



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

## FACULTAD DE CIENCIAS

ANÁLISIS MORFOLÓGICO DEL EFECTO TÓXICO DEL FRUTO  
DE LA *Karwinskia humboldtiana* EN EL SISTEMA NERVIOSO  
CENTRAL Y PERIFÉRICO DE RATAS

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)

## PRESENTA

Víctor Javier Romero Díaz

DIRECTORA DE TESIS: Dra. Elsa Guadalupe Escamilla Chimal



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.

## **AGRADECIMIENTOS**

A todos mis Profesores y Maestras del Posgrado en Ciencias Biológicas, U.N.A.M. tanto de la Facultad de Ciencias como del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía-MVS, que con sus cátedras y ejemplos contribuyeron a mi formación profesional y me dieron luz en el camino del saber.

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la supervisión y el apoyo del Dr. y Ph.D. Julio Sepúlveda Saavedra.

A los Miembros del Jurado:

Dra. María Luisa Fanjul Peña

Dra. María Genoveva González Morán

Dra. Elsa Guadalupe Escamilla Chimal

Dra. Marcela Esperanza Aguilar Morales

Dr. Luis Felipe Jiménez García

Por la revisión del trabajo, dándome sus valiosas observaciones, comentarios y sugerencias para que quedara íntegra ésta presentación.

Un reconocimiento especial a la Dra. Elsa G. Escamilla Chimal quien me alentó a lograr mi propósito académico, proporcionándome su apoyo profesional, científico y hasta administrativo. Agradeciéndole infinitamente su compañerismo y amistad.

## DEDICATORIAS

A mis queridísimos padres Manuel y Lilia †

Que siempre, con su gran amor me brindaron su apoyo constante, velando siempre porque alcanzara mis propósitos. Alentándome para esquivar y superar los infortunios hasta alcanzar el éxito.

A mis hermanas(os): Edmé Lilia, Aileen Ivette, Héctor Antonio e Igal Arturo

Como ejemplo de perseverancia, agradeciéndoles también su entero apoyo y cariño.

A mi esposa Adriana:

Quien con su grandioso amor está alentando siempre mis ideales.

Compañera en todo momento de mis albores dichas y desvelos.

A mi hijo Juan Pablo:

Poseedor de una constante inquietud y cariño, sirvió de estímulo para alcanzar el éxito.

A todos mis familiares, amigos y compañeros de trabajo, que con su apreciado afecto y compañerismo me exhortaron al progreso.

## INDICE

Resumen bilingüe.

1. Generalidades del Sistema Nervioso.....	3
1.1. Corteza Cerebral .....	3
1.2. Estructuras Cerebrales (área motora) .....	4
1.3. Cerebelo .....	4
1.4. Puente .....	5
1.5. Médula espinal (astas anteriores) .....	5
2. Patología del sistema nervioso central .....	6
3. Sistema nervioso periférico .....	6
3.1. Estructura anatómica de los nervios periféricos .....	6
3.2. Estructura de las fibras nerviosas .....	8
3.3. Patología del sistema nervioso periférico .....	9
4. Antecedentes del estudio .....	14
5. Objetivos .....	15
6. Material y Métodos .....	15
7. Resultados .....	17
7.1. Corteza Cerebral Motora .....	17
7.2. Cerebelo .....	23
7.3. Puente .....	23
7.4. Médula Espinal .....	28
7.5. Nervios Ciáticos .....	29
7.5.1. Análisis Ultraestructural del Nervio Ciático .....	33
8. Discusión .....	35
9. Conclusión .....	37
10. Perspectivas .....	38
11. Referencias bibliográficas .....	39

ANÁLISIS MORFOLÓGICO DEL EFECTO TÓXICO DEL FRUTO DE LA *Karwinskia humboldtiana* EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y PERIFÉRICO DE RATAS

RESUMEN

El fruto de la *Karwinskia humboldtiana* (tullidora) causa alteraciones neurológicas después de la ingestión, caracterizadas por flaccidez simétrica y parálisis ascendente similar al síndrome de Guillain-Barré. En éste trabajo se describen las alteraciones morfológicas observadas en el sistema nervioso central y en los nervios periféricos producidas por la ingestión crónica del fruto de la tullidora. Se formaron cuatro grupos de ratas Wistar las cuales recibieron dosis fraccionadas del fruto molido en suspensión acuosa por vía oral mediante una sonda. Una dosis de 1.5g/Kg seguida de 4 dosis de 0.5 g/Kg a los 3, 7 10 y 14 días después de la dosis inicial (dosis total 3.5 g/Kg) el grupo control solamente recibió agua. Todos los animales fueron evaluados clínicamente. Las ratas se sacrificaron por dislocación cervical a los 24, 48, 58 y 112 días. Se extrajeron el encéfalo, el puente y la médula espinal y se fijaron en formalina al 10% amortiguada. Después los nervios ciáticos fueron fijados en glutaraldehído al 2.5%. Todas las muestras se procesaron con técnicas de rutina y especiales para su análisis mediante microscopía de luz. Una porción de nervio se procesó con la técnica para inclusión en resina epóxica, se obtuvieron cortes semifinos y ultrafinos para ser observados por microscopía de luz y electrónica respectivamente. Los animales tratados desarrollaron parálisis progresiva hasta el día 58 recuperándose completamente por el día 112. En los órganos del SNC se identificaron alteraciones morfológicas y estructurales tanto en las células nerviosas como en los tractos de fibras nerviosas relacionadas con las vías motoras. Los nervios mostraron desmielinización segmentada, pérdida de fibras e infiltrados celulares hasta el día 58 y cambios de remielinización en el día 112. Este modelo experimental es reproducible y de fácil manejo lo cual permitirá hacer estudios sobre el mecanismo patofisiológico de la enfermedad y probar nuevas terapias para la neuropatía periférica.

## MORPHOLOGIC ANALYSIS OF THE TOXIC EFFECT OF THE FRUIT *Karwinskia humboldtiana* IN THE CENTRAL AND PERIPHERAL NERVOUS SYSTEM OF RATS

### ABSTRACT

The fruit of the *Karwinskia humboldtiana* (buckthorn) cause neurological alterations after the ingestion, characterized by symmetrical flaccidity and ascending paralysis similar to the Guillain-Barre syndrome. In this work the observed morphologic alterations in the central nervous system and the peripheral nerves induced by the chronic ingestion of the fruit of the tullidora are described. Four groups of Wistar rats received oral doses of dried ground and sifted buckthorn fruit in an aqueous suspension through an esophageal tube. One dose of 1.5g/Kg followed of 4 doses of 0,5 g/Kg at days 3, 7, 10 and 14 after the initial dose (total dose 3.5 g/Kg) the group control only received water. All the animals were evaluated clinically. The rats were sacrificed by cervical dislocation to the 24, 48, 58 and 112 days. Soon were extracted the brain, cerebellum, pons and spinal cord, and they placed fixative solution of 10% buffered formalin. Later the sciatic nerves were fixed in 2.5% glutaraldehyde. All the tissue samples were processed with routine and special techniques and observed with light microscopy. Fragments of nerve were embedded in epon, semi thin and ultrathin sections were obtained and observed by light and electronic microscopy. Treated animals developed progressive paralysis through 58 days, and then completely recovered by 112 days. The SNC organs showed morphologic and structural lesions in the neurons as in the nerve tracts related with motor pathways. Sciatic nerves showed segmental demyelination, loss of fibers and cellular infiltrates until 58 days after exposure and them re-myelinating changes at 112 days. This experimental model is reproducible and easy to handle which will allow making studies on the patophysiological mechanism of the disease and may be useful to test new therapies for peripheral neuropathy.

# ANÁLISIS MORFOLÓGICO DEL EFECTO TÓXICO DEL FRUTO DE LA *Karwinskia humboldtiana* EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y PERIFÉRICO DE RATAS

## 1. GENERALIDADES DEL SISTEMA NERVIOSO.

El sistema nervioso es el conjunto de estructuras funcionalmente especializadas mediante las cuales el organismo responde adecuadamente a los estímulos que recibe, tanto del medio externo como del medio interno. De la forma en la que responde, depende la posibilidad de adaptación al ambiente y por tanto, la supervivencia.

**Sistema Nervioso Central (SNC)** se constituye por dos órganos principales unidos entre sí sin discontinuidad: el encéfalo (cerebro y cerebelo) contenido en el cráneo y la médula espinal alojada en el conducto raquídeo.

El **cerebro** está constituido por dos hemisferios, uno derecho y otro izquierdo, unidos por las comisuras interhemisféricas. En conjunto tiene forma ovoide de extremidad gruesa posterior. Dorsalmente corresponde a la bóveda craneal; su cara basal descansa hacia delante sobre los pisos anterior y medio de la base del cráneo y hacia atrás sobre el *tentorium* (tienda del cerebelo), que lo separa del cerebelo. La superficie de los hemisferios cerebrales está constituida por la corteza cerebral que en los mamíferos se desarrolla extraordinariamente y se pliega formando circunvoluciones o giros que se hallan separadas por surcos o cisuras de diferente profundidad. Desde el punto de vista evolutivo, los animales que poseen corteza se clasifican en dos grandes grupos: lisencéfalos, los que tienen corteza lisa, es decir, sin pliegues, y girencéfalos los que presentan circunvoluciones. La girencefalia parece complicarse a través de la escala evolutiva de los mamíferos, entre los cuales el hombre y el delfín se hallan entre los girencéfalos más complejos.

**1.1.** Los pliegues de la **corteza cerebral** presentan una superficie constituida por una gruesa capa de sustancia gris y debajo de ella una zona constituida por sustancia blanca. La sustancia gris se compone de 6 capas de células nerviosas o neuronas, son de forma estrellada o piramidal y varían en tamaño, siendo las más grandes las que se ubican en la quinta capa. Todas ellas se interrelacionan con células neuróglías (astrocitos, oligodendrocitos y microglía) y juntas se encuentran inmersas en el neuropilo (trama de aspecto fibrilar) constituido por todos los procesos membranosos de las prolongaciones citoplasmáticas de las células neurales, y también se encuentran los vasos sanguíneos que nutren y oxigenan al tejido. El espesor y distribución de las capas en la corteza varía de una región a otra en el cerebro.

Del exterior hacia el interior el nombre que reciben estas capas son:

- I. Capa molecular
- II. Capa granulosa externa
- III. Capa piramidal externa
- IV. Capa granulosa interna
- V. Capa piramidal interna
- VI. Capa polimorfa o multiforme

La sustancia blanca, se encuentra constituida por los axones o fibras nerviosas, astrocitos, oligodendrocitos y vasos sanguíneos. Debajo de los pliegues y en áreas centrales de los hemisferios se sitúan grupos de células nerviosas denominadas “núcleos de los hemisferios cerebrales” entre los que destacan, se mencionan a los ganglios basales, que corresponden a masas de sustancia gris situadas entre la sustancia blanca profunda.



## 1.2. Estructuras Cerebrales.

El estudio de la arquitectura cortical ha permitido definir ciertas áreas de los hemisferios cerebrales para establecer zonas funcionales de la corteza cerebral. La carta de Brodmann es de uso habitual en la clínica neurológica y para estudios neurofisiológicos experimentales; por ejemplo, el **Area Motora** se halla ocupando la mayor parte de la circunvolución precentral y la zona anterior del lóbulo paracentral (que se encuentra en la superficie medial del hemisferio) y que corresponde al área 4 de Brodmann, la que además ha sido subdividida teniendo en cuenta diferencias en la arquitectura celular. En cambio, para realizar estudios morfológicos (macroscópicos y microscópicos) se hace uso de coordenadas estereotáxicas de Bregma. Y en particular, nuestro estudio se centró en un área específica del cerebro, el área motora.

## 1.3. Cerebelo.

El cerebelo está formado por dos hemisferios entre los cuales se halla una porción media, el vermis que en la superficie superior sobresale de los hemisferios, los que descienden hacia los lados en ligero declive. La superficie de éste órgano presenta numerosos pliegues finos, las folias las cuales están separadas por surcos de diferente profundidad y además se disponen transversalmente en su mayor parte.

El cerebelo está unido al tallo cerebral por los tres pares de pedúnculos cerebelosos: los inferiores o cuerpos restiformes lo relacionan con el bulbo y la médula espinal; los medios o *brachia pontis* contienen fibras que se dirigen del puente al cerebelo, y los superiores o *brachia conjuntiva* conducen en su mayor parte fibras de los núcleos centrales del cerebelo al tallo cerebral y al diencefalo.

La corteza cerebelosa presenta el mismo modelo estructural y los mismos tipos de conexiones sinápticas en todas sus regiones. Histológicamente se definen tres capas:

- I. Externa o molecular
- II. Intermedia ganglionar o de células de Purkinje
- III. Interna o granular

Hay cinco tipos de neuronas en la corteza: las células de Purkinje, las células de Golgi, las células estrelladas externas, las células en canasta y las células granulosas.

La capa molecular se forma en gran parte por las ramas de bifurcación de los axones de las células granulosas, que cursan siguiendo el eje longitudinal de las folias, también se hallan las arborizaciones dendríticas de las células de Purkinje y de las de Golgi. Contiene los pequeños somas, dendritas y axones de las células estrelladas externas (Golgi tipo I o de axón largo y tipo II de axón corto) y de las células en canasta, las cuales tienen un soma pequeño y da origen a dendritas que se ramifican en la parte profunda de la capa molecular; su axón sigue un trayecto paralelo y al pasar sobre un cierto número de células de Purkinje, emite colaterales descendentes que establecen sinapsis con la parte basal de éstas células. Las células de Purkinje son las neuronas más características del cerebelo, su soma tiene aspecto piriforme, de la parte superior estrecha, se origina una gruesa dendrita que luego se subdivide en dos o tres secundarias las que originan un exuberante penacho.

Los axones de las células de Purkinje terminan en su mayor parte en los núcleos centrales del cerebelo, pero algunos llegan directamente a los núcleos vestibulares. La capa granulosa contiene una numerosa población neuronal, las células son pequeñas, de soma esférico, con dendritas escasas y cortas en forma de garra y forman parte de los glomérulos cerebelosos para hacer contacto con las fibras musgosas y las células de Golgi. El fino axón de las células granulosas asciende a la capa molecular y se bifurca en T. Las células de Golgi se hallan en la parte superficial de la capa granular y por debajo de las células de Purkinje. Tienen un soma grande de forma estrellada, del que se origina un árbol dendrítico muy frondoso en espigas que se expande en la capa molecular.

#### **1.4. El Tallo Cerebral**

Está constituido por las estructuras derivadas de las tres últimas vesículas cerebrales secundarias, entre ellas el metencéfalo del cual proviene el **Puente** ventralmente y el cerebelo dorsalmente. La característica más importante del puente, es la aparición en su parte ventral de una ancha banda transversal, la porción basilar, formada por fibras pontocerebelosas, entre las cuales pasan, disociadas, las fibras de los haces corticoespinales. Dorsalmente se encuentra el piso del cuarto ventrículo en cuya parte lateral, bajo el área acústica se hallan los núcleos vestibulares y lateralmente a éstos los cocleares dorsal y ventral, en relación con el cuerpo restiforme; los núcleos vestibulares y cocleares pertenecen al VIII nervio.

#### **1.5. Médula Espinal.**

La médula es un órgano cilíndrico y en la mayor parte de su extensión está ligeramente aplanada en sentido ventrodorsal. Presenta dos ensanchamientos uno braquial, y otro lumbar, en relación con los nervios que se distribuyen, respectivamente, por los miembros superiores e inferiores. Muestra 4 caras que son: la ventral o anterior, las laterales y la dorsal o posterior. Al hacer un corte transversal de la médula aparecen dos aspectos distintos en el tejido nervioso que la constituye; en el centro, de color amarillo pardo, se halla la sustancia gris y en la periferia, rodeando a aquella, se ve la sustancia blanca formando los llamados cordones medulares: ventrales, laterales y dorsales. Los cordones dorsales están separados en la línea media por un tabique que parte del surco medio dorsal y llega hasta la sustancia gris, llamado septum medio dorsal.

El aspecto general de la sustancia gris es de una H o de una mariposa con las alas extendidas. Se compone de las siguientes regiones: dos astas dorsales, dos astas laterales, dos astas ventrales y la comisura gris, parte intermedia que une ambos lados de la sustancia gris y ahí se encuentra el conducto o canal ependimario.

En la médula, la sustancia gris está constituida por cúmulos de neuronas y glía; algunas neuronas quedan totalmente dentro de ella (axón corto o de Golgi tipo II), otras de axón largo (o Golgi tipo I), lo envían a los cordones medulares o a las raíces ventrales, permaneciendo en la sustancia gris el cuerpo celular y las dendritas. La sustancia blanca está formada por fibras nerviosas (axones de las neuronas) generalmente revestidas de mielina y por glía. Las proporciones de sustancia gris y blanca varían según la región de la médula considerada; en general, cuanto más inferior sea el nivel medular que se observa, mayor será la cantidad de sustancia gris y menor, proporcionalmente, la de sustancia blanca.

En general en las neuronas de las astas dorsales se recibe información de la periferia a través de las raíces dorsales de los nervios espinales, que contienen las ramas centrales de las neuronas aferentes cuyo soma se encuentra en los ganglios espinales. La prolongación periférica de estas neuronas termina en relación con receptores distribuidos en el tegumento, músculos, articulaciones y vísceras, del cuello hacia abajo. Y en las astas ventrales, algunas neuronas reciben la información procesada de las neuronas sensitivas del asta dorsal y otras la reciben directamente de los somas contenidos en los ganglios, por lo que la respuesta a la información recibida se llevará a cabo por las neuronas eferentes llamadas motoneuronas; particularmente, estas neuronas originan axones que salen de la médula por las raíces ventrales, cursan por los nervios espinales y periféricos, y terminan en las fibras musculares estriadas formando complejos neuromusculares (placas motoras) (López-Antúnez, 1983; Junqueira y Carneiro, 2000; Gartner y Hiatt, 2002).

## **2. Patología del Sistema Nervioso Central**

Cada área del sistema nervioso tiene funciones específicas y las lesiones circunscritas (focales) del sistema nervioso producen síntomas y signos clínicos característicos; los estudios neurológicos y neurofisiológicos pueden identificar estos síntomas y signos, y sugerir la localización neuroanatómica apropiada para la alteración. Teniendo de esta manera una clasificación de síndromes ocasionados por alteración o daño de ciertas regiones del cerebro, por ejemplo el síndrome del lóbulo occipital, síndromes cerebelosos y síndromes de la médula espinal. Se pueden presentar otras lesiones que causan alteraciones estructurales y funcionales específicas en estos órganos como son: edema cerebral, trombosis, hemorragia intracerebral, hipoxia, isquemia e infarto (secundario a lesiones vasculares). Hay enfermedades que pueden ser originadas por infecciones (bacterianas, fúngicas y virales) y por parásitos (toxoplasmosis y cisticercosis). Otras enfermedades son producidas por trastornos neurodegenerativos (Alzheimer y Parkinson), por tumores diversos (como los gliomas), por alteraciones neurometabólicas debidas a deficiencias enzimáticas. Hay alteraciones que se originan por trastornos en la vaina de mielina produciendo desmielinización (esclerosis múltiple) por procesos inflamatorios agudos o crónicos y autoinmunológicos. También están las enfermedades tóxicas causadas por la ingesta de líquidos o sólidos, metales pesados, fármacos y drogas, y las enfermedades nutricionales por deficiencias vitamínicas o por hipoglucemia, por excesos de amonio, por uremia o por depósitos de bilirrubina en el cerebro. Por lo que entonces las encefalopatías y mielopatías son todas aquellas alteraciones que se producen debido a cambios morfológicos, estructurales y/o funcionales en las células nerviosas o neuronas, en las células neuróglícas y/o en los axones o fibras nerviosas (Brumback y Leech, 1995).

### **3. Sistema Nervioso Periférico.**

El sistema nervioso periférico (SNP) comprende todo el tejido nervioso fuera del encéfalo y la médula espinal, de los cuales surgen los nervios craneales y espinales que contienen las prolongaciones de las neuronas aferentes y eferentes. Cada uno de estos tipos de neuronas se subdivide en somáticas y viscerales. Las neuronas aferentes somáticas conducen información de receptores situados en la piel, mucosas ectodérmicas, músculos, tendones, articulaciones y oído. Las neuronas aferentes viscerales llevan impulsos originados en los receptores de las vísceras, gustativos y olfativos. Las neuronas eferentes somáticas inervan el músculo estriado derivado de las somitas. Las neuronas eferentes viscerales llevan impulsos a los efectores viscerales: músculo liso, músculo cardíaco, glándulas y el músculo estriado que está en relación con el esqueleto visceral que proviene de los arcos branquiales.

Los nervios espinales contienen fibras aferentes y eferentes tanto somáticas como viscerales. Los nervios craneales tienen una organización muy variable en cuanto a las fibras que los forman. Algunos, como el X (vago) poseen hasta cinco variedades de ellas. Los componentes viscerales del sistema nervioso periférico y los ganglios paravertebrales, prevertebrales y paraviscerales a ellos asociados, constituyen el sistema neurovegetativo que se subdivide en parasimpático y simpático e interviene en la regulación de la actividad de las vísceras.

#### **3.1. Estructura Anatómica de los Nervios Periféricos.**

Los nervios periféricos constituyen un intrincado sistema de conducción que sirve como mediador a los impulsos nerviosos que viajan en ambas direcciones entre el sistema nervioso central (SNC) y otros tejidos del cuerpo, y a través de los cuales son reguladas muchas funciones orgánicas importantes. Con fines descriptivos los nervios periféricos pueden clasificarse según su función y origen en el SNC en: nervios craneales que emergen de la base del encéfalo; nervios espinales que se originan en la médula espinal; y sistema nervioso autónomo que está intrincadamente asociado con los nervios craneales y espinales, pero difiere en función y detalles de estructura y distribución.

Los nervios periféricos están constituidos por diferentes tipos de fibras, dependiendo esto del calibre de las mismas, de su velocidad de conducción, de la duración de la espiga del potencial de acción, de la duración y existencia de pospotenciales, etc. Los factores más importantes, cuando menos desde el punto de vista práctico, parecen ser el calibre de la fibra y por consiguiente la velocidad a que conduce. De acuerdo con esto, las fibras de los nervios periféricos fueron clasificadas por Erlanger y Gasser (1937), citado por Barr (1975) y López Antúnez (1983), en tres grupos a los que llamaron **A**, **B** y **C**.

Las fibras **A**, mielínicas, son las más gruesas y por consiguiente, las de mayor velocidad de conducción. Las fibras **B**, también mielínicas, corresponden principalmente a las fibras preganglionares del sistema visceral, y las fibras **C**, amielínicas, se encuentran así mismo en el sistema visceral como fibras postganglionares, y corresponden también a algunos tipos de fibras sensoriales, somáticas y viscerales.

En los nervios periféricos existen tres vainas: **epineuro**, la más externa; el **perineuro**, la intermedia, y el **endoneuro**, situada internamente.

El **epineuro** está constituido por fibras colágenas y elásticas que forman una envoltura en todo el nervio. Representa a la duramadre en los nervios periféricos. Forma una matriz laxa que cubre a los fascículos de fibras, protegiéndolos contra las fuerzas que tienden a deformarlos. Por el epineuro cursan los vasos que irrigan al nervio.

El **perineuro** contiene fibras colágenas dispuestas en varios sentidos formando láminas, separadas por células aplanadas y especializadas, orientadas circularmente formando lamelas concéntricas. El perineuro cubre a fascículos de fibras del sistema nervioso periférico por completo, incluyendo estructuras autónomas y de las raíces espinales, donde se continúa con la piamadre a las terminaciones nerviosas distales. En terminaciones sensoriales, el perineuro se une con las vainas envolviendo a los órganos terminales.

Las células perineurales tienen una cantidad moderada de organelos citoplásmicos y numerosas vesículas pinocíticas grandes; además están presentes en el citoplasma unas estructuras parecidas a miofilamentos, en vista de lo cual, se ha postulado un papel de contractilidad para el perineuro. Estas estructuras están revestidas externamente por una lámina basal. Se ha mostrado que en la unión neuromuscular, las prolongaciones de la

célula perineural forman una cubierta con aspecto de campana que no hace contacto directo con la fibra. Existe un espacio de unión llamado "unión gap o nexo", de 1 a 1.5  $\mu\text{m}$  situado entre la terminación de la vaina perineural y la lámina basal que envuelve a la fibra muscular, (Dick et al., 1984).

Muchos estudios sostienen el concepto de una barrera perineural, que funciona para muchas macromoléculas, así como el de transportar selectivamente materiales y fluidos del exterior hacia los espacios endoneurales.

El **endoneuro** es el espacio limitado entre las células perineurales y las fibras nerviosas. Los constituyentes endoneurales incluyen fibras colágenas, orientadas longitudinalmente de manera general, junto con finas fibrillas y material granular amorfo. Las fibras colágenas están frecuentemente agrupadas en paquetes. En muchas neuropatías crónicas, el área endoneural total aumenta, caracterizándose esto por el incremento en la cantidad de fibras colágenas y del espacio intersticial.

Otros elementos presentes son los fibroblastos, aún cuando no son numerosos. Son fácilmente identificados dentro del endoneuro, son característicos por su forma y sus largos y tenues procesos que van de 1 a 4 en cortes seriados; se les encuentra situados en los septos subperineural y endoneurales. En cortes longitudinales y vistos al microscopio de luz, los fibroblastos son raramente distinguibles de las células de Schwann.

Ultraestructuralmente, los fibroblastos son identificables en cualquier plano de corte por la ausencia de membrana basal y por el citoplasma rico en ribosomas y retículo endoplásmico granular. Como una regla general, los fibroblastos representan el 5 % o menos de todas las células que están dentro del espacio rodeado por el perineuro. El 90 % son células de Schwann y el resto son células endoteliales, pericitos y mastocitos ocasionales.

En estados patológicos, la respuesta usual de los fibroblastos es a proliferar; sin embargo, su proporción con respecto a todas las células no cambia mucho, porque las células de Schwann proliferan mucho más en respuesta a estímulos patológicos, (Asbury y Johnson, 1978).

Las vainas de los nervios periféricos parecen desempeñar funciones muy importantes: a) difusión de sustancias dentro del nervio, b) regulación de la presión intrafascicular y c) regeneración nerviosa, (López Antúnez, 1983).

### **3.2. Estructura de las fibras nerviosas.**

Están constituidas por un axón y por sus vainas envolventes. Los grupos de fibras nerviosas forman haces o tractos del sistema nervioso central y los nervios del sistema nervioso periférico. El axón es una prolongación neuronal protoplásmica, única y alargada, con la función especializada de conducir impulsos desde la zona dendrítica y termina en cierto número de botones terminales o telodendrones axónicos. Aunque el cuerpo celular usualmente está localizado en la zona dendrítica, puede yacer dentro del axón (por ejemplo en las neuronas auditivas) o estar unido al lado de él (por ejemplo en una neurona bipolar). El tamaño de las neuronas y la longitud de sus prolongaciones varían mucho en diferentes partes del sistema nervioso.

Los axones del tejido nervioso adulto están envueltos por pliegues únicos o múltiples formados por una célula envolvente. En las fibras nerviosas periféricas esta célula se denomina "célula de Schwann". En el SNC las células envolventes son los oligodendrocitos. Los axones de pequeño diámetro están envueltos por un único pliegue de la célula envolvente, constituyendo las fibras nerviosas amielínicas. En los axones de mayor calibre, la célula envolvente forma un repliegue envolviendo en espiral al axón. El conjunto de estas envolturas concéntricas se denomina "vaina de mielina" y las fibras se llaman fibras nerviosas mielínicas.

Los axones se presentan por lo general como prolongaciones únicas y netamente definidas. Se originan habitualmente en el soma y aparecen como una elevación cónica, llamada "cono de origen o montículo del axón", pero pueden nacer también en la parte basal de la dendrita troncal.

El cono axónico se describe como una región del pericarion que es distinguida por su deficiencia de substancia de Nissl o material basófilo. Tal zona es fácilmente aparente en microfotografías electrónicas de grandes neuronas, en las cuales el cono axónico tiene una cantidad considerablemente reducida de retículo endoplásmico granular. Los organelos predominantes en el citoplasma de esta región son ribosomas libres y mitocondrias, y los neurofilamentos y microtúbulos que pasan al interior del axón.

### **3.3. Patología del Sistema Nervioso Periférico.**

Es sabido que las neuronas no se dividen, por lo que su destrucción representa una pérdida permanente. Sus prolongaciones, no obstante, pueden regenerarse dentro de ciertos límites debido a la actividad sintética de los respectivos pericariones dado que estos no están lesionados. Cuando una célula nerviosa se destruye, las que están unidas a ella no sufren, excepto en los casos raros en que una neurona recibe impulsos exclusivamente de otra. En este caso, la neurona que queda completamente privada de impulsos nerviosos por la destrucción de la otra sufre la llamada "degeneración transneuronal".

En contraste con los elementos nerviosos, las células de la neuroglía, así como su equivalente en el SNP (células de Schwann y células satélites de los ganglios nerviosos) están dotadas de gran capacidad de proliferación. Los espacios dejados por las células y fibras nerviosas del SNC destruido por accidente o enfermedad se rellenan de células de neuroglía.

Debido a su distribución por todo el cuerpo, las lesiones de los nervios son relativamente frecuentes. Cuando un nervio es seccionado, se producen alteraciones degenerativas, seguidas de una fase de reparación.

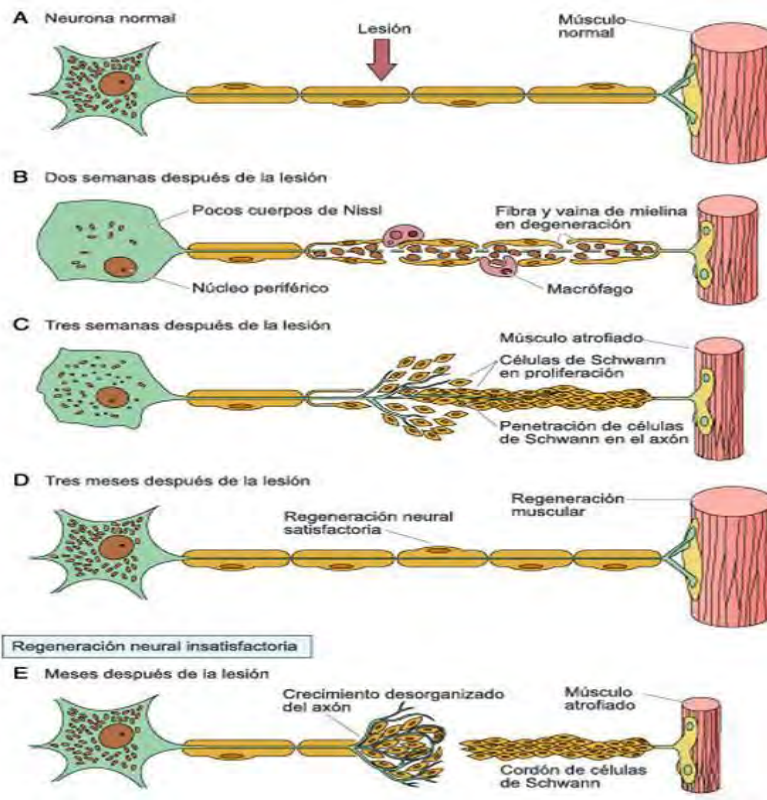
En un nervio lesionado se debe distinguir la parte de la fibra que por la lesión se separó de su neurona (parte distal) y la parte que continúa unida a la neurona (parte proximal). El segmento proximal frecuentemente se regenera por mantener contacto con el pericarion que es el centro trófico, mientras que el segmento distal degenera por completo y acaba siendo reabsorbido.

La figura 1, explica de modo esquemático las modificaciones que ocurren en las fibras lesionadas y en los respectivos pericariones. El cuerpo celular cuyo axón sufre lesión muestra las siguientes alteraciones:

- a. Cromatolisis, es la disolución de los corpúsculos de Nissl y consecuentemente disminución de la basofilia citoplásmica.
- b. Aumento del volumen del pericarion.
- c. Desplazamiento del núcleo a la periferia del pericarion. Una pequeña extensión de la fibra lesionada degenera junto a la herida, pero su crecimiento se inicia una vez que los macrófagos remueven los restos degenerados, (Barr, 1975; López Antúnez, 1983; Robbins et al., 1986; Chusid, 1987; Junqueira y Carneiro, 2000; Gartner y Hiatt, 2002).

La neuropatía periférica es la alteración más común y consiste en cambios degenerativos en los nervios periféricos, que causan pérdidas de sensibilidad y debilidad motora. Se afectan primero las porciones distales de los nervios con síntomas en las manos o pies. Hay múltiples causas de la neuropatía periférica, incluyendo deficiencias nutricionales, infecciones bacterianas (lepra) y virales, toxinas de varias clases y desórdenes metabólicos como la diabetes. Independientemente del agente etiológico aparente, es probable que la avitaminosis, especialmente la del complejo B sea un factor importante en muchos casos (Ortiz-Hidalgo y Weller, 1992).

La degeneración de un nervio periférico a raíz de un corte o alguna lesión a nivel más proximal, está siempre acompañada por cambios reactivos en las células de Schwann. Los axones que han sido seccionados de su centro trófico o sea del cuerpo celular, degeneran en un lugar distal a la sección. Este proceso degenerativo recibe el nombre de **degeneración walleriana**. Incluye toda la parte distal de un axón así como sus ramificaciones terminales. Si bien es posible observar los primeros síntomas cerca de la parte seccionada, los cambios afectan a toda la región distal de manera más o menos simultánea.



**Figura 1.-** Degeneración y regeneración del axón con cambios en el soma neuronal. Se muestran cambios locales, una reacción anterógrada y reacción y regeneración retrógrados. Tomado de Gartner y Hiatt, 2002.

Los primeros cambios en el axón se producen en los nódulos de Ranvier con el edema del axón y la rotura de las mitocondrias. A las pocas horas empiezan a fragmentarse las partes paranodales de la vaina de mielina y comienzan a aparecer gran cantidad de hendiduras en los internódulos que se asemejan a las cisuras de Schmidt-Lanterman. A esto sigue la fragmentación de toda la vaina miélinica que aparece como una cadena de materia ovoide o vesicular en los preparados teñidos con colorantes normales para la mielina (tal como el tetróxido de osmio). Estas masas se vuelven más densas y fragmentadas y junto con los desechos del axoplasma degenerado son fagocitadas por las células de Schwann que invaden la parte afectada del nervio desde la corriente sanguínea. Estas células se llenan con vacuolas y cuerpos densos y heterogéneos de gran tamaño, que contienen en su mayor parte lípidos provenientes de la degeneración adicional de los fragmentos de mielina.

Las células de Schwann se hipertrofian y aumentan considerablemente de número. La proliferación puede continuar por espacio de tres semanas y el número de células puede incrementarse hasta más de 10 veces la población original. Resulta obvio que extensas partes de la membrana de la célula de Schwann sufren alteraciones en el curso de la fragmentación de la vaina miélinica, pero en realidad hay pocas que mueren. Durante el curso de su proliferación las células de Schwann parecen liberarse de la lámina basal que las rodea, permaneciendo ésta como una serie de tubos orientados longitudinalmente. Las células de Schwann forman a lo



largo de éstos tubos una masa interdigitada de prolongaciones citoplásmicas que, junto con la materia de los tubos nombrados, parece guiar a los brotes axónicos en regeneración hacia el segmento degenerado distal, o sea desde el lugar proximal del corte hasta su parte distal.

Los compartimientos formados por las prolongaciones interdigitadas de las células de Schwann y la lámina basal reciben el nombre de "tubos de Schwann" o "bandas de Von Büngner".

A medida que avanza la regeneración de los axones, las células de Schwann se vuelven más ordenadas, colocándose gradualmente en formación lineal sobre la base de los tubos remanentes de la lámina basal. Los nuevos axones se invaginan dentro de los tubos y comienzan a mielinizarse de nuevo. Los nuevos internódulos de mielina son, por lo general, más cortos y delgados que aquellos del nervio normal.

Otra de las neuropatías periféricas que se presenta es la **desmielinización segmentada** la cual empieza por un ensanchamiento de la unión nodal. El patrón es casual, es decir que no hay un agrupamiento sistemático de la desmielinización en ciertas fibras, como ocurre en la neuropatía urémica con una desmielinización secundaria. Muchos internodos de la misma fibra tienden a diferir con la edad y la severidad.

Ultraestructuralmente, los primeros cambios vistos son en el nodo de Ranvier, aunque las cisuras de Schmidt-Lanterman pueden mostrar cambios simultáneamente. La mielina terminal se separa en asas del axolema, de la célula de Schwann nodal aparecen dedos hinchados de citoplasma y también restos de mielina, particularmente del colapso de la lamela interna de la mielina en asas terminales adyacentes al axolema.

Al evolucionar la desmielinización, ocurren retracciones adicionales de las asas terminales, y se incrementan las cantidades de los restos de mielina acumulados en el citoplasma de las células de Schwann paranodales, las cuales a menudo se desprenden del nodo de Ranvier, además de este modo se ensancha la unión nodal dejando ésta cubierta sólo por membrana basal.

Varios días después de la desintegración de la mielina, aparecen en el tejido numerosos macrófagos y fagocitan los restos de mielina parcialmente digerida, frecuentemente junto con un delgado borde de citoplasma de la célula de Schwann.

Todos estos cambios han sido posibles de observarse mediante los estudios hechos con las toxinas de la difteria, la cual produce una neuropatía desmielinizante pura en muchos animales de laboratorio; derivándose de todo esto el entendimiento de los caracteres morfológicos y electrofisiológicos de la desmielinización y remielinización en el SNP (Asbury y Johnson, 1978).

Resumiendo, los mecanismos patológicos de la desmielinización segmental son:

- 1) usualmente implica una destrucción primaria de la vaina de mielina dejando intacto al axón.
- 2) a menudo principia en los nodos de Ranvier.
- 3) desde el punto de vista fisiológico, las conducciones resultan en bloqueo total o disminuyen marcadamente.
- 4) el músculo no se denerva, pero puede sufrir atrofia por desuso si la parálisis se prolonga.
- 5) no se presenta la cromatolisis del cuerpo celular nervioso.
- 6) La proliferación de la célula de Schwann no es tan intensa como en la degeneración walleriana.

7) una vez que empieza la remielinización, la recuperación es rápida.

8) la recuperación es frecuentemente completa.

Otra de las enfermedades del SNP es la **degeneración axonal**, la cual mediante estudios ultraestructurales se estableció como una neuropatía de naturaleza retrógrada, demostrándose que los cambios tempranos toman lugar en las prolongaciones distales del nervio intramuscular y en terminales axonales del *nucleus gracilis* de la parte superior de la médula cervical.

El primer cambio es la marcada acumulación de neurofilamentos, a menudo en el punto de distensión de los nervios terminales. Las fibras miélicas grandes son las más severamente afectadas.

Por medio de estudios experimentales de una neuropatía por acrilamida (Edwards, et al. 1991), se ha visto que los cambios iniciales ocurren en la porción terminal de los axones sensoriales. Dentro de los corpúsculos de Pacini retraídos aparecen mitocondrias degeneradas, cuerpos densos y cúmulos de neurofilamentos. El axón terminal completamente desintegrado es fagocitado por células adyacentes a la terminación sensorial. También ocurren cambios en algunos nodos de Ranvier preterminales, con hinchazón de las regiones nodal y paranodal debido a la acumulación intra-axonal de masas de neurofilamentos, mitocondrias y cuerpos densos membranosos. Los procesos de la degeneración que inician en la fibra nerviosa son centrípetos, afectando primero a las fibras grandes y largas (Asbury y Johnson, 1978).

En resumen, tenemos que los pasos de los mecanismos patológicos básicos de la degeneración axonal, son los siguientes:

1) esta patología implica desarreglo metabólico de toda la neurona, pero se manifiesta como mortal para ella al lado opuesto de la porción distal del axón.

2) la vaina de mielina se colapsa conjuntamente con el axón; la desmielinización secundaria puede ocurrir más proximalmente donde el axón, aunque atrófico esté todavía intacto.

3) fisiológicamente, la conducción es relativamente normal o poco reducida.

4) los músculos, particularmente los distales, muestran cambios similares a los ya vistos en la degeneración walleriana.

5) la cromatolisis puede estar presente en casos severos, de manera similar a la degeneración walleriana.

6) la proliferación de células de Schwann es más discreta y prolongada que en la degeneración walleriana.

7) la recuperación puede ocurrir por regeneración de axones que reinervan estructuras denervadas en la periferia.

8) la recuperación puede ser sólo parcial, dependiendo de las bases de la neuropatía, de su severidad y de la edad del individuo.

La degeneración de los axones distales de largas y grandes fibras nerviosas periféricas, es tal vez la lesión más común en las intoxicaciones. Esta degeneración de las fibras nerviosas puede tener su origen en:

1°. Por una lesión metabólica, si bien que el cuerpo celular pueda parecer morfológicamente normal de las neuronas centrales que les dan origen, ya sean encefálicas o medulares y se denomina axonopatía distal centro-periférica o degeneración axonal retrógrada, por incapacidad de mantener un ritmo de síntesis para conservar las áreas axonales más distales.

2°. Por una lesión primaria del sistema nervioso periférico, situada en segmentos del axón.

3°. La axonopatía o neuropatía producida o asociada a una lesión de la vaina miélica, secundaria a una alteración axonal primaria en que ésta es incapaz de mantener metabólicamente la viabilidad de la mielina.

4°. La lesión directa de los oligodendrocitos o de las células de Schwann, seguida de degeneración de la vaina, lo que determina un proceso secundario degenerativo y atrófico de las fibras nerviosas, las cuales pueden ser envueltas más tarde por astrocitos o fibroblastos, (Schaumburg y Spencer, 1976 y 1979).

La sintomatología se inicia con debilidad muscular, calambres, prurito, adormecimiento de brazos y piernas, seguida de atrofia muscular y dificultad para caminar. Hay pérdida progresiva de reflejos tendinosos. Además se altera hasta desaparecer, la sensibilidad al tacto, al dolor y a las vibraciones.

#### 4. ANTECEDENTES DEL ESTUDIO

*Karwinskia humboldtiana* (*K.h*) conocida también como tullidora, coyotillo o capulín tullidor, es un arbusto venenoso de la familia de las *Rhamnaceae*. Está constituido por arbustos y árboles pequeños que crecen en zonas tropicales y en áreas desérticas, incluye alrededor de 15 especies de árboles y arbustos cuyo hábitat natural se extiende desde el sur de los Estados Unidos de América hasta el norte de Colombia, Cuba, Haití y República Dominicana. En la República Mexicana se han identificado alrededor de once especies (Fernández, 1992).

Crece como arbusto silvestre y produce una drupa de color violeta oscuro cuando está maduro, de medio a un centímetro de diámetro, de endocarpio leñoso, que encierra frecuentemente dos semillas fértiles y dos abortadas, contiene una sustancia amarilla, soluble en agua y un sabor dulce debido a su contenido de glucosa.



**Figura 2.**-Fotografía del arbusto de *K. humboldtiana* y su fruto en diferentes estados de maduración.

El fruto de *K.h* después de ser ingerido accidental o experimentalmente, produce en tres a cuatro semanas una polineuropatía en humanos y animales cuyo cuadro clínico está caracterizado por parálisis flácida, simétrica, progresiva y ascendente, iniciándose en las extremidades inferiores de donde asciende progresivamente afectando a los segmentos superiores del cuerpo, hasta presentarse parálisis bulbar que puede ocasionar la muerte (Puértolas et al, 1984; Padrón, 1951). Si el individuo afectado sobrevive, la recuperación se hace paulatinamente, en forma espontánea, desapareciendo la parálisis en orden inverso al de aparición, lentamente hasta obtenerse recuperación funcional completa (Bermúdez, 1995; Arellano et al, 1994; Martínez, 1994).

Actualmente, existen casos de intoxicación accidental en humanos que son diagnosticados erróneamente, debido a que el cuadro clínico de esta polineuropatía se confunde con el de la poliomielitis y el Síndrome de Guillain-Barré, entre otras patologías similares (Castillo, 1920; Arellano et al, 1994; Segovia y Fernández, 1972; Bustamante et al, 1978; Puértolas et al, 1984; Bermúdez et al, 1986 y 1995; Ocampo et al, 2007). A través del tiempo, en un intento por dilucidar los mecanismos involucrados en el desarrollo de la intoxicación, cuyo síntoma principal es la parálisis ascendente, se han realizado trabajos experimentales que en su gran mayoría se han orientado al estudio del sistema nervioso periférico y donde se describe a la desmielinización segmentada

como alteración principal en nervios periféricos de miembros inferiores (Escobar y Nieto, 1965; Charlton y Pierce, 1970; Muñoz y Chávez, 1979; Muñoz et al, 1983; Bermúdez et al, 1986; Salazar et al., 2006).

Existen en la literatura únicamente tres reportes en animales de laboratorio intoxicados de forma aguda con *K.h*, en los que se describen en forma general las alteraciones en la médula espinal, corteza cerebelosa, puente, corteza motora e hipocampo, a tiempos muy cortos post-intoxicación (Padrón,1951; Padrón,1956; Ortiz,1992). Durante la intoxicación aguda, los animales desarrollan rápidamente la parálisis y mueren a los pocos días, no permitiendo que se desarrolle el cuadro clínico descrito anteriormente, por lo que no es posible observar y estudiar el proceso de recuperación como ocurre en el humano.

En México se han publicado diversos trabajos en donde se describen observaciones clínicas o experimentales sobre los efectos paralizantes de la *K.h*. Entre esas publicaciones destaca el trabajo clínico de Castillo (1920), que describe la intoxicación de 106 soldados en donde menciona haber practicado tres autopsias en las que al realizar el examen macroscópico menciona solo ligera disminución del volumen de algunos nervios periféricos” sin haber encontrado “lesiones visibles en la médula, meninges o cerebro y concluyó, basándose en el estudio clínico, que seguramente se trataba de una *polineuritis tóxica* y no de lesiones de la médula espinal, ya que los enfermos que se curaban mostraban una recuperación funcional completa y los muy graves fallecían debido a lesiones de los nervios de origen bulboprotuberancial, como sucede en otras polineuritis.

Por otra parte, Segovia y Fernández (1972) reportaron el caso de un paciente en el cual el diagnóstico de polineuritis se efectuó por el antecedente de la ingestión de la fruta de *K.h*, así como por el cuadro típico de parálisis simétrica, progresiva, ascendente y por el estudio del líquido cefalorraquídeo, siendo corroborada la lesión del nervio periférico mediante el estudio electromiográfico. Bustamante y colaboradores (1978) reportan otro caso de intoxicación por el mismo fruto, a este paciente se le diagnosticó cuadriparesia flácida con arreflexia bulbar, paresia de los músculos intercostales y diafragmáticos. En otro caso, Bermúdez y cols. (1986) hacen mención de la intoxicación de una familia en donde 10 de sus 13 miembros murieron, a los cuales se les diagnosticó una polirradiculoneuritis por desmielinización segmentada. Y en otro estudio, al intoxicar ratones con la T-544 describió alteraciones en nervios periféricos, además en los animales que sobrevivieron cinco días o más, presentaban alteraciones de las láminas de mielina, sin infiltrado inflamatorio en este tejido.

Las alteraciones en el sistema nervioso periférico han sido estudiadas extensamente. Sin embargo, las interrogantes sobre cuales células están involucradas o mediadores son responsables de los mecanismos de degeneración y regeneración después de una alteración son controversiales. Aún cuando se ha reportado ampliamente que los macrófagos y las células de Schwann juegan un papel importante en la degradación y remoción de la mielina (Raposo et al., 1997).

Estudios realizados por Olsson (1968) y Olsson y Sjostrand (1969) han reportado la participación de las células cebadas durante la degeneración Walleriana.

## **5. OBJETIVOS GENERALES**

Analizar la morfología de regiones del encéfalo (corteza motora, corteza cerebelosa y puente), de la médula espinal (asta motora) y de los nervios periféricos (nervio ciático) de ratas Wistar para identificar cambios estructurales y establecer una correlación entre las alteraciones del SNC y SNP con el desarrollo de la polineuropatía en diferentes etapas, por la intoxicación con el fruto de la *Karwinskia humboldtiana*.

### **Objetivos Particulares**

**5.1.** Analizar la morfología del SNC (encéfalo y médula espinal) e identificar alteraciones estructurales a través de microscopía de luz empleando técnicas de rutina y especiales.

**5.2.** Analizar la morfología de los nervios periféricos (nervios ciáticos) aplicando métodos de rutina y especiales mediante microscopía de luz.

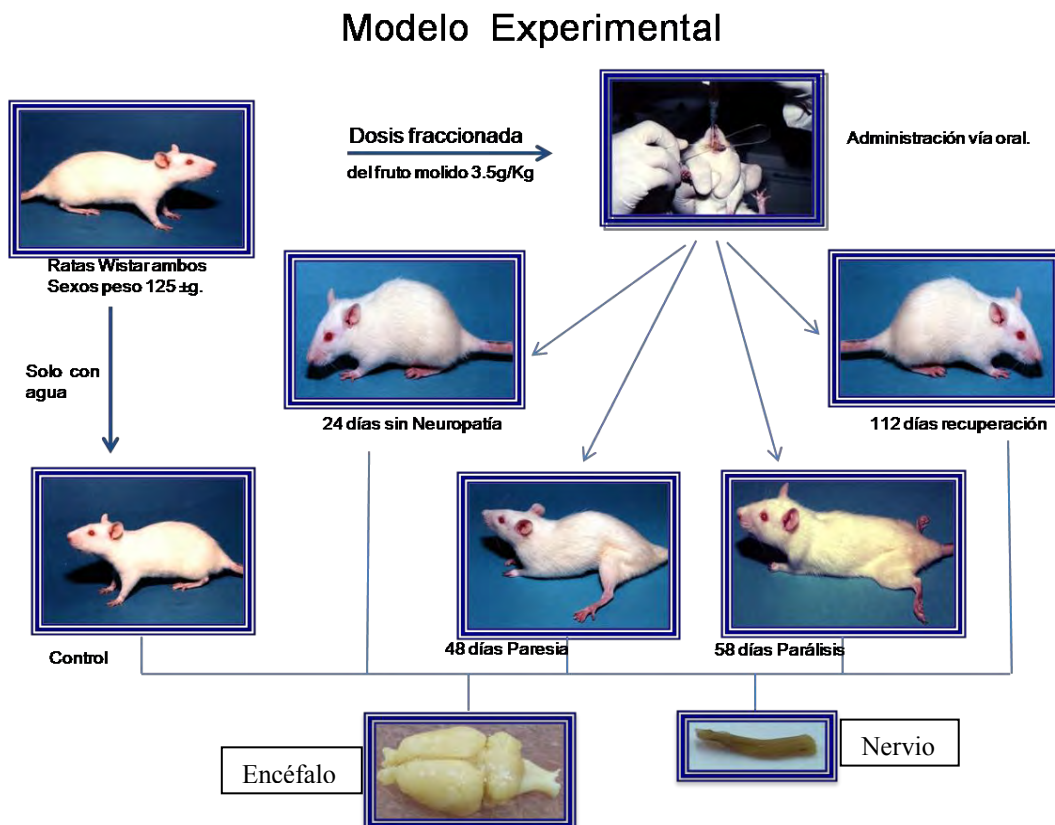
**5.2a.** Identificar las alteraciones morfológicas en los nervios por medio de microscopía óptica de alta resolución.

**5.2b.** Analizar las alteraciones ultraestructurales en los fascículos nerviosos a través de microscopía electrónica de transmisión.

## 6. MATERIAL Y METODOS

En el trabajo realizado se generó un modelo de polineuropatía tóxica al administrar a ratas Wistar el fruto completo maduro, seco y molido de *Karwinskia humboldtiana*, fraccionado en 5 dosis por vía oral, lo cual logró reproducir en las ratas, cada una de las etapas clínicas de forma similar a las que se han descrito en el cuadro clínico que presentan los humanos cuando no mueren.

Se utilizaron ratas Wistar hembras y machos, con un peso promedio de  $125 \pm 25$  g y fueron distribuidas en grupos de cinco animales, los cuales previo ayuno de seis horas recibieron por vía oral, dosis fraccionadas del fruto molido en suspensión acuosa por vía oral mediante una sonda esofágica. Una primera dosis de 1.5g/Kg seguida de 4 dosis de 0.5 g/Kg a los 3, 7 10 y 14 días después de la dosis inicial (dosis total 3.5 g/Kg) el rango de volumen administrado fue de  $1.52 \pm 0.27$  ml, el grupo control solamente recibió agua. Todos los animales fueron evaluados clínicamente y el peso del cuerpo fue registrado diariamente durante las 2 primeras semanas, cada tercer día a partir de la semana 3 a la 8 y luego una vez al mes hasta finalizar el periodo de observación que fue de 112 días después de la dosis inicial. Todos los animales se mantuvieron bajo condiciones estándar de bioterio, ciclos de luz-oscuridad de 12 horas, temperatura 22 °C y recibieron agua y alimento completo, balanceado y libre de antibióticos *ad libitum*. En total se formaron 5 grupos experimentales de cada una de las etapas clínicas de la polineuropatía tóxica manifestada en las ratas incluyendo el tratamiento control al cual no se le administró el fruto, quedando de la siguiente manera: *Control* (grupo I), *Sin Neuropatía* (grupo II, 24 días), *Paresia* (grupo III, 48 días), *Parálisis* (grupo IV, 58 días) y *Recuperados* (grupo V, 112 días) (Fig. 3).



**Figura 3.**

Se representa la organización y distribución del grupo control y de los grupos experimentales, los días en los cuales se sacrificaron y los órganos estudiados.

Las ratas de los diferentes grupos se sacrificaron por dislocación cervical, inmediatamente después se extrajeron el encéfalo y la médula espinal. Estas regiones del SNC fueron fijadas en formalina al 10% en buffer de fosfatos, después fueron procesadas de manera rutinaria para inclusión en parafina. Posteriormente se realizaron cortes de los tejidos de 5 y 10µm de grosor, provenientes de áreas específicas y tomadas por referencia de coordenadas estereotáxicas en la posición de Bregma 0.84 mm a 2.04 mm para corteza cerebral y área motora, posición Bregma -12.0 mm a -13.08 mm para corteza cerebelosa y de la posición Bregma -9.0 mm a -10.08 mm para el puente (Paxinos y Watson, 2005). Estos cortes fueron teñidos con hematoxilina-eosina (H-E), violeta de cresilo (VC), Klüver-Barrera (K-B) y el método de impregnación de Marslan-Glees-Erickson (MGE) para ser observados mediante microscopía de luz (Klüver y Barrera, 1953; Marsland et al, 1954).

Los nervios ciáticos se disecaron y se fijaron en glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilatos a 0.1M y a pH 7.4. Después una porción de los fragmentos, fueron posfijados en osmio al 1%, luego se deshidrataron y se incluyeron en resina epóxica. Posteriormente se realizaron cortes semifinos de 350 nm de espesor y se tiñeron con azul de toluidina para examinarse bajo microscopía de luz y se llevaron a cabo fotomicrografías. Finalmente se obtuvieron secciones finas de color gris plata (del espectro de interferencia de la luz), se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo para ser observados por microscopía electrónica (Carl Zeiss EM-109) y se obtuvieron micrografías, las cuales, una vez impresas en papel fotográfico fueron analizadas.

La segunda parte de los fragmentos ya fijados en glutaraldehído se procesaron para inclusión en parafina, se hicieron cortes de 5, 7 y 10µm para ser teñidos con hematoxilina-eosina, Klüver-Barrera, método estándar de azul de toluidina (AT) y el método de impregnación de Marslan-Glees-Erickson. Adicionalmente en otros cortes se aplicaron métodos inmunohistoquímicos con anti-IgG siguiendo el método de la peroxidasa y métodos histoquímicos (P.A.S., azul-alciano/P.A.S., Safranina/azul-alciano) para identificar cambios en los gránulos de los mastocitos.



## 7. RESULTADOS

En este estudio se reprodujo el cuadro clínico y la lesión neurológica ya descrita para la neuropatía ocasionada por la ingesta del fruto de la *K. humboldtiana* o tullidora, observándose en los cuatro grupos de ratas intoxicadas lo siguiente:

### EXAMEN FÍSICO Y ESTUDIO CLÍNICO.

Pérdida importante de peso (16.9%) después de la administración de la dosis inicial

Pilo erección de moderada a severa

Áreas de alopecia en la región frontal de la cabeza y el dorso

Debilidad generalizada de moderada a severa

Ocasionalmente disnea y secreción ocular

Disminución de la actividad espontánea

En las Ratas con manifestaciones neurológicas (etapas I, II, III, IV y V) se observó:

Adelgazamiento de las extremidades posteriores

Paresia

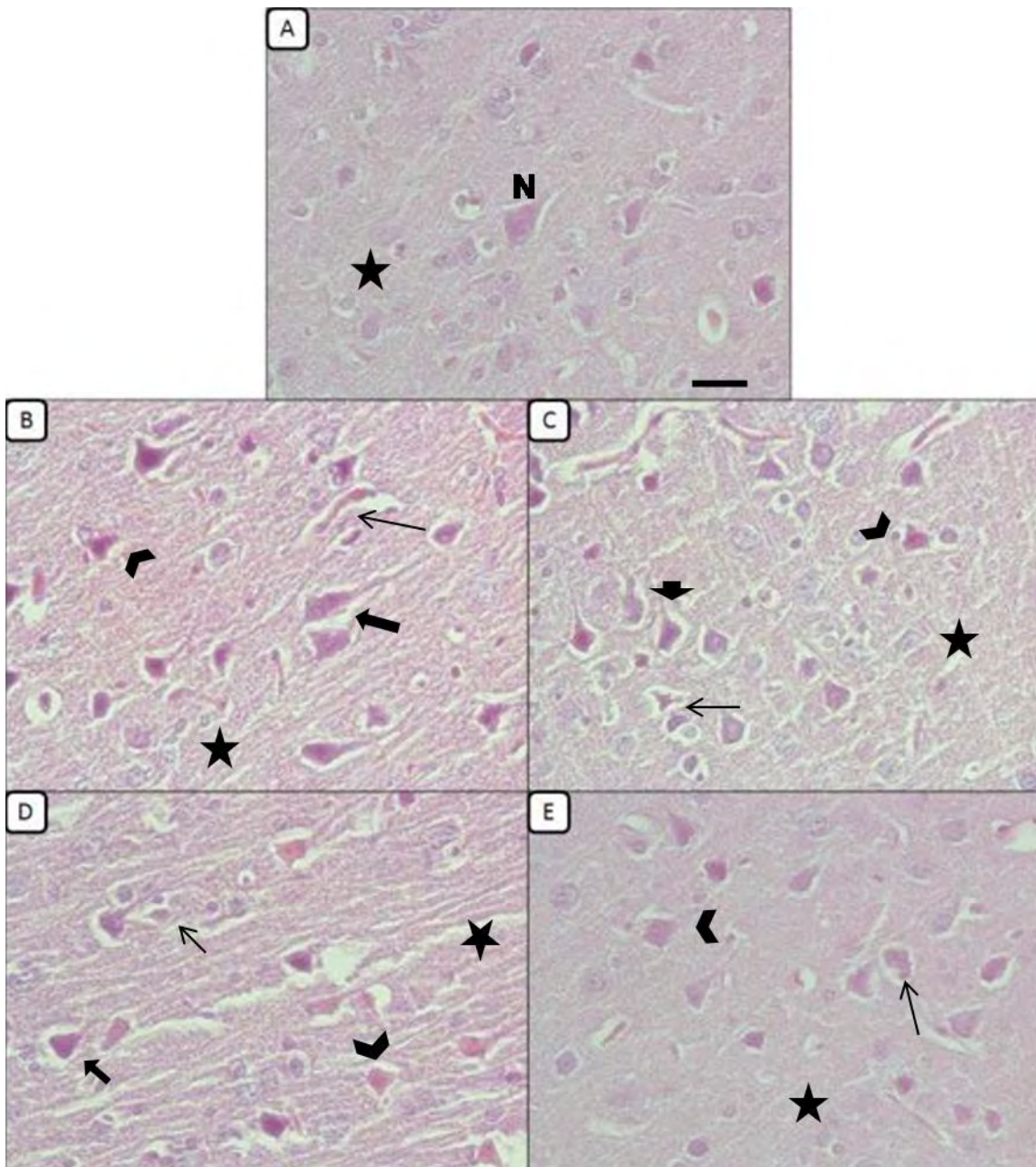
Parálisis flácida

Extremidades anteriores en forma de garra

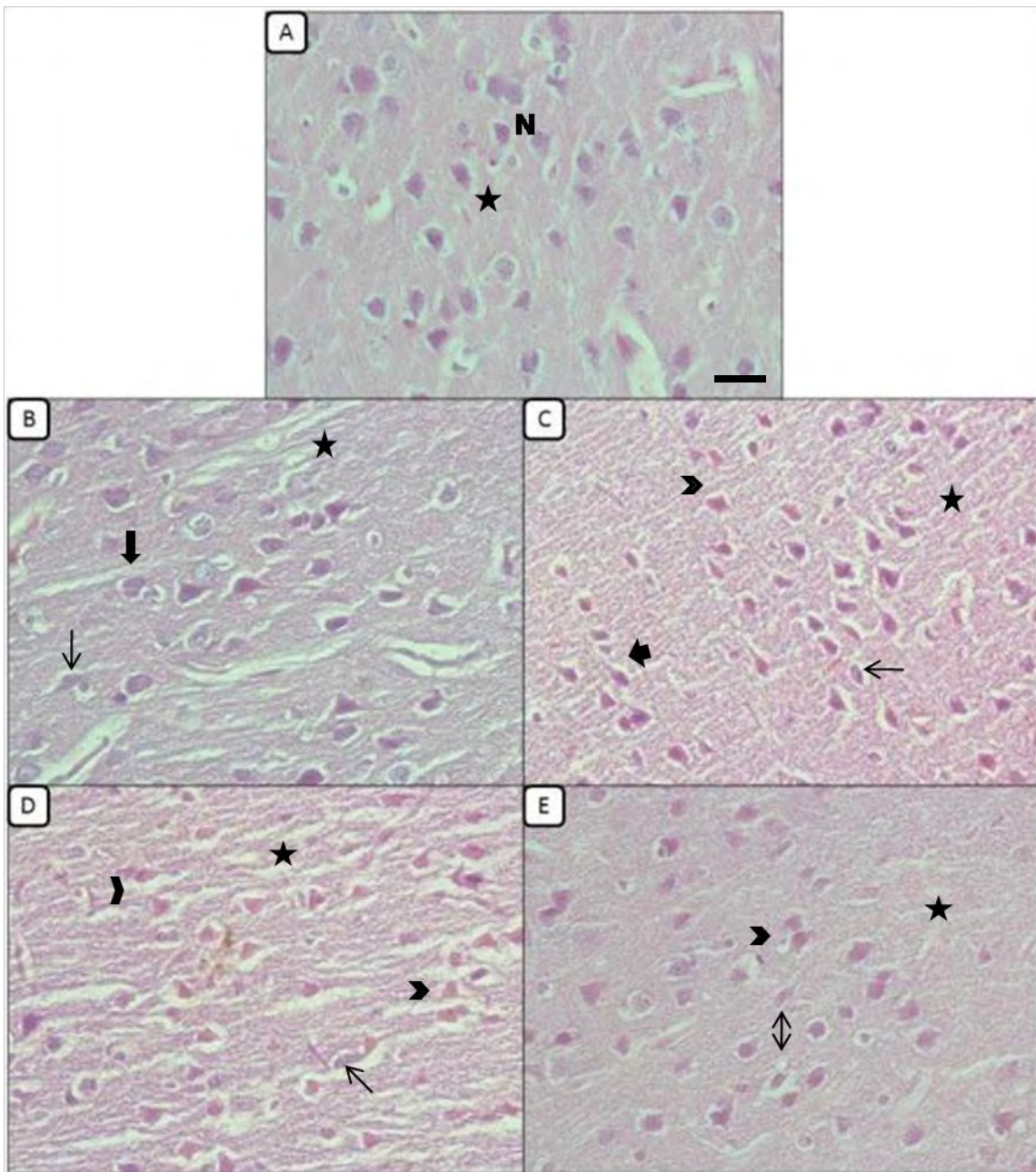
## ESTUDIO MICROSCOPICO.

### **7.1. Observaciones en la corteza motora.**

En el grupo control (I) la morfología de las capas piramidales externa e interna, de cortes teñidos con H-E, mostraron neuronas normales y tinción pálida, así como un neuropilo normal de apariencia homogénea. Las alteraciones en los diferentes grupos de ratas se presentaron de manera focal. En el grupo sin neuropatía (II), las neuronas, se observaron con un patrón de tinción basófilo. En los grupos con paresia (III) y con parálisis (IV), se presentó una coexistencia de neuronas basófilas y eosinófilas y finalmente, en el grupo de ratas con recuperación (V), la mayoría de las neuronas presentaron una tinción eosinófila. La permanencia de neuronas con ambas tinciones en las capas piramidales mostró diferencia, debido a que en la capa piramidal externa sólo se observó esta coexistencia en el grupo con paresia (III), mientras que en la capa piramidal interna se observó tanto en el grupo con paresia (III) como en el grupo con parálisis (IV). Además, en ambas capas piramidales de los grupos sin neuropatía (II), con paresia (III) y con parálisis (IV), se hicieron presentes neuronas retraídas, con la presencia de halos o espacios en los contornos de las neuronas piramidales. Por último, el neuropilo también se vio alterado, este pierde su aspecto uniforme y homogéneo, que se observa en el grupo control (I). Estas alteraciones, siguieron presentes en el grupo de ratas recuperadas (V), aunque atenuados (figs. 3 y 4). El análisis morfológico se centró en cortes de las coordenadas estereotáxicas de Bregma 0.84 a 2.04 mm.



**Figura 4.-** Cortes coronales de la corteza motora de rata (tinción con HE). Capa piramidal interna. **A:** Grupo control (I), muestra neuronas piramidales normales (N) y neuropilo normal (★). **B:** El grupo sin neuropatía (II) presenta neuronas con aspecto basófilo (→), retracción (→) y neuropilo esponjoso (★). **C y D:** Cortes representativos de los grupos con paresia (III) y con parálisis (IV) se observa la coexistencia de neuronas eosinófilas (➤) y basófilas (→), neuronas retraídas (→) y alteración del neuropilo (★). **E:** El grupo con recuperación (V) sólo mostró neuronas eosinófilas (➤) y disminución del número de neuronas retraídas (→). Barra = 20  $\mu$ m.

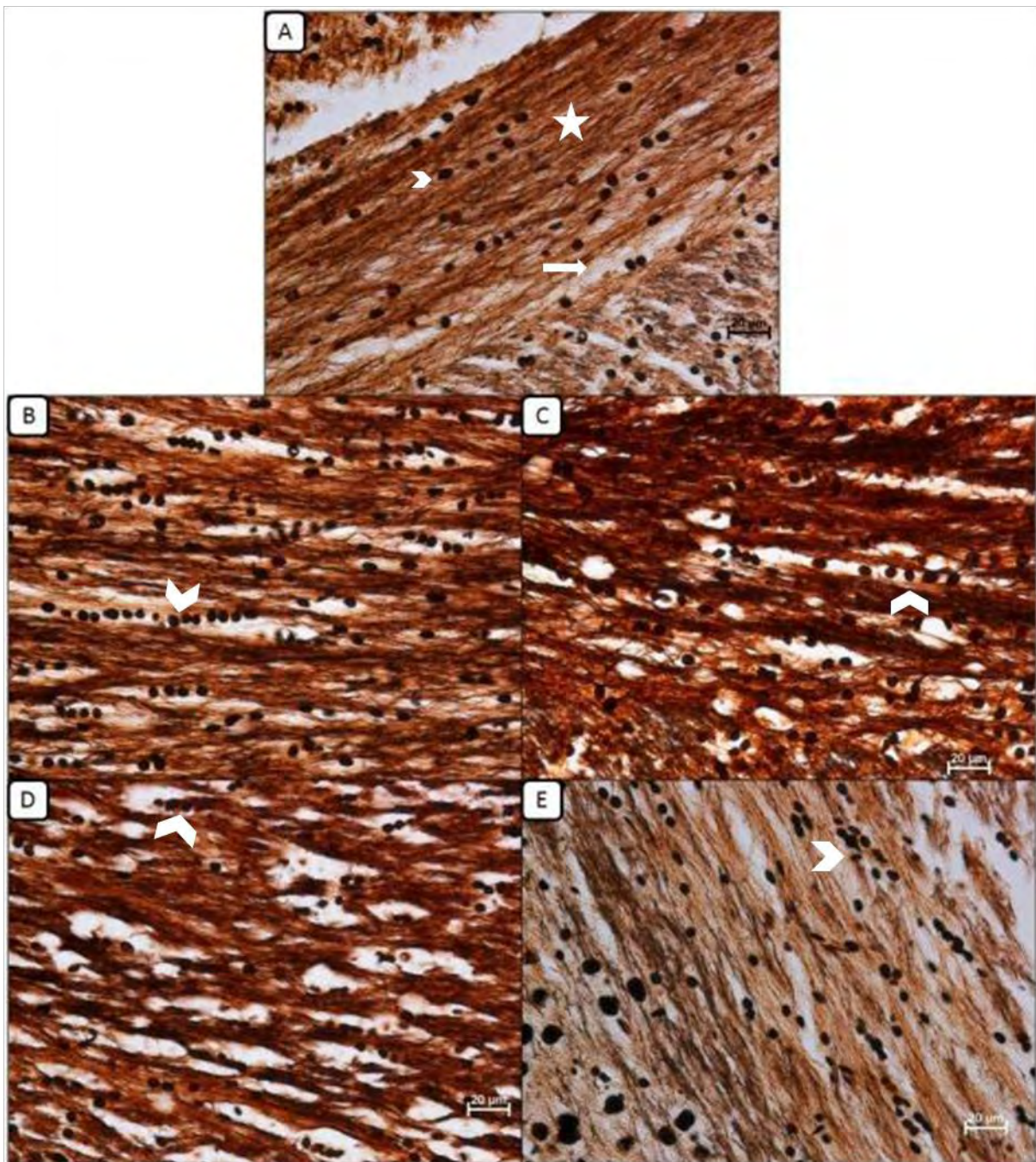


**Figura 5.**

Cortes coronales de la corteza motora de rata (tinción con H-E). Capa piramidal externa. **A:** Grupo control (I), muestra neuronas piramidales (N) y neuropilo (★) normales. **B:** Grupo sin neuropatía (II) se muestran neuronas basófilas (→), retracción de estas (→) y desorganización del neuropilo (★). **C:** Grupo con paresia (III), se observan neuronas eosinófilas (➤) y basófilas (→), neuronas retraídas (→) y alteración del neuropilo (★). **D:** Grupo con parálisis (IV), solo se observaron neuronas eosinófilas y alteraciones acentuadas en la retracción neuronal (→) y en el neuropilo (★). **E:** El grupo con recuperación (V) sólo mostró neuronas eosinófilas (➤) y disminución del número de neuronas retraídas (→). Barra= 20µm

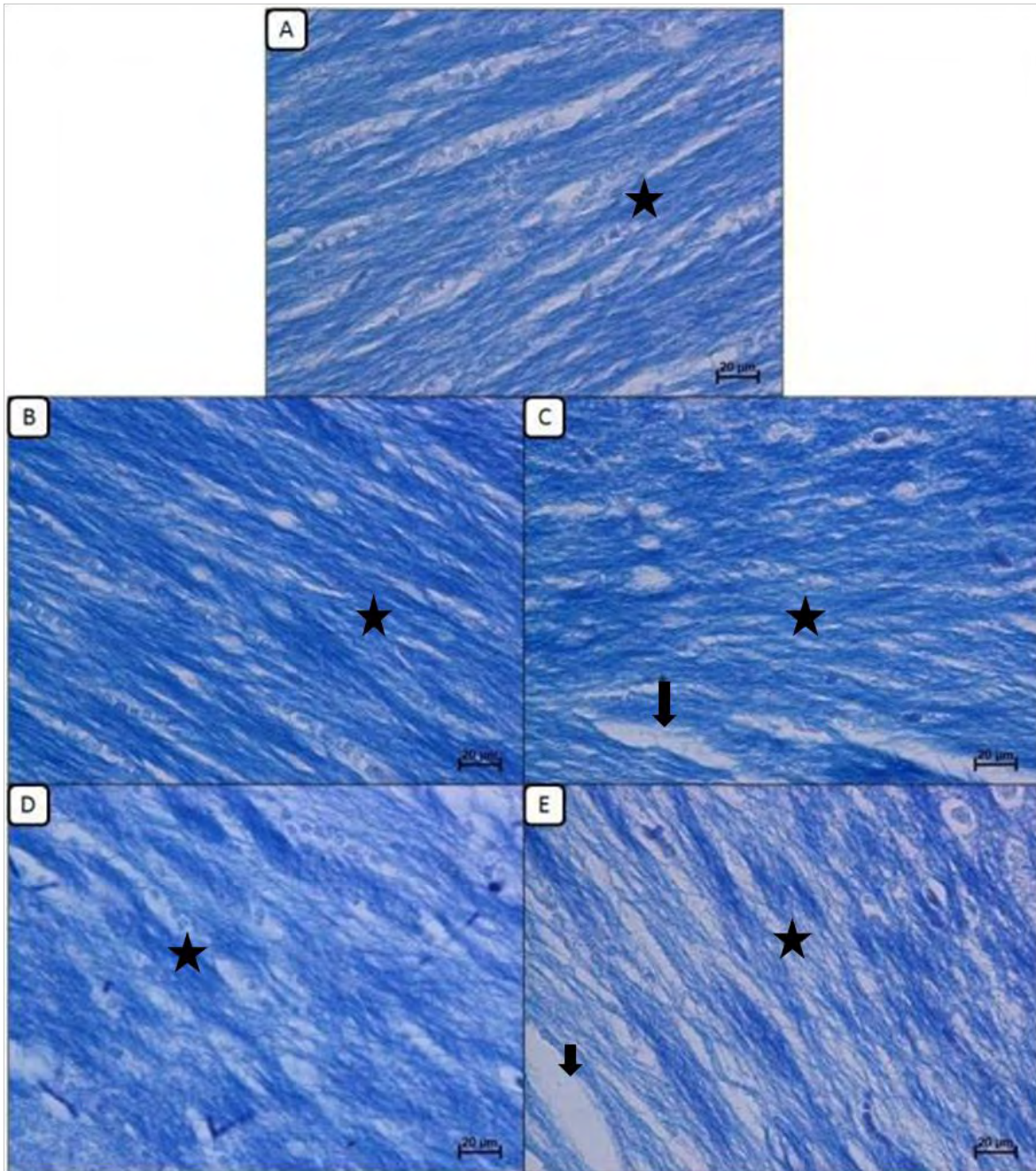
Al examinar la sustancia blanca, el grupo control (I) presentó la morfología se caracterizó por la uniformidad y continuidad de este componente. En los grupos posteriores a la intoxicación, es decir, desde el grupo sin neuropatía hasta el grupo con recuperación (II al V, respectivamente), no se observó pérdida de mielina, únicamente pérdida del trayecto regular de los tractos nerviosos (Fig.6). Los cambios también se ven reflejados en la morfología axonal en cortes impregnados con plata, donde se observó la pérdida del trayecto regular que se presenta en el grupo control (I), y aparición de espacios cada vez mayores en los grupos de ratas intoxicadas.

En cortes impregnados con plata, se observaron en el grupo control (I), tractos de axones definidos, paralelos y organizados, con pequeños espacios regulares entre tracto y tracto. En los grupos sin neuropatía (II), con paresia (III) y con parálisis (IV), se observaron cambios progresivos caracterizados por la pérdida del trayecto lineal e irregularidades en el grosor de los axones, así como por espacios de mayor tamaño entre ellos, estas alteraciones, también se observaron aunque en menor grado en el grupo con recuperación (V). Por otra parte, los oligodendrocitos en el grupo control (I) y sin neuropatía (II), se observaron alineados y paralelos a los tractos nerviosos, conforme avanzó la polineuropatía, se observó una disminución aparente en la cantidad de oligodendrocitos (no cuantificados) y una distribución al azar (Fig.7).



**Figura 6.**

Cortes de la sustancia blanca de cerebro de rata (impregnación con plata, MGE). **A:** Grupo control (I), muestra axones de trayecto regular y paralelos entre sí (★), con algunos espacios entre estos (➔). Oligodendrocitos organizados (➤). **B:** Grupo sin neuropatía (II), muestra pérdida del trayecto lineal regular y espacios más acentuados entre los axones. Oligodendrocitos alineados (➤). **C y D:** Grupos con paresia (III) y con parálisis (IV), continúa la pérdida del trayecto axonal con espacios más evidentes. Aparente disminución del número de oligodendrocitos y organización al azar (➤). **E:** Grupo con recuperación (V), tractos con aparente regresión a la morfología normal aunque continúan algunos de los cambios mencionados. Barra = 20 μm.



**Figura 7.**

Cortes de sustancia la blanca de cerebro de rata (tinción con KB). **A:** Grupo control (I), muestra la fibras con mielina bien definida, de trayecto lineal y agrupada en haces (★), así como espacios entre los tractos. **B y C:** Cortes representativos de los grupos sin neuropatía (II) y con paresia, (III), muestra pérdida del trayecto lineal (★) de las vainas de mielina, así como espacios aumentados (→). **D:** Grupo con parálisis (IV), se acentúan las alteraciones descritas en vainas de mielina (★) y en los espacios (→). **E:** Permanencia de la alteración del trayecto lineal (★) en el grupo recuperado (V) con espacios mayores (→). Barra = 20 μm.

### **7.2. Observaciones en el cerebelo.**

Los cortes de cerebelo del grupo de ratas control (I), presentaron una estructura normal, la monocapa de neuronas de Purkinje se ubicó entre la capa molecular y la capa granular. En cambio, todos los grupos de ratas intoxicadas, presentaron diferentes alteraciones morfológicas de manera focal. En el grupo sin neuropatía (II) se observaron principalmente células picnóticas e hipercrómicas. En el grupo con paresia (III) se presentó cromatolisis caracterizada por: migración de la sustancia de Nissl a la periferia, el núcleo claro y nucléolo acéntrico. En el grupo con parálisis (IV), llamó la atención que un número considerable de células de Purkinje no se encontraba en su localización normal. Por otra parte, en la capa granulosa se observaron células que corresponden a otro tipo de neuronas y que antes no destacaban. En este mismo grupo se observó la formación de gliosis, caracterizada por la presencia de células neuróglicas en los espacios anteriormente ocupados por las células de Purkinje. Por último, en el grupo con recuperación (V), se observaron células de Purkinje con picnosis e hiper cromasia, zonas con gliosis, así como también un mayor número de células con características morfológicas normales y una aparente redistribución a lo largo de la línea de capa intermedia, comparadas con el resto de los grupos de ratas intoxicadas (Fig.8). La zona de estudio en los cortes correspondió a las coordenadas de Bregma -12 a -13.08 mm.

### **7.3. Observaciones en el puente.**

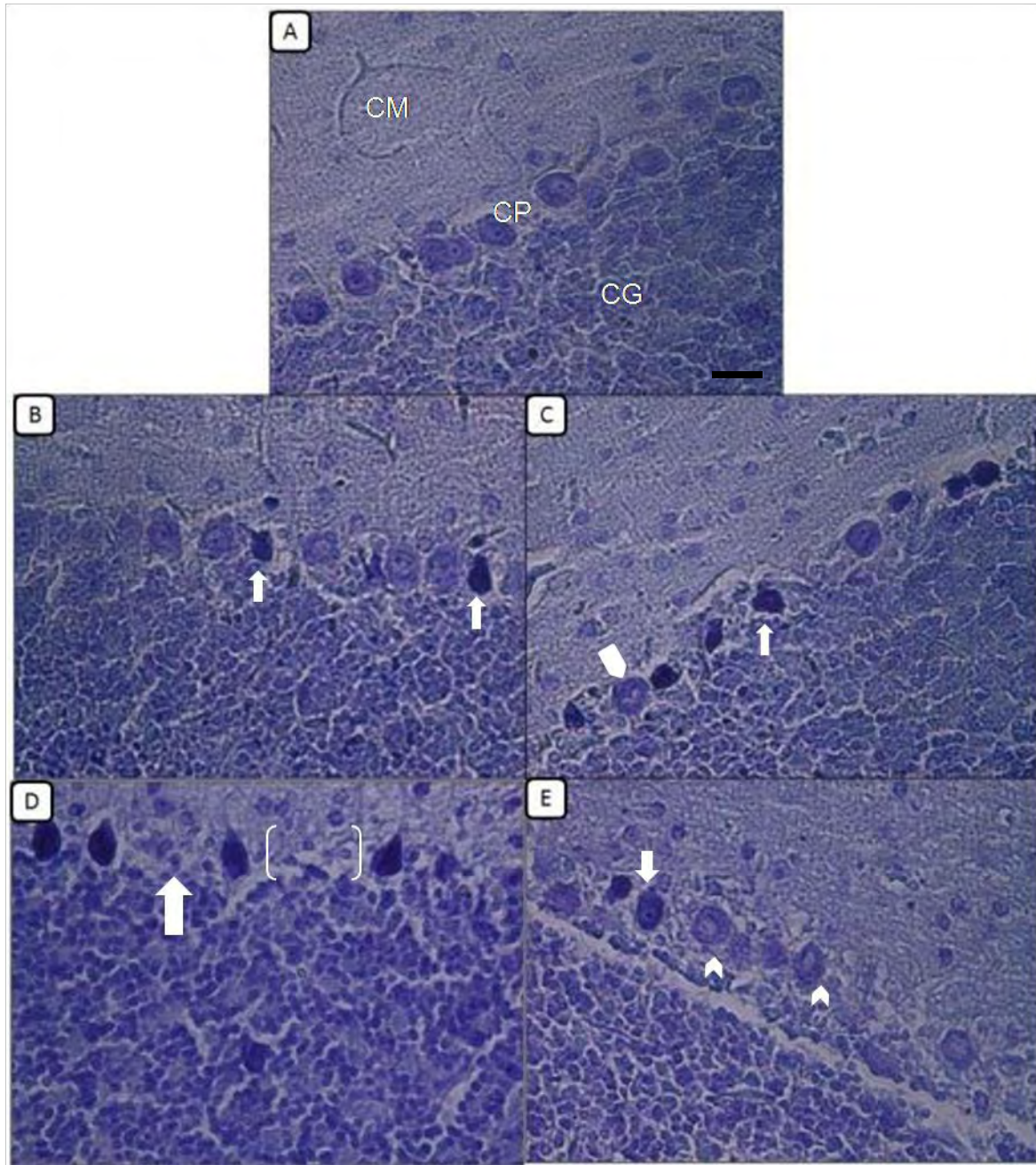
Los núcleos vestibulares y los tractos nerviosos fueron las zonas analizadas en el puente, tanto en las ratas intoxicadas como en las ratas del grupo control (I). Las neuronas observadas por microscopía de luz en el grupo control (I) presentaron morfología multipolar, con núcleo y nucléolo central, así como con una distribución uniforme de la sustancia de Nissl en el cuerpo neuronal.

En los grupos sin neuropatía (II) y con paresia (III) se observaron cambios morfológicos característicos de cromatolisis, los cuales consistieron en pérdida de la morfología multipolar, aumento del volumen celular, hiper cromasia, así como compactación y migración de la sustancia de Nissl a la periferia, lo que permitió mejor definición del núcleo y nucléolo. En el grupo con parálisis (IV), se observó en la mayoría de las neuronas una aparente disminución de la hiper cromasia y del volumen celular. La morfología del grupo recuperado (V) presentó mayor similitud con el control (I), sin embargo persistieron células con aumento de volumen e hiper crómicas en los núcleos vestibulares (Fig.9).

Al examinar los tractos corticopontocerebelosos en cortes del grupo control (I) impregnados con plata, se observaron con arreglo lineal, paralelos entre sí, con espacios regulares entre los tractos, así como axones con un grosor uniforme. En el grupo sin neuropatía (II) se observó pérdida del arreglo regular de los tractos nerviosos, además, axones aislados con segmentos más gruesos. En el grupo con paresia (III), la desorganización de los tractos nerviosos continúa y las dilataciones segmentarias se presentaron con mayor continuidad y frecuencia. En el grupo con parálisis (IV), los tractos nerviosos se observaron con pérdida del arreglo lineal (“zigzag”), de tal manera que entran y salen del plano de corte; además, los axones en su mayoría presentaron engrosamientos a manera de varicosidades. En el grupo con recuperación (V), se observó una aparente reorganización de los tractos nerviosos, sin embargo persistieron las dilataciones por segmentos (Fig.10). Al examinar los tractos corticopontocerebelosos teñidos para la demostración de la mielina, no se observó pérdida de ésta, sólo se confirmó la alteración del trayecto regular de los tractos ya descritos. En el grupo control (I) se observaron tractos regulares. En el grupo sin neuropatía (II) se observó pérdida de la uniformidad esta alteración se incrementó progresivamente en los grupos con paresia (III) y con parálisis (IV) permaneciendo en el grupo de ratas con recuperación (V) en la mayoría de los axones (Fig.11).

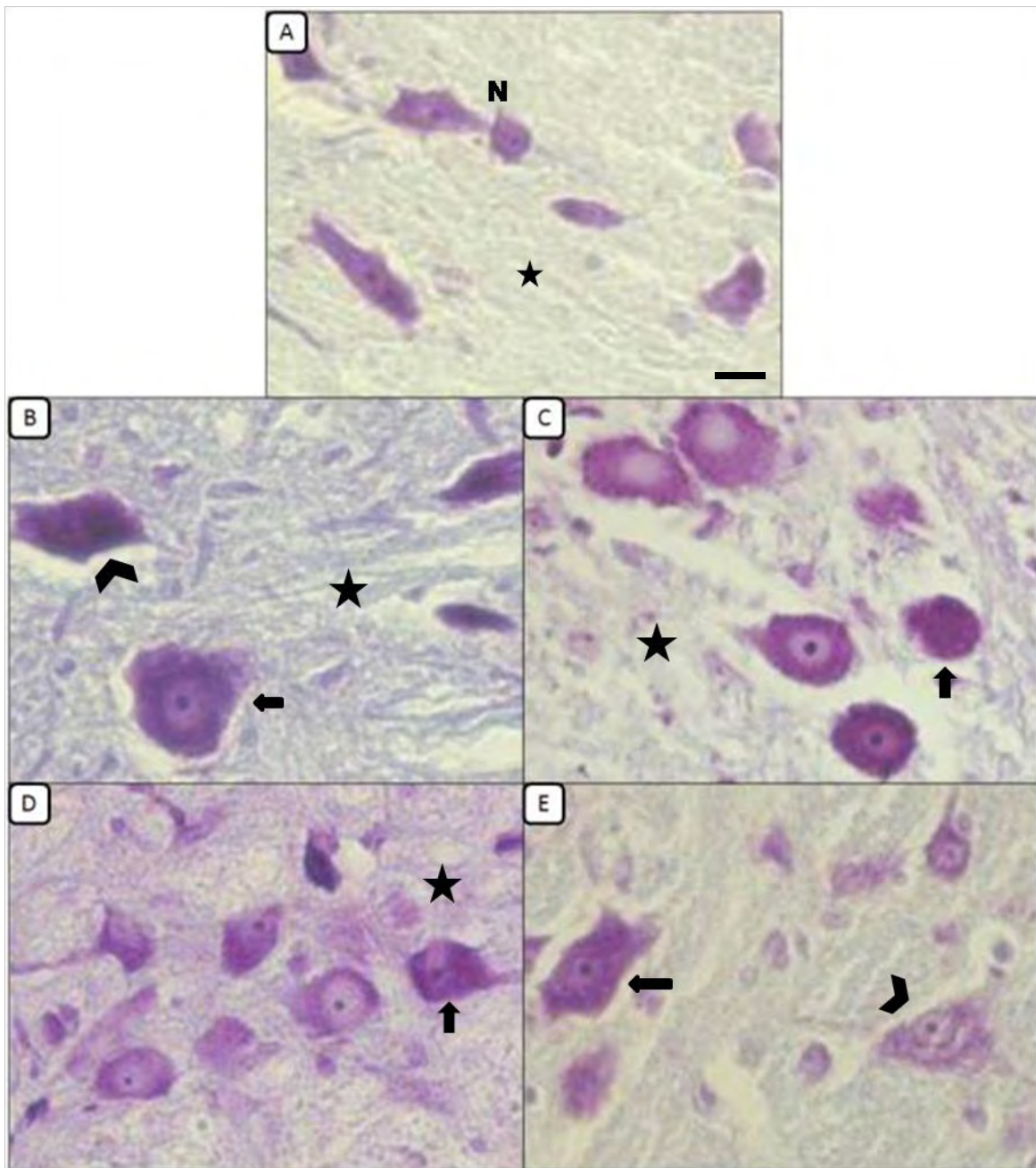


Las áreas de observación estuvieron comprendidas en las coordenadas de Bregma -9.0 a -10.08 mm.



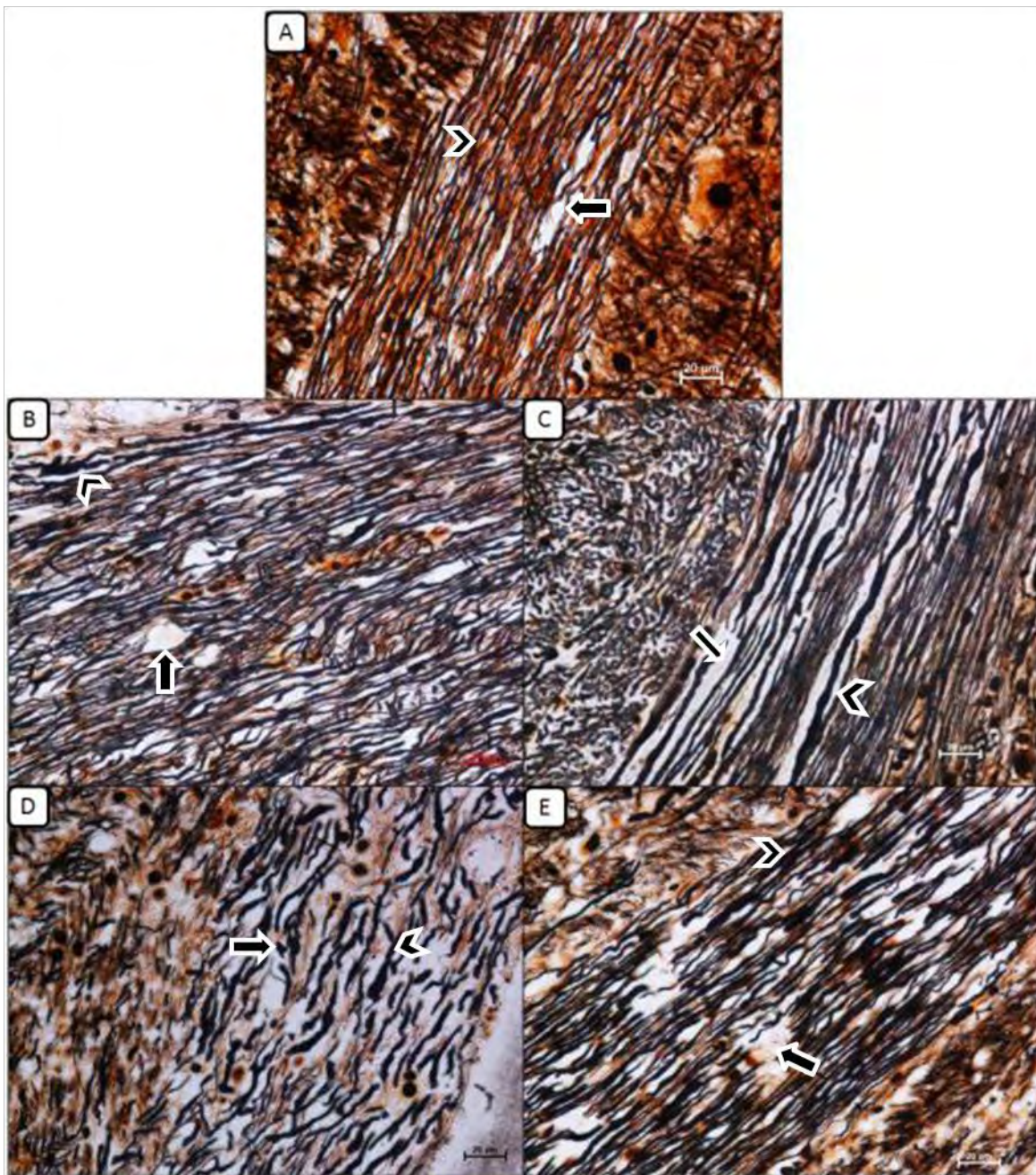
**Figura 8.**

Cortes coronales de la corteza cerebelosa de rata (tinción con VC). **A:** Grupo control (I), muestra células de Purkinje (CP) organizadas entre la capa molecular (CM) y capa granulosa (CG). **B:** En el grupo sin neuropatía (II) se observaron CP hiperocrómicas (→). **C:** El grupo con paresia (III) muestra CP en fase de cromatolisis (▸). **D:** Grupo con parálisis (IV), ausencia de CP entre la CG y CM (recuadro) y formación de gliosis (→). **E:** Grupo con recuperación (V), permanencia de CP alteradas (▸), y otras aparentemente normales (➤) y presencia de gliosis. Barra= 20µm



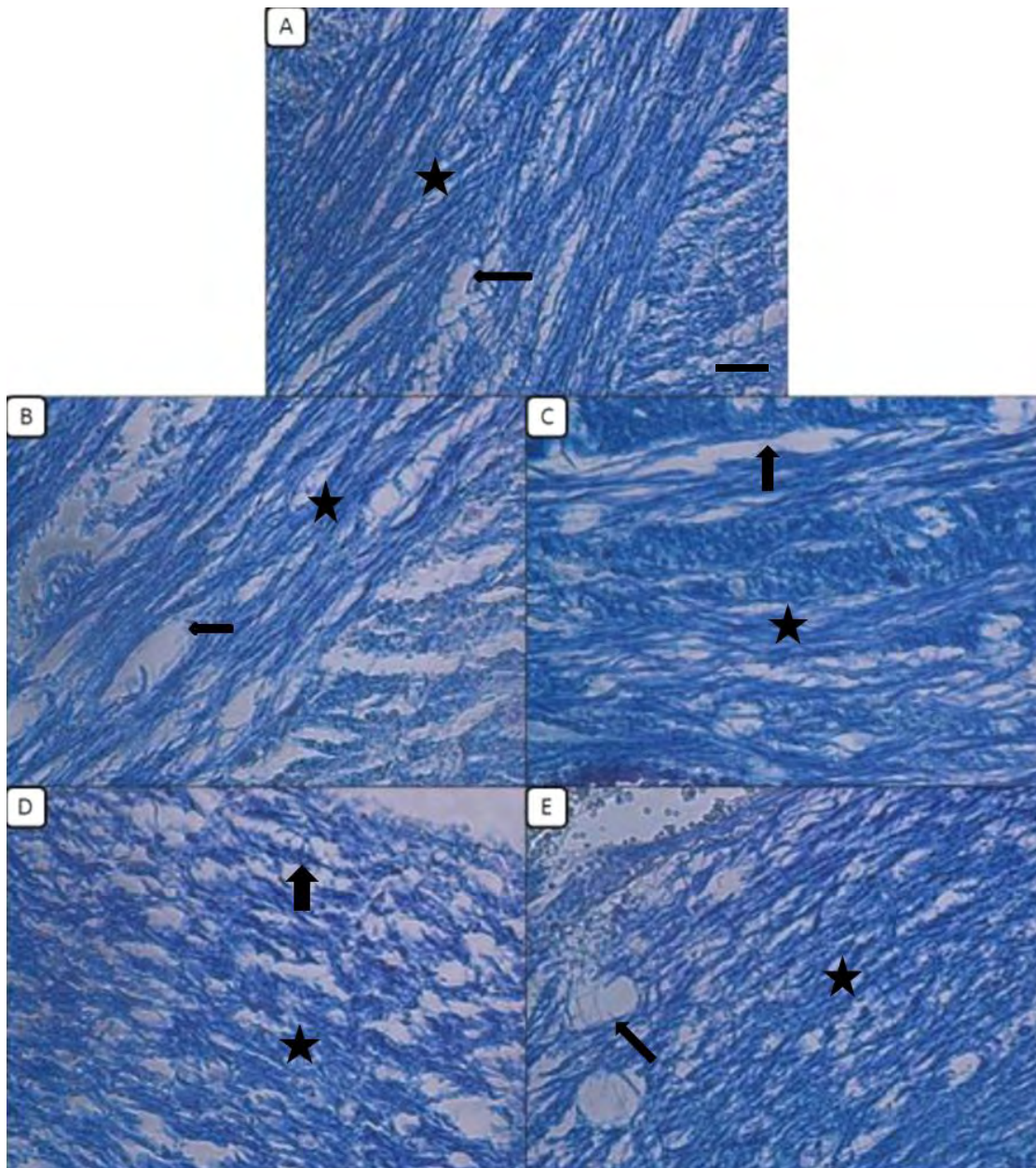
**Figura 9.**

Cortes coronales del núcleo vestibular de rata (tinción con VC). **A:** Grupo control (I), se observan neuronas normales multipolares (N) con diferente orientación y plano de corte, así como el neuropilo normal (★). **B:** Grupo sin neuropatía (II), se observaron neuronas hipercrómicas (▲) y neuronas aumentadas de volumen (➡) y pérdida de la morfología multipolar. Las neurofibrillas del neuropilo alterado se observan más definidas. **C y D:** En los grupos con paresia y con parálisis (III y IV respectivamente) se observa cromatolisis (➡) en neuronas y las alteraciones del neuropilo acentuadas (★). **E:** Grupo con recuperación (V), presencia de neuronas con diferente grado de alteración, hipercrómicas(➡) y aparentemente normales (▲). Barra= 20µm



**Figura 10.**

Cortes coronales del tracto corticopontocerebeloso de rata (impregnación con plata, MGE). **A:** Grupo control (I), axones de trayecto regular y paralelos entre sí (▮), con algunos espacios entre estos (⇨). **B y C:** Cortes representativos de los grupos experimentales sin neuropatía (II) y con paresia, (III), muestran pérdida del trayecto lineal, segmentos de axones aumentados de grosor (▮) y formación de espacios de mayor tamaño entre los axones (⇨). **D:** Grupo con parálisis (IV), axones varicosos (▮) con pérdida de su trayecto lineal de axones, aparentemente segmentados (⇨) debido a que atraviesan el plano de corte. Espacios aumentados de tamaño (⇨). **E:** Grupo con recuperación (V), axones de trayecto lineal con segmentos engrosados (⇨) y espacios más evidentes. Barra = 20 µm.

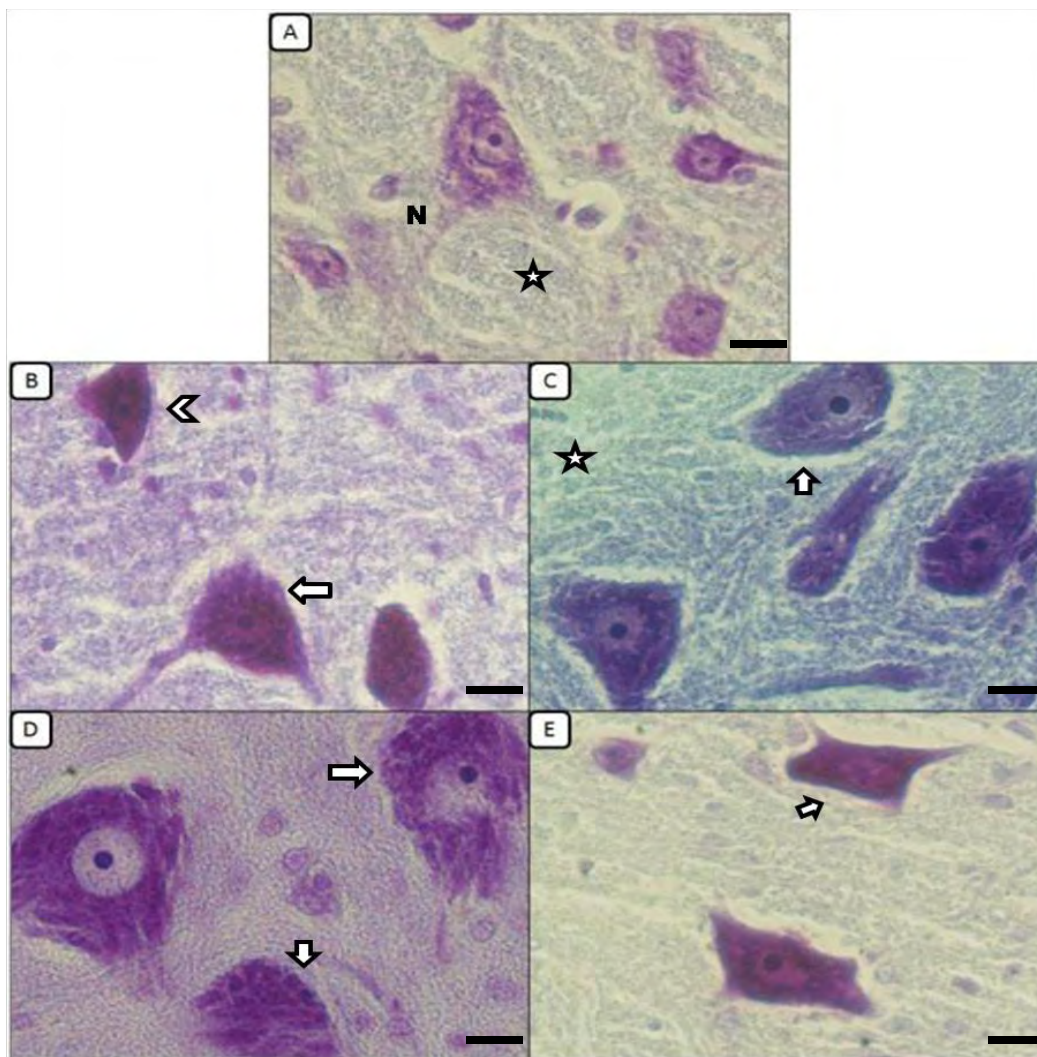


**Figura 11.**

Cortes coronales del tracto corticopontocerebeloso de rata (tinción con KB). **A:** Grupo control (I), muestra la mielina bien definida, de trayecto lineal y agrupada en haces (★), así como espacios entre estas (➡). **B y C:** Cortes representativos de los grupos experimentales sin neuropatía (II) y con paresia, (III), muestran pérdida del trayecto lineal de las vainas de mielina (★), así como espacios aumentados (➡). **D:** Grupo con parálisis (IV), se acentúan las alteraciones descritas en vainas de mielina (★) y en los espacios (➡). **E:** Grupo con recuperación (V), permanece la alteración del trayecto lineal (★), con espacios más evidentes (➡). Barra= 20μm

#### 7.4. Observaciones en la médula espinal.

Las neuronas motoras multipolares de las astas anteriores del grupo control (I) presentaron una morfología normal. El grupo sin neuropatía (II) mostró alteraciones caracterizadas por hiper Cromasia y un aparente aumento de volumen de neuronas con pérdida de la morfología multipolar regular. En el grupo con paresia (III) las alteraciones aumentaron, en el soma se observó aumento de volumen celular, compactación de la sustancia de Nissl y núcleo definido. En el grupo con parálisis (IV), el daño en las neuronas fue más severo, se presentó el fenómeno de cromatolisis, esto es: un mayor aumento de volumen, mayor compactación y migración de la sustancia de Nissl hacia la periferia de la célula, esto permite que el núcleo y el nucléolo se observen claramente. En las neuronas motoras de las ratas recuperadas (V), la cromatolisis persiste. (Fig.12).



**Figura 12.**

Cortes transversales de las astas anteriores de la médula espinal de rata (tinción con VC). A: Grupo control (I), se observan neuronas normales multipolares (N), así como el neuropilo normal (▣). B: Grupo sin neuropatía (II), se observaron neuronas hiper Cromáticas (▣) y neuronas aumentadas de volumen (★) lo que provoca pérdida de la morfología multipolar. El neuropilo alterado se observa definido. C y D: En los grupos con paresia (III) y con parálisis (IV) se observa cromatolisis en neuronas (▣) y las alteraciones del neuropilo más acentuadas (★). E: Grupo con recuperación (V), presencia de neuronas hiper Cromáticas con morfología multipolar (▣).

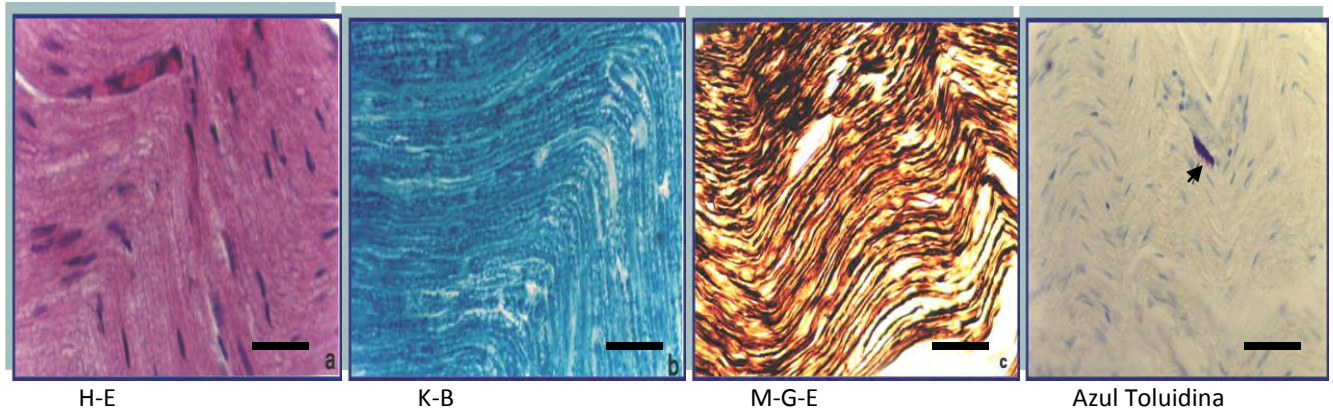
Barra =20µm

### **7.5. Observaciones en los nervios ciáticos.**

En los cortes de nervio ciático se ven anomalías histológicas caracterizadas por la pérdida y separación de las fibras, una desmielinización segmentada moderada en varias fibras, hinchazón y vacuolización de la vaina miélica, congestión vascular y vasodilatación. Las alteraciones axonales más comúnmente observadas consistieron en una alternancia en el engrosamiento y adelgazamiento en algunas zonas así como también en algunas áreas del fascículo nervioso.

En el análisis de los cortes del grupo control (I) se observó que la morfología normal del nervio se caracteriza por la forma circular regular de los axones mielinizados y sin cambios estructurales, así como un grosor uniforme de la vaina de mielina con un 25% proporcional al diámetro del axón, las fibras miélicas se disponen uniformemente y se encuentran muy cercanas entre sí y no dejan espacios, además de la presencia de escasas células cebadas en el intersticio o cerca de los vasos sanguíneos, en ninguno de éstos animales se vieron linfocitos. Posterior a la intoxicación, en el grupo II (sin Neuropatía) y a los 24 días, se presentaron fibras nerviosas con vacuolizaciones (huecos) en la vaina de mielina, vasodilatación y congestión vascular, con ello se establece un cambio en la morfología de los axones mielinizados. En la etapa de paresia (III) a los 48 días se acentúan las alteraciones la vaina de mielina se presentaba más hinchada en algunas zonas, los axones se ven adelgazados y otros se ven con retracción o sinuosos. En la etapa de parálisis (día 58 o grupo IV) se observa el mayor grado de alteración en los axones pues mostraron una severa desmielinización y daño axonal con pérdida de fibras, hay microvacuolización y macrovacuolización en las fibras residuales y vasodilatación. Otras fibras presentaron engrosamiento, encogimiento o interrupción y la presencia de células cebadas e infiltrado de células mononucleares. Es durante la etapa de recuperados (grupo V) en donde se observa que el espesor de la vaina de mielina se hace más regular o uniforme en toda la circunferencia de los axones mielinizados, sin embargo la vasodilatación y los infiltrados de células cebadas persistieron. (Figs.12, grupos I al V, cortes de material incluido en parafina y procesado con métodos especiales de tinción e impregnación) y (Figs.13, grupos I al V, cortes de material incluido en resina epóxica y teñidos con azul de toluidina).

FIGURA 13.- FOTOMICROGRAFIAS DE LOS GRUPOS I – V. Inclusión en parafina.



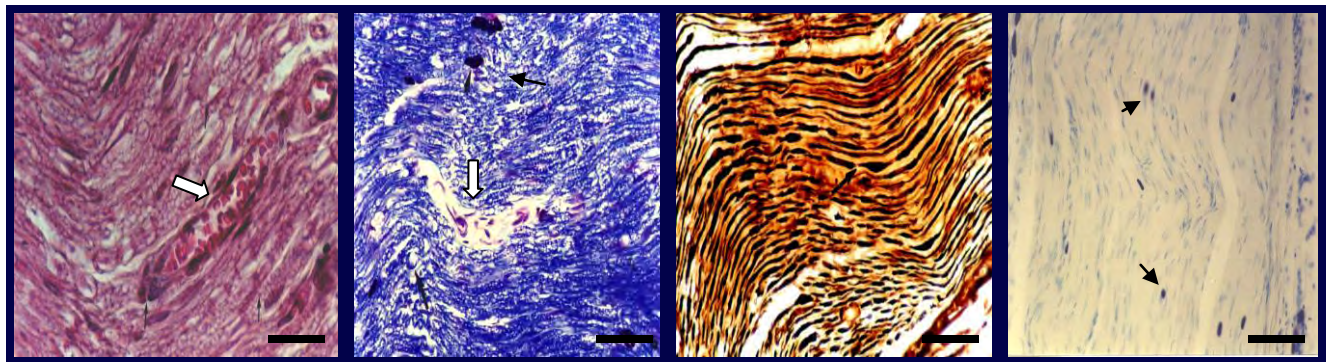
H-E

K-B

M-G-E

Azul Toluidina

Grupo I. Ratas sin tratar. En los cortes longitudinales de fascículos nerviosos no se encontraron alteraciones en las vainas de mielina, ni en los axones. Sólo se observó la presencia ocasional de mastocitos íntegros ( → ) en las fibras nerviosas. Barra= 30µm



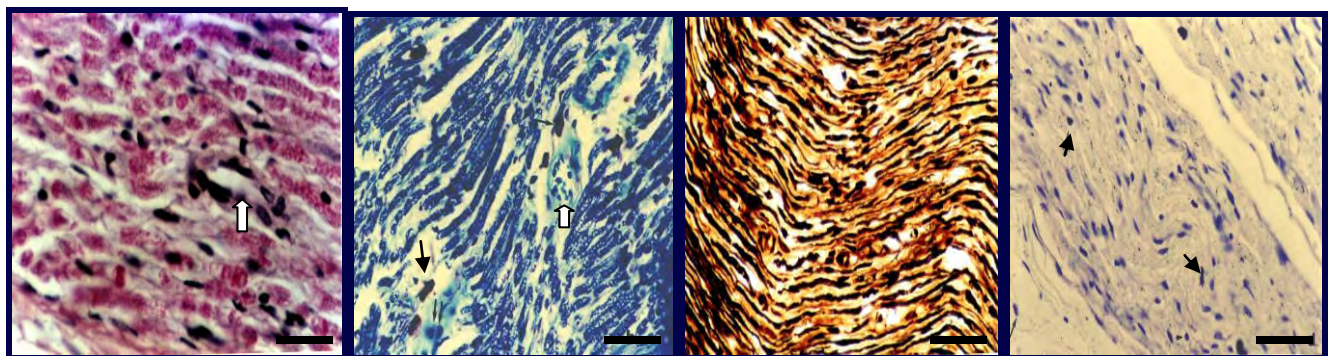
a). H-E

b). K-B

c). MGE

d). AT

Grupo II. Ratas Intoxicadas Sin Neuropatía (24 días). a) mostraron vasodilatación (⇨) y cambios tempranos en la vaina de mielina que consistieron en micro y macrovacuolización (⇨) y separación de las láminas de mielina. c) mostraron dilatación axonal segmentaria. d) se observan mastocitos íntegros dentro del fascículo nervioso ( → ). Barra= 30µm



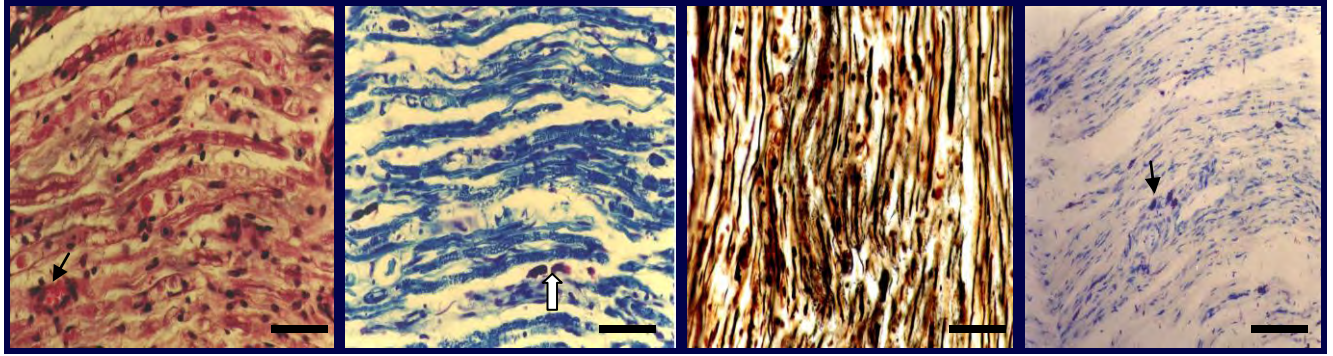
a). H-E

b). K-B

c). MGE

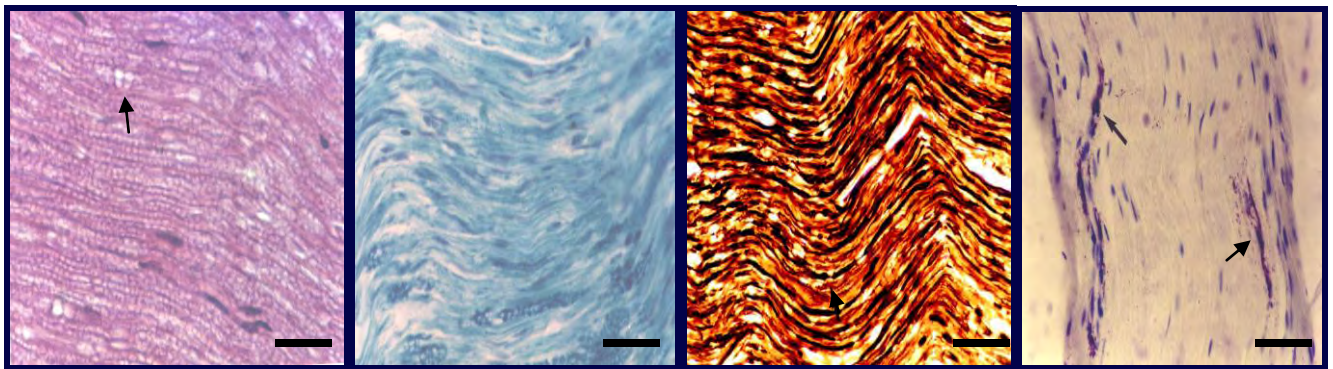
d). AT

Grupo III. Ratas Intoxicadas con Paresia (48 días). a) se observaron alteraciones más acentuadas en la vaina de mielina, vasodilatación y la presencia de infiltrado celular (⇨). b) se encontró desmielinización segmentaria de la vaina de mielina, pérdida moderada de fibras nerviosas, vasodilatación (⇨) y la presencia de mastocitos ( → ) y linfocitos dispersos entre las fibras nerviosas. c) se observó degeneración axonal moderada. d) se observó la presencia de mastocitos ( → ). Barra= 30µm



a). H-E                      b). K-B                      c). MGE                      d). AT

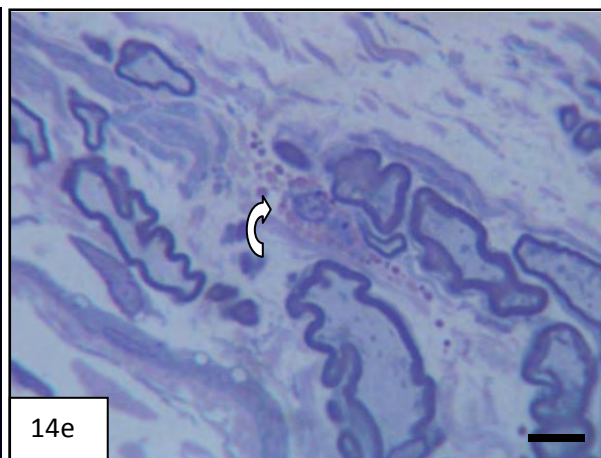
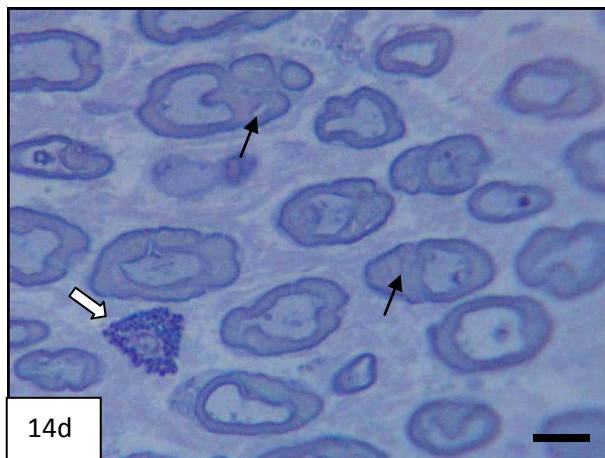
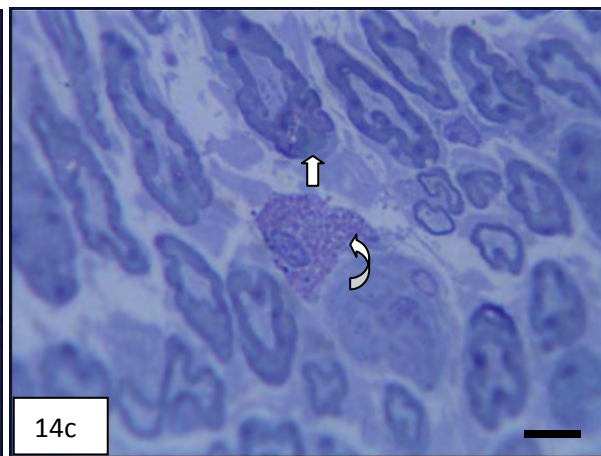
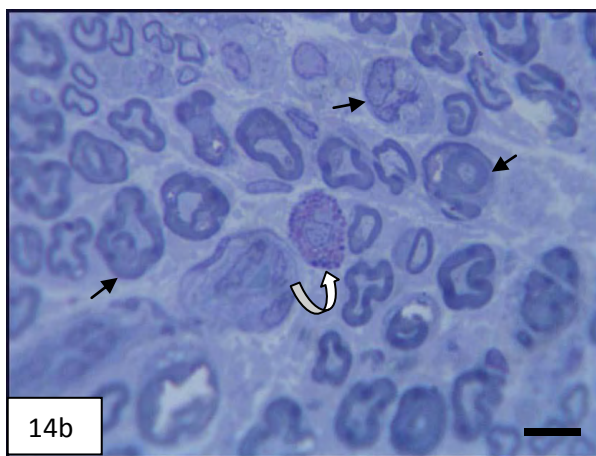
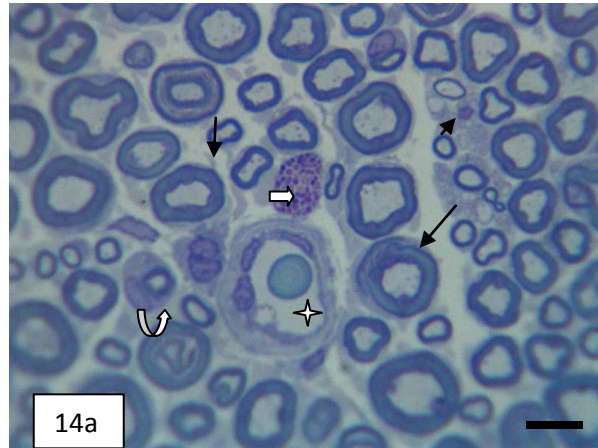
Grupo IV. Ratas Intoxicadas con Parálisis Fláccida (58 días). a) se observan fibras nerviosas con alteraciones estructurales importantes en la vaina de mielina, vasodilatación (→) e infiltrado celular intersticial difuso. b) se presenta desmielinización severa, pérdida importante de las fibras nerviosas, mastocitos íntegros (↑) y desgranulados y linfocitos. c) degeneración axonal acentuada, donde destaca la dilatación, fragmentación y desintegración de las fibras nerviosas. d) se observó la presencia de mastocitos desgranulados (↓) y de linfocitos en el fascículo nervioso. Barra= 30µm



a). H-E                      b). K-B                      c). MGE                      d). AT

Grupo V. Ratas Intoxicadas Recuperadas de la Neuropatía (112 días) a) se observó regeneración de las fibras nerviosas y ligeras alteraciones residuales (↑). b) se observó regeneración de la vaina de mielina y proliferación de núcleos de las células de Schwann. c) hay regeneración axonal y alteraciones residuales (↑). d) se observó la presencia de mastocitos desgranulados (flechas) dentro del fascículo nervioso. Barra= 30µm





**Figura 14a.** Nervio ciático de rata **Control**. Se muestra la morfología normal en donde se aprecian grupos de axones amielínicos (▶) y así como axones mielinizados (→) envueltos por una vaina de mielina originada por las células de Schwann (⤵). Además, se observa una sección de una célula cebada íntegra (⇨) con gran cantidad de gránulos metacromáticos (color magenta); así como un vaso sanguíneo (✦) con un eritrocito. Aumentos 100x, Barra= 5µm

**Figura 14b.** Nervio ciático de rata **Sin Neuropatía**. Se observan axones mielinizados (→) con alteraciones de su forma normal circular a una irregular, así como también son visibles alteraciones en el grosor de la vaina de mielina (→), obsérvese los espacios dentro de estas vainas. Destaca un mastocito junto a un vaso capilar (∩).

**Figura 14c.** Nervio ciático de rata con **Paresia**. Se aprecian alteraciones de la morfología de las fibras, en la mayoría de los axones mielinizados, presentándose un mayor engrosamiento de la vaina de mielina (⇔) y de los espacios dentro de estas. Se presenta un mastocito con granulaciones separadas cercano a un capilar (∩).

**Figura 14d.** Nervio ciático de rata con **Parálisis**. Se acentúa los cambios de la morfología en la mayoría de los axones mielinizados, así como el engrosamiento de la vaina de mielina y los espacios dentro de estas (▶); Nótese la pérdida de la metacromasia (color azul) en los gránulos de secreción en la célula cebada (⇔).

**Figura 14e.** Nervio ciático de rata **Recuperada**. Se observa como el engrosamiento de la vaina de mielina se ha restablecido casi por completo. Obsérvese al mastocito (∩) en proceso de desgranulación y los gránulos presentan nuevamente su típica metacromasia (color magenta).

#### **7.5.1. Análisis ultraestructural del nervio ciático.**

Al realizar el análisis de los cortes finos en el grupo control se observó la ultraestructura normal del nervio que se caracteriza por la forma circular regular de los axones mielinizados, así como un grosor uniforme de la vaina de mielina proporcional al diámetro del axón, además los axones mielinizados y amielínicos se observaron con una electrondensidad uniforme (Figura 15a). Posterior a la intoxicación, durante la etapa de paresia (48 días), al igual que en microscopía de luz, se hacen presentes alteraciones manifestadas principalmente por la pérdida de la apariencia regular de las lamelas de mielina debidas a hinchazón y la formación de espacios dentro de ésta por desorganización de las láminas, y la presencia de macrófagos conteniendo fragmentos de mielina fagocitada; cambios en la morfología de los axones mielínicos con una variación en la electrondensidad por incremento de los neurofilamentos, mielina degradada y actividad lisosomal viéndose también en algunos axones amielínicos. Es en la etapa de Parálisis (58 días), en donde se presenta el mayor grado de alteración de la vaina de mielina la cual presenta alteraciones manifestadas como des-laminación siendo más marcadas que en la etapa anterior, además de observarse con un mayor grosor, también muestra numerosos espacios dentro de la vaina y en el citoplasma de las células de Schwann aparecen restos de mielina fagocitada, además de verse segmentos de axones completamente desmielinizados. En la etapa de recuperados (112 días) (Figuras 15b, c, d, e) se observan fibras en donde el espesor de la vaina de mielina se hace más regular y uniforme en la circunferencia de los axones, hay fibras que presentan remielinización, así como también algunas fibras en las que persisten los daños.

MICROGRAFIAS ELECTRONICAS DE LOS GRUPOS: I – V. Inclusión en resina epóxica, secciones finas, contrastadas con acetato de uranilo y citrato de plomo.

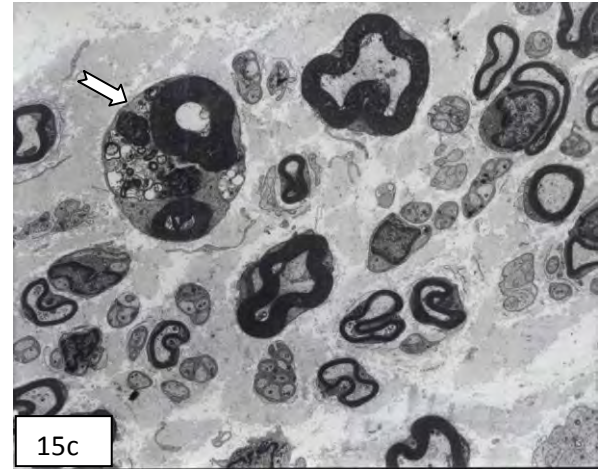
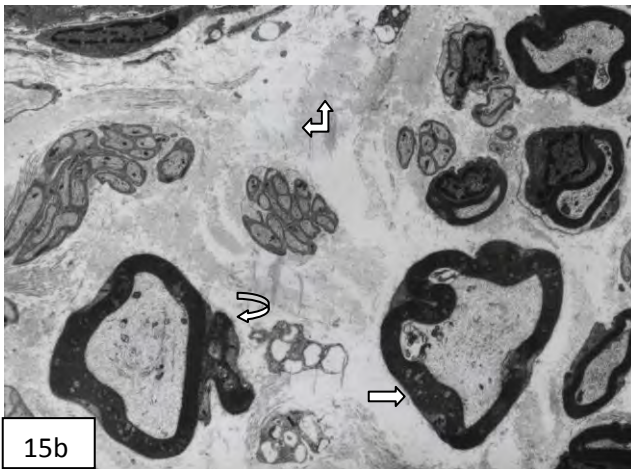
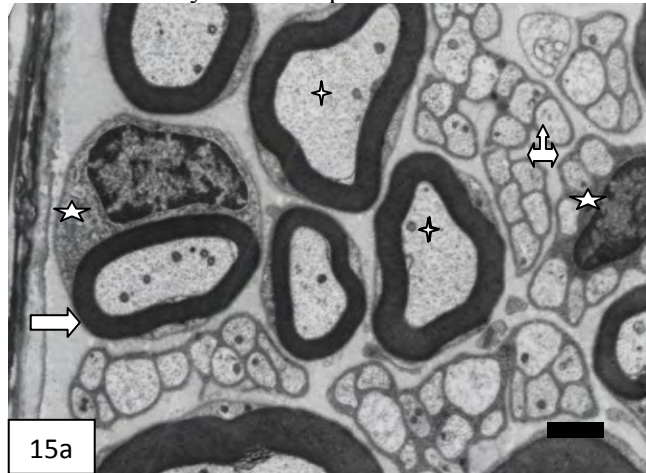


Figura 15a. Fascículo nervioso de rata **Control**. Se muestran tanto axones ( ✚ ) mielinizados envueltos por una vaina de mielina ( ⇔ ), así como varios grupos de axones amielínicos ( ⇨ ) con una morfología semicircular y rodeados por las células de Schwann ( ☆ ). 10,000x. Barra= 3µm




Figura 15b. Fascículo nervioso de rata **Sin Neuropatía**. Se muestran algunas alteraciones en los axones mielinizados () como cambios en su morfología, hay aumento y agregación de neurofilamentos y vesículas, además la vaina que los rodea presenta hinchamientos (). Además el espacio intersticial () se incrementa debido a la pérdida de fibras nerviosas tanto amielínicas como mielínicas. 5,000x


Figura 15c. Fascículo nervioso de rata con **Paresia**. Se observan fibras mielinizadas con zonas de estrechamiento axonal parcial y separación de las láminas en algunas regiones de la vaina de mielina. Se ve una fibra en proceso degenerativo (). 5,000x





Figura 15d. Fascículo nervioso de rata con **Parálisis**. Obsérvese los múltiples vacuolizaciones y restos de mielina dentro del citoplasma de la célula de Schwann (), zonas de hinchamiento y disgregación de la vaina de mielina (). 5,000x

Figura 15e. Fascículo nervioso de rata **Recuperada**. Se observan axones mielinizados con vaina de mielina que aun presenta alteraciones y con zonas de esponjamiento (). Hay axones en remielinización (fibras con vaina muy delgada, ). 8,000x

Por último, se confirma la participación del sistema inmune con la detección de anticuerpos IgG contra proteínas de la mielina (pruebas no incluidas en el manuscrito) y por la presencia de infiltrado inflamatorio que correspondía a linfocitos y células cebadas; estas células presentaban un comportamiento particular, en donde los linfocitos se presentaban después de la intoxicación, aumentaban progresivamente hasta la etapa de parálisis y disminuían drásticamente en el período de recuperación. (Figuras 13 de los grupos II al IV).

Con respecto a las células cebadas estas se presentan en el nervio ciático como residentes normales, tanto íntegras como en proceso de desgranulación. Pero posterior a la intoxicación con el fruto de *K.h.*, su número aumenta y es en la etapa de paresia (Día 48) donde se observa el primer incremento significativo, este permanece casi constante hasta la etapa de parálisis (Día 58) y durante la etapa de recuperación la cantidad de estas células aumenta nuevamente. Cabe mencionar que durante cada una de las etapas se detectaron células cebadas con la misma morfología que la presentada en el grupo control, es decir, tanto íntegras como desgranuladas o en proceso de desgranulación. De tal forma que este incremento podría ser explicado como una migración de las células cebadas hacia el área afectada, donde puede ser necesaria una participación activa de mediadores biológicos, proporcionados por los gránulos de este tipo celular. (Figuras 14 a-e).

## 8. DISCUSIÓN

Los hallazgos más frecuentes del efecto neurotóxico del fruto de *K.h* en la corteza motora, se presentaron en las neuronas de la capa piramidal externa y la interna, las cuales presentaron cambios tintoriales: neuronas basófilas (moradas) y neuronas eosinófilas (rojas) y cambios morfológicos por atrofia con retracción de las prolongaciones dendríticas y del soma, así como de la condensación de la cromatina. Particularmente para las neuronas rojas, este cambio de afinidad por los colorantes, se ha relacionado con la alteración del pH citoplasmático y nuclear, en otro tipo de intoxicaciones (Ortiz et al, 1992; Bañuelos et al, 2005). Además, estas alteraciones en la corteza motora, aparentemente fueron menos acentuadas con respecto a las observadas en el

resto de las regiones evaluadas en este estudio. Una posible explicación podría ser que, por ser esta una polineuropatía ascendente, lo primero que se lesiona es la parte distal de los axones (en el SNP) y por daño retrógrado al soma neuronal. Al estar alterado el soma, las sinapsis relacionadas con éste, pudieran presentar alteraciones que continúan avanzando en forma retrógrada hasta las conexiones con otras neuronas para finalmente alcanzar a las células de la corteza motora. Sin embargo se desconoce cómo se llevan a cabo estas alteraciones.

En la corteza cerebelosa llamó la atención la falta de células de Purkinje en los grupos de ratas intoxicadas con respecto al grupo control (I). La evaluación morfométrica mostró una disminución progresiva en el número de células de Purkinje en los diferentes grupos de ratas intoxicadas, incluso el grupo con recuperación (V) mostró una cantidad menor que el grupo con parálisis (IV). Debido a que las células de Purkinje contribuyen al control de la actividad motora, inicio del movimiento y al aprendizaje (López-Antúnez, 1983; Afifi y Bergman, 1999), la alteración de estas neuronas produce alteración en la marcha, esto pudiera explicar parte de las manifestaciones clínicas que se presentaron en las ratas a partir del grupo con paresia (III).

Otras de las alteraciones observadas en las células de Purkinje fueron retracción celular, hipercromasia y picnosis. En la literatura existen reportes de alteraciones en cerebelo inducidas por diversos químicos (Cavanagh, 1954; Costero y Barroso-Moguel, 1978; Branch y Jacqz, 1986; Takahashi et al, 1994), así como por diversos metabolitos producidos por plantas (Carod, 2003). En el estudio de Padrón y Velázquez (1956) describe alteraciones extensas y difusas de células de Purkinje de conejos a los cuales intoxicó de forma aguda con el fruto de *K.h.* 72 horas después de la intoxicación. Por lo tanto, las observaciones en nuestro estudio, pueden deberse a que transcurre un tiempo prolongado (24 días) entre el inicio de la intoxicación y la obtención de las muestras (grupo de ratas sin neuropatía), lapso en el que pudo haber ocurrido el fenómeno de cromatolisis. Se ha descrito que este fenómeno es progresivo y se desarrolla entre la primera y la segunda semana siguientes a la agresión neuronal (Lieberman, 1971; McIlwain y Hoke, 2005). Sin embargo, para el caso particular de la intoxicación con *K.h.*, este fenómeno se presenta mucho más rápido, porque se administraron dosis altas del fruto (Padrón y Velázquez, 1956).

En el puente, así como en la médula espinal, se encuentran neuronas directamente relacionadas con la motricidad y coordinación del movimiento. Padrón y Velázquez (1956) describe que durante la intoxicación aguda con el fruto de *K.h.* en conejos, las neuronas de la médula espinal y del puente se observaron de la siguiente manera: *“En muchas células el núcleo se vio considerablemente disminuido de tamaño y arrugado o transformado en vesículas grandes y claras, con la cromatina aglutinada en forma de bandas basófilas que unían al núcleo a la membrana. Finalmente aparecía disuelto en el citoplasma”*. Estas características morfológicas no se observaron en el presente trabajo en ninguna de las regiones analizadas. Esto pudiera deberse a que la dosis tóxica total del fruto se fraccionó en varias dosis para su administración en un lapso de 14 días. Por otra parte en esta investigación se describió la presencia de neuronas en fase de *cromatolisis*, el cual es un mecanismo de protección que se presenta después de una agresión neuronal. Esta reacción se ha descrito principalmente en neuronas que presentan una interrupción de la continuidad del axón, en donde la primera reacción del soma se caracteriza por la agrupación de la sustancia de Nissl y migración de esta a la periferia celular y por último, el núcleo adopta una localización excéntrica (Schwab y Bartholdi, 1996).

En los núcleos corticopontocerebelosos se llevan a cabo funciones relacionadas con el equilibrio, de esta manera se pudiera explicar en parte, la falta de coordinación observada en las ratas intoxicadas. Otra región relacionada

con la coordinación y regulación del movimiento son los tractos corticopontocerebelosos (Afifi y Bergman, 1999); en este estudio no se observó pérdida de la mielina como sucede en el SNP (Salazar et al., 2006), únicamente se observaron alteraciones morfológicas en los axones de estos tractos, desde el grupo de ratas sin neuropatía (II) hasta el grupo de ratas con recuperación (V). Algunos axones de estos tractos nerviosos provienen de las neuronas de los núcleos corticopontocerebelosos, por lo tanto es posible que debido a las alteraciones descritas del axón, se inicie el fenómeno de cromatolisis en las neuronas de estos núcleos y esas alteraciones repercutan en la falta de coordinación previa a la presencia de parálisis en las ratas intoxicadas.

La desmielinización segmentada y el daño axonal observado en el modelo experimental aquí descrito son comparables con reportes previos de desmielinización local en el nervio ciático de rata, que fueron inducidos por inyección intraneural de las toxinas purificadas del fruto de *K.h.* (Mitchell et al., 1978).

Muñoz y Chávez (1979) en otro experimento realizado en gatos con extractos de la semilla, concluye que la parálisis producida por las toxinas de la “tullidora” es el resultado tanto del bloqueo de la conducción de los impulsos nerviosos como de la denervación muscular; por otra parte sugiere que la implicación de los nervios motores en la neuropatía experimental por tullidora y la preservación de sensación somática en cuadriplejía de niños intoxicados accidentalmente, están relacionados con la distribución de los diámetros axonales en nervios periféricos.

Latker y colaboradores (1991) mencionan que, después de un daño las células cebadas se acumulan y se desgranulan en el nervio periférico. Así mismo, se ha reportado en otras investigaciones un aumento en la cantidad de células cebadas endoneurales en diferentes neuropatías y en enfermedades neurodegenerativas del SNC por ejemplo: la neuropatía diabética, esclerosis múltiple, el síndrome de Guillain-Barré, Alzheimer y degeneración Walleriana entre otras (Olsson y Sjostrand, 1969; Esposito et al., 2002).

## 9. CONCLUSIONES

Con la información obtenida en estos estudios, se observó que durante la intoxicación crónica con el fruto de *Karwinskia humboldtiana*, se producen alteraciones de diferente magnitud en neuronas y axones del cerebro (corteza motora), cerebelo (corteza cerebelosa), puente (núcleos vestibulares, tractos corticopontocerebelosos) y médula espinal (astas anteriores) del Sistema Nervioso Central, que pudieran contribuir al desarrollo de la polineuropatía característica de esta intoxicación.

A nivel del área motora de la corteza se presentaron cambios tintoriales: neuronas basófilas (moradas) y neuronas eosinófilas (rojas) y cambios morfológicos por atrofia con retracción de las prolongaciones dendríticas y del soma, y la condensación de la cromatina, así como también cambios en la estructura del neuropilo. La sustancia blanca muestra evidencia de desmielinización, interrupción o ruptura y pérdida axonal.

En la corteza cerebelosa destacó la pérdida de células de Purkinje en los grupos de ratas intoxicadas además de alteraciones observadas en las células tales como: retracción celular, hipercromasia, picnosis nuclear y gliosis.

En el puente se observaron neuronas en fase de cromatolisis (agrupación de la sustancia de Nissl y migración de ésta a la periferia celular y por último, el núcleo adopta una localización excéntrica). Y en los núcleos y tractos corticopontocerebelosos se observaron cambios morfológicos debidos a cromatolisis, hipercromasia y retracción del soma, además de la pérdida de axones y desmielinización desde el grupo de ratas sin neuropatía (II) hasta el grupo de ratas con recuperación (V).

En el asta anterior de la médula se vieron algunos cambios en la morfología neuronal, con retracción del soma e hipercromasia además de la cromatolisis y cambios en el neuropilo debidos a alteraciones en las prolongaciones dendríticas y axonales.

Y finalmente se produjo desmielinización segmentada y alteraciones en la estructura axonal, así como la pérdida de las fibras en el nervio ciático de ratas intoxicadas en las diferentes etapas de la polineuropatía, persistiendo aún en el grupo de ratas con recuperación. Además se demuestran cambios en la densidad de las células cebadas y cambios histoquímicos en los gránulos, durante las diferentes etapas de la neuropatía periférica. Esto sugiere la participación activa de estas células en el proceso de desmielinización y remielinización del nervio ciático.

## 10. PERSPECTIVAS

Con el fin de caracterizar en forma integral la intoxicación producida por el fruto de la *K. humboldtiana*, se propone que en este mismo modelo, se estudien las alteraciones morfológicas a diferentes tiempos (1 a 2 semanas) entre cada una de las etapas ya descritas para esta intoxicación, tanto a nivel central como periférico; ya que la evaluación en este estudio se realizó en periodos que varían entre 10 y 50 días y además, en el grupo de ratas con recuperación (grupo V) continúan las alteraciones morfológicas en el SNC y SNP, quedando la incertidumbre de saber si estas alteraciones se resolverán en forma total o parcial, o que pudieran dejar secuelas neurológicas en un individuo a largo plazo. También es importante analizar el curso de estas alteraciones en el sistema nervioso en tiempos más prolongados. Por otro lado, hay que considerar que existen factores bioquímicos y moleculares que intervienen en la generación de las alteraciones descritas, los cuales también deben ser analizados.

Es necesario valorar si hay cambios en la morfología, en la densidad y actividad de las células neuróglas del SNC y en las células de Schwann con métodos de estudio específicos.

Determinar el mecanismo mediante el cual las células cebadas activan o inhiben la liberación de sus gránulos durante la degeneración y regeneración en este modelo animal.

Y finalmente implementar un estudio electrofisiológico en las ratas para conocer el comportamiento de la conducción nerviosa durante el desarrollo de la neuropatía hasta la recuperación.

Una vez que se obtenga mayor información será posible plantear los mecanismos patofisiológicos de estas intoxicaciones, los que a su vez darían lugar a la elaboración de tratamientos para aliviar estas alteraciones o incluso a extrapolar a otras neuropatías desmielinizantes. Ya que hasta el momento, lo único que se puede ofrecer a los pacientes son tratamientos de sostén y rehabilitación.

Este nuevo modelo experimental para polineuropatía periférica es reproducible, de fácil manejo y relativamente inocuo, porque las toxinas de *K.h.* no se absorben por la piel o membranas mucosas durante su manipulación, puede tener otras aplicaciones y ser desarrollado en diversas especies de animales.



## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

### Referencias del trabajo de tesis basado en los dos artículos publicados:

\*Salazar-Leal M.E., Flores M.S., Sepúlveda-Saavedra J., Romero-Díaz V.J., Becerra-Verdín E.M., Tamez-Rodríguez V., Martínez H.R., Piñeyro-López A., and Bermúdez M.V.: An experimental model of peripheral neuropathy induced in rats by *Karwinskia humboldtiana* (buckthorn) fruit. Journal of the Peripheral Nervous System 11:252-261 (2006).

\*Becerra-Verdín E.M., Bermúdez-Barba M.V., Salazar-Leal M.E., Ancer-Rodríguez J., Romero-Díaz V., Soto-Domínguez A., Ballesteros-Elizondo R.G., Saucedo-Cárdenas O., Piñeyro-López A., Sepúlveda-Saavedra J.: *Karwinskia humboldtiana* (buckthorn) fruit causes Central Nervous System damage during chronic intoxication in the rat. Toxicon 53: 645-651 (2009).

### Referencias generales y complementarias al trabajo de tesis:

-Afifi, A.K., Bergman, R.A., 1999. Neuroanatomía funcional. McGraw Hill. 45-199.

-Arellano, E.C., Mendoza, J.C., Domínguez, F.C., 1994. Intoxicación por *Karwinskia johnstonii*: Estudio de 12 pacientes. Boletín Médico. Hospital Infantil México. 51 (2), 105-112.

-Asbury, A.K, Johnson, P.C., 1978. Pathology of Peripheral Nerve. Vol. 9 in the Series Major Problems in Pathology. W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto. pp. 311.

-Bañuelos, P.J., Nolasco, R.G., Monteón, J.A., García, L.P., Ruiz, L.M., García, E.J. 2005. Histological evaluation of brain damage caused by crude quinolizidine alkaloid extracts from lupines. Histology and histopathology. (20) 1147-1153.

-Barr, M.L. (1975): El Sistema Nervioso Humano: Un Punto de Vista Anatómico. Ed. Harla, S.A. de C.V. México. pp.373.

-Bermúdez, M.V., González, S.D., Guerrero, M., Waksman, N., Piñeyro, A., 1986. Experimental intoxication with fruit and purified toxins of buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*). Toxicon. 24 (11-12), 1091-7.

-Bermúdez, M.V., Lozano Meléndez, F.E., Salazar Leal, M.E., Waksman, N., Piñeyro, A., 1995. Intoxicación de una familia con *Karwinskia humboldtiana* (tullidora). Gac. Méd. Mex. (131), 100-106.

-Branch, R.A., Jacqz, E., 1986. Subacute neurotoxicity following long-term exposure to carbaryl. Am. J. Med. 80 (4) ,741-745.

-Brumback, R.A., Leech, R.W. 1995. Neuropathology and basic neuroscience. Oklahoma Notes. Springer-Verlag, New York, Inc. USA. Pp. 276.

-Bustamante, S., Olvera, R., Correa, N., 1978. Intoxicación fatal por tullidora (*Karwinskia humboldtiana*). Gaceta médica de México. (114), 241-244.

-Carod, F.J., 2003. Neurological syndromes linked with the intake of plants and fungi containing a toxic component (I). Neurotoxic syndromes caused by the ingestion of plants, seeds and fruits. Rev Neurol. 36 (9), 860-871.

-Castillo, N.F., 1920. Contribución al estudio de las parálisis tóxicas. Un caso de envenenamiento colectivo por tullidora. En Memorias del Quinto Congreso Médico Mexicano. Puebla. (1), 240-243.

-Cavanagh, J.B., 1954. The toxic effect of tri-ortho-cresyl phosphate on the nervous system. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 17 (3), 163-172.

-Charlton, K.M., Pierce, K.R., 1970. A neuropathy in goats caused by experimental collotillo (*Karwinskia humboldtiana*) poisoning. II. Lesions in the peripheral nervous system-teased fiber and acid phosphatase studies. Path. Vet. 7 (5), 385-407.

- Chusid, J.G., 1987. Neuroanatomía Correlativa y Neurología Funcional. Ed. El Manual Moderno. México. Pp. 580.
- Costero, I., Barroso-Moguel, R., 1978. Alteraciones Microscópicas Encontradas en el Sistema Nervioso Central de Gatos y Ratas Albinas, Relacionadas con la Intoxicación de Solventes Industriales (Tolueno y Tíner). Cuad. Científ. CEMESAN. México. 8:91-122.
- Dyck, P.J., Thomas, P.K., Lambert, E.H., 1984. Peripheral Neuropathy. W.B. Saunders Company. Canada. Vol.II 2a.ed. pp.754.
- Edwards P.M., Sporel-ozakat, E., Gispen, W.H., 1991. Neurotoxic Acrylamide and Neurotrophic Melanocortin Peptides. Can Contrasting Actions Provide Clues About Modes of Action? Neuropathol. Appl. Neurobiol. 17(2):91-104.
- Escobar, A., Nieto, D., 1965. Aspectos neuropatológicos de la intoxicación con *Karwinskia humboldtiana*. Estudio experimental. Gac. Med. Méx. (2), 163-177.
- Esposito, B.; De Santis, A.; Monteforte, R.; and Chieffi, B. G. (2002). Mast cell in Wallerian degeneration: Morphologic and ultrastructural changes. The journal of comparative neurology. 445, 199-210.
- Fernández, N.R., 1992. Nombres comunes, usos y distribución geográfica del género *Karwinskia* (Rhamnaceae) de México. Anales del Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Serie Botánica. (63), 1-23.
- Gartner, L.P., Hiatt, J.L., 2002, Texto Atlas de Histología, 2a. ed. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V. México D.F., (9), 210-211.
- Junqueira, L.C., y Carneiro, J., 2000. Histología Básica. 5ª. Ed. Masson, S.A. Barcelona, Esp. 149-181.
- Klüver, H., Barrera, E., 1953. A method for the combined staining of cells and fibers of the nervous system. Journal of Neuropathology and Experimental Neurology. 12 (4), 400-3.
- Latker, C.H.; Wadhvani, K.C.; Balbo, A.; Rapoport, S.I. (1991) Blood-nerve barrier in the frog during Wallerian degeneration: are axons necessary for maintenance of barrier function?. J. Comp. Neurol. 309, 650-664.
- Lieberman, A.R., 1971. The axon reaction: a review of the principal features of perikaryal responses to axon injury. Int. Rev. Neurobiol. (14), 49-124.
- López-Antúnez L., 1983. Anatomía Funcional del Sistema Nervioso. Editorial Limusa, S.A. México. pp. 784.
- Marsland, T.A., Glees, P., Eriksson, L.B., 1954. Modification of the Glees silver impregnation for paraffin sections. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 13 (4), 587-91.
- Martínez, M., 1994. Tullidora: Las plantas medicinales en México. 1ª Ed. Editorial Botas. 501-504.
- McIlwain, D.L., Hoke, B.V., 2005. The role of the cytoskeleton in cell body enlargement, increased nuclear eccentricity and chromatolysis in axotomized spinal motor neurons. BMC Neurosci. 6 (1), 19.
- Mitchell, R.O., Weller, H., Evans, I., Arai and Daves, G.D. (1978) Buckthorn neuropathy: Effects of intraneural injection of *Karwinskia humboldtiana* toxins. Neuropathology and applied neurobiology. 4: 85-97.
- Muñoz, M.E., Chávez, B., 1979. Conduction block and functional denervation caused by tullidora (*Karwinskia humboldtiana*). Experimental neurology. (65), 255-270.
- Muñoz, M.E., Chavez, B., Nathan J., 1983. Denervation caused by tullidora (*Karwinskia humboldtiana*). Neuropathol Appl. Neurobiol. 9 (2), 121-34.
- Ocampo, R.L., Ontiveros, N.O., Fernández, L.O. 2007. Intoxication with buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*): report of three siblings. Pediatr. Dev. Pathol. 10 (1), 66-68.
- Ortiz, G.G., González, B.I., Fera, V.A., 1992. Structural study of the acute effect of *Karwinskia humboldtiana* on cerebral motor cortex, hippocampus, and caudate nucleus of the rat. Gen Pharmacol. 23 (3), 543-547.
- Ortiz-Hidalgo, C., Weller, R.O., 1992. Peripheral Nervous System. Histology for Pathologists, Chapter 7. Ed. Stephen S. Sternberg. Raven Press, Ltd, New York. 169-193.

- Olsson, Y. (1968). Mast cell in the nervous system. *Int. Rev. Cytol.* 24: 27-70.
- Olsson, Y; Sjöstrand, J. (1969). Proliferation of mast cell in peripheral nerves during Wallerian degeneration: a radioautographic study. *Acta Neuropathol.* 13, 11-122.
- Padrón, F., 1951. Clinical and experimental studies on paralysis in children due to *Karwinskia humboldtiana*. *Gac. Med. Mex.* 81(2-3-4), 299-311.
- Padrón, F., Velázquez, T., 1956. Patología experimental y clínica de la parálisis por *Karwinskia humboldtiana*. *Rev. Mex. Ped.* (25), 225-237.
- Paxinos, G., Watson, C., 2005. *The brain stereotaxic coordinates*. Elsevier Academic Press. San Diego, California, U.S.A. 5<sup>th</sup> edition.
- Puértolas, M.M., Nava, J.O., Medina, L.H., López, O.F., Oyervides, P.J., 1984. Polirradiculoneuritis por *Karwinskia humboldtiana*. Informe de seis casos. *Rev. Med. IMSS. (Mex).* (22), 22-27.
- Raposo, G.; Tenza, D.; Mecheri, S; Peronet, R.; Bonnerot, C. and Desaymard, C. (1997). Accumulation of major histocompatibility complex class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation. *Mol. Biol. Cell.* 8, 2631-2645.
- Robbins. (1984) *Patología Estructural y Funcional*. 2ª Edición. Nueva Editorial Interamericana México D.F. 1420-1424.
- Salazar-Leal M.E., Flores M.S., Sepúlveda-Saavedra J., Romero-Díaz V.J., Becerra-Verdín E.M., Tamez-Rodríguez V., Martínez H.R., Piñeyro-López A., and Bermúdez M.V.: An experimental model of peripheral neuropathy induced in rats by *Karwinskia humboldtiana* (buckthorn) fruit. *Journal of the Peripheral Nervous System* 11,252-261 (2006).
- Schaumburg, H.H., Spencer, P.S., 1976. Degeneration in Central and Peripheral Nervous Systems Produced by pure n-hexane: An Experimental Study. *Brain.* 99,183-192.
- Schwab, M.E., Bartholdi, D.,1996. Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiological reviews.* 76 (2), 319-370.
- Segovia, A.P., Fernández, Z.P., 1972. Polirradiculoneuritis tóxica por *Karwinskia humboldtiana*. *Bol. Med. Hosp. Infant.* 29 (1), 89-90.
- Takahashi, A., Mizutani, M., Agr, B., Itakura, C., 1994. Acrylamide induced neurotoxicity in the central nervous system of Japanese quails. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 53 (3), 276-283.

RESEARCH REPORT

An experimental model of peripheral neuropathy induced in rats by *Karwinskia humboldtiana* (buckthorn) fruit

Martha E. Salazar-Leal<sup>1</sup>, M.S. Flores<sup>2</sup>, Julio Sepulveda-Saavedra<sup>3</sup>,  
Viktor J. Romero-Diaz<sup>3</sup>, Eduardo M. Becerra-Verdin<sup>3</sup>, Victor A. Tamez-Rodriguez<sup>1</sup>,  
Hector R. Martinez<sup>4</sup>, Alfredo Piñeyro-Lopez<sup>1</sup>, and M.V. Bermudez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Farmacología y Toxicología; <sup>2</sup>Departamento de Microbiología; <sup>3</sup>Departamento de Histología; and  
<sup>4</sup>Servicio de Neurología, Hospital Universitario y Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León,  
Monterrey, Mexico

Toxicon 53 (2009) 6–10–101



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicon

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/toxicon](http://www.elsevier.com/locate/toxicon)



*Karwinskia humboldtiana* (buckthorn) fruit causes Central Nervous System damage during chronic intoxication in the rat

Eduardo M. Becerra-Verdín<sup>a</sup>, M.V. Bermúdez-Barba<sup>b</sup>, Martha E. Salazar-Leal<sup>b</sup>,  
J. Ancer Rodríguez<sup>c</sup>, Viktor Romero-Diaz<sup>a</sup>, Adolfo Soto-Domínguez<sup>a</sup>,  
Raquel G. Ballesteros-Eliozondo<sup>a</sup>, Odila Saucedo-Cardenas<sup>a,d</sup>,  
Alfredo Piñeyro Lopez<sup>e</sup>, Julio Sepúlveda-Saavedra<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Histología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Av. Madero y Eduardo Aguirre Pequeño, A.P. 1563 Monterrey, Nuevo León, Mexico

<sup>b</sup>Departamento de Farmacología y Toxicología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, A.P. 1563 Monterrey, Nuevo León, Mexico

<sup>c</sup>Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, A.P. 1563 Monterrey, Nuevo León, Mexico

<sup>d</sup>Centro de Investigación Biomédica del Noroeste, IMSS, Monterrey, Nuevo León, Mexico

<sup>e</sup>Pharma, S.A. Monterrey, Nuevo León, Mexico