

**C) Variable CC/mm<sup>2</sup> con contenido de mucinas ácidas o neutras:** para la evaluación de esta variable se utilizó la técnica histoquímica de **azul alciano/PAS (AA/PAS)**, la cual es una técnica que combina por una parte el azul anciano que detecta mucinas ácidas como el condroitin sulfato (A, B, C), heparan sulfato, queratan sulfato, entre otros y por otra parte utiliza la técnica de PAS para detectar las mucinas neutras como hexosaminas asociadas con grupo de hexosas libres (Apéndice J).

**D) Variable CC/mm<sup>2</sup> jóvenes o maduras:** para la evaluación de esta variable se utilizó la técnica histoquímica de **azul alciano/safranina (AA/S)**, con esta técnica histoquímica (Apéndice K) se pueden identificar aminas biogénicas como adrenalina, dopamina, histamina y serotonina, además de heparina en los gránulos de células cebadas, también es capaz diferenciar entre los gránulos maduros (viejos, CC en color azul) de los que aun se encuentran en este proceso (jóvenes, CC en color rojo).

Enseguida, las laminillas con los cortes de nervio ciático teñidas histoquímicamente con cada tratamiento fueron deshidratadas, montadas con resina sintética (Apéndice L) y observadas bajo un microscopio de luz de campo claro a un aumento de 100x.

### **2.6.2. Muestras en Resinas Epóxicas.**

Los cortes semifinos y finos obtenidos de los bloques de resinas epóxicas se utilizaron para su observación a microscopía de luz y microscopía electrónica de transmisión respectivamente, las cuales fueron variables de observación que no fueron sometidas a ningún análisis estadístico, pero sí se utilizaron para describir la morfología del nervio ciático en el modelo animal.

Los cortes semifinos fueron contrastados con azul de toluidina (Apéndice M), en estos se describieron las características morfológicas del nervio ciático, para su estudio comparativo entre las ratas *Control* (día 0) y con las etapas: *Sin Neuropatía* (24 días), *Paresia* (48 días), *Parálisis* (58 días) y *Recuperados* (112 días)

Los cortes finos se contrastaron con sales de metales pesados como se indica en el Apéndice N y posteriormente se utilizaron para analizar las características ultraestructurales de los axones, vaina de mielina, células de Schwann y elementos celulares asociados al nervio ciático, de ratas *Control* y de cada una de las etapas desarrolladas en el modelo animal.

## 2.7. Análisis Estadístico.

Una vez obtenidos los datos experimentales se desarrollo el análisis de varianza para la estimación de parámetros y/o prueba de hipótesis; así como la prueba de comparaciones múltiples según el procedimiento Tukey ( $\alpha = 0.05$ ), analizados mediante el paquete estadístico SAS<sup>48</sup>.

## CAPITULO 3

### RESULTADOS

#### 3.1. Análisis Morfológico Mediante Microscopía de Luz.

##### 3.1.1. Análisis con Azul de Toluidina (AT).

Todos los resultados obtenidos de la población de las células cebadas, a partir del análisis de cortes de nervios ciáticos incluidos en parafina, de todos los tiempos y condiciones experimentales, fueron comparados con los resultados obtenidos en el *Control*. Al analizar las células cebadas con la tinción de AT, no encontramos patrones distintivos de estas células en cuanto a su morfología, es decir, observamos tanto células íntegras, bien delimitadas, con gránulos de secreción metacromáticos (Figura 8 A,D), así como también células en proceso de desgranulación o desgranuladas por completo (Figura 8 B,C) en cada una de las etapas desarrolladas en el modelo animal.

##### 3.1.2. Análisis con Ácido Per-lódico de Schiff (PAS).

La tinción de PAS nos mostró la presencia de mucopolisacáridos, específicamente heparina y solo reveló células cebadas con una morfología íntegra; aún cuando la positividad estuvo presente en cada una de las etapas desarrolladas en el modelo animal (Figura 9 A,C,D), existió una diferencia de tinción clara durante la etapa de *Paresia* (Figura 9 B) en donde se presentaba la mayor positividad comparada con el resto de las etapas y al parecer un menor tamaño de estas células.

### 3.1.3. Análisis con Azul Alciano/PAS (AA/PAS).

Al identificar en los gránulos de secreción de células cebadas mucinas ácidas y neutras con la combinación de AA/PAS, se observaron solo células íntegras, con positividad ligera al PAS (Figura 10 C) o células con gránulos positivos para ambas tinciones (Figura 10 A,D), esta característica de tinción fue observada durante las etapas *Control*, *Sin Neuropatía*, *Parálisis* y *Recuperados*. Durante la etapa de *Paresia* (Figura 10 B) se observaron únicamente células cebadas negativas al AA y con una positividad al PAS muy marcada, incluso mayor a la presentada en el resto de las etapas.

### 3.1.4. Análisis con Azul Alciano/Safranina (AA/S).

Al utilizar la combinación de AA/S, se facilitó la identificación de aminas biogénicas y heparina respectivamente en los gránulos de las células cebadas, en las etapas *Control*, *Sin Neuropatía*, *Parálisis* y *Recuperados*, en las cuales se observaron células íntegras que van desde ovales hasta alargadas, bien delineadas, en las que se pueden distinguir diferentes patrones histoquímicos en sus gránulos, por ejemplo se presentan gránulos (Figura 11 A,B) con positividad para ambos colorantes pero con diferentes patrones de organización intracitoplasmática; también se observaron células cebadas que únicamente contenían gránulos positivos a la safranina (Figura 10 C). La diferencia se presenta durante la etapa de *Paresia* (Figura 10 D), en donde las células cebadas se observan con una morfología poliédrica y que dan la apariencia de un menor contenido citoplasmático comparado con las anteriores fotomicrografías y es en esta etapa en donde solo se observaron células con positividad a la safranina.

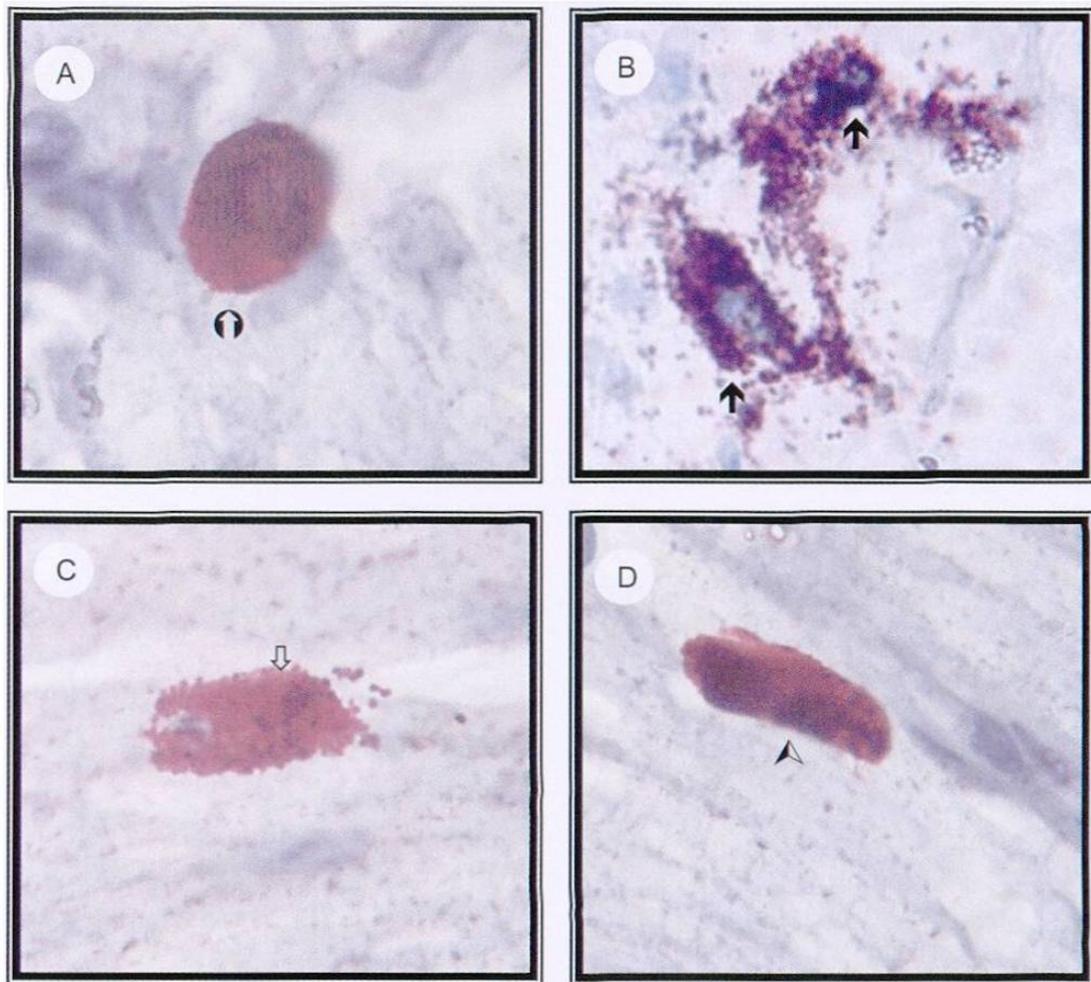


Figura 8. Nervio ciático de rata. Se muestran células cebadas de la etapa *Control*, en **A)** una célula íntegra, bien delimitada y de forma redonda (⊖); y en **B)** dos células desgranuladas por completo a manera de estallamiento (↑). **C)** Célula en etapa de *Paresia* iniciando el proceso de desgranulación (⊥). **D)** Célula en etapa de *Recuperados* íntegra y de forma ovalada (△). Fotomicrografía de luz. Inclusión en parafina. Tinción con AT. 1000X.

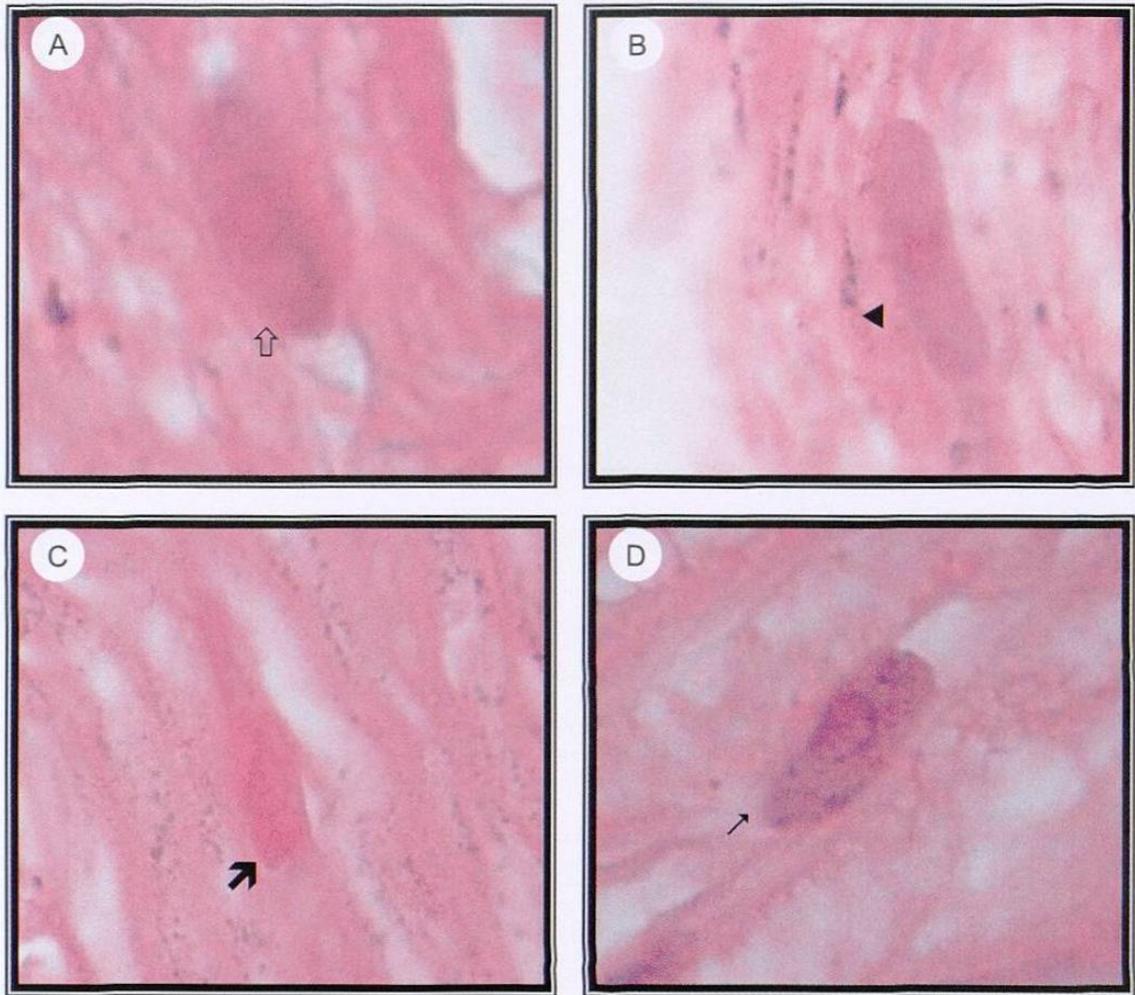


Figura 9. Nervio ciático de rata. **A) Control:** se observa una célula cebada (↑) íntegra, ovalada ligeramente positiva (+). **B) Sin Neuropatía:** célula cebada (◄) íntegra, ovalada con positividad regular(++). **C) Paresia:** célula cebada (↗) de morfología poliédrica con una elevada positividad (+++), así como una aparente disminución de volumen. **D) Parálisis:** célula cebada (↗) íntegra, ovalada ligeramente positiva (+). Fotomicrografía de luz. Inclusión en parafina. Tinción con PAS. 1000X.

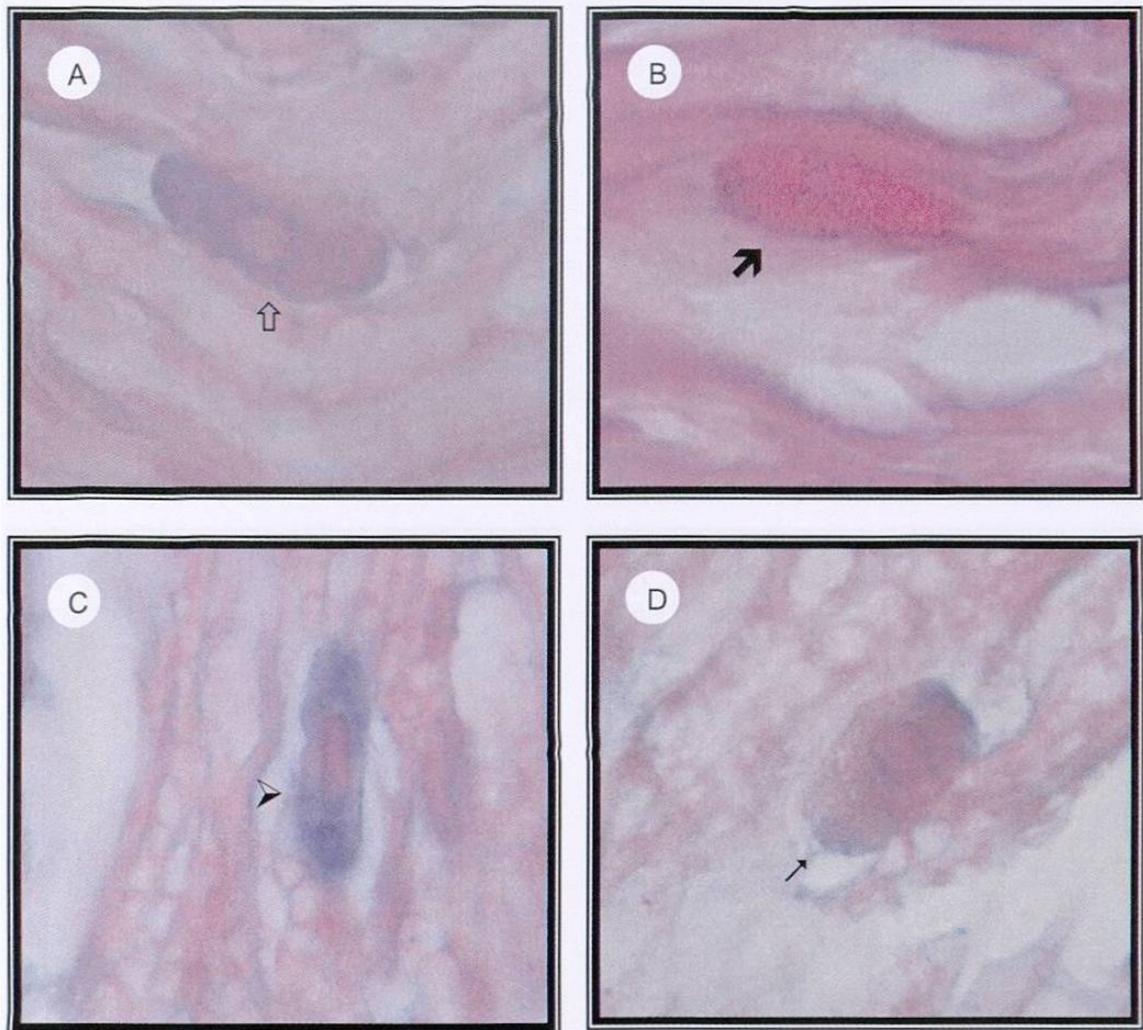


Figura 10. Nervio ciático de rata. **A) Control:** se observa una célula cebada íntegra (↑) con positividad al AA y al PAS . **B) Paresia:** célula cebada (↗) con una elevada positividad al PAS. **C) Parálisis:** se aprecia una célula cebada (↘) con positividad marcada al AA y ligera al PAS. **D) Recuperados:** muestra una célula cebada (↖) con positividad ligera al AA y al PAS (✓). Fotomicrografía de luz. Inclusión en parafina. Tinción con AA/PAS. 1000X.

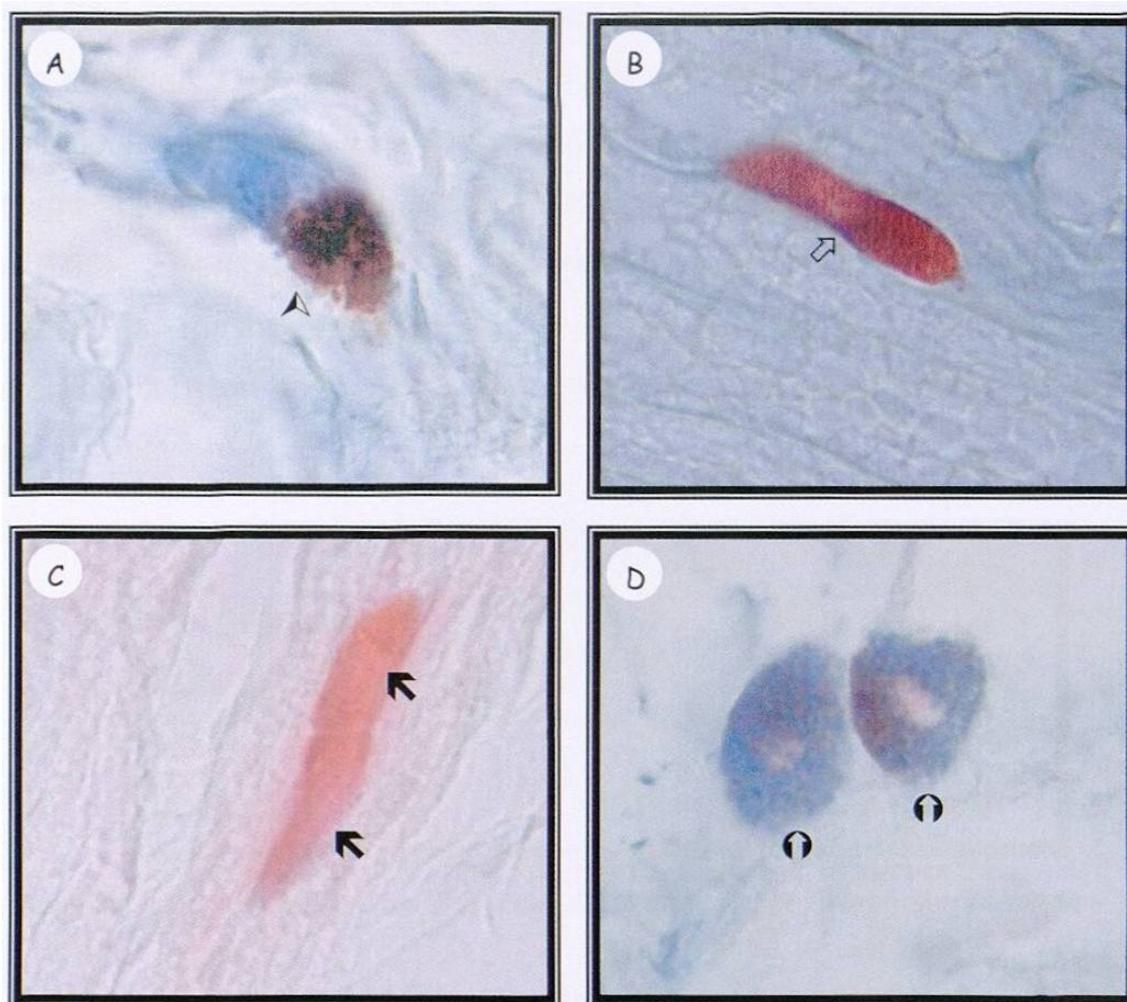


Figura 11. Nervio ciático de rata. Se muestran células cebadas de la etapa *Control*, en **A)** una célula (⬇) positiva para ambos colorantes y con gránulos de secreción polarizados; y en **B)** una célula (↗) con positividad solo para safranina. **C)** Células en etapa de *Paresia* solo positivas a la safranina (⬆). **D)** *Parálisis*: células íntegras (⬇) con gránulos positivos a ambos colorante, con una organización citoplasmática heterogénea. Fotomicrografía de luz. Inclusión en parafina. Tinción con AA/S. 1000X.

### 3.2. Cuantificación de las Poblaciones de Células Cebadas.

A partir de los cortes de nervios ciáticos incluidos en bloques de parafina se cuantificaron y se valoraron los cambios histoquímicos de los gránulos en células cebadas. Una vez obtenidos los datos experimentales se desarrollo el análisis de varianza para la estimación de parámetros y/o prueba de hipótesis; así como la prueba de comparaciones múltiples según el procedimiento Tukey ( $\alpha = 0.05$ ). El primer paso fue verificar cual de las técnicas histoquímicas detectaba la mayor cantidad de células cebadas por  $\text{mm}^2$  (CC/ $\text{mm}^2$ ), comparada con los otros procedimientos, se realizó un análisis estadístico (Tabla 2).

Prueba de Medias		
Azul de toluidina	10.467	a
Azul Alciano/Safranina	8.34	ab
PAS	3.959	bb
Azul Alciano/PAS	3.546	b

Misma literal significa que son estadísticamente iguales al 0.05 en la prueba de Tukey

Tabla 3. Comparación entre las diferentes técnicas utilizando una prueba de medias.

Esto nos indicó que el AT es la técnica que detectó el mayor número de células debido a que en la prueba de medias es estadísticamente superior al 95% con respecto a los otros métodos con la prueba de Tukey, ya que el valor de su media (10.467a) es estadísticamente diferente al resto de las técnicas. Las técnicas de AA/S (8.34ab) y PAS (3.959bb), no mostraron diferencias significativas. La tinción con AA/PAS fue en la que se detectó una menor cantidad de células cebadas (3.546b), esto también nos indica que es estadísticamente diferente al resto de las técnicas.

Una vez que identificamos que con el AT se cuantificaba la población total de células cebadas endoneurales, tanto desgranuladas como las no desgranuladas (Tabla 3), evaluamos los resultados obteniendo el promedio y la desviación estándar de las variables de interés para cada técnica histoquímica (Tablas 4, 5 y 6).

Variables de interés		Etapas de la neuropatía.				
		Control (Día 0)	Sin Neuropatía (Día 24)	Paresia (Día 48)	Parálisis (Día 58)	Recuperados (Día 112)
Valor promedio de CC/mm <sup>2</sup>	Totales	6.12	6.59	8.88	9.05	11.6
	No Desgranuladas	3.94	4.27	5.88	6.10	8.43
	Desgranuladas	2.18	2.32	3.00	2.95	3.17
Desviación estándar de CC totales		0.98	2.38	2.33	1.93	0.82

Tabla 4. Resultados de la cuantificación de las células cebadas totales endoneurales teñidas con AT.

Etapas de la neuropatía		Porcentaje de positividad en células cebadas			Total de CC /mm <sup>2</sup>
					
Día 0	Control	67.0 %	33.0 %	---	3.14 ± 1.02
Día 24	Sin Neuropatía	74.2 %	25.8 %	---	3.03 ± 1.14
Día 48	Paresia	24.4 %	32.5 %	43.1 %	1.84 ± 0.64
Día 58	Parálisis	63.3 %	36.7 %	---	4.54 ± 0.93
Día 112	Recuperados	71.0 %	27.8 %	1.2 %	6.00 ± 0.67

Intensidad de la reacción: + = Rosa pálido, +++ = Fucsia

Tabla 5. Resultados de la cuantificación de las células cebadas teñidas con PAS.

Etapas de la neuropatía		Porcentaje de células cebadas		Total de CC /mm <sup>2</sup>
		 Púrpuras	 Azules	
Día 0	Control	96.1 %	3.9 %	3.67 ± 1.39
Día 24	Sin Neuropatía	98.9 %	1.1 %	3.47 ± 0.64
Día 48	Paresia	100 %	---	1.93 ± 1.03
Día 58	Parálisis	95 %	5.0 %	3.77 ± 0.88
Día 112	Recuperados	99.4 %	0.6 %	4.87 ± 1.14

Tabla 6. Resultados de la cuantificación de las células cebadas teñidas con azul alciano/PAS.

Etapas de la neuropatía		Porcentaje de células cebadas		Total de CC /mm <sup>2</sup>
		 Rojas	 Azules	
Día 0	Control	91.3 %	8.8 %	6.28 ± 1.92
Día 24	Sin Neuropatía	89.6 %	10.4 %	6.06 ± 1.88
Día 48	Paresia	100 %	---	1.34 ± 0.87
Día 58	Parálisis	82.1 %	17.9 %	7.75 ± 1.08
Día 112	Recuperados	91.1 %	8.9 %	11.5 ± 1.54

Tabla 7. Resultados de la cuantificación de las células cebadas teñidas con azul alciano/safranina.

### 3.3. Representación Gráfica de las Poblaciones de Células Cebadas.

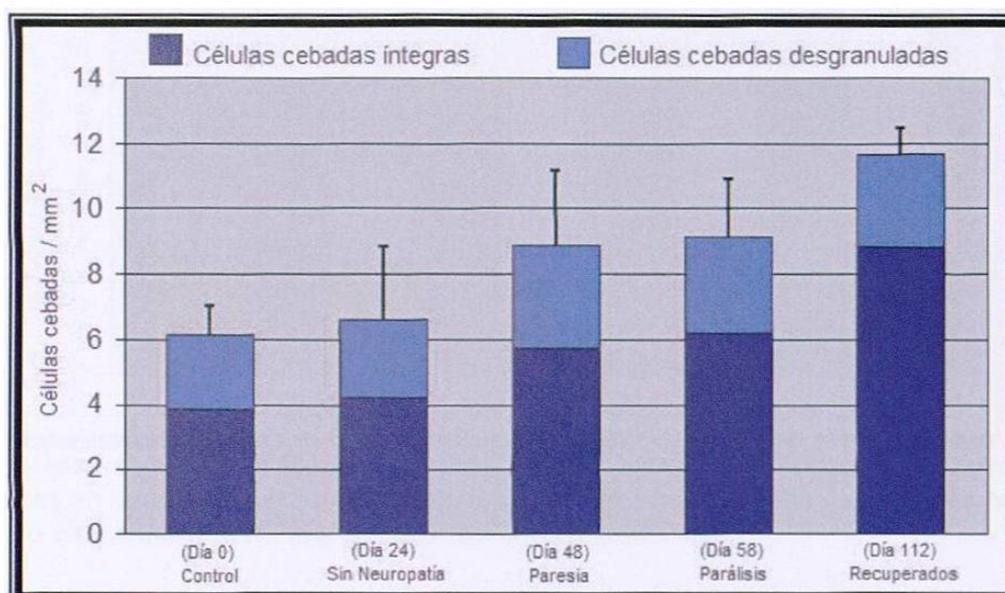
Posteriormente se graficó el valor medio de los datos obtenidos en la cuantificación de células cebadas, en donde se tomó como punto de comparación el AT (Gráfica 1), ya que fue la técnica con la que se detectó el mayor número de células cebadas por  $\text{mm}^2$ . Encontrando células cebadas como residentes normales tanto íntegras como en proceso de desgranulación o desgranuladas completamente; este mismo patrón se mantiene en la etapa *Sin Neuropatía* sin existir alguna diferencia significativa; conforme la neuropatía avanza a la etapa de *Paresia*, aumenta el número de  $\text{CC}/\text{mm}^2$ , el cual se mantiene sin diferencia hasta la etapa de *Parálisis*. Durante la etapa de *Recuperación* se observa nuevamente un incremento en el número de células cebadas.

Al utilizar la tinción con PAS (Gráfica 2), prácticamente la tendencia es la misma a la de la población total observada con AT, solo con una menor cantidad de  $\text{CC}/\text{mm}^2$ ; la otra diferencia y que es la que más llama la atención es que al analizar la etapa de *Paresia*, en lugar de existir un aumento del número de células como se muestran con el AT, la detección de esas mismas células con PAS disminuye.

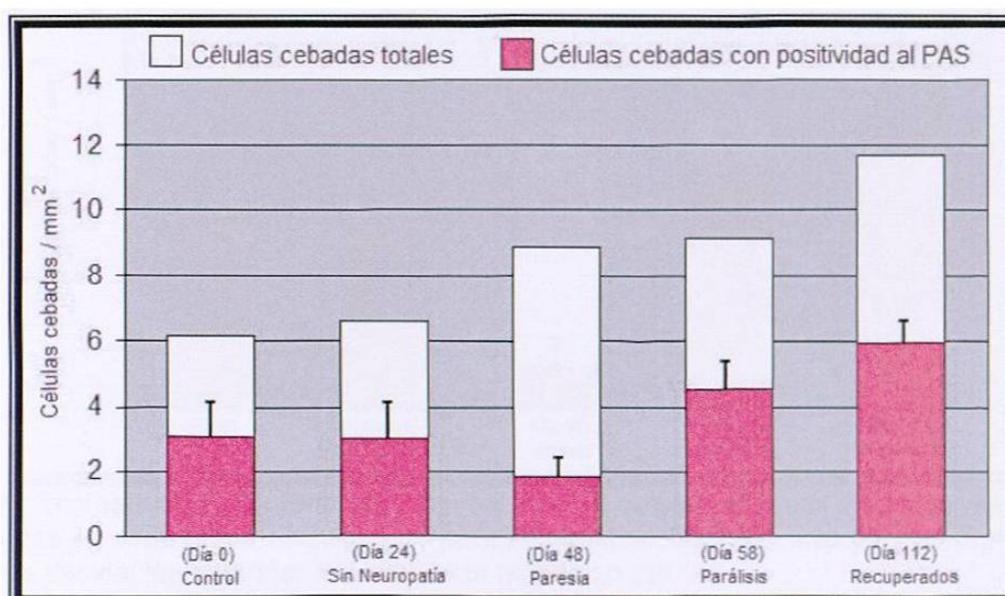
Con la tinción de AA/PAS (Gráfica 3) también se detectó una menor cantidad de células cebadas comparadas con las detectadas con AT. Durante la etapa *Control y Sin Neuropatía* la mayoría de las células cebadas endoneurales mostraban positividad al PAS y muy pocas al AA (Tabla 5) \*. Además, se puede observar que es durante la etapa de *Paresia* en donde se cuantifica la menor cantidad de  $\text{CC}/\text{mm}^2$  y que estas únicamente son positivas al PAS.

\* Se observó una gran cantidad de células cebadas positivas al AA fuera de los límites del nervio ciático, en todas las etapas, excepto durante la *Paresia (Día 48)*. Estas células que no se cuantificaron.

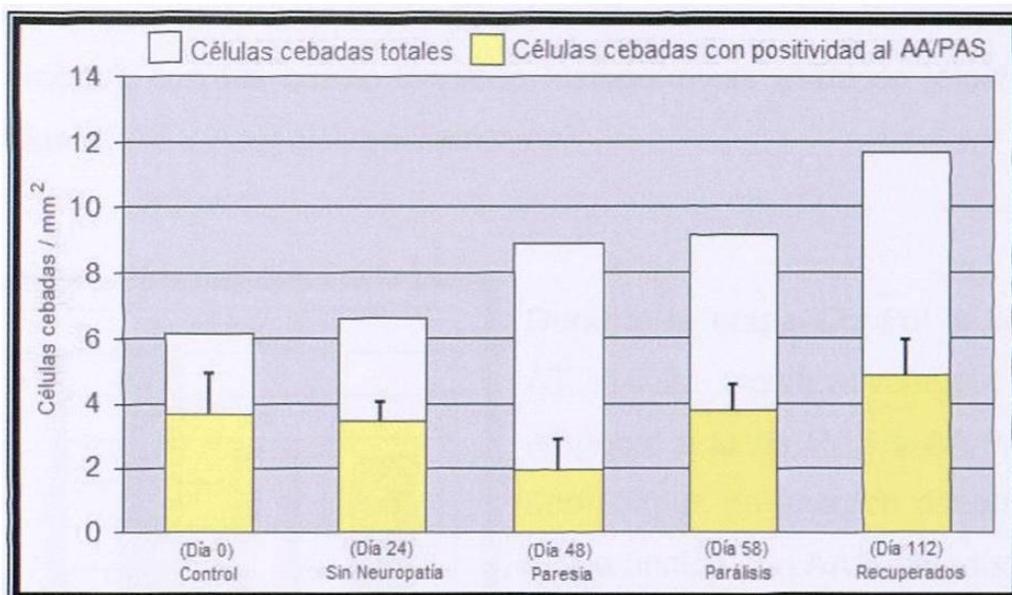
Con AAS (Gráfica 4) no se observó una diferencia en cuanto al las CC/mm<sup>2</sup> al compararla con las que se detectaron con AT. Con excepción de la etapa de *Paresia* que es en donde se cuantificó la menor cantidad de CC/mm<sup>2</sup> y que de nuevo estas resultaron ser positivas únicamente a la tinción con PAS.



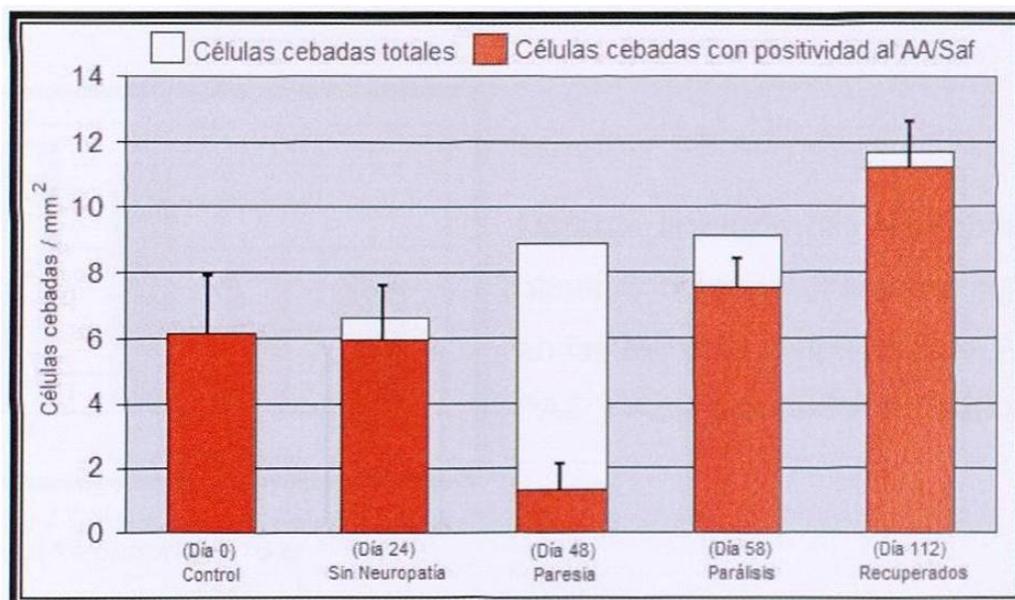
Gráfica 1. Representación gráfica del número total de células cebadas endoneurales por mm<sup>2</sup> cuantificadas en cada etapa en cortes de parafina teñidos con AT. Los valores representan el promedio  $\pm$  desviación estándar del total de la población celular.



Gráfica 2. Representación gráfica del número total de células cebadas endoneurales por mm<sup>2</sup> cuantificadas en cada etapa en cortes de parafina teñidos con PAS. Los valores representan el promedio  $\pm$  desviación estándar del total de la población celular.



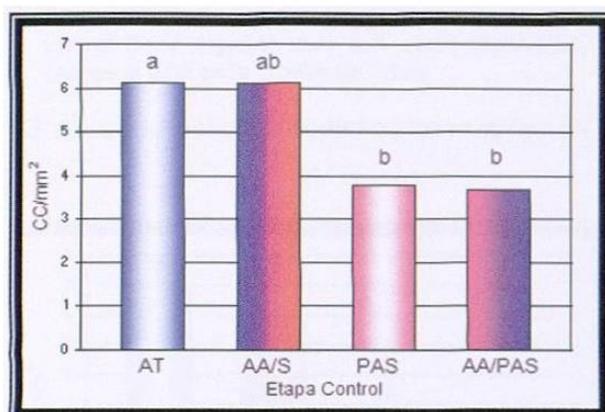
Gráfica 3. Representación gráfica del número total de células cebadas endoneurales por mm<sup>2</sup> cuantificadas en cada etapa en cortes de parafina teñidos con AA/PAS. Los valores representan el promedio  $\pm$  desviación estándar del total de la población celular.



Gráfica 4. Representación gráfica del número total de células cebadas endoneurales por mm<sup>2</sup> cuantificadas en cada etapa en cortes de parafina teñidos con AA/S. Los valores representan el promedio  $\pm$  desviación estándar del total de la población celular.

### 3.4. Análisis Estadístico por Etapas.

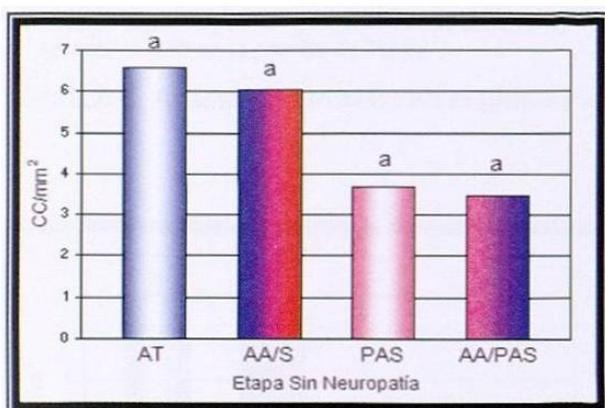
También se realizó una prueba de medias para comparar cada una de las cinco etapas de la neuropatía (*Control, Sin Neuropatía, Paresia, Parálisis y Recuperados*), con las cuatro técnicas histoquímicas (Azul de toluidina, PAS, Azul alciano/PAS y Azul alciano/Safranina)



Misma literal significa que son estadísticamente iguales al 0.05 en la prueba de Tukey

Durante la etapa *Control* la tinción con AT resultó significativamente diferente respecto a la de PAS y AAPAS, estas dos últimas no tuvieron diferencia entre sí. La tinción con AA/S estadísticamente es igual al resto de las tinciones (Gráfica 5).

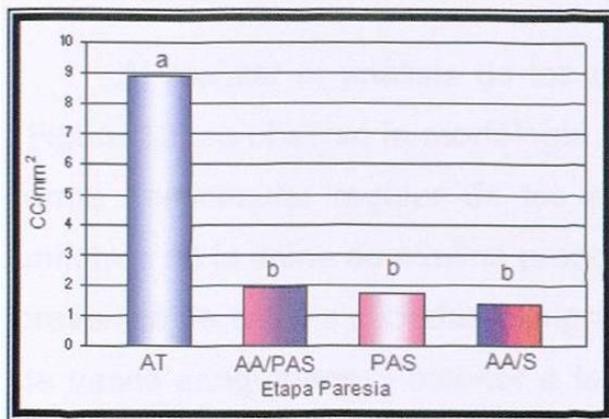
Gráfica 5. Análisis estadístico en el grupo *Control* con las diferentes técnicas histoquímicas.



Misma literal significa que son estadísticamente iguales al 0.05 en la prueba de Tukey

Durante la etapa *Sin Neuropatía* no se observó ninguna diferencia significativa en las técnicas histoquímicas. AT, AA/S, PAS y Azul alciano/PAS (Gráfica 6).

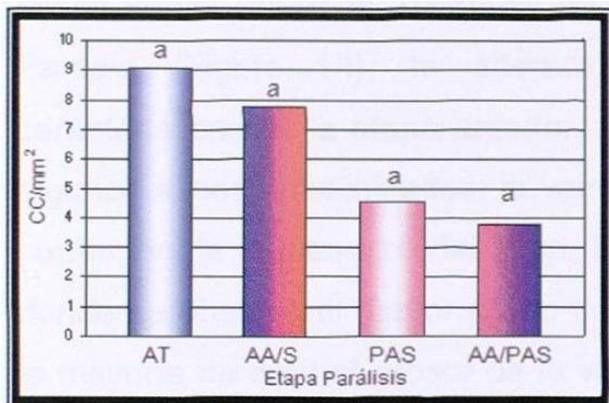
Gráfica 6. Análisis estadístico en el grupo *Sin Neuropatía* con las diferentes técnicas histoquímicas.



Misma literal significa que son estadísticamente iguales al 0.05 en la prueba de Tukey

Durante la etapa de *Paresia* la tinción con la técnica de AT resultó significativamente diferente respecto al resto de las tinciones, o explicado de otra forma, las técnicas histoquímicas de AA/PAS, AA/S y PAS son estadísticamente iguales entre sí pero diferentes al AT (Gráfica 7).

Gráfica 7. Análisis estadístico en el grupo *Paresia* con las diferentes técnicas histoquímicas.



Misma literal significa que son estadísticamente iguales al 0.05 en la prueba de Tukey

Durante la etapa *Parálisis* no se observó ninguna diferencia significativa en las técnicas histoquímicas. AT, AA/S, PAS y AA/PAS (Gráfica 8).

Gráfica 8. Análisis estadístico en el grupo *Parálisis* con las diferentes técnicas histoquímicas.



Misma literal significa que son estadísticamente iguales al 0.05 en la prueba de Tukey

Durante la etapa de *Recuperados* la tinción con AT y AA/S, resultaron estadísticamente iguales entre sí pero significativamente diferentes al PAS y AA/PAS (Gráfica 9).

Gráfica 9. Análisis estadístico en el grupo *Recuperados* con las diferentes técnicas histoquímicas.

### 3.5. Análisis Morfológico del Nervio Ciático .

Al realizar el análisis de los cortes semifinos, durante la etapa *Control* (Figura 12) se observó la morfología normal del nervio que se caracteriza por la forma semicircular regular de los axones mielinizados, así como un grosor uniforme de la vaina de mielina proporcional al diámetro del axón, además de la presencia de células cebadas con gránulos metacromáticos y macrófagos cerca de vasos sanguíneos. Posterior a la intoxicación, durante la etapa de *Paresia* (Figura 13), se hacen presentes alteraciones manifestadas principalmente en la vaina de mielina que se observan como un aumento en el grosor y espacios dentro de esta, con ello un cambio en la morfología normal de los axones mielinizados. 48 días después de la intoxicación, etapa designada como *Paresia* (Figura 14), la alteración se acentuó más con las mismas características de la etapa anterior, además, en esta etapa se observó que en algunos axones mielinizados, la vaina de mielina presentaba un grosor que no correspondía al diámetro del axón. En la etapa de *Parálisis* (Figura 15), es en donde se observa el mayor grado de alteración en los axones mielinizados, en la mayoría de ellos el grosor de la vaina de mielina se observa aumentado, así como también aumento de los espacios que se presentan dentro de esta; además los gránulos de secreción de las células cebadas no presentan su típica metacromasia. Es durante la etapa de *Recuperados* (Figura 16) en donde se observa que el grosor de la vaina de mielina es mas regular en toda la circunferencia en los axones mielinizados, además, las células de Schwann presentan de nuevo metacromasia en sus gránulos.

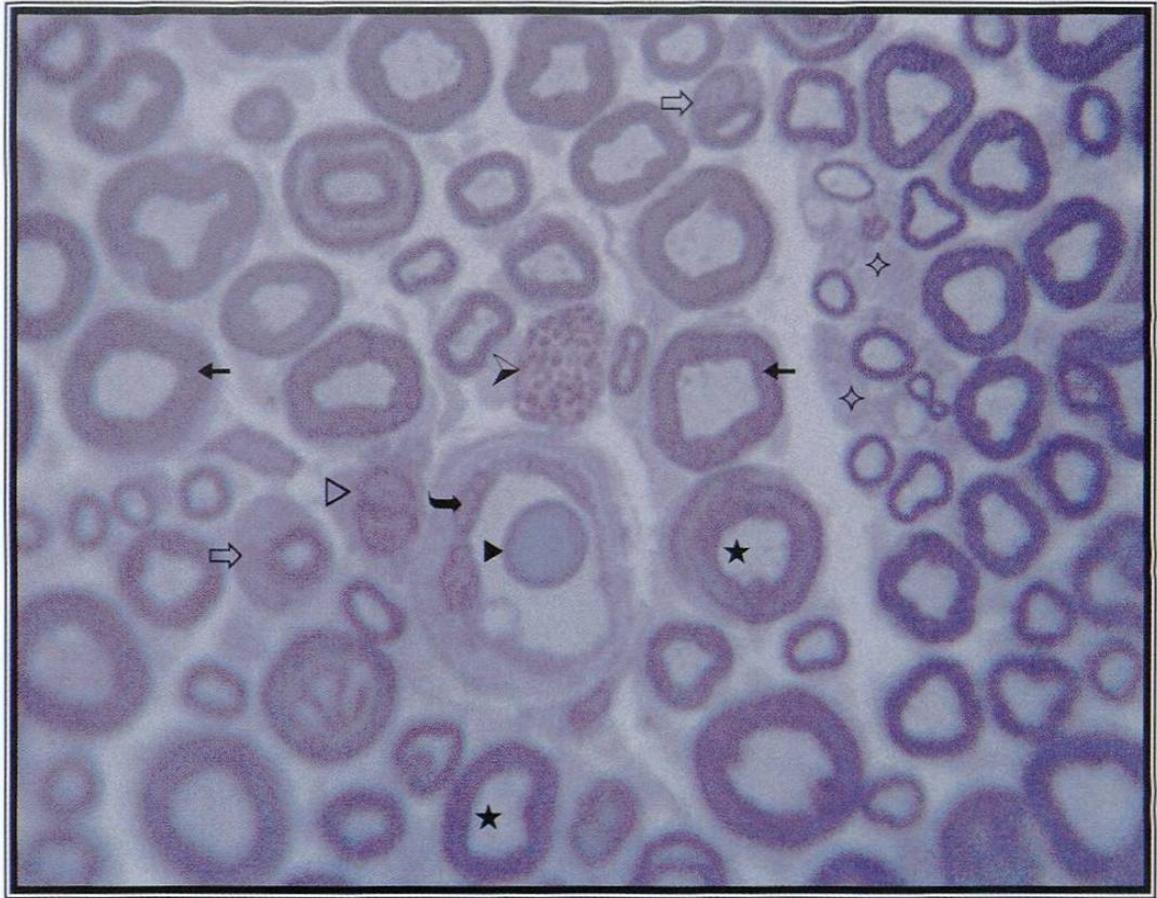


Figura 12. Nervio ciático de rata. **Etapa Control.** Se muestra la morfología normal en donde se aprecian grupos de axones amielínicos (◇) y así como axones mielinizados (★), envueltos por una vaina de mielina (←) originada por las células de Schwann (⇒). Además, se observa una sección de una célula cebada íntegra (▷), con gran cantidad de gránulos metacromáticos (color magenta); así como un vaso sanguíneo (↪) con un eritrocito (▶) y muy cercano a este al parecer un macrófago (▷). Fotomicrografía de luz. Inclusión en resina epóxica. Azul de toluidina. 1000x.

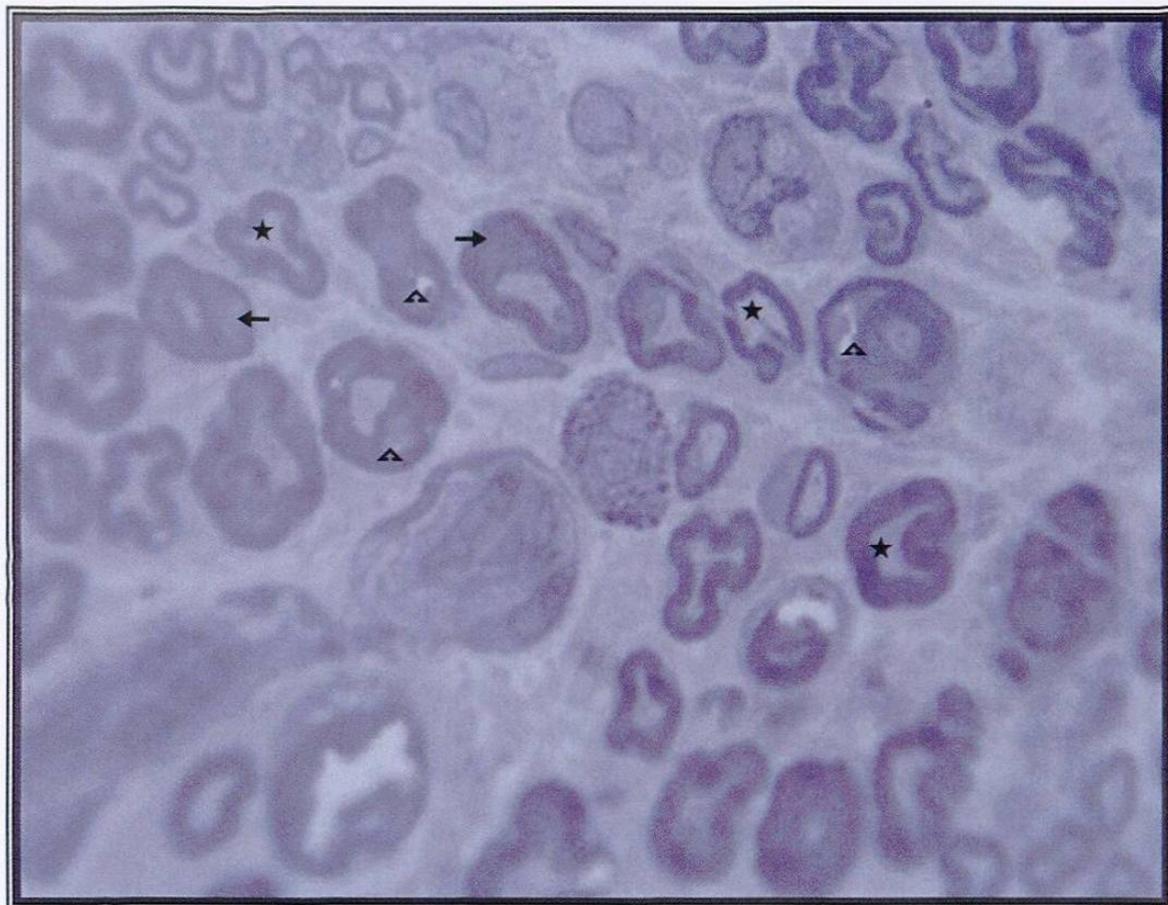


Figura 13. Nervio ciático de rata. **Etapa *Sin Neuropatía***. Se observan axones mielinizados (★) con alteraciones de su forma normal circular a una irregular, así como también son visibles alteraciones en el grosor de la vaina de mielina (→), obsérvese los espacios dentro de estas vainas (▲). Fotomicrografía de luz. Inclusión en resina epóxica. Azul de toluidina. 1000x.

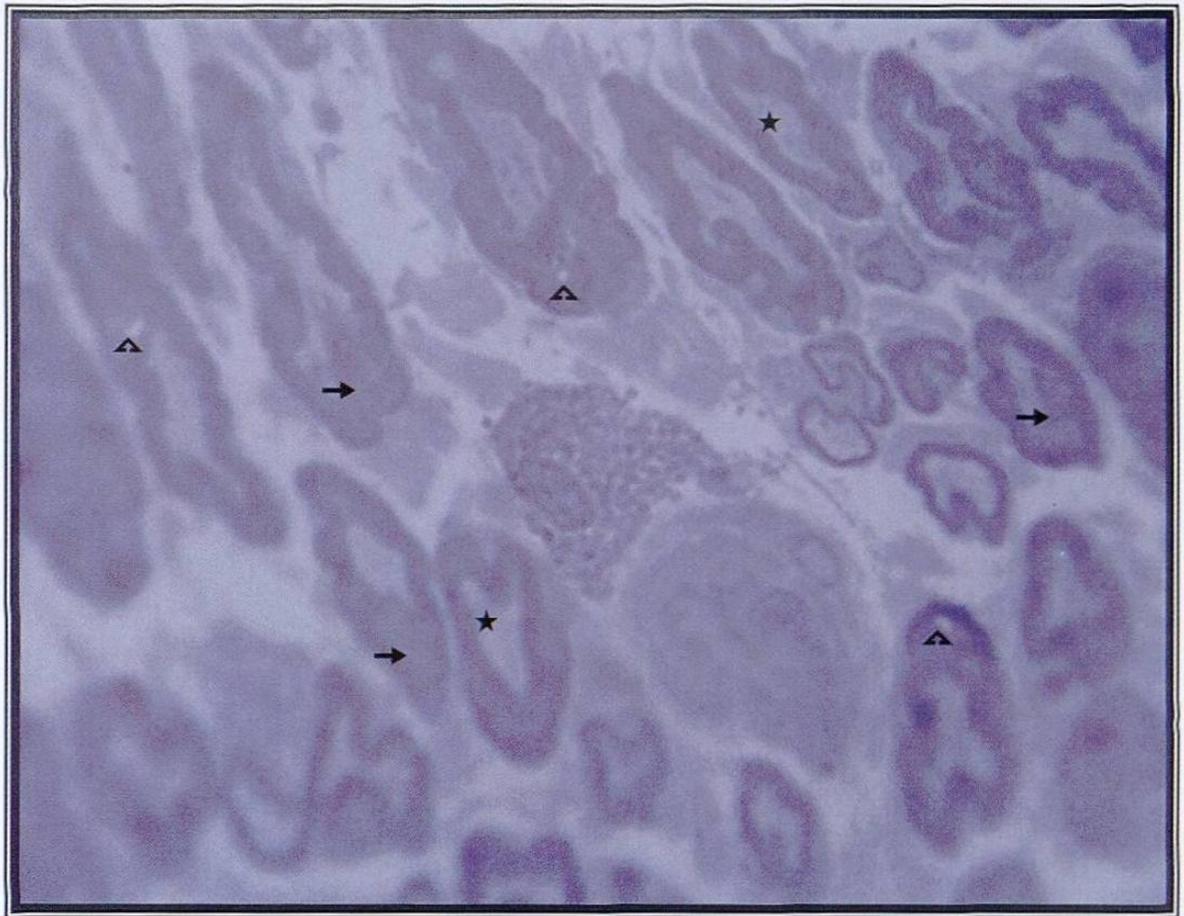


Figura 14. Nervio ciático de rata. **Etapa Paresia**. Se aprecian alteraciones de la morfología normal del nervio ciático, en la mayoría de los axones mielinizados (★), presentándose en un mayor número de células el engrosamiento de la vaina de mielina (→) y los espacios dentro de estas (△). Fotomicrografía de luz. Inclusión en resina epóxica. Azul de toluidina. 1000X.

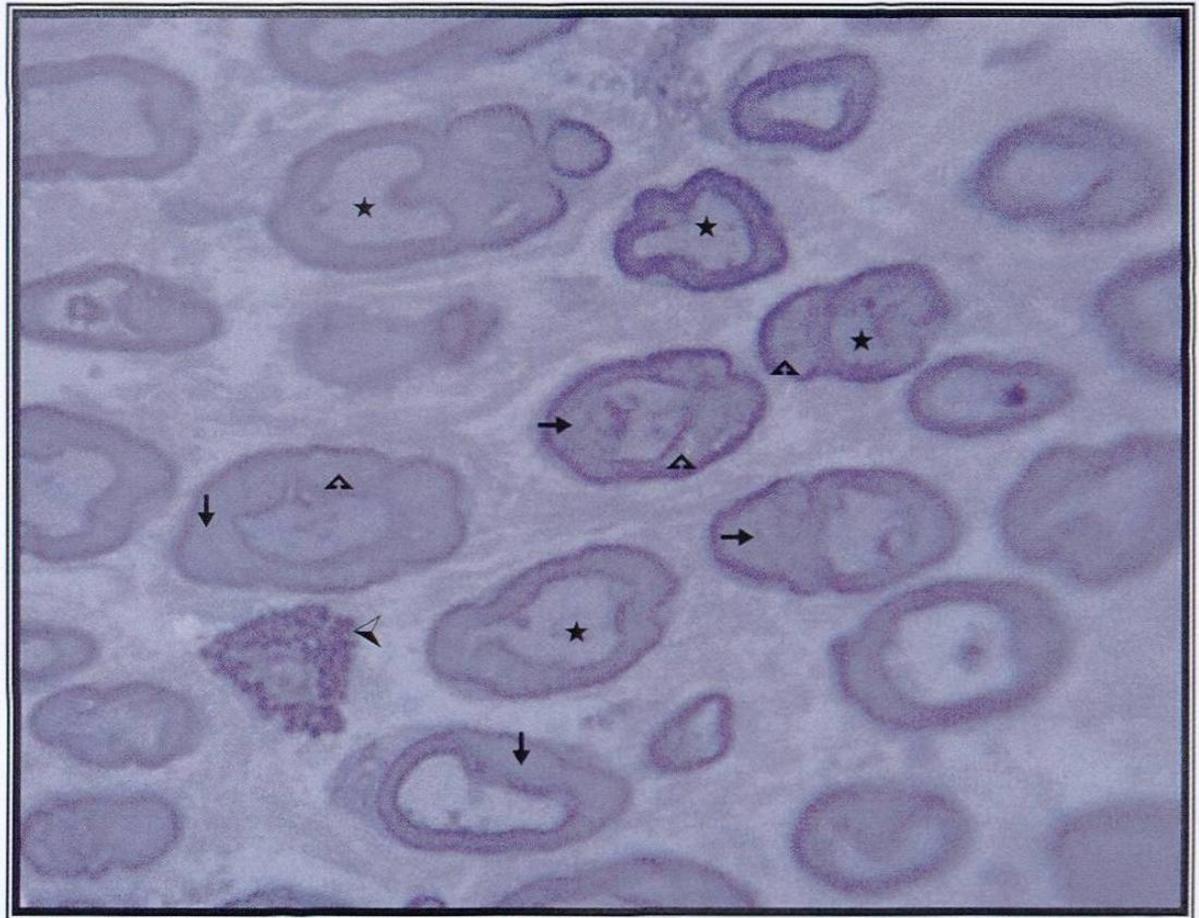


Figura 15. Nervio ciático de rata. **Etapa *Parálisis***. Se acentúa las alteraciones de la morfología normal del nervio ciático, en casi la totalidad de los axones mielinizados (★), así como el engrosamiento de la vaina de mielina (→) y los espacios dentro de estas (▲); Nótese la pérdida de la metacromasia (color azul) en los gránulos de secreción en la célula cebada (▷). Fotomicrografía de luz. Inclusión en resina epóxica. Azul de toluidina. 1000X.

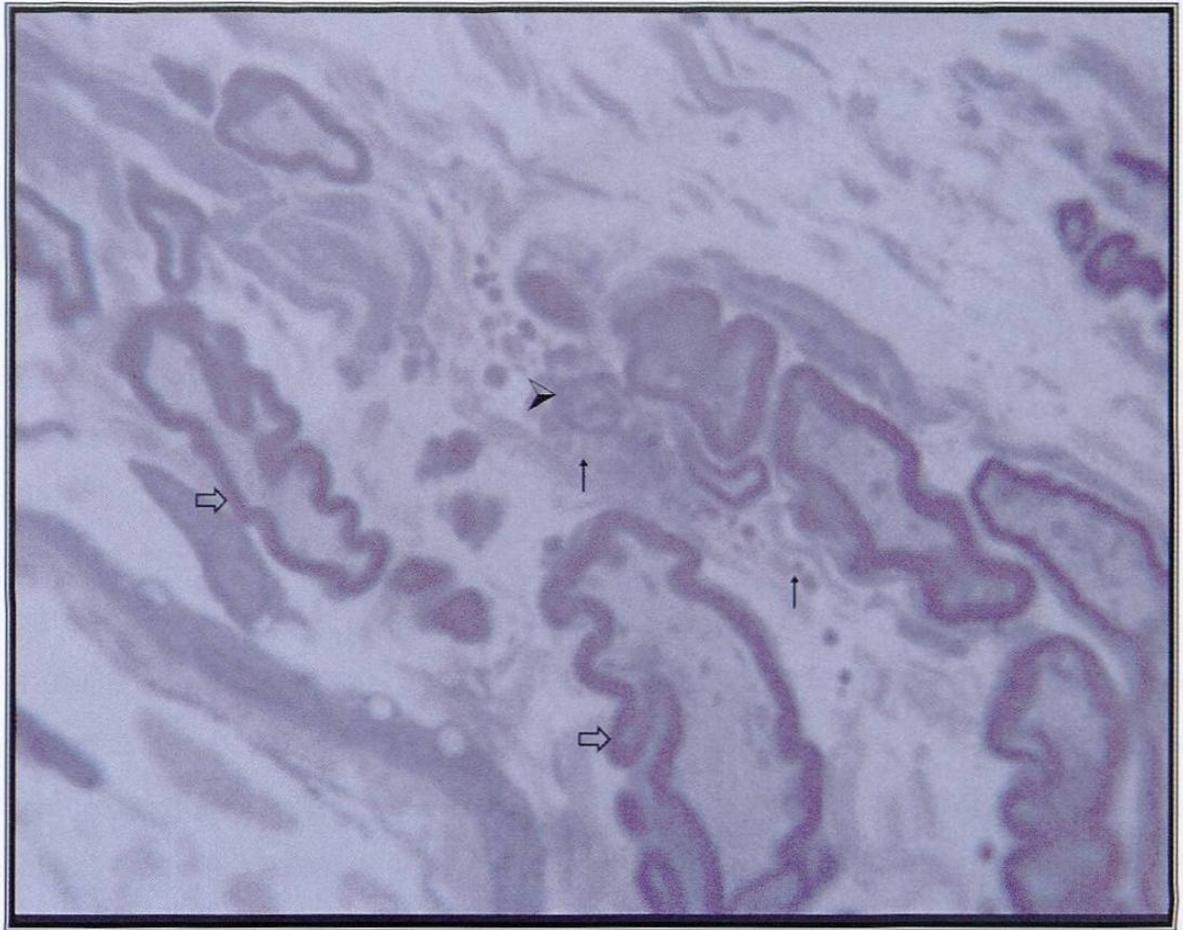


Figura 16. Nervio ciático de rata. **Etapa *Recuperados***. Se observa como el engrosamiento de la vaina de mielina (⇨) se ha restablecido casi por completo. Obsérvese en la célula cebada (➤) en proceso de desgranulación como los gránulos presentan de nuevo su típica metacromasia (↑:color magenta). Fotomicrografía de luz. Inclusión en resina epóxica. Azul de toluidina. 1000X.