

Rosmarinus officinalis mejora el aprendizaje y la capacidad de memoria del ratón en el modelo de laberinto acuático de Morris

T. Verónica Barón Flores¹, Daniel Hernández López¹, María Luisa Pérez González¹, Héctor J. Delgadillo Gutiérrez¹, Camilo Ríos Castañeda¹

¹Universidad Autónoma Metropolitana, Departamento de Sistemas Biológicos, Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, Delegación Coyoacán, 04960, Ciudad de México, México.

*Correspondencia: Dra. Verónica Barón Flores. Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, Delegación Coyoacán, 04960, Ciudad de México, México. Email: vbaron@correo.xoc.uam.mx

Resumen

Rosmarinus officinalis, conocido como aceite de romero, se utiliza en herbolaria tradicional. Estudios recientes han encontrado que algunos alcaloides aislados de la planta actúan como antidepresivos y antiinflamatorios, debido a su actividad inhibidora sobre la acetilcolinesterasa y la butirilcolinesterasa, por lo tanto, podrían actuar como tratamiento complementario para la enfermedad de Alzheimer, en la que se presenta una deficiencia de acetilcolina.

Objetivo: evaluar el efecto del aceite de romero sobre el aprendizaje y la memoria, evaluado por medio del laberinto acuático de Morris en ratones.

Material y métodos: se utilizaron 24 ratones macho de la cepa CD1, con 20-30g de peso. Se dividieron en cuatro grupos de tratamiento: 1. solución salina, vía intraperitoneal, 2. memantina (10µg/Kg), vía intraperitoneal, 3. aceite de romero (20 µg/Kg), vía inhalatoria y 4. aceite de romero (120 µg/Kg), vía oral. Se midió el tiempo que permaneció en cada cuadrante como una forma de evaluar el aprendizaje y la memoria, a través del reconocimiento del área.

Resultados: se encontró que el grupo tratado con aceite de romero por vía oral consiguió un desempeño parecido al del grupo tratado con memantina, fármaco utilizado para tratar el Alzheimer, en cambio, el grupo tratado por vía inhalatoria no mostró diferencia significativa.

Conclusiones: el presente estudio mostró que los ratones tratados con aceite de romero por vía oral presentan un mejor desempeño en el laberinto acuático de Morris, en comparación con los ratones tratados por vía inhalatoria y los controles, lo que indica que se mejora el aprendizaje y la memoria. Se concluye que el uso de este remedio etnobotánico podría aportar una opción al tratamiento de pacientes con Alzheimer.

Palabras clave: aceite de romero, laberinto acuático de Morris, memoria, aprendizaje.

Aceptado: 3 mayo 2017

Rosmarinus officinalis improves learning and memory of mouse model of Morris water maze

Abstract

Rosmarinus officinalis known as rosemary oil is used in herbal medicine, recent studies have found that some alkaloids act as antidepressants and anti-inflammatories because of their inhibitory activity on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, so that rosemary could be a complementary treatment for the disease. Alzheimer's disease, because this disease is linked to an acetylcholine deficiency.

Objective: to evaluate the effect of rosemary oil on learning through the Morris water maze.

Material: twenty-four male CD1 mice weighing 20-30g were divided into four groups: 1. saline solution intraperitoneally 2. memantine (10µg/kg) intraperitoneally, 3. rosemary oil (20µg/kg) inhalation and 4. rosemary oil (120µg/Kg) oral administration. The time that remained in each quadrant was measured as a way of evaluating learning, through the recognition of the area.

Results: It was found that the group treated with oral rosemary oil had a learning similar to that of memantine, a drug used to treat Alzheimer's, in which the group treated by inhalation was not significant.

Conclusions: The present study showed that mice treated with oral rosemary oil did exhibit a tendency to improve performance in the Morris water maze compared to mice treated by inhalation, indicating that improved learning and memory capacity, is the beginning for complementary treatments in Alzheimer's disease and other types of dementia using rosemary oil.

Keywords: *rosemary oil, Morris water maze, memory, learning.*

Introducción

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia en sujetos mayores de 65 años. La EA representa entre el 60 y 70 % de las demencias. La demencia de origen vascular es la segunda causa de demencia, y la mixta, la tercera¹. El impacto social de las demencias es muy grande, ya que cursan con trastornos del comportamiento y requieren una vigilancia constante¹.

La EA se caracteriza por la presencia de placas seniles extracelulares que contienen un núcleo de péptido β -amiloide ($A\beta$), las marañas neurofibrilares intracelulares (NFT) y la pérdida selectiva de neuronas². Se cree que la deposición de $A\beta$ juega un papel central en una cascada de eventos dañinos, incluyendo las respuestas inflamatorias, estrés oxidante, sinaptotoxinas, y la muerte neuronal.

Los tratamientos sólo pueden retardar el deterioro de las funciones cognitivas afectadas, mejorar y mantener la calidad de vida del paciente y de su entorno. Se considera que es de buena utilidad la combinación de tratamientos farmacológicos y no farmacológicos. Con respecto a los tratamientos no farmacológicos están dirigidos más que nada al apoyo médico, social, a la familia y al paciente, con la finalidad de evitar la progresión de la enfermedad y la aparición de complicaciones, también que el paciente realice diversas terapias como: terapia de orientación a la realidad, terapia de reminiscencia, las nuevas tecnologías como instrumentos para el entrenamiento cognitivo, rehabilitación de memoria, ayuda de memoria no electrónicas, psicoestimulación cognitiva como la aromaterapia, musicoterapia, juegos de activación física y la estimulación psicosocial con animales¹. Todos los tratamientos farmacológicos son sintomáticos, pretendiendo mantener y enlentecer el deterioro cognitivo y controlar los desajustes emocionales y del comportamiento. Los fármacos que han demostrado tener efectividad en el deterioro cognitivo son: tacrina, rivastigmina, donezepilo, galantamina principalmente; son inhibidores de la acetilcolinesterasa, lo que hacen es actuar sobre la acetilcolinesterasa y la butilcolinesterasa, proporcionando un aumento de la concentración de acetilcolina en la sinapsis y este aumento en el SNC mejora la función cognitiva³. Sin embargo, estos fármacos también actúan a nivel del SNP lo cual provoca alteraciones relacionadas con la hiperestimulación muscarínica periférica provocando de esta manera los efectos adversos³. Otro de los fármacos utilizados es la memantina, que es un antagonista del receptor NMDA que ha sido recientemente aprobado en

el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer moderada a grave⁴. Dado que el glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio del cerebro, cuando hay una sobre estimulación glutaminérgica (como en la EA)⁵, se produce un daño neuronal, cuando esto pasa se le conoce como excitotoxicidad que es una sobrecarga de calcio en el interior de la neurona esto lleva a la neurodegeneración⁶⁻⁸. El glutamato estimula al receptor postsináptico N-metil-D-aspartato (NMDA) este interviene en los procesos de formación de la memoria y patogenia de las demencias⁹. Lo que hace la memantina es situarse sobre el receptor NMDA para bloquear el acceso continuo de calcio y así sólo permitir el paso de calcio necesario para la neurona evitando la excitotoxicidad glutaminérgica^{10,11}.

Aromaterapia y aceite esencial de romero (*rosmarinus officinalis*)

La aromaterapia (aceites esenciales inhalados) es una terapia complementaria, dado que los aceites esenciales no sólo son un simple aroma agradable si no que se les atribuye propiedades terapéuticas específicas a una gran variedad de estas esencias. El concepto aromaterapia es mencionado en este siglo por el químico francés René Maurice Gattefosé, pero el empleo de los aceites esenciales tiene sus raíces en las prácticas curativas más antiguas de la humanidad¹².

Los aceites esenciales, en general, comparten ciertas propiedades terapéuticas como la antiséptica, antiinflamatoria y cicatrizante, pero cada esencia destaca por alguna propiedad única, hay que tener en cuenta que esto va a depender de la interacción molecular de sus componentes químicos¹².

Debido a la permeabilidad de los aceites esenciales y por su alta lipofilicidad, penetran a través de la piel y mucosas (boca, nariz, faringe) y en el tracto gastrointestinal, por lo tanto, se pueden administrar por vía dérmica, respiratoria u oral. La región olfatoria es el único lugar del organismo donde el sistema central está estrechamente relacionado con el mundo exterior, así los estímulos olfativos llegan de manera directa a las centrales de conexiones más internas del cerebro. Después de un mensaje olfatorio, el aroma atraviesa la corteza rinencefálica a través de numerosas fibras nerviosas y alcanza las centrales de control superior del cerebro como el hipotálamo, la glándula hormonal superior y el tálamo que es el centro más importante para los estímulos sensoriales. Estas glándulas constituyen, en su conjunto el sistema más primitivo del organismo humano, el sistema límbico. El sistema límbico es un conjunto de núcleos cerebrales y zonas corticales estrechamente ligadas entre sí, donde se coordinan el comportamiento emocional y los impulsos condicionados por los instintos, además se le atribuyen centros de funcionamiento esencial para la capacidad de memorización y aprendizaje¹². Por consiguiente, el estímulo olfatorio puede ocasionar efectos tanto sobre percepciones como fisiológicos.

En la actualidad el efecto ansiolítico es muy buscado en la aromaterapia y atribuible a ciertas esencias como la de lavanda e ilang-ilang. La angustia y la ansiedad constituyen problemas importantes que afectan la salud mental en el mundo entero. Existen estudios que sugieren que aceites esenciales con propiedades ansiolíticas podrían ejercer un efecto beneficioso sobre estas emociones¹³.

En este contexto la terapia complementaria aparece como una alternativa de apoyo a los procedimientos necesarios de realizar a un paciente¹³. El aceite de romero (*rosmarinus officinalis*, pertenece a la familia *lamiaceae* (*labiatae* labiadas) es una planta rica en principios activos y con acción sobre casi todos los órganos de cuerpo humano¹⁴. Al tener un alto contenido en aceites esenciales, cuyos ingredientes activos son flavonoides, ácidos fenólicos y principios amargos, genera una acción tónica y estimulante sobre el sistema nervioso, circulatorio y corazón, además de ser colerético, colagogo, antiespasmódico, diurético, emenagogo y antigodanotrópico^{15,16}. Es por eso que en este estudio se evaluó el uso de aceite de romero para mejorar el aprendizaje en el ratón como un tratamiento complementario.

Material y métodos

Se utilizaron 24 ratones CD1 machos con una variación de peso entre 20 y 30 g, los cuales fueron suministrados por el Bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. Se mantuvieron en cajas de acrílico en ciclos de luz/oscuridad de 12/12 horas a una temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$, tuvieron libre acceso a alimento purina y agua. Todos los animales se manejaron de conformidad con los estándares éticos de investigación (NOM-062ZOO-1999), aprobados por el Comité Nacional de Cuidados Animales y contenidos en la Ley General de Salud. En la evaluación de la memoria: se utilizó el modelo del laberinto acuático de Morris; prueba que con más frecuencia utilizan los investigadores para el estudio de la memoria espacial¹⁷. En esta prueba se evalúa el tiempo de latencia que emplea el animal en alcanzar la plataforma sumergida, que representa un estímulo reforzante de escape. Si la plataforma permanece en el mismo lugar.

En la mayoría de los estudios conductuales podemos distinguir tres fases: la de orientación a la piscina, fase de aprendizaje y de retención del aprendizaje denominada también de prueba. En la fase de orientación se introdujo al animal con el hocico hacia las paredes de la piscina, se le deposita en el agua y se le deja nadar con libertad durante 60 a 120 segundos^{18,19}.

Con estos ensayos de orientación en los que la plataforma no está sumergida (escape) y con las señales espaciales presentes, se pretende familiarizar al animal con la situación experimental y paliar los efectos interferentes sobre el mismo causados por las respuestas emocionales a los estímulos nuevos^{20,21,22}.

Desarrollo experimental: se realizó el estudio durante cuatro días a los cuatro grupos de estudio; se utilizó una tina ovalada con capacidad para 650 litros (figura 1), de 60 cm x 1.95 m. En cada sesión se realizaron 4 ensayos de 2 minutos de duración por cada ratón. Cada ensayo se iniciaba desde una posición que no variaba.

Los animales debían nadar en la piscina hasta localizar la plataforma escondida (plataforma de escape) que estaba señalizada con diferentes marcas colocadas sobre la pared de la piscina, durante tres días y al cuarto día se retiró la plataforma de escape y se realizó la prueba, midiendo el tiempo que duraron en el cuadrante donde estaba la plataforma escondida (figura 1).



Figura 1. Evaluación del aprendizaje en ratón en el laberinto acuático de Morris

Resultados

Se realizó un ANOVA para la comparación de los tiempos promedio que permanecieron en el mismo cuadrante y la prueba de Tukey-Kramer para observar si había diferencias significativas entre los grupos. Los resultados demuestran que si existen variaciones entre los promedios y los grupos, se muestra una tendencia a mejorar el aprendizaje del grupo de aceite de romero por vía oral, muy parecida al de memantina; sin embargo, entre el grupo control y el aceite de romero por vía inhalatoria no existen diferencias significativas, esto es correcto debido a que todos los grupos tuvieron una fase de entrenamiento y los ratones aprenden y memorizan el área, donde se encuentra la plataforma de escape, aún sin tratamiento, otros factores que pueden influir en las diferencias muy pequeñas entre los grupos pueden ser la administración, que cuando se atomiza hay grandes variaciones de dosificación, el ambiente en el laboratorio como el ruido o colocar más marcadores pero con luz, las condiciones espaciales, y tal vez las dosis administradas. No obstante, se puede observar la mejora en el aprendizaje por el tiempo que permaneció en el lugar de la plataforma por vía oral.

Conclusión

Los ratones aprenden con rapidez después de los entrenamientos, consideramos que se puede incrementar el tiempo de entrenamiento, así como las señales espaciales para que el ratón encuentre rápidamente el lugar de permanencia; asimismo se pueden utilizar programas computarizados para analizar los tiempos que permanecen en los diferentes cuadrantes y también aumentar las dosis de aceite de romero. En este estudio se logró seguir el comportamiento del ratón control, el cual buscaba una base en la plataforma; sin embargo, una vez encontrado, permanecían en el mismo lugar y más tranquilos. Los resultados de este estudio son el comienzo para continuar en la búsqueda de tratamientos complementarios para la enfermedad de Alzheimer, son muy alentadores pues se observa la mejora del aprendizaje cuando administramos aceite de romero; no obstante, se recomienda continuar realizando pruebas con otras dosis o con la administración simultánea de fármacos aprobados junto con el aceite de romero, para mejorar la calidad de vida de los pacientes con demencia.

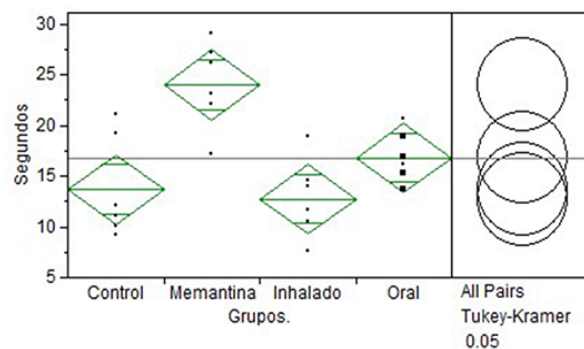


Tabla 1. Tiempo de permanencia en el lugar de la plataforma de escape, Tukey-Kramer $p < 0.05$

Referencias

1. Tanzi R, Bertram L. Twenty years of the Alzheimer's review disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell* 2005;120:545-55.
2. Wang R, Zhang Y, Zhang C. Resveratrol ameliorates spatial learning memory 3 impairment induced by ab1-42 in rats. *Neuroscience* 2016 dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.08.051.
3. Goodman L, Hardman J. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 10ª Ed; México, McGraw-Hill Interamericana, 2004.
4. Dargahi L, Nasoohi S, Omidbakhsha R, Mohameda Z, Chika Z, Naidud M, et al. Neurorestorative effect of FTY720 in a rat model of Alzheimer's disease: comparison with memantine. *Behav Brain Res* 2013;252:415-21.
5. Nikiforuk A, Potasiewicz A, Kos T, Popik P. The combination of memantine and galantamine improves cognition in rats: the synergistic role of the 7 nicotinic acetylcholine and NMDA receptors. *Behav Brain Res* 2016;313:214-8.
6. Dashniani M, Burjanadze M, Beselia G, Chkhikvishvili N, Naneishvili T. Effects of the uncompetitive NMDA receptor antagonist memantine on recognition memory in rats. *Georgian Med News* 2010;183:27-33.
7. Jain K. Evaluation of memantine for neuroprotection in dementia. *Expert Opin Investig Drugs* 2000;9(6):1397-406.
8. Bormann J. Memantine is a potent blocker of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor channels. *Eur J Pharmacol* 2009;166(3):591-2.
9. Eleti S. Drugs in Alzheimer's disease dementia: an overview of current pharmacological management and future directions. *Psychiatr Danub* 2016; 28(1):136-40.
10. Wimo A, Winblad B, Stoffer A, Wirth, P. y Mobius, L. Resource utilisation and cost analysis of memantine in patients with moderate to severe Alzheimer's disease. *H Pharmacoeconomics* 2003;21(5):327-40.
11. Winblad B, Poritis N. Memantine in severe dementia: results of the 9M-Best Study (Benefit and efficacy in severely demented patients during treatment with memantine). *Int J Geriatr Psychiatry* 2009;14:135-46.
12. Alonso J. Tratado de fitofármacos y nutracéuticos, 2a. Edición, Buenos Aires: Corpus; 2004.
13. Kaymaz T, Ozdemir L. Effects of aromatherapy on agitation and related caregiver burden in patients with moderate to severe dementia: A pilot study. *Geriatr Nurs* 2016; doi: 10.1016/j.gerinurse.2016.11.001
14. Sardans J, Roda F y Peñuelas J. Effects of water and nutrient pulse supply on *Rosmarinus officinalis* growth, nutrient content and flowering in the field. *Environ Exp Bot* 2005;53(1):1-11.
15. Sotelo J, Martinez D, y Marriel P. Evaluation of the effectiveness of *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) in the alleviation of carbon tetrachloride-induced acute hepatocytotoxicity in the rat. *J Ethnopharmacol* 2002;81(3):145-54.
16. Khorshidi J, Rahmat M, Mohamed F, Himan N. Influence of drying methods, extraction time, and organ type on essential oil content of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L). *Natural Science* 2009;7(11):42-4.
17. Wenzhu W, Lixu L, Peng J, Tong Z. Levodopa improves learning and memory ability on global cerebral ischemia-reperfusion injured rats in the Morris water maze test. *Neurosci Lett* 2016;32428:1-8.
18. Wenk G. Assessment of spatial memory using radial arm and Morris water mazes. In: current protocols in neuroscience. Crawley J, Gerfen C, McKay R, Rogawski M, Sibley D and Skolnick P. New York: 1998.
19. Navarrete F, Pérez J, Femenía M, García M, García P, Leiva C, Manzanares J. Methods to evaluate cognitive disorders in animal models. *Rev neurol* 2008;47(3):137-145.
20. Sarasa M. Experimental models for Alzheimer's disease research. *Rev Neurol* 2006;42:297-301.
21. Brandeis R, Brandys Y and Yehuda S. The use of the Morris water maze in the study of memory and learning. *Int J Neurosci* 1989;48:29-69.
22. Holscher C. Stress impairs performance in spatial water maze learning tasks. *Behav Brain Res*. 1999;100:225-235.

Artículo sin conflicto de interés

© Archivos de Neurociencias