

Alteraciones motoras inducidas por la microinyección intrahipocampal de metilazoximetanol en ratas macho forzadas a nadar

Margarita Saavedra^{1,2}, Eduardo Rivadeneyra-Domínguez¹, Juan Francisco Rodríguez-Landa^{1,2}

RESUMEN

El metilazoximetanol (MAM) y el ácido β -metil-amino-L-alanina (L-BMAA,) son neurotóxicos presentes en las cícadas. El consumo de semillas de cícadas induce alteraciones motoras y en la rata produce la conducta de giro cuando son forzadas a nadar. Sin embargo, se desconoce la base neuroanatómica involucrada en dichas alteraciones. *Material y métodos:* evaluamos el efecto de la microinyección del MAM en el hipocampo sobre el desempeño motor de ratas forzadas a nadar, lo cual fue comparado con el glutamato. Treinta y dos ratas macho (Wistar) fueron distribuidas en cuatro grupos: vehículo (1.0 μ l solución salina), metilazoximetanol (10nM), glutamato (10nM) y glutamato-MAM (10nM, respectivamente). Los tratamientos fueron administrados durante 7 días, cada 24 hs. El efecto fue evaluado en las pruebas de nado forzado y campo abierto. *Resultados:* el vehículo no modificó la actividad locomotriz en campo abierto, ni produjo la conducta de giro en nado forzado. El MAM promovió la conducta de giro desde el primer día de tratamiento y disminuyó significativamente a lo largo del tratamiento, mientras que incrementó el tiempo de hundimiento. El glutamato aumentó gradualmente la conducta de giro a lo largo del tratamiento, en tanto que la combinación glutamato-MAM produjo el mayor número de giros, los cuales se incrementaron significativamente a lo largo del tratamiento. El MAM, glutamato y glutamato-MAM disminuyeron significativamente el número de neuronas en las áreas CA1 y CA3, del hipocampo con respecto al vehículo. *Conclusión:* el hipocampo participa en la aparición del daño motor en ratas forzadas a nadar, quizás mediada por efectos excitatorios a nivel neuronal.

Palabras clave: cícadas, hipocampo, metilazoximetanol, microinyección.

Locomotor impairment induced by intra-hippocampus microinjection of methylazoxymethanol in male rats in the forced swim test

ABSTRACT

Methylazoxymethanol (MAM) and the non-protein amino acid β -N-methyl-amino-L-alanine (L-BMAA) are neurotoxins contained in cycads. The consumption of cycads seeds produces locomotor impairment and rotational behavior in rats in the forced swim test. The present study investigated the neuroanatomical basis of these impairments. Thirty-two male Wistar rats were randomly divided into four groups: vehicle (1.0 μ l physiological saline), MAM (10nM), glutamate (10nM) and glutamate-MAM (10nM each). The treatments were microinjected every 24h for 7 days. The behavioral effects were evaluated in the forced swim and open field tests. *Results:* The vehicle did not modify locomotor activity in the open field test or produce rotational behavior in the forced swim test. Methylazoxymethanol promoted rotational behavior on the first day of treatment an effect that significantly decreased throughout the treatment, and increased sink time. Glutamate gradually increased

rotational behavior throughout the treatment and the glutamate-MAM combination produced the greatest number of rotations, which significantly increased throughout the treatment. The MAM, glutamate and glutamate-MAM groups exhibited a significant decrease in the number of neurons in the CA1 and CA3 of the hippocampus compared with vehicle. **Conclusion:** The hippocampus participates in the expression of the locomotor impairment in rats in the forced swim test, an effect possibly mediated by excitatory effects at the neuronal level.

Key words: cycads, hippocampus, methylazoxymethanol, microinjection.

Las cícadas son plantas tóxicas debido a sus componentes químicos como la cicasina, macrozamina, el aminoácido β -metil-amino-L-alanina (L-BMAA) y metilazoximetanol (MAM). Este último tiene una semejanza estructural con el aminoácido excitatorio glutamato, por lo que se ha sugerido que podría ser uno de los responsables de la neurotoxicidad producida por las cícadas¹. En este sentido, en las Islas de *guam*, existe una alta incidencia de esclerosis lateral amiotrófica (ELA) o enfermedad de Lou Gehrig²; además los pacientes manifiestan síntomas similares al Alzheimer, lo cual ha sido atribuido a las toxinas de cícadas³. No obstante, en otras partes del mundo donde se consume almidón de cícada los efectos neurotóxicos no se producen, lo cual sugiere que las cícadas de dichas Islas pueden ser más tóxicas que las de otros lugares, sobre todo *Cycas circinalis*⁴. Adicionalmente, las ovejas, caballos o perros que comen alguna parte de las cícadas desarrollan un desorden neurológico irreversible llamado *tambaleo de Zamia*, caracterizado por alteraciones motoras, gastrointestinales y daño hepático¹. Experimentalmente se ha estudiado el efecto del consumo crónico de semillas de cícada (*Dioon spinulosum*) sobre la conducta motora de la rata macho, donde se identificó la aparición de la conducta de giro en ratas forzadas a nadar, sugiriendo deficiencia en la coordinación motriz quizás inducida por los componentes neurotóxicos de la planta; un efecto que fue prevenido por el tratamiento previo con progesterona⁵, lo cual puede ser explicado por los efectos neuroprotectores de esta hormona^{6,7}.

Por otro lado, el hipocampo participa en la regulación visceral, endócrina, emociones; procesos de condicionamiento y aprendizaje, así como en la memoria⁸. El hipocampo contiene a la vía excitatoria glutamatérgica hipocampo-núcleo *accumbens* que contribuye a la integración de las señales límbicas en actos motores, la cual integra la actividad locomotriz iniciada en el hipocampo que requiere de orientación espacial⁹. El hipocampo al formar parte del sistema límbico tiene una función directa en la motivación para el inicio de las respuestas motoras, por lo que se sugiere que la lesión química con MAM o glutamato (GLU) quizás interfiera en la expresión de los patrones motrices del animal. Aunado a esto, el límbico y motor están anatómicamente y funcionalmente relacionados¹⁰. Por otra parte, la sobre ac-

tivación de los receptores glutamatérgicos en hipocampo produce una entrada excesiva de calcio, activando una serie de enzimas que contribuyen al deterioro de las neuronas. La pérdida de la integridad de las membranas neuronales da lugar a la fuga de glutamato, lo cual contribuye a la activación prolongada de los receptores glutamatérgicos de las células vecinas. A su vez, la entrada de calcio también estimula la liberación de glutamato por exocitosis, estableciéndose así un sistema de retroalimentación positiva que redundante en la sobre-excitación neuronal prolongada, llevando a la apoptosis neuronal^{11,12}. Lo anterior podría ser una posible explicación a las alteraciones motoras que pudieran inducir el MAM y glutamato en el hipocampo, una posibilidad que requiere ser evaluada.

OBJETIVO

Determinar la participación del hipocampo en las alteraciones motoras inducidas por la microinyección de MAM y en combinación con el aminoácido excitatorio glutamato en ratas macho de la cepa Wistar forzadas a nadar.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 32 ratas macho adultas de la cepa Wistar con un peso de 250 a 300 g al inicio de los experimentos. Los animales se mantuvieron en cajas de acrílico translúcidas en un bioterio de estancia con temperatura ambiente y ciclo de luz/oscuridad de 12 x 12 horas (la luz se encendió a las 7:00 am). El acceso al agua y alimento fue *ad libitum*. Todas las manipulaciones experimentales se realizaron de acuerdo a los Códigos Éticos Internacionales¹³ y a la Norma Oficial Mexicana¹⁴.

Grupos experimentales

Se siguió un diseño mixto con grupos independientes, cada grupo (n=8) fue microinyectado en el hipocampo

Recibido: 8 febrero 2011. Aceptado: 2 marzo 2011.

¹Facultad de Química Farmacéutica Biológica, Universidad Veracruzana, Xalapa. Veracruz, México. ²Instituto de Neuroetología, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México. Correspondencia: Dr. Eduardo Rivadeneyra Domínguez. POB 391, Xalapa 91001, Veracruz, México. E-mail: rivadeneyra2002@hotmail.com, ricyedu@yahoo.com.mx

con el tratamiento respectivo, durante siete días cada 24 hs. El efecto fue evaluado en las pruebas de actividad locomotriz en campo abierto y nado forzado, diariamente 10 min después de cada microinyección. Se administró vehículo (VEH, solución salina fisiológica, 1.0 µL), MAM (methilazoxymethanol, Sigma-Aldrich 10 nM, 1.0 L), glutamato (GLU, 1.0 µL de glutamato 10nM) o combinación glutamato-MAM (G-M, 1.0 µL de glutamato 10nM y de MAM 10 nM). La concentración de MAM fue seleccionada considerando que la administración intrahipocampal de MAM en dosis de 10nM induce actividad onda-espiga en la rata Wistar¹⁵. La concentración de glutamato se basó en estudios de Borson, et al¹⁶ donde el glutamato (10nM) activa receptores glutamatérgicos, originando una sobre-excitación neuronal que conduce a la apoptosis neuronal y daño motor.

Cirugía estereotáxica

La cánula guía fue implantada unilateralmente, manteniendo al animal bajo anestesia profunda con éter etílico (BAKER). La cabeza de la rata fue fijada en un aparato estereotáxico (STOELTING), se procedió a realizar una incisión longitudinal en la piel para descubrir el cráneo. Tomando como referencia la sutura Bregma de acuerdo a las coordenadas estereotáxicas del atlas de Paxinos y Watson¹⁷, se realizó un trepano en el cráneo con un taladro dental (STRONG 90). Las coordenadas empleadas fueron AP: -2.3 mm, L: 1.2 mm, H: 3.0 mm, las cuales correspondieron a las regiones CA1 y CA3 del hipocampo. Después, se descendió una cánula guía de acero inoxidable (10mm de longitud, 0.7 mm Ø), la cual fue fijada al cráneo con acrílico dental (NICTONE CROSS LINKED, U.S.A). Después del implante de la cánula guía se dejaron pasar cuatro días de recuperación. Al final de este periodo los tratamientos (vehículo, MAM, glutamato y la combinación glutamato-MAM) fueron microinyectados en el hipocampo y el efecto fue evaluado en las pruebas conductuales.

Microinyección

Para la microinyección, la cánula inyectora fue construida a partir de una aguja calibre 22 G X11/4" (0.7 X 30 mm) de acero inoxidable, conectada a una jeringa Hamilton de 1.0 mL por medio de un tubo de polietileno (COLE-PARMER). Cada una de las sustancias utilizadas en el experimento se microinyectaron a una velocidad constante de 0.1 µl/min, durante 10 min. Al finalizar la administración intrahipocampal se dejó la cánula durante 1.0 min para evitar que la sustancia inyectada regresará por capilaridad, inmediatamente después de este tiempo los animales fueron sometidos a la prueba de actividad locomotriz en campo abierto y enseguida a la prueba de nado forzado.

Pruebas conductuales

Actividad locomotriz en campo abierto. La prueba consistió en colocar a la rata en una caja de acrílico opaca (44 x 33 x 20 cm) cuya base estuvo dividida en cuadros de 11 x 11 cm. Se evaluó el número de cuadros cruzados por el animal durante 5 min, tomando como criterio que la rata pasara al menos tres cuartas partes de su cuerpo de un cuadro a otro. En esta misma prueba se contabilizó la frecuencia de la conducta vertical y su duración, esta conducta es definida como los periodos en los que la rata adquiere una postura vertical con respecto al piso, apoyada en sus extremidades posteriores. El número de cuadros cruzados se empleó para determinar un posible efecto de hipo o hiperactividad inducida por los tratamientos, mientras que la conducta vertical se utilizó para detectar posibles alteraciones en la coordinación motriz¹⁸.

Nado forzado: por lo general, esta prueba se utiliza en el *screening* de fármacos con potencia antidepresiva^{19,20}. Sin embargo, por las características de la prueba también se ha utilizado para evaluar los efectos de fármacos que dañan el sistema vestibular que producen alteraciones motrices en los animales^{21,22}. La prueba consistió en colocar a la rata en un estanque de vidrio (26 x 29 cm de base x 50 cm de altura) con agua a una temperatura de 25°C (± 1). El nivel fue ajustado al tamaño del animal de tal forma que le permitiera tocar el fondo del estanque con sus extremidades posteriores y mantener la nariz por arriba del nivel del agua. En esta prueba se evaluó el número de giros, definidos como los periodos en los cuales la rata no tuvo desplazamiento y nadó girando sobre su propio eje hacia el lado derecho. En esta misma prueba se evaluó la conducta de hundimiento que fueron los periodos en los que las ratas no realizaron los movimientos mínimos necesarios para mantenerse a flote y se hundían por cortos periodos de tiempo sin llegar a ahogarse. Estas dos conductas han sido consideradas como un indicador de deterioro motriz causado por lesiones en estructuras cerebrales relacionadas con el control motor²³. Todas las sesiones de prueba en campo abierto y en nado forzado fueron videograbadas para después realizar el registro conductual por dos observadores independientes quienes desconocían el tratamiento de los animales.

Análisis histológico

Una vez terminado el experimento, todos los animales fueron sacrificados y perfundidos por vía intracardiaca con 50 ml de solución salina fisiológica (NaCl al 0.9%), seguido de 50 ml de formol al 20%. Se extrajeron los cerebros y se realizaron cortes gruesos, para verificar el sitio en donde se localizaban las cánulas guía. Sólo los datos obtenidos de las ratas donde se identificó el correcto implante de las

cánulas en CA1 y CA3 del hipocampo fueron tomados en cuenta para el análisis estadístico. Para el análisis histológico se emplearon 7 cerebros de rata de cada grupo, los cuales fueron incluidos en parafina para la obtención de cortes de 40 μ que fueron teñidos mediante la técnica de hematoxilina-eosina. Posteriormente, se cuantificó el número de neuronas correspondientes a la zona CA1 y CA3 del hipocampo. La selección de la zona de conteo se realizó considerando las coordenadas del implante y el diámetro externo de la cánula guía, de manera tal que se analizó un área de 1 mm de ancho x 3.5 mm de profundidad. Se obtuvieron fotografías amplificadas de las zonas seleccionadas y de manera manual se realizó el conteo neuronal utilizando una cuadrícula y por sección se fue marcando y contabilizando las células que tenían núcleo²⁴. Este conteo fue realizado por dos observadores independientes y para validarlo se solicitó el apoyo de un histopatólogo como tercer observador.

Análisis estadístico

Los datos conductuales fueron analizados mediante ANOVA de 2 vías para grupos independientes (factor A: tratamiento, factor B: duración del tratamiento) y como *post hoc* se empleó la prueba de Student-Newman-Keuls. Los datos se presentan como la media $\pm$ el error estándar de cada variable evaluada. Para el análisis histológico se utilizó el ANOVA de 1 vía para grupos independientes.

RESULTADOS

Actividad locomotriz en campo abierto

Número de cuadros cruzados. El análisis del número de cuadros cruzados reveló diferencias significativas entre tratamientos ($F_{3,140} = 3.67$, $p < 0.001$), días de tratamiento ($F_{6,140} = 14.71$, $p < 0.0001$) e interacción entre factores ($F_{18,140} = 2.71$, $p < 0.006$). La prueba *post hoc* reveló que el grupo vehículo redujo significativamente los cuadros cruzados a partir del segundo día de tratamiento, observándose los valores más bajos entre los días 3 y 6 de tratamiento. El grupo MAM redujo significativamente el número de cuadros cruzados a partir del tercer día y se mantuvo, así a lo largo del experimento. En los grupos glutamato y glutamato-MAM no se observaron diferencias significativas en esta variable a lo largo de los días de tratamiento (tabla 1).

El análisis de frecuencia de la conducta vertical, mediante el ANOVA de dos vías, reveló diferencias significativas entre tratamientos ($F_{3,140} = 24.69$, $p < 0.001$), pero no entre días de tratamiento ($F_{6,140} = 1.597$, $p < 0.06$, NS) ni en la interacción de factores ($F_{18,140} = 1.597$, $p < 0.06$, NS). Por tal motivo y considerando que se encontraron diferencias entre tratamientos, se realizó un análisis de cada tratamiento

por separado mediante ANOVA de una vía. De esta forma se encontró que en el grupo vehículo no hubo diferencias significativas en la conducta vertical ($F_{6,27} = 2.497$, $p < 0.06$, NS) a lo largo de los días de tratamiento. En el grupo MAM se encontraron diferencias significativas ($F_{6,42} = 3.466$, $p < 0.007$) a lo largo de los días de tratamiento. La prueba *post hoc* reveló que esta variable disminuyó ($p < 0.007$) en el sexto y séptimo día de tratamiento, con respecto al día uno de tratamiento. En el grupo glutamato también se encontraron diferencias significativas ($F_{6,36} = 4.182$, $p < 0.003$). La prueba *post hoc* reveló que en los días 3 y 4 disminuyó esta variable con respecto al día uno de tratamiento. Del mismo modo en el grupo glutamato-MAM se encontraron diferencias significativas ($F_{6,35} = 4.267$, $p < 0.003$). La prueba *post hoc* reveló que esta variable se redujo significativamente en los días 3, 4, 5 y 7 con respecto al primer día de tratamiento (tabla 1).

Tabla 1. Variables evaluadas en la prueba de campo abierto en cada uno de los grupos experimentales.

Días	GRUPOS											
	VEHICULO			MAM			GLUTAMATO			GLUTAMATO - MAM		
	CUADROS CRUZADOS (n)	CONDUCTA VERTICAL (n)	CONDUCTA VERTICAL (seg)	CUADROS CRUZADOS (n)	CONDUCTA VERTICAL (n)	CONDUCTA VERTICAL (seg)	CUADROS CRUZADOS (n)	CONDUCTA VERTICAL (n)	CONDUCTA VERTICAL (seg)	CUADROS CRUZADOS (n)	CONDUCTA VERTICAL (n)	CONDUCTA VERTICAL (seg)
1	62.2±8.5	3.5±0.86	7.3±2.15	50.7±2.96	2.14±0.72	5.7±2.00	40.7±1.02	7.0±0.72	21.0±2.00	41.2±1.07	6.8±0.78	20.5±2.15
2	41.0±13.4*	0.4±0.86	1.8±2.36	30.3±5.20	0.71±0.72	1.4±2.00	38.8±0.83	5.0±0.78	12.6±2.15*	40.0±0.43	2.8±0.78	6.8±2.15*
3	20.0±7.1*	0.8±0.86	1.8±2.36	26.3±4.18	0.86±0.72	4.1±2.00	36.0±2.16	1.8±0.78*	4.1±2.15*	39.3±1.14	1.3±0.78*	3.0±2.15*
4	18.0±5.1*	0.0±0.86	2.8±2.36	21.3±3.00	0.86±0.72	2.4±2.00	32.5±1.33	2.0±0.78*	4.0±2.15*	36.3±1.70	0.6±0.78*	1.5±2.15*
5	18.2±4.8*	0.0±0.86	-2.65E-15±2.359	24.0±4.06	0.57±0.72	2.0±2.00	30.3±1.37	4.1±0.78	8.5±2.15*	35.5±0.88	1.3±0.78*	3.1±2.15*
6	22.8±5.8*	1.5±0.96	2.0±2.63	15.7±1.41	-9.71E-16±0.726*	-2.10E-15±1.994	30.0±2.21	4.8±0.78	8.5±2.15*	31.3±2.02	2.6±0.78	5.6±2.15*
7	31.3±13.4*	2.7±0.96	10.0±2.63	29.1±6.18	0.43±0.72*	1.1±2.00	24.0±1.61	3.6±0.78	7.5±2.0*	28.0±1.14	2.1±0.78*	4.5±2.15*

* $p < 0.05$ vs día 1 del grupo respectivo. Representan los valores de la media $\pm$ error estándar de cada variable.

Nado forzado

Conducta de giro. Debido a que en el grupo control no se observó la conducta de giro, para este análisis sólo se incluyeron los grupos MAM, glutamato, y glutamato-MAM. El análisis de la frecuencia de giros reveló diferencias significativas entre tratamientos ($F_{2,112} = 89.19$, $p < 0.0001$), días de tratamiento ($F_{12,112} = 12.87$, $p < 0.0001$), en la interacción entre factores ($F_{12,112} = 12.87$, $p < 0.0001$). La prueba *post hoc* indicó que el grupo MAM, en el primer día, tuvo la mayor frecuencia de giros con respecto al grupo glutamato, pero a partir del segundo día se redujo significativamente esta variable con respecto al primer día. Por el contrario, en el grupo glutamato la frecuencia de giros aumentó de manera gradual a lo largo del tratamiento. De manera similar, el grupo glutamato-MAM incrementó gradualmente la frecuencia de giros, pero desde el primer día desplegó la mayor frecuencia de giros con respecto al grupo glutamato (figura 1).

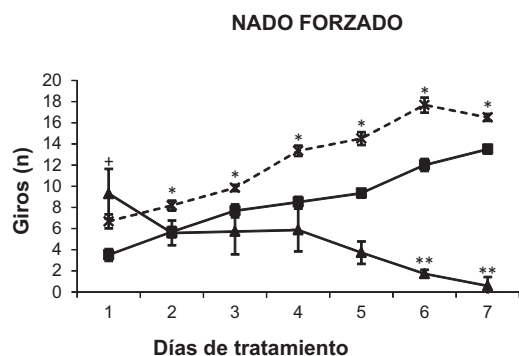


Figura 1. El número de giros incrementó gradualmente en los grupos glutamato y glutamato-MAM, por el contrario el grupo MAM lo redujo gradualmente y en el séptimo día de tratamiento no se observó dicha conducta. + $p < 0.0001$ vs GLU * $p < 0.0001$ vs primera sesión de cada grupo ** $p < 0.0001$ vs 1, 2, 3, 4, 5. Cuadro negro n grupo glutamato, triángulo negro grupo MAM, X grupo glutamato-MAM.

Hundimiento: debido a que en el grupo control no se observó la conducta de giro, para este análisis sólo se incluyeron los grupos MAM, glutamato y glutamato-MAM. El análisis de la duración del hundimiento, mediante el ANOVA de dos vías, reveló diferencias entre tratamientos ($F_{2,113} = 36.10$, $p < 0.001$) y días de tratamiento ($F_{6,113} = 14.49$, $p < 0.001$). Sin embargo, la interacción de factores no alcanzó la significancia estadística ($F_{12,113} = 1.69$, $p < 0.07$, NS). Por tal motivo; considerando que se encontraron diferencias entre tratamientos, se realizó un análisis de cada tratamiento mediante ANOVA de una vía. De esta forma se encontró que los grupos glutamato y glutamato-MAM se encontraron diferencias significativas ($F_{6,36} = 3.159$, $p < 0.01$; $F_{6,35} = 4.205$, $p < 0.003$, respectivamente). La prueba *post hoc* reveló que esta variable disminuyó ($p < 0.01$) el tiempo de hundimiento en los días 5, 6 y 7 de tratamiento. Adicionalmente en el grupo MAM se detectaron diferencias significativas de acuerdo al día de tratamiento. La prueba *post hoc* ($p < 0.01$) mostró que el tiempo de hundimiento se incrementó a partir del tercer día de tratamiento (figura 2).

Por último, el análisis histológico del número de neuronas de acuerdo al ANOVA de una vía reveló diferencias significativas entre los grupos ($F_{3,135} = 6.183$). La prueba *post hoc* reveló que el grupo glutamato, MAM y glutamato-MAM disminuyeron el número de neuronas en las regiones CA1 y CA3 con respecto al grupo vehículo (tabla 2).

Tabla 2. Número de neuronas por grupo de tratamiento.

VEHÍCULO	MAM	GLUTAMATO	GLUTAMATO+MAM
57.5 ± 7.9	47.5 ± 6.5*	48.6 ± 6.5*	46.1 ± 6.5*

Los valores representan la media ± el error estándar de neuronas en las áreas CA1 y CA3 Del hipocampo. * $p < 0.01$ vs grupo vehículo. ANOVA de 1 vía para grupos independientes, *post hoc* Student-Newman-Keuls.

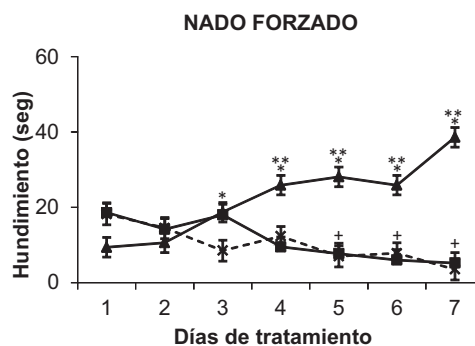


Figura 2. La duración de hundimiento en nado forzado se redujo en los grupos glutamato y glutamato-MAM a partir del día 5; sin embargo, el grupo MAM incrementó el hundimiento de manera gradual desde el tercer día de tratamiento. + $p < 0.01$ vs 1,2 en GLU, G-M * $p < 0.001$ vs 1,2 en gpo MAM. ** $p < 0.001$ vs 1, 2,3 en grupo MAM. El cuadro negro ■ representa al grupo glutamato, el triángulo negro representa al MAM y la X representa al grupo glutamato-MAM.

DISCUSIÓN

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la microinyección de metilazoximetanol (MAM) y glutamato (GLU) en el hipocampo sobre la coordinación motriz de la rata. Los resultados se resumen de la siguiente manera: **a.** En la prueba de actividad locomotriz, el MAM y el vehículo redujeron la actividad ambulatoria a partir de la segunda sesión, mientras que los grupos que recibieron glutamato y la combinación glutamato-MAM se mantuvieron sin cambios a lo largo del experimento; asimismo, la conducta vertical se mantuvo sin cambios en los grupos MAM y vehículo. **b.** En nado forzado, el grupo vehículo no desplegó ni la conducta de giro ni el hundimiento; no obstante, la frecuencia de giros aumentó gradualmente con los tratamientos glutamato y glutamato-MAM reduciendo con el tratamiento MAM, a la vez que el tiempo de hundimiento aumentó en este último grupo y disminuyó con glutamato y glutamato-MAM; lo anterior sugiere que las áreas CA1 y CA3 del hipocampo participan en la expresión de la conducta de giro en ratas forzadas a nadar, quizás mediada por efectos excitatorios a nivel neuronal.

Efectos conductuales en campo abierto

La prueba de campo abierto se ha utilizado, entre otras cosas, para identificar cambios en la motricidad de tratamientos farmacológicos o determinadas manipulaciones experimentales. La repetición de prueba en campo abierto puede conducir a un proceso de habituación, durante el cual se modifica la actividad motora subsiguiente respecto al basal⁹, donde se involucra la consolidación de la memoria. En el presente trabajo, se encontró que los grupos glutamato y glutamato-MAM no redujeron la actividad

locomotriz en campo abierto a lo largo de las sesiones experimentales, contrario a lo que se observó en los grupos MAM y vehículo, los cuales redujeron gradualmente la locomoción. En el primer caso, la ausencia de cambios en la locomoción en campo abierto quizás está asociada a la exploración que se mantiene a lo largo del estudio, como resultado de las acciones neurotóxicas del glutamato en hipocampo que impiden consolidar la memoria del animal. Por lo tanto, las condiciones en campo abierto seguirán siendo novedosas, aún tras la repetición de prueba y el animal seguirá explorando ese ambiente novedoso. Por el contrario, la administración conjunta de glutamato-MAM puede ejercer un efecto deletéreo más acentuado. Lo anterior es apoyado por los reportes de la literatura donde el glutamato activa a los receptores iónicos glutamatérgicos, los cuales causan daño neuronal en el hipocampo impidiendo la consolidación de la memoria²⁵. En cuanto a la conducta vertical, en el grupo MAM estuvo disminuida quizás por la pérdida de la coordinación motriz consecuente a la administración del neurotóxico, como ha sido reportado por otros autores²⁶. Asimismo, la actividad basal en la prueba de campo abierto tuvo una tendencia a incrementarse con la administración de glutamato; mientras que la combinación glutamato-MAM alcanzó la significancia estadística.

Considerando los datos antes señalados, se sugiere que el glutamato y la combinación glutamato-MAM, podrían ejercer efectos negativos sobre la memoria del animal que impide reconocer un ambiente en el que previamente ha estado, lo cual podría reflejarse en el mantenimiento de la exploración representada por la locomoción y el aumento de la conducta vertical a lo largo del experimento, siendo una propuesta que requiere ser explorada en estudios específicos.

Efectos conductuales en nado forzado

La prueba de nado forzado es un modelo experimental utilizado para el *screening* de sustancias con potencia antidepressiva^{19,20}. Sin embargo, de acuerdo a las características de la prueba también se ha utilizado para evaluar otras conductas motrices asociadas al tratamiento farmacológico. Por ejemplo, se ha utilizado para evaluar los efectos de fármacos que dañan el sistema vestibular y producen alteraciones motrices en la prueba de nado^{21,22}; de igual forma, en estudios previos se utilizó esta prueba para evaluar alteraciones motrices asociadas al consumo de semillas de cicada en las ratas, en las que se observó la aparición de la conducta de giro⁵. Lo anterior sustenta el uso de esta prueba para explorar el efecto de la microinyección de glutamato y MAM en el hipocampo de la rata.

En el presente estudio, la microinyección del MAM en el hipocampo (regiones CA1 y CA3) indujo la conducta de giro en las ratas forzadas a nadar, pero ésta fue dismi-

nuyendo a lo largo del tratamiento. En este sentido la administración de MAM reduce la neurogénesis hipocampal y produce muerte neuronal²⁶. La conducta de giro ha sido asociada con alteraciones en la coordinación motora de las extremidades de la rata²³ y podría remedar lo observado en pacientes con esclerosis lateral amiotrófica asociada al consumo de semilla de cicada y sus derivados^{27,28}, específicamente con la parálisis lenta y progresiva de las extremidades inferiores y superiores^{29,30}.

CONCLUSIÓN

En este trabajo, se observó que el MAM incrementó el déficit motor inducido por glutamato cuando se administran de manera conjunta, lo cual se traduce en un incremento en el despliegue de la conducta de giro. Este hallazgo puede relacionarse con lo reportado en diversos experimentos³¹⁻³⁴ donde se menciona que después de 30 min de la inyección sistémica de GLU en ratas jóvenes, las células del núcleo arcuato del hipotálamo tienen un evidente hinchamiento de las dendritas y los somas celulares, el cual es seguido de la degeneración de organelos intracelulares y pycnosis nuclear. Después de varias horas las células mueren y son fagocitadas. Por lo tanto, las acciones neurotóxicas en el hipocampo podrían ser parte de la causa neurobiológica de la conducta de giro observada en el presente trabajo.

Posible mecanismo de acción neurotóxica

El mecanismo preciso por el cual la microinyección de MAM y GLU en el hipocampo produce los efectos neurotóxicos sobre la incoordinación motriz en los animales, se mantiene para ser explorado. Sin embargo, considerando que el hipocampo al formar parte del sistema límbico tiene una función directa en la motivación para el inicio de las respuestas motoras; es decir que su lesión química con MAM y GLU interfiere en la expresión de los patrones motrices del animal. Aunado a esto, el sistema límbico y motor están anatómicamente y funcionalmente relacionados. Por lo tanto, la conducta de giro y el hundimiento pueden asociarse al decremento en el número de neuronas hipocámpales, por lo que la administración intrahipocámpal del neurotóxico MAM induce déficit motor en ratas forzadas a nadar, quizá debido a procesos excitatorios producidos por la estimulación de receptores glutamatérgicos, que conllevan a la disminución de la densidad neuronal en el hipocampo; lo anterior es relevante porque estaríamos quizás ante un modelo de neurodegeneración útil para evaluar el deterioro motor en ratas macho de la cepa Wistar, ya que existen modelos de enfermedades neurodegenerativas como ELA en otras cepas de ratas, pero aún no se ha reportado un modelo de neurodegeneración en esta cepa de ratas.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue apoyado por el Sistema Nacional de Investigadores (SNI exp. 19190 y 32753) y Cuerpo Académico UVE-CA-202. E.R.D. (# 197669) recibió beca por CONACYT.

REFERENCIAS

- Spencer PS, Nunn PB, Hugon J, Ludolph AC, Ross SM, Roy DN, et al. Guam amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism-dementia linked to a plant excitant neurotoxin. *Science* 1987;237:517-22.
- Steele JC, Guzman T. Observations about amyotrophic lateral sclerosis and the parkinsonism-dementia complex of Guam with regard to epidemiology and etiology. *Can J Neurol Sci* 1987; 14: 358-62.
- Brayne C, Calloway P. Normal ageing, impaired cognitive function, and senile dementia of the Alzheimer's type. 2a. ed. *Lancet British Edition*, 1998.
- Tillema S, Wynberg CJ. Cycas of the world. *Tropica* 2004;5:366-70.
- Rivadeneira- Domínguez E, Saavedra M, Rodríguez-Landa JF. El tratamiento con progesterona previene las alteraciones motoras inducidas por la intoxicación con semillas de cycada (*Dioon spinulosum*) en la rata macho. *Rev Toxicol* 2009;26:36-40.
- Roof RL, Hall ED. Gender differences in acute CNS trauma and stroke: neuroprotective effects of estrogen and progesterone. *J Neurotrauma* 2000;17:367-88.
- González MC, López-Costa JJ, Saavedra JP, Pietranera L, Garay L, Guennoun R, et al. Progesterone neuroprotection in the Wobbler Mouse, a genetic model of spinal cord motor neuron disease. *Neurobiol Dis* 2002;11:457-68.
- López-Antúnez L. Anatomía funcional del sistema nervioso. 1ª. Ed. México: Limusa, 1983.
- Brudzynski SM, Krol S. Analysis of locomotor activity in the rat: parallelism index, a new measure of locomotor exploratory pattern. *Physiol Behav* 1997;62:635-42.
- Alcaráz V, Gumá E. Texto de neurociencias cognitivas: 1ª. Ed. México: El manual moderno, 2001.
- Schwartz R, Foster AC, French, ED, Whetsell C. Excitotoxic models for neurodegenerative disorders. *Life Sci* 1984;35:19-32.
- Shaw PJ. Excitatory amino acid receptors, excitotoxicity, and the human nervous system. *Curr Op Neurol Neurosur* 1993;6:414-22.
- National Research Council. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: a report of the Institute of Laboratory Animal Resource Committee on the Care and Use of Laboratory Animals. NIH Publication No. 85-23. Washington, D.C.: U.S. Department of Health and Human Services. 1996.
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio. México, D.F. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 1999.
- Contreras CM, Saavedra MV, Martínez-Mota L, Ortiz M, Vázquez-Torres M. Crude preparations of *Dioon spinulosum* Dyer neurotoxicity: metilazoximetanol produces petit mal seizures in susceptible individuals. *Phytomedicine* 1998;5:227-33.
- Borson JR, Manolillo PA, Miller RJ. Ca^{2+} entry via AMPA/KA receptors and excitotoxicity in cultured cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci* 1994;14:187-97.
- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 2a. ed. Australia: Academic Press, 1982.
- Oddie SD, Kirk IJ, Gorny BP, Whishaw IQ, Bland BH. Impaired dodging in food-conflict following fimbria-fornix transection in rats; a novel hippocampal formation deficit. *Brain Res Bull* 2002; 57:565-73.
- Porsolt RD, Pichon ML, Jaifre M. Depression: a new model sensitive to the antidepressant treatment. *Nature* 1997a; 266: 730-2.
- Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jaifre M. Behavioural despair in rats: a new model to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol* 1978b; 47:379-91.
- Petrosini L. Task- dependent rate of recovery from hemilabyrinthectomy: an analysis of swimming and locomotor performances. *Physiol Behav* 1984;33:799-804.
- Kaiser A, Fedrowitz M, Ebert U, Zimmermann E, Hedrich HJ, Wedekind D, et al. Auditory and vestibular defects in the circling (Ci2) rat mutant. *Eur J Neurosci* 2001; 14: 1129-42.
- Richter A, Ebert U, Nobrega JN, Vallbacka JJ, Fedrowitz M, Loscher W. Immunohistochemical and neurochemical studies on nigral and striatal functions in the circling (ci) rat, a genetic animal model with spontaneous rotational behavior. *Neurosci* 1999;89: 461-71.
- Leeson T, Leeson R, Paparo A. Texto/Atlas de Histología. 3ª. Ed. México: Interamericana-McGraw Hill,1990.
- Clelland CD, Choi M, Romberg C, Clemenson GD, Fragniere A, Tiers P, et al. A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science* 2009; 5937: 210-3.
- Shors TJ, Townsend DA, Zhao M, Kozorovitskiy Y, Gould E. Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal dependent learning. *Behav Neurosci* 2001; 115:1175-87.
- Kurland LT, Mulder DW. Epidemiologic investigations of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 1954a;4:355-78.
- Kurland LT, Mulder DW. Epidemiologic investigations of amyotrophic lateral sclerosis. Familial aggregations indicative of dominant inheritance (Part I). *Neurol* 5: 182-268.
- Hirono A. An appraisal of the neurotoxicity of cycad and the etiology of amyotrophic lateral sclerosis on Guam. *Brain* 1961a; 84: 642-661.
- Hirono A, Malamud N, Kurland LT. Parkinsonism-dementia complex, an endemic disease on the island of Guam. II. Pathological features. *Brain* 1961b;84:662-79.
- Choi NW, Sayre GP. Motor neuron diseases. *Neurol* 1969a;2:28-50.
- Choi DW. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* 1987b;7:369-79.
- Choi DW, Maulucci-Gedde MA, Kriesegstein AR. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J Neurosci* 1987c; 7: 357-68.
- Choi DW. Cell death. *J Neurobiol* 1992d;23:1261-76.