

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



EVALUACION HISTOLOGICA DEL ENCEFALO
Y MEDULA ESPINAL EN UN MODELO DE
POLINEUROPATIA CAUSADA POR EL FRUTO DE
Karwinskia humboldtiana EN RATA WISTAR

PRESENTA

M.C. EDUARDO MENDELEEV BECERRA VERDIN

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACION
TERMINAL EN MORFOLOGIA

NOVIEMBRE 2008

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
NUEVO LEÓN**

FACULTAD DE MEDICINA



**EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DEL ENCÉFALO Y MÉDULA ESPINAL
EN UN MODELO DE POLINEUROPATÍA CAUSADA POR EL FRUTO
DE *Karwinskia humboldtiana* EN RATA WISTAR.**

PRESENTA

M.C. EDUARDO MENDELEEV BECERRA VERDÍN

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACION TERMINAL
EN MORFOLOGIA**

NOVIEMBRE 2008

**EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DEL ENCÉFALO Y MÉDULA ESPINAL
EN UN MODELO DE POLINEUROPATÍA CAUSADA POR EL FRUTO DE
Karwinskia humboldtiana EN RATA WISTAR**

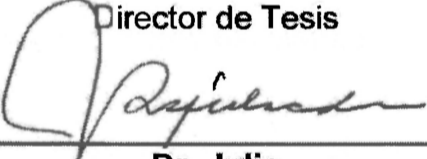
Presentado por:

M.C. Eduardo Mendeleev Becerra Verdín

Este trabajo se realizó en el Departamento de Histología, bajo la dirección del Dr. Julio Sepúlveda Saavedra, así como en el Departamento de Farmacología y Toxicología, bajo la co-dirección de la Dra. med. Ma. Victoria Bermúdez Barba y la Dra. Martha Elizabeth Salazar Leal, en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

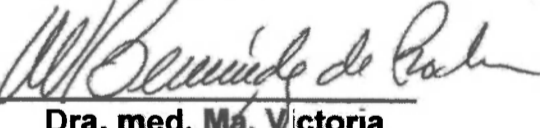
FIRMAS

Director de Tesis



**Dr. Julio
Sepúlveda Saavedra**

Co-Directora



**Dra. med. Ma. Victoria
Bermúdez Barba**

Co-Directora



**Dra. Martha Elizabeth
Salazar Leal**

AGRADECIMIENTOS

A mi Dios y mi Virgen de Guadalupe, por brindarme su protección en todos los sentidos durante todos y cada y uno de los días de mi existencia.

A la Familia Rodríguez Aguayo y todos los miembros que directa o indirectamente la conforman y a quienes considero también mi familia, por participar en una gran parte de mi formación en todos los aspectos, pero principalmente como persona.

Al Dr. Julio Sepúlveda Saavedra, por aceptarme en su línea de investigación y sobre todo por la confianza que ha depositado en mí, así como por el apoyo moral y académico brindado para sacar adelante este trabajo.

A las doctoras: Viky, Martha, Raquel y Odila, por apoyarme con su valioso tiempo, sus ideas y por darle un toque distinguido a esta trabajo.

A mis amigos y compañeros del posgrado, Adolfo, Diana, Blanca, Jaime, Humberto, Cristian, Arnulfo, Cecilia, Laura, Marcos, Araceli, Viviana, Marichú, Julio, Martha, ..., etc, etc. por los buenos consejos para mejorar mi trabajo y por los buenos momentos que pasamos.

A mis amigos: el batito, el chinis, el médico, el pato, Mr. horse, los carpinteros chapulines y a Víctor, por todo su apoyo y porque siempre es posible contar con un buen consejo de ellos.

Al Sr. Omar Wicab Gutiérrez, rector de la Universidad Autónoma de Nayarit por creer en mí y apoyarme para poder realizar este posgrado.

Al CONACYT por la beca No. 171908 otorgada para el desarrollo de este trabajo.

Al personal del Departamento de Histología: Viktor, Nora, Lencho, Licha, Juany y Rosy, por ayudarme en las diferentes etapas de la realización de este trabajo.

Al personal responsable de la Facultad de Medicina de la UANL, por facilitarme sus instalaciones para la realización de este proyecto.

TABLA DE CONTENIDO**CAPITULO 1**

1.1. Introducción y antecedentes.	1
1.2. Justificación.	3
1.3. Hipótesis de trabajo.	3
1.4. Objetivo general.	3
1.5. Objetivos específicos.	4

CAPITULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS.	5
2.1. Modelo animal de intoxicación crónica.	5
2.2. Obtención de muestras y métodos de tinción.	5
2.3. Morfometría.	6
2.4. Análisis de la corteza motora.	6
2.5. Análisis del cerebelo.	7
2.6. Análisis del puente.	7
2.7. Análisis de la médula espinal.	7
2.8. Evaluación de apoptosis.	8

CAPITULO 3

RESULTADOS.	9
3.1. Observaciones en la corteza motora.	9
3.2. Observaciones en el cerebelo.	11
3.3. Observaciones en el puente.	12
3.4. Observaciones en la médula espinal.	14
3.5. Evaluación de apoptosis.	15
3.6. Relación de datos entre el SNC y SNP.	15
3.7. Figuras.	16

CAPITULO 4

4.1. DISCUSIÓN.	31
4.2. CONCLUSIÓN.	36
4.3. PERSPECTIVAS.	36

CAPITULO 5

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	38
----------------------------------	----

CAPITULO 6

APÉNDICE.	43
6.1. Tinción estándar con hematoxilina y eosina.	43
6.2. Tinción rápida con violeta de Cresilo.	45
6.3. Tinción rápida con Klüver-Barrera.	46
6.4. Impregnación con plata, método Marsian, Glees y Erickson.	48
6.5. Técnica de TUNEL.	50

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO.	53
------------------------------	----

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Coordenadas estereotáxicas de la corteza motora, puente y verabelo.	16
FIGURA 2. Neuronas piramidales internas de la corteza motora. ...	17
FIGURA 3. Neuronas piramidales externas de la corteza motora. ...	18
FIGURA 4. Análisis morfométrico de las neuronas en las capas piramidales interna y externa.	19
FIGURA 5. Axones de la sustancia blanca en la corteza motora.	20
FIGURA 6. Vainas de mielina de la sustancia blanca en la corteza motora.	21
FIGURA 7. Neuronas de Purkinje de la corteza cerebelosa.	22
FIGURA 8. Análisis morfométrico de neuronas de Purkinje.	23
FIGURA 9. Neuronas de los núcleos vestibulares del puente.	24
FIGURA 10. Análisis morfométrico de las neuronas en los núcleos vestibulares.	25
FIGURA 11. Axones de los tractos corticopontocerebelosos del puente.	26
FIGURA 12. Vainas de mielina de los tractos corticopontocerebelosos del puente.	27
FIGURA 13. Neuronas de astas anteriores de médula espinal.	28
FIGURA 14. Evaluación de apoptosis en la médula espinal, puente, cerebelo y corteza motora.	29
FIGURA 15. Relación de datos entre el SNC y el SNP durante una intoxicación aguda y una crónica.	30

RESUMEN

Eduardo Mendeleev Becerra Verdín
Universidad Autónoma de Nuevo León.
Facultad de Medicina.

Título

EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DEL ENCÉFALO Y MÉDULA ESPINAL EN UN MODELO DE POLINEUROPATÍA CAUSADA POR EL FRUTO DE *Karwinskia humboldtiana* EN RATA WISTAR.

Área de estudio: Morfología

Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con Orientación Terminal en Morfología.


Propósito y Método de Estudio:

El fruto de *Karwinskia humboldtiana* (*Kh*) 3-4 semanas después de su ingestión produce una polineuropatía similar a la del síndrome Guillain-Barré, cuya severidad es proporcional a la cantidad de fruto ingerido. Tanto en la intoxicación aguda como en la crónica, se han descrito alteraciones morfológicas en el nervio periférico; sin embargo se ha dejado de lado el estudio del Sistema Nervioso Central (SNC) durante la intoxicación crónica. Por lo tanto, consideramos que, la evaluación del SNC puede contribuir al entendimiento de los mecanismos responsables de la alteración motora, que aún son desconocidos. Por lo anterior, se consideró de suma importancia estudiar diferentes áreas del SNC relacionadas con la función motora, en un modelo animal de polineuropatía tóxica causada por el fruto de *Kh*, el cual reproduce las diferentes etapas de la polineuropatía que se presenta en el humano. En este modelo, se administró fruto molido de *Kh* a ratas Wistar (3.5 g/Kg en dosis fraccionadas vía oral). Se procesó el cerebro, cerebelo, puente y médula espinal hasta su inclusión en parafina. Los cortes de estos bloques se tiñeron con Hematoxilina-Eosina, Violeta de Cresilo, Kluver-Barrera, Marslan-Glees-Erickson y TUNEL. Se evaluaron los cambios morfológicos y morfométricos en el SNC de grupos de ratas de las diferentes etapas de la polineuropatía: grupo control (I), sin neuropatía (II), con paresia (III), con parálisis (IV) y con recuperación (V).

Conclusiones y Contribuciones:

Este es el primer reporte en el que se describen alteraciones de diferente magnitud en neuronas, axones y vainas de mielina, de regiones de importancia motora del SNC, a lo largo del desarrollo de la neuropatía causada por la intoxicación con el fruto de *Kh* y del proceso de recuperación. Estos datos, son de gran ayuda para caracterizar mejor el modelo animal y proporcionan una mayor comprensión de este tipo de polineuropatía, además, nos permiten iniciar una investigación objetiva de los factores que conducen a estas alteraciones y posteriormente a la búsqueda de un posible tratamiento.

DIRECTOR DE TESIS



Dr. Julio Sepúlveda Saavedra

CAPITULO 1

1.1. Introducción y Antecedentes.

Karwinskia humboldtiana (*Kh*), mejor conocida como tullidora, coyotillo o capulín tullidor, es un arbusto venenoso de la familia de las *Rhamnaceae* que se encuentran distribuidas extensamente en México, América central y sur de Estados Unidos (Fernández 1992).

El fruto de *Kh* tres a cuatro semanas después de ser ingerido accidental o experimentalmente, produce en humanos y animales una polineuropatía cuyo cuadro clínico está caracterizado por parálisis flácida, simétrica, progresiva y ascendente, sin embargo, en los casos graves puede ocurrir la muerte; si el paciente sobrevive, se recupera en forma progresiva hasta su restablecimiento total (Bermúdez 1995, Arellano 1994, Martínez 1994). Actualmente, existen casos de intoxicación accidental en el humano que son diagnosticados erróneamente, debido a que el cuadro clínico de esta polineuropatía se confunde con el de la poliomielitis y el Síndrome de Guillain-Barré, entre otras patologías similares (Castillo 1920, Arellano 1994, Segovia 1972, Bustamante 1978, Puértolas, 1984, Bermúdez 1986, Bermúdez 1995, Ocampo 2007). A través del tiempo, en un intento por elucidar los mecanismos involucrados en el desarrollo de la intoxicación, cuyo cuadro clínico principal es la parálisis ascendente; se han realizado trabajos experimentales que en su gran mayoría se han orientado al estudio del sistema nervioso periférico (SNP) y donde se describe a la desmielinización segmentaria como alteración principal en nervios periféricos de miembros inferiores (Escobar 1965, Charlton 1970, Muñoz 1979, Muñoz 1983, Bermúdez 1986, Salazar 2006).

Existen en la literatura únicamente tres reportes en animales de laboratorio intoxicados de forma aguda con *Kh*, en los que se describen en forma general las alteraciones en la médula espinal, corteza cerebelosa, puente, corteza motora e hipocampo, a tiempos muy cortos post-intoxicación (Padrón 1951, Padrón 1956, Ortiz 1992). Durante la intoxicación aguda, los animales desarrollan

rápidamente la parálisis y mueren a los pocos días, esto no permite que se desarrolle el cuadro clínico descrito anteriormente, por lo que no es posible observar y estudiar el proceso de recuperación como ocurre en el humano.

En un trabajo previo se generó un modelo de polineuropatía tóxica al administrar a ratas Wistar 3.5 g/Kg del fruto completo maduro, seco y molido de *Karwinskia humboldtiana*, fraccionado en 5 dosis por vía oral, lo cual logró reproducir en las ratas, cada una de las etapas clínicas de forma similar a las que se han descrito en el cuadro clínico que presentan los humanos cuando no mueren. Las etapas clínicas se clasificaron en los grupos de ratas de la siguiente manera: sin neuropatía (II) al día 24, con paresia (III) al día 48, con parálisis (IV) al día 58 y con recuperación (V) al día 112. Además en este trabajo, se demostró la presencia de desmielinización segmentaria y alteraciones en el grosor y continuidad de los axones en el nervio ciático de ratas intoxicadas en las diferentes etapas de la polineuropatía, inclusive en el grupo de ratas con recuperación. Las lesiones en el SNP sugieren una posible alteración de estos mismos componentes, así como de cuerpos neuronales pero en el SNC (Salazar 2006). Por lo tanto, a partir del mismo modelo se obtuvieron muestras del sistema nervioso central (SNC), lo cual permitió realizar una evaluación sistemática de diversas regiones de importancia motora, por medio de técnicas histológicas y morfométricas, que sirvieron para identificar los cambios morfológicos que ocurren durante el transcurso de la neuropatía, para poder comparar la morfología de éstos tejidos en relación a las observaciones en el SNP, y lograr una caracterización más completa del modelo animal de polineuropatía tóxica.

1.2. Justificación.

Debido a que no existen estudios que describan las alteraciones del SNC en la intoxicación crónica con el fruto de *Kh*, se consideró importante evaluar la presencia de alteraciones morfológicas causadas en las células y en tractos nerviosos de regiones del encéfalo y médula espinal de ratas, durante cada una de las etapas de la polineuropatía producida por *Kh*, para contrastar los datos obtenidos en este estudio del SNC con los ya reportados en el SNP, y contribuir así a la comprensión y caracterización de esta polineuropatía.

1.3. Hipótesis de trabajo.

En la intoxicación crónica con el fruto de *Kh* se producen alteraciones en regiones de importancia motora del encéfalo y médula espinal que pueden contribuir al desarrollo de la polineuropatía periférica.

1.4. Objetivo general.

Evaluar la morfología de células y tractos nerviosos de regiones del encéfalo (corteza motora, corteza cerebelosa y puente) y médula espinal, para establecer si existe relación entre las alteraciones del SNC y SNP.

1.5. Objetivos específicos.

A partir de muestras colectadas de las ratas que se utilizaron para el desarrollo del modelo animal (Salazar 2006), se obtuvieron muestras del cerebro, cerebelo, puente y médula espinal, en las que se realizaron los siguientes objetivos:

1. Evaluar la morfología de las neuronas y tractos nerviosos de la corteza motora, corteza cerebelosa, puente y médula espinal, tanto en ratas intoxicadas como en ratas control.
2. Determinar el número y área de las neuronas de la capa piramidal interna y externa de la corteza motora, neuronas de Purkinje de la corteza cerebelosa y neuronas de los núcleos vestibulares, en ratas intoxicadas con fruto molido administrado vía oral y en ratas control.
3. Evaluar la presencia de apoptosis en corteza motora, corteza cerebelosa, puente y médula espinal en ratas intoxicadas con fruto molido administrado vía oral y en ratas control.
4. Contrastar los datos obtenidos entre el SNC y SNP.

CAPITULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. Modelo animal de intoxicación crónica.

El material utilizado en este estudio se obtuvo de los animales (ratas) analizados en el desarrollo del modelo animal de intoxicación crónica con el fruto de *Kh* reportado por Salazar y cols. (2006). De manera breve: se intoxicaron ratas Wistar ambos géneros por vía oral con el fruto maduro de *Kh* (dosis total de 3.5 g/Kg administrada en forma fraccionada, los controles solo recibieron agua), se analizaron grupos de 5 animales de cada una de las etapas clínicas de la polineuropatía tóxica manifestada en las ratas, de la siguiente manera: grupo sin neuropatía (II, día 24), grupo con paresia (III, día 48), grupo con parálisis (IV, día 58) y un grupo con recuperación (V, día 112), así como un grupo control (I).

2.2. Obtención de muestras y métodos de tinción.

Las ratas de los diferentes grupos se sacrificaron por dislocación cervical, inmediatamente después se obtuvieron las muestras provenientes de la médula espinal, puente, cerebelo y cerebro. Estas regiones del SNC fueron fijadas en formalina al 10% en buffer de fosfatos e incluidas en parafina para microscopía de luz. Posteriormente se obtuvieron cortes de tejido de 10 μ m de grosor. Estos cortes fueron teñidos con hematoxilina-eosina (HE. Gill 1974), violeta de Cresilo (VC. Einarson 1932), Klüver-Barrera (KB. Klüver 1953), Marslan-Glees-Erickson (MGE. Marsland 1954) y para la técnica de TUNEL (Gavrieli 1992).

2.3. Morfometría.

El análisis morfométrico se realizó en grupos de cinco ratas. Para cada región del SNC se realizaron dos cortes de 10 μm de grosor, con una separación de 30 μm entre cada corte. Los cortes se tiñeron con HE y VC, posteriormente se montaron en laminillas. Se observaron a 40 \times y se obtuvieron imágenes digitales de alta resolución por medio de un Microscopio Nikon eclipse 50i con un analizador de imagen Digital Sight dDS-2Mu. Para cada corte, se contaron las células de interés en tres zonas diferentes seleccionadas en forma aleatoria, se obtuvieron los valores promedio, la desviación estándar y se sometieron a un análisis de varianza, seguido por una prueba de Tukey, para lo cual se utilizó el software estadístico SAS (SAS 1998), con un nivel de significancia de $P \leq 0.05$.

2.4. Análisis de la corteza motora.

Se describieron y se cuantificaron las neuronas piramidales internas y externas localizadas entre la posición Bregma 0.84 mm a 2.04 mm, de acuerdo con las coordenadas estereotáxicas descritas por Paxinos (Paxinos, 2005) (Fig. 1). Para la cuantificación se seleccionó un área de 100 \times 150 μm (1.5 mm^2) y a partir de ésta se midieron 20 áreas consecutivas. Todas las neuronas dentro de los campos fueron consideradas para la medición. Además, se analizaron los tractos nerviosos en la sustancia blanca.

2.5. Análisis del cerebelo.

Para la medición se consideraron las neuronas de Purkinje (CP) de la corteza cerebelosa localizadas entre la posición Bregma -12.0 mm y -13.08 mm (Paxinos, 2005) (Fig. 1). Se seleccionó el primer campo y a partir de este se midieron los campos subsecuentes hasta completar una longitud total de 3000 μm sobre la línea de CP.

2.6. Análisis del puente.

Se analizaron las neuronas de los núcleos vestibulares, así como los tractos nerviosos corticopontocerebelosos, localizados en la posición Bregma -9.0 a -10.08 mm (Paxinos 2005) (Fig. 1). Se seleccionó un área de $100 \times 150 \mu\text{m}$ (1.5 mm^2) y a partir de ésta se evaluaron áreas subsecuentes; todas las neuronas fueron consideradas para la cuantificación.

2.7. Análisis de la médula espinal.

Se analizaron las astas anteriores de la médula espinal, debido a que en éstas se encuentran las neuronas motoras que son de interés para este estudio. Se realizaron observaciones en la médula, a diferentes niveles seleccionados al azar (cervical, torácica y lumbar).

2.8. Evaluación de apoptosis.

Para evaluar la presencia o ausencia de apoptosis en cada región, se utilizó el kit Trevigen®, de acuerdo con las instrucciones del mismo. éste detecta la fragmentación de DNA al añadir uridin-trifosfato biotinilado marcados en los extremos 3'OH libres del DNA mediante la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal (TDT), que son reconocidos por un anticuerpo antiestreptavidina unido a peroxidasa, el cual es revelado por H₂O₂-diaminobencidina (Gavrieli 1992). Las muestras se analizaron mediante microscopía de luz.

CAPITULO 3

RESULTADOS.

3.1. Observaciones en la corteza motora.

En el grupo control (I) la morfología de las capas piramidales externa e interna, de cortes teñidos con HE, mostraron neuronas normales y tinción pálida, así como un neurópilo normal de apariencia homogénea (Fig. 2 y 3 A). Las alteraciones en los diferentes grupos de ratas se presentaron de manera focal. En el grupo sin neuropatía (II), las neuronas, se observaron con un patrón de tinción basófilo (Fig. 2 y 3 B). En los grupos con paresia (III) y con parálisis (IV), se presentó una coexistencia de neuronas basófilas y eosinófilas (Fig. 2C y D, 3C) y finalmente, en el grupo de ratas con recuperación (V), la mayoría de las neuronas presentaron una tinción eosinófila (Fig. 2E, 3D y E). La permanencia de neuronas con ambas tinciones en las capas piramidales mostró diferencia, debido a que en la capa piramidal externa sólo se observó esta coexistencia en el grupo con paresia (III), mientras que en la capa piramidal interna se observó tanto en el grupo con paresia (III) como en el grupo con parálisis (IV). Además, en ambas capas piramidales de los grupos sin neuropatía (II), con paresia (III) y con parálisis (IV), se hicieron presentes neuronas retraídas, con la presencia de halos o espacios en los contornos de las neuronas piramidales (Fig. 2 y 3 B-D). Por último, el neurópilo también se vio alterado, este pierde su aspecto uniforme y homogéneo, que se observa en el grupo control (I) (Fig. 2 y 3 B-D). Estas alteraciones, siguieron presentes en el grupo de ratas recuperadas (V), aunque atenuados. Además, no se observó la presencia de cuerpos apoptóticos, ni positividad al TUNEL en los grupos de ratas intoxicadas (Fig. 14).

Morfometría. Se realizó un estudio morfométrico para determinar el número de neuronas y el volumen celular, en los diferentes grupos de ratas intoxicadas y del grupo control (I) (Fig. 4). Estadísticamente no se obtuvieron diferencias significativas ($p > 0.05$).

En cortes impregnados con plata, se observaron en el grupo control (I), tractos de axones definidos, paralelos y organizados, con pequeños espacios regulares entre tracto y tracto (Fig. 5A). En los grupos sin neuropatía (II), con paresia (III) y con parálisis (IV), se observaron cambios progresivos caracterizados por la pérdida del trayecto lineal e irregularidades en el grosor de los axones, así como por espacios de mayor tamaño entre ellos (Fig. 5 C a D), estas alteraciones, también se observaron aunque en menor grado en el grupo con recuperación (V) (Fig. 5E). Por otra parte, los oligodendrocitos en el grupo control (I) y sin neuropatía (II), se observaron alineados y paralelos a los tractos nerviosos, conforme avanzó la polineuropatía, se observó una disminución aparente en la cantidad de oligodendrocitos (no cuantificados) y una distribución al azar (Fig. 5 C a D).

Al examinar la sustancia blanca teñida con KB, el grupo control (I) presentó la morfología se caracterizó por la uniformidad y continuidad de este componente. En los grupos posteriores a la intoxicación, es decir, desde el grupo sin neuropatía hasta el grupo con recuperación (II al V, respectivamente), no se observó pérdida de mielina, únicamente pérdida del trayecto regular de los tractos nerviosos (Fig. 6). Los cambios también se ven reflejados en la morfología axonal en cortes impregnados con plata, donde se observó la pérdida del trayecto regular que se presenta en el grupo control (I), y aparición de espacios cada vez mayores en los grupos de ratas intoxicadas.

3.2. Observaciones en el cerebelo.

Los cortes de cerebelo teñidos con VC del grupo de ratas control (I), presentaron una estructura normal, la monocapa de neuronas de Purkinje (CP) se ubicó entre la capa molecular (CM) y la capa granular (CG, Fig. 7A). En cambio, todos los grupos de ratas intoxicadas, presentaron diferentes alteraciones morfológicas de manera focal. En el grupo sin neuropatía (II) se observaron principalmente células picnóticas e hipercrómicas (Fig. 7B). En el grupo con paresia (III) se presentó cromatólisis caracterizada por: migración de la sustancia de Nissl a la periferia, el núcleo claro y nucléolo acéntrico (Fig. 7C). En el grupo con parálisis (IV), llamó la atención que un número considerable de CP no se encontraban en su localización normal (Fig. 8A). Por otra parte, en la CG se observaron células que pudieran corresponder a las CP (Fig. 7D). En este mismo grupo se observó la presencia de gliosis, caracterizada por la presencia de células gliales en los espacios anteriormente ocupados por las CP. Por último, en el grupo con recuperación (V), se observaron CP con picnosis e hiperromasia, zonas con gliosis (Fig. 7E), así como también un mayor número de CP con características morfológicas normales y una aparente redistribución a lo largo de la línea de CP, comparadas con el resto de los grupos de ratas intoxicadas (Fig. 8C). En ninguno de los grupos se observó la presencia de cuerpos apoptóticos ni positividad al TUNEL (Fig. 14).

Morfometría. El análisis morfométrico mostró en los grupos de ratas sin neuropatía (II), con paresia (III), con parálisis (IV) y con recuperación (V), una disminución progresiva en el número total de CP en comparación con el número de CP determinadas para el grupo control (I) (Fig. 8A, barra azul). Por otra parte, a partir de estos resultados, se obtuvo el número de CP con alteraciones morfológicas (Fig. 8A, barra roja), en los que se observó un aumento progresivo de CP con alteraciones conforme se desarrolló la polineuropatía tóxica. Además,

con base en las alteraciones morfológicas observadas, las CP se clasificaron de la siguiente manera: N-I, neuronas normales; N-II, neuronas en fase de cromatólisis, N-III, neuronas retraídas e hipercrómicas y N-IV, neuronas picnóticas (Fig. 8B). El análisis morfométrico reveló una disminución progresiva del número de N-I que inició en el grupo control (I) y continuó hasta el grupo con recuperación (II-IV respectivamente). Al mismo tiempo se observó un aumento progresivo del número de células N-II, este incremento fue continuo y progresivo hasta el grupo con recuperación (V). También se presentó un aumento importante de N-III, este se observó a partir del grupo sin neuropatía (II), en el grupo con paresia (III) se detectó la mayor cantidad de N-III, y de manera gradual disminuyó en el grupo con recuperación (V). Finalmente las células N-IV fueron las que se observaron en menor número, con aumento progresivo a partir del grupo sin neuropatía (II), este persistió hasta el grupo con parálisis (IV) y disminuyó durante el grupo con recuperación (V) (Fig. 8C).

3.3. Observaciones en el puente.

Los núcleos vestibulares y los tractos nerviosos fueron las zonas analizadas en el puente, tanto en las ratas intoxicadas como en las ratas del grupo control (I). La arquitectura se delineó en cortes teñidos con HE, VC, KB, MGE. Las neuronas observadas por microscopía de luz en el grupo control (I), presentaron morfología multipolar, con núcleo y nucléolo central, así como con una distribución uniforme de la sustancia de Nissl en el cuerpo neuronal (Fig. 9A).

En los grupos sin neuropatía (II) y con paresia (III) se observaron cambios morfológicos característicos de cromatólisis, los cuales consistieron en pérdida de la morfología multipolar, aumento del volumen celular, hiper cromasia, así

como compactación y migración de la sustancia de Nissl a la periferia, lo que permitió mejor definición del núcleo y nucléolo (Fig. 9B y C). En el grupo con parálisis (IV), se observó en la mayoría de las neuronas una aparente disminución de la hipercromasia y del volumen celular (Fig. 9D). La morfología del grupo recuperado (V) presentó mayor similitud con el control (I), sin embargo persistieron células con aumento de volumen e hipercrómicas en los núcleos vestibulares (Fig. 9E). En ninguno de los grupos se observó positividad al TUNEL (Fig. 14) ni cuerpos apoptóticos.

Morfometría. Después de realizar la cuantificación de las neuronas y la determinación del volumen celular de acuerdo al método descrito, no se obtuvo diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre los datos del grupo control (I) y los de los grupos intoxicados (Fig. 10).

Al examinar los tractos corticopontocerebelosos en cortes del grupo control (I) impregnados con plata, se observaron con arreglo lineal, paralelos entre sí, con espacios regulares entre los tractos, así como axones con un grosor uniforme (Fig. 11A). En el grupo sin neuropatía (II) se observó pérdida del arreglo regular de los tractos nerviosos, además, axones aislados con segmentos más gruesos (Fig. 11B). En el grupo con paresia (III), la desorganización de los tractos nerviosos continúa y las dilataciones segmentarias se presentaron con mayor continuidad y frecuencia (Fig. 11C). En el grupo con parálisis (IV), los tractos nerviosos se observaron con pérdida del arreglo lineal ("zig-zag"), de tal manera que entran y salen del plano de corte; además, los axones en su mayoría presentaron engrosamientos a manera de varicosidades, (Fig. 11D). En el grupo con recuperación (V), se observó una aparente reorganización de los tractos nerviosos, sin embargo persistieron las dilataciones segmentarias en la mayoría de los axones (Fig. 11E).

Al examinar los tractos corticopontocerebelosos teñidos con KB para la demostración de la mielina, no se observó pérdida de ésta, sólo se confirmó la alteración del trayecto regular de los tractos ya descritos. En el grupo control (I) se observaron tractos regulares (Fig. 12A). En el grupo sin neuropatía (II) se observó pérdida de la uniformidad (Fig. 12B), esta alteración se incrementó progresivamente en los grupos con paresia (III) y con parálisis (IV) (Fig. 12 C a D), y permaneció en el grupo de ratas con recuperación (V) (Fig. 12E).

3.4. Observaciones en la médula espinal.

Por microscopía de luz, las neuronas motoras multipolares de las astas anteriores del grupo control (I) presentaron una morfología normal (Fig. 13A). El grupo sin neuropatía (II) mostró alteraciones caracterizadas por hiperromasia y un aparente aumento de volumen de neuronas con pérdida de la morfología multipolar regular (Fig. 13B). En el grupo con paresia (III) (Fig. 13C) las alteraciones aumentaron, en el soma se observó aumento de volumen celular, compactación de la sustancia de Nissl y núcleo definido. En el grupo con parálisis (IV), el daño en las neuronas fue más severo, se presentó el fenómeno de cromatólisis, esto es: un mayor aumento de volumen, mayor compactación y migración de la sustancia de Nissl hacia la periferia de la célula, esto permite que el núcleo y el nucléolo se observen claramente (Fig. 13D). En las neuronas motoras de las ratas recuperadas (V), la cromatólisis persiste (Fig. 13E). En ninguno de los grupos se observó positividad al TUNEL (Fig. 14) ni cuerpos apoptóticos.

3.5. Evaluación de apoptosis.

Se realizó la técnica de TUNEL para evaluar la fragmentación de la cromatina y poder determinar la presencia o ausencia del fenómeno de apoptosis, en las diferentes regiones del SNC en los grupos de ratas intoxicadas y en el grupo control. La técnica resultó negativa, lo que indicó que no existe fragmentación de la cromatina y por lo tanto no se puede considerar que haya apoptosis en ninguna de las regiones evaluadas (Fig. 14).

3.6. Comparación de datos entre el SNC y SNP.

En la figura 15 se muestran los datos comparativos entre los hallazgos en el SNP y el SNC durante las intoxicaciones aguda y crónica con el fruto de *Kh*.

163657

3.7. Figuras.

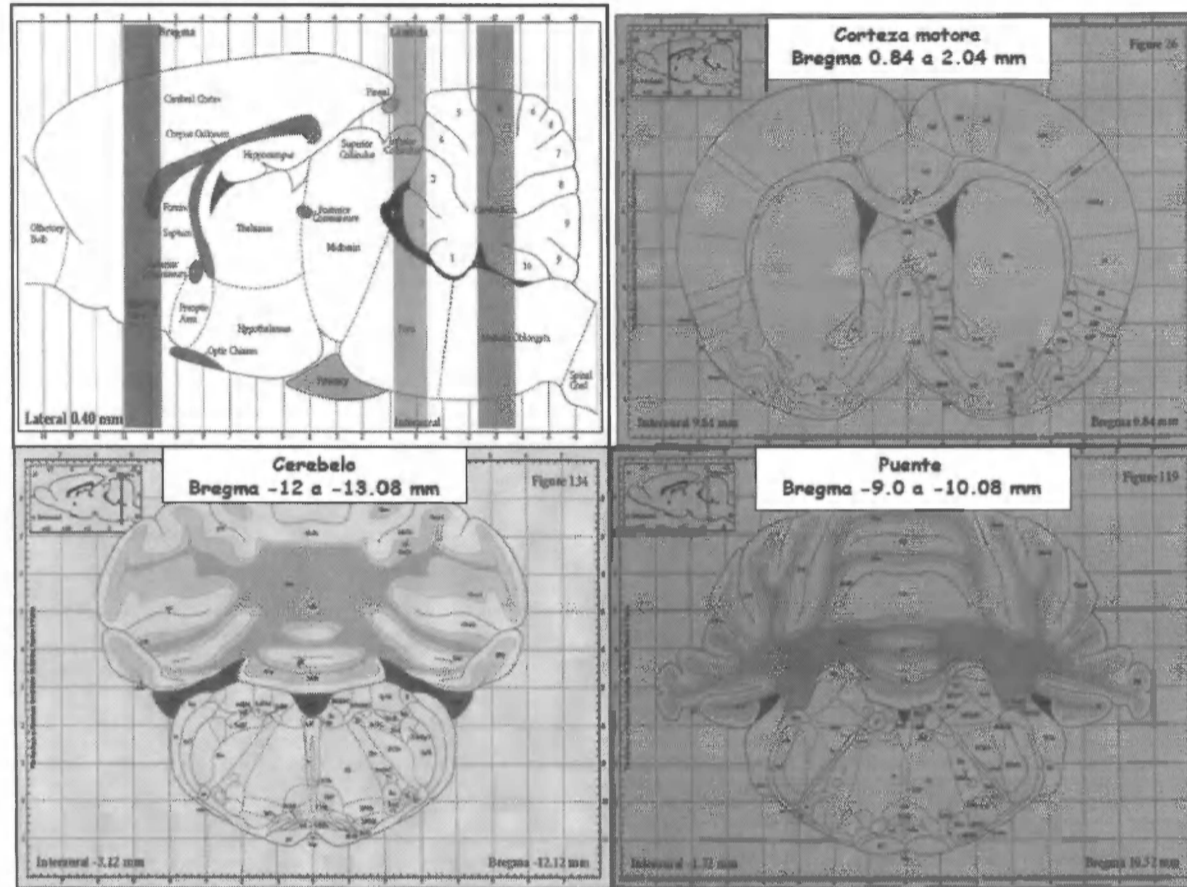


Figura 1. Coordenadas estereotáxicas para las regiones estudiadas en el encéfalo; las líneas y las imágenes en azul, verde y roja corresponden a la corteza motora, puente y cerebelo respectivamente (Paxinos 2005).

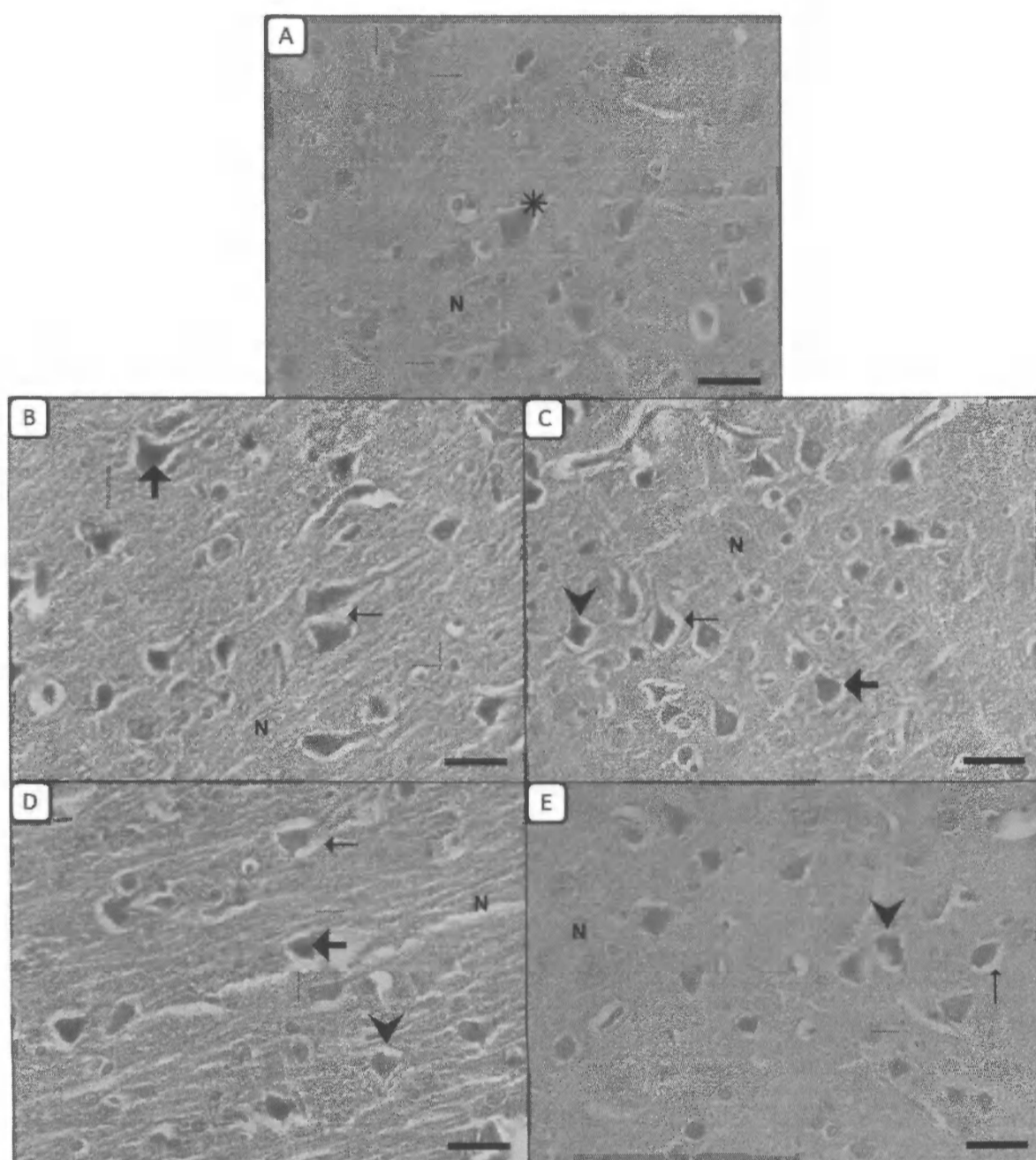


FIGURA 2.

Cortes coronales de la corteza motora de rata (tinción con HE). Capa piramidal interna. **A:** Grupo control (I), muestra neuronas piramidales normales (*) y neuropilo normal (N). **B:** El grupo sin neuropatía (II) presenta neuronas con aspecto basófilo (→), retracción (→) y neuropilo esponjoso (N). **C y D:** Cortes representativos de los grupos con paresia (III) y con parálisis (IV) se observa la coexistencia de neuronas eosinófilas (▶) y basófilas (→), neuronas retraídas (→) y alteración del neuropilo (N). **E:** El grupo con recuperación (V) sólo mostró neuronas eosinófilas (▶) y disminución del número de neuronas retraídas (→). Barra = 20 μm.

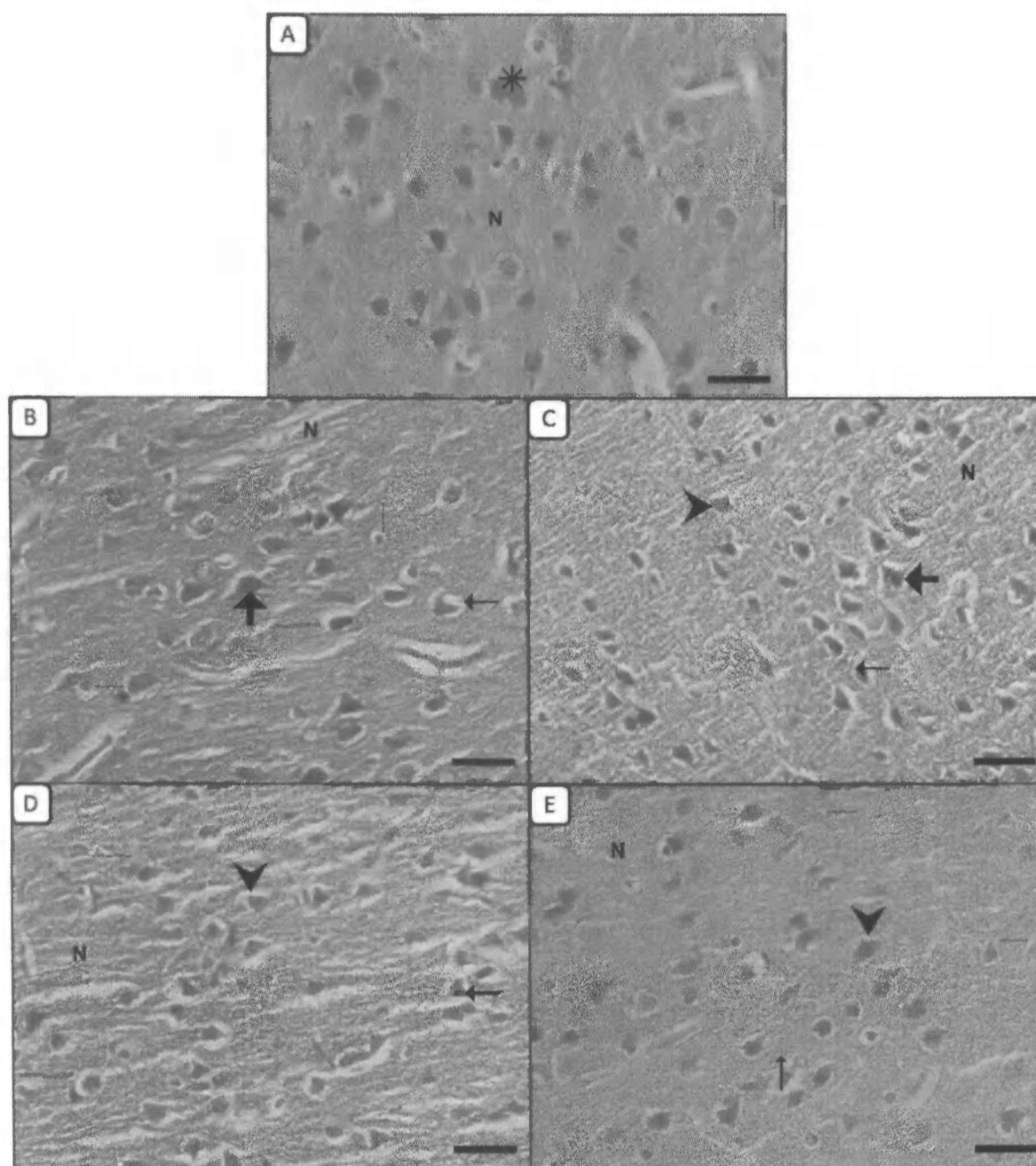


FIGURA 3.

Cortes coronales de la corteza motora de rata (tinción con HE). Capa piramidal externa. **A:** Grupo control (I), muestra neuronas piramidales (*) y neuropilo (N) normales. **B:** Grupo sin neuropatía (II) se muestran neuronas basófilas (→), retracción de estas (↔) y desorganización del neuropilo (N). **C:** Grupo con parestesia (III), se observan neuronas eosinófilas (➤) y basófilas (→), neuronas retraídas (↔) y alteración del neuropilo (N). **D:** Grupo con parálisis (IV), solo se observaron neuronas eosinófilas y alteraciones acentuadas en la retracción neuronal (↔) y en el neuropilo (N). **E:** El grupo con recuperación (V) sólo mostró neuronas eosinófilas (➤) y disminución del número de neuronas retraídas (↔). Barra = 20 μm .

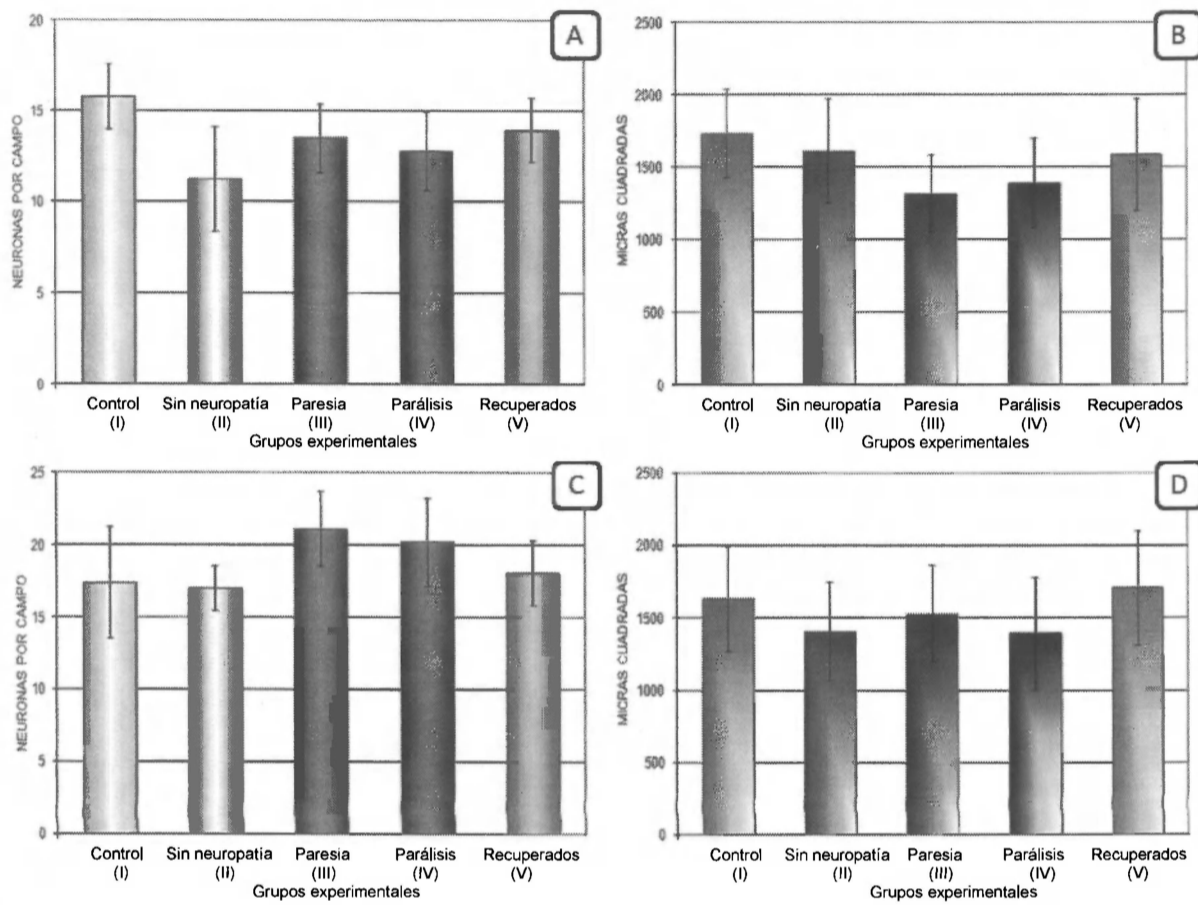


FIGURA 4.

Análisis morfométrico de neuronas de las capas piramidales. **A y C:** Valor promedio del número de neuronas por campo de la capa piramidal interna y externa respectivamente. **B y D:** Valor promedio del área neuronal por campo de la capa piramidal interna y externa respectivamente. Para ambos parámetros de medición no hay diferencia estadística significativa entre los grupos experimentales y el control. Prueba de Tukey, $P \leq 0.05$.

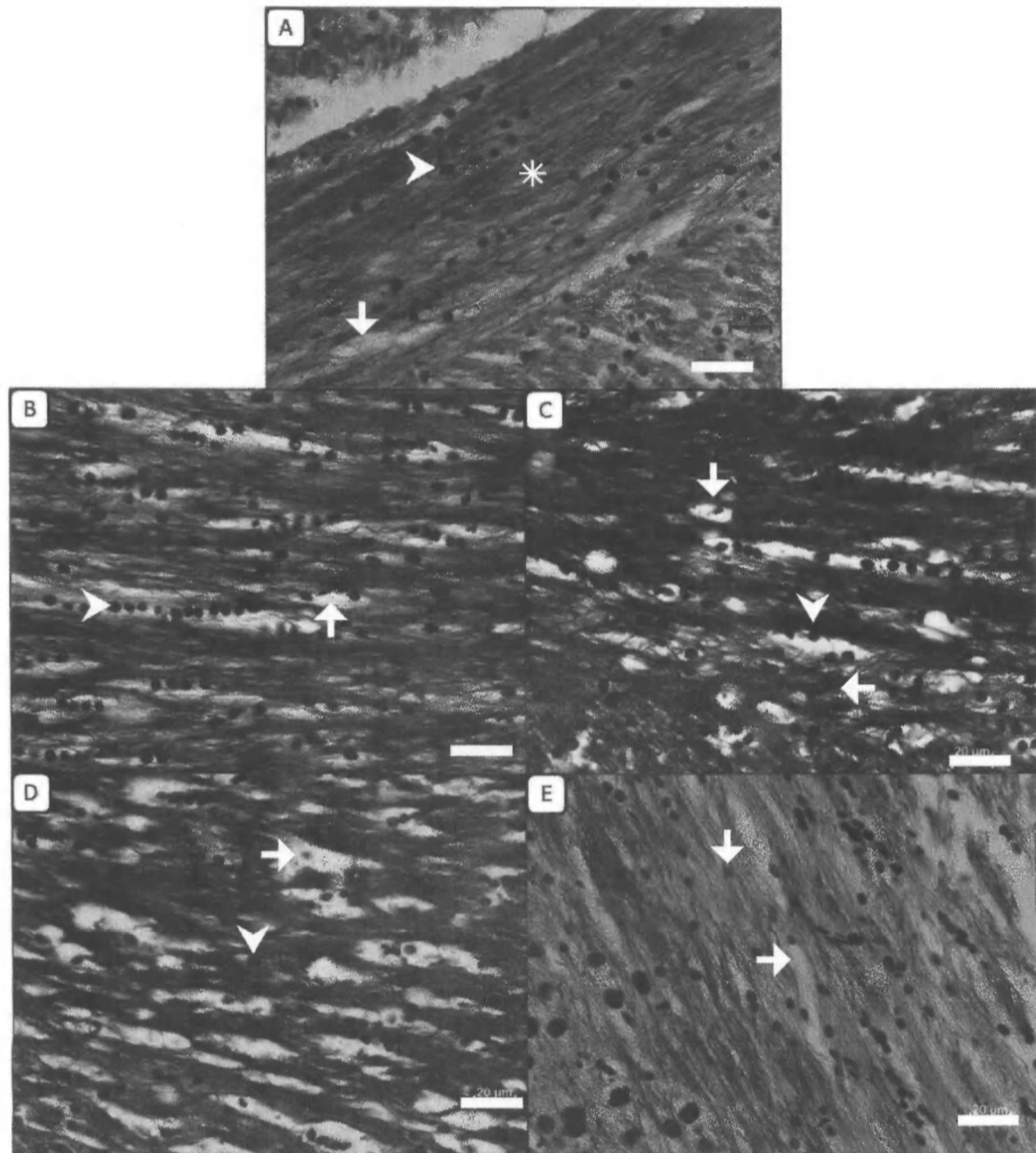


FIGURA 5.

Cortes de la sustancia blanca de cerebro de rata (impregnación con plata, MGE). **A:** Grupo control (I), muestra axones de trayecto regular y paralelos entre sí (*), con algunos espacios entre estos (→). Oligodendrocitos organizados (▶). **B:** Grupo sin neuropatía (II), muestra pérdida del trayecto lineal regular y espacios más acentuados entre axones(→). Oligodendrocitos alineados (▶). **C y D:** Grupos con paresia (III) y con parálisis (IV), continúa la pérdida del trayecto axonal con espacios más evidentes (→). Aparente disminución del número de oligodendrocitos y organización al azar (▶). **E:** Grupo con recuperación (V), tractos con aparente regresión a la morfología normal aunque continúan algunos de los cambios mencionados (→). Barra = 20 μ m.

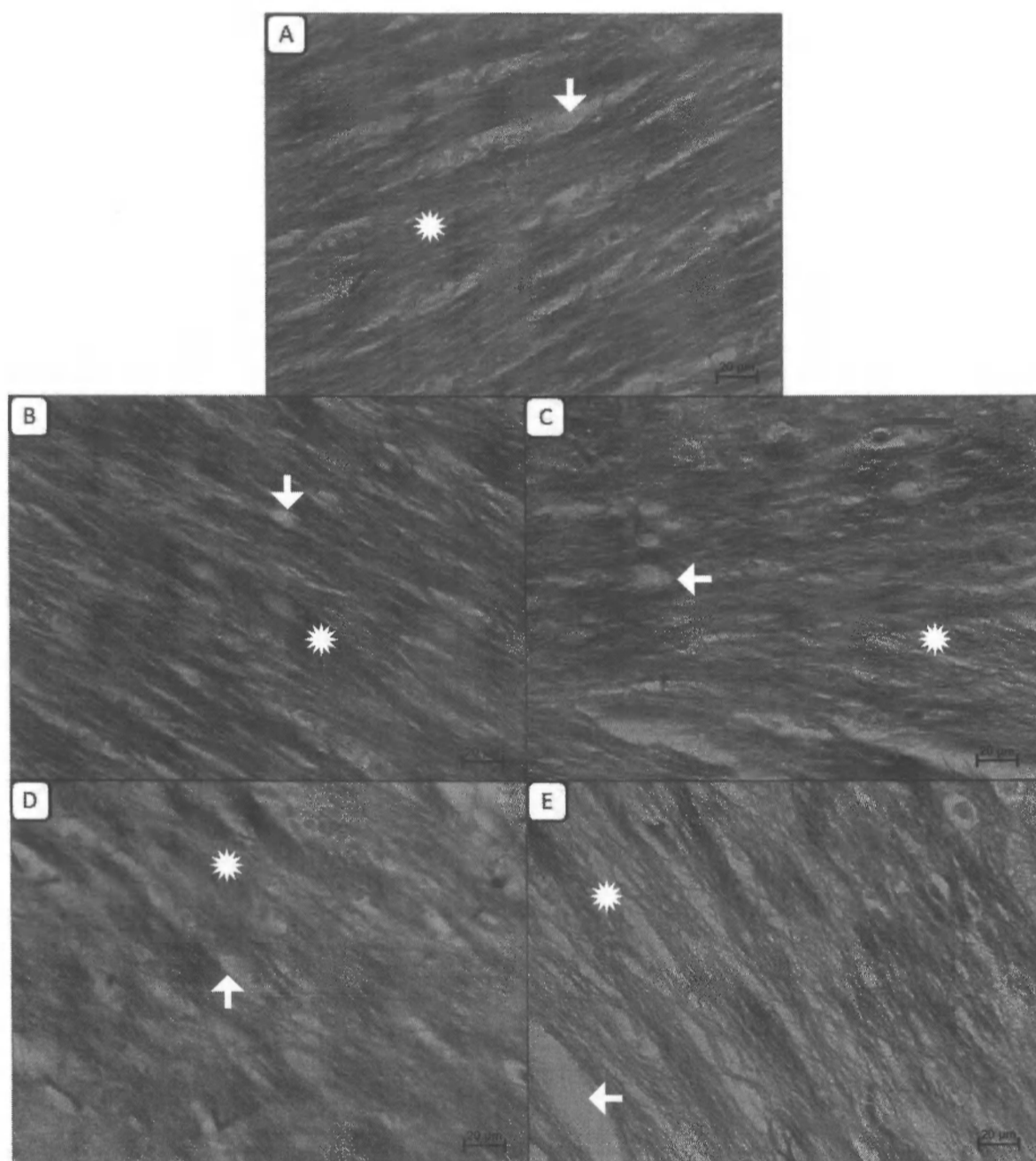


FIGURA 6.

Cortes de sustancia la blanca de cerebro de rata (tinción con KB). **A:** Grupo control (I), muestra la fibras con mielina bien definida, de trayecto lineal y agrupada en haces (*), así como espacios entre los tractos (→). **B y C:** Cortes representativos de los grupos sin neuropatía (II) y con paresia, (III), muestra pérdida del trayecto lineal (*) de las vainas de mielina, así como espacios aumentados (→). **D:** Grupo con parálisis (IV), se acentúan las alteraciones descritas en vainas de mielina (*) y en los espacios (→). **E:** Permanencia de la alteración del trayecto lineal (*) en el grupo recuperado (V) con espacios mayores (→). Barra = 20 μ m.

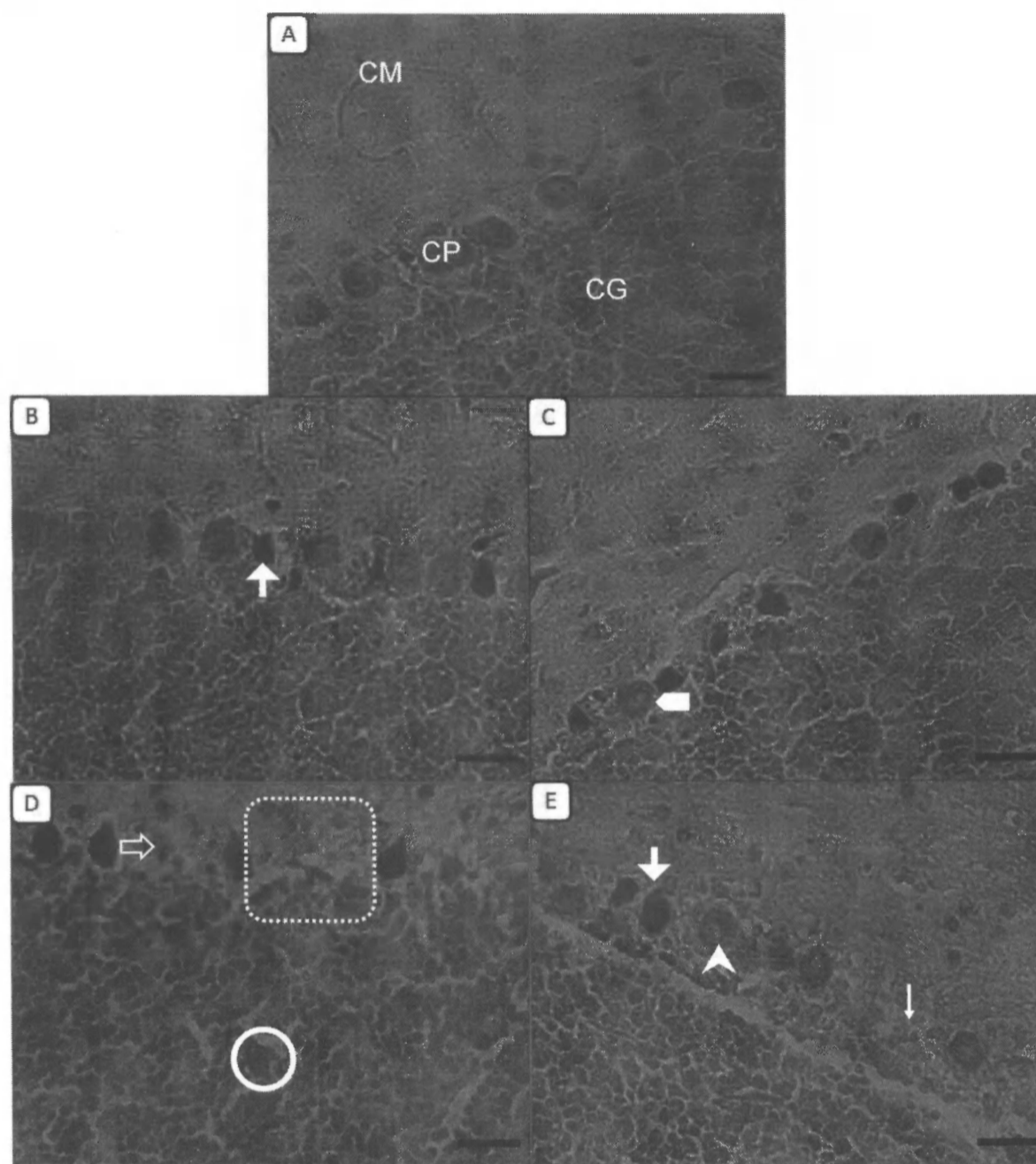


FIGURA 7.

Cortes coronales de la corteza cerebelosa de rata (tinción con VC). **A:** Grupo control (I), muestra CP organizadas entre la capa molecular (CM) y capa granulosa (CG). **B:** En el grupo sin neuropatía (II) se observaron CP hipercrómicas (→). **C:** El grupo con paresia (III) muestra CP en fase de cromatólisis (▸). **D:** Grupo con parálisis (IV), ausencia de CP entre la CG y CM (recuadro), células que parecen corresponder a CP en la CG (○) y presencia de gliosis (⇔). **E:** Grupo con recuperación (V), permanencia de CP alteradas (→), presencia de CP aparentemente normales (➤) y presencia de gliosis (→) Barra = 20 μm.

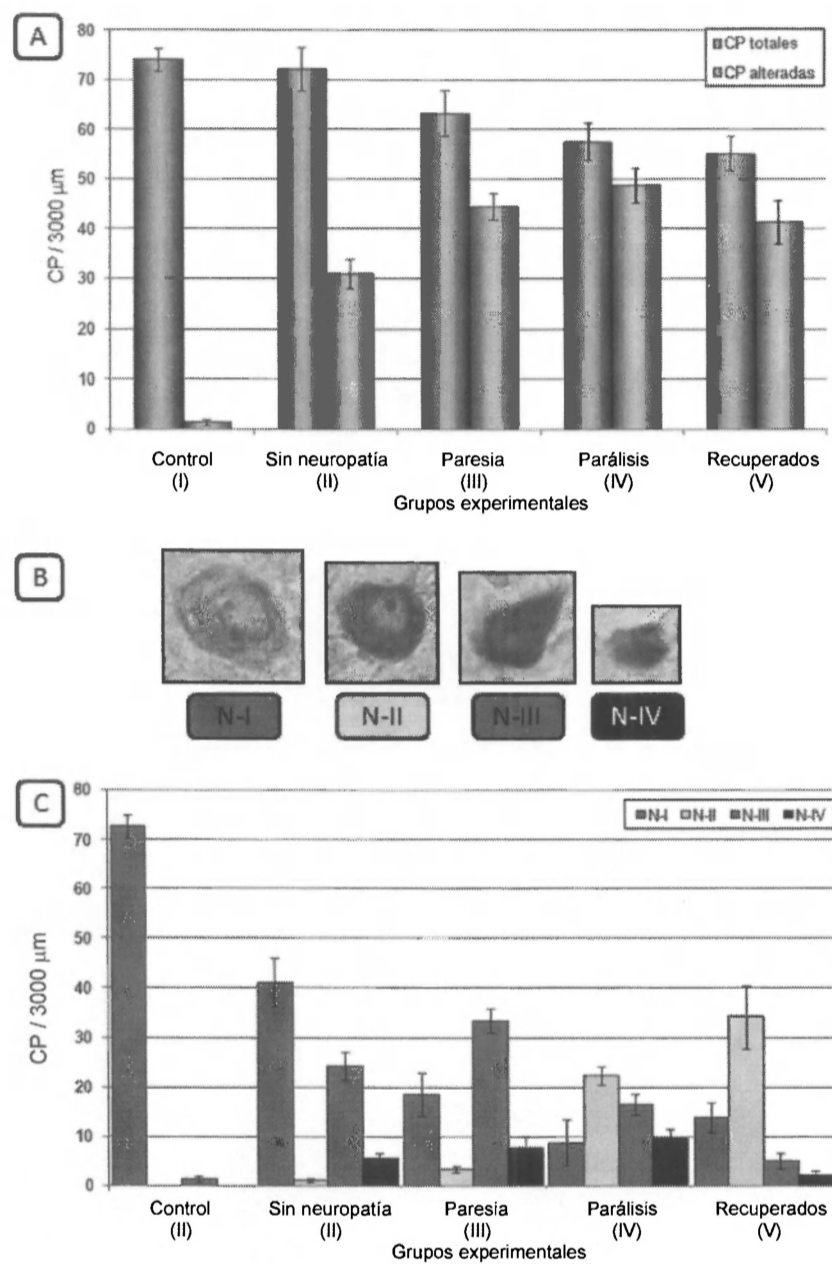


FIGURA 8.

Análisis morfométrico de las CP. **A:** Promedio de CP/3000 mm; muestra como las CP totales tienden a disminuir significativamente y al mismo tiempo de forma significativa aumentan las CP alteradas. Prueba de Tukey, $P < 0.05$. **B:** Clasificación de los diferentes aspectos morfológicos de CP de acuerdo al grado de alteración presentado: N-I, normales; N-II, cromatólisis; N-III, hipercrómicas y retraídas y N-IV, picnóticas. Barra = 20 μm. **C:** Análisis morfométrico de las CP de acuerdo a las diferentes morfologías observadas. El número de CP N-III en el grupo con paresia (III), se invierte a N-II en el grupo con recuperación (V). Prueba de Tukey, $P < 0.05$.

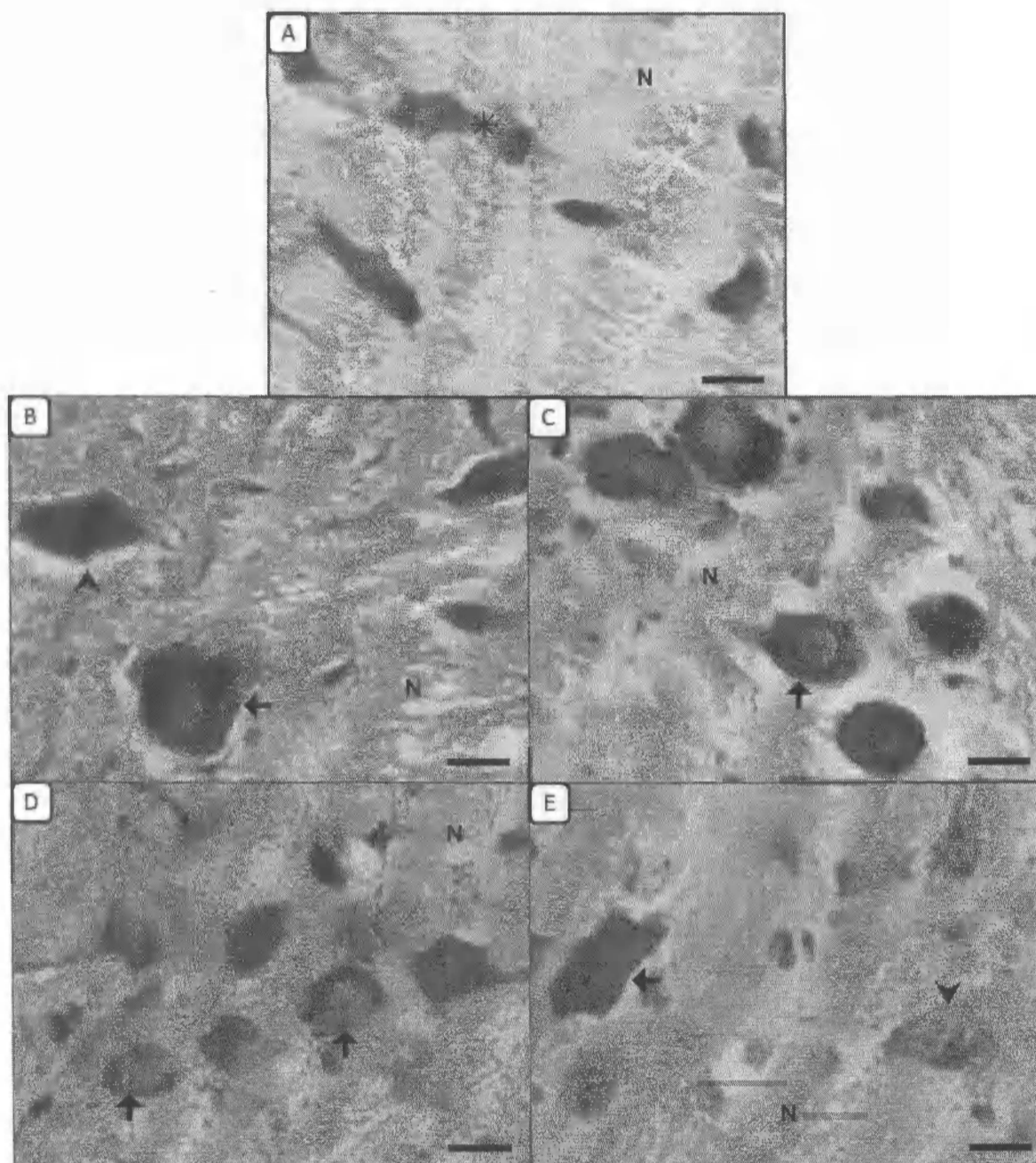


Figura 9.

Cortes coronales del núcleo vestibular de rata (tinción con VC). **A:** Grupo control (I), se observan neuronas normales multipolares (*) con diferente orientación y plano de corte, así como el neuropilo normal (N). **B:** Grupo sin neuropatía (II), se observaron neuronas hipercrómicas (▶) y neuronas aumentadas de volumen (→) y pérdida de la morfología multipolar. Las neurofibrillas del neuropilo alterado se observan más definidas. **C y D:** En los grupos con paresia y con parálisis (III y IV respectivamente) se observa cromatólisis (→) en neuronas y las alteraciones del neuropilo acentuadas (N). **E:** Grupo con recuperación (V), presencia de neuronas con diferente grado de alteración, hipercrómicas(→) y aparentemente normales (▶). Neuropilo alterado (N). Barra = 20 μ m.

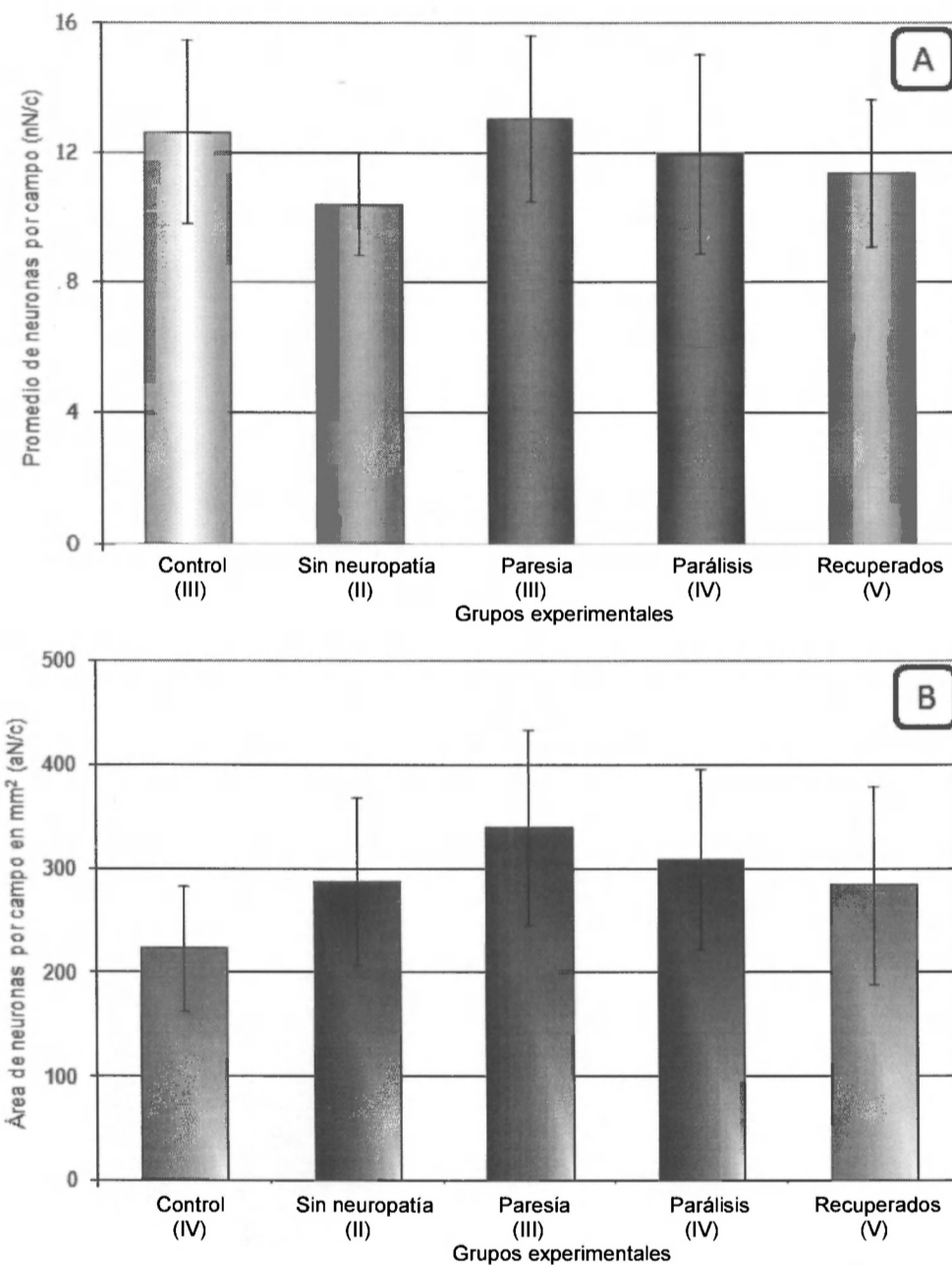


Figura 10. Análisis morfométrico de neuronas de los núcleos vestibulares. (A) Promedio del número de neuronas por campo y (B) Promedio del área de neuronas por campo en mm². Para ambos parámetros de medición no hay diferencia estadística significativa entre los grupos experimentales y el control. Prueba de Tukey, $P \leq 0.05$.

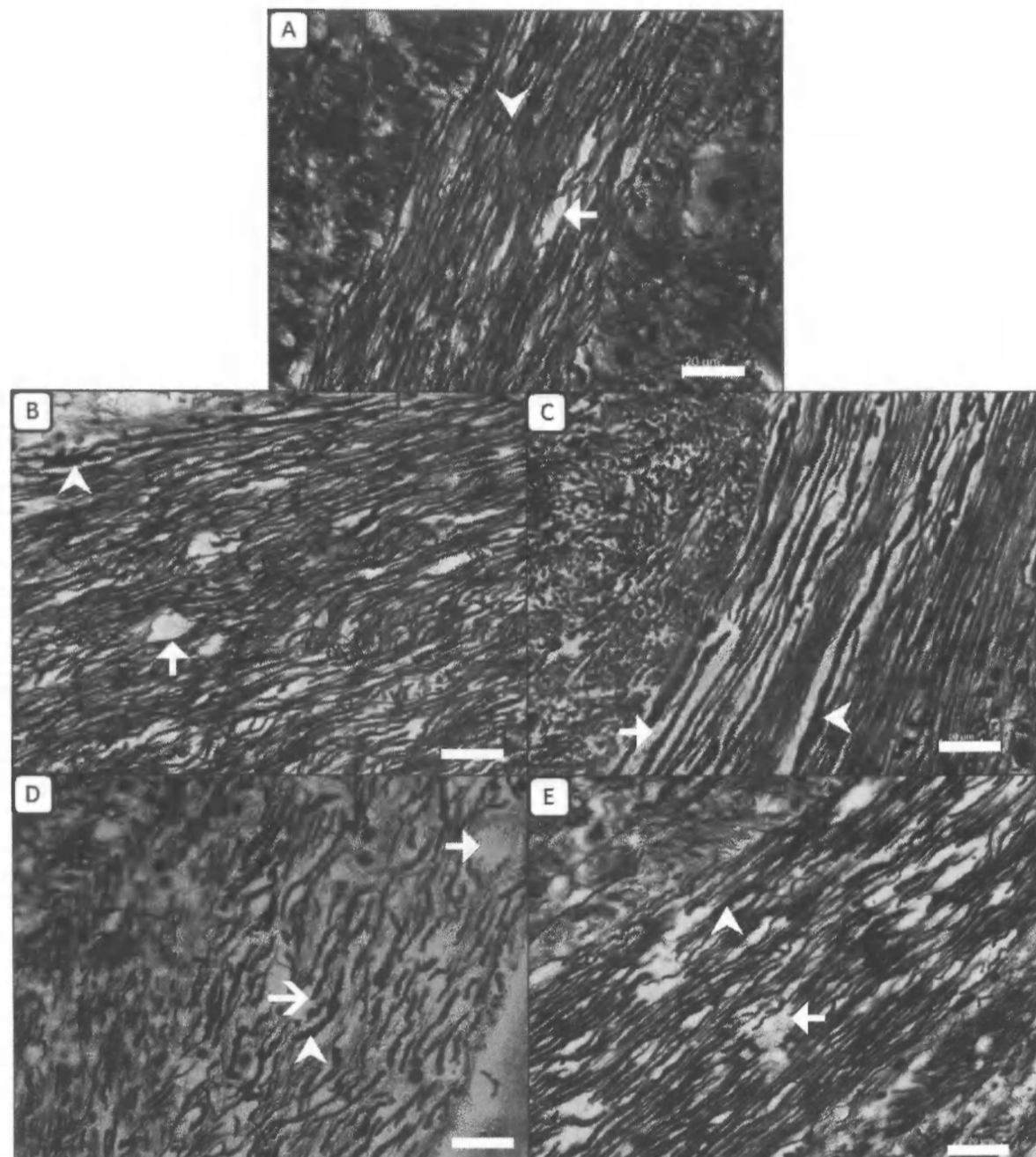


Figura 11. Cortes coronales del tracto corticopontocerebeloso de rata (impregnación con plata, MGE). **A:** Grupo control (I), axones de trayecto regular y paralelos entre sí (▼), con algunos espacios entre estos (→). **B y C:** Cortes representativos de los grupos experimentales sin neuropatía (II) y con paresia, (III), muestran pérdida del trayecto lineal, segmentos de axones aumentados de grosor (▶) y presencia de espacios de mayor tamaño entre los axones (→). **D:** Grupo con parálisis (IV), axones varicosos (▶) con pérdida de su trayecto lineal de axones, aparentemente segmentados (→) debido a que atraviesan el plano de corte. Espacios aumentados de tamaño (→). **E:** Grupo con recuperación (V), axones de trayecto lineal con segmentos engrosados (▶) y espacios más evidentes (→). Barra = 20 μ m.

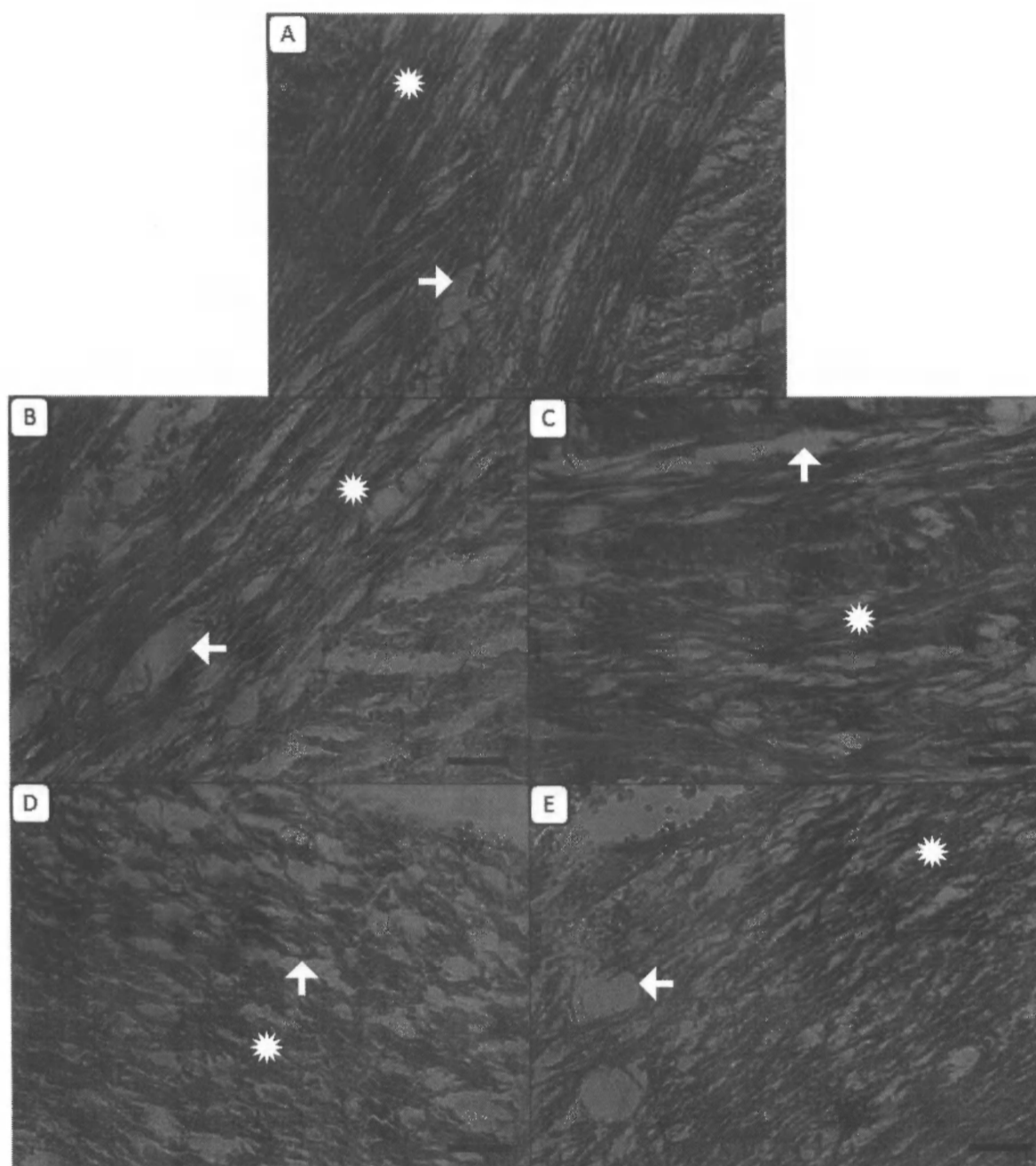


FIGURA 12.

Cortes coronales del tracto corticopontocerebeloso de rata (tinción con KB). **A:** Grupo control (I), muestra la mielina bien definida, de trayecto lineal y agrupada en haces (*), así como espacios entre estas (→). **B y C:** Cortes representativos de los grupos experimentales sin neuropatía (II) y con paresia, (III), muestran pérdida del trayecto lineal de las vainas de mielina (*), así como espacios aumentados (→). **D:** Grupo con parálisis (IV), se acentúan las alteraciones descritas en vainas de mielina (*) y en los espacios (→). **E:** Grupo con recuperación (V), permanencia de la alteración del trayecto lineal (*), con espacios más evidentes (→). Barra = 20 μm .

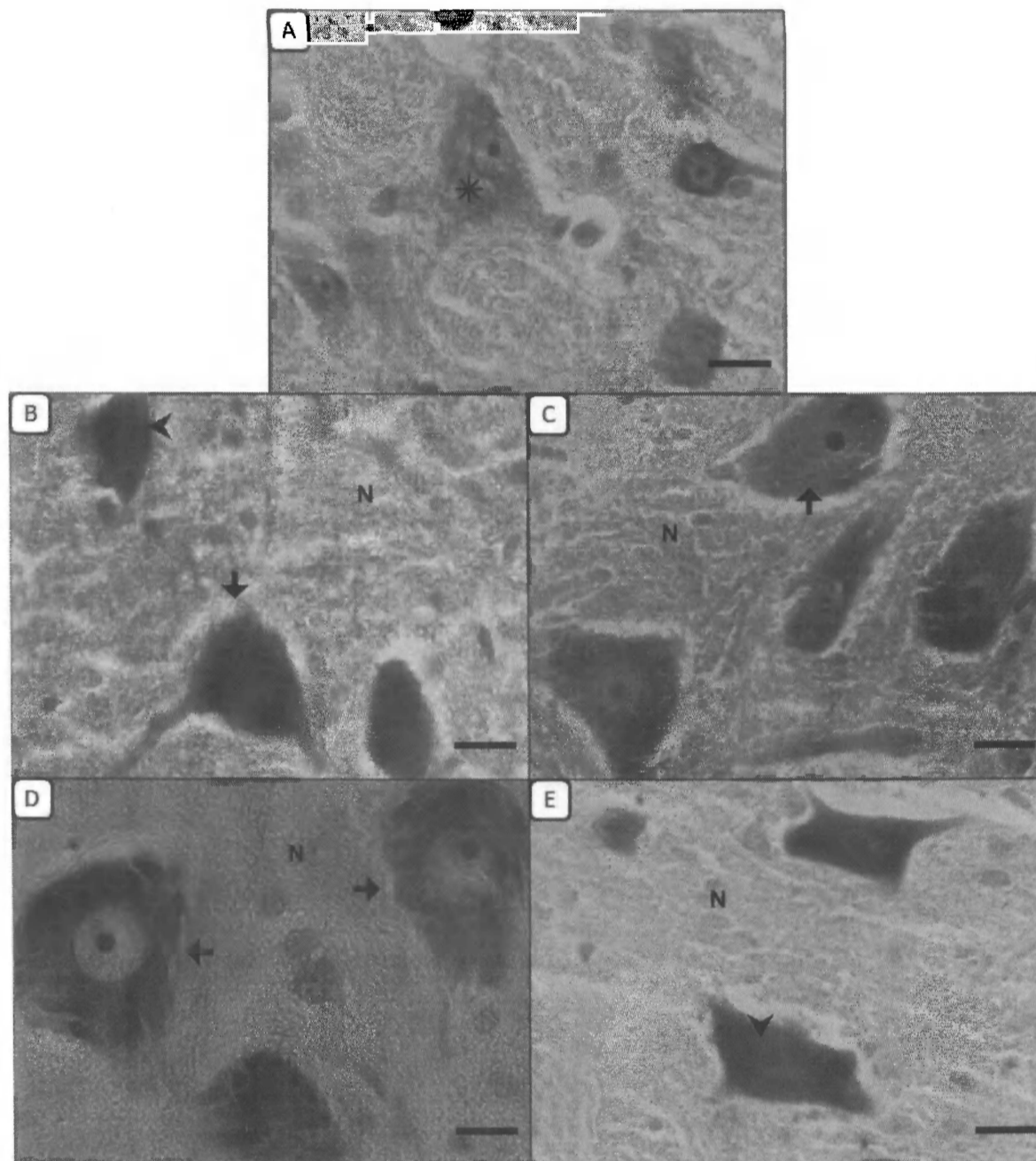


Figura 13.

Cortes transversales de las astas anteriores de la médula espinal de rata (tinción con VC). **A:** Grupo control (I), se observan neuronas normales multipolares (*), así como el neurópilo normal (N). **B:** Grupo sin neuropatía (II), se observaron neuronas hipercrómicas (>) y neuronas aumentadas de volumen (→) lo que provoca pérdida de la morfología multipolar. El neurópilo alterado se observa definido. **C y D:** En los grupos con paresia (III) y con parálisis (IV) se observa cromatólisis en neuronas (→) y las alteraciones del neurópilo más acentuadas (N). **E:** Grupo con recuperación (V), presencia de neuronas hipercrómicas con morfología multipolar (>). Neurópilo alterado (N). Barra = 20 μ m.

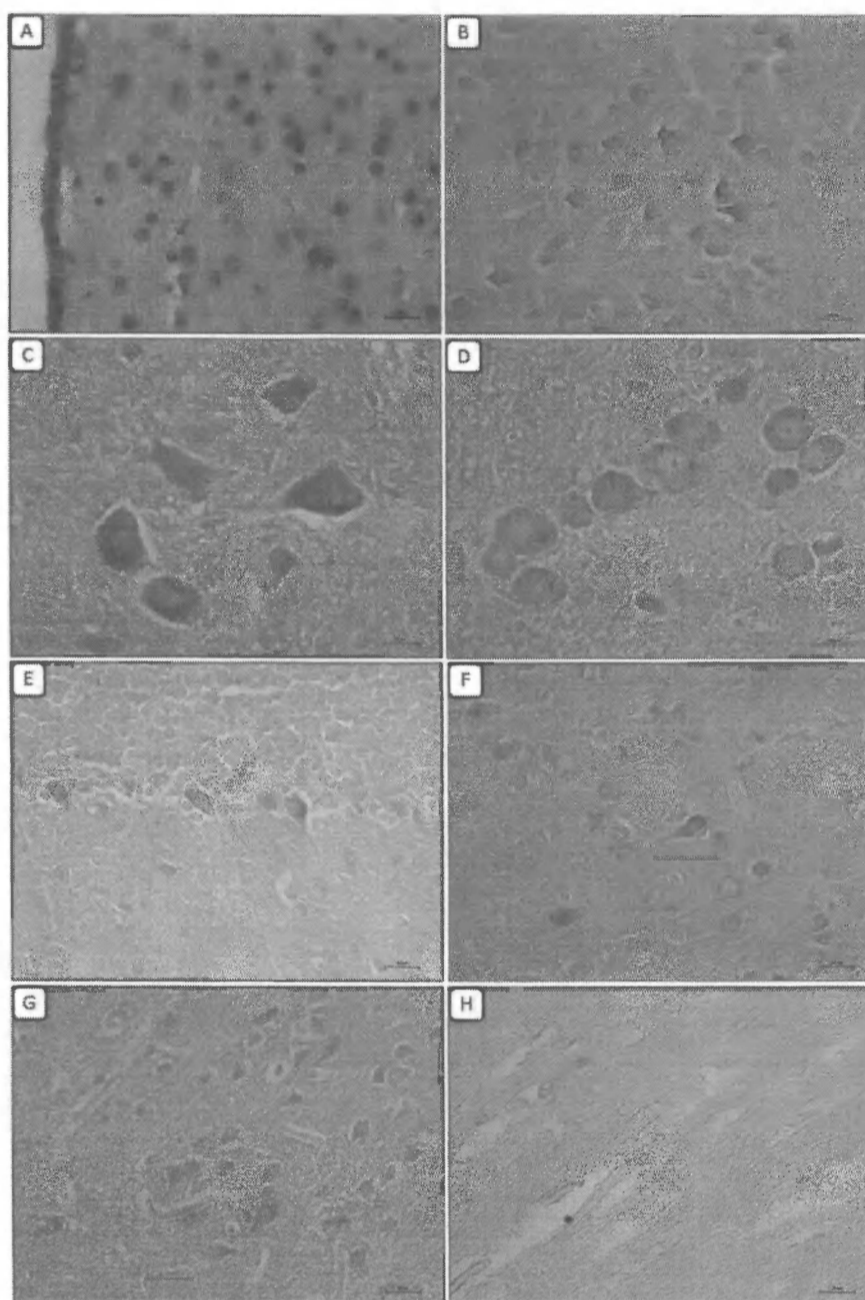


Figura 14.

Fotomicrografías representativas de las regiones analizadas del SNC para la evaluación de apoptosis. **A:** Control de técnica positivo, se observan los núcleos en color café debido a la fragmentación de la cromatina por nucleasa. **B:** Control de técnica negativo, sin provocar la ruptura de la cromatina. **C:** médula espinal, grupo III. **D:** núcleo vestibular, grupo III. **E:** corteza cerebelosa, grupo IV. **F, G:** capas piramidales interna y externa repectivamente, grupo III y **H:** corteza motora, sustancia blanca, grupo IV. Las regiones analizadas del SNC tanto de los grupos experimentales como del control, no mostraron positividad para la fragmentación de la cromatina. Barra = 20 μ m.

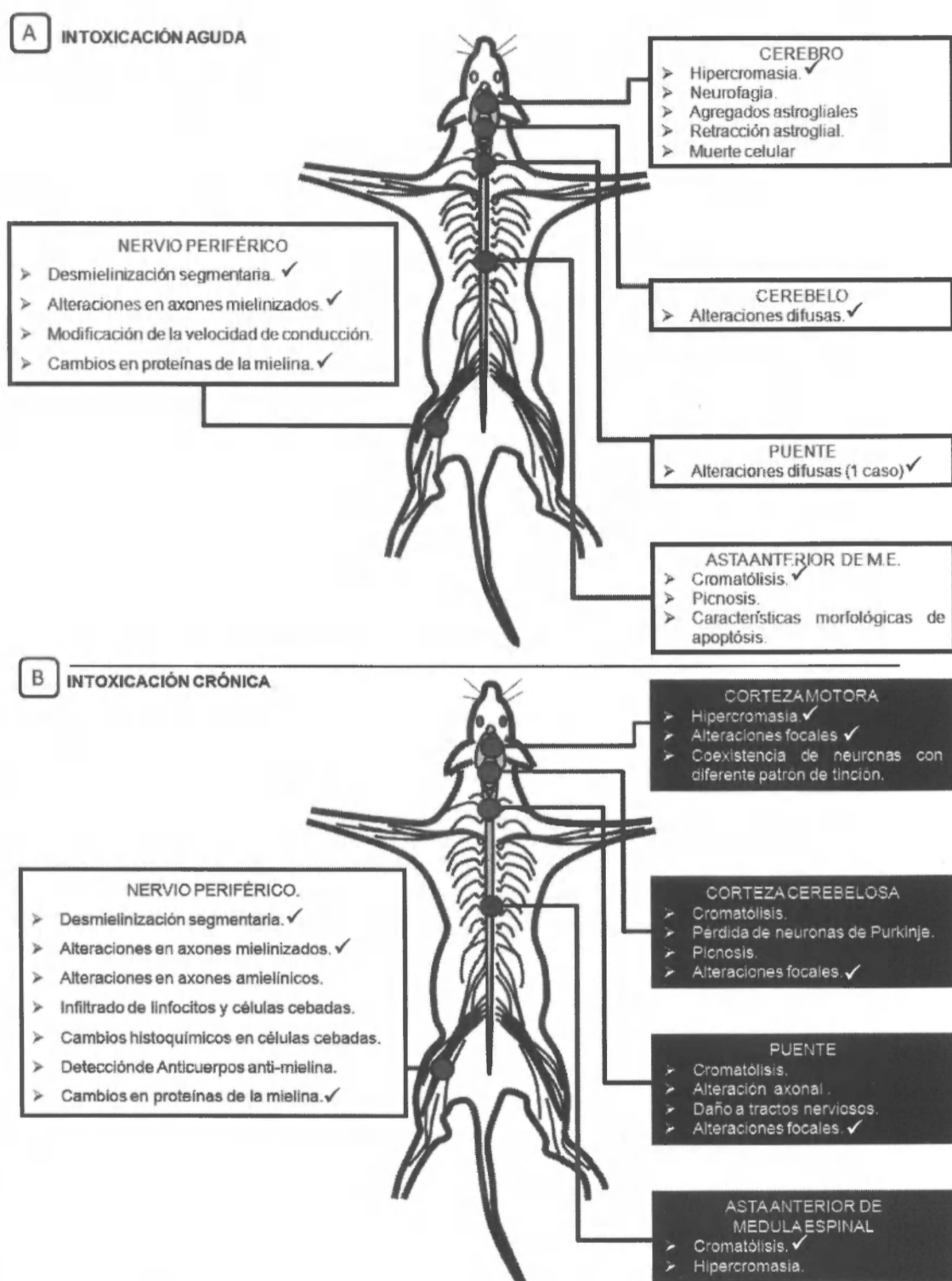


Figura 15. Relación de datos entre el SNC y SNP, registrados durante una intoxicación aguda (A) y una intoxicación crónica (B). Los cuadros en negro muestran las observaciones realizadas en este estudio. El símbolo (✓) indica las alteraciones comunes entre los dos tipos de intoxicación.

CAPITULO 4

4.1. DISCUSIÓN.

Es importante subrayar que este es el primer trabajo que estudia el desarrollo, evolución y recuperación de las alteraciones en el Sistema Nervioso Central, en un modelo animal (ratas) con polineuropatía tóxica, producida por el fruto de la *Karwinskia humboldtiana* al ser administrado por vía oral. También se logró determinar la existencia de alteraciones en diferentes regiones del SNC como: la corteza motora, corteza cerebelosa, puente y médula espinal de ratas intoxicadas con el fruto de *Kh*.

Los hallazgos más frecuentes del efecto neurotóxico del fruto de *Kh* en la corteza motora, se presentaron en las neuronas de la capa piramidal interna y la externa, las cuales presentaron cambios tintoriales: neuronas basófilas (azules) y neuronas eosinófilas (rojas). Particularmente para las neuronas rojas, este cambio de afinidad por los colorantes, se ha relacionado con la alteración del pH citoplasmático y nuclear, en otro tipo de intoxicaciones (Bañuelos 2005). Además, estas alteraciones en la corteza motora, aparentemente fueron menos acentuadas con respecto a las observadas en el resto de las regiones evaluadas en este estudio. Una posible explicación podría ser que por ser esta una polineuropatía ascendente, lo primero que se lesiona es la parte distal de los axones (en el SNP) y por daño retrógrado al soma neuronal. Al estar alterado el soma, las sinapsis relacionadas con éste, pudieran presentar alteraciones que continúan avanzando en forma retrógrada hasta las conexiones con otras neuronas para finalmente alcanzar a las células de la corteza motora. Sin embargo se desconoce cómo se llevan a cabo estas alteraciones.

En la corteza cerebelosa llamó la atención la falta de CP en los grupos de ratas intoxicadas con respecto al grupo control (I). La evaluación morfométrica mostró una disminución progresiva en el número CP en los diferentes grupos de ratas intoxicadas (Fig. 8A), incluso el grupo con recuperación (V) mostró una cantidad menor que el grupo con parálisis (IV). Debido a que las CP contribuyen al control de la actividad motora, inicio del movimiento y al aprendizaje (Affi 1999), la alteración de estas neuronas produce alteración en la marcha, esto pudiera explicar parte de las manifestaciones clínicas que se presentaron en las ratas a partir del grupo con paresia (III). Por otra parte, la ausencia de CP condujo a la realización de la técnica de TUNEL en todas las regiones de interés, para determinar la presencia de apoptosis. Sin embargo, tanto en el grupo de ratas control (I) como en los grupos de ratas intoxicadas, no se presentó fragmentación de la cromatina, ni se observaron cuerpos apoptóticos y por lo tanto no se puede considerar que se presente el fenómeno de apoptosis en ninguna de las regiones analizadas (Fig. 14).

Otras de las alteraciones observadas en las CP fueron retracción celular, hipercromasia y picnosis (Fig. 7B-E). En la literatura existen reportes de alteraciones en cerebelo inducidas por diversos químicos (Cavanagh 1954, Branch 1986, Takahashi 1994), así como por diversos metabolitos producidos por plantas (Carod 2003). Padrón (1956) describe alteraciones extensas y difusas de CP de conejos a los cuales intoxicó de forma aguda con el fruto de *Kh*. En este trabajo, se observaron neuronas con cambios morfológicos en los grupos de ratas intoxicadas, lo que permitió clasificarlas con base en estas características: N-I, neuronas normales, N-II neuronas en fase de cromatólisis, N-III neuronas retraídas e hipercrómicas y N-IV neuronas picnóticas.

Con base en estas observaciones podemos suponer que los cambios morfológicos observados en las CP, indican una posible secuencia del grado de daño. Esto pudiera llevarse a cabo de la siguiente manera: las neuronas N-I después de la intoxicación, entran en fase de cromatólisis N-II para posteriormente adquirir el patrón morfológico N-III. En el grupo sin neuropatía (II) llamó la atención que el tipo de morfología predominante en las CP fue el N-III y no el N-II (Fig. 8C). En el estudio de Padrón (1956), se describen "*alteraciones difusas en neuronas de Purkinje*" durante la intoxicación aguda con el fruto de *Kh*, 72 horas después de la intoxicación. Por lo tanto, las observaciones en nuestro estudio, pueden deberse a que transcurre un tiempo prolongado (24 días) entre el inicio de la intoxicación y la obtención de las muestras (grupo de ratas sin neuropatía), lapso en el que pudo haber ocurrido el fenómeno de cromatólisis. Se ha descrito que este fenómeno es progresivo y se desarrolla entre la primera y la segunda semana siguientes a la agresión neuronal (Lieberman 1971, McIlwain 2005). Sin embargo, para el caso particular de la intoxicación con *Kh*, este fenómeno se presenta mucho más rápido, porque se administraron dosis altas del fruto (Padrón 1956). Por lo tanto, es posible que las CP que observamos en las ratas sin neuropatía (II), se encontraran en una fase de alteración más avanzada, en la que el número de células N-III y N-IV fue mayor con respecto al de N-II (Fig. 8C).

En el grupo de ratas con paresia (III), continúa la disminución de células N-I, hay presencia de células N-II y las células N-III llegan a su pico máximo. Esta tendencia cambia en el grupo de ratas con parálisis (IV), mientras que las N-III disminuyen, las N-II aumentan. Una posible explicación a este fenómeno pudiera ser, que las neuronas dañadas N-III, tuvieran la capacidad de recuperarse y pasar a N-II. En los resultados del grupo de ratas con recuperación (V), también se observó esta tendencia, en donde el número de neuronas N-III disminuye aún más, mientras que el número de neuronas N-I y N-II presentaron un aumento progresivo, de tal manera que pudiera indicar una posible

recuperación de las alteraciones neuronales inducidas por la administración del fruto de *Kh*.

Como ya se mencionó anteriormente, existe una disminución del número total de CP, lo cual se manifiesta por una ausencia de estas células en algunos de los sitios observados. Al analizar la CG en la corteza cerebelosa teñida con VC, sólo en el grupo de ratas con parálisis (IV) se detectaron células que parecen corresponder a las CP (Fig. 7D). Sin embargo, con los datos con que contamos, no es posible explicar si estos espacios son originados por un cambio de ubicación de las CP hacia la CG, ya que para comprobar esto, es necesario realizar un marcaje específico para CP.

En el puente, así como en la médula espinal, se encuentran neuronas directamente relacionadas con la motricidad y coordinación del movimiento. Padrón (1956) describe que durante la intoxicación aguda con el fruto de *Kh* en conejos, las neuronas de la médula espinal y del puente se observaron de la siguiente manera: *“En muchas células el núcleo se vio considerablemente disminuido de tamaño y arrugado o transformado en vesículas grandes y claras, con la cromatina aglutinada en forma de bandas basófilas que unían al núcleo a la membrana. Finalmente aparecía disuelto en el citoplasma”*; estas descripciones parecen indicar la presencia de apoptosis y aunque este término no se conocía en esa época, la descripción morfológica de Padrón detalla este fenómeno. Estas características morfológicas no se observaron en el presente trabajo en ninguna de las regiones analizadas. Esto pudiera deberse a que la dosis tóxica total del fruto se fraccionó en varias dosis para su administración en un lapso de 14 días. Por otra parte en esta investigación se describió la presencia de neuronas en fase de *cromatólisis*, el cual es un mecanismo de protección que se presenta después de una agresión neuronal. Esta reacción se ha descrito principalmente en neuronas que presentan una interrupción de la

continuidad del axón, en donde la primera reacción del soma se caracteriza por la agrupación de la sustancia de Nissl y migración de esta a la periferia celular y por último, el núcleo adopta una localización excéntrica (Schwab 1996).

En los núcleos corticopontocerebelosos se llevan a cabo funciones relacionadas con el equilibrio, de esta manera se pudiera explicar en parte, la falta de coordinación observada en las ratas intoxicadas. Otra región relacionada con la coordinación y regulación del movimiento son los tractos corticopontocerebelosos (Afifi 1999); en este estudio no se observó pérdida de la mielina como sucede en el SNP (Saizar 2006), únicamente se observaron alteraciones morfológicas en los axones de estos tractos, desde el grupo de ratas sin neuropatía (II) hasta el grupo de ratas con recuperación (V). Algunos axones de estos tractos nerviosos provienen de las neuronas de los núcleos corticopontocerebelosos, por lo tanto es posible que debido a las alteraciones descritas del axón (Fig. 11B-E), se inicie el fenómeno de cromatólisis en las neuronas de estos núcleos y esas alteraciones repercutan en la falta de coordinación previa a la presencia de parálisis en las ratas intoxicadas.

Aunque no se observó necrosis, cuerpos apoptóticos o positividad al TUNEL en las regiones del SNC evaluadas, es importante realizar un análisis a tiempos más cortos post-intoxicación, debido a que se ha reportado que 24 horas después de haber administrado el fruto de *Kh* en una dosis elevada (intoxicación aguda), se observaron alteraciones como hiper cromasia y muerte celular (Ortiz 1992). La evaluación en este estudio se realizó en periodos que varían entre 10 y 50 días, por lo tanto, es importante realizar estudios entre cada uno de los tiempos de observación. Además, llama la atención que en el grupo de ratas con recuperación (V) continúa la presencia de alteraciones morfológicas en el SNC; ante esta situación, queda la incertidumbre de saber si estas alteraciones se resolverán en forma total o parcial, que pudieran dejar secuelas neurológicas

en el individuo a largo plazo. Por lo tanto, también es importante analizar el curso de estas alteraciones en el Sistema Nervioso en tiempos más prolongados a los evaluados en este estudio.

Con la información obtenida en este estudio, se observó que durante la intoxicación crónica con el fruto de *Karwinskia humboldtiana*, no solamente se afectan las vainas de mielina y los axones del Sistema Nervioso Periférico como se ha demostrado (Salazar 2006), sino que también se producen alteraciones severas en las neuronas del Sistema Nervioso Central, en las regiones evaluadas.

4.2. CONCLUSIÓN.

Con base en los resultados obtenidos, se demuestra la existencia de alteraciones de diferente magnitud en neuronas y axones del cerebro (corteza motora), cerebelo (corteza cerebelosa), puente (núcleos vestibulares, tractos corticopontocerebelosos) y médula espinal (astas anteriores), del Sistema Nervioso Central, que pudieran contribuir al desarrollo de la polineuropatía característica de esta intoxicación.

4.3. PERSPECTIVAS.

Con el fin de caracterizar en forma integral la intoxicación producida por el fruto de la *Kh*, se propone que en este mismo modelo, se estudien las alteraciones morfológicas a diferentes tiempos entre cada una de las etapas ya descritas para esta intoxicación, tanto a nivel central como periférico. Así mismo, es muy importante investigar la persistencia de estas alteraciones después de

que ocurre la recuperación del paciente. Por otro lado, no hay que olvidar que existen factores bioquímicos y moleculares que intervienen en la generación de las alteraciones aquí descritas, mismos que también deben ser investigados.

Conforme se vaya obteniendo esta información será posible obtener conclusiones y dar inicio a la búsqueda de los mecanismos subyacentes a estas alteraciones, que posteriormente den lugar a la generación de posibles tratamientos para esta intoxicación o incluso a extrapolarse a otras neuropatías desmielinizantes, ya que lo único que se puede ofrecer a estos pacientes hasta el momento, son tratamientos de sostén y rehabilitación.

CAPITULO 5

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Afifi, A.K., Bergman, R.A., 1999. Neuroanatomía funcional. McGraw Hill.

Arellano, E.C., Mendoza, J.C., Domínguez, F.C., 1994. Intoxicación por *Karwinskia johnstonii*: Estudio de 12 pacientes. Boletín Médico. Hospital Infantil México. 51 (2), 105-112.

Bañuelos, P.J., Nolasco, R.G., Monteon, J.A., Garcia, L.P., Ruiz, L.M., Garcia, E.J. 2005. Histological evaluation of brain damage caused by crude quinolizidine alkaloid extracts from lupines. Histology and histopathology. (20) 1147-1153.

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

Bermúdez, M.V., Lozano Meléndez, F.E., Salazar Leal, M.E., Waksman, N., Piñeyro, A., 1995. Intoxicación de una familia con *Karwinskia humboldtiana* (tullidora). Gac. Méd. Mex. (131), 100-106.

Branch, R.A., Jacqz, E., 1986. Subacute neurotoxicity following long-term exposure to carbaryl. Am. J. Med. 80 (4), 741-745.

Bustamante, S., Olvera, R., Correa, N., 1978. Intoxicación fatal por tullidora (*Karwinskia humboldtiana*). Gaceta médica de México. (114), 241-244.

Carod, F.J., 2003. Neurological syndromes linked with the intake of plants and fungi containing a toxic component (I). Neurotoxic syndromes caused by the ingestion of plants, seeds and fruits. *Rev Neurol.* 36 (9), 860-871.

Castillo, N.F., 1920. Contribución al estudio de las parálisis tóxicas. Un caso de envenenamiento colectivo por tullidora. En *Memorias del Quinto Congreso Médico Mexicano*. Puebla. (1), 240-243.

Cavanagh, J.B., 1954. The toxic effect of tri-ortho-cresyl phosphate on the nervous system. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 17 (3), 163-172.

Chariton, K.M., Pierce, K.R., 1970. A neuropathy in goats caused by experimental collotillo (*Karwinskia humboldtiana*) poisoning. II. Lesions in the peripheral nervous system-teased fiber and acid phosphatase studies. *Path. vet.* 7 (5), 385-407.

Einarson, L., 1932. A method for progressive selective staining of Nissl and nucleus substance in nerve cells. *American -journal of Pathology.* 8 (3), 295-308.

Escobar, A., Nieto, D., 1965. Aspectos neuropatológicos de la intoxicación con *Karwinskia humboldtiana*. Estudio experimental. *Gac. Med. Mex.* (2), 163-177.

Fernández, N.R., 1992. Nombres comunes, usos y distribución geográfica del género *Karwinskia* (Rhamnaceae) de México. *Anales del Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Serie Botanica.* (63), 1-23.

Gavrieli, Y., Sherman, Y., and Ben-Sasson, S.A. 1992. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119(3), 493-501.

Gill, G.W., Frost, J.K., Miller, K.A., 1974. A new formula for half-oxidise Hematoxilyn solutions that neither overstains or requires differentiation. *Acta Citologica*. 18 (4), 300-11.

Klüver, H., Barrera, E., 1953. A method for the combined stainin of cells and fibres of the nervous system. *Journal of Neuropathology end Experimental Neurology*. 12 (4), 400-3.

Lieberman, A.R., 1971. The axon reaction: a review of the principal features of perikaryal responses to axon injury. *Int. Rev. Neurobiol.* (14), 49-124.

Marsland, T.A., Glees, P., Eriksson, L.B., 1954. Modification of the Glees silver impregnation for paraffin sections. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 13 (4), 587-91.

Martínez, M., 1994. *Tullidora: Las plantas medicinales en México*. 1ª Ed. Editorial Botas. 501-504.

Mcllwain, D.L., Hoke, B.V., 2005. The role of the cytoskeleton in cell body enlargement, increased nuclear eccentricity and chromatolysis in axotomized spinal motor neurons. *BMC Neurosci.* 6 (1), 19.

Muñoz, M.E., Chavez, B., 1979. Conduction block and functional denervation caused by tullidora (*Karwinskia humboldtiana*). *Experimental neurology*. (65), 255-270.

Muñoz, M.E., Chavez, B., Nthan J., 1983. Denervation caused by tullidora (*Karwinskia humboldtiana*). *Neuropathol Appl. Neurobiol.* 9 (2), 121-34.

Ortiz, G.G., Gonzalez, B.I., Feria, V.A., 1992. Structural study of the acute effect of *Karwinskia humboldtiana* on cerebral motor cortex, hippocampus, and caudate nucleus of the rat. *Gen Pharmacol.* 23 (3), 543-547.

Ocampo, R.L., Ontiveros, N.O., Fernández, L.O. 2007. Intoxication with buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*): report of three siblings. *Pediatr. Dev. Pathol.* 10 (1), 66-68.

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

Padrón, F., Velázquez, T., 1956. Patología experimental y clínica de la parálisis por *Karwinskia humboldtiana*. *Rev. Mex. Ped.* (25), 225-237.

Paxinos, G., Watson, C., 2005. *The brain in stereotaxic coordinates*. Elsevier academics press. San Diego California. 5th Edition.

Puértolas, M.M., Nava, J.O., Medina, L.H., López, O.F., Oyervides, P.J., 1984. Polirradiculoneuritis por *Karwinskia humboldtiana*. Informe de seis casos. *Rev. Med. IMSS. (Mex).* (22), 22-27.

Salazar, L.M., Flores, M.S., Sepulveda, S.J., Romero D.V., Becerra, V.E., Tamez, R.V., Martínez, H.R., Piñeyro, L.A., Bermudez, M.V., 2006. An experimental model of peripheral neuropathy induced in rats by *Karwinskia humboldtiana* (buckthorn) fruit. *J Peripher Nerv Syst.* 11 (3), 253-61.

SAS Institute, Inc. 1998. *SAS user guide: Statistics*, 6TH Ed. SAS Institute, Inc., Cary N.Y. USA.

Schwab, M.E., Bartholdi, D., 1996. Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiological reviews.* 76 (2), 319-370.

Segovia, A.P., Fernando, Z.P., 1972. Polirradiculoneuritis tóxica por *Karwinskia humboldtiana*. *Bol. Med. Hosp. Infant.* 29 (1), 89-90.

Sekerková, G., Ilijic, E., Mugnaini, E., 2004. Bromodeoxyuridine administered during neurogenesis of the projection neurons causes cerebellar defects in rat. *J. Comp. Neurol.* 470 (3), 221-39.

Takahashi, A., Mizutani, M., Agr, B., Itakura, C., 1994. Acrylamide induced neurotoxicity in the central nervous system of Japanese quails. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 53 (3), 276-283.

Thach, W.T., 1998. A role for the cerebellum in learning movement coordination. *Neurobiol Learn Mem.* 70(1-2):177-88

CAPITULO 6

APÉNDICE.

6.1. Tinción de rutina con hematoxilina y eosina.

TÉCNICA: Cortes de parafina de 10 μm .

EQUIPO: Vasos coplin, estufa a 60°C.

REACTIVOS:

Hematoxilina de Gill:

Agua destilada.	730 mL.
Etilenglicol.	250 mL.
Hematoxilina anhidra (polvo)....	2.0 g.
Yodato de sodio.	0.2 g.
Sulfato de aluminio.	17.6 g.
Ácido acético glacial.	2.0 mL.

Filtrar antes de usar por primera vez.

Eosina (Solución stock concentrada):

Eosina amarillenta.	1.0 g.
Agua destilada.	20 mL.
Etanol al 96%.	80 mL.

Solución de trabajo:

Solución stock.	25 mL.
Etanol al 80%.	74.5 mL.
Ácido acético glacial.	0.5 mL.

Alcohol ácido:

Etanol al 70%.	99 mL.
Ácido clorhídrico concentrado. .	1.0 mL.

Agua amoniacal:

Hidróxido de amonio.	99 mL.
Agua destilada.	1.0 mL.

PROCEDIMIENTO:

1. Desparafinar y rehidratar los cortes de la siguiente manera:

- a) Colocar los cortes por 20 minutos en la estufa a 60°C.
- b) Xilol 5 minutos.
- c) Etanol-xilol 2 minutos.
- d) Etanol absoluto 2 minutos.
- e) Alcohol 96% 2 minutos.
- f) Agua destilada 2 minutos (inmersión y movimientos lentos).

Nota: Limpiar la superficie de la hematoxilina con un papel, para remover las partículas oxidadas. Quitar el exceso de agua de las laminillas antes de sumergirlas en hematoxilina.

2. Tinción con hematoxilina:

- a) Hematoxilina 2 minutos.
- b) Agua corriente 2 inmersiones lentas.
- c) Alcohol ácido 1 inmersión rápida.
- d) Agua corriente 2 inmersiones rápidas.
- e) Agua amoniacal 1 inmersión rápida.
- f) Agua corriente 2 inmersiones.

Nota: Eliminar el exceso de agua de las laminillas antes de sumergirlas en eosina.

3. Tinción con eosina:

- a) Eosina (solución trabajo) 1 minuto.
- b) Etanol 96% 1 inmersión rápida.
- c) Etanol 96% 2 minutos.
- d) Etanol absoluto 2 minutos x 2 cambios.
- e) Etanol-xilol (50%) 2 minutos.
- f) Xilol 2 minutos x 2 cambios.

Montar los cortes teñidos con entellan.

6.2. Tinción con violeta de Cresilo.

SECCIONES: Cortes de parafina de 10 μ m.

EQUIPO: Vasos coplin, estufa a 60°C.

REACTIVOS:

Reactivo de tinción (solución A):

Violeta de cresilo. 0.5 g.
Agua destilada. 100 mL.

Solución diferenciadora (solución B):

Ácido acético glacial. 250 μ L.
Alcohol. 100 mL.

PROCEDIMIENTO:

1. Desparafinar y rehidratar los cortes de la siguiente manera:
 - a. Colocar los cortes por 20 minutos en la estufa a 60°C.
 - b. Xilol. 5 minutos.
 - c. Etanol-xilol 2 minutos.
 - d. Etanol absoluto. 2 minutos.
 - e. Alcohol 96%. 2 minutos.
 - f. Agua destilada. 2 minutos (inmersión y movimientos lentos).
2. Sumergir en **solución A** de 10-20 minutos.
3. Enjuagar en agua destilada.
4. Diferenciar en **solución B** de 4-8 segundos.
5. Deshidratación y aclaramiento
 - a. Etanol 96%. 1 inmersión rápida.
 - b. Etanol 96%. 2 minutos.
 - c. Etanol absoluto. 2 minutos x 2 cambios.
 - d. Etanol-xilol (50%). 3 minutos.
 - e. Xilol. 2 minutos x 2 cambios.

Nota: Repetir los pasos 4 y 5 en caso de ser necesario diferenciar más la muestra.

6. Montar los cortes teñidos con entellan.

RESULTADOS:

Sustancia de Nissl. Morado-azul oscuro
Neuronas. Morado pálido- azul
Núcleos celulares. azul.

6.3. Tinción Klüver-Barrera con Azul luxol rápido.

SECCIONES: Cortes de parafina de 10 μ m.

EQUIPO: Vasos coplin, estufa a 60°C.

REACTIVOS:

Luxol rápido (Solución A):

Azul luxol.	1.0 g.
Metanol absoluto.	1000 mL.
Ácido acético al 10%.	5 mL.
Mezcla y filtra.	

Reactivo diferenciador 1 (solución B):

Carbonato de litio.	0.05 g..
Agua destilada.	100 mL.

Reactivo diferenciador 2 (solución C):

Alcohol absoluto al 95%.

Reactivo de tinción (solución D):

Violeta de Cresilo.	0.5 g..
Agua destilada.	100 mL.

Reactivo diferenciador 3 (solución E):

Alcohol.	100 mL..
Ácido acético glacial.	250 μ L.

PROCEDIMIENTO:

- Desparafinar y rehidratar los cortes de la siguiente manera:
 - Colocar los cortes por 20 minutos en la estufa a 60°C.
 - Xilol. 5 minutos.
 - Etanol-xilo 2 minutos.
 - Etanol absoluto. 2 minutos.
 - Alcohol 96%. 2 minutos.
 - Agua destilada. 2 minutos (inmersión y movimientos lentos).
- Sumergir en **solución A** por 2 horas a 60°C, o 37°C toda la noche.
- Enjuagar en alcohol al 70%.
- Enjuagar en agua corriente.
- Diferenciar en **solución B** hasta distinguir la sustancia blanca y gris claramente y sumergir rápidamente en **solución C**.
- Enjuagar en agua corriente.
- Verificar la diferenciación al microscopio y repetir paso 5 si es necesario.
- Sumergir en **solución D** de 10-20 minutos.

9. Enjuagar en agua corriente.
10. Sumergir en **solución E** de 4-8 segundos.
11. Deshidratación:
 - a. Etanol 96%. 1 inmersión rápida.
 - b. Etanol 96%. 2 minutos.
 - c. Etanol absoluto. 2 minutos x 2 cambios.
 - d. Etanol-xilol 3 minutos.
 - e. Xilol. 2 minutos x 2 cambios.
 - f. Observar al microscopio.
12. Montar los cortes teñidos con entellan.

RESULTADOS:

Mielina. Azul intenso.
Células. Violeta/rosa.

6.4. Impregnación con plata por el método Marsland, Glees y Erlickson.

SECCIONES: Cortes de parafina de 10 μ m.

EQUIPO: Vasos coplin, estufa a 60°C.

REACTIVOS:

Nitrato de plata (Solución A):

Nitrato de plata. 6.0 g.
Agua destilada. 30 mL.

Fijador (solución B):

Formaldehído. 5 mL.
Agua destilada. 45 mL.

Nitrato de plata amoniacal (solución C):

Solución A. 30 mL.
Etanol absoluto. 20 mL.

Añadir hidróxido de amonio concentrado gota a gota hasta disolución del precipitado.

Fijador de tiosulfato (solución D):

Tiosulfato de sodio. 5 g.
Agua destilada. 45 mL.

PROCEDIMIENTO:

1. Desparafinar y rehidratar los cortes de la siguiente manera:
 - a. Colocar los cortes por 20 minutos en la estufa a 60°C.
 - b. Xilol. 5 minutos.
 - c. Etanol-xilol. 2 minutos.
 - d. Etanol absoluto. 2 minutos.
 - e. Alcohol 96%. 2 minutos.
 - f. Agua destilada. 2 minutos (inmersión y movimientos lentos).
2. Sumergir en **solución A** por 45 minutos o hasta que adquieran color amarillento.
3. Sumergir en **solución B** 15 segundos o hasta que adquieran un color café.
4. Sumergir en **solución C** de 30 segundos.
5. Sumergir en **solución B** 1-2 minutos.
6. Examinar al microscopio y si es necesario repetir pasos 3 y 4.
7. Enjuagar en agua desionizada.
8. Fijar la reacción con solución **solución D** de 1-5 minutos.
9. Enjuagar con agua desionizada.
10. Deshidratación:
 - a. Etanol 96%. 1 inmersión rápida.
 - b. Etanol 96%. 2 minutos.

- c. Etanol absoluto. 2 minutos x 2 cambios.
- d. Etanol-xilol (50%). 3 minutos.
- e. Xilol. 2 minutos x 2 cambios.
- f. Observar al microscopio.

11. Montar los cortes teñidos con entellan.

RESULTADOS:

Axones y núcleos. café oscuro/negro.
Fondo. amarillento.

6.5. Técnica de TUNEL para evaluación de apoptosis.

CONTROLES:

Positivo. Cortes tratados con nucleasa para inducir la fragmentación del DNA.

Negativo. Se empleó agua destilada en lugar de la enzima TDT.

SECCIONES: incluidas en parafina y cortes de 6 μ m.

REACTIVOS

PBS 10 X

* Para preparar 100 mL

NaCl	8 g.
KCl	0.2 g.
Na ₂ HPO ₄	1.44 g.
KH ₂ PO ₄	0.24 g.
Ajustar pH a 7.2	
Almacenar a 4 °C.	

PBS 1X

Para preparar 500 mL

PBS 10X	50 mL
Agua destilada	450 mL
Ajustar pH a 7.2	
Almacenar a 4 °C.	

PROCEDIMIENTO

- 1.- Colocar los cortes en estufa a 57°C, 5 min.
- 2.- Pasar cortes a 2 cambios de xilol 5 min c/u.
- 3.- Hidratar en alcoholes 100%, 95 % y 70%, 5 min c/u.
- 4.- Sumergir en PBS 1 X, 2 cambios 5 min c/u.

NO PERMITIR QUE LOS CORTES SE SEQUEN.

Protocolo del kit

- 1.- Sumergir las muestras en PBS 1 X 10 min a Temperatura Ambiente (TA).
* Secar cuidadosamente alrededor de la muestra.
- 2.- Cubrir con 50 μ L/muestra de solución de proteinasa K, incubar de 15 a 30 min. a 37°C.
- 3.- Lavar 2 veces en agua desionizada 2 min c/u.
- 4.- Sumergir las muestras en solución bloqueadora por 5 min (**NO más**) a TA 5.-
Lavar las muestras en PBS 1 X, 1 min.
- 6.- Sumergir en Buffer TDT 1 X, 5 min.
- 7.- Cubrir la muestra con 50 μ L de mezcla de reacción de marcaje e incubar de 30 a 60 min. a 37°C en cámara húmeda.
- 8.- Sumergir en Buffer Stop TDT 1 X, 5 minutos a temperatura ambiente
- 9.- Lavar 2 veces en PBS 1X 2 min c/u a TA.

- 10.- Cubrir la muestra con 50 μ L de solución Strep-HRP e incubar 10 min. 37 °C
- 11.- Lavar 2 veces en PBS 1X 2 min c/u.
- 12.- Sumergir en solución de diaminobencidina de 2 a 7 min.
- 13.- Lavar en varios cambios de agua desionizada 2 min c/u.

Contratinción

- 1.- Sumergir las muestras en agua desionizada por 2 min.
- 2.- Sumergir las muestras de 5 segundos a 5 min. en verde de metilo.
- 3.- Lavar las muestras en forma consecutiva sumergiéndolas 10 veces en cada uno:
 - Agua desionizada.
 - Etanol 70 %, 2 cambios.
 - Etanol 95 %, 2 cambios.
 - Etanol 100 %, 2 cambios.
 - Xilol 2 cambios.
- 4.- Limpie el exceso de xilol
- 5.- Montar y almacenar en oscuridad.

Inmunohistoquímica (TUNEL).

La técnica de TUNEL se determinó utilizando el kit TACS™ 2 TdT *In Situ* Apoptosis Detection de Trevigen®, las soluciones marcadas con * se deben preparar no más de 30 minutos antes de usarse.

Solución de proteinasa K.

	2 muestras	4 muestras	10 muestras
Agua desionizada	100 μ L	200 μ L	500 μ L
Proteinasa K	2 μ L	4 μ L	10 μ L

Solución bloqueadora:

Metanol	45 mL
Peróxido de Hidrógeno 30%	5 mL

Solución de Buffer de marcaje TDT 1 X

- Diluir el buffer TDT 10 X utilizando agua destilada.
- Use 50 mL de Buffer TDT 1 X para procesar de 1 a 10 muestras
- Separe una alícuota de 50 μ L por muestra para preparar la mezcla de reacción de marcaje (paso 7), y almacenar en hielo

Mezcla de Reacción de Marcaje

- Descongele la mezcla de TDT y dNTP a TA, colóquela en hielo
- Para mantener la actividad óptima de la enzima saque del refrigerador el tubo de la enzima solo el tiempo necesario para tomar el volumen.
- Mantenga la mezcla en hielo.

- Prepare 50 μ L por muestra de la manera siguiente:

	2 muestras	4 muestras	10 muestras
Mezcla de TDT dNTP	2 μ L	4 μ L	10 μ L
Stock Catiónica 50 X	2 μ L	4 μ L	10 μ L
Enzima TDT	2 μ L	4 μ L	10 μ L
Buffer de marcaje TDT 1X	100 μ L	200 μ L	500 μ L

Buffer Stop TDT 1X

- Diluir el buffer stop TDT 10 X utilizando agua destilada, almacenar a temperatura ambiente.

Use 50 mL de buffer stop TDT 1 X para procesar de 1 a 10 muestras.

Buffer Stop TDT 1X	5 mL
Agua desionizada	45 mL

Solución Strep-HRP

- Use 50 μ L Solución Strep-HRP por muestra

- Almacene la solución a temperatura ambiente.

- Para preparar añada:

	2 muestras	4 muestras	10 muestras
PBS 1 X	100 μ L	200 μ L	500 μ L
Strep-HRP	2 μ L	4 μ L	10 μ L

Solución de DAB

- Descongele DAB a 37 $^{\circ}$ C. Almacene a temperatura ambiente **NO** en hielo, precipita la solución DAB.

- Prepare la solución no más de 30 minutos antes de usarla.

- Use 50 mL de solución DAB para procesar de 1 a 10 muestras.

- Para preparar añada:

PBS 1 X	50 mL
DAB	250 μ L
H ₂ O ₂ 30%	50 μ L
DAB Enhancer	25 μ L

Verde de metilo 1 %

- Esta listo para usarse, Puede re-usarse, almacene en recipiente cerrado, si precipita, filtre.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Eduardo Mendeleev Becerra Verdín

Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con Orientación Terminal en Morfología

Título de la Tesis: Evaluación Histológica del Encéfalo y Médula Espinal en un Modelo de Polineuropatía Causada por el Fruto de *Karwinskia humboldtiana* en Rata Wistar.

Área de Estudio: Histología.

Biografía:

Datos Personales:

Nací en Tepic, Nayarit, México; el 15 de mayo de 1976. Estado civil: soltero.

Escolaridad:

Egresado de la Universidad Autónoma de Nayarit con la Licenciatura de Químico Farmaco-Biólogo.

Título de Maestría en Ciencias con Orientación Terminal en Morfología otorgado por la Universidad Autónoma de Nuevo León (2005).

Reconocimientos como "*Mejor Estudiante de Maestría*" (ciclo escolar 2002-2003), así como al "*Mejor Estudiante de Doctorado*" (ciclo 2007-2008) en el Posgrado en Ciencias con Orientación terminal en Morfología, otorgado por la Facultad de Medicina de la U.A.N.L.

Participación como Maestro de Histología y Biología Celular y Tisular del curso 2004 a 2007, que se imparte en la carrera de Médico Cirujano y Partero de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L.

Presentación de trabajos de investigación en 15 Congresos Nacionales e Internacionales desde el 2000 a la fecha.

Publicación: *An experimental model of peripheral neuropathy induced in rats by Karwinskia humboldtiana (buckthorn) fruit. Journal of the Peripheral Nervous System. Septiembre de 2006;11(3):253-61.*

Premio al Investigador 2008 otorgado por "*The European Federation of Neurological Societies*". Madrid, España. Agosto 2008.

Premio de 1^{er} lugar en el módulo de Morfología Experimental durante el XXII Congreso Nacional de Anatomía. Matamoros, Tamps, Mex. Octubre 2008.