



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

ANÁLISIS DE LA TOXICIDAD AGUDA PRODUCIDA POR TULLIDORA
(*Karwinskia Humboldtiana*)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA

MA. GUADALUPE CASTILLO CANO

ASESORADO POR

M. C. FERNANDO JARAMILLO JUAREZ

NOVIEMBRE DE 1995

T
OK 495
R 45
C 3
E. 1



1080075000



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

ANALISIS DE LA TOXICIDAD AGUDA PRODUCIDA POR TULLIDORA
(Karwinskia Humboldtiana)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA

MA. GUADALUPE CASTILLO CANO

ASESORADO POR

M. C. FERNANDO JARAMILLO JUAREZ

NOVIEMBRE DE 1995

T
9K495
R415
C3





APROBACION DE TEMA DE TESIS

MA. GUADALUPE CASTILLO CANO
P R E S E N T E:

Por este conducto me permito informar a USTED usted, que el H. Consejo Técnico Consultivo de esta Facultad de Ciencias Químicas, en sesión ordinaria de fecha 29 de Enero de 1993., tuvo a bien aprobar el tema de su tesis profesional titulada: ANALISIS DE LA TOXICIDAD AGUDA PRODUCIDA POR EL CONSUMO DE TRUTAS DE TULLIDORA (*Karwinskia Humboldtiana*) mismo que será asesorado por el M.C. FERNANDO JARAMILLO JUAREZ, para la presentación de su examen profesional de QUÍMICO FARMACOBIOLOGO.

Sin más por el momento queda de usted.

Atentamente


ING. ROGELIO A. COLUNGA REYNA
SECRETARIO DE LA FACULTAD


FACULTAD DE
CIENCIAS QUÍMICAS
SECRETARIA

San Luis Potosí, S.L.P. a 9 de noviembre de 1995

Esté trabajo se realizó en el departamento
de Fisiología y Farmacología del Centro Básico
de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

DEDICATORIA

A mis padres, por su gran apoyo, confianza y comprensión.

A mis hermanos, por su ayuda.

A Javier.

AGRADECIMIENTOS

- Al M.C. Fernando Jaramillo Juárez, quien con su orientación y asesoría hizo posible éste trabajo.

- A la T.L.Q. Ma. Luisa Rodriguez Vazquez por su gran apoyo y colaboración en este estudio.

- Al Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad Autónoma de Aguascalientes por las facilidades prestadas para la realización de este trabajo.

- A mis Maestros de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí por su gran enseñanza.

INDICE

	Pág.
RESUMEN.....	1
ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION DEL TRABAJO.....	3
INTRODUCCION.....	8
OBJETIVOS.....	14
MATERIAL Y METODOS.....	15
RESULTADOS.....	20
DISCUSION.....	28
CONCLUSIONES.....	31
BIBLIOGRAFIA.....	32

RESUMEN

La tullidora (*Karwinskia humboldtiana*) es un arbusto que pertenece a la familia de las ramináceas y que crece en las regiones semidesérticas de nuestro país. La ingestión de sus frutos en el hombre, y en animales de pastoreo, produce parálisis flácida, progresiva y ascendente, que puede culminar con la muerte aparentemente por parálisis respiratoria. En el humano el cuadro causado por la ingestión de tullidora es confundido en su fase crónica con el síndrome de Guillain-Barré-Laundry o con la poliomielitis, desconociéndose hasta ahora las posibles soluciones terapéuticas o paliativas.

En los animales de experimentación se ha encontrado que la administración de frutos de tullidora, o de la toxina aislada de ellos, produce un cuadro de intoxicación en donde claramente se distinguen dos fases: la fase de intoxicación aguda, que se inicia un día después de la administración de los materiales tóxicos, y que se prolonga durante dos o tres semanas, fase caracterizada por un descenso considerable en el peso de los animales intoxicados y en donde se presenta la muerte de un gran número de ellos, y la fase de intoxicación crónica, que se inicia aproximadamente entre la tercera y cuarta semana después del tratamiento con tullidora y durante la cual aparecen y se desarrollan los trastornos motores y la parálisis flácida anteriormente descrita.

Los trastornos motores provocados por la ingestión de los frutos de tullidora, representan la manifestación clínica de una axonopatía periférica, distal, desmielinizante y progresivamente ascendente. Las características de esta neuropatía experimental han sido bien documentadas, pero hasta la fecha solo se conocen parcialmente las causas fisiopatológicas de la toxicidad producida por tullidora durante la fase aguda. La determinación de estas causas representa un problema importante para el investigador y para el médico en virtud de que una gran parte de las muertes causadas por la ingestión de los frutos de tullidora, tanto en el hombre como en los animales, ocurren durante la fase de intoxicación aguda.

En este trabajo se analizan los mecanismos de coagulación sanguínea y las concentraciones de ATP en algunos órganos y tejidos de ratas Wistar intoxicadas con frutos de tullidora, con el propósito de contribuir a determinar las causas de la muerte y las alteraciones fisiopatológicas que se presentan durante la fase de intoxicación aguda producida por esta planta.

ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION DEL TRABAJO

La cita más antigua relacionada con la toxicidad producida por tullidora se remonta al siglo XVIII y es dada por el historeador Don Francisco Javier Clavijero en su obra titulada " Historia de la Antigua o Baja California ".(1)

A dos siglos del testimonio de Clavijero, las alteraciones causadas por la ingestión de los frutos de tullidora han sido objeto de estudios, tanto clínicos como experimentales.

En efecto, en 1918, Castillo Nájera F. presentó una comunicación en la que describe 106 casos de intoxicación colectiva por consumo de frutos de tullidora, observados en Guaymas, Sonora, con una tasa de mortalidad del 10% (2).

Por otra parte, años más tarde, Padrón Puyou menciona haber observado varios casos de niños que presentaban el cuadro de parálisis clásico producido por la tullidora. Tales niños procedían de diversas regiones del estado de San Luis Potosí, entre ellas, Río Verde, Moctezuma y la Huasteca Potosina. También Padrón Puyou al analizar a estos niños intoxicados con frutos de tullidora, describe el cuadro clínico de la intoxicación afirmando que primeramente se paralizan los miembros inferiores, después la parálisis asciende hasta impedir los movimientos de los miembros superiores y provocar dificultades en la función respiratoria y en la deglución, así como en la articulación de las palabras. Cuando el ataque es leve, la parálisis se limita a los miembros inferiores. La gravedad del caso parece estar en relación directa con la cantidad y grado de actividad del fruto ingerido. La reanudación de movimientos se obtiene en sentido inverso a la instalación del daño. (3)

Hoy en día, sabemos que la tullidora causa parálisis por que su acción produce una desnervación de los músculos afectados; esto es, la parálisis es neurogénica. Esta desnervación puede ser funcional o anatómica (4). Cuando es funcional se mantiene la integridad estructural de los axones motores, los cuales excitan normalmente las fibras musculares, pero la excitación y la contracción muscular no ocurren en los animales intoxicados porque la propagación (conducción) de la actividad eléctrica se interrumpe en esos axones (5).

Esta interrupción (bloqueo de la conducción) es consecuencia de la desmielinización segmentaria inicialmente descrita por Escobar y Nieto, en 1965, al estudiar gatos y ratas intoxicados oralmente con frutos de tullidora (6). En los axones desmielinizados hay una fuga de la corriente eléctrica asociada a la propagación de la excitación; la fuga ocurre en los segmentos desmielinizados e inexcitables, lo que a su vez determina una disminución de la densidad de la corriente que fluye a través de la membrana axonal que si es excitable, si la densidad es inferior a un cierto valor, la propagación se suspende.

La alteración más grave causada por la toxina de la tullidora es degeneración de axones motores (desnervación anatómica). La mayor parte de las fibras musculares quedan desnervadas en los músculos distales de la extremidad posterior de los animales severamente intoxicados, la muerte sobreviene cuando los músculos respiratorios están también severamente afectados (7).

Se ha encontrado que todo el mal causado por el fruto de la tullidora radica en la semilla; en efecto, de la cutícula que cubre la semilla se ha aislado, purificado e identificado la estructura molecular de un compuesto polifenólico que administrado oralmente en animales de experimentación reproduce las alteraciones observadas cuando se ingieren los frutos (4). Además, otros autores han aislado varios compuestos con actividad tóxica que en su conjunto pudieran explicar la alta toxicidad de esta planta (8).

Ahora bien, en los animales de experimentación se ha encontrado que la administración de frutos de tullidora, o de la toxina aislada de ellos, produce un cuadro de intoxicación en donde claramente se distinguen dos fases: la fase de intoxicación aguda, que se inicia un día después de la administración de los materiales tóxicos, y que se prolonga durante dos o tres semanas, fase caracterizada por un descenso considerable en el peso de los animales intoxicados y en donde se presenta la muerte de un gran número de ellos, y la fase de intoxicación crónica durante la cual aparecen y se desarrollan los trastornos motores y la parálisis flácida como consecuencia de una neuropatía periférica ya descrita, que se inicia aproximadamente entre la tercera y cuarta semanas después de la administración de una dosis de tullidora (9).

Los aspectos fisiopatológicos que conducen a la muerte de los animales durante la fase de intoxicación aguda, hasta hoy en día, sólo se conocen parcialmente.

Ha sido descrito que la función renal de ratas intoxicadas con frutos de tullidora, durante la fase de intoxicación aguda, presenta alteraciones caracterizadas por disminución en la tasa de filtración glomerular y en el flujo sanguíneo renal. Como consecuencia de la caída en la tasa de filtración glomerular, disminuye la carga filtrada de sodio en los glomérulos renales; sin embargo la excreción fraccionaria de sodio se encuentra aumentada significativamente, con relación a los valores obtenidos en los animales testigos. Lo anterior revela daño en el mecanismo de reabsorción tubular de sodio de los animales intoxicados con tullidora (10). También se ha descrito, edema y congestión pulmonar y hepático, acompañados de alteraciones en el electrocardiograma y elevación de la transaminasa glutámico oxaloacética (TGO) sérica en la rata, durante la fase de intoxicación aguda (11).

Con relación a los problemas zootécnicos producidos por tullidora, se ha encontrado que el consumo de esta planta por animales de pastoreo les genera intoxicaciones que se reconocen generalmente hasta el envenenamiento crónico. La planta es tóxica para bovinos, caprinos y ovinos. El síndrome crónico se traduce en parálisis de los miembros posteriores y después en parálisis de los miembros anteriores. Antes de presentarse la parálisis total, el ganado no muestra signos manifiestos de anormalidad alguna. Pueden transcurrir hasta tres meses para que se muestren los síntomas de intoxicación en algunos animales, mientras que otros se observan alterados a sólo dos semanas después de ingerir la planta. El órgano más afectado es el hígado que muestra cirrosis, degeneración grasa y pequeñas hemorragias. El riñón evidencia aumento de volumen, los pulmones pueden sufrir edema y congestión, y el corazón muestra pequeñas hemorragias e infiltración grasa (12).

Finalmente, utilizando extractos de frutos de tullidora, Wheeler y Camp demostraron en estudios in vitro que la tullidora actúa a nivel de mitocondrias aisladas de hígado y corazón de rata, inhibiendo el consumo de oxígeno al actuar directamente en la cadena respiratoria. Además, Chariton ha encontrado anomalías morfológicas en mitocondrias de nervios periféricos de cabras alimentadas con frutos de tullidora (13).

En nuestro país, existe la necesidad de penetrar en el estudio sistemático de las plantas que, a través de su ingesta o contacto, afectan la salud de personas o animales. En el ámbito médico, anualmente se presentan numerosos casos de intoxicación por ingestión de plantas, tanto en las ciudades como en las áreas rurales; éstos casos exigen medidas de acción urgentes y tratamientos específicos, así como indicadores sobre la naturaleza del vegetal tóxico (14).

Con relación a tullidora, como ya se mencionó, los trastornos motores provocados por la ingestión de los frutos de esta planta, representan la manifestación clínica de una axonopatía periférica, distal, desmielinizante y progresivamente ascendente. Las características de esta neuropatía experimental han sido bien documentadas, pero hasta la fecha no se han determinado las causas de la toxicidad de la fase aguda, lo que resulta de interés para el investigador e importante para el médico, ya que como se dijo, una gran parte de las muertes causadas por la ingestión de tullidora ocurren durante la fase de intoxicación aguda en el hombre y en los animales de experimentación.

Ha sido descrito que en ratas Wistar aparecen edema y congestión pulmonar y hepático, acompañados de elevación de la transaminasa glutámico oxaloacética (TGO) en la sangre (11). También se ha encontrado que en animales de pastoreo el órgano más afectado es el hígado que muestra cirrosis, degeneración grasa y pequeñas hemorragias; además, en el corazón también se han encontrado infiltración grasa y pequeñas hemorragias (12). Por otra parte, mediante estudios in vitro se ha demostrado que los extractos de tullidora actúan a nivel de mitocondrias de hígado y corazón de rata inhibiendo el consumo de oxígeno al actuar directamente en la cadena respiratoria (13). Lo anteriormente descrito apoya la necesidad de realizar estudios relacionados con los mecanismos de coagulación de la sangre y con la síntesis de ATP en diferentes órganos y tejidos, con el propósito de analizar y caracterizar el posible daño producido por tullidora en estos procesos.

Finalmente, es importante subrayar que no existe un antídoto específico contra la intoxicación producida por el consumo de los frutos de esta planta, el tratamiento es sintomático, de sostén y de rehabilitación (15). Por lo tanto, la caracterización de los aspectos fisiopatológicos relacionados con la toxicidad producida por tullidora (fase aguda) puede representar el punto de partida para establecer un tratamiento racional (o encontrar un antídoto) que reduzca la severidad de los daños producidos por el consumo de esta planta.

INTRODUCCION

En México, la herbolaria ocupa un lugar preponderante en la vida de sus pobladores. Desde la época en que alcanzaron su esplendor las culturas indígenas mesoamericanas hasta hoy en día, contamos con testimonios que subrayan la importancia de la herbolaria en la vida de nuestro país. Las plantas alimenticias, ornamentales, medicinales, tóxicas, etc., se mencionan con cierta frecuencia en las obras que aluden a la historia nacional. En efecto, a la llegada de los españoles a estas tierras, en el siglo XVI, les llamó mucho la atención el interés de los habitantes de este continente por las plantas medicinales. Había jardines botánicos de plantas curativas, muy bien cuidados, en Tenochtitlan, Atzacapotzalco, Texcoco, Oaxtepec, y en otros lugares. El uso de plantas medicinales está descrito en la "Historia General de las Cosas de la Nueva España" de Sahagún y en los protocolos de las fuentes indígenas.

En algunas obras, las plantas Tóxicas aparecen descritas de una manera circunstancial. Tal es el caso de la Tullidora, cuya cita mas antigua que se conoce se remonta a la segunda mitad del siglo XVIII, época en la que el historiador jesuita Don Francisco Javier Clavijero consignó en su obra (Historia de la Antigua ò Baja California) lo siguiente: " En varios lugares de la península hay otro arbusto cuyo fruto es redondo, del tamaño de un garbanzo, y negro cuando está maduro. Los indios cochimi se abstienen de comerlo porque saben que es muy nocivo, pero como los niños lo ignoran ò nada temen suelen comerle instigados por el hambre ò la golosina. 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, por cuyo motivo han procurado los misioneros exterminar en todas partes aquella planta. Sin embargo, los pericúes comen el fruto sin que les haga daño, quitando primero la semilla en la cual, según ellos dicen, consiste todo el mal" (1).

Una de las actividades más importantes del hombre es la producción de alimentos y dentro de ella, la ganadería ocupa un lugar preponderante. En la producción de ganado, las pérdidas por la ingestión de plantas tóxicas ocasionan importantes perjuicios, especialmente en los estados del norte del país, en donde como es sabido, las variaciones climáticas pueden llevar a períodos de sequía prolongados, que obligan al sobrepastoreo de los terrenos en que crecen las plantas forrajeras y al consumo consecuente de vegetales venenosos.

La Tullidora (Karwinskia humboldtiana) es un arbusto que pertenece a la familia de las ramnáceas y que crece en las regiones semidesérticas de nuestro país. Este arbusto se encuentra ampliamente distribuido en la parte central y norte de la República Mexicana, extendiéndose hasta el sur de los Estados Unidos de Norteamérica. La ingestión de sus frutos, ò de las toxinas aisladas de ellos, produce en el hombre y en animales de pastoreo, parálisis flácida, progresiva y ascendente, que puede culminar con la muerte aparentemente por parálisis respiratoria. En el humano, el cuadro causado por la ingestión de tullidora es confundido en su fase crónica con el síndrome de Guillain-Barrè-Laundry ò con la poliomielitis, desconociéndose hasta ahora las posibles soluciones terapéuticas o paliativas. (6,12)

MARCO TEORICO

El tratamiento con buenos resultados de un paciente con algún trastorno hemorrágico depende, en gran parte, de un diagnóstico exacto. El diagnóstico correcto y el tratamiento racional se basan en el conocimiento de los mecanismos normales de hemostasia.

Puede haber pérdida de sangre cuando la pared de los vasos sanguíneos se interrumpe o cuando se hace permeable a los eritrocitos. La hemostasia normal comprende mecanismos que se activan inmediatamente después de la lesión, y un mecanismo de efecto más prolongado que evita la pérdida de sangre (16).

Los principales mecanismos inmediatos son: 1). la vasoconstricción debida a contracción del músculo liso de la pared vascular y 2). La formación de un tapón por acumulación de plaquetas. La hemostasia prolongada se produce mediante la formación del coágulo de fibrina, producto de las reacciones de los factores de la coagulación.

Las plaquetas se forman en la médula ósea (megacariocitos), de donde son liberadas hacia la circulación. Son cuerpos anucleados de 2 a 3 μ de diámetro cuya vida media es de aproximadamente diez días. Su característica peculiar es la capacidad de adherirse a superficies extrañas y formar acúmulos como respuesta a diversos estímulos que incluyen trombina, colágena, adenosindifosfato (ADP) y adrenalina. En las mitocondrias de las plaquetas se genera ATP a través de la glucólisis (17).

Las plaquetas también participan en las reacciones de los factores de la coagulación que dan lugar a la formación de trombina. En este caso, participan los factores de la coagulación X y V. El factor Xa se une, junto con el factor V, a la membrana plaquetaria de lipoproteínas y activa así a la protrombina. Es necesaria la activación de la plaqueta para la unión del factor Xa y el fomento consecuente de la coagulación (17).

Por otra parte, la principal función de los factores de la coagulación presentes en el plasma es producir trombina para formar el coágulo de fibrina y estabilizar el tapón plaquetario. El sistema de coagulación antes señalado y las plaquetas actúan de manera conjunta para bloquear la hemorragia de los vasos sanguíneos.

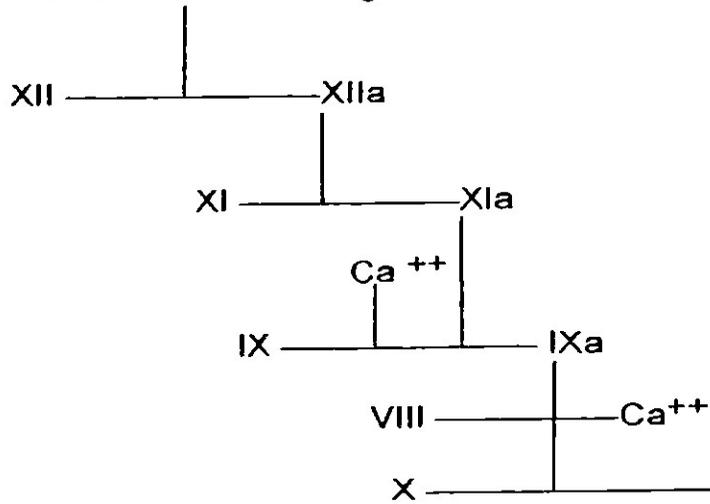
En la cascada de la coagulación participan una serie de proenzimas que circulan en el plasma en estado inactivo y que se activan cuando aparece una lesión vascular o cuando se alteran los mecanismos que controlan el proceso hemostático. Pueden presentarse trastornos hemorrágicos por actividad deficiente de uno o más factores de la coagulación o por inhibición de este mecanismo. Las deficiencias de los factores de la coagulación pueden deberse a su producción reducida o a la elaboración de proteínas anormales con actividad biológica defectuosa o con catabolismo excesivamente rápido. Los trastornos en la producción de los factores de la coagulación pueden tener origen genético o pueden deberse a enfermedades hepáticas, así como a deficiencias de vitamina K (17).

Para el estudio de los mecanismos de la coagulación se han descrito dos sistemas: El sistema intrínseco, relacionado con los procesos sanguíneos intravasculares, y el sistema extrínseco, que se activa por la acción de un factor proveniente de tejidos lesionados. En la figura No. 1 se describen los factores que participan en los sistemas de la coagulación sanguínea.

Finalmente, es un hecho bien conocido que en los mamíferos el ATP (adenosintrifosfato) es un sustrato energético utilizado por las células para realizar un gran número de funciones. Participa en los sistemas de transporte de iones a través de la membrana (ejemplo, bomba Na^+ y K^+), en el proceso de contracción del músculo esquelético, en la síntesis de proteínas, en la liberación del ADP contenido en los gránulos de las plaquetas mediante su conversión, por la adenilatociclasa en AMP cíclico, etc. En los organismos aerobios, la fosforilación oxidativa es el proceso principal por el que se forma ATP. Este proceso es llevado a cabo por sistemas respiratorios que se localizan en la membrana interior de las mitocondrias. El ATP se forma a medida que se transfieren electrones desde el NADH ò el FADH_2 , hasta el O_2 mediante una serie de transportadores de electrones (18).

VIA INTRINSECA

Traumatismo a la sangre
o contacto con colágeno



VIA EXTRINSECA

Traumatismo tisular

Tromboplastina tisular
(proteína + fosfolípido)

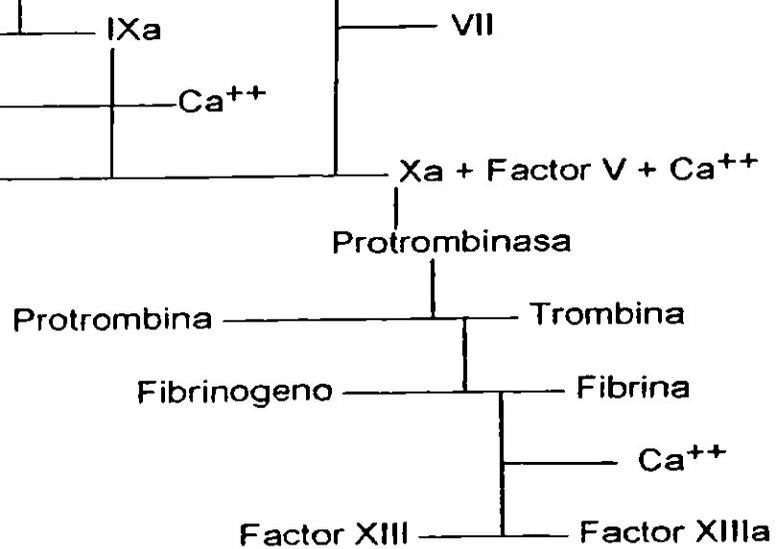


FIGURA 1.- VIAS DESCRITAS EN LA CASCADA DE LA COAGULACION SANGUINEA .

HIPOTESIS DE TRABAJO

Durante la intoxicación producida por Karwinskia humboldtiana, los mecanismos de coagulación sanguínea y las concentraciones celulares de ATP se encuentran alterados, y su daño se relaciona con los factores fisiopatológicos involucrados en la toxicidad aguda producida por esta planta.

OBJETIVOS

Mediante el desarrollo de este trabajo pretendemos analizar los mecanismos de coagulación sanguínea y las concentraciones de ATP en algunos órganos y tejidos de ratas Wistar intoxicadas con frutos de tullidora, en un intento por determinar las causas de muerte y las alteraciones fisiopatológicas que se presentan durante la fase de intoxicación aguda producida por esta planta. Por lo tanto, los objetivos de este trabajo son:

- 1). Estudiar los mecanismos de coagulación sanguínea durante la intoxicación aguda producida por Karwinskia humboldtiana (tullidora).
- 2). Analizar las concentraciones de ATP en corazón, hígado y sangre de animales de experimentación tratados con tullidora.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron ratas Wistar machos (250-320g) los cuales fueron divididos en dos lotes: lote A, formado por 17 ratas, en el cual se hicieron estudios de coagulación sanguínea y lote B, formado por 26 ratas, en las cuales se cuantificó ATP celular. En los animales pertenecientes al lote A, antes y después de la intoxicación con frutos de tullidora, se determinaron los siguientes parámetros: Tiempo de Sangrado, por el método de Ivy ; Tiempo de Protrombina, por el método de Quick ; Tiempo de Tromboplastina Parcial, método del Langdell et al; y Recuento de Plaquetas, método de Brecher y Chronkite (19,20). Por otra parte, los animales pertenecientes al lote B fueron divididos en dos grupos (testigos y tratados) y en ellos se cuantificaron las concentraciones de ATP en hígado, corazón y sangre por el método de Bucher modificado por Adams (21).

Los animales tratados recibieron homogeneizados de frutos de tullidora a dosis de 1.5g/kg de peso, vía oral, mientras que los animales testigos recibieron un volumen equivalente de agua por vía oral. Los parámetros anteriormente descritos fueron estudiados en todos los animales intoxicados habiendo transcurrido 3-5 días de haber recibido los frutos de tullidora (fase de intoxicación aguda).

Las ratas del lote A fueron anestesiadas con Pentobarbital sódico (30mg/kg, vía intraperitoneal) para la toma de muestra de sangre (1ml). Las ratas del lote B, también fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (30 mg/Kg.) para la obtención de las muestras de los tejidos ya señalados; se utilizaron dosis anestésicas de pentobarbital para llevar a las ratas a un plano de anestesia quirúrgica.

Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante la prueba t de student.

A continuación se señala el fundamento de las pruebas realizadas y el material biológico utilizado

TIEMPO DE SANGRADO

El tiempo de sangrado se determina haciendo un corte fino a la punta de la cola de la rata, al mismo tiempo que se pone en marcha el cronómetro; se introduce la cola en un vaso con agua a 37°C y el cronómetro se detiene hasta que la rata deja de sangrar.

RECUESTO DE PLAQUETAS

Se utiliza sangre de la arteria caudal de la rata, usando heparina como anticoagulante. En seguida, con una pipeta para cuenta de glóbulos blancos se toma oxalato de amonio al 3.8% hasta la marca 0.5, después se lleva hasta la marca 1 con sangre bien homogeneizada y finalmente se afora a la marca 11 con oxalato de amonio. Se agita 45 segundos en el agitador mecánico para pipetas, se tiran las tres primeras gotas de la pipeta y la cuarta se utiliza para llenar por capilaridad uno de los compartimentos de la cámara de Neubauer, se deja reposar en cámara húmeda cinco minutos y se hace el recuento de plaquetas con el objetivo de 40X, contando 80 cuadros de la cuadrícula para glóbulos rojos; utilizando los 16 cuadros de cada esquina y 16 del centro para obtener un resultado más homogéneo.

TIEMPO DE PROTROMBINA

De acuerdo a las especificaciones descritas por Simplastin Excell. Por lo general, un T.P. prolongado es indicativo de un nivel disminuido de uno o más factores del sistema extrínseco, cuya causa puede deberse a trastornos hereditarios de la coagulación, deficiencia de vitamina K, enfermedad hepática, etc. Para esta determinación se extrae de la arteria caudal de la rata 1ml de sangre, usando citrato de sodio (1.34 %) como anticoagulante, en proporción 1:10 (1 parte de citrato y 9 de sangre), se centrifuga y se separa el plasma.

Técnica:

1. Reconstruir con 3 ml, de agua el vial para T.P.
2. Incubar a 37 °C 0.2 ml de Simplastin Excell por prueba.
3. Marcar un tubo de ensaye para cada muestra.
4. Pipetear 0.1 ml de plasma al tubo apropiado.
5. Incubar el plasma a 37 °C durante 2-3 minutos.
6. Pipetear rapidamente 0.2 ml. de Simplastin Excell (37 °C) en el tubo con la muestra (plasma). Simultáneamente poner el cronómetro en marcha hasta la detección del coágulo.
- 7.- Anotar el tiempo en segundos.

TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL

De acuerdo a las especificaciones de Organon Teknika, En este método se incluye un reactivo para ser utilizado en la determinación del Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada (TTPA), prueba sensible a todos los factores que intervienen en el sistema intrínseco de coagulación, excepto el Factor 3. Al mezclarse TTPA con el plasma, se obtiene un nivel óptimo de factor plaquetario 3 y una activación uniforme de la muestra. Después de un determinado período de incubación a 37°C, la reacción se inicia añadiendo cloruro de calcio y se mide el tiempo que transcurre (en segundos) hasta la detección del coágulo.

Para la determinación de TTPA se necesita 1ml de sangre de la arteria caudal de la rata. En esta prueba se va a trabajar usando la misma muestra que para el T.P.

Técnica

1. Incubar a 37 °C 0.1 ml. por prueba de cloruro de calcio 0.025 M .
2. Identificar un tubo de ensaye para cada muestra a analizar.
3. Colocar 0.1ml de plasma en su tubo correspondiente. Añadir 0.1 ml de TTPA a cada tubo
4. Incubar a 37°C cinco minutos exactos.
5. Inmediatamente añadir 0.1ml de solución de cloruro de calcio 0.025 M (37 °C). Simultáneamente poner el cronómetro en marcha y determinar la formación del coágulo.
6. Anotar el tiempo en segundos.

OBTENCION DE HIGADO Y CORAZON

1. Pesar la rata
2. Anestesiaria usando pentobarbital sódico a dosis de 30mg/kg de peso.
3. Preparar la rata para extraer el corazón y el hígado (cirugía).
4. Se hace un corte en la línea media de la rata. Extraer el corazón y el hígado; el corazón se corta a la mitad para enjuagarlo bien, cuidando que no lleve coágulos en los ventrículos. Del hígado se toma 1g y se enjuaga dos veces en solución salina.
5. Se pesa el corazón, se homogeniza en un mortero y se diluye con un volumen de agua doble a su peso. El hígado se homogeniza en un mortero y se diluye con 1ml de agua destilada.
6. Previamente se rotulan dos tubos: uno para el corazón en el cual se pone 1ml de ácido tricloroacético (15%) para desproteínizar; el otro para el hígado, con 1ml de ácido perclórico 0.9M para desproteínizar. Se coloca el homogeneizado de corazón e hígado en su tubo correspondiente; se agitan los tubos en agitador mecánico.
7. Se centrifuga a 3000rpm., durante cinco minutos, y se decantan los sobrenadantes para trabajar con ellos.

El sobrenadante contiene el ATP y debe trabajarse de inmediato.

OBTENCION DE SANGRE

1. Se rotula un tubo para la sangre con 1 ml. de ácido tricloroacético para desproteínizar y se coloca en baño de hielo
2. Se extrae 1 ml. de la arteria caudal de la rata, usando heparina como anticoagulante. Se lleva la sangre al tubo y se agita en el agitador mecánico.
3. Se centrifuga a 3000 rpm., durante cinco minutos.
4. Se decanta el sobrenadante para trabajar con él.

TECNICA PARA CUANTIFICAR ATP

En un vial que contiene 0.3mg de NADH, pipetear los reactivos que a continuación se indican, en el orden siguiente:

1.0ml de solución buffereada de ácido 3-fosfoglicérico (18mmol/l)

1.5ml de agua

0.5ml de sobrenadante de la muestra biológica.

Mezclar varias veces para disolver el NADH.

- Decantar el contenido en una cubeta y leer la absorbancia inicial a 340nm, utilizando agua como referencia (valor inicial A).
- Dentro de una cubeta pipetear 0.04ml de la mezcla enzimática GAPD/PGK (3 fosfato deshidrogenasa/fosfoquinasa de ácido 3-fosfoglicérico).
- Mezclar el contenido de la cubeta por inversión y colocarla en el aparato.
- Leer la absorbancia (contra agua) a 340nm. Registrar la absorbancia hasta que esta alcance su valor mínimo (generalmente se requiere menos de 10 minutos). Este valor se registra como valor final A.

CALCULOS

$$\Delta A = A \text{ inicial} - A \text{ final}$$

$$\text{ATP sangre (mmol/dl)} = \Delta A \times 195$$

$$195 = \frac{3.04 \times 100}{6.22 \times 0.25}$$

3.04 = Volumen del líquido en la cubeta (ml.)

100 = Conversión de la concentración de ml. a dl.

6.22 = Absortividad milimolar del NADH a 340 nm.

0.25 = Volumen de muestra.

Kit usado:

Adenosine - 5' - Triphosphate (ATP) Sigma Diagnostics,

Procedure No. 366 - UV

RESULTADOS

Los valores de los parámetros analizados en el estudio de la coagulación sanguínea antes de la intoxicación de los animales de experimentación se muestran en el cuadro No. 1. Por otra parte, en el cuadro No. 2 se muestran los valores de estos parámetros después de la intoxicación con frutos de tullidora. En algunas de las ratas intoxicadas no fue posible determinar el tiempo de sangrado a causa de los severos trastornos hemodinámicos (presión sanguínea muy abatida) que se presentan a medida que progresa la fase de intoxicación aguda.

Un resumen de los datos anteriormente señalados se muestra en el cuadro No. 3. Puede observarse un descenso considerable en el peso de los animales intoxicados, con relación al valor medio de los controles, así como también un 21% de mortalidad en las ratas tratadas con tullidora, signos que demuestran que efectivamente estos animales presentaron el cuadro de intoxicación producido por esta planta. Puede observarse también que el valor medio del tiempo de sangrado de los animales intoxicados se incrementa en un 119% con relación al valor medio obtenido en los animales controles.

Analizando las vías descritas en la cascada de la coagulación, se encuentra alterado el valor medio del tiempo de protrombina, ya que muestra un incremento significativo (71%) con relación al valor medio de los controles. Sin embargo, no se presentan diferencias significativas en los valores medios obtenidos para el tiempo parcial de tromboplastina antes del tratamiento y después del tratamiento con frutos de tullidora. Finalmente, es necesario señalar la existencia de una disminución moderada y no significativa en la cuenta plaquetaria de los animales intoxicados.

En el cuadro No.4 se presentan los valores de las concentraciones de ATP en sangre, hemoglobina, corazón e hígado de los animales control. Los valores de concentración de ATP en los tejidos antes señalados y correspondientes a la población de animales intoxicados se muestran en el cuadro No. 5. Un resumen de estos datos se presenta en el cuadro No. 6. Puede observarse una disminución significativa (46%) en el valor medio de la concentración de ATP en el hígado de los animales intoxicados con relación al valor medio de la población de los animales control. No existen diferencias significativas en las concentraciones de ATP en sangre, hemoglobina y corazón de las poblaciones estudiadas.

CUADRO No. 1.- VALORES CONTROLES DE LOS PARAMETROS ANALIZADOS EN EL ESTUDIO DE LA CUAGULACION SANGUINEA DE RATAS WISTAR MACHOS ANTES DEL TRATAMIENTO CON HOMOGENEIZADOS DE FRUTOS DE TULLIDORA.

Rata (No.)	Peso (g)	Plaquetas (mm³)	Tiempo de sangrado (min)	Tiempo de protrombina (seg)	Tiempo parcial de tromboplastina (seg)
1	268	415.000	1.53	12.5	36.0
2	258	379.000	3.45	12.0	42.0
3	255	386.000	4.20	11.5	38.0
4	262	320.000	1.37	12.0	39.7
5	256	358.000	3.30	13.0	44.5
6	289	410.000	2.17	14.2	35.0
7	262	419.000	6.03	13.0	35.0
8	277	433.000	4.17	12.5	32.5
9	298	394.000	3.33	13.0	32.0
10	278	382.000	2.15	13.5	32.0
11	278	392.000	2.83	14.5	35.0
12	278	341.000	2.50	13.0	37.0
13	296	326.000	2.67	14.0	32.5
14	287	432.000	2.83	13.0	32.0
15	280	415.000	1.45	13.0	35.0
16	276	358.000	2.00	14.0	31.5
17	286	348.000	1.37	12.5	35.0

CUADRO No. 2 .- VALORES DE LOS PARAMETROS ANALIZADOS EN EL ESTUDIO DE LA COAGULACION SANGUINEA DE RATAS WISTAR MACHOS, INTOXICADOS CON HOMOGENEIZADOS DE FRUTOS DE TULLIDORA (1.5 g/Kg DE PESO, VIA ORAL), A LOS 3-5 DIAS DEL TRATAMIENTO.

Rata (No.)	Peso (g)	Plaquetas (mm³)	Tiempo de sangrado (min)	Tiempo de protrombina (seg)	Tiempo parcial de tromboplastina (seg)
1	193	493,000	8.88	17.5	32.0
2	178	467,000	9.53	19.0	39.0
3	189	319,000	3.58	19.9	34.0
4	204	305,000	3.63	18.0	35.0
5	164	376,000	8.03	22.0	43.0
6	189	230,000	3.02	22.5	41.5
7	Muere	-----	-----	-----	-----
8	194	384,000	-----	27.5	39.0
9	Muere	-----	-----	-----	-----
10	186	342,000	-----	25.0	51.0
11	217	387,000	-----	24.0	41.0
12	193	361,000	-----	21.5	41.0
13	Muere	-----	-----	-----	-----
14	201	406,000	-----	28.5	42.0

CUADRO No. 3.- ESTUDIO DE LA COAGULACION SANGUINEA EN RATAS WISTAR MACHOS, ANTES DE LA INTOXICACION CON TULLIDORA (GPO. CONTROL) Y DESPUES DEL TRATAMIENTO CON LOS FRUTOS DE ESTA PLANTA (GPO. INTOXICADO). SE EXPRESAN LOS VALORES MEDIOS (\pm DESVIACION ESTANDAR) DE LOS PARAMETROS ANALIZADOS.

* DIFERENCIAS ESTADISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS CON RESPECTO A LOS VALORES CONTROLES.

Grupo	Peso (g)	Mortalidad (%)	Tiempo de sangrado (min)	Tiempo de protrombina (seg)	Tiempo parcial de tromboplastina (seg)	Plaquetas (mm ³)
Control (N=17)	275 (\pm 13)	-----	2.78 (\pm 1.23)	13.01 (\pm 0.83)	35.54 (\pm 3.75)	384,882 (\pm 38,781)
Intox. (N=14)	188* (\pm 14)	21	6.11* (\pm 3.00)	22.23* (\pm 3.74)	39.86 (\pm 5.15)	370,000 (\pm 73,243)

CUADRO No. 4.- VALORES CONTROLES DE LAS CONCENTRACIONES DE ATP EN DIFERENTES TEJIDOS DE RATAS WISTAR MACHOS.

Rata (No.)	Peso (g)	Hto (%)	Hb (g/dl)	Concentraciones de ATP			
				Sangre ($\mu\text{mol/dl}$)	Hemoglo bina. ($\mu\text{mol/g}$)	Corazón ($\mu\text{mol/g}$)	Hígado ($\mu\text{mol/g}$)
1	288	42	13.9	56.16	4.05	42.54	126.36
2	287	39	12.9	15.70	4.01	43.22	111.94
3	281	44	14.5	44.85	3.08	34.92	146.64
4	306	33	10.9	36.66	3.36	49.64	124.80
5	314	41	13.5	56.55	4.18	79.82	124.80
6	317	40	13.2	39.58	2.99	64.50	102.96
7	314	44	14.5	53.23	2.32	62.33	-----
8	315	45	14.8	46.41	3.12	54.30	185.64
9	308	39	12.9	46.21	3.59	53.88	95.56
10	299	40	13.2	36.85	2.79	47.72	111.14
11	292	41	13.5	49.14	3.63	86.92	120.50
12	300	42	13.9	46.41	3.35	48.20	134.14

CUADRO No. 5.- VALORES DE LAS CONCENTRACIONES DE ATP EN DIFERENTES TEJIDOS DE RATAS WISTAR MACHOS INTOXICADOS CON HOMOGENEIZADOS DE FRUTOS DE TULLIDORA, (1.5 g /Kg, VIA ORAL), A LOS 3-5 DIAS DEL TRATAMIENTO.

Rata (No.)	Peso (g)	Hto (%)	Hb (g/dl)	Concentraciones de ATP			
				Sangre ($\mu\text{mol/dl}$)	Hemoglo bina. ($\mu\text{mol/g}$)	Corazón ($\mu\text{mol/g}$)	Hígado ($\mu\text{mol/g}$)
1	186	34	11.2	62.00	5.52	46.59	46.40
2	Muere	-----	-----	-----	-----	-----	-----
3	158	40	13.2	33.73	2.55	37.88	58.50
4	189	42	13.9	65.13	4.69	66.70	85.02
5	186	42	13.9	33.93	2.45	46.15	66.18
6	189	42	13.9	61.80	4.45	54.26	62.00
7	Muere	-----	-----	-----	-----	-----	-----
8	194	40	13.2	54.00	4.09	32.76	40.94
9	Muere	-----	-----	-----	-----	-----	-----
10	186	44	14.5	62.00	4.26	99.98	68.64
11	217	45	14.9	40.30	2.70	46.43	85.80
12	193	44	14.5	41.14	2.83	71.38	89.32
13	Muere	-----	-----	-----	-----	-----	-----
14	201	49	16.2	45.80	2.83	72.00	81.40

CUADRO No. 6.- EFECTO DE INTOXICACION AGUDA PRODUCIDA POR TULLIDORA, EN RATAS WISTAR MACHOS, SOBRE LAS CONCENTRACIONES DE DE ATP DE DIFERENTES TEJIDOS. SE EXPRESAN LOS VALORES MEDIOS (\pm DESVIACION ESTANDAR) DE LOS PARAMETROS ANALIZADOS.

*** DIFERENCIAS ESTADISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS CON RELACION A LOS VALORES CONTROLES.**

Grupo	Peso (g)	Mortalidad (%)	Hto (%)	Hb (g/dl)	Concentraciones de ATP			
					Sangre (μ mol/dl)	Hemoglo bina. (μ mol/g)	Corazón (μ mol/g)	Higado (μ mol/g)
Control (N=12)	301 (\pm 12)	-----	40.8 (\pm 3.2)	13.4 (\pm 1.1)	46.98 (\pm 6.82)	3.37 (\pm 0.55)	55.66 (\pm 15.37)	125.86 (\pm 24.41)
Intox. (N=14)	190* (\pm 15)	28	42.2 (\pm 3.9)	13.9 (\pm 1.3)	49.98 (\pm 12.40)	3.64 (\pm 1.10)	57.41 (\pm 29.19)	68.12* (\pm 16.96)

DISCUSION

En este trabajo se encontró que las ratas tratadas con frutos de tullidora muestran un aumento en el tiempo de sangrado, sin que se modifique significativamente la cuenta plaquetaria. Además, también se encontró un incremento significativo en el tiempo de protrombina, sin que se altere el tiempo de tromboplastina parcial.

La lesión de un vaso sanguíneo expone estructuras subendoteliales a la sangre circulante. El mecanismo hemostático está destinado a evitar la pérdida de sangre, cuando se produce una hemorragia, y mantener este fluido dentro de los vasos lesionados. La detención de la hemorragia es efectuada por tres eventos secuenciales: Reacción vascular, Formación de un tapón plaquetario y activación de la cascada de la coagulación.

Las plaquetas desempeñan un papel importante en el inicio de la formación y localización del coagulo, una vez que se activa el proceso de coagulación. Las plaquetas poseen dos funciones: la de formar un tapón plaquetario temporal y la de proporcionar un lugar de encuentro (sitios receptores) para las proteínas de la cascada de la coagulación. Este lugar de encuentro está constituido por un fosfolípido plaquetario, y es denominado factor 3-plaquetario (PF-3). Los eventos secuenciales de la interacción plaquetaria con un vaso lesionado incluyen: contacto con la pared del vaso lesionado, adhesión al tejido conectivo subendotelial, liberación de ADP para atraer otras plaquetas y agregación de un gran número de plaquetas para taponar el vaso sanguíneo lesionado y evitar la pérdida de sangre.

Como se mencionó inicialmente, los datos surgidos de este trabajo muestran que la tullidora incrementa el tiempo de sangrado, sin que se modifique significativamente la cuenta plaquetaria. Ahora bien, la coexistencia del tiempo de sangrado prolongado junto con una cuenta plaquetaria normal refleja la presencia de un trastorno en la función de las plaquetas (17). La determinación del mecanismo por el cual se altera la función de las plaquetas, a causa de la ingestión de frutos de tullidora, requiere de estudios adicionales sobre el proceso de agregación plaquetaria.

Por otra parte, la presencia de un incremento en el tiempo de protrombina sin que se altere el tiempo de tromboplastina parcial, durante la intoxicación aguda producida por tullidora, señala la existencia de un daño selectivo en la cascada de la coagulación sanguínea. En efecto, el tiempo de protrombina es una prueba que analiza la eficacia de la vía extrínseca en el mecanismo de la coagulación; mediante esta prueba se mide la contribución, de manera global, de los factores II, V, VII y X a la generación de trombina. Por lo tanto, cuando el nivel sanguíneo de uno o más de estos factores está reducido, se incrementa el tiempo de protrombina.

El daño hepático generado por la ingestión de sustancias tóxicas es una de las causas que conducen a la aparición de trastornos hemorrágicos. Bajo estas condiciones, el sangrado se debe a una disminución de la síntesis de factores de coagulación. En la hepatopatía grave los estudios de la coagulación muestran, en forma característica, un nivel bajo de fibrinógeno, tiempo de protrombina prolongado, tiempo parcial de tromboplastina normal y tiempo incrementado de trombina. La normalidad del tiempo parcial de tromboplastina puede ser debida al aumento de concentración del factor VIII, el que posiblemente compensa los niveles bajos de los otros factores. La causa del aumento de concentración del factor VIII es desconocido (22). Ha sido reportado que durante la intoxicación aguda producida por tullidora existe daño hepático. En efecto, Cueva Jesús y colaboradores (11) han descrito elevación sérica de la transaminasa glutámico oxaloacética desde las 24 horas postintoxicación de animales de experimentación y ligero edema hepático a las 48 horas del tratamiento con tullidora. Estos datos sugieren que los trastornos de la coagulación sanguínea encontrados en este trabajo pueden ser la consecuencia de daño hepático acompañado con disminución en la síntesis de factores de la coagulación.

Finalmente con relación a la concentración de ATP en diversos tejidos se encuentra una disminución significativa en el hígado de los animales intoxicados. Este fenómeno puede ser debido al daño directo producido por las toxinas de tullidora a nivel mitocondrial y/o a una disminución en la perfusión sanguínea del hígado. Wheller y Camp han reportado que el extracto de frutos de tullidora reduce o impide la fosforilación oxidativa de mitocondrias in vitro (13). Por otra parte, también ha sido reportado que la presión arterial media de ratas intoxicadas con tullidora se encuentra considerablemente abatida (10). La caída en la presión arterial media disminuye el aporte de oxígeno y de nutrientes a los diferentes órganos y tejidos de los animales intoxicados, conduciendo con ello a una disminución en la síntesis de ATP. El hecho de que la concentración de ATP en el hígado de los animales intoxicados disminuya significativamente, con relación a los animales control, puede explicarse en función de dos factores toxocinéticos. En primer lugar la administración de frutos de tullidora se realizó por vía oral. La absorción intestinal de las toxinas conduce a estos compuestos, a través del sistema porta, al hígado. Por lo tanto, es este órgano el que recibe en primera instancia la mayor concentración de las sustancias tóxicas. En segundo lugar, es el hígado el órgano encargado de modificar la estructura química de sustancias extrañas al organismo, a través del proceso de biotransformación, con el propósito de facilitar su eliminación. Por ello, se puede explicar el hecho anteriormente descrito (23).

CONCLUSIONES

De este trabajo se puede concluir que durante la fase de intoxicación aguda producida por la tullidora (*Karwinskia humboldtiana*) se presentan, los animales de experimentación utilizados, las siguientes alteraciones fisiopatológicas:

- 1) Incremento en el tiempo de sangrado sin que existan cambios significativos en la cuenta plaquetaria, lo que refleja un trastorno en la función de las plaquetas.
- 2) Daño selectivo en la cascada de la coagulación sanguínea, caracterizado por un incremento significativo en el tiempo de protrombina sin que se altere el tiempo de tromboplastina parcial.
- 3) Disminución significativa en la concentración de adenosintrifosfato (ATP) en el hígado, lo cual sugiere la existencia de daño en las células hepáticas.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Clavijero F.X. "" Storia della California", Venecia. (1789).
Republicada como: Clavijero F.X. ." Historia de la Antigua o Baja California". Museo Nacional de Arqueología, Historia y Etnografía, México D.F. (1933)
- 2) Castillo Nájera F. "Contribucion al estudio de las parálisis tóxicas. Un envenenamiento colectivo por tullidora". Memoria del 5º Congreso Médico Mexicano. México I: 240. 1920.
- 3) Padrón Puyou F. "Estudio clínico experimental de la parálisis por *Karwinskia humboldtiana*.(tullidora) en niños".
Gac. Méd. Méx. , 81:299-311.1951.
- 4) Muñoz-Martínez E. J., Cueva J. y Joseph-Nathan P. "Denervation caused by tullidora(*Karwinskia humboldtiana*)". *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* , 9:121-134. 1983.
- 5) Muñoz-Martínez E. J. y Chávez B. "Conduction block and functional denervation caused by tullidora(*Karwinskia humboldtiana*)". *Expr. Neurol.* , 65:255-270. 1979.
- 6) Escobar Izquierdo A. y Nieto D. "Aspectos neuropatológicos de la intoxicación con *Karwinskia humboldtiana*". Estudio experimental.
Gac. Méd. Méx., 95:163-177. 1965.
- 7) Muñoz-Martínez E. J., Cueva J. y Joseph-Nathan P. .
"Hypersensitivity to Ach in innervated muscle fibre. Proc. IX Ann. Meet".
Society for Neuroscience, Pag. 768. Los Angeles, CA, USA. 1979.
- 8) Guerrero M. et al. "Extraction and quantification of toxins from *Karwinskia humboldtiana* (tullidora)". *Toxicon*, 5:565-568. 1987.

- 9) Cueva Chávez J. "Alteraciones neurotróficas por la intoxicación con tullidora(Karwinskia humboldtiana)". Tesis de maestría en Neurociencias. CINVESTAV-IPN. México, D.F. 1979.
- 10) Jaramillo Juárez F. et al. "Renal failure during ante toxicity produced by tullidora (Karwinskia humboldtiana)". General Pharmacology (En Prensa). 1993.
- 11) Cueva Jesus et al. "Edema pulmonar y hepático, alteraciones séricas del colesterol y la transaminasa glutámico oxaloacética (TGO) durante la intoxicación aguda por tullidora en la rata como probable consecuencia de falla cardiaca". Memorias del XXVIII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. R-168. Universidad Autonoma de Puebla, Puebla, Pueb. 1985.
- 12) Gonzales Stuart A. "Plantas tóxicas para el ganado". Cap. 5, Págs. 141-142, Ed. Limusa, 1ª Edición. (1989).
- 13) Wheeler M.H. and Camp B.J. "Inhibitory and uncoupling actions of extracts from Karwinskia humboldtiana on respiration and oxidative phosphorylation". Life Sciences 10:41-51. 1971.
- 14) Contreras Aguilar A. y Solla C. "Plantas tóxicas de México". Editado por el Instituto Mexicano del Seguro Social, 1ª ed. (1982).
- 15) Puértolas Márquez M. A. et al. "Polirradiculoneuritis por Karwinskia humboldtiana-Informe de seis casos". Rev. Méd. IMSS (México), 22:25-27. 1984.
- 16) Fischbach David P. y Fogdall Richard P. "Coagulación, fundamentos". Págs. 14-20, Ed. Panamericana, 1ª ed. México. (1985).
- 17) Rifkind Richard A. "Hematología clínica". Págs. 167-213, Editorial Interamericana, 3ª ed. México. (1988).

- 18) Newsholme E. A. Leech A. R. "Bioquímica Médica". Págs. 104-139, Ed. Interamericana, 1ª ed. México. (1987).
- 19) Platt William R. "Atlas de hematología en color". Págs. 89-100 y 213-244, Ed. JIMS, 1ª ed. México. (1972).
- 20) Henry Bernard J. "Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio". Ed. Salvat, 8ª ed. México. (1988).
- 21) Adams H. "Adenosine 5'-Triphosphate Determination with Phosphoglycerate Kinase. In Methods of Enzymatic Analysis". Ed. by HV Bergmeyer, Academic Press, New York, pp. 539-543. (1963).
- 22) Fiore Louis M.D. et al. "Alterations of hemostasis in patients with liver disease. In hepatology a text book of liver disease". Ed. by Zakim and Boyer, Saunders, pp. 546-566. (1990).
- 23) Casarett and Doull's. "Toxicology the basic science of poisons". Págs. 33-98, Ed. Mac Millan, 3ª ed. (1986).

