

01672 7
201



CAMBIOS ULTRAESTRUCTURALES EN EL SISTEMA NERVIOSO
CENTRAL PRODUCIDOS POR METABOLITOS TOXICOS PURIFICADOS
DE *Fusarium moniliforme* y *F. subglutinans* EN EQUIDOS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

*Tesis presentada ante la
División de Estudios de Posgrado de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
de la
Universidad Nacional Autónoma de México.
Para la obtención del Grado de
Maestro en Ciencias Veterinarias*

por
MARIO ALBERTO NIETO AVILA

Julio de 1992

Aprobado por
Dra. Ph. D. Fernanda Texeira de Aranda

M.V.Z. M.C. Reyna Sánchez San Martín
Asesor Principal

1992





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 está 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.

LISTA DE CONTENIDO

	<u>Página</u>
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE CUADROS.....	viii
INTRODUCCION.....	1
A. Revisión bibliográfica.....	2
a). Antecedentes históricos.....	2
b). Características de la enfermedad.....	4
c). Características del agente.....	6
d). Características de la micotoxina.....	7
B. Justificación.....	10
MATERIAL Y METODOS.....	11
RESULTADOS.....	15
DISCUSION.....	30
CONCLUSIONES.....	33
BIBLIOGRAFIA.....	35

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Edema perivascular	16.
2. Edema perivascular.	16.
3. Gliosis focal.	17.
4. Gliosis focal	17.
5. Separación entre la neurópila y la pared vascular	18
6. Edema en sustancia blanca	18.
7. Necrosis axonal	20.
8. Axón normal.	20.
9. Vaso sanguíneo. Complejo de unión.	21.
10. Pared vascular normal.	21.
11. Edema perivascular	22.
12. Vaso sanguíneo con adherencias hacia la neurópila	22.
13. Hemorragia en telencéfalo.	24.
14. Hemorragia en sustancia blanca.	24.
15. Gliosis focal en sustancia blanca.	25.

16.	Edema perivascular	25.
17.	Edema en la neurópila.	26.
18.	Sustancia blanca normal.	26.
19.	Célula fagocítica periférica a un vaso sanguíneo.	27.
20.	Citoplasma de célula fagocítica.	27.
21.	Hemorragia y edema.	29.
22.	Discreto edema perivascular.	29.

LISTA DE CUADROS

<u>Cuadro</u>	<u>Página</u>
1. Especies toxigénicas de fusarium	8
2. Esquema de dosificación de la micotoxina	12

RESUMEN

NIETO AVILA MARIO ALBERTO. Cambios ultraestructurales en el sistema nervioso central producidos por metabolitos tóxicos purificados de *Fusarium moniliforme* y *F. subglutinans* en équidos. (Bajo la dirección de la MVZ. MC. Reyna Sánchez San Martín y de la Dra. Ph.D. Fernanda Texeira de Aranda).

Micotoxina purificada e identificada como Fusarenona X, aislada de maíz contaminado con los hongos *Fusarium moniliforme* y *F. subglutinans* fué administrada a un grupo 3 équidos, a diferentes dosis en un intento de reproducir la Leucoencefalomalacia Micotóxica de los Equinos (LMED). Se realizaron estudios anatomopatológicos, histopatológicos y ultraestructurales en los encéfalos de los equinos, observándose como principales cambios histológicos la presencia de edema, hemorragias y reactividad glial en la sustancia blanca cerebral. Ultraestructuralmente los cambios se identificaron predominantemente en la sustancia blanca donde se pudo apreciar una franca separación entre la pared vascular y los procesos astrocíticos adyacentes, formándose un espacio que se encontró ocupado por un material proteinaceo y fibras de colágena. lo que sugiere edema. Se observaron también algunas zonas de edema en la neurópila y reactividad glial, especialmente células microgliales activas fagocitando restos celulares. No se demostró pérdida de integridad en las paredes vasculares.

Se discute la relación de la dosis de micotoxina con la intensidad de las lesiones y se proponen nuevos estudios que permitan aclarar el proceso patogénico y las lesiones típicas

de leucoencefalomalacia en équidos, usando metabolitos tóxicos de los hongos en cuestión.

SUMMARY

NIETO AVILA MARIO ALBERTO. Ultrastructural changes in the central nervous system in equidae, produced by the purified toxic metabolites of *Fusarium moniliforme* and *F. subglutinans* (Under direction of Reyna Sánchez San Martín M. Sc. and Fernanda Texeira de Aranda Ph. D.)

The purified mycotoxin, identifies as Fusarenona X. isolated from corn grain contaminated with *Fusarium moniliforme* and *F. subglutinans*, was administered to a group of equidae, in different doses, as to induce the development of Equine Mycotoxic Leucoencephalomalacia (LME for its Spanish initials).

The brains of these animals underwent a detailed macroscopic, histopatologic, and ultrastructural study, which revealed edema, hemorrhage and glial reactivity in the white matter as the main changes. Ultrastructurally, there were clear spaces between the vascular walls and the adjacent astrocytic processes, that were occupied by a proteinaceous material and collagen fibers. There were also some areas of edema in the neuropil, as well as glial reactivity, with active microglial cells phagocytosing cellular debris. Loss of the integrity of the vascular walls was not demonstrated.

The relationship between dosage of the mycotoxin and the intensity of the injury is discussed. Further studies that may explain the pathogenesis of the typical changes in LEM in equidae, using toxic metabolites of the causative fungus are proposed.

INTRODUCCION

La Leucoencefalomalacia es una neuropatía que se presenta en caballos y asnos por el consumo de grano (principalmente maíz) contaminado con hongos del género *Fusarium*, en el que destacan las especies *F. moniliforme* y *F. subglutinans*^{2,9,10, 13,14,18,22,23,38.}

Estos organismos producen micotoxinas que se han clasificado en cuatro grupos que incluyen: butenolida, moniliformina, tricotecenos y zearalenona, siendo los tricotecenos y sus derivados los que se producen en mayor cantidad por los hongos de este género^{18,25,31,35.}

Las lesiones mas relevantes se presentan en la substancia blanca subcortical del cerebro y corresponden a necrosis licuefactiva, edema, hemorragias, infiltración perivascular por neutrófilos y eosinófilos, presencia de "celulas de edema citotóxico" y engrosamiento de las paredes vasculares con separación de sus láminas^{4,6,7,16,17,19, 20,28,37.}

Considerando la naturaleza de las lesiones se puede proponer al daño vascular como la causa primaria del problema. Para tratar de aclarar lo anterior se administró a équidos, micotoxina purificada aislada de maíz contaminado con hongos del género *Fusarium* asociado a un brote de campo de LME, en cuyos encéfalos se estudiaron los cambios anatomopatológicos y ultraestructurales resultantes. De la misma forma, este trabajo pretende sentar un precedente en el manejo de metabolitos tóxicos purificados de *Fusarium spp* en la inducción de lesiones de LME.

A. REVISION BIBLIOGRAFICA

a). Antecedentes históricos.

El primer reporte de LME se remonta a principios de siglo, en los Estados Unidos. A partir de entonces se ha informado de ella en varios países incluyendo a México^{2,5, 9,10,12,19,22,28}. En 1901, Buckley y Mac Callum, en Maryland E. U. reportaron una enfermedad de caballos a la que llamaron "enfermedad del maíz mohoso"⁸.

Posteriormente Butler en 1902, reportó la muerte de un equino causada por el consumo de maíz mohoso y al estudiar el cerebro encontró zonas de reblandecimiento en substancia blanca⁹, y no es sino hasta 1935 que se hace el siguiente informe en la literatura cuando Graham estudió una epizootia de encefalomielitis en el estado norteamericano de Illinois, en donde murieron mas de 5000 equinos, en dicho artículo, haciendo un estudio retrospectivo, menciona brotes similares en 1893 y 1914 en los cuales se asoció el problema con el alimento a base de maíz. El autor recopila para este informe los diversos nombres que en aquella época se daba al padecimiento, a saber: Enfermedad del maíz mohoso, forraje venenoso, enfermedad de la cañuela, encefalomielitis equina, parálisis cerebroespinal y cerebritis¹².

Schwart *et al.*, en 1937, informaron en Iowa E. U. la muerte de equinos que presentaron cuadro clínico caracterizado por signos nerviosos y al examinar los cerebros encontraron zonas de licuefacción y desintegración de la substancia blanca en los hemisferios cerebrales, así como edema y hemorragias. Lograron reproducir la enfermedad

bajo condiciones experimentales y propusieron la existencia de agentes tóxicos producidos por microorganismos como responsables de la enfermedad²⁹.

En 1943 Vander Walt y Steyn, describieron un síndrome neurotóxico en caballos de Transval, Sudáfrica, caracterizado por lesiones cerebrales, daños hepáticos, edema y hemorragias, atribuyendo estas alteraciones a las toxinas presentes en el frijol dulce (*Phaseolus vulgaris*) y paja contaminados con *Fusarium moniliforme*, que fueron consumidos por los equinos³⁴.

Después de un largo período en el que no se informó de nuevos casos, Badiali, et al, mencionan cuatro epizootias de un síndrome neurológico en asnos de Egipto en los años 1957, 1965, 1966 y 1968. Al estudiar los cerebros de los asnos muertos encontraron áreas necróticas, hemorragias y edema en sustancia blanca. Reprodujeron la enfermedad administrando maíz contaminado con hongos del género *Fusarium* y la llamaron leucoencefalomalacia equina, a la cual consideraron producto de una micotóxicosis descartando a virus, bacterias y protozoarios como agentes causales². Posteriormente Wilson y Maronport, en 1971 en Sudáfrica, aislaron el hongo *F. moniliforme* de maíz que causó LME, manifestando que ésta se debe a metabolitos tóxicos del agente. Al tratar de reproducir experimentalmente la enfermedad obtuvieron solo lesiones hepáticas³⁷.

Kriek, et al, en 1981 intentaron reproducir la LME en caballos, cerdos, conejos, mandriles y ratas a partir de alimento contaminado con *F. moniliforme*, observando lesiones

cerebrales únicamente en caballos. El resto de los animales presentó lesiones en hígado, riñones y corazón. Propusieron como posible causa de la enfermedad a la toxina moniliformina, producida por el hongo²⁰

En 1982, Correa, et al. reportaron un brote de LME en Brasil; aislaron a *F. moniliforme* de maíz mohoso y en los estudios anatomopatológicos de los cerebros encontraron las lesiones típicas de la enfermedad¹⁰.

En México, Sánchez et al., en 1987 realizaron estudios anatomopatológicos en encéfalos de equinos provenientes de Xochimilco D.F., los cuales murieron después de mostrar un cuadro neurológico. Encontraron lesiones cerebrales características de LME, además de otros cambios patológicos en hígado y riñones²⁸.

b). Características de la enfermedad.

Nombre: Leucoencefalomalacia Micotóxica de los équidos (LME)¹⁷.

Etiología: metabolitos tóxicos de hongos del género *Fusarium*, principalmente *F. moniliforme* y *F. subglutinans*^{27,38}.

Especies afectadas: Las lesiones cerebrales se presentan exclusivamente en équidos²⁰.

Curso: variable de 1 a 25 días^{2,19,20}.

Signos: se caracteriza por un cuadro neurológico severo que incluye incoordinación, deambulación en círculos, movimientos periódicos violentos de patas y cabeza, movimientos lentos de ojos, depresión, orejas erectas, apoyo de la cabeza contra objetos sólidos (cefalea), ceguera, fiebre, postración y muerte^{2,4,5,6,7,19,20,28,38}.

Lesiones anatomopatológicas: La LME se caracteriza por áreas de malacia multifocal en la substancia blanca subcortical, formando cavidades cuya distribución puede ser unilateral o bilateral no simétrica. Las zonas de cavitación en substancia blanca contienen material fluido y fragmentos de tejido necrosado. El contorno de éstas es irregular y generalmente rodeado de vasos sanguíneos de neoformación. Las áreas vecinas de las zonas de malacia se encuentran edematosas y hemorrágicas. Es importante hacer notar que algunos animales que presentan antecedentes de consumo de alimento contaminado con *Fusarium* no llegan a presentar el síndrome neurológico y en otros casos en que los animales mueren después de un cuadro clínico definido, no presentan las lesiones necróticas en substancia blanca cerebral, aunque sí se puede encontrar edema cerebral aunado a lesiones viscerales^{2,4,10,28,29,38}.

Características histopatológicas: la presencia histológica de las áreas de malacia corresponden a necrosis licuefactiva acompañada de zonas de hemorragia y edema.¹⁷

Domenech *et al.*, informan además, la presencia de un infiltrado perivascular por células linfocíticas y algunos acúmulos de polimorfonucleares⁸. Otros autores refieren la presencia de eosinófilos y algunas células plasmáticas^{17,28}.

Sánchez *et al.*, reportan que este infiltrado se deposita entre las diferentes capas de los vasos sanguíneos, las que se encuentran moderadamente separadas. Mencionan además la presencia de células fagocíticas y engrosamiento de la pared vascular debido a proliferación de la adventicia²⁸. Algunos autores refieren la presencia de lipofuscinas en macrófagos y

neuronas^{17,28}.

Características ultraestructurales: hasta el momento no ha sido posible encontrar en la literatura informes sobre los detalles ultraestructurales de la enfermedad.

c). Características del agente.

Desde tiempos muy remotos hasta la actualidad, los cereales han sido parte esencial de la dieta en la mayoría de las civilizaciones humanas y de sus animales domésticos. Desde el descubrimiento de éstos el hombre ha tratado de mejorar sus granos para obtener un mejor rendimiento. Hoy en día se ha conseguido producir granos mejorados que sin embargo, no dejan de ser susceptibles al ataque de diversos factores que merman la productividad y calidad de los mismos. Uno de estos factores son los hongos que atacan a los cereales ya sea durante su desarrollo en el campo o bien durante su almacenamiento. Algunos de estos hongos parásitos producen metabolitos secundarios tóxicos llamados micotoxinas. Estas son importantes por que están implicadas en toxicosis en animales incluyendo al hombre, cuando consumen alimento contaminado con las mismas³.

Dentro del numeroso grupo de hongos que parasitan a los cereales, se encuentra el género *Fusarium*, que corresponde a organismos saprobios y fitopatógenos ampliamente difundidos en todo el mundo; este género tiene gran importancia en la agricultura ya que fácilmente parasita a un importante número de plantas cultivables³. La clasificación taxonómica de este hongo es la siguiente:^{3a}

Reino: Vegetal
 Sub reino: Fungi
 División: Eumycota
 Subdivisión: Deuteromycotina
 Clase: Hyphomycetes
 Orden: Moniliales
 Familia: Tuberculariaceae
 Género: *Fusarium*

Fusarium moniliforme es el hongo patógeno del maíz más común en todo el mundo, tanto en ambientes cálidos y húmedos como ambientes secos y se ha logrado aislar hasta en el 100% de las semillas en algunas muestras^{24,32}.

En las mazorcas *Fusarium moniliforme* se circunscribe principalmente a granos individuales o áreas limitadas de la mazorca. Los granos infectados desarrollan un moho algodonoso²⁴.

El género *Fusarium* presenta un importante número de especies productoras de micotoxinas (ver cuadro 1) que están relacionadas con enfermedades tóxicas en humanos, como el cáncer esofágico; y en animales con síndromes hemorrágicos y estrogénicos, edema pulmonar, cirrosis hepática, cambio grasoso hepático, trombosis cardíaca, carcinoma esofágico y leucoencefalomalacia, entre otras^{25,26}.

d). Características de la micotoxina

La fusarenona X, micotoxina empleada para este experimento pertenece al grupo de los tricotecenos, que han

Cuadro 1. Especies Toxigénitas de *Fusarium*

Sección	Especies
Eupionotes	<i>F. merismoides</i>
Arachnites	<i>F. nivale</i>
Sporotrichiella	<i>F. sporotrichioides</i>
	<i>F. Chlamydosporum</i>
	<i>F. poae</i>
	<i>F. tricinctum</i>
Roseum	<i>F. Avenaceum</i>
Arthrosporiella	<i>F. semitectum</i>
Gibbosum	<i>F. equiseti</i>
	<i>F. acuminatum</i>
Discolor	<i>F. sambucinum</i>
	<i>F. culmorum</i>
	<i>F. Graminearum</i>
Liseola	<i>F. moniliforme</i>
	<i>F. proliferatum</i>
	<i>F. subglutinans</i>
	<i>F. anthropilum</i>
Elegans	<i>F. oxysporum</i>
	<i>F. solani</i>

Fuente: International Toxic *Fusarium* Reference collection
Fusarium Research Center.
 The Pennsylvania State University, USA.

sido clasificados con base en su estructura en cuatro grupos, de los cuales los grupos A y B son producidos por *Fusarium*³⁵.

Dentro del grupo de los tricotecenos tipo B, se encuentran tres sustancias: nivalenol, deoxinivalenol y fusarenona X.^{18,25,31,35} Esta última tiene como sinónimo los nombres de fusarenona, monoacetilnivalenol y monoacetato de nivalenol. Su nombre químico es 4-acetoxi-3,7,15-trihidroxi-12-13-epoxidtricotec-9-en-8-ona²⁵.

B. JUSTIFICACION.

Los brotes de encefalopatías en équidos han ido en aumento año con año, según informes del Sistema de Vigilancia Epizootiológica de la Dirección General de Sanidad Animal de la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Los registros correspondientes a los años 1979 a 1987 muestran un aumento en los estados de la República Mexicana donde se han presentado neuropatías en équidos. En 1987 hubo 59 informes de brotes de enfermedades neurológicas, muriendo 266 animales³⁰. Con frecuencia, dichos brotes son atribuidos a una etiología viral sin tomar en cuenta un probable origen micotóxico, que es posible, sobre todo debido a las inadecuadas condiciones de manejo de los granos en el medio rural mexicano, situación que también puede estar presente en otros países donde se ha observado la LME. Por otro, lado no se encontraron informes en la literatura referentes a la utilización de micotoxinas purificadas de *Fusarium* para reproducir LME. De la misma forma no han sido estudiadas las lesiones a nivel ultraestructural de esta entidad. Por consiguiente, este trabajo pretende asociar a los principios tóxicos purificados de *Fusarium* con las lesiones en tejido nervioso características de LME, que fueron estudiadas a nivel ultraestructural, haciendo una contribución al esclarecimiento del proceso patogénico de esta entidad.

MATERIAL Y METODOS

El estudio se llevó a cabo en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M., Ciudad Universitaria, D.F., México, utilizando las instalaciones y equipo de los Departamentos de Patología y de Clínica para Equinos. Los trabajos de microscopía electrónica de transmisión fueron realizados en el Departamento de Patología Experimental del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía de la Secretaría de Salud.

La micotoxina purificada fué proporcionada por la Doctora Magda Carvajal (Laboratorio de Fitopatología del Instituto de Biología de la U.N.A.M.) Dicha micotoxina fué extraída a partir de maíz contaminado con los hongos *F. moniliforme* y *F. subglutinans*, proveniente de lugares donde han muerto equinos por LME. La micotoxina fué extraída mediante los métodos de Stoloff y Thomas e identificada por cromatografía en capa delgada, espectroscopía infra-roja y espectrometría de masas llegando a la conclusión de que se trata de Fusarenona X perteneciente al grupo de los tricotecenos grupo B^{2*}.

Para el desarrollo de la prueba biológica se utilizaron 5 équidos (3 caballos y 2 asnos). Los animales se alojaron en grupos previa identificación de acuerdo al tratamiento correspondiente. La alimentación consistió en paja de avena y grano de cebada administrados dos veces al día. para ésto se

* Las necesidades específicas de material y equipo se detallan en la descripción de la técnica correspondiente y en las referencias indicadas

contó con las instalaciones y el personal del Departamento de Clínica para Equinos.

Diseño experimental.

Se estableció un diseño experimental mediante grupos totalmente al azar con un grupo problema y uno testigo; el primero formado de tres animales (dos caballos y un asno) y el segundo de dos (un caballo y un asno), desarrollando el siguiente esquema de dosificación:

Cuadro 2. Esquema de dosificación.

GRUPO	ANIMAL	DOSES	PERIODICIDAD	TIEMPO TOTAL	DOSES TOTAL
PROBL.	CABALLO 1	40 mg	DIARIO	30 DIAS	1.200 mg
	CABALLO 2	50 mg	DIARIO	40 DIAS	2.000 mg
	ASNO 1	50 mg	DIARIO	14 DIAS	700 mg
	CABALLO 3	_____	_____	_____	_____
	ASNO 2	_____	_____	_____	_____

La micotoxina se encapsuló junto con el gel de sílice como excipiente, utilizando cápsulas de gelatina y fué administrada por vía oral.

El peso conjunto del gel de sílice y la micotoxina se tomó como la cantidad específica de dosificación, ya que la cromatografía de capa fina da cantidades de partes por billón de micotoxina que solo pueden ser cuantificados por métodos más sofisticados como la espectrometría de masas.

Cuarenta y ocho horas después de completado el esquema de dosificación para cada animal (cuadro 2), fueron sacrificados utilizando pentobarbital sódico por vía endovenosa. A Cada equino le fue extraído el encéfalo procediendo a preparar el tejido para microscopía electrónica de transmisión e histopatología de rutina.

Estudio ultraestructural.

Los tejidos fueron transferidos a una solución de glutaraldehído al 2.5% en buffer de cacodilatos 0.1 M. y pH 7.2 por 24 horas. Posteriormente las muestras se lavaron en buffer de cacodilatos durante 10 minutos. A continuación fueron post fijadas en tetraóxido de osmio al 1% y deshidratadas con cambios sucesivos de acetona del 70%, 80%, 90% y absoluta durante 10 minutos en cada cambio. Se preincluyeron en una solución 1:1 de resina epóxica (EPON) y acetona absoluta por 18 horas y se incluyeron en EPON para finalmente polimerizarse a 60°C por 18 horas. Los cortes semifinos (1µm.) y ultrafinos (60-80 nm.) se prepararon en un ultramicrotomo American Optical OM V3. Las secciones semifinas fueron teñidas con azul de toluidina y evaluadas con microscopio de luz. Los cortes ultrafinos se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo y se evaluaron en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 10^{3d}

Estudio histopatológico.

En cada uno de los équidos sacrificados se practicó la necropsia completa. Secciones de encéfalo de 0.5 cm. de

espesor fueron fijadas en formalina bufferada al 10%, embebidas en parafina, cortadas a 6 μ m. de espesor y posteriormente teñidas con hematoxilina y eosina (H y E), para su evaluación con microscopio de luz⁴.

RESULTADOS

Los resultados del estudio indican una relación entre la ingestión de Fusarenona X y la presencia de cambios ultraestructurales en el sistema nervioso central en équidos. De la misma forma fue posible observar que a medida que la dosis total se incrementó, se presentó una mayor cantidad e intensidad de lesiones. A continuación se describen las observaciones para cada animal en particular.

Caballo 1.- Este animal recibió 40 mg. diarios de la micotoxina por un período de 30 días, acumulando un total de 1200 mg. Durante la necropsia no hubo hallazgos macroscópicos en el sistema nervioso central, sin embargo, en el estudio histopatológico fue posible identificar áreas de edema, sobre todo en las zonas de transición de corteza cerebral a sustancia blanca subcortical, predominantemente en las porciones anteriores de la región telencefálica (figura 1 y 2). De igual forma se encontraron numerosos focos de gliosis y reactividad glial manifiesta en zonas de sustancia blanca subcortical (figuras 3 y 4).

Ultraestructuralmente, en la sustancia blanca a nivel telencefálico se observó la formación de un espacio perivascular real debido a la separación de la pared de algunos vasos sanguíneos y los procesos astrocíticos de la neurópila adyacente (figura 5). El espacio formado se encontró ocupado con fibras de colágena y material proteináceo homogéneo, lo cual sugiere edema. En algunas zonas de la neurópila se presentó una moderada disociación en sus componentes siendo ocupados los espacios por un material



Figura 1. Edema perivascular. Zona de transición entre sustancia gris y sustancia blanca mostrando marcado edema perivascular y aspecto esponjoso de la neurópila adyacente. x 180.

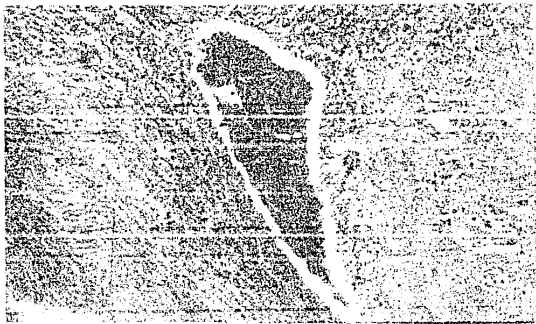


Figura 2. Edema perivascular. Detalle de la figura anterior, mostrando el edema perivascular y la esponjosis. x 320.

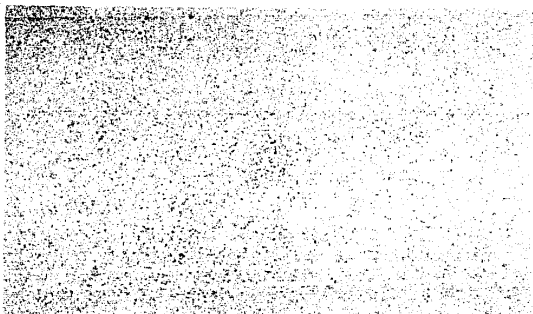


Figura 3. Gliosis focal. Zona de sustancia blanca subcortical a nivel telencefálico mostrando un acúmulo de células gliales reactivas. x 180.

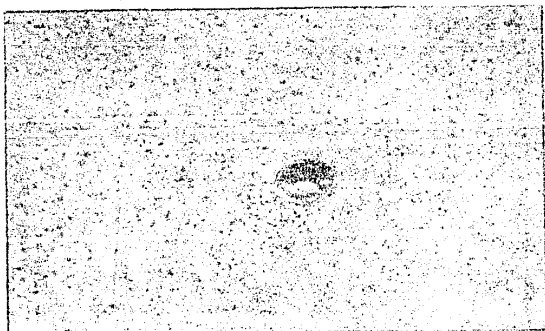


Figura 4. Gliosis focal. Zona de sustancia blanca adyacente a un vaso sanguíneo mostrando discreto acúmulo de células gliales. x 240.

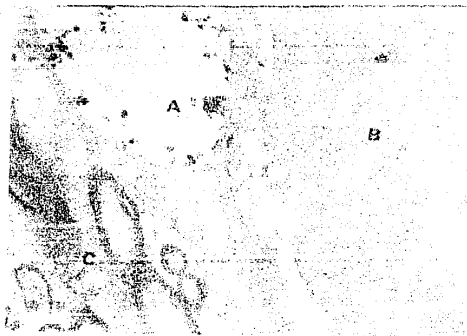


Figura 5. Separación entre la neurópila y la pared vascular. A. Pared vascular que muestra una separación con la membrana de los procesos astríficos adyacentes. B. Eritrocitos. C. Neurópila. x 12,500

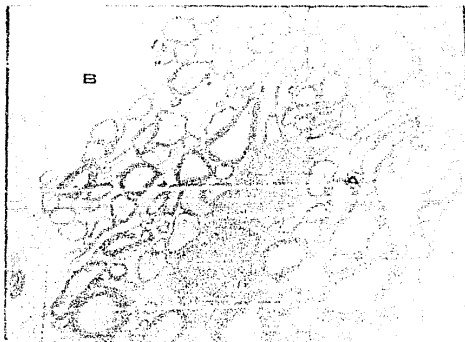


Figura 6. Edema en sustancia blanca. A. Disociación de los componentes de la neurópila. B. Formación de espacios que quedan ocupados por material proteináceo que sugiere la presencia de edema. x 4,000.

con las mismas características descritas para los espacios perivasculares (figura 6). En la misma zona, se observaron ocasionales axones degenerados con disociación secundaria de la mielina (Figura 7), a diferencia de los casos testigo donde se encontraron sin cambios (figura 8).

A pesar de lo anteriormente mencionado, en ninguna muestra de éste ni el resto de los casos fue posible identificar alteraciones en la integridad de la pared de los vasos sanguíneos que siempre mostraron características normales (figura 9 y 10).

Caballo 2. Este animal fue quien recibió la mayor cantidad de micotoxina y durante el mayor período de tiempo. Se le aplicaron 50 mg. diarios durante 40 días consecutivos para llegar a un total de 2000 mg. durante la prueba. No se identificaron lesiones macroscópicas a la necropsia, sin embargo, fué en este caso en el que se observaron los cambios histológicos y ultraestructurales mas relevantes.

Durante el estudio histopatológico se encontraron áreas de sustancia blanca subcortical con marcado edema perivascular (figura 11) así como puntos de adherencia entre la adventicia vascular y neurópila adyacente formando una imagen de "patas de araña", y presencia de pequeñas gotas hialinas en el espacio peivascular (figura 12), lo que coincide con la descripción de Jones para edema en encéfalo¹⁴. En este caso se presentaron también focos hemorrágicos en telencéfalo a nivel perivascular (figura 13), afectando pequeñas zonas de la neurópila adyacente en la que se pudo observar desmielinización y edema (figura 14). En



Figura 7. Necrosis axonal con restos membranosos formando asas. Sustancia blanca subcortical. x 10,000.

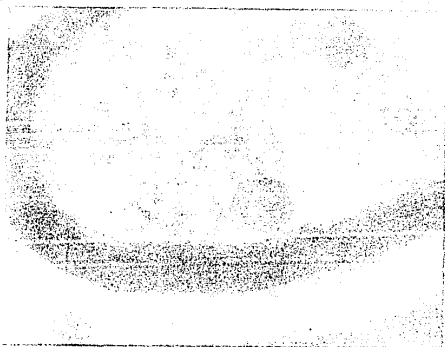


Figura 8. Axón normal. Axón mielinico mostrando perfecta compactación entre las láminas que forman la vaina de mielina. x 40,000.

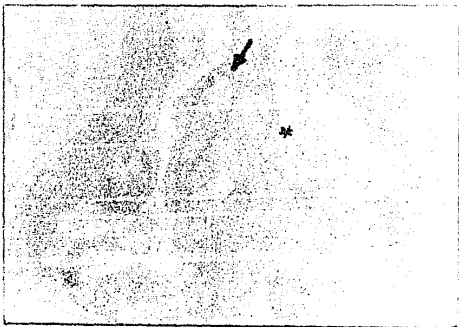


Figura 9. Vaso sanguíneo. Complejo de unión. A pesar de observarse una separación entre la pared vascular y la neurópila (*), el vaso sanguíneo presenta morfología normal. Obsérvese el complejo de unión entre dos células endoteliales. (flecha). x 31,500.

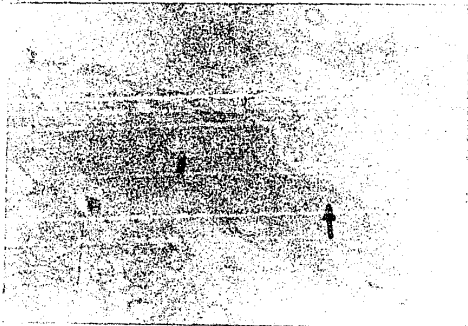


Figura 10. Pared vascular normal. Pequeño vaso capilar mostrando un complejo de unión normal (Flecha) y abundantes vesículas pinocitóticas (cabeza de flecha). x 31,500.



Figura 11. Edema perivascular. Substancia blanca subcortical donde se observa un vaso sanguíneo con marcado edema perivascular. x 200



Figura 12. Vaso sanguíneo con adherencias hacia la neuropila. Vaso sanguíneo mostrando delgados filamentos de adherencia a la neuropila (flecha) y presencia de gotas hialinas en el espacio perivascular (cabeza de flecha). x 400.



Figura 13. Hemorragia en telencéfalo. Hemorragia en la zona de unión entre sustancias gris y blanca. x 180.

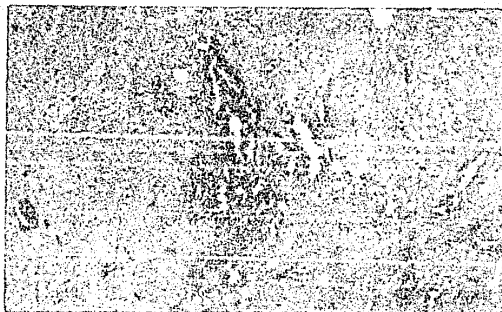


Figura 14. Hemorragia en sustancia blanca. Cambios degenerativos en la neurópila adyacente a un foco hemorrágico. x 200.

este encéfalo se encontraron también discretos focos de gliosis en sustancia blanca (figura 15).

Mediante el estudio al microscopio electrónico de transmisión se identificó separación entre pared vascular y neurópila con formación de espacios perivasculares reales así como tumefacción de los procesos astrocíticos que rodean a los vasos sanguíneos (figura 16). Se observó separación de las láminas mielínicas así como disociación de la neurópila por causa del edema. (Muchos de los cambios observados en las vainas de mielina de los animales de ambos grupos son artefactos y aparecen como una separación de las láminas mielínicas. Tal cambio se debe a las dificultades para perfundir con glutaraldehído los encéfalos de estos animales al momento del sacrificio). En los espacios formados al separarse los componentes de la neurópila se encontraron restos membranosos (figura 17), alteración que no apareció en los casos control (figura 18). Se pudo notar un aumento en la población de células gliales especialmente células microgliales con actividad fagocítica que se observaron repletas de lisosomas secundarios lo que podría ser indicativo de necrosis en el tejido nervioso con posterior fagocitosis por parte de estas células (figura 19 y 20).

Año 1. Este animal recibió una dosis total de 700 mg. de fusarenona X, fraccionada en 14 dosis diarias de 50 mg. y los hallazgos fueron los siguientes:

Ausencia de lesiones macroscópicas. Histopatológicamente los cambios se encontraron concentrados en la sustancia blanca de la región mesencefálica en donde se presentaron



Figura 15. Gliosis focal en sustancia blanca. x 400.

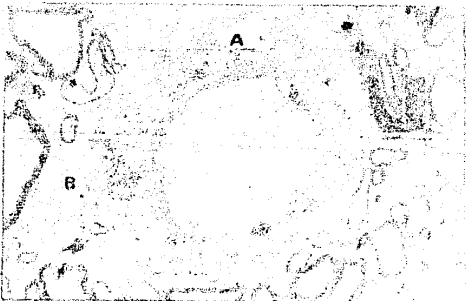


Figura 16. Edema perivascular. A. fibras de colágeno en el espacio formado entre la pared vascular y la neurópila adyacente. B. Disociación de la neurópila y presencia de un material proteináceo de baja electrodensidad que sugiere edema. x 5.000.

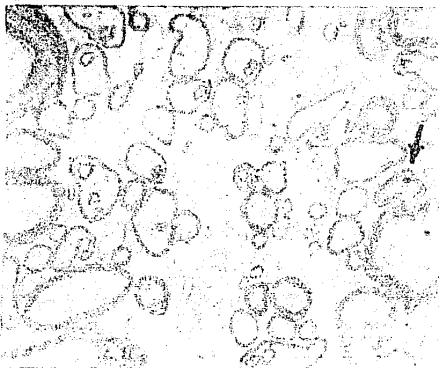


Figura 17. Edema en la neurópila. Discreta disociación de las láminas de mielina (flecha) y separación de los componentes de la neurópila. x 8,300.



Figura 18. Sustancia blanca normal. Axones mielínicos con características morfológicas normales. x 16,000.

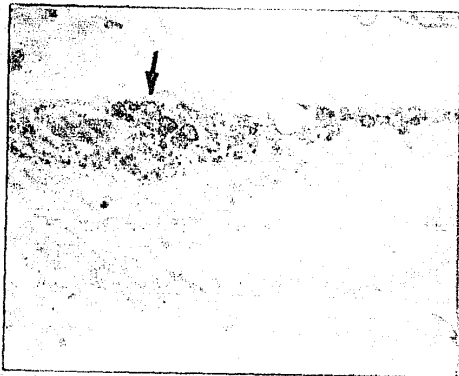


Figura 19. Célula fagocítica periférica a un vaso sanguíneo. Nótese la presencia de partículas fagocitadas en el citoplasma de la célula (flecha). x 6,300.



Figura 20. Citoplasma de célula fagocítica (pericito). Se pueden observar las partículas que han sido fagocitadas (flechas), formando lisosomas secundarios. x 12,500.

zonas discretas de hemorragia, edema perivascular y espongiosis de la neurópila (figuras 21 y 22), así como zonas focales de reactividad glial en telencéfalo. No fue posible encontrar lesiones ultraestructurales.

Caballo 3 y asno 2. En estos animales correspondientes al grupo testigo no se identificaron lesiones macroscópicas, histológicas ni ultraestructurales.

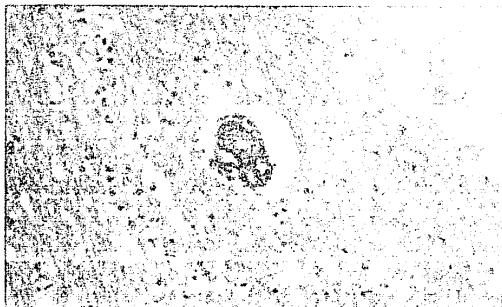


Figura 21. Hemorragia y edema. Pequeña hemorragia perivascular y moderado edema con cambios degenerativos de la neurópila. x 240.

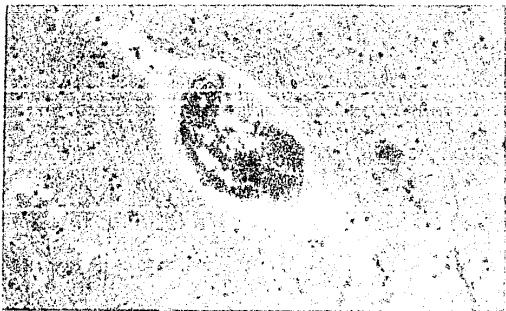


Figura 22. Discreto edema perivascular. x 320.

DISCUSION

De los resultados de la investigación se desprende que la micotoxina identificada como fusarenona X, producida por los hongos *Fusarium moniliforme* y *F. subglutinans*, al ser administrada en équidos es capaz de producir alteraciones en el sistema nervioso central, que en este caso solo se identificaron a nivel histológico y ultraestructural, sin embargo, por el tiempo y dosis empleados no se logró reproducir la malacia observable macroscópicamente que se presenta en los casos de intoxicación natural.

Debido a la imposibilidad de encontrar reportes de investigaciones previas en lo que respecta al uso de micotoxinas purificadas en la reproducción de LME, no hubo un punto de partida que nos indicara la forma de estructurar un esquema de dosificación que asegurara la presentación de las lesiones típicas de la enfermedad y se optó por desarrollar uno en base a la disponibilidad de micotoxina que dicho sea de paso es difícil de obtener en grandes cantidades, razón por la cual hubo de usarse un reducido número de animales de experimentación. Además, por estudios anteriores, está comprobado que no es posible reproducir lesiones nerviosas de LME en animales de laboratorio quienes solo desarrollan cambios viscerales, por lo tanto, es forzoso hacer el estudio en équidos²⁰.

Con la dosificación al azar desarrollada en el estudio, se pudo comprobar que la intensidad de las lesiones fue

diréctamente proporcional a la dosis aplicada y al tiempo de exposición a la micotoxina.

El período de tiempo durante el cual se aplicó la micotoxina se considera adecuado, ya que en experimentos donde se ha alimentado a équidos con maíz contaminado, aproximadamente al décimo día se inicia la presentación de signos y lesiones de la enfermedad^{2a}.

Tendrá que profundizarse en el estudio patogénico del proceso, pues en este trabajo a pesar de haberse encontrado edema e incipiente daño en la substancia blanca cerebral, no se demostró pérdida en la integridad de la pared vascular que de esa manera pudiese explicar la lesión. Sin embargo, la falta de cambios vasculares en microscopía electrónica debe ser tomada con precaución, ya que el muestreo utilizado para este tipo de estudios reduce la posibilidad de una observación más amplia. Se debe, fuera de dudas, tomar en cuenta la valiosa información de la microscopía óptica que muestra cambios vasculares evidentes. Probablemente los cambios vasculares mas importantes se presentaron en vasos de mayor diámetro, que no fueron muestreados para microscopía electrónica, pero que fueron observados en la histopatología.

Powell y Lampert proponen un interesante modelo patogénico para explicar el edema. Afirman que la lesión se presenta por una alteración en el transporte activo de iones y de agua ocasionando cambios en la permeabilidad de membrana. Un posible mecanismo es la inhibición de la enzima adenosin trifosfatasa (ATPasa) que es especialmente activa en el cerebro²⁷. Jellinger y Seitelberger indican que la

inhibición de este sistema enzimático de membrana ha sido observado en una variedad de formas experimentales de edema cerebral por productos tóxicos¹⁵. El anterior modelo patogénico es digno de ser tomado en cuenta para explicar el edema que como consecuencia de la ingestión de fusarenona X se observó en este trabajo.

CONCLUSIONES

1. La toxina identificada como fusarenona X, producida por los hongos *Fusarium moniliforme* y *F. subglutinans* es capaz de producir lesiones en el sistema nervioso central de équidos, que para este trabajo consistieron fundamentalmente de edema, hemorragias, gliosis focal y difusa y reactividad glial en la sustancia blanca del encéfalo.

2. Las dosis de micotoxina utilizadas en el estudio resultaron subóptimas para producir la necrosis licuefactiva observable macroscópicamente que se presenta en casos naturales de LME.

3. No se observan alteraciones ultraestructurales de las paredes vasculares en el sistema nervioso central de los animales afectados. La intensidad de la vasculopatía puede ser mejor evaluada en los hallazgos de microscopía óptica.

4. Son necesarias nuevas investigaciones que permitan dejar en claro el papel de los metabolitos tóxicos de los hongos en cuestión.

5. Para abaratar los costos de experimentación sobre todo considerando la dificultad de obtener grandes cantidades de micotoxina purificada, se sugiere diseñar nuevos protocolos de investigación empleando cultivos de tejidos nerviosos para probar el efecto neurotóxico de estas sustancias.

7. - BIBLIOGRAFIA

1. **Armed Force Institute of Pathology**.: Manual of Histologic staining methods. 3rd. ed. *Mc Graw-Hill Book Co.* New York, Toronto, Sydney, London, 1968.
2. **Badiali, H., Abou-Youssif, M.H., Rodwan, A.I., Hamdy, F.M., and Hildebrandt, P.K.**: Moldy corn poisoning as the major cause of an encephalomalacia syndrome in egyptian equidae. *Am. J. Vet. Res.*, 29: 2029-2035 (1968).
3. **Barcenas, E.**: Extracción, purificación e identificación de metabolitos tóxicos de *Fusarium moniliforme* y *F. subglutinans*. Tesis de licenciatura en Biología *Facultad de Ciencias, UNAM.*, México, D.F., 1988.
4. **Biester, H.E., Schart, L.H., and Reddy, C.H.**: Further studies on moldy corn poisoning (Leukoencephalomalacia) in horses. *Vet. Med. Med.*, 35: 636-639 (1940).
5. **Brito, L.A.B., Nogueira, R.H.G., Ferreira, J.J., Chiquiloff, M.A.**: Leucoencefalomalacia em equino associada a ingestão de milho mofado. *Vet. Boll., Univ. Minas Gerais, Goiânia Brazil.*, 34: 49-53 (1982).
6. **Brownie, C.F., Cullen, J.**: Characterization of experimentally induced equine leucoencephalomalacia (ELEM) in ponies (*Equus caballus*): preliminary report. *Vet. Human. Toxicol.* 29: 34-37 (1987).
7. **Buck, W.B., Hliburton, J.C., Thilsted, J.P., Lock, T. F. and Vasonder, R.F.**: Equine Leukoencephalomalacia: comparative pathology of naturally occurring and experimental cases. *Amer. Assoc. Vet. Lab. Diagnosticians.* 22: 239-258 (1979).
8. **Buckley, S.S., and McCallum, W.G.**: Acute hemorrhagic encephalitis prevalent among horses in maryland. *Amer. Vet. Rev.* 25: 99-102 (1901).
9. **Butler, T.**: Notes on a feeding experiment to produce Leucoencephalitis in a horse with a positive results. *Amer. Vet. Rev.*, 26: 748-751 (1902).
10. **Correa, F.R., Mirelles, M.A., Soares, J.M., Machado, J.J., and Zambrano, A.F.**: Equine leucoencephalomalacia associated with ingestion of moldy corn in three counties in southern Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 2:27-30 (1982).
11. **Domenech, J. Boccas, B., Pellegrin, F., Laurent, D., Kholer, F., Magnol, J. and Lambert, C.**: Equine leucoencephalomalacia in New Caledonia. *Australian Vet. J.* 32: 422-423 (1985).
12. **Graham, R.**: Results of inoculating laboratory animals

- with equine brain-tissue suspension and equine brain-tissue filtrates from spontaneous cases of so called cornstalk disease. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.* 86: 778-780 (1935).
13. **Halliburton, J.C., Vasonder, R.F., Lock, T.F. and Buck, W. B.:** Equine leucoencephalomalacia (ELEMD): a study of *Fusarium moniliforme* as an etiologic agent. *Vet. Human. Toxicol.* 21: 348-351 (1979).
 14. **Halliburton J.C., Buck, W.B., Lock, T.F., Vesonder, R.F. and Wilson, B.J.:** Equine leucoencephalomalacia: the toxicity of three *Fusarium moniliforme* metabolites in equidae. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.* 179: 262-263 (1981).
 15. **Jellinger, K. and Seitelberger, F.:** Spongy degeneration of the central nervous sistem. *Curr. Top. Pathol.* 53: 90-160 (1970).
 16. **Jones, T.L. and Hunt, R.D.:** Veterinary Pathology. 5th. ed. *Lea and Febiger*. Philadelphia, 1983.
 17. **Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C. and Palmer, N.:** Pathology of Domestic Animals 3rd. ed. vol. 1 *Academic Press*, Orlando, Florida, 1985.
 18. **Kamimura, H., Nashijima, M. Yasuda, K., Saito, K., Ibe A., Nagayama, T., Usiyama, H. and Naoui, Y.:** Simultaneous detection of several *Fusarium* micotoxins in cereals, grains and foodstuffs. *J. Assoc. off Anal. Chem.* 64: 1067-1073 (1981).
 19. **Kellerman, T.S., Marasas, W.F.D., Pienaar, J.C. and Naude, T.W.:** A mycotoxicosis of equidae caused by *Fusarium moniliforme* sheldon. A preliminary communication. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 39: 205-208 (1972).
 20. **Kriek, N.P.J., Kellerman, T.S. and Marasas, W.F.O.:** A comparative study of the toxicity of *Fusarium verticilloides* (= *Fusarium moniliforme*) to horses, primates, pigs, sheep and rats. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 48: 129-131 (1981).
 21. **Leon de, G.:** Enfermedades del Maíz. Una guía para su identificación en el campo. 3a. ed. *Centro Internacional Para el Mejoramiento del Maíz y el Trigo (CIMMYT)*, México, 1984.
 22. **Magnol, J.P., Bars, J.L. and Quere, J.P.:** Leucoencephalomalacia (LEM) toxique chez le cheval. Un cas tres probable en territoire metropolitain. *Revue de Medicine Veterinaire.* 134: 297-299 (1983).
 23. **Marasas, W.F.O., Kellerman, T.S., Pienaar, J.G. and Naude, T.W.:** leucoencephalomalacia: a micotoxicosis of equidae caused by *Fusarium moniliforme* sheldon.

Onderstepoort J. Vet. Res. 43:113-122 (1976).

24. **Marasas, W.F.O., Mehnr, S.J., Rensburg van, S.J. and Schalkwyk, D.J.:** Mycroflora of corn produced in human esophageal cancer areas in Transkei, Southern Africa. *Phytopathology*. 71: 792-796 (1981).
25. **Marasas, W.F.O., Nelson, P.E. and Tousson, T.A.:** Toxicigen *Fusarium* species. Identity and micotoxology. *The Pennsylvania State University Press, U.S.A., (1984).*
26. **Mirocha, C.J. and Christiansen, C.M.:** Mycotoxins. 1st. ed. *Academic Press, U.S.A., 1983.*
27. **Powell, H.C. and Lampert, P.W.:** Hexachlorophene neurotoxicity. *Neurotoxicology*. Ed. by: Roisin, L. Shiraki, H. and Grcevic, N. *Raven Press, New York, 1977.*
28. **Sanchez, S.M.R., de Alba, G.P. y Constantino, C.F.:** Leucoencefalomalacia en equinos (Estudio anatomopatológico de tres casos). *Veterinaria México*. 18: 145-150 (1987).
29. **Schwartz, L.H., Biester, H.E. and Murray, C.:** A disease of horses caused by feeding moldy corn. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.* 90: 76-85 (1937).
30. **Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos:** Investigación de un posible caso de E.E.V. *Boletín de la Comisión México-Americana para la prevención de la Fiebre Aftosa*, 22: 3 (1986).
31. **Thiel, P.G. Meyer, C.J. and Marasas, W.F.O.:** Natural occurrence of moniliformin together with deoxynivalenol and zearalenona in Transkeian Corn. *J. Agric. Food. Chem.* 30: 308-312 (1982).
32. **Tsung-Chi, T. and Li-Lin, L.:** Mycotoxin produced by *Fusarium spp.* of taiwan. *Bot. Bull. Academia Sinica*. 27: 35-43 (1986).
33. **Ulloa, M. y Hanlin, R.:** Atlas de Micología Básica, 1a. ed. *Concepto, México*. 1978.
34. **Van der Walt, S.J. and Steyn, D.G.:** Recent investigations into the toxicity of plants, etc. XI11. *Onderstepoort J. Vet. Sci. Anim. Ind.* 18: 207-224 (1943).
35. **Visconti, A., Bottalico, A., Palmisano, F. and Zambonin, P.G.:** Diferencial pulse polarography of trichothecene micotoxins. Determination of deoxynivalenol, nivalenol and Fusarenone X in maize. *Analytica Chimica Acta*. 159: 11-118 (1984).
36. **Weakley, B.S.:** A Beginner's Handbook in Biological Electron microscopy. *Churchill Livingstone, Londres* 1972.

37. **Wilson, B.J. and Maronport, R.R.:** Causative fungus agent of leucoencephalomalacia in equine animals. *Vet. Rec.* 88:484-486 (1971).
38. **Wilson, B.J. Maronport, R.R. and Hildebrandt, P.K.:** Equine leucoencephalomalacia *J. Amer. Vet. Assoc.* 163:1293-1294 (1973).