

203



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

SOBREVIDA DE CELULAS CULTIVADAS DE Galphimia glauca INJERTADAS EN EL PARENQUIMA CEREBRAL DE RATAS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A
MARIA GUADALUPE TORRES FUENTES



290461



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
"Sobrevida de células cultivadas de Galohimia glauca
injertadas en el marénquima cerebral de ratas".

realizado por TORRES FUENTES MA. GUADALUPE.

con número de cuenta 8650009-2 , pasante de la carrera de **BIOLOGÍA**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario DR. GRIJALVA OTIRO JOSÉ ERREN ISRAEL

Propietario M. en C. GONZÁLEZ IBARRA MINERVA LEONOR

Propietario BIOL. GONZÁLEZ AVALOS MA. RAQUEL

Suplente M. en C. OSUNA FERNÁNDEZ VIDA MARISA

Suplente M. en C. QUIROZ TORRES AGUSTÍN DOMÍNGO

FACULTAD DE CIENCIAS
U N A M

Consejo Departamental de Biología.

Edna María Suárez Díaz
DRA. EDNA MARÍA SUÁREZ DÍAZ



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGÍA

El Presente Trabajo de Investigación fue realizado en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas del Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social, y en las instalaciones del Centro de Investigación Proyecto Camina A.C.. El financiamiento para el mismo fue de ambas partes, contando con el apoyo de la Unidad de Investigación Biomédica del sur del IMSS en Xochitepec Mor.

DEDICO ESTA TESIS:

A DIOS

A MI MADRE, Y A MI TÍA YOLANDA POR SU AMOR INCONDICIONAL A LO LARGO DE TODA MI VIDA.

A MIS HERMANOS GABRIEL Y JUAN RAMÓN.

A MIS MAESTROS POR SUS ENSEÑANZAS.

A MIS AMIGOS, ANGEL, EDITH, JUDITH, ALEJANDRA, JOSÉ ANTONIO, YURJANA Y ROSALINA, POR SU AMISTAD Y COMPañÍA A LO LARGO DE LA CARRERA.

UN ESPECIAL AGRADECIMIENTO:

*A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE CIENCIAS*

AL DR. GRIJALVA POR SU ASesorÍA Y APOrTE DE CONOCIMIENTOS.

AL CENTRO DE INVESTIGACIÓN "PROYECTO CAMINA" POR PERMITIR EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO.

AL DR. TORTORIELLO Y A LA BIOL. LIDIA OSUNA POR EL APOYO BRINDADO PARA LA REALIZACIÓN DE ESTA TESIS.

ALOS DRs. SERGIO SÁNCHEZ, Y JAQUELINE SÁNCHEZ POR SU AYUDA PARA HACER POSIBLE ESTE OBJETIVO.

A LA DRA ALMA PATRICIA POR SU APOYO PARA LOGRAR ESTA META

A LOS PROFESORES DEL JURADO POR SUS APORTACIONES VALIOSAS PARA EL MEJORAMIENTO DE ESTE TRABAJO.

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS DE "PROYECTO CAMINA" ANGELINA, ALBERTO, SERGIO, RAFAEL, DR. ALIEJO HERNÁNDEZ, DRA. GÓMEZ Y SRA. ENNA BOJISEA UÑEAU POR SU AMISTAD Y DEDICACIÓN PRESTADA A MI PROYECTO.

ÍNDICE

RESÚMEN	VIII
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
Historia de los Trasplantes	3
Los Trasplantes en el SNC	4
Respuesta Inmune	5
Inmunología del SNC	5
Importancia de la Biotecnología en los Implantes Vegetales	6
Implantes Vegetales	7
Pruebas Usadas para la Determinación de Viabilidad Vegetal	9
Etnobotánica de <i>Galphimia glauca Cav</i>	10
Farmacología de <i>Galphimia glauca Cav</i>	11
JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	14
MATERIALES Y MÉTODOS	15
Diseño Experimental biomédico	15
Muestra	15
Grupo experimental y Testigo	15
Etapas del Estudio	15
PROCEDIMIENTOS GENERALES	16

Obtención y Preparación del tejido vegetal a implantar	16
Método de Anestesia	18
Técnica Quirúrgica: Craneotomía	18
a) Células en Callo	20
b) Células Disociadas	21
c) Gelfoam	21
Cuidados Posoperatorios	22
DETERMINACIÓN DE VIABILIDAD VEGETAL	22
Prueba de Fluoresceína propidio	22
Recultivo	23
RESULTADOS	24
Estudio de fluoresceína propidio	24
Recultivo	32
DISCUSIÓN	33
CONCLUSIONES	36
PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN	36
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
APÉNDICE A	42
APÉNDICE B	43
APÉNDICE C	44

RESÚMEN

Con base en algunos trabajos previos sobre el estudio de la interacción de un tejido vegetal implantado en un hospedero animal, se decidió demostrar la sobrevivencia de células vegetales cultivadas *in vitro* de *Galphimia glauca*, injertadas en el parénquima cerebral de ratas, así como comparar la sobrevivencia de injertos provenientes de cultivos en callo y de suspensión semanalmente durante cuatro semanas. Estas células fueron injertadas en condiciones de esterilidad dentro del parénquima cerebral de ratas mediante la práctica de una craneotomía a cada animal. Cada semana, la viabilidad celular fue demostrada tanto con la prueba de fluoresceína-propidio como con el recultivo de tejido implantado en un medio de cultivo sólido especial para *Galphimia glauca*.

Los resultados demostraron sobrevivencia de las células en todos los tiempos y en ambos tipos de implante estudiados; sin embargo, la morfología de las células fue diferente desde la primer semana y el tejido procedente del cultivo líquido, mostró evidencia de diferenciación celular a la tercera semana, lo cual no fue observable en el implante de callo a ningún tiempo de seguimiento. Por otro lado, parte del tejido implantado en callo, al ser recultivado en su medio de cultivo original mostró evidencia de crecimiento, no siendo el caso del implante de células disociadas, donde no se observó crecimiento.

Se concluye que los tipos de implante utilizados aunque difieren en la morfología celular y en su capacidad para diferenciarse, ambos pueden sobrevivir dentro de un hospedero animal.

INTRODUCCIÓN

El presente trabajo aborda una nueva línea de investigación, el trasplante de células vegetales en organismos animales, también llamados trasplantes inter-regni. Tejidos cultivados de varias especies vegetales tales como *Mimosa tenuiflora*, *Nicotiana tabacum*, *Zea mays* y *Galphimia glauca* se han injertado en diferentes órganos de rata, pudiéndose comprobar la sobrevivencia de las células dentro de un medio ambiente animal.

La micropropagación de tejidos vegetales ha jugado un papel muy importante en este tipo de procedimientos, ya que mediante ella se logra la producción de los llamados callos, (conjuntos de células totipotenciales e indiferenciadas en medios de cultivo propios de cada especie) que han sido usados en diferentes líneas de investigación, como lo es la producción de metabolitos de importancia farmacológica que no han podido ser sintetizados químicamente, y que han sido estudiados desde el punto de vista biomédico y químico. La difícil germinación de algunas especies ha sido lograda mediante éstos métodos, los cuáles permiten además probar, cuál es el medio más adecuado para ello (Jenq-chuan Yang y cols; 1995). También se ha logrado la regeneración de algunas especies, tal es el caso de *Eucalyptus camaldulensis*, cuyos cultivos *in vitro* han logrado aumentar a los miembros de esta especie considerablemente (Shu-hwa Chang y cols; 1995). Esto es importante sobre todo al aplicarlo a especies en peligro de extinción.

Dentro del conocimiento médico tradicional, las plantas han sido retomadas en el campo de la investigación, particularmente con fines terapéuticos

En este trabajo se realizaron dos tipos de implante: a) células directamente del callo, y b) tejido vegetal disociado proveniente de un cultivo líquido. Ambos fueron injertados directamente en el parénquima cerebral de ratas comparándose la sobrevivencia en ambos casos. La planta elegida para este trabajo fue la especie *Galphimia glauca*, que presenta como uno de sus principios activos galphimina B, compuesto que recientemente se ha demostrado posee propiedades anticonvulsivas y sedantes.

La interacción entre ambos reinos, muestra múltiples preguntas por resolver, entre ellas, hallar el conocimiento de la relación que pueden guardar ambos tipos de tejido. La posibilidad de sobrevivencia del injerto en un medio aparentemente adverso abre líneas de investigación respecto a nutrición, mecanismos de tolerancia o de rechazo, producción de metabolitos activos, liberación de los mismos en el hospedero, la respuesta inflamatoria en contra del injerto, el aislamiento o la integración del injerto, la captación de los principios activos, y la determinación de los efectos benéficos o deletéreos que genera el mismo.

Se ha visto que las asociaciones simbióticas entre organismos de diferentes reinos ya no es inusual, el mas remarcable caso ya reportado es la asociación simbiótica entre el molusco *Elisya chlorótica* G. y los cloroplastos de el alga *Vauqueria litorea* C. Cuando el molusco se alimenta de esta alga todo el contenido es desechado excepto los cloroplastos, los cuales son engullidos fagocíticamente en el interior de las células digestivas, y se ha visto que el molusco no solo distribuye estas células por su aparato digestivo (capa que está bajo la epidermis), sino también es capaz de capturar la energía solar y fijar el bióxido de carbono, y en algunos casos el resultado, son productos de carbón que pueden sostener al molusco por varios meses en la ausencia de algas como fuente de alimento. (Rumpho y cols; 2000)

En este trabajo sólo se plantea la sobrevida y la comparación entre dos diferentes tipos de implante, utilizando para ello individuos de diferente reino.

ANTECEDENTES

HISTORIA DE LOS TRASPLANTES

Los trasplantes han existido en todas las culturas médicas, desde la antigua China, hasta la era moderna (Cuervas, 1994) Se sabe sin embargo, que a partir del siglo XVIII la medicina experimental inició estudios sistemáticos que llevaron a generar el conocimiento requerido, para que, casi doscientos años después, los trasplantes pudieran ser parte de la rutina del quehacer quirúrgico de numerosos hospitales en varias partes del mundo (Degos, 1994).

El auto-trasplante de piel, es el trasplante mas antiguo del que se tenga noticia. Para finales del siglo XVIII se realizaron los primeros experimentos científicos de trasplantes de tejidos, (con el propósito explícito de ensayar diversos métodos y técnicas para el mejor desarrollo de los mismos) pero fue hasta el siglo XIX, cuando se amplió el conocimiento sobre la función de algunas glándulas y el papel que la sangre jugaba como nutriente indispensable para el mantenimiento de la vida de los órganos (Cuervas, 1994).

En los últimos decenios del siglo XIX los cirujanos buscaron perfeccionar la técnica de unión de vasos, pensando que si se lograba la adecuada irrigación sanguínea del órgano transplantado su función podría estar garantizada. A partir de aquí, surgieron los modelos pioneros de Carrel en cirugía experimental, que fueron utilizados posteriormente para hacer estudios de circulación, lo que permitió realizar mas tarde, observaciones sobre factores nerviosos y humorales en distintas funciones fisiológicas en organismos quirúrgicamente unidos (Degos, 1994).

A partir de entonces el desarrollo de la inmunología y de la genética ha sido vertiginoso y todos los hallazgos en este campo de la ciencia han hecho comprender la respuesta inmunológica que se da en este tipo de procedimientos, lo cual ha permitido que los trasplantes sean una realidad práctica en varias especialidades de la medicina. Tal es el caso de la realización con éxito del primer trasplante de córnea por Zirm en 1905; del trasplante de corazón realizado por Bernard en 1967, y

del primer trasplante de hígado realizado por Starzi en 1963; por mencionar algunos ejemplos (Cuervas, 1994).

TRASPLANTES EN EL SNC

Por otra parte el sistema nervioso central (SNC) de algunas especies de animales ha sido sujeto a trasplantes de diversos tipos de tejidos o células para estudiar sobrevida, interacción injerto-hospedero y recuperación funcional de diversos tipos de lesión, inducidas experimentalmente.

Thompson de la Universidad de Nueva York en 1890, fué el primero en realizar trasplantes al SNC en corteza cerebral de gatos adultos y perros; y en 1917 Elizabeth Dunn utilizó por primera vez tejido nervioso inmaduro al intercambiar fragmentos de corteza entre ratas de diez días de vida, esto sirvió para establecer los lineamientos para la obtención y preparación de tejido para los trasplantes. (Das, 1979; Wallace,1982). El tejido nervioso fetal ha mostrado una gran capacidad de crecimiento, abundancia de factores tróficos, favoreciendo la reconexión de circuitos neuronales lesionados y la producción de neurotransmisores, pudiendo detener la progresión del daño y estimulando los mecanismos de reconstrucción neural en diferentes circuitos encefálicos tales como corteza cerebral, cerebelo, etc.(Bjorklund 1984, 1987).

En humanos los trasplantes al cerebro han permitido recuperación funcional en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson (Lindvall, 1990; Madrazo, 1987) La primera aplicación clínica de los trasplantes de tejido fetal al SNC se llevó a cabo en pacientes con esta enfermedad obteniéndose una mejoría considerable en los signos y síntomas de los pacientes estudiados (Madrazo, 1988 y 1991; Freed, 1992 y1999; Hitchcock, 1992; López-Lozano, 1999).

RESPUESTA INMUNE

La inmunidad supone generalmente una resistencia no solo a agentes infecciosos, sino también a partículas extrañas, toxinas, células vivas y al cáncer. El éxito del sistema inmune se basa en la capacidad de los organismos vivos para reconocer, por diferentes medios, las moléculas extrañas que carecen de relación con su propia estructura normal (Wesley, 1980).

El sistema inmunitario consta de un componente específico y de otro inespecífico, cuyas funciones son distintas, pero se superponen. Los sistemas inmunitarios humoral (de anticuerpos) y mediado por células comportan especificidad y memoria de los antígenos con los que se ha puesto en contacto previamente. Las células fagocíticas y las proteínas del complemento son, respectivamente, mecanismos celulares y factores humorales inespecíficos; no obstante, a pesar de su falta de especificidad, estos componentes son esenciales, ya que en gran medida son responsables de la inmunidad natural frente a una amplia gama de microorganismos ambientales (Lawlor, 1990).

INMUNOLOGIA DEL SNC

Durante el desarrollo embrionario los vasos sanguíneos del SNC adquieren una característica diferente a los del resto del organismo: se forma la barrera hematoencefálica (BHE) que impide a las células del sistema inmunológico reconocer a muchos de los antígenos neurales (Lampson, 1987). Dicho privilegio inmunológico se ha atribuido al SNC por:

1. La existencia de la BHE que por las uniones fuertes existentes entre las células endoteliales y las prolongaciones astrocíticas impiden el paso de inmunoglobulinas, inmunomoduladores de gran tamaño y células inmunocompetentes en general (Rapaport 1976).
2. El SNC carece de un drenaje linfático convencional por lo que, se supone, está impedido el transporte de los antígenos neurales a los órganos linfoides.
3. En condiciones normales las células neurales (neuronas y células gliales) aparentemente no expresan moléculas del Complejo Principal Histocompatibilidad (MHC) clase I y clase II, de tal forma que, las células neurales en cierto modo quedan protegidas de la respuesta inmunológica celular de tipo celular (Wekerle y cols. 1986).

Alternativamente el callo a causa de la diferenciación celular, puede originar un proceso de especialización celular, en el cual las células se dividen, y muchas de ellas llegan no sólo a crecer si no a ser mas complejas formando tejidos, órganos y hasta formar tejidos organizados y posteriormente la planta entera puede ser regenerada (Salisbury,1994). Además esos callos pueden ser introducidos en un medio de cultivo líquido, que gracias a una agitación constante estas células logran dispersarse y forman un cultivo en suspensión. Cada célula es en teoría totipotencial y, también deben tener el potencial de sintetizar todos los compuestos asociados con la planta entera. (Payne, 1992).

Todo esto tiene relevancia ya que se sabe que por lo menos la cuarta parte de los fármacos empleados hoy en los países industrializados proceden o se han modelado a partir de productos vegetales (Lozoya 1997).

IMPLANTES VEGETALES

No se sabe con certeza donde empezaron y cuándo tuvieron lugar los primeros injertos vegetales, ni que reflexiones u observaciones provocaron su aparición. Ya en el año 1000 a.C , los fenicios cultivaban árboles de fruta injertados en sus huertas (Schmid , 1994).

Hasta ahora los injertos vegetales han tenido aplicación e importancia sobre todo en el campo de la fruticultura, ya que se han implementado diferentes tipos de técnicas de injerto para mejorar los árboles del lugar que no satisfacen las condiciones requeridas. Los sistemas de injerto no sólo sirven para cultivar y propagar variedades de valor, sino que también ofrecen las posibilidades de evitar deficiencias en la calidad de los frutales (Schmid, 1994).

Es posible reconocer que ha existido una gran evolución científica, que se inicia con trasplantes de tejidos, para posteriormente desarrollar éstos a partir de órganos, y ahora en etapas mas recientes

dar la base para trabajar con células, tanto animales, (Brown 1974; August, 1968) como vegetales (Lozoya, 1995 (b)).

Con estas bases se inició también el estudio de los implantes de células vegetales en animales. El primer trasplante de células vegetales en animales se realizó en 1993, el cuál consistió en implantar células vegetales indiferenciadas en tejido subcutáneo de ratas, utilizando para ello células de *Mimosa tenuiflora* cultivadas *in vitro*. El objetivo de ese trabajo fue estudiar la sobrevivencia de dichas células en un lapso de 4 meses, lo cuál se logró de forma satisfactoria. Los estudios microscópicos del injerto mostraron que, en todos los casos, las células vegetales permanecieron vivas en el medio animal subcutáneo y durante las dos primeras semanas de realizado el implante, el tejido vegetal fue rodeado por un número moderado de células polimorfonucleares y macrófagos, al tiempo que se observó la incipiente formación de una cápsula de fibroblastos que paulatinamente rodeó al implante vegetal subcutáneo. En los meses siguientes, además de observar una clara disminución de la reacción inflamatoria en la zona de contacto entre el tejido vegetal y el animal, se formaron trabéculas a través de las cuales se diferenciaron vasos sanguíneos capilares que ingresaban al espacio intercelular del parénquima vegetal (Lozoya, 1995 (a)).

Estos estudios han sido reproducidos varias veces con idénticos resultados y se ha logrado el trasplante inter-regni con otras especies botánicas como son *Galphimia glauca*, *Nicotiana tabacum* y *Zea mays* (Lozoya, 1995 (b)).

El mismo tejido fue llevado al parénquima cerebral de ratas, y a un mes de estudio, la reacción inflamatoria inespecífica observada desde la primera semana postrasplante fue similar a la descrita en el injerto subcutáneo. Consistió en células polimorfonucleares y macrófagos atacando al tejido implantado, principalmente en la periferia del implante, dejando el centro libre de infiltrado. Contrario a lo reportado en el implante subcutáneo, estuvo ausente la formación de una cápsula de tejido conectivo. Estas observaciones permiten cuestionar si es el tipo de implante en callo lo que permite que las células centrales del mismo sobrevivan en el medio animal, dada su "protección" que les confieren las células periféricas.

PRUEBAS USADAS PARA LA DETERMINACIÓN DE VIABILIDAD VEGETAL

Las pruebas que se han empleado hasta ahora para determinar la viabilidad del tejido vegetal implantado han sido, resiembra de éste en su medio de cultivo original, y prueba con diacetato de fluoresceína-propidio (Lozoya, 1995 (b), Widholm, 1972). Se han realizado, además, estudios histológicos para ver la zona de contacto entre el tejido vegetal y el animal y poder analizar la morfología celular presente en estas áreas. En estos trabajos se ha observado una correlación entre un estudio histológico que denota la presencia de células vegetales con un núcleo, membrana y pared íntegras, y un recultivo del tejido vegetal implantado que muestra una capacidad de recrecimiento en su medio de cultivo original y, al mismo tiempo, una prueba de viabilidad por fluorescencia positiva (Lozoya, 1995 (a); 1997).

Galphimia glauca Cav, es un arbusto mexicano que pertenece a la familia Malpighiaceae, conocido comúnmente como "calderona amarilla", "flor estrella", "hierba del cuervo", "ojo de gallina", "hierba del desprecio", y "árnica roja". Se trata de un arbusto de 1-3 m. de altura, cuyas hojas son alargadas, ovales u oblongas, verdes en la parte superior y verde azulado en la parte inferior, de 5 cm de largo por 1.5 cm de ancho, con peciolo delgado, abruptamente puntiagudas en el ápice, angostas o truncas en la base y bordes enteros. Las inflorescencias surgen en forma de panículas, con pedicelos anchos de pocas flores; raquis pubescente, con pelos rojo oscuros y glabros con el tiempo, los sépalos son oblongos o lanceolados de 3.5 mm de largo con corola amarilla y pétalos de 12 mm de largo; y los frutos son unas cápsulas de 4 cm de largo de color rojo escarlata con rugosidades. (Tortoriello 1991).

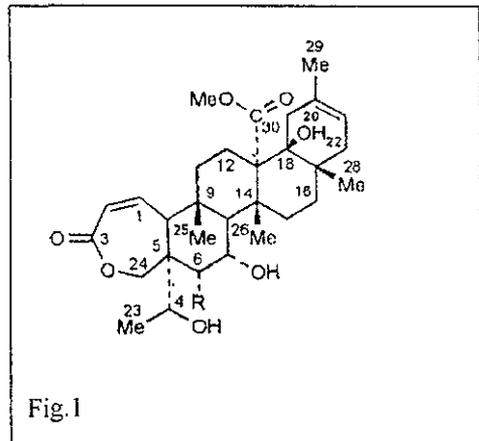
Este arbusto es endémico de México, habita en climas semicálidos y templados entre los 920 y los 2600 m snm. Crece principalmente en los estados de Guerrero, Michoacán, San Luis Potosí, Morelos, Chiapas y Sonora. Se distribuye en el campo asociado a la vegetación perturbada de bosques tropicales caducifolio y perennifolio, matorral xerófilo, bosques de encino y de pino y bosques de juníperos. (Argueta 1994).

En Morelos es importante el uso de "árnica roja" para curar heridas y "granos". También se ocupa para "fortalecer la cintura", y para el caso de "entuerto" y "rasgaduras en el postparto", así como para "flujo o inflamación de la matriz". Algunos autores le han atribuido propiedades como antirreumático, antidiarreico, y antipalúdico (Argueta 1994).

Aunque se carece de registros escritos actuales se sabe que las infusiones de las hojas de esta planta han sido usadas en medicina tradicional mexicana como un sedante y tranquilizante en algunos enfermos mentales. Para tales efectos los pobladores que colectan la planta, lo hacen al amanecer, evitando así ser sorprendidos y que la comunidad asuma, que en la familia del colector hay algún "loco que se necesite calmar" (Tortoriello, 1991).

FARMACOLOGÍA DE *Galphimia glauca* Cav (Malpigiaceae).

Como se sabe que *Galphimia glauca* Cav (Malpigiaceae) es un arbusto usado en medicina tradicional para tratar desórdenes mentales, y considerándose que no había previos reportes que validaran las propiedades sedativas de este remedio herbal, Tortoriello en 1991 decide determinar el efecto de un extracto metanólico obtenido de las partes aéreas de *Galphimia glauca* Cav, y de ahí extrajo un compuesto al que le denominó Galphimina B, el cuál es un nor-triterpenoide (Tortoriello 1991). Ver figura 1.



También emplea varios modelos animales experimentales, y observa la capacidad de potenciar el efecto de un barbitúrico (pentobarbital sódico) al incrementar la duración del sueño en animales. Observa también que la temperatura del cólon fue modificada en animales que recibieron el extracto metanólico de *Galphimia glauca* (MEGA) intraperitonealmente, y que el efecto hipotérmico producido por una dosis de 50 mg/100g fue estadísticamente significativo. Por otro lado, la actividad anticonvulsivante a 50 mg /100g produjo un incremento de latencia (38%) de las convulsiones inducidas con estriquina, (periodo que tardan en presentarse las convulsiones después de administrada la droga), lo que es considerado como una indicación de protección. A la misma dosis fue capaz de reducir en un 30 % la latencia de convulsiones, y de reducir la mortalidad en un 40 % en animales en quienes recibieron leptazol como inductor de convulsiones. (Tortoriello y Lozoya 1991).

Todos estos resultados sugieren la evidencia de efectos sedativos producidos por MEGA en el Sistema Nervioso Central y que *Galphimia glauca* tiene propiedades psicotrópicas. (Tortoriello y Lozoya 1991). Un último trabajo realizado con esta planta demuestra que galphimina B modifica la actividad eléctrica de neuronas del área tegmental ventral en neuronas de ratas. Esos resultados son importantes, debido a que debe recordarse que esta área es el mayor centro dopaminérgico

responsable de la inervación de la corteza prefrontal, núcleos acumbens y la región entorinal, áreas que están involucradas con mecanismos de regulación de la excitación emocional y que en este experimento mostraron que son blanco para la acción de la droga antipsicótica (Tortoriello 1998).

De aquí surge la idea de emplear a esta planta como implante en el parénquima cerebral de ratas, ya que los resultados anteriores demuestran que galphimina B es una de las sustancias activas de *Galphimia glauca* Cav. con propiedades depresivas sobre el Sistema Nerviosos Central, y que el efecto anticonvulsivante y sedante del extracto metanólico puede ser debido a diferentes compuestos presentes en esta planta. (Tortoriello y Ortega 1993).

JUSTIFICACIÓN

En el presente trabajo se pretende probar la sobrevida de un tejido vegetal modificado biotecnológicamente e injertado en un medio animal, en este caso, el parénquima cerebral de rata; además de observar las diferencias en sobrevida y diferenciación entre dos tipos de implante, el proveniente de cultivo en callo, y el de cultivo disociado.

Cabe la posibilidad de plantear un diseño a futuro de realizar un trasplante que funcione como bio-bomba de liberación de algún fármaco que implantado en determinada región del animal proporcione algún fin terapéutico. *Galphimia glauca* puede ser empleada en el tratamiento de algunas enfermedades mentales, dadas sus propiedades depresivas sobre el SNC en la actualidad ya identificadas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

PREGUNTA GENERAL

1 ¿El implante de tejido vegetal de *Galphimia glauca* en callo o disociado será capaz de sobrevivir un mes en el parénquima cerebral de ratas?

PREGUNTA PARTICULAR

2 ¿Será la sobrevivencia del implante en bloque igual a la del disociado?

HIPÓTESIS GENERAL

HIPÓTESIS 1. "Si el tejido vegetal obtenido de un callo estéril y formado por células indiferenciadas (obtenidas en condiciones de crecimiento *in vitro*), es capaz de sobrevivir por largo tiempo en hospederos animales, por lo tanto, se espera que el tejido de *Galphimia glauca* sobreviva en el parénquima cerebral de ratas durante un mes".

HIPÓTESIS 2. "Si un implante de células disociadas está en mayor contacto con el medio animal que un implante en callo, entonces se espera que el implante en callo sobreviva más que el de tejido disociado".

OBJETIVO GENERAL

1. Evaluar la sobrevivencia del injerto de *Galphimia glauca* en callo o disociado dentro del cerebro de rata, en el lapso de un mes.

PREGUNTA PARTICULAR

2 ¿Será la sobrevivencia del implante en bloque igual a la del disociado?

HIPÓTESIS GENERAL

HIPÓTESIS 1 "Si el tejido vegetal obtenido de un callo estéril y formado por células indiferenciadas (obtenidas en condiciones de crecimiento *in vitro*), es capaz de sobrevivir por largo tiempo en hospederos animales, por lo tanto, se espera que el tejido de *Galphimia glauca* sobreviva en el parénquima cerebral de ratas durante un mes"

HIPÓTESIS 2. "Si un implante de células disociadas está en mayor contacto con el medio animal que un implante en callo, entonces se espera que el implante en callo sobreviva más que el de tejido disociado".

OBJETIVO GENERAL

1. Evaluar la sobrevivencia del injerto de *Galphimia glauca* en callo o disociado dentro del cerebro de rata, en el lapso de un mes.

OBJETIVO PARTICULAR

1.1 Evaluar y comparar la sobrevivencia entre un implante de células vegetales de *Galphimia glauca* en callo y uno de células disociadas, injertados en el parénquima cerebral de ratas.

MATERIAL Y MÉTODO

DISEÑO EXPERIMENTAL BIOMÉDICO

MUESTRA:

Veinticuatro ratas Wistar machos adultos con peso de 200-250 g

GRUPO EXPERIMENTAL Y TESTIGO

Todos los animales se sometieron inicialmente a una craneotomía, tomando el día de la operación, como día cero del seguimiento.

OBJETIVO PARTICULAR

1.1 Evaluar y comparar la sobrevivencia entre un implante de células vegetales de *Galphimia glauca* en callo y uno de células disociadas, injertados en el parénquima cerebral de ratas

MATERIAL Y MÉTODO

DISEÑO EXPERIMENTAL BIOMÉDICO

MUESTRA:

Veinticuatro ratas Wistar machos adultas con peso de 200-250 g.

GRUPO EXPERIMENTAL Y TESTIGO

Todos los animales se sometieron inicialmente a una craneotomía, tomando el día de la operación, como día cero del seguimiento.

GRUPO EXPERIMENTAL. Las ratas fueron divididas en dos grupos. El grupo A, que lo conformaron 8 de las ratas con implante de tejido vegetal en callo, y el grupo B conformado por 8 ratas a las que se les implantaron células disociadas de la misma especie vegetal

GRUPO TESTIGO. Este grupo fue conformado por 8 ratas con las características anteriormente expuestas, las cuales fueron implantadas con fragmentos de material utilizado para hemostasia (Método para cohibir el sangrado) denominado Gelfoam.

TABLA 1 Distribución de ratas empleadas en cada fase del estudio.

Semanas de Estudio	Implante en callo	Implante de Células Disociadas	Grupo testigo (Gelfoam)
1	2 (F/R)	2 (F/R)	2
2	2 (F/R)	2 (F/R)	2
3	2 (F/R)	2 (F/R)	2
4	2 (F/R)	2 (F/R)	2
Total	8	8	8

NOTA: F/R=Fluoresceína y recultivo.

ETAPAS DEL ESTUDIO

El diseño del estudio se efectuó en dos etapas. La primera correspondió a la estandarización de la técnica para implantar el tejido vegetal disociado, y la segunda en la cuál se aplicó la maniobra experimental propuesta.

PROCEDIMIENTOS GENERALES

OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DEL TEJIDO VEGETAL A IMPLANTAR .

El tejido vegetal usado para trasplante se obtuvo de *Galphimia glauca*, el cual fué sometido a manipulación biotecnológica, tanto en el caso de callo, como de tejido disociado; este procedimiento consiste en cultivar explantes derivados de hipocótilos de la planta en un medio de cultivo aséptico tanto sólido como líquido, suplementado con factores reguladores del crecimiento. Se usó para la preparación de un litro de medio de cultivo, 30 gr. de sacarosa, 100 ml. de solución inorgánica, 10 ml. de solución orgánica (ver apéndice A), y 2 mg de ácido 2,4 diclorofenoxiacético. Todo esto fue aforado a un litro con agua desionizada, adicionando para el caso de medio sólido, 6 gr. de agar por litro. Los cultivos se mantuvieron en incubación a 28° C con un fotoperíodo diario de 16 hrs., y el tejido fue subcultivado en medio fresco cada 15 días. Este método permitió que las plantas diferenciadas pudieran transformarse en células totipotenciales indiferenciadas (Murashige,1974). El tejido en callo se extrajo del medio de cultivo sólido y se pesó bajo la campana de flujo laminar para evitar la contaminación del mismo. Posteriormente se colocó en tubos Ependorff estériles (40-60 mg) para su transporte al área operatoria.

ETAPAS DEL ESTUDIO

El diseño del estudio se efectuó en dos etapas. La primera correspondió a la estandarización de la técnica para implantar el tejido vegetal disociado, y la segunda en la cuál se aplicó la maniobra experimental propuesta.

PROCEDIMIENTOS GENERALES

OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DEL TEJIDO VEGETAL A IMPLANTAR .

El tejido vegetal usado para transplante se obtuvo de *Galphimia glauca*, el cual fué sometido a manipulación biotecnológica, tanto en el caso de callo, como de tejido disociado; este procedimiento consiste en cultivar explantes derivados de hipocótilos de la planta en un medio de cultivo aséptico tanto sólido como líquido, suplementado con factores reguladores del crecimiento. Se usó para la preparación de un litro de medio de cultivo, 30 gr. de sacarosa, 100 ml. de solución inorgánica, 10 ml. de solución orgánica (ver apéndice A), y 2 mg de ácido 2,4 diclorofenoxiacético. Todo esto fue aforado a un litro con agua desionizada, adicionando para el caso de medio sólido, 6 gr. de agar por litro. Los cultivos se mantuvieron en incubación a 28° C con un fotoperíodo diario de 16 hrs., y el tejido fue subcultivado en medio fresco cada 15 días. Este método permitió que las plantas diferenciadas pudieran transformarse en células totipotenciales indiferenciadas (Murashige,1974). El tejido en callo se extrajo del medio de cultivo sólido y se pesó bajo la campana de flujo laminar para evitar la contaminación del mismo. Posteriormente se colocó en tubos Ependorff estériles (40-60 mg) para su transporte al área operatoria.

El implante de tejido vegetal disociado fue aislado del medio de cultivo líquido mediante una jeringa de 3 cc, el paquete celular fue colocado en tubos Ependorff estériles y posteriormente con ayuda de una jeringa de 5cc y una aguja de 20 mm, las células fueron lavadas y disociadas con solución isotónica de Hank's (Ver apéndice B) Ya limpio el paquete celular del medio de cultivo, se colocó en tubos Ependorff estériles previamente pesados. Se inyectaron 100 microlitros de tejido vegetal, (el equivalente en peso a lo implantado en callo).

MÉTODO DE ANESTESIA

Se utilizó una mezcla de clorhidrato de Ketamina (75 mg/Kg), e hidrocloreuro de xilacina (12.5 mg/Kg) vía intramuscular, para anestésiar a los animales, ya sea para procedimientos quirúrgicos (craneotomías y/o el transplante de tejido vegetal) o para su sacrificio.

TÉCNICA QUIRÚRGICA: CRANEOTOMÍA

Bajo efecto de la anestesia previamente descrita, se procedió a practicar a los animales una tricotomía de la cabeza y seguido de una asepsia con isodine se colocaron los campos estériles para delimitar el área a operar. Todos los procedimientos quirúrgicos se realizaron con material e instrumental de microcirugía estériles y en condiciones estrictas de asepsia. Se practicó una incisión en la piel, seguida de una disección del epicráneo con ayuda de unas tijeras y una hoja de bisturí del No. 20; teniendo ya expuesto el cráneo se procedió a realizar con ayuda de un microscopio estereoscópico, un taladro y unas pinzas 2A dos craniectomías de 5 mm de diámetro cada una, a ambos lados de la línea media y equidistante a la sutura coronal (área premotora),

todo esto teniendo cuidado de no manipular las meninges ni dañar el tejido encefálico. Posteriormente; la duramadre se abrió parasagitalmente 4 mm de longitud rasgándola levemente con el bisel de una aguja N° 25, y se realizó una corticotomía de 3 mm de longitud con ayuda de tijeras de microcirugía, procurando hacerla entre dos venas de grueso tamaño, las cuales se preservaron (Ver Fig. 2 y 3).

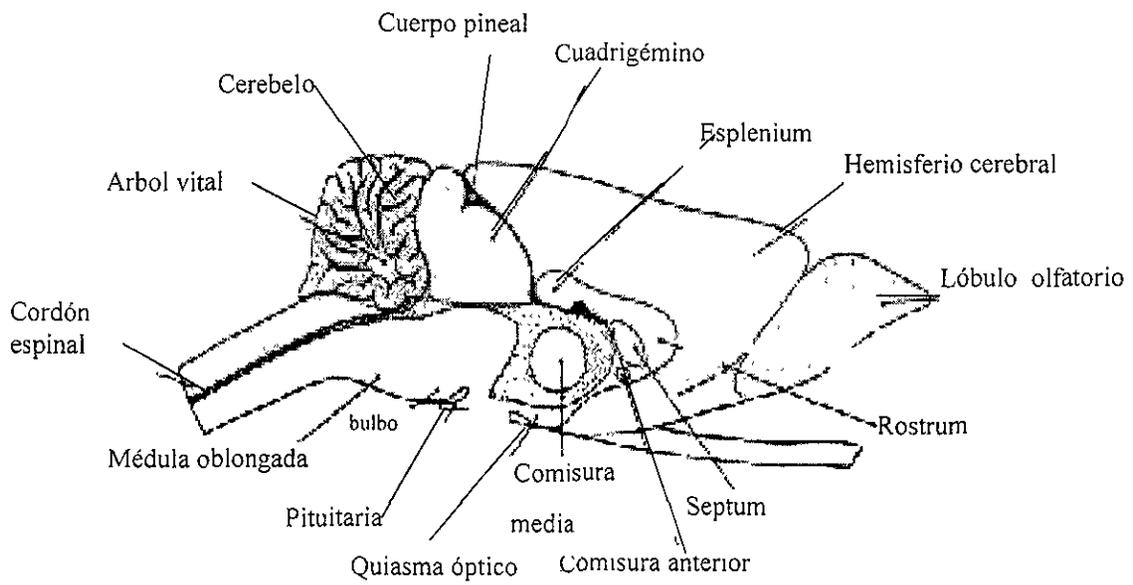


Fig. 2. Esquema del cerebro de rata con sus estructuras.

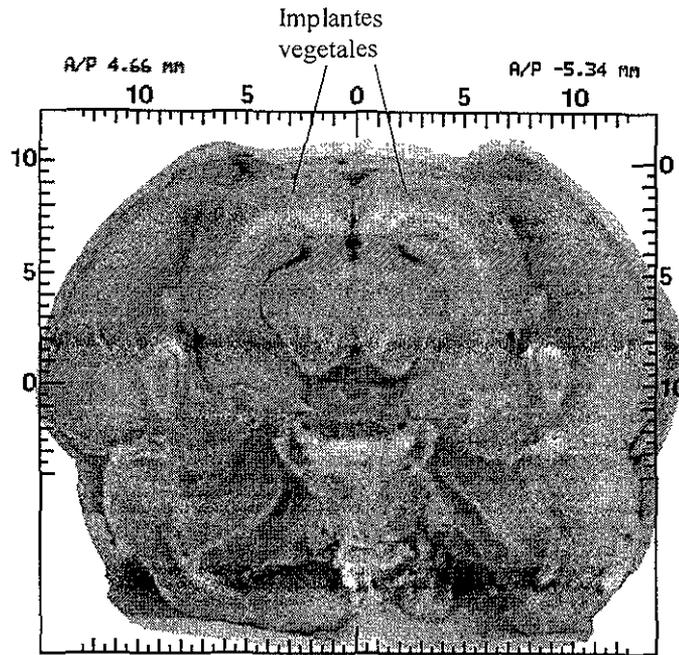


Fig 3. Localización de los implantes en el parénquima cerebral en un corte transversal del cerebro de rata

IMPLANTE DE TEJIDO VEGETAL

a) CÉLULAS EN CALLO

Se tomó un fragmento de tejido directamente del interior del cultivo, de la porción exterior y basal de coloración verde, éste fue colocado en un tubo Ependorff estéril previamente pesado, para que posteriormente restando el peso final se pudiera saber el peso de el injerto.

El tejido que tiene condiciones de esterilidad con peso aproximado de 40-60 mg. se introdujo al parénquima cerebral a través de la corticotomía previamente descrita y con ayuda de unas pinzas AA. Finalmente los animales fueron suturados e inyectados con penicilina antes de que acabara el efecto anestésico.

b) CÉLULAS DISOCIADAS

Las células vegetales de cultivo líquido fueron tomadas con una jeringa de 5 cc y transferidas a tubos Ependorff dentro de un área estéril (campana de flujo laminar), para su posterior transporte al área operatoria. Estas células fueron lavadas y disociadas con solución isotónica y tomadas con una microjeringa (100 microlitros, equivalentes en peso a lo implantado en callo), para ser colocada en el equipo de estereotaxia.

Con la rata en posición de decúbito ventral y previa asepsia y colocación de campos estériles, se procedió a realizar la craneotomía. Posteriormente los animales fueron colocados en un equipo de estereotaxia en donde, con ayuda del mismo aparato, la cabeza de la rata fue fijada para implantar las células vegetales disociadas, inyectándolas a través de una punta de pipeta desprovista de su ápice, cuyo diámetro externo coincidía con el de la corticotomía la cuál se introdujo 2 mm a partir de la corteza cerebral para finalmente inyectar las células vegetales disociadas en 300 microlitros de solución de Hank's, después de lo cuál se retiró la punta de la pipeta junto con la jeringa, para finalmente cerrar la incisión quirúrgica.

c) GELFOAM

Al grupo testigo, se le realizó la craneotomía y la corticotomía de la misma manera que para los grupos experimentales, pero aplicando un volúmen similar de Gelfoam estéril en cada hemisferio como fue mencionado anteriormente, con ayuda de pinzas de microcirugía.

Posterior a la cirugía se suturaron las incisiones realizadas en la piel con puntos simples de dermalón 5 ceros y se les aplicó una dosis de 120,000 UI de penicilina benzatínica (0.05 ml/0.05 Kg) por vía intramuscular, para prevenir infecciones.

CUIDADOS POSTOPERATORIOS

Al final de la cirugía los animales se introdujeron en una jaula con aserrín estéril previamente identificada y colocada con alimento y agua, en una unidad de cuidados intensivos para animales pequeños con temperatura controlada a 25 grados centígrados por 24 hrs. Una vez recuperadas de la cirugía se colocaron en un cuarto de bioterio con temperatura y luz controlada apto para estos animales. Todas las ratas incluidas en el proyecto recibieron el mismo tipo de alimentación y cuidados generales. Los animales que dieron indicio de infección a nivel de la herida quirúrgica fueron sacrificados y sustituidos por otros.

El tiempo de sacrificio, la prueba de recultivo y la prueba de fluoresceína-propidio se realizaron 1,2,3 y 4 semanas post-implante. Para el sacrificio, las ratas se anestesiaron como se describió para la cirugía.

DETERMINACIÓN DE VIABILIDAD VEGETAL

PRUEBA DE FLUORESCÉINA PROPIDIO.

La prueba de fluoresceína-propidio fue aplicada al tejido vegetal antes de ser injertado, Esta prueba incluye el uso de diacetato de fluoresceína y yoduro de propidio, y evalúa la actividad de las esterasas de membrana, característica de las células vegetales vivas, el diacetato de fluoresceína es una molécula no polar que entra a las células vivas, donde los residuos de acetato se pegan a las esterasas y cuando se acumulan estas moléculas fluorescen, estas enzimas conforman la maquinaria bioquímica de la célula viva, y por lo tanto se usa como testiga de la viabilidad del tejido vegetal. (Lozoya (a) 1995; Widholm 1972).

Antes de cada cirugía una muestra del tejido a implantar fue lavada con PBS y colocada en un portaobjetos para aplicarle solución de fluoresceína al 2% y de yoduro de propidio al 4%, (Ver

CUIDADOS POSTOPERATORIOS

Al final de la cirugía los animales se introdujeron en una jaula con aserrín estéril previamente identificada y colocada con alimento y agua, en una unidad de cuidados intensivos para animales pequeños con temperatura controlada a 25 grados centígrados por 24 hrs. Una vez recuperadas de la cirugía se colocaron en un cuarto de bioterio con temperatura y luz controlada apto para estos animales. Todas las ratas incluidas en el proyecto recibieron el mismo tipo de alimentación y cuidados generales. Los animales que dieron indicio de infección a nivel de la herida quirúrgica fueron sacrificados y sustituidos por otros.

El tiempo de sacrificio, la prueba de recultivo y la prueba de fluoresceína-propidio se realizaron 1,2,3 y 4 semanas post-implante. Para el sacrificio, las ratas se anestesiaron como se describió para la cirugía.

DETERMINACIÓN DE VIABILIDAD VEGETAL

PRUEBA DE FLUORESCEÍNA PROPIDIO.

La prueba de fluoresceína-propidio fue aplicada al tejido vegetal antes de ser injertado. Esta prueba incluye el uso de diacetato de fluoresceína y yoduro de propidio, y evalúa la actividad de las esterasas de membrana, característica de las células vegetales vivas, el diacetato de fluoresceína es una molécula no polar que entra a las células vivas, donde los residuos de acetato se pegan a las esterasas y cuando se acumulan estas moléculas fluorescen, estas enzimas conforman la maquinaria bioquímica de la célula viva, y por lo tanto se usa como testiga de la viabilidad del tejido vegetal. (Lozoya (a) 1995; Widholm 1972).

Antes de cada cirugía una muestra del tejido a implantar fue lavada con PBS y colocada en un portaobjetos para aplicarle solución de fluoresceína al 2% y de yoduro de propidio al 4%, (Ver

apéndice C) para ser observada después de 2 min. bajo el microscopio de luz UV y tomar fotografías.

Para la determinación de ésta variable, los animales en estudio se anestesiaron como se describió previamente después de haber transcurrido 1,2,3, y 4 semanas del trasplante. En todos los casos y bajo asepsia-antisepsia, se reabrió la cicatriz quirúrgica hasta identificarse la zona del injerto, obteniéndose fragmentos del mismo. Los fragmentos del injerto inmediatamente después se lavaron con PBS (siglas en inglés de una solución amortiguadora de fosfatos, ver apéndice B), y fueron colocados en portaobjetos, para aplicarles el procedimiento anteriormente descrito y tomar fotografías. El animal se sacrificó con una sobredosis de éter después de la obtención del injerto.

RECULTIVO

En el caso de los animales destinados a la realización de los recultivos, 5 minutos antes del sacrificio, se les aplicó una dosis intraperitoneal de 1000 UI de heparina, para posteriormente practicarles una toracotomía amplia y canulación de la aorta a través del ventrículo izquierdo. Inicialmente se les perfundieron 50 ml de solución salina isotónica, para lavar los residuos sanguíneos con ayuda de una bomba de perfusión, a una velocidad de 30 ml/min simulando el gasto cardíaco. El injerto fue extraído inmediatamente previa asepsia del área operatoria con iodine (iodopolivinilpirrolidona), y en un área estéril dada por dos mecheros, con los cuáles fueron flameados los frascos que contenían el medio de cultivo en gel original. Una vez extraído el implante, éste fue limpiado de todo material extra, y lavado con solución isotónica estéril, para posteriormente ser sembrado en el medio de cultivo. Se realizaron recultivos del injerto, cada 15 días, es decir, colocando fragmentos de éste en medio de cultivo nuevo para evaluar su capacidad de mantener su crecimiento en cada caso.

RESULTADOS

ESTUDIO DE FLUORESCÉINA-PROPIDIO

Las células antes de ser injertadas dieron una coloración verde- amarillenta intensa, después de aplicar la prueba de fluoresceína-propidio, esta coloración se volvió a presentar al evaluar las células del implante , así mismo, esta reacción se dio en las cuatro semanas de estudio en ambos casos, en las células de callo y en las disociadas; esto nos indica que las células lograron sobrevivir durante un mes de estudio, ya que esta coloración es una característica de las células vivas. Se empleó el microscopio de fluorescencia para poder evaluar esta prueba y al observar las células mostraban su membrana y pared íntegras, además de poder observar también los pigmentos que son característicos en las células de esta especie. A continuación se presentan las fotografías que fueron tomadas.

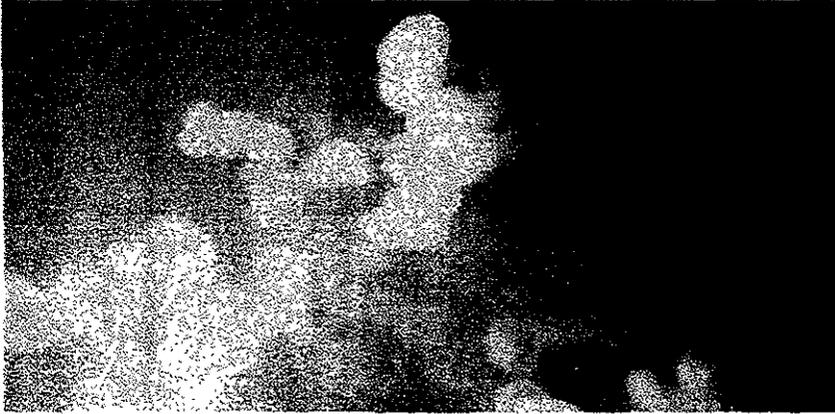


Foto 1.- Fotomicrografía de células de *Galphimia glauca* en callo antes de ser injertadas, en donde se observan las células fluorescentes como indicio de su viabilidad. Técnica de fluoresceína-propidio. (10x).

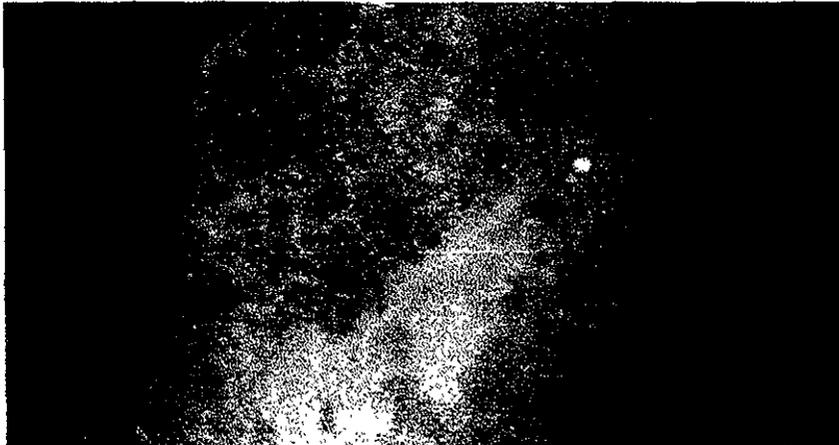


Foto 2.- Fotomicrografía de células de *Galphimia glauca* en callo una semana después de haber sido implantadas, en donde se observan las células fluorescentes como indicio de su viabilidad. Técnica de Fluoresceína-propidio (10 x).

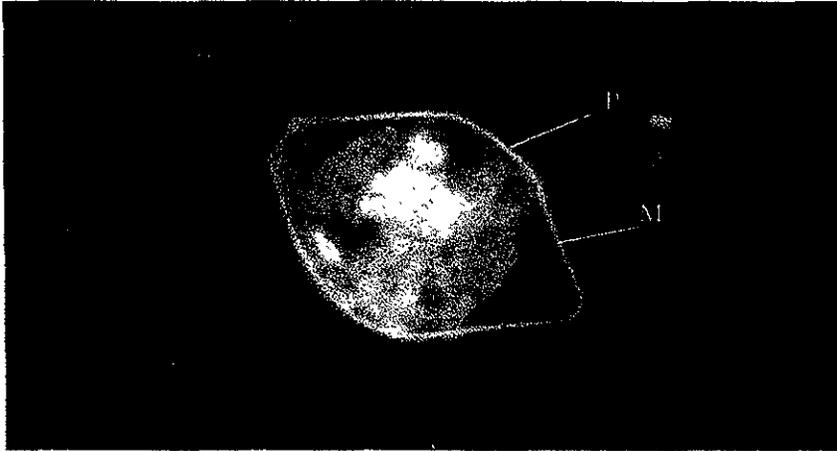


Foto 3.- Fotomicrografía que muestra la morfología típica de una célula de *Galphimia glauca* de callo. Se observa la membrana (M) y pared (P) íntegras una semana después de haber sido implantadas en el parénquima cerebral de rata. Técnica de Fluoresceína-propidio (40X).

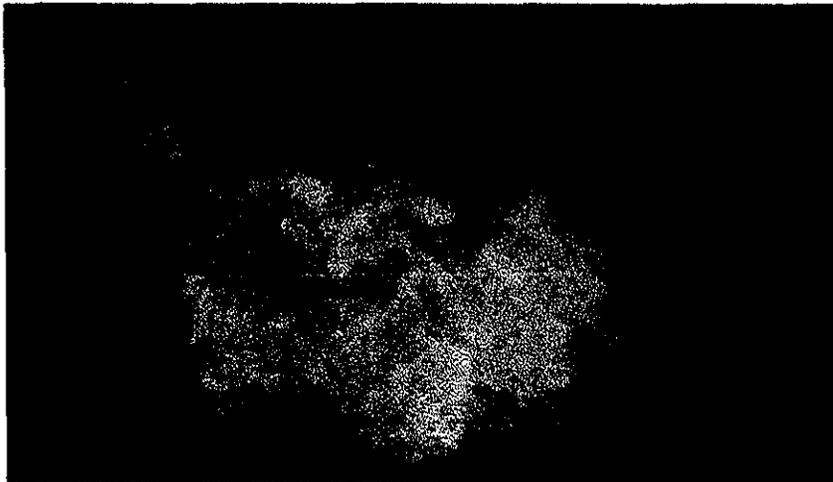


Foto 4.- Fotomicrografía de Células de *Galphimia glauca* en callo después de una semana de haber sido implantadas, en donde se observan las células fluorescentes como indicio de su viabilidad. Técnica de Fluoresceína-propidio (10 x).



Foto 5.- Fotomicrografía de células de *Galphimia glauca* en callo después de dos semanas de haber sido implantadas, en donde se observa las células fluorescentes como indicio de su viabilidad. Técnica Fluoresceína-propidio (10 x).

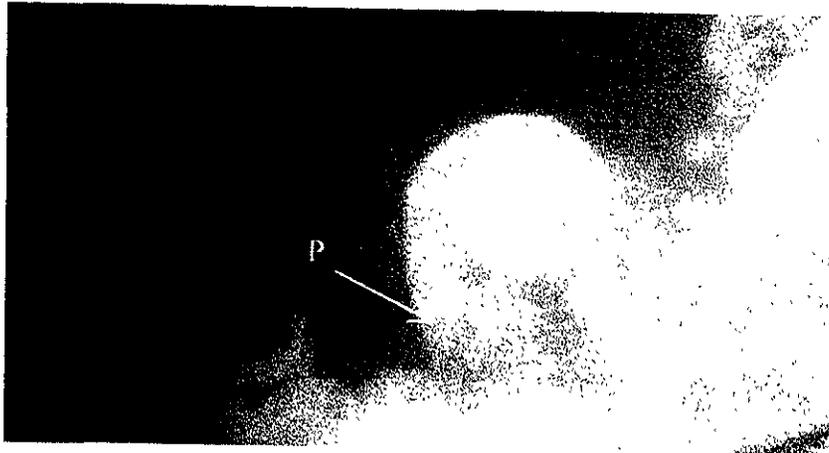


Foto 6.- Fotomicrografía que da un acercamiento de las células de *Galphimia glauca* en callo viables con sus pigmentos (P), a 2 semanas postimplante. Técnica de Fluoresceína-propidio (40x).

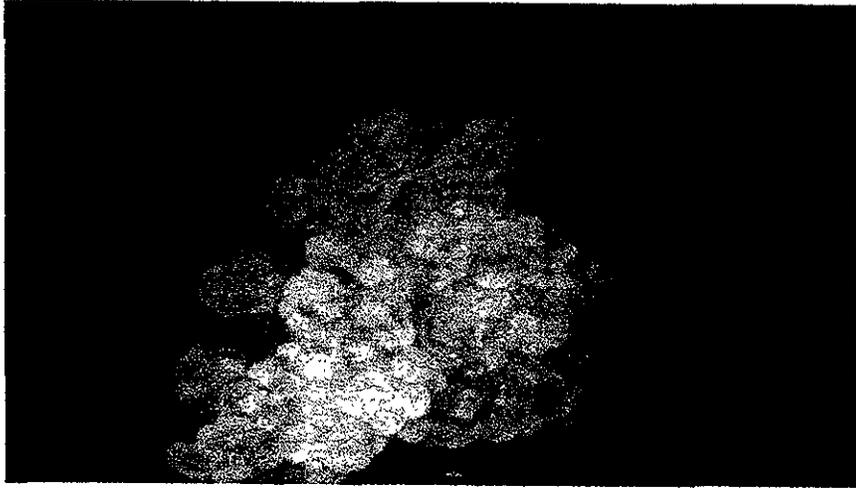


Foto 7- Fotomicrografía que muestra las células de *Galphimia glauca* en callo viables a 3 semanas de haber sido implantadas en el parénquima cerebral de ratas. Técnica de Fluoresceína-propidio (10x).

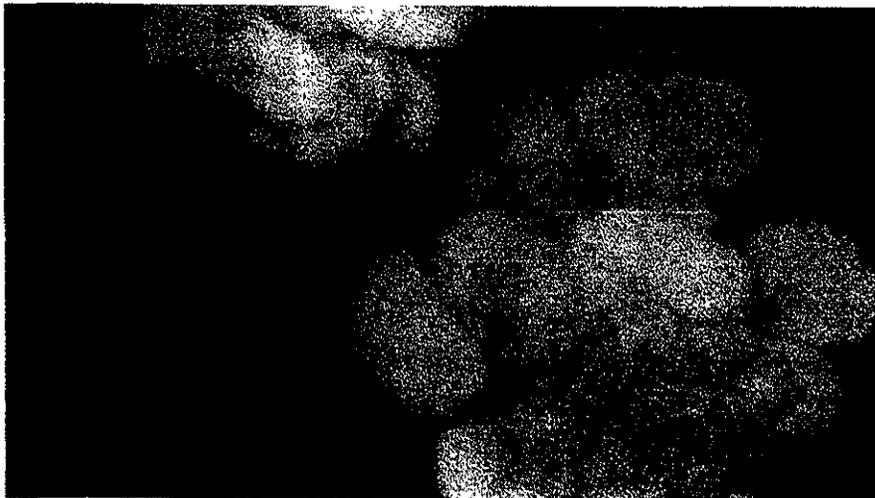


Foto 8-Acercamiento de las células anteriormente citadas en donde se observa en color amarillo los pigmentos celulares (40 x).

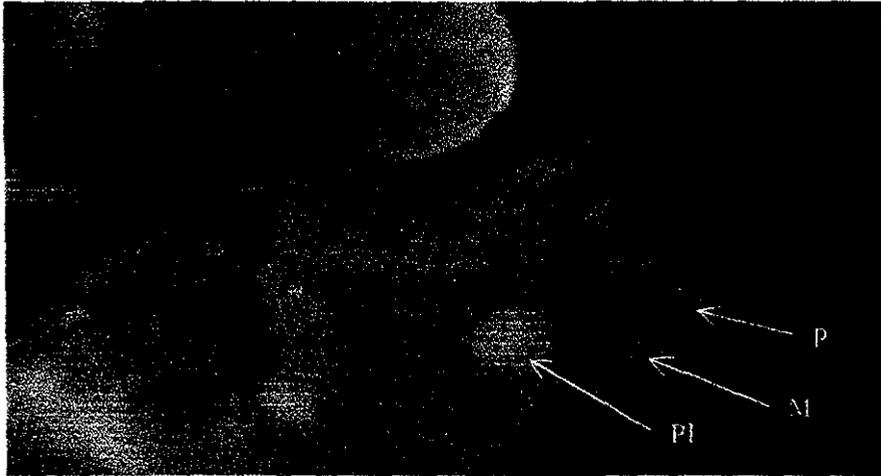


Foto 9-Fotomicrografía que muestra células viables de callo de *Galphimia glauca* a 4 semanas de haber sido implantadas. Se observa pared (P), Membrana (M), y pigmentos (PI). Técnica de Fluoresceína-propidio (40 x).

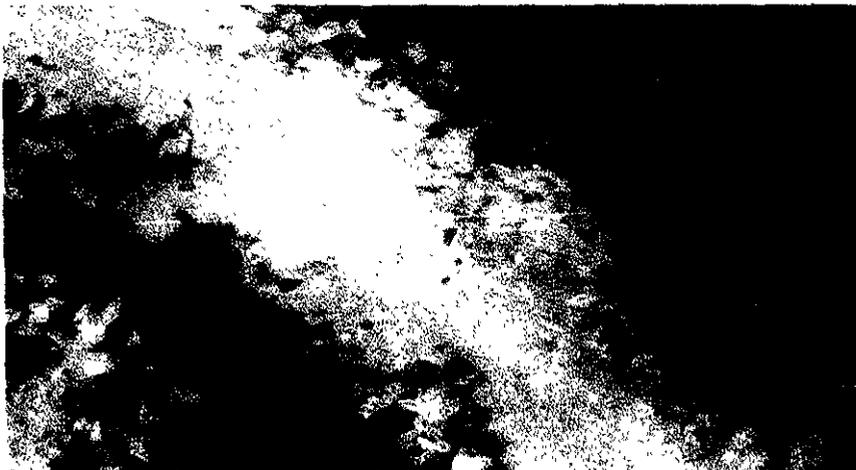


Foto 10 Fotomicrografía de células de cultivo disociado de *Galphimia glauca* a una semana de haberse implantado en cerebro de ratas, en donde se observan células fluorescentes como indicio de su viabilidad. Técnica Fluoresceína-propidio (10x).

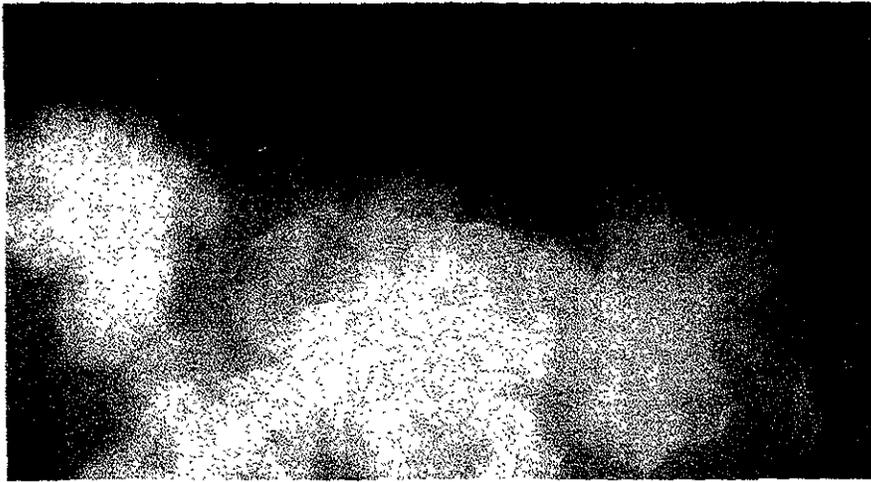


Foto 11- Acercamiento de la fotografía anteriormente citada. Nótese que la morfología celular es diferente a la de las células en callo (40x) (Ver foto 9).



Foto 12- Fotomicrografía de células disociadas de *Galphimia glauca* a 3 semanas de haber sido implantadas en cerebro de rata en donde se observa viabilidad y ya hay diferenciación celular a elementos de vaso. Técnica de Fluoresceína-propidio (10x).



Foto 13- Acercamiento de la foto anterior en donde se puede observar con mas detalle la diferenciación a elementos de vaso de las células implantadas a 3 semanas de estudio. Técnica de Fluoresceína-propidio (40x).

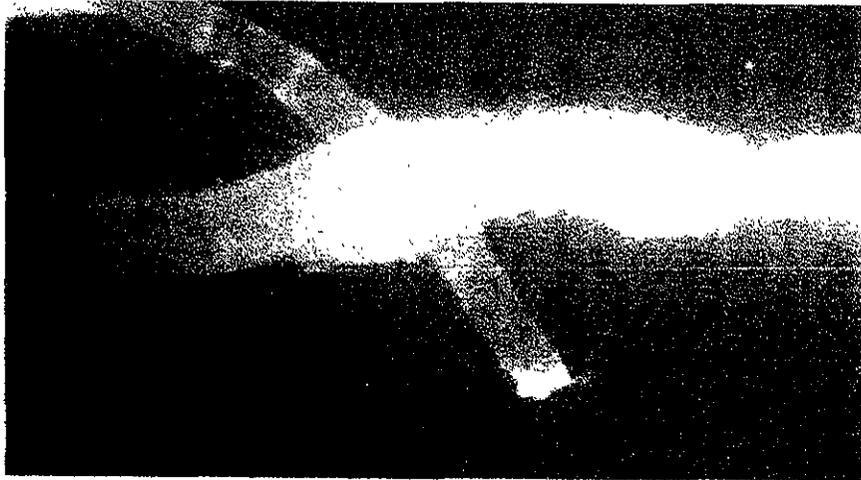


Foto 14- Fotomicrografía que muestra la viabilidad y la diferenciación celular del implante de células disociadas de Galphimia glauca implantadas a 4 semanas de estudio. Técnica de Fluoresceína-propidio (40x).

RECVTIVO

En los 3 frascos de recultivo de los implantes de tejido en callo correspondientes a las segunda, tercera y cuarta semanas de estudio se observó un crecimiento lento, pero hubo crecimiento en todos los casos; no siendo así para el tejido disociado, en el cuál sólo se obtuvo poco tejido al reoperar en la tercera y cuarta semana de estudio en donde en ninguno de los dos casos se observó crecimiento del fragmento recultivado.

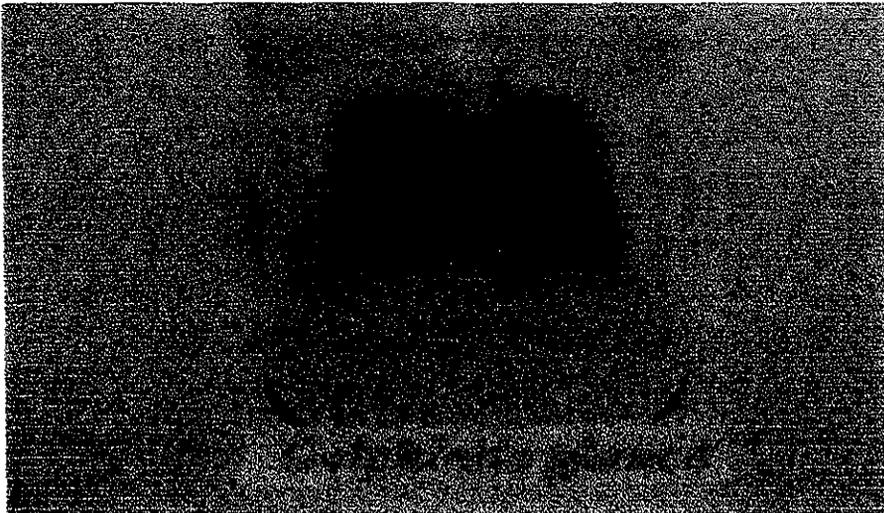


Foto 15- Recultivo de implante en callo de *Galphimia glauca* a la cuarta semana de estudio; 4 meses después de haber sido recultivado, en donde se observa crecimiento del tejido (T).

DISCUSIÓN

Es difícil establecer una discusión en un campo por demás virgen, en donde sólo existen algunas publicaciones que describen la interacción entre el tejido vegetal injertado y el hospedero animal en otras regiones, y ninguna en donde se explore el implante de *Galphimia glauca* intracerebral. La asociación de ambos paradigmas sólo se refiere a un trabajo aún no publicado, en donde participó el asesor de tesis.

El punto de comparación sin embargo, es el trabajo publicado por Lozoya y cols. en 1995 quienes injertaron células vegetales indiferenciadas provenientes de callos de *Mimosa tenuiflora*, las que sobrevivieron durante 4 meses en el tejido subcutáneo de ratas adultas. Estos autores, basaron sus observaciones en pruebas de viabilidad celular y en estudios histológicos. En el primer caso, la propiedad de reaccionar al diacetato de fluoresceína y yoduro de propidio por las células de planta, confirmaron la sobrevivencia durante todo el seguimiento. De la misma manera, en el presente trabajo se observó sobrevivencia de las células vegetales injertadas, utilizando las mismas pruebas de viabilidad celular, durante un mes de seguimiento. En ambos casos, para sobrevivir, aparentemente éstas células fueron capaces de adquirir sus nutrientes del medio que las rodeaba (Osuna 1994, Villarreal 1991, 1993).

Por otra parte, los animales operados con Gelfoam, así como los implantados con células vegetales, lograron sobrevivir sin modificación alguna en el tiempo de estudio.

En el presente trabajo se realizaron dos tipos de implante, uno proveniente de callo y otro de tejido vegetal disociado, los cuales sobrevivieron aunque con características diferentes. Al observar los especímenes con microscopio de fluorescencia, las células mostraron morfología diferente. Las

Provenientes del implante de callo tuvieron forma globular a diferencia de las provenientes de cultivo líquido que fueron de forma alargada. Con el transcurso del tiempo las primeras prácticamente no cambiaron su morfología, mientras que las segundas empezaron a diferenciarse a partir de la tercera semana de seguimiento, lo que puede ser secundario a las diferencias existentes entre ambos tipos de cultivo. Los de células vegetales en suspensión están conformados por células autónomas, las cuáles están dispersas uniformemente en el medio, y tienen la capacidad de crecer más que en el callo, ya que se encuentran sumergidas en el medio nutritivo. Consecuentemente estos cultivos son fisiológicamente más homogéneos (y por lo tanto potencialmente más controlables) que el cultivo sólido, y esto ofrece ventajas para la producción de bioquímicos vegetales (Payne G y col, 1992). Las células provenientes de cultivo en suspensión se diferenciaron más rápidamente que las de callo, ya que con la excepción de cultivos oncogénicos, todos los cultivos vegetales requieren la adición de fitoreguladores al medio para un consistente crecimiento por división celular; y se sabe que una diferenciación o morfogénesis celular es usualmente inducida por una baja concentración de auxinas, o por una depleción en las sustancias involucradas en el crecimiento (Mantell y Smith 1986); así, al encontrarse en un medio carente de fitoreguladores, como lo es el parénquima cerebral, se vieron limitadas rápidamente de su medio nutritivo, y por lo tanto en su división celular, cesando el crecimiento exponencial, para pasar a la fase de desaceleración o estacionaria, que generalmente conduce a la biosíntesis de metabolitos secundarios, a su acumulación y a un cambio inminente en su morfología. (Mantell y Smith, 1986) A diferencia de lo anterior, las células de callo, aunque lograron sobrevivir el mismo tiempo, no se diferenciaron en el medio ambiente animal. Esto puede deberse a la heterogeneidad de este tipo de cultivo, ya que, en un mismo callo al evaluarse en un tiempo específico, muestra diferencias en color, morfología, estructura, crecimiento y metabolismo; además, el callo crece en base a un gradiente de nutrientes que se forma entre las células que lo estructuran y la superficie del medio nutritivo. Esto hace que transcurra más tiempo para que las células del callo puedan nutrirse por gradiente, manteniéndose más tiempo indiferenciadas (Payne

G 1992). Cabe aclarar que al inmovilizar células en cultivo en callo se dan cambios de tipo metabólico, mas nunca físico como sucedió en este caso (Buitelar RY, Tramper J 1992).

En el caso del tejido proveniente de cultivo líquido, la cantidad fue suficiente para las pruebas de fluorescencia positivas (todos los casos), pero no para recultivo positivo. En el caso del tejido proveniente del tejido en callo, la cantidad fue suficiente para las pruebas de fluorescencia positivas (todos los casos) y parcialmente para el recultivo positivo (3 casos) Se sabe que para tener un cultivo exitoso debe sembrarse un inóculo adecuado por lo que en ambos casos la falla del recultivo positivo pudo deberse a la cantidad insuficiente de tejido obtenido para tal fin. Sin embargo, en el primer caso puede deberse además, a que las células no se recultivaron en el medio original a diferencia de las provenientes de callo que si lograron recrecer.

CONCLUSIONES

- 1.- Tanto el implante de células provenientes de callo como que el proveniente de células disociadas de *Galphimia glauca* lograron sobrevivir durante un mes en el parénquima cerebral de ratas.
- 2.- El implante de células en callo permite obtener mayor cantidad de tejido para recultivo que el implante de células disociadas
- 3.- El implante de células disociadas tiene una mayor capacidad de diferenciación dentro del medio animal.

PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN

Se propone que en futuros experimentos se incremente el número de animales injertados, se aumente la cantidad de tejido injertado y obtenido para recultivo, y en el caso del tejido proveniente de cultivo en suspensión, el recultivo deberá hacerse en su medio original. Además, la evaluación histológica podrá complementar los resultados de viabilidad anteriormente propuestos. Queda abierto este campo de investigación, para otro tipo de estudios acerca de todos los cuestionamientos que surgen sobre la interacción celular planta-animal.

CONCLUSIONES

1.- Tanto el implante de células provenientes de callo como que el proveniente de células disociadas de *Galphimia glauca* lograron sobrevivir durante un mes en el parénquima cerebral de ratas.

2 - El implante de células en callo permite obtener mayor cantidad de tejido para recultivo que el implante de células disociadas.

3.- El implante de células disociadas tiene una mayor capacidad de diferenciación dentro del medio animal.

PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN

Se propone que en futuros experimentos se incremente el número de animales injertados, se aumente la cantidad de tejido injertado y obtenido para recultivo, y en el caso del tejido proveniente de cultivo en suspensión, el recultivo deberá hacerse en su medio original. Además, la evaluación histológica podrá complementar los resultados de viabilidad anteriormente propuestos. Queda abierto este campo de investigación, para otro tipo de estudios acerca de todos los cuestionamientos que surgen sobre la interacción celular planta-animal.

BIBLIOGRAFÍA

1. Anton R., Jiang Y., Weniger B., Beck J., Rivier L. (1993) **Pharmacognosy of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) poiret.** *J Ethnopharmacology.* 38:153-157 .
- 2 Argueta A. V., Cano A L., et al. 1994. **Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Instituto Nacional Indigenista.** Vol. I, México D. F., p 583.
3. August C. S., Rosen F. S., Filler R. M., et al. (1968) **Implantation of a fetal thymus restoring immunological competence in a patient with a thymic aplasia (Digeoge's syndrome).** *Lancet* 2:1210-1211.
- 4 Bantorpe D.V., Branch S.A., Njar V.C.O., Osborne G M., Watson G.D. (1986) **Ability of plant callus cultures to syntethesize and accumulate lower terpenoids.** *Phytochemistry.* 25:629-636.
5. Berry M . (1974) **An immunological approach to regeneration in the central nervous system.** *Brith J Med.* 30:135-140.
- 6.Bjorklund A., Stenevi U. (1984) **Intracerebral neural implants: neuronal replacement and reconstrucción of damaged circuitres.** *Annu Rev Neurol .* 7:279-308.
- 7.Bjorklund A., Lindvall O. (1987) **Mechanisms of action of intracerebral neural implants: Studies on nigral and striatal grafts to the lesioned striatum.** *TINS;*10:509-516.
- 8.Brown J , Molnar I. G., Clark W, (1974) **Control of experimental diabetes in a rats by transplantación of fetal pancreas.** *Science.* 184: 1377-1379.

9. Buitelaar R.M and Tramper J. (1992) **Strategies to improve the production of secondary metabolites with plant cell cultures: a literature review** *Jor. of Biotech.* 23: 111-141.
10. Cuervas M, Del Castillo O. 1994. **Introducción al Transplante de órganos y tejidos** Libro del Año Madrid España, p 621.
- 11 Chang Shu-hwa, Jenq-chuan Yang (1995) **Callus culture and regeneración de *Eucalyptus camadulensis***. Bull Taiwan For. Res. Inst. Neww Series. 10(1):15-24.
12. Das GD., Hallas BH, Das KG. (1979) **Transplantación of neural tissues in the brains of laboratory mammals: technical details and comments.** *Experientia*; 35:143-286.
13. Degos L. (1994) **Los trasplantes de órganos.** Debate/Dominos. Madrid España. p 520 .
- 14 Freed C.R, Breeze R E., Greene P.E, Eidelberg W. Tsai, J Murphy, J O. Trojanowsky, Rosestein J.M. Fahn S. (1999) **Double-Blind placebo-controlled human fetal dopamine cell transplants in advanced parkinson's disease.** *Soc. Neuroci (Abst.;*125:212).
15. Lampson LA. (1987) **Molecular bases of the immune response to neural antigens.** *Trends Neurosci*;10:211-216.
16. Lawlor J. G., Fisher J. T. (1990) **Manual de alergia e inmunología. Diagnóstico y Tratamiento.** 2ª Edición Salvat S.A. Barcelona, España. 585 p
17. Lindvall O, Brundin P., Winder H, Rehncrona S, Gustavii B., Leenders K., (1990) **Grafts of fetal dopamina neurons survive and improve motor función in Parkinson's disease** *Science.* 247:574-577.

18. López-Lozano J.M., H.D.; Javier Abascal, M.D., PH; Begoña Brera, PH.D, Isabel Millan, PH.D., Gonzalo Bravo, M.D., PH.D. (1999) **Clinical outcome of cotransplantation of peripheral nerve and adrenal medulla in patients with parkinson's disease.** *J. Neurosurg* ; 90:875-882.
19. Lozoya X. (1997) **Fármacos de origen vegetal de ayer y de hoy.** *Investigación y Ciencia.* 254: 4-10 .
20. Lozoya X., Madrazo I., Guizar G., et al. (1995) **Survival of cultured plant cells grafted into the subcutaneous tissue of rats.** (preliminary report) *Arch Med Res* ; 26:85-89 (a).
21. .Lozoya X. (1995) **Los injertos planta-animal o trasplantes Inter.-regni.** *Ciencias.* 40:28-35 (b).
22. Madrazo I. R., Druker Colín (1987) **Open microsurgical autograft of adrenal medulla to right caudate nucleus in two patients with intractable Parkinson's disease.** *The New Eng J Med.* 316:831-834.
23. Madrazo I, Franco Bourland, Aguilera M., Ostroski-Solis F. (1991) **Development of human neural transplantation.** *Neurosurgery*; 29: 165-177.
24. Martell H, Smith H. (1986) **Plant Biotechnology.** Cambridge University Press USA. p 86-87 .
25. Murashige T. (1974) **Plant propagation through tissue culture.** *Ann Rev Plant Physiol* 25:135.
26. Osuna L Miranda N., Villarreal M. (1994) **Producción of triterpene compounds in *Galphimia glauca* tissue culture.** *Arch Med Res* ;25:129-131

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

27. Payne G. y cols. (1992) **Plant cell tissue culture in liquid systems**. J. Wiley & Sons. N Y. USA pp1-24 .
28. Rapaport SI.(1976) **Blood-brain in physiology and medicine**, Raven Press, Neww York .
- 29.Salisbury, F. B., Y. Ross W. C. 1994. **Fisiología Vegetal**. Grupo Editorial Iberoamérica. México, D.F. 363 p.
30. Schmid Heiner (1994) **Manual de injerto de frutales**. Omega. Barcelona, Espña.191 p.
- 31.Tortoriello J., Ortega A., Trujillo J., Herrera M. (1998) **Galphimine-B modifies electrical activity of ventral tegmental area neurons in rats**.*Planta Médica*. 64: 309-313.
- 32.Tortoriello J., Ortega A (1993) **Sedative effect of Galphimine-B, a nor-seco-triterpenoid from *Galphimia glauca***. *Planta Médica* . 59:398-400 .
- 33.-Tortoriello J. 1991. **Estudio fitoquímico y Farmacológico de *Galphimia glauca* Cav . Tersis: Antecedentes Etnobotánicos de *Galphimia glauca* Cav**. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Facultad de Medicina IMSS. Xochitepec Mor. pp. 4-8
- 34 Tortoriello J., Lozoya X. (1991) **Effect of *Galphimia glauca* metanolic extract neuropharmacological test**. *Planta Médica*. 58:234-236.
- 35 Wallace RB., Das GD. (1982) **Behavioral effects of CNS tranplants in the rat**. *Brain Res* 243:133-139.

36. Yang, Jenq-chuan, Jeen-yin Tsay, Jeng-der Chung, Zenn-zong Chen (1993) In vitro clonal propagation and cell suspension culture of *Gmelina arborea*. *Bull Taiwan For. Res. Inst. New Series*, 8 (1) 1-9.
37. Werkele H., Linigton C., Lassmann H. and Meyermann R. (1986) **Cellular immune reactivity within the CNS** *Trends Neurosci.* 9:502-526.
38. Wesley J.A (1980) **Principios de inmunología clínica**. Reverté. Barcelona, España. 416p.
39. Widholm J.M. (1972) **The use of fluoresceín diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells**. *Stain Technol.* 47:189-194.

APÉNDICE A

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

SOLUCIÓN ORGANICA

Solución stock	mg/l
Myoinositol	100 mg/l
Tiamina	50 mg/l
Piridoxina	50 mg/l
Ac. Nicotínico	10 mg/l

SOLUCIÓN INORGÁNICA

Solución stock	mg/l
Nitrato de amonio	16500
Ac Bórico	63
Cloruro de calcio	4400
Cloruro de cobalto	0.25
Sulfato cúprico	0.25
Sulfato ferroso	278
Sulfato de magnesio	169
Yoduro de Potasio	8.3
Nitrato de potasio	19000
Fosfato de potasio	1700
Sal sódica de etilen dinitril	
tetracetato	373
Molibdato de sodio	2.5
Sulfato de Zinc	86

APÉNDICE B

SOLUCION DE HANK'S

Solución stock	g/l
Cloruro de potasio	0.4
Fosfato de sodio anhidro	0.06
Cloruro de sodio	8.00
Fosfato de sodio dibásico anhidro	0.04788
Glucosa	1.0
Rojo fenol	0.11
Bicarbonato de sodio	0.38

Nota: Usar agua desionizada y ajustar el pH a 7.4

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS (PBS)

Cloruro de Sodio	8.7 g/l
Fosfato dibásico de sodio	2.4 g/l
Fosfato monobásico de sodio	0.4 g/l

Nota: Aforar a un litro estas cantidades y ajustar el pH a 7.4

APÉNDICE C

PREPARACIÓN DE FLUORESCÉINA STOCK

10 Mg Fluoresceína ----- 2 ml. acetona

PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN DE FLUORESCÉINA

Mezclar en un frasco oscuro:

5 ml..... agua desionizada

0.1 ml fluoresceína stock

Duración 10 min.

PREPARACIÓN DE YODURO DE PROPIDIO

50 ml... .. PBS

0.1 mg yoduro de propidio

SOLUCIÓN DE TRABAJO:

Mezclar en un frasco pequeño:

2ml ----- PBS

0.5 mlde solución anterior de yoduro de propidio