



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, INGENIERÍA Y MEDICINA

PROGRAMAS MULTIDISCIPLINARIOS DE POSGRADO EN CIENCIAS  
AMBIENTALES

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

## MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES

CARACTERIZACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA DEL NERVIO SURAL DE RATAS  
EXPUESTAS CON SEMILLAS DE *Dioon edule* Lindl.

PRESENTA:

**I.B.T. LILIANA HORTENCIA MÉNDEZ BARREDO**

**DIRECTOR DE TESIS:**

DRA. ERIKA GARCÍA CHÁVEZ

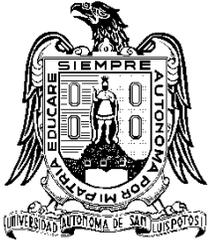
**CO-DIRECTOR DE TESIS**

DR. ISMAEL JIMÉNEZ ESTRADA

**ASESORA:**

DRA. LAURA YÁÑEZ ESPINOSA

SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P., SEPTIEMBRE DE 2011



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, INGENIERÍA Y MEDICINA

PROGRAMAS MULTIDISCIPLINARIOS DE POSGRADO EN CIENCIAS  
AMBIENTALES

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

## MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES

CARACTERIZACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA DEL NERVIO SURAL DE RATAS EXPUESTAS CON  
SEMILLAS DE *Dioon edule* Lindl.

PRESENTA:

**I.B.T. LILIANA HORTENCIA MÉNDEZ BARREDO**

**COMITÉ TUTELAR:**

**DIRECTOR:** DRA. ERIKA GARCÍA CHÁVEZ

---

---

**CO-DIRECTOR:** DR. ISMAEL JIMÉNEZ ESTRADA

---

---

**ASESORA:** DRA. LAURA YÁÑEZ ESPINOSA

---

**SINODALES:**

**PRESIDENTE:** DRA. ERIKA GARCÍA CHÁVEZ

---

---

**SECRETARIO:** DR. ISMAEL JIMÉNEZ ESTRADA

---

---

**VOCAL:** DRA. BERTHA SEGURA ALEGRÍA

---

# **CRÉDITOS INSTITUCIONALES**

## **PROYECTO REALIZADO EN:**

El Instituto de Investigación de Zonas Desérticas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí Bajo la tutoría de la Dra. Erika García Chávez, y en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN-Zacatenco bajo la co-dirección del Dr. Ismael Jiménez Estrada.

## **CON FINANCIAMIENTO DE:**

PROGRAMA DE MEJORAMIENTO DE PROFESORADO (PROMEP- BAJO EL FOLIO UASLP-PTC-151)

FONDO DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN (FAI-C10-FAI-05-58.87)

**AGRADEZCO A CONACyT EL OTORGAMIENTO DE LA BECA-TESIS**

**Becario No. 333085**

**LA MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES RECIBE APOYO ATRAVÉS  
DEL PROGRAMA NACIONAL DE POSGRADOS DE CALIDAD (PNPC)**

## DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mis padres;

**Alonso Méndez Santiz y María Guadalupe Barredo Cano.**

No hay letras ni palabras que describan cuanto los quiero.

A mis hermanos;

**Luis y Cuauhtémoc**, que me han apoyado en todo momento y aunque están lejos, sus palabras siempre me fortalecen.

A mi hermano **Marcos** que siempre va a estar en mi corazón.

A los angelitos que Dios nos mando, Augusto y Máximo Méndez Estrada.

Para todas aquellas personas que han confiado en mí, que siempre me han dado un pedacito de su corazón en cada momento de mi vida. A los que se quedaron en esta tierra y a los que ya no están.

## AGRADECIMIENTOS

**Dios** te agradezco la fortaleza que me has dado para levantarme después de cada tropiezo y poder seguir adelante, por permitirme saber lo que es la vida, el trabajo y el amor.

A la Dra. **Bertha Segura Alegría** y al Dr. **Ismael Jiménez Estrada**, por ser unas maravillosas personas, por abrirme las puertas de su laboratorio en el CINVESTAV Zacatenco, darme todas las facilidades de trabajar con ellos, compartirme su conocimiento, guiarme en todo momento, les agradezco mucho todo el apoyo que me han dado, Dios los bendiga siempre.

A la Dra. **Erika García Chávez**, por su dirección, por darme la oportunidad y confianza de trabajar en su grupo de investigación.

A la Dra. **Laura Yáñez Espinosa**, por todo su apoyo y confianza en la realización de éste trabajo, por sus consejos, y sobre todo por su amistad.

Al Dr. **Ramón Jarquin Gálvez**, por el apoyo incondicional que me has dado todo este tiempo, por tu amistad sincera y por tus consejos.

A **David Ruiz Tavares**: Por tu apoyo, tu paciencia, tu comprensión y tu cariño. Te quiero

A **José Carlos Guadarrama**, por su apoyo técnico y experiencia de trabajo en el bioterio y en el cuidado de los animales experimentales así como la fabricación de material para electrofisiología.

A mis compañeros del IIZD de la UASLP; **Ángeles Ortega, Paulina Rodríguez, Carmen Ortiz, César Godínez, Roció Tovar**, por su tiempo y amistad.

Al Dr. **Rogelio Aguirre Rivera, Dr. Juan Carlos García, Dr. Gregorio Álvarez**, a la Dra. **Bertha Juárez**, que fueron pieza fundamental en la adquisición de nuevos conocimientos.

# CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS .....	VII
ÍNDICE DE CUADROS .....	VII
<b>ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>1</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>2</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
1.1 Generalidades de las <i>Cycadales</i> .....	3
1.1.1 Usos antropogénicos.....	4
1.1.2 Toxicidad de las <i>Cycadales</i> .....	4
1.1.3 Metabolitos secundarios.....	5
1.2 Las <i>Cycadas</i> en México .....	9
1.3 <i>Dioon edule</i> Lindl. (chamal).....	10
1.3.1 Descripción botánica de <i>Dioon edule</i> Lindl.....	10
1.3.2 Usos antropogénicos.....	11
1.3.3 Toxicidad de <i>Dioon edule</i> Lindl.....	11
1.4 Generalidades del Sistema Nervioso Periférico.....	13
<b>II. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>18</b>
<b>III. HIPÓTESIS .....</b>	<b>19</b>

<b>IV. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>19</b>
<b>V. OBJETIVOS ESPECIFICOS .....</b>	<b>19</b>
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
5.1 Recolección de material vegetal .....	20
5.2 Preparación del material vegetal .....	20
5.3 Animales experimentales.....	20
5.4 Tratamientos .....	21
5.5 Análisis electrofisiológico .....	22
5.6 Análisis estadístico.....	23
<b>VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>24</b>
<b>VIII. CONCLUSIONES .....</b>	<b>31</b>
<b>IX. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>33</b>
<b>X. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>35</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Metabolitos secundarios Toxinas de las cicadáceas. ....	6
Figura 2. Estrótróbilos de <i>Dioon edule</i> Lindl. ....	11
Figura 3. Respuesta eléctrica del potencial de acción compuesto en nervios periféricos, con bajo umbral de excitación. ....	17
Figura 4 . Peso corporal. ....	24
Figura 5. PAC producidos por estímulos eléctricos de intensidad creciente. ....	26
Figura 6. Amplitud del PAC. ....	27
Figura 7. Área del PAC. ....	28
Figura 8. Velocidad de máxima de conducción. ....	29
Figura 9. Velocidad de conducción promedio. ....	30

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación de las fibras aferentes .....	15
---	----

---

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

**BMAA.**  $\beta$ -N-metilamino-L-alanina

**DABA.** Acido 2,4-diamino butírico

**ELA/DCP=** (Esclerosis lateral amiotrófica/demencia compleja parkinsoniana)

**MAAM.** Metilazoximetanol

**NMDA.** N-metil-D-aspartato

**PA.** Potencial de Acción

**PAC.** Potencial de Acción Compuesto

**SN.** Sistema Nervioso

**SNC.** Sistema Nervioso Central

**SNP.** Sistema Nervioso Periférico

**Vía i.g.** Vía intragástrica

**Vía i.p.** Vía intraperitoneal

---

## RESUMEN

Las *Cycadales* son un pequeño grupo de plantas gimnospermas clasificadas en tres familias *Cycadaceae*, *Stangeriaceae* y *Zamiaceae*. Respecto a su uso alimentario, se ha identificado que el género *Cycas*, posee una neurotoxina  $\beta$ -N-metilamino-L-alanina (L-BMAA), asociada a una patología humana conocida como esclerosis lateral amiotrófica-demencia compleja parkinsoniana, tras la ingesta de animales consumidores de sus semillas. Modelos animales, expuestos a la neurotoxina, muestran alteraciones del comportamiento, rigidez, movimientos involuntarios y dificultad en su locomoción. En San Luis Potosí se distribuye la especie *Dioon edule* Lindl. (*Zamiaceae*) de uso alimentario. Un estudio etnobotánico, señala la presencia de toxicidad en humanos y ganado, tras el consumo de semillas y hojas. Un trabajo previo, corroboró la capacidad toxica del chamal sobre la locomoción. Tal hallazgo sugiere que las semillas tienen efectos sobre el sistema nervioso. Se valoró las características electrofisiológicas del potencial de acción compuesto, en el nervio sural de ratas expuestas con semillas de chamal. Los experimentos se llevaron a cabo con 25 ratas macho Wistar de 200 gramos de peso al iniciar el experimento, distribuidas completamente al azar en cada tratamiento. La planta fue administrada por vía i.g en suspensiones acuosas de 0.5 g/kg/día. Grupos: a) semilla; b) sarcotesta; c) gametofito; d) agua 0.5ml/kg y e) L-BMAA (2.0 mg/kg-dosis vía i.p. inductora de alteraciones en la locomoción. Al finalizar los 30 días de exposición los animales fueron pesados y anestesiados con hidrato de cloral para extraer el nervio. Éstos se sometieron a los análisis electrofisiológicos. Los datos obtenidos se analizaron utilizando el software Stata 8 y para la evaluación de los tratamientos se realizó un análisis de varianza usando como prueba post-hoc de Tukey. Considerando una significancia de  $P < 0.05$ . Los resultados mostraron que tanto la semilla como los componentes individuales, sarcotesta y gametofito, a una dosis de 0.5 mg/kg de peso durante 30 días de exposición por vía oral, no modificaron las características electrofisiológicas: a) Umbral de activación, b) Amplitud y/o área del potencial de acción compuesto (PAC); c) Latencia al inicio y al pico del PAC; y d) Velocidad de conducción de nervios sural de ratas tratadas y no tratadas, mientras que la toxina L-BMAA a una dosis de 2.0 mg/kg de peso durante 30 días de exposición vía intraperitoneal, disminuye significativamente las características electrofisiológicas, previamente señaladas, de nervios sural de ratas Wistar.

### 1.1 Generalidades de las *Cycadales*

El nombre *cycada* se deriva de la palabra griega *koikas*, usado por Teofrasto para una palma egipcia (*Hyphane the - baica*). Linneo, en el año 1737, fue el primero en dar a las *cycadas* su estatus taxonómico al nombrar uno de los géneros, *Cycas* (Norstog y Nicholls, 1997). Junto con *Ginkgo*, son consideradas como las plantas vivientes con semilla más primitivas que se conocen (Arnold, 1953; CONABIO, 2009). Su registro fósil, aún escaso, se puede seguir hasta el periodo Pérmico (hace unos 280 millones de años según Zhifeng-Gao y Thomas, 1989; CONABIO, 2009) y posiblemente hasta el Carbonífero (hace 345 millones de años). De acuerdo con Mamay (1976) estas plantas formaban un componente importante de la vegetación del planeta durante la Era Mesozoica (hace unos 160 millones de años), comúnmente conocida como la "Era de los dinosaurios y las *Cycadas*" (CONABIO, 2009).

Las *cycadales* se clasifican en tres familias: *Cycadaceae*, *Stangeriaceae* y *Zamiaceae* y once géneros (Vovides et al., 2004; Yañez, 2006, Covarrubias, 2009). En la actualidad la distribución de las *cycadales* está limitada a las regiones tropicales y subtropicales del mundo, desde selvas húmedas, selvas secas, bosques nublados, bosques de pino-encino y matorrales (CONABIO, 2009), con un poco más de 200 especies descritas (Stevenson et al., 1995; CONABIO, 2009).

### **1.1.1 Usos antropogénicos**

Las *cycadales* conservan un sentido religioso y cultural para muchos pueblos alrededor del mundo. Según su forma de uso por el hombre se clasifican en plantas ornamentales vivas, debido a que poseen hojas coloridas y brillantes, y conos masculinos gigantescos (Brener et al., 1997; Covarrubias, 2009), medicinales, insecticidas y comestibles. Actualmente estas plantas se encuentran en peligro de extinción (IUCN, 2009), debido a la destrucción de su hábitat y al comercio ilegal de plantas silvestres (CITES, 1997; Pérez et al., 2006).

### **1.1.2 Toxicidad de las *Cycadales***

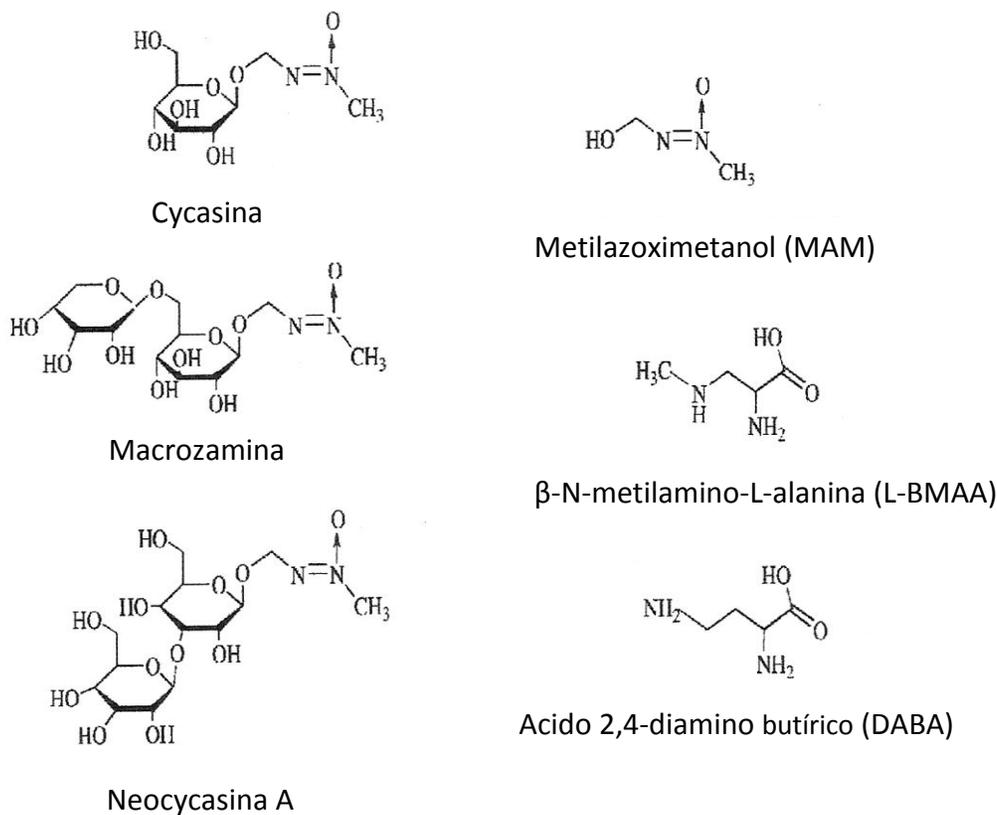
Dentro de su uso alimentario, se han identificado especies que poseen un alto grado de neurotoxicidad. Marjorie Withing (1963), fue la primera en proponer que las *cycadales*, especialmente *Cycas micronesica* Hill, podría ser la responsable de la patología neurológica conocida como esclerosis lateral amiotrófica - demencia compleja parkinsoniana (ELA/DCP), enfermedad que hace algunos años se presentaba con muy alta frecuencia (33%) entre los indios Chamorro en Guam, y que se caracteriza por mostrar signos típicos de inmovilidad post-encefálica y parálisis que semeja a la esclerosis lateral amiotrófica, en otros casos, se presenta una forma progresiva de la enfermedad de Parkinson (Withing, 1963; Spencer et al., 1987; Pérez y Soto, 2007).

De acuerdo con lo anterior, esta planta ha sido objeto de estudio principalmente en la búsqueda de los metabolitos secundarios responsables de su toxicidad y los mecanismos de acción (Withing, 1963; Brener et al., 1997; Steward et al., 2006; Yáñez, 2006; Pérez y Soto, 2007).

### 1.1.3 Metabolitos secundarios

Como muchos otros grupos de plantas, las cycadas producen metabolitos secundarios que almacenan en altas concentraciones y en diversos tejidos. Estos compuestos son secundarios, ya que no son vitales para el metabolismo de la planta, pero en muchos casos cumplen una función protectora porque son desagradables o tóxicos para los depredadores y además son elementos cruciales en el desarrollo y mantenimiento del mutualismo (polinización) y el parasitismo (herbivoría) de los herbívoros ligados a estas plantas (Norstog y Nicholls, 1997; Schneider et al., 2002).

Entre los metabolitos identificados en estas plantas (Figura 1), se encuentran el **metilazoxiglucósido**, un azúcar adherido a **Metilazoximetanol (MAM)**, que se producen relativamente en altas concentraciones y es sin duda responsable de algunas enfermedades neurales degenerativas de corto y largo plazo derivadas de su consumo (Norstog y Nicholls, 1997), éste ha sido identificado en especies del género de *Cycas* (Moretti et al., 1983). El azoxiglucósido más común es la **cycasina**, la cual puede encontrarse en concentraciones de hasta 4% del peso húmedo en algunos tejidos de *Cycas*. Por otra parte también se han identificado otros dos grupos conocidos como **neocycasina**, metabolito que difiere únicamente en la estructura de la porción del carbohidrato, y **macrozamina** originalmente encontrado en semillas de *Macrozamia*, cuya estructura de nuevo se diferencia en la mitad del carbohidrato, el azúcar primoverosa (un disacárido compuesto de glucosa y xilosa) en lugar de la simple glucosa en la cycasina (Norstog y Nicholls, 1997).



**Figura 1. Metabolitos secundarios Toxinas de las cicadáceas.**

Metilazoxiglucósidos: cycasina, macrozamina, neocycasina A, metilazoximetanol (MAM); aminoácidos no protéicos:  $\beta$ -N-metilamino-L-alanina (L-BMAA), ácido 2,4-diaminobutírico (DABA) (Traducido de Schneider et al., 2002).

La cycasina y otros azoxiglucósidos por si mismos no presentan características tóxicas. Sin embargo, el potencial tóxico y carcinogénico de estos metabolitos, surge como resultado de los procesos de biotransformación, en especial por la participación de la enzima  $\beta$ -glucosidasa, tras el consumo de las semillas (Norstog y Nicholls, 1997).

Se ha demostrado que la administración de MAM ó MAM-acetato causa efectos agudos a largo plazo en una gran variedad de animales, incluyendo insectos, peces,

pollos (los cuales muestran ser más resistentes a los efectos que los mamíferos). Frecuentemente los síntomas son acompañados de daño neural tales como parálisis de las extremidades traseras, efectos similares a los observados en vacas y ovejas que pastan en campos donde las cycadas crecen naturalmente (Norstog y Nicholls, 1997).

En ratas la dosis letal es de 90 mg/Kg, mientras que en los ratones es solo con 10 mg/Kg. MAM y su acetato son potencialmente carcinogénicos, los órganos más afectados son el hígado y los riñones particularmente después de la exposición crónica a relativamente altas dosis (Ganote y Rosental, 1968).

En roedores las lesiones cancerosas han sido encontradas en pulmones, colon, duodeno, el canal auditivo y sistema nervioso periférico (Norstog y Nicholls, 1997). Estos compuestos además son mutagénicos y teratogénicos, probablemente la interacción directa de iones de metilcarbono con ADN, puede causar cambios cromosómicos y varias mutaciones en una gran variedad de células, de bacterias y otros microorganismos, mamíferos y plantas superiores (Norstog y Nicholls, 2007).

Otro metabolito ampliamente identificado del género *cycas*, es el aminoácido no proteico conocido como  **$\beta$ -N-metilamino-L-alanina (L-BMAA)**, el cual ha sido objeto de estudio en modelos animales debido a que es considerado uno de los principales componentes neurotóxicos de esta especie distribuida en Guam (Vardan et al., 2007; Banack y Murch, 2009).

L-BMAA, se destaca por ser la toxina más estudiada hasta ahora, y que a finales de la década de los 60 se registró como un componente tóxico presente en la harina preparada con la semilla de las cycadas y que era usada como alimento por los indios chamorros en Guam (Norstog y Nicholls, 1997).

Las manifestaciones tóxicas de este metabolito, se asociaron con una alta incidencia inusual de esclerosis lateral amiotrófica y demencia parkinsoniana (ELA/DCP) en habitantes de mediana edad de la población nativa en Guam, donde se consumía *Cycas rumphii*, durante periodos cortos de la segunda guerra mundial (Norstog y Nicholls, 1997). Ésta enfermedad degenerativa ha ocurrido con frecuencia de 50-100 veces más alta que en los EU y la tendencia de edades es más temprana en Guam, la exposición prolongada a bajas dosis de L-BMAA causan daños neuronales ocultos que eventualmente se van revelando con el tiempo y está relacionada con cambios progresivos degenerativos en el cerebro (Liu et al., 2009). Por otra parte, altas incidencias son encontradas en la península Kii de la isla de Honshu en Japón y en Irian Jaya (Este de Guinea), y en ambos lugares utilizan la pulpa de *cycas* para la preparación de pasta con propósitos medicinales para el tratamiento de heridas (Liu et al., 2009).

Spencer y colaboradores (1987) describen que la administración oral diaria de L-BMAA a primates, induce debilidad muscular, inactividad general y pérdida de la coordinación, síntomas que se han relacionado con daño en la corteza motora del cerebro y en menor medida a nivel de la médula espinal.

Cultivos celulares de neuronas aisladas de animales, han mostrado que la toxina L-BMAA en altas concentraciones pueden inducir la muerte neuronal actuando a través de distintos mecanismos; la activación de NMDA y receptores mGluR5, e inducción de estrés oxidativo, también a través de análisis electrofisiológicos se ha demostrado que éste actúa directamente sobre el receptor NMDA, como un agonista de los receptores de glutamato (Manzoni et al., 1991; Ross et al., 1987; Weiss y Choi, 1988, Weiss et al., 1989, Lobner et al., 2007).

Estudios realizados sobre el contenido de la toxina en las semillas de las cycadas, han mostrado que éste no es considerable como para causar daños en el cerebro o la médula espinal (Duncan et al., 1990). Sin embargo, Cox y colaboradores (1997) demostraron que la toxina L-BMAA se biomagnifica, tras ser consumidas las semillas por los murciélagos de la fruta, que a su vez son fuente de alimento de los indios Chamorros (Cox et al., 1997).

Por otro lado, se ha demostrado que la toxina L-BMAA puede asociarse a proteínas (Liu et al., 2009), sugiriendo que, esta propiedad le confiere la capacidad de acumularse en los tejidos y proporciona un mecanismo de liberación lento, que se ha asociado con el retraso en la aparición de los efectos de la ELA/DCP (Murch et al., 2004; Ince y Codd, 2005).

## **1.2 Las *Cycadas* en México**

En México únicamente se distribuye la familia Zamiaceae, clasificada en los géneros *Dioon* con 12 especies, *Zamia* con 15 especies, y *Ceratozamia*, con 21 especies. La abundancia de *Zamiaceas* representa el 50% en América, distribuidas en las estribaciones de la Sierra Madre Oriental, Occidental y del Sur, y sus poblaciones en general están restringidas o incluso apenas representadas (Vazquez et al., 1989).

Las *cycadas* se distribuyen en aproximadamente 60% del país, y las regiones en donde no se encuentra ninguna especie son la Península de Baja California y La Mesa del Norte en la Altiplanicie Mexicana (García y Falcón, 1989).

### **1.3 *Dioon edule* Lindl. (chamal)**

*Dioon edule* es un taxón endémico de México, su distribución abarca la zona volcánica subhúmeda del centro de Veracruz y el pie de monte de la sierra Madre Oriental, San Luis Potosí, Hidalgo, Querétaro y Guanajuato. (De Luca et al., 1982).

#### **1.3.1 Descripción botánica de *Dioon edule* Lindl.**

Son plantas arborescentes con tallo de hasta 4m de alto, 30-50 cm diámetro; 50-150 hojas en una corona. Hojas verde pálido o brillante o azul-verdes, semi-lustrosas a opacas, 100-200 cm de largo, planas con 70-150 foliolos; foliolos basales reducidos a espinas, peciolo inerme por 5 cm; foliolos angostamente lanceolados, concoloros, no falcados, insertos en el raquis en ángulo recto, no imbricados; márgenes planos, enteros; 6-12 cm de largo, 5-10 mm de ancho; catafilos 20-30 mm de largo, tormentosos. Conos masculinos ovados a fusiformes, pardo pálido, 15-40 cm de largo, 6-10 cm diámetro; ápice microsporofilo 30 mm de largo, 20 mm de ancho. Conos femeninos ovados, gris pálido, 20-35 cm de largo, 15-20 cm diámetro; ápice megasporofilo 35 mm de largo, 25 mm de ancho. Semillas ovadas, 25-45 mm de largo, 20-30 mm de ancho, sarcotesta amarillo pálido (Figura 2), (Norstog y Nicholls, 1997, Vovides et al., 1983, Yáñez, 2006).

Esta planta también es conocida como palma de dolores, palmita, palma de serrucho, palma de teresita, quiotamal, sotol, tullidora, quiotamal y en la región de estudio es conocida principalmente como chamal (Avendaño y Flores, 1999).



**Figura 2. Estrótrobilos de *Dioon edule* Lindl.**

A) femenino. B) masculino. (Fotografía: Erika García Chávez y Laura Yáñez Espinosa).

### **1.3.2 Usos antropogénicos**

De acuerdo con la evaluación del riesgo de extinción de *Dioon edule* numeral 5.7 de la NOM-059-SEMARNAT-2001, describe que el nombre específico de la especie hace alusión a que antiguamente las semillas se empleaban para producir una harina comestible. Además, la testa vacía de las semillas es un material básico para la elaboración de “rezumbadores”, un tipo de juguete infantil (Vovides, 1983). La decocción de las semillas se reporta como remedio contra la neuralgia (Jones, 1993).

### **1.3.3 Toxicidad de *Dioon edule* Lindl.**

González (1990) realizó el estudio de las características de la interacción biológica entre las plantas de *Dioon edule* Lindl. y el roedor *Peromyscus mexicanus* Saussure, en el Estado de Veracruz. Esta investigación fue orientada a la determinación de la sobrevivencia de los roedores a una dieta a base de *D. edule*, con el objetivo de establecer la depredación de las semillas. La prueba de aceptabilidad de la semilla,

en especial la sarcotesta por el roedor fue del 100% (n=10), continuando con el resto de la semilla. Sin embargo la sobrevivencia de los individuos a la dieta a base de *D. edule* no excedió los 7 días, ya que se presentó una mortalidad del 100% de los individuos evaluados.

Por otro lado de acuerdo con un estudio etnobotánico realizado sobre la distribución del chamal, se señala la presencia de toxicidad en ganado bovino por el consumo de las semillas caracterizada por: diarrea, parálisis de las patas traseras, dificultad para caminar y en algunos casos la muerte (Yáñez et al., 2006). Los efectos tóxicos son similares a los que producen la cycasina y la macrozamina al ganado en Australia (Jones, 1993). Por otra parte, se mencionan alteraciones gastrointestinales como vómito, diarrea y dificultad para caminar en personas intoxicadas con alimentos preparados con las semillas de chamal.

De acuerdo con lo anterior, la toxicidad generada tras el consumo de semillas de *Dioon edule* Lindl., sugiere alteraciones sobre el sistema nervioso central. Éste antecedente proporciona indicios de la posible capacidad tóxica de la especie. Un estudio reciente, corroboró la presencia de alteraciones sobre el patrón de la locomoción en ratas expuestas a semillas de *Dioon edule* durante 15 días (Covarrubias, 2009).

Tal hallazgo proporciona un antecedente importante sobre la caracterización tóxica de *Dioon edule*, sin embargo aún no es del todo claro el mecanismo por el cual provoca tal efecto, es por ello que es pertinente realizar estudios enfocados sobre el efecto del chamal, en el sistema nervioso periférico, por esta razón y para proporcionar un mejor entendimiento de esta investigación, se incluye una breve descripción del sistema nervioso periférico (SNP), especialmente en sus

características electrofisiológicas debido a su participación en la transmisión de información nerviosa tanto sensorial como motora.

#### **1.4 Generalidades del Sistema Nervioso Periférico**

Los nervios periféricos están formados por un conjunto de axones de neuronas sensitivas y motoras, las cuales tienen la función de transmitir información mediante potenciales de acción (PA), desde los receptores sensoriales localizados en la piel, los músculos y las vísceras hasta la médula espinal. Los nervios periféricos se clasifican de acuerdo a varios criterios; A) de acuerdo a la estructura que inervan, los axones se clasifican como; a) **nervios cutáneos o sensoriales**, cuyos axones (fibras aferentes) provienen de receptores situados en la piel o en las vísceras, así como de receptores musculares, como los husos musculares (fibras aferentes Ia y II) y los órganos tendinosos de Golgi (fibras aferentes Ib), o de receptores profundos (de presión) y b) **nervios musculares o motores**, cuyos axones provienen de las neuronas motoras de la médula espinal (eferentes) e inervan a las fibras musculares extrafusales (en el músculo esquelético).

B) Desde el punto de vista histológico, los axones periféricos (cutáneos y motores) han sido clasificados en **fibras mielínicas o fibras amielínicas**, de acuerdo a la presencia o ausencia de vainas de mielina que circunda los axones nerviosos. La vaina de mielina, formada por las células de Schwann en el sistema nervioso periférico, está constituida por una serie de capas concéntricas de lípidos y proteínas que rodean al axón. La mielina está constituida por aproximadamente un 70% de lípidos (con una concentración alta de fosfolípidos y colesterol) y un 30% de proteínas (Rogert y Richie, 1977).

En el estado inicial de envainamiento, la célula de Schwann envuelve al axón dejando un canal (mexason) abierto al espacio extracelular. Después, una prolongación del citoplasma de la célula de Schwann se extiende en espiral alrededor del axón y finalmente, la compactación de las membranas de las células de Schwann ocurre cuando el citoplasma se expulsa fuera de la porción internodal y permanece como un collar externo que contiene el núcleo de la célula (Gutiérrez 2000). Por otra parte, la membrana de las fibras que serán mielinizadas (axolema) se encuentra regionalizada, pues el axolema nodal exhibe características diferentes a las del axolema internodal. Debido a esto, el axón mielinizado se divide en dos porciones: **Porción internodal**, en la que se encuentra la mielina, y **porción nodal** (o **nodos de Ranvier**), que constituyen las zonas en las que no se ha formado la mielina (Gutiérrez, 2000).

Cabe señalar que la mielina es un excelente aislante eléctrico, por lo que la corriente iónica no puede fluir a través de ella y se propaga únicamente en los nodos de Ranvier; esto permite que ocurra la propagación saltatoria de los PA y que se incremente la velocidad de conducción de los mismos, es decir la velocidad en la que se transmiten los impulsos nerviosos encargados de la comunicación neuronal. (Rogert y Richie, 1977). Los axones no mielinizados, en cambio, se caracterizan por una velocidad de conducción disminuida y una dispersión temporal de los impulsos (Waxman, 1977).

Como se mencionó en el párrafo anterior, los axones de los nervios periféricos son elementos neuronales excitables, es decir, tienen la propiedad de generar y transmitir los PA por toda su longitud. Con base en esto, los axones nerviosos poseen diversas propiedades funcionales, como umbral eléctrico de activación y velocidad de conducción.

### **Umbral eléctrico de activación.**

Es la cantidad mínima de corriente, capaz de generar un potencial de acción; este parámetro varía en relación inversa con el diámetro de los axones, de manera que las fibras del grupo A $\alpha$  y A $\beta$  tienen un umbral de activación considerablemente inferior (entre 10 y 20 veces menor) que el de las fibras C, esta característica favorece la activación de manera selectiva, de los distintos grupos de axones periféricos, que constituyen un nervio (ver cuadro 1; Segura 2003).

**Cuadro 1. Clasificación de las fibras aferentes**

<b>FIBRA AFERENTE</b>	<b>DIÁMETRO</b>	<b>VELOCIDAD DE CONDUCCIÓN</b>
<b>GRUPO</b>	<b>(<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>(m/s)</b>
<b>A<math>\alpha</math></b>	<b>13-20</b>	<b>72-120</b>
<b>A<math>\beta</math></b>	<b>6-12</b>	<b>24-71</b>
<b>A<math>\delta</math></b>	<b>1-5</b>	<b>6-23</b>
<b>C</b>	<b>&lt;1</b>	<b>0.5-5</b>

### **Velocidad de conducción.**

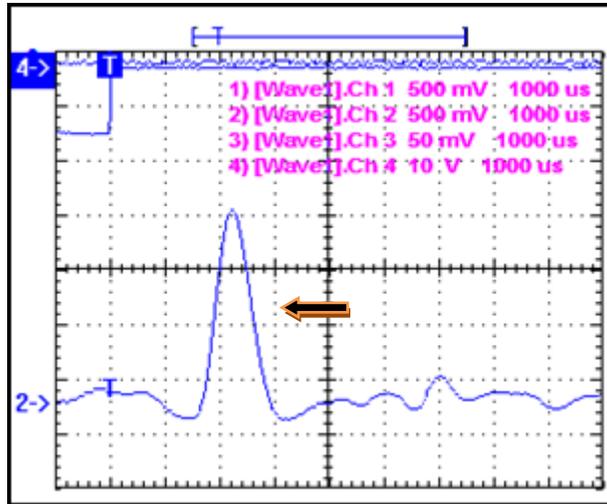
Esta característica está en función del diámetro del axón, debido a que las fibras nerviosas gruesas presentan una menor resistencia al flujo longitudinal de corriente, es decir, la corriente eléctrica se desplaza con mayor rapidez en las fibras gruesas que aquellas con diámetro pequeño (cuadro 1). Otro factor que influye en la velocidad de conducción, es la presencia de vainas de mielina, que como ya se mencionó, favorece la conducción del impulso nervioso, debido a que este compuesto actúa como un aislante eléctrico que impide la generación del PA en la

membrana axonal que se encuentra por debajo de la región internodal, siendo los nodos de Ranvier los sitios en donde se puede generar los impulsos nerviosos (Rogart y Ritchie, 1997; Segura, 2003)

La respuesta de un nervio a la estimulación eléctrica umbral o supraumbral, se denomina potencial de acción compuesto (PAC), y es el resultado de la suma de los potenciales de acción generados en cada una de las fibras nerviosas que constituyen a dicho nervio. Debido a la presencia de fibras nerviosas con diferente umbral de excitación eléctrica y con distinta velocidad de conducción, el registro del PAC de un nervio periférico puede presentar varios componentes.

Así, durante el registro del PAC en un nervio sensitivo es posible observar dos componentes principales: el primero (componente A), resulta de la activación de axones con bajo umbral de excitación y posee una latencia de aparición muy breve.

El segundo componente (componente C), es provocado probablemente por la activación de fibras mielínicas de alto umbral ( $A\delta$  y C), por lo que solo se registra cuando el axón es estimulado con pulsos de corriente entre 10 y 20 veces mayor que la requerida para activar las fibras más excitables del primer componente (Figura 3). El componente C presenta una mayor latencia de aparición, ya que la velocidad de conducción de las fibras  $A\delta$  o C es considerablemente menor que la de las fibras A (Gutierrez, 2000; Segura, 2003).



**Figura 3. Respuesta eléctrica del potencial de acción compuesto en nervios periféricos, con bajo umbral de excitación.**

La presencia de neuropatías periféricas y/o pueden producir alteraciones periféricas y centrales, las cuales se ven reflejadas por una desmielinización axonal y su consecuente disminución en la velocidad de conducción tal alteración puede provocar efectos sobre la funcionalidad orgánica, la conducta y el movimiento de un organismo

---

## II. JUSTIFICACIÓN

Las Cycadales presentan una amplia gama de metabolitos secundarios, que han sido asociados con los efectos neurotóxicos en el hombre y animales, y *Dioon edule* Lindl., no es la excepción.

En humanos provoca alteraciones gastrointestinales como vómito, diarrea y alteraciones motoras caracterizadas por dificultad para caminar. Tales efectos neurotóxicos fueron identificados de manera similar en ganado bovino que consumió los brotes tiernos de las plantas.

En México esta especie aún se usa como fuente de alimento para el hombre; tal hecho nos ha permitido conocer la capacidad tóxica de la especie a través de un estudio etnobotánico, pero éste carecía de respaldo experimental.

Un trabajo reciente demostró que ratas expuestas a semillas, gametofito y sarcotesta de chamal presentaron alteraciones en la locomoción (Covarrubias, 2009).

Por lo que se consideró conveniente evaluar la capacidad tóxica de *Dioon edule* Lindl., sobre las propiedades electrofisiológicas de nervios periféricos sensoriales de ratas expuestas a las semillas.

---

### III. HIPÓTESIS

El potencial de acción compuesto del nervio periférico sural de ratas expuestas a semillas de *Dioon edule* Lindl., presentarán cambios electrofisiológicos en los parámetros de amplitud, área y velocidad de conducción (máxima y promedio).

---

### IV. OBJETIVO GENERAL

Evaluar las características electrofisiológicas del potencial de acción compuesto (amplitud, área, velocidad promedio y máxima) registradas en el nervio sural de ratas, tratadas con la semilla completa de *Dioon edule* Lindl. y los componentes individuales de ésta (sarcotesta y gametofito).

---

### V. OBJETIVOS ESPECIFICOS

Evaluar el efecto de la administración de la semilla completa o sus distintas partes (sarcotesta, gametofito) sobre los parámetros electrofisiológicos del nervio sural (umbral, área y velocidad de conducción), así como con la toxina L-BMAA.

Comparar los efectos de la intoxicación provocada por la semilla con respecto a los causados por la toxina L-BMAA.

---

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Recolección de material vegetal

Se recolectaron conos femeninos maduros con peso aproximado de 1.9 a 2.1 kg en el estado de San Luis Potosí, México. (Permiso SEMARNAT -**SGPA/DGVS 00507/08**).

### 5.2 Preparación del material vegetal

La semilla completa, así como sus componentes individuales (sarcotesta y gametofito) se sometieron a un proceso de secado a temperatura ambiente durante 10 días. Posteriormente el material vegetal se pulverizó en un molino eléctrico (Osterizer), y el polvo obtenido, se pasó por un tamiz No. 40 (Perfoparts, S.A. de C.V.), con la finalidad de unificar el tamaño de las partículas de la muestra y llevar a cabo la preparación de las diferentes soluciones para la evaluación toxicológica.

### 5.3 Animales experimentales

Se utilizaron 25 ratas macho adultas, de la cepa Wistar (200-210g de peso corporal, al inicio del experimento), que fueron proporcionadas por el UPEAL del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN-Zacatenco. Las ratas fueron tratadas bajo las especificaciones técnicas de producción, cuidado y uso de animales de laboratorio, establecidas en la norma oficial NOM-062-ZOO-1999. Los animales fueron mantenidos bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12/12h a una temperatura de  $22 \pm 1$  °C y una humedad de  $50 \pm 5\%$ , y fueron alimentadas con una dieta estándar (Rodent laboratory Chow\* 5001) y agua ad libitum.

Todos los animales fueron sometidos a un periodo de adaptación durante dos semanas previas a la aplicación de los tratamientos.

El consumo de agua y alimento se monitoreo diariamente y el peso corporal cada tercer día durante 30 días.

#### **5.4 Tratamientos**

Las 25 ratas macho Wistar de 200g-210g de peso, fueron distribuidas completamente al azar en cinco lotes: A) Control, al cual se le administró 0.5 ml/Kg de agua durante 30 días; B) Semilla, C) Sarcotesta, D) Gametofito, a cada uno de estos grupos se les administraron 0.5 g/Kg/día de las partes de la semilla señaladas en los incisos B,C y D, durante 30 días; E) A este lote, se le administró el compuesto L-BMAA (2.0 mg/Kg, vía i.p. dosis utilizada previamente para provocar alteraciones en la locomoción de los animales; Covarrubias, 2009). La administración de cada uno de los tratamientos con *Dioon edule*, se efectuó por vía intragástrica y la dosis aplicada equivale a 0.125 g/ml de solución acuosa de los componentes de la semilla.

Al finalizar los 30 días de exposición a los tratamientos, las ratas fueron anestesiadas y se diseccionó quirúrgicamente el nervio sural de ambas extremidades para realizar los estudios electrofisiológicos. Se seleccionó el nervio sural debido a que está constituido primordialmente por fibras aferentes sensoriales (Gutiérrez, 2000).

## **5.5 Análisis electrofisiológico**

Al término del tiempo de exposición, los animales se pesaron y anestesiaron con hidrato de cloral (400 mg/Kg de peso; Laboratorios Monterrey S.A.). Cada uno de los nervios disecados, fue colocado en una cámara de registro llena con solución de Krebs oxigenada (NaCl 128, KCl 3,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.5,  $\text{CaCl}_2$  1.5,  $\text{MgSO}_4$  1,  $\text{NaHCO}_3$ , 21, Glucosa 30 mM; Baker), conservada a 37° C. El nervio en estudio fue succionado de ambos extremos mediante pipetas, cuya punta tenía un diámetro semejante al de éste. El PAC fue provocado por la aplicación de un voltaje conocido, aplicado a través de una micropipeta de succión rodeada con un alambre aislado, conectada a un generador de pulsos (Devices Digitimer Type 2533) y a una unidad de estimulación (Devices Isolated Stimulator Type 2533); mientras que se registro el PAC con otra micropipeta de succión conectada a un amplificador de alta ganancia (Grass, modelo P511), que a su vez estaba conectado a un osciloscopio (Tektronix, modelo TDS 460A) y a una computadora, donde se almacenaron los registros para su posterior análisis mediante el programa Wavestar.

En todos los casos, el PAC fue provocado mediante la aplicación de pulsos únicos, con una duración de 0.05 ms y de intensidad graduada y creciente; para ello se estableció el umbral eléctrico (1xU) de los nervios (intensidad mínima necesaria para activar las fibras más excitables del nervio) y a partir de ese valor se incrementó gradualmente la intensidad del estímulo, utilizando múltiplos de la intensidad umbral desde 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2.0, 2.2, 2.4, 2.6, 2.8, 3.0 ó 4.0 xU hasta lograr la respuesta máxima, esto es, aquella intensidad de estimulación con la cual se logra activar a la mayoría de las fibras con mielina contenidas en el nervio en estudio.

Con el objeto de establecer si los diferentes tratamientos modifican la excitabilidad de los axones mielínicos del nervio sural de la rata expuesta, en cada una de las

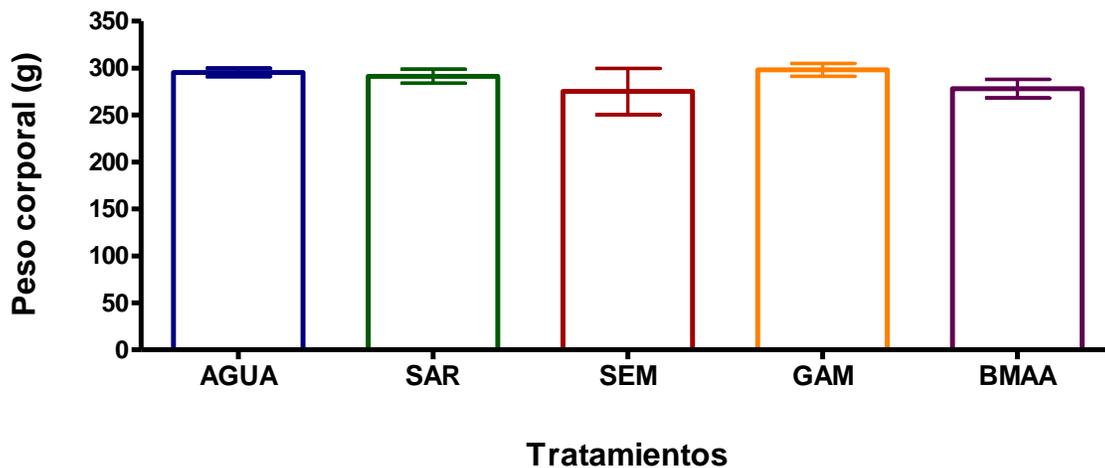
intensidades empleadas para generar el PAC, se midió la amplitud (A), la latencia al inicio (Li), y al pico (Lp), y se calculó el área del componente A del mismo mediante la siguiente ecuación:  $\text{Área} = (Lp - Li) \times A$ . Para lograr la activación de fibras de mayor umbral se incremento la intensidad de la corriente hasta 3 veces el valor umbral.

## **5.6 Análisis estadístico**

Se calculó el promedio y el error estándar ( $\pm EE$ ) de los resultados obtenidos en cada uno de los parámetros medidos en el PAC de los nervios control y de los tratados con la semilla de chamal y cada una de sus porciones (Semillas completa, gametofito, sarcotesta), así como con la toxina BMAA, se utilizó el software Stata 8.0 (Stata, Corp. College Station Tx). Para la evaluación de más de dos grupos de tratamientos se realizó el análisis de varianza (ANOVA) usando como prueba de post hoc TUKEY, se consideró que cada uno de los tratamientos produjo diferencias estadísticamente significativas, respecto del control cuando se obtuvo un valor de  $p < 0.05$ .

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al término de la exposición a los tratamientos, no se observaron cambios significativos en el consumo de agua, alimento y ganancia de peso corporal entre los animales tratados y los del grupo control (Figura 4). Los animales tratados tanto con la semilla de *Dioon edule* Lindl. y los componentes individuales de éste, como los intoxicados con L-BMAA no mostraron cambios o efectos gastrointestinales asociados a la administración de estos tratamientos; por lo que los hallazgos de este estudio están relacionados únicamente a la acción del tratamiento y no a cambios en el estado nutricional de las ratas tratadas.



**Figura 4 . Peso corporal.**

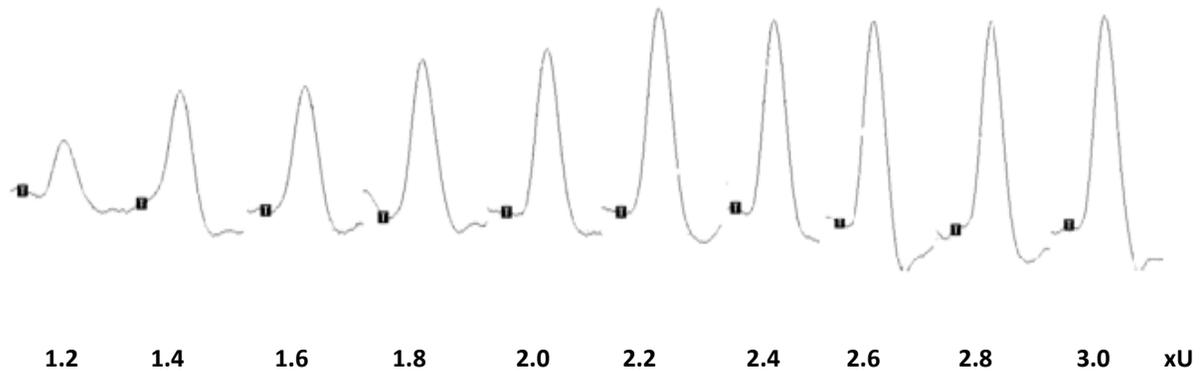
Los valores representan la media  $\pm$  EE; n= 5 animales; \*p< 0.05 comparado con el grupo control (Agua 0.5 ml/kg/día); SAR: Sarcotesta, 0.5 g/Kg/día; SEM: Semilla, 0.5 g/Kg/día; GAM: Gametofito, 0.5 g/Kg/día; L-BMAA, 2.0 mg/kg).

De acuerdo con el estudio electrofisiológico, la aplicación de estímulos eléctricos en un extremo del nervio sural succionado por el electrodo de estimulación provocó la excitación de los axones, y surgió como respuesta el PAC, el cual se registró a través del electrodo de registro. La amplitud, así como el área del

componente A que se logran registrar un PAC, obedece al número y las propiedades electrofisiológicas de las fibras nerviosas que fueron excitadas; mientras que el umbral de activación se relaciona con la excitabilidad de las fibras más gruesas, en tanto que la velocidad de conducción del impulso nervioso puede asociarse con las características de la vaina de mielina que rodea a estos axones.

Las respuestas eléctricas fueron generadas por estímulos simples independientes, pero de distinta intensidad. Con estímulos de baja intensidad (2-3 xU) es factible generar un componente temprano en el PAC, cuya latencia al inicio es de aproximadamente 0.1 ms. Es ampliamente aceptado que este componente resulta de la activación de las fibras aferentes del tipo  $A\alpha$  o  $A\beta$  de bajo umbral de activación y gran velocidad de conducción del potencial de acción (Segura 2001).

Para activar a la mayor parte de los axones contenidos en los nervios en estudio, se empleó un protocolo de estimulación en el que se utilizó una secuencia de pulsos individuales y de intensidad creciente (Segura, 2003), tal como se ilustra en la figura 5. En esta figura se observa que la amplitud del PAC fue aumentando progresivamente a medida que se incrementó la intensidad del estímulo. Esto muestra que a medida que se incrementa la intensidad del estímulo se van excitando progresivamente los axones con distinto umbral de activación, cuyos potenciales de acción individuales se van reclutando gradualmente al PAC.

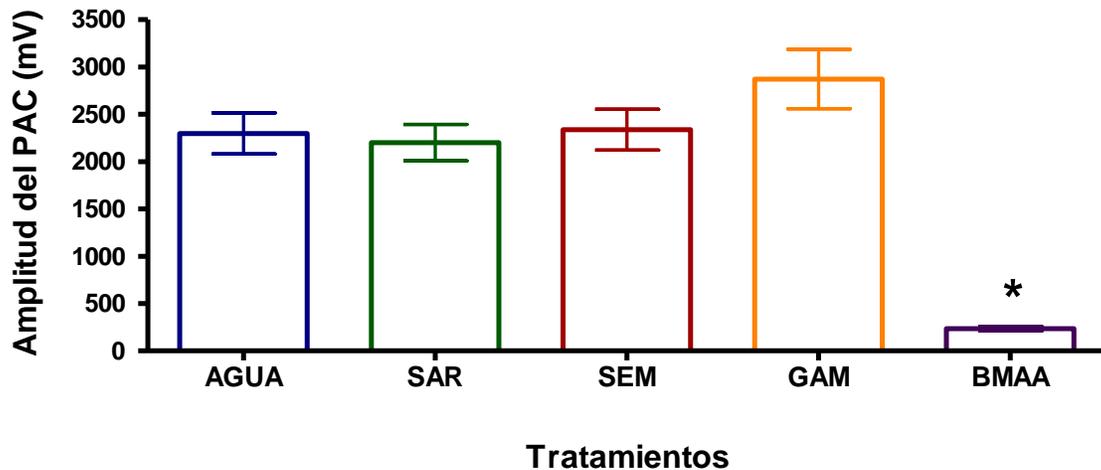


**Figura 5. PAC producidos por estímulos eléctricos de intensidad creciente.**

La estimulación con corrientes de intensidad creciente, aumenta significativamente la amplitud y el área del PAC registrado en el nervio sural de ratas control (Agua 0.5 ml/kg/día).

Este procedimiento fue utilizado en todos los experimentos para obtener el PAC de máxima amplitud y área generado en nervios de animales control y experimentales con los distintos tratamientos de *Dioon edule* Lindl. y la toxina (Figura 5).

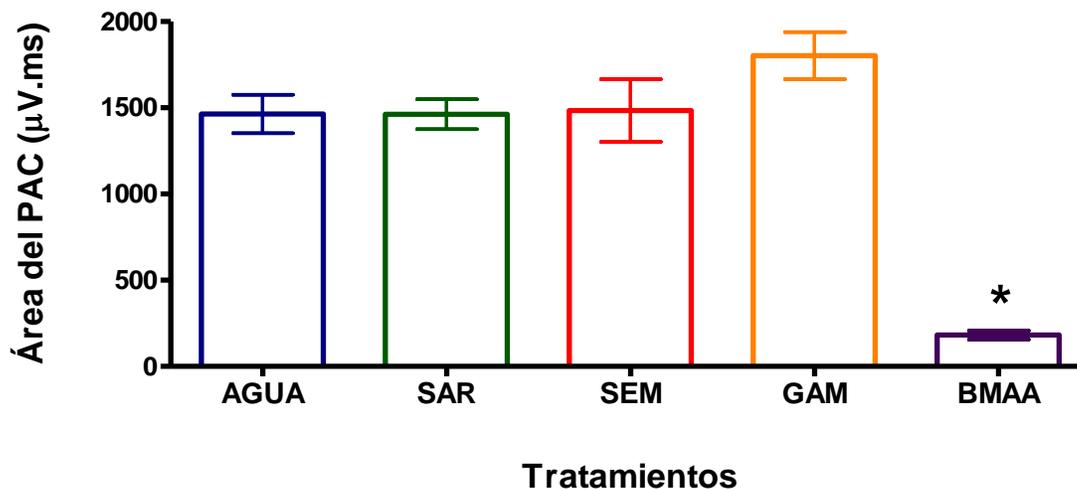
Con respecto a la amplitud del PAC, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con *Dioon edule* con respecto al grupo control. Sin embargo, el grupo tratado con la toxina L-BMAA mostró una disminución significativa ( $p < 0.05$ ), con respecto a todos los tratamientos (Figura 6).



**Figura 6. Amplitud del PAC.**

Los valores representan la media  $\pm$  EE; n=8-10 nervios; \* significa  $p < 0.05$  comparado con el grupo control (Agua 0.5 ml/kg/día); SAR: Sarcotesta, 0.5 g/Kg/día; SEM: Semilla, 0.5 g/Kg/día; GAM: Gametofito, 0.5 g/Kg/día; L-BMAA, 2.0 mg/kg).

En la figura 6 se observa que la amplitud del PAC de nervios provenientes de animales de los grupos expuestos con *Dioon edule* no mostraron cambios significativos con respecto al control, únicamente el PAC registrado en animales intoxicados con la toxina BMAA mostraron una disminución significativa en su amplitud. Este comportamiento está asociado a una disminución en el número de fibras nerviosas activadas que se reclutaron en el PAC de los nervios tratados con la toxina.

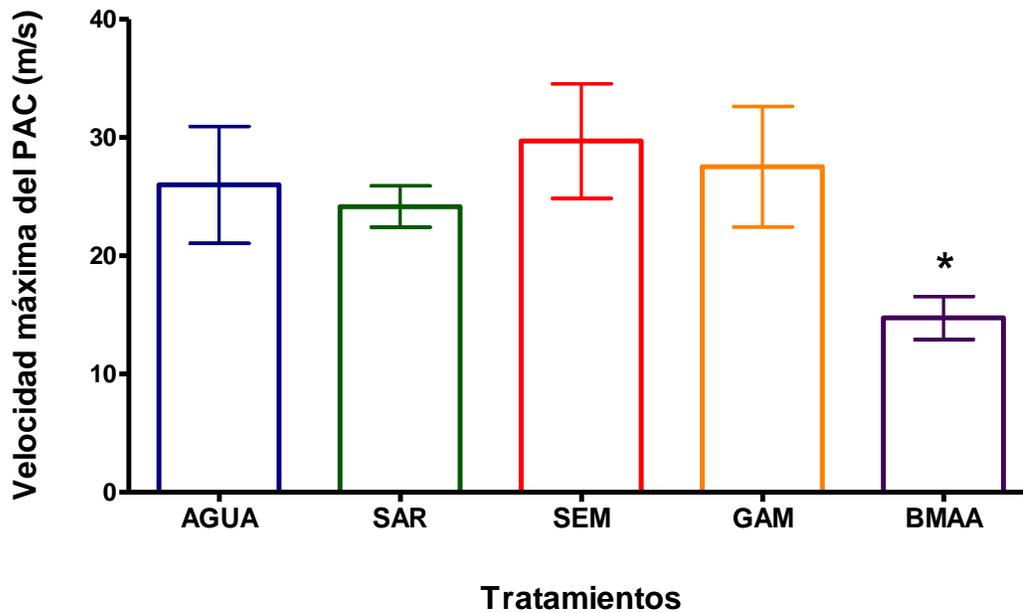


**Figura 7. Área del PAC.**

Los valores representan la media  $\pm$  EE; n=8-10 nervios, \* indica  $p < 0.05$  comparado con el grupo control (Agua 0.5 ml/kg/día); SAR: Sarcotesta, 0.5 g/Kg/día; SEM: Semilla, 0.5 g/Kg/día; GAM: Gametofito, 0.5 g/Kg/día; L-BMAA, 2.0 mg/kg).

En resumen, las características electrofisiológicas de amplitud y área del PAC en los grupos tratados con *Dioon edule*, no mostraron cambios significativos bajo el régimen de administración de los distintos componentes de la semilla (Figura 6 y 7). Esto indica electrofisiológicamente que la capacidad de activación de los axones que constituyen el nervio sensorial sural, no es afectada por el tratamiento con *Dioon edule* Lindl., ya que éste responde adecuadamente a un estímulo dado.

La figura 8 muestra que la velocidad máxima de conducción del PAC no presentó cambios significativos luego de la administración de semilla, sarcotesta y gametofito de *Dioon edule* con respecto al control; sin embargo los grupos tratados con la toxina BMAA mostraron una disminución significativa en la velocidad de conducción con respecto al control.

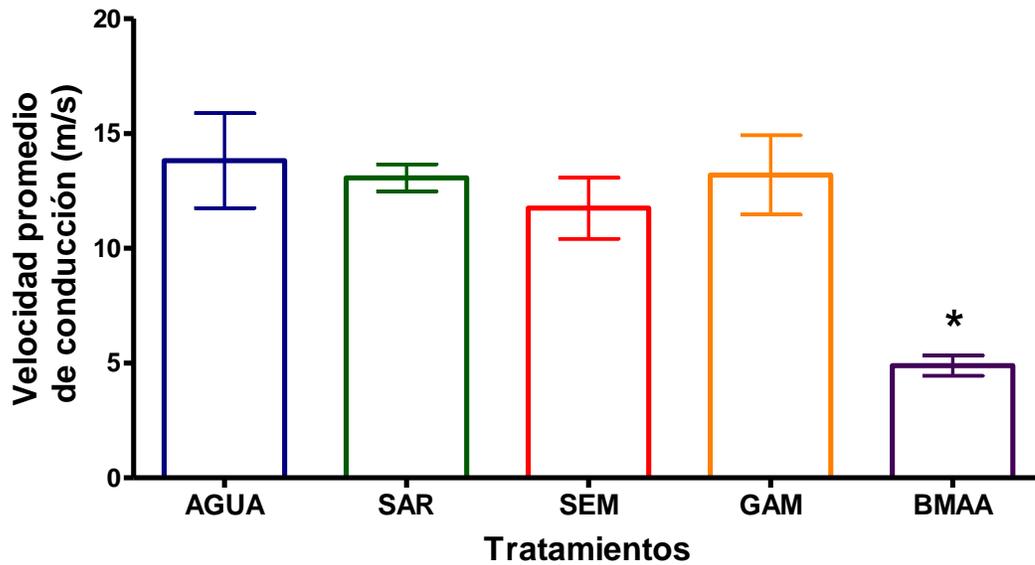


**Figura 8. Velocidad de máxima de conducción.**

Los valores representan la media  $\pm$  EE; n=8-10 nervios; \* indica  $p < 0.05$  comparado con el grupo control (Agua 0.5 ml/kg/día); SAR: Sarcotesta, 0.5 g/Kg/día; SEM: Semilla, 0.5 g/Kg/día; GAM: Gametofito, 0.5 g/Kg/día; L-BMAA, 2.0 mg/kg).

Con respecto a la velocidad promedio de conducción, no se observaron cambios significativos entre los grupos tratados con *Dioon edule* con respecto al grupo control. Únicamente se observó un decremento significativo de la velocidad en el grupo tratado con la toxina BMAA en comparación con todos los grupos (Figura 9).

Los resultados del análisis electrofisiológico nos llevan a considerar varios aspectos sobre la toxicidad de *Dioon edule*, así como la posible relación entre las alteraciones electrofisiológicas reportadas en el presente trabajo con las alteraciones en la locomoción, reportadas por Covarrubias (2009).



**Figura 9. Velocidad de conducción promedio.**

Los valores representan la media  $\pm$  EE;  $n=8-10$  nervios;  $*p < 0.05$  comparado con el grupo control (Agua 0.5 ml/kg/día); SAR: Sarcotesta, 0.5 g/Kg/día; SEM: Semilla, 0.5 g/Kg/día; GAM: Gametofito, 0.5 g/Kg/día; BMAA, 2.0 mg/kg).

Cabe señalar, que en el proceso de locomoción participan nervios sensoriales y motores, que transmiten información aferente desde los músculos hasta la médula espinal y el encéfalo y desde estas estructuras centrales hasta los músculos (vía eferente); pero debido a que en el presente estudio se analizaron únicamente las alteraciones provocadas por la intoxicación con *Dioon edule*, sobre el nervio sural (aferente) y a que los resultados obtenidos descartan la presencia de alteraciones en la generación y conducción del PA en la vía sensitiva, es válido considerar que posiblemente la exposición a *Dioon edule* modifique la actividad funcional de nervios los motores y esto podría ejercer un efecto sobre las fibras eferentes o sobre los circuitos que generan la locomoción, pero no de los nervios sensitivos.

---

## VIII. CONCLUSIONES

Tanto la semilla como los componentes individuales, sarcotesta y gametofito de *Dioon edule* Lindl. a una dosis de 0.5 mg/kg de peso durante 30 días de exposición por vía oral, no modificaron las características electrofisiológicas de nervio sensorial sural de ratas Wistar.

La toxina BMAA a una dosis de 2.0 mg/kg de peso durante 30 días de exposición vía i.p, disminuye significativamente las características electrofisiológicas de nervio sensorial sural de ratas Wistar.

De acuerdo a los parámetros electrofisiológicos obtenidos y en relación con la reducción de los valores obtenidos para la toxina L-BMAA, es posible proponer que el decremento provocado por el tratamiento con la toxina L-BMAA en la velocidad de conducción, está relacionada con una disminución en el diámetro y/o con alteraciones de la vaina de mielina que rodea a los axones, y que la disminución observada en el área del PAC, asociada con la proporción de axones que responden al estímulo supraumbrales sugiere la existencia de alteraciones en el grosor y el grado de compactación de la vaina de mielina que rodean a los axones; lo cual conlleva la necesidad de efectuar el análisis histológico de los nervios.

Por otro lado, si bien no se encontraron diferencias en las propiedades electrofisiológicas del nervio sural de los animales tratados con las semillas de *Dioon edule* Lindl., no puede descartarse la capacidad tóxica del consumo de estas semillas como fuente de alimento (Yáñez, 2006) y los daños en la locomoción de la rata (Covarrubias, 2009). Tales efectos registrados, no descartan la posibilidad de

que sean provocados por daño sobre los nervios motores o sobre estructuras centrales del sistema nervioso. Por lo tanto, es importante continuar la investigación sobre la relación que existe entre el consumo de *Dioon edule* Lindl., y la aparición de las patologías neurológicas reportadas en personas y animales.

---

## IX. PERSPECTIVAS

- Aunque no se encontraron diferencias en las características electrofisiológicas en el nervio sural de los grupos control e intoxicados con la semilla o los componentes individuales de *Dioon edule* Lindl. es necesario establecer si ésta modifica la función de los nervios motores y de esta manera concluir el estudio del daño causado por esta especie sobre el SNP. Posteriormente podría estudiarse el efecto de *Dioon edule* Lindl. sobre el sistema nervioso central.
- También es necesario realizar una evaluación química para identificar y cuantificar los compuestos secundarios que se encuentran presentes en las diferentes partes de la planta, y así poder evaluar el potencial tóxico que se da tras su consumo por los diferentes organismos. Esto es de importancia tanto para los grupos humanos que continúan consumiendo los alimentos preparados con esta semilla, ya que como se ha mencionado, ésta provoca patologías neurológicas, como para el ganado que come los brotes tiernos de la planta, y que presenta problemas estomacales y de intoxicación. Además, los daños provocados al ganado afectan, directa o indirectamente, a la población humana ya que estos animales tienen gran importancia económica, y como señala Jones, (1993), las toxinas se acumulan en el cuerpo del ganado provocando que los animales se debiliten y mueran. En la Sierra Madre Oriental los animales intoxicados son sacrificados y la carne es consumida por la población, lo cual podría inducir al proceso de bioacumulación y biomagnificación del componente tóxico, contribuyendo a incrementar los efectos indirectos de la planta sobre la población humana, tal y como lo describe Cox con el murciélago de la fruta en Guam.

Debido a que los datos para el grupo tratado con la toxina L-BMAA mostró una clara disminución en los parámetros electrofisiológicos evaluados, es conveniente la realización de un estudio histológico para establecer si existe una correlación entre los parámetros electrofisiológicos evaluados (área y velocidad de conducción del PAC) y las características estructurales de los axones presentes en el nervio sural de los animales intoxicados con BMAA, entre estas el número y el diámetro de las fibras nerviosas y el grosor de la vaina de mielina que las rodea).

---

## X. BIBLIOGRAFÍA

- Arnold, C.A. 1953. Origin and relationships of the cycads. *Phytomorphology* Vol. 3:51-65
- Avendaño R. S.; G. Flores. 1999. Registro de plantas toxicas para ganado en el estado de Veracruz, Mexico. *Vet. Mex.* 30 (1) 80:94.
- Banack, S.; Murch S. 2009. Multiple neurotoxic items in the Chamorro diet link BMAA with ALS/PDC. Institute for Ethnomedicine. *Suppl* 2:34-40
- Brener, E.D.; D. W. Stevenson; R.W. Twigg. 1997. Cycads: evolutionary innovations and the role of plant-derived neurotoxins. *Trends in plant Science*.8(9):442-446.
- CITES 1997. Examen del comercio significativo de la CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestres). Cycadas (Noviembre, 1997). PC14 Doc. 9.2.2 Anexo 1
- CONABIO. Mexico 2009. Junio de 2011.
- <http://www.biodiversidad.gob.mx/especies/pdf/granfamilia/plantas/cycadas.pdf>
- Covarrubias A.2009. Caracterización de la locomoción de ratas expuestas a semillas de *Dioon edule* Lindl. Tesis de Licenciatura. UASLP. FCQ. SLP.
- Cox, P.A.; S. Banack; S. Murch. 1997. Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 13380–13383
- De Luca P.; S. Sabato; M. Vázquez. 1982. Distribution and variation of *Dioon edule* (Zamiaceae). *Brittonia* 34:355-362.

- Duncan, W.J.; I.Steele; P. Kopin; S. Markey. 1990. 2-Amino-3-(methylamino)-propanoic acid (BMAA) in cycad flour: an unlikely cause of amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia of Guam. *Neurology*. Vol. 40; 767–772.
- Ganote C.; S. Rosental.1968. A review of cycad megasporophylls with new evidence of *Crossozamia* Pomel and its associated leaves from the Lower Permian Taiyuan, China. *Review of paleontology and Palynology*. 68:197-201.
- Garcia, E.; G. Falcón. 1989. *Nuevo atlas Porrúa de la República Mexicana*. 8va. Ed. Editorial Porrúa. México, D.F. 219 p.
- González A. 1990. Algunas interacciones entre *Dioon Edule* (Zamiaceae) y *Peromyscus Mexicanus* (Rodentia : Cricetidae). *La Ciencia y el Hombre*, enero-junio 1990, no.5, p. 77-92.
- Gutiérrez A. 2000. Efecto de la desnutrición sobre el potencial de acción compuesto (PAC) del nervio sural de durante el desarrollo posnatal de la rata. Tesis. UNAM.
- Ince, P.; G. Codd. 2005. Return of the cycad hypothesis- does the amyotrophic lateral sclerosis /parkinsonism dementia complex (ALS/PDC) of Guam have new implications for global health?. *Neuropathology and applied Neurobiology*. 31:345-353.
- IUCN (2009). IUCN (the International Union for Conservation of Nature) Red List of Threatened Species. Version 2010.4. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Downloaded on 14 June 2011.
- Jones, D. L. 1993. *Cycads of the World*. Reed Books. Sydney. 312 pp

- Liu X.; T. Rush; J. Zapata; D. Lobner. 2009.  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine induces oxidative stress and glutamate release through action on system Xc<sup>-</sup>. *Experimental Neurology* 217; 429–433
- Lobner, D.; P. Piana; A. Salous; R. Peoples. 2007. Beta-N-methylamino-L-alanine enhances neurotoxicity through multiple mechanisms. *Neurobiol. Dis.* 25, 360–366.
- Mamay, S.H. 1976. Paleozoic origin of the cycads. *Professional Paper* 934, U.S. Geological Survey, Washington, D.C.
- Manzoni, O.J.; L. Prezeau; J. Bockaert. 1991. Beta-N-methylamino-L-alanine is a low affinity agonist of metabotropic glutamate receptors. *Neuroreport* Vol. 2; 609–611.
- Moretti, A.; S. Sabato; G. Siniscalco;. 1983. Taxonomic significance of methylazoxymethanol glycosides in the cycads. *Phytochemistry*.Vol. 22:115-118
- Murch S.J.; P. Cox; S. Banack. 2004a. A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 12228–12231.
- Norstog, K.J.; T.J. Nicholls. 1997. *The Biology of the Cycads*, Cornell University Press, Ithaca, NY, USA.
- Pérez, F. M.; A. P. Vovides; P. Octavio A.; J. González; J. Cruz; R. Hernández; S. Villalobos. 2006. Demography of the cycad *Ceratozamia mirandae* (Zamiaceae) under disturbed and undisturbed conditions in a biosphere reserve of Mexico. *Journal of Plant Ecology*. Vol. 187: 97-108.

- Perez, C.; E. Soto. 2007. Neurotoxinas en los alimentos. Elementos: ciencia y cultura. 14 (66): 47-50.
- Rogert R.; J. Richie. 1977. Physiological basis of conduction in myelinated nerve fibers. In: Morell P. (Ed) Myelin Plenum. New York. P.p. 117-159.
- Ross, S.M.; M. Seelig; P. Spencer. 1987. Specific antagonist of excitotoxic action of 'uncommon' amino acids assayed in organotypic mouse cortical cultures. Brain Res. 425, 120–127.
- Segura B.; J. Guadarrama; A. Gutiérrez; H. Merchant; L. Cintra , I. Jiménez. 2001. Effect of perinatal food deficiencies on the compound actino potential evoked in sensory nerves of developing rats. Nutritional Neuroscience. Vol. 4 pp.475-488\*.
- Segura B. Efecto de la desnutrición y malnutrición sobre la generación y transmisión de potencial de acción compuesto generados en nervios sensoriales periféricos, durante el desarrollo posnatal de la rata. Tesis de Doctorado (2003) UNAM, Instituto de Neurobiología.
- Spencer P.S.; P. Nunn; J. Hugon; A. Ludolph; S. Ross; D. Roy; R. Robertson. 1987. Guam amyotrophic lateral sclerosis Parkinsonism-dementia linked to a plant excitant neurotoxin. Science. Vol. 237:517-522.
- Stevenson, D., R. Osborne; K. Hill. 1995. The world list of cycads. En: P.Vorster (ed.) *The Third International Conference on Cycad Biology*. pp. 55-64.
- Steward, I.; P. Webb; P. Schluter; G. Shaw. 2006. Recreational and occupational field exposure to freshwater cyanobacteria –review of anecdotal and case reports, epidemiological studies and the challenges for epidemiologic assessment. Environmental health. 5(6):1-13

- Vardan K.; R. Speth. 2007. Animal models of BMAA neurotoxicity: A critical review. *Life Sciences* 82 (2008) 233–246
- Vázquez, M.; M. Sánchez; J. Alejandro. 1989. Algunos datos etnobotánicos sobre las Zamiaceae (Cycadales) de México. Núm. 3, ene-jun. Pp. 19-30 (Divulgación).
- Vovides, A. P. 1983. *Flora de Veracruz. Fasc. 26. Zamiaceae*. INIREB, Xalapa. 31 pp..  
1990. "Spatial distribution, survival and fecundity of *Dioon edule* (Zamiaceae) in a tropical deciduous forest in Veracruz, Mexico". *American Journal of Botany* 77:1532-1543.
- Vovides, A.; D. González; M. Pérez; S. Avendaño; C. Bárcenas. 2004. A review of research on the cycad genus *Ceratozamia* Brong. (Zamiaceae) in Mexico. *Taxon*. 53(2): 291-297.
- Waxman S. 1977. Conduction in myelinated, un myelinated fibrs. *Arch. Neurol.*,34: 585-589
- Weiss, P.H.; D. Choi. 1988. Beta-N-methylamino-L-alanine neurotoxicity: requirement for bicarbonate as a cofactor. *Science* 241, 973–975
- Whiting, M.G. (1963) Toxicity of cycads. *Econ. Bot.* Vol. 17: 271–302
- Yáñez, L. 2006. Las cycadas. *Biología y conservación en México*. Chapingo, Estado de México: Universidad Autónoma de Chapingo. Pp(67-120)
- Zhifeng, G. y B.A. Thomas, 1989.. A review of fossil cycad megasporophylls, with new evidence of *Crossozamia* Pomel and its associated leaves from the lower Permian of Taiyuan, China. *Review of Palaeobotany and Palynology* 60: 205-223