 45°C durante 4 h, se pesaron nuevamente (peso seco).

Determinación de radioactividad

Los haces musculares desecados, se homogenizaron con

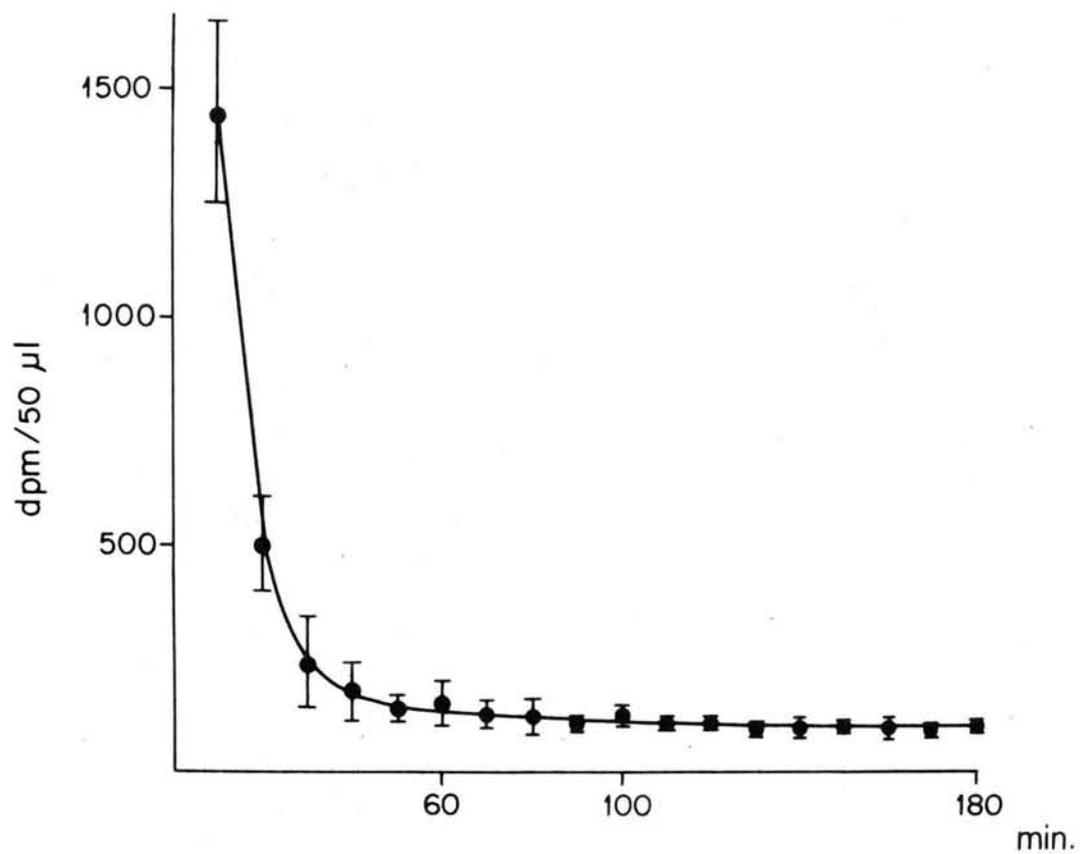


Figura 4.
Curva de decaimiento de la radioactividad en las soluciones de lavado, las barras representan el error estandar.

300 μ l de una solución alcalina (NCS Amersham) y 25 μ l de agua durante 3 h, en un recipiente al que después se añadieron 10 ml de una solución centelleante conteniendo 4 g de 2,5-difeniloxazola (PPO) y 100 mg de 1,4 bis-2-(5-feniloxazolil)-benceno (POPOP) por litro de tolueno. A las alícuotas tomadas durante las 2 h de lavado se les añadieron 10 ml de solución centelleante para muestras acuosas Insta-gel (Packard). Las muestras se almacenaron a 4°C durante 12 h, en oscuridad. Se contó la luz emitida por las muestras en un contador de centelleo líquido (Packard). Como testigos se tomaron músculos tratados de igual manera, pero no fueron sometidos a la incubación con ^3H - α -bungarotoxina. En el contador de centelleo se determinaron las cuentas por minuto (cpm) y se calcularon las desintegraciones por minuto (dpm), tomando en cuenta la eficiencia del aparato, que fue previamente determinada utilizando soluciones estándar con actividad radioactiva conocida (véase Fig. 5).

Finalmente se estimó el porcentaje de α -bungarotoxina fijadas por mg (peso seco) del músculo, tomando en cuenta la actividad específica de la ^3H - α -bungarotoxina, la vida media del tritio (12.3 años), la fecha en que la molécula fue irradiada y el proceso de decaimiento exponencial de la radioactividad, de acuerdo con la fórmula de la Fig. 5.

Preparación del tejido

Para determinar el número de fibras por haz muscular se fijaron haces de músculos normales en formaldehído al 10%, se incluyeron en parafina y se procesaron mediante la

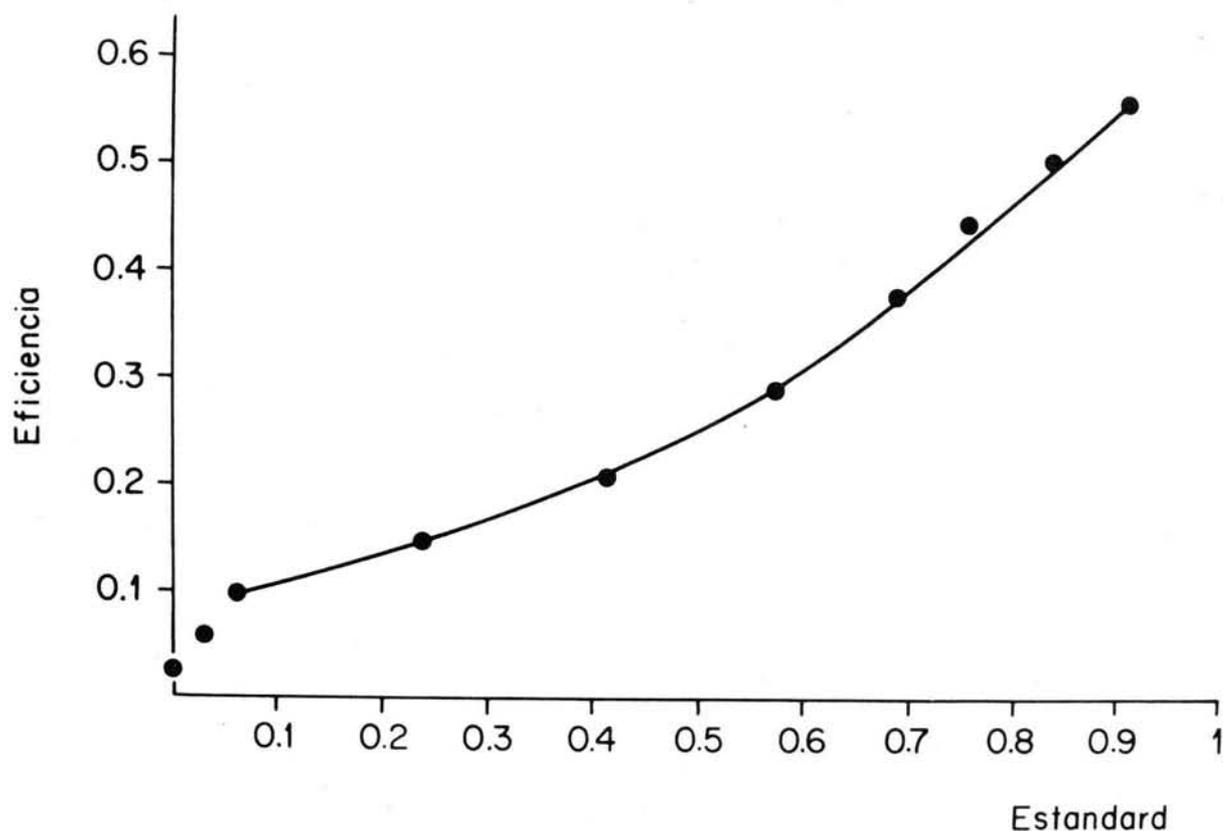


Figura 5.

Curva de eficiencia del aparato de centelleo líquido. Los valores de las abscisas son los valores arbitrarios de apagamiento estandar; 1 corresponde a apagamiento 0 y 0 corresponde a apagamiento total (o absorción total por parte de la solución). La disminución de la radioactividad de los estandares fué calculada mediante la ecuación; $A = A_0 e^{-0.693/T}(t)$ donde A_0 = actividad inicial, A = actividad presente después del tiempo t , T = vida media del ^3H , t = tiempo transcurrido y e = base de los logaritmos naturales. Los valores graficados en las ordenadas, fueron el resultado del cociente de los cpm contados en el aparato, entre los valores de la radioactividad resultante (dpm) de la ecuación para cada estandar.

técnica histológica ordinaria teñidos con hematoxilina y eosina (Fig. 2).

Para la observación de la ultraestructura de las terminales, se resecaron haces musculares de músculos intoxicados los que se fijaron con glutaraldehído, después fueron incluidos en resina Epon 812 y seccionados para su observación a microscopía electrónica (Fig. 13).

RESULTADOS

Síndrome de intoxicación producido por la administración de la Tullidora o del Tullidinol en la rata.

El cuadro de intoxicación producido por la administración de una sola dosis de Tullidora o de Tullidinol en la rata, fue similar al encontrado por Muñoz-Martínez y Chávez (1979) en gatos intoxicados y consistió en dos tipos de alteraciones: la alteración inicial, se presentó durante la primera semana de intoxicación con Tullidora o Tullidinol, y se caracteriza por hipoactividad y disminución en la ingestión de los alimentos que trae como consecuencia la pérdida de peso de los animales. Este período ha sido llamado el período agudo; durante el período agudo ocurrió el mayor porcentaje de muertes. Posteriormente el cuadro de toxemia aguda cedió y dos semanas después de la administración los animales se mostraron normales en cuanto a su conducta motora, para luego presentarse el segundo tipo de alteración entre la tercera y la quinta semana después de la intoxicación. Este período se conoce como crónico. Las alteraciones de la conducta motora se inician con hipotonia, alteraciones de la marcha y parálisis flácida de las extremidades posteriores. En ningún animal intoxicado con Tullidora o Tullidinol se observó parálisis de las extremidades anteriores ni parálisis respiratoria.

Se utilizaron diferentes dosis de homogenado crudo de la almendra de la Tullidora (véase Tabla I) para averiguar cuál era la conveniente para producir el síndrome motor

característico. En la primera semana de la intoxicación se observó gran porcentaje de mortalidad en todas las dosis empleadas, siendo la dosis de 1.3 g /kg (véase METODOS) la adecuada por presentar menor porcentaje de mortalidad y un mayor porcentaje de ratas que presentaron el estado crónico. En cuanto a las ratas intoxicadas con Tullidinol, se utilizaron dosis de 300, 200, 180, 160 ó 140 mg/kg de peso corporal, siendo esta última con la que se obtuvo mayor porcentaje de ratas intoxicadas.

Aumento de la densidad de receptores en músculos desnervados.

El aumento de receptores a la ACh en el músculo soleo desnervado ya ha sido estudiada por otros autores (véase, por ejemplo, Bray, Hubbar y Mills, 1979), pero nuestras condiciones experimentales fueron diferentes. En experimentos previos, la bungarotoxina fue marcada con ^{125}I y las concentraciones utilizadas fueron mayores a las usadas en nuestros experimentos. En los presentes experimentos la bungarotoxina fue marcada con ^3H y las concentraciones fueron considerablemente menores; la concentración que se utilizó con mayor frecuencia fue de 2.48×10^{-11} M. La razón para usar estas bajas concentraciones es el alto costo de esta sustancia.

Para poder interpretar correctamente los resultados obtenidos en los animales intoxicados era necesario saber si las bajas concentraciones de ^3H - α -bungarotoxina que utilizamos es o no es una variable que debiera ser tomada en consideración. Para ello se estudió la fijación de la toxina en

músculos que permanecieron desnervados durante períodos variables. En estos experimentos se incubaron conjuntamente haces del músculo desnervado y del músculo inervado contralateral del mismo animal (músculo normal). Nuestros resultados fueron comparados con los obtenidos por Bray et al (1979). La concentración utilizada por estos autores fue de 1×10^{-9} M.

Los valores normalizados (100% = fijación en los músculos testigo) unidos con líneas continuas en la Fig. 6 corresponden a los resultados de Bray et al. Como puede verse, ambas curvas muestran tendencias similares aunque, en general, la fijación obtenida por Bray et al. es mayor, sobre todo para el período de tres días. Como se discutirá posteriormente, esta diferencia puede ser explicada al menos parcialmente por los diferentes niveles en los que se practicaron las secciones nerviosas; las diferencias para los períodos de 8 días en adelante parecen ser poco significativas (véase la DISCUSION). Nuestros resultados y la comparación mencionada nos permiten concluir que las diferencias en isótopos y en concentración no son variables importantes.

Fijación de ^3H - α -bungarotoxina en músculos desnervados y en músculos inervados de un mismo animal después de la sección espinal

La sección espinal tuvo por objeto producir inmovilidad de las extremidades posteriores (choque espinal). En los animales espinalizados se seccionó el nervio ciático de un solo lado y se estudió la fijación de ^3H - α -bungarotoxina

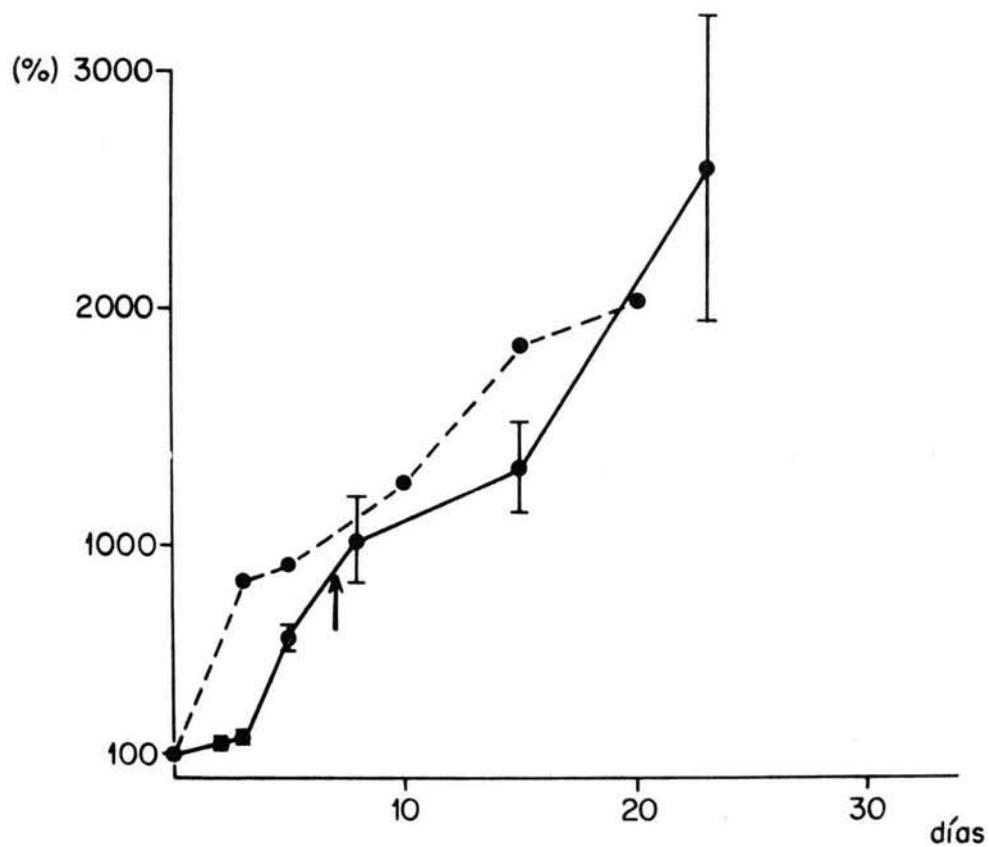


Figura 6.
Curva de incremento de la fijación de α -BuTX en musculos soleos desnervados. La concentración utilizada fué de 2.48×10^{-11} M
—— Resultados obtenidos de nuestros experimentos
---- Resultados obtenidos por Bray et al.
Las barras representan el error estandar.

(2.48×10^{-11} M) en ambos músculos soleos. En estos experimentos se incubaron en un mismo tubo haces de fibras musculares del músculo inervado, del músculo desnervado y, además, de un soleo testigo. Se calculó la fijación por unidad de peso seco (dpm/mg). La fijación en los haces musculares del animal experimental (F_e ; desnervado o inervado, F_{ed} o F_{ei}) se comparó con la fijación en el tejido muscular testigo (F_t). El aumento porcentual de la fijación (ΔF) se calculó con las fórmulas:

$$\Delta F_d = \frac{F_{ed}}{F_t} \times 100 \quad ; \quad \Delta F_i = \frac{F_{ei}}{F_t} \times 100$$

Las barras oscuras de la Fig. 7 corresponden a los valores de F_d , obtenidos de animales espinalizados durante 3, 4 y 5 días. Nótese que el incremento de F_d se manifiesta claramente al tercer día de desnervación y que F_d y F_i son diferentes ($p < 0.001$; probabilidad t de Students). A los 4 y 5 días después de la sección medular, F_d y F_i son aún mayores, pero la diferencia entre ambos también aumenta ($p < 0.0005$ para los valores de 4 días y $p < 0.0001$ para los de 5 días). Estos resultados son cualitativamente semejantes a los obtenidos por otros autores utilizando ^{125}H - α -bungarotoxina (Lavoie et al., 1975; Bray et al., 1979) aunque las diferencias entre F_d y F_i fueron mayores en nuestros experimentos. Aparentemente, la inactividad muscular es capaz de producir un cierto grado de hipersensibilidad a la ACh en los músculos inervados, aunque esta hipersensibilidad es menor que la producida por la desnervación. Sin embargo, aunque F_d/mg y F_i/mg aumentan progresivamente, es de esperar que la

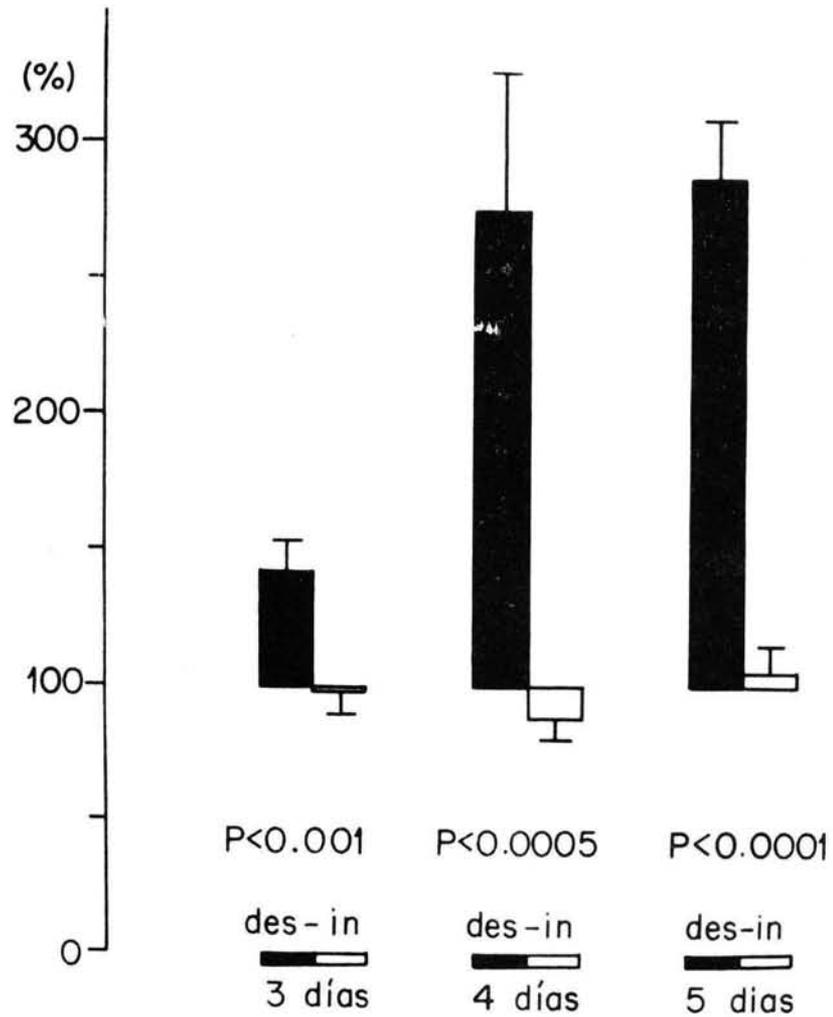


Figura 7.
Histograma de distribución de la fijación de α -BuTX en músculos desnervados e inervados, (véase el texto). Las barras representan el error estándar.

inactividad muscular produjo atrofia, de tal manera que si se desean conocer las variaciones por músculo o por fibra muscular -ya que el número de fibras no disminuye en la atrofia dentro de un período de 5 días- es necesario corregir F_d y F_i por el grado de atrofia muscular.

La Fig. 8 muestra la atrofia muscular de los mismos músculos utilizados para estudiar F_d y F_i . La medida de la atrofia es un proceso complicado que es conveniente explicar:

Para medir la atrofia de un músculo es necesario comparar su peso con el peso del animal o con el peso de un músculo soleo normal de ratas con el mismo peso corporal. La sección espinal produce atrofia no solamente en el músculo que nos interesa (soleo), sino también en los otros músculos de las extremidades posteriores. En consecuencia, el peso del animal disminuirá por esta atrofia generalizada de las extremidades, de manera que en estos animales, el co ci ente peso del soleo/peso corporal será mayor que si el peso corporal no aumentase. Por otra parte, a las ratas de laboratorio se les ofrece comida *ad libitum* y éstas llegan a alcanzar pesos de 500 g; en nuestros experimentos utiliza mos ratas entre 150 y 200 g el día que fueron operadas (peso inicial (P_i)), pero que si no hubiesen sido operadas habrían pesado más el día del experimento. No obstante, si se tomase en cuenta el peso del animal en este día, se come tería el error señalado anteriormente. Para poder medir la atrofia muscular de una manera más correcta, primero se ave riguó en un grupo de animales testigo la tasa de crecimiento

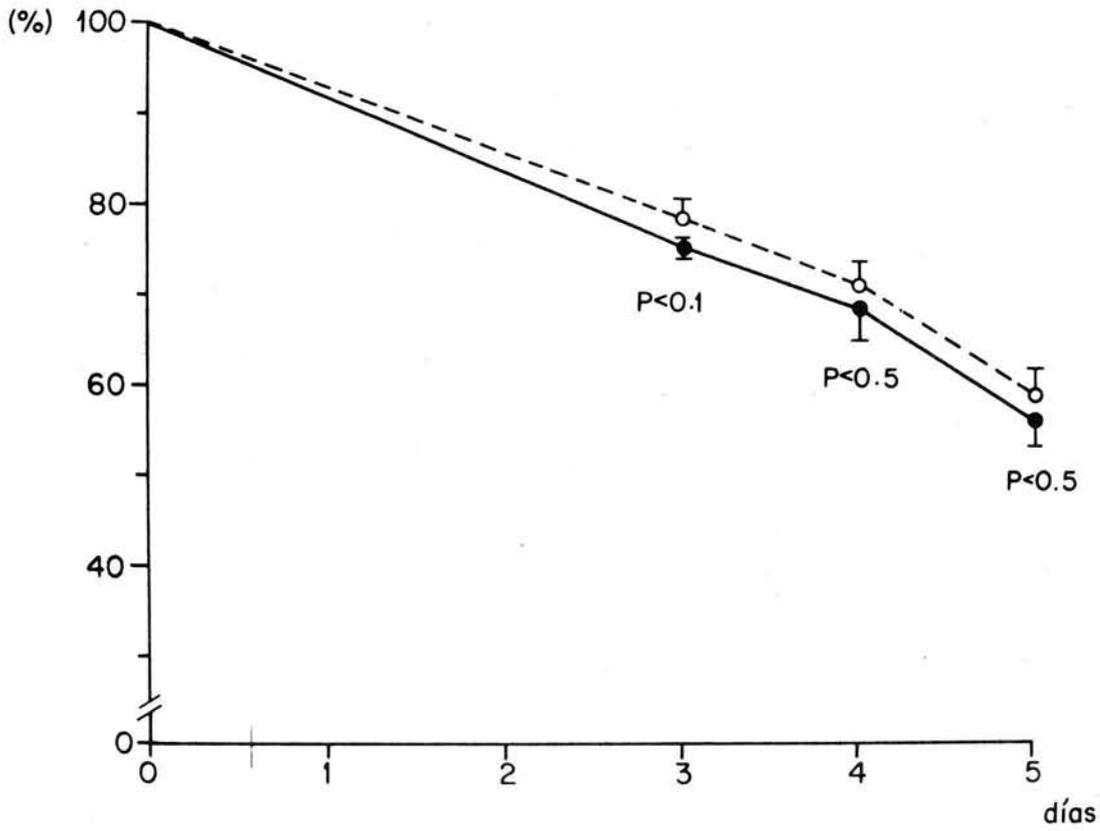


Figura 8.
Atrofia de musculos soleos de animales con sección medular • desnervados;
◦ inervados. (véase el texto). Las barras representan el error estandar.

durante lapsos de 3, 4 y 5 días; encontramos que estas tasas fueron 9.5%, 14% y 17%, respectivamente, de manera que a los 3, 4 y 5 días después de la sección medular, los pesos de los animales serían $P_i \times 0.095$, $P_i \times 0.14$ y $P_i \times 0.17$; estas últimas cifras serán denominadas como factor de corrección (Fc). También se averiguó el peso del soleo en los animales testigo, fue $0.0796\% \pm 0.00069$ (desviación estándar); a este cociente se le denominará P_{mt} . Así pues, la atrofia (A) de los músculos desnervados o inactivos fue calculada de la siguiente manera:

$$A_{des} = \frac{\frac{P_{des}}{P_i + (P_i \times Fc)}}{P_{mt}} \dots\dots\dots (1)$$

$$A_{in} = \frac{\frac{P_{in}}{P_i + (P_i \times Fc)}}{P_{mt}} \dots\dots\dots (2)$$

donde P_{des} y P_{in} son los pesos secos de los músculos desnervados e inactivos de las ratas con sección espinal. Los valores de P_{des} y P_{in} se averiguaron desecando y pesando conjuntamente todos los haces musculares obtenidos de un músculo dado. Una vez determinados los correspondientes valores de atrofia (A), se determinó y normalizó la fijación corregida (Fec) de la siguiente manera:

$$Fec = \frac{\frac{Fe(dpm/mg)}{Ft(dpm/mg)}}{A} 100$$

Las barras claras de la Fig. 9 corresponden a los valores de Fec para los músculos desnervados e inervados.

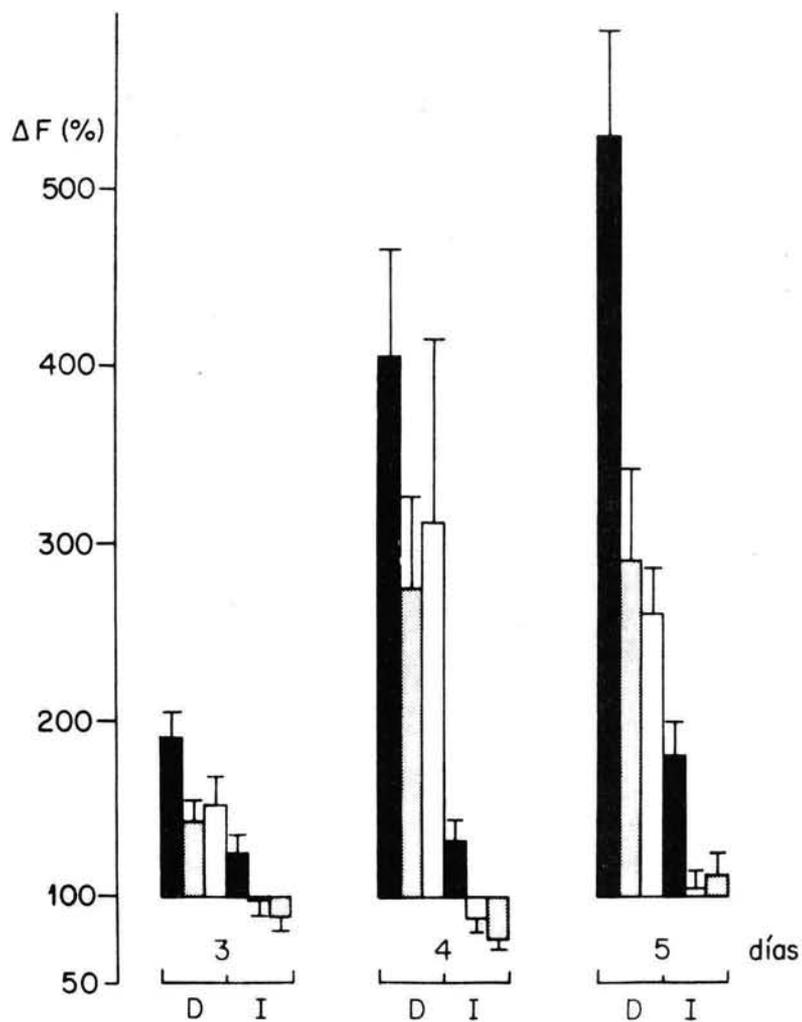


Figura 9.
Histograma de distribución de la fijación de α -BuTX en músculos desnervados (D) e innervados(I).

- Fijación corregida
 - Fijación no corregida
 - ▨ Fijación de parejas de músculos (desn. e iner.) cuyos pesos difieren entre sí por lo menos de 5 %
- Las barras representan el error estandar.

En esta figura $F_t = 100\%$. Nótese que debido al factor de corrección A, las fijaciones corregidas (barras claras) son menores que las no corregidas (barras oscuras), y que en el caso de los músculos inervados no hay aumento de fijación de $^3\text{H-}\alpha$ -bungarotoxina. Dada la discrepancia entre nuestros resultados y los obtenidos por otros autores (véase Berg y Hall, 1974; Lavoie et al., 1975; Bray et al., 1979), podría arguirse que el músculo inervado de los animales con sección espinal no estuvo totalmente inactivo, y que un pequeño grado de actividad pudo haber prevenido la aparición de hipersensibilidad a la ACh (véase Lømo y Westgaard, 1972). De hecho, como puede verse en la Fig. 8, la atrofia de los músculos desnervados fue ligeramente mayor que la de los inervados, aunque la diferencia no pareció ser significativa cuando se aplicó la prueba de t de Students, los valores de p fueron menores que 0.5 para los casos de los músculos estudiados 4 y 5 días después de la sección medular y menor de 0.1 por los de 3 días. Aún así, decidimos seleccionar parejas de músculos (desnervados e inervados; cada pareja fue obtenida de un mismo animal) cuyos pesos difiriesen entre sí por los menos de 5%. La Fec de estos músculos se encuentra expresada por las barras punteadas en la Fig. 9. Como puede verse, tampoco hubo incremento de la fijación en los músculos inervados.

Fijación de $^3\text{H-}\alpha$ -bungarotoxina en animales intoxicados con Tullidora

La parálisis flácida que se desarrolla en los animales

intoxicados puede ser manifestación del bloqueo de la conducción nerviosa en los axones motores (Muñoz-Martínez y Chávez, 1979; Muñoz-Martínez, Cueva y Joseph-Nathan, 1979) sin que exista desnervación anatómica. Si éste fuese el caso y, en vista de los resultados anteriores, parece poco probable que la inactividad muscular que podría haber sido producida por un posible bloqueo nervioso, llegase a producir un incremento en la síntesis de receptores a la ACh y un aumento correspondiente en la fijación de α -bungarotoxina. En todo caso, la inactividad podría producir un pequeño incremento (barras obscuras en la Fig. 9) que, como vimos, es resultado de la atrofia muscular, lo que no implica aumento en el número de receptores por músculo (o por fibra muscular). En los animales intoxicados no fue posible determinar el grado de atrofia muscular ya que, como se mencionó en la INTRODUCCION, después del tratamiento los animales disminuyen su ingestión de alimento y pierden peso corporal, de forma que la posible atrofia muscular en estos animales podría reflejar el estado de caquexia generalizada además de la inactividad. Así pues, la fijación de α -bungarotoxina en los músculos de animales intoxicados será expresada como incremento porcentual por mg de peso seco.

En la primera serie de experimentos con animales intoxicados con extractos crudos de *Tullidora* (véase METODOS), se seleccionaron ratas que mostraban parálisis flácida total de las extremidades posteriores, entre 45 y 48 días después de la administración de una sola dosis. La Fig. 10A muestra los resultados obtenidos para el músculo soleo de cinco

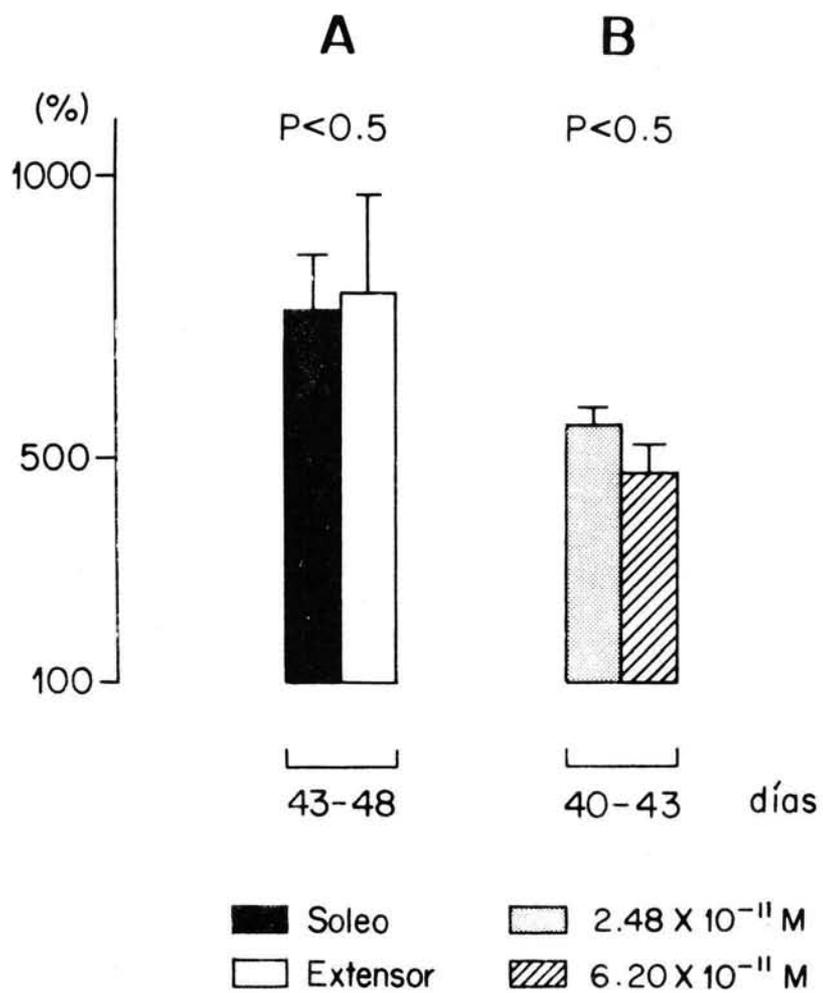


Figura 10.
 Histograma de distribución de la fijación de α -BuTX en musculos de ratas intoxicadas con Tullidora. (véase el texto). Las barras representan el error estandar.

animales (barra oscura); la fijación aumentó en más del 600%. Posteriormente se discutirá que este aumento no puede ser causado únicamente por la posible atrofia muscular (véase la DISCUSION). La barra clara de la Fig. 10A corresponde a los resultados obtenidos en el músculo extensor largo de los dedos (músculo de sacudida rápida). Dado que no existen diferencias entre las fijaciones por parte de este músculo comparada con la del soleo (músculo de sacudida lenta), puede concluirse que el aumento de receptores probablemente ocurre en todos los músculos de las extremidades posteriores, independientemente de las propiedades mecánicas de éstos, de tal forma que los resultados obtenidos con ambos músculos pueden ser agrupados.

La Fig. 10B muestra los resultados obtenidos en otros animales que fueron sacrificados entre 40 y 43 días después de la administración de Tullidora. En este caso se utilizaron dos concentraciones diferentes de ^3H - α -bungarotoxina, pero los resultados fueron comparables, por lo que también es válido agrupar los resultados obtenidos con estas dos concentraciones. Nótese, sin embargo, que en los músculos de los animales sacrificados entre 40 y 43 días muestran menos fijación que en caso de los obtenidos entre 43 y 48 días, lo cual sugiere que el aumento en el número de receptores a la ACh aumenta progresivamente. En efecto, como se muestra en la Fig. 11A, la fijación de ^3H - α -bungarotoxina comenzó a aumentar claramente entre 22 y 28 días después de la administración de los principios activos de la Tullidora (homogenizados crudos) y continuó aumentando hasta alcanzar un valor

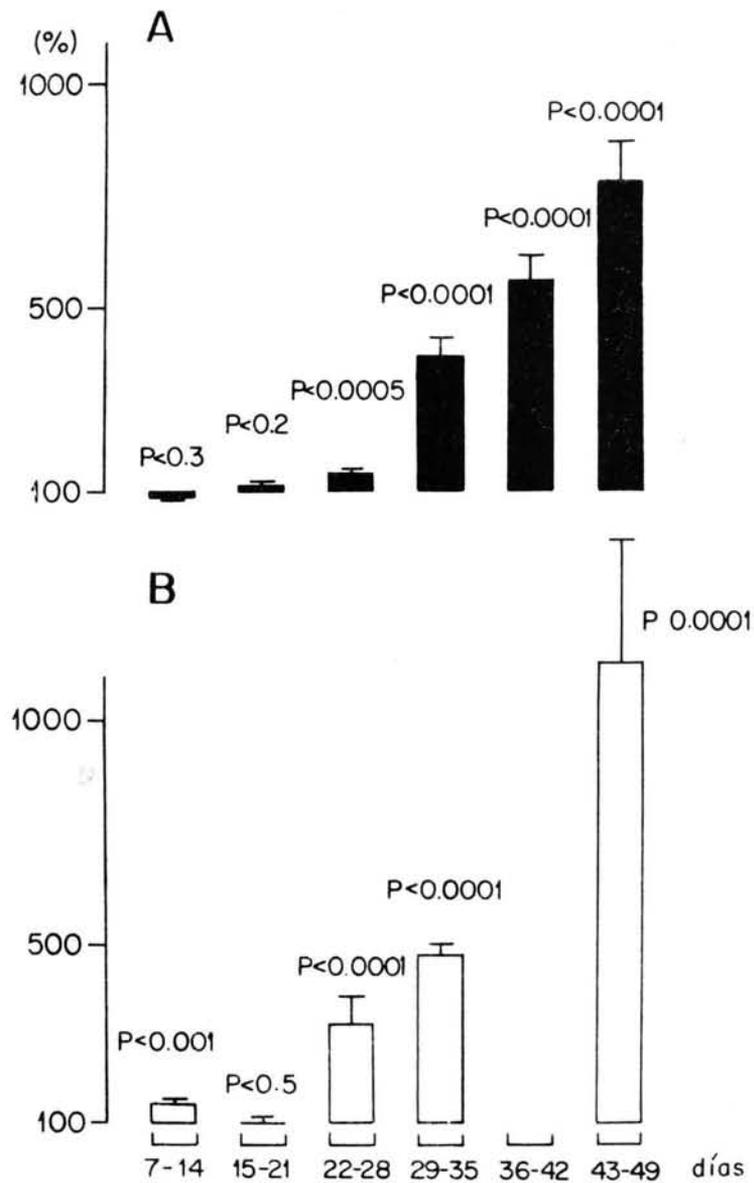


Figura 11.
 Histograma de distribución de la fijación de α -BuTX en músculos soleo y extensor largo de los dedos de animales intoxicados con Tullidora (A) o con Tullidinol (B), (véase el texto). Las barras representan el error estandar.

máximo entre 43 y 49 días; no se estudió la fijación en animales intoxicados durante períodos mayores. Nótese en la Fig. 11A un pequeño incremento (110%) para el caso de los animales sacrificados entre 15 y 21 días después de la intoxicación, pero dicho aumento no fue estadísticamente significativo ($p < 0.2$; probabilidad *t* de Students). Sin embargo, la baja significación puede resultar de la dispersión de los valores testigos, ya que para esta serie experimental, los músculos testigo fueron procesados por separado. Con el objeto de establecer con mayor precisión en qué momento aparece el aumento de receptores en los animales intoxicados, se realizaron experimentos en los que, para cada caso, los músculos de animales intoxicados fueron incubados conjuntamente con músculos testigos, de manera que la fijación de $^3\text{H}-\alpha$ -bungarotoxina en los primeros fue referida a la fijación en los testigo incubados en las mismas condiciones; además en estos experimentos siempre se utilizó la misma concentración de α -bungarotoxina (2.48×10^{-11} M). Como se muestra en la Fig. 12 el aumento de fijación fue estadísticamente significativo para los músculos de animales intoxicados entre 15 y 16 días. Conviene remarcar que antes de estas fechas, los animales intoxicados no mostraron signos motores aparentes. Así pues, el propósito de averiguar en qué momento aparece el aumento de la fijación fue razonablemente satisfecho: entre 15 y 16 días después de la intoxicación.

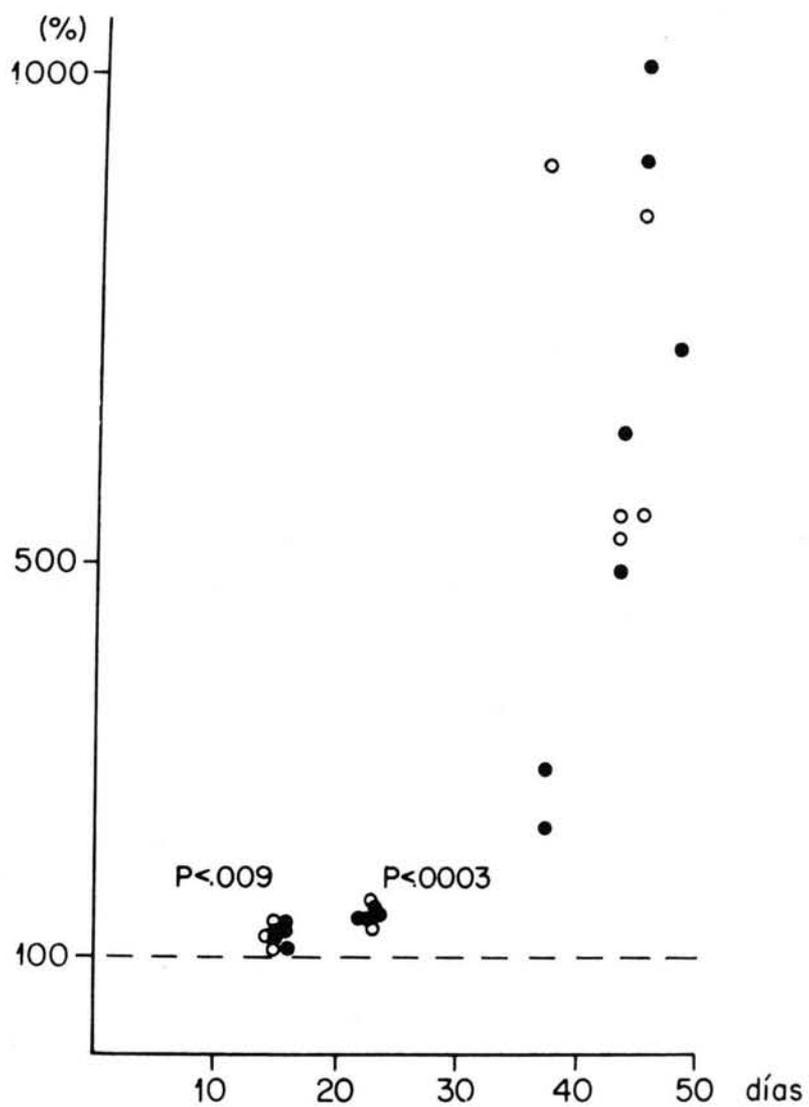


Figura 12.
Incremento de la fijación de α -BuTX en músculos \bullet Soleo y \circ Extensor largo de los dedos de animales intoxicados con Tullidora, los que fueron incubados con músculos normales, (véase el texto).

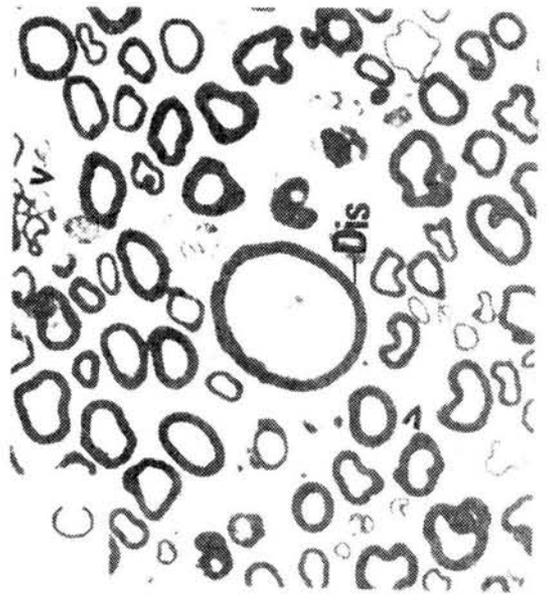
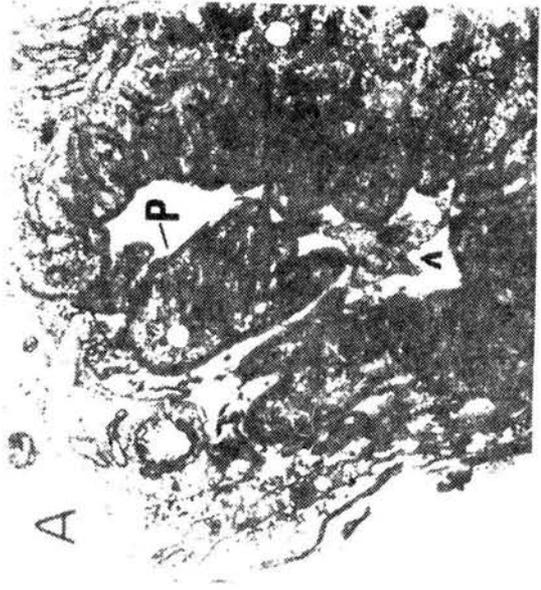
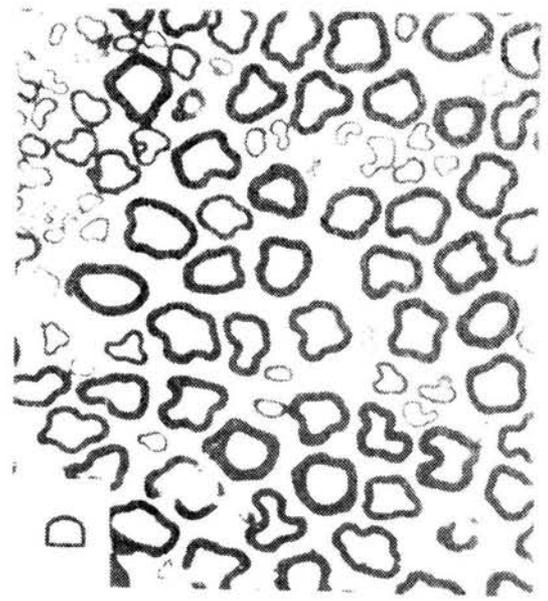
Fijación de ^3H - α -bungarotoxina en animales intoxicados con Tullidinol.

La Fig. 11B muestra los resultados obtenidos en animales intoxicados con Tullidinol (véase Fig. 1). Aunque el número de animales estudiados fue menor, parece claro que el Tullidinol reproduce los efectos encontrados en animales intoxicados con homogenados crudos de la almendra del fruto, aunque deben señalarse dos diferencias. Por un lado, en los músculos de animales tratados con la sustancia pura, parece ocurrir un aumento significativo en la fijación de ^3H - α -bungarotoxina entre 7 y 14 días después de la administración. Por otra parte, para cada intervalo considerado la fijación fue mayor cuando se utilizó el Tullidinol (compárense los resultados de la Fig. 11 A y B).

Desnervación anatómica en músculos de animales intoxicados.

Los datos obtenidos mediante el uso de α -bungarotoxina indican que el aumento en el número de receptores a la ACh es compatible con un proceso de desnervación. Para verificar si en efecto existe desnervación anatómica bajo el efecto de la neurotoxina de la Tullidora (Tullidinol) se extrajeron los músculos de animales intoxicados y se fijaron *in vitro* con una solución de glutaraldehído (vease METODOS). Una vez fijado el músculo, se localizaron bajo el microscopio estereoscópico zonas de fibras musculares en cuya vecindad se observasen ramas axónicas terminales; y se obtuvo un fragmento del músculo que contuviese dichas zonas, el cual

fue procesado para microscopía electrónica. También se disecaron ramas nerviosas intramusculares, el tronco nervioso del soleo, así como dos porciones del nervio ciático. La Fig. 13 A muestra una placa muscular desnervada. La desnervación no parece deberse a degeneración axonal extensa: si bien se observaron alteraciones en algunos axones intramusculares, las alteraciones estructurales fueron menores en el tronco nervioso y menores aún en el nervio ciático. Es decir, las alteraciones estructurales parecen circunscribirse o ser más intensas en la porción terminal de los axones motores, por lo que la neuropatía causada por la toxina de la Tullidora es del tipo "muerte retrógrada" ("dying back neuropathy"). No obstante, aunque las alteraciones axonales se presentan en la porción distal de los nervios musculares, las células de Schwann muestran un aumento aparente de la masa citoplasmática que es evidente aun en fascículos del nervio ciático tomados en la parte superior del muslo aunque en forma menos extensa (véase Fig. 13C).



A) Microfotografía de una placa muscular colapsada y sin terminal nerviosa asociada a ella, excepto quizás por lo que parecen restos o fragmentos de tejido axonal (flecha). Nótese los pliegues (P) característicos de la placa motora. En las placas neuromusculares normales, la región de los pliegues está asociada a la terminal nerviosa. La muestra fué tomada del músculo soleo de una rata intoxicada con Tullidino1 (12 000 aumentos).

B) Ramas nerviosas intramusculares disecadas en la ve cindad de la placa motora que se muestra en A. Nótese una vaina de mielina (flecha) que no envuelve al axón que - normalmente se asocia a ella. Algunas fibras nerviosas - muestran signos claros de degeneración (Deg) mientras que el aspecto de otras fibras es normal(N). Microscopía electrónica (2 600 aumentos).

C) Sección del nervio ciático del mismo animal. En - comparación con las ramas intramusculares (véase B) las alteraciones en el nervio ciático son menos importantes. Nótese un axón engrosado (axón distrófico, Dis) y el - aumento en la masa citoplásmica de las células de Schwann (flechas). La sección fué tomada a 2 cm. del extremo superior del músculo soleo (Microscopía óptica, 1000 aumentos)

D) Sección del nervio ciático tomada a 2 cm. proximal mente, de la sección ilustrada en C. Nótese el aspecto - esencialmente normal de los axones, aunque persiste el aumento de la masa citoplasmática en algunas células de - Schwann (Microscopía óptica, 1000 aumentos).

DISCUSION

Fijación de ^3H - α -bungarotoxina en músculos inactivos y en músculos desnervados.

De acuerdo con nuestros resultados, la inactividad muscular no produce un aumento real en el número de receptores a la ACh, al menos para el caso de músculos inactivos durante un período de 3 a 5 días. Los animales con choque espinal no se mantuvieron durante períodos más prolongados debido a que después de seis días de la sección medular, las ratas presentan actividad refleja exacerbada (reflejos en masa). El pequeño aumento en la fijación de α -bungarotoxina que aparece cuando los resultados se expresan como dpm/mg de peso seco muscular, desaparece cuando los dpm se corrigieron tomando en cuenta la atrofia muscular. Aceptando que la inactividad muscular mantenida durante cinco días no produce disminución alguna en el número de fibras musculares, puede concluirse que el número de receptores por fibra muscular no cambió.

Nuestros resultados no nos permiten explicar la disparidad con los resultados obtenidos por otros autores. Sin embargo, parece evidente que el grado de hipersensibilidad a la ACh -determinado por el aumento en el número de receptores al neurotransmisor- parece estar relacionado con el tipo de maniobra utilizada para producir inmovilidad. Por ejemplo, Fischbach y Robbins (1971) encontraron que en los músculos soleo de ratas cuyas extremidades posteriores fueron inmovilizadas fijando los huesos de la articulación de

la rodilla, solamente ocurre un aumento poco importante del área sensible a la ACh (normalmente restringida a la placa motora) y al mismo tiempo una disminución de la sensibilidad absoluta; en consecuencia es posible que en estos experimentos no aumentase el número total de receptores. Johns y Thesleff (1961) encontraron hipersensibilidades discretas en el músculo *Tenuissimus* del gato después de la sección espinal y rizotomía dorsal de los segmentos lumbares. Esta maniobra es semejante a la que nosotros utilizamos, pero nuestros resultados difieren de los de Johns y Thesleff, dado que nosotros no encontramos ningún aumento significativo en el número de receptores. Estas diferencias quizás puedan ser explicadas debido a que en los experimentos de estos autores la sección espinal fue realizada en los segmentos lumbares L₄ y L₅ que están relativamente cerca de los núcleos de motoneuronas que inervan al músculo *Tenuissimus*; lo que podría haber provocado la muerte de algunas neuronas por alteración vascular regional. En nuestros experimentos tuvimos la precaución de realizar la sección medular en los segmentos torácicos quinto y séptimo, los que están suficientemente distantes de las motoneuronas del soleo.

La mínima o nula hipersensibilidad encontrada por Fischbach y Robbins quizás sea la manifestación de que los músculos inmovilizados por fijación ósea no estuvieron totalmente inactivos (véase Rosenthal, 1979). De hecho, estos autores estimaron que en esos músculos persistía un pequeño grado de actividad (entre 5 y 15% en comparación con los músculos de animales normales). Podría arguirse que en

nuestros experimentos los músculos tampoco estuvieron totalmente inactivos, lo que podría determinar la pequeña diferencia entre las atrofias de los músculos inactivos y de los músculos desnervados. No obstante, cuando se hizo una selección de los músculos estudiados de tal manera que la atrofia fuese igual en ambos músculos que la diferencia entre ellos fuese menor al 5%, los resultados fueron iguales. Es decir, los músculos desnervados mostraron un aumento considerable en la fijación de la α -bungarotoxina, mientras que los músculos inactivos con atrofias comparables (o menores solamente en 5% o menos), no mostraron aumentos significativos.

La fijación de α -bungarotoxina por unidad de peso encontrada en los presentes experimentos fue menor que la obtenida por Bray et al. (1979) en músculos inmovilizados mediante la aplicación de tetrodotoxina en el nervio ciático (la tetrodotoxina bloquea los canales membranales para el Na que son sensibles al voltaje y por lo tanto impide la generación de potenciales de acción en el axon), pero cabe la posibilidad de que esta maniobra experimental o la tetrodotoxina misma causen alguna otra alteración en los axones que pudiese traer como resultado el aumento en el número de receptores a la ACh. Si los autores mencionados hubiesen corregido sus resultados tomando en cuenta la atrofia muscular, sus resultados quizás no hubiesen mostrado grandes diferencias en comparación con los nuestros.

En vista de nuestros resultados y también los de Bray et al. y Lavoie et al., parece claro que los resultados de Berg y Hall (1974) no fueron correctamente interpretados.

Estos autores inmovilizaron ratas durante períodos de dos a cinco días mediante la administración intraperitoneal continua de d-tubocurarina; los animales fueron mantenidos bajo respiración artificial. En estos experimentos, las fibras musculares del diafragma mostraron una hipersensibilidad a la ACh comparable a la encontrada en diafragmas desnervados, por lo que concluyeron que la inactividad muscular explicaba por completo la hipersensibilidad. Nosotros nos inclinamos a pensar que en estos experimentos la hipersensibilidad fue causada por la d-tubocurarina y no por la inactividad.

Lømo y Rosenthal (1972) y Lømo y Westgaard (1974) demostraron que la aparición de hipersensibilidad puede prevenirse casi completamente en músculos desnervados si éstos son estimulados eléctricamente durante varios días. De hecho, esta observación fue determinante para postular la relación entre inactividad e hipersensibilidad. Sin embargo, las tasas de estimulación aplicada diariamente durante cinco días excedía de 3.5×10^6 impulsos diarios. Esta es una frecuencia que corresponde a una actividad continua de todas las fibras del músculo a 4.17/seg. Por estas observaciones parece muy improbable que la escasa o nula hipersensibilidad por Fischbach y Robbins, así como la ausencia de incremento en el número de receptores en músculos supuestamente inactivos, pueda haberse debido a la permanencia de un nivel discreto de actividad muscular (véase Rosenthal).

Aumento de la fijación de α -bungarotoxina en el músculo soleo de animales intoxicados.

Los resultados parecen ser suficientemente claros. El aumento en el número de receptores a la ACh es compatible con el desarrollo de desnervación, la cual puede ser demostrada en algunas fibras. Sin embargo, desconocemos qué porcentaje de fibras en un músculo dado puedan haber estado desnervadas, y que existe la posibilidad de que algunas no desnervadas fuesen hipersensibles a la ACh. De acuerdo con la hipótesis que postula la existencia de un factor neurotrófico que regularía la síntesis y localización de los receptores a la ACh, la ausencia de este factor produciría aumento en el número de estos receptores sin que fuese necesario que la fibra muscular estuviese desnervada, bastando con que la terminal nerviosa no produjese o liberase el hipotético factor. Para averiguar si existen fibras inervadas con aumento en el número de receptores bajo el efecto del Tullidino1 son necesarios otros experimentos, pero al menos podemos concluir que:

1) Bajo el efecto de Tullidino1, aumenta el número de receptores a la ACh en los músculos de las extremidades posteriores de la rata intoxicada. Dicho aumento ocurre en músculos tanto de sacudida lenta como de sacudida rápida.

2) El aumento en el número de receptores no se debe a inactividad muscular y se debe, al menos en parte, a desnervación de las fibras musculares.

3) El aumento comienza a detectarse al mismo tiempo o aún antes de que sean evidentes los signos de alteraciones

motoras en los animales intoxicados. Dado que en estos animales no es posible estimar en forma confiable el grado del aumento observado entre 15 y 16 días después de la intoxicación podría reflejar una disminución del peso muscular, como fue el caso de los músculos inactivos después de la sección espinal. El aumento observado entre los días 22 y 23 a partir de la intoxicación, difícilmente podrían ser explicados por atrofia muscular por las siguientes razones; supóngase que el proceso de desnervación (o del cese en la liberación de factores neurotróficos; véase arriba), se inicia en todas las fibras musculares entre los días 15 y 16 después de la intoxicación. Si este fuese el caso, una semana después el peso del músculo debería haberse reducido en un 50%, aproximadamente (véase la Fig. 8), pero en este caso el incremento en el número de receptores debería haber sido de un 600% (véase la Fig. 9). Sin embargo, en los animales intoxicados, el incremento fue únicamente de un 30% entre 22 y 28 días. Dado que existe una relación lineal entre el número de fibras desnervadas y el incremento en el número de receptores, si este incremento no es superior al 40%, el número de fibras desnervadas no puede haber sido mayor del 3% ($[30/600] \cdot 100$). Consiguientemente, la atrofia sería despreciable.

El inicio precoz (antes de que se detecten signos de alteraciones motoras) y el curso temporal del incremento en la fijación de α -bungarotoxina (que sabemos resulta de un aumento en el número de receptores a la ACh) hace poco probable la posibilidad de que la hipersensibilidad detectada por

Muñoz-Martínez, Cueva y Joseph-Nathan (1979) en músculos parcialmente inervados de animales intoxicados pudiera ser la manifestación de que las fibras inervadas de estos animales hubieran estado previamente desnervadas, y que posteriormente hubieran sido reinervadas antes de que desapareciese la hipersensibilidad por desnervación (véase INTRODUCCION).

4) Por último, la substancia purificada (Tullidinol) reproduce los efectos consecuentes a la administración de homogenados crudos del fruto de la Tullidora. Por lo tanto, puede concluirse que esta substancia puede explicar la toxicidad de la planta. De acuerdo con los resultados de la Fig. 11B a la dosis utilizada, el Tullidinol fue más potente que los homogenados crudos, dado que para los mismos períodos, el incremento en la fijación de α -bungarotoxina producido por la substancia pura fue mayor.

REFERENCIAS

- ALBUQUERQUE, E.X. y MC ISSAC, R.J. (1970). Fast and slow mammalian muscles after denervation. *Expl. Neurol.* 26: 183-202.
- ALBUQUERQUE, E.X., WARNICK, J.E., TASSE, J.R. y SANSONE, F.M. (1972). Effects of vinblastine and colchicine on neural regulation of the fast and slow skeletal muscles of the rat. *Expl. Neurol.* 37: 607-634.
- AOKI, K. y MUÑOZ-MARTINEZ, E.J. (1981). Quantitative changes in myelin proteins in a peripheral neuropathy caused by *Tullidora* (*Karwinskia humboldtiana*). *J. Neurochem.* 36: 1-8.
- ARAI, I., DREYER, D.L., ANDERSON, W.R. y DAVES, G.D. (1978). Neurotoxins of *Karwinskia humboldtiana*. Atropisomerism and diastereomeric oxidation products. *J. Org.Chem.* 43: 1253-1254.
- AXELROD, D., RAVDIN, M.P. Y PODLESKI, R.T. (1978). Control of acetylcholine receptor mobility and distribution in cultured muscle membranes. *B.B. Acta* 511: 23-38.
- AXELSSON, J. y THESLEFF, S. (1959). A study of sensitivity in denervated mammalian skeletal muscle. *J. Physiol.* 147: 178-193.

BERG, D.K., KELLY, R.B., SARGENT, P.B., WILLIAMSON, P. y HALL, Z.W. (1972). Binding of α -bungarotoxin to acetylcholine receptors in mammalian muscle. Proc. Nat. Acad. Sci. 69: 147-151.

BERG, D.K. Y HALL, Z.W. (1974). Fate of α -bungarotoxin bound to acetylcholine receptors of normal and denervated muscle. Science 184: 473-475.

BERG, D.K. y HALL, Z.W. (1975). Loss of α -bungarotoxin from junctional and extrajunctional acetylcholine receptors in rat diaphragm muscle *in vivo* and in organ culture. J. Physiol. 252: 771-789.

BEVAN, S. y STEINBACH, H.J. (1977). The distribution of α -bungarotoxin binding sites on mammalian skeletal muscle developing *in vivo*. J. Physiol. 267: 195-213.

BRAY, J.J., HUBBARD, J.I. y MILLS, R.G. (1979). The trophic influence of tetrodotoxin-inactive nerves on normal and re-innervated rat skeletal muscles. J. Physiol. 297: 479-491.

BROCKES, J.P. y HALL, Z.W. (1975). Acetylcholine receptors in normal and denervated rat diaphragm muscle. I. Purification and interaction with (125 I)- α -bungarotoxin. Biochem. 14: 2092-2099.

BROCKES, J.P. y HALL, Z.W. (1975). Acetylcholine receptors in normal and denervated rat diaphragm muscle. II. Comparison of junctional and extrajunctional receptors. *Biochemistry* 14: 2100-2106.

CASTILLO NAJERA, R. (1920). Contribución al estudio de las parálisis tóxicas. Un envenenamiento colectivo por Tullidora. *Memorias del V Congreso Médico Mexicano* 1: 240-244.

CHANG, C.C. y LEE, C.Y. (1963). Isolation of neurotoxins from the venom of *Bungarus multicinctus* and their modes of neuromuscular blocking action. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 144: 241-257.

CHANG, C.C., CHEN, T.F. y CHUANG, S.T. (1973a). N,O-di and N,N,-tri[³H]acetyl- α -bungarotoxins as specific labelling agents of cholinergic receptors. *Br. J. Pharmacol.* 47: 147-160.

CHANG, C.C., CHUANG, S.T. y HUANG, M.C. (1975). Effects of chronic treatment with various neuromuscular blocking agents on the number and distribution of acetylcholine receptors in the rat diaphragm. *J. Physiol.* 250: 161-173.

CHANG, C.C. y HUANG, M.C. (1975). Turnover of junctional and extrajunctional acetylcholine receptors of the rat diaphragm. *Nature.* 253: 643-644.

CHARLTON, K.M. y PIERCE, K.R. (1970a). A neuropathy in goats caused by experimental Coyotillo (*Karwinskia humboldtiana*) poisoning. II. Lesions in the peripheral nervous system— teased fiber and acid phosphatase studies. Path. Vet. 7: 385-407.

CHARLTON, K.M. y PIERCE, K.R. (1970b). A neuropathy in goats caused by experimental Coyotillo (*Karwinskia humboldtiana*) poisoning. III. Distribution of lesions in peripheral nerves. Path. Vet. 7: 408-419.

CHARLTON, K.M. y PIERCE, K.R. (1970c). A neuropathy in goats caused by experimental Coyotillo (*Karwinskia humboldtiana*) poisoning. IV. Light and electron microscopic lesions in peripheral nerves. Path. Vet. 7: 420-434.

CHARLTON, K.M., PIERCE, K.R., STORTS, R.W. y BRIDGES, C.H. (1970). A neuropathy in goats caused by experimental Coyotillo (*Karwinskia humboldtiana*) poisoning. V. Lesions in the central nervous system. Path. Vet. 7: 435-447.

CHARLTON, K.M., CLABORN, L.D. y PIERCE, K.R. (1971). A neuropathy in goats caused by experimental Coyotillo (*Karwinskia humboldtiana*) poisoning: clinican and neurophysiological studies. Am. J. Vet. Res. 32: 1381-1389.

CLAVIJERO, F.X. (1933). Historia de la Antigua o Baja California (Trad.). Impresiones del Museo Nacional de Arqueología, Historia y Etnografía. México.

CRISS, HH., KUFFLER, S.W. y YOSHIKAMI, D. (1975). The number of acetylcholine molecules in a quantum and the interaction between quanta at the subsynaptic membrane of the skeletal neuromuscular synapse. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 40: 175-186.

CUEVA, J. (1979). Alteraciones neurotróficas por la intoxicación con Tullidora (*Karwinskia humboldtiana*). Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias, especialidad en Neurociencias. CIEA-IPN.

CUEVA, J., MUÑOZ-MARTINEZ, E.J. (1980). Hipersensibilidad a la ACh en fibras musculares inervadas; un efecto de la intoxicación por Tullidora (*Karwinskia humboldtiana*). *Bol. Estud. Méd. Biol. Méx.* 31: 48-49.

DEL CASTILLO, J. y KATZ, B. (1955). On the localization of acetylcholine receptors. *J. Physiol.* 128: 157-181.

DREYER, F. y PEPPER, K. (1974). The acetylcholine sensitivity in the vicinity of the neuromuscular junction of the frog. *Pflug. Arch.* 348: 273-286.

DREYER, F. y PEPPER, K. (1975). Density and dose-response curve of acetylcholine receptor in frog neuromuscular junction. *Nature* 253: 641-643.

DRYDEN, W.F. y HARVEY, A.L. (1974). The effect of receptor desensitization on the action of α -bungarotoxin on cultured skeletal muscle. *Br. J. Pharmacol.* 51: 456-458.

ELMQVIST, D. y THESLEFF, S. (1960). A study of acetylcholine induced contractures in denervated mammalian muscle. *Acta pharmacol. Toxicol.* 17: 84-93.

ESCOBAR, I. y NIETO, D. (1965). Aspectos neuropatológicos de la intoxicación con *Karwinskia humboldtiana*. Estudio experimental. *Gac. Méd. Méx.* 95: 163-177.

FAMBROUGH, D.M. y HARTZELL, H.C. (1972). Acetylcholine receptors number and distribution at neuromuscular junctions in rat diaphragm. *Science* 176: 189-191.

FAMBROUGH, D.M. (1974). Acetylcholine receptors. Revised estimates of extrajunctional receptor density in denervated rat diaphragm. *J. Gen. Physiol.* 64: 468-472.

FAMBROUGH, D.M. (1979). Control of acetylcholine receptors in skeletal muscle. *Physiol. Rev.* 59: 165-227.

FERTUCK, C.H. y SALPETER, M.M. (1976). Quantitation of junctional and extrajunctional acetylcholine receptors by electron microscope autoradiography after ^{125}I - α -bungarotoxin binding at mouse neuromuscular junctions. *J. Cell Biol.* 69: 144-158.

FISCHBACH, G.D. y ROBBINS, N. (1971). Effect of chronic disuse of rat soleus neuromuscular junctions on postsynaptic membrane. *J. Neurophysiol.* 34: 562-569.

FRANK, E., GAUTVIK, K. y SOMMERSCHILD, H. (1975). Persistence of junctional acetylcholine receptors following denervation. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 40: 275-281.

FRANK, E., GAUTVIK, K. y SOMMERSCHILD, H. (1975). Cholinergic receptors at denervated mammalian motor end-plates. *Acta physiol. scand.* 95: 66-76.

HARTZELL, H.C. y FAMBROUGH, D.M. (1972). Acetylcholine receptors. Distribution and extrajunctional density in rat diaphragm after denervation correlated with acetylcholine sensitivity. *J. gen. Physiol.* 60: 248-262.

HOFFMAN, W.W. y THESLEFF, S. (1972). Studies on the trophic influence of nerve on skeletal muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 20: 256-260.

JOHNS, T.R. y THESLEFF, S. (1961). Effects of motor inactivation on the chemical sensitivity of skeletal muscle. *Acta physiol. scand.* 51: 136-141.

JONES, R. y VRBOVA, G. (1971). Can denervation hypersensitivity be prevented? *J. Physiol.* 217: 67P-68P.

JONES, R. y VRBOVA, G. (1974). Two factors responsible for the development of denervation hypersensitivity. *J. Physiol.* 236: 517-538.

JONES, R. y VYSKOCIL, F. (1975). An electrophysiological examination of the changes in skeletal muscle fibres in response to degenerating nerve tissue. *Brain Res.* 88: 309-317.

KATZ, B. y MILEDI, R. (1964). Further observations on the distribution of acetylcholine reactive sites in skeletal muscle. *J. Physiol.* 170: 379-388.

KATZ, B. y MILEDI, R. (1973). The effect of α -bungarotoxin on acetylcholine receptors. *Br. J. Pharmacol.* 49: 138-139.

KATZ, B. y THESLEFF, S. (1957). A study of the desensitization produced by acetylcholine at the motor end-plate. *J. Physiol.* 138: 63-80.

LAVOIE, P.A., COLLIER, B. y TENENHOUSE, A. (1977). Role of skeletal muscle acetylcholine sensitivity. *Expl. Neurol.* 54: 148-181.

LEE, C.Y., TSENG, L.F. y CHIU, T.H. (1967). Influence of denervation on localization of neurotoxins from clapid venoms in rat diaphragm. *Nature* 215: 1177-1178.

- LEE, C.Y., CHANG, S.L., KAU, S.T. y LUH, S.H. (1972b).
Chromatographic separation of the venom of *Bungarus multicinctus* and characterization of its components. J. Chromatogr. 72: 71-82.
- LØMO, T. y ROSENTHAL, J. (1972). Control of acetylcholine sensitivity by muscle activity in the rat. J. Physiol. 221: 493-513.
- LØMO, T. y WESTGAARD, R.H. (1975). Further studies on the control of acetylcholine sensitivity by muscle activity in the rat. J. Physiol. 252: 603-626.
- LUCO, J.V. y EYZAGUIRRE, C. (1955). Fibrillation and hypersensitivity to ACh in denervated muscle: effect of length of degenerating nerve fibers. J. Neurophysiol. 18: 65-73.
- MARSH, C.D., CLAWSON, A.B. y ROE, G.C. (1958). Coyotillo (*Karwinskia humboldtiana*) as a poisonous plant. Tech. Bull. U.S. Dept. Agric. Washington, D.C. 29: 1-27.
- MILEDI, R. (1960a). The acetylcholine sensitivity of frog muscle fibers after complete or partial denervation. J. Physiol. 151: 1-23.
- MILEDI, R. (1960b). Junctional and extra-junctional acetylcholine receptors in skeletal muscle fibres. J. Physiol. 151: 24-30.

MILEDI, R. y POTTER, L.T. (1971). Acetylcholine receptors in muscle fibres. *Nature* 233: 599-603.

MITCHELL, J., WELLER, R.O., EVANS, H., ARAI, I. y DAVES, G.D. (1978). Buckthorn neuropathy: effects of intraneural injection of *Karwinskia humboldtiana* toxins. *Neuropath. Appl. Neurobiol.* 4: 85-97.

MUÑOZ-MARTINEZ, E.J. y CHAVEZ, B. (1979). Conduction block and functional denervation caused by Tullidora (*Karwinskia humboldtiana*). *Expl. Neurol.* 65: 255-270.

MUÑOZ-MARTINEZ, E.J. y CUEVA, J. (1979). Hypersensitivity to ACh in innervated muscle fibers. *Proc. IX Ann. Meet. Soc. Neurosc.* p. 768. Atlanta, GA, EUA.

MUÑOZ-MARTINEZ, E.J., CUEVA, J. y JOSEPH-NATHAN, P. (1979). Un principio activo de la Tullidora (*Karwinskia humboldtiana*). *Rev. Soc. Quím. Méx.* 23: 314.

MUÑOZ-MARTINEZ, E.J., NUÑEZ, R. y SANDERSON, A. (1981). Axonal transport: a quantitative study of retained and transported protein fractions. *J. Neurobiol.* 12: 15-26.

PADRON, F. (1951). Estudio experimental de la parálisis por *Karwinskia humboldtiana* (Tullidora) en niños. *Gac. Méd. Mex.* 8: 299-311.

PADRON, F. y VELAZQUEZ, T. (1956). Patología experimental y clínica de la parálisis por *Karwinskia humboldtiana*. Rev. Mex. Pediat. 25: 225-237.

PESTRONK, A., DRACHMAN, D.B. y GRIFFIN, J. (1976). Disuse of muscle: effect on extrajunctional acetylcholine receptors. Nature 260: 352-358.

PORTER, C.W., BARNARD, E.A. y CHIU, T.H. (1973). The ultrastructural localization and quantitation of cholinergic receptors at the mouse motor endplate. J. Membrane Biol. 14: 383-402.

RANG, H.P. (1975). Acetylcholine receptors. Quart. Rev. Biophys. 7: 283-399.

ROSENTHAL, J. (1979). Trophic interactions of neurons. En: Handbook of Physiology, J.M. Brockhart, V.B. Mountcastle (Eds.), Cap. 21: 775-801. Waberly Press, Baltimore.

STILLER, B.A. (1969). Experimentación clínica de la intoxicación por *Karwinskia humboldtiana* en el ganado caprino en la región norte del Estado de Coahuila. Tesis para obtener el grado de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

TERAN, F. y MUÑOZ-MARTINEZ (1976). Efectos de la *Karwinskia humboldtiana* sobre la velocidad de conducción en nervios periféricos. Bol. Inst. Est. Méd. Biol. Méx. 29: 291-292.

UCHITEL, O. y ROBBINS, N. (1978). On the appearance of acetylcholine receptors in denervated rat diaphragm and its dependence on nerve stump length. Brain Res. 153: 539-548.

VILLANUEVA, T.T. (1968). Estudio farmacológico preliminar de algunos extractos de *Karwinskia humboldtiana* (Tullidora). Tesis para obtener el título de Químico Farmacobiólogo. Escuela de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de San Luis Potosí.