

Resumen

La biodiversidad de plantas silvestres en México es muy extensa, por lo que en la actualidad se busca el aprovechamiento de estos recursos en diversas áreas industriales y tecnológicas.

Una parte de estas acciones, están encaminados a la obtención de nuevas fuentes proteínicas, denominados alimentos no convencionales, los cuales en principio no se consumen por contener agentes tóxicos y/o antinutrientales, pero con un tratamiento adecuado y económicamente rentable se pueden eliminar dichos agentes para su utilización en la alimentación animal como primera instancia y posteriormente en la alimentación humana.

Un caso es el de la semilla de higuera (***Ricinus communis***), ya que al contener factores tóxicos como son la ricina y la ricinina, la primera es una lectina mortal para humanos y animales, mientras que la segunda es un alcaloide que tiene efectos sobre el sistema nervioso; no se puede utilizar con fines alimentación si no se lleva a cabo su destoxificación.

En este trabajo se realizó la evaluación toxicológica, donde se incluye el estudio hematológico e histopatológico en ratones alimentados con un concentrado proteínico de la almendra de higuera (***Ricinus communis***) destoxificada.

La destoxificación de la semilla se llevo a cabo por medio de un tratamiento térmico con calor húmedo, un descascarillado y posteriormente un desengrasado, el cual se propone en un estudio previo.⁶



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

En el bioensayo se utilizaron como modelo biológico ratones macho de la cepa ICR, de 16-18g, los cuales fueron alimentados con pellets que contengan el **CPAHD**, llevando un control de incremento de peso y alimento consumido de dichos animales en estudio.

Al término del experimento se realizó una evaluación hematológica: citometría hemática y química sanguínea; posteriormente se realizó necropsia de los animales, para observar posibles daños morfológicos, por medio de la obtención de la relación porcentual, así como la evaluación histológica de los siguientes órganos: bazo, corazón, hígado, riñones y pulmones.

Con base a los resultados obtenidos y el análisis estadístico pertinente, se propone el valor toxicológico de seguridad, denominado NOEL, es decir la dosis a la en la que no se observa efecto adverso; así como, la ingesta diaria admisible (IDA).

Capítulo I

Introducción

En la actualidad, la desnutrición todavía representa un problema en ciertas regiones de la población mundial. En México, la prevalencia de la desnutrición proteínico-energético sigue siendo un problema de salud pública que afecta a la sociedad de bajos recursos, en especial a la población infantil.^{17, 52}

Actualmente se han planteado propuestas basadas en la utilización de los recursos naturales del país, sobre todo en el aprovechamiento de la extensa biodiversidad en áreas industriales y tecnológicas.⁵²

Una parte de estas acciones, están encaminados a la obtención de nuevas fuentes proteínicas, denominados alimentos no convencionales, los cuales en principio no se consumen por contener agentes tóxicos y/o antinutrimientales, pero con un tratamiento adecuado y económicamente rentable se pueden eliminar dichos agentes para su utilización en la alimentación animal como primera instancia y posteriormente en la alimentación humana.^{22, 60}

Tal es el caso de la semilla de higuera (***Ricinus communis***), industrialmente se utiliza en la obtención de aceite de ricino, pues la almendra puede contener del 35 al 55% de aceite.⁴⁵

La torta resultante después de la extracción del aceite, es utilizado como fertilizante, ya que a pesar de que posee un alto contenido proteínico, no es utilizado con fines alimenticios al contener factores tóxicos como son la ricina y la ricinina, la primera es una lectina mortal para humanos y animales, mientras que la segunda es un alcaloide que tiene efectos sobre el sistema nervioso.^{2, 59, 64}

En este trabajo se realizó la evaluación toxicológica, en ratones machos alimentados con un concentrado proteínico de la almendra de higuera (*Ricinus communis*) destoxificada (**CPAHD**), donde se incluye el estudio hematológico e histopatológico.

Las muestras de la planta de higuera fueron recolectadas en los alrededores de *Zacualtipan Hidalgo*, principalmente en *San Agustín Metzquititlan*.

Del fruto recolectado, se obtuvo la semilla, a la cual se le realizó un proceso de destoxificación por medio de calor húmedo, un descascarillado de la almendra y posteriormente un desengrasado.

En la evaluación toxicológica se utilizó como modelo biológico ratones macho de la cepa ICR de 16-18 g de peso corporal, los cuales fueron alimentados con pellets que contenían el CPAHD. El material a evaluar se administró por un periodo de 14 semanas (98 días), llevando un control de incremento de peso y alimento consumido.

En el ensayo biológico se realizaron pruebas sanguíneas: citometría hemática y química sanguínea; así como la observación de signos clínicos. Al término del experimento se realizaron necropsias, para observar posibles daños morfológicos, por medio de la obtención de la relación porcentual de órganos y la evaluación histopatológica de los siguientes órganos: bazo, corazón, hígado, riñones y pulmones.

Los resultados obtenidos en el estudio de toxicidad, fueron analizados estadísticamente y con base a estos se calculó el valor toxicológico denominado NOEL.

Capítulo II

Objetivos

2.1 Objetivo general

- ❖ Evaluar la toxicidad crónica, hematológica e histopatológica en ratones alimentados con un concentrado proteínico de la almendra destoxificada de Higuierilla (***Ricinus communis***), recolectado en los alrededores de *Zacualtipan Hidalgo*, principalmente de *San Agustín Metzquititlan*.

2.2 Objetivos particulares

- ❖ Realizar la destoxificación de la almendra de Higuierilla (***Ricinus communis***).
- ❖ Aprender el manejo y cuidado de animales, así como la obtención de fluidos fisiológicos y órganos de los mismos.
- ❖ Evaluar el crecimiento de ratones macho alimentados con el concentrado de proteínico de la almendra destoxificada de Higuierilla (***Ricinus communis***).
- ❖ Realizar la evaluación hematológica de los animales: citometrías hemáticas y químicas sanguíneas.
- ❖ Realizar la evaluación de la relación porcentual de los siguientes órganos: bazo, corazón, hígado, pulmones y riñones.
- ❖ Realizar la evaluación histológica de los órganos: bazo, corazón, hígado, pulmones y riñones.

Capítulo III

Marco teórico

3.1 La Higuierilla (*Ricinus communis*)

La planta de higuierilla, también conocida como ricino, palma Christi, higuierilla del diablo, mamona, etc,^{25, 48} pertenece a la familia ***Euphorbiaceae***, es una arbusto dioico, anual, considerado como una planta invasiva, resistente a condiciones climáticas y edafológicas adversas.^{9, 20, 25}

Históricamente se ha cultivado con la finalidad de obtener el principal producto de la semilla, el aceite de ricino o aceite de castor (35-55%), el cual es ampliamente utilizado principalmente en la producción bioenergética; además el aceite refinado se utiliza con fines medicinales como laxante y en la elaboración de cosméticos.^{3, 45}

La India es actualmente el principal país productor de higuierilla con una producción anual de 1,098,000 toneladas en el año 2009, de acuerdo a los datos publicados por la FAO; mientras que Brasil es el tercer país productor a nivel mundial y el primero en América Latina, en el año 2009 se reportó una producción de 91,076 toneladas.^{18, 19}

La torta resultante después de la extracción del aceite de ricino, posee un alto contenido de proteína, pero debido a la presencia de factores tóxicos, se emplea como fertilizante orgánico.²

En la actualidad se realizan investigaciones enfocadas en la búsqueda de métodos de destoxificación económicamente rentables con el propósito de la utilización de la torta residual en la elaboración de concentrados proteínicos para alimentación animal.^{2, 59}

En un estudio previo se propuso un método de destoxificación de la almendra de higuerilla utilizando calor húmedo y la extracción del aceite de ricino con el fin de obtener una torta proteínica.⁶

En el análisis proximal del concentrado proteínico la almendra de higuerilla destoxificada, se reporta un contenido proteínico del 63.25% en base seca⁶, lo que demostró que el material se puede considerar como un autentico concentrado proteínico

3.1.1 Morfología

La planta consta de varios tallos o ramas, tiene grandes hojas palmatilobadas (5-12 lóbulos) aserradas. Las flores son de color blanco verdoso o marrón rojizo, se encuentran reunidas en racimos.⁵

En algunas variedades, las flores femeninas se encuentran en la parte superior de la espiga y las flores masculinas en la parte inferior. Otras variedades tienen flores masculinas y femeninas intercaladas.^{5, 20, 25}

El fruto es una capsula trioca, que puede ser espinosa o lisa en la superficie exterior, en cada capsula contiene tres semillas separadas por lóbulos.^{5, 20, 47}

Las semillas son lisas y brillantes, presentan un marmoleado en rojo, negro o pardo, tienen forma de huevo, oblongo, redondo, por lo general con una ampliación en un extremo, llamado carúncula.^{5, 12}

3.1.2 Historia

La planta higuerilla es originaria de África y Asia, donde se conoce desde hace mas de 6 mil años. Hoy en día, crece en forma silvestre en muchas regiones tropicales y subtropicales en todo el mundo.^{9, 14}

El ricino ha desempeñado un papel importante en la historia de la producción del aceite de ricino, pues desde la antigüedad ha sido utilizado con fines medicinales y tecnológicos. Se menciona que los egipcios utilizaban el aceite como combustible para lámparas y como ungüento.^{12, 44}

La higuierilla fue utilizada ampliamente en la medicina egipcia y griega, información contenida en el sanscrito de medicina Hindú "*Susruta Ayurveda*" del siglo VI a.C.⁴⁴ También hay evidencia literaria de que fue descrita por Teofrasto y Dioscórides en el siglo I, Dioscórides describe el proceso de extracción del aceite y menciona que no es apta en alimentación.^{12, 47}

Durante la edad Media, fue cultivada en Europa, por Alberto Magno, para su uso en medicina. Actualmente, se cultiva en todo el mundo, pues ha demostrado tener ventajas tecnológicas y ecológicas en el desarrollo de la agricultura en suelos áridos.¹²

3.1.3 Toxicidad de la planta de higuierilla

La planta de higuierilla es considerada toxica, pues contiene ricina, ricinina y algunos alérgenos. De éstos, la ricina representa un mayor problema, debido a su alta toxicidad y concentración, se ha reportado que la semilla puede contener hasta un 5% de ricina; en el caso de la ricinina y los alérgenos, se encuentran en niveles más bajos, aproximadamente del 0.2% y 0.09% respectivamente.^{12, 43, 45}

3.1.3.1 Ricina

La ricina es un heterodímero de naturaleza glicoproteínica, pertenece a la familia de proteínas conocidas como proteínas inactivantes de los

ribosomas. Esta compuesta de dos subunidades, A y B, la primera tiene acción enzimática y la segunda de receptor, por medio de sus residuos terminales de galactosa.^{4, 43, 44}

Para ejercer su efecto, es necesario la introducción de la molécula dentro de la célula, por medio de la unión la subunidad B a ciertas glicoproteínas o glicolípidos de la membrana celular. Una vez en el interior de la célula, la ricina entra en el complejo de Golgi, pasando después al retículo endoplásmico, donde la subunidad A tiene acción enzimática sobre la subunidad 28s de los ribosomas, impidiendo la síntesis de proteínas.^{27, 45}

La ricina tiene aplicaciones terapéuticas en la detección de células cancerígenas, mapeo analítico de neuronas y creación de modelos de enfermedades neuronales degenerativas.²⁷

3.1.3.2 Ricinina

La ricinina o 3-ciano-4-metoxi-N-metil-2-piridina, es un alcaloide de bajo peso molecular (164.2 g/mol). Se encuentra distribuida en toda la planta, la semilla contiene la mayor proporción.^{2, 39, 62}

La ricinina es un insecticida que confiere protección a la planta, por lo que en la industria es utilizada en control de plagas como emulsión acuosa.^{27, 33, 53}

3.2 Toxicología

La toxicología es la ciencia que se basa en el estudio del origen, naturaleza y propiedades de los tóxicos, por medio de conocimientos químicos y biológicos que permiten determinar su comportamiento cinético y sus efectos sobre los organismos vivos, las manifestaciones

clínicas de la intoxicación, la detección y cuantificación de un toxico, así como los procedimientos adecuados de prevención y tratamiento y las implicaciones médico-legales.^{31, 35, 51}

El manejo y consumo de una sustancia tóxica está en función de:

- a) Las características fisicoquímicas de la sustancia.
- b) Su potencialidad toxica (pT)
- c) La probabilidad de ser absorbida por el hombre y frecuencia con que esto pueda ocurrir.

3.3 Toxicología de alimentos

La toxicología de los alimentos, también conocida como toxicología bromatológica, se refiere al conocimiento sistemático y científico de la presencia de sustancias indeseables presentes en los alimentos y que son potencialmente dañinas para la salud humana. El aislamiento y detección de dichas sustancias permite establecer la ingesta de una cantidad que no ponga en riesgo la salud del ser humano.^{16, 50, 60}

3.4 Ensayos biológicos

El principal objetivo de un ensayo biológico consiste en estimar la dosis, en la que se observa algún efecto adverso o actividad biológica de una sustancia sobre un sistema biológico, con la finalidad de establecer la evaluación del riesgo potencial que un agente xenobiótico puede causar sobre un individuo.^{31, 51}

Un estudio de toxicidad permite el conocimientos de los peligros de toxicidad intrínseca de un agente xenobiótico, establecer la relación dosis-respuesta, el mecanismo y órganos diana sobre los cuales actúa el agente tóxico, para el establecimiento de niveles de seguridad.^{13, 51, 60}

De este modo, habrá sustancias que causen algún efecto tóxico a bajas concentraciones, éstas son clasificados como extremadamente tóxicos, mientras que las sustancias prácticamente no toxicas causan efecto a concentraciones muy altas.⁶⁰

3.4.1 Variables generales

La acción de un agente tóxico se puede ver afectado por diversos factores que están íntimamente ligados al proceso de intoxicación, como son:

3.4.1.1 Carácter toxico del agente xenobiótico

Un agente xenobiótico que produce una intoxicación que puede ser químico, físico o biológico, en toxicología de alimentos, se refiere exclusivamente a sustancias químicas. Es necesario tener la mayor información sobre las características fisicoquímicas de la sustancia a estudiar (identificación, composición de la muestra, naturaleza, polaridad entre otras) lo que permite:^{13, 51}

- Definir las condiciones de manipulación y almacenamiento de dicha sustancia.
- Definir el modelo experimental, especialmente con relación a la vía de administración
- Explicación de la aparición de algunos fenómenos tóxicos.

3.4.1.2 Elección del sistema biológico

La respuesta biológica que presenta un agente tóxico varía de organismo a organismo. La elección de la especie sobre la cual se probará el agente xenobiótico está con base en los criterios de

disponibilidad, sensibilidad y similitud del mecanismo de acción en humanos.

Por lo que la selección del organismo sobre el cual se hará el estudio dependerá del objetivo y la evaluación de factores como: la respuesta biológica a monitorear, la facilidad de manipulación, condiciones de mantenimiento, consumo de alimento y eliminación de residuos.^{11, 51}

3.4.1.3 Elección de los grupos

En general, se manejan tres grupos de prueba y un control, el tamaño de la muestra debe asegurar su validez estadística, se recomienda el uso de animales consanguíneos. La elección de los grupos debe ser aleatorizada para minimizar la heterogeneidad.^{31, 51}

3.4.1.4 Elección de la vía de administración

La vía de administración se elige de acuerdo a la vía en que los seres humanos están expuestos al agente xenobiótico, pues un mismo agente tóxico puede producir efectos muy diferentes, dependiendo de la ruta por la cual el sistema biológico lo absorba.⁵¹

Dependiendo de la vía de administración, será el tiempo de respuesta al efecto tóxico. En toxicología de alimentos, la vía de administración suele ser por vía oral, el producto prueba se administra por medio de una sonda esofágica o estomacal (estudios de corto plazo) o mezclando el xenobiótico con la comida o bebida (estudios de largo plazo).^{11, 13, 51}

Usualmente, se requiere de un "vehículo", que es medio para disolver o suspender la sustancia a probar, con el fin de facilitar su administración. El vehículo empleado no debe ser tóxico ni interaccionar con el producto prueba.^{31, 46, 60}

3.4.1.5 Elección de la dosis

La elección de la dosis depende del estudio toxicológico a evaluar y del tipo de respuesta que se espera gradual o cuantal.⁶⁰

En estudios de toxicidad en alimentos, se manejan tres dosis de prueba, una dosis baja en la que no se produzca efecto tóxico; una dosis alta en la que se pueda observar el efecto tóxico; y una dosis intermedia, con la finalidad de identificar los órganos diana afectados.⁵¹

3.4.1.6 Tiempo de interacción del agente xenobiótico

El efecto de un agente tóxico sobre un sistema biológico se evalúa en función al número de dosis administradas en un periodo de tiempo. Los efectos adversos pueden aparecer rápidamente o después de un periodo de latencia, dependiendo de la especie y de las condiciones a las cuales el organismo sea sometido durante el estudio; por ello, la duración de los estudios toxicológicos es muy variable.^{11, 13, 35, 51}

Los estudios de toxicidad se clasifican en tres categorías, de acuerdo al tiempo de interacción del agente xenobiótico con el organismo prueba:

➤ Toxicidad aguda. Implican la administración de una o varias dosis del agente xenobiótico de prueba en un periodo de 24 horas. En este tipo de estudios se suele determinar la dosis letal media (DL50), que es la dosis necesaria para producir el 50% de la muerte en una población de organismos vivos en estudio.^{11, 35}

➤ Toxicidad subcrónica (corto plazo). Consiste en la administración de dosis repetidas en un periodo de aproximadamente el 10% de esperanza de vida del animal de prueba.^{11, 35}

➤ Toxicidad crónica (largo plazo). Se llevan a cabo administraciones repetidas en un periodo que corresponde a toda la vida de los animales de prueba o una fracción importante de ella.^{11, 35}

3.4.1.7 Indicadores biológicos de toxicidad

Realizar toma de muestras para determinar ciertos parámetros o valores mesurables que permiten detectar y cuantificar un efecto producido por el agente xenobiótico administrado.⁵¹

➤ **Observaciones clínicas**. Incluyen una evaluación física, estado de salud, comportamiento y signos clínicos, como por ejemplo:^{6, 14, 40}

- Lordosis. Curvatura de la columna vertebral, caracterizada por un movimiento ondulante del lomo.
- Xifosis. Curvatura dorsal de la columna vertebral caracterizada por un movimiento ondulante de la cadera.
- Disnea. Frecuencia anormal de la respiración.
- Cianosis. Coloración azulada de la piel debido a la falta de oxigenación.
- Ataxia. Falta de coordinación muscular manifestada por un trastorno de equilibrio.
- Piloerección. Erección del pelo debido a alteraciones en el sistema nervioso simpático.
- Erección caudal. Erección de la cola.
- Aletargamiento. Periodo de inactividad y reposo.

➤ **Pruebas de laboratorio**. Generalmente se realizan pruebas sanguíneas.⁵¹

3.4.1.8 Análisis de resultados

Aplicación de un análisis estadístico, que debe incluir los valores que comprueben su validez como: el promedio del valor, el intervalo de confianza, desviación estándar, etc.⁵¹

3.4.1.9 Modelo predictivo

Establecimiento de los valores de referencia de seguridad para el uso del agente xenobiótico estudiado.⁵¹

3.5 Sangre

La sangre está compuesta de una porción líquida y elementos celulares, tiene una temperatura de 37-38°C, un pH entre 7.35 y 7.45 y constituye aproximadamente el 8% del peso corporal.⁶¹

La parte líquida es el plasma, el cual constituye aproximadamente el 55% del volumen sanguíneo, el plasma contiene varias sustancias químicas disueltas, de éste, también se puede separar el suero, el cual es el resultado de separar el fibrinógeno.^{19, 63}

La parte celular constituye aproximadamente el otro 45% del volumen sanguíneo, consta principalmente de glóbulos rojos y en mucha menor proporción, de glóbulos blancos y plaquetas.

Las funciones de la sangre son: ^{19, 31, 63}

- **Transporte.** Distribuye a las células del todo el cuerpo oxígeno, sustancias alimenticias, celulares y bioquímicas, así como otros residuos celulares.

- **Regulación.** Del pH mediante las sustancias amortiguadoras, regulación de la temperatura corporal y el contenido de agua de las células, por interacción de los iones y proteínas disueltos.
- **Protección.** Mediante la coagulación se evita la pérdida excesiva de sangre. Mediante la fagocitosis y la producción de anticuerpos protege contra las enfermedades.

3.5.1 Citometría hemática

El termino citometría hemática proviene del vocablo "*citos*", que significa célula, "*metros*" que significa medida, y "*haematos*", que significa sangre. Por lo mismo se define como la medición del número y características de las células de la sangre.⁵⁵

La citometría hemática está constituida por tres partes: la serie roja, la serie blanca y la serie trombocítica.

3.5.1.1 Serie roja

Eritrocitos (ERI). Los eritrocitos o glóbulos rojos son las células que carecen de núcleo, se encuentran en mayor proporción en la sangre.

Por lo anterior el número de eritrocitos es el número de células rojas contenidas por volumen de sangre, se expresan en millones de células por microlitro.^{55, 49}

Hemoglobina (Hb). Es la cantidad de proteína por unidad de volumen de sangre, se expresa en g/dL. Este parámetro es una medida indirecta de la capacidad de transporte de oxígeno en la sangre.

La estructura de Hb está compuesta por un anillo de porfirina que contiene un átomo de hierro, por lo que este índice se utiliza para definir la existencia de anemia.^{55, 63}

Hematocrito (Hct). Es la proporción de eritrocitos respecto al volumen sanguíneo total, expresado en porcentaje. Su valor se calcula a partir del número de eritrocitos y el volumen corpuscular medio.^{26, 55}

Volumen corpuscular medio (VCM). Se expresa en femtolitros (fL), se refiere al volumen medio de eritrocitos individuales.⁵⁵

El VCM se emplea para clasificar las células como: normocíticas, macrocíticas o microcíticas.⁴⁹

Hemoglobina corpuscular media (HCM). Es una medición del peso promedio de hemoglobina contenida en cada eritrocito, expresada en picogramos (pg).^{49, 55}

Concentración corpuscular media de hemoglobina (CHCM). Es la concentración media de hemoglobina por volumen de eritrocitos. Se obtiene al dividir la hemoglobina entre el hematocrito.⁵⁵

Este índice compara la concentración promedio de hemoglobina dentro de cada célula con el volumen promedio de la célula e indica si la población celular es normocrómica, hiperocrómica o hipocrómica.³⁰

3.5.1.2 Serie Blanca

Leucocitos (LEU). Son células nucleadas incoloras, de mayor tamaño que los eritrocitos. Su función es la respuesta contra infecciones, la cual incluye dos sucesos separados, pero interrelacionados: la fagocitosis y el subsiguiente desarrollo de la respuesta inmunitaria.⁵⁵

De acuerdo a su tipo de función en la respuesta defensiva, se clasifican en: granulocitos, monocitos y linfocitos. Los granulocitos y monocitos se

ocupan de fagocitar, mientras que los monocitos y linfocitos interactúan para producir una respuesta inmunitaria.^{55, 63}

Granulocitos. Son células granulares, se clasifican en:

- Neutrófilos. Constituyen la mayor parte de leucocitos de la sangre periférica. Su número absoluto puede variar a lo largo del día, de acuerdo con grado de actividad del individuo.⁵⁵
- Basófilos. Son los granulocitos más pequeños, actúan junto con células cebadas como mediadores de las respuestas inflamatorias, en especial las de hipersensibilidad o alérgicas, al liberar enzimas vasoactivas, broncoconstrictivas y quimiotácticas.^{26, 55}
- Eosinófilos. Son los encargados de modular la respuesta alérgica, al segregar sustancias que pueden neutralizar los productos de células cebadoras y basófilos.^{49, 55}

Monocitos. El sistema monocito-macrófago inicia y regula la respuesta inmunológica. Ingieren factores de coagulación activados, proteínas desnaturalizadas y complejos antígeno-anticuerpo^{55, 63}

Linfocitos. Su función primaria es reaccionar con antígenos y trabajar con monocitos para modular la respuesta inflamatoria, por medio de los linfocitos T y linfocitos B.⁵⁵

Los linfocitos T participan en una la respuesta inmune mediada por células, la cual requiere la interacción entre macrófagos, linfocitos T y antígeno. Mientras que los linfocitos B incluyen la parte de la respuesta inmune conocida como inmunidad humoral que se basa en la síntesis y secreción de anticuerpos.^{55, 63}

3.5.1.3 Serie trombocítica

Plaquetas. Son células discoidales de superficie lisa. Lleva acabo funciones de adhesión, agregación y liberación en la formación de coágulos sanguíneos. También promueven la reparación tisular después de una lesión.⁵⁵

La cantidad y morfología de las plaquetas puede proporcionar datos adicionales respecto a la causa de anemia, debido a que algunas deficiencias nutricionales, alteraciones y anormalidades en las células, pueden alterar su producción, función y/o morfología.

3.5.2 Química sanguínea

La química sanguínea o análisis metabólico base, es un grupo de pruebas de laboratorio que se basa en el análisis de sustancias químicas disueltas en la sangre, las cuales proporcionan información acerca del metabolismo de un organismo y que, a su vez evidencia el funcionamiento de órganos, como el hígado, el corazón y los riñones principalmente.⁶¹

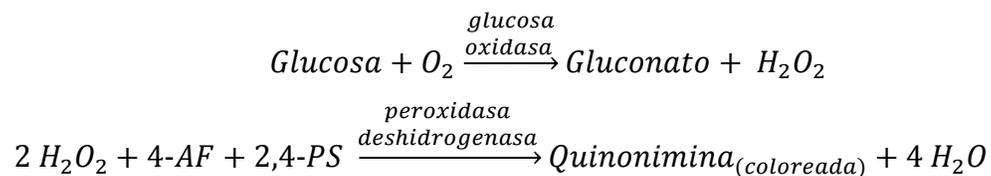
3.5.2.1 Glucosa

La glucosa es un hidrato de carbono simple, su principal función bioquímica es proporcionar energía para los procesos del organismo; así la glucosa es transportada a través de la sangre para ser almacenada como reservorio compacto (glucógeno) y también para movilizar la glucosa almacenada, para mantener el nivel de glucosa en sangre.⁶¹

La prueba de glucosa en ayunas evalúa de modo aproximado la capacidad del cuerpo para regular la glucosa y proporciona información acerca de la clase de anormalidad, hipoglucemia o hiperglucemia.^{23, 61}

La determinación de glucosa por un método enzimático fue propuesto por Trinder en 1972, en el cual la enzima glucosa oxidasa cataliza la oxidación de la glucosa a gluconato y peróxido de hidrogeno.⁶¹

La concentración de glucosa es proporcional al H_2O_2 , el cual puede determinarse por medio de una reacción acoplada que utiliza la enzima peroxidasa deshidrogenasa y 4-aminofenazona en medio alcalino obteniéndose un compuesto coloreado el cual es leído a 520 nm.⁶¹



4-AF = 4-aminofenazona

2,4-PS = 2,4-diclorofenol sulfonato

3.5.2.2 Colesterol

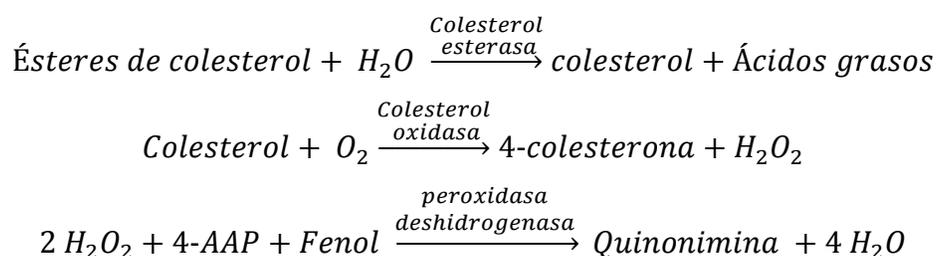
El colesterol es una sustancia hidrófoba, insoluble en el plasma sanguíneo, puede tener una procedencia exógena o endógena; se sintetiza sobre todo en el hígado, pero también en la piel, intestino, glándulas suprarrenales, ovarios, testículos, riñón y el pulmón.^{23, 36}

El colesterol es esencial para funciones del organismo, como:

- Componente estructural esencial de membranas de todas las células animales y partículas subcelulares.
- Precursor de ácidos biliares.
- Precursor de hormonas esteroideas.
- Precursor de vitamina D.

La determinación de colesterol se realiza por medio de un método analítico enzimático, en el que los esteres de colesterol son hidrolizados y oxidados por medio de la enzima colesterol esterasa y colesterol oxidasa respectivamente, produciendo 4-colesterona y peróxido de hidrogeno.⁶¹

El peróxido de hidrogeno producido se valora mediante la reacción con 4-aminoantipirina y fenol, en presencia de peroxidasa, para producir un cromógeno con absorbancia máxima a 520 nm. La intensidad del color producida es directamente proporcional a la concentración de colesterol total en la muestra.⁶¹



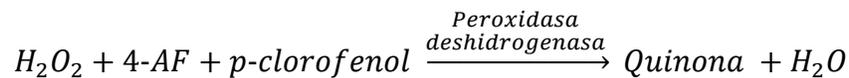
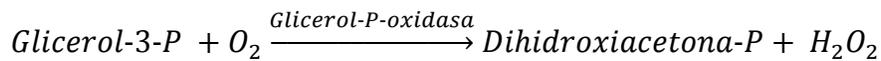
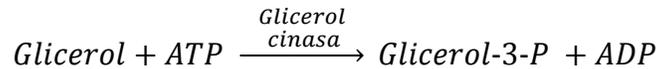
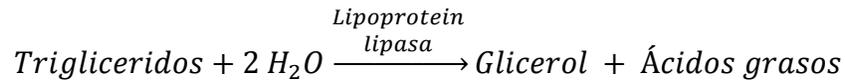
4-AAP = 4-aminoantipirina

3.5.2.3 Triglicéridos

Los triglicéridos son moléculas esterificadas constituidas por glicerol y ácidos grasos.⁵⁷

Las fuentes de lípidos pueden ser exógenas o endógenas, sus vías metabólicas hacia todas las áreas del organismo y procedentes de ellas constituyen una red compleja de reacciones químicas en las que participan moléculas individuales y lipoproteínas de gran tamaño.²³

Su determinación está basada en un método enzimático en el cual la enzima glicerol cinasa y Glicerol-P-oxidasa, libera el peróxido de hidrógeno que se valora mediante la reacción de Trinder, de acuerdo a las siguientes reacciones:⁶¹



4-AF = 4-aminofenazona

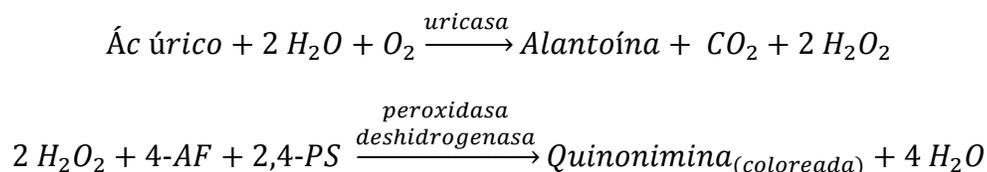
3.5.2.4 Ácido úrico

El ácido úrico es un ácido débil que se encuentra en el plasma sanguíneo en su forma no ionizada (uratos), en los mamíferos es el producto final del catabolismo de las bases púricas. Los uratos se sintetizan en los tejidos que contienen xantina oxidasa, especialmente el hígado y la mucosa intestinal, su eliminación es principalmente por el riñón.²³

Su origen puede ser endógeno, debido al catabolismo de purinas y exógeno por la hidrólisis de ácidos nucleicos provenientes de la ingestión de alimentos ricos en purinas.^{23, 61}

Niveles altos de ácido úrico están asociados a patología renal por retención de productos nitrogenados.

Para su cuantificación, se utilizan métodos basados en la oxidación del ácido úrico a alantoína y peróxido de hidrógeno, que en presencia de la enzima peroxidasa deshidrogenasa y 4-aminofenazona en medio alcalino se obtiene un compuesto coloreado el cual es leído a 520 nm en el espectrofotómetro.⁶¹



4-AF = 4-aminofenazona

2,4-PS = 2,4-diclorofenol sulfonato

Donde la intensidad de quinonimina roja formada es proporcional a la concentración de ácido úrico presente en la muestra sanguínea.

3.5.2.5 Creatinina

La creatinina es un ácido orgánico nitrogenado que se obtiene como producto final del metabolismo muscular, resultado de la degradación de la creatina, por pérdida de una molécula de agua.³⁶

La creatinina es un componente de los músculos y células nerviosas, puede generar ATP, por lo que es una fuente de energía para las células. Su eliminación tiene lugar casi exclusivamente a través de riñón, siendo un importante índice del funcionamiento renal.^{36, 61}

Los métodos utilizados para la determinación de creatinina se basan en la reacción de Jaffé, descrita en 1886. La creatinina reacciona con una solución alcalina de picrato sódico para formar un complejo coloreado rojo-anaranjado el cual es leído a 520 nm. El control del pH es de suma

importancia, debido a la presencia de sustancias que pueden actuar como cromógenos durante la reacción.⁶¹

Se han desarrollado otros métodos que se basan en la cuantificación de amonio liberado por la enzima *creatininimido hidrolasa*.⁶¹

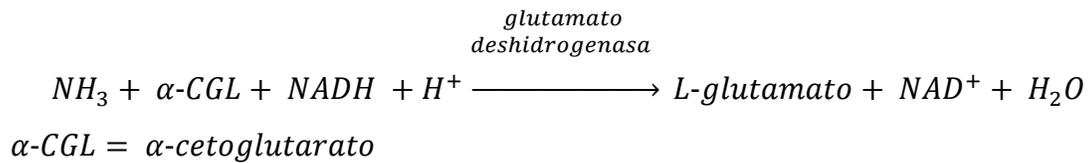
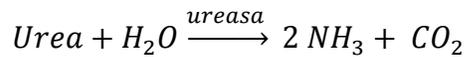
3.5.2.6 Urea

La urea es un compuesto nitrogenado no proteico, obtenido como producto final del catabolismo de proteínas y de los aminoácidos a través del ciclo de la urea, sintetizado en el hígado. Su excreción es por riñón (90%) y también por sudor e intestino.^{23, 61}

La urea se filtra por los glomérulos y una gran parte (40- 80%) se reabsorbe de forma pasiva con el agua en los túbulos proximales. El valor de urea está condicionado por la ingestión proteínica y por el aumento del catabolismo.^{23, 61}

Los métodos más usuales se basan en la determinación de nitrógeno de urea en sangre (BUN) tienen como objetivo la determinación de amoníaco liberado por la urea, empleando la titulación de hipobromuro o mediante la reacción de indolfenol de Berthelot.⁶¹

Otros métodos se basan en el uso de la enzima ureasa, la cual cataliza la hidrólisis de urea en amoníaco y CO₂. La producción de amoníaco formado se acopla a la reacción de valoración enzimática de la glutamato deshidrogenasa, pasando NADH a NAD⁺.⁶¹



Donde la disminución de la absorbancia a 340nm, frente al tiempo es proporcional a la concentración de urea.

3.6 Histología

Consiste en un estudio microscópico de células, tejidos y órganos, así como de su función en términos estructurales.⁵⁴

3.6.1 Técnica histológica

Consiste en cortes del material incluido en parafina y teñido con hematoxilina y eosina (HE). Los pasos importantes en la técnica histológica son:^{15, 24, 54}

Fijación. Conservar la estructura de los tejidos, se pueden utilizar agentes fijadores físicos o químicos, el más utilizado es el formaldehído.

Deshidratación. Eliminación de H₂O para poder fijarlo en parafina, se utilizan soluciones alcohólicas de graduación creciente.

Aclaramiento. Utilización de un disolvente orgánico para el proceso de aclaramiento, por lo regular se utiliza xilitol.

Inclusión. Consiste en infiltrar el tejido en parafina fundida, para formar un bloque llamado "taco".

Corte. Se realizan cortes por medio de un instrumento llamado micrótopo, por lo general, se realizan cortes de 5 a 8 micras. El grosor del corte está regulado por medio de un tornillo micrométrico.

Hidratación. Consiste en eliminar la parafina, utilizando un disolvente orgánico, posteriormente, se realiza la rehidratación por medio de una serie de soluciones alcohólicas decrecientes, hasta llegar a H₂O.

3.6.2 Tinción hematoxilina-Eosina

La coloración es una propiedad que poseen ciertos cuerpos de ejercer sobre la luz de absorción selectiva.⁵⁴

La tinción de hematoxilina–eosina consiste en la aplicación de colorantes de diferente carga para poder diferenciar ciertas estructuras dentro de la célula o tejido de acuerdo a su naturaleza química.^{15, 54}

Hematoxilina. Se utiliza con un mordiente (intermediario) para asemejar a un colorante básico, por lo cual se asocia y colorea estructuras aniónicas. Su componente cromógeno es el complejo de hemateína y aluminio.^{15, 21, 54}

La reacción de éstos varía de acuerdo al pH, tiñen estructuras nucleares:

- Fosfatos y ácidos nucleicos (DNA y RNA).
- Sulfatos de los glucosaminoglucanos.
- Grupo carboxilo de las proteínas.

Eosina. Colorante ácido, se asocia y colorea estructuras catiónicas (cargas con densidad positiva).^{15, 21, 54}

Es un colorante citoplasmático:

- Grupos amino ionizados de las proteínas.
- Filamentos citoplasmáticos
- Membranas intracelulares
- Fibras extracelulares

Los componentes teñidos por la hematoxilina, colorante básico, se describen como *basófilos*; mientras que a los componentes celulares que captan y sean teñidos por la eosina, colorante ácido, se les describe como *acidófilos*.^{29, 34,}

3.7 Eficiencia alimenticia

La eficiencia alimenticia es una medida de productividad animal, se define como la cantidad de alimento necesario para obtener una ganancia de peso corporal de una unidad, es decir la relación entre el incremento en la masa corporal y el alimento consumido.^{14, 37, 65} Entre mayor es el valor obtenido de esta relación, mayor es la eficiencia.

Sin embargo es un parámetro que puede variar debido a:

- **Factores extrínsecos.** Se refieren a las condiciones externas a las cuales se encuentra expuesto el organismo en estudio, por ejemplo temperatura, calidad del alimento y agua, ventilación, nivel de actividad física en la que se encuentra sometido, etc.¹⁰
- **Factores intrínsecos.** Son el conjunto de características propias del animal, como pueden ser especie, edad, aspectos genéticos, funcionamiento del metabolismo, enfermedades.^{8, 14}

3.8 Curvas de crecimiento

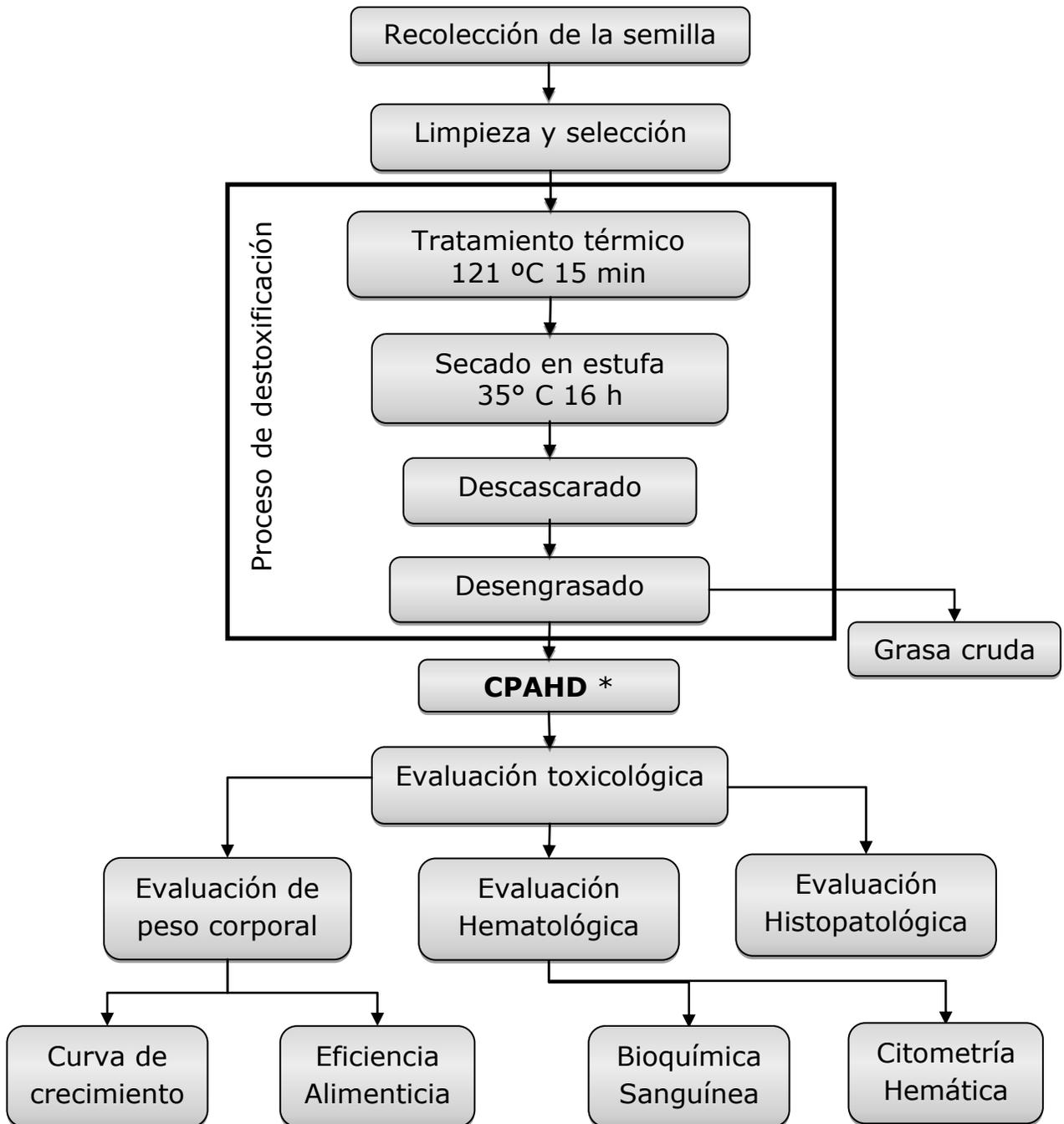
Las curvas de crecimiento se refieren al tipo de gráfico que representa la tasa de crecimiento de un individuo o una población. Son útiles para conocer de qué manera está cambiando la población en el tiempo.⁵⁸

El gráfico es generalmente una curva de tipo asintótico, lo que significa que los individuos no pueden sobrepasar un peso máximo, como tampoco pueden crecer indefinidamente.⁵⁸

La utilización de curvas de crecimiento en ensayos biológicos se basa en la evaluación del peso corporal de un individuo con respecto al tiempo de experimentación, este parámetro es un indicador simple pero sensible de posibles efectos tóxicos.^{7, 10, 32}

Capítulo IV Método

4.1 Diagrama General de Trabajo



*Concentrado Proteínico de la Almendra de Higuierilla Destoxificada.

Figura 4.1 Diagrama general de desarrollo experimental

4.2 Recolección de la semilla

Los frutos de higuera (*Ricinus communis*) fueron recolectados en los alrededores de Zacualtipan Hidalgo, principalmente de *San Agustín Metzquititlan*.

4.3 Limpieza y selección de la semilla

Material

- Pinzas de punta y corte TRUPER

Procedimiento

Las semillas se obtuvieron de manera manual por medio de unas pinzas de punta, teniendo cuidado de no romper la semilla. Al mismo tiempo se hizo la selección de estas, eliminando las semillas rotas, contaminadas y/o secas.

Las semillas fueron almacenadas en un recipiente de plástico con tapa a temperatura ambiente.

4.4 Destoxificación: tratamiento térmico

Se realizó por calor húmedo en una autoclave, la cual permite calentar las muestras a temperaturas superiores a las de ebullición del agua, dicho tratamiento térmico se llevó a cabo a 121 °C (15 psi) 15 minutos, con el fin de inactivar los agentes tóxicos y/o antinutrientales presentes en la semilla de higuera.

Materiales y reactivos

- Autoclave HIRAYAMA modelo HA-300 MII
- Estufa de secado FELISA modelo FE-293A

- 1 vaso de precipitados de 2 L
- Papel de Aluminio
- Balanza SAUTER
- Charola de Aluminio
- 1 Litro de Agua

Procedimiento

Se pesó 1 kg de semillas en un vaso de precipitados de 2L se agregó agua en relación 1:1 masa-volumen, se tapó con papel aluminio, se metió a la autoclave a 121 °C 15 min, posteriormente las semillas se colocaron en una estufa de secado por 16 h a 35°C.⁶

4.5 Destoxificación: descascarado

El descascarado tiene como objetivo separar la almendra de la cáscara de la higerilla.

Materiales

- Pinzas de punta y corte TRUPER

Procedimiento.

Se tomó una semilla de higerilla y se presiona ligeramente con unas pinzas de punta hasta quebrar la cáscara. La almendra se obtuvo de forma manual, se colocó en un recipiente de plástico etiquetado y se guardó a temperatura ambiente.

4.6 Destoxificación: desengrasado

Se basa en la extracción de la grasa contenida en la almendra de higerilla por medio de disolventes orgánicos, en este caso, se utilizó como disolvente hexano.³⁰

Materiales y reactivos

- Equipo de extracción especial tipo Soxhlet
- Matraz bola de 3L
- Soporte universal
- 2 pinzas de nuez
- Canastilla de calentamiento
- Bomba de agua
- Charola de plástico
- Papel filtro
- Rotavapor Büchi modelo RE-111
- Baño de agua Büchi modelo B-461
- Termómetro
- Hexano (R.A.)

Procedimiento

Se colocó la muestra fraccionada en una funda de tela dentro del tubo contenedor del equipo de Soxhlet, se colocó el refrigerante conectado a una bomba, que se encontraba en baño de hielo con el objetivo de recircular agua fría.³⁰

En el matraz bola, se colocaron piedras de ebullición y se agregó hexano hasta la mitad de su capacidad. Se colocó en una canastilla de calentamiento a una temperatura de 50-60°C, se verificó que el equipo estuviera bien montado y que no tuviera fugas.

Después de aproximadamente 30 h de funcionamiento continuo, se procedía hacer una prueba que consiste en tomar un pedazo de papel filtro y adicionar un poco de disolvente que haya estado en contacto con la muestra, si no se observa una mancha de grasa, se consideró que la

muestra está desengrasada; si por el contrario, hay la existencia de una mancha de grasa sobre el papel filtro, se sigue el proceso de desengrasado hasta que la prueba sea negativa.³⁰

Cuando la muestra está desengrasada, se desmonta el equipo, la muestra dentro de la funda de tela se coloca sobre la campana de extracción para la evaporación del disolvente residual y posteriormente la harina se guarda en un frasco etiquetado.

La grasa cruda se separó del disolvente por medio de un equipo de rotavapor a una temperatura de 45 °C a presión reducida. La grasa cruda recuperada se guardó en un frasco etiquetado y se almacenó en el congelador.

4.7 Ensayo biológico. Prueba de toxicidad crónica

La toxicidad crónica es el conjunto de efectos observados por la administración de dosis repetidas, durante un periodo del 10% de la vida media del modelo biológico estudiado. Los objetivos fundamentales de los estudios a largo y mediano plazo son obtener y determinar la dosis sin efecto observado (NOEL).⁵¹

Materiales y reactivos

- Balanza para animales de laboratorio triple brazo OHAUS modelo 730-SW
- Balanza granataria digital OHAUS
- 5 Jaulas de acrílico con tapa de enrejado de acero inoxidable
- 5 bebederos
- 50 ratones macho de la cepa ICR de 16-20 g, recién destetados
- Marcador de orejas metálico

Procedimiento

4.7.1 Modelo biológico

En el estudio de toxicidad crónica del concentrado proteínico de la almendra de higuierilla destoxificada (**CPAHD**), se utilizó como modelo biológico ratones macho de la cepa ICR de 16–18 g de peso corporal, recién destetados (1-2 semanas de edad), con el fin de observar su desarrollo durante el bioensayo y poder elaborar las respectivas curvas de crecimiento.^{38, 46}

4.7.2 Registro

Para la identificación de los animales se realizó el marcaje de los ratones de forma permanente por medio de la perforación de orejas.

- a) Se inmovilizó al ratón con una mano de modo que las orejas queden perfectamente accesibles.¹
- b) Se realizaron perforaciones en las orejas del animal siguiendo el código de marcaje¹ que se muestra en la figura siguiente:

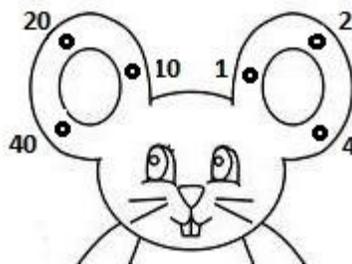


Figura 4.2. Código de marcaje ratones.

4.7.3 Distribución de los animales

Los ratones fueron pesados y se distribuyeron en 5 lotes colocando 10 ratones por jaula, en una distribución de "culebra japonesa" (anexo), para que el peso de los lotes fuera lo más homogéneo posible.¹

4.7.4 Elección de los grupos

Se trabajaron 5 lotes de 10 animales cada uno, de los cuales se manejaron 3 lotes con diferentes concentraciones del CPAHD y 2 lotes control. La asignación del lote se hizo de manera aleatorizada.

4.7.5 Vía de administración y dosis

La vía de administración fue oral, incorporándose la cantidad calculada del CPAHD en el alimento comercial para roedores de la marca HARLAN. Las dosis utilizadas se determinaron con base en un estudio previo⁷ en el cual se realizó una evaluación de toxicidad aguda con el CPAHD, a una dosis máxima de 15 000 mg/kg_{p.c.}, donde no se produjo toxicidad alguna.

Se utilizaron dos controles y tres dosis prueba del CPAHD, la siguiente tabla muestra la dosis empleada, la concentración y la clave utilizada para fines prácticos.

Tabla 4.1. Especificaciones del alimento empleado para el estudio de toxicidad crónica.

	Material evaluar	Clave	Concentración (%)	Dosis (mg/Kg_{p.c.})
Grupos Control	TEKLAD Global para roedores 18% Proteína HARLAN®.	CPT	-----	-----
	Concentrado Proteínico de Soya (<i>Glycine max</i>) desengrasada	CS75	7.5	15,000
Grupos prueba	CPAHD	HI50	5.0	10,000
		HI75	7.5	15,000
		HI100	10.0	20,000

4.7.6 Preparación de la muestra

Para la preparación del alimento se utilizaron pellets de composición conocida (anexo), los cuales se molieron finamente y se mezclaron con el CPAHD, según las dosis a emplear, adicionando la cantidad de agua para formar una pasta y formar los pellets.

Posteriormente, los pellets se colocaron en una estufa de secado a una temperatura de $54^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante aproximadamente 18 horas hasta observar que estuvieran absolutamente secos, se dejaron enfriar, para después almacenarlos a temperatura ambiente en recipientes limpios y secos de plástico.

4.7.6.1 Cálculos

El promedio del alimento ingerido por día de un ratón es de 3-6 g, el cual varía de acuerdo a la edad. Para el estudio de toxicidad del CPAHD, se utilizaron los siguientes datos reportados de un estudio previo:⁴⁶

- Alimento ingerido promedio: 5.52 g de alimento ingerido/día
- Peso corporal promedio del ratón: 27.8 g

a) Concentración de las dosis empleadas

Tomando en cuenta los datos reportados y las dosis empleadas para el estudio, se obtiene, la concentración de CPAHD en el alimento.

- Dosis de 10 000 mg/kg_{p.c.}

$$(27.80 \text{ g p.c. ratón}) \left(\frac{10\,000 \text{ mg CPAHD}}{1000 \text{ g p.c. ratón}} \right) \left(\frac{1 \text{ g CPAHD}}{1000 \text{ mg CPAHD}} \right) = 0.28 \text{ g CPAHD}$$
$$\left(\frac{0.28 \text{ g CPAHD}}{5.52 \text{ g de alimento}} \right) (100) = 5.04 \% \cong 5.0 \%$$

b) Cálculos para la preparación de muestras por lote

Los cálculos efectuados para la preparación de las muestras, según las dosis empleadas, se muestran a continuación:

$$(10 \text{ ~~ratón~~}) \left(5.52 \frac{g \text{ alimento}}{\text{día} * \text{ratón}} \right) = 55.20 \frac{g \text{ alimento}}{\text{día}}$$

Se infirió que hay un desperdicio del 15% por lo que para conocer la cantidad de alimento que se necesita, se realiza la siguiente operación:

$$\left(55.20 \frac{g \text{ alimento}}{\text{día}} \right) + \left[(0.15) \left(55.20 \frac{g \text{ alimento}}{\text{día}} \right) \right] = 63.50 \frac{g \text{ alimento}}{\text{día}}$$

Para conocer la cantidad de harina del CPAHD a incorporar en el alimento comercial (harina de pellets), se realizaron los siguientes cálculos:

CPAHD al 5.0 %

$$\left(63.50 \frac{g \text{ alimento}}{\text{día}} \right) \left(\frac{5 g \text{ CPAHD}}{100 g \text{ alimento}} \right) = 3.20 \frac{g \text{ CPAHD}}{\text{día}}$$

La cantidad de harina de pellet, a pesar en cada caso, se obtiene por medio de la diferencia de la cantidad de alimento y la cantidad de CPAHD.

$$\left(63.50 \frac{g \text{ alimento}}{\text{día}} \right) - \left(3.20 \frac{g \text{ CPAHD}}{\text{día}} \right) = 60.30 \frac{g \text{ pellet}}{\text{día}}$$

En la siguiente tabla, se muestra el resumen de las cantidades a emplear de cada ingrediente en la preparación de los pellets en un periodo de un día.

Tabla 4.2. Preparación de pellets con incorporación del CPAHD.

Concentración de CPAHD (%)	Harina del CPAHD $\left(\frac{\text{g CPAHD}}{\text{día}}\right)$	Harina pellet comercial $\left(\frac{\text{g harina pellet}}{\text{día}}\right)$
5.0	3.2	60.3
7.5	4.8	58.7
10.0	6.4	57.1

4.7.7 Administración de las muestras de estudio

➤ El alimento se administró *ad libitum*, se pesó 3 veces por semana, llevando un control de los datos (anexo). Ya que estos animales tienden a desperdiciar alimento, se recuperó el alimento que pudiera encontrarse en su cama de aserrín.

➤ El agua fue administrada *ad libitum*, cambiándose una vez por semana.

➤ Las jaulas se cambiaron una vez por semana y la cama de aserrín se cambió 2 veces por semana.

➤ Los animales se mantuvieron a una temperatura de 24°C con una humedad relativa de 30-35%, con ciclos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad (sistema automatizado marca TORK), libre de olores y ruidos.

4.7.8 Observaciones e indicadores de toxicidad

Durante todo el experimento, se observó a los animales detalladamente para evidenciar los efectos tóxicos potenciales del CPAHD en cuestión.

➤ **Peso corporal y consumo de alimento.** El consumo de alimento y el peso corporal de animales se monitoreo cada tercer día, anotando los datos obtenidos en una hoja control (anexo), para observar su crecimiento a lo largo del experimento.

➤ **Observaciones clínicas.** Se realizó la evaluación clínica observando los siguientes signos: lordosis, sifoxis, ataxia, piloerección, erección caudal, agresividad, aletargamiento, excitación, disnea, cianosis e hipotermia.

➤ **Pruebas de laboratorio.** Al término del experimento se realizaron evaluaciones de sangre: citometría hemática y química sanguínea.

➤ **Examen *Post-mortem*.** Al término del experimento a los animales en estudio se les realizó una necropsia con el objetivo de obtener un examen patológico general.

Se extrajeron los siguientes órganos: bazo, corazón, hígado, pulmones y riñones; posteriormente, se realizaron exámenes histológicos.

4.7.9 Análisis de resultados

Una vez obtenidos los parámetros a evaluar se realizó el cálculo de la media, desviación estándar y coeficiente de variación de: curvas de crecimiento, eficiencia alimenticia, conversión alimenticia, citometrías hemáticas, químicas sanguíneas y relación porcentual de órganos.

Seguidamente, se realizó un análisis de varianza para determinar si hay diferencia significativa entre los datos obtenidos mediante un programa estadístico llamado *SPSS 15 for Windows*.

4.7.10 Modelo predictivo

Una vez obtenido el análisis estadístico de resultados se hizo la estimación del **NOEL** como valor de referencia de seguridad para el uso del CPAHD.

4.8 Evaluación de parámetros sanguíneos

Se realizó la recolección de muestras sanguíneas para evaluarlas clínicamente y poder determinar posibles daños causados por el consumo del CPAHD en los ratones utilizados para el estudio. Las cuales fueron tomadas a las 14 semanas del estudio.

Para la obtención de las muestras se emplearon dos metodologías, para procurar el bienestar de los animales en estudio.⁴²

4.8.1 Extracción de sangre de seno retro-orbital

El sangrado del seno retro-orbital es una técnica que implica punzar el seno venoso que se halla inmediatamente al globo ocular, este procedimiento se realiza bajo anestesia.

Material y reactivos

- Tubos capilares heparinizados
- Microtiner brand tubes para 200-500 μ L con EDTA potásico (Becton Dickinson Vacutainer No 365973)
- Desecador de vidrio con tapa
- Algodón
- Éter etílico

Procedimiento

La anestesia se realizó al introducir al ratón en el desecador, en cuyo interior se colocó algodón impregnado con éter etílico.

Una vez anestesiado, se sujeta al animal estirando la piel del cuello hacia atrás, asegurándose de no dificultar la respiración. Se insertó el capilar heparinado en el ángulo externo del ojo (2 mm aprox).

La muestra de sangre se recogió en tubos microtiner con EDTA y se retiró el capilar. Se comprobó la recuperación de la anestesia y se regreso a su respectiva jaula.

4.8.2 Extracción de sangre de Vena Mandibular

La punción mandibular es un método para la obtención de sangre en roedores, pues es un procedimiento sencillo y poco traumático en el que se realiza una punción a la altura del ángulo de la mandíbula.

Material

- Aguja 19 – 21 G
- Microtiner brand tubes para 200-500 μ L con EDTA potásico (Becton Dickinson Vacutainer No 365973)

Procedimiento

Se sujetó firmemente al ratón por la piel y el cuello de manera que la cabeza quedará alineada con el cuerpo, provocando la suficiente tensión como para dificultar temporalmente el retorno venoso yugular y facilitar el sangrado, pero teniendo la precaución de que el animal continuará respirando sin dificultad.

Se localizó la zona dorsocaudal, al ángulo de la mandíbula, donde confluyen las venas facial, maxilar y temporal superficial, en animales de pelaje blanco, se puede apreciar una pequeña zona circular desprovista de pelo, situada centralmente en la mandíbula inferior del animal (puede no estar presente en algunas cepas).

Con una aguja de 19 G o 21 G, dependiendo de la edad y/o tamaño del ratón, se realizó la punción (inclinando dorsalmente la aguja 1-2 mm) en la zona anteriormente descrita. La profundidad óptima es de 2-3 mm.

La sangre se recogió en tubos microtiner con EDTA potásico, hasta un volumen mínimo de 250 μ L. Una vez obtenida la muestra, se liberó al ratón.

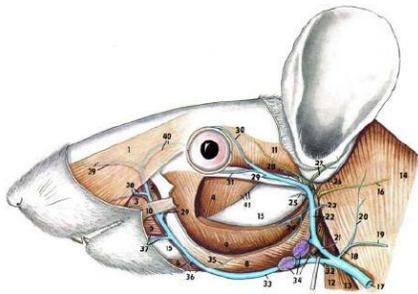


Figura 4.3 Vascularización venosa de la cabeza de ratón.



Figura 4.4 Punción de la zona mandibular.

4.8.3 Citometría Hemática y Química Sanguínea

Las muestras sanguíneas se obtuvieron por cualquiera de las dos técnicas de extracción de sangre descritas. Éstas fueron analizadas con apoyo del Departamento de Hematología Clínica de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la UNAM para la evaluación de citometrías hemáticas y para la realización de químicas sanguíneas se contó con el apoyo del Centro Universitario de Diagnóstico, de la FES Cuautitlán de la UNAM.

4.9 Necropsias

Al término del experimento, los animales se pesaron, se sacrificaron y se les realizó necropsia; también se calculó la relación porcentual de los siguientes órganos: bazo, corazón, hígado, pulmones y riñones. Para ello se utilizó la operación aritmética:

$$\text{Relación porcentual} = \frac{\text{Peso \acute{o}rgano}}{\text{Peso corporal final}} \times 100$$

4.10 Evaluaci3n histopal3gica de 3rganos

La t3cnica histol3gica utilizada consisti3 en el an3lisis microsc3pico anat3mico y estructural de cortes de c3lulas, tejidos y/o 3rganos, incluidos en parafina y teñidos con hematoxilina-eosina.

Material y reactivos

- Pinzas de punta
- Navaja
- Cron3metro
- Portaobjetos
- Charola de disecci3n
- Parafina fundida
- Frascos 3mbar de vidrio con tapa
- Micr3tomo LabTek modelo MIHI-05-2
- Histoquinette LEICA modelo HIQ-DP-MV005
- Microscopio de Luz
- Agua destilada
- Formol 10% pH 7.2-7.4
- Soluci3n alcoh3lica al 80%
- Soluci3n alcoh3lica al 96%
- Alcohol absoluto
- Xilitol
- Soluci3n de hematoxilina de Harris
- Soluci3n de eosina alcoh3lica.

Procedimiento

4.10.1 Preparación de las muestras

Una vez que los ratones fueron sacrificados, se les extrajeron los siguientes órganos: bazo, corazón, hígado, riñones y pulmones, los cuales se almacenaron en frascos ámbar con tapón de 10 mL con formol al 10% pH 7.2-7.4.

4.10.2 Disección de órganos

En una charola de disección previamente desinfectada, se colocó el órgano, se seccionó en fragmentos menores a 1 cm, se colocó en una laminilla de plástico previamente etiquetada, se fijó en una solución de formol al 10% por 24 horas, con el fin de conservar la estructura del órgano.

4.10.3 Fijación, deshidratación e inclusión en parafina

El procedimiento de inclusión y cortes en parafina se realizó por medio de un equipo automático "Histoquinete". El procedimiento se llevó a cabo en un tiempo de 24 horas, el cual se describe a continuación:

a) Para terminar de fijarse, se puso en contacto por dos horas en una solución de formol al 10%.

b) Se realizaron lavados con agua corriente de 15 a 30 minutos, los cortes de los órganos se sumergieron en soluciones alcohólicas de concentración ascendente desde 80% hasta 96%, las cuales se mantuvieron por un tiempo de 2 horas en cada solución, con el propósito de eliminar el agua tisular.

c) Para el proceso de aclaramiento, se sumergió por un periodo de 2 horas en una mezcla de alcohol-benceno y posteriormente por 4 horas en una solución de benceno.

d) El corte del órgano fue infiltrado en parafina fundida (temperatura entre 56- 63°C).

4.10.4 Corte

Una vez solidificada, se le dio forma de bloque para realizar cortes muy finos por medio de un equipo llamado "micrótomo".

Los cortes se colocaron en un baño de flotación a 37°C con gelatina, previamente disuelta, para adherir el órgano a un portaobjetos y se dejaron secar a temperatura ambiente.

4.10.5 Tinción hematoxilina eosina

La eliminación de los restos de parafina se realizó en dos lavados con xilitol, de 5 minutos cada uno. Los portaobjetos con el corte del tejido, se colocaron en cambios sucesivos de soluciones alcohólicas de concentraciones decrecientes desde alcohol al 96% hasta alcohol un lavado con H₂O, por 5 minutos cada uno.

Se agregó una solución de hematoxilina de Harris de 1 a 10 min, se lavó con agua corriente y alcohol ácido para eliminar el exceso de colorante.

Se agregó una solución de agua amoniacal para cambiar el pH (morado a azul) y se deshidrató con un lavado de agua y una solución de alcohol al 96%.

Luego, se tiñó con una solución de eosina de 3 a 5 minutos, posteriormente, se realizaron los lavados con alcohol absoluto y alcohol absoluto-xilitol.

Una vez deshidratada, se agregaron dos lavados con xilitol para aclarar.

4.10.6 Observación e interpretación

Para la observación e interpretación del material histológico obtenido, se utilizó la toma de fotografías en un fotomicroscopio de disposición automático.

4.11 Eficiencia alimenticia

La eficiencia alimenticia (**EA**), se calculó por medio de la siguiente ecuación:

$$EA = \frac{\Delta \text{ peso corporal}}{\text{alimento consumido}} \times 100$$

Donde:

$$\Delta \text{ peso corporal} = \text{peso final} - \text{peso inicial}$$

alimento consumido = Alimento total consumido en el experimento.

Capítulo V

Resultados y discusión

El estudio de toxicidad crónica del concentrado proteínico de la almendra de higuera destoxificada (**CPAHD**), tuvo una duración de 14 semanas (98 días), como modelo biológico se emplearon ratones macho de la cepa ICR, con un peso promedio de 16–18 g. Los animales fueron distribuidos en 5 lotes. La vía de administración fue oral por medio de la elaboración de pellets en los que se incorporó el material a evaluar.

Las dosis empleadas fueron 10,000 mg/kg_{pc}, 15,000 mg/kg_{pc} y 20,000 mg/kg_{pc}. Se manejaron dos controles uno que corresponde al alimento estándar para ratones y otro que fue elaborado con un concentrado de soya, para simular la adición de un preparado proteínico, relativamente inocuo en los pellets.

Para fines prácticos, se utilizaron las siguientes abreviaturas: CPT para el grupo control, alimentados con pellets TEKLAD Global para roedores 18% Proteína HARLAN[®]; CS75 para el lote control de pellets preparados con un concentrado de soya al 7.5%; HI50 para el lote alimentado con un CPAHD al 5%; HI75 para el grupo alimentado con pellets al 7.5% del CPAHD y HI100 para el lote alimentado con un CPAHD al 10%.

5.1 Incremento en peso corporal

Durante el estudio, se llevó a cabo la evaluación del crecimiento por medio del incremento en peso, con el fin de observar la influencia del material en este parámetro.

En la tabla 5.1, se reporta el promedio del peso acumulativo al final del estudio de toxicidad, así como la desviación estándar y el porcentaje del coeficiente de variación.

Los valores promedio del incremento en peso corporal obtenidos son muy cercanos entre cada lote; de manera general, se puede decir que el lote HI75 tuvo un mayor incremento en peso corporal, mientras que el lote HI50 tuvo un menor incremento de peso, con respecto al grupo control CPT.

Tabla 5.1 Incremento en peso corporal promedio de los diferentes lotes de animales alimentados con preparados de pellets.

Lote³	Incremento en peso	
CPT	Promedio (g)	22.4
	DS ¹	7.5
	CV ² (%)	33.3
CS75	Promedio (g)	24.8
	DS ¹	7.4
	CV ² (%)	29.7
HI50	Promedio (g)	23.6
	DS ¹	8.0
	CV ² (%)	33.9
HI75	Promedio (g)	26.5
	DS ¹	7.9
	CV ² (%)	29.9
HI100	Promedio (g)	24.4
	DS ¹	7.5
	CV ² (%)	30.6

¹ Desviación estándar.

² Coeficiente de variación expresado en porcentaje.

³ **CPT**: control pellets 18% proteína. **CS75**: Pellets 7.5% concentrado proteínico de soya. **HI50**: pellets 5% del CPAHD. **HI75**: pellets 7.5% del CPAHD. **HI100** pellets 10% del CPAHD.

* **CPAHD**: Concentrado proteínico de almendra de higuera destoxificada.

La evaluación de este parámetro se puede visualizar de manera más clara en el gráfico 5.1, el cual representa el incremento en peso corporal con respecto al tiempo. Se observa que el crecimiento de los animales en estudio fue muy similar con respecto al lote control CPT a través de las 14 semanas de experimentación.

Gráficamente no existe diferencia significativa, pues las barras de desviación estándar indican que ningún valor se encuentra por encima o debajo de está.

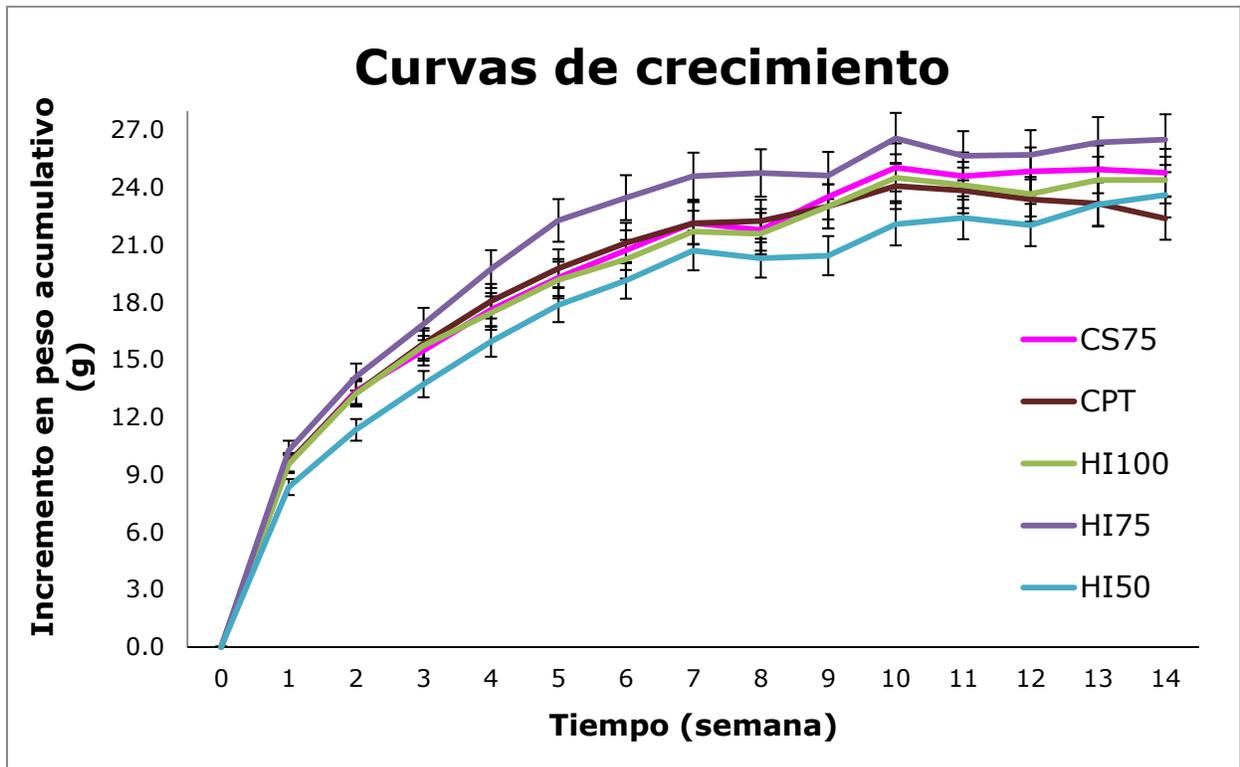


Gráfico 5.1 Promedio incremento en peso acumulativo con respecto al tiempo en un periodo de 14 semanas, en el estudio de la evaluación toxicológica del **CPAHD***.

CPT: control pellets 18% proteína. **CS75:** Pellets 7.5% concentrado proteínico de soya. **HI50:** pellets 5% del CPAHD. **HI75:** pellets 7.5% del CPAHD. **HI100** pellets 10% del CPAHD.

* **CPAHD:** Concentrado proteínico de almendra de higuera destoxificada.

Para comprobar esta afirmación, se realizó un análisis de varianza (anexo), para la última semana del estudio, se planteó la hipótesis "Ho: no existe diferencia entre lotes". En el análisis estadístico, se acepta la hipótesis nula, al no encontrarse diferencia significativa entre el incremento en peso corporal de los diferentes lotes evaluados.

5.2 Consumo de Alimento

De acuerdo al gráfico 5.2 se observa que la ingesta de alimento fue muy similar entre todos los lotes con respecto al control. El lote que ingirió más alimento fue el lote control CPT, este efecto se empezó a manifestar a partir de la semana 5; para el caso de los lotes CS75, HI75 y HI100, el consumo de alimento se ve muy similar; mientras que el lote HI50 fue el lote que ingirió menor cantidad de alimento.

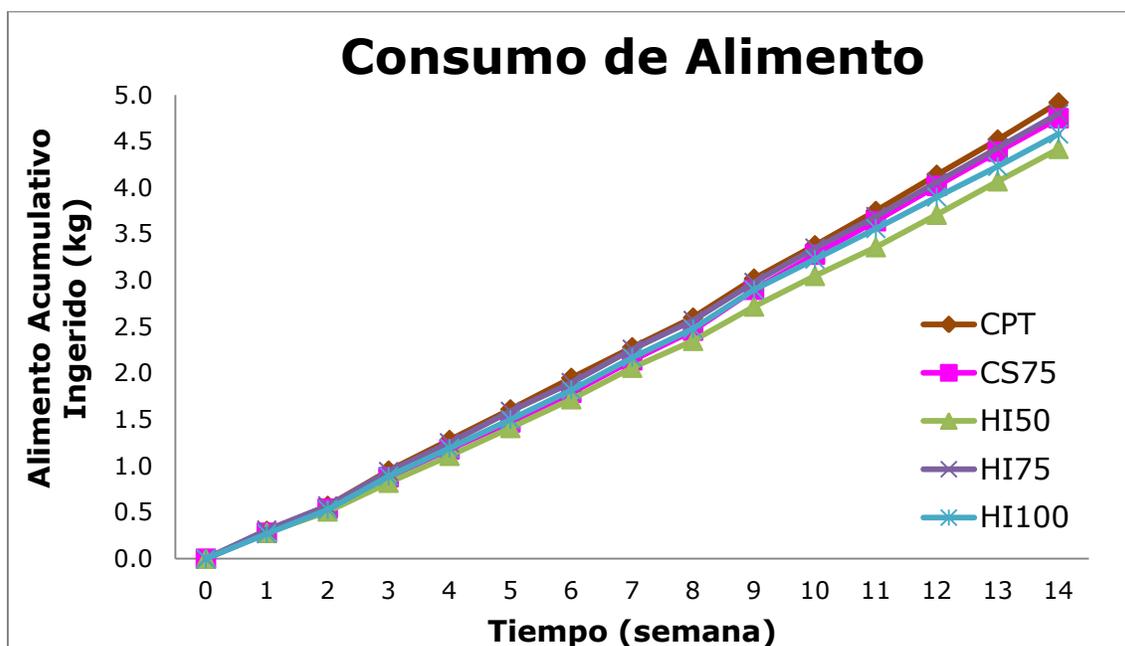


Gráfico 5.2 Alimento acumulado ingerido respecto al tiempo, en el estudio de la evaluación toxicológica del **CPAHD***.

CPT: control pellets 18% proteína. **CS75:** Pellets 7.5% concentrado proteínico de soya. **HI50:** pellets 5% del CPAHD. **HI75:** pellets 7.5% del CPAHD. **HI100** pellets 10% del CPAHD.

* **CPAHD:** Concentrado proteínico de almendra de higuera destoxificada.

Al parecer, las diferencias entre la cantidad de alimento consumido no afectó el incremento en peso de los ratones, pues se observa un crecimiento en peso muy similar, lo cual indica, que para este parámetro biológico, no se presentaron anomalías.

5.3 Signos clínicos

Los ratones se mantuvieron en observación durante todo el estudio, los signos clínicos evaluados fueron: lordosis, xifosis, disnea, cianosis, ataxia, excitación, erección caudal, piloerección, hipotermia, agresividad y aletargamiento.

Los signos clínicos antes mencionados se evaluaron por medio de la observación de los diferentes lotes de prueba con respecto al lote control CPT. Durante el periodo de evaluación de los diferentes preparados del CPAHD, no se observaron signos clínicos que pudiesen indicar alguna anomalía debida al consumo del material en estudio.

En este ensayo biológico, no se reporta la muerte de ninguno de los ratones, lo que indica la posible ausencia de alguna sustancia tóxica que pudiese causar mortalidad en alguno de los lotes evaluados.

5.4 Eficiencia alimenticia

Se realizó el cálculo de eficiencia alimenticia, que es una medida de productividad de un animal, este parámetro se puede utilizar como un indicador de la calidad de proteínica del material de prueba con respecto al control CPT, pues la eficiencia alimenticia relaciona la cantidad de alimento consumido y la ganancia en peso corporal de un organismo.

Los valores de eficiencia alimenticia calculados se reportan en la tabla 5.2, en la que se puede observar que los valores obtenidos son muy similares en los lotes de animales alimentados con diferentes concentraciones proteínicas. Al realizar el análisis de varianza correspondiente (anexo), se encontró que no existe diferencia significativa entre los lotes.

Vale la pena mencionar que los tres concentrados proteínicos de almendra de higuera destoxificada (CPAHD) que se estudiaron presentaron un valor mayor que el lote control CPT, lo que podría indicar una mayor eficiencia alimenticia por parte del concentrado proteínico en evaluación, acercándose más a la calidad proteínica del concentrado de soya.

Tabla 5.2 Eficiencia alimenticia de preparados de pellet

Lote^b	Eficiencia Alimenticia^a (%)
CPT	4.5898 ± 0.8457
CS75	5.2179 ± 0.4241
HI50	5.3411 ± 1.0649
HI75	5.5209 ± 0.4698
HI100	5.3267 ± 0.6165

^a Se reporta valor promedio ± desviación estándar.

^b**CPT:** control pellets 18% proteína. **CS75:** Pellets 7.5% concentrado proteínico de soya. **HI50:** pellets 5% del CPAHD. **HI75:** pellets 7.5% del CPAHD. **HI100** pellets 10% del CPAHD.

***CPAHD:** Concentrado proteínico de almendra de higuera destoxificada.

La eficiencia alimenticia es un indicador simple, pero sensible a los efectos tóxicos de una sustancia; por lo tanto, al no observarse diferencia significativa entre los valores calculados, se deduce que no se presentaron anomalías debidas a algún compuesto toxico presente en el CPAHD estudiado.

5.5 Citometría hemática

Los parámetros de una citometría hemática son indicadores del estado de salud de un individuo, ya que suelen evidenciar signos subclínicos debidos a un daño causado por alguna sustancia toxica que pudiera estar presente en el CPAHD.

Al término del experimento, se realizó la toma de muestras sanguíneas sobre los animales en estudio, con el fin realizar un análisis de laboratorio, la obtención de las muestras se realizó por medio de un sangrado vena mandibular o seno retro-orbital.

El análisis de las muestras sanguíneas se realizó con el apoyo del Departamento de Patología Clínica de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia, de la UNAM.

Los parámetros hematológicos obtenidos se dividieron en tres grupos: serie blanca, serie roja y serie trombocítica, los cuales se representan gráficamente a continuación, donde en cada gráfico se puede observar la barra del valor promedio con su intervalo que corresponde a una desviación estándar.

Serie blanca

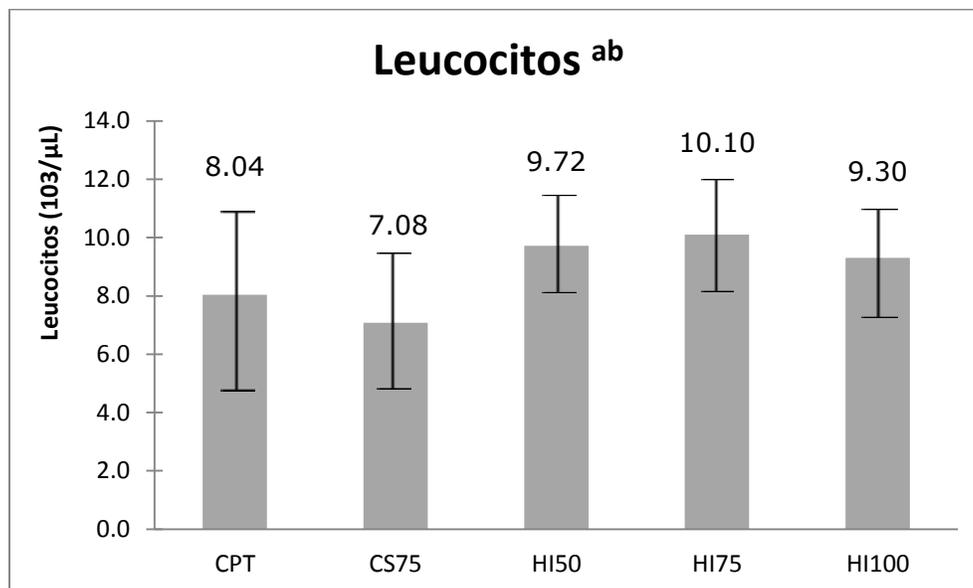


Gráfico 5.3 Resultados leucocitos (LEU) en el estudio de la evaluación toxicológica del **CPAHD***.

^aSe reporta el valor promedio con barras de desviación estándar.

^b**CPT**- control pellets 18% proteína; **CS75**- Pellets 7.5% concentrado proteínico de soya; **HI50**- pellets 5% del CPAHD; **HI75**: pellets 7.5% del CPAHD. **HI100** pellets 10% del CPAHD.

***CPAHD**: Concentrado proteínico de almendra de higuierilla destoxificada.

Serie roja

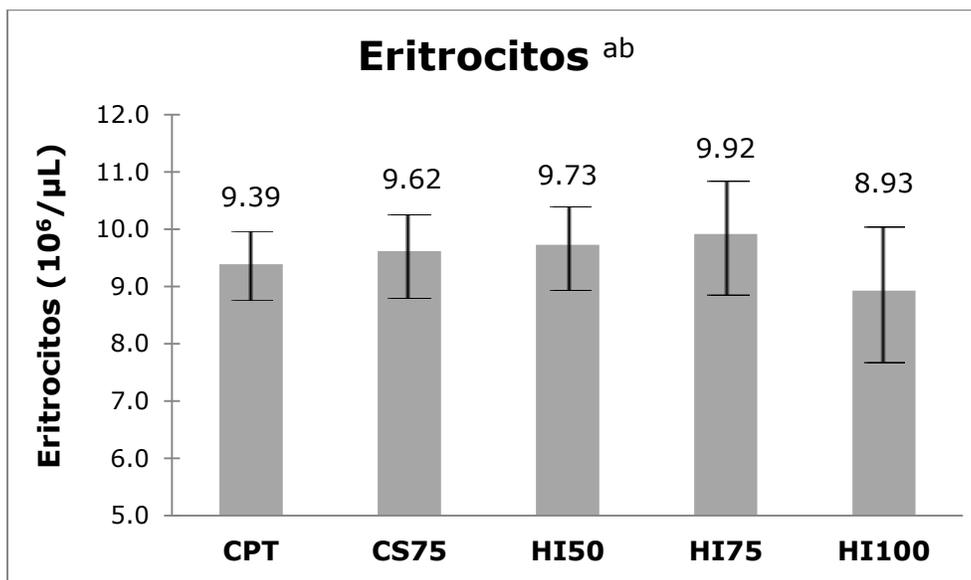


Gráfico 5.4 Resultados eritrocitos (ERI) en el estudio de la evaluación toxicológica del **CPAHD**^{*}.

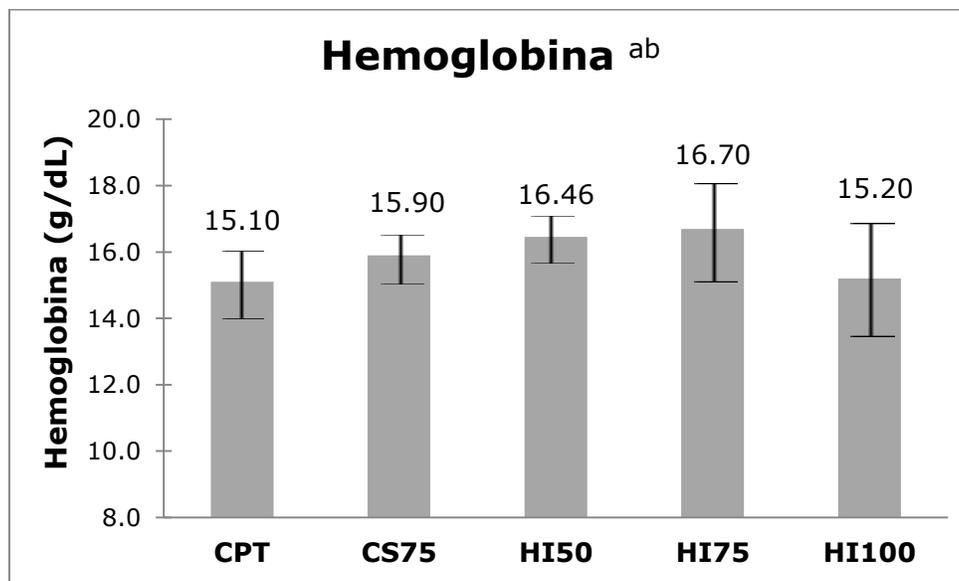


Gráfico 5.5 Resultados hemoglobina (Hb) en el estudio de la evaluación toxicológica del **CPAHD**^{*}.

^aSe reporta el valor promedio con barras de desviación estándar.

^b**CPT**: control pellets 18% proteína. **CS75**: Pellets 7.5% concentrado proteínico de soya. **HI50**: pellets 5% del CPAHD. **HI75**: pellets 7.5% del CPAHD. **HI100**: pellets 10% del CPAHD.

^{*}**CPAHD**: Concentrado proteínico de almendra de higuera destoxicada.

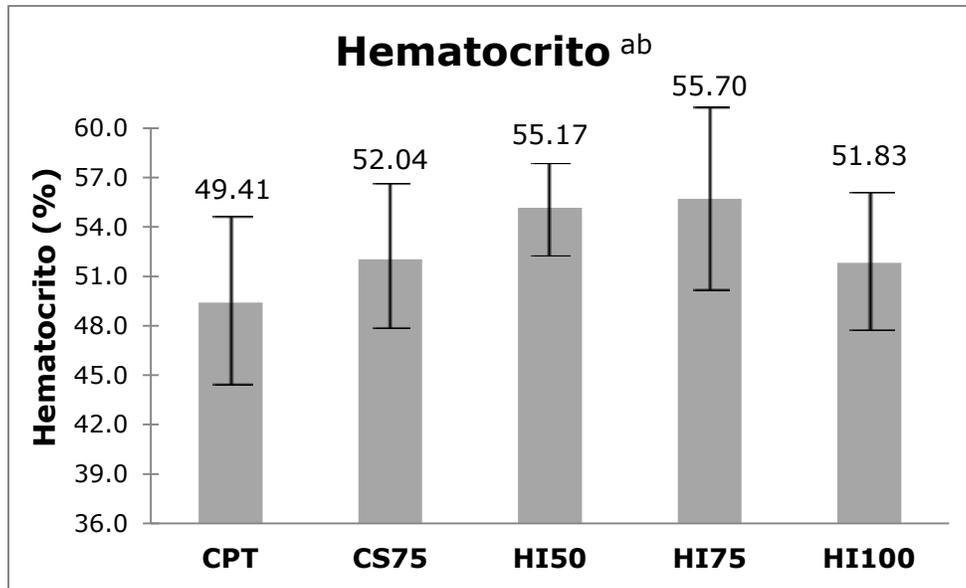


Gráfico 5.6 Resultados hematocrito (Hct) en el estudio de la evaluación toxicológica del **CPAHD***.

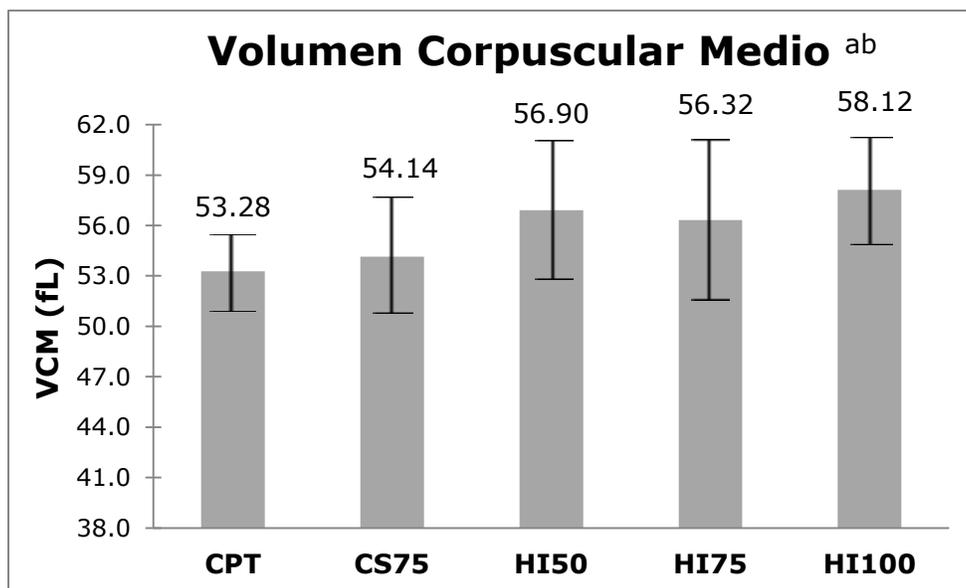


Gráfico 5.7 Resultados volumen corpuscular medio (VCM) en el estudio de la evaluación toxicológica del **CPAHD***.

^aSe reporta el valor promedio con barras de desviación estándar

^b**CPT**: control pellets 18% proteína. **CS75**: Pellets 7.5% concentrado proteínico de soya. **HI50**: pellets 5% del CPAHD. **HI75**: pellets 7.5% del CPAHD. **HI100** pellets 10% del CPAHD.

***CPAHD**: Concentrado proteínico de almendra de higuera destoxificada.

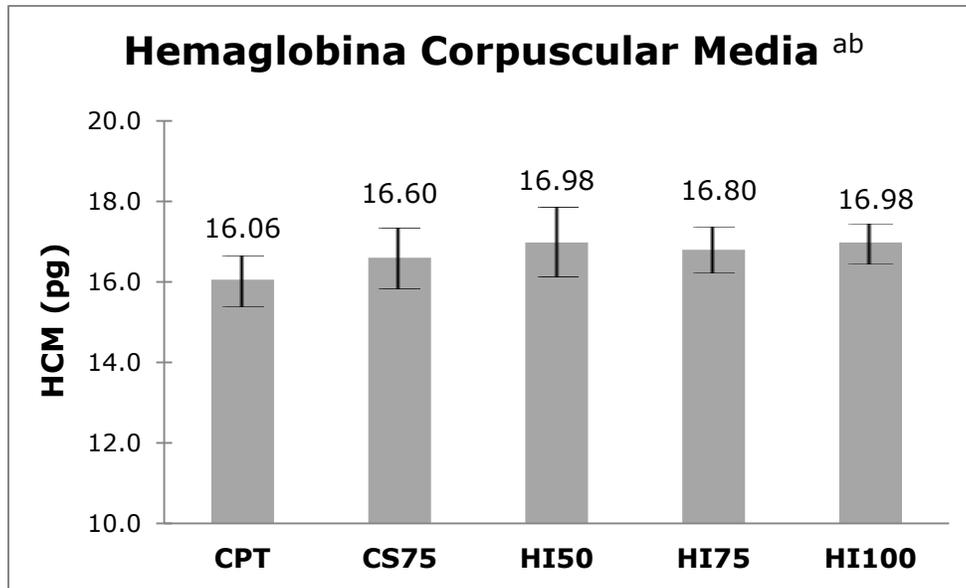


Gráfico 5.8 Resultados hemoglobina corpuscular media (HCM) en el estudio de la evaluación toxicológica del **CPAHD***.

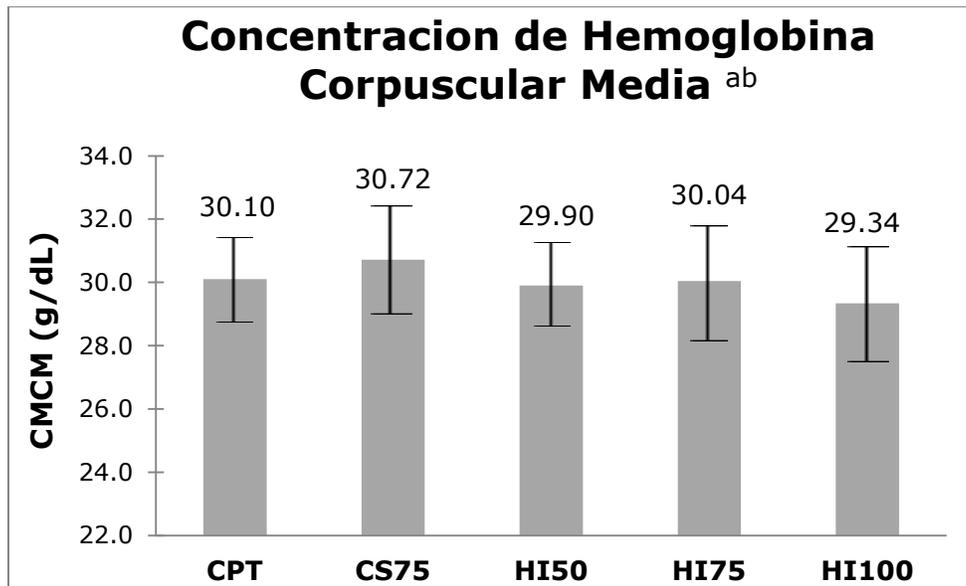


Gráfico 5.9 Resultados concentración de hemoglobina corpuscular media (CMCM) en la evaluación toxicológica del **CPAHD***.

^aSe reporta el valor promedio con barras de desviación estándar.

^b**CPT**: control pellets 18% proteína. **CS75**: Pellets 7.5% concentrado proteínico de soya. **HI50**: pellets 5% del CPAHD. **HI75**: pellets 7.5% del CPAHD. **HI100** pellets 10% del CPAHD.

***CPAHD**: Concentrado proteínico de almendra de higuera destoxicada.

Serie trombocítica

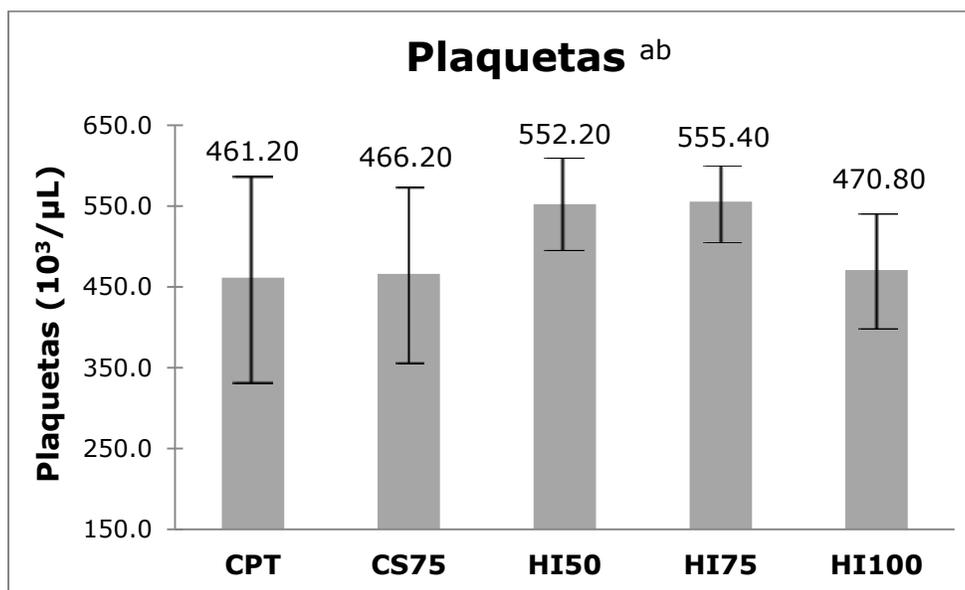


Gráfico 5.10 Resultados plaquetas (PQT) en el estudio de la evaluación toxicológica del **CPAHD***.

^aSe reporta el valor promedio con barras de desviación estándar.

^b**CPT**: control pellets 18% proteína. **CS75**: Pellets 7.5% concentrado proteínico de soya. **HI50**: pellets 5% del CPAHD. **HI75**: pellets 7.5% del CPAHD. **HI100** pellets 10% del CPAHD.

***CPAHD**: Concentrado proteínico de almendra de higuera destoxicada.

En la representación gráfica de los resultados obtenidos en la evaluación de citometría hemática, se presentan las barras correspondientes a \pm una desviación, lo que nos permite observar de una manera mas sencilla que los valores obtenidos en los diferentes parámetros evaluados son muy similares, entre los grupos de ensayo del CPAHD, con respecto a los controles CPT y CS75.

Se realizó un análisis de varianza de una vía (anexo) en cada uno de los parámetros obtenidos, para demostrar que no existe diferencia significativa entre los diferentes lotes, con un intervalo de confianza del 10%, debido a que es un estudio biológico, se debe considerar la variabilidad intrínseca que existe entre los individuos.

En dicho estudio estadístico, se corroboró que no hay diferencia significativa entre los lotes en ninguno de los parámetros evaluados en la citometría hemática. Lo que en cierta forma indica la posible inocuidad del concentrado proteínico evaluado.

5.6 Química sanguínea

Los parámetros de la química sanguínea hacen referencia al funcionamiento metabólico de un individuo, por lo que, en el estudio toxicológico del CPAHD, se realizó tal evaluación, para ello los animales se sometieron a 4 horas de ayuno, posteriormente, se obtuvieron las muestras sanguíneas y se procesaron con apoyo de el Centro Universitario de Diagnóstico, de la FES Cuautitlán, de la UNAM.

Se realizó una química sanguínea de seis elementos: glucosa, colesterol, triglicéridos, ácido úrico, urea y creatinina, los cuales se analizaron en una representación gráfica y posteriormente con un análisis estadístico.

A continuación, se presentan de manera gráfica los resultados correspondientes de la química sanguínea realizada al termino del experimento de la evaluación toxicológica en ratones alimentados con un concentrado proteínico de almendra de higuierilla destoxificada (CPAHD); en tales gráficos, se reporta la barra del valor promedio con su intervalo que corresponde a una desviación estándar; el porcentaje del coeficiente de variación de cada lote se muestran en el anexo.

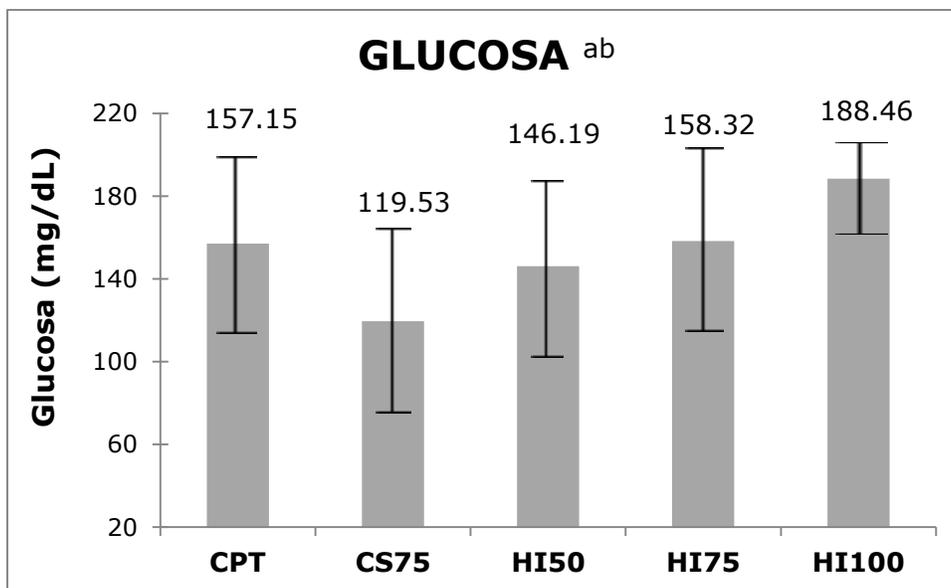


Gráfico 5.11 Resultados glucosa en el estudio de la evaluación toxicológica del **CPAHD***.

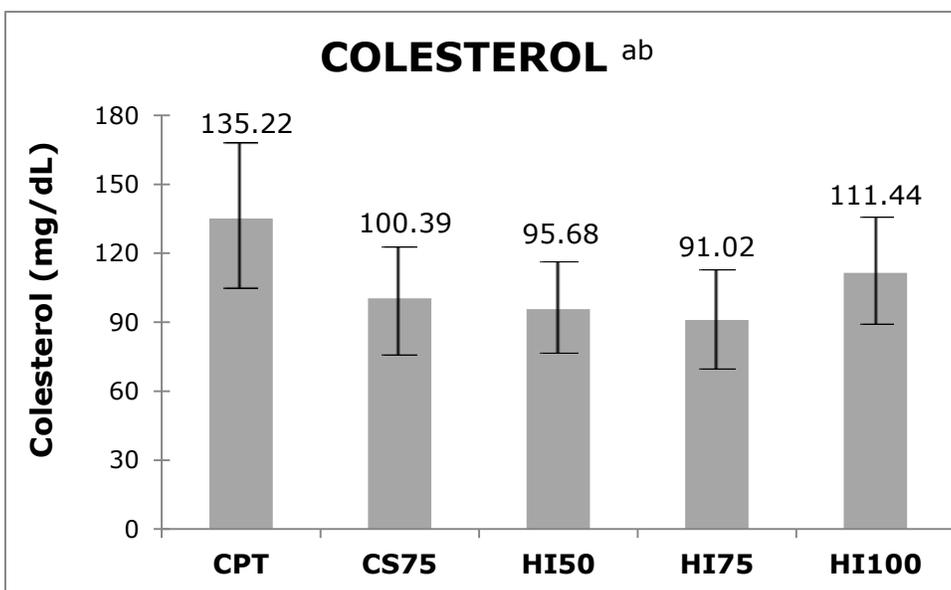


Gráfico 5.12 Resultados colesterol en el estudio de la evaluación toxicológica del **CPAHD***.

^aSe reporta el valor promedio con barras de desviación estándar.

^b**CPT**: control pellets 18% proteína. **CS75**: Pellets 7.5% concentrado proteínico de soya. **HI50**: pellets 5% del CPAHD. **HI75**: pellets 7.5% del CPAHD. **HI100** pellets 10% del CPAHD.

***CPAHD**: Concentrado proteínico de almendra de higuera destoxificada.

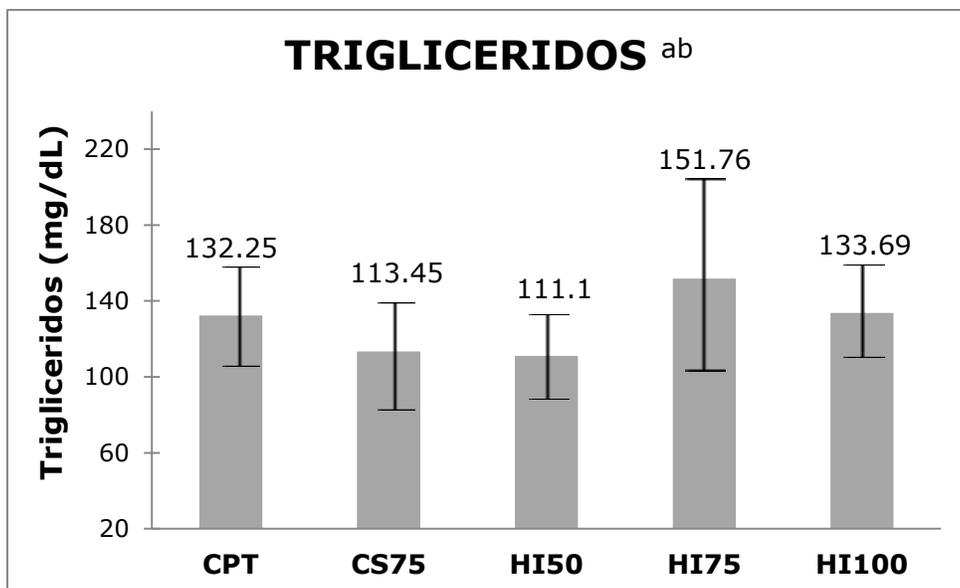


Gráfico 5.13 Resultados triglicéridos en el estudio de la evaluación toxicológica del **CPAHD***.

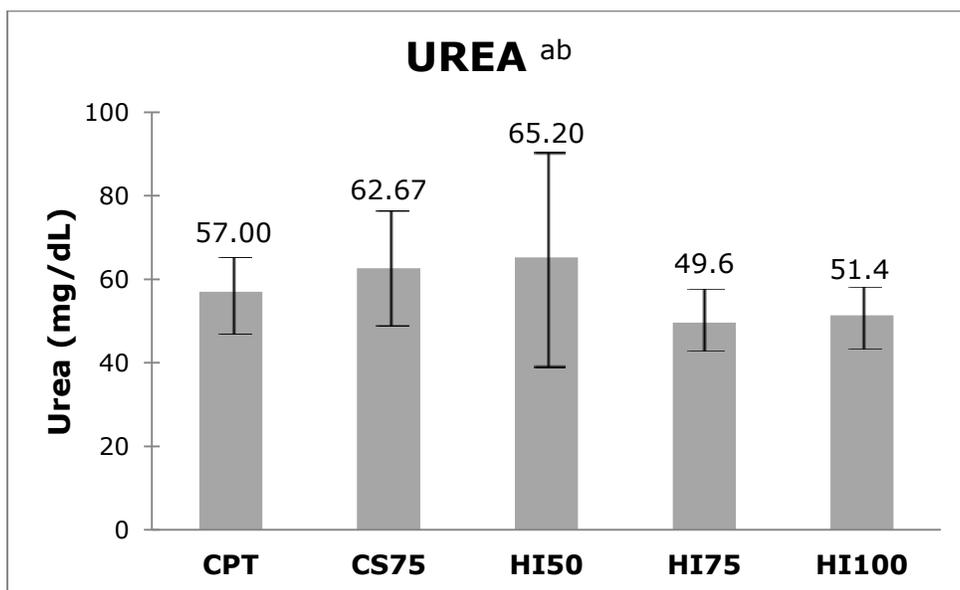


Gráfico 5.14 Resultados urea en el estudio de la evaluación toxicológica del **CPAHD***.

^aSe reporta el valor promedio con barras de desviación estándar.

^b**CPT**: control pellets 18% proteína. **CS75**: Pellets 7.5% concentrado proteínico de soya. **HI50**: pellets 5% del CPAHD. **HI75**: pellets 7.5% del CPAHD. **HI100** pellets 10% del CPAHD.

***CPAHD**: Concentrado proteínico de almendra de higuera destoxificada.

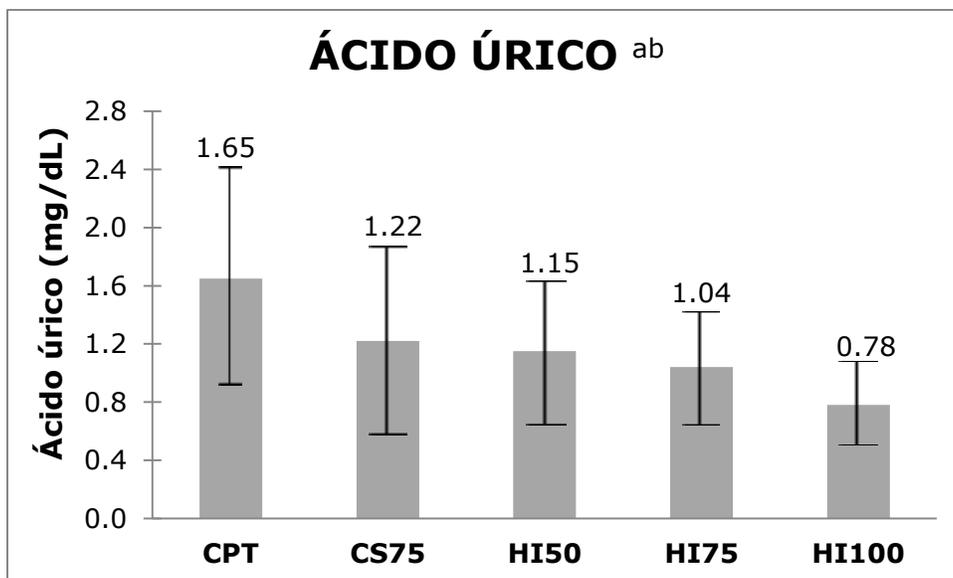


Gráfico 5.15 Resultados ácido úrico en el estudio de la evaluación toxicológica del **CPAHD***.

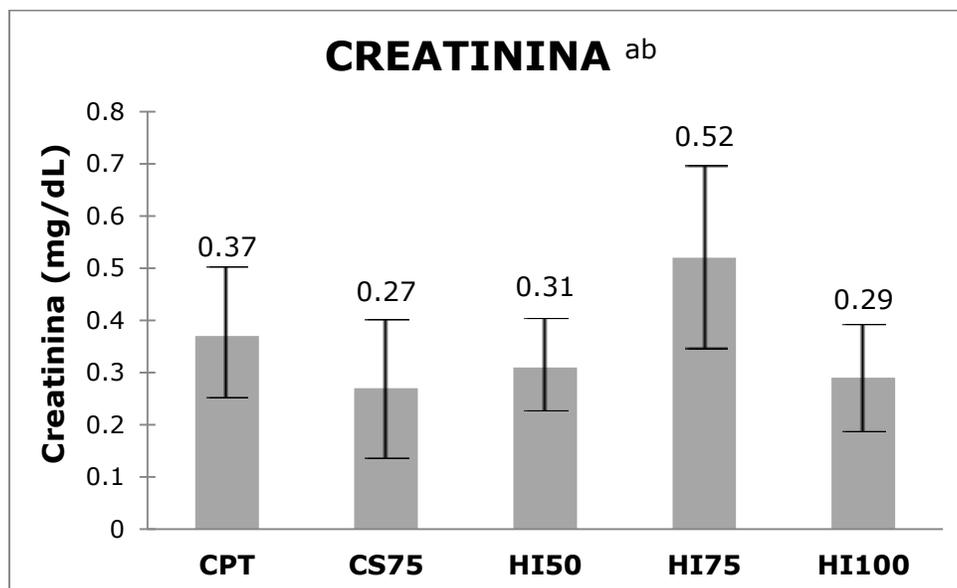


Gráfico 5.16 Resultados creatinina en el estudio de la evaluación toxicológica del **CPAHD***.

^aSe reporta el valor promedio con barras de desviación estándar.

^b**CPT**: control pellets 18% proteína. **CS75**: Pellets 7.5% concentrado proteínico de soya. **HI50**: pellets 5% del CPAHD. **HI75**: pellets 7.5% del CPAHD. **HI100** pellets 10% del CPAHD.

***CPAHD**: Concentrado proteínico de almendra de higuera destoxificada.

Los datos obtenidos, se analizaron estadísticamente, por medio de un análisis de varianza de una vía, con una α de 0.01 (anexo), debido a la variabilidad intraespecie. Al ser una investigación de tipo biológica, en dicho análisis estadístico, se encontró que los parámetros evaluados no presentan diferencia significativa entre los diferentes preparados de CPAHD y los controles CPT y CS75.

Lo anterior indica, de forma indirecta, que el funcionamiento del hígado y riñones es adecuado, por lo que se podría afirmar que el toxico presente en forma natural en la semilla de higuierilla se ha desactivado y/o eliminado, por lo que, aparentemente, no hay presencia de algún daño causado por la ingesta del CPAHD durante el periodo ensayado.

5.7 Relación porcentual de órganos

Al término del estudio, se realizaron necropsias a los animales empleados durante el ensayo biológico, con el objetivo de observar posibles alteraciones en los órganos, se extrajeron 5 órganos: bazo, corazón, hígado, pulmones y riñones.

Los órganos extraídos se pesaron inmediatamente después de realizar la necropsia, para hacer una relación entre el peso del órgano y el peso del animal, es decir, obtener la relación porcentual de cada uno de estos órganos.

Los resultados obtenidos se muestran en los siguientes gráficos de barras, en los que se presenta el valor promedio con su intervalo que corresponde a una desviación estándar, la tabla de resultados correspondientes se reporta en el anexo.

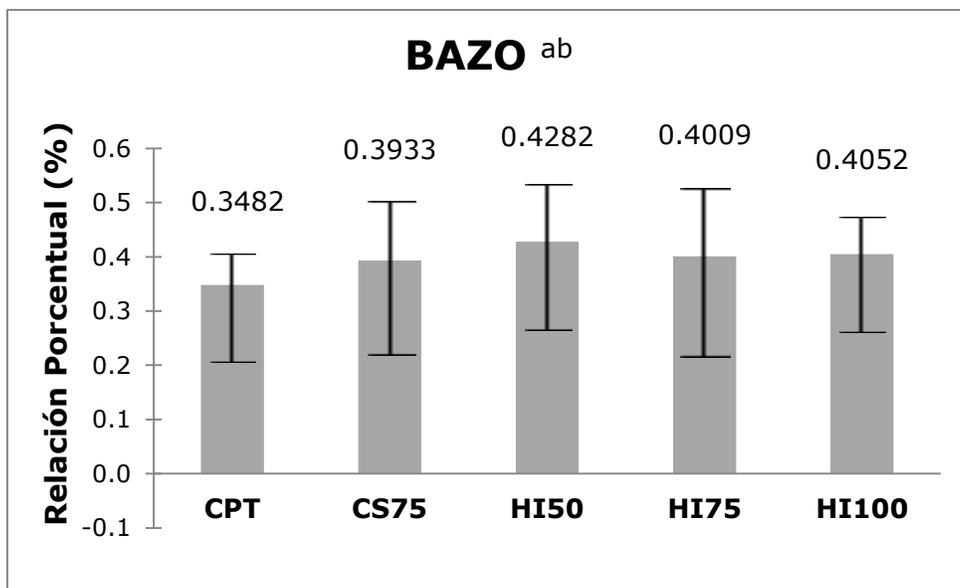


Gráfico 5.17 Resultados relación porcentual del bazo en el estudio de la evaluación toxicológica del **CPAHD***.

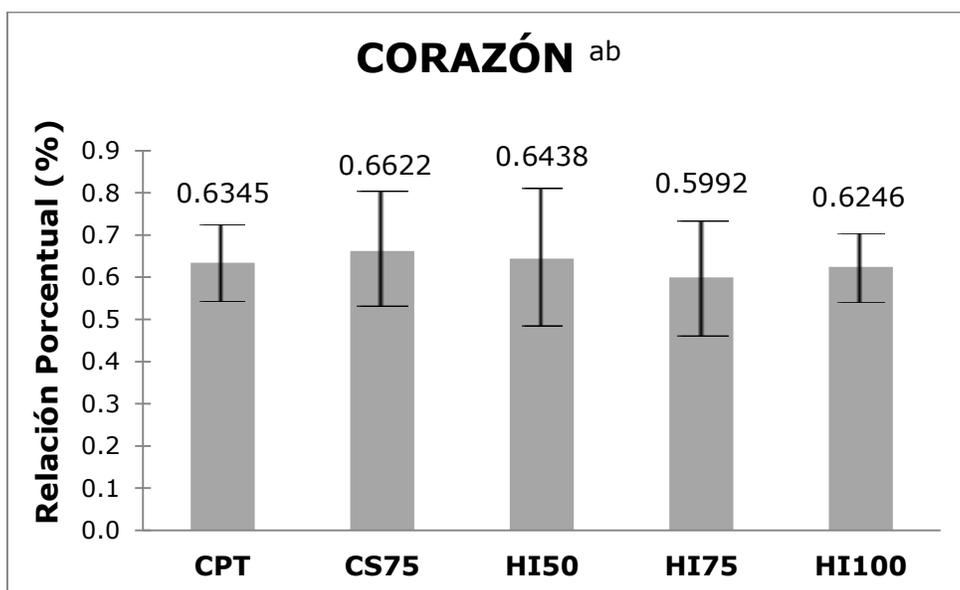


Gráfico 5.18 Resultados relación porcentual del corazón en el estudio de la evaluación toxicológica del **CPAHD***.

^aSe reporta el valor promedio con barras de desviación estándar.

^b**CPT**: control pellets 18% proteína. **CS75**: Pellets 7.5% concentrado proteínico de soya. **HI50**: pellets 5% del CPAHD. **HI75**: pellets 7.5% del CPAHD. **HI100** pellets 10% del CPAHD.

***CPAHD**: Concentrado proteínico de almendra de higuerrilla destoxificada.

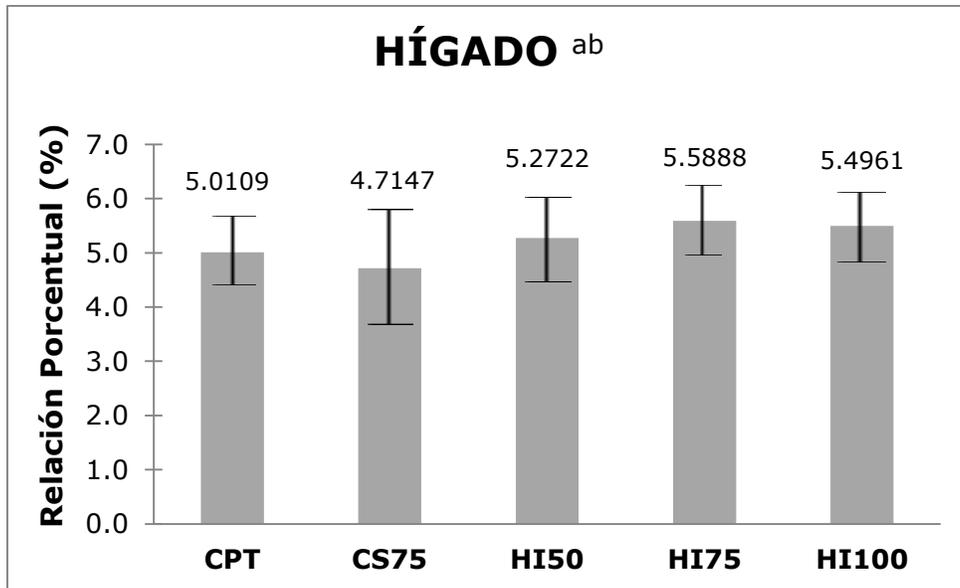


Gráfico 5.19 Resultados relación porcentual del hígado en el estudio de la evaluación toxicológica del **CPAHD***.

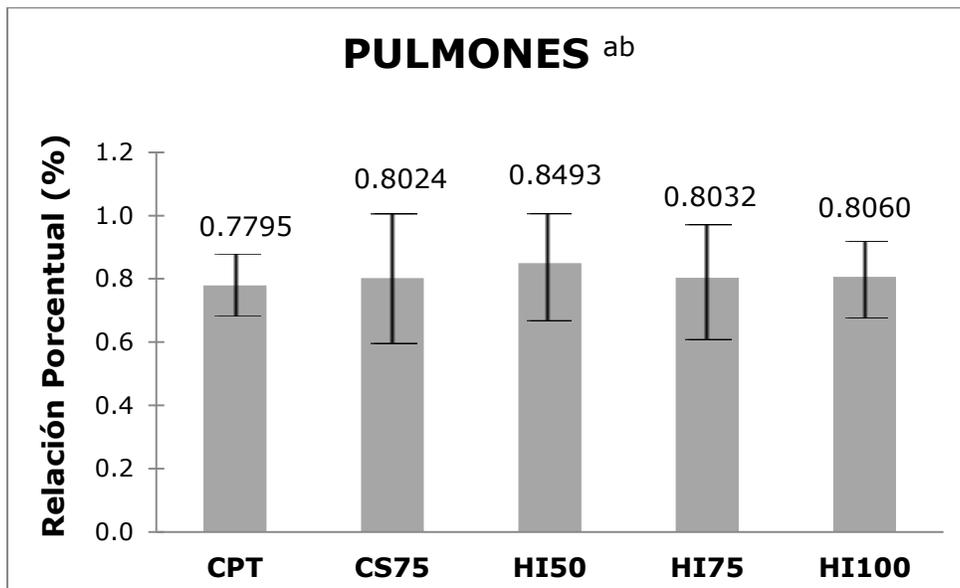


Gráfico 5.20 Resultados relación porcentual de los pulmones en el estudio de la evaluación toxicológica del **CPAHD***.

^aSe reporta el valor promedio con barras de desviación estándar.

^b**CPT**: control pellets 18% proteína. **CS75**: Pellets 7.5% concentrado proteínico de soya. **HI50**: pellets 5% del CPAHD. **HI75**: pellets 7.5% del CPAHD. **HI100** pellets 10% del CPAHD.

***CPAHD**: Concentrado proteínico de almendra de higuerrilla destoxificada.

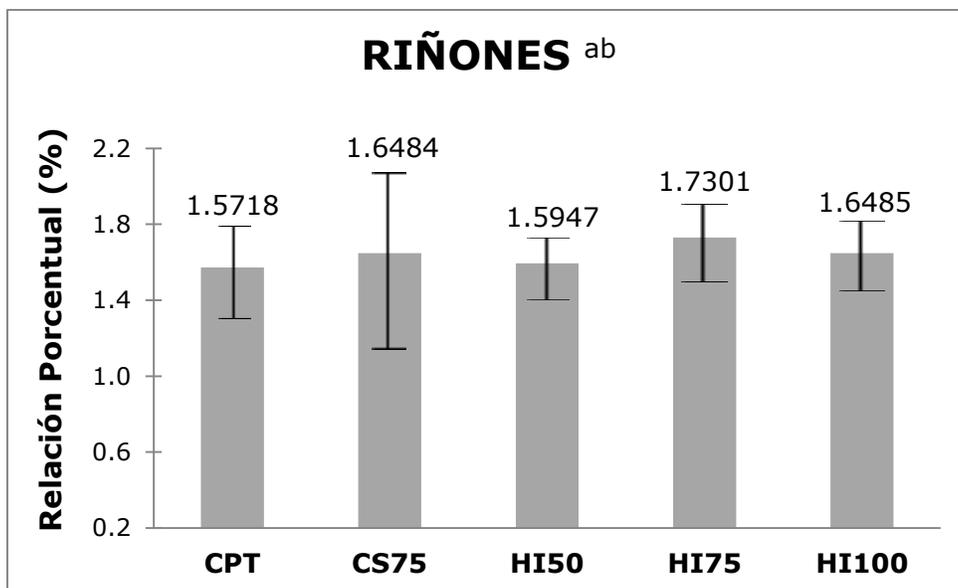


Gráfico 5.21 Resultados relación porcentual de los riñones en el estudio de la evaluación toxicológica del **CPAHD***.

^aSe reporta el valor promedio con barras de desviación estándar.

^b**CPT**: control pellets 18% proteína. **CS75**: Pellets 7.5% concentrado proteínico de soya. **HI50**: pellets 5% del CPAHD. **HI75**: pellets 7.5% del CPAHD. **HI100** pellets 10% del CPAHD.

***CPAHD**: Concentrado proteínico de almendra de higuera destoxificada.

De los datos obtenidos en la relación porcentual de los órganos extraídos, se les realizó un análisis de varianza de una vía (anexo), con un nivel de significancia de $\alpha=0.01$, debido a la variabilidad intraespecie, al ser un estudio biológico.

El análisis estadístico muestra que no existe diferencia significativa en la relación porcentual obtenida entre los datos de los órganos correspondientes a los animales que fueron alimentados con las diferentes dosis del concentrado proteínico de la almendra de higuera destoxificada (CPAHD) y de los animales que fueron alimentados con pellets para roedores de la marca HARLAN 18% proteína.

Los resultados obtenidos señalan que los órganos de los ratones en experimentación no sufrieron alguna alteración causada por el consumo habitual del CPAHD, lo cual puede ser indicio de su relativa inocuidad.

5.8 Evaluación histopatológica de órganos

Se realizó la evaluación histológica de los siguientes órganos: bazo, corazón, hígado, pulmones y riñones; por medio la observación microscópica de los tejidos, incluidos en parafina y teñidos con hematoxilina-eosina (HE).

El procedimiento histopatológico se realizó en la Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, en el Departamento de Patología, con base en el Manual de métodos histotecnológicos, del Instituto de Patología, de las fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP).²⁸

Para el estudio, se eligieron de forma aleatoria 5 ratones de cada lote, a los cuales, al finalizar el experimento, se les extrajeron los cinco órganos antes mencionados, teniendo un total de 25 muestras por cada lote.

A continuación, se muestran las fotomicrografías de los tejidos de los órganos analizados histológicamente, en donde los resultados que se obtuvieron se agruparon de acuerdo al órgano analizado, para facilitar la comparación del tejido con respecto al grupo control y los diferentes lotes que se manejaron en el estudio toxicológico de la almendra de higuera destoxificada.

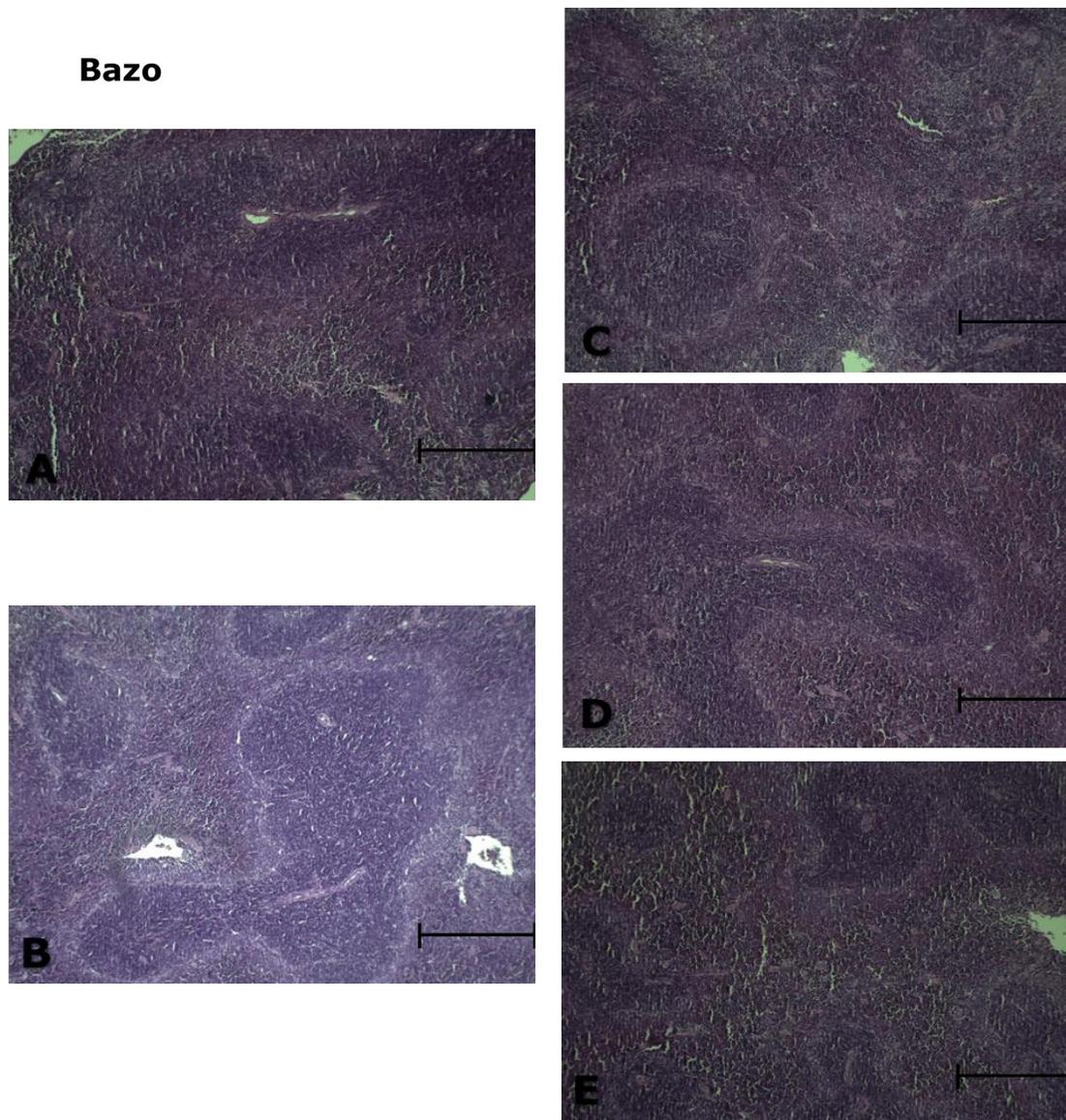


Figura 5.1 Resultados tinción HE de las células del bazo, evaluación histopatológica del CPAHD*.

A. Fotomicrografía del bazo lote CPT (control pellets 18% proteína) sin cambios histopatológicos aparentes (40x); **B.** Fotomicrografía del bazo lote CS75 (pellets 7.5% del CPAHD) sin cambios histopatológicos aparentes (40x); **C.** Fotomicrografía del bazo lote HI50 (pellets 5% del CPAHD) sin cambios histopatológicos aparentes (40x); **D.** Fotomicrografía del bazo lote HI75 (pellets 7.5% del CPAHD) sin cambios histopatológicos aparentes (40x); **E.** Fotomicrografía del bazo lote HI100 (pellets 10 % del CPAHD) sin cambios histopatológicos aparentes (40x).

* **CPAHD**: Concentrado proteínico de almendra de Higuera destoxificada.

Corazón

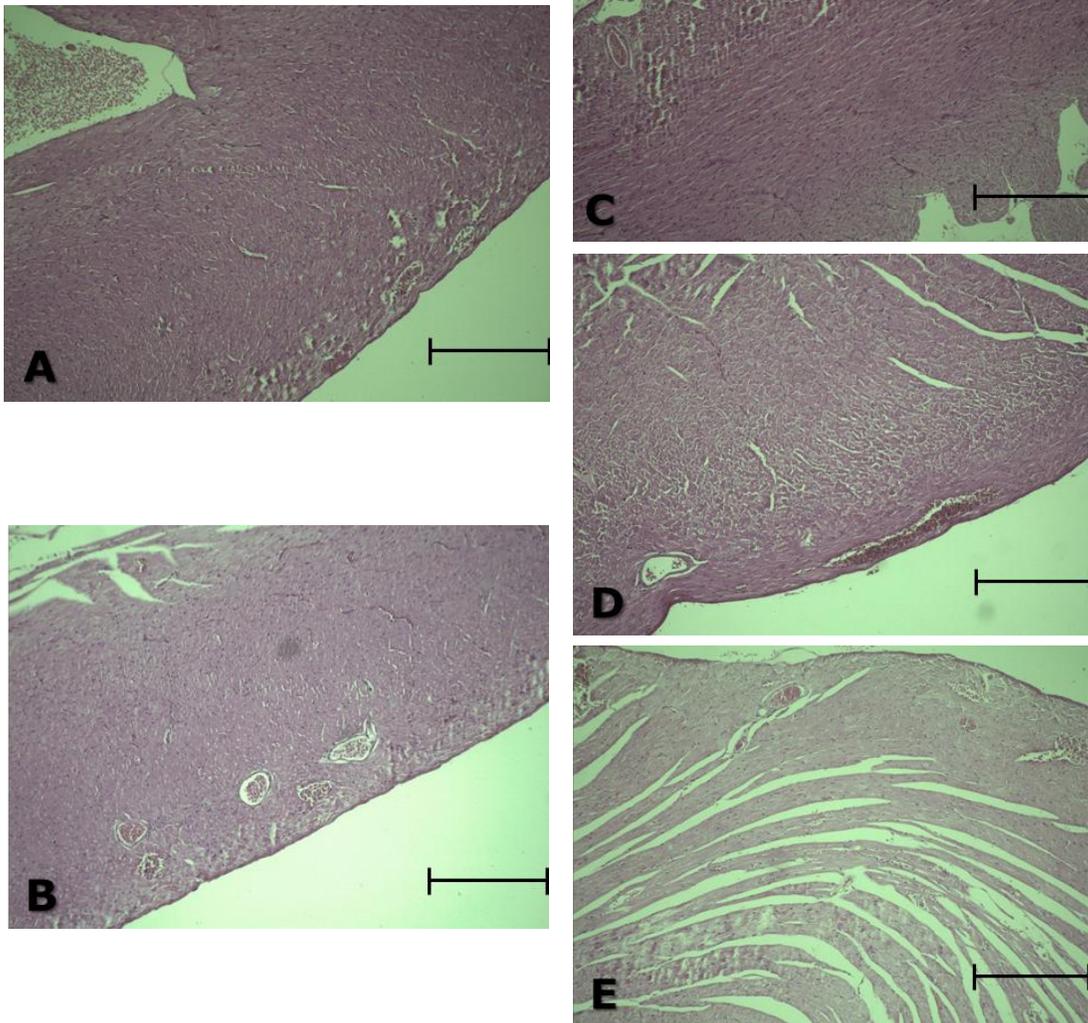


Figura 5.2 Resultados tinción HE de las células del corazón, evaluación histopatológica del CPAHD*.

- A.** Fotomicrografía del corazón lote CPT (control pellets 18% proteína) sin cambios histopatológicos aparentes (10x); **B.** Fotomicrografía del corazón lote CS75 (pellets 7.5% del CPAHD) sin cambios histopatológicos aparentes (10x); **C.** Fotomicrografía del corazón lote HI50 (pellets 5% del CPAHD) sin cambios histopatológicos aparentes (10x); **D.** Fotomicrografía del corazón lote HI75 (pellets 7.5% del CPAHD) sin cambios histopatológicos aparentes (10x); **E.** Fotomicrografía del corazón lote HI100 (pellets 10 % del CPAHD) sin cambios histopatológicos aparentes (40x).

* **CPAHD**: Concentrado proteínico de almendra de Higuera destoxificada.

Hígado

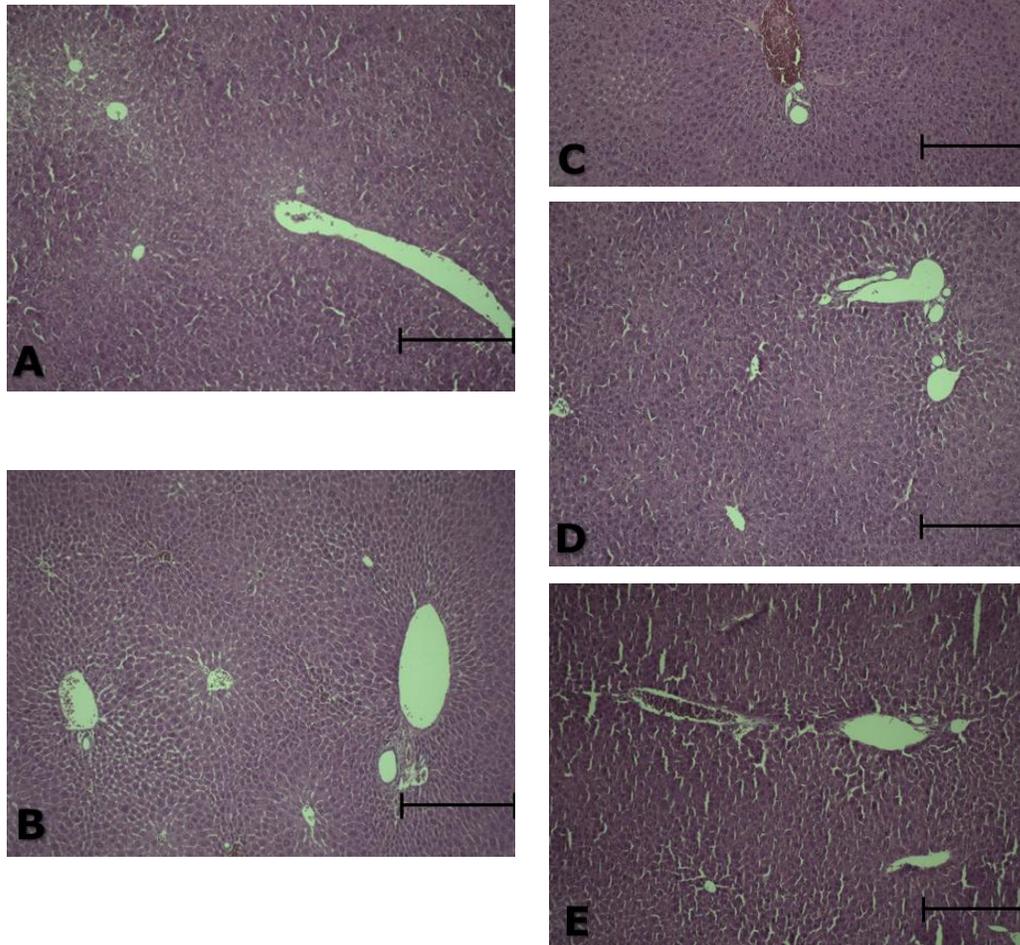


Figura 5.3 Resultados tinción HE de las células del hígado, evaluación histopatológica del CPAHD*.

A. Fotomicrografía del hígado lote CPT (control pellets 18% proteína) sin cambios histopatológicos aparentes (10x); **B.** Fotomicrografía del hígado lote CS75 (pellets 7.5% del CPAHD) sin cambios histopatológicos aparentes (10x); **C.** Fotomicrografía del hígado lote HI50 (pellets 5% del CPAHD) sin cambios histopatológicos aparentes (10x); **D.** Fotomicrografía del hígado lote HI75 (pellets 7.5% del CPAHD) sin cambios histopatológicos aparentes (10x); **E.** Fotomicrografía del hígado lote HI100 (pellets 10 % del CPAHD) sin cambios histopatológicos aparentes (40x).

* **CPAHD:** Concentrado proteínico de almendra de Higuera destoxificada.

Pulmón

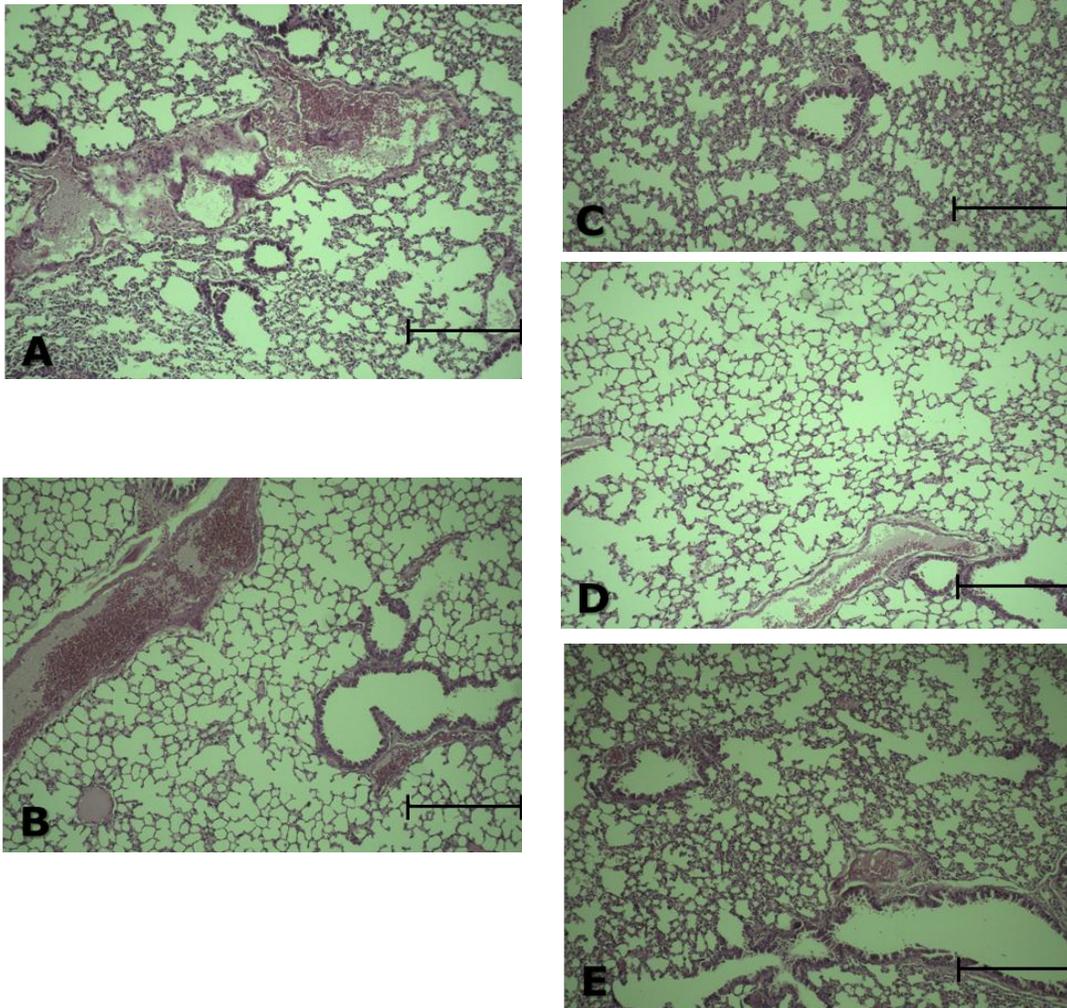


Figura 5.4 Resultados tinción HE de las células de pulmón, evaluación histopatológica del CPAHD*.

A. Fotomicrografía de pulmón lote CPT (control pellets 18% proteína) sin cambios histopatológicos aparentes (40x); **B.** Fotomicrografía de pulmón lote CS75 (pellets 7.5% del CPAHD) sin cambios histopatológicos aparentes (40x); **C.** Fotomicrografía de pulmón lote HI50 (pellets 5% del CPAHD) sin cambios histopatológicos aparentes (40x); **D.** Fotomicrografía de pulmón lote HI75 (pellets 7.5% del CPAHD) sin cambios histopatológicos aparentes (40x); **E.** Fotomicrografía de pulmón lote HI100 (pellets 10 % del CPAHD) sin cambios histopatológicos aparentes (40x).

* **CPAHD:** Concentrado proteínico de almendra de Higuera destoxificada.

Riñón

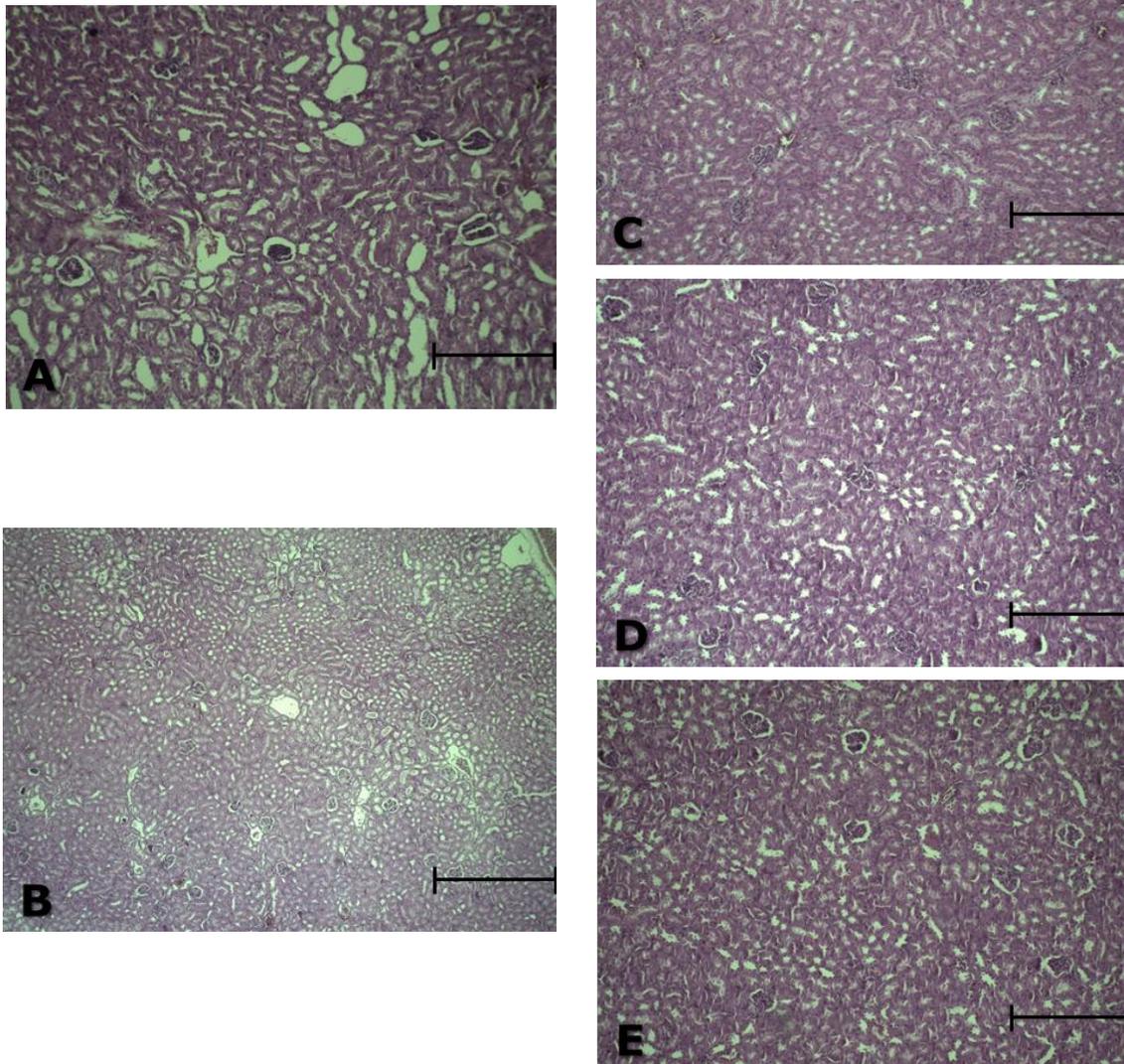


Figura 5.5 Resultados tinción HE de las células de riñón, evaluación histopatológica del CPAHD*.

A. Fotomicrografía de riñón lote CPT (control pellets 18% proteína) sin cambios histopatológicos aparentes (40x), **B.** Fotomicrografía de riñón lote CS75 (pellets 7.5% del CPAHD) sin cambios histopatológicos aparentes (40x), **C.** Fotomicrografía de riñón lote HI50 (pellets 5% del CPAHD) sin cambios histopatológicos aparentes (40x), **D.** Fotomicrografía de riñón lote HI75 (pellets 7.5% del CPAHD) sin cambios histopatológicos aparentes (40x), **E.** Fotomicrografía de riñón lote HI100 (pellets 10 % del CPAHD) sin cambios histopatológicos aparentes (40x).

* **CPAHD:** Concentrado proteínico de almendra de Higuera destoxificada.

En las observaciones microscópicas de los tejidos del bazo, corazón, hígado, riñón y pulmón de los animales evaluados, se presentó un patrón histológico en los ratones alimentados con el CPAHD, lo que se confirma al comparar éstas preparaciones histológicas contra las preparaciones de los animales utilizados como control (CPT y CS75).

Con base en los resultados obtenidos en este último estudio y las anteriores pruebas realizadas en la evaluación toxicológica del concentrado proteínico de la almendra de higuera, se puede establecer que este concentrado proteínico es relativamente inocuo, pues no se presentaron alteraciones de ningún tipo sobre los ratones en estudio.

5.9 Estimación de parámetros de seguridad

Las pruebas de laboratorio y observaciones que se realizaron a lo largo del estudio señalan que, aparentemente el CPAHD, no produce daño alguno en el organismo de estudio a las dosis empleadas.

Contando con los resultados anteriores, se decidió realizar el cálculo del parámetro toxicológico de la dosis mas alta de un xenobiótico que no manifiesta efectos tóxicos, denominado como NOEL y de esta forma proponer este valor como índice toxicológico regulatorio de suma importancia y así poder a su vez hacer una propuesta de la Ingesta Diaria Admisible (IDA) del CPAHD.

A continuación se presentan los cálculos realizados para obtener en primera instancia el NOEL y posteriormente la IDA del CPAHD.

Capítulo VI

Conclusiones

El estudio toxicológico, hematológico e histopatológico, tuvo una duración de 14 semanas, en ratones macho de la cepa ICR, alimentados con un concentrado proteínico de la almendra de Higuierilla (***Ricinus communis***) destoxificada (**CPAHD**) a concentraciones de 5%, 7.5% y 10%, utilizando como vehículo el alimento TEKLAD global para roedores 18% Proteína, permite concluir que dicho material evaluado es prácticamente no tóxico debido a que:

- ✓ No influye en el crecimiento de los animales, al no observarse diferencia significativa en el incremento en peso con respecto al control, así como en el consumo de alimento.
- ✓ En los análisis sanguíneos realizados: citometría hemática y química sanguínea no se muestra la presencia de algún daño o anomalía debida al consumo del **CPAHD**, al no encontrarse diferencia significativa en el análisis estadístico realizado.
- ✓ En la evaluación estadística de la relación porcentual de los órganos extraídos al final del experimento, no se encontró diferencia significativa entre el control de soya y al control de pellets comerciales y los diferentes preparados de **CPAHD**.
- ✓ La evaluación histopatológica de los órganos bazo, corazón, hígado, riñón y pulmón teñidos con hematoxilina-eosina, se observan dichos tejidos normales, sin cambios aparentes.

Por lo que se propone como NOEL un valor de 11446 mg/Kg_{p.c} día, y como IDA 114.46 mg/Kg_{p.c} día.

6.1 Perspectivas

- Realizar el ensayo toxicológico en otra especie más sensible, de preferencia en toda la vida del organismo, evaluar a lo largo del estudio: los signos clínicos, el incremento en peso corporal, el alimento consumido, parámetros hematológicos.
- Al final del experimento, evaluar posibles daños morfológicos de órganos por medio de necropsias, así como su estudio histopatológico de los principales órganos.
- Establecer la calidad proteínica del concentrado proteínico de almendra de higuera destoxificada, por medio de métodos químicos, biológicos e inclusive microbiológicos.
- Realizar el perfil de aminoácidos de importancia en el área de nutrición.
- Realizar estudios nutricionales en animales de laboratorio, para determinar la disponibilidad y aprovechamiento de la proteína, por medio de experimentación basada en la ganancia en peso o balance de nitrógeno.

Capítulo VII

Bibliografía

1. Alvarado, E. Evaluación toxicológica de la fracción proteínica de la almendra de capulín (*Prunus serotina*). México D.F.: Facultad de Química de la UNAM. 1999.
2. Anandan, S., Anil Kumar, G., Ramachandra, K. Effect of different physical and chemical treatments on detoxification of ricin in castor cake. Anim. Feed Sci. and Technol. 2005; 120: 159–168.
3. *Atlas de las plantas Alóctonas Invasoras en España. Euphorbiaceae. Ricinus communis L.* [en línea][ultimo acceso 15 de enero del 2012] disponible en:
http://www.marm.es/es/biodiversidad/temas/inventarios-nacionales/ricinus_communis_tcm7-21598.pdf.
4. Bradberry, S. Ricin and abrin. Chem. terrorism. 2007; 35: 576-577.
5. Bruneton, J. Plantas tóxicas, vegetales peligrosos para el hombre y los animales. Zaragoza: Acribia. 2001. Pág 263-264.
6. Castillo, M. Análisis proximal y determinación de factores tóxicos naturales en las semillas de Higuierilla (*Ricinus communis*). México D.F.: Facultad de Química de la UNAM. 2011.
7. Church, D.C., Pond, W.G., Pond, K.R. Fundamentos de nutrición y alimentación en animales. 2ª ed. México D.F.: Limusa Wiley. 2007. Pág. 289-305, 318-321.

8. Coleman, J., Berry, D., Pierce, K., Brennan, A., Horan, B. Dry matter intake and feed efficiency profiles of 3 genotypes of Holstein-Friesian within pasture-based systems of milk production. J. of Dairy Sci. 2010; 93: 4318–4331.
9. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), Vibrans, H. Ficha técnica de Higuierilla (***Ricinus communis***) [en línea] actualizada al julio 2009 [ultimo acceso 8 de mayo del 2011] disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/euphorbiaceae/ricinuscommunis/fichas/ficha5>.
10. Crowley, J., Evans, R.D., Mc Hugh, N., Pabiou, T., Kenny, D., Mc Gee, M., Crews, D. Genetic associations between feed efficiency measured in a performance test station and performance of growing cattle in commercial beef herds. J. Anim. Sci. 2011; 89: 3382–3393.
11. Derache, R. Toxicología y Seguridad de los Alimentos. Barcelona: Omega. 1990. Pág. 57-65, 69-72, 123-124. 130.
12. Dove Biotech LTD. Castor Bean ***Ricinus Communis*** an international botanical answer to biodiesel production & renewable energy. [paper Online] [Cited 2011, Dec. 22nd] available from: [http://www.dovebiotech.com/pdf/CASTOR%20BEAN%20\(RICINUS%20COMMUNIS\)%20-%20BIODIESEL.pdf](http://www.dovebiotech.com/pdf/CASTOR%20BEAN%20(RICINUS%20COMMUNIS)%20-%20BIODIESEL.pdf).
13. Doull, J., Klaassen, C., Amur, M. Toxicology the science of poisons, 2nd ed. New York: Macmillan Publishing, 1980. Pp.17-26, 70-82.

14. Esquivel, J., Determinación de toxicidad subcrónica de los diferentes preparados del aceite de almendra de Capulín (*Prunus serótina*). México D.F.: Facultad de Química de la UNAM. 2010.
15. Estrada, E., Peralta, L., Rivas, P. Manual de técnicas histológicas. México D.F.: AGT editor. 1982. pág. 31-32, 38-56, 63.
16. Fennema, O. Química de alimentos. 2ª edición. Zaragoza: Acribia. 2000. Pág. 270-271, 471-477, 480-481, 975-981.
17. Fernández, S., Viguri, R. La Mortalidad por desnutrición en México en menores de cinco años, 1990-2009. Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 2010; 67: 471-473.
18. Food and Agriculture Organization of the United States. Economic and social Department The Statistics Division [online] [actualized 2005] [cited 2012, Jan 14th] available from: <http://www.fao.org/es/ess/top/commodity.html?lang=en&item=265&year=2005>.
19. Food and Agriculture Organization of the United States. FAOSTAT. [online] [actualized 2010 [cited 2012, Jan 14th] available from: <http://faostat.fao.org/site/613/default.aspx#ancor>.
20. Front, P. Plantas medicinales. El Dioscórides renovado. 9ª edición. Barcelona: ed. Labor. 1985. Pág. 187-188.
21. Geneser, F. Histología: Sobre bases moleculares. 3ª edición. Madrid: ed. Medica Panamericana. 2003. Pág. 1, 19-21, 32-35, 242-243, 321-326, 434-438, 518-529, 542-552, 555-575.

22. Giral, F., Sotelo, A., Lucas, B., De la Vega, A. Chemical composition and toxic factors content in fifteen leguminous seeds. *Quart. J. Crude Drug Res.* 1978; 16:3 143-149.
23. Gonzales, J. M., Arrilla, E., Rodríguez, S., Sánchez, A. *Bioquímica Clínica*. 1ª reimpresión, Madrid: Interamericana de España, S.A. 1999. Pág. 161-179, 493-495.
24. Ham, A., Cormarck, D. *Histología*. 9ª edición. México DF: ed. Oxford University. 2003. Pág 4-7, 9-23, 521-556, 641-659, 665-669, 699-718.
25. Harborne, J., Herber, B., Moss, G. *Dictionary of plant toxins*. Canada: John Wiley and Sons. 1998. Pp. 321
26. Hurtado R., Meyado, Y., Flores G., Vargas, P. *Semiología de la Citometría Hemática*. *Rev. Fac. de Medicina de la UNAM*. 2010; 53:4 36-43.
27. Instituto Químico Biológico. *Mediclopedia: Monografía Ricina*[online] [actualizado 3-May 2011 [citado 16-enero-2012] disponible en: <http://www.iqb.es/monografia/toxinas/ricina.htm>.
28. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América. *Métodos Histotecnológicos*. Editado por Prophet, E., Mills, B., Arrington, J., Sobin, L., 1995 Washington DC: Registro de Patología de los Estados Unidos de América (ARP) 1995. Pág. 55-56, 58-59.

29. Junqueira, L., Carneiro, J. Histología Básica Texto y Atlas. 6ª ed. Barcelona: Masson. 2006. Pág 1-4, 324-330, 371-385.
30. Kirk, S., Sawyre R. Composición y Análisis de los alimentos. 2ª edición. Barcelona: Pearson. 1996. Pág. 25-26.
31. Klaassen, D., Watkins, J.B. Manual de Toxicología. La Ciencia básica de los tóxicos. 5ª edición. México D.F.: McGraw-Hill Interamericana. 1999. Pág 28, 30-33, 280-285, 305-318, 352-356, 369-372, 394-400, 452-455.
32. Kotsonis, F., Mackey, M. Nutritional Toxicology. 2nd ed. Florida: CRC Press. 2002. Pp. 243-253, 260-261, 263-283.
33. Lee, H.J., Waller, G.R. Ricinine metabolism and translocation in ***Ricinus communis***. Phytochem. 1972; 11: 965 - 973.
34. Leeson, T., Leeson, R., Paparo, A. Texto y atlas de histología. México D.F.: McGraw-Hill Interamericana. 1990. Pág. 1-8, 14-15, 347-358, 476-496, 513-520, 536-560.
35. Loomis, T. Fundamentos de Toxicología. 3ª ed. Zaragoza: Acribia. 1997. Pág. 88, 181-218, 229-236.
36. Marshall, W., Bangert, S. Clinical Chemistry. 5th edition. China: ELSEVIER. 2004. Pp.1-9, 263, 191-193.
37. McDonal, P., Edwards, R., Greenhalgh, J. Nutrición Animal. 4ª ed. Zaragoza: Acribia. 1993. Pág. 284, 324-328, 483-487.

38. Mc. Guire, E., Difonzo, C., Martin, R., De la Iglesia, F. Evaluation of chronic toxicity and carcinogenesis in rodents with the synthetic analgesic, Tilidine Fumarate. *Toxicol.* 1986; 39: 149-163.
39. Melo, C., Baltalhao, J., Cassia, V., Correa, O., Rodrigues, E., Forim, M., Fernandes, M., Cezar, P., Batista, J. High-speed counter-current chromatography isolation of ricinine an insecticide from *Ricinus Communis*. *J. Chromatogr. A.* 2009; 1216: 4290-4294.
40. NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Publicada en el Diario Oficial de la Federación. 2001.
41. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Test Guideline 452: Chronic Toxicity Studies. Vol. VIII. November 2008.
42. Olfert, E., Cross, B., Mc William, A. Manual sobre el cuidado y uso de los animales de experimentación. Editores *Ottawa: Consejo Canadiense de Protección de los Animales. 1998. Pág. 42-57, 79- 85, 117-120.*
43. Olses, S., Kozlov, J. Ricin. *Toxicon* 2011; 39: 1723-1728.
44. Olses, S. The history of ricin, abrin, and related toxins. *Toxicon* 2004; 44: 361-370.
45. Oplinger, E.S., Oelke, E.A., Kaminski, A.R., Combs, S.M., Doll, J.D., Schuler, R.T. Castor beans. [Online] *Alternative Field Crops Manual*, University of Wisconsin Cooperative Extension Service, University of Minnesota Extension Service, Center for Alternative Plant & Animal

Products [Cited 2012, Jan. 14th] available
<http://www.hort.purdue.edu/newcrop/afcm/castor.html>.

46. Ortiz, V. Evaluación Toxicológica y Bioensayo Nutritivo Preliminar de la almendra de calabaza (***Cucurbita argyrosperma***) consumida en Cuetzalan Puebla. México D.F.: Facultad de Química de la UNAM. 2005.
47. Preciado, A. Monografía La higuera o ricino. México D.F.: Secretaria de Agricultura y Ganadería, Dirección General de Economía Agrícola. 1959.
48. Quattrocchi, U. CRC World Dictionary of Plant Names, Common Names, Scientific Names, Eponyms, Synonyms and Etymology. Vol IV. R-Z. Florida: CRC Press. 2000. Pp. 2317-2318.
49. Rapaport, S. Introducción a la hematología, 2^a ed. México D.F.: Masson Doyma. 2002. Pág. 52-54.
50. Repetto, M., Camerán, A. Toxicología de Alimentos. Madrid: ed. Díaz de Santos. 2006. Pág. 77-93.
51. Repetto, M., Reppeto, G. Toxicología Fundamental. 4^a ed. Madrid: Díaz Santos Ediciones. 2009. Pág. 23-35, 403-464, 482-483.
52. Rivera, J. Improving Nutrition in Mexico: the use of research for decision making. Nutrition Rev. 2009; 67: 62-65.
53. Robinson, T. Precursors of Ricinine in the Castor Bean Plant. Phytochem. 1978; 17: 1903-2905.

54. Ross, M., Kaye, G., Pawlina, W. Histología: texto y atlas a color con Biología Molecular. 4ª edición Buenos Aires: ed. Medica Panamericana. 2004 Pág. 17-21, 31-55, 224-227, 314-316, 347-354, 391-394, 434-440, 464-493, 518-526, 542-552, 555-575.
55. Ruíz, G. Fundamentos de Hematología. 3ª edición. México D.F.: ed. Medica Panamericana. 2003. Pág. 45-60.
56. Swanson-Biearman, B. Castor Bean. Chem. Abstracts Elsevier Inc. 2005. Pp. 486.
57. Tuetz, N. Fundamentals of chemistry. Philadelphia: W.B. Daundes Company. 1970. Pp. 146-165, 177-185, 194-199, 302-305, 352-360.
58. Universidad Nacional de Catamarca. Ed. Científica Universitaria. Introducción a la Ecología de Poblaciones. [online] actualizado 2004 [citado 21-enero-2012] disponible en: <http://www.editorial.unca.edu.ar/Publicacione%20on%20line/Ecologia/imagenes/pdf/012-poblacion.pdf>.
59. Valdo, J., Alves, J., Alves, G. Detoxification of castor bean residues and the simultaneous production of tannase and phytase by solid-state fermentation using *Paecilomyces variotii*. Biores. Technol. 2011; 102: 7343 - 7348.
60. Valle, P., Lucas, B. Toxicología de Alimentos. México, D.F.: Instituto Nacional de Salud Publica Centro Nacional de Salud Ambiental. 2000. Pág. 1, 6-31.

61. Velázquez, R. Manual de bioquímica clínica. México D.F.: Facultad de Química de la UNAM. 2009. Pág. 40-49, 73-95.
62. Waller, G., Tang, M., Scott, M., Goldbert, F., Mayes, J., Auda, H. Metabolism of Ricinine in the Castor Plant. [on line] [Cited 2012, Jan. 15th] available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC550384/pdf/plntphys00407-0025.pdf>.
63. Woodliff, H., Herrman, R. Hematología Clínica. 7^a reimpresión. México D.F.: ed. El Manual Moderno. 1993. Pág. 1-11, 16, 34-35, 125, 184-187.
64. Worbs, S., Köhler, K., Pauly, D., Avondet, M., Schaer, M., Dorner, M., Dorner, B. ***Ricinus communis*** Intoxications in Human and Veterinary Medicine. A summary of Real Cases. Toxins. 2011; 3: 1332-1372.
65. Zhen-Yu, D., Liu, Y., Tian, L., He, J., Cao, J., Liang, G. The influence of feeding rate on growth, feed efficiency and body composition of juvenile grass carp (***Ctenopharyngodon idella***). Aquaculture Intern. 2006; 14: 247-257.

Capítulo VIII

Anexos

8.1 Análisis proximal de alimento TEKLAD global para roedores 18% proteína HARLAN®

Tabla 8.1 Análisis proximal alimento comercial TEKLAD

Determinación	Base seca (%)
Proteína cruda (mínima)	18.0
Grasa cruda (mínima)	5.0
Fibra cruda (máxima)	5.0

Ingredientes: Trigo molido, maíz molido, aceite de trigo, harina de soya descascarillada, harina de gluten de maíz, aceite de soya, carbonato de calcio, levadura de cerveza deshidratada, fosfato dicálcico, sal yodada, L-lisina, DL-metionina, cloruro de colina, mononitrato de tiamina, biotina, niacina, acetato de vitamina A, clorhidrato de piridoxina, suplemento de vitamina D3, ácido fólico, complejo de bisulfito sódico de metionina, suplemento de vitamina E, suplemento de vitamina B12, pantotenato de calcio, sulfato ferroso, óxido de magnesio, óxido de manganeso, óxido de zinc, sulfato de cobre, yodato de calcio, carbonato de cobalto, sulfato crómico de potasio y coalin.

8.2 Hoja de registro de datos para la prueba de toxicidad

Ratón: _____ Sexo: _____ Peso inicial (Pi): _____ lote: _____ Fecha: _____													
Tiempo (días)													
Peso animal ($P_{\text{día}}$)													
Incremento acumulado ($P_{\text{día}} - P_i$)													
Alimento inicial (I)													
Alimento final (F)													
Alimento ingerido ($AI = I - F$)													
Alimento acumulado (ΣAI)													
Observaciones: _____													

8.3 Distribución de culebra japonesa

- Los ratones se pesan y se marcan de manera individual, lo que corresponde a su peso inicial (P_i)
- Los animales se distribuyen de manera ascendente siguiendo la distribución de culebra japonesa, de tal forma que entre los lotes, el peso de los ratones sea lo más uniforme posible. Colocando 10 ratones por lote en su respectiva jaula.

Tabla 8.2 Distribución de culebra japonesa

Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Lote 5
15.70 →	15.70 →	15.70 →	15.80 →	15.80
15.90 ←	15.90 ←	15.90 ←	15.90 ←	15.80 ←
16.00 →	16.10 →	16.10 →	16.20 →	16.20
16.30 ←	16.20 ←	16.20 ←	16.20 ←	16.20 ←
16.30 →	16.30 →	16.30 →	16.30 →	16.40
16.50 ←	6.40 ←	16.40 ←	16.40 ←	16.40 ←
16.50 →	16.50 →	16.50 →	16.70 →	16.70
16.80 ←	16.80 ←	16.80 ←	16.70 ←	16.70 ←
16.90 →	16.90 →	17.00 →	17.00 →	17.20
17.9 ←	17.50 ←	17.30 ←	17.20 ←	17.20 ←
Promedio 16.48	Promedio 16.43	Promedio 16.42	Promedio 16.44	Promedio 16.46

8.4 Tablas de resultados

8.4.1 Incremento en peso corporal y consumo de alimento

Tabla 8.3 Incremento en peso acumulativo promedio por semana de los diferentes lotes de animales alimentados con preparados de pellets.

Semana	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Lote CPT Pellet TEKLAD Global														
Promedio (g)	9.7	13.3	15.9	18.1	19.8	21.1	22.1	22.3	23.0	24.1	23.9	23.4	23.2	22.4
DS	3.0	4.1	4.9	5.5	5.9	6.3	6.8	7.0	7.2	7.5	7.4	7.4	7.2	7.5
CV (%)	30.8	31.2	30.9	30.4	30.0	29.8	30.6	31.4	31.1	31.0	31.2	31.8	31.2	33.3
Lote CS75 Pellet 7.5 % de Harina de SOYA desengrasada														
Promedio (g)	9.6	13.4	15.5	17.6	19.3	20.7	22.2	21.8	23.5	25.1	24.6	24.9	25.0	24.8
DS	3.1	4.2	4.9	5.4	5.8	6.3	6.8	6.6	7.1	7.7	7.6	7.7	7.6	7.4
CV (%)	32.3	31.4	31.6	30.8	30.1	30.3	30.5	30.2	30.3	30.7	30.7	30.9	30.4	29.7
Lote HI50 Pellet 5.0 % de CPAHD														
Promedio (g)	8.4	11.3	13.7	16.0	17.9	19.2	20.7	20.3	20.4	22.1	22.4	22.0	23.1	23.6
DS	3.1	4.2	4.7	5.4	6.0	6.3	6.7	6.7	6.7	7.1	7.4	7.2	7.6	8.0
CV (%)	36.6	36.7	34.4	33.7	33.8	32.7	32.2	33.2	32.7	32.2	33.1	32.8	32.9	33.9
Lote HI75 Pellet 7.5 % de CPAHD														
Promedio (g)	10.3	14.1	16.9	19.7	22.3	23.5	24.6	24.8	24.6	26.6	25.7	25.7	26.4	26.5
DS	3.1	4.2	5.1	5.9	6.7	7.0	7.3	7.5	7.4	8.0	7.6	7.8	8.0	7.9
CV (%)	30.0	30.1	30.3	30.1	30.3	29.9	29.8	30.1	29.9	30.1	29.8	30.2	30.2	29.9
Lote HI100 Pellet 10.0 % de CPAHD														
Promedio (g)	9.6	13.2	15.7	17.4	19.2	20.3	21.7	21.6	23.0	24.5	24.1	23.7	24.4	24.4
DS	3.0	4.2	4.9	5.4	5.8	6.2	6.7	6.7	7.1	7.5	7.3	7.2	7.4	7.5
CV (%)	31.8	31.8	31.4	30.8	30.2	30.6	30.9	31.0	30.9	30.7	30.3	30.3	30.5	30.6

CPT: control pellets 18% proteína. **CS75:** Pellets 7.5% concentrado proteínico de soya. **HI50:** pellets 5% del CPAHD. **HI75:** pellets 7.5% del CPAHD. **HI100** pellets 10% del CPAHD.

***CPAHD:** Concentrado proteínico de almendra de higuera destoxificada.

Tabla 8.4 Análisis de varianza del peso promedio por lote de una vía para la semana 14.

	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Media de cuadrados	F_{exp}	F_{crítica}	Decisión
Entre Grupos	91,82	4	22,96	2.03	3.78	No hay diferencia
Dentro de grupos	509,45	45	11,32			
Total	601,27	49				

Tabla 8.5 Alimento acumulativo por semana de los diferentes preparados de pellets durante el estudio de toxicidad crónica.

Semana	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Lote CPT	Pellet TEKLAD Global													
Alimento acumulativo (Kg)	0.30	0.57	0.95	1.28	1.61	1.95	2.28	2.60	3.02	3.38	3.75	4.14	4.52	4.92
Lote CS75	Pellet 7.5 % de SOYA													
Alimento acumulativo (Kg)	0.28	0.54	0.88	1.18	1.47	1.79	2.14	2.46	2.90	3.28	3.64	4.02	4.39	4.75
Lote HI50	Pellet 5.0 % de HIGUERILLA													
Alimento acumulativo (Kg)	0.28	0.51	0.82	1.11	1.41	1.72	2.06	2.35	2.72	3.05	3.36	3.71	4.07	4.42
Lote HI75	Pellet 7.5 % de HIGUERILLA													
Alimento acumulativo (Kg)	0.31	0.57	0.94	1.25	1.59	1.90	2.26	2.57	2.98	3.35	3.69	4.06	4.43	4.80
Lote HI100	Pellet 10.0 % de HIGUERILLA													
Alimento acumulativo (Kg)	0.27	0.53	0.89	1.19	1.50	1.82	2.17	2.48	2.90	3.23	3.56	3.90	4.23	4.58

CPT: control pellets 18% proteína. **CS75:** Pellets 7.5% concentrado proteínico de soya. **HI50:** pellets 5% del CPAHD. **HI75:** pellets 7.5% del CPAHD. **HI100** pellets 10% del CPAHD.

***CPAHD:** Concentrado proteínico de almendra de higuera destoxificada.

8.4.2 Citometría hemática

8.4.2.1 Resultados

Tabla 8.6 Resultados citometría hemática.

SERIE BLANCA						
Parámetro		CPT	CS75	HI50	HI75	HI100
LEU ^a (10 ³ / μL)	Promedio	8.04	7.08	9.72	10.10	9.30
	DS	3.46	2.58	1.72	2.05	1.81
	CV (%)	43.07	36.44	17.72	20.28	19.41
SERIE ROJA						
Parámetro		CPT	CS75	HI50	HI75	HI100
ERI ^b (10 ⁶ /μL)	Promedio	9.39	9.62	9.73	9.92	8.93
	DS	0.58	0.76	0.69	0.92	1.01
	CV (%)	6.19	7.90	7.09	9.24	11.35
Hb ^c (g/dL)	Promedio	15.10	15.90	16.46	16.70	15.20
	DS	0.86	0.48	0.54	1.41	1.55
	CV (%)	5.70	3.05	3.29	8.44	10.20
Hct ^d (%)	Promedio	49.41	52.04	55.17	55.70	51.83
	DS	4.88	4.54	2.57	5.89	5.46
	CV (%)	9.87	8.72	4.67	10.57	10.54
VCM ^e (fL)	Promedio	53.28	54.14	56.90	56.32	58.12
	DS	2.21	3.48	4.30	5.06	3.76
	CV (%)	4.14	6.43	7.56	8.99	6.47
HCM ^f (pg)	Promedio	16.06	16.60	16.98	16.80	16.98
	DS	0.48	0.86	0.73	0.46	0.31
	CV (%)	3.01	5.16	4.30	2.73	1.83
CHCM ^g (g/dL)	Promedio	30.10	30.72	29.90	30.04	29.34
	DS	2.12	2.24	1.48	2.25	1.81
	CV (%)	7.04	7.31	4.95	7.48	6.18
SERIE TROMBOCITICA						
Parámetro		CPT	CS75	HI50	HI75	HI100
PLQ ^h (10 ³ /μL)	Promedio	461.20	466.20	552.20	555.40	470.80
	DS	132.42	113.09	57.10	47.37	54.35
	CV (%)	28.71	24.26	10.34	8.53	11.54

^aLeucocitos^bEritrocitos^cHemoglobina^dHematocrito

^eVolumen corpuscular medio^fHemaglobinacorpuescular media

^gConcentración de hemoglobina corpuscular medio ^hPlaquetas

CPT: control pellets 18% proteína. **CS75:** Pellets 7.5% concentrado proteínico de soya. **HI50:** pellets 5% del CPAHD. **HI75:** pellets 7.5% del CPAHD. **HI100** pellets 10% del CPAHD.

***CPAHD:** Concentrado proteínico de almendra de higuera destoxificada.

8.4.2.2 Análisis estadístico

Tabla 8.7 Análisis de varianza de una vía resultados **leucocitos (LEU)**.

	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Media de cuadrados	F_{exp}	F_{crítica}	Decisión
Entre Grupos	31.55	4	7.88	1.36	4.43	No hay diferencia
Dentro de grupos	116.28	20	5.81			
Total	147.84	24				

Tabla 8.8 Análisis de varianza de una vía resultados **eritrocitos (ERI)**.

	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Media de cuadrados	F_{exp}	F_{crítica}	Decisión
Entre Grupos	2.88	4	0.72	1.11	4.43	No hay diferencia
Dentro de grupos	13.02	20	0.65			
Total	15.90	24				

Tabla 8.9 Análisis de varianza de una vía resultados **hemoglobina (Hb)**.

	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Media de cuadrados	F_{exp}	F_{crítica}	Decisión
Entre Grupos	10.40	4	2.60	2.30	4.43	No hay diferencia
Dentro de grupos	22.63	20	1.13			
Total	33.03	24				

Tabla 8.10 Análisis de varianza de una vía resultados **volumen corpuscular medio (VCM)**.

	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Media de cuadrados	F_{exp}	F_{crítica}	Decisión
Entre Grupos	73.52	4	18.38	1.18	4.43	No hay diferencia
Dentro de grupos	296.30	19	15.59			
Total	369.82	23				

Tabla 8.11 Análisis de varianza de una vía **hemoglobina corpuscular media (HCM)**.

	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Media de cuadrados	F_{exp}	F_{crítica}	Decisión
Entre Grupos	2.93	4	0.73	2.02	4.43	No hay diferencia
Dentro de grupos	7.23	20	0.36			
Total	10.15	24				

Tabla 8.12 Análisis de varianza de una vía **concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM)**.

	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Media de cuadrados	F_{exp}	F_{crítica}	Decisión
Entre Grupos	4.86	4	1.22	0.31	4.43	No hay diferencia
Dentro de grupos	75.75	19	3.99			
Total	80.61	23				

Tabla 8.13 Análisis de varianza de una vía **plaquetas (PLQ)**.

	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Media de cuadrados	F_{exp}	F_{crítica}	Decisión
Entre Grupos	46,438.9	4	11,609.7	1.50	4.43	No hay diferencia
Dentro de grupos	155,132.4	20	7,756.6			
Total	201,571.3	24				

8.4.3 Química sanguínea

8.4.3.1 Resultados

Tabla 8.14 Resultados química sanguínea.

Parámetro		CS75	CPT	HI50	HI75	HI100
Glucosa (mg/dL)	Promedio	119.53	157.15	146.19	158.32	188.46
	DS	44.19	44.51	39.27	44.66	16.84
	CV (%)	36.97	28.33	26.86	28.21	8.94
Colesterol (mg/dL)	Promedio	100.39	135.22	95.68	91.02	111.44
	DS	21.20	30.15	21.15	12.68	26.31
	CV (%)	21.11	22.29	22.11	13.93	23.61
Trigliceridos (mg/dL)	Promedio	113.45	132.25	111.10	151.76	133.69
	DS	29.67	24.30	21.22	86.19	22.45
	CV (%)	26.15	18.38	19.10	56.79	16.79
Urea (mg/dL)	Promedio	62.67	57.00	65.20	49.60	51.40
	DS	13.52	7.84	25.92	4.62	5.94
	CV (%)	21.57	13.76	39.75	9.30	11.56
Ácido Úrico (mg/dL)	Promedio	1.22	1.65	1.15	1.04	0.78
	DS	0.78	1.10	0.43	0.34	0.26
	CV (%)	63.72	66.26	37.84	32.52	33.51
Creatinina (mg/dL)	Promedio	0.27	0.37	0.31	0.52	0.29
	DS	0.11	0.10	0.10	0.31	0.09
	CV (%)	39.38	27.08	34.10	59.67	30.46

CPT: control pellets 18% proteína. **CS75:** Pellets 7.5% concentrado proteínico de soya. **HI50:** pellets 5% del CPAHD. **HI75:** pellets 7.5% del CPAHD. **HI100:** pellets 10% del CPAHD.

***CPAHD:** Concentrado proteínico de almendra de higuera destoxificada.

8.4.3.2 Análisis estadístico

Tabla 8.15 Análisis de varianza de una vía **glucosa**.

	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Media de cuadrados	F _{exp}	F _{crítica}	Decisión
Entre Grupos	12,326	4	3,081	1.99	4.43	No hay diferencia
Dentro de grupos	31,018	20	1,550			
Total	43,344	24				

Tabla 8.16 Análisis de varianza de una vía **colesterol**.

	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Media de cuadrados	F_{exp}	F_{crítica}	Decisión
Entre Grupos	6,215.5	4	1,553.9	2.92	4.43	No hay diferencia
Dentro de grupos	10,634.5	20	531.7			
Total	16,850.0	24				

Tabla 8.17 Análisis de varianza de una vía **triglicéridos**.

	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Media de cuadrados	F_{exp}	F_{crítica}	Decisión
Entre Grupos	7,364.6	4	1,841.2	0.98	4.43	No hay diferencia
Dentro de grupos	37,530.6	20	1,876.5			
Total	44,895.3	24				

Tabla 8.18 Análisis de varianza de una vía **urea**.

	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Media de cuadrados	F_{exp}	F_{crítica}	Decisión
Entre Grupos	922.96	4	230.74	1.13	4.43	No hay diferencia
Dentro de grupos	4,072.40	20	203.62			
Total	4,995.36	24				

Tabla 8.19 Análisis de varianza de una vía **ácido úrico**.

	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Media de cuadrados	F_{exp}	F_{crítica}	Decisión
Entre Grupos	2.04	4	0.51	1.17	4.43	No hay diferencia
Dentro de grupos	8.70	20	0.43			
Total	10.74	24				

Tabla 8.20 Análisis de varianza de una vía **creatinina**.

	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Media de cuadrados	F_{exp}	F_{crítica}	Decisión
Entre Grupos	0.21	4	0.05	1.88	4.43	No hay diferencia
Dentro de grupos	0.55	20	0.03			
Total	0.76	24				

8.4.4 Relación porcentual de órganos

8.4.4.1 Resultados

Tabla 8.21 Resultados relación porcentual.

Parámetro	CPT	CS75	HI50	HI75	HI100	
Bazo	Promedio	0.3482	0.3933	0.4282	0.4009	0.4052
	DS	0.0890	0.1274	0.1021	0.1302	0.0960
	CV (%)	25.5	32.4	23.8	32.5	23.7
Corazón	Promedio	0.6345	0.6622	0.6438	0.5992	0.6246
	DS	0.0783	0.1453	0.1652	0.1209	0.0667
	CV (%)	12.3	21.9	25.7	20.2	10.7
Hígado	Promedio	5.0109	4.7147	5.2722	5.5888	5.4961
	DS	0.5526	0.8662	0.8087	0.4195	0.4469
	CV (%)	11.0	18.4	15.3	7.5	8.1
Pulmones	Promedio	0.7795	0.8024	0.8493	0.8032	0.8060
	DS	0.0629	0.2083	0.1614	0.1474	0.0877
	CV (%)	8.1	26.0	19.0	18.4	10.9
Riñones	Promedio	1.5718	1.6484	1.5947	1.7301	1.6485
	DS	0.2129	0.5059	0.0920	0.1658	0.1536
	CV (%)	13.5	30.7	5.8	9.6	9.3

CPT: control pellets 18% proteína. **CS75:** Pellets 7.5% concentrado proteínico de soya. **HI50:** pellets 5% del CPAHD. **HI75:** pellets 7.5% del CPAHD. **HI100:** pellets 10% del CPAHD.

***CPAHD:** Concentrado proteínico de almendra de higuera destoxificada.

8.4.4.2 Análisis estadístico

Tabla 8.22 Análisis de varianza de una vía **bazo**.

	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Media de cuadrados	F_{exp}	F_{crítica}	Decisión
Entre Grupos	0.034	4	0.009	0.71	3.78	No hay diferencia
Dentro de grupos	0.547	45	0.012			
Total	0.581	49				

Tabla 8.23 Análisis de varianza de una vía **corazón**.

	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Media de cuadrados	F_{exp}	F_{crítica}	Decisión
Entre Grupos	0.022	4	0.009	0.37	3.78	No hay diferencia
Dentro de grupos	0.662	45	0.012			
Total	0.684	49				

Tabla 8.24 Análisis de varianza de una vía **hígado**.

	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Media de cuadrados	F_{exp}	F_{crítica}	Decisión
Entre Grupos	5.1639	4	1.285	3.08	3.78	No hay diferencia
Dentro de grupos	18.768	45	0.417			
Total	23.907	49				

Tabla 8.25 Análisis de varianza de una vía **pulmones**.

	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Media de cuadrados	F_{exp}	F_{crítica}	Decisión
Entre Grupos	0.026	4	0.006	0.313	3.78	No hay diferencia
Dentro de grupos	0.926	45	0.021			
Total	0.951	49				

Tabla 8.26 Análisis de varianza de una vía **riñones**.

	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Media de cuadrados	F _{exp}	F _{crítica}	Decisión
Entre Grupos	0.150	4	0.037	0.518	3.78	No hay diferencia
Dentro de grupos	3.248	45	0.072			
Total	3.397	49				

8.5 Fotografías de ratones alimentados con concentrado proteínico de almendra de Higuierilla destoxificada (*Ricinus communis*)



Figura 8.1 Ratones alimentados pellets elaborado con un concentrado proteínico de almendra de Higuierilla destoxificada al 5%.

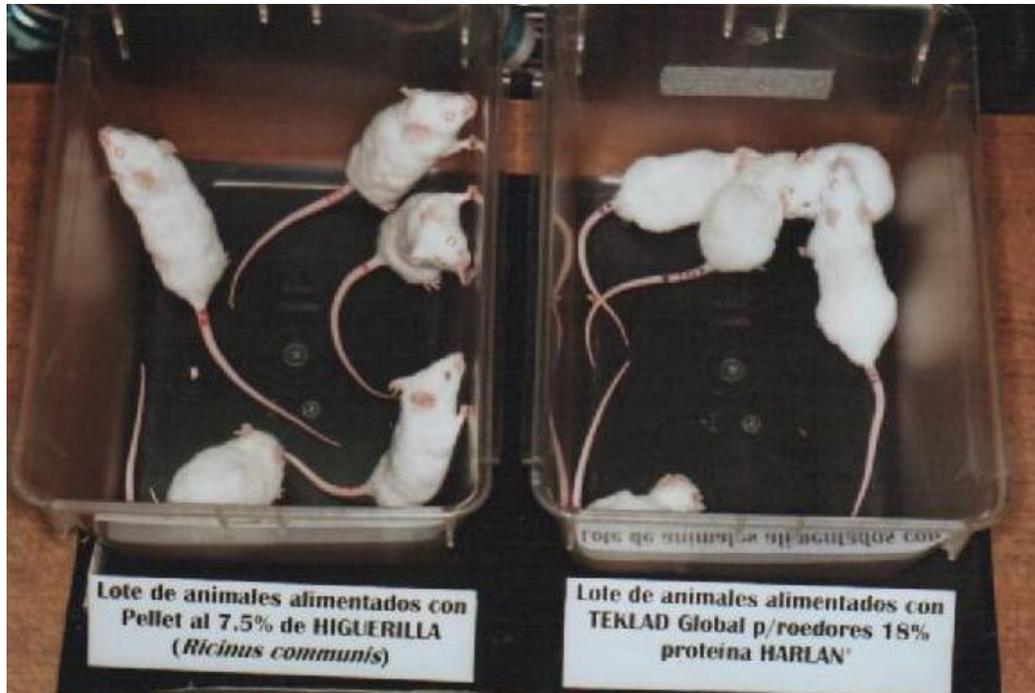


Figura 8.2 Ratones alimentados pellets elaborado con un concentrado proteínico de almendra de Higuierilla destoxificada al 7.5%.



Figura 8.3 Ratones alimentados pellets elaborado con un concentrado proteínico de almendra de Higuierilla destoxificada al 10 %.



Figura 8.4 Ratones alimentados pellets elaborado con un concentrado proteínico de soya desengrasada (*Glycinemax*) al 7.5 %.