



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFFECTO DE LA ADMINISTRACION SISTEMICA
DE DAPSONA SOBRE LA NEUROTOXICIDAD
INDUCIDA POR EL ACIDO QUINOLINICO EN
EL CUERPO ESTRIADO DE LA RATA:
ESTUDIO MORFOLOGICO**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A:
ANA ERIKA RODRÍGUEZ MARTINEZ

ASESOR: DR. ABEL SANTAMARIA DEL ANGEL



MEXICO, D.F.

2000.

279704



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: EFECTO DE LA ADMINISTRACION SISTEMICA DE DAPSONA SOBRE LA NEUROTOXICIDAD INDUCIDA POR EL ACIDO QUINOLINICO SOBRE EL CUERPO ESTRIADO DE LA RATA: ESTUDIO MORFOLOGICO.

realizado por Ana Erika Rodríguez Martínez

con número de cuenta 9354903-3 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario Dr. Abel Santamaría del Ángel
Propietario Dra. Marcela Esperanza Aguilar Morales
Propietario Biol. Juana Villeda Hernández
Suplente Dra. María Luisa Fanjul Peña
Suplente Biol. Teresa Sosa Rodríguez

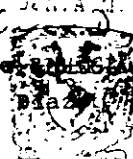
[Handwritten signatures: Abel Santamaría del Ángel, Marcela Esperanza Aguilar Morales, Juana Villeda Hernández, María Luisa Fanjul Peña, Teresa Sosa Rodríguez]

FACULTAD DE CIENCIAS

DE N. A. M.

Consejo Departamental de Estudios Profesionales

DRA. Edna María Suárez



DEPARTAMENTO DE BIOLÓGICAS

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi director de tesis Dr. Abel Santamaría del Angel por su apoyo y dedicación a mi trabajo.

Agradezco a mis sinodales: Dr. Abel Santamaría del Angel, Dra. Marcela E. Aguilar Morales, M en C Juana Villeda Hernández, Dra María Luisa Fanjul Peña y a la Biol. Teresa Sosa Rodríguez por sus comentarios, sugerencias y por el tiempo que dedicaron a este trabajo.

Agradezco al Laboratorio de Neuroquímica del INNN en especial a Laura, Sonia, Moi, Abi y a Leti, por toda la ayuda y amistad que me han dado.

Agradezco al Laboratorio de Neuromorfología del INNN a Mari, Juanita por el tiempo que me dedicaron.

Agradezco al Dr. Arturo Hernández Cruz por darme la oportunidad de conocer las neurociencias, a Nicolas, Ricardo, Tere y Carlos por su tiempo y amistad.

Agradezco a Ricardo Juárez S. por su amistad incondicional, su apoyo y por todo el amor que me ha brindado.

Agradezco a todos los amigos y personas de la fac. de Ciencias que en algún momento me ayudaron como Ricardo G y Sandra P.

DEDICATORIAS

A mi papá y a mi mamá por todos sus sabios consejos y su apoyo incondicional en todo momento, por la confianza, dedicación y amor que siempre me ha dado, por su amistad incondicional y por mil y un cosas más. Gracias.

A Miguel y a Alfre por ser los mejores hermanos del mundo, por todos sus consejos, apoyo y cariño que me han dado.

A Gabi mi hermana por las interminables charlas que hemos tenido, por su confianza y por ser una gran amiga.

Indice

Página

1 Antecedentes.....	4
1.1 Aminoácidos excitadores (AAE).....	4
1.2 Receptores para AEE.....	4
2 Ácido quinolínico (QUIN).....	5
2.2 Neurotoxicidad del QUIN.....	7
2.3 El QUIN como modelo experimental de la enfermedad de Huntington (EH).....	8
3 Sulfonas.....	9
3.1 Dapsona (DDS).....	9
3.2 Usos terapéuticos y actividad antibacteriana de la DDS.....	10
4 Objetivos.....	13
5 Hipótesis.....	14
6 Materiales.....	15
7 Métodos.....	16
8 Resultados.....	19
8.1 Descripción histológica.....	19
8.2 Efecto de la DDS sobre el número de células sanas en cuerpo estriado de ratas lesionadas con QUIN.....	20
8.3 Efecto de la DDS sobre el número de células dañadas en cuerpo estriado de ratas lesionadas con QUIN.....	21
8.4 Efecto de la DDS sobre el número de células totales en cuerpo estriado de ratas lesionadas con QUIN.....	21
8.5 Efecto de la DDS sobre la tasa de mortalidad neuronal en cuerpo estriado de ratas lesionadas con QUIN.....	22
9 Discusión.....	23
10 Conclusiones.....	28
11 Referencias.....	29

Resumen

Los ácidos glutámico y aspártico son aminoácidos excitadores y tienen un papel como neurotransmisores excitadores. Estos actúan sobre receptores a glutamato tales como los receptores tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), involucrados en la hiperexcitabilidad neuronal típica de la epilepsia, enfermedades neurodegenerativas y muerte celular producida por exceso de excitación, isquemia, anoxia o hipoglucemia. El ácido quinolínico (QUIN) es un metabolito endógeno de L-triptofano que se forma por la vía de la kinurenina y presenta actividad como agonista de receptores glutamatérgicos tipo NMDA. El QUIN ha sido el mejor modelo de la enfermedad de Huntington (EH). Por su parte, la dapsona (4,4'-diamino-difenilsulfona o DDS) es una sulfona, y un conocido agente antimicrobiano y bacteriostático utilizado contra la lepra y en diversas dermatitis. Recientemente, la DDS fue probada como agente anticonvulsivante. En este trabajo se evaluó el efecto de la DDS como posible agente protector después de la administración intraestriatal de QUIN: se administraron dosis de DDS de 6.25, 9.37, 12.5 y 25.0 mg/kg vía intraperitoneal y dos horas después se administró un μl de QUIN (240 nmol / μl) en cuerpo estriado derecho de las ratas. Siete días después, se realizaron perfusiones intracardiacas, extracción y procesamiento de tejido estriatal por técnicas histológicas convencionales, y se procedió a hacer el conteo celular general, obteniéndose un mayor número de células sanas al utilizar una dosis de DDS de 12.5 mg/kg. Estos hallazgos sugieren un papel protector de la DDS sobre el patrón de excitotoxicidad ejercido por el QUIN en cuerpo estriado de rata.

Abreviaturas

SNC: Sistema Nervioso Central

NMDA: N-metil-D-aspartato

AAE: aminoácidos excitadores

QUIN: ácido quinolínico

DDS: dapsona (4,4'-diaminofenilsulfona)

1. Antecedentes

1.1. Aminoácidos excitadores (AAE)

Los aminoácidos cuyo efecto excitador ha sido demostrado en Sistema Nervioso Central son los ácidos aspártico y glutámico. Sin duda, ambos desempeñan un papel como neurotransmisores excitadores en muchas regiones cerebrales. En los últimos años, los receptores al glutamato (o en general, receptores a aminoácidos excitadores) han sido objeto de extensos estudios, tanto por su localización intracerebral, como con respecto a su mecanismo de funcionamiento y farmacología. Este interés ha sido estimulado por diversos estudios experimentales del receptor tipo N-metil-D-aspartato (NMDA, llamado así por reconocer específicamente a esta molécula), entre estos estudios están la diferenciación y el crecimiento neural, la plasticidad sináptica manifestada en diversos procesos como la llamada potenciación a largo plazo, la hiperexcitabilidad neural típica de la epilepsia, enfermedades neurodegenerativas y la muerte celular producida por exceso de excitación (excitotoxicidad), isquemia, anoxia o hipoglucemia (Pasantes y col., 1991).

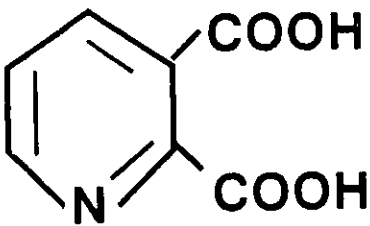
1.2 Receptores para AAE

Los receptores para aminoácidos excitadores (AAE) son genéricamente conocidos también como receptores glutamatérgicos. Existen dos clases de receptores para AAE sensibles a glutamato: a) metabotrópicos, los cuales se encuentran acoplados a proteínas G y ejercen su acción mediante cascadas de segundos mensajeros; y b) ionotrópicos, los

cuales están asociados a canales iónicos y son permeables principalmente a Ca^{2+} y Na^+ . Estos últimos han sido postulados como componentes etiológicos asociados a algunas neuropatías observadas en humanos, tales como la isquemia cerebral, la epilepsia, el mal de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la corea de Huntington, etc. (Simoniani y Coyle, 1996). El papel mediador del glutamato en la sobreexcitación de los receptores metabotrópicos también lleva a patrones de neurotoxicidad descritos recientemente (Sacaan y Shoep, 1992).

2. Acido quinolínico (QUIN)

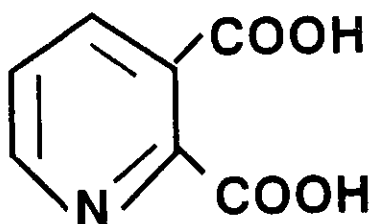
El ácido quinolínico (ácido 2,3-piridín-dicarboxílico o QUIN) es un metabolito endógeno del L-triptofano que se forma en la vía de la kinurenina (Vender, 1975) y presenta actividad como agonista de los receptores glutamatérgicos para NMDA (Stone, 1993).



cuales están asociados a canales iónicos y son permeables principalmente a Ca^{2+} y Na^{+} . Estos últimos han sido postulados como componentes etiológicos asociados a algunas neuropatías observadas en humanos, tales como la isquemia cerebral, la epilepsia, el mal de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la corea de Huntington, etc. (Simonnan y Coyle, 1996). El papel mediador del glutamato en la sobreexcitación de los receptores metabotrópicos también lleva a patrones de neurotoxicidad descritos recientemente (Sacaan y Shoep, 1992).

2. Acido quinolínico (QUIN)

El ácido quinolínico (ácido 2,3-piridín-dicarboxílico o QUIN) es un metabolito endógeno del L-triptofano que se forma en la vía de la kinurenina (Vender, 1975) y presenta actividad como agonista de los receptores glutamatérgicos para NMDA (Stone, 1993).



El QUIN fue localizado primeramente en tejido cerebral de rata y de humanos (Wolfensberg y col., 1984) y se encuentra preferencialmente en la corteza cerebral, cuerpo estriado, hipocampo, diencefalo, cerebelo y tallo cerebelar de varias especies de mamíferos. Su concentración aumenta con la edad, pues se ha comprobado que en animales de edad avanzada, las concentraciones de QUIN en cerebro llegan a ser elevadas (Moroni y col., 1984). Lo anterior sugiere que el QUIN podría estar asociado a procesos de envejecimiento celular tales como el daño oxidativo y la apoptosis (Stone, 1993).

Por la localización de las respectivas enzimas de síntesis - la 3-hidroxi-antranilato-oxigenasa (3-HAO) - y de degradación - la QUIN-fosforribosil-transferasa (QPRT) - del QUIN, se cree que el papel fisiológico de este metabolito podría estar relacionado con su actividad como neurotransmisor o neuromodulador en SNC (Stone, 1993).

Por otra parte QUIN presenta una baja capacidad para cruzar la barrera hematoencefálica, por lo que se cree que su contenido en cerebro es originado endogenamente a partir de la vía de la kinurenina (Foster y col., 1984) (ver Esquema 1).

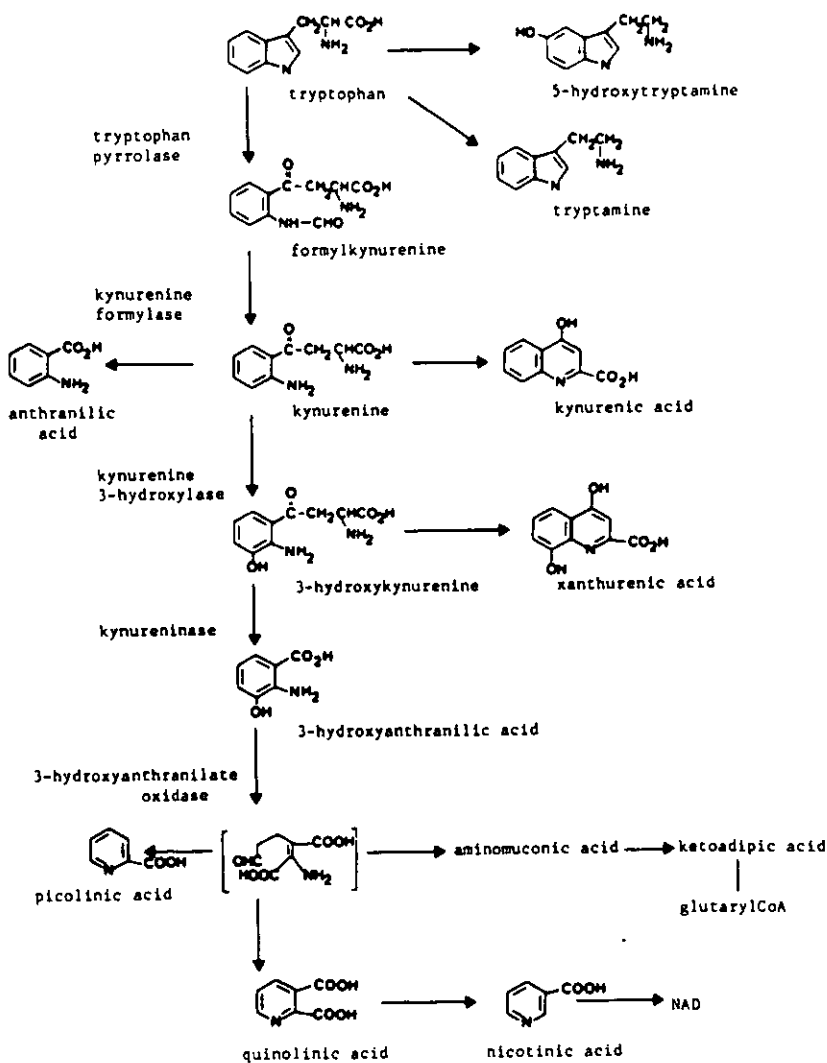


Fig. 2. Kynurenine pathway of tryptophan metabolism.

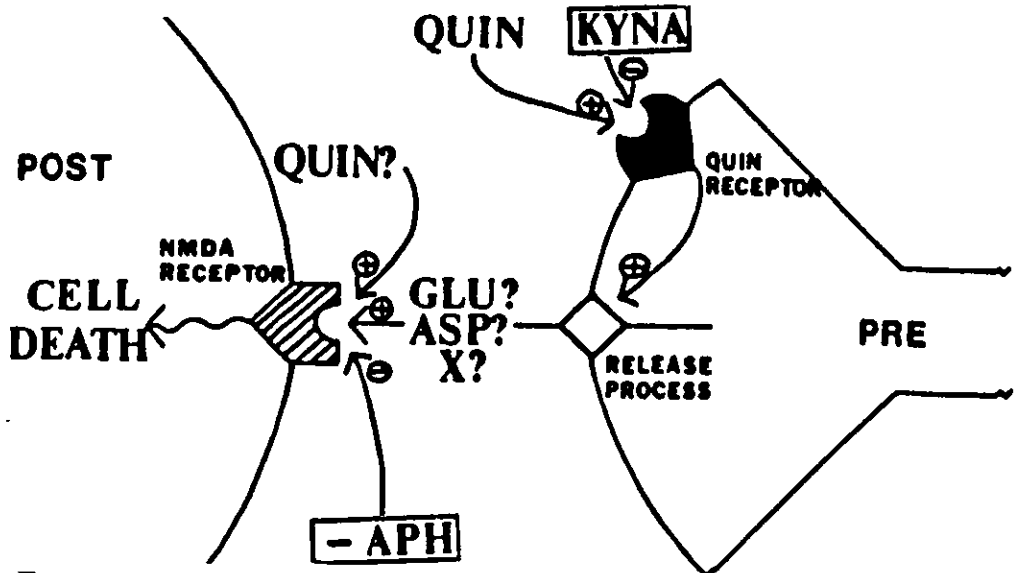
Esquema 1. Tomado de J. of Neurol. Sciences Vol. 95 (Bruyn, RPM and Stoof, JC. 1990)

Es interesante el hecho que al parecer el cuerpo estriado no cuenta con mecanismos de degradación del QUIN en el espacio extracelular por carecer de la QPRT u otras enzimas de degradación de este metabolito (Stone, 1993), lo anterior podría explicar la selectividad de los efectos tóxicos del QUIN sobre dicha región cerebral.

2.2. Neurotoxicidad del QUIN

El QUIN ejerce su patrón de toxicidad de dos formas:

- 1) activando receptores presinápticos para NMDA y a su vez induciendo la liberación, por excitación, de algún posible neurotransmisor endógeno, el cual a su vez podría unirse a un receptor post-sináptico glutamatérgico de tipo NMDA; y 2) fundamentalmente activando receptores NMDA directamente sobre la estructura postsináptica, con la consecuente generación de cascadas de eventos iónicos y metabolitos resultado de dicha activación (ver Esquema 2).



Esquema 2. Tomado de Life Sci. Vol. 35 (Schwarcz R. et al 1984)

2.3. El QUIN como modelo experimental de la enfermedad de Huntington (EH)

En años recientes, considerable interés se ha centrado en las propiedades neurotóxicas de los AAE y su posible relevancia para el estudio de enfermedades neurodegenerativas humanas. El término excitotoxina ha sido acuñado para la familia de AAE que producen lesiones neuronales características que involucran la muerte celular por sobre-excitación. El diseño de modelos experimentales de enfermedades neurodegenerativas ha conducido a la hipótesis de que las excitotoxinas endógenas pueden existir y actuar en diversas patogénesis humanas tales como el Parkinson, Alzheimer y Huntington (Simonnan y Coyle, 1996).

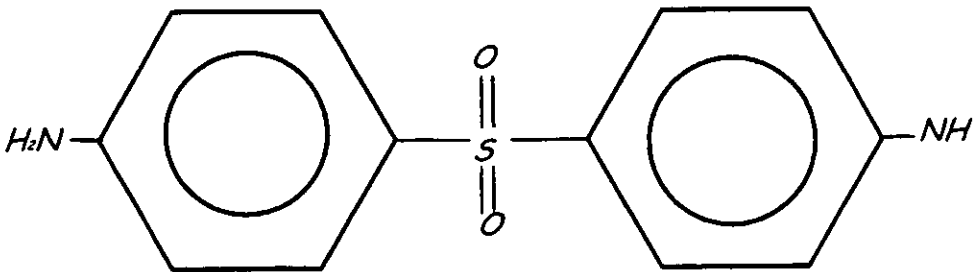
En términos generales, en un modelo clásico de excitotoxicidad, los neurotransmisores liberados desde las estructuras presinápticas por activación de receptores tipo NMDA bien podría ser el glutamato, el aspartato o algún otro agente excitador aún desconocido (Schwarcz y col., 1984).

Uno de los más prometedores candidatos de la enfermedad de Huntington descubiertos para ser utilizado como modelo es el QUIN. Las propiedades excitotóxicas particulares del QUIN se acentúan por su naturaleza endógena, estando disponible para las funciones fisiológicas y fisiopatológicas del SNC, causando muerte neuronal selectiva (Schwarcz y col, 1984).

3. Sulfonas

3.1. Dapsona (DDS)

Las sulfonas son derivados genéricos de la 4,4'-diamino-difenilsulfona (Dapsona o DDS) (ver Esquema 3) y todas presentan propiedades farmacológicas comunes (Goodman y Gilman, 1990). Las sulfonas pronto atrajeron el interés de los investigadores por su semejanza química con las sulfamidas. En 1937, se observó que la DDS era treinta veces más activa que la sulfanilamida contra la infección estreptocócica del ratón. Ninguna de las sulfonas sintetizadas desde entonces tienen tanto valor en la terapéutica de las infecciones microbianas como la DDS. Más aún, Rist y colaboradores (1940) y Feldman y colaboradores (1941) observaron que tanto la DDS como la glucosulfona (o promin, un conocido derivado de la DDS) eran ambos eficaces para atenuar las infecciones experimentales por el bacilo de la tuberculosis.



DAPSONA

3.2. Usos terapéuticos y actividad antibacteriana de la DDS

La DDS es un conocido agente antimicrobiano y bacteriostático (pero no bactericida) contra *M. leprae* y se estima una sensibilidad a este fármaco de entre 1 y 10 ng/ml para microorganismos reestablecidos en pacientes no tratados (Levy y Peters, 1976). La DDS es también una sulfona usada comunmente como quimioterapia contra la lepra y en la profilaxis contra la malaria, y en combinación con trimetropina para el tratamiento de la neumonía causada por *Pneumocystis carinii*. La DDS es también efectiva en una gran variedad de dermatitis inflamatorias no infecciosas, aunque las bases moleculares de la acción terapéutica de la DDS en inflamaciones cutáneas aún no es clara. Aparentemente este fármaco tiene la capacidad de interferir con la síntesis del ácido fólico en microorganismos susceptibles. Muchas enfermedades dermatológicas en las que se utiliza DDS como fármaco de elección, están caracterizadas por la infiltración de neutrófilos; sin embargo, la DDS no interfiere con la migración, fagocitosis o liberación de enzimas lisosomales de los neutrófilos, las cuales son inhibidas por la DDS. Existen dos hipótesis para explicar esta acción: 1) La DDS puede inhibir bases de la mieloperoxidasa y bases de peróxido de hidrógeno en sistemas citotóxicos de neutrófilos (Fredenberg y Malkinson, 1987); ó 2) puede actuar como atrapador de especies reactivas del oxígeno, y así minimizar la inflamación asociada a la producción de éstas especies reactivas del oxígeno (Wozel y Barth, 1988).

Además de usarse contra la lepra, la DDS ha sido utilizada en dermatología, como sustitución de esteroides y por sus efectos anti-inflamatorios en enfermedades autoinmunes y dermatitis.

Reportes clínicos han sugerido que la DDS también puede ser usada para una variedad de otras erupciones dérmicas, incluyendo dermatitis linear de IgA (Leonard y col., 1982), dermatitis pustular subcorneal (Olsen y col., 1979), soriasis pustular generalizada (Macmillan y Champion, 1973) y la vasculitis necrosante (Fredenberg y Malkinson, 1987). Recientemente, la DDS fue probada como un agente anticonvulsivante efectivo contra convulsiones amigdalinas e hipocampales (Hamada y col., 1991; Ishida y col., 1992), sugiriendo que la DDS puede controlar la descarga neuronal en estos modelos; sin embargo, el mecanismo preciso de acción protectora de esta sulfona en alteraciones epileptogénicas todavía es poco claro. Por su demostrado potencial terapéutico, el empleo de la DDS se ha orientado a atenuar el patrón de neurotoxicidad del ácido quinolínico (Santamaría y col., 1997), previniendo las alteraciones bioquímicas y conductuales observadas después de la administración intraestriatal de esta toxina en ratas. El efecto protector de la DDS sobre la toxicidad producida por el QUIN resultó dosis-dependiente (Santamaria y col., 1997). Debido a lo anterior, se sugirió que la DDS puede actuar como antagonista glutamatérgico o como un posible bloqueador de canales de calcio.

Podrían ser postulados dos posibles mecanismos de protección podrían para explicar la acción de la DDS: 1) Bloqueo de procesos excitatorios mediados por receptores a glutamato; ó 2) incremento en la inhibición neuronal probablemente mediada por neuronas GABAérgicas (Milgram y col., 1991).

La DDS es así empleada para muchos propósitos terapéuticos en humanos, y estos últimos sugieren una posible utilidad terapéutica en algunas alteraciones neurológicas e

inflamatorias (Santamaría y col, 1997). A pesar de la prueba funcional, aún no existen evidencias morfológicas del efecto protector que la DDS ejerce sobre el SNC afectado por el QUIN.

Debido a lo anterior, el interés de este trabajo se centró en caracterizar el posible efecto protector de la DDS a nivel morfológico, en tejido estriatal de ratas lesionadas tópicamente con QUIN.

4. Objetivos

- Evaluar, mediante técnicas histológicas, el daño neuronal inducido por el QUIN en cuerpo estriado de ratas.
- Analizar, mediante técnicas histológicas, el efecto de dosis crecientes de DDS sobre la neurotoxicidad inducida por el QUIN en cuerpo estriado de rata.

5. Hipótesis

- El QUIN producirá daño neuronal en cuerpo estriado; que se va contraponiendo por el efecto neuroprotector de la DDS.
- Este efecto neuroprotector será dosis dependiente.

6. Materiales

Animales

Se utilizaron 21 ratas Wistar machos de 250 a 300 g de peso. Se formaron 7 lotes de tres animales por caja para los diferentes tratamientos.

Reactivos

Se usó solución salina para la preparación del QUIN (240 nmol/ μ l) y se ajustó el pH a 7.4 con NaOH 1 N. Para la preparación de la DDS, se utilizó una solución de polietilenglicol al 4 % en H₂O deionizada. Las concentraciones preparadas de la dapsona fueron 6.25, 9.37, 12.5 y 25 mg/kg.

7. Métodos

Pretratamientos

Lote 1. Control, los animales fueron inyectados intraperitonealmente (i.p) con solución salina, media hora después se inyectó intraestriatalmente (i.e) 1µl de solución salina.

Lote 2. QUIN, los animales fueron inyectados i.p con solución salina e i.e con ácido quinolínico (240 nmol/µl).

Lote 3. DDS, los animales fueron inyectados i.p con DDS(12.5mg/kg) e inyectados i.e con solución salina .

Lote 4. Tratamiento 1, los animales fueron inyectados con DDS i.p (6.25 mg/kg) + QUIN i.e (240nmol/µl).

Lote 5. Tratamiento 2, los animales fueron inyectados con DDS i.p (9.375 mg/kg) + QUIN i.e (240nmol/µl)

Lote 6. Tratamiento 3, los animales fueron inyectados con DDS i.p (12.5 mg/kg) + QUIN i.e (240nmol/µl).

Lote 7. Tratamiento 4, los animales fueron inyectados con DDS i.p (25 mg/kg) + QUIN i.e (240nmol/µl).

Microinyección estereotáxica

Treinta minutos después de los respectivos pretratamientos con DDS y/o solución salina vía i.p., las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (50mg/kg) y sometidas a inyecciones unilaterales de QUIN (240 nmol/ μ l), con un volumen de 1 μ l, con una microjeringa Hamilton de 10 μ l en el cuerpo estriado derecho de los animales a las siguientes coordenadas estereotáxicas: 0.5 mm anterior a bregma, 2.6 mm lateral a bregma y 4.5mm ventral a la dura. De acuerdo con el atlas estereotáxico del cerebro de rata de Paxinos y Watson (1998). El QUIN fue administrado en un periodo de 2 minutos y la jeringa fue mantenida en en el sitio durante otros dos minutos después de los cuales fue removida lentamente.

Perfusión

Después de siete días, el cerebro de las ratas fue perfundido, realizando una punción en el ventrículo derecho del corazón y se procedió a drenar la sangre durante diez minutos con solución salina y heparina, para evitar coagulación (500 ml de suero y 1 ml de heparina); transcurrido este tiempo, se perfundió a cada animal con formaldehído al 10% en suero. Se extrajo el cerebro y se cortó el tejido 3 mm hacia la derecha y 3 mm a la izquierda de la lesión; esta muestra se colocó en un frasco con paraformaldehído al 10% y se procedió a la inclusión en parafina (Anexo I).

Se hicieron cortes seriados de 5μ de grosor, y se utilizaron las siguientes técnicas histológicas: Hematoxilina -Eosina (Anexo III), Tricrómico de Mason (Anexo IV), Violeta de cresilo (Anexo II).

Para el conteo celular se tomaron 10 campos al azar por laminilla.

Análisis Estadístico

Para el análisis del conteo de células en los diferentes tratamientos se realizó un análisis de varianza de Kruskal-Wallis. Posteriormente, se consideró a los diferentes tratamientos para estadística paramétrica comparativa, por lo que se les aplicó una prueba de Tukey para comparaciones de medias.

8. Resultados

8.1. Descripción histológica

En la figura 1 A, se muestra el cuerpo estriado de una rata control a la cual se le administró solución salina vía intraestriatal. Se observan neuronas con apariencia normal (N) con paquetes de fibras (f) entre ellas y parénquima normal. La figura 1B presenta una micrografía de estriado de una rata tratada con QUIN que se utilizó como control positivo de daño; en ésta se observan neuronas estriatales necrosadas (d), intenso edema intersticial (*), ausencia de fibras, neuronas hipercromáticas (↑) y algunos núcleos ya en estado picnótico. En el grupo tratado con dapsona a una concentración de 12.5 mg/kg, (control positivo de protección) se encontró que el estriado tenía una apariencia completamente normal con neuronas preservadas (N), parénquima cerebral normal, fibras presentes y preservadas (f). (Figura 1 C)

En la figura 1D se observa el estriado de una rata tratada con QUIN a una concentración de 240 nmol/μl + Dapsona a una concentración de 6.25 mg/kg, en la cual se observa que la dapsona no tuvo efecto protector sobre el tejido neuronal ya que se observan neuronas necrosadas (d), hipercromáticas (↑), núcleos aislados de glía, ausencia de fibras nerviosas, congestión capilar (C) e intenso edema intersticial (*) que son cambios muy parecidos a los vistos en las ratas tratadas sólo con QUIN. En la figura 1E se muestra el estriado de una rata tratada con QUIN + Dapsona 9.375 mg/kg, con presencia de neuronas necrosadas y núcleos hipercromáticos (↑) entre algunas neuronas de apariencia normal (N), fibras dañadas (fd) y poco edema intersticial (*); sugiriendo que al aumentar la concentración de dapsona hay un ligero efecto protector, ya que las alteraciones observadas son menores. La

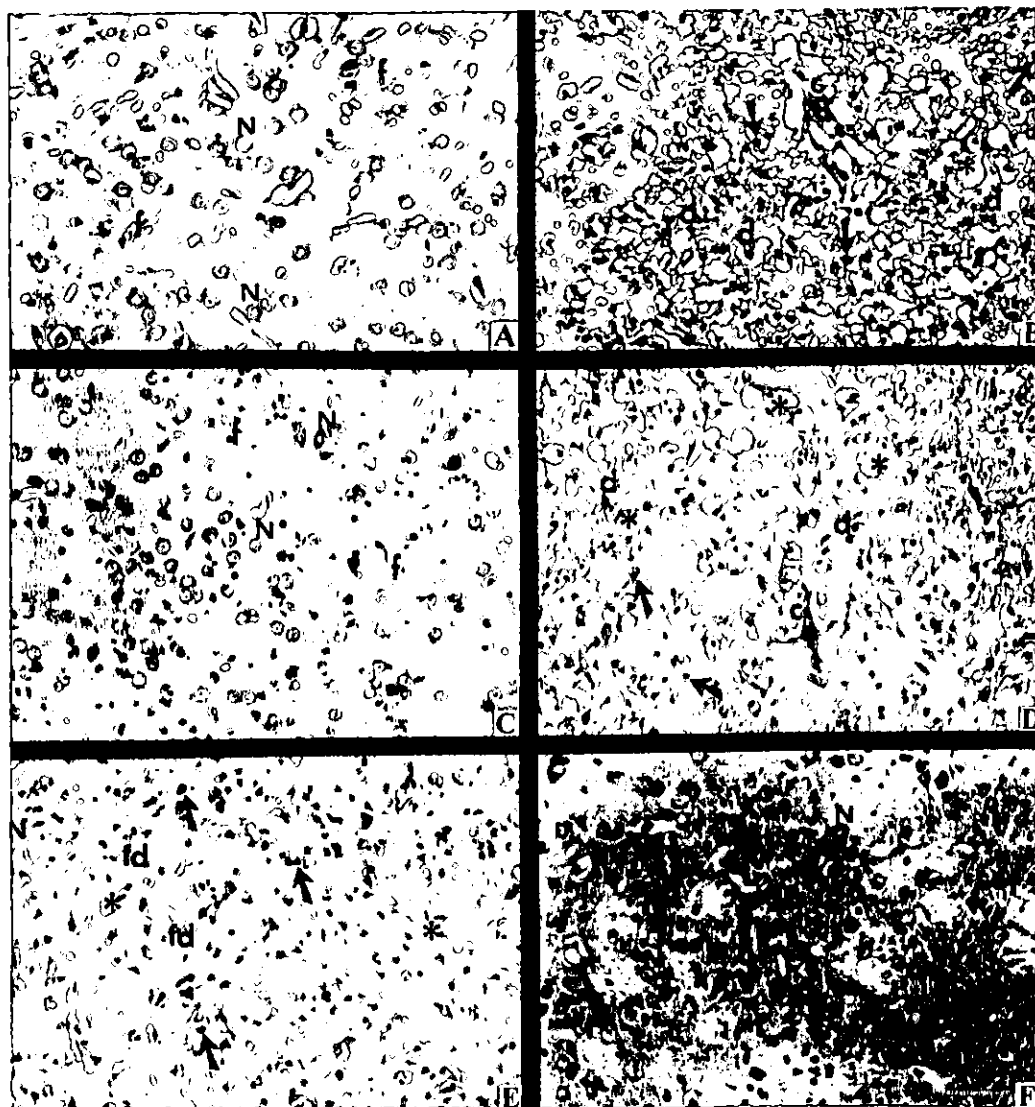


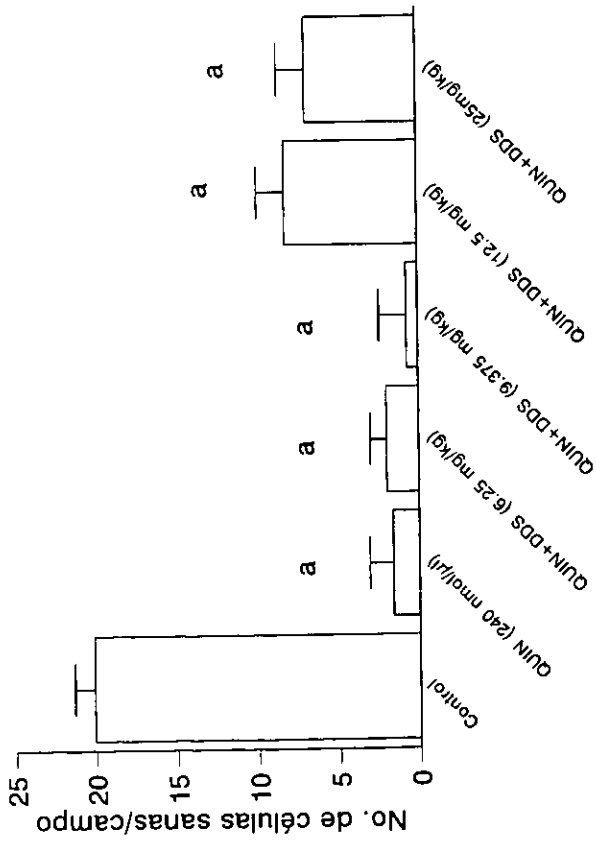
Fig.1.-Micrografías de cuerpo estriado mostrando la inyección estriatal unilateral de QUIN después de 7 días de pretratamiento con DDS. A) Sol.Salina; B) QUIN; C) DDS 12.5 mg/kg; D) QUIN+DDS 6.25mg/kg; E) QUIN+DDS 9.375mg/kg; F) QUIN+DDS 12.5 mg/kg. A) Neuronas normales (N); fibras nerviosas normales (f) y parénquima cerebral bien conservado. B) Intenso edema intersticial (*); congestión capilar (c); neuronas destruidas (d) y núcleos hiper cromáticos (T). C) Neuronas (N) y fibras nerviosas (f) con apariencia normal y con parénquima cerebral bien conservado. D) Núcleos hiper cromáticos (T), congestión capilar (c), neuronas destruidas (d) e intenso edema intersticial (*). E) Núcleos hiper cromáticos (T) fibras nerviosas destruidas (fd) y algunas neuronas normales (N). F) Neuronas (N) y fibras nerviosas (f) completamente normales. Tinción de Violeta de Cresil 20X.

micrografía de la figura 1F muestra el estriado de una rata tratada con QUIN + Dapsona a una concentración de 12.5 mg/kg, en la cual podemos observar un marcado efecto protector sobre el tejido evidenciado por neuronas bien preservadas (N) dispuestas entre paquetes de fibras nerviosas (f) con un parénquima cerebral bien constituido. El mismo efecto fue observado en las ratas tratadas con QUIN + Dapsona a 25.0 mg/kg (micrografía no mostrada).

8.2. Efecto de la DDS sobre el número de células sanas en cuerpo estriado de ratas lesionadas con QUIN

Los resultados de la Gráfica 1 muestran la densidad de células sanas por campo en cuerpo estriado de ratas administradas con QUIN. Si comparamos el tratamiento con QUIN solo (240 nmol/ μ l), se observa que hay un 85 % de disminución del número de células sanas con respecto al tratamiento control. Cuando se administran las dosis de 6.25 y 9.375 mg/kg de DDS + QUIN, se obtienen valores de 85 % y 95 % de disminución del número de células sanas, respectivamente. En contraste, a la dosis de 12.5 mg/kg, el porcentaje de disminución de células sanas fue de 55 %, mostrándose una tendencia similar para la dosis de 25 mg/kg.

Gráfica.1. Efecto de la DDS sobre el número de células sanas en cuerpo estriado de ratas tratadas con QUIN



Densidad de células sanas por campo en cuerpo estriado de ratas administradas intraestriatalmente con QUIN y diferentes dosis i.p. de DDS. Se presentan valores promedio \pm error estándar de 10 campos por sección (3 secciones por rata). ^a $p < 0.05$, diferencias vs control; ANOVA de Kruskal-Wallis seguido por prueba de Tukey.

8.3. Efecto de la DDS sobre el número de células dañadas en cuerpo estriado de ratas lesionadas con QUIN

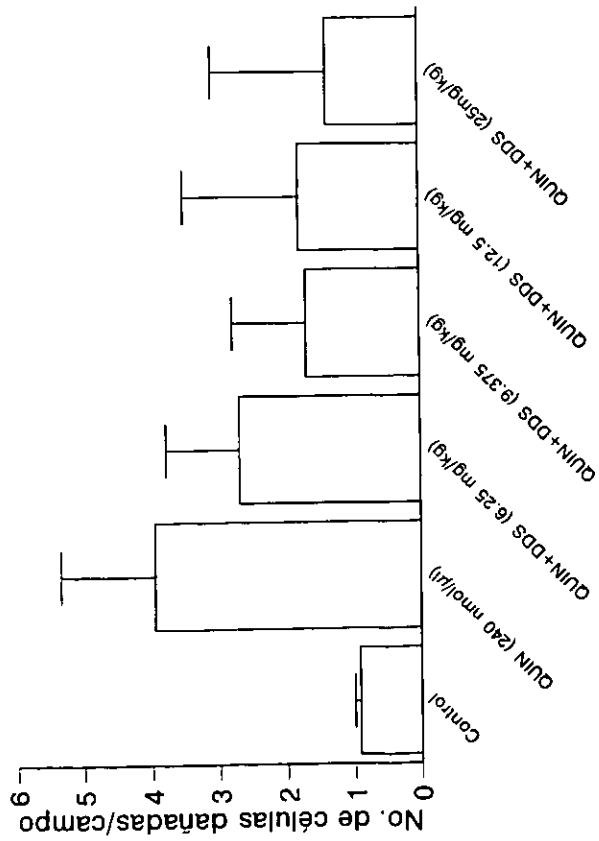
La Gráfica 2 muestra la densidad de células dañadas por campo cuando se administran diferentes dosis de DDS + QUIN. Se observa que cuando se administra únicamente el QUIN (240 nmol/ μ l) vía intraestriatal, hay un evidente aumento en el número de células dañadas (300 %) con respecto al control.

Por su parte, con las dosis de 6.25 y 9.375 mg/kg de DDS, hay un 100 % de aumento en el número de células dañadas para ambas dosis con respecto al valor control, mientras que a las dosis de 12.5 y 25.0 mg/kg no se detectó aumento en el número de células dañadas con respecto al valor control.

8.4. Efecto de la DDS sobre el número de células totales en cuerpo estriado de ratas lesionadas con QUIN

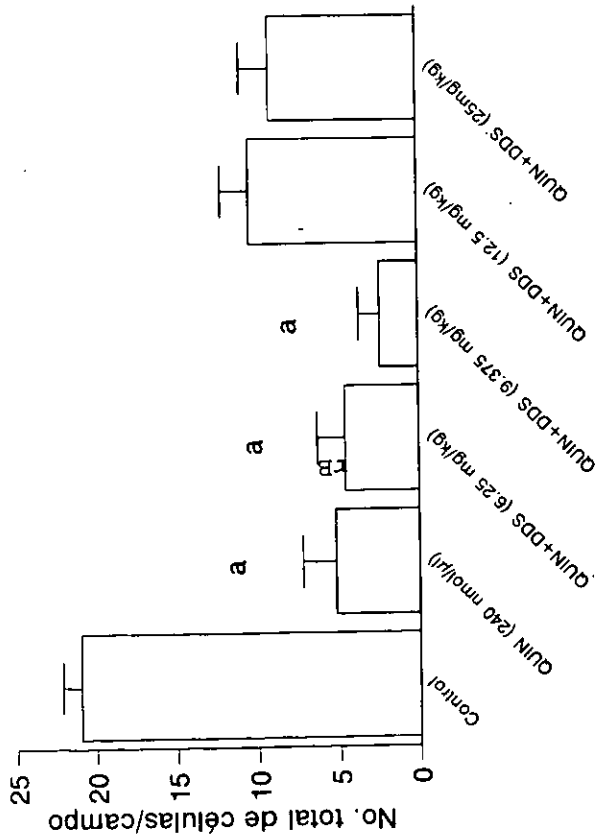
La Gráfica 3 muestra la densidad de células totales por campo en cuerpo estriado de ratas. Se encontró un 67% de disminución en el número de células totales en los lotes tratados con QUIN solo. Al administrar DDS a las dosis de 6.25 y 9.375 mg/kg + QUIN, se observaron disminuciones de 76 % y 81 % vs control, respectivamente. Con la dosis de 12.5 mg/kg se observó una disminución del total celular del 57 %, al igual que a la dosis de 25 mg/kg.

Gráfica. 2. Efecto de la DDS sobre el número de células dañadas en cuerpo estriado de ratas tratadas con QUIN



Densidad de células dañadas por campo en cuerpo estriado de ratas administradas intraestriatalmente con QUIN y diferentes dosis i.p. de DDS. Valores promedio \pm error estándar de 10 campos por sección (3 secciones por rata). ANOVA de Kruskal-Wallis.

Gráfica. 3. Efecto de la DDS sobre el número total de células en cuerpo estriado de ratas tratadas con QUIN

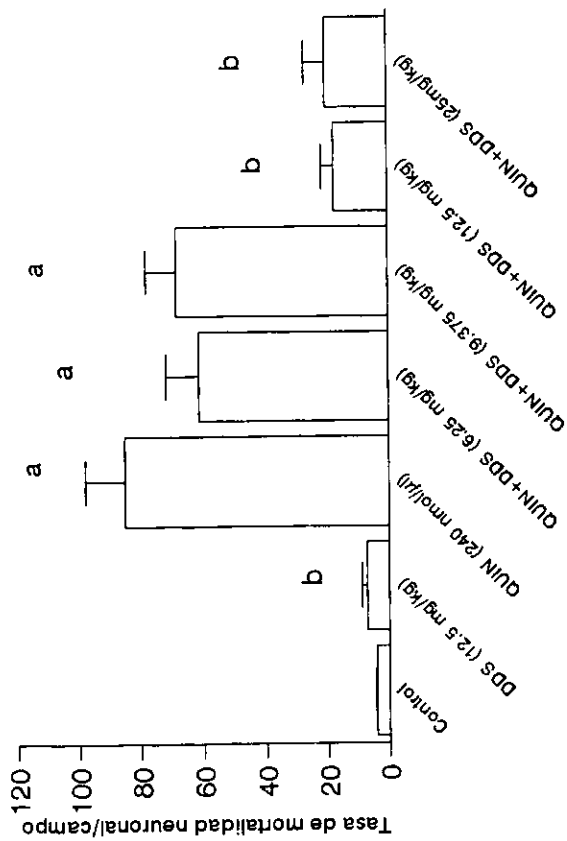


Densidad total de células por campo en cuerpo estriado de ratas administradas intracerebralmente con QUIN y diferentes dosis i.p. de DDS. Valores promedio \pm error estándar de 10 campos por sección (3 secciones por rata). ^a $p < 0.05$, diferencias vs control; ANOVA de Kruskal-Wallis y prueba de Tukey.

8.5. Efecto de la DDS sobre la tasa de mortalidad neuronal en cuerpo estriado de ratas lesionadas con QUIN

En la Gráfica 4 se observa que en animales control, la tasa de mortalidad neuronal es baja, mientras que cuando se introduce un control de DDS (12.5 mg/kg) se observa un 75% de tasa de daño con respecto al control, el cual no resultó significativo. En animales tratados únicamente con QUIN, se observa un 8,000 % de aumento en la tasa de daño con respecto al control y cuando se administran las dosis de 6.25 y 9.375 mg/kg, hay un 5,600 % y 6,400 % de aumento en las tasas de daño vs control, respectivamente. A la dosis de 12.5 mg/kg de DDS hay una tasa de daño neuronal de 1,300 %, y en el caso de la DDS a 25.0 mg/kg, esta tasa fue de 1,500 % vs control.

Gráfica. 4. Efecto de la DDS sobre la tasa de mortalidad neuronal inducida por el QUIN en cuerpo estriado de ratas



Tasa de mortalidad neuronal en cuerpo estriado de ratas administradas intraestriatalmente con QUIN y diferentes dosis i.p. de DDS. Valores promedio \pm error estándar de 10 campos por sección (3 secciones por rata). ^a $p < 0.05$, diferencias vs control; ^b $p < 0.05$, diferencias vs QUIN; ANOVA de Kruskal-Wallis seguido por prueba de Tukey.

9. Discusión

En este trabajo se evaluó el efecto protector de la DDS sobre las alteraciones morfológicas observadas en un modelo excitotóxico de daño neuronal producido por el QUIN en cuerpo estriado de rata. El efecto protector de la DDS sobre la toxicidad ejercida por el QUIN observado en este estudio, resultó ser dosis-dependiente, de acuerdo a previos estudios acerca de efectos neuroprotectores de este fármaco descritos a dosis equivalentes en algunos modelos excitotóxicos similares (Ishida y col., 1992; Altagracia y col., 1994; Santamaría y col., 1997). Como se pudo observar en los animales tratados con DDS y QUIN, a dosis de DDS (6.25 y 9.37 mg/kg) la tasa de mortalidad neuronal no disminuyó significativamente con respecto a la alcanzada por el QUIN sólo, por lo que se concluye que la DDS no tiene efecto protector sobre la toxicidad del QUIN a dichas dosis; sin embargo, es importante mencionar que la DDS a dosis de 12.5 y 25.0 mg/kg resultó ser efectiva como protector y atenuó la destrucción celular por QUIN, lo que demuestra un efecto dosis-dependiente de la DDS, sugiriendo que sus mecanismos median su acción protectora sobre la activación de diferentes poblaciones de receptores a glutamato (NMDA y no-NMDA).

Por otra parte, se ha encontrado que la dizocilpina (MK-801) - un fármaco que bloquea canales de calcio asociados a receptores para AAE - es capaz de prevenir completamente la neurotoxicidad inducida por el QUIN (Santamaría y col, 1996). El mecanismo de protección de la dizocilpina contra la toxicidad del QUIN es mediado por un antagonismo no competitivo sobre receptores tipo NMDA. Consecuentemente, no es difícil hipotetizar

que la DDS también podría estar actuando, al menos parcialmente, como bloqueador selectivo de canales de calcio o como un modulador de receptores a glutamato. Esta especulación se ve reforzada por el efecto protector que la DDS ejerce sobre la disminución sobre los niveles estriatales de GABA mediada por el ácido kaínico (KA). El KA es un conocido agonista glutamatérgico de receptores tipo no-NMDA y presenta actividad excitotóxica, lo que sugiere un amplio espectro de acción de la DDS sobre diferentes entidades de receptores glutamatérgicos.

Se sabe que la DDS es un fármaco de elección comunmente empleado en diversos desórdenes infecciosos (May y col., 1990; May y col., 1993), incluyendo la lepra y también es administrado comunmente como componente politerapéutico en desórdenes crónicos con componentes autoinmunes (Kumato y col., 1983; Swain y col., 1983; Waters, 1983), contra el sarcoma de Karposi (Poulsen y col., 1984) y contra pneumonia causada por *Pneumocystis carinii* en pacientes con SIDA (Leoung y col., 1986; Lee y col., 1989). Los mecanismos terapéuticos de la DDS en todos estos desórdenes tienen que ver con sus propiedades antibióticas y anti-inflamatorias.

Se han propuesto además tres posibles mecanismos para la acción neuroprotectora de la sulfona a nivel de modelos excitatorios:

- 1) La DDS podría estar actuando como atrapador de especies reactivas del oxígeno (Wozel y Barth, 1988), o bien inhibiendo el sistema citotóxico de neutrófilos (Fredenberg y Malkinson, 1987);

2) Podría también estar bloqueando procesos excitatorios mediados por receptores a glutamato;

3) ó bien podría estar incrementando la inhibición recurrente mediada probablemente por neuronas GABAérgicas (Milgram y col, 1991) en un proceso claramente antagónico a la excitotoxicidad.

Como se mencionó en el primer mecanismo, la DDS puede actuar como atrapador de radicales, disminuyendo la concentración de intermediarios del oxígeno (H_2O_2 , OH. y O_2^-) en capítulos de inflamación producidos por leucocitos polimorfonucleares (Niwa y col., 1984). Muchos intermediarios del oxígeno son generados por H_2O_2 , y la reacción directa de la sulfona con peróxido de hidrógeno puede también inhibir el efecto del sistema citotóxico del complejo mieloperoxidasa- H_2O_2 . Un efecto antioxidante similar de la DDS ha sido demostrado en la inhibición de la proteasa humana alfa-1 *in vitro* (Theron y Anderson, 1982). Más investigaciones *in vitro* en células endoteliales pulmonares de bovino, sugieren un efecto crítico anti-inflamatorio que envuelve la supresión directa de la generación de tóxicos, radicales derivados del oxígeno en leucocitos polimorfonucleares y mejora la inhibición de la formación de intermediarios del oxígeno (Martin y Kachel, 1985).

El metabolismo de la DDS y la generación de subproductos tóxicos o potencialmente terapéuticos de la misma, tienen que ver ambos con su destino en el organismo. Dicho metabolismo se dá generalmente en dos vías:

a) por N-acetilación (Gelber y col., 1971; Weber y Hein, 1985; May y col., 1990) que genera el producto protector y que se lleva a cabo en el hígado, siendo que el grado de acetilación está determinado genéticamente. La eliminación urinaria de sulfonas varía en humanos y va del 70% al 80% (Goodman y Gilman, 1978);

b) por hidroxilación (DDS-NOH) (Israili y col., 1973) y causa hemólisis de varios grados; también es común la metahemoglobinemia (Vage y col., 1991) y puede existir formación secundaria de los cuerpos de Heinz. La anemia hemolítica es rara, excepto cuando hay anomalías de los eritrocitos o de la médula ósea (Pengelly, 1963); sin embargo, a veces es tan intensa que las manifestaciones de hipoxia son evidentes.

Las sulfonas se distribuyen por todo el líquido corporal y en todos los tejidos. Tienen afinidad por la piel y los músculos, especialmente por el hígado y el riñón; en éstos órganos se encuentran indicios del medicamento hasta tres semanas después de haber suspendido el tratamiento, y se mantiene largo tiempo en el torrente sanguíneo (Goodman y Gilman, 1978).

Aunque la DDS es empleada comunmente para muchos propósitos terapéuticos en humanos, una parte de su metabolismo podría ser dañina si no se administra correctamente: si la DDS se va por la vía de la hidroxilación por efecto de un esquema terapéutico erróneo o por elevadas dosis, podrían observarse efectos negativos.

Los datos presentados en este trabajo sugieren su posible utilidad terapéutica específica en el tratamiento de algunas alteraciones neurológicas de origen inflamatorio o infeccioso. Adicionalmente, podríamos sugerir que los efectos protectores ejercidos por la DDS en este trabajo corresponden a una orientación clara en su metabolismo hacia la formación de la especie acetilada, y no la hidroxilada. Sin embargo, aunque aquí se sugiere su posible empleo terapéutico a nivel experimental, debe considerarse que aún no es conveniente postularlo como fármaco de elección para el tratamiento de neuropatías humanas y que si sería conveniente la realización de otros estudios más detallados para poder asegurar su correcta administración y garantizar su adecuado metabolismo.

10. Conclusiones

- Se observó un claro efecto tóxico del QUIN en cuerpo estriado de ratas, evidenciado tanto por la destrucción de células nerviosas y fibras a nivel de análisis morfológico, como por el incremento en la tasa de daño celular
- Se encontró un efecto protector de la DDS sobre la neurotoxicidad inducida por el QUIN a nivel morfológico en cuerpo estriado de ratas lesionadas tópicamente con la toxina. Dicho efecto resultó ser dosis-dependiente, exhibiendo sus mayores efectos a las dosis más altas
- Las dosis efectivas de DDS para prevenir el daño generado por el QUIN en cuerpo estriado fueron de 12.5 y 25 mg/kg
- Los mecanismos involucrados en dicho efecto protector podrían tener relación con la acción antioxidante de la DDS, con su metabolismo preferencial hacia la acetilación y/o con el bloqueo de canales de calcio o de receptores para AAE

11. Referencias

- Altagracia M., Monroy-Noyola A., Osorio-Rico L., Kravzov J., Alvarado-Calvillo R., Manjarrez-Marmolejo J. y Ríos C.: Dapsone attenuates kainic acid-induced seizures in rats. *Neurosci. Lett.* 176 (1994): 52-54.
- Feldman W. H., Hinshaw H. C y Moses H. E treatment of experimental tuberculosis with PROMIN (sodium salt of p, p'-diamino-diphenyl sulfone-N,N'-dextrose sulfonate): preliminary report. *Proc. Staff Meet. Mayo Clin.* 16 (1941): 118-125.
- Foster A.C., Vezzani A., French E.D. y Shwarcz R.: Kynurenic acid blocks neurotoxicity and seizures induced in rats by the related brain metabolite quinolinic acid. *Neurosci. Lett.* 48 (1984): 273-278.
- Fredenberg M.F y Malkinson F.D.: Sulfone therapy in the treatment of leucocytoclastic vasculitis. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 16 (1987): 772-778.
- Gelber R., Peters J.H., Gordon G.R., Glazko A.J. y Levy L.: The polymorphic acetylation of dapsone in man. *Clinic. Pharmacol. Ther.* 12 (1971): 225-238.
- Goodman L.S. y Gilman A.: *The pharmacological basis of therapeutics.* 8ª Ed. Pergamon Press (1990): 1819 pp.
- Hamada K., Hiyoshi T., Kobayashi S., Ishida S., Yagi K. y Seino M.: Anticonvulsive effect of dapsone (4,4'-diaminodiphenilsulphone) on amygdala-kindled seizures in rats and cats. *Epilepsy* 10 (1991): 93-102.
- Ishida S., Hamada K., Yagi K. Y Seino M.: Comparing the anticonvulsive effects of dapsone on amygdala-kindled seizures and hippocampal-kindled seizures in rats. *Acta Neurol. Scand.* 85 (1992): 132-135.

ESTA TESIS NO DEBE
SAIR DE LA BIBLIOTECA

- Israili Z.H., Lucinell S.A., Vaught J., Davis E., Lesser J.M. y Dayton P.G.: Studies of the metabolism of dapsone in man and experimental animals: Formation of N-hidroxy metabolites. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 187 (1973): 138-151.
- Leonard J. N., y otros.: Linear IgA disease in adults. *Br. J. Dermatol.* 107 (1982): 301-316.
- Levy L., Shepard C. C . y Fasal, P.: Clofazimine therapy of lepromatous leprosy caused by dapsone resistant *Micobacterium leprae*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 21 (1976): 315-321.
- Luna G., Heffess M.D., Mullick M.D.: Métodos histotecnológicos, Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos DE América (AFIP). McGraw-Hill, New York (1995).
- Macmillan A. L., y Champion R. H.: Generalized pustular psoriasis treated with dapsone. 88 (1973): 183-185.
- Martin W. y Kachel D.L.: Reduction of neutrophil-mediated injury to pulmonary endothelial cells by dapsone. *Am. Rev. Respir. Dis.* 135 (1985): 544-547.
- May D.G., Porter J.A., Vetrecht J.P., Wilkinson G.R. y Branch R.A.: The contribution of N-hidroxylation and acetylation to dapsone pharmacokinetics in normal subjects. *Clin. Pharmacol. Ther.* 48 (1990): 619-627.
- Milgram N.W., Yearwood T., Khurgel M., Ivy G.O. y Racine R.: Changes in inhibitory processes in the hippocampus following recurrent seizures induced by systemic administration of kainic acid. *Brain Res.* 551 (1991): 236-246.
- Moroni F., Lombardi G., Monet G. y Aldino C.: The excitotoxin quinolinic acid is present in the brain of several animal species and its cortical content increases during the ageing process. *Neurosci. Lett.* 47 (1984): 51-55.

- Niwa Y., Sakane T. y Miyachi Y.: Dissociation of the inhibitory effect of dapsone on generation of oxygen intermediates in comparison with that of colchicine and various scavengers. *Biochem. Pharmacol.* 33 (1984): 2355-2360.
- Olsen T. G., Wright R. C., y Lester A. I.: Subcorneal pustular dermatosis and crippling arthritis. *Arch. Dermatol.* 115 (1979):185-188.
- Pasantes H., Sánchez J. y Tapia R.: *Neurobiología Celular*. SEP/FCE. México (1991): 361 pp.
- Poulsen A., Hultberg B., Thomsen K. y Wantzin G.L.: Regression of Karposi's sarcoma in AIDS after treatment with dapsone. *Lancet* 1 (1984): 560.
- Pengelly C.D.R.: Dapsone-induced hemolysis. *Br. Med. J.* 2 (1963): 662-664.
- Rist N., Block F., y Hamon V.: Action inhibitrice du sulfamide et d'une sulfone sur la multiplication in vitro et in vivo du bacilli tuberculeux aviare. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*. 64 (1940): 203-237.
- Scaan A.Y. y Shoepf D.D.: Activation of hippocampal metabotropic excitatory amino acid receptors lead to seizures and neuronal damage. *Neurosci. Lett.* 139 (1992): 77-82.
- Santamaría A., Ríos C., Solís-Hernández F., Ordaz-Moreno J., González-Reynoso L., Altagracia M. y Kravzov J.: D,L-Kynurenine and probenecid pretreatments attenuates quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats. *Neuropharmacology* 35 (1996): 23-28.
- Santamaría A., Ordaz-Moreno. J., Rubio-Osornio M., Solís-Hernández F. y Ríos C.: Neuroprotective effect of dapsone against quinolinate-and kainate-induced striatal neurotoxicities in rats. *Pharmacol. Toxicol.* 81 (1997): 271-275.
- Schwarcz R.: Excitotoxic models for neurodegenerative disorders. *Life Sci.* 35 (1984): 19-32.

- Stone T.W.: Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. *Pharmacol. Rev.* 45 (1993): 309-379.
- Swain A.F., Ahmad R.A., Rogers H.J., Leonard J.N. y Fry L.: Pharmacokinetic observations on dapsone in dermatitis herpetiformis. *Br. J. Dermatol.* 106 (1983): 91-98.
- Theron A. y Anderson R.: Investigation of the protective effects of the antioxidants ascorbate, cysteine, and dapsone on the phagocyte-mediated oxidative inactivation of human alpha-1-proteasa inhibitor in vivo. *Clin. Exp. Immunol.* 47 (1982): 225-232.
- Vage Ch., Saab N., Woter P.M. y Svensson G.K.: Dapsone-induced toxicity: comparison of the methemoglobin-forming ability of hydroxylamine metabolites of dapsone in rat and human blood. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 129 (1991): 309-316.
- Vender A.D.: The kynurenine pathway of tryptophan metabolism. In: John Wiley and Sons (Eds.) *Amino acid metabolism*. John-Wiley & Sons. U.S.A. (1995): 172-177.
- Waters M.F.R.: New approaches to chemotherapy for leprosy. *Drugs* (1983): 465-467.
- Weber W.W. y Hein D.W.: N-acetylation pharmacogenetics. *Pharmacol. Rev.* 37 (1975): 25-79.
- Wolfensberg M., Amsler U., Cuenod M., Foster A.C., Whetsell W.O. Jr. y Schwarcz R.: Identification of quinolinic acid in rat and human brain tissue. *Neurosci. Lett.* 41 (1984): 247-251.
- Wozel G. y Barth J.: Current aspects of modes of action of dapsone. *J. Invest. Dermatol.* 27 (1988): 547-552.

Anexo I. Procesamiento de muestras e inclusión de tejido (Luna, 1995).

- Se lavan los cerebros en agua corriente por 3 horas para quitar el exceso de formol.
- Se lavan en agua destilada.
- Se deshidratan en alcoholes graduales de 60, 70, 80, 96 dos cambios; alcohol absoluto dos cambios; se aclaran dos cambios de xilol (1 hora por cada cambio).
- Se hicieron dos cambios en parafina por una hora cada cambio y se hizo la inclusión definitiva.
- Se hicieron los cortes de 5 micras de grosor (en microtomo de parafina).

Anexo II. Técnica de tinción por Violeta de cresilo (0.5 %) (Luna, 1995).

- Xileno, dos cambios de 15 min.
- Alcohol absoluto 3 min.
- Alcohol 95 % 3 min.
- Hidratar con agua destilada 3 min.
- Teñir de uno a tres minutos con la solución de violeta de cresilo.
- Lavar con dos cambios de agua destilada 3 minutos.
- Pasar al alcohol de 95° durante 30 seg.
- Pasarlos por alcohol absoluto durante 30 seg.
- Pasarlos a xilol durante un minuto.
- Montar con Entellan.

Anexo III. Técnica de tinción por Hematoxilina-Eosina (Luna, 1995).

- Desparafinar en Xilol
- Hidratar en alcoholes graduales
- Pasarlos por agua destilada
- Pasarlos a la hematoxilina de Harris
- Se pasa por agua destilada de nuevo
- Se pasan a una solución de carbonato de litio
- Se lavan con agua destilada de nuevo
- Se pasan al alcohol de 70°
- Se pasan a Eosina por dos minutos
- Se pasan al alcohol de 70°
- Se deshidrata en alcohol de 96°
- Se pasan a alcohol absoluto
- Se aclaran en xilol en dos cambios
- Se cubren con resina

Anexo IV. Técnica de tinción por Tricómico de Masson (Luna, 1995).

- Desparafinar en Xilol
- Deshidratar en alcoholes graduales
- Se enjuaga con agua destilada
- Se pasan 12 horas a Bouin
- Lavar en agua corriente por 15 minutos
- Enjuagar en agua destilada
- Pasar a una solución de Bouin durante una noche a temperatura ambiente
- Lavar con agua corriente hasta que el color amarillo haya desaparecido
- Enjuagar en agua destilada
- pasar a una solución de hematoxilina férrica de Weigert 15 min
- Lavar en agua corriente durante 10 min para virar a la hematoxilina (agitando suavemente y cambiando el agua)
- Enjuagar en agua destilada
- Pasar a una solución de fucsina escarlata por 15 min
- Enjuagar con agua destilada 3 veces
- Pasar a la solución de ácido fosfomolibdico y fosfotúngstico de 10-15 min
- Pasar a una solución de azul de anilina por 12 min
- Se lavan en agua destilada 3 veces durante 5 minutos
- Pasar a una solución acuosa de ácido acético al 1% de 3-5 min
- Deshidratar en alcoholes graduales (70°, 96°, absoluto y xilol 2 cambios)
- Cubrir con resina sintética.