CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso periférico (SNP) esta formado por ganglios y un conjunto de nervios motores y nervios sensitivos que en la cara ventral y dorsal de la médula espinal, establecen la red de comunicación entre el sistema nervioso central (SNC) y las diferentes estructuras en el organismo.

El SNP se divide en **somático** que controla *las actividades voluntarias* y en **autónomo** que se encarga de regular las actividades involuntarias. Por lo tanto, la función principal del SNP es la conducción de información sensorial al SNC y de órdenes motoras a través de fibras nerviosas a los órganos efectores como el músculo. [1, 2]

Los nervios periféricos son haces de fibras nerviosas que transmiten la información como impulsos nerviosos en un sentido por medio de los axones, que a partir de 0.7 μm de diámetro están rodeados por vainas de mielina producidas por diferenciación y enrollamiento de la membrana plasmática de la célula de Schwann sobre un segmento del axón[3]. La vaina de mielina permite la propagación rápida de los potenciales de acción a lo largo de los axones que rodea, la vaina de mielina depende de interacciones intercelulares no sólo durante su formación, sino también a través de toda la vida y durante los procesos patológicos que afectan al axón o a la célula de Schwann[4] . Además, se propone que la vaina de mielina participa en el mantenimiento de la homeostasis iónica, en la protección y posiblemente en apoyo metabólico de los axones[5].

Una de las características bioquímicas que distingue a la mielina de otras membranas biológicas es que en ella se encuentran representadas todas las clases principales de lípidos en mayor proporción que las proteínas[3]. Es importante mencionar que las células de Schwann son vulnerables a daños por neurotóxicos durante el máximo estrés metabólico, ya que sintetizan grandes cantidades de proteínas de la mielina y lípidos en periodos muy cortos ya programados. Así mismo, el carácter hidrofóbico de la mielina le permite actuar como reservorio de substancias tóxicas liposolubles y es posible que los mecanismos de mantenimiento que requieran energía, sean puntos vulnerables en la vaina de mielina madura [5].

Por lo tanto, la alteración en cualesquiera de los componentes que forman las fibras nerviosas puede modificar su función y conducir al desarrollo de neuropatía periférica, la cual un término que designa a la afección nerviosa del nervio periférico. En sentido estricto, la neuropatía periférica incluye sólo a las formas de lesión no inflamatorias, sin embargo, en sentido amplio se aplica a todo tipo de daño que afecte al nervio.

A *la neuropatía periférica también se le ha descrito como una* neuritis sin que este término se relacione específicamente con inflamación, en ella se presentan en forma aislada o conjunta síntomas motores, sensitivos, reflejos o vasomotores, no obstante, la neuritis se define como un proceso o afección inflamatoria y degenerativa de uno o varios nervios. Otro de los términos utilizados, es el de polineuritis que se refiere como un síndrome que afecta al sistema nervioso periférico que tiende a ser simétrico, bilateral y de predominio distal[6,7].

La *neuropatía periférica* puede ser clasificada de acuerdo al **tipo de nervio afectado** (motor, sensitivo o autónomo), a la **localización anatómica** como mononeuropatía si la lesión ocurre en un solo nervio, polineuropatía si ocurre en varias áreas y principalmente en varios nervios, neuropatía simétrica si afecta áreas iguales a ambos lados del cuerpo, radiculopatía si afecta a las raíces nerviosas y finalmente según **la etiología** (diabetes, nutricional o idiopática)[8].

Aunque son muchos los procesos patológicos que pueden lesionar al nervio periférico, se observan solamente tres clases de daño en esta estructura.

Desmielinización segmentaria si existe destrucción primaria de la vaina de mielina, sin daño al axón lo que resulta en una disminución o bloqueo de la conducción nerviosa. Sin embargo, puede ocurrir remielinización y la recuperación completa. El término de **desmielinización secundaria** se utiliza para describir desmielinización en presencia de anormalidades axonales. La **degeneración Walleriana** ocurre cuando se secciona el axón o cuando se destruye a la neurona. Las células de Schwann proliferan distalmente al corte y puede producirse regeneración axonal. **Degeneración axonal retrograda** implica una alteración metabólica de la neurona que se manifiesta como muerte de la porción distal del axón. Adicionalmente, puede presentarse desmielinización secundaria proximal a la porción intacta del axón atrófico[2].

En resumen, los términos polineuropatía, neuritis, polineuritis y polirradiculoneuritis se emplean para describir una serie de procesos inflamatorios, no inflamatorios y/o degenerativos que afectan al sistema nervioso periférico de formas muy diversas.

Las causas de estos procesos desmielinizantes son múltiples y van desde, estados carenciales y trastornos metabólicos como el alcoholismo y la diabetes; estados infecciosos e inflamatorios como la difteria, polio, lepra y el síndrome de Guillain-Barré hasta intoxicaciones por metales (arsénico, plomo, talio, etc.), medicamentos (vincristina, isoniacida, etc.), substancias orgánicas (acrilamida y monóxido de carbono, etc.) y por plantas como la *K. humboldtiana* (coyotillo o tullidora)[1, 6, 8-12].

La *Karwinskia humboldtiana* comúnmente conocida como tullidora, coyotillo, capulín tullidor, cacachila, cacatsin y capulincillo entre otros nombres [13] , es un arbusto venenoso de la familia de las ramnáceas, que se encuentra ampliamente distribuido en la República Mexicana, sur de los Estados Unidos y Centro América [14] (Figura 1).

Figura 1. a) Arbusto de la *K. humboldtiana.* **b)** Distribución en la República Mexicana. **c)** fruto en diferentes etapas de maduración verde, semimaduro y maduro.

El fruto maduro de la tullidora es de color violeta obscuro, de sabor dulce, que al ser consumido es capaz de producir una parálisis, fláccida simétrica, progresiva y ascendente que en los casos graves puede ocurrir la muerte por parálisis bulbar[9-11]. No obstante, se han reportado pacientes con parálisis de miembros inferiores que desarrollan insuficiencia respiratoria que pone en peligro la vida e incluso provoca la muerte antes de que aparezca la parálisis de los músculos intercostales [12].

Es importante destacar que, cuando se ingieren grandes cantidades del fruto, la muerte puede ocurrir por daño pulmonar y hepático grave en un lapso de 24 a 48 h[15], sin que se presente el cuadro neurológico característico de esta intoxicación[11, 16-19].

Los efectos tóxicos de esta planta fueron descritos por primera vez por el historiador jesuita Francisco Xavier Clavijero en su libro de la Historia de la Antigua o Baja California en 1789, en el libro se menciona que los indios pericúes no sufrían daño si consumían el fruto sin semillas, ya que es allí donde se localiza el tóxico[20].

Otras citas datan de finales del siglo IXX por los doctores Secundino Sosa y Carlos Cuilty en 1887 y por el doctor Manuel Godoy y Álvarez en 1890[17, 18, 21]. Tal era la importancia de esta intoxicación que en 1895 el poeta Potosino Manuel José Othón describió los efectos paralizantes de la *K. humboldtiana* en su cuento intitulado "El Pastor Gorydon".

Uno de los reportes que contribuyó en forma importante a la clínica fue hecho por el Dr. Castillo Nájera en 1918, donde describe la intoxicación que sufrieron 106 soldados de la División del Norte en Guaymas Sonora y en donde murieron más del 20%, él practicó tres autopsias y encontró únicamente daño en los nervios periférico[16].

El principio tóxico de la *K. humboldtiana* se encuentra contenido principalmente en las semillas de donde se aislaron originalmente cuatro antracenonas diméricas que se clasificaron según su peso molecular como: T-496, T-514, T-516 y T-544, a las que se les consideró como neurotoxinas[22] (Figura 2).

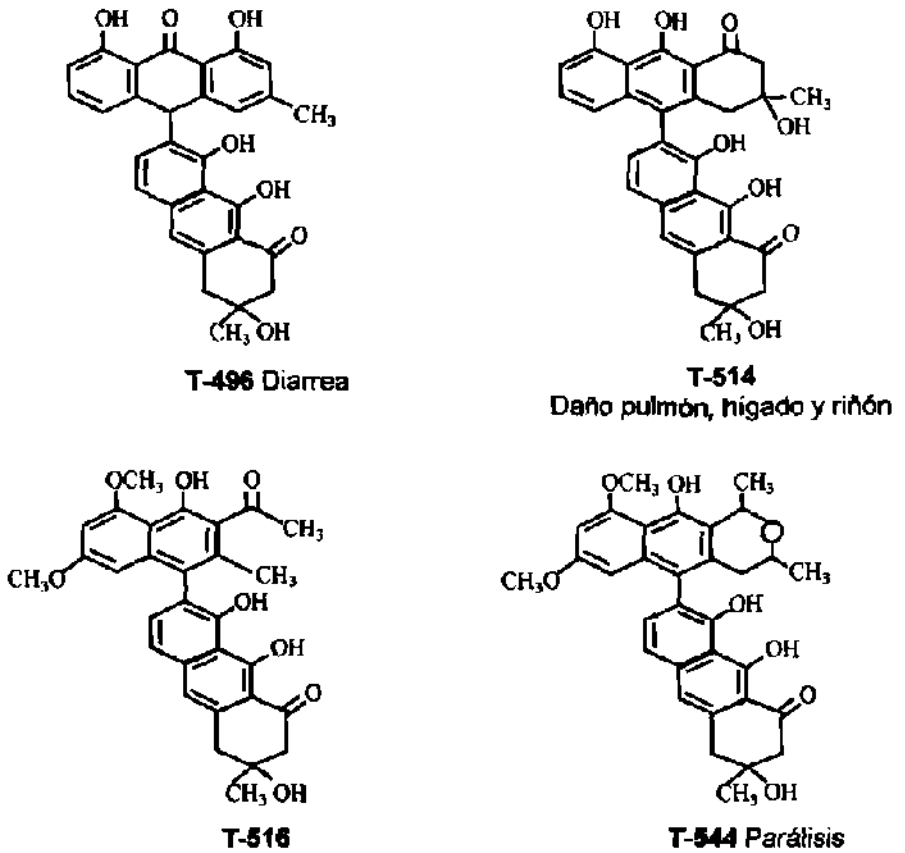

Figura 2. Toxinas aisladas del fruto de *la K. humboldtiana* (tullidora) y sus efectos en diferentes especies de animales. Dreyer D.L. y cols. *J. Am. Soc.* 97:4985-4990. 1975[22]. Bermúdez y cols. *Toxicon* 30:1493-1493. 1992[27]

El contenido de las toxinas en el fruto varía según la región geográfica de la que procedan, el tiempo en que se recolecta el fruto, las condiciones de humedad, del tipo de suelo, de la temperatura, de la luz, etc.,[19].

Recientemente, se han aislado de otras plantas del género *Karwinskia* compuestos estructuralmente similares a estas toxinas, como dos diasteroisómeros de la T-514 (PA_2 y PA_3) que se obtuvieron de la *K. parvifolia,* de la *K. umbellata* se aisló un isómero de la T-514 y de la *K. affin humboldtiana* la T-510, compuestos a los que también se les ha considerado como tóxicos[24-26].

En estudios de toxicidad aguda realizados con el fruto de la *K. humboldtiana* en diferentes especies animales se encontraron lesiones severas, principalmente en hígado y pulmón y de menor magnitud en el riñón.

Cabe destacar, que en el pulmón se observaron diferentes grados de congestión venocapilar intersticial, edema, hemorragia e infiltrado celular consistente en polimorfonucleares y linfocitos. Las lesiones características en el hígado fueron necrosis centrilobulillar, esteatosis de gota fina y congestión venocapilar y sinusoidal. Además, en el riñón se presentó degeneración hidrópica tubular y en algunos casos tumefacción turbia, mientras que en el nervio periférico no se encontró daño. Por lo tanto, se consideró a las toxinas contenidas en el fruto como las responsables de la muerte en estos casos [27, 28].

Por otra parte, en estudios con las toxinas aisladas realizados en roedores se reportó que la T-496 produjo diarrea intensa pocas horas después de su administración, la T-514 causó daño severo en hígado y pulmón y la T-544 fue la responsable del cuadro neurológico, aunque a altas dosis también causó lesión pulmonar y hepática similar a la observada con la T-514 [28, 29].

En el humano la intoxicación con el fruto ocurre en forma accidental principalmente en niños entre los tres y los once años de edad y puede presentarse en cualquier época del año ya que la fructificación depende de la zona geográfica donde se localice la planta. En cuanto a la frecuencia de la intoxicación, se ha reportado que se presentan anualmente de 20 a 30 casos en por lo menos 18 estados de la República Mexicana [30].

El cuadro neurológico de la intoxicación se caracteriza por parálisis fláccida, progresiva, simétrica y ascendente, la parálisis al principio es espástica y después fláccida, se presenta hiporreflexia tendinosa, generalmente no es dolorosa y si se presenta dolor es de poca intensidad. Se conserva la sensibilidad al dolor, al tacto y la temperatura. Ocasionalmente se presentan vómitos, diarrea y signos de infección en las vías respiratorias superiores. La severidad del cuadro es proporcional a la cantidad y a la actividad del fruto ingerido, si el paciente sobrevive, la recuperación es lenta, la parálisis se vuelve regresiva, en sentido inverso a como se presentó y el tiempo de evolución puede ser de 6 meses a un año [17, 31, 32].

No existe hasta la fecha un tratamiento específico y el manejo de los pacientes es similar al de otras polineuropatías como el Síndrome de Guillain-Barré (SGB), es decir sintomático, de sostén y rehabilitación[19, 32]. Si el paciente no recibe rehabilitación se producen deformidades debidas a la atrofia muscular por inactividad, que depende de la extensión y gravedad del ataque inicial [10,11,18,21,33].

Histológicamente la lesión neurológica ha sido identificada como desmielinización segmentaria primaria acompañada de degeneración Walleriana, en la que puede observarse micro y macrovacuolización en las vainas de mielina, así como restos de mielina fagocitados por las células de Schwann[10, 29,34-36].

Se han realizado diferentes trabajos encaminados al esclarecimiento de las alteraciones observadas en los nervios motores en esta polineuropatía, lo cuales se resumirán en forma breve en los párrafos siguientes.

En diversos estudios neurofisiológicos en animales, se han reportado alteraciones en la velocidad e incluso bloqueo en la conducción nerviosa así como, denervación muscular. Se sugiere que estos cambios pudieran ser los responsables de la parálisis [9, 37-41]. Por microscopía electrónica se corroboró el daño al nervio ya observado por microscopía de luz y además se encontró lesión en las células de Schwann, degeneración mitocondrial y depleción de glucógeno[42].

En estudios bioquímicos *in vitro*, se reportaron modificaciones en la fosforilación oxidativa que quizá sean resultado de la alteración en la función

mitocondrial, debido a la acción de las toxinas obtenidas después de la extracción del fruto de la *K. humboldtiana* con éter de petróleo [43].

Por otra parte, se cuantificaron por densitometría las proteínas de la mielina de nervios motores y cutáneos de gatos tratados con extracto etéreo del fruto de la *K. humboldtiana*. En este estudio las proteínas específicas la mielina disminuyeron en un 50% en los nervios motores y en los nervios cutáneos la disminución fue menor del 25%. Dichos cambios se presentaron principalmente en las regiones más distales, además, se presentó un aumento en la proteína de 68 KDa que corresponde a los neurofilamentos de 100 Å. A raíz de estos resultados se sugiere que las toxinas son captadas por las terminales nerviosas motoras por endocitosis[39, 44]. En gatos se reportó alteración en el transporte axonal de proteínas después de la administración intraneural de la T-544 (tullidinol), esto también se observó después de la administración por V.O[41].

De los diferentes trabajos de investigación realizados se han planteado una serie de hipótesis que pretenden explicar como ocurre la desmielinización, así se propuso que las toxinas de esta planta pudieran actuar de manera similar al plomo, es decir, por competencia con los iones de calcio o como la toxina diftérica por depresión en la síntesis de proteínas básicas y proteolípidos de la mielina[33, 45, 46].

También se ha propuesto que el daño inicia en la célula de Schwann por cambios metabólicos y alteración de las enzimas lisosomales[31], otra de las hipótesis sugirió que la parálisis resulta del bloqueo total del impulso nervioso y denervación muscular.

Además, también se ha reportado que las toxinas de este arbusto afectan selectivamente a las fibras motoras gruesas, lo que hace improbable que las células de Schwann sean primariamente afectadas[39, 42]. A pesar de la información obtenida hasta ahora, aún se desconoce el mecanismo por el cual las toxinas de la *K. humboldtiana* causan desmielinización.

La semejanza que guarda el cuadro clínico de esta intoxicación con el presentado por otras enfermedades desmielinizantes como la poliomielitis y particularmente el Síndrome de Guillain-Barré, dificultan el establecimiento de un diagnóstico diferencial correcto, sobre todo en las etapas tempranas ya que son prácticamente indistinguibles entre sí. Por lo tanto, muchos de los casos de intoxicación son diagnosticados erróneamente como SGB, incluso se ha considerado a esta intoxicación como una de las etiologías del SGB [30-32].

En el SGB y en la intoxicación por *K. humboldtiana* se presenta un cuadro prodrómico caracterizado por afección de vías respiratorias superiores similar a una gripe, también puede presentarse diarrea e incluso vómito[19, 47]. Posteriormente, el problema neurológico inicia con debilidad de miembros inferiores que progresa hasta el desarrollo de parálisis fláccida simétrica y ascendente, pueden cursar con compromiso respiratorio de leve a severo y en muchos de los casos puede requerirse de respiración asistida. Además, en ambas enfermedades se conserva el control de esfínteres, la sensibilidad al tacto, al dolor y a la temperatura. También se observa pérdida de los reflejos osteotendinosos profundos, disfonía y disfagia [31, 32, 47-49].

Frecuentemente, en el SGB se encuentran afectados los pares craneales, situación que no es común observarla en la intoxicación con la *K. humboldtiana*, no obstante, se han reportado casos de intoxicación en los que se ven afectados los pares craneales[50, 51]. Se tiene conocimiento del caso de una paciente intoxicada con la *K. humboldtiana* que desarrolló parálisis descendente, asimétrica y paresia facial bilateral, además de dos niños intoxicados con la *K. johnstonii Fernández* que también presentaron afección de pares craneales [19, 31, 32].

Las diferencias entre éstos dos padecimientos radican principalmente en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y en el nervio periférico; en el LCR de pacientes con el SGB se presenta una disociación albúmino-citológica[50, 51], en cambio en la intoxicación por la *K. humboldtiana* el LCR se reporta como normal [18, 32, 33, 36].

En cortes de nervio periférico se observa infiltrado celular caracterizado por células mononucleares, linfocitos T y macrófagos en el SGB[50, 52, 53]. No obstante, existe un solo reporte sobre la presencia de macrófagos en el nervio periférico de cabras principalmente cuando existe desmielinización severa.

Sin embargo, Charlton y Pierce sugirieron que los macrófagos no participan en la generación del daño a la mielina, sino que solamente se encargan de la remoción de los detritos celulares[34]. Además, únicamente Padrón-Poyou y Velázquez han reportado en conejos intoxicados la presencia infiltrado de linfocitos en las astas anteriores de la médula espinal[18]. Por su parte, Dreyer y cols. reportaron que las toxinas de la *K. humboldtiana* producían una neuropatía paralítica no inflamatoria[22].

En estudios realizados en animales con el fruto de la *K. humboldtiana* y con la T-514 (PA_1) se ha reportado la presencia de infiltrado de polimorfonucleares (PMN), linfocitos y macrófagos en pulmón. Además se encontró un aumento del TNFα sérico y en el homogenizado pulmonar de ratones intoxicados con la PA_1. En estudios de toxicidad dérmica en conejos, se reportó en cortes piel infiltrado celular consiste en células mononucleares y linfocitos[27, 54-56].

En la fase aguda del SGB, se ha reportado la presencia de títulos altos de IgM dirigida contra la mielina del nervio periférico, capaz de fijar complemento[52, 57-59]. No obstante, en la intoxicación por *K. humboldtiana* no se tiene conocimiento de la participación de anticuerpos dirigidos contra componentes de la mielina del nervio periférico.

En la neuritis experimental aguda (EAN), que es el modelo animal del SGB, Brosnan y cols. reportaron un aumento en la cantidad de mastocitos desgranulados[60] y posteriormente Jonhson y cols. se sugirieron su participación en la patogénesis de esta enfermedad experimental desmielinizante autoinmune[61]. En la intoxicación con el fruto de la *K. humboldtiana* no se ha reportado la presencia de dichas células.

Tomando en cuenta que aún se desconoce del mecanismo de acción, por el cual las toxinas del fruto de la *K. humboldtiana* producen desmielinización en los nervios motores y que además, falta información acerca de la participación del

sistema inmune en esta polineuropatía, se consideró muy importante realizar una investigación sistemática, para buscar la presencia de infiltrado celular e inmunoglobulinas dirigidas contra proteínas de la mielina, en nervios ciáticos de ratas intoxicadas con el fruto de la *K. humboldtiana*.

OBJETIVO GENERAL

Establecer un modelo de neuropatía tóxica con el fruto de la *K. humboldtiana* para investigar la participación de células del sistema inmune en nervio periférico e inmunoglobulinas contra proteínas de la mielina de nervio ciático de ratas Wistar.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.- Cuantificar la concentración de toxinas presentes en el fruto de la *K. humboldtiana* por CLAR-FR.

2.- Establecer el esquema de dosificación del fruto de la *K. humboldtiana*, que administrado por vía oral, sea capaz de inducir paresia, parálisis y recuperación en ratas Wistar.

3.- Evaluar la histología del nervio ciático de ratas tratadas y controles sin tratar, mediante técnicas de rutina y técnicas especiales.

4.- Cuantificar mediante estudio morfométrico el infiltrado celular que estuviese presente en el nervio ciático de ratas tratadas y control sin tratar. Realizar el análisis estadístico de los resultados obtenidos.

5.- Buscar anticuerpos IgM e IgG dirigidos contra proteínas de la mielina del nervio ciático, en el suero de las ratas Wistar intoxicadas y ratas control sin tratar.

CAPÍTULO 2

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 MATERIAL

2.1.1 Material biológico

2.1.1.1 Fruto maduro de la *K. humboldtiana*

Se utilizó en este estudio fruto maduro y seco de *K. humboldtiana* recolectado en el municipio de Hidalgo, N. L., en el año de 1997 por el Ing. M.C. Rubén Luján.

2.1.1.2 Ratas Wistar

Se utilizaron ratas Wistar de ambos sexos, con un peso promedio de 195 ± 25 g y fueron distribuidas en lotes de 7 animales como mínimo. Todas los animales se mantuvieron bajo condiciones estándar de laboratorio, ciclo luz-obscuridad de 12 horas, temperatura 22 °C y recibieron agua y alimento completo, balanceado y libre de antibióticos *ad libitum*.

2.1.2 Equipo y material general

Agitador de vaivén

Agitador magnético con placa de calentamiento Corning PC101

Balanza analítica Mettler-Toledo AB204.

Balanza granataria Mettler-Toledo PB3001.

Bomba peristáltica de velocidad variable BioRad

Cámara para electroforesis mini-PROTEAN II BioRad

Cámara para electrotransferencia BioRad

Centrífuga Beckman Spinchrone.

Congelador White-Westighouse -20 °C

Criostato Tissue Tek

Cromatógrafo Hewlett-Packard, modelo 1090 con detector de arreglo de diodos

Cubeta de cuarzo con un trayecto óptico de 1 cm.

Cubreobjetos de vidrio

Espectrofotómetro UV-VIS Beckman, modelo DU-7500, con arreglo de diodos con controlador de temperatura Peltier (variación en la temperatura de ± 0.1 °C).

Fuente de Poder PowerPac 200 BioRad

Microscopio Binocular Carl Zeiss®

Histoembedder Leica® R134

Histoquinette Leica® TP 1010

Homogeneizador Potter-Elvejhem con pistilo de vidrio y pistilo de teflón.

Jaulas de acrílico y tapas

Jeringas desechables de 10 mL con aguja 20 x 32 mm

Liofilizador VIRTIS mod 6211-0120

Mallas circulares de 30, 50 y 100 μm de diámetro de poro.

Microcentrígufa Eppendorff modelo 5415C

Microtomo Leica® RM 2025.

Molino Thomas-WILEY, LABORATORY MILL, modelo 4, malla 2 mm.

Papel filtro 3mm de espesor por pliegos

Papel filtro Whatman número 1

Pipetas automáticas y puntillas 0.5-10 µL, 10-100 µL y de 100-1000 µL Eppendorff

Pipetas lineales de diferentes capacidades

Pipeteador automático sigma P5925

Portaobjetos de vidrio

Potenciómetro Beckman Ø 50pHmeter

Probetas de diferentes capacidades

Rotavapor Büchii 461

Rotor de columpio Beckman SW-28, para 28,000 r.p.m.

Tubos para ultracentrífuga de polialómero Beckman.

Ultracentrífuga Beckman L8-M.

Vasos de precipitados diferentes capacidades

2.1.3 Reactivos para aislamiento de la mielina de nervio periférico, electroforesis de proteínas, Western Blot e Inmunohistoquímica

Acrilamida	Sigma	A-3553
Albúmina sérica bovina	Sigma	A-7888
Alcohol metílico	Merck	grado reactivo
Anticuerpo Anti-CD4 de rata	RD	RDI-RTCD4abm-PEPE
Anticuerpo Anti-IgG de Rata conjugada con Peroxidasa hecho en conejo	Sigma	A-5795
Anticuerpo Anti-IgM de Rata conjugada con Peroxidasa hecho en cabra	Pierce	31476
Anticuerpo Anti-IgM de ratón conjugado con Peroxidasa hecho en cabra	Sigma	A8786
Anticuerpo monoclonal Anti-mielina de nervio periférico humano hecho en ratón	ICN	10700
Azul Brillante R	Sigma	B-7290
Azul de Bromofenol	Sigma	B-8026
Bloqueador de Proteínas	DAKO	X-0909
Cloruro de sodio (NaCl)	PQM	grado reactivo
Cloruro de potasio (KCl)	PQM	grado reactivo
Diaminobencidina líquida	DAKO	K-3466
Fosfato de sodio dibásico anhidro (Na_2HPO_4)	Merck	grado reactivo

Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4)	Merck	grado reactivo
Glicerol	Sigma	G-5516
Glicina	Sigma	G-4392
Lauril Sulfato de Sodio	Sigma	L-4390
Leche en polvo sin grasa	Santa Cruz	SC2325
Marcador de PM Rango amplio	Sigma	M-4038
Medio para montar tejido para congelación O.C.T.	Tissue Tek	4583
Membranas de Nitrocelulosa	Sigma	N-8017
2- Mercaptoetanol	Sigma	M-6250
N'N'-Metilen-bis-acrilamida	Sigma	M-2022
PBS (Buffer de Fosfatos)	Sigma	P-7059
Persulfato de Amonio	Sigma	A-9164
Proteína Básica de la Mielina de Conejo	Sigma	M-2016
Sacarosa	Sigma	S9378
Sistema LSAB(R)2 inmunotinción peroxidasa	Dako	K-0609
Sistema para detección de proteínas	BioRad	500-0002
TEMED	Sigma	T-7024
Trizma Base (Biología Molecular)	Sigma	T-8524
Trizma Base (Grado reactivo)	Sigma	T-1503

2.1.4 Reactivos para tinciones histológicas de rutina y especiales

Ácido acético glacial	ANALYTYKA	Grado reactivo
Ácido clorhídrico (HCl 12N)	ANALYTYKA	Grado reactivo
Alcohol etílico absoluto	ANALYTYKA	Grado reactivo
Alcohol etílico 96°	ANALYTYKA	Grado reactivo
Alcohol isopropílico	ANALYTYKA	Grado reactivo
Azul luxol	Sigma	S 6140
Azul de Toluidina	Merck	115930
Carbonato de litio (Li_2CO_3)	Merck	105670
Entellan (resina de montaje)	Merck	107960
Eosina amarilla	ANALYTYKA	

Etilenglicol	Quimik especializada	
Formalina 10%	ANALYTYKA	
Hematoxilina anhidra	ANALYTYKA	
Hidróxido de amonio	ANALYTYKA	Grado reactivo
Nitrato de plata $AgNO_3$	Merck	
Sulfato de aluminio ($Al_2(SO4)_3$)	ANALYTYKA	
Thiosulfato de sodio ($Na_2S_2O_3$) anhidro	Merck	106512
Violeta de crecilo	Merck	105235
Xilol	ANALYTYKA	Grado reactivo
Yodato de sodio ($NaIO_3$)	ANALYTYKA	S4050SR

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Procesamiento del fruto maduro de la *K. humboldtiana*

Para este estudio se utilizó fruto maduro y seco de la tullidora procedente del municipio de Hidalgo, N. L. recolectado en 1997 por el Ing. Mc. Rubén Luján. Posteriormente, se molió el fruto en un molino Thomas-WILEY, LABORATORY MILL, modelo 4, malla 2 mm y se cribó primeramente en una malla de 30 μm, el fruto así obtenido se cribó nuevamente en una malla de 50 y 100 μm respectivamente. El fruto ya cribado se almacenó a 4 °C en un recipiente de vidrio protegido de la luz hasta su uso.

2.2.1.1 Cuantificación de las de toxinas del fruto de *la K. humboldtiana* por CLAR-FR

A 0.5 g del fruto molido y cribado se le realizaron tres extracciones con 5 mL de acetato de etilo, se recuperó cada una de las fases orgánicas se mezclaron y después se evaporó el solvente en un rotavapor Büchi 461 a 35°C. El residuo se disolvió en 0.5 mL de cloroformo. El extracto se analizó por CLAR en fase reversa C18 con arreglo de diodos de acuerdo con el método reportado por Salazar, M. L. y cols. 1996[62]. Se obtuvo del cromatograma el área bajo la curva en porcentaje para el diasteroisómero de la T-514 (PA_2), la T-514 (PA_1), la mezcla de T-544 y la T-496 de acuerdo con el método de normalización de Poole & Poole 1991[63].

2.2.2 Determinación del esquema de dosificación del fruto de la *K. humboldtiana* para el desarrollo del modelo experimental de polineuropatía

Para este estudio se utilizaron ratas Wistar de ambos sexos ($n \geq 7$), las cuales previo ayuno de 6 hs recibieron por V.O. mediante una sonda esofágica, dosis únicas de 1.25, 1.5, 1.75, 1.76, 1.77, 1.8 y 1.9 g/Kg y una dosis de 3.5 g/Kg fraccionada en 5 o 7 dosis del fruto maduro de la *K. humboldtiana* en suspensión acuosa, el grupo control solo recibió el vehículo (Figura 3). Las ratas se mantuvieron bajo condiciones estándar de laboratorio como ya se describió previamente y recibieron agua y alimento *ad libitum*. El esquema de dosificación fraccionada se muestra en las tablas I y II.

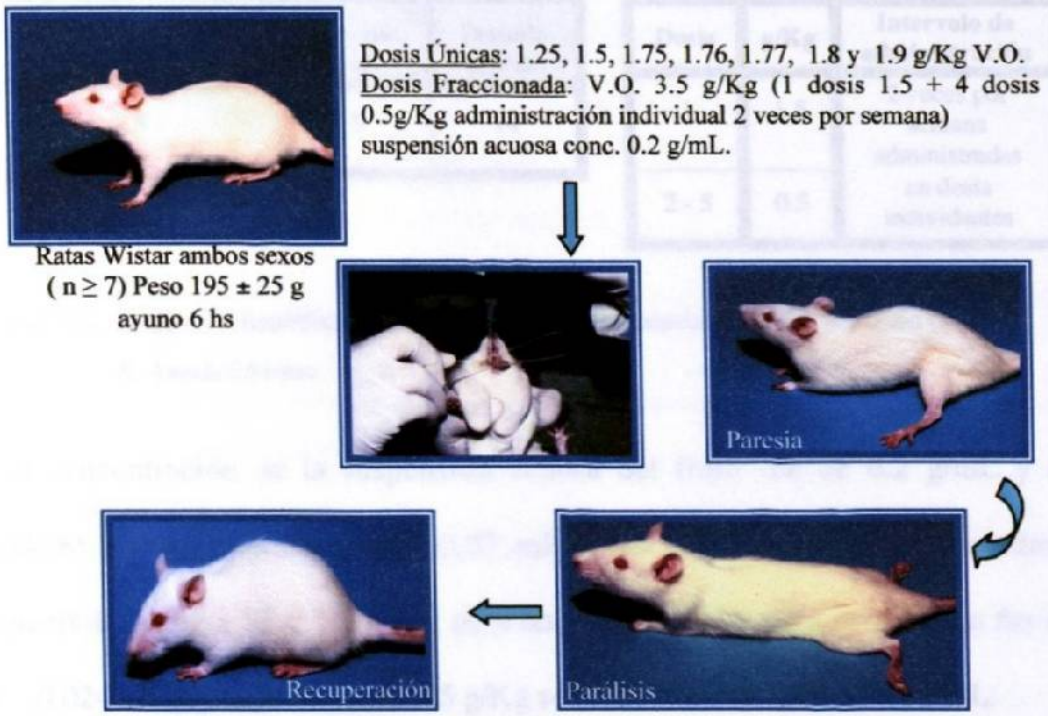

Figura 3. Método de administración de las dosis únicas y dosis fraccionada del fruto de la *K. humboldtiana* V.O.

Dosis total fraccionada g/Kg	No. de dosis	Periodo en días
3.5	7	28

Dosis	g/Kg	Intervalo de administración
1	1.0	Cada 4 días*
2 - 4	0.25	
		Descanso de 10 días
5	0.25	Cada 4 días*
6	0.5	*administradas en dosis individuales
7	1.0	

Tabla I. Esquema de dosificación fraccionada por V.O. del fruto de la *K. humboldtiana*

Dosis total fraccionada g/Kg	No. de dosis	Periodo en días
3.5	5	14

Dosis	g/Kg	Intervalo de administración
1	1.5	2 veces por semana administradas en dosis individuales
2 - 5	0.5	

Tabla II. Esquema simplificado de dosificación fraccionada por V.O. del fruto de la *K. humboldtiana*.

La concentración de la suspensión acuosa del fruto fue de 0.2 g/mL y se administró un volumen de 1.52 ± 0.27 mL a las ratas que recibieron las dosis comprendidas entre 1.25 y 1.9 g/Kg, para las dosis de 0.25 g/Kg el volumen fue de 0.22 ± 0.024 mL y para la dosis de 0.5 g/Kg se administraron 0.47 ± 0.052 mL.

2.2.2.1 Registro del peso corporal

Se hizo un registro diario del peso de todos los animales en una balanza granataria digital Mettler-Toledo PB3001 durante las primeras dos semanas después de la administración de la dosis inicial del fruto. Posteriormente, se registró el peso cada tercer día hasta el día 58 después de la dosis inicial y finalmente se registró una vez por semana hasta el día 112 después de la dosis inicial.

2.2.2.2 Evaluación clínica

Durante todo el experimento se evaluaron los siguientes manifestaciones de intoxicación: piloerección, cambios en la actividad espontánea, alteracione en los reflejos osteotendinosos, tono muscular, debilidad, jiba, función respiratoria, alopecia, alteraciones en la marcha, parálisis de miembros posteriores y/o anteriores.

2.2.2.3 Obtención de las muestras séricas

Se obtuvo la sangre de las ratas tratadas y ratas control por punción cardiaca, posteriormente esta se centrifugó a 3000 r.p.m. por 5 min. Se separó el suero y se almacenó a -20 °C en alícuotas de 150 μL.

2.2.2.4 Obtención de lo nervios ciáticos

Se disecaron los nervios ciáticos de ambas extremidades posteriores desde su salida de la columna vertebral hasta las ramas peroneal y tibial a nivel de la rodilla de las ratas tratadas y de las ratas control. El nervio derecho se fijó en formalina al 10% amortiguada con sales de fosfatos. El nervio izquierdo se colocó en OCT y se guardó a -20 °C.

2.2.3 Aislamiento de la mielina del nervio ciático

Se obtuvieron por disección los nervios ciáticos de 55 ratas Wistar normales de ambos sexos de forma similar a la descrita en la sección 2.2.2.4. Los nervios se cortaron en trozos pequeños, se liofilizaron, se pesaron y se almacenaron al vacío a -20 °C.

La mielina se obtuvo mediante la técnica de Wiggins y cols., 1975[64] donde, el aislamiento de la mielina se realizó a través de ultracentrifugación por gradiente de densidad discontinuo en sacarosa. Todas las soluciones utilizadas y el procedimiento seguido se realizó a una temperatura de entre 4 °C y 8 °C. Ver apéndice A para preparación de reactivos pagina 124.

Los nervios liofilizados se procesaron en fracciones de 250 mg como se describe a continuación. Se homogeneizaron 250 mg de nervio ciático liofilizado en 50 mL de sacarosa 0.29 M en un homogeneizador Potter-Elvejhem con pistilo de vidrio esmerilado.

Una vez homogeneizado el nervio se llevó a un volumen de 100 mL con sacarosa 0.29 M. Un sexto del homogeneizado (16.7 mL) se colocó sobre 15.0 mL de sacarosa 0.85 M en tubos de ensayo de polialómero Beckman. Posteriormente se colocaron en un rotor de columpio Beckman SW28 y se centrifugaron a 25,000 r.p.m. (82,000 g) durante 45 min. en una ultracentrífuga Beckman L8-M. Una vez transcurrido este tiempo se recuperó la capa de mielina cruda de la interfase con una pipeta pasteur y se descartó el resto de la solución.

La mielina recuperada de cada uno de los tubos se colocó en un matraz Erlen-Meyer de 250 mL y se llevó a un volumen final de 150 mL con agua bidestilada. La suspensión se centrifugó a 25,000 r.p.m. (82,000 g) por 15 min. Se recuperó la mielina por decantación y se eliminó el sobrenadante.

La mielina que se recuperó en el paso anterior se resuspendió nuevamente en 60 mL de agua bidestilada, se dejó reposar en hielo por 20 min. y se centrifugó a 10,000 r.p.m. (13,200 g) por 10 min. Se recuperó la mielina por decantación y se eliminó el sobrenadante. Finalmente, se resuspendió la mielina en 60 mL de agua bidestilada y se centrifugó a 15,000 r.p.m. (30,000 g) por 15 min. La mielina obtenida se liofilizó y se almacenó al vacío a -20 °C hasta su uso.

2.2.3.1 Determinación de proteínas por el método de Bradford

Para la determinación del contenido de proteínas en la mielina de nervio se siguió el método de Bradford, en donde la absorbancia máxima de una solución ácida de azul brillante de Coomasie G-250 cambia de 465 nm a 595 nm cuando se une a la proteína. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de la proteína.

2.2.3.1.1 Solución estándar de albúmina. Se preparó una solución de albúmina bovina a una concentración de 1000 μg/mL. La albúmina bovina se disolvió en agua bidestilada.

2.2.3.1.2 Reactivo de Bradford. El reactivo concentrado de Bradford (BioRad) se diluye 1:5 con agua destilada y se filtró en un papel Whatman 1 antes de su uso.

2.2.3.1.3 Curva de calibración. Se determinó por triplicado el cambio de absorbancia a 595 nm de cada uno de los estándares de albúmina. El promedio de estos valores fue utilizado para graficar la curva de calibración.

Las concentraciones de los estándares empleadas para la realización de la curva de calibración se describen en la tabla III.

Proteínas (μg/mL)	Albúmina μL	Agua bidestilada μL	Reactivo de Bradford (μL)
0.0	----	200.0	800
2.5	2.5	197.5	800
5.0	5.0	195.0	800
7.5	7.5	192.5	800
10.0	10.0	190.0	800
15.0	15.0	185.0	800
20.0	20.0	180.0	800

Tabla III. Concentraciones de proteína empleadas para la realización de la curva de calibración.

2.2.3.1.4 Preparación y dilución de la mielina. Se pesó 1mg de la mielina liofilizada y se disolvió en 500 μL de buffer de muestra y se llevó a ebullición durante 3 minutos. La concentración de proteínas de realizó sin dilución y con dilución 1:10 en el buffer de muestra 2x.

2.2.3.1.5 Cálculos. La concentración de proteínas de la mielina fue interpolada en la curva de calibración obtenida al graficar el valor de absorbancia contra la concentración de proteína de los estándares, los valores fueron ajustados con el método de mínimos cuadrados (programa estadístico del espectrofotómetro UV-VIS Beckman DU-7500).

2.2.4 Estudio histológico

2.2.4.1 Tinción de hematoxilina y eosina

Se hicieron cortes del nervio ciático incluido en parafina de un espesor de 6 μm con un microtomo Leica, se desparafinizaron y posteriormente se tiñeron con la técnica estándar de H y E. La evaluación morfológica del tejido se realizó por microscopía de luz a 10X y 40X en un microscopio binocular Carl Zeiss®. Ver apéndice B páginas 125 a 127 para descripción detallada de la técnica y preparación de reactivos.

2.2.4.2 Método de Klüver-Barrera

Se hicieron cortes de 6μm de espesor del nervio ciático incluido en parafina tanto de las ratas intoxicadas como de las ratas control. Las muestras posteriormente se tiñeron mediante el método descrito por Klüver-Barrera en 1960, para el estudio de la mielina y la observación de células[65]. La evaluación morfológica se realizó por microscopía de luz como se mencionó en la sección 2.2.4.1. Ver apéndice B páginas 128 y 129.

2.2.4.3 Tinción de azul de toluidina

Este método es específico para la detección de mastocitos del tejido conectivo presentes en nervio ciático. Para esta tinción se hicieron cortes de 6 μm de espesor del nervio ciático incluido en parafina, posteriormente se tiñeron según el método estándar de azul de toluidina[66], la evaluación de los cortes se realizó por microscopía de luz como ya se describió previamente. La técnica se describe en el apéndice B página 130.

2.2.4.4 Método de Marsland-Glees y Erickson

Técnica especial de impregnación con plata para la identificación y evaluación de la integridad axonal en el nervio periférico. Se hicieron cortes de 9 μm de espesor del nervio ciático incluido en parafina tanto de las ratas tratadas como de las ratas control. Previa desparafinización se procedió a teñir las muestras según el método descrito por Marsland[67]. La evaluación de los cortes se realizó por microscopía de luz. La técnica se describe en el apéndice B páginas 125, 131 y 132.

2.2.5 Estudio morfométrico

2.2.5.1 Cuantificación de mastocitos

La cuenta de mastocitos endoneurales se realizó a un aumento de 40x por microscopía de luz, en cortes de nervio ciático teñidos con azul de toluidina y con el método de Klüver-Barrera. Se observó un área de 5.74 mm^2 (2.87 mm^2 para cada una

de las tinciones) que se determinó después de medir el ancho y el largo del nervio ciático en mm, con una escala montada en el ocular. Finalmente, se expresó el promedio del número de mastocitos por mm^2, del porcentaje de mastocitos no desgranulados y desgranulados, así como el promedio de mastocitos no desgranulados y desgranulados por mm^2 de cada una de las etapas de la polineuropatía y del grupo control sin tratar.

2.2.5.2 Cuantificación de linfocitos

La cuenta de linfocitos endoneurales se realizó por microscopía de luz a un aumento de 40x, en cortes del nervio ciático teñidos con el método de Klüver-Barrera. El área observada fue de 2.0 a 3.0 mm^2 de nervio ciático y se determinó después de medir el ancho y el largo del nervio ciático en mm con una escala montada en el ocular. Finalmente, se expresó el valor promedio de linfocitos por mm^2 en cada una de las etapas de la neuropatía y en el grupo control sin tratar.

2.2.6 Identificación de linfocitos por inmunohistoquímica

La inmunotinción con peroxidasa se realizó con un anticuerpo monoclonal anti CD-4 comercial específico para tejido de rata, como control positivo se utilizó amígdala de rata y como control negativo, se omitió el primer anticuerpo. El procedimiento se detalla en el apéndice C página 134.

2.2.7 Western Blot

2.2.7.1 Electroforesis de la mielina del nervio ciático

Ver apéndice D página 136 para la preparación de reactivos.

2.2.7.1.1 Preparación de las muestras. Marcadores de Peso molecular A una alícuota de 10 μL del marcador de peso molecular de 205,000 a 6,500 KDa se le adicionaron 20 μL del buffer de muestra 2X y se llevó a ebullición en baño de agua por 2 minutos. Se aplicaron 10 μL del marcador de peso molecular a un carril de 5 mm de ancho por 12 mm de alto (0.6 cm^2).

Proteína básica de la mielina de conejo (P_1). La PBM de conejo se reconstituyó con 150 μL de buffer de muestra 2X (1 mg/150 μL), se hicieron alícuotas de 30μL, se colocaron en tubos Eppendorff de 100 μL y se congelaron a –70°C hasta su uso. A 30 μL de la PBM se le adicionó un 5% de ß-mercaptoetanol y se llevó a ebullición en baño de agua por 4 min. Se aplicaron de 150 a 200μg de la PBM en un volumen de 25 a 30 μL a un carril de 5.7 cm de ancho por 1.2 cm de alto (6.84 cm^2).

Mielina de nervio ciático

Un mg. de la mielina liofilizada se disolvió en 40 μL del buffer de muestra 2X y se le agregó un 5% de ß-mercaptoetanol, se agitó en un agitador mecánico y se llevó a ebullición en baño de agua por 4 min. Se aplicaron 1.25 mg de la mielina de nervio ciático en un volumen de 50 a 55 μL a un carril de 5.7 cm de ancho por 1.2 cm de alto (6.84 cm^2).

2.2.7.1.2 Preparación de los geles de poliacrilamida-SDS. Se preparó el gel concentrador de poliacrilamida-SDS al 5% y los geles separadores al 12 y 14% según se muestra en las tablas IV y V. Las medidas finales del gel fueron, de 2.5 cm de alto por 8.3 cm de ancho para el gel concentrador y de 4.8 cm de alto por 8.3 cm de ancho para el gel separador.

Reactivo	Cantidad
Acrilamida/bis-acrilamida 30%	500 μL
Buffer Tris/HCl pH 6.8	300 μL
Agua desionizada	2.16 mL
SDS 20%	15 μL
PSA 10 %	15 μL
TEMED	2 μL

Tabla IV. Preparación del Gel Concentrador de Poliacrilamida al 5%

Reactivo	12%	14%
Acrilamida/bis-acrilamida 30%	1.99 mL	2.3 mL
Buffer Tris/HCl pH 8.8	915 μL	1.1 mL
Glicerol 50%	336 μL	392 μL
Agua desionizada	1.6 mL	630 μL
SDS 20%	25 μL	25 μL
PSA 10 %	18 μL	24 μL
TEMED	3.5 μL	5 μL

Tabla V. Preparación del gel separador de poliacrilamida al 12% y14%

2.2.7.1.3. Condiciones de la electroforesis de proteínas. La electroforesis se realizó en una cámara para electroforesis mini PROTEAN marca BioRad y como fuente de poder Power Pac 200 de Bio Rad. Tanto para la mielina del nervio ciático como para la PBM de conejo, el corrimiento en el gel concentrador se realizó a 30 volts con amperaje libre, y del corrimiento en el gel separador llevó a cabo a 60 volts y el amperaje se dejo libre. Una vez concluida la electroforesis se obtuvo el gel y se corto una tira de aproximadamente 1.5 cm de ancho de la parte derecha, en donde se localizaron los marcadores de peso molecular y parte de la muestra de mielina del nervio ciático o de la PBM de conejo y se colocó en azul de Coomasie por 16 hs, el resto del gel se preparó para su eletrotransferencia.

2.2.7.2 Electrotransferencia

Antes de finalizar la electroforesis se colocaron en buffer de transferencia frío durante 45 min, 4 papeles filtro de 3 mm de espesor y una pieza de la membrana de nitrocelulosa del tamaño del gel. Una vez que se tiene el gel se colocan 2 de los papeles filtro sobre una esponja de fibra impregnada con el buffer de transferencia, se retiran muy bien las burbujas con un agitador de vidrio, esta operación se realizó cada vez que se colocó una nueva capa del emparedado, después, se colocó el gel sobre el papel filtro, sobre el gel se colocó la membrana de nitrocelulosa y finalmente otros dos pedazos de papel filtro y la otra esponja de fibra, por último se cerró bien el dispositivo, el procedimiento se muestra en la figura 4.

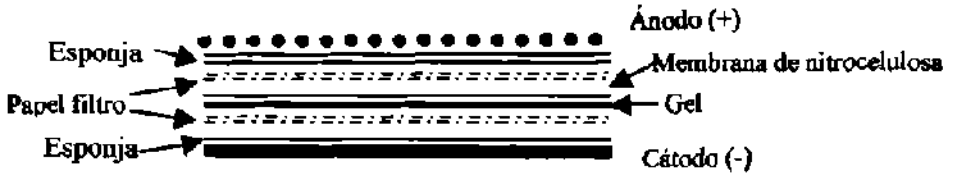

Figura 4. Representación esquemática de la preparación del gel de poliacrilamida y la membrana de nitrocelulosa para la transferencia.

Se colocó el dispositivo dentro de la cámara de transferencia de forma que la membrana de nitrocelulosa quedara del lado del ánodo. La transferencia se realizó en frío, con agitación constante, a 100 volts y amperaje libre por 1.0 h, una vez transcurrido este tiempo se recuperó la membrana de nitrocelulosa y se tiño con solución de Ponceau por 10 min. en agitación y a temperatura ambiente, se lavó con PBS 1X para quitar el exceso del colorante, se colocó sobre un papel filtro y se dejó secar.

Se recuperó el gel y se tiño en azul de Coomasie por 16 hs. Los geles que se pusieron a teñir en el azul de Coomasie se destiñeron por agitación con solución decolorante en repetidas ocasiones hasta eliminar el exceso del colorante lo que permitió la visualización del patrón característico de las bandas de proteína de cada una de las muestras analizadas. Ver apéndice D página 137.

2.2.7.3 Detección por WB de inmunoglobulinas séricas contra la mielina del nervio ciático

Se cortaron tiras del papel de nitrocelulosa previamente transferido de 3 mm de ancho y cada una se bloqueó con 1.5 mL de solución albúmina sérica bovina al 1% en PBS 1X pH 7.4 por 30 min a temperatura ambiente y agitación en vaivén. Una vez transcurridos los 30 min se retiró la solución de bloqueo y se procedió a hacer tres lavados con PBS 1X pH 7.4 durante 10 min cada uno en agitación en vaivén y a temperatura ambiente.

Después del último lavado se incubaron las tirillas por 2 hs a temperatura ambiente y agitación ligera con un combinado de ocho sueros de ratas de cada una de la etapas de la neuropatía, excepto en la etapa de recuperación en que solo se emplearon 7, así como del grupo de ratas control sin tratar, posteriormente, se probaron individualmente cinco sueros de cada una de las etapas de la polineuropatía para la detección de IgG. La dilución del suero en todos los casos fue de 1:20 y se diluyó en solución de albúmina sérica bovina al 0.1% en PBS 1X pH 7.4.

Como control positivo se utilizó anticuerpo monoclonal comercial contra mielina del nervio periférico a una dilución de 1:120. El volumen utilizado por tirilla fue de 1.5 mL. Posteriormente, se incubaron las tirillas durante toda la noche a 4°C.

Se retiraron las tirillas del refrigerador y se dejaron a temperatura ambiente por espacio de 1.0 hs, después se procedió a retirar cada uno de los sueros y se hicieron tres lavados con PBS 1X pH 7.4 como se describió anteriormente.

Después del tercer lavado se procedió a incubar las tirillas con el segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa contra IgG de rata a una dilución de 1:1,500, contra IgM de rata a una dilución de 1:1,500 y contra IgM de ratón a una dilución de 1:1000 para el control positivo, por 2 hs a temperatura ambiente y agitación ligera.

Al terminó de las 2 hs se realizaron tres lavados con PBS 1X pH 7.4 como ya se describió. Finalmente se procedió a revelar cada una de las tirillas en una solución de 3'3 diaminobencidina comercial, el tiempo de revelado fue 3 a 5 min. De detiene la reacción al colocar las tirillas en agua bidestilada y luego en PBS 1X pH 7.4.

2.2.7.4 Detección por WB de inmunoglobulinas séricas contra la PBM de conejo

Se cortaron tiras del papel de nitrocelulosa previamente transferido de 3 mm de ancho y cada una se bloqueó con 1.5 mL de solución de leche en polvo sin grasa al 0.1% en PBS 1X pH 7.4 durante 1hs a temperatura ambiente y agitación en vaivén.

Una vez transcurridos los 30 min se retiró la solución de bloqueo y se procedió a hacer tres lavados con PBS 1X pH 7.4 durante 10 min cada uno en agitación en vaivén a temperatura ambiente.

Después del último lavado se incubaron las tirillas por 2 hs a temperatura ambiente y agitación ligera con una mezcla de ocho sueros de ratas de cada una de la etapas de la neuropatía, excepto en la etapa de recuperación en que solo se emplearon 7, así como del grupo de ratas control sin tratar, posteriormente, se probaron individualmente cinco sueros de cada una de las etapas de la polineuropatía.

La dilución del suero en todos los casos fue de 1:20 y se diluyó en solución de leche en polvo al 0.01% en PBS 1X pH 7.4. Posteriormente, se incubaron las tirillas durante toda la noche a 4°C.

Se retiraron las tirillas del refrigerador y se dejaron a temperatura ambiente por espacio de 1.0 h, después se procedió a retirar cada uno de los sueros y se hicieron tres lavados con PBS 1X pH 7.4 como se describió anteriormente.

Después del tercer lavado se procedió a incubar las tirillas con el segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa contra IgG de rata hecho en conejo a una dilución de 1:2,500, contra IgM de rata hecho en cabra a una dilución de 1: 5000 y contra IgM de ratón a una dilución de 1:1000 para el control positivo, por 2 hs a temperatura ambiente y agitación ligera.

Al terminó de las 2 hs se realizaron tres lavados con PBS 1X pH 7.4 como ya se describió. Finalmente se procedió a revelar cada una de las tirillas en una solución de 3'3 diaminobencidina comercial, el tiempo de revelado fue 3 a 5 min. De detiene la reacción al colocar las tirillas en agua bidestilada y luego en PBS 1X pH 7.4.

Adicionalmente se realizó la detección IgM dirigida contra la PBM en una mezcla de 8 sueros de ratas Wistar de nuestro bioterio y en una mezcla de 8 sueros de ratas Sprague-Dawley sin tratar, procedentes del bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL. Ver apéndice E página 139 para la preparación de reactivos.

2.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

2.3.1 Análisis de Varianza (ANOVA)

Se utilizó para la evaluación de los resultados morfométricos de mastocitos y linfocitos, así como, para determinar si influye o no el género de las ratas en las variables bajo estudio.

2.3.2 Prueba de Kolmogorov-Smirnov

Se realizó esta prueba para evaluar el tipo de distribución de los resultados.

2.3.3Prueba de Fisher de comparaciones múltiples de diferencia mínima significativa (LSD)

Se realizó para evaluar si hubo diferencia significativa entre los grupos de estudio.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE TOXINAS EN EL FRUTO DE LA *K. humboldtiana* POR CLAR- FR

La cuantificación de las toxinas se realizó por cromatografía de líquidos de alta resolución después de la extracción de 0.5 gr del fruto de la *K. humboldtiana* con acetato de etilo. En el cromatograma se observan los tiempos de retención en minutos de las toxinas y el área bajo la curva de la T-514 y de la mezcla de la T-544 como se muestra en la figura 4 y en la tabla VI se muestran las concentraciones en porcentaje de cada una de estas toxinas.

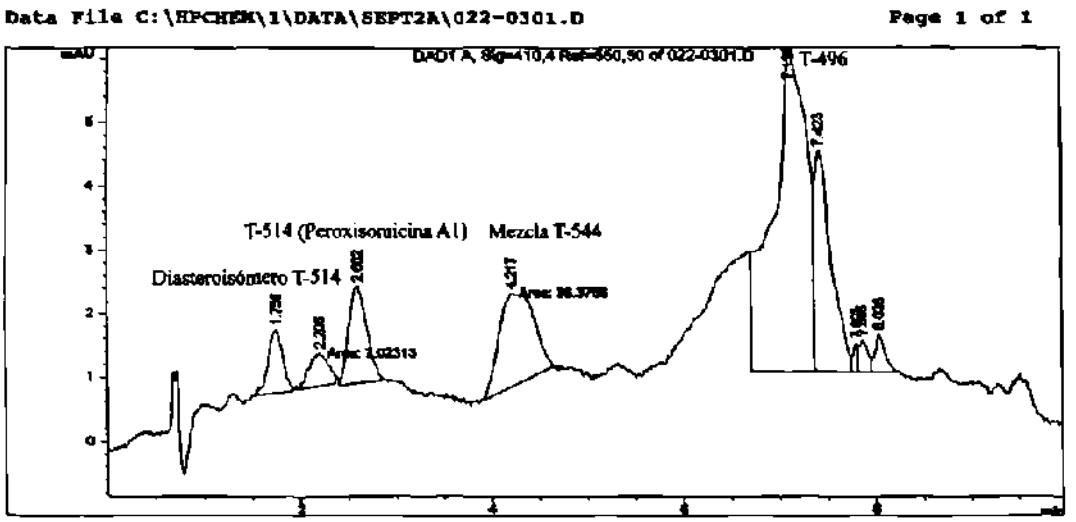

Figura 5. Cromatograma de las toxinas del fruto maduro de la *K. humboldtiana* por CLAR-FR

Compuesto	%
Diasteroisómero de la T-514	4.2
Peroxisomicina A1 (T-514)	7.9
Complejo T-544	14.6
T-496	50.3

Tabla VI.- Relación del porcentaje de área en el cromatograma de cada una de las toxinas del fruto maduro de *la K. humboldtiana.* (Método de normalización Poole & Poole 1991)[63].

3.2 OBTENCIÓN DE LA MIELINA DE NERVIO CIÁTICO

3.2.1 Rendimiento de la mielina de nervio ciático

A partir de 500 mg de nervio ciático liofilizado y homogeneizado procedente de ratas Wistar normales, se obtuvo un total de 32.7 mg de mielina por ultracentrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa, siendo el rendimiento en este proceso del 6.54%.

3.2.1.1 Concentración de proteínas en la mielina de nervio ciático

La concentración de proteínas en la mielina de nervio ciático obtenida en el punto anterior fue de 68.17 μg/mg. según el método de Bradford.

3.3 MODELO EXPERIMENTAL DE POLINEUROPATÍA CON EL FRUTO DE LA *K. humboldtiana*

Para este estudio se probaron por V.O. diferentes dosis únicas y una dosis de 3.5 g/Kg del fruto maduro de la *K. humboldtiana* que se administró fraccionada en cinco dosis, los resultados se muestran en las tablas VII y VIII respectivamente.

Dosis Única g/Kg	Mortalidad n = 8	%	Desarrollo de Paresia Parálisis
1.25	0/8	0	Ninguna
1.50	1/8	12.5	Ninguna
1.75	3/8	37.5	Paresia severa
1.76	**5/8**	**62.5**	**Parálisis**
1.77	**7/8**	**87.5**	**Parálisis**
1.80	**7/8**	**87.5**	**Parálisis**
1.90	8/8	100	———

Tabla VII Relación de dosis únicas empleadas para la elección del esquema de dosificación para el desarrollo del modelo experimental de polineuropatía.

En esta tabla se puede observar que con las dosis de 1.76, 1.77 y 1.8 g/Kg las ratas que no murieron desarrollaron parálisis, sin embargo, se descartó el uso de este esquema de dosificación por no obtenerse el número de muestra suficiente, debido a la alta mortalidad que se presentó a estas dosis.

Por lo tanto, se procedió a la administración del esquema de dosificación fraccionada como se muestra en la tabla VIII.

Dosis total fraccionada g/Kg	No. de dosis	Periodo en días	Mortalidad n = 8	%
3.5	5	14	1/8	12.5

Dosis	g/Kg	Intervalo
1	1.5	2 veces por semana administradas en forma individual
2 - 5	0.5	

Desarrollo de paresia (32 días ddi*) parálisis (52 días ddi) y recuperación a partir del día 65 ddi.
*ddi después de la dosis inicial

Tabla VIII. Resultados después de la administración del esquema de dosis fraccionada (3.5g/Kg) V.O del fruto de la *K. humboldtiana*.

En esta tabla se puede observar que se administraron un total de 5 dosis del fruto maduro de la *K. humboldtiana* en un periodo de 14 días, con este esquema se observó el desarrollo de paresia (32 días ddi) que progresó hasta parálisis (52 días ddi) respectivamente. Seguida de la parálisis se presentó la recuperación de las ratas a partir del día 65 ddi. Con este modelo, el 87.5 % de las ratas tratadas desarrolló el cuadro neurológico tradicionalmente descrito para esta intoxicación.

3.3.1 Manifestaciones clínicas de intoxicación

Todas las ratas tratadas con el fruto de la *K. humboldtiana* se revisaron a diario y se registro la aparición de los parámetros clínicos de intoxicación mencionados en el capítulo 2 sección 2.2.2.2.

3.3.1.1 Etapa sin neuropatía (Grupo 24 días ddi)

Las principales manifestaciones clínicas de intoxicación se presentaron en la primera semana después de la administración de la dosis inicial del fruto. Estos animales mostraron pérdida de peso importante, debilidad, piloerección, disminución en la actividad espontánea y como signo constante de la intoxicación se presentó disnea desde ligera hasta severa que en algunos casos, culminó en la muerte de la rata. Durante la segunda y tercera semana se observó una recuperación aparente que se caracterizó principalmente por aumento de peso corporal, disminución de la disnea, sin embargo, durante este periodo las ratas presentaron alopecia en el área frontal de la cara y en la región dorsal. En la figura 6a se puede observar una rata representativa de la etapa sin neuropatía .

3.3.1.2 Etapa de paresia (Grupo 48 días ddi)

En este grupo de animales además de los signos ya mencionados para el grupo sin neuropatía (24 días ddi), se observó adelgazamiento e hiperextensión del tren posterior, jiba, hiporreflexia y dificultad en la marcha. Nuevamente se observó pérdida de peso que coincide con la instalación de la paresia 36 ± 4 días. Además, se presentó dificultad respiratoria de moderada a severa (Figura 6b).

3.3.1.3 Etapa de parálisis (Grupo 58 días)

En estos animales además de los signos de intoxicación ya mencionados, el adelgazamiento del tren posterior se hizo más evidente, la paresia progresó hasta el desarrollo de la parálisis fláccida bilateral y arrastre del tren posterior.

El peso corporal permanece bajo sin variaciones significativas, en algunos animales se observaron las manos en garra o en gota. La alopecia se hizo más evidente y en algunos casos se presentó aumento de la frecuencia respiratoria, principalmente en aquellas ratas que mostraron un mayor deterioro (Figura 6d).

3.3.1.4 Etapa de recuperación (Grupo 112 días)

Este grupo de ratas presentó todos los signos de intoxicación antes mencionados, sin embargo, a partir de la sexta y séptima semana los animales iniciaron su recuperación, con aumento de peso sostenido, aumento progresivo de la actividad espontánea, disminución de la debilidad y mejoramiento de la apariencia general. Hasta que ninguno de los signos de la polineuropatía fue evidente (Figura 6e).

3.3.1.5 Grupo control

Este grupo no presentó durante todo el estudio ninguno de los signos (Figura 6c).

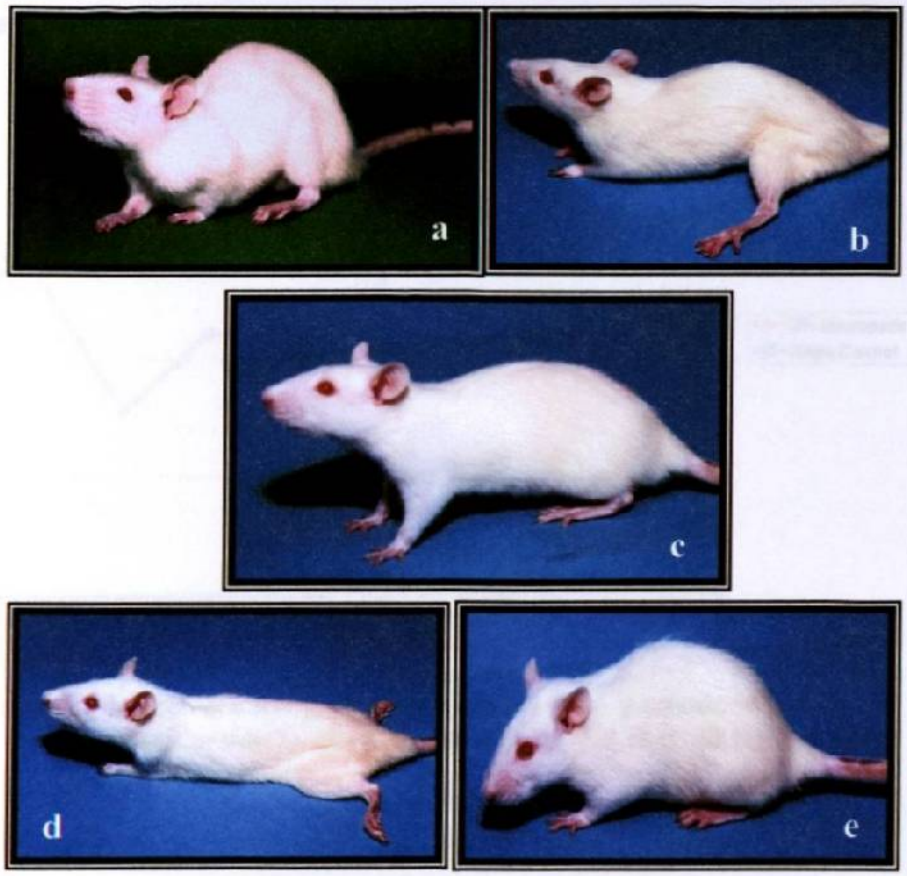

Figura 6. Ratas Wistar representativas de cada una de la etapas de la polineuropatía causada por el fruto de la *K. humboldtiana* y grupo control sin tratar. **a)** Rata intoxicada sin neuropatía (24 días ddi), **b)** Rata intoxicada con paresia (48 días ddi), **c)** Rata control normal, **d)** Rata intoxicada con parálisis (58 días ddi) y **e)** Rata intoxicada recuperada de la neuropatía (112 días ddi).

3.3.2 Registro del peso corporal

3.3.2.1 Etapa sin neuropatía (Grupo 24 días ddi)

En la figura 7 se muestra el comportamiento del peso corporal promedio de las ratas durante los primeros 24 días de la intoxicación.

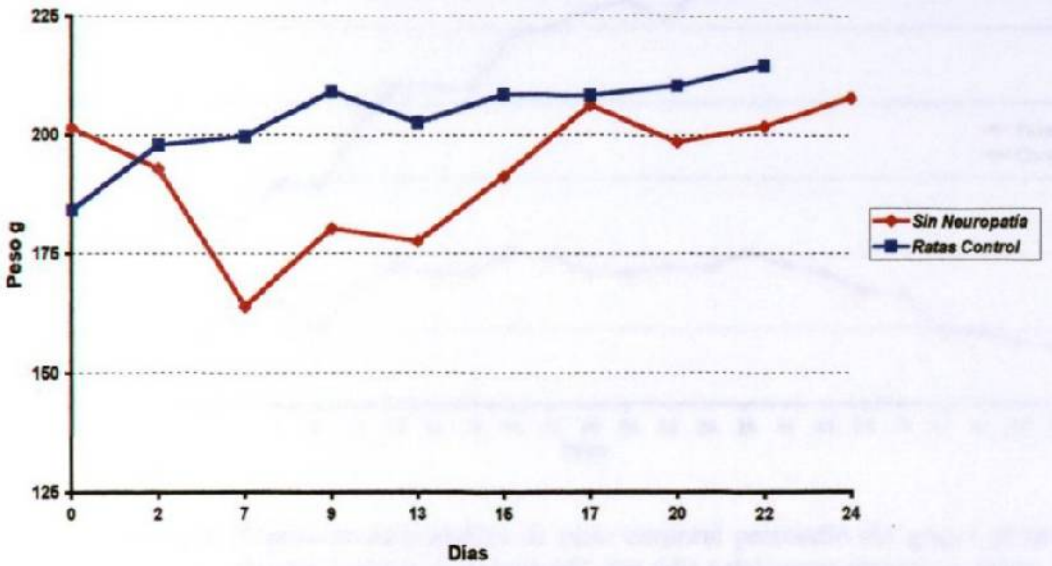

Figura 7. Representación gráfica del peso corporal promedio del grupo de ratas durante la etapa sin neuropatía (24 días ddi) y del grupo control sin tratar.

En esta gráfica se observa en esta etapa una pérdida importante de peso del 19.45 ± 4.83% al séptimo día de la intoxicación, mientras que el grupo control presentó un aumento del 8.37 ± 1.52%. A partir de la segunda semana del tratamiento hasta el día en que los animales fueron sacrificados hubo un aumento de peso del 5.17 ± 5.1%.

3.3.2.2 Etapa de paresia (Grupo 48 días ddi)

En la figura 8 se muestra el comportamiento del peso corporal promedio de las ratas con paresia.

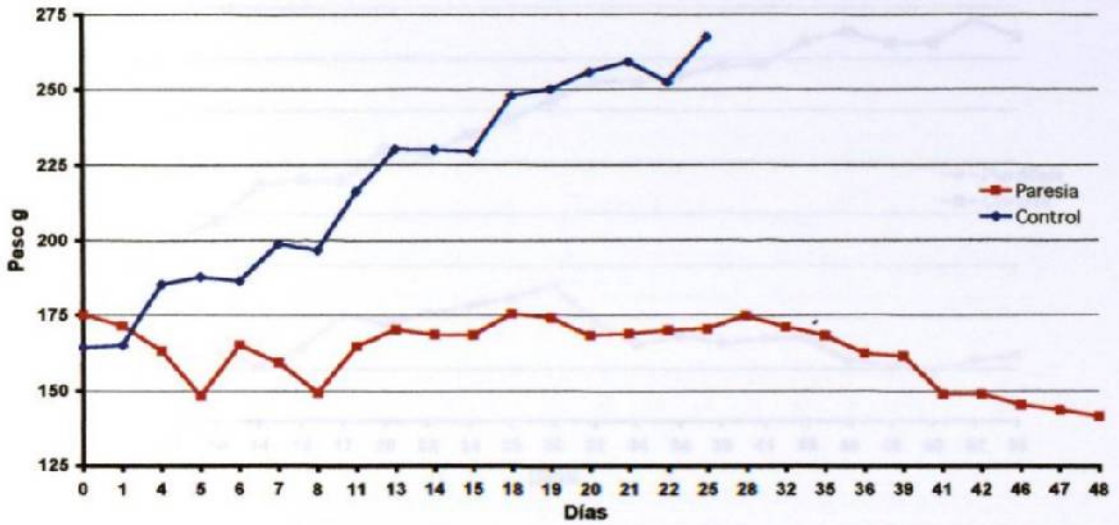

Figura 8. Representación gráfica de peso corporal promedio del grupo de ratas durante la etapa de paresia (48 días ddi) y del grupo control sin tratar.

En esta gráfica se observa una pérdida importante de peso del 14.7 ± 5.74% al séptimo día de la intoxicación, mientras que el grupo control presentó un aumento del 8.32 ± 1.65%. Del día 9 al 32 hubo un aumento de peso del 15.0 ± 12.45%. Sin embargo, del día 32 hasta el día 48 en que fueron sacrificadas, se presentó nuevamente pérdida de peso del 20.0 ± 6.22%.

3.3.2.3 Etapa de parálisis (Grupo 58 días)

En la figura 9 se muestra el comportamiento del peso corporal promedio del grupo de ratas con parálisis.

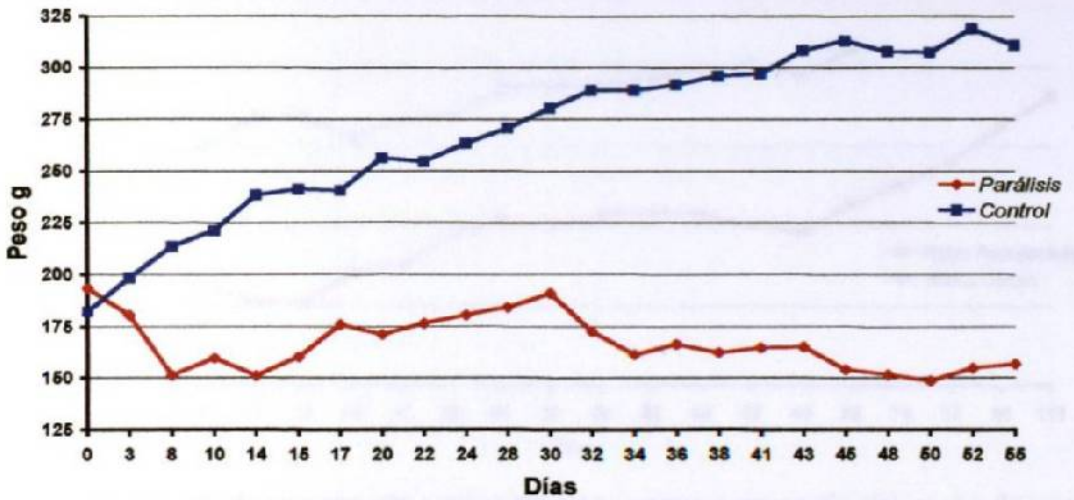

Figura 9. Representación gráfica de peso corporal promedio del grupo de ratas durante la etapa de parálisis (58 días ddi) y del grupo control sin tratar.

En esta gráfica se observa una pérdida importante de peso del 21.57 ± 8.08% al séptimo día de la intoxicación, mientras que el grupo control presentó un aumento del 17.22 ± 3.97%. Del día 9 al 32 hubo un aumento de peso del 8.73 ± 4.0%. Sin embargo, del día 32 hasta el día 58 en que fueron sacrificadas, se observó nuevamente pérdida de peso del 15.02 ± 5.88%.

3.3.2.4 Etapa de recuperación (Grupo 112 días)

En la figura 10 se muestra el comportamiento del peso corporal promedio del grupo de ratas recuperadas de la neuropatía.

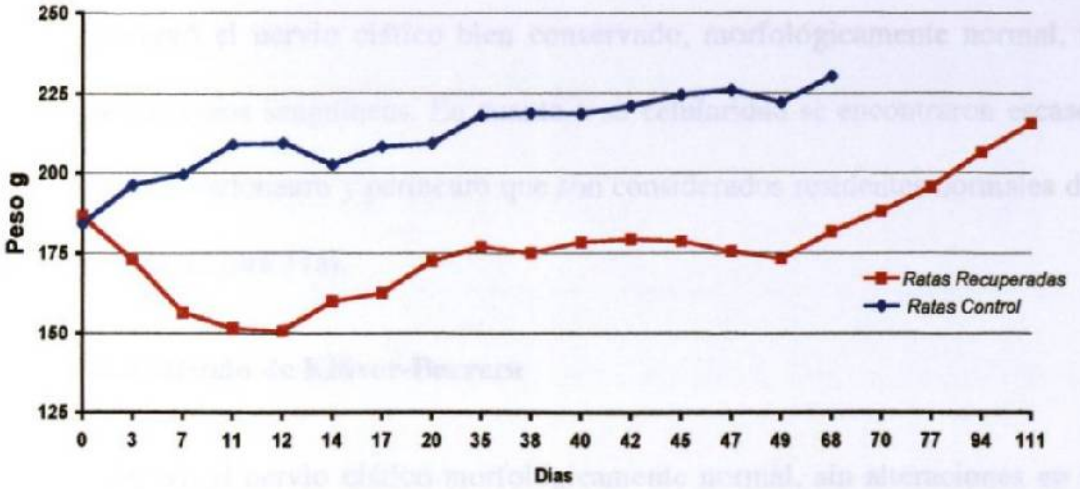

Figura 10. Representación gráfica del peso corporal promedio del grupo de ratas durante la etapa de recuperación (112 días ddi) y del grupo control sin tratar.

En esta gráfica se observa una pérdida de peso del 19.35 ± 11.82% al séptimo día de la intoxicación, mientras que el grupo control que presentó un aumento del 13.58 ± 1.47%. Del día 9 al 32 hubo un aumento de peso del 15.62 ± 11.3%. Sin embargo, del día 32 hasta el día 55 lapso en que se presentó la parálisis, se observó nuevamente pérdida de peso del 10.25 ± 1.8%. Finalmente, a partir del día 65 hasta el día 112 en que fueron sacrificadas presentaron un aumento de peso del 16.4 ± 3.5%.

3.4 RESULTADOS HISTOLÓGICOS

3.4.1 Grupo Control

3.4.1.1 Tinción con hematoxilina y eosina

Se observó el nervio ciático bien conservado, morfológicamente normal, lo mismo que los vasos sanguíneos. En cuanto a su celularidad se encontraron escasos mastocitos en el endoneuro y perineuro que son considerados residentes normales del tejido nervioso (Figura 11a).

3.4.1.2 Método de Klüver-Barrera

Se observó el nervio ciático morfológicamente normal, sin alteraciones en la vaina de mielina, fibras nerviosas íntegras y bien definidas (Figura 11b), además de algunos mastocitos no desgranulados y desgranulados tanto en el endoneuro como en el perineuro, principalmente a nivel perivascular.

3.4.1.3 Tinción de Azul de toluidina

Se confirmó e identificó la presencia de mastocitos perivasculares tanto desgranulados como no desgranulados en endoneuro y perineuro del nervio ciático, (Figura 11d).

3.4.1.4 Método de Marsland-Glees y Erickson

Con esta tinción se observó la presencia de axones bien conservados sin alteraciones morfológicas, (Figura 11c).

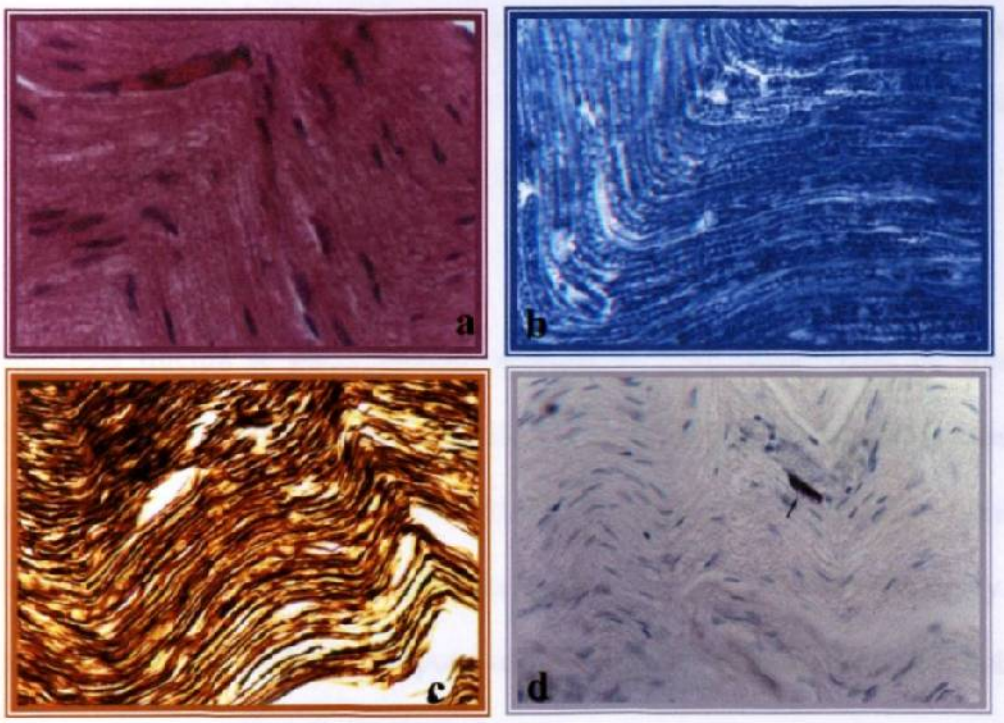

Figura 11. Cortes de nervio ciático de rata Wistar control sin tratar. **a)** Tinción H y E se observó la morfología normal del nervio. **b)** Método de Klüver-Barrera, se apreció la mielina bien conservada. **c)** Método de Marsland-Glees y Erickson se observaron axones normales. **d)** Tinción de azul de toluidina se observó un mastocito perivascular residente del tejido nervioso (→). **40x.**

3.4.2 Etapa sin neuropatía (Grupo 24 días ddi)

3.4.2.1 Tinción hematoxilina y eosina

En el estudio histológico se encontraron alteraciones en la morfología del nervio ciático, consistentes en vacuolización intersticial de la vaina de mielina y dentro de las fibras nerviosas, vasodilatación y congestión vascular. Así como, la presencia de infiltrado de mastocitos tanto en el endoneuro como en el perineuro, en cantidad superior al observado en el grupo control, (Figura 12a).

3.4.2.2 Método de Klüver-Barrera

Con esta tinción se pudo apreciar desmielinización segmentaria de algunas fibras nerviosas, micro y macrovacuolización entre y dentro de las vainas de mielina, separación de las fibras nerviosas, vasodilatación. y congestión vascular. También fue evidente la presencia de numerosos mastocitos con bordes bien definidos y con gránulos metacromáticos color púrpura en su interior (Figura 12b). Además se observaron numerosos linfocitos a nivel vascular.

3.4.2.3 Tinción de azul de toluidina

Con esta tinción fue posible la identificación y confirmación de la presencia de numerosos mastocitos endoneurales íntegros en el nervio ciático, (Figura 12d).

3.4.2.4 Método de Marsland-Glees y Erickson

El método de impregnación con plata permitió observar las alteraciones presentes a nivel axonal en el nervio ciático. Se observaron alteraciones axonales que consistieron en zonas de adelgazamiento alternadas con abultamientos del axón dando la apariencia de cuentas de un rosario, (Figura 12c).

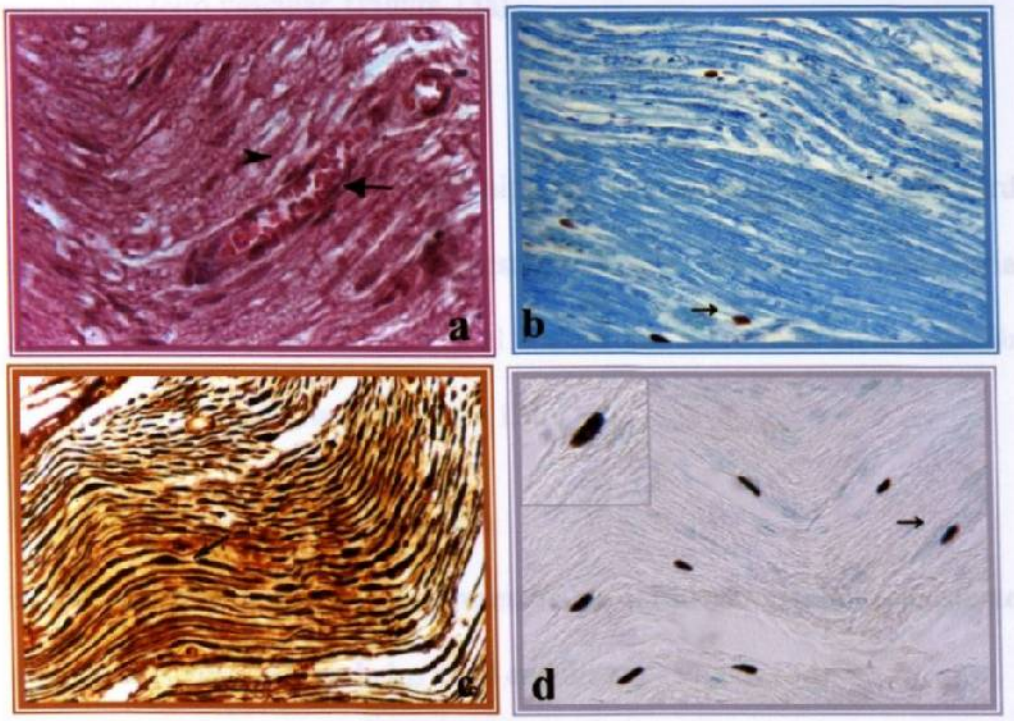

Figura 12. Cortes de nervio ciático de ratas Wistar sin neuropatía (24 días ddi). **a)** Tinción H y E se observa vacuolización (➤) en las vainas de mielina, vasodilatación y congestión vascular (→). **b)** Método de Klüver-Barrera se aprecia desmielinización segmentaria ligera e infiltrado de mastocitos íntegros principalmente (→). **c)** Método Marsland-Glees y Erickson se presentan alteraciones en algunos axones (→) . **d)** Tinción de azul de toluidina se aprecia un aumento en la cantidad de mastocitos endoneurales íntegros (→). **40x.**

3.4.3 Etapa de Paresia (Grupo 48 días ddi)

3.4.3.1 Tinción con hematoxilina y eosina

En esta etapa de la intoxicación, la alteración en la morfología normal del *nervio ciático fue evidente y consistió en vacuolización endoneural, vasodilatación,* congestión vascular y la presencia de abundantes mastocitos endoneurales desgranulados. Además, se encontró infiltrado de linfocitos en el endoneuro y adheridos al endotelio vascular, (Figura 13a).

3.4.3.2 Método de Klüver-Barrera

Con esta tinción se observó desmielinización segmentaria, separación y pérdida de *fibras nerviosas, vasodilatación y congestión* vascular, además, de la presencia de mastocitos desgranulados y *linfocitos en el endoneuro, sobre todo en aquellas áreas* donde el daño fue más importante, (Figura 13b).

3.4.3.3 Tinción de azul de toluidina

En estos cortes se observó la presencia de infiltrado celular consistente en abundantes mastocitos desgranulados en el endoneuro, (Figura 13d).

3.4.3.4 Método de Marsland-Glees y Erickson

En estos cortes se observó daño axonal moderado consistente en zonas de adelgazamiento alternadas con zonas abultadas y tortuosas incluso se observaron axones interrumpidos. En otras áreas se observó la pérdida de los axones, (Figura 13c).

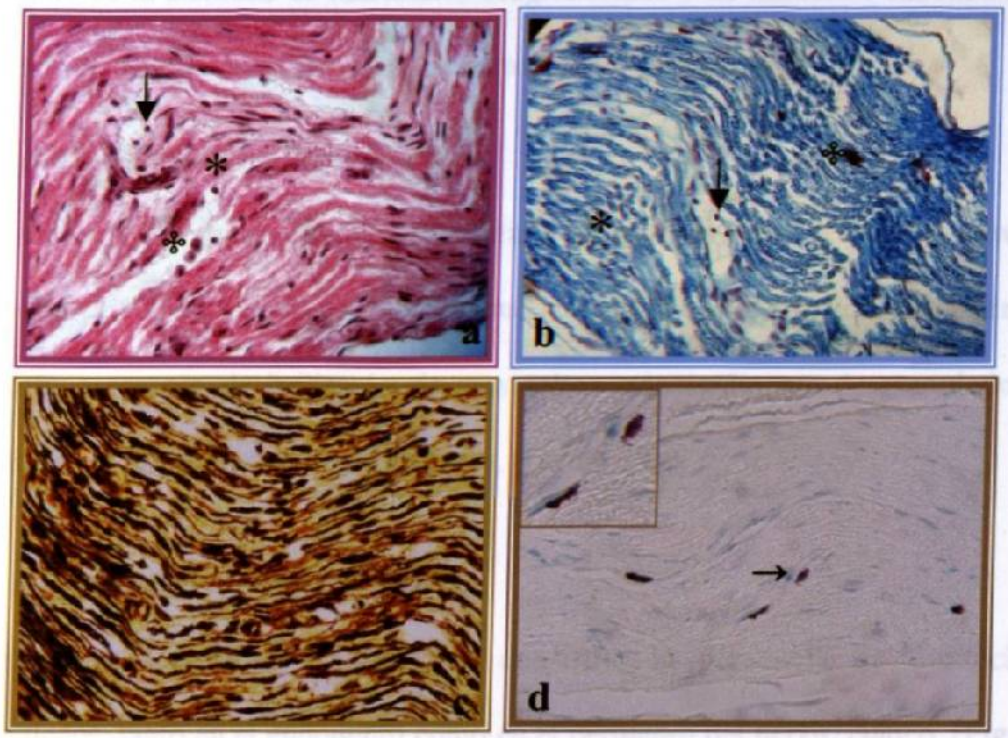

Figura 13. Cortes de nervio ciático de ratas Wistar con paresia (48 días ddi). **a)** Tinción H y E se observa infiltrado de mastocitos (✣) y linfocitos en el endoneuro (*), además de linfocitos adheridos al endotelio vascular (→). **b)** Método de Klüver-Barrera se aprecia desmielinización segmentaria e infiltrado de mastocitos (✣) y linfocitos en el endoneuro (*), además, de linfocitos adheridos al endotelio vascular (→). **c)** Método de Marsland-Glees y Erickson se advierte daño axonal que se manifiesta por la presencia de axones tortuosos. **d)** Tinción de azul de toluidina, se observa infiltrado de mastocitos principalmente desgranulados en el endoneuro (→). **40x.**

3.4.4 Etapa de Parálisis (Grupo 58 días ddi)

3.4.4.1 Tinción hematoxilina y eosina

En esta etapa el daño morfológico en el nervio ciático fue severo y consistió en pérdida importante de las fibras nerviosas y vasodilatación. Además, se observó un incremento en la cantidad de mastocitos desgranulados y de linfocitos endoneurales, sobre todo en aquella áreas que mostraron más daño, (Figura 14a).

3.4.4.2 Método de Klüver-Barrera

Se observó desmielinización segmentaria en grandes áreas del nervio, pérdida importante de fibras nerviosas, macrovacuolización y vasodilatación. También se apreció la presencia de infiltrado de mastocitos principalmente desgranulados y linfocitos en el endoneuro y en el perineuro, (Figura 14b).

3.4.4.3 Tinción de azul de toluidina

En estos cortes se identificó y confirmó la presencia de mastocitos desgranulados, tanto en el endoneuro como en el perineuro del nervio ciático, (Figura 14d).

3.4.4.4 Método de Marsland-Glees y Erickson

Se observó pérdida axonal muy importante, los axones presentes mostraron grandes zonas de adelgazamiento con tendencia a desaparecer, en otros sitios se observan tramos de axón contraídos, también se observaron axones tortuosos y gruesos, (Figura 14c).

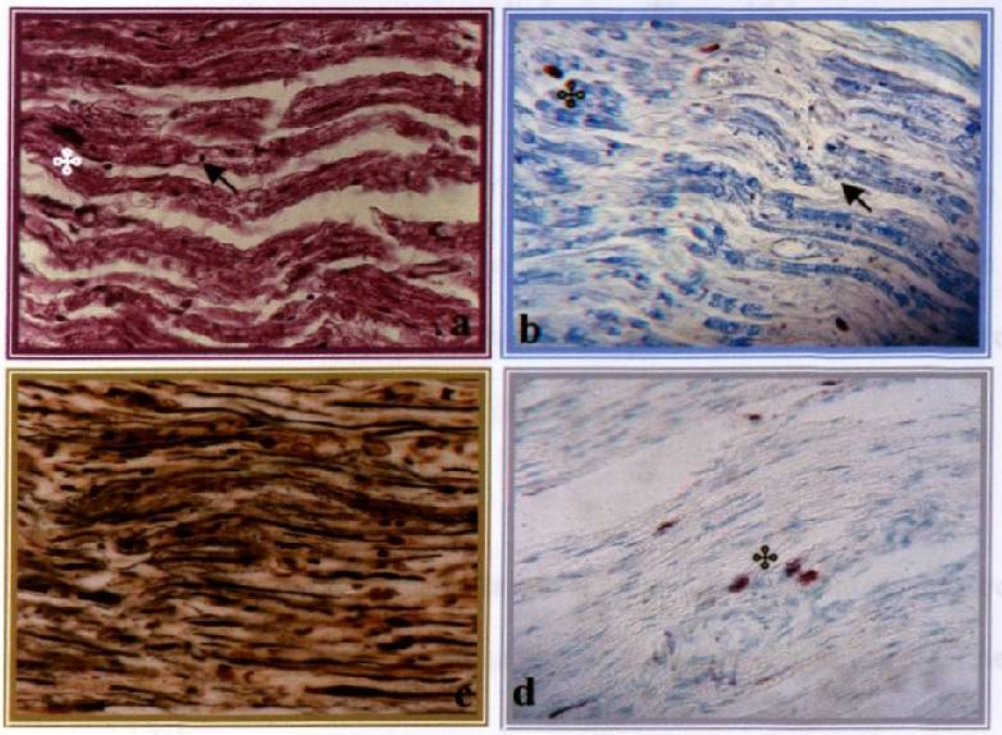

Figura 14. Cortes de nervio ciático de ratas Wistar con parálisis (58 días ddi). **a)** Tinción H y E se aprecia infiltrado de mastocitos (✤) y linfocitos (→). **b)** Método de Klüver-Barrera se observa desmielinización severa e infiltrado de mastocitos (✤) y linfocitos (→). **c)** Método Marsland-Glees y Erickson, se advierte daño axonal severo. **d)** Tinción de azul de toluidina se nota un aumento en la cantidad de mastocitos desgranulados en el endoneuro (✤). **40x**

3.4.5 Etapa de Recuperación (Grupo 112 días ddi)

3.4.5.1 Tinción hematoxilina y eosina

Se observó recuperación de la morfología normal del nervio, sin embargo, *persistió la vasodilatación y la presencia de abundantes mastocitos desgranulados*. Es importante mencionar que no se encontraron linfocitos, (Figura 15a).

3.4.5.2 Método de Klüver-Barrera

Se observó remielinización de las fibras nerviosas a tal grado que son casi indistinguibles del nervio ciático control sin tratar. Persistió la vasodilatación y la presencia de abundantes mastocitos desgranulados en el endoneuro y perineuro del nervio ciático, no así la presencia linfocitos, (Figura 15b).

3.4.5.3 Tinción de azul de toluidina

Con esta tinción se identificó la presencia de abundantes mastocitos principalmente desgranulados tanto en el endoneuro como en el perineuro del nervio ciático, (Figura 15d).

3.4.5.4 Método de Marsland-Glees y Erickson

Se observó recuperación axonal de los nervios ciáticos, sin embargo se presentaron en algunas zonas daño residual caracterizado por áreas de adelgazamiento axonal, (Figura 15c).

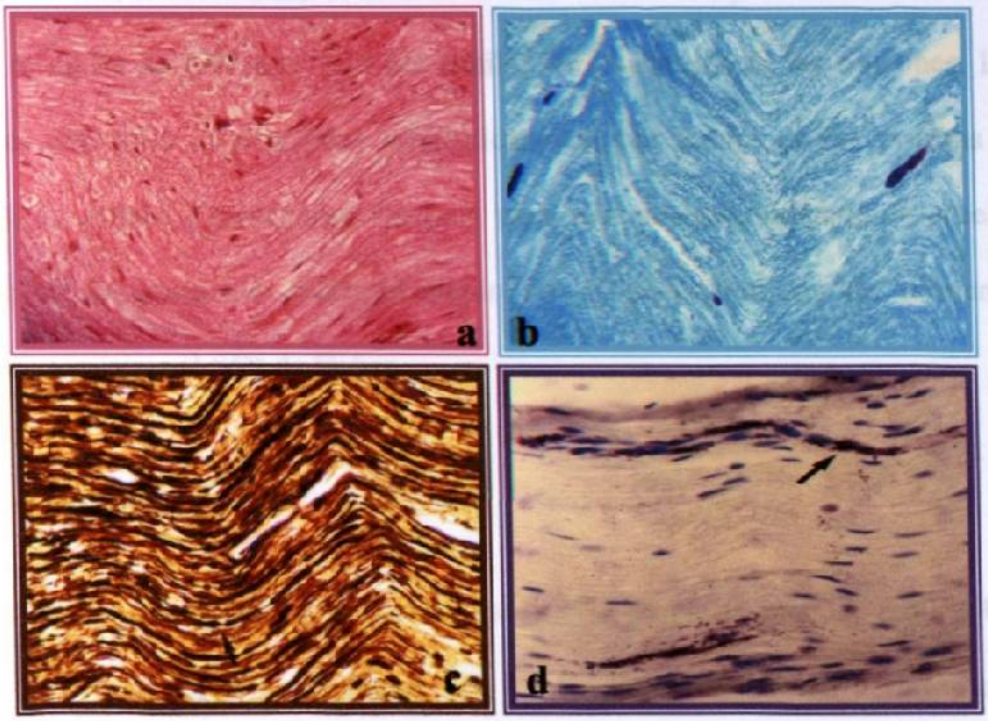

Figura 15. Cortes de nervio ciático de ratas Wistar en la etapa de recuperación (112 días ddi). **a)** Tinción H y E se observa recuperación de la morfología normal del nervio ciático. **b)** método de Klüver-Barrera, se aprecia remielinización e infiltrado de mastocitos (✤). **c)** Método Marsland-Glees y Erickson se advierte regeneración axonal y daño residual en algunas zonas (→). **d)** Tinción de azul de toluidina se observan mastocitos desgranulados principalmente (→). **40X**

3.5 CUANTIFICACIÓN DE MASTOCITOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

La cuenta de mastocitos se realizó en los cortes de nervio ciático teñidos con azul de toluidina, así como, con el método de Klüver-Barrera, para esto se estableció un área de tejido de 2.87 mm^2 que fue similar para cada una de las tinciones. Los resultados obtenidos se evaluaron estadísticamente por medio de las pruebas de ANOVA, la prueba Kolmogorov-Smirnov para una muestra, además de pruebas post-hoc de comparación múltiple según en el procedimiento de diferencia significativa mínima (LSD) de Fisher.

3.5.1 Grupo Control

La cuenta de mastocitos endoneurales en este grupo de ratas se realizó bajo condiciones ya descritas en el punto 3.5. Ya finalizado el conteo de mastocitos endoneurales no desgranulados y desgranulados, se obtuvo la cantidad de mastocitos totales por mm^2 (mastot/mm^2), así como la cantidad de mastocitos desgranulados por mm^2 (mastdes/mm^2) y su porcentaje en relación con la cantidad de mastot/mm^2 de cada una de las muestras de nervio ciático. Para la evaluación de los resultados se obtuvo el promedio y la desviación estándar de las tres variables de interés como se muestra en la tabla IX.

Rata	Área observada mm^2	Mastocitos Endoneurales desgranulados		Total	mastot/mm^2	Mastocitos Desgranulados	
		No	Si			%	mastdes/mm^2
1	5.73	49	42	91	15.88	46.15	7.33
2	5.74	48	23	71	12.37	32.39	4.01
3	5.77	35	70	105	18.20	66.67	12.13
4	5.76	25	37	62	10.76	59.68	6.42
5	5.74	32	48	80	13.94	60.00	8.36
6	5.72	5	28	33	5.77	84.85	4.9
7	5.77	36	38	74	12.82	51.35	6.59
8	5.74	47	56	103	17.94	54.37	9.76
				Promedio	**13.46**	**56.93**	**7.44**
				Desviación std	**4.08**	**15.34**	**2.63**

Tabla IX. Cuantificación y relación de mastocitos endoneurales no desgranulados y desgranulados por mm^2 en el nervio ciático de ratas control sin tratar.

En la tabla se pueden observar los resultados obtenidos para cada una de las muestras analizadas, después de realizar los cálculos antes descritos se obtuvo un promedio de 13.46 ± 4.08 mastot/mm^2, de estas células el 56.93 ± 15.34 % presentaron desgranulación, que corresponde a 7.44 ± 2.63 mastdes/mm^2, el error estándar de la media que es la medida de la variabilidad en el muestreo para estas variables fue de 1.44 y de 0.928 respectivamente. El rango alrededor de la media para los mastot/mm^2 fue de 10.05 – 16.87 y para los mastdes/mm^2 fue de 5.24 – 9.63 con un intervalo de confianza del 95%.

El análisis estadístico que muestra la distribución de los resultados se resume en la tabla IXa.

		mastot/mm²	[c]mastdes/mm²
N		8	8
Parámetros Normales [a,b]	Media	13.4610	7.4364
	Desviación Estándar	4.0823	2.6252
Extremo Mayor Diferencias	Absoluto	.145	.141
	Positiva	.123	.141
	Negativa	-.145	-.100
Kolmogorov-Smirnov Z		.409	.399
Sig. Asymp. (2 colas)		.996	.997

a. La prueba de distribución es normal
b. Calculada a partir de los datos
c. Mastocitos desgranulados

Tabla IXa. Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra.

3.5.2 Etapa Sin Neuropatía (Grupo 24 días ddi)

La cuenta de mastocitos endoneurales en este grupo de ratas se realizó de acuerdo a las condiciones descritas en el punto 3.5 y 3.5.1. Se contaron los mastocitos endoneurales tanto no desgranulados como desgranulados y los resultados se muestran en la tabla X.

Rata	Área observada mm^2	Mastocitos Endoneurales desgranulados		Total	mastot/mm^2	Mastocitos Desgranulados	
		No	Si			%	mastdes/mm^2
1	5.74	223	42	265	46.17	15.84	7.32
2	5.75	165	74	239	41.57	30.96	12.87
3	5.74	162	42	204	35.54	20.59	7.32
4	5.67	66	52	118	20.81	44.07	9.17
5	5.66	67	100	167	29.51	59.88	17.67
6	5.70	155	85	240	42.08	35.42	14.91
7	5.74	163	67	230	40.07	29.13	11.67
8	5.71	123	116	239	41.86	48.53	20.31
9	5.67	75	85	160	28.22	53.12	14.99
10	5.71	85	54	139	24.34	38.84	9.46
11	4.96	66	61	127	25.60	48.03	12.30
12	5.71	90	60	150	26.27	40.00	10.51
13	5.60	100	85	185	33.03	45.95	15.18
			Promedio		33.47	39.29	12.60
			Desviación std		8.27	12.70	3.93

Tabla X. Cuantificación y relación de mastocitos endoneurales no desgranulados y desgranulados en el nervio ciático de ratas durante la etapa sin neuropatía (24 días ddi).

En la tabla se observa la en la cantidad promedio de mastocitos totales es de 33.47 ± 8.27 mastot/mm^2, donde el 39.29 ± 12.70 % de estas células se encuentran desgranuladas lo que es igual a 12.6 ± 3.93 mastdes/mm^2.Además puede observarse que el 60.71 ± 12.7 % de estas células se encuentran no desgranuladas lo que corresponde a 20.87 ± 8.61 mastnd/mm^2.

El error estándar de la media para los mastot/mm^2 fue de 2.29 y para los mastdes/mm^2 de 1.09. El rango alrededor de la media para mastot/mm^2 fue de 28.47 – 38.46 y para los mastdes/mm^2 fue de 10.22 – 14.97 con un intervalo de confianza del 95%. El análisis estadístico de distribución de los resultados se resume en la tabla Xa.

		mastot/mm^2	[c]mastdes/mm^2
N		13	13
Parámetros Normales [a,b]	Media	33.4666	12.5970
	Desviación Estándar	8.2660	3.9327
Extremo Mayor	Absoluto	.172	.108
Diferencias	Positiva	.142	.102
	Negativa	-.172	-.108
Kolmogorov-Smirnov Z		.622	.390
Sig. Asymp. (2 colas)		.834	.998

a. La prueba de distribución es normal
b. Calculada a partir de los datos
c. Mastocitos desgranulados

Tabla Xa. Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra.

3.5.3 Etapa de Paresia (Grupo 48 días ddi)

La cuenta de mastocitos endoneurales en este grupo de ratas se realizó de acuerdo a las condiciones descritas en el punto 3.5 y 3.5.1. Los resultados para esta etapa se resumen en la tabla XI.

Rata	Área observada mm^2	Mastocitos Endoneurales desgranulados		Total	mastot/mm^2	Mastocitos Desgranulados	
		No	Si			%	mastdes/mm^2
1	5.73	91	99	190	33.14	52.11	17.27
2	5.73	98	107	205	35.77	52.19	18.67
3	5.75	102	104	206	35.83	50.48	18.08
4	4.95	56	115	171	34.55	67.25	23.23
5	4.98	53	91	144	28.92	63.19	18.27
6	5.74	52	94	146	25.44	64.38	16.38
7	5.74	39	141	180	31.36	78.33	24.56
8	4.70	24	111	135	28.72	82.22	23.61
9	5.76	61	125	186	32.29	67.20	21.70
10	5.74	76	140	216	37.63	64.81	24.39
11	5.71	130	116	246	43.08	47.15	20.31
12	5.71	33	59	92	16.11	64.13	10.33
			Promedio		31.90	62.71	19.73
			Desviación std		6.79	10.82	4.15

Tabla XI. Cuantificación y relación de mastocitos endoneurales no desgranulados y desgranulados en el nervio ciático de ratas durante la etapa de paresia (48 días ddi).

En la tabla puede observarse la cantidad promedio de mastocitos endoneurales es de 31.9 ± 6.79 mastot/mm^2 donde el 62.71 ± 10.82 % de los mastot/mm^2 se encuentran desgranulados lo que corresponde a 19.73 ± 4.15 mastdes/mm^2. El error estándar de la media para mastot/mm^2 y para mastdes/mm^2 fue de 1.96 y de 1.2 respectivamente, *así mismo*, el rango alrededor de la media para mastot/mm^2 fue de 27.58 – 36.22 y para los mastdes/mm2 fue de 17.09 - 22.37 con un intervalo de confianza del 95%.

El análisis estadístico de distribución de los resultados se resume en la tabla XIa.

		mastot/mm²	[c]mastdes/mm²
N		12	12
Parámetros Normales[a,b]	Media	31.9023	19.7334
	Desviación Estándar	6.7953	4.1536
Extremo Mayor Diferencias	Absoluto	.153	.134
	Positiva	.116	.122
	Negativa	-.153	-.134
Kolmogorov-Smirnov Z		.531	.463
Sig. Asymp. (2 colas)		.941	.983

a. La prueba de distribución es normal
b. Calculada a partir de los datos
c. Mastocitos desgranulados

Tabla XIa. *Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra.*

3.5.4 Etapa de Parálisis (Grupo 58 días ddi)

La cuenta de mastocitos endoneurales en este grupo de ratas se realizó bajo las condiciones descritas en el punto 3.5 y 3.5.1 Los resultados para esta etapa se resumen en la tabla XII.

Rata	Área observada mm^2	Mastocitos Endoneurales desgranulados		Total	mastot/mm^2	Mastocitos Desgranulados	
		No	Si			%	mastdes/mm^2
1	5.75	75	93	168	29.22	52.11	16.17
2	5.75	19	71	90	15.65	52.19	12.35
3	5.74	69	99	168	29.27	50.48	17.25
4	5.77	57	77	134	23.22	67.25	13.34
5	5.86	104	141	245	41.81	63.19	24.06
6	5.76	100	181	281	48.78	64.38	31.42
7	5.82	46	101	147	25.26	78.33	17.35
8	4.30	45	60	105	28.72	24.42	13.95
9	5.68	106	140	246	43.31	67.20	24.64
10	4.32	47	127	174	40.28	64.81	29.40
11	3.51	11	131	142	43.08	47.15	37.32
			Promedio		32.88	65.51	21.57
			Desviación std		10.49	11.75	8.36

Tabla XII. Cuantificación y relación de mastocitos endoneurales no desgranulados y desgranulados por mm^2 en el nervio ciático de ratas durante la etapa de parálisis (58 días ddi).

En la tabla puede observarse que la cantidad de mastocitos endoneurales es de 32.88 ± 10.49 mastot/mm^2, donde el 65.51 ± 11.75% de los mastocitos se encuentran desgranulados lo que es igual a 21.57 ± 8.36 mastdes/mm^2. El error estándar de la media para mastot/mm^2 y para mastdes/mm^2 fue de 3.16 y de 2.52 respectivamente. El rango alrededor de la media para los mastot/mm^2 fue de 25.83 – 39.92 y para los mastdes/mm^2 fue de 15.96 - 27.19 con un intervalo de confianza del 95%.

El análisis estadístico de distribución de los datos se resume en la tabla XIIa.

		mastot/mm²	[c]mastdes/mm²
N		11	11
Parámetros Normales [a,b]	Media	32.8795	21.5704
	Desviación Estándar	10.48	8.3574
Extremo Mayor	Absoluto	.214	.239
Diferencias	Positiva	.180	.239
	Negativa	-.214	-.135
Kolmogorov-Smirnov Z		.711	.791
Sig. Asymp. (2 colas)		.693	.559

a. La prueba de distribución es normal
b. Calculada a partir de los datos
c. Mastocitos desgranulados

Tabla XIIa. Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra.

3.5.5 Etapa de Recuperación (Grupo 112 días ddi)

La cuenta de mastocitos endoneurales en este grupo de ratas se realizó bajo las condiciones descritas en el punto 3.5 y 3.5.1. Los resultados encontrados en este grupo se resumen en la tabla XIII.

Rata	Área observada mm^2	Mastocitos Endoneurales desgranulados		Total	mastot/mm^2	Mastocitos Desgranulados	
		No	Si			%	mastdes/mm^2
1	3.5	22	74	96	27.43	77.08	21.14
2	5.34	90	108	198	37.08	54.55	20.22
3	5.74	72	213	285	49.65	74.74	37.11
4	5.74	48	203	251	43.73	80.88	35.37
5	5.74	111	134	245	42.68	54.69	23.34
6	5.71	53	144	197	36.41	73.10	26.62
7	5.74	76	191	267	46.52	71.54	33.28
			Promedio		**40.50**	**65.51**	**28.15**
			Desviación std		**7.47**	**10.60**	**7.02**

Tabla XIII. Cuantificación y relación de mastocitos endoneurales no desgranulados y desgranulados por mm^2 en el nervio ciático de ratas durante la etapa de recuperación (112 días ddi).

En la tabla puede observarse que la cantidad de mastocitos endoneurales es de 40.5 ± 7.47 mastot/mm^2, donde el 65.51 ± 10.6% de los mastocitos totales se encuentran desgranulados lo que es igual a 28.15 ± 7.02 mastdes/mm^2. El error estándar de la media fue de 2.82 y de 2.65 para mastot/mm^2 y para mastdes/mm^2 respectivamente. El rango alrededor de la media para los mastot/mm^2 fue de 33.6 – 47.4 y de 21.66 – 34.65 para los mastdes/mm^2 con un 95% de confianza. El análisis estadístico de distribución de los datos se resume en la tabla XIIIa.

		mastot/mm²	[c]mastdes/mm²
N		7	7
Parámetros Normales [a,b]	Media	40.5000	28.1541
	Desviación Estándar	7.4654	7.0229
Extremo Mayor Diferencias	Absoluto	.186	.196
	Positiva	.110	.182
	Negativa	-.186	-.196
Kolmogorov-Smirnov Z		.493	.518
Sig. Asymp. (2 colas)		.968	.952

a. La prueba de distribución es normal
b. Calculada a partir de los datos
c. Mastocitos desgranulados

Tabla XIIIa. Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra.

3.5.6 Resumen de resultados de la cuantificación de mastocitos en nervio de ratas durante las diferentes etapas de la polineuropatía y de las ratas control sin tratar

En la tabla XIV se muestran la cantidad promedio por etapa de mastocitos endoneurales totales, no desgranulados y desgranulados por mm², así como también sus respectivos porcentajes con respecto del promedio total de estas células.

	Mastocitos				
	mastnd/mm²	(%)	mastdes/mm²	(%)	mastot/mm²
Control	6.02 ± 2.57	43.07 ± 15.34	7.44 ± 2.63	56.93± 15.34	*13.46 ± 4.08*
24 Días	**20.87 ± 8.61**	**60.71 ± 12.69**	**12.6 ± 3.93**	39.29 ± 16.69	***33.47 ± 8.26***
48 Días	12.17 ± 5.36	37.29 ± 10.82	**19.73 ± 4.15**	**62.71 ± 10.82**	***31.9 ± 6.79***
58 Días	11.31 ± 5.3	34.49 ± 11.75	**21.57 ± 8.36**	**65.51 ± 11.75**	***32.88 ± 10.5***
112 Días	12.35 ± 4.64	30.49± 10.60	**28.15 ± 7.02**	**69.51 ± 10.60**	***40.5 ± 7.47***

Tabla XIV. Resumen de los resultados de la cuantificación de mastocitos en las diferentes etapas de la polineuropatía por *K. humboldtiana*.

La representación gráfica de estos resultados se muestra en la figura 16.

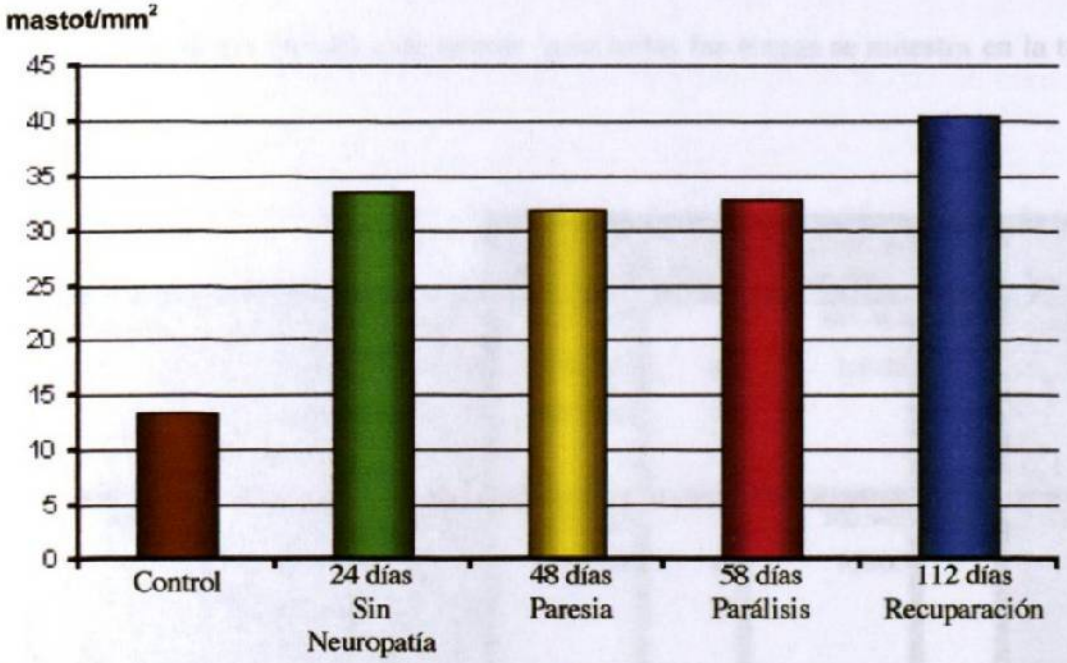

Figura 16. Representación gráfica de la cantidad de mastocitos totales por mm² en nervio ciático de ratas tratadas en las diferentes etapas de la neuropatía y en las ratas control sin tratar.

En la figura 17 se comparan los mastocitos no desgranulados y desgranulados por mm^2 en las diferentes etapas de polineuropatía y en el grupo control sin tratar.

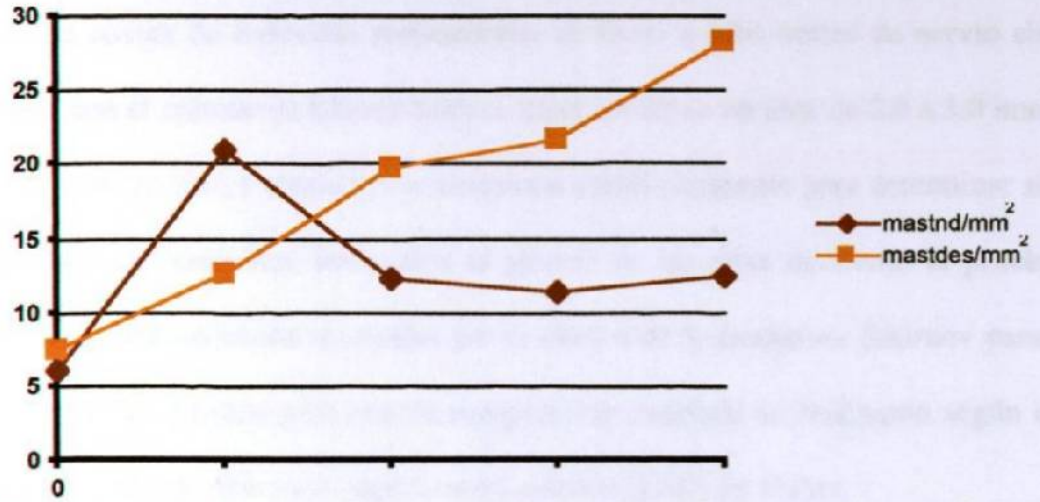

Figura 17. Relación de mastocitos no desgranulados y desgranulados/mm^2 en las diferentes etapas de la polineuropatía causada por el fruto de la *K. humboldtiana* y en las ratas del grupo control sin tratar.

El análisis estadístico para determinar la influencia del género de las ratas sobre los resultados de las variables de interés para todas las etapas se muestra en la tabla XV.

		Suma de cuadrados	DF	Cuadrado de la media	F	Sig.
mastot/mm^2	Entre los grupos	307.957	1	307.957	2.607	.113
	Dentro de los grupos	5789.087	49	118.45		
	Total	6097.044	50			
mastdes/mm^2	Entre los grupos	102.942	1	102.942	1.452	.234
	Dentro de los grupos	3474.407	49	70.906		
	Total		50			

Tabla XV. Prueba de ANOVApara determinar la influencia del género de las ratas sobre los resultados.

3.6 CUANTIFICACIÓN DE LINFOCITOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

La cuenta de linfocitos endoneurales se llevó a cabo cortes de nervio ciático teñidos con el método de Klüver-Barrera (azul luxol) en un área de 2.0 a 3.0 mm^2 del tejido. Los resultados obtenidos se evaluaron estadísticamente para determinar si hay diferencia de resultados atribuibles al género de las ratas mediante la prueba de ANOVA, su distribución de evaluó por la prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra y las pruebas post-hoc de comparación múltiple se realizaron según en el procedimiento de diferencia significativa mínima (LSD) de Fisher.

3.6.1 Grupo Control

La cuantificación de linfocitos endoneurales en este grupo de ratas se realizó bajo las condiciones descritas en el punto 3.6. Ya finalizado el conteo de linfocitos endoneurales, se obtuvo la cantidad de linfocitos totales por mm^2 de cada una de las muestras analizadas, posteriormente se obtuvo el promedio y la desviación estándar como se muestra en la tabla XVI.

Rata	Área Observada mm^2	Linfocitos Totales	Linfocitos/mm^2
1	2.0	0	—
2	2.2	0	—
3	2.0	0	—
4	2.0	0	—
5	2.1	0	—
6	2.0	0	—
7	2.2	0	—
8	2.0	0	—
		Promedio	0.00
		Desviación Std.	0.00

Tabla XVI. Cuantificación de linfocitos endoneurales en el nervio ciático de ratas control sin tratar.

Como se aprecia en la tabla en este grupo no se encontraron linfocitos en el nervio ciático y por esta razón no fue posible la realización de la prueba de distribución.

3.6.2 Etapa Sin Neuropatía (Grupo 24 días ddi)

La cuantificación de linfocitos endoneurales en este grupo de ratas se realizó bajo las condiciones descritas en el punto 3.6 y 3.6.1. En la tabla XVII se presentan los resultados para este grupo.

Rata	Área Observada mm²	Linfocitos Totales	Linfocitos/mm²
1	2.56	41	16.02
2	2.10	59	28.10
3	2.55	14	5.49
4	2.95	7	2.37
5	2.52	11	4.37
6	2.10	10	4.76
7	2.80	21	7.50
8	2.34	1	0.43
9	2.31	30	12.99
10	2.69	30	11,15
11	2.35	27	11.49
12	2.19	28	12.77
13	2.04	28	13.73
		Promedio	**10.09**
		Desviación Std.	**7.26**

Tabla XVII. Cuantificación de linfocitos endoneurales en el nervio ciático de ratas durante la etapa sin neuropatía (24 días ddi).

En la tabla se muestra que la cantidad de linfocitos presentes en el endoneuro es de 10.09 ± 7.36. El error estándar de la media fue de 2.01 y el intervalo para la media fue de 5.7–14.48 linfocitos/mm² con un 95% de confianza. El análisis estadístico de la distribución de los resultados se resumen en la tabla XVIIa.

		Linfocitos/mm²
N		13
Parámetros Normales [a,b]	Media	10.0880
	Desviación Estándar	7.2639
Extremo Mayor	Absoluto	.154
Diferencias	Positiva	.154
	Negativa	-.097
Kolmogorov-Smirnov Z		.557
Sig. Asymp. (2 colas)		.916

a. La prueba de distribución es normal
b. Calculada a partir de los datos

Tabla XVIIa. Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra.

3.6.3 Etapa con Paresia (Grupo 48 días ddi)

La cuenta de linfocitos endoneurales en este grupo de ratas se realizó bajo las mismas condiciones ya descritas en el punto 3.6 y 3.6.1. Los resultados para esta etapa se muestran en la tabla XVIII.

Rata	Área Observada mm^2	Linfocitos Totales	Linfocitos/mm^2
1	3.0	108	36.78
2	2.9	94	32.41
3	2.88	34	11.81
4	2.52	42	16.67
5	2.11	87	4.28
6	2.45	68	27.76
7	2.22	87	39.19
8	2.31	31	13.42
9	3.1	48	15.58
10	2.4	110	44.35
11	2.4	14	11.38
12	2.1	28	13.66
		Promedio	**25.32**
		Desviación Std.	**12.96**

Tabla XVIII. Cuantificación de linfocitos endoneurales en el nervio ciático de ratas durante la etapa de paresia (48 días ddi).

En la tabla puede observarse que la cantidad de linfocitos endoneurales es de 25.32 ± 12.96 *linfocitos/mm*^{2}. El error estándar de la media fue de 3.74 y el intervalo alrededor de la media de 17.09 – 33.56 linfocitos/mm^2 con un intervalo de confianza del 95%. El análisis estadístico de distribución de los datos se resume en la tabla XVIIIa.

		Linfocitos/mm²
N		12
Parámetros Normales [a,b]	Media	25.3270
	Desviación Estándar	12.9656
Extremo Mayor	Absoluto	.248
Diferencias	Positiva	.248
	Negativa	-.146
Kolmogorov-Smirnov Z		.859
Sig. Asymp. (2 colas)		.452

a. La prueba de distribución es normal
b. Calculada a partir de los datos

Tabla XVIIIa. Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra.

3.6.4 Etapa de Parálisis (Grupo 58 días)

La cuenta de linfocitos endoneurales en este grupo de ratas se realizó bajo las mismas condiciones ya descritas en el punto 3.6 y 3.6.1. Los resultados para esta etapa se muestran en la tabla IXX.

Rata	Área Observada mm^2	Linfocitos Totales	Linfocitos/mm^2
1	2.53	32	12.65
2	2.45	77	31.43
3	2.50	240	97.96
4	2.21	303	137.10
5	2.60	133	51.15
6	2.50	165	66.00
7	2.40	234	97.50
8	2.85	76	26.71
9	2.36	51	21.61
10	2.00	56	28.00
11	2.10	114	54.81
		Promedio	**56.19**
		Desviación Std.	**38.51**

Tabla IXX. Cuantificación de linfocitos endoneurales en el nervio ciático de ratas durante la etapa de parálisis (58 *días ddi*).

En la tabla puede observarse la cantidad de linfocitos presentes en el endoneuro del nervio ciático el cual es de 56.19 ± 38.51 linfocitos/mm^2. El error estándar de la media fue de 11.61 y el intervalo de la media con un 95% confianza fue de 30.32 - 82.06 linfocitos/mm^2. El análisis estadístico de distribución de los datos se resume en la tabla IXXa.

		Linfocitos/mm³
N		11
Parámetros Normales [a,b]	Media	56.1898
	Desviación Estándar	38.5101
Extremo Mayor	Absoluto	.194
Diferencias	Positiva	.194
	Negativa	-.130
Kolmogorov-Smirnov Z		.645
Sig. Asymp. (2 colas)		.800

a. La prueba de distribución es normal
b. Calculada a partir de los datos

Tabla IXXa. Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra.

3.6.5 Etapa de Recuperación (Grupo 112 días)

La cuenta de linfocitos endoneurales en este grupo de ratas se realizó bajo las mismas condiciones ya descritas en el punto 3.6 y 3.6.1. Los resultados para esta etapa se muestran en la tabla XX.

Rata	Área Observada mm²	Linfocitos Totales	Linfocitos/mm³
1	2.25	4	1.78
2	2.44	7	2.87
3	2.06	0	——
4	2.30	0	——
5	2.31	0	——
6	2.00	0	——
7	2.7	7	2.59
		Promedio	1.03
		Desviación Std.	1.33

Tabla XX. Cuantificación de linfocitos endoneurales en el nervio ciático de ratas durante la etapa de recuperación (112 días ddi).

En la tabla puede observarse que la cantidad de linfocitos presentes en el endoneuro del nervio ciático fue de 1.03 ± 1.33 linfocitos/mm^2. El análisis estadístico de distribución de los datos se resume en la tabla XXa.

		Linfocitos/mm^2
N		7
Parámetros Normales [a,b]	Media	1.0342
	Desviación Estándar	1.3308
Extremo Mayor	Absoluto	.353
Diferencias	Positiva	.353
	Negativa	-.219
Kolmogorov-Smirnov Z		.959
Sig. Asymp. (2 colas)		.348

a. La prueba de distribución es normal
b. Calculada a partir de los datos

Tabla XXa. Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra.

3.6.6 Resumen de los resultados de la cuantificación de linfocitos en nervio de ratas durante las diferentes etapas de la polineuropatía y de las ratas control sin tratar

En la tabla XXI se muestra la cantidad promedio por etapa de linfocitos endoneurales por mm^2.

	Linfocitos/mm^2
Control	0.00
Etapa sin neuropatía (24 días ddi)	10.09 ± 7.26
Etapa de paresia (48 días ddi)	25.32 ± 12.96
Etapa de parálisis (58 días ddi)	56.19 ± 38.51
Etapa de recuperación (112 días ddi)	1.03 ± 1.33

Tabla XXI. Resumen de la cuantificación de linfocitos en las diferentes etapas de la polineuropatía por *K. humboldtiana*.

La representación gráfica de los resultados se puede observar en la figura 18.

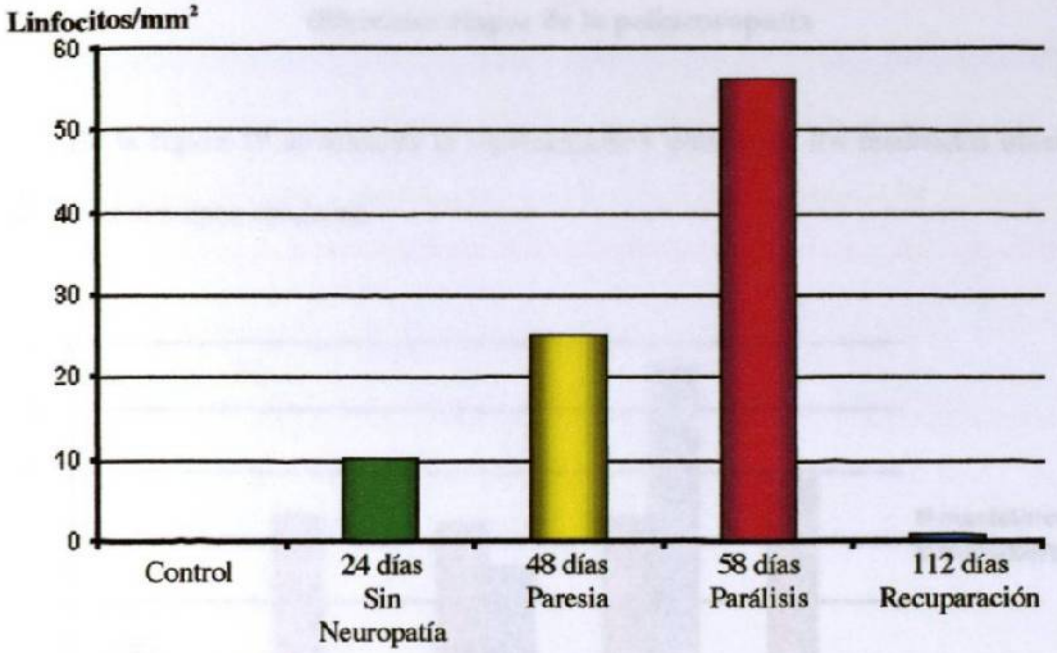

Figura 18. Representación gráfica de la cantidad de linfocitos/mm² en el nervio ciático de ratas tratadas durante las diferentes etapas de la polineuropatía causada por la *K. humboldtiana*.

El análisis estadístico para determinar la influencia del género de las ratas sobre los resultados de las variables de interés para todas las etapas se muestra en la tabla XXII.

		Suma de cuadrados	df	Cuadrado de la media	F	Sig.
Linfocitos/mm²	Entre los grupos	407.116	1	407.116	.516	**.476**
	Dentro de los grupos	38626.519	49	788.296		
	Total	39033.635	50			

Tabla XXII. Prueba de ANOVA para establecer si el género de las ratas influyen en los resultados obtenidos.

3.6.7 Relación de mastocitos y linfocitos por mm² en nervio ciático durante las diferentes etapas de la polineuropatía

En la figura 19 se muestra la representación gráfica de los resultados obtenidos para estos dos tipos celulares.

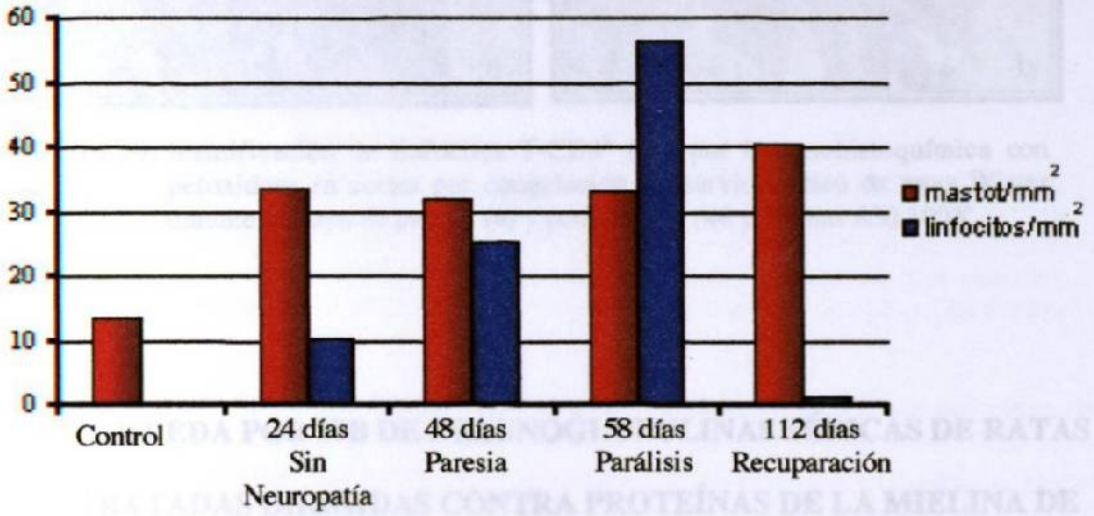

Figura 19. Relación de Mastocitos/mm² y Linfocitos/mm² en las diferentes etapas de la polineuropatía causada por la *K. humboldtiana* en ratas Wistar.

3.7 IDENTIFICACIÓN DE LINFOCITOS POR INMUNOHISTOQUÍMICA

Se realizó la identificación de linfocitos presentes en el nervio ciático de ratas tratadas en las diferentes etapas de la polineuropatía por inmunohistoquímica con peroxidasa, de acuerdo al método previamente descrito en la sección 2.2.6, se observó que estas células expresan la molécula CD4 en su superficie. Los resultados se muestran en la figura 20.