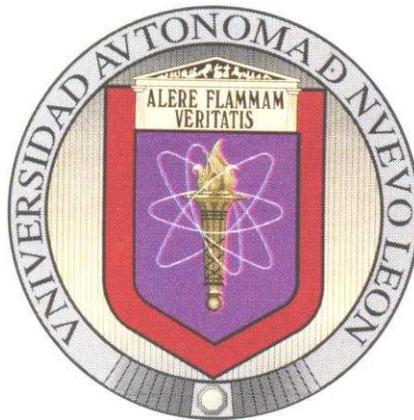


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**Evaluación clínica e histológica del efecto del ácido lipoico
(Thioctacid®) en la intoxicación por *Karwinskia humboldtiana* en la
rata Wistar.**

Por:

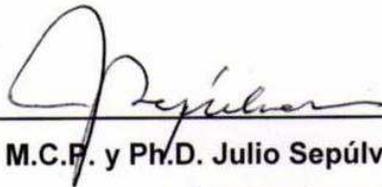
M.C.P. y M.C. JAIME GARCÍA JUÁREZ.

Como requisito parcial para obtener el Grado de DOCTOR EN
CIENCIAS con Orientación Terminal en Morfología.

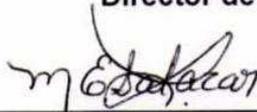
ENERO 2012.

EVALUACIÓN CLÍNICA E HISTOLÓGICA DEL EFECTO DEL ÁCIDO LIPOICO
(THIOCTACID®) EN LA INTOXICACIÓN POR *Karwinskia humboldtiana* EN LA
RATA WISTAR.

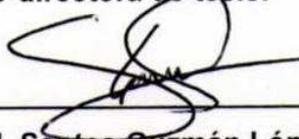
Aprobación de la tesis:



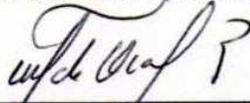
M.C.F. y Ph.D. Julio Sepúlveda Saavedra.
Director de tesis.



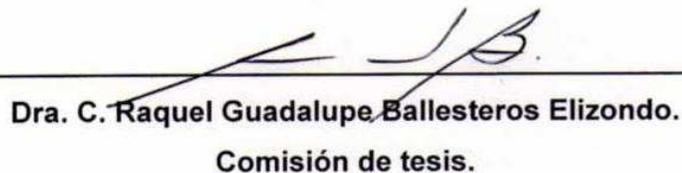
Dra. C. Martha Elizabeth Salazar Leal.
Co-directora de tesis.



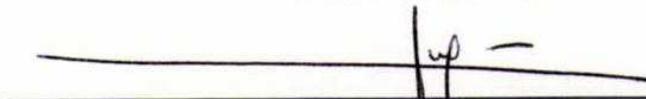
Dr. Med. Santos Guzmán López.
Co-director de tesis.



Dr. C. Roberto Montes de Oca Luna.
Comisión de tesis.



Dra. C. Raquel Guadalupe Ballesteros Elizondo.
Comisión de tesis.



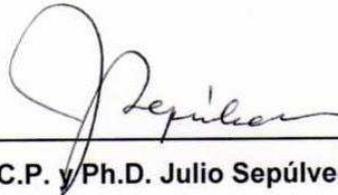
Dr. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado.
Subdirector de Estudios de Posgrado.

**EVALUACIÓN CLÍNICA E HISTOLÓGICA DEL EFECTO DEL ÁCIDO LIPOICO
(THIOCTACID®) EN LA INTOXICACIÓN POR *Karwinskia humboldtiana* EN LA
RATA WISTAR.**

Presentado por:

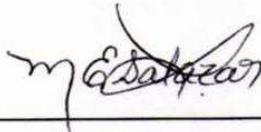
M.C.P. y M.C. Jaime García Juárez.

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L., bajo la dirección del M.C.P. y Ph.D. Julio Sepúlveda Saavedra y la coordinación de la Dra. C. Martha Elizabeth Salazar Leal y del Dr. Med. Santos Guzmán López.



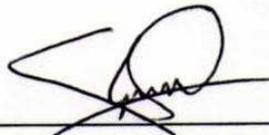
M.C.P. y Ph.D. Julio Sepúlveda Saavedra.

Director de tesis.



Dra. C. Martha Elizabeth Salazar Leal.

Co-directora de tesis.



Dr. Med. Santos Guzmán López.

Co-director de tesis.

DEDICATORIA

A Patricia, mi esposa, con cariño.

A mis padres Francisco y Josefina.

A mis hermanos.

A los que tengan interés sobre este tema.

Atte. Jaime.

AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, por darme vida, una esposa, salud, trabajo, por escoger este lugar y este tiempo en el que me pusiste.

A **Patricia**, por la paciencia y el amor que me has demostrado desde que eres mi compañera y esposa.

A **Francisco García** y **Josefina Juárez**, mis padres por su gran apoyo.

A mis **hermanas** y a mi **hermano**, por todo el apoyo que me han dado.

Al **Dr. Julio Sepúlveda Saavedra**, por su paciencia, experiencia y por todo el apoyo.

A la **Dra. Martha Elizabeth Salazar Leal**, por los consejos, formación y la experiencia invaluable que me compartió, mis mejores deseos para usted.

A la **Dra. María Victoria Bermúdez Q.E.P.D.**, por su consejo y el apoyo que me brindó al iniciar de esta tesis.

Al **Dr. Santos Guzmán López** por todo el apoyo brindado.

Al **Dr. Roberto Montes de Oca Luna** por su valioso apoyo.

A la **Dra. Raquel Gpe. Ballesteros Elizondo** por su oportuno apoyo.

A la **Dra. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez**, muchísimas gracias por todo.

Al M.C. **Víktor Romero Díaz** por tu valiosa experiencia compartida en este trabajo.

A la **Dra. Rosalba Ramírez**, por su apoyo.

Al **Dr. Rodrigo Omaña**, al **Dr. Rigoberto Vargas**, por su apoyo.

A la **Subdirección de Investigación y Estudios de Postgrado** por esta oportunidad de superación.

Al **Departamento de Histología**, especialmente a **Nora, Lorenzo, Luis** por su valiosa ayuda.

A todos mis **compañeros** especialmente a **Carmen Barboza, Arnulfo, Laura, Rubén, Sergio, Lalo, etc.**

A mis **amigos**, gracias por sus oraciones.

A los instructores **Omar y Antonio**, por su interés y apoyo en este trabajo.

A todos **mis alumnos** que mostraron interés en este trabajo.

Al **CONACYT** por la beca que me brindó.

Al **PAICYT** por financiar la parte inicial de este trabajo.

A los que pudiera llegar a olvidar en este momento.

Muchísimas gracias.

Atte. Jaime.

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. <i>Karwinskia humboldtiana</i>	1
1.2. Células cebadas.	9
1.3. Radicales libres.	10
1.4. Acido α -lipoico (Thioctacid®).	12
1.5. JUSTIFICACIÓN.	14
1.6. HIPÓTESIS.	14
1.7. OBJETIVO GENERAL.	14
1.8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	15

2. MATERIALES Y MÉTODOS.	16
2.1. Equipo.	16
2.2. Material de laboratorio y de consumo.	17
2.3. Reactivos.	17
2.4. Material biológico.	18
2.5. Colecta y preparación de fruto molido.	18
2.6. Grupos Experimentales.	19
2.7. Tratamientos.	20
2.8. Registro de las manifestaciones clínicas.	21
2.9. Obtención de las muestras.	22
2.10. Procesamiento de las muestras.	23
3. RESULTADOS.....	25
3.1. Manifestaciones clínicas.	25
3.2. Evaluación histológica del sistema nervioso central y periférico ..	27
3.2.1. Cerebro.	27
3.2.2. Cerebelo.	29

3.2.3. Médula espinal.	31
3.2.4. Nervio periférico.	32
3.3. Evaluación histológica de pulmón.	39
3.4. Evaluación histológica de hígado.	41
3.5. Evaluación histológica de riñón.	44
4. DISCUSIÓN.	50
5. CONCLUSIÓN.	57
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	58
APÉNDICE.	66

LISTA DE FIGURAS

Figura

1. Arbusto de <i>Karwinskia humboldtiana</i>	1
2. Distribución de las especies de <i>Karwinskia humboldtiana</i> en la República Mexicana.	2
3. Hojas y fruto de <i>Kh</i>	3
4. Pacientes pediátricos que muestran las manifestaciones neurológicas de la intoxicación por <i>Kh</i>	4
5. Toxinas extraídas por Dreyer y cols., (1975) a partir de la semilla de fruto de <i>Kh</i> ...	5
6. Esquema del modelo experimental de intoxicación crónica con fruto de <i>Kh</i> (Salazar y cols., 2006).....	7
7. Nervio periférico de rata en etapa de parálisis.....	8
8. Curvas de los promedios de peso.....	26
9. Corteza motora de cerebro de rata.....	28
10. Corteza de cerebelo de rata.....	30

11. Asta anterior de la médula espinal.....	31
12. Nervio periférico de rata teñido con H&E.....	32
13. Nervio periférico de rata teñido con la técnica de Klüver y Barrera.....	33
14. Nervio periférico de rata con la técnica de Marsland, Glees & Erickson.....	34
15. Poblaciones de células cebadas en nervio periférico de rata.....	36
16. Células cebadas totales por mm ²	37
17. Conteo de las poblaciones de células cebadas.....	38
18. Pulmón de rata teñido con H&E.....	40
19. Hígado de rata teñido con H&E.....	42
20. Hígado de rata teñido con rojo oleoso.....	43
21. Corteza renal (glomérulos) de rata teñido con H&E.....	45
22. Corteza renal (laberinto cortical) de rata teñido con H&E.....	46
23. Médula renal de rata teñido con H&E.....	47
24. Corteza renal de rata teñida con tricrómico de Masson.....	48
25. Corteza renal de rata con PAS.....	49

LISTA DE TABLAS

Tabla

I. Esquema de tratamientos de los grupos experimentales y los grupos control.....20

II. Manifestaciones clínicas registradas en los grupos de trabajo.....27

ABREVIATURAS.

α	Alfa
A-AAL	Agua – ácido α -lipoico
A-SS	Agua – solución salina
AAL-A	Ácido α -lipoico – agua
AAL-Kh	Ácido α -lipoico – <i>Karwinskia humboldtiana</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AgNO ³	Nitrato de plata
AM-A	Aceite de maíz – agua
AM-Kh	Aceite de maíz – <i>Karwinskia humboldtiana</i>
β	Beta
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
cm.	Centímetro, centímetros
cols.	Colaboradores
Dr. C.	Doctor en Ciencias
Dra. C.	Doctora en Ciencias
Dr. Med.	Doctor en Medicina
Fig.	Figura
FR	Fase reversa
G	Calibre de aguja
γ	Gama
g	Gramos

g/Kg	Gramos por Kilogramo
g/mol	Gramos por mol
h	Hora, horas
H&E	Hematoxilina y eosina
i.p.	Intraperitoneal
Kg	Kilogramo, kilogramos
<i>K.</i>	<i>Karwinskia</i>
<i>Kh</i>	<i>Karwinskia humboldtiana</i>
<i>Kh-AAL</i>	<i>Karwinskia humboldtiana</i> – ácido α -lipoico
<i>Kh-SS</i>	<i>Karwinskia humboldtiana</i> – solución salina
M.C.	Maestro en Ciencias
M.C.P.	Médico Cirujano y Partero
min.	Minutos
Min.	Mínimo
mL	Mililitro, mililitros
mm ²	Milímetros cuadrados
mg/Kg	Miligramos por Kilogramo
mg/Kg/día	Miligramos por Kilogramo por día
μ m	Micrómetros, micras
n	Número
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida
NGF	Factor de crecimiento neural (Nerve growth factor, siglas en inglés)
N.L.	Nuevo León
O ²⁻	Oxígeno

PA1	Peroxisomicina A1
PA3	Peroxisomicina A3
PAS	Ácido peryódico de Schiff
pH	Logaritmo negativo de la concentración de iones H ⁺
Ph.D.	Doctorado en investigación (Philosophiae Doctor, siglas en latín)
PM	Peso molecular
pm	Horas de la tarde
PMN	Polimorfonuclear, polimorfonucleares
®	Marca registrada
T	Toxina
seg.	Segundos
S.A.	Sociedad Anónima
SOD	Superóxido dismutasa
SNC	Sistema nervioso central
U.A.N.L.	Universidad Autónoma de Nuevo León
v.o.	Vía oral
x	Por (número de veces que se incrementa la imagen un objetivo)
°C	Grados centígrados, grados Celsius
%	Por ciento
±	Más o menos
-	Menos
=	Igual
#	Número

RESUMEN

Jaime García Juárez.
Universidad Autónoma de Nuevo León.
Facultad de Medicina.
Título:

Fecha de Graduación: Enero de 2012.

EVALUACIÓN CLÍNICA E HISTOLÓGICA DEL EFECTO DEL ÁCIDO LIPOICO (THIOCTACID®) EN LA INTOXICACIÓN POR *Karwinskia humboldtiana* EN LA RATA WISTAR.

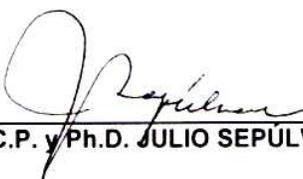
Número de páginas: 85.
Área de estudio: Morfología.

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

Propósito y Método de Estudio: La ingesta accidental de fruto de *Karwinskia humboldtiana* (*Kh*) ocasiona una parálisis flácida, simétrica, progresiva y ascendente, similar a la del síndrome de Guillain-Barré. Evolucionan en el transcurso de 3 a 12 meses hasta su recuperación total, pero los casos graves terminan en la muerte por insuficiencia respiratoria. En la actualidad no se dispone de un tratamiento específico. La lesión histopatológica descrita en nervio periférico de pacientes, y animales de experimentación corresponde a una desmielinización segmentaria acompañada de degeneración Walleriana, y la lesión ultraestructural que se presenta en la intoxicación experimental con fruto de *Kh* es similar a la que se observa en los modelos animales de diabetes. Por otra parte, en un estudio *in vitro* se reportó que la T-514 (una de las toxinas extraídas a partir de la semilla del fruto) incrementa la producción de radicales libres sobre células en cultivo. Los radicales libres se han relacionado con la desmielinización que se presenta en otros tipos de neuropatías como en la diabética, en la cual se ha utilizado con éxito tanto en pacientes como en animales de experimentación el ácido α -lipoico, un poderoso agente antioxidante que depura a los radicales libres. De acuerdo con estos antecedentes, se decidió administrar este agente antioxidante, en un modelo de intoxicación crónica por fruto de *Kh* y evaluar las manifestaciones clínicas y órganos del sistema nervioso central y periférico, pulmón, hígado y riñón.

Contribuciones y Conclusiones: En el presente estudio se utilizó por primera vez un tratamiento orientado específicamente a un posible factor que pudiera estar involucrado en el desarrollo de la parálisis y las lesiones que se presentan en los casos de intoxicación por *Kh*, el ácido α -lipoico. Sin embargo, no se observó mejoría sobre las manifestaciones clínicas evaluadas en los animales o sobre las lesiones histopatológicas presentes en el sistema nervioso central y periférico, pulmón, hígado y riñón. Estos resultados sugieren que los radicales libres no son el mecanismo principal de lesión sobre los órganos evaluados en la intoxicación causada por *Kh*. Por otro lado, se describe también por primera vez, la lesión de otras neuronas de cuerpo voluminoso que se localizan en la capa granulosa del cerebelo, además de las neuronas de Purkinje previamente reportadas.

FIRMA DEL DIRECTOR DE TESIS.


M.C.P. y Ph.D. JULIO SEPÚLVEDA SAAVEDRA.

CAPÍTULO 1.

INTRODUCCIÓN.

1.1. *Karwinskia humboldtiana*.

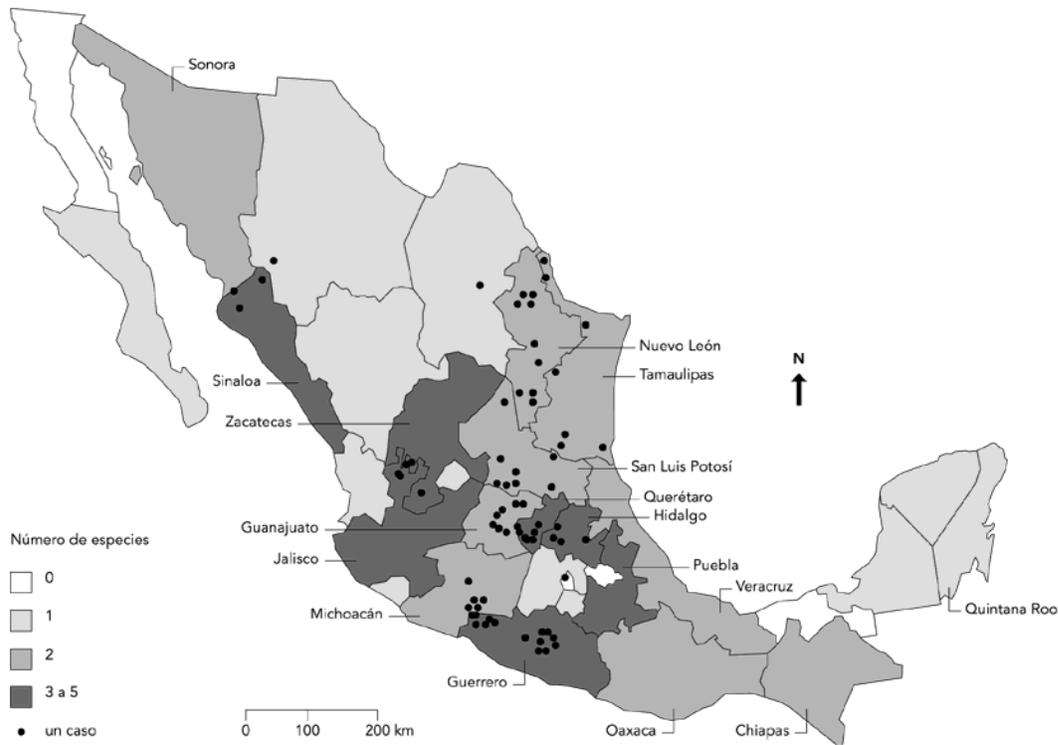


Figura 1. Arbusto de *Karwinskia humboldtiana*. Parque recreativo “Potrero Chico” en Hidalgo, Nuevo León, México, durante el mes de Agosto.

Las plantas del género *Karwinskia* pertenecen a la familia *Rhamnaceae*, conformada por arbustos y árboles pequeños (Fig. 1) que crecen a lo largo de toda la República Mexicana (Fig. 2), sur de los Estados Unidos, Centroamérica, Sudamérica y el Caribe. La especie más abundante en México es la *Karwinskia humboldtiana*

(*Kh*), conocida comúnmente como “coyotillo”, “capulín tullidor” o “tullidora”. (Fernández, 1992; Arreola., 2000).

Mapa de número de especies de *Karwinskia* en México y casos de intoxicación, 1990-1994.



Elaboró: M. E. Arreola Nava.
Fuente: Fernández, 1992; Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud.

Figura 2. Distribución de las especies de *Karwinskia* en la República Mexicana.

La *Kh* produce un fruto esférico que corresponde a una drupa de unos 0.5 cm de diámetro (Fig. 3), que cuando madura adquiere un color morado oscuro y un sabor dulce (Bustamante y cols., 1978). Este fruto puede ser ingerido accidentalmente por animales y por humanos (Padrón, 1951), lo cual ocasiona una parálisis flácida, simétrica, progresiva y ascendente; que puede acompañarse por mano en garra y ptosis palpebral (Fig. 4). Este cuadro es similar al que se presenta

en el síndrome de Guillain-Barré, con el cual suele confundirse, por lo que no se hace el diagnóstico oportunamente (Bustamante y cols., 1978; García y Cacho, 2005).



Figura 3. Hojas y fruto de *Kh.*

Los pacientes intoxicados pueden evolucionar hasta su recuperación total en el transcurso de 3 a 12 meses (Padrón y Velázquez, 1956). Sin embargo, en otros pueden quedar secuelas como la deformidad o la debilidad muscular, debidas a una recuperación lenta o a consecuencia de una segunda ingesta (Padrón, 1951; Segovia y cols., 1972). Del Pozo (1965) refiere en algunos pacientes la persistencia de la parálisis aún 14 meses después de la ingesta del fruto. Los casos de intoxicación graves terminan en la muerte, presumiblemente por parálisis bulbar (Padrón, 1951), aunque también se ha reportado que una ingesta muy copiosa de fruto ocasiona la muerte por insuficiencia respiratoria (Puértolas y cols., 1984).

Cabe señalar que esta intoxicación se presenta sobre todo en las zonas rurales donde las personas son de un nivel socio-económico bajo y, por lo general

afecta más a los menores de edad, quienes ingieren el fruto ignorando el peligro de consumirlo (Arreola y cols., 2000).

A pesar de todos los estudios experimentales realizados para esta intoxicación, aún no se conoce el mecanismo que induce la parálisis, ni existe un tratamiento específico (Puértolas y cols., 1984). Las medidas terapéuticas que se les brinda a los pacientes dependen de la gravedad de sus manifestaciones clínicas y son: el uso de fármacos anti-inflamatorios, vitaminas del complejo B, fisioterapia temprana y ventilación mecánica en los casos graves (Padrón, 1951; Puértolas y cols., 1984).



Figura 4. Pacientes pediátricos que muestran las manifestaciones neurológicas de la intoxicación por *Kh*.

Los efectos tóxicos de esta planta fueron descritos por primera vez por el historiador jesuita Francisco Xavier Clavijero en su libro “Historia de la Antigua Baja California” en 1789, donde se menciona que los indios pericúes no sufrían daño si no consumían las semillas (Salazar, Tesis Doctoral 2003). A partir de esta semilla, Dreyer y cols., (1975) extrajeron diversos compuestos químicos antracenónicos que se han clasificado según su peso molecular como T-496, T-514, T-516 y T-544 (Fig. 5). Más recientemente se aislaron de otras plantas del género *Karwinskia* compuestos estructuralmente similares a estas toxinas: dos diastereoisómeros de la T-514 (PA1 y PA3), un isómero de la T-514 y la T-510 obtenidos de la *K. parvifolia*, de la *K. umbellata* y de la *K. affin humboldtiana* (Rivas y cols., 1990; Waksman y cols., 1992; Rivas, Tesis de Maestría 1995).

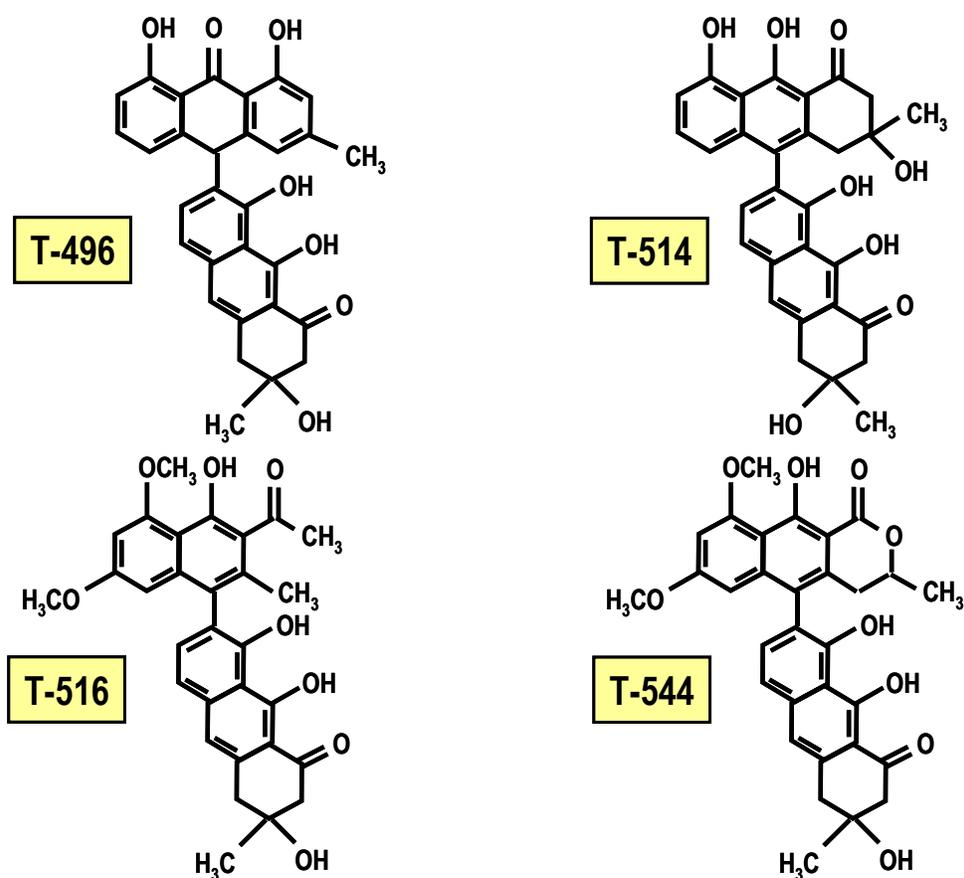


Figura 5. Toxinas extraídas por Dreyer y cols., (1975) a partir de la semilla de fruto de *Kh*.

En la intoxicación experimental aguda con las toxinas aisladas se determinó que la T-496 ocasiona diarrea, la T-514 provoca daño severo en hígado, pulmón y riñón, y que la T-544 produce el cuadro neurológico (Bermúdez y cols., 1986; Bermúdez y cols., 1992), a la T-544 también se le ha llamado “tullidinol” (Muñoz y cols., 1994).

La T-514 también produce daño selectivo sobre la membrana de los peroxisomas de levaduras metilo-tróficas (Sepúlveda y cols., 1992) y ha sido objeto de estudios que tienen la finalidad de emplearlo como un posible agente anti-neoplásico, debido a que presenta toxicidad selectiva en contra de algunas líneas celulares tumorales (Piñeyro y cols., 1994). Además, esta toxina produce *in vitro* un incremento en la producción de radicales libres (Garza y cols., 2003), que podría en parte explicar el mecanismo de lesión que ocasiona la parálisis.

Es importante mencionar que en la mayoría de los estudios experimentales se administró una dosis alta y única del fruto (intoxicación aguda) que ocasiona desmielinización segmentaria y degeneración Walleriana en nervio periférico, además de cromatólisis en neuronas de ganglio nervioso, médula espinal, cerebro y cerebelo (Padrón y Velázquez, 1956; Escobar y Nieto, 1965; Charlton y Pierce, 1970; Becerra y cols., 2009). En los trabajos realizados con dosis altas de fruto los animales no suelen recuperarse, sino que mueren en el transcurso de algunos días pudiendo ser la muerte debida al daño pulmonar, hepático y renal (Bermúdez y cols., 1986). Recientemente se desarrolló un modelo experimental de intoxicación crónica por fruto de *Kh* en la rata Wistar (Salazar y cols., 2006).

En este modelo se administró una suspensión acuosa de fruto completo de *Kh* que previamente fue secado, molido y tamizado, a una dosis total de 3.5 g/Kg de peso fraccionada en 5 tomas que se administraron en un período de 15 días. De esta forma se logró reproducir el cuadro neurológico progresivo con manifestaciones

clínicas neurológicas similares a las que se presentan en los seres humanos, evolucionando hasta la recuperación (Fig. 6).

En este modelo de intoxicación crónica con fruto de *Kh* se demostró también la desmielinización segmentaria (Fig. 7B) que concuerda con trabajos realizados previamente en varias especies de animales intoxicados en forma aguda (Muñoz y cols., 1983; Bermúdez y cols., 1986) y en forma crónica (Charlton y Pierce, 1970).

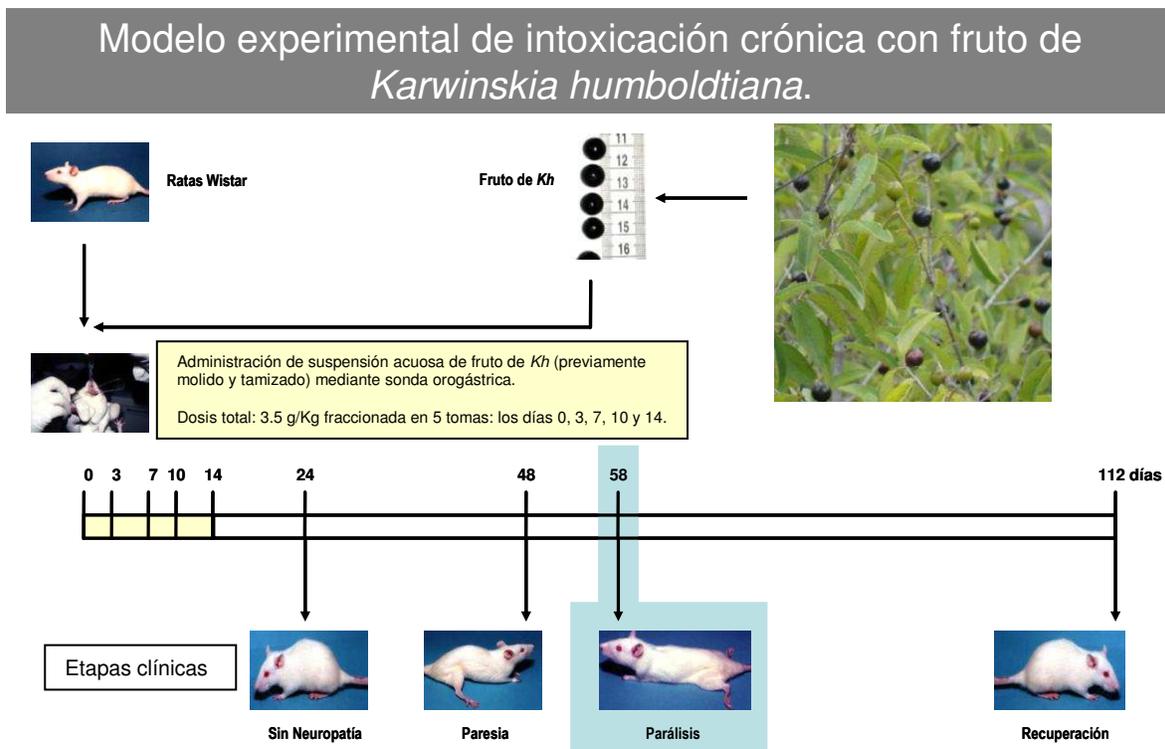


Fig. 6. Esquema del modelo experimental de intoxicación crónica con fruto de *Kh*. (Salazar y cols., 2006).

Así mismo, se logró reproducir la lesión axonal caracterizada por la presencia de irregularidades en el grosor y la coexistencia de segmentos engrosados y adelgazados en un mismo axón, lo que genera un aspecto “varicoso”, además de vacuolización de los mismos (Fig. 7D). Además, en los cortes finos observados a

microscopía electrónica de transmisión se observó engrosamiento y desorganización de las laminas que forman la vaina de mielina (Fig. 7F) y compresión del axón, así como cambios de electrodensidad en los axones no mielinizados (Salazar y cols., 2006).

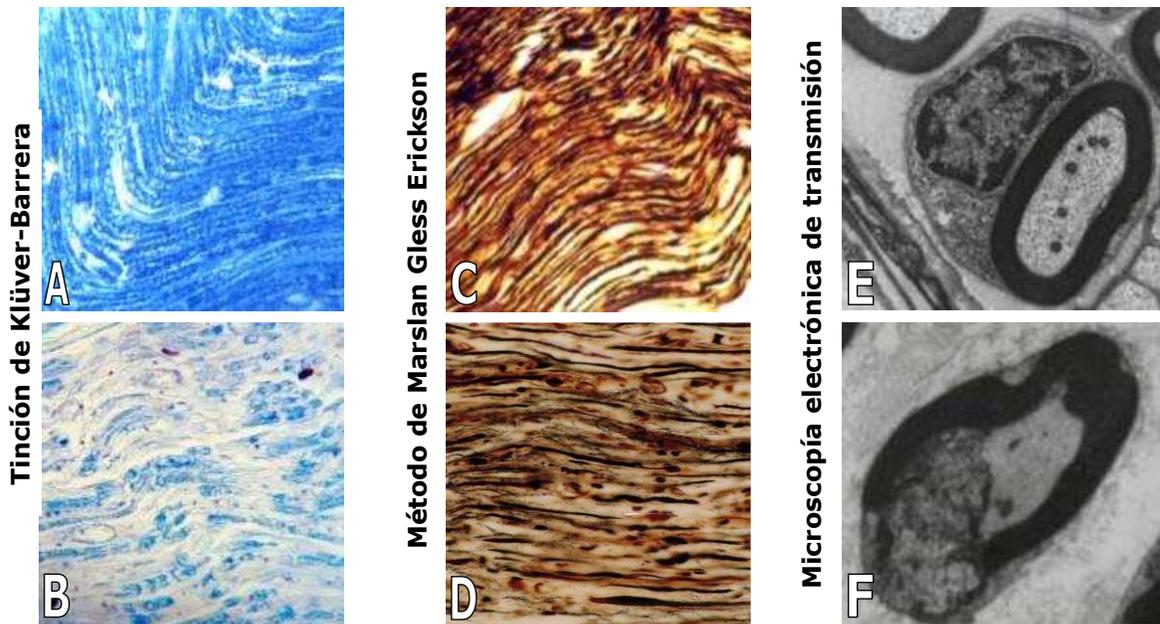


Fig. 7. Nervio periférico de rata en la etapa de parálisis. **A)** Vainas de mielina de aspecto normal en azul. **B)** Desmielinización segmentaria. **C)** Axones de aspecto normal. **D)** Engrosamiento y adelgazamiento irregular de los axones. **E)** Vaina de mielina de aspecto normal. **F)** Desorganización de las hojas de membrana que forman la vaina de mielina. Según el modelo desarrollado por Salazar y cols., 2006.

En ratas Wistar intoxicadas de forma aguda con 2 g/Kg de fruto se han reportado alteraciones en la corteza motora, el núcleo caudado e hipocampo consistentes en hiper cromasia del citoplasma en los cuerpos de las neuronas piramidales, acompañada de un ensanchamiento de los espacios de Virchow-Robin, neuronofagia y agregados de astrocitos, retracción de la célula y edema nuclear en las neuronas no piramidales de la corteza cerebral (Ortiz y cols., 1992). También en

el modelo de intoxicación crónica que desarrollaron Salazar y cols. (2006) se describieron alteraciones en las propiedades tintoriales y en el tamaño de los cuerpos neuronales de la corteza motora del cerebro, cerebelo y médula espinal. Cambios acompañados por desmielinización segmentaria de los tractos nerviosos de la vía motora y, disminución en el número de las células de Purkinje en el cerebelo (Becerra y cols., 2009).

Por otra parte, estudios histológicos preliminares mostraron en el pulmón el engrosamiento de los tabiques inter-alveolares, con la presencia de un abundante infiltrado inflamatorio principalmente de células mononucleares. En el hígado se reportó daño intracelular severo de los hepatocitos, con presencia de esteatosis, necrosis focal y dilatación sinusoidal. Además, en riñón se observó la presencia de necrosis tubular focal, congestión vascular, infiltrado de células inflamatorias y depósito de material hialino en la luz de los túbulos contorneados (Romero y cols., 2005).

1.2. Células cebadas.

Las células cebadas residen normalmente en el nervio periférico y se tiene evidencia que sugiere su participación activa en los procesos de mielinización y desmielinización en el sistema nervioso (Monk y cols., 2007).

En el modelo experimental desarrollado por Salazar y cols. (2006) se observó un incremento gradual en el número de células cebadas con relación al grupo control (Salazar, Tesis Doctoral 2003), y en la etapa de recuperación se reportó el mayor número de células cebadas presentes. También se demostró que existe un incremento gradual en el número de células desgranuladas con relación a las no desgranuladas en cada una de las etapas de este modelo.

Además se demostró mediante técnicas histoquímicas que el contenido de los gránulos de las células cebadas varía en las diferentes etapas, lo cual sugiere que participan en el proceso de lesión al nervio periférico (Becerra, Tesis de Maestría 2005).

Las células cebadas llevan a cabo múltiples funciones entre las cuales destacan la secreción de enzimas como la triptasa y la quimasa que se sabe degradan a la proteína básica de la mielina y a la proteína P2. Cuando estas proteínas de la mielina son expuestas pueden potenciar la desgranulación de más células cebadas con la consecuente liberación de sus mediadores químicos (Christy y Brown, 2007).

Estas células también secretan factores de crecimiento como el factor de crecimiento neural (NGF, por sus siglas en inglés) el cual está relacionado con la reparación de la mielina. Los mediadores de las células cebadas incrementan la permeabilidad vascular, causan vasodilatación, producen espasmo del músculo liso, quimiotaxis de PMN, estimulación de la adenilato ciclasa, generación de radicales superóxido, formación de prostaglandinas, secreción de moco y ácido gástrico, hipotensión, destrucción de tejido e infiltración de células mononucleares (Esposito y cols., 2001; Khalil y cols., 2004).

1.3. Radicales libres.

Los radicales libres son productos del metabolismo y están formados por átomos con electrones impares en su última órbita, altamente reactivos. Ante su necesidad de volverse estables inician reacciones en cadena que lesionan estructuras celulares, causando mutaciones en el ADN (principal factor en el desarrollo del cáncer), daño proteico relacionado con enfermedades del sistema

inmunitario y peroxidación lipídica que es causante de procesos inflamatorios y degenerativos (Trush y cols., 1982).

La producción de radicales libres es un fenómeno normal y esencial para el metabolismo celular. Los organismos vivos poseen una serie de mecanismos para depurar los radicales libres y bloquear así sus efectos oxidativos. Existen sistemas antioxidantes endógenos conformados por enzimas como la superóxido-dismutasa (SOD), la glutatión-peroxidasa y la catalasa. Además de estas enzimas existen otros antioxidantes que se incorporan a partir de la dieta como es la vitamina C, activa en la fase líquida de la célula, o la vitamina E y el beta-caroteno, que protegen a la membrana celular gracias a su carácter lipofílico. Se dice que se presenta estrés oxidativo cuando la generación de radicales libres sobrepasa la capacidad de su depuración.

Los radicales libres tienen funciones en la regulación de varias respuestas de las células cebadas, incluyendo la desgranulación, la secreción de leucotrienos y la producción de citocinas. Las investigaciones más recientes revelan que los radicales libres pueden jugar también un papel importante en la activación de las células cebadas por diversas sustancias ambientales relacionadas con la alergias, por ejemplo metales pesados e hidrocarburos aromáticos poli-cíclicos (Suzuki, y cols., 2005).

En un estudio *in vitro* realizado con la T-514 se reportó un incremento en la producción de radicales libres (Garza y cols., 2003). Esto podría ser extrapolado a las otras toxinas contenidas en el fruto de *Kh* ya que su naturaleza química es la misma, lo que contribuiría al incremento en la producción de radicales libres cuando se ingiere el fruto completo.

Así mismo, se ha demostrado que existe una relación entre el estrés oxidativo y la desmielinización que se presenta en otros padecimientos como la poli-neuropatía diabética. En la diabetes mellitus se genera estrés oxidativo debido a la

hiperglicemia, lo cual activa una serie de mecanismos que llevan al desarrollo de lesiones desmielinizantes de los nervios periféricos (Evans, y cols., 2002).

En el modelo experimental de diabetes inducida por estreptozotocina se ha descrito la ultraestructura de la lesión nerviosa (Fahim y cols., 2000), la cual resulta ser similar a la que se observa en los animales intoxicados experimentalmente con el fruto de *Kh*. Además, en el síndrome de Guillain-Barré también se ha encontrado evidencia que indica que el estrés oxidativo juega un papel importante en el desarrollo de sus lesiones desmielinizantes.

1.4. Ácido α -lipoico (Thioctacid®).

El ácido α -lipoico es un poderoso compuesto antioxidante de origen endógeno que además de depurar los radicales libres tiene la capacidad de restablecer los sistemas antioxidantes del organismo (Biewenga y cols., 1997; Bilaska y cols., 2005).

El efecto antioxidante de este compuesto es muy potente ya que actúa tanto en las regiones hidrosolubles de la célula así como en las regiones liposolubles. Debido a esto, es más potente que otros antioxidantes como la vitamina C, la cual solamente actúa en las regiones hidrosolubles; y que la vitamina E o los β -carotenos que actúan en las regiones liposolubles (Packer, y cols., 1997).

En general, la administración de ácido α -lipoico no tiene contraindicaciones, salvo si el paciente resulta ser alérgico a algún componente de la fórmula. Produce pocos efectos adversos como la irritación gástrica y, además reduce la glicemia, lo cual también resulta en beneficio en los pacientes diabéticos (Gandhi y cols., 1985; Parris, 2005; Cantú y cols., 2007).

El uso del ácido α -lipoico en los pacientes con diabetes mellitus ha tenido una efectividad contundente, ya que mejora notablemente las manifestaciones clínicas que se presentan en la poli-neuropatía diabética como el dolor y las parestesias; incluso cuando se inicia su uso en los pacientes que presentan manifestaciones clínicas incapacitantes (Ziegler, y cols., 1999 y 2006; Bansal y cols., 2006).

Por otra parte, en los modelos de diabetes inducida experimentalmente con estreptozotocina se ha demostrado que el ácido α -lipoico mejora notablemente la conducción nerviosa y puede prevenir la neuropatía en ratas diabéticas cuando se administra como suplemento combinado con el ácido γ -linolénico (Pitel y cols., 2007). También se ha demostrado su efecto neuroprotector (Packer y cols., 1997; Mitsui y cols., 1999; Tirosh y cols., 1999; Manda y cols., 2007), así como se ha demostrado su utilidad como un agente quelante (Keith y cols., 1997).

Se ha demostrado que los suplementos dietéticos con 30 mg/Kg de ácido lipoico por día durante 12 semanas evitan el aumento de la albuminuria y el desarrollo de glomeruloesclerosis y fibrosis túbulo-intersticial asociada con nefropatía diabética. Uno de los mecanismos por los cuales el ácido lipoico ejerce este efecto nefroprotector es disminuyendo el estrés oxidativo mediante la reducción de NADPH inducida por la generación de O^{2-} y la regulación de la expresión de las subunidades de la NADPH oxidasa (Bhatti y cols., 2005).

1.5. JUSTIFICACIÓN.

Se desconoce la etiopatogenia de las lesiones ocasionadas por la intoxicación con fruto de *Kh*; por lo que no existe tratamiento específico. La T-514 incrementa la producción de radicales libres *in vitro*, por lo que resulta de interés evaluar el efecto in vivo del agente antioxidante ácido α -lipoico, ya que este compuesto ha demostrado tener efectividad en el tratamiento de otras intoxicaciones, incluso en la polineuropatía diabética, que se asocian con la presencia de radicales libres.

1.6. HIPÓTESIS.

El tratamiento con ácido α -lipoico tiene un efecto favorable sobre las manifestaciones clínicas y las lesiones histológicas causadas por la intoxicación con el fruto de la *Karwinskia humboldtiana*.

1.7. OBJETIVO GENERAL.

Evaluar si las manifestaciones clínicas y las lesiones histológicas causadas por la intoxicación con el fruto de la *Karwinskia humboldtiana* se modifican favorablemente por la administración de ácido α -lipoico.

1.8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1.- Evaluar el efecto del ácido α -lipoico sobre las manifestaciones clínicas que se presentan durante la intoxicación con fruto de *Karwinskia humboldtiana* en un modelo experimental.

2.- Analizar el efecto del ácido α -lipoico sobre las alteraciones histológicas causadas por *Karwinskia humboldtiana* sobre:

- A) Nervio periférico
- B) SNC: vía motora
- C) Hígado
- D) Pulmón
- E) Riñón

CAPÍTULO 2.

MATERIAL Y MÉTODOS.

2.1 Equipo.

Balanza de barra triple Analit® modelo 4066.

Báscula analítica Mettler AE 160.

Balanza analítica OHAUS.

Baño de flotación con control de temperatura Lipshaw MFG CO.

Campana de extracción.

Centro de inclusión Tissue Embedding Center Tissue Tek II.

Criostato con micrótopo modelo 4551 A.

Estuche de disección.

Estufa eléctrica Equiphos S.A.

Fotomicroscopio Nikon eclipse 50i.

Histokinette.

Licuadaora Maxim Food Processor VJ-753.

Mallas circulares para tamizaje de partículas de 30x30, 50x50 y 100x100.

Microtopo American Optical Corporation.

Microscopio de luz de campo claro EAGLE modelo CM240.

Placa caliente Corning Hot Plate Stirrer PC-351 con magneto.

Potenciómetro Orion Research modelo 601 A / digital ionalyzer.

Refrigerador Supermatic® modelo 0803.

Sistema Millipore® desionizador y purificador de agua mili-Q, con cartuchos de intercambio iónico de carbón y filtros de ésteres de celulosa (poro 0.22 µm) biológicamente inertes.

2.2 Material de laboratorio y de consumo.

Abatelenguas con orificio.

Algodón en torundas.

Cubreobjetos de vidrio.

Equipo de venoclisis.

Frascos de vidrio claro de 200 mL.

Frascos de vidrio oscuro de 200 mL.

Gasas.

Guantes de látex.

Matraces bola de 1000 mL.

Matraces Erlenmeyer de 100, 200 y 2000 mL.

Navajas desechables.

Jeringas desechables de 10 mL con aguja 21 G x 32 mm.

Jeringas desechables de 1 mL con aguja 27 G x 13 mm.

Pipetas automáticas de 200 y 1000 μ L.

Pipetas de vidrio.

Portaobjetos de vidrio.

Probetas de 100, 500 y 1000 mL.

Recipientes de vidrio.

Sondas para alimentación infantil.

Vasos de Coplin de vidrio y de plástico.

Vasos de precipitado de 50, 200 y 1000 mL.

2.3 Reactivos.

Aceite de maíz comercial Mazola®.

Ácido alfa-lipoico SIGMA (\pm)- α -lipoic acid T5625-50G lote #069K0308.

Buffer de solución salina SIGMA P-7059 lote #106H9430 pH 7.4.

Cloruro de sodio inyectable PiSA lote A078427.
Entellan® Rapid Embedding Agent for Microscopy EMS Catálogo #14800.
Glutaraldehído.
Heparina INHEPAR PiSA S.A.
Nitrato de plata AgNO_3 PM=169.87 g/mol Min. 99.8 % DEQ.
Pentobarbital sódico (Anestesa®) Pfizer SAGARPA Q-0001-065.
Solución de formaldehído al 37 % 2106-03 J.T.Baker.
Solución de poli-L-lisina SIGMA P8920.
Thioctacid® 600T solución inyectable 600 mg/24 mL lote X102 Bayer.

2.4 Material biológico.

Se utilizó fruto maduro de *Karwinskia humboldtiana* que fue recolectado en el paraje conocido como "Potrero Chico" en la localidad de Hidalgo, N.L. durante los meses de Julio y Agosto de 2008.

Se utilizaron ratas Wistar de 250 ± 25 g machos y hembras que fueron mantenidas en bioterio bajo condiciones estándar de alimentación, con ciclos de luz/oscuridad de 12 h cada uno. Fueron sometidas a un ayuno de 8 h previo a la administración de los tratamientos.

2.5 Colecta y preparación de fruto molido.

El fruto maduro de *Kh* fue recolectado tomando en cuenta para su identificación las características propias de las hojas y los frutos de la planta que son: hojas ovoides de más de 2.5 cm de largo y unos 2 cm de ancho aproximadamente y el fruto maduro que es una drupa de más de 0.5 cm de diámetro y de cáscara de

color morado oscuro. Se tomaron muestras de sus hojas para la confirmar la especie.

Después de ser colectado, el fruto se lavó con agua corriente y se extendió sobre una superficie plana cubierta con papel absorbente para ser secado al aire libre y en condiciones de oscuridad por un período mínimo de 2 semanas antes de ser molido.

Luego de este período se molió el fruto en una licuadora común y se tamizaron las partículas de polvo: primero sobre mallas calibre 30x30, luego sobre mallas calibre 50x50 y por último sobre mallas 100x100. Después de tamizado, el polvo fue almacenado en refrigerador a 4 °C dentro de un recipiente de vidrio herméticamente cerrado y protegido de la luz hasta que fue utilizado.

Se utilizó una fracción de este polvo para realizar la determinación de la presencia de las toxinas contenidas en el fruto mediante cromatografía de líquidos de alta resolución de fase reversa (CLAR de FR), según lo descrito en el modelo experimental desarrollado por Salazar y cols., (2006).

2.6 Grupos experimentales.

Se administró ácido α -lipoico a ratas Wistar bajo dos modalidades: a un grupo (n=5) se le administró un tratamiento de 30 mg/Kg/día por vía oral (v.o) durante 15 días antes de ser intoxicadas con el fruto de la *Kh* y a otro grupo (n=5) se le administró la misma dosis por vía intraperitoneal (i.p) durante 44 días posterior a la intoxicación con el fruto. Para cada uno de estos grupos se contó con sus respectivos grupos control, tal como se muestran en la tabla I.

TABLA I. Esquema de tratamientos de los grupos experimentales y los grupos control.

GRUPO	TRATAMIENTO PREVIO	INTOXICACIÓN	TRATAMIENTO POSTERIOR
AAL-Kh (n=5)	ácido α -lipoico (30 mg/Kg/día) en aceite de maíz por v.o. durante 15 días	Kh (*)	ninguno
Kh-AAL (n=5)	ninguno	Kh (*)	ácido α -lipoico (30 mg/Kg/día) en solución salina por vía i.p. durante 44 días
AM-Kh (n=5)	aceite de maíz por v.o. durante 15 días	Kh (*)	ninguno
Kh-SS (n=5)	ninguno	Kh (*)	solución salina por vía i.p. durante 44 días
AAL-A (n=5)	ácido α -lipoico (30 mg/Kg/día) en aceite de maíz por v.o. durante 15 días	no (**)	ninguno
A-AAL (n=5)	ninguno	no (**)	ácido α -lipoico (30 mg/Kg/día) en solución salina por vía i.p. durante 44 días
AM-A (n=5)	aceite de maíz por v.o. durante 15 días	no (**)	ninguno
A-SS (n=5)	ninguno	no (**)	solución salina por vía i.p. durante 44 días

(*) de acuerdo con el modelo desarrollado por Salazar y cols., 2006.

(**) los grupos que no fueron intoxicados solamente recibieron agua potable *ad libitum*.

2.7 Tratamientos.

Los animales fueron sometidos a un ayuno durante 8 h antes de administrar por v.o. la suspensión acuosa de fruto molido de *Kh*, los vehículos y el pre-tratamiento con ácido α -lipoico. Para administrar el ácido α -lipoico y el vehículo

solución salina por vía i.p., los animales no fueron sometidos al ayuno. Todos los tratamientos fueron aplicados de 3:00 a 4:00 pm.

Los grupos AAL-A y AAL-*Kh* recibieron un pre-tratamiento con ácido α -lipoico disuelto en aceite de maíz y administrado por vía oral mediante una sonda orogástrica. Se calculó la dosis según el peso del animal (30 mg/Kg/día) durante un período de 2 semanas, al término del cual se les administró el fruto molido según el modelo empleado (Salazar y cols., 2006). Los animales de los grupos AM-A y AM-*Kh* solamente recibieron el vehículo en un volumen equivalente.

Se preparó una suspensión acuosa de fruto molido de *Kh* y se administró por v.o mediante el uso de una sonda oro-gástrica los días 0, 3, 7, 10 y 14; siguiendo el modelo de intoxicación experimental ya descrito y asegurando su correcta administración. La dosis total que recibió cada uno de los animales fue de 3.5 g/Kg de peso fraccionada en 5 tomas, siendo la primera de 1.5, y las cuatro restantes de 0.5 g/Kg de peso.

Una vez terminada la administración del fruto, se inició el tratamiento por vía i.p. de 30 mg/Kg de peso por día de ácido α -lipoico; esta dosis ya ha sido utilizada en otros trabajos de experimentación y se tomó en cuenta que la dosis letal media para esta especie y por esta vía es de 200 mg/Kg.

2.8 Registro de las manifestaciones clínicas.

Se registraron diariamente las manifestaciones clínicas de los animales desde el día 0, incluyendo el peso, la presencia de pilo-erección, dificultad respiratoria, disminución de la actividad espontánea, debilidad muscular, alteraciones de la marcha, atrofia, mano en garra, deformidad espinal, secreción periocular de porfirina y ataque al estado general.

Con estos parámetros se realizó una curva de peso y las manifestaciones clínicas se reportaron mediante en una tabla con escala de cruces para comparar los grupos, en la cual (-) significa ausente, (+) presente, (++) moderado y (+++) grave.

2.9 Obtención de las muestras.

Todos los animales fueron sacrificados mediante la administración de pentobarbital sódico disuelto en solución salina; a una dosis única de 40 mg/Kg de peso por vía i.p. Se comprobó el efecto de la anestesia mediante la exploración del reflejo palpebral y doloroso en los animales y una vez ausente se procedió a realizar la disección.

Se disecaron, primero la cavidad abdominal y luego la torácica hasta exponer el corazón y los grandes vasos; se introdujo un catéter en el ventrículo izquierdo y una vez que se inició el goteo de la solución de lavado se cortó la aurícula derecha para que drenara la sangre.

La solución de lavado se preparó en 125 mL de solución salina con 50 UI de heparina y se pasó a goteo lento en aprox. 10 min. hasta que se observó que drenaba líquido cristalino y sin sangre. Luego se realizó una perfusión por la misma vía con 125 mL de una solución 1:1 de glutaraldehído al 2.5% (Apéndice B) y paraformaldehído al 4% (Apéndice C) en solución buffer de fosfatos a pH 7.2.

Una vez terminada la perfusión se obtuvieron los nervios ciáticos y safenos de ambos lados, el cerebro, el cerebelo, la médula espinal, los pulmones, el hígado y los riñones; los cuales se cortaron y fijaron en formalina amortiguada en buffer de fosfatos a pH 7.2.

2.10 Procesamiento de las muestras.

Todas las muestras fueron procesadas mediante la técnica histológica de rutina e incluidas en bloques de parafina (Apéndice D), luego se procedió a la microtomía (Apéndice E) para obtener secciones histológicas de 5, 7 y 10 μm que fueron usadas para las técnicas de tinción empleadas, tanto de rutina como especiales.

Se realizaron secciones longitudinales de los nervios periféricos de diferente grosor para cada una de las técnicas de tinción de rutina y especiales utilizadas: se obtuvieron secciones de 5 μm para realizar la tinción de rutina con hematoxilina y eosina (Apéndice H). Las secciones de 7 μm fueron teñidas mediante la técnica de Klüver y Barrera (Klüver & Barrera, 1995), la cual tiñe a las vainas de mielina en color azul (Apéndice P). Las secciones de 10 μm fueron tratadas con el método de impregnación argéntica de Marsland, Glees y Erickson (Marsland y cols., 1954), con la cual analizamos la integridad de los axones (Apéndice Q).

Para diferenciar a las diferentes poblaciones de células cebadas según el contenido de sus gránulos citoplásmicos, se realizaron las siguientes tinciones especiales: 1) azul de toluidina (Apéndice J) para visualizar las células cebadas con sus gránulos íntegros y a las desgranuladas, 2) técnica histoquímica con ácido peryódico de Schiff (Apéndice K) para visualizar a las células cebadas que contienen gránulos con mucinas neutras, 3) azul alciano-ácido peryódico de Schiff (Apéndice M) para visualizar a las células cebadas que contienen gránulos con mucinas ácidas y neutras, y 4) con azul alciano-safranina (Apéndice N) para visualizar a las células cebadas que tienen gránulos con aminas biogénicas como la histamina.

Se realizó un conteo de cada población de células presentes en el endoneurio del nervio periférico por mm^2 , las cuales fueron comparadas entre los diferentes

grupos y posteriormente sometidas a un análisis estadístico utilizando una prueba t de Student.

Se realizaron secciones histológicas de 5 μm de grosor de cerebro, cerebelo y médula espinal que fueron evaluados mediante la técnica de tinción de rutina con hematoxilina y eosina (Apéndice H).

Se obtuvieron cortes de 5 μm de grosor de pulmón, hígado y riñón fueron teñidos con hematoxilina y eosina (Apéndice H), tricrómico de Masson (Apéndice I) y mediante la técnica histoquímica de PAS con diastasa (Apéndice L). Además, se realizaron secciones de 10 μm de hígado en criostato para la aplicación de la técnica de rojo oleoso (Apéndice O) que permite la identificación de grasa.

CAPÍTULO 3.

RESULTADOS.

3.1. Manifestaciones clínicas.

El promedio de peso de las ratas de los grupos que no recibieron fruto de *Kh* (AM-A, AAL-A, A-SS y A-AAL) se mantuvo normal y no presentaron ninguna de las manifestaciones clínicas evaluadas. En la gráfica realizada con los promedios de peso se observa una curva de crecimiento normal y en ascenso desde el día 0 hasta el día 58 en estos grupos experimentales (Fig. 8). En cambio, el promedio de peso de las ratas de los grupos que recibieron fruto de *Kh* (AM-*Kh*, AAL-*Kh*, *Kh*-SS y *Kh*-AAL) descendió (Fig. 8).

Las ratas de los grupos que recibieron primero el tratamiento con ácido α -lipoico o el vehículo aceite de maíz por vía oral y después el fruto de *Kh* (AM-*Kh* y AAL-*Kh*) descendieron de peso de igual manera y no mostraron diferencia estadística significativa entre sí ($p=0.5820$). Las ratas de los grupos que recibieron primero el fruto de *Kh* y después el tratamiento con ácido α -lipoico (*Kh*-SS y *Kh*-AAL) también descendieron de peso de igual forma y no se observó diferencia estadística entre ellos ($p=0.1675$).

Todos los animales de los grupos que recibieron el fruto molido de *Kh* (AM-*Kh*, AAL-*Kh*, *Kh*-SS y *Kh*-AAL) presentaron todas las manifestaciones clínicas que se registraron (pilo-erección, dificultad respiratoria, disminución de la actividad espontánea, debilidad, alteración de la marcha, atrofia muscular, mano en garra, deformidad espinal, secreción de porfirina periocular, ataque al estado general) hasta desarrollar la parálisis (día 58) y aparecen en la Tabla II.

Como se puede observar, los grupos de ratas que no recibieron fruto molido de *Kh* (AM-A, AAL-A, A-SS y A-AAL) no presentaron las manifestaciones clínicas anteriormente mencionadas.

Como dato relevante, se puede observar que los animales que recibieron el tratamiento con ácido α -lipoico posterior a la administración de fruto de *Kh* (*Kh*-AAL) presentaron agravamiento en las siguientes manifestaciones clínicas: disminución de la actividad espontánea, debilidad, secreción de porfirina periocular y ataque al estado general.

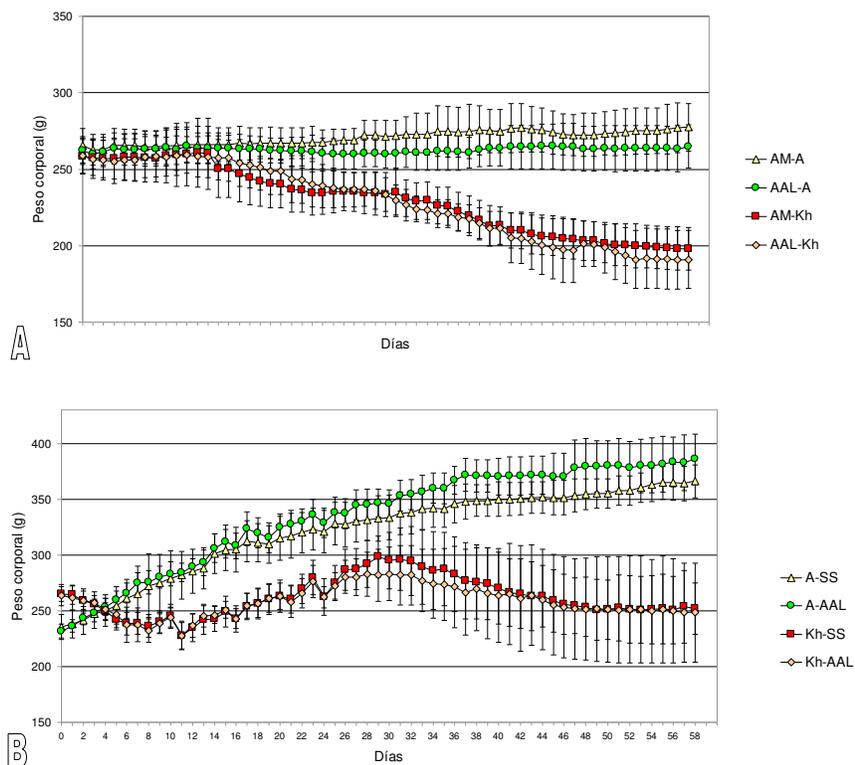


Fig. 8. A) Curvas de los promedios de peso de los grupos AAL-*Kh*, AM-*Kh*, AAL-A y AM-A con su desviación estándar, ($p=0.5820$). **B)** Promedios de peso de los grupos *Kh*-AAL, *Kh*-SS, A-AAL y A-SS con su desviación estándar, ($p=0.1675$).

Tabla II. Manifestaciones clínicas registradas en los grupos de trabajo.

Manifestaciones clínicas → ↓ Grupos	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
AAL-Kh	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kh+AAL	+	+	+++	+++	+	+	+	+	+++	+++
AM+Kh	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kh+SS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AAL-A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A-AAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AM-A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A-SS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Manifestaciones clínicas: **A)** piloerección, **B)** dificultad respiratoria, **C)** disminución de la actividad espontánea, **D)** debilidad, **E)** alteración de la marcha, **F)** atrofia muscular, **G)** mano en garra, **H)** deformidad espinal, **I)** secreción de porfirina periocular, **J)** ataque al estado general.

Escala: ausente (-), presente (+), moderada (++) y grave (+++).

3.2. Evaluación histológica del sistema nervioso central y periférico.

Se describen sólo los hallazgos de los grupos *Kh-AAL*, *Kh-SS*, *A-AAL* y *A-SS*.

3.2.1. Cerebro.

En la corteza motora se observó que los cuerpos de las neuronas de los animales de los grupos que no recibieron fruto molido de *Kh* (*A-SS* y *A-AAL*) mostraron un aspecto normal. Se observaron los núcleos eucromáticos, con nucléolos prominentes y citoplasma con grumos basófilos (sustancia de Nissl) regularmente distribuidos (Fig. 9A y 9B). En cambio, las neuronas de la corteza

cerebral de los animales de los grupos que recibieron fruto de *Kh* (*Kh*-SS y *Kh*-AAL) presentaron retracción del cuerpo, hiper cromasia de citoplasma y picnosis nuclear (Fig. 9C y 9D).

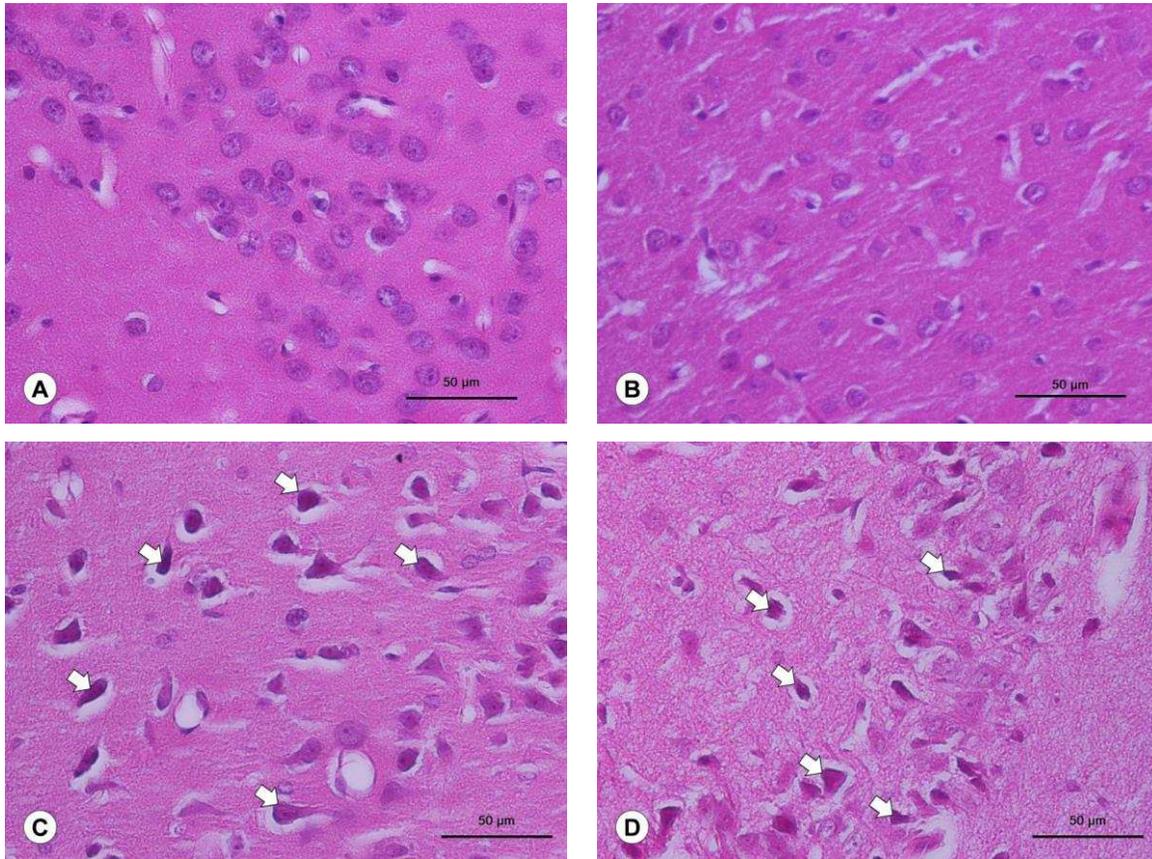


Figura 9. **A)** Corteza motora de cerebro de rata del grupo A-SS. Se observan los cuerpos neuronales de tamaño y aspecto normales. **B)** Corteza motora de cerebro de rata del grupo A-AAL. Los cuerpos neuronales muestran un tamaño y aspecto normales. **C)** Corteza motora de cerebro de rata del grupo *Kh*-SS. Se observa retracción del cuerpo de las neuronas, hiper cromasia de citoplasma y picnosis nuclear (flechas). **D)** Corteza motora de cerebro de rata del grupo *Kh*-AAL. Se observa retracción del cuerpo de las neuronas, además de hiper cromasia del citoplasma y picnosis nuclear (flechas). Cortes de 5 µm de espesor, teñidos con H&E, 40x.

3.2.2. Cerebelo.

El cerebelo de los grupos que no recibieron fruto de *Kh* (A-SS y A-AAL) se observaron las capas: molecular, de neuronas de Purkinje y granulosa de aspecto normal. Además, en la capa granulosa se observaron neuronas de cuerpo ovoide y voluminoso, de características similares a las neuronas de Purkinje. Se observó que estas neuronas también presentaron aspecto normal (Fig. 10A y 10B).

Por el contrario, en el cerebelo de los animales de los grupos que recibieron fruto de *Kh* (*Kh*-SS y *Kh*-AAL) se observó retracción del cuerpo de las neuronas, con hipercromasia del citoplasma y picnosis nuclear. Esta lesión fue más evidente en las neuronas de Purkinje y en las neuronas de cuerpo grande localizadas en la capa granulosa (Fig. 10C y 10D).

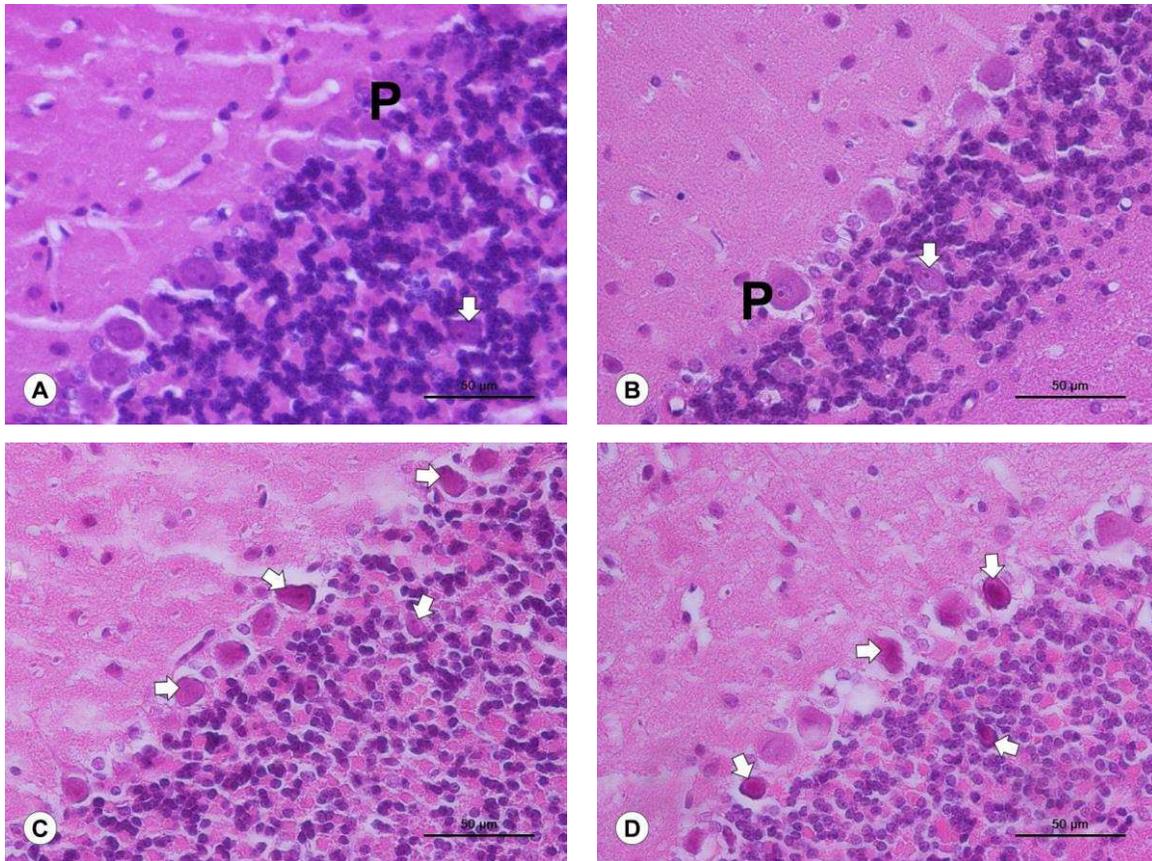


Figura 10. **A)** Corteza de cerebelo de rata del grupo A-SS. Se observan los cuerpos neuronales de tamaño y aspecto normal. Nótese el aspecto normal de las neuronas de Purkinje (P) y de las neuronas grandes presentes en la capa granulosa (flecha). **B)** Corteza de cerebelo de rata del grupo A-AAL. Los cuerpos de las neuronas de Purkinje (P) y de la capa granulosa (flecha) muestran un tamaño y aspecto normales. **C)** Corteza de cerebelo de rata del grupo *Kh*-SS. Se observan las neuronas de Purkinje y las neuronas grandes de la capa granulosa con retracción del cuerpo, hiper cromasia de citoplasma y picnosis nuclear (flechas). **D)** Corteza de cerebelo de rata del grupo *Kh*-AAL. Se observa una notoria retracción del cuerpo de las neuronas de Purkinje y de las neuronas grandes presentes en la capa granulosa, hiper cromasia del citoplasma y picnosis nuclear (flechas). Cortes de 5 µm de espesor, teñidos con H&E, 40x.

3.2.3. Médula espinal.

En los cortes de la médula espinal de los grupos que no recibieron fruto molido de *Kh* (A-SS y A-AAL), se observaron los cuerpos de las neuronas motoras del asta anterior de aspecto normal (Fig. 11A y 11B). En los grupos que recibieron fruto de *Kh* (*Kh*-SS y *Kh*-AAL) se observaron cuerpos neuronales con retracción, hiper cromasia del citoplasma y picnosis nuclear (Fig. 11C y 11D).

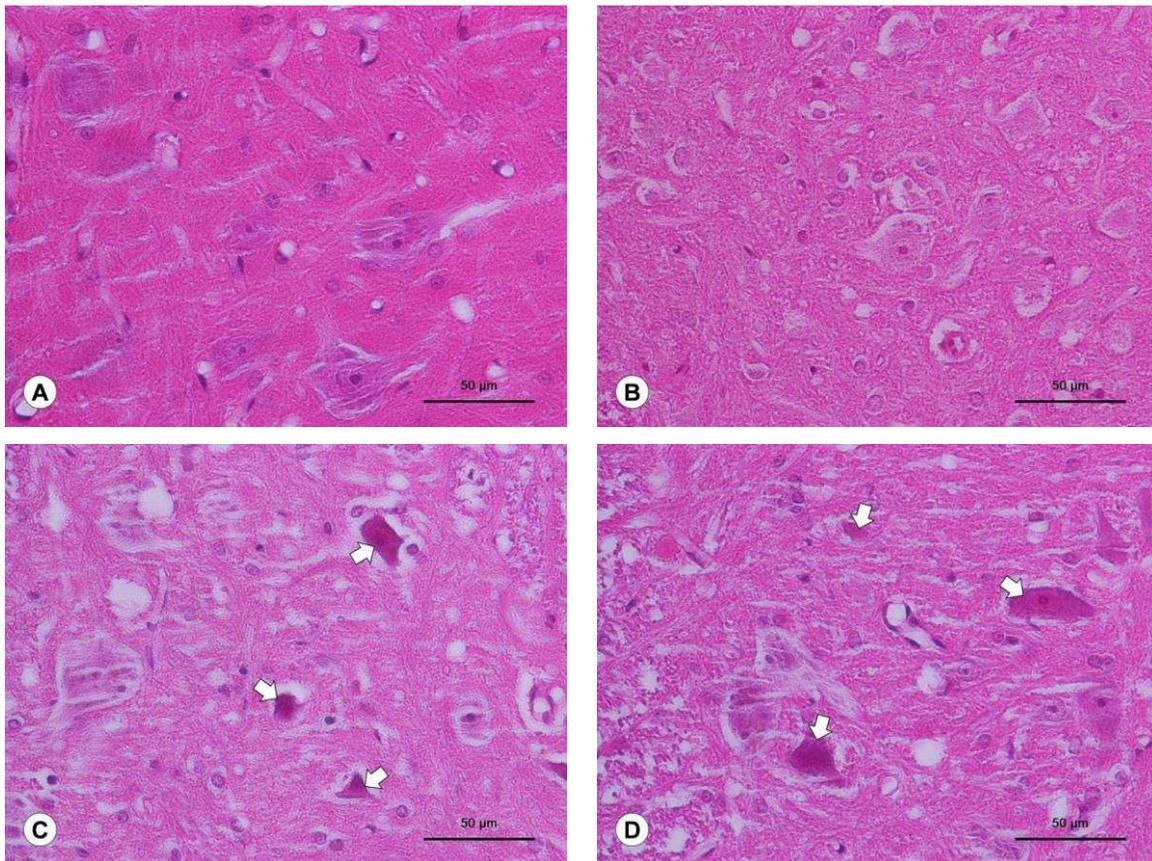


Figura 11. **A)** Asta anterior de la médula espinal de rata del grupo A-SS. Se observan los cuerpos neuronales de tamaño y aspecto normal. **B)** Asta anterior de médula espinal de rata del grupo A-AAL. Los cuerpos de las neuronas muestran un tamaño y aspecto normales. **C)** Neuronas motoras del asta anterior de la médula espinal de rata del grupo *Kh*-SS. Se observa retracción del cuerpo neuronal, hiper cromasia de citoplasma y picnosis nuclear (flechas). **D)** Asta anterior de médula espinal de rata del grupo *Kh*-AAL. Se observa también la retracción del cuerpo de las neuronas, además de la hiper cromasia del citoplasma y picnosis nuclear (flechas). Cortes de 5 µm de espesor, teñidos con H&E, 40x.

3.2.4. Nervio periférico.

En las preparaciones histológicas de nervio periférico de los grupos que no recibieron fruto de *Kh* (A-AAL y A-SS), las fibras nerviosas presentaron grosor y trayecto regulares (Fig. 12A y 12B). En los nervios periféricos de los grupos que recibieron *Kh* (*Kh*-SS y *Kh*-AAL), se observó vacuolización en algunos segmentos de las fibras nerviosas (Fig. 12C y 12D).

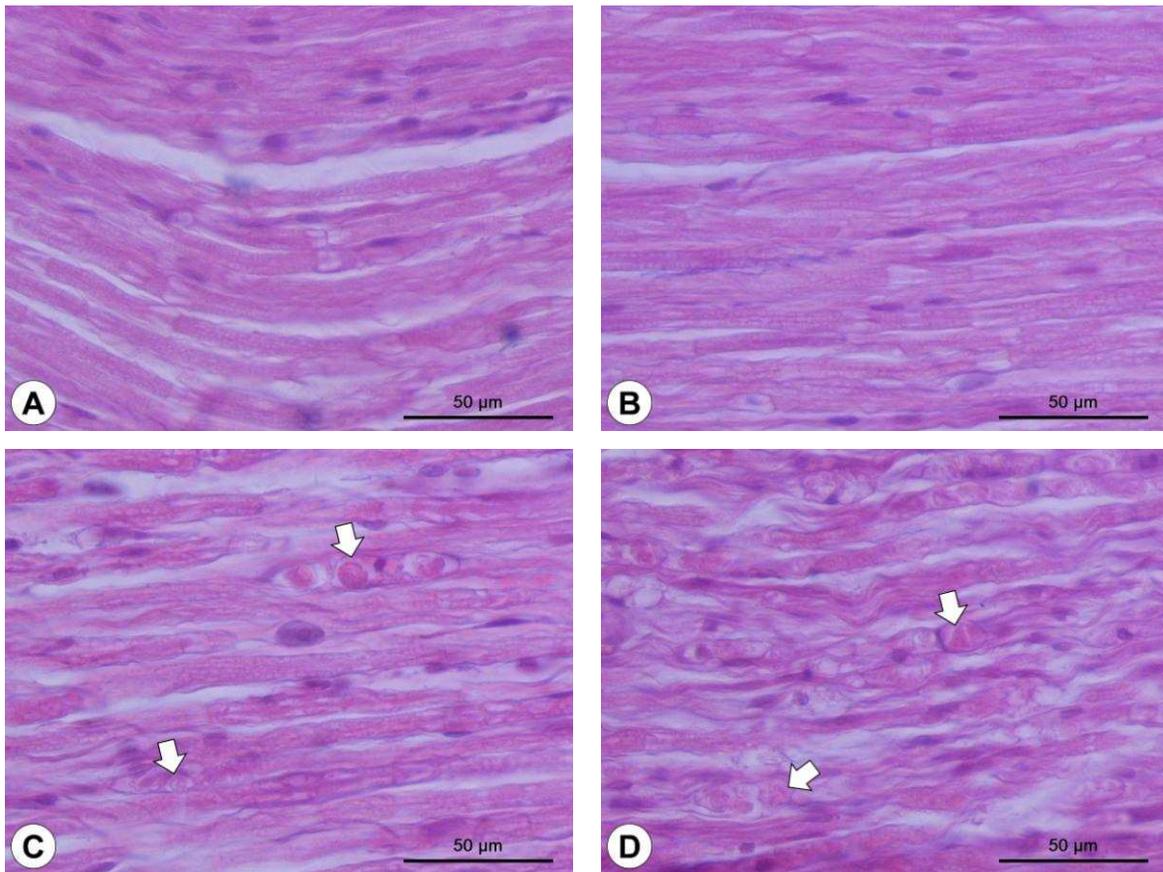


Figura 12. **A)** Nervio periférico de rata del grupo A-SS. Se observan las fibras nerviosas de trayecto y aspecto normales. **B)** Nervio periférico de rata del grupo A-AAL. Las fibras nerviosas muestran un trayecto y aspecto normales. **C)** Nervio de rata del grupo *Kh*-SS. Se observan fibras nerviosas con aspecto vacuolado y la presencia de material eosinofílico en el interior de algunos segmentos (flechas). **D)** Nervio periférico de rata del grupo *Kh*-AAL. Se observan irregularidades en el trayecto de las fibras nerviosas, con aspecto vacuolado y la presencia de material eosinofílico en algunos segmentos (flechas). Cortes de 5 µm de espesor, teñidos con H&E, 40x.

En las preparaciones de nervio periférico de los grupos que recibieron fruto de *Kh* (*Kh*-AAL y *Kh*-SS) teñidas mediante el método de Klüver y Barrera, se observaron segmentos con áreas desprovistas de mielina y que corresponden a una desmielinización segmentaria (Fig. 13C y 13D). En estas preparaciones también se observó la presencia de macrófagos por dentro del endoneurio y un aparente incremento de células cebadas, las cuales posteriormente fueron cuantificadas. En los nervios periféricos de los grupos que no recibieron fruto de *Kh* (A-AAL y A-SS) se observaron las vainas de mielina de un aspecto normal (Fig. 13A y 13B).

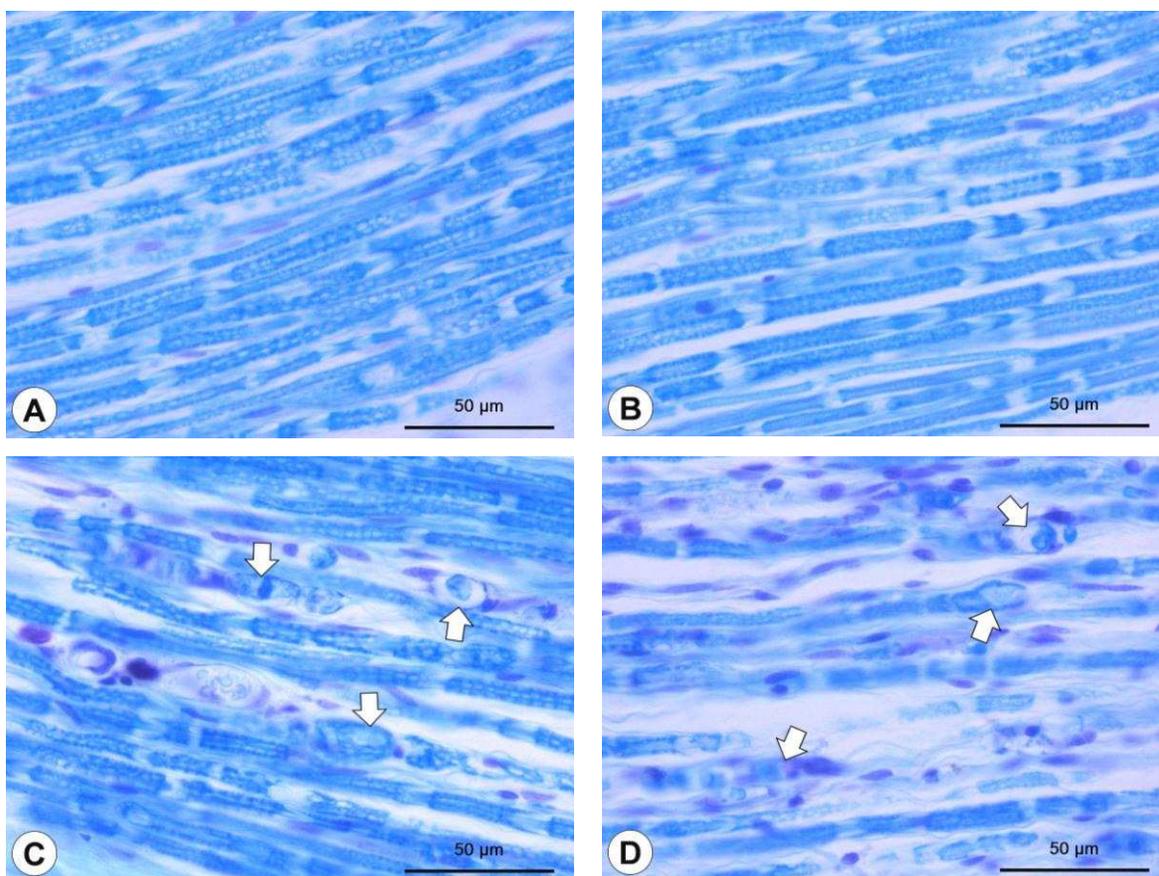


Figura 13. **A)** Nervio periférico de rata del grupo A-SS. Se observan las vainas de mielina de aspecto normal. **B)** Nervio periférico de rata del grupo A-AAL. Se observa también las vainas de mielina de aspecto normal. **C)** Nervio de rata del grupo *Kh*-SS. Se observa fragmentación de las vainas de mielina con presencia de macrófagos adentro del endoneurio (flechas). **D)** Nervio periférico de rata del grupo *Kh*-AAL. Se observa desmielinización segmentaria con presencia de fragmentación de las

vainas de mielina y algunos macrófagos adentro del endoneurio (flechas). Cortes de 7 μm de espesor, teñidos mediante la técnica de Klüver & Barrera, 40x.

En las preparaciones de nervio periférico impregnadas con plata mediante la técnica de Marsland, Glees y Erickson se observó degeneración Walleriana en los grupos que recibieron fruto de *Kh* (*Kh*-AAL y *Kh*-SS). En estas preparaciones se puede observar la coexistencia de segmentos engrosados y adelgazados en un mismo axón, que le da un aspecto tortuoso al trayecto de los mismos (Fig. 14C y 14D). Los axones en las preparaciones histológicas de los grupos que no recibieron fruto de *Kh* (A-AAL y A-SS) mostraron aspecto y grosor normales (Fig. 14A y 14B).

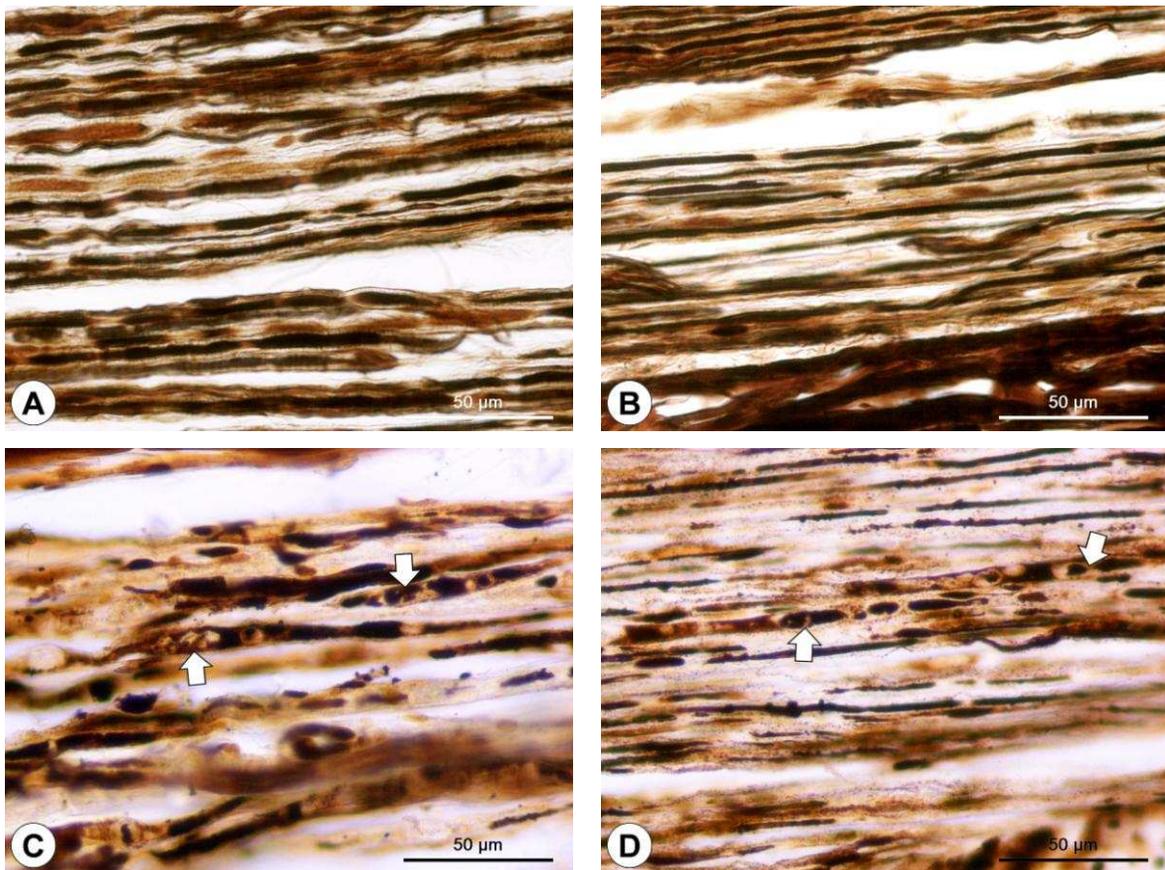


Figura 14. **A)** Nervio periférico de rata del grupo A-SS. Se observan los axones de grosor y aspecto normal. **B)** Nervio periférico de rata del grupo A-AAL. Se observa también el grosor y aspecto normal de los axones. **C)** Nervio de rata del grupo *Kh*-SS. Se observa la coexistencia de segmentos adelgazados y engrosados de los axones acompañados de vacuolización, que corresponde a

degeneración Walleriana (flechas). **D)** Nervio periférico de rata del grupo *Kh*-AAL. Se observa degeneración Walleriana en los axones (flechas). Cortes de 10 μm de espesor, impregnadas con plata, mediante la técnica de Marsland, Glees & Erickson, 40x.

Para contabilizar el total de células cebadas presentes en el endoneurio de los nervios periféricos se utilizaron preparaciones teñidas con azul de toluidina y para contabilizar las diferentes poblaciones de células cebadas según el contenido de sus gránulos se usaron: la técnica histoquímica con el ácido peryódico de Schiff, la técnica con azul alciano y ácido peryódico de Schiff y la técnica con azul alciano y safranina (Fig. 15-17).

En los cortes de nervio periférico teñidos con azul de toluidina se obtuvieron los siguientes promedios: 25.2 ± 1.3 en el grupo *Kh*-AAL, en el grupo *Kh*-SS fue de 33.2 ± 5.5 , en el grupo A-AAL fue de 31.8 ± 3.9 y en el grupo A-SS fue de 21.6 ± 4.2 células cebadas por mm^2 . El promedio de células desgranuladas fue de 4.5 ± 0.9 , 6.3 ± 1.7 , 9.4 ± 3.5 y 5.8 ± 1.3 respectivamente (Fig. 16).

En los cortes de nervio periférico teñidos con la técnica de PAS se obtuvieron los siguientes promedios: 9.6 ± 4.8 en el grupo *Kh*-AAL, en el grupo *Kh*-SS fue de 9.1 ± 2 , en el grupo A-AAL fue de 8.1 ± 3.3 y en el grupo A-SS fue de 5.8 ± 3.5 células cebadas por mm^2 (Fig. 16).

En los cortes de nervio periférico teñidos con la técnica de azul alciano y ácido peryódico de Schiff se obtuvieron los siguientes promedios: 7.9 ± 2.3 en el grupo *Kh*-AAL, en el grupo *Kh*-SS fue de 6.2 ± 1.5 , en el grupo A-AAL fue de 8.4 ± 3 y en el grupo A-SS fue de 4.3 ± 2.6 células cebadas por mm^2 (Fig. 16).

En los cortes de nervio periférico teñidos con la técnica de azul alciano y safranina se obtuvieron los siguientes promedios: 7 ± 1.8 en el grupo *Kh*-AAL, en el grupo *Kh*-SS fue de 5.8 ± 1.1 , en el grupo A-AAL fue de 8.9 ± 5.3 y en el grupo A-SS fue de 5.8 ± 1.6 células cebadas por mm^2 (Fig. 16).

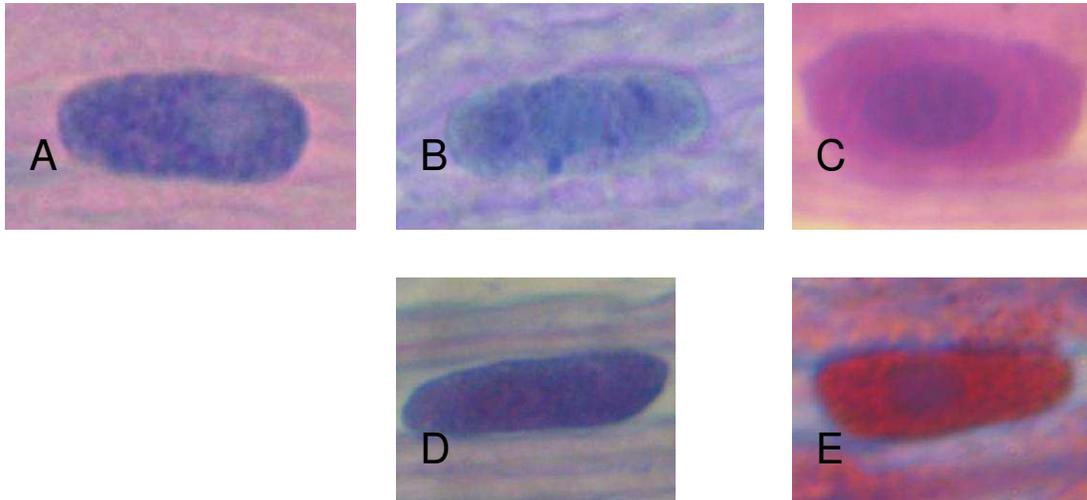


Figura 15. A) Célula cebada presente en nervio periférico teñida con azul de toluidina que demuestra en color morado los gránulos presentes. **B)** Célula cebada desgranulada teñida con azul de toluidina. **C)** Célula cebada positiva a la técnica histoquímica con el ácido peryódico de Schiff que indica la presencia de gránulos con mucinas neutras en color magenta. **D)** Célula cebada con tinción positiva a la técnica con azul alciano y ácido peryódico de Schiff que permite visualizar la población de células cebadas con gránulos que contienen mucinas ácidas y neutras. **E)** Célula cebada positiva a la tinción con azul alciano y safranina que permitió visualizar el contenido de aminas biogénicas como la histamina dentro de los gránulos secretorios de estas células. Células observadas con el objetivo 100x.

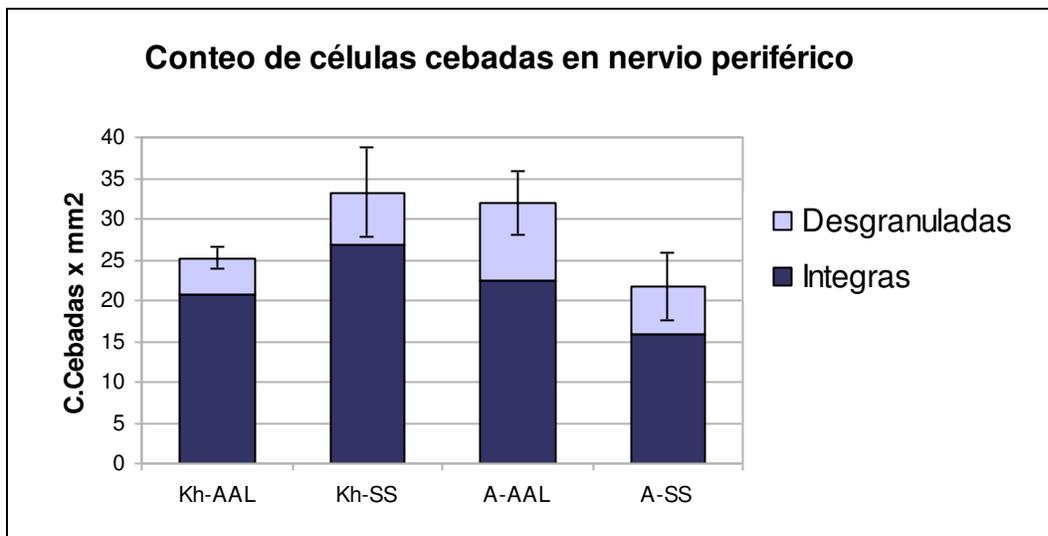


Figura 16. Células cebadas totales por mm² en nervio periférico de rata teñido con azul de toluidina. Cada barra representa el promedio de 5 conteos de células cebadas de cada grupo y sus respectivas desviaciones estándar. En azul oscuro se muestra el promedio de células cebadas íntegras no desgranuladas y en color azul claro las células cebadas desgranuladas. No se encontró diferencia estadística significativa entre los grupos *Kh-ALA* y *Kh-SS* ($p=0.1654$).

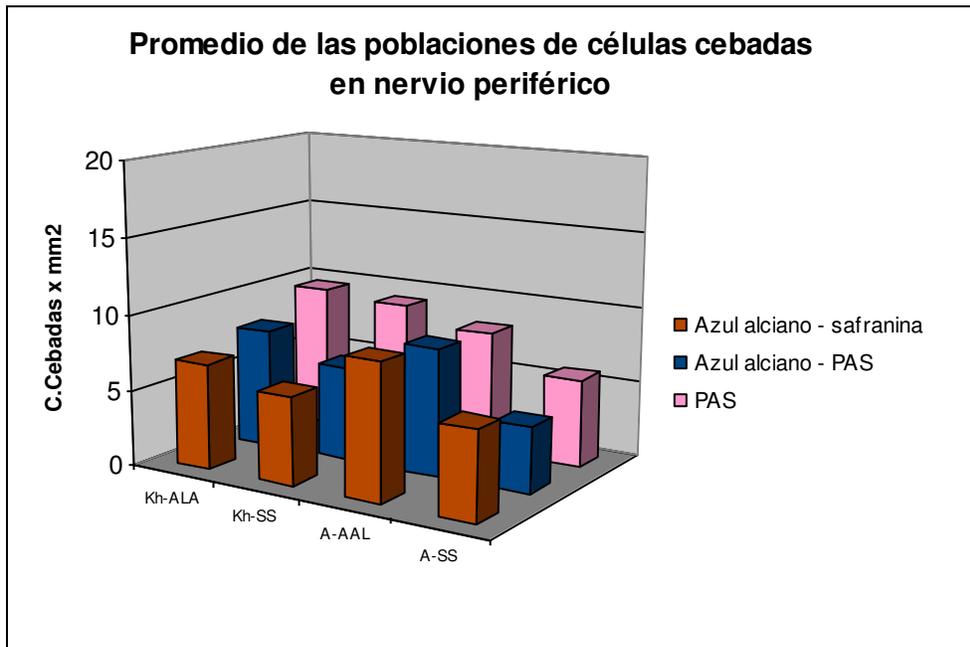


Figura 17. Conteo de las poblaciones de células cebadas con gránulos positivos a las tinciones especiales en nervio periférico de rata. Cada barra representa el promedio de 5 conteos por mm^2 . No se encontró diferencia estadística significativa entre los grupos *Kh-AAL* y *Kh-SS* tal y como lo indica el resultado de *p* en cada caso. **A)** En color magenta se muestran las barras de la población de células con gránulos positivos para la tinción con PAS ($p=0.8402$). **B)** En color azul las barras que corresponden a las células cebadas positivas a la tinción con azul alciano y PAS ($p=0.2143$). **C)** En color rojo se muestra las barras que corresponden al promedio de células cebadas con gránulos positivos a la tinción con azul alciano y safranina ($p=0.2542$).

3.3. Evaluación histológica de pulmón.

Los grupos que no recibieron fruto de *Kh* (A-SS y A-AAL) no mostraron daño en pulmón (Fig. 18A y 18B). En los cortes de los grupos que recibieron *Kh* (*Kh*-SS y *Kh*-AAL) se observó engrosamiento de los tabiques inter-alveolares debido a la presencia de células mononucleares y algunos neutrófilos, así como por congestión vascular (Fig. 18C y 18D). En algunas áreas se observó la presencia de abundantes macrófagos alveolares.

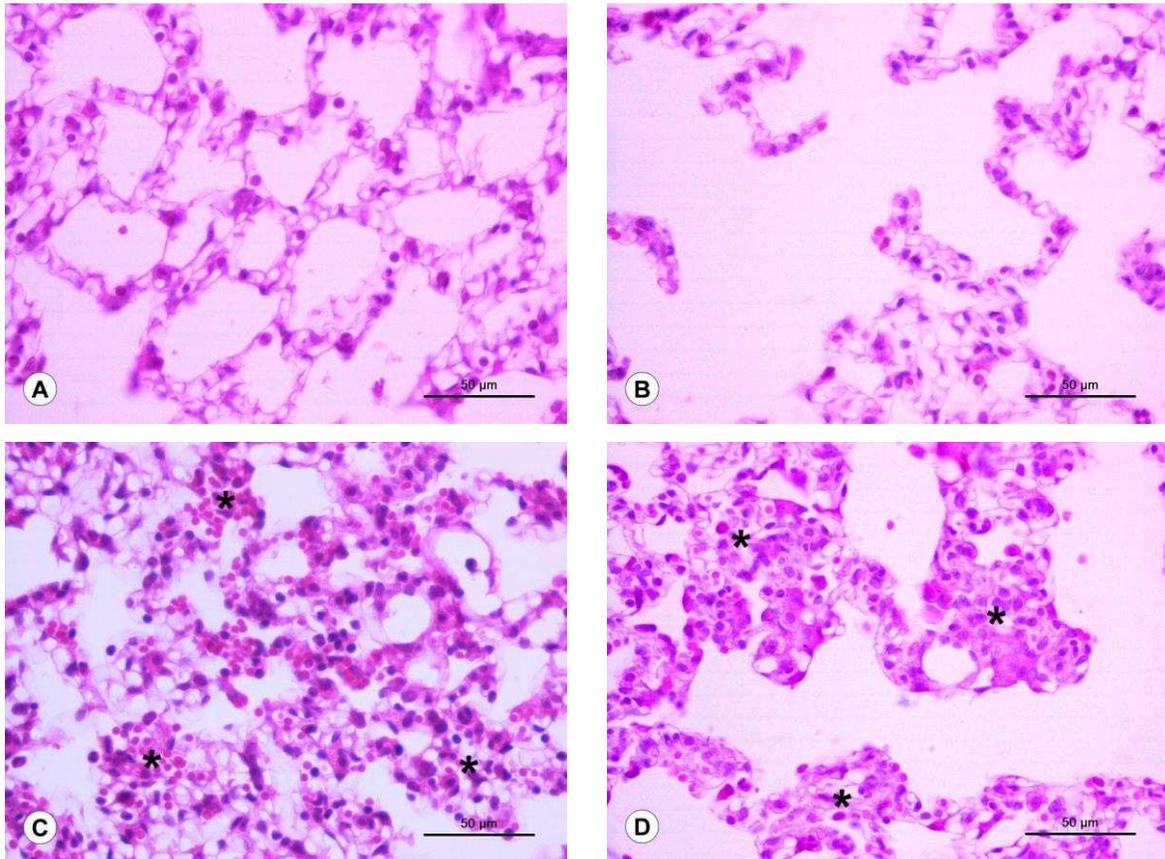


Figura 18. **A)** Pulmón de rata del grupo A-SS. Se observan los tabiques inter-alveolares y los espacios aéreos de aspecto normal. **B)** Pulmón de rata del grupo A-AAL. Los tabiques inter-alveolares y el espacio aéreo se observan de aspecto normales. **C)** Pulmón de rata del grupo *Kh*-SS. Se observa engrosamiento de los tabiques inter-alveolares, congestión vascular y presencia de células inflamatorias (*). **D)** Pulmón de rata del grupo *Kh*-AAL. Se observa engrosamiento de los tabiques inter-alveolares. Cortes de 5 µm de espesor, teñidas con H&E, 40x.

3.4. Evaluación histológica de hígado.

El hígado de las ratas de los grupos que no recibieron *Kh* (A-SS y A-AAL) mostró aspecto normal caracterizado por las láminas de hepatocitos de aspecto radiado y ramificado alrededor de la vena central, sinusoides de grosor uniforme (Fig. 19A y 19B) y espacios porta de aspecto normal. En las preparaciones histológicas de hígado de los grupos que recibieron *Kh* (*Kh*-SS y *Kh*-AAL) se observaron hepatocitos con vacuolización en el citoplasma característico de esteatosis (Fig. 19C y 19D). Para comprobar la presencia de esteatosis se realizó la técnica de coloración con rojo oleoso en cortes por congelación (Fig. 20C y 20D). Además, se observó necrosis hepática focal caracterizada por hepatocitos con citoplasma y núcleos pálidos (Fig. 19C y 19D), en otras áreas se observaron hepatocitos con citoplasma hiperpigmentado y picnosis nuclear. En algunas áreas se observó dilatación de los sinusoides (Fig. 20C y 20D).

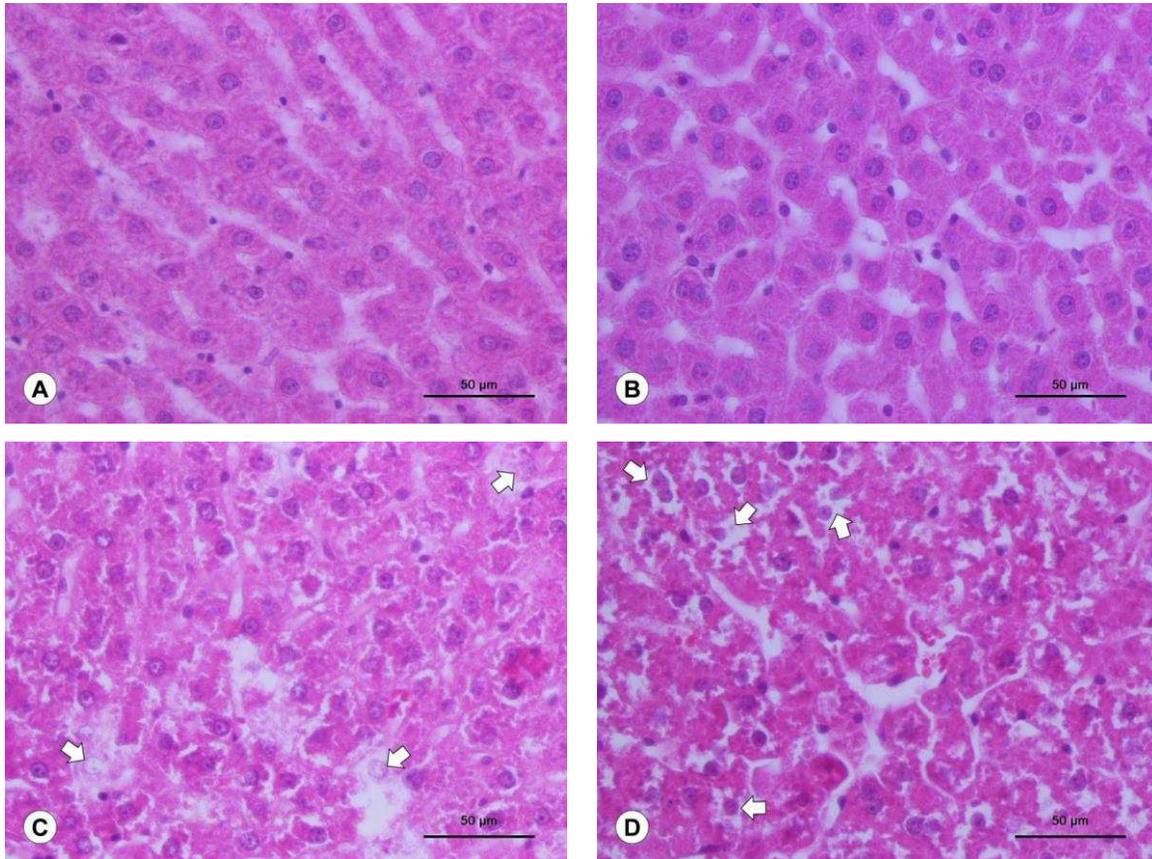


Figura 19. **A)** Hígado de rata del grupo A-SS. Se observan las láminas de hepatocitos y sinusoides de aspecto normales. **B)** Hígado de rata del grupo A-AAL. Se observan también las láminas de hepatocitos y sinusoides de aspecto normal. **C)** Hígado de rata del grupo *Kh*-SS. Se observa necrosis de hepatocitos, caracterizada por palidez de núcleo y citoplasma (flechas). **D)** Hígado de rata del grupo *Kh*-AAL. Se observan hepatocitos con vacuolización del citoplasma (flechas). Cortes histológicos de 5 µm de espesor, teñidos con H&E, 40x.

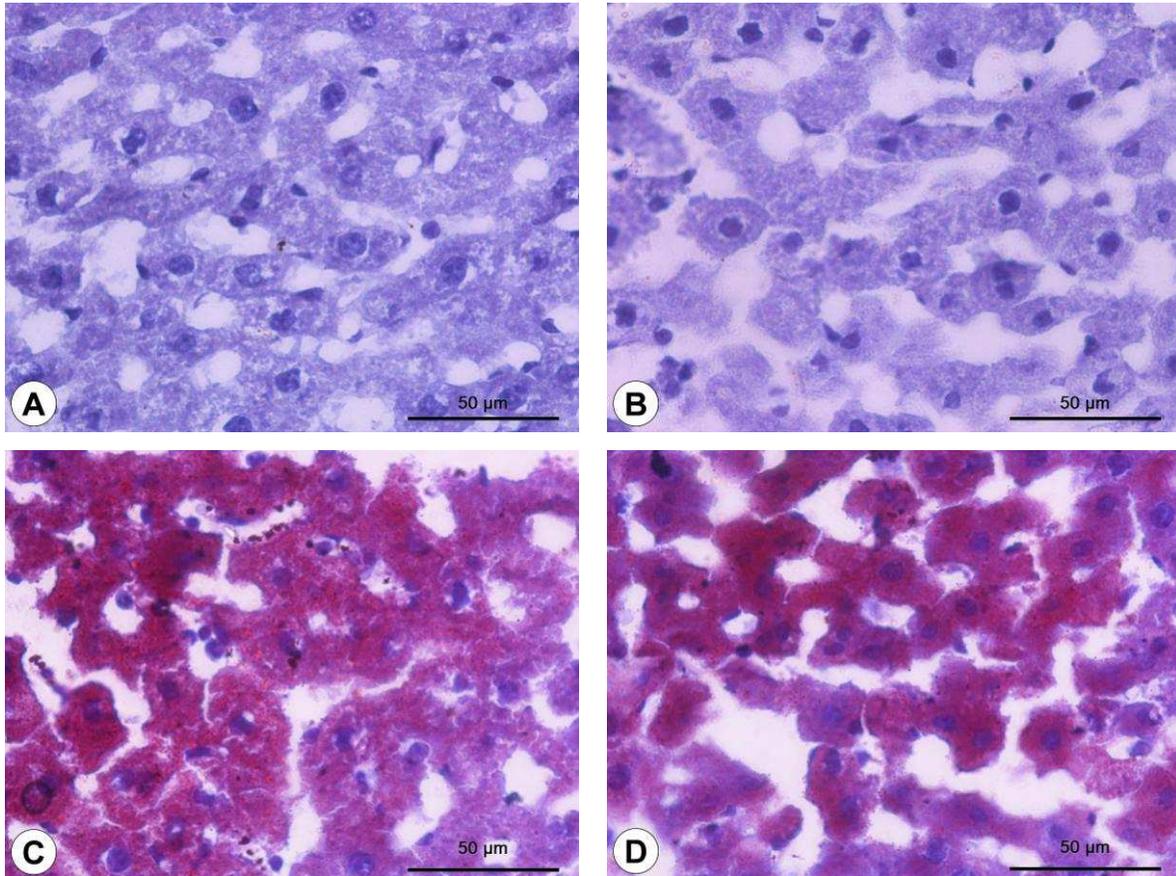


Figura 20. **A)** Hígado de rata del grupo A-SS. Se observan las láminas de hepatocitos de aspecto normal y con tinción negativa al colorante rojo oleoso. **B)** Hígado de rata del grupo A-AAL. Se observan también las láminas de hepatocitos de aspecto normal y sin coloración positiva al rojo oleoso. **C)** Hígado de rata del grupo *Kh*-SS. Se observa que el citoplasma de los hepatocitos muestra coloración positiva al rojo oleoso. **D)** Hígado de rata del grupo *Kh*-AAL. Se observa coloración positiva al rojo oleoso en los hepatocitos. Cortes de 10 µm de espesor, teñidos con la técnica de rojo oleoso y contrastados con hematoxilina de Gill, 40x.

3.5. Evaluación histológica de riñón.

El riñón de ratas de los grupos que no recibieron fruto de *Kh* (A-SS y A-AAL) mostró aspecto normal. En la corteza, se evaluaron los glomérulos conformados por su cápsula de Bowman y capilares (Fig. 17A y 17B), los cuales se observaron de aspecto normal. Además, se revisó el epitelio de los túbulos proximales y distales (Fig. 18A y 18B), los cuales presentaron su epitelio de aspecto normal. En la médula, se observó el epitelio de las asas de Henle y túbulos colectores con su epitelio de aspecto normal (Fig. 19A y 19B).

En las preparaciones histológicas de riñón de los grupos que recibieron fruto de *Kh* (*Kh*-SS y *Kh*-AAL) teñidas con H&E se observaron lesiones focales en la corteza caracterizadas por la presencia de glomérulos retraídos, congestión vascular e infiltrado inflamatorio mononuclear de aspecto linfocitario en el intersticio que rodea a la cápsula de Bowman (Fig. 21C y 21D). En las células epiteliales de los túbulos proximales y distales se observó vacuolización y necrosis. Los túbulos proximales y distales presentaron pérdida de sus microvellosidades y material hialino en la luz de los mismos (Fig. 22C y 22D). En la médula renal se observó vacuolización de las células epiteliales, tanto en las asas de Henle como en los túbulos colectores, así como presencia de material hialino en la luz de los mismos (Fig. 23C y 23D).

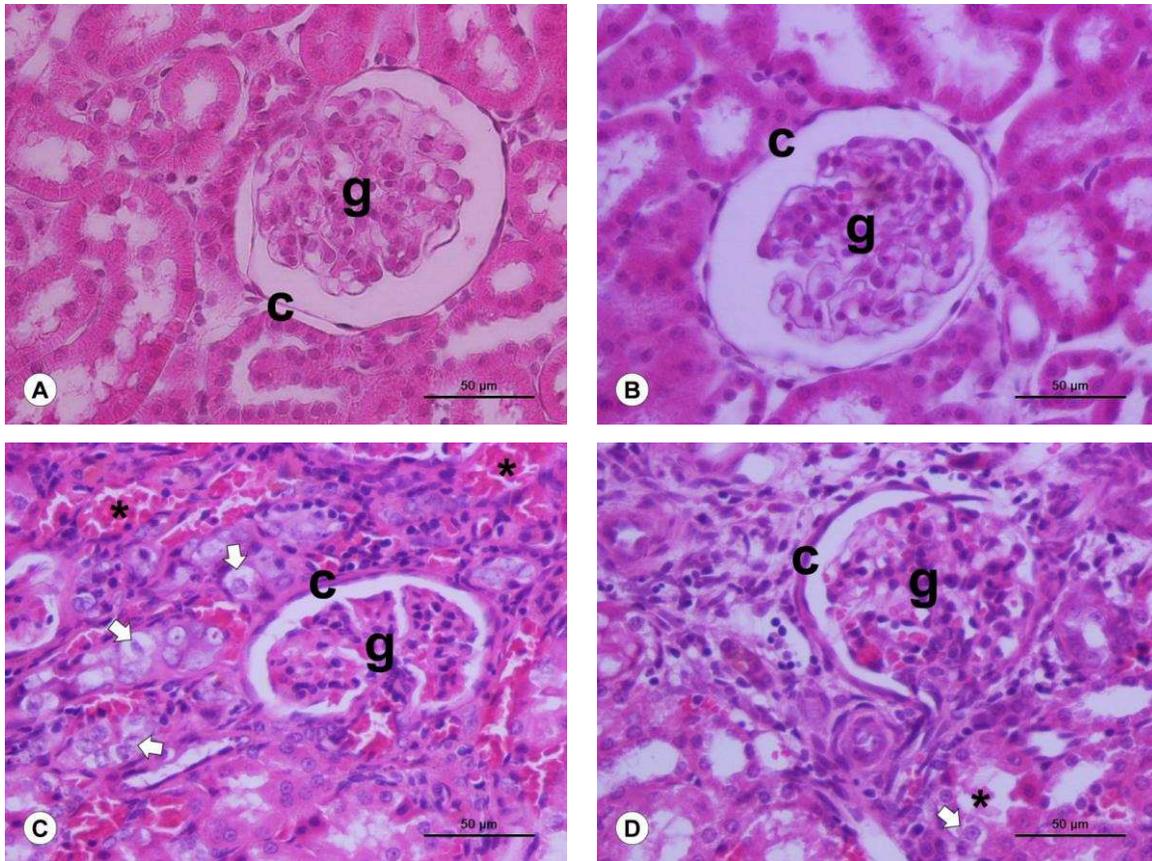


Figura 21. A) Corteza renal de rata del grupo A-SS. Se observan la cápsula de Bowman (c) y los capilares glomerulares (g) de aspecto normal. **B)** Corteza renal de rata del grupo A-AAL. La cápsula de Bowman (c) y los capilares glomerulares (g) muestran un aspecto normal. **C)** Corteza renal de rata del grupo *Kh*-SS. Se observa engrosamiento de la cápsula de Bowman (c), infiltrado inflamatorio mononuclear en la periferia de la misma, retracción glomerular (g), vacuolización de las células epiteliales de los túbulos contorneados (flechas) y congestión vascular (*). **D)** Corteza renal de rata del grupo *Kh*-AAL. Se observa engrosamiento de la cápsula de Bowman (c), infiltrado inflamatorio en el intersticio que la rodea, vacuolización epitelial de los túbulos contorneados (flecha), además de la presencia de material hialino en la luz (*). Cortes de 5 µm de espesor, teñidos con H&E, 40x.

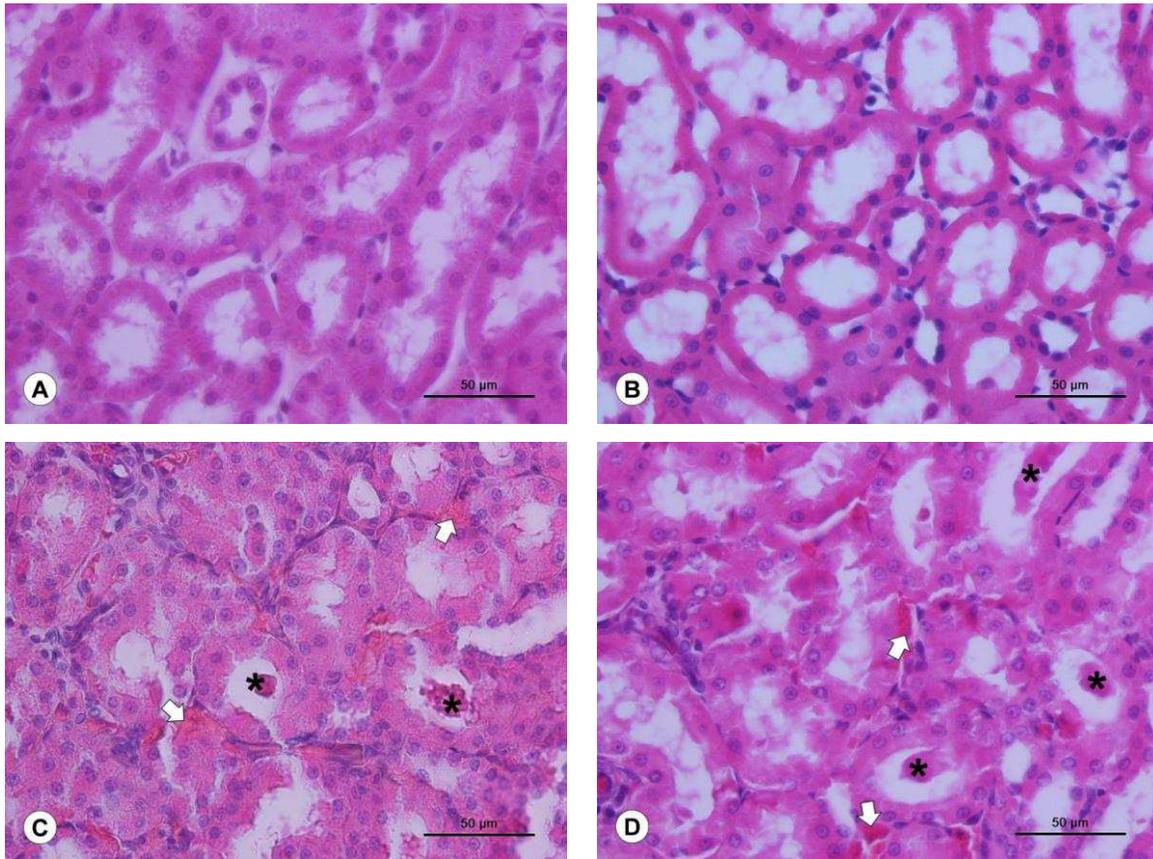


Figura 22. **A)** Corteza renal de rata del grupo A-SS. Se observa el epitelio de los túbulos contorneados de aspecto normal. **B)** Corteza renal de rata del grupo A-AAL. Se observa el epitelio de los túbulos contorneados de aspecto normal. **C)** Corteza renal de rata del grupo *Kh*-SS. Se observa material hialino en la luz de los túbulos contorneados (*) y congestión vascular (flechas). **D)** Corteza renal de rata del grupo *Kh*-AAL. Se observa la presencia de material hialino en la luz de los túbulos contorneados (*) y congestión vascular (flechas). Cortes de 5 µm de espesor, teñidos con H&E, 40x.

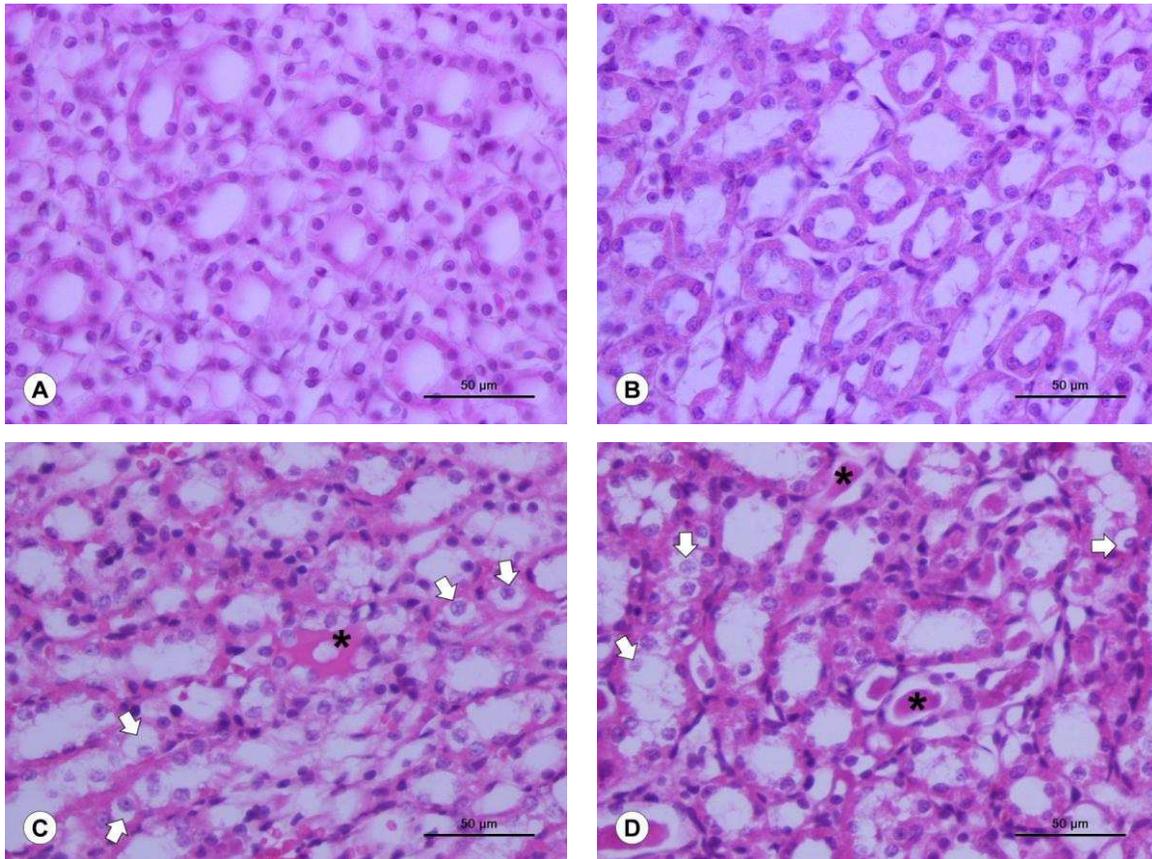


Figura 23. **A)** Médula renal de rata del grupo A-SS. Se observa el epitelio de las asas de Henle y túbulo colectores de aspecto normal. **B)** Médula renal de rata del grupo A-AAL. Se observan las asas de Henle y túbulo colectores de aspecto normal. **C)** Médula renal de rata del grupo *Kh*-SS. Se observa vacuolización del epitelio en los túbulo colectores y asas de Henle (flechas), además la presencia de material hialino en la luz de los mismos (*). **D)** Médula renal de rata del grupo *Kh*-AAL. Se observa vacuolización en el epitelio de los túbulo colectores y asas de Henle (flechas) y presencia de material hialino en la luz (*). Cortes de 5 µm de espesor, teñidos con H&E, 40x.

En riñón de ratas de los grupos que recibieron *Kh* (*Kh*-AAL y *Kh*-SS) teñidos con tricrómico de Masson se observó la presencia de fibrosis glomerular fuera de la cápsula de Bowman (Fig. 24C y 24D). Además en las preparaciones que fueron tratadas mediante la reacción histoquímica de PAS se observó en los glomérulos un engrosamiento de la membrana basal que rodea a la cápsula de Bowman (Fig. 25C y

25D), además se observaron áreas con material hialino en la luz de los túbulos renales y reacción positiva a esta técnica histoquímica.

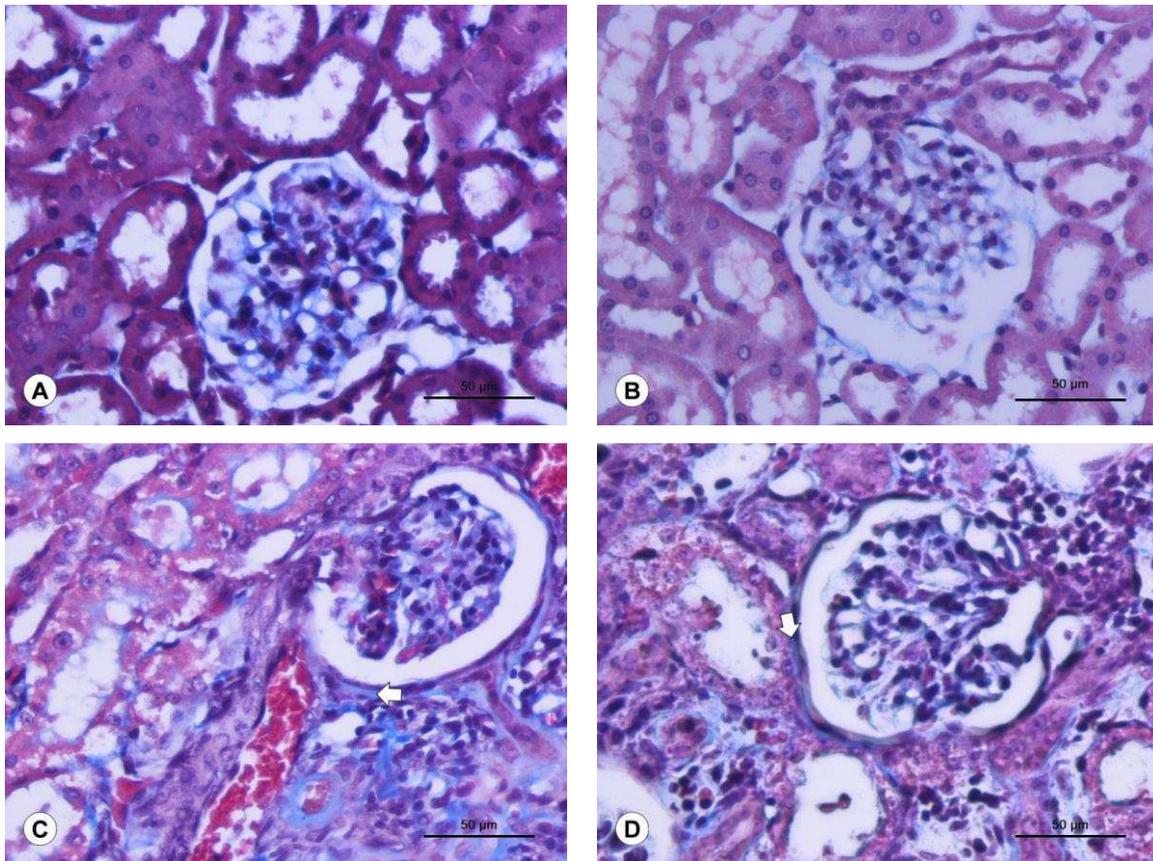


Figura 24. **A)** Corteza renal de rata del grupo A-SS. Se observan la cápsula de Bowman y el intersticio renal de aspecto normal. **B)** Corteza renal de rata del grupo A-AAL. La cápsula de Bowman y el intersticio muestran un aspecto normal. **C)** Corteza renal de rata del grupo *Kh*-SS. Se observa fibrosis en la parte exterior de la cápsula de Bowman (flecha). **D)** Corteza renal de rata del grupo *Kh*-AAL. Se observa la presencia de fibrosis en la periferia de la cápsula de Bowman. Cortes de 5 µm de espesor, teñidos mediante la técnica de tricrómico de Masson, 40x.

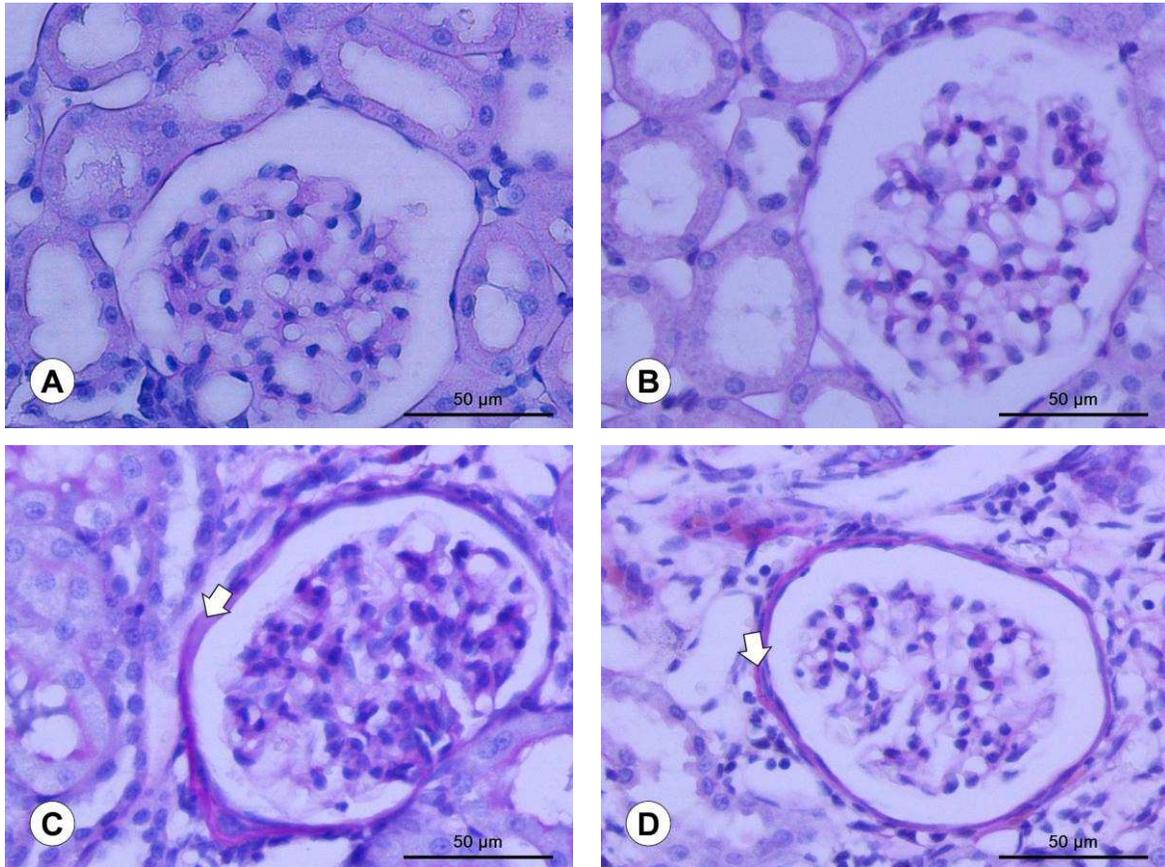


Figura 25. **A)** Corteza renal de rata del grupo A-SS. Se observa la membrana basal de la cápsula de Bowman de aspecto normal. **B)** Corteza renal de rata del grupo A-AAL. La membrana basal de la cápsula de Bowman presenta un aspecto normal. **C)** Corteza renal de rata del grupo *Kh*-SS. Se observa engrosamiento de la membrana basal de la cápsula de Bowman (flecha). **D)** Corteza renal de rata del grupo *Kh*-AAL. Se observa engrosamiento de la membrana basal de la cápsula de Bowman (flecha). Cortes de 5 µm de espesor, reacción histoquímica de PAS, 40x.

CAPÍTULO 4.

DISCUSIÓN.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se rechaza la hipótesis planteada, por lo que; el tratamiento con ácido α -lipoico no tiene un efecto favorable sobre las manifestaciones clínicas ni sobre las lesiones histológicas causadas por la intoxicación con el fruto de la *Karwinskia humboldtiana* (*Kh*).

Para realizar este trabajo se consideraron los siguientes antecedentes; el estudio *in vitro* (Garza y cols., 2003), en el que se muestra un incremento en la producción de radicales libres causado por T-514 en células en cultivo y la efectividad del ácido α -lipoico tanto en modelos de neuropatía diabética (Manda y cols., 2007; Pitel y cols., 2007), así como en la aplicación terapéutica en pacientes con neuropatía diabética (Ziegler y cols., 1999; Ziegler y cols., 2006). Esto hace suponer que el uso de un potente antioxidante como el ácido α -lipoico tendría un efecto favorable en la recuperación de esta intoxicación dada la semejanza histológica entre estas neuropatías (Fahim y cols., 2000; Salazar y cols., 2006).

En el presente trabajo, se administró ácido α -lipoico antes y después de la administración de fruto molido de *Kh*. Sin embargo, su administración no condujo a una respuesta favorable en ninguna de las dos modalidades de administración ya que no evitó el desarrollo de la intoxicación. En cambio, ocurrió el agravamiento de algunas manifestaciones clínicas como la disminución de la actividad espontánea, la debilidad, la secreción de porfirina periocular y el ataque al estado general (Tabla II) en el grupo *Kh*-AAL.

El agravamiento de las manifestaciones clínicas en el grupo *Kh*-AAL pudiera deberse a la lesión ocasionada a los riñones y al hígado como se demostró en la evaluación histológica de estos órganos en el presente trabajo (Fig. 17-23). Estos

órganos normalmente conjugan y eliminan a los fármacos. Además, los animales del grupo AAL-*Kh*, que recibieron durante 2 semanas el tratamiento de ácido α -lipoico por la vía oral previo a la administración de fruto de *Kh*, tampoco mostraron mejoría en ninguna de las manifestaciones clínicas.

Las curvas de peso obtenidas a partir de su registro diario no muestran, ninguna diferencia ($p=0.5820$) entre los grupos AAL-*Kh* y AM-*Kh* (Fig. 6A). Tampoco existe diferencia ($p=0.1675$) entre los grupos *Kh*-AAL y *Kh*-SS (Fig. 6B). En cuanto a la caída de peso de los animales a los que se les administró fruto molido de *Kh*, se observó que es más notable después de la cuarta semana posterior al inicio de la administración de fruto de *Kh* llegando a un promedio de -5% en machos y -25% en hembras comparado con un promedio de 62% de ganancia de peso en machos y 5% en hembras de los grupos que no recibieron *Kh*.

Un dato interesante en cuanto a esto es que los machos incrementan su peso en forma constante y mostrando una curva empinada (Fig. 6 B) que es normal para este género de ratas, en cambio las hembras mantienen su peso durante más tiempo y muestran una curva de crecimiento más estable (Fig. 6A).

Así, mientras que los grupos A-AAL y A-SS integrados por ratas machos muestran una curva de crecimiento empinada, los grupos *Kh*-AAL y *Kh*-SS bajan de peso bruscamente desde el inicio de la administración de fruto, con una aparente recuperación a partir de la segunda semana y hasta que en la cuarta semana se presenta nuevamente una franca disminución de su peso (Fig. 6B).

Al comparar las curvas de crecimiento de los animales del grupo AAL-*Kh* y AM-*Kh* se observa que no hay diferencia estadística alguna ($p=0.1675$). Tampoco se observó diferencia en la curva de crecimiento entre los grupos *Kh*-AAL y *Kh*-SS.

Los resultados obtenidos durante el registro de peso y de las manifestaciones clínicas nos indican que si se elevara la dosis de ácido α -lipoico, se agravaría el

cuadro clínico de los animales intoxicados, sobre todo el grupo *Kh*-AAL. Ahora bien, si se optara por bajar la dosis no observaríamos ninguna mejoría clínica, ya que ninguno de los grupos a los que se les administró fruto molido de *Kh* y que recibieron tratamiento previo o posterior mostraron mejoría alguna.

Cabe señalar que los tratamientos con ácido α -lipoico, tanto en su modalidad de pre-tratamiento (AAL-A) por vía oral, así como en su modalidad de post-tratamiento a la administración de agua (A-AAL) no presentaron ninguna de las manifestaciones clínicas registradas, ni modificaron su curva de crecimiento de peso, la cual fue normal (Fig. 6A y 6B).

Las alteraciones histológicas que se presentaron en las neuronas de cerebro y cerebelo de los grupos que recibieron *Kh* son las mismas que las previamente reportadas por Becerra y cols. (2009). Estas alteraciones, y las que presentan las neuronas motoras del asta anterior de la médula espinal se presentaron de igual manera en las ratas de los grupos que recibieron *Kh* y ácido α -lipoico, lo que indica que la administración de ácido α -lipoico no evita el desarrollo de la lesión histológica en el cerebro (Fig. 7D), cerebelo (Fig. 8D) y médula espinal (Fig. 9D).

Resulta de interés señalar que las neuronas afectadas en forma más evidente en los órganos del sistema nervioso central, se observan en las áreas donde los cuerpos neuronales son voluminosos (astas anteriores de la médula espinal, corteza motora de cerebro y capa de neuronas de Purkinje de cerebelo), por lo que no se descarta que también puedan presentarse alteraciones en los cuerpos de otras neuronas de menor tamaño y que no son observables al microscopio de luz.

Además, en este trabajo se encontró por primera vez que otras neuronas de cuerpo grande localizadas en la capa granulosa del cerebelo también resultan dañadas. Estas células se observaron en cortes de cerebelo de los grupos control y mostrando una apariencia normal (Fig.8A y 8B). De acuerdo con su localización y sus características histológicas, estas neuronas podrían ser las llamadas neuronas

en cesta o las neuronas de Golgi o tal vez las neuronas de Lugaro, las cuales se localizan normalmente en esta capa (Barmack y Yakhnitsa, 2008). Resultaría conveniente identificar en un futuro mediante técnicas de impregnación argéntica en cortes gruesos o con algún marcador específico a esta variedad de neuronas, ya que también se observaron lesionadas igual que las células de Purkinje en los grupos que recibieron *Kh* (Fig. 8C y 8D).

Los nervios periféricos de las ratas del grupo *Kh*-SS (Fig. 10C) presentaron las mismas lesiones descritas en el modelo desarrollado por Salazar y cols. (2006). En los nervios periféricos de las ratas del grupo *Kh*-AAL no se observó mejoría debida al tratamiento con ácido α -lipoico (Fig. 10D). En cuanto al total de células cebadas íntegras y desgranuladas (Fig. 14), no hubo diferencia estadística significativa entre los grupos *Kh*-AAL y *Kh*-SS, ($p=0.1654$), lo cual indica que el tratamiento con ácido α -lipoico no tiene influencia aparente sobre el número de estas células en los grupos que recibieron *Kh*.

Así mismo, no hubo diferencias en el conteo de las poblaciones de células cebadas según el contenido de sus gránulos citoplásmicos entre los grupos *Kh*-SS y *Kh*-AAL (Fig. 15). De hecho, el promedio de células encontradas por mm^2 en nervio periférico es menor de 10 en todos los casos. Estos resultados indican que la administración de ácido α -lipoico no cambia aparentemente la proporción de las diferentes poblaciones de células cebadas en el nervio periférico.

Las células cebadas que residen en el nervio periférico participan en los procesos de mielinización y desmielinización (Monk y cols., 2007) y en el modelo experimental desarrollado por Salazar y cols. (2006) se observó un incremento progresivo en el número de células cebadas con relación al grupo control, encontrándose el mayor número de células cebadas durante la etapa de recuperación a los 112 días. Sin embargo, en el presente trabajo solo se estudió la etapa correspondiente a la parálisis por lo que no se puede hacer una comparación del comportamiento numérico de estas células a lo largo de la intoxicación.

Las células cebadas también secretan quimasa y triptasa que degradan y exponen a las proteínas de la mielina, lo cual potencia la desgranulación de otras células cebadas (Christy y Brown, 2007). ¿Qué pasaría si se administra un agente inhibitorio de la desgranulación de las células cebadas durante el desarrollo de esta intoxicación? ¿Se podría evitar la evolución del cuadro neurológico de parálisis si se administra desde el inicio de la ingesta de fruto? ¿Podría detenerse el desarrollo del cuadro de parálisis si se administra después de la aparición de los primeros signos?

Sería interesante en el futuro emplear un agente inhibidor de la desgranulación de las células cebadas en este modelo. Aunque, hay que considerar que también las células cebadas secretan factor de crecimiento neural (NGF, por sus siglas en inglés), el cual está relacionado con la reparación de la mielina, no solamente secretan mediadores que incrementan la permeabilidad vascular, o que causan vasodilatación o generación de radicales superóxido, destrucción de tejidos e infiltración de células mononucleares (Esposito y cols., 2001; Khalil y cols., 2007). ¿Podría la administración de un inhibidor de células cebadas limitar la recuperación de un cuadro ya establecido?

Por otro lado, aunque se ha reportado que la T-514 ocasiona un incremento de radicales libres *in vitro* (Garza y cols., 2003), no se han reportado estudios que evalúen el incremento de radicales libres en modelos de intoxicación experimental con el fruto completo. Resulta lógico pensar que el fruto completo ocasiona estrés oxidativo, ya que todas las toxinas comparten la misma estructura química (Dreyer y cols., 1975; Waksman y cols. 1990 y 1992). Sin embargo, esto deberá demostrarse en un futuro, ya que puede ser parte de una serie de factores desencadenantes de la respuesta tóxica.

Ahora bien, aunque se demostrara que la ingesta de fruto de *Kh* ocasiona un incremento de estrés oxidativo, en el presente trabajo no mejoraron las manifestaciones clínicas ni las lesiones histológicas al administrar el ácido α -lipoico,

ni antes ni después de la administración de *Kh*. Posiblemente esto se debe a que otros mediadores como las células cebadas y otros mediadores químicos que no se han explorado estén más relacionadas con la producción del cuadro clínico y las lesiones.

También se evaluaron otros órganos, como el pulmón, hígado y riñón. En el presente trabajo solamente se comparó la región alveolar de pulmón, observando que los grupos que recibieron *Kh* presentaron engrosamiento de los tabiques interalveolares (Fig. 16C), de igual forma los grupos que recibieron *Kh* y ácido α -lipoico presentaron la misma alteración (Fig. 16D). Estos hallazgos coinciden con lo reportado previamente por otros autores en modelos de intoxicación aguda con fruto de *Kh* (Bermúdez y cols., 1986; Romero y cols., 2005). Además se observaron masas de tejido linfóide abundantes en la lámina propia de los bronquios y de algunos bronquiolos en ambos grupos. Sin embargo, en los bronquios de los grupos control también pudieron ser observadas estas masas de tejido linfóide, por lo que amerita en un futuro el análisis de la población celular presente en estas masas de tejido linfóide y de su posible correlación con el cuadro neurológico.

Las lesiones histológicas presentes en el hígado de los grupos que recibieron *Kh*, así como en los grupos que recibieron *Kh* y ácido α -lipoico caracterizadas por la presencia de hepatocitos con vacuolización del citoplasma (Fig. 17C y 17D), esteatosis (Fig. 18C y 18D), necrosis hepática focal (Fig. 17C y 17D) y dilatación sinusoidal concuerdan con lo reportado previamente por Bermúdez y cols., (1986) y Romero y cols., (2005). Además, se ha reportado que en la intoxicación aguda con fruto de *Kh* se ven afectadas las funciones que se llevan a cabo en este órgano (Jaramillo y cols., 2009). Como se puede observar, la administración de este compuesto antioxidante no evitó el desarrollo de las lesiones sobre el hígado. Más aún, la lesión sobre los hepatocitos podría explicar, en parte, el agravamiento de algunas manifestaciones clínicas presentes en las ratas tratadas con ácido α -lipoico como ya se mencionó (Tabla II).

Tampoco se observó que el ácido α -lipoico evitara el desarrollo de las lesiones focales presentes en el riñón. La presencia de glomérulos retraídos, congestión vascular e infiltrado inflamatorio en el intersticio que rodea a la cápsula de Bowman (Fig. 19C y 19D), además del daño ocasionado a las células epiteliales de los túbulos proximales y distales (Fig. 20C y 20D) y sobre las asas de Henle (Fig. 21C y 21D) comprometen la función de este órgano, lo cual se ha reportado en la intoxicación aguda (Jaramillo y cols., 1995). Esto también podría explicar la acentuación de las manifestaciones clínicas observadas en los animales tratados con este compuesto posterior a la administración de fruto de *Kh*.

Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo indican que las lesiones ocasionadas por la ingesta de fruto maduro de *Kh* en el sistema nervioso central y periférico, así como en el pulmón, hígado y riñón; no son ocasionados en forma primaria o directa por la producción de radicales libres.

Por otra parte, el modelo experimental desarrollado por Salazar y cols., (2006) resulta muy útil para el estudio de los posibles mecanismos involucrados en el desarrollo de esta intoxicación o el ensayo de posibles tratamientos *in vivo*, no sólo para esta intoxicación sino también para otras neuropatías con características similares, como la neuropatía diabética o el síndrome de Guillain-Barré.

CAPÍTULO 5.

CONCLUSIÓN.

Las lesiones ocasionadas por la ingesta de fruto maduro de *Kh* en el sistema nervioso central y periférico, así como en el pulmón, hígado y riñón; no son ocasionados en forma primaria o directa por la producción de radicales libres.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Arreola-Nava, M.E.; Vázquez-Castellanos, J.L. & González-Castañeda, M.E. Geographical factors in the epidemiology of intoxication by *Karwinskia* (tullidora) in Mexico. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 16(1):255-260, 2000

Bansal, V.; Kalita, J. & Misra, U.K. Diabetic neuropathy. Postgrad Med J. 82:95-100, 2006.

Barmack, N.H. & Yakhnitsa, V. Functions of interneurons in mouse cerebellum. J. Neurosci. 30;28(5):1140-52, 2008.

Becerra-Verdín, E.M. Cambios histoquímicos y ultraestructurales del nervio ciático de la rata con intoxicación crónica con fruto molido de *Karwinskia humboldtiana* por vía oral. Tesis de Maestría UANL. 2005.

Becerra-Verdín, E.M.; Bermúdez-Barba, M.V.; Salazar-Leal, M.E.; Ancer-Rodríguez, J.; Romero-Díaz, V.J.; Soto-Domínguez, A.; Ballesteros-Elizondo, R.G.; Saucedo-Cárdenas, O.; Piñeyro-López, A. & Sepúlveda-Saavedra, J. *Karwinskia humboldtiana* (buckthorn) fruit causes central nervous system damage during chronic intoxication in the rat. Toxicon. 53(6):645-651, 2009.

Bermúdez, M.V.; González-Spencer, D.; Guerrero, M.; Waksman, N. & Piñeyro, A. Experimental intoxication with fruit and purified toxins of buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*). Toxicon. 24(11-12):1091-1097, 1986.

Bermúdez, M.V.; Martínez, F.J.; Salazar, M.E.; Waksman, N. & Piñeyro, A. Experimental acute intoxication with ripe fruit of *Karwinskia humboldtiana* (Tullidora) in rat, Guinea pig, hamster and dog. Toxicon; 30:1493-1496, 1992.

Bhatti, F.; Mankhey, R.W.; Asico, L.; Quinn, M.T.; Welch, W.J. & Maric, C. Mechanisms of antioxidant and pro-oxidant effects of α -lipoic acid in the diabetic and nondiabetic kidney. *Kidney Int.* 67(4):1371–1380, 2005.

Biewenga, G.P.; Haenen, G.R. & Bast, A. The Pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *Gen. Pharmacol.*, 29(3):315-331, 1997.

Bilska, A. & Włodek, L. Lipoic acid - the drug of the future? *Pharmacol Rep.* 57(5):570-577, 2005.

Bustamante-Sarabia, J.; Olvera-Rabiela, J.E.; & Nieto-Cañedo, L.C. Intoxicación fatal por tullidora (*Karwinskia humboldtiana*). Comunicación de un caso. *Gaceta Médica de México.* 114(5):241-244, 1978.

Cantú-Brito, C.; Baizábal-Carvalho, F., Aldrete-Velasco, J. & Chávez-Güitrón, E. Aplicaciones clínicas del ácido alfa-lipoico (ácido α -lipoico) en pacientes con neuropatía diabética sintomática: revisión. *Med. Int. Mex.* 23:151-158, 2007.

Charlton, K.M. & Pierce, K.R. A neuropathy in goats caused by experimental coyotillo (*Karwinskia humboldtiana*) poisoning. II. Lesions in the peripheral nervous system - teased fiber and acid phosphatase studies. *Pathol. Vet.*, 7(5):385-407, 1970.

Christy, A.L. & Brown, M.A. The multitasking mast cell: positive and negative roles in the progression of autoimmunity. *J Immunol.* 1;179(5):2673-2679, 2007.

Del Pozo, E.C. Los efectos paralizantes de la "tullidora". Estudios clínicos y experimentales. (Comentario al trabajo "Aspectos neuropatológicos de la intoxicación con *Karwinskia humboldtiana*. Estudio experimental."). *Gac. Med. Mex.*, 95:179-182, 1965.

Dreyer, D.L.; Arai, I.; Bachman, C.D.; Anderson, W.R. Jr.; Smith, R.G. & Daves, G.D. Jr. Toxins causing noninflammatory paralytic neuropathy. Isolation and structure elucidation. *J. Am. Chem. Soc.*, 20;97(17):4985-90, 1975.

Escobar, A. & Nieto, D. Aspectos neuropatológicos de la intoxicación con *Karwinskia humboldtiana*. Estudio experimental. *Gac Med Mex.* 95:163-167, 1965.

Esposito, P.; Gheorghe, D.; Kandere, K.; Pang, X.; Conally, R.; Jacobson, S. & Theoharides, T.C. Acute stress increases permeability of the blood-brain-barrier through activation of brain mast cells. *Brain Res* 888:117–127, 2001.

Evans Joseph L., Goldfine Ira D., Maddux Betty A. & Grodsky Gerold M. Oxidative Stress and Stress-Activated Signaling Pathways: A Unifying Hypothesis of Type 2 Diabetes. *Endocr. Rev.*, 23(5):599-622, 2002.

Fahim, M.A.; Hasan, M.Y. & Alshuaib, W.B. Early morphological remodeling of neuromuscular junction in a murine model of diabetes. *J. Appl. Physiol.*, 89(6):2235-40, 2000.

Fernández-Nava, R. Nombres comunes, usos y distribución geográfica del género *Karwinskia* (*Rhamnaceae*) en México. *Anales Inst. Biol. Univ. Nac. Autón. México, Ser. Bot.* 63(1):1-23, 1992.

Gandhi, V.M.; Wagh, S.S.; Natraj, C.V. & Menon, K.K.G. Lipoic acid and diabetes II: Mode of action of lipoic acid. *J. Biosci.* 9(1-2):117–127, 1985.

García-Ramos GS & Cacho-Díaz B. Síndrome de Guillain-Barré (SGB). Diagnóstico diferencial. *Rev Mex Neuroci.* 6(5): 448-454, 2005.

Garza-Ocañas, L.; Zanatta-Calderón, M.T.; Acosta, D.; Torres-Alanís O. & Piñeyro-López, A. Production of reactive oxygen species by toxin T-514 of genus *Karwinskia* in vitro. *Toxicol. In Vitro*, 17(1):19-25, 2003.

Jaramillo-Juárez, F.; Ortiz, G.; Rodríguez-Vázquez, M.L.; Falcón-Franco, M.A. & Feria-Velazco, A. Renal failure during acute toxicity produced by tullidora ingestion (*Karwinskia humboldtiana*). *Gen. Pharmac.*, 26(3):649-653, 1995.

Jaramillo, F.; Rodríguez, M.L.; Castillo, M.G.; Quezada, T.; Cerda, E.; Posadas, F.A. & Taboada, C. Daño hepático y en la coagulación de la sangre producido por la administración de los frutos maduros de la planta tullidora (*Karwinskia humboldtiana*) en la rata. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 40(1):28-34, 2009.

Khalil, M.; Ronda, J.; Weintraub, M.; Jain, K.; Silver, R. and Silverman, A.J. Brain mast cell relationship to neurovasculature during development. *Brain Res.* 26;1171:18–29, 2007.

Keith, R.L.; Setiarahardjo, I.; Fernando, Q. Utilization of renal slices to evaluate the efficacy of chelating agents for removing mercury from the kidney. *Toxicology* 116:67-75, 1997.

Klüver, H. & Barrera, E. In: *Métodos Histotecnológicos*. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los EUA. Editorial ARP (Registro de Patología de los EUA) Washington, D.C., 96-97, 1995.

Manda, K.; Ueno, M.; Moritake, T. & Anzai, K. Radiation-induced cognitive dysfunction and cerebellar oxidative stress in mice: Protective effect of α -lipoic acid. *Behavioural Brain Research*. 177:7–14, 2007.

Marsland, T.H.; Glees, P. & Erickson, L.B. Modification of the Glees silver impregnation for paraffin sections. *J. Neuropathol Exp. Neurol.* 13:587-597, 1954.

Mitsui, Y.; Schmelzer, J.D.; Zollman, P.J.; Mitsui, M.; Tritschler, H.J & Phillip A. Low. Alpha-lipoic acid provides neuroprotection from ischemia-reperfusion injury of peripheral nerve. *Journal of the Neurological Sciences*. 163:11–16, 1999.

Monk, K.R.; Qiang Wu, J.; Williams, J.P.; Finney, B.A.; Fitzgerald, M.E.; Filippi, M.D. & Ratner, N. Mast cells can contribute to axon–glial dissociation and fibrosis in peripheral nerve. *Neuron. Glia. Biol.* 3(3):233–244, 2007.

Muñoz-Martínez, E.J. & Cueva, J. & Joseph-Nathan, P. Denervation caused by tullidora (*Karwinskia humboldtiana*). *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 9:121-134, 1983.

Muñoz-Martínez, E.J.; Cuéllar-Pedroza, H.; Rubio-Franchini, C.; Jáuregui-Rincón, J. & Joseph-Nathan, P. Depression of fast axonal transport in axons demyelinated by intraneural injection of neurotoxin from *K. humboldtiana*. *Neurochem. Res.* 19(11):1341-1348, 1994.

Ortiz G., G., Gonzalez-Burgos, I. & Feria-Velasco, A. Structural study of the acute effect of *Karwinskia humboldtiana* on cerebral motor cortex, hippocampus, and caudate nucleus of the rat. *General Pharmacology*, 23(3):543-547., 1992

Packer, L.; Tritschler H.J. & Wessel, K. Neuroprotection by the metabolic antioxidant α -lipoic acid. *Free Radical Biology & Medicine*. 22:359-378, 1997.

Parris M. Kidd, PhD. Neurodegeneration from mitochondrial insufficiency: nutrients, stem cells, growth factors, and prospects for brain rebuilding using integrative management. *Alternative Medicine Review*. 10(4): 268-293, 2005.

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

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

Piñeyro-López, A.; Martínez, L. & González-Alanís R. *In vitro* selective toxicity of toxin T-514 from *Karwinskia humboldtiana* (buckthorn) plant on various human tumor cell lines. Toxicology 92:217-227, 1994.

Pitel, S.; Raccah, D.; Gerbi, A.; Pieroni, G.; Vague, P. & Coste, T.C. At low doses, a γ -linolenic acid-lipoic acid conjugate is more effective than docosahexaenoic acid-enriched phospholipids in preventing neuropathy in diabetic rats. J Nutr. 137(2):368-72, 2007.

Puértolas, M.; Nava, O.; Medina, H.; López, F. & Oyervides, J. Polineuritis por *Karwinskia humboldtiana*. Rev. Med. IMSS, 22:22-27, 1984.

Rivas, V.; Torres, R. & Waksman, N. Dimeric anthracenones from *Karwinskia species*. Planta Med.; 56:562-564, 1990.

Rivas, V. Estudio químico de los extractos semipolares del fruto de la *K. parvifolia* y *K. johnstonii*. Tesis de Maestría UANL. 1995.

Romero-Díaz, V.J.; Salazar-Leal, M.E.; Flores-Diego, M.A.; Sepúlveda-Saavedra, J. & Bermúdez-de Rocha, M.V. Morphologic study of hepatorenal lesions in a polyneuropathy model with *Karwinskia humboldtiana* (buckthorn) fruit in rats. Histol. Histopathol., Suppl. 1:S156-S157, 2005.

Romero-Díaz, V.J.; Salazar-Leal, M.E.; Flores-Diego, M.A.; Sepúlveda-Saavedra, J. & Bermúdez-de Rocha, M.V. Morphologic study of lung lesion in a polyneuropathy model with *Karwinskia humboldtiana* (buckthorn) fruit in rats. Histol. Histopathol., Suppl. 1:S157-S158, 2005.

Salazar-Leal, M.E. Búsqueda de componentes del sistema inmune en un modelo de polineuropatía en ratas con el fruto de la *Karwinskia humboldtiana* por vía oral. Tesis Doctoral UANL. 2003.

Salazar-Leal M.; Flores M.S.; Sepúlveda-Saavedra, J.; Romero-Díaz, V.J.; Becerra-Verdín E.M., Tamez-Rodríguez, V.A.; Martínez, H.R.; Piñeyro-López, A. & Bermúdez M.V. An experimental model of peripheral neuropathy induced in rats by *Karwinskia humboldtiana* (buckthorn) fruit. J. Peripher. Nerv. Syst. 11(3):253-261, 2006.

Segovia, A. & Zermeño, F. Polirradiculoneuritis tóxica por *Karwinskia humboldtiana*. A propósito de un caso. Bol. Med. Hosp. Infant. Méx. Vol XXIX. 1:89-90, 1972.

Sepúlveda-Saavedra J.; Van Der-Klei, I.; Kaiser, I.; Piñeyro-López, A.; Harder, W. & Veenhuis, M. Studies on the effect of T-514 on the integrity of peroxisomes in methyltrophic yeast. FEMS Microbiol. Lett., 91:207-212, 1992.

Suzuki, Y.; Yoshimaru, T.; Inoue, T.; Niide, O. & Ra, C. Role of oxidants in mast cell activation. Chem. Immunol. Allergy 87, 32– 42, 2005.

Tirosh, O.; Sen, C.K.; Roy, S.; Kobayashi, M.S. & Packer L. Neuroprotective effects of α -lipoic acid and its positively charged amide analogue. Free Radical Biology & Medicine. 26(11/12):1418–1426, 1999.

Trush, M. A.; Mimnaugh, E. G. & Gram, T. E. Activation of pharmacologic agents to radical intermediates. Implications for the roles of free radicals in drug action and toxicity. Biochem. Pharmac., 31: 3335-3343, 1982.

Waksman de Torres, N. & Ramírez-Durón, R. Isolation of a new dimeric anthracenone from *Karwinskia parvifolia*. Rev. Latinoam. Quim. 23/1 y 22/4; 25-27, 1992.

Ziegler, D.; Hanefeld, M.; Ruhnau, K.J.; Hasche, H.; Lobisch, M.; Schütte, K.; Kerum, G. & Malessa, R. Treatment of symptomatic diabetic polyneuropathy with the antioxidant alpha-lipoic acid: a 7-month multicenter randomized controlled trial (ALADIN III Study). ALADIN III Study Group. Alpha-Lipoic Acid in Diabetic Neuropathy. *Diabetes Care*. 22(8):1296-301, 1999.

Ziegler, D.; Ametov, A.; Barinov, A.; Dyck, P.J.; Gurieva, I.; Low, P.A.; Munzel, U.; Yakhno, N.; Raz, I.; Novosadova, M.; Maus, J. & Samigullin, R. Oral treatment with α -lipoic acid improves symptomatic diabetic polyneuropathy: the SYDNEY 2 trial. *Diabetes Care*. 29(11):2365-70, 2006.

APENDICE.

A. Buffer de cacodilatos.

Reactivos:

Solución A.

1. En 200 mL de agua ultrapura.
2. Disolver 8.56 g de cacodilato de sodio.

Solución B.

1. En 25 mL de agua ultrapura.
2. Agregar 0.5 mL de ácido clorhídrico.

Procedimiento:

1. En los 200 mL de la solución A.
2. Adicionar 10.8 mL de la solución B.
3. Aforar a 400 mL con agua ultrapura.
4. Ajustar el pH a 7.4 con hidróxido de sodio.

B. Fijador glutaraldehído al 2.5 %:

Procedimiento:

1. En 90 mL de buffer de cacodilatos al 0.1 M, a un pH de 7.2-7.4 (Apéndice A).
2. Agregar 100 mL de glutaraldehído al 25 %.
3. Mezclar vigorosamente.
4. Almacenar a 4°C en un frasco de vidrio ámbar.

C. Fijador paraformaldehído al 4 %.

Procedimiento:

1. En 450 mL de agua destilada.
2. Agregar 20 g de paraformaldehído.
3. Disolver en plancha caliente a 60 °C por 30 minutos y dejar enfriar.
4. Agregar 50 mL de PBS 10 x.
5. Ajustar el pH a 7.2.
6. Aforar a un volumen de 500 mL.

D. Técnica histológica para inclusión en parafina.

Material y equipo:

Viales con las muestras que se van a procesar fijadas en paraformaldehído al 4 % o glutaraldehído al 2.5 %.

Histoquinete.

Estufa a 60 °C.

Centro de inclusión.

Moldes de acero.

Agujas histológicas.

Pinzas de disección.

Procedimiento:

1. Obtener y fijar los fragmentos de los tejidos u órganos durante un período mínimo de 2 horas.
2. Lavar en agua corriente.
3. Deshidratar con etanol (se puede utilizar el histoquinete desde este paso hasta la preinclusión):
 - a) Pasar por etanol al 60 % durante 60 min.
 - b) Pasar por etanol al 70 % durante 60 min.
 - c) Pasar por etanol al 80 % durante 60 min.
 - d) Pasar por etanol al 96 % durante 60 min.
 - e) Pasar por etanol al 96 % durante 60 min.
 - f) Pasar por etanol absoluto durante 60 min.
 - g) Pasar por etanol absoluto durante 60 min.
4. Pasar por etanol-xilol 1:1 durante 60 min.
5. Aclarar en xilol durante 60 min dos veces.
6. Preincluir los fragmentos en parafina líquida a 60 °C durante 60 min dos veces.
7. Incluir los fragmentos en parafina y dejar solidificar (esto se realiza utilizando los moldes de acero, se orienta el fragmento con ayuda de la aguja histológica y se utiliza el centro de inclusión).

E. Microtomía y corte histológico.

Material y equipo:

Microtomo.

Criostato.

Cuchillas desechables.

Baño con termostato.

Agujas histológicas.

Pinceles.

Gasas.

Hielo.

Laminillas tratadas con poli-lisina o con silano.

Lápiz de diamante.

- a) Para las técnicas de tinción con hematoxilina y eosina, tricrómico de Masson, técnica histoquímica de PAS, azul alciano-PAS y azul alciano-safranina se procedió a obtener cortes histológicos de 5 a 6 μm de grosor.
- b) Para la técnica de tinción que emplea el método de Klüver y Barrera se obtienen cortes histológicos de unas 7 a 10 μm de grosor.
- c) Para la aplicación de la técnica de Marsland, Glees y Erickson de impregnación argéntica y para la tinción con el rojo oleoso se obtienen cortes histológicos (en el criostato) de unas 10 μm de grosor.

F. Desparafinado de laminillas.

Material y equipo:

Estufa a 60 °C.
Recipientes de vidrio.
Canastillas para laminillas.

Procedimiento:

1. Colocar las laminillas con los cortes histológicos en las canastillas en la estufa a 60 °C por 10-20 min.
2. Colocar en xilol por 5 min.
3. Colocar en una mezcla de xilol-etanol 1:1 por 5 min.
4. Colocar en etanol absoluto por 2 min.
5. Colocar en etanol al 96 % por 2 min.
6. Enjuagar lentamente con agua destilada por 2 min.

G. Deshidratación y montaje final de laminillas.

Material:

Cubreobjetos.
Resina o medio de montaje (Entellan® o gelatina glicerinada; según sea el caso).
Gasas.

Procedimiento:

1. Deshidratar con etanol al 96 % realizando unas 20 inmersiones rápidas.
2. Deshidratar con etanol absoluto realizando el mismo procedimiento.
3. Realizar el mismo procedimiento en xilol-etanol.
4. Colocar las laminillas en xilol.
5. Añadir una gota de medio de montaje Entellan® sobre la muestra en la laminilla y colocar un cubreobjetos, procurando no dejar burbujas entre el corte.

H. Tinción con hematoxilina y eosina.

Secciones:

Cortes de tejido incluido en parafina de 5 µm de grosor.

Reactivos:

Hematoxilina de Gill:

1. Usar 730 ml de agua destilada.
2. Agregar 250 ml de etilenglicol.
3. Agregar 2 g de hematoxilina anhidra.
4. Agregar 0.2 g de yodato de sodio.
5. Agregar 17.6 g de sulfato de amonio.
6. Agregar 2 ml de ácido acético glacial.

Alcohol ácido:

1. Usar 99 ml de etanol al 70 %.
2. Agregar 1 ml de ácido clorhídrico (HCl) concentrado.

Agua amoniaca al 1 %:

1. Usar 99 ml de agua destilada.
2. Agregar 1 ml de hidróxido de amonio.

Procedimiento:

1. Desparafinar las laminillas (Apéndice F).
2. Colocar las laminillas en la hematoxilina de Gill por 2 min.
3. Enjuagar lentamente con agua corriente 2 veces.
4. Una inmersión rápida en alcohol ácido.
5. Enjuagar lentamente con agua corriente 2 veces.
6. Dos inmersiones rápidas en agua amoniaca al 1 %.
7. Enjuagar lentamente con agua corriente 2 veces.
8. Enjuagar lentamente con agua destilada.
9. Colocar las laminillas en eosina (6 inmersiones).
10. Enjuagar brevemente con alcohol al 96 %.
11. Deshidratar y montar las laminillas (Apéndice G).

Resultados:

Núcleos en color morado oscuro.

Citoplasma y fibras de la matriz extracelular en color rosa.

I. Técnica de tinción con tricrómico de Masson.

Secciones:

Cortes de tejido incluido en parafina de 6 μm de grosor.

Reactivos:

Solución de fucsina ácida al 1 %.

1. En 100 mL de agua destilada.
2. Disolver 1g de fucsina ácida.

Solución de escarlata de Biebrich al 1 %.

1. En 100 mL de agua destilada.
2. Disolver 1g de escarlata de Biebrich.

Solución de fucsina ácida y escarlata de Biebrich.

1. En 90 mL de escarlata de Biebrich al 1 %.
2. Mezclar 10 mL de fucsina ácida al 1 %.
3. Adicionar 1 mL de ácido acético glacial.

Solución de ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico.

1. En 200 mL de agua destilada.
2. Disolver 5 g de ácido fosfotúngstico.
3. Disolver 5 g ácido fosfomolibdico lentamente.

Solución acuosa de ácido acético 1%.

1. En 100 mL de agua destilada.
2. Adicionar 1 mL de ácido acético glacial.

Solución fijadora de Bouin.

1. En 75 mL de solución acuosa saturada de ácido pícrico
2. Mezclar 25 ml de formaldehído al 37 %.
3. Adicionar 5 mL de ácido acético glacial.

Solución metabisulfito de sodio 10 %.

1. En 100 mL de agua destilada.
2. Disolver 10 g de metabisulfito de sodio.

Solución sulfurosa para enjuagar.

1. En 300 mL de agua destilada.
2. Agregar 15 mL de ac. clorhídrico 1 N.
3. Mezclar 18 mL de metabisulfito de sodio 10 %.

Procedimiento:

1. Desparafinar las laminillas (Apéndice F).
2. Usar como "mordente" el fijador de Bouin por 60 min. a 56 °C.
3. Lavar en agua corriente hasta que el color amarillo desaparezca.
4. Enjuagar los cortes en agua destilada.
5. Pasar los cortes a la hematoxilina férrica de Weigert durante 10 min.
6. Lavar en agua corriente por 5 min.
7. Enjuagar en agua destilada.
8. Teñir con la solución de fucsina-escarlata por 1 min.
9. Lavar varias veces en agua destilada hasta que ésta deje de teñirse.
10. Pasar los cortes a la solución de ácidos fosfomolibdico-fosfotúngstico durante 10 min.
11. Enjuagar brevemente con agua destilada.
12. Teñir con la solución de azul de anilina durante 1 min.
13. Lavar con agua destilada hasta eliminar el exceso del colorante.
14. Colocar en ácido acético por 2 min.
15. Deshidratar en etanol al 96 % por unos segundos (cuidar que no se decolore).
16. Deshidratar y montar las laminillas (Apéndice G).

Resultados:

Fibras de colágeno en color azul.
Estructuras oxidadas, citoplasma, queratina, glóbulos rojos y el tejido muscular en color rojo.
Núcleos en color lila o marrón.

J. Técnica de tinción con azul de toluidina.

Secciones:

Cortes de tejido incluido en parafina de 5 μm de grosor.

Reactivos:

Solución amortiguadora de Walpole a pH 4.2:

1. 37.5 mL de ácido acético al 0.01 M.
2. Agregar 12.5 mL de acetato de sodio al 0.01 M.
3. Ajustar el pH a 4.2.

Solución de trabajo (azul de toluidina):

1. 50 mL de isopropanol absoluto.
2. Agregar 50 mL de la solución amortiguadora de Walpole.
3. Disolver 1 g de azul de toluidina.

Procedimiento:

1. Desparafinar las laminillas (Apéndice F).
2. Colocar las laminillas en la solución de trabajo por 30 min. a 37 °C.
3. Escurrir las laminillas para eliminar la mayor cantidad del colorante.
4. Colocar las laminillas en isopropanol absoluto por 1 minuto.
5. Deshidratar y montar las laminillas (Apéndice G).

Resultados:

Gránulos de las células cebadas en color morado o púrpura.

K. Técnica histoquímica con ácido peryódico de Schiff (PAS).

Secciones:

Cortes de tejido incluido en parafina de 5 μ m de grosor.

Reactivos:

Reactivo de Schiff (Sigma).

Solución acuosa de ácido peryódico al 5 %:

1. 50 mL de agua destilada.
2. Disolver 0.5 g de ácido peryódico en cristales.

Solución sulfurosa para enjuagar:

1. En 300 mL de agua destilada.
2. Agregar 15 mL de ácido clorhídrico al 1 N.
3. Agregar 18 mL de metabisulfito de Na 10 %.

Hematoxilina de Gill:

1. En 730 mL de agua destilada.
2. Agregar 250 mL de etilenglicol.
3. Disolver 2 g de hematoxilina anhidra.
4. Disolver 0.2 g de yodato de sodio.
5. Disolver 17.6 g de sulfato de amonio.
6. Agregar 2 mL de ácido acético glacial.

Alcohol ácido:

1. En 99 mL de etanol al 70 %.
2. Agregar 1 mL de ácido clorhídrico (HCl) concentrado.

Agua amoniacal:

1. En 99 mL de agua destilada.
2. Agregar 1 mL de hidróxido de amonio.

Procedimiento:

1. Desparafinar las laminillas (Apéndice F).
2. Colocar las laminillas en solución acuosa de ácido peryódico por 7.5 min. aprox..
3. Enjuagar con agua destilada unas 2 o 3 veces.
4. Colocar las laminillas en el reactivo de Schiff por 13 a 15 min.
5. Diferenciar en la solución sulfurosa para enjuagar unos dos cambios de 2 min. cada uno.
6. Lavar con agua corriente por 3-5 min.
7. Enjuagar con agua destilada.
8. Contrastar con hematoxilina de Gill por 1-2 min.
9. Lavar con agua corriente.
10. Decolorar en alcohol ácido y posteriormente lavar con agua destilada.
11. Virar en agua amoniaca y lavar con agua corriente y luego con agua destilada.
12. Deshidratar y montar las laminillas (Apéndice G).

Resultados:

Gránulos de las células cebadas en color magenta.

L. Técnica histoquímica de ácido peryódico de Schiff (PAS) con diastasa.

Secciones:

Cortes de tejido incluido en parafina de 5 μ m de grosor.

Reactivos:

Reactivo de Schiff (Sigma).

Diastasa salival.

Solución acuosa de ácido peryódico al 5 %:

1. 50 mL de agua destilada.
2. Disolver 0.5 g de ácido peryódico en cristales.

Solución sulfurosa para enjuagar:

1. En 300 mL de agua destilada.
2. Agregar 15 mL de ácido clorhídrico al 1 N.
3. Agregar 18 mL de metabisulfito de Na 10 %.

Hematoxilina de Gill:

1. En 730 mL de agua destilada.
2. Agregar 250 mL de etilenglicol.
3. Disolver 2 g de hematoxilina anhidra.
4. Disolver 0.2 g de yodato de sodio.
5. Disolver 17.6 g de sulfato de amonio.
6. Agregar 2 mL de ácido acético glacial.

Alcohol ácido:

1. En 99 mL de etanol al 70 %.
2. Agregar 1 mL de ácido clorhídrico (HCl) concentrado.

Agua amoniacal:

1. En 99 mL de agua destilada.
2. Agregar 1 mL de hidróxido de amonio.

Procedimiento:

1. Desparafinar las laminillas (Apéndice F).
2. Colocar diastasa salival sobre las laminillas por 7.5 min. aprox.
3. Enjuagar con agua destilada.
4. Colocar las laminillas en solución acuosa de ácido peryódico por 7.5 min. aprox.
5. Enjuagar con agua destilada unas 2 o 3 veces.
6. Colocar las laminillas en el reactivo de Schiff por 13 a 15 min.
7. Diferenciar en la solución sulfurosa para enjuagar unos dos cambios de 2 min. cada uno.
8. Lavar con agua corriente por 3-5 min.
9. Enjuagar con agua destilada.
10. Contrastar con hematoxilina de Gill por 1-2 min.
11. Lavar con agua corriente.
12. Decolorar en alcohol ácido y posteriormente lavar con agua destilada.
13. Virar en agua amoniaca y lavar con agua corriente y luego con agua destilada.
14. Deshidratar y montar las laminillas (Apéndice G).

Resultados:

Membrana basal en color magenta.

M. Técnica de tinción con azul alciano-PAS.

Secciones:

Cortes de tejido incluido en parafina de 5 µm de grosor.

Reactivos:

Reactivo de Schiff (Sigma).

Azul alciano al 1%:

1. En 100 mL de agua destilada.
2. Disolver 1 g de azul alciano.
3. Agregar 3 mL de ácido acético al 3 %.

Hematoxilina de Gill:

1. En 730 mL de agua destilada.
2. Agregar 250 mL de etilenglicol.
3. Disolver 2 g de hematoxilina anhidra.
4. Disolver 0.2 g de yodato de sodio.
5. Disolver 17.6 g de sulfato de amonio.
6. Agregar 2 mL de ácido acético glacial.

Procedimiento:

1. Desparafinar las laminillas (Apéndice F).
2. Colocar las laminillas en azul alciano por 5 min.
3. Lavar en agua corriente y luego en agua destilada.
4. Colocar las laminillas en el reactivo de Schiff por 15 min.
5. Lavar en agua corriente por 5 a 10 min.
6. Colocar en la hematoxilina de Gill por 1 min.
7. Lavar con agua destilada.
8. Deshidratar y montar las laminillas (Apéndice G).

Resultados:

Gránulos de las células cebadas en color azul oscuro y en color magenta.

N. Técnica de tinción con azul alciano-safranina.

Secciones:

Cortes de tejido incluido en parafina de 5 μ m de grosor.

Reactivos:

Buffer de acetatos a pH 1.42:

1. En 140 mL de agua destilada.
2. Agregar 60 mL de ácido clorhídrico al 1 N.
3. Agregar 50 mL de acetato de sodio al 1 M.

Solución de trabajo:

1. En los 250 mL de buffer de acetatos a pH 1.42.
2. Disolver 900 mg de azul alciano.
3. Disolver 45 mg de safranina.
4. Disolver 1.2 g de sulfato de amonio férrico.

Procedimiento:

1. Desparafinar las laminillas (Apéndice F).
2. Colocar las laminillas en la solución de trabajo durante 15 min.
3. Lavar con agua corriente.
4. Deshidratar y montar las laminillas (Apéndice G).

Resultados:

Gránulos de las células cebadas en anaranjado o rojizo.

O. Técnica de tinción con rojo oleoso.

Secciones:

Cortes fijados en formalina o por congelación y seccionados en el criostato de 10 μm de grosor.

Material y equipo:

Vasos de Coplin.
Criostato.

Reactivos:

Solución saturada de rojo oleoso O en isopropanol al 99%:

1. En 99 mL de isopropanol.
2. Agregar 1 mL de agua destilada.
3. Agregar poco a poco el colorante en polvo hasta que se observe un sedimento que ya no se disuelva.

Solución de trabajo de rojo oleoso (preparar 1 hora antes de su uso)

1. En 30 mL de solución saturada de rojo oleoso O.
2. Agregar 20 mL de agua destilada y mezclar.
3. Filtrar justo antes de usar.

Alcohol isopropílico (isopropanol) al 60%:

1. En 60 mL de isopropanol.
2. Agregar 40 mL de agua destilada.

Gelatina glicerinada (medio de montaje acuoso):

1. En 42 mL de agua destilada.
2. Disolver lentamente 7 g de gelatina pura en polvo, para evitar la formación de grumos.
3. Agregar 50 mL de glicerina y calentar a baño María.
4. Disolver 1 g de ácido fénico o fenol mientras se calienta a baño María y se agita.
5. Se filtra en caliente.
Se puede refrigerar si no se utiliza inmediatamente y al momento de usarse se calienta para licuar la gelatina.

Procedimiento:

1. Colocar las laminillas en alcohol isopropílico al 60% por 15 segundos.
2. Colocar en la solución de trabajo de rojo oleoso por 15 minutos.
3. Diferenciar en alcohol isopropílico hasta que en un corte de control aparezcan los lípidos coloreados de rojo.
4. Lavar en agua destilada.
5. Contrastar con hematoxilina de Mayer o de Gill por 2 a 3 minutos.
6. Lavar en agua corriente y luego en agua destilada.
7. Aplicar el medio de montaje (gelatina glicerinada) y el cubreobjetos.

Resultados:

Lípidos no saturados hidrofóbicos, aceites o grasas minerales en color rojo.
Algunos fosfolípidos en rosa.

P. Técnica de tinción de Klüber y Barrera.

Secciones:

Cortes de tejido incluido en parafina de 10 μ m de grosor.

Material y equipo:

Vasos de Coplin.
Estufa a 37 ó a 60 °C.

Reactivos:

Solución A (azul luxol rápido):

1. En 1000 mL de metanol absoluto.
2. Disolver 1 g de azul luxol rápido.
3. Agregar 5 mL de ácido acético al 10 %.
4. Mezclar y filtrar.

Solución B (reactivo diferenciador 1):

1. En 100 mL de agua destilada.
2. Disolver 0.05 g de carbonato de litio.

Solución C (reactivo diferenciador 2):

1. En 95 mL de etanol absoluto.
2. Agregar 5 mL de agua destilada.

Solución D (reactivo de tinción):

1. En 100 mL de agua destilada.
2. Disolver 0.5 g de violeta de Cresilo.

Solución E (reactivo diferenciador 3):

1. En 100 mL de etanol.
2. Agregar 250 μ l de ácido acético glacial.

Procedimiento:

1. Desparafinar y rehidratar las laminillas (Apéndice F).
2. Colocar las laminillas en la solución A por 2 h a 60 °C. Opcionalmente puede dejarse a temperatura ambiente toda la noche.
3. Enjuagar con etanol al 70 %.
4. Enjuagar con agua corriente.
5. Diferenciar en la solución B hasta distinguir claramente la sustancia blanca de la sustancia gris, luego sumergir rápidamente en la solución C.
6. Enjuagar con agua corriente.
7. Verificar la diferenciación al microscopio y repetir el paso 5 si es necesario.
8. Sumergir en la solución D por 10-20 min.
9. Enjuagar con agua corriente.
10. Sumergir en la solución E por 4-8 seg.
11. Deshidratar con etanol al 96 % mediante 1 inmersión rápida.
12. Colocar en etanol al 96 % por 2 min.
13. Colocar en etanol absoluto por 2 min (2 cambios).
14. Colocar en etanol-xilol (1:1) por 3 min.
15. Colocar en xilol por 2 min (2 cambios).
16. Montar los cortes con Entellan®.

Resultados:

Mielina de color azul intenso.
Células de color violeta o rosa.

Q. Técnica de impregnación argéntica de Marsland, Gleys y Erickson.

Secciones:

Cortes de tejido incluido en parafina de 10 μ m de grosor.

Material y equipo:

Vasos de Coplin.
Estufa a 60 °C.

Reactivos:

Solución A (nitrato de plata):

1. En 80 mL de agua desionizada.
2. Disolver 16 g de nitrato de plata.

Solución B (fijador):

1. En 45 mL de agua desionizada.
2. Agregar 5 mL de formaldehído (formalina comercial al 10 %).

Solución C (nitrato de plata amoniacal):

1. En 30 mL de la solución A.
2. Agregar 20 mL de etanol absoluto.
3. Se agrega hidróxido de amonio concentrado gota a gota hasta que se precipita la solución y luego hasta que se disuelva la plata, y luego se agregan 5 gotas más.

Solución D (fijador de tiosulfato):

1. Se utilizan 45 mL de agua destilada.
2. Se agregan 5 g de tiosulfato de sodio.

Procedimiento:

1. Desparafinar las laminillas (Apéndice F).
2. Colocar las laminillas en la solución A por 45 min o hasta que adquieran una coloración amarillenta.
3. Colocar las laminillas en la solución B por 15 seg o hasta que adquieran una coloración café.
4. Colocar las laminillas en la solución C por 30 seg.
5. Colocar las laminillas en la solución B por 1-2 min.
6. Examinar al microscopio y repetir los pasos 4 y 5 si es necesario.
7. Enjuagar con agua desionizada.
8. Fijar la reacción con la solución D por 1-5 min.
9. Enjuagar con agua desionizada.
10. Deshidratar con etanol al 96 % mediante 1 inmersión rápida.
11. Colocar en etanol al 96 % por 2 min.
12. Colocar en etanol absoluto por 2 min (2 cambios).
13. Colocar en etanol-xilol (1:1) por 3 min.
14. Colocar en xilol por 2 min (2 cambios).
15. Montar los cortes con Entellan®.

Resultados:

Axones y núcleos de color café oscuro a negro.
Fondo amarillento.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Jaime García Juárez

Candidato para el Grado de Doctorado en Ciencias
con Orientación Terminal en Morfología

Título de la Tesis: Evaluación clínica e histológica del efecto del ácido lipoico (Thioctacid®) en la intoxicación por *Karwinskia humboldtiana* en la rata Wistar.

Área de Estudio: Morfología

Biografía:

Datos personales: Nacido en Guadalupe, Nuevo León, México. El 10 de Agosto de 1970. Hijo del Sr. Francisco García Hernández y la Sra. Josefina Juárez Rodríguez. Actualmente casado con la Dra. Patricia Galván Gálvez.

Escolaridad: Egresado de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León en 1994. **Grados obtenidos:** Médico Cirujano y Partero en Mayo de 1997 y Maestro en Ciencias con Especialidad en Morfología en Junio de 2004.

Experiencia profesional: Servicio Social de Medicina en la Jurisdicción I de la S.S.A. de San Luis Potosí, S.L.P., de Agosto de 1994 a Julio de 1995. Consulta General en Clínica y Maternidad Alba de Abril de 1997 hasta Septiembre de 1999. **Participación en Cursos:** Instructor y Becario de Histología de 1989 a 1993. Profesor de Histología y Biología Celular de Pregrado desde Septiembre de 1997 hasta la fecha. Profesor e Instructor de laboratorio de Histología de Postgrado en 2003, 2004, 2005 y 2006. Facultad de Medicina de la U.A.N.L. Profesor de Capacitación para el Exámen Nacional de Residencias Médicas en 1999, 2000 y 2001. **Participación en Congresos:** XX Congreso Nacional de Investigación Biomédica en 2002, XXI Congreso Nacional de Investigación Biomédica en 2003, XXVII Congreso Nacional de Histología en 2003, XV Reunión Nacional de Morfología en 2003, XXII Congreso Nacional de Investigación Biomédica en 2004, XIII Congreso Nacional de Histología e Ingeniería Tisular y First International Congress of Histology and Tissue Engineering en Alcalá de Henares Madrid en 2005, XXXIII Congreso Nacional de Histología en 2010, I Congreso de Cuerpos Académicos de Ciencias de la Salud UANL en 2011, XXXIV Congreso Nacional de Histología en 2011 y XXVI Congreso Nacional de Investigación Biomédica en 2011. **Publicaciones:** "Evaluación del efecto del tratamiento con ácido lipoico administrado a la rata Wistar intoxicada con el fruto de *Karwinskia humboldtiana*." Enviado y en revisión. Capítulos 13 y 18 del Texto de Histología de Sepúlveda 2011. **Reconocimientos:** Estudiante Distinguido de Doctorado en Morfología en Octubre de 2011.

ACUSE DE RECIBO.

IJM 548-11

Dear Dr. Jaime García Juárez

I received your article entitled "Evaluación del efecto del tratamiento con ácido lipoico administrado a la rata Wistar intoxicada con el fruto de *Karwinskia humboldtiana*".

Thank you for submitting your manuscript to be considered for publication in International Journal of Morphology.

You will be notified as soon as the editorial board decides concerning the publication of your manuscript.

Your Sincerely

Dr. Mariano del Sol
Editor
Int. J. Morphol.

LA SOCIEDAD MEXICANA DE HISTOLOGÍA Y LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS A TRAVÉS DEL CUERPO ACADÉMICO "MANEJO
BIOTECNOLÓGICO DE RECURSOS ACUÁTICOS" Y EL CUERPO ACADÉMICO
"FISIOLÓGIA Y FISIOPATOLOGÍA"

OTORGAN EL PRESENTE
RECONOCIMIENTO A:

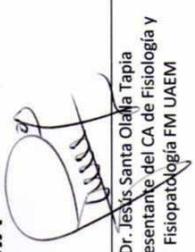
**JUÁREZ RODRIGUEZ OMAR ALEJANDRO, PIÑEIRO
MARTÍNEZ ANTONIO, GARCÍA JUÁREZ JAIME Y
SEPVEDA SAAVEDRA JULIO.**

Por su presentación en modalidad cartel con el trabajo:
**EVALUACIÓN DEL EFECTO ÁCIDO TIÓCTICO SOBRE EL RIÑÓN DE RATAS
WISTAR INTOXICADAS CON FRUTO DE *Karwinskia humboldtiana*.**

**XXXIII CONGRESO NACIONAL DE HISTOLOGÍA
DEL 27 AL 29 DE OCTUBRE DEL 2010**


Dra. Claudia Sierra Castillo
Presidenta del Comité Organizador
Representante del CA Manejo
Biotecnológico de Recursos Acuáticos CIB UAEM


M. en C. Nora Luz Rivero Ramirez
Presidenta de la Sociedad Mexicana de
Histología


Dr. Jesús Santa Olajía Tapia
Representante del CA de Fisiología y
Fisiopatología FM UAEM

Cuernavaca Morelos 29 de Octubre del 2010.





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE ODONTOLÓGIA

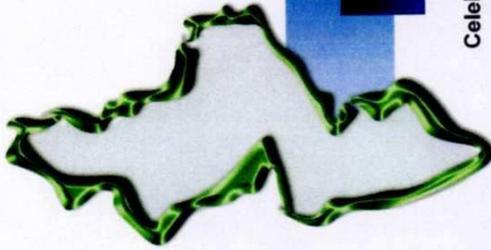


Otorgan el presente

RECONOCIMIENTO

a

García Juárez J., Salazar Leal M. E., Romero Díaz V. J.,
Guzmán López S., Sepúlveda Saavedra J.



Por la presentación de su trabajo

EVALUACIÓN CLÍNICA E HISTOLÓGICA DEL EFECTO DEL ÁCIDO LIPOICO (TIÓCTICO)
EN LA INTOXICACIÓN POR *Karwinskia humboldtiana* EN LA RATA WISTAR



de Ciencias de la Salud UANL

Celebrado en el Centro de Convenciones de la Facultad de Odontología de la U.A.N.L.
del 24 al 26 de Agosto del 2011

Dra. Matihela Garza Enríquez
DIRECTORA DE LA FACULTAD DE ODONTOLÓGIA

Dr. en C. Mario César Salinas Carmona
Secretaría de Investigación, Innovación y Posgrado

Dr. Juyán Manuel Solís Soto
PRESIDENTE DEL COMITÉ ORGANIZADOR





XXXIV Congreso Nacional de Histología
México, D.F. Octubre 26-28, 2011

La Sociedad Mexicana de Histología, A.C.

Otorga la presente

CONSTANCIA

a: Jaime García Juárez, Martha Elizabeth Salazar Leal,
Viktor Javier Romero Díaz, Santos Guzmán López
y Julio Sepúlveda Saavedra

Por su participación en el trabajo de cartel:
*"Evaluación clínica e histológica del efecto del ácido lipoico
(tioctico) en la intoxicación por Karwinskia humboldtiana
en la rata wistar."*

Facultad de Ciencias, UNAM
México, D.F.

Dr. Guillermo Laguna Hernández
Presidente SMH



Facultad de Medicina



La Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León
a través de la Subdirección de Investigación otorga
la presente

CONSTANCIA

a:
M.C. Jaime García Juárez, Dr. C. Martha Elizabeth Salazar Leal, M.C. Viktor Javier Romero Díaz, Dr. med.
Santos Guzmán López, M.D., Ph.D. Julio Sepúlveda Saavedra

por la presentación en **CARTEL** del trabajo titulado:

"EVALUACIÓN CLÍNICA E HISTOLÓGICA DEL EFECTO DEL ÁCIDO TIÓCTICO EN LA INTOXICACIÓN POR KARWINSKIA HUMBOLDTIANA EN LA RATA WISTAR."



Llevado a cabo del 22 al 24 de Septiembre de 2011
en Monterrey, NL. México
"Alere Flammam Veritatis"


Dr. med. Santos Guzmán López
Director



Dr. C. Guillermo Elizondo Riojas
Secretario de Fomento a la Investigación


Dr. med. José Gerardo Loyaález González
Subdirector de Investigación


Dr. med. Consuelo Treviño Garza
Coordinadora XXVI Congreso Nacional
de Investigación en Medicina



La Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León
a través de la Subdirección de Estudios de Posgrado

Otorga el presente

Reconocimiento

al

M.C. Jaime García Juárez

Por su trayectoria académica como

Estudiante Distinguido

en el Programa de Doctorado en Ciencias con Orientación Terminal en:

MORFOLOGIA

durante el ciclo escolar 2010-2011

"Alere Flammam Veritatis"

Monterrey, N. L. a 20 de octubre de 2010.


DR. med. DONATO SALDIVAR RODRIGUEZ
Director


DR. med. JUAN O GALINDO GALINDO
Subdirector