



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION

*EFFECTO NEUROPROTECTOR
DE LA SPIRULINA EN RATON*

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICOBIOLOGICAS**

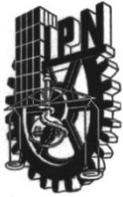
P R E S E N T A:

ANGÉLICA PÉREZ JUÁREZ



MÉXICO, D. F.

JULIO 2011



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 10:00 horas del día 20 del mes de Junio del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas para examinar la tesis titulada:

Efecto neuroprotector de la *Spirulina* en ratón

Presentada por el alumno:

Pérez
Apellido paterno

Juárez
Apellido materno

Angélica
Nombre(s)

Con registro:

B	0	7	1	0	7	2
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Doctorado en Ciencias Quimicobiológicas

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Germán Alberto Chamorro Cevallos

Dr. Jorge Pacheco Rosado

Dra. María del Rocio Elizabeth Ortiz Butrón

Dra. Norma Paniagua Castro

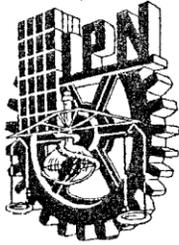
Dra. Leticia Garduño Siciliano

Dr. Sergio Roberto Zamudio Hernández

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Manuel Jesús Piñón López



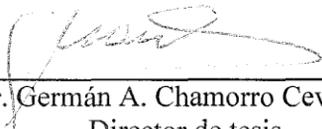


INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F., el día 2 del mes junio del año 2011, el (la) que suscribe alumno (a) del Programa de Doctorado en Ciencias Quimicobiológicas con número de registro B071062, adscrito a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Germán Alberto Chamorro Cevallos y Dr. Jorge Pacheco Rosado y ceden los derechos del trabajo intitulado “Efecto neuroprotector de la *Spirulina* en ratón”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección __gchamcev@yahoo.com.mx__. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



Dr. Germán A. Chamorro Cevallos
Director de tesis



Dr. Jorge Pacheco Rosado
Director de tesis



Alumna: Angélica Pérez Juárez

ARTICULO ACEPTADO

URL: www.academicjournals.org

Academic Journals <accounts3@acadjournal.org>
MPR-11-718 Angélica et al

Dear Sir,

I am happy to inform you that your manuscript JMPR-11-718 Angélica et al has been accepted and it is currently undergoing publication process.

Please contact me if you have any question and do include your manuscript number in all your correspondence with us. Thank you very much for publishing with Academic Journals.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA PRECLINICA DEL
DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y EN EL **LABORATORIO**
DE NEUROFISIOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE
FISIOLOGÍA DE LA ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS DEL **INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**,
BAJO LA DIRECCIÓN DE LOS DOCTORES: **GERMÁN A.**
CHAMORRO CEVALLOS Y JORGE PACHECO ROSADO.

LA REALIZACION DEL PRESENTE PROYECTO FUE
APOYADO POR **CONACYT** (BECA: 174486) Y LOS
PROYECTOS **SIP** 20091763 Y 20101447.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Germán Chamorro por darme la oportunidad de realizar el presente trabajo.

Al Dr. Jorge Pacheco por su apoyo para la realización de este proyecto.

A la Dra. Norma Paniagua por su paciencia, disposición y observaciones para mejorar este trabajo.

A mis sinodales: Dr. Germán A. Chamorro Cevallos, Dr. Jorge Pacheco Rosado, Dra. Norma Paniagua Castro, Dra. Leticia Garduño Siciliano, Dra. María del Roció E. Ortiz Butrón, Dr. Sergio R. Zamudio Hernández; por sus pertinentes comentarios y observaciones durante el desarrollo del presente proyecto de investigación.

A la Dra. Claudia Alva Sánchez por su asesoría en la técnica histológica.

ÍNDICE

Índice general	I
Índice de tablas y figuras	III
Resumen	IV
Abstract	VI
Abreviaturas	VIII
GENERALIDADES	
1.1 Neurodegeneración	1
1.2 Estrés oxidativo	3
1.3 Excitotoxicidad	6
1.3 Ácido kaínico	7
1.4 Hipocampo	8
1.5 Spirulina	15
1.5.1 Efecto antioxidante de la Spirulina	16
1.5.2 Spirulina y neurodegeneración	21
2. JUSTIFICACIÓN	23
3. HIPÓTESIS	24
4. OBJETIVOS	24
4.1 OBJETIVO GENERAL	24
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
5. METODOLOGÍA	25
5.1 Evaluación de la Spirulina en el sistema nervioso central	26

5.2 Análisis de lipoperoxidación	28
5.3 Actividad de la SOD	29
5.4 <i>Análisis histológico</i>	29
5.5 <i>Análisis estadístico</i>	30
6. RESULTADOS	31
7. DISCUSIÓN	40
8. CONCLUSIONES	49
9. BIBLIOGRAFÍA	50

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla1. Principales especies reactivas.	4
Figura1. Ácido kaínico.	8
Figura 2. Estructura del hipocampo.	10
Figura 3. Alga Spirulina.	15
Figura 4. Efecto de la Spirulina frente al daño inducido por el ácido kaínico sobre la coordinación motora en la prueba de rota-rod.	31
Figura 5. Efectos de la Spirulina en la prueba del laberinto acuático de Morris contra el efecto inducido por ácido kaínico.	32
Figura 6. Efectos de la Spirulina en la prueba de la placa caliente.	33
Figura 7. Efecto de la Spirulina en la prueba de laberinto en cruz elevado.	34
Figura 8. Efectos de la Spirulina en la prueba de nado forzado.	35
Figura 9. Contenido de MDA en el hipocampo 10 días después de la administración de ácido kaínico.	36
Figura 10. Actividad de SOD en el hipocampo 10 días después de la administración de ácido kaínico.	37
Figura 11. Contenido de células piramidales en el hipocampo	38
Figura 12. Morfología de las neuronas piramidales del hipocampo en ratones adultos	39

RESUMEN

El alga *Spirulina* (*Arthrospira*) *maxima* es una cianobacteria con numerosas propiedades nutricionales y farmacológicas, además de poseer una actividad antioxidante importante. La *Spirulina* ha demostrado tener acciones beneficiosas en diversos modelos animales de enfermedades neurodegenerativas. Se ha demostrado que la *Spirulina* protege a los animales de una aguda inflamación sistémica, de una lesión del sistema dopaminérgico nigroestriatal, de isquemia y una reducción en el volumen de infarto en la corteza cerebral. Muchas de estas propiedades están relacionadas principalmente con su capacidad antioxidante debido a la presencia de compuestos fenólicos, ácido γ -linoleico, minerales, tocoferoles, β -carotenos y ficocianinas.

Este estudio evaluó el papel neuroprotector de la *Spirulina* contra la neurotoxicidad provocada por el ácido kaínico. Se utilizaron ratones macho Swiss Webster que fueron tratados con *Spirulina* (200, 400 y 800 mg / kg) durante 24 días vía oral, el ácido kaínico (35 mg / kg) por vía intraperitoneal en dosis única, el día 14. Después del tratamiento, se evaluó la actividad de *Spirulina* sobre: la coordinación motora, memoria espacial, actividad analgésica, ansiedad y el estrés ocasionado por el ácido kaínico, aunado la peroxidación de los lípidos, la actividad antioxidante SOD y análisis morfológico de las neuronas en el hipocampo.

Las dosis empleadas de *Spirulina*, contrarrestaron el efecto causado por el ácido kaínico en las pruebas neurofarmacológicas de coordinación motora, memoria-aprendizaje y ansiedad.

La lipoperoxidación fue significativamente mayor en el grupo de ácido kaínico en comparación con el grupo testigo. El tratamiento con *Spirulina* a las dosis más altas (*Spirulina* 400 + ácido kaínico y *Spirulina* 800 + ácido kaínico) redujo la peroxidación de los lípidos con respecto al grupo de ácido kaínico, demostrando que la *Spirulina* reduce el estrés oxidativo y protege contra los efectos neuroconductuales del ácido kaínico.

La actividad de la SOD no se modificó en los grupos tratados con respecto al grupo testigo.

Mientras que el tratamiento con *Spirulina* en la dosis de 400 y 800 mg/kg aumentó la cantidad de células normales en hipocampo con respecto al grupo de ácido kaínico.

De acuerdo a los resultados, la *Spirulina* disminuyó el efecto neurotóxico del ácido kaínico probablemente debido a sus propiedades antioxidantes, lo que sugiere que podría ser una alternativa en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

ABSTRACT

The algae *Spirulina* (*Arthrospira*) *maxima* is a cyanobacterium with numerous nutritional and pharmacological properties, besides having an important antioxidant activity. *Spirulina* has been shown to have beneficial actions in various animal models of neurodegenerative diseases. It has been shown that *Spirulina* protects the animals from acute systemic inflammation, a lesion of nigrostriatal dopaminergic system of ischemia and reduced infarct volume in the cerebral cortex. Many of these properties are mainly related to its antioxidant capacity due to the presence of phenolic compounds, γ -linolenic acid, minerals, tocopherols, β -carotene and phycocyanin.

This study evaluated the neuroprotective role of *Spirulina* against neurotoxicity induced by kainic acid. We used Swiss Webster male mice treated with *Spirulina* (200, 400 and 800 mg / kg) orally for 24 days, the kainic acid (35 mg / kg) intraperitoneally a single dose on day 14. After treatment, we assessed the activity of *Spirulina* on: motor coordination, spatial memory, analgesic activity, anxiety and stress caused by kainic acid, coupled peroxidation of lipids, antioxidant SOD activity and morphological analysis of neurons in the hippocampus.

The doses used in *Spirulina*, counteracted the effect caused by kainic acid in neuropharmacological tests of motor coordination, memory, learning and anxiety.

Lipoperoxidation was significantly higher in the kainic acid group compared with the control group. *Spirulina* treatment at higher doses (*Spirulina* 400 + kainic acid and *Spirulina* 800 + kainic acid) reduced lipid peroxidation

compared to kainic acid group, showing that *Spirulina* reduces oxidative stress and protects against neurobehavioral effects kainic acid.

The SOD activity was unchanged in the treated groups compared to control group.

While treatment with *Spirulina* in doses of 400 and 800 mg / kg increased the number of normal cells in the hippocampus compared to kainic acid group.

According to the results, *Spirulina* decreased the neurotoxic effect of kainic acid probably due to its antioxidant properties, suggesting that it could be an alternative in the treatment of neurodegenerative diseases.

ABREVIATURAS

CA	Cuerno de Ammon
EA	Enfermedad de Alzheimer
EP	Enfermedad de Parkinson
MDA	Malondialdehído
EML	Esclerosis múltiple lateral
RL	Radicales libres
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SOD	Superóxido dismutasa
SNC	Sistema nervioso central

1. GENERALIDADES

1.1 Neurodegeneración

La neurodegeneración es la pérdida irreversible de neuronas y células de la glía, siendo la principal característica patológica de enfermedades agudas y crónicas como la enfermedad de Alzheimer (EA) y la enfermedad de Parkinson (EP) además de estar presente en infecciones virales, apoplejía, trastornos paraneoplásicos y esclerosis múltiple lateral (EML) (Ames y cols., 1993) la neurodegeneración puede estar determinada por factores genéticos, traumáticos, esporádicos y envejecimiento (Navarrete y cols., 2000).

La muerte celular se puede clasificar por diferentes criterios morfológicos y bioquímicos, que han permitido definir al menos tres clases: la apoptosis, la autofagia y la necrosis (Rojas y Ramírez, 2010; Kroemer y cols., 2009).

La apoptosis o programa de muerte celular es regulada fisiológicamente; los propios genes de la célula participan de manera activa, es decir, hay “suicidio celular” y sus principales mediadores son proteasas denominadas caspasas. Durante la apoptosis la célula mantiene la integridad de sus organelos por un cierto periodo, lo que permite conservar el estado energético, la homeostasis celular y en algunos casos, mantener la maquinaria necesaria para sintetizar proteínas implicadas en el mismo proceso (Fink y Cookson, 2005). En los procesos apoptóticos se pueden distinguir tres fases: activación, propagación y ejecución que, en ocasiones, se preceden por un periodo de latencia de extensión variable. La fase de activación puede iniciarse por señales extracelulares, como la unión de un ligando a su receptor o por señales intracelulares. La fase de propagación intracelular, es mediada por el Ca^{2+} , las

especies reactivas del oxígeno y factores de transcripción. Finalmente, en la etapa de ejecución la célula activa procesos de degradación en los que participan proteasas y ADNasas (Segura y cols., 2003).

La autofagia es un proceso lento que es inducido en condiciones limitantes de nutrientes y cuando se debe remover un organelo con alteraciones funcionales, inicialmente afecta a organelos y compartimientos celulares. Durante la autofagia algunas porciones del citoplasma quedan aisladas dentro de una vacuola de doble membrana y son digeridas por hidrolasas lisosomales (Kroemer y cols., 2009; Levine y Kroemer, 2008).

En la autofagia se realiza un mecanismo de adaptación tisular como la atrofia, en la que se reducen el volumen celular y la función del órgano. Hay dos tipos de autofagia: la microautofagia definida como la absorción del citoplasma dentro del lisosoma o de una vacuola, en el caso de las levaduras. El segundo tipo es la macroautofagia, en la cual se degradan las proteínas como una estrategia de supervivencia, en condiciones de baja disponibilidad de aminoácidos (Krick y cols., 2008). Las vacuolas autofágicas se forman inicialmente a partir de las membranas del retículo endoplásmico que rodea una región del citoplasma. Esta estructura forma una doble membrana que se fusiona con endosomas tardíos y lisosomas, generando un autofagolisosoma, donde finalmente se degradan las proteínas u organelos que habían sido autofagocitadas. La acumulación de autofagosomas y autolisosomas es un marcador morfológico de la macroautofagia (Klionsky y Emr, 2010).

En la necrosis hay ganancia de volumen celular (oncosis), ruptura de la membrana plasmática y salida del material intracelular. Desde el punto de vista morfológico, se ha definido como el espectro de cambios *post mortem* en un

tejido por la acción progresiva de enzimas propias de las estructuras lesionadas. El aspecto de las células necróticas resulta de la desnaturalización de proteínas y de la digestión enzimática autolítica o heterolítica (Eisenberg y cols., 2010; Proskuryakov y cols., 2003).

Existen patologías que se caracterizan por una disminución en el número de células en determinadas poblaciones neuronales, por ejemplo en la EA (Toledo, 2011), en donde se ha observado una pérdida de neuronas colinérgicas fundamentalmente en el hipocampo y la amígdala. En la EML se reduce la población de motoneuronas (Lassmann, 2011), así como en la EP son las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra (Meyer y cols., 1998; Segura y cols., 2003).

La pérdida neuronal se refleja clínicamente por la aparición de sintomatologías específicas, como alteración en los procesos de memoria y lenguaje en la EA, modificación en el control y la coordinación del movimiento en la EP, o debilidad progresiva en la EML (Segura y cols., 2003). Estas tres son algunas de las patologías neurológicas más devastadoras y que mayor gasto económico representan para la sociedad actual (Mayeux, 2003), siendo la población que se encuentra por arriba de los 50 años de edad la que presenta una mayor predisposición a padecerlas, lo que coincide con una disminución de la concentración sanguínea de hormonas gonadales, uno de los diversos factores de riesgo (Meyer y cols., 1998).

1.2 Estrés oxidativo

El mantenimiento y la optimización del balance óxido-reducción como resultado del metabolismo celular preserva el equilibrio entre la producción de pro-

oxidantes y los sistemas de defensa antioxidantes (Dorado y cols., 2003). Los radicales libres (RL) y las especies reactivas de oxígeno (ROS) (tabla 1), son normalmente generados por el metabolismo de las células para la obtención de energía (McCord, 2000; Finkel, 1998). En un estado de estrés oxidativo, se presenta un exceso de pro-oxidantes que no puede ser contrarrestados por los sistemas antioxidantes (Dorado y cols., 2003; Pérez y Arancibia, 2007).

Tabla 1. Principales especies reactivas

Radical o especie reactiva	Especies reactivas de oxígeno	Especies reactivas del nitrógeno
<i>Radical superóxido</i>	$\cdot\text{O}^{2-}$	-
<i>Peróxido de hidrógeno</i>	H_2O_2	-
<i>Radical hidroxilo</i>	$\cdot\text{OH}$	-
<i>Radical alcóxido</i>	$\text{RO}\cdot$	-
<i>Radical peróxido</i>	$\text{ROO}\cdot$	-
<i>Oxido nítrico</i>	-	$\text{NO}\cdot$
<i>Dióxido de nitrógeno</i>	-	$\text{NO}_2\cdot$
<i>Peroxinitrito</i>	-	ONOO^{2-}

Aunque el estado de estrés oxidativo no es el causante directo o el factor etiológico responsable de las neuropatologías, existen evidencias de que la presencia de radicales libres produce el daño tisular degenerativo (Butterfield, 2002). El cerebro es particularmente susceptible al daño oxidativo por su elevada tasa metabólica y su reducida capacidad para la regeneración celular. (Shi y Liu, 2007).

Para prevenir un aumento descontrolado de las ROS, las células tienen sistemas antioxidantes. Estos sistemas pueden clasificarse en enzimáticos (como por ejemplo, en superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y la glutatión

peroxidasa), los antioxidantes endógenos (ejemplo: la transferrina, la lactoferrina, la ceruloplasmina, la albumina, la bilirrubina, el ácido úrico) o elementos contenidos en la dieta (vitaminas C y E, el β -caroteno, los flavonoides, el selenio y el zinc) y por último antioxidantes farmacológicos como: el tirilazad, ebselen, la N- acetil cisteína y las porfirinas, entre otros (Christen, 2000; Butterfield y cols., 2002; Gotay y Mederos, 2006).

El daño por estrés oxidativo depende de algunos factores como el tiempo que dure el estrés, la efectividad de las defensas antioxidantes, la edad del organismo, el estado nutricional y en factores genéticos que codifican los sistemas antioxidantes (Beckman y Ames, 1998; McCord, 2000; Lin y Beal, 2006; Pérez y Arancibia, 2007).

Sistema antioxidante enzimático

La enzima (SOD) es una de las enzimas de la primera línea de defensa antioxidante ya que cataliza la reacción del radical superóxido formando peróxido de hidrogeno. El ion superóxido es uno de los más peligrosos de las especies reactivas de oxígeno en el estrés celular. Una mayor cantidad de SOD endógena protege de daño neuronal, debido a la captura del radical superóxido además de reducir el estrés oxidativo al modular otros niveles antioxidantes.

La enzima contiene Zn y Cu en su centro activo, cuando hay pequeñas cantidades de Zn se produce una pérdida de motoneuronas, lo que confirma la necesidad de un enzima funcional (McCord, 2000).

Marcadores de estrés oxidativo

Los marcadores de estrés oxidativo son una herramienta para evaluar la progresión de alguna enfermedad. Uno de estos marcadores, el MDA, se forma a partir de la ruptura de endoperóxidos durante las últimas etapas de oxidación de los AGPIs, principalmente de los que contienen tres o más dobles enlaces. El MDA reacciona con grupos amino primarios de moléculas biológicas, formándose como aldehído libre o aducto con otros componentes celulares (Dorado y cols., 2003). Los estudios de diversas enfermedades neurodegenerativas, han revelado un incremento en los niveles del MDA en el hipocampo, corteza piriforme y amígdala, corteza temporal, frontal, parietal y occipital.

1.3 Excitotoxicidad

El estudio sobre los mecanismos de neurodegeneración, ha confirmado que en numerosas ocasiones la muerte neuronal comienza mediante la sobreexcitación en respuesta a la acumulación extracelular de glutamato. El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio y su interacción con receptores específicos de la membrana es la responsable de algunas funciones neurológicas como: cognición, memoria, entre otras (Lipton, 1999; Meldrum, 2000). Este mecanismo de neurodegeneración se denomina excitotoxicidad, el cual se ha relacionado con una variedad de enfermedades neurodegenerativas del sistema nervioso central (SNC), incluyendo la EA, EP y la EML. En las últimas décadas, se han desarrollados grandes logros obtenidos en la información de las vías de señalización que se activan a consecuencia de la excitación neuronal; sin embargo, el mecanismo por el cual los receptores de

glutamato están implicados en los trastornos neurodegenerativos sigue sin estar claro (Xiang-Yu, 2011).

Se ha propuesto que uno de los principales procesos responsables de la muerte neuronal es la sobreactivación de los receptores de glutamato, provocando un importante incremento de Ca^{2+} en el citoplasma, (Olney, 1969). Se ha determinado que los altos niveles de Ca^{2+} citoplasmático por sí mismos no son necesariamente tóxicos para las neuronas sin embargo, el incremento de Ca^{2+} puede inducir la muerte en la neurona por: a) la disminución en la reserva energética que produce la sobre activación de los receptores de glutamato alterando la homeostasis iónica neuronal y llevando a la muerte por necrosis, aunque, si el estado energético se recupera habría una muerte neuronal retardada mediante apoptosis; b) la liberación de factores proapopticos, desde el espacio intermembranar de la mitocondria hacia el citosol, como el citocromo c; c) el incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno, debido a que la mitocondria produce superóxido y especies reactivas de oxígeno (Ankarcrona y cols., 1995).

Con base en el concepto de excitotoxicidad, se ha establecido un modelo que induce neurodegeneración en el sistema nervioso central, de manera similar a la observada en varias patologías, siendo generada mediante la administración de un agonista del receptor al glutamato: el ácido kaínico.

1.3 Ácido kaínico

En 1953 se aisló el ácido kaínico del alga marina *Digenea simplex*, y se utilizó como agente anti-ascaridiasis. En 1970 se describió su potente acción como neurotoxina en el SNC de mamíferos (Johnston y cols., 1979). El ácido kaínico

(figura 1) es un análogo conformacional del ácido L-glutámico y es el agonista prototipo de un tipo de los receptores ionotrópicos del glutamato; por lo que son llamados tipo kainato (Simon y cols., 1976).

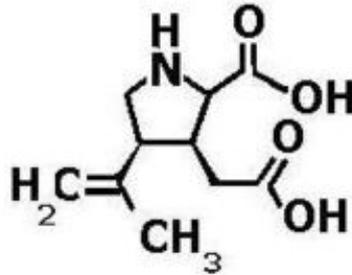


Figura 1. Ácido kaínico

El ácido kaínico induce convulsiones y neurodegeneración *in vivo* y se emplea para inducir epilepsia experimental en roedores (Ando y cols., 2004; Bausch y McNamara, 2004). La administración local del ácido kaínico provoca lesiones axonales y produce convulsiones cuando se aplica por vía sistémica. La degradación neuronal permanece durante meses, produciendo la retracción masiva del hipocampo y de la amígdala, corteza piriforme y áreas de la corteza entorrinal (Schwob, 1980; Baran y cols., 1995, Jong-Seon y cols., 2009).

1.4 Hipocampo

El hipocampo deriva del telencéfalo, que es un órgano par, por lo que se tiene un hipocampo derecho y uno izquierdo. Su nombre deriva del griego por su forma curva semejante a un caballito de mar (*Hippocampus*; hippos=caballo, kampi=curva del). Forma parte del sistema límbico y sus funciones cognitivas primarias se refieren a la memoria y a la organización espacial. Diferentes procesos de telencefalización filogenética y ontogénica lo llevan a la posición mesial basal que ocupa, se localiza en la parte dorsomedial de los lóbulos

temporales del cerebro, por debajo del ventrículo lateral (Castro-Sierra y cols., 2007a).

El hipocampo se conforma de las siguientes porciones:

- a) Hipocampo retrocomisural, o hipocampo propiamente dicho.
- b) Hipocampo supracomisural.
- c) Hipocampo precomisural.

El hipocampo retrocomisural está situado en la región más medial del quinto giro temporal, su cara externa y superior se encuentra en el receso temporal del ventrículo lateral y se divide en tres estructuras (ver figura 2):

- Cuerno de Ammon (CA): en el cual se distinguen cuatro regiones; CA1, CA2, CA3 y CA4, en donde CA1 es vecino del subículo y CA4, del giro dentado. La corteza del cuerno de Ammon contiene tres capas: molecular, celular y poliforma.
- Giro dentado: Este es también una corteza de tres capas: poliforma, granulosa y molecular. Está en contacto con los 4 componentes del CA y el prosubículo. Diversos estudios han descrito la presencia de glutamato como neurotransmisor primario, además de la presencia de GABA, somatostatina, colecistocinina y polipéptido vasoactivo.
- Subículo: Es una corteza transicional, constituida por tres capas neuronales típicas: la alo corteza, la capa neuronal y la capa molecular, aunque estas capas se pueden encontrar en número de tres a seis. Se divide en cuatro partes:
 1. Prosubículo, vecino a CA1.
 2. Subículo

3. Presubículo
4. Parasubículo, vecino a la corteza entorrínica.

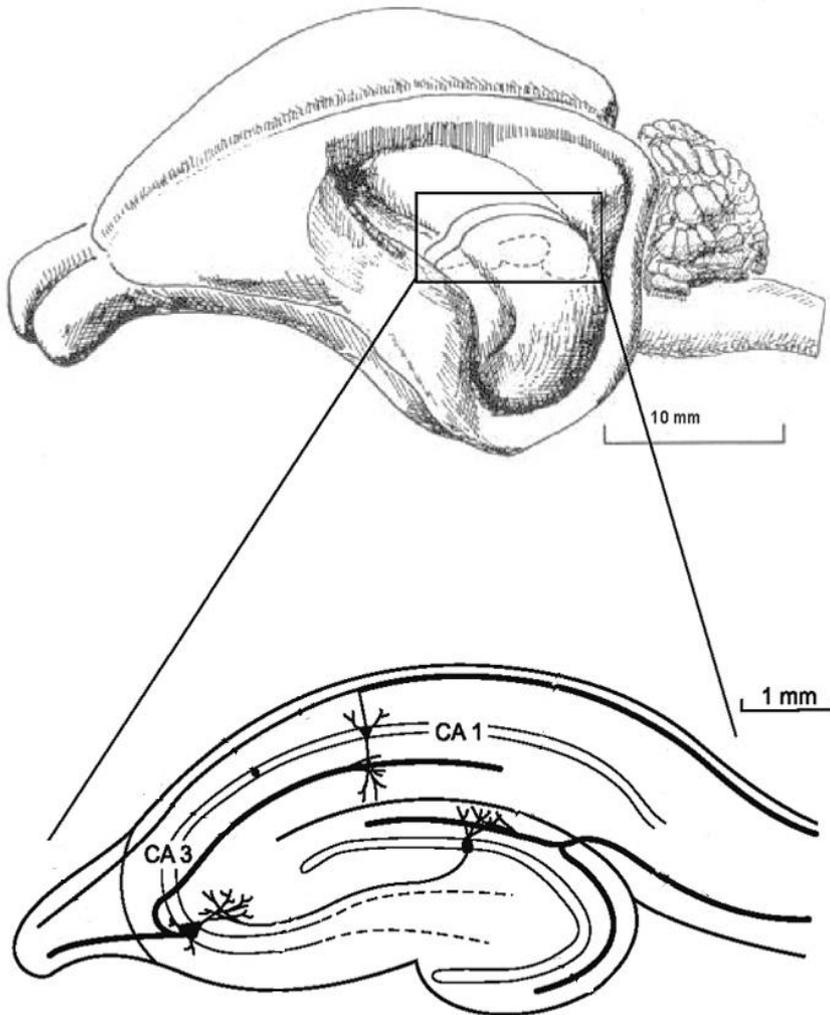


Figura 2. Estructura del hipocampo (Tomado de: Brandy, 2006).

Funciones fisiológicas del hipocampo

Como todos los componentes del sistema límbico, desarrolla tres funciones:

- a) Mnemónicas: Se relaciona con la memoria reciente. El complejo polisináptico que se encarga de fijar la memoria va desde la corteza

entorrínica, pasando por las células granulosas del giro dentado, CA3 y, luego, CA1, subículo y *albeus*, hasta el fórnix.

- b) Motivacionales: Como centro de motivaciones para la memorización, tendrá funciones tanto fisiológicas como mnemónicas.
- c) Conductuales: En relación con estimulación o una lesión del hipocampo, el sujeto presenta reacciones de defensa, ataque y furia, así como respuestas viscerales de diferente tipo (Castro-Sierra y cols., 2007b).

Hipocampo: neurodegeneración y comportamiento

Se ha visto que el hipocampo es particularmente vulnerable a una variedad de condiciones, tales como anoxia, estado epiléptico, demencia senil y enfermedades neurodegenerativas, en los que el número de neuronas piramidales disminuye (Sperk, 1994).

Los estudios realizados reportan que los cerebros obtenidos a partir de animales tratados con ácido kaínico, se alteran de manera macroscópica, incrementando su volumen, principalmente en los lóbulos temporales (Sperk, 1994).

Hipocampo y locomoción

El núcleo accumbens, estriado medial, y la corteza prefrontal medial recibir entrada glutamatérgica de las regiones del cerebro límbico-corticales, tales como el hipocampo, la amígdala, el tálamo y áreas corticales asociadas. Estos datos indican que las regiones del cerebro límbico-corticales dañadas por ácido kaínico modulan la actividad locomotora (Bardgett y cols., 1998).

La administración de ácido kaínico, mostro un déficit de la locomoción en rata, ocasionando una pérdida de motoneuronas, imitando las características clínico-patológicas de la ELA (Hui y cols., 2006).

Hipocampo y memoria

El hipocampo es una estructura cerebral necesaria para la adquisición y recuperación de la información espacial, al igual que para su consolidación y almacenamiento. La administración de ácido kaínico, provoca el proceso de degeneración neuronal, aún meses después de haberse administrado, generando lesiones masivas en el hipocampo y en las áreas de amígdala, corteza piriforme y corteza entorrinal (Sperk, 1994). Estas lesiones provocan la disfunción del hipocampo, alterando la recuperación de la memoria en las ratas (Arkhipov y cols., 2007), principalmente afectando el área de CA1 y CA3 las cuales juegan un papel importante en el aprendizaje y memoria. Los reportes indican que la lesión en CA1 produjo un déficit en la adquisición de memoria en la prueba de laberinto de Morris, así mismo en CA3 también causo déficit de aprendizaje en la misma prueba realizada y ocasiono alteraciones aun mayores en el rendimiento en la prueba de evitación pasiva (Pentkowsi y cols., 2006).

Hipocampo e hiperalgesia.

Si bien los efectos de los aminoácidos excitatorios han sido bien caracterizados en el SNC, se sabe relativamente poco acerca de su posible modulación de los elementos responsables en la hiperalgesia en los tejidos periféricos. La administración de glutamato, provoca una respuesta térmica: hiperalgesia en las latencias, lo que sugiere que los aminoácidos excitatorios

activar un mecanismo periférico que estimula la hiperalgesia a través de un proceso mediado por los receptores.

Hipocampo y ansiedad

Se cree ampliamente que el hipocampo está implicado en espacial navegación (O'Keefe y Nadel, 1978) y ciertas formas de aprendizaje y memoria (Eichenbaum, 2000, Escudero et al, 2004). Sin embargo, cada vez es más evidente que el hipocampo también puede ayudar a modular la ansiedad relacionada con comportamientos (Gray & McNaughton, 2000; Bannerman et al., 2004) y respuestas defensivas frente a diversos estímulos amenaza.

El laberinto en cruz elevado, es una de las pruebas de ansiedad más utilizadas siendo el modelo mejor validado desde el punto de vista conductual, farmacológico y fisiológico, se basa en la aversión no condicionada de los roedores hacia los lugares abiertos y altos. Este método determina cambios en ansiedad permitiendo observar el comportamiento espontaneo de los animales, sin someterlos a estímulos nocivos, privación de alimento y agua.

Hipocampo y estrés

El estrés es el estado en el cual el cerebro interpreta que un estímulo determinado es excesivo o perjudicial (Kama y cols., 2001). El estímulo estresor altera la homeostasis del cuerpo y desencadena respuestas fisiológicas cognitivas y conductuales que permiten restaurar las condiciones basales. Se han descrito pruebas conductuales en las cuales se induce estrés a los animales por medio de traumatismos, infecciones, calor o frío intenso, inmovilización o la inducción del nado forzado. En la prueba de nado forzado se

obliga al animal a nadar en un espacio reducido del cual no hay escape, los animales que luchan para escapar hasta llegar a la inmovilidad excepto por pequeños movimientos para mantener la cabeza fuera del agua. En esta prueba se relaciona el tiempo de lucha con la capacidad que tiene el animal de responder al estrés (Porsolt, 1977).

Hipocampo y muerte neuronal

Los cambios neuroquímicos e histológicos observados en hipocampo se pueden relacionar directamente con las características excitotóxicas y convulsionantes producidas por el ácido kaínico que a su vez ocasiona disturbios en la microcirculación produciendo anoxia e isquemia, siendo factores importantes en la patología de diversas enfermedades neurodegenerativas (Pong y cols., 1999; Candelario-Jalil y cols., 2001).

Las neuronas más sensibles al daño neuronal inducido con ácido kaínico son las neuronas piramidales de la región CA1 y CA3 del hipocampo, así como las interneuronas del hilum del giro dentado, debido a su alta concentración de receptores tipo kaínato (Mandel y cols., 2004; Sok y cols., 2005; Sanon y cols., 2005).

Se ha sugerido, que los receptores para el ácido kaínico localizados en las fibras musgosas presinápticas inducen liberación de glutamato al momento de unirse al ácido kaínico, lo cual contribuye indirectamente en la acción neurotóxica del ácido kaínico (Takeda y cols., 2004). A nivel del hilus del hipocampo es posible observar una disminución en el número de células, tras la aplicación selectiva de dosis bajas de ácido kaínico.

1.5 *Spirulina*

El uso de las algas en la prevención y/o el tratamiento de diversos padecimientos han sido comprobados por sus propiedades farmacológicas en diferentes modelos experimentales. Entre ellas destaca la cianobacteria *Spirulina*, alga verde-azul que en algunos países se cultiva como suplemento alimenticio, fuente de colorantes y de aditivos para la industria farmacéutica (Stein y Borden, 1984; Cood y cols., 1989; Cood, 1995).

El alga *Spirulina* (figura 3), ahora nombrada *Arthrospira*, pertenece a la familia *Oscillatoraceae*; es una cianobacteria microscópica y filamentosa (Ramírez-Moreno y Olvera-Ramírez, 2006). Su nombre deriva de la naturaleza espiral o helicoidal de sus filamentos.

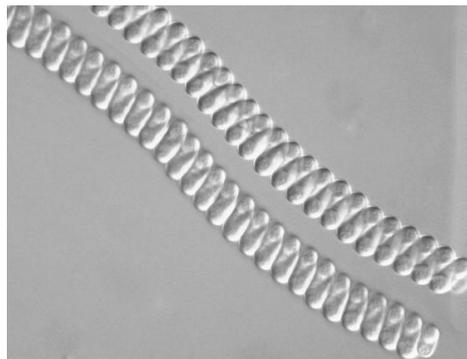


Figura 3. Alga *Spirulina*

La *Spirulina* crece en aguas alcalinas tropicales y subtropicales, ricas en sodio, con un pH de 11, a una temperatura de 30-35 °C y con una iluminación mínima de 25000 lux diarios; su crecimiento de manera natural se da en lagos alcalinos, como los ubicados en Asia, África, Norteamérica y Sudamérica.

Diversos trabajos reportan que fue utilizada como alimento en México durante la civilización Azteca, hace unos 400 años (Ramírez-Moreno y Olvera-Ramírez, 2006). En los últimos 20 años se ha utilizado comercialmente como

alimento; la producción se realiza en estanques al aire libre, bajo condiciones controladas, aunque algunas empresas también la cultivan directamente en lagos, siendo la producción actual a nivel mundial cerca de 2,000 toneladas métricas (Belay y cols., 1996).

Estudios a corto, mediano y largo plazo en animales de laboratorio han demostrado que la *Spirulina* no produce efectos tóxicos, lo que representa una ventaja en relación a otras algas que han ocasionado toxicidad y muerte en animales domésticos y salvajes, por la presencia de hepato y neurotoxinas (Chamorro y cols., 1996; Chamorro y cols., 2002; Islam y cols., 2009).

La importancia de esta alga se relaciona principalmente por su alto contenido en proteínas (60 a 70%), vitaminas (vitamina B12, provitamina A), aminoácidos esenciales, minerales, especialmente hierro, y de ácidos grasos esenciales como el linolénico, así como su baja cantidad de colesterol, grasas y calorías además de contener otras sustancias fitoquímicas como polisacáridos y ficobiliproteínas (ficocianina y aloficocianina), las cuales han demostrado poseer propiedades antioxidantes (Belay y cols., 1993; Chamorro y cols., 2002).

1.5.1 Efecto antioxidante de la *Spirulina*

Spirulina y toxicidad

Los contaminantes pueden ocasionar diversos efectos a la salud y al ambiente, dependiendo del elemento. El mercurio es un contaminante industrial, que produce alteraciones en tejidos de plantas y animales, siendo el órgano blanco el hígado. Este metal en su forma Hg^{2+} causa estrés oxidativo debido a su afinidad por las proteínas intracelulares con grupos sulfidrilo, así mismo incrementa la peroxidación de lípidos.

Se ha demostrado que la ingesta de cianobacterias del genero *Spirulina* protege contra la citotoxicidad inducida por HgCl_2 .

Spirulina fusiformis (800 mg/kg) disminuyo la actividad de la fosfatasa alcalina y la fosfatasa acida en testículos y por lo tanto en la toxicidad testicular en ratón por HgCl_2 (Saxena y Kumar, 2004). Utilizando el mismo toxico se demostró el efecto de *Spirulina fusiformis* (200-1200 mg/kg) previniendo el daño oxidativo, manteniendo la concentración de GSH y el grado de lipoperoxidación, aunado a la reducción de calcio y de la fosfatasa ácida, incrementando el fierro y la fosfatasa alcalina (Sharma y cols., 2005; Kumar y cols., 2007). De la misma manera utilizando el extracto de *Spirulina fusiformis* frente a los efectos tóxicos de HgCl_2 se redujo significativamente la toxicidad hepática aumentando la actividad de enzimas antioxidantes: SOD, CAT, GST y el contenido de GSH hepático; disminuyendo por lo tanto la concentración de MDA, la actividad sérica de AST y ALT y las alteraciones histopatológicas (Sharma y cols., 2007). Reportes recientes indican que *Spirulina platensis* (800 mg/kg) atenuó la hepatotoxicidad y la alteración del perfil lipidico a través de su actividad antioxidante al disminuir significativamente la concentración plasmática de enzima hepáticas, colesterol total, triglicéridos, hidroperóxidos (Kumar y cols., 2007; Bashandy y cols., 2011).

El acetato de plomo ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$), se trata de un compuesto altamente toxico y peligroso, es decir, aunque su exposición sea corta y aun recibiendo atención medica podría causarle la muerte. *Spirulina fusiformis* (800 mg/kg) redujo las alteraciones producidas en el peso de los animales y de los testículos, en el diámetro tubular y en la población de los tipos celulares de túbulos seminíferos cuando se administro después del metal (Shastri y cols.,

1999). En otro trabajo (Ponce-Canchihuamán y cols., 2010), *Spirulina máxima* previno la disminución de peso corporal y la afectación hepática regresando a valores normales la actividad de ALT y la concentración plasmática de colesterol y triglicéridos, tanto en hígado como en riñón. La *Spirulina* (300 mg/kg) demostró un efecto protector contra el aumento en el número de mastocitos en los ovarios durante el ciclo estral (Karaca y Simsek, 2007).

Por otro lado al suplementar la dieta con 6% de *Spirulina* produjo la máxima protección al aumentar el consumo de alimento, el crecimiento, la actividad de fosfatasas, los parámetros hematológicos afectados por el cobre; además de incrementar la eliminación del mismo vía heces (James y cols., 2009).

Utilizando otro tóxico, *Spirulina platensis* normalizó la actividad tanto en suero como en el hígado de AST, ALT Y ALP. Asimismo, produjo un incremento importante en el contenido hepático de vitamina A tanto en animales con dieta libre de la vitamina como en los suplementados con hexaclorociclo hexano (Venkataraman y cols., 1994).

En otro estudio, el tetracloruro de carbono, (CCl₄) que es un compuesto químico, cancerígeno y puede ser causa de leucemia linfocítica, tricoleucemia, cirrosis y cáncer de hígado y cáncer de pulmón, se demostró que *Spirulina* protegió de la hepatotoxicidad del tetracloruro de carbono al disminuir la alteración de AST, ALP, proteínas totales, albumina bilirrubina total, así como colesterol (Gad y cols., 2010).

El cadmio (Cd) es un contaminante ambiental acumulativo e industrial que afecta a la mayoría de los órganos de las personas especialmente al hígado. Estudios con *Spirulina* (500mg/kg) frente a los efectos del CdCl₂

previno parcialmente la disminución de la concentración sérica de cobre, zinc, hierro y selenio, así como la hepato y nefrotoxicidad. Además, protegió de la afectación histológica de hígado y riñón, normalizo el contenido de MDA y de GSH (Jeyaprakash y Chinnaswamy, 2005; Amin y cols., 2006). Aunado por lo reportado por Karadeniz y cols., (2008), donde *Spirulina platensis* protegió de la hepatotoxicidad al reducir la degeneración vacuolar severa, la infiltración grasa y la fibrosis ocasionadas por el metal, además disminuyo el MDA y aumento la concentración de GSH, SOD y NO.

Por otro lado con la intoxicación del arsénico, el tratamiento con el extracto de *Spirulina*, aumento drásticamente la excreción urinaria del metaloide (Misbahuddin y cols., 2006; Saha y cols., 2010). Así mismo, el alga redujo la alteración de parámetros hematológicos como la cuenta eritrocitaria total, el contenido de hemoglobina, la tasa de sedimentación eritrocitaria y el volumen del paquete celular (Islam y cols., 2010).

Estos trabajos sugieren que el alga *Spirulina* podría desempeñar un papel en la reducción y prevención de los efectos tóxicos de diversos contaminantes ambientales y laborales, debido a sus propiedades antioxidantes.

Además de su alto valor nutritivo, la *Spirulina* y sus extractos han demostrado tener diversas propiedades farmacológicas in vitro y/o in vivo, con posibles utilidades terapéuticas (Karkos y cols., 2011).

Muchas de estas propiedades están relacionadas principalmente con su capacidad antioxidante (Kim y cols., 2010; Thakur y Sravanthi, 2010; Ponce Canchihuman y cols., 2010; Chu y cols., 2010; Viswanadha y cols., 2011;

Golechha y cols., 2001; Kalafati y cols., 2009). Existen varios estudios donde reportan que la *Spirulina* tiene gran variedad de antioxidantes que han demostrado su efecto individualmente y por sinergismo, tales como compuestos fenólicos, tocoferol, beta-caroteno, flavonoides, ficobiliproteínas, provitamina a (beta-caroteno), la superóxido dismutasa (SOD), vitamina C y E, minerales (Upasani y cols., 2001).

También, se ha reportado que la *Spirulina* tiene propiedades antialérgicas (Cingi y cols., 2008), antibacterianas (Ozdemir y cols., 2004), anticarcinogénicas (Ismail y cols., 2009), anti-coagulantes (Majdoub y cols., 2009), antígenotóxico (Chamorro y cols., 2007), anti-hipertensiva (Juárez-Oropeza y cols., 2009), antiteratogénico (Paniagua-Castro y cols., 2011), anti-inflamatorio (Dartch, 2008), antinefrotóxico (Sharma y cols., 2007), antiviral (Hayashi y cols., 1996; Barrón y cols., 2008; Hernández-Corona, 2002), hipolipidémico (Torres-Durrán y cols., 2007; Cheong y cols., 2010; Kim y cols., 2010), inmunomoduladora (Selmi y cols., 2011), vasorelajante (Mascher y cols., 2006), hipocolesterolemiaante (Cheong y cols., 2010). Además, se ha reportado que la *Spirulina* participa de manera especial en el mantenimiento de la estructura y función del SNC (Bachstetter y cols., 2010; Stromberg y cols., 2005; Thaakur y Sravanti 2010; Wang y cols., 2005; Chamorro y cols., 2006).

Se ha demostrado la actividad de la *Spirulina* como un potente atrapador de radicales libres, además de inhibir la peroxidación microsomal de lípidos, actividad relacionada con su elevado contenido de moléculas con propiedades antioxidantes (Colla y cols., 2007). Entre estas moléculas, la ficocianina (ficobiliproteína más abundante) (Yoshida y cols., 1996), es una proteína

conjugada (Wang y cols., 2001), que se ha identificado como responsable de la actividad antioxidante de la *Spirulina* (Bermejo y cols., 2008).

La ficocianina consta de 3 grupos cromógenos (tetrapirroles lineales) por unidad monomérica, que poseen una estructura muy similar a la de la bilirrubina, reconocido antioxidante endógeno (Berns y Mac Coll, 1989). Es una ficobiliproteína soluble en agua, que contiene un grupo cromóforo tetrapirrólico conocido como ficocianobilina, que se encuentra covalentemente unida a la apoproteína. Se ha reportado que la ficocianina es un potente atrapador de radicales libres (radicales hidroxilo y peróxilo) por lo que inhibe la lipoperoxidación microsomal (Romay y cols., 2001).

Estudios de la ficocianina reportaron sus efectos antioxidantes, antiinflamatorios (Darth, 2008), hepatoprotectores y neuroprotectores (Benedetti y cols., 2004). En relación a esta última actividad, se demostró que la C-ficocianina disminuyó la incidencia de cambios neuroconductuales en rata, así mismo, mostró efectos neuroprotectores en cultivos de células en rata, en las que se produjo daño en el cerebro por la administración de ácido kaínico (Rimbau y cols., 1999).

1.5.2 Spirulina y neurodegeneración

Numerosas enfermedades neurológicas comparten una característica patológica fundamental, como es la serie de reacciones inflamatorias atípicas. La neuroinflamación puede ser tanto causa como consecuencia del estrés oxidativo crónico (Elejalde- Guerra, 2001; Gilgu-Sherki y cols., 2001).

Se ha demostrado recientemente el efecto protector de antioxidantes, como componentes dietarios (Burtin, 2003; Duffy y cols., 2008), capaces de

modificar la expresión de citocinas que están relacionadas con la regulación del mecanismo de la inflamación (Vila y cols., 2006). Entre estos estudios se encuentra el efecto de dietas enriquecidas con *Spirulina*, las cuales invirtieron totalmente la sobreexpresión de citocinas proinflamatorias observadas en cerebro de ratas adultas. Así mismo, disminuyeron los niveles de malondialdehído, un marcador del daño oxidativo (Cartford y cols., 2002; Gemma y cols., 2002), además de la disminución en la inflamación sistémica del hipocampo (Bachstetter y cols., 2010) y la regulación del sistema de dopamina en el sistema nigro-estriatal (Stromberg y cols., 2005).

Aunado a estas investigaciones, Wang y colaboradores (2005) demostraron que el tratamiento con dietas enriquecidas con *Spirulina* redujeron los cambios neurodegenerativos en animales envejecidos.

También, se ha reportado que la administración de *Spirulina* en roedores disminuyendo significativamente la discinesia tardía inducida por haloperidol, así como la atenuación en la lesión cerebral por isquemia (Thaakur y Jyothi, 2007; Thaakur y Sravanti, 2010), la reducción de estrés oxidativo en animales (Vadiraja y cols., 2001). Además esta alga parcialmente mejoro los principales daños de la enfermedad de Parkinson inducido por 1-metil-4-fenil-1, 2,3,6 tetrahidropiridina en ratones (Chamorro y cols., 2006).

El presente trabajo se enfoca a estudiar los efectos de la *Spirulina* en relación con la neurotoxicidad producida por el del ácido kaínico utilizando diferentes pruebas de comportamiento y determinando si este efecto está relacionado con su actividad antioxidante.

2. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades neurodegenerativas son patologías muy complejas que tienen como característica común el carácter progresivo de los síntomas y la degeneración paulatina de una parte o partes del sistema nervioso que desemboca en incapacidad física y psíquica.

Los estudios sobre la *Spirulina* indican que la ingesta de esta microalga desempeña una función importante en el balance nutritivo, participan de manera especial en el mantenimiento de la estructura y función normal del sistema nervioso, por lo que se sugiere un posible efecto favorable del alga en trastornos neurodegenerativos de origen diverso. Sin embargo, a pesar de las evidencias teóricas en favor del empleo de la *Spirulina* como agente neuroprotector, no permiten definir su posible participación en la protección del daño neuronal. Así, es importante utilizar modelos experimentales cuyos resultados pueden contribuir a esclarecer algunos aspectos de su capacidad neuroprotectora. Por tal motivo y dada la dificultad para encontrar tratamientos naturales efectivos frente a las enfermedades neurodegenerativas, es necesario esclarecer el efecto neuroprotector de la *Spirulina* frente a la neurotoxicidad producida por el ácido kaínico en ratón.

3. HIPÓTESIS

Las ficobiliproteínas de *Spirulina* protegerán contra los efectos neurotóxicos causados por el ácido kaínico en el hipocampo de ratón.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la capacidad protectora de la *Spirulina* contra los efectos neurotóxicos del ácido kaínico en el sistema nervioso central del ratón.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer el efecto neuroprotector de la *Spirulina* utilizando pruebas conductuales.
- Determinar si la lipoperoxidación en el hipocampo inducida por ácido kaínico puede disminuirse por la administración de *Spirulina*.
- Analizar la actividad de la SOD en hipocampo
- Evaluar el efecto de la *Spirulina* como agente protector contra el daño neuronal provocado por el ácido kaínico en el hipocampo del ratón.

5. METODOLOGÍA

Todos los procedimientos experimentales y protocolos utilizados en este estudio fueron realizados conforme a los principios éticos y las normas especificadas por el Cuidado Animal y del Comité de Bioética de nuestra Institución y con base a la norma NOM-082-Z00-1999 para el manejo de animales de laboratorio.

Para la realización de este experimento se emplearon ratones machos SW (25-30 g), los cuales fueron mantenidos en locales apartados de ruido, con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas cada uno (8:00 a.m. a 8: p.m. horas/luz) con una temperatura de 24 ± 2 °C, humedad relativa del 50%, así mismo, se les ofreció alimento y agua *ad libitum*.

Los animales fueron asignados aleatoriamente en seis grupos de seis animales cada uno de la siguiente manera:

Grupos	Tratamiento (mg/kg peso corporal)
1	Testigo salina
2	<i>Spirulina</i> (800 mg/kg)
3	Ácido kaínico (35 mg/kg)
4	<i>Spirulina</i> 200 mg/kg + ácido kaínico
5	<i>Spirulina</i> 400 mg/kg + ácido kaínico
6	<i>Spirulina</i> 800 mg/kg + ácido kaínico

La *Spirulina* (Andes *Spirulina*, Quito, Ecuador) fue administrada por vía oral (vo) y el ácido kaínico (KA; Sigma, St. Louis, MO, USA) por vía intraperitoneal (ip) al día 14.

El grupo 1 designado como el testigo negativo el cual recibió solución salina (10 mL/kg, de ratón), el grupo 2 fue administrado con *Spirulina* (800 mg/kg, diariamente una vez al día) durante 24 días, los grupos 3-6 fueron administrados con *Spirulina* a las dosis de 200, 400 y 800 mg/kg, una vez al día, durante 14 días antes y 10 días después de la administración de ácido kaínico (35 mg/kg, ip). Al final de este tratamiento se evaluó el comportamiento.

5.1 Evaluación del efecto de la Spirulina sobre el sistema nervioso central

La actividad de la *Spirulina* en el SNC se realizó evaluando sus efectos sobre: la coordinación motora, la memoria espacial, la actividad analgésica, la ansiedad y el estrés. Además, se determinó en el hipocampo la peroxidación lipídica y la actividad antioxidante de la SOD.

Administración del ácido kaínico.

Las dosis de ácido kaínico utilizada fue de 35 mg/kg, administrada vía ip y solución salina en el caso del grupo testigo.

Después de un periodo de 24 horas se evaluó la sobrevivencia. A los 10 días se sometieron todos los grupos a las pruebas conductuales:

Efectos sobre la coordinación motora.

La coordinación motora fue determinada por el método de Boissier's y cols., (1972). Los animales se colocaron en un rodillo giratorio (Rotamex-Columbia) y fueron entrenados por 5 días, posteriormente se realizó la prueba.

Los ratones se colocaron en una barra horizontal (diámetro de 3 centímetros) con una superficie antideslizante, se utilizó una velocidad de 15

RPM y el estado latente a caer fue medido hasta por 2 min. Se registró el tiempo que los animales permanecieron sin caerse.

Memoria espacial: laberinto acuático de Morris

Esta prueba de navegación espacial fue utilizada para determinar la capacidad memoria de los animales (Morris, 1984). Se utilizó una tina circular de plástico de 73 cm de diámetro, llena de agua hasta una profundidad de 56 cm. El agua se mantuvo a 27 ± 2 ° C. La tina se dividió conceptualmente en cuatro cuadrantes y una plataforma (6 X6 cm) se colocó a 1 cm por debajo de la superficie del agua en el centro de uno de los cuatro cuadrantes. Los ratones fueron colocados individualmente en uno de los cuatro cuadrantes, con la cara hacia la pared de la tina.

Los ratones fueron entrenados con 4 ensayos por día durante 5 días (a intervalos de 1 min). La tina se fijó en la misma posición en la habitación, debido a la capacidad del animal para localizar la plataforma utilizando referencias visibles alrededor de la tina. Se registró la latencia, definida como el tiempo desde la liberación del ratón hasta el momento en el que el animal sube a la plataforma. Se considera que un animal ha encontrado la plataforma cuando permanece en ella por 5 segundos.

Actividad analgésica: prueba de la placa caliente.

La antinocicepción fue determinada por la prueba de la placa caliente (LSI Letica 7406). La temperatura de la placa se mantuvo a 56 °C. Los ratones fueron colocados individualmente en la placa caliente y se registró la latencia para lamer las extremidades posteriores. Esta prueba fue realizada 30 y 60 minutos después de la administración de *Spirulina*.

Ansiedad: prueba de laberinto en cruz elevado.

La ansiedad se evaluó mediante el laberinto elevado en cruz para ratones (Lister, 1987). Este laberinto consta de dos brazos abiertos (30 x 5 cm) y dos brazos cerrados (30 x 5 x 25 cm) en posición perpendicular que se extiende desde una plataforma central (5 x 5 cm) y una elevación de 45 cm del suelo. El animal fue colocado en el centro del laberinto. El comportamiento del ratón se observó durante 5 min. Se registro el tiempo de permanencia en los brazos abiertos.

Estrés: prueba de nado forzado.

La prueba de nado forzado incluye dos exposiciones en un tanque de agua, con una separación de 1 día. Se colocó individualmente a cada ratón en un cilindro de plástico (diámetro de 22 cm, altura de 40 cm) el agua se encontraba a una altura de 20 cm. La temperatura del agua se mantuvo a 25 °C. En el primer día de la prueba, los animales se ven obligados a nadar durante 15 minutos. El día 2 (período de prueba), los animales fueron obligados a nadar durante 5 minutos. Se registró el tiempo de inmovilidad de los ratones. El ratón fue considerado como inmóvil cuando dejó de intentar para escapar y permaneció flotando en el agua, manteniendo su cabeza fuera del agua.

5.2 Análisis de lipoperoxidación

La peroxidación lipídica se evaluó midiendo el contenido de malondialdehído (MDA), de acuerdo con Calderón y cols., (2007), con modificaciones menores. El hipocampo se homogeneizó en 0,5 mL de buffer de fosfato (pH 7.0). A una

alícuota de este homogeneizado se añadió 1 mL de reactivo de ácido tiobarbitúrico (el 16% (w/v) TCA - 0,5% (w/v) de TBA - 0.7N HCl) y la solución se calentó durante 30 minutos en un baño de agua hirviendo. Después se enfrió, para ser separado por centrifugación a 1000 g durante 10 minutos. La absorbancia de la muestra se determinó en un espectrofotómetro (Shimadzu) a 532 nm frente a un blanco de reactivos. El contenido de MDA en la muestra fue calculado usando un coeficiente de extinción de $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. El contenido de proteína de las muestras se determinó por el método de Bradford (1976), usando como estándar albúmina sérica bovina (BSA). Y se registra como mg/proteína.

5.3 Actividad de la SOD

La actividad de la SOD (CuZn-SOD más Mn SOD) se determinó con base en la inhibición de la autoxidación de la adrenalina (30 mM Sigma Chem Co.) por la SOD en buffer de carbonatos (50 mM Na_2HCO_3 , 0.1 mM EDTA, pH 10.2) a 480 nm (Misra y Fridovich, 1972). La absorbancia de la muestra fue determinada a los 5 y 30 minutos con un espectrofotómetro (Shimadzu). La actividad de la SOD se calculó utilizando una curva estándar obtenida de la actividad de 2.19 a 13.39 U de SOD pura de bovino (Sigma Chem Co.). Los resultados se expresaron como U SOD/mg de proteína.

5.4 Análisis histológico

Para realizar el análisis morfológico de las neuronas constituyentes en el área CA3 del hipocampo, 10 días después de la administración del ácido kaínico, los animales se sacrificaron por perfusión cardiaca, con el objetivo de obtener y

fijar los encéfalos, que fueron almacenados en paraformaldehído al 4% hasta su análisis. Una vez fijado el tejido, se utilizó la técnica histológica de inclusión de parafina, posteriormente, con un micrótopo rotatorio se obtuvieron cortes transversales de 7 micras de la región hipocámpal de cada cerebro procesado, los cortes fueron procesados para su tinción con la técnica de azul de toluidina. Se determinó a las neuronas en estado atrófico como aquellas células que presentaron una disminución en el volumen celular, hipercromasia del citoplasma y del núcleo, y ausencia de nucléolo. Se realizó la cuenta de las células del hipocampo con micrómetros objetivo y ocular, existentes en un área $10000\mu\text{m}^2$.

5.4 Análisis estadístico

Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar de la media. Los datos paramétricos se analizaron con la prueba de análisis de varianza (ANOVA), seguido por la prueba de Tukey's *post hoc*. Para la prueba de placa caliente y la parte histológica, se realizó una prueba de análisis de varianza bifactorial, seguidas de la prueba de Tukey's *post hoc*. En todos los casos los datos se procesaron en el software Sigma Stat ver. 2.07, se consideró una $p < 0,05$ para establecer diferencia significativa.

6. RESULTADOS

La administración sistémica de ácido kaínico produjo efectos en el comportamiento, incluyendo sacudidas de "perro mojado", que progresaron a convulsiones generalizadas tónico-clónicas. La mortalidad fue del 60% para el grupo que recibió sólo ácido kaínico (grupo 3), similar al grupo que fue administrado con *Spirulina* a una dosis de 200 mg/kg (grupo 4), mientras que la muerte se redujo un 20% para los grupos tratados con ácido kaínico más *Spirulina* a una dosis de 400 y 800 mg/kg (grupos 5 y 6 respectivamente).

El ácido kaínico provocó falta de coordinación motora en la prueba de rodillo giratorio, mientras que el grupo de 800 mg/kg de *Spirulina* no mostró ninguna alteración. El tratamiento con *Spirulina* en dosis de 200, 400 y 800 mg/kg evitó los efectos neurotóxicos inducidos por ácido kaínico (figura 4).

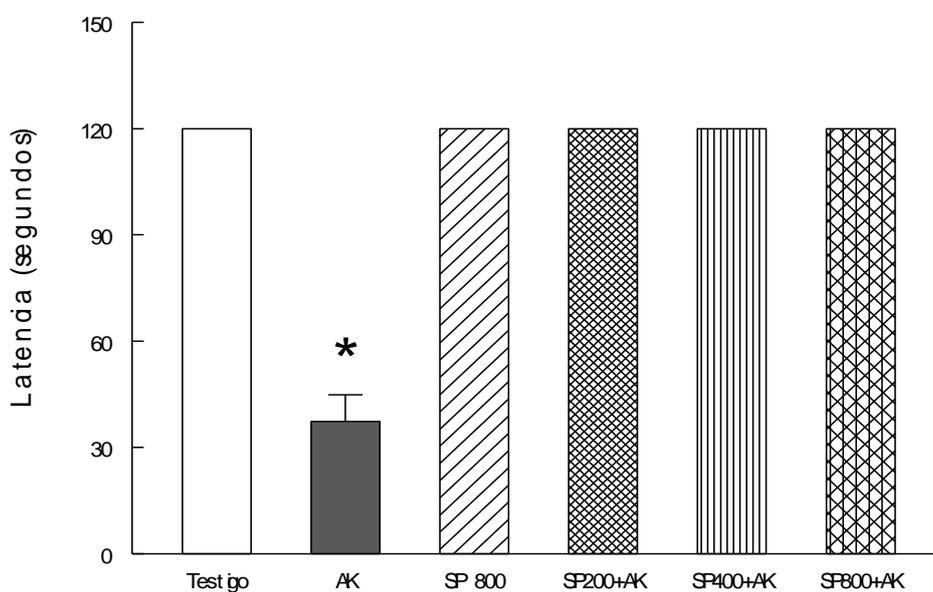


Figura 4. Efecto de la *Spirulina* frente al daño inducido por el ácido kaínico sobre la coordinación motora en la prueba de rota-rod. Tiempo de latencia de caída para cada grupo experimental. La *Spirulina* se administró durante 24 días. El ácido kaínico fue administrado 10

días antes de la prueba. Cada barra representa la media \pm SEM (n = 6). *: p <0.05 vs grupo testigo.

El daño de las neuronas piramidales del hipocampo inducido por el ácido kaínico deterioró la memoria espacial, como se observa en la figura 2. El tratamiento previo con *Spirulina* en las tres dosis empleadas previno dicho deterioro (figura 5).

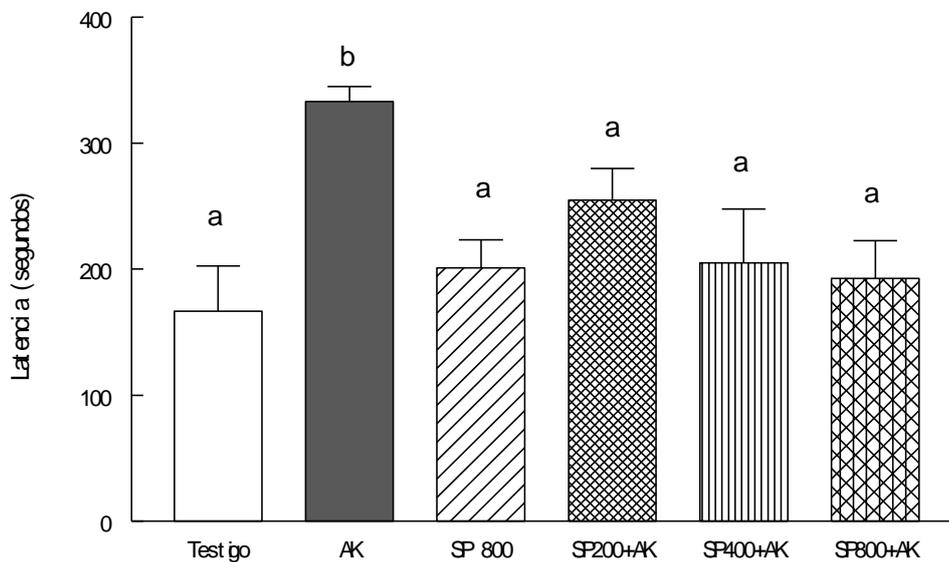


Figura 5. Efectos de la *Spirulina* en la prueba del laberinto acuático de Morris contra el efecto inducido por ácido kaínico. Se registró el tiempo de latencia para llegar a la plataforma para cada grupo experimental. La *Spirulina* se administró durante 24 días. El ácido kaínico fue administrado 10 días antes de la prueba. Cada barra representa la media \pm SEM (n = 6), y las diferentes letras muestran diferencia significativa (p <0,05).

En la prueba de la placa caliente, la administración de *Spirulina* por sí sola no produjo ningún efecto significativo en los dos tiempos registrados. Sin embargo, los ratones tratados con *Spirulina* en dosis de 400 mg/kg más ácido

kaínico mostraron un aumento significativo en la latencia a los 30 minutos, mientras que en los ratones tratados con 800 mg/kg más ácido kaínico aumentó la latencia en ambos tiempos con respecto al grupo testigo (figura 6).

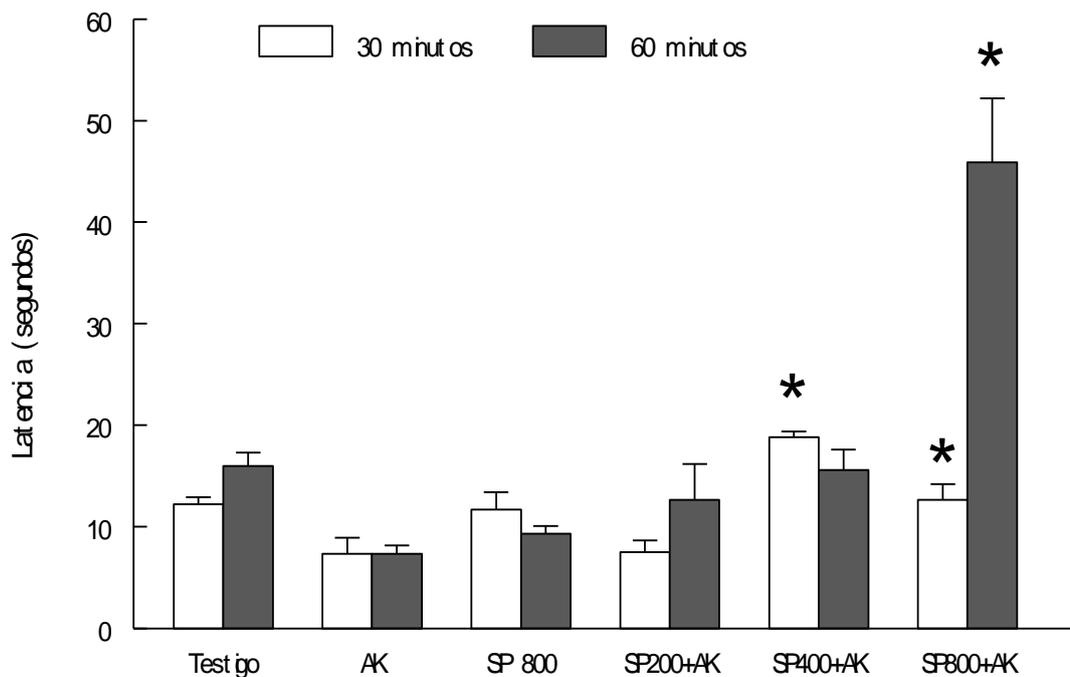


Figura 6. Efectos de la *Spirulina* en la prueba de la placa caliente. El tiempo de latencia fue registrado a los 30 y 60 minutos después de la última administración del *Spirulina*, para cada grupo experimental. La *Spirulina* se administró durante 24 días. El ácido kaínico fue administrado 10 días antes de la prueba. Cada barra representa la media \pm SEM (n = 6). * $p < 0,05$ vs grupo testigo, al mismo tiempo.

Se evaluó la ansiedad mediante la prueba del laberinto de cruz elevado. La administración de ácido kaínico, aumento significativamente el tiempo en que los ratones permanecen en los brazos cerrados, mientras que el tratamiento con *Spirulina* en dosis de 800 mg/kg no indujo ninguna diferencia respecto al grupo testigo (figura 7).

Después del tratamiento con *Spirulina*, los ratones permanecieron menos tiempo en los brazos abiertos con respecto al grupo testigo, pero pasaron más tiempo que el grupo de ácido kaínico (figura 7).

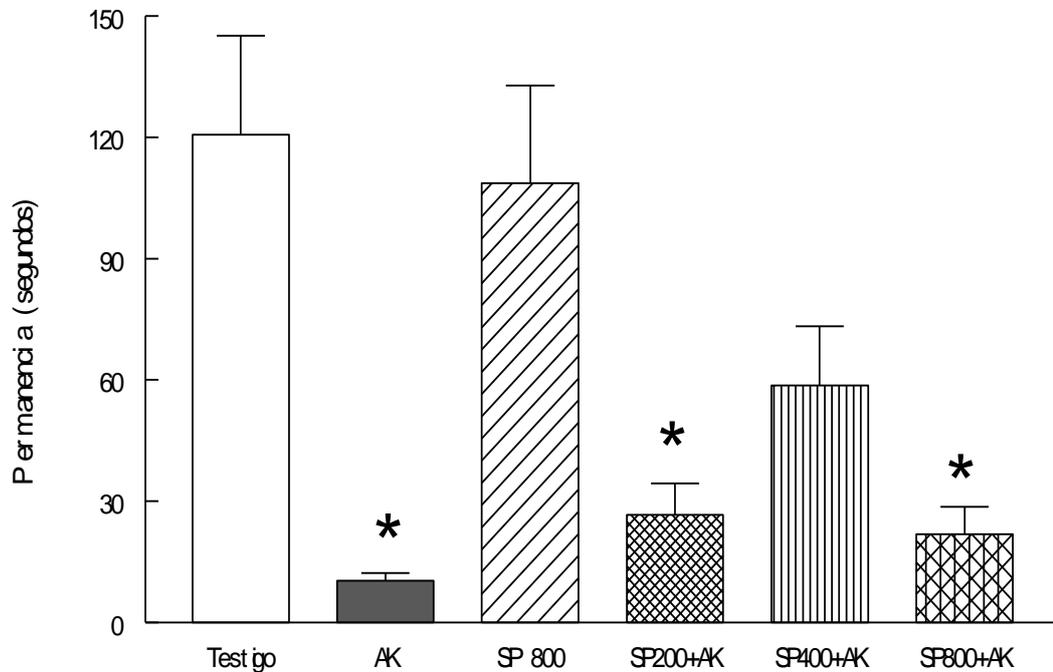


Figura 7. Efecto de la *Spirulina* en la prueba de laberinto en cruz elevado. Se reporta el tiempo que permanecían los ratones en los brazos abiertos. La *Spirulina* se administró durante 24 días. Ácido kaínico fue administrado 10 días antes de la prueba. Cada barra representa la media \pm SEM (n = 6). *: p < 0.05 vs grupo testigo.

La administración de ácido kaínico aumento la duración de la inmovilidad en la prueba de nado forzado. El tratamiento de *Spirulina* por sí sola no afectó la duración de la inmovilidad y el tratamiento de *Spirulina* en las tres dosis no evitó el efecto del ácido kaínico (figura 8).

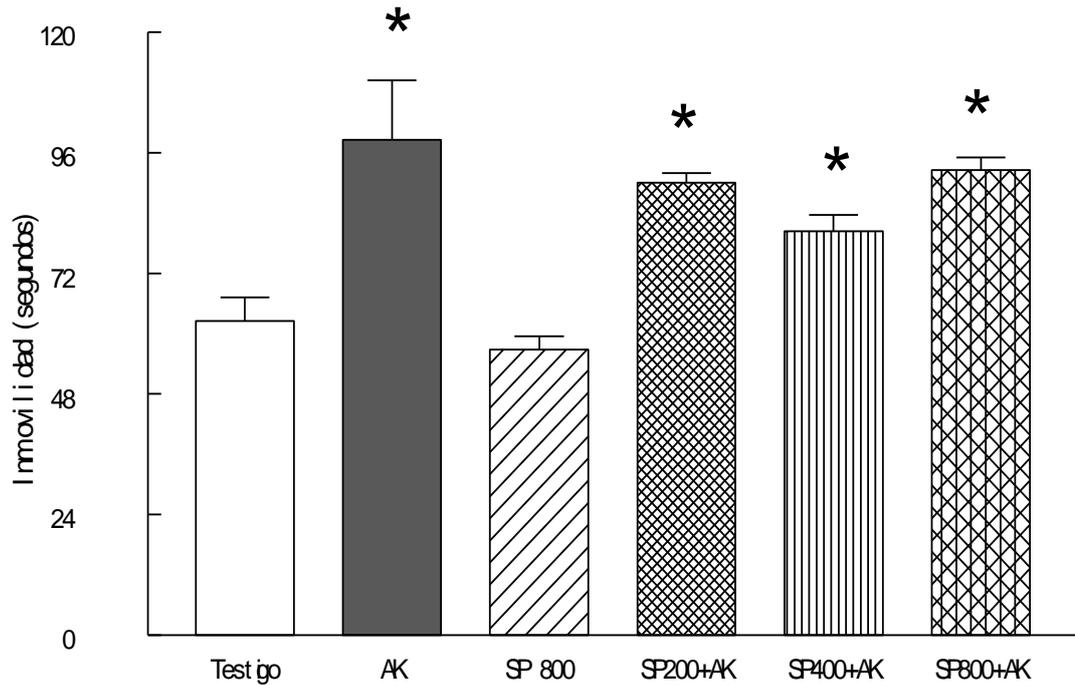


Figura 8. Efectos de la *Spirulina* en la prueba de nado forzado. Se registró el tiempo de inmovilidad para cada grupo experimental. La *Spirulina* se administró durante 24 días. El ácido kaínico fue administrado 10 días antes de la prueba. Cada barra representa la media \pm SEM (n = 6). *: $p < 0.05$ vs grupo testigo.

El contenido de MDA en el hipocampo, se muestra en la figura 9. La peroxidación lipídica se incrementó en el grupo de ácido kaínico en comparación con el grupo testigo, mientras que el tratamiento *Spirulina* en las dosis más altas (400 y 800) redujo la peroxidación lipídica con respecto al grupo de ácido kaínico.

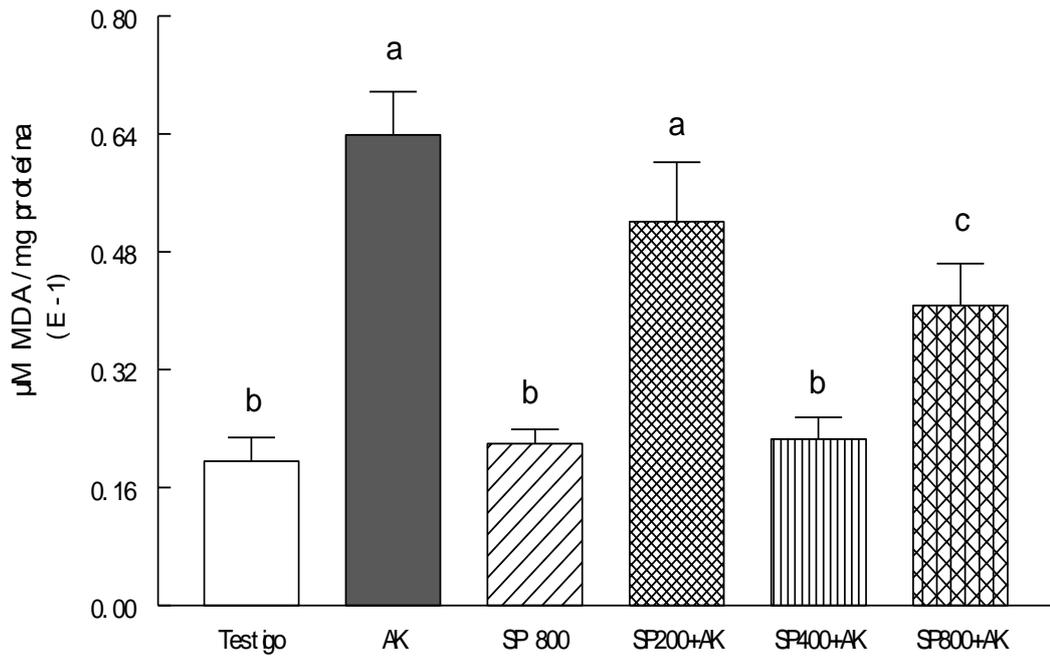


Figura 9. Contenido de MDA en el hipocampo 10 días después de la administración de ácido kaínico en los ratones tratados con *Spirulina* (200, 400 y 800 mg/kg). Los resultados se expresan como media \pm SEM. Diferentes letras representan una diferencia significativa, $p < 0,05$.

Con respecto a la actividad de la SOD en el hipocampo después de la administración de los diferentes tratamientos no muestra diferencia significativa en ningún grupo con respecto al grupo testigo (figura 10).

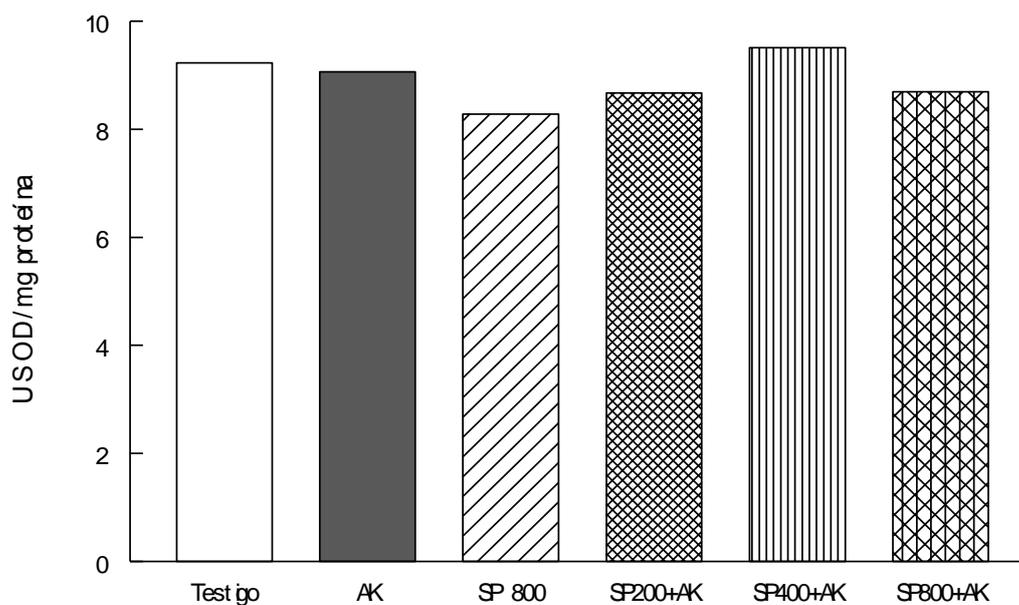


Figura 10. Actividad de SOD en el hipocampo 10 días después de la administración de ácido kaínico en ratones previamente tratados con *Spirulina* (200, 400 y 800 mg/kg). Los resultados se expresan como media \pm SEM.

El contenido neuronal en el hipocampo se muestra en la figura 11. La cantidad de células normales disminuyó significativamente en el grupo de ácido kaínico en comparación con el grupo testigo, mientras que el tratamiento con *Spirulina* en la dosis de 400 y 800 mg/kg aumentó la cantidad de células normales con respecto al grupo de ácido kaínico.

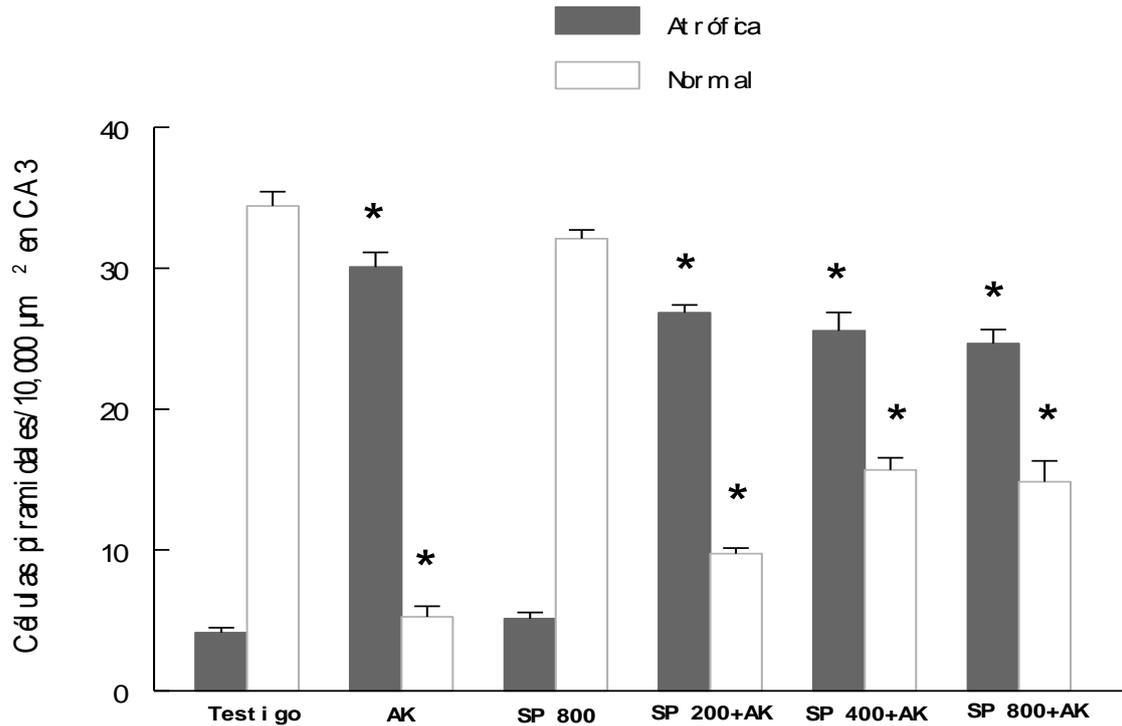


Figura 11. Contenido de células piramidales en el hipocampo, 10 días después de la administración de ácido kaínico en los ratones tratados con *Spirulina*. Los resultados se expresan como media \pm SEM. * representa una diferencia significativa, $p < 0.05$ con respecto al grupo testigo.

En la figura 12, se observa el daño neuronal del grupo de ácido kaínico caracterizado por la presencia de neuronas atróficas, las cuales presentaron alteraciones morfológicas como la reducción del volumen celular, hiper cromasia, el contorno irregular de la membrana nuclear sin evidencia del nucleolo con integridad de la membrana celular

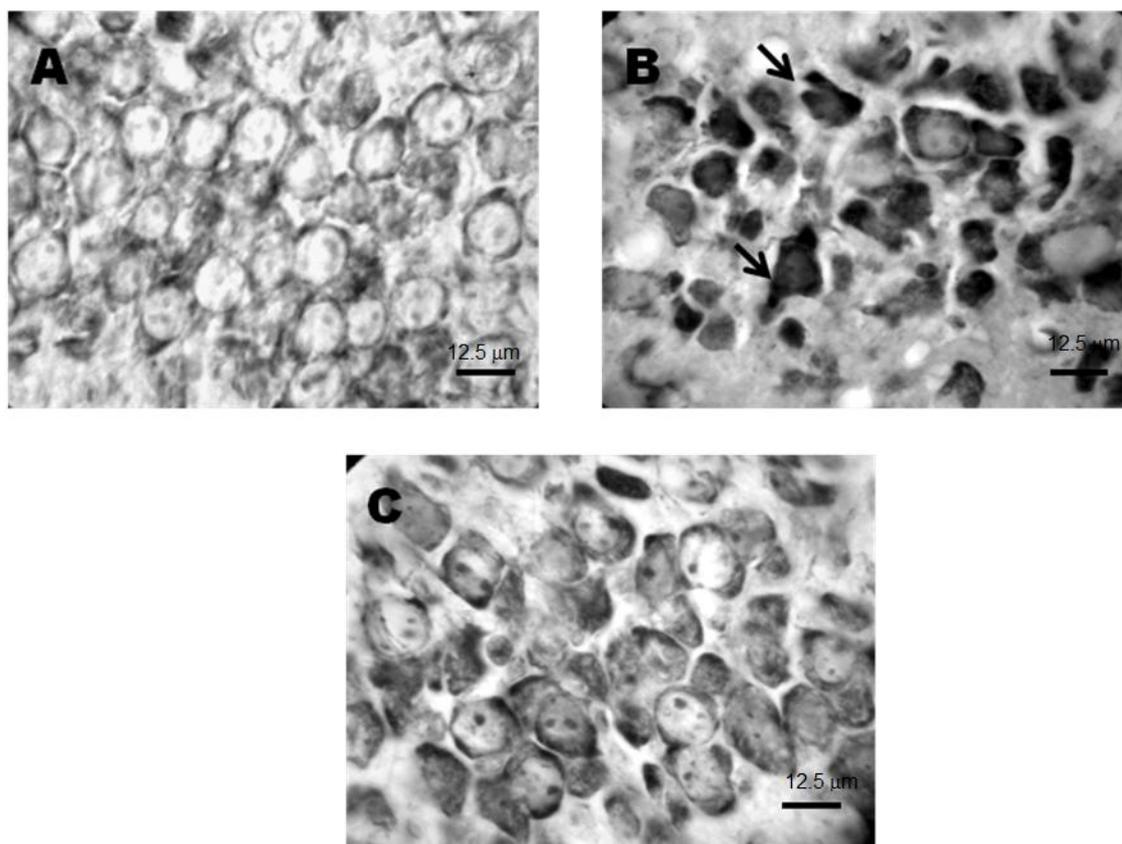


Figura 12. Morfología de las neuronas piramidales del hipocampo en ratones adultos. (A) Fotomicrografía representativa de la capa piramidal de la región CA3 del grupo control tomada al microscopio óptico. (B) Atrofia neuronal inducida por la administración de ácido kaínico (35 mg/kg) ver flechas. (C) Neuronas piramidales del grupo tratado con *Spirulina* (400 mg/kg) + ácido kaínico (35 mg/kg); este último redujo significativamente el daño neuronal.

7. DISCUSIÓN

El estrés oxidativo es un evento que se ha asociado a patologías relacionadas al SNC como la EA, EP, EML, entre otras. Debido a que el cerebro tiene un alto contenido de lípidos y una baja actividad antioxidante, ocasiona que sea un tejido altamente susceptible al estrés oxidativo.

Existe una gran cantidad de evidencias sobre el papel de la excitotoxicidad en lesiones de las células neuronales. Por lo tanto, es muy importante explorar métodos para retrasar o revertir la lesión neuronal excitotóxica.

La excitotoxicidad inducida con ácido kaínico ha sido ampliamente utilizada como una herramienta experimental por sus propiedades neurotóxicas y epileptogénicas, efectos que son producidos debido a su capacidad de unirse y activar un subtipo de receptores ionotrópicos de glutamato, tipo kainato. El ácido kaínico induce una serie de procesos celulares, incluyendo la producción de RL de oxígeno y nitrógeno, que conduce a muerte neuronal. La administración del ácido kaínico por inyección sistémica, daña el hipocampo, principalmente el área CA3, debido a su alta densidad de los receptores kainato (Xiang-Yu y cols., 2011).

En este sentido, ciertos compuestos dietéticos están empezando a recibir mayor atención por sus propiedades antioxidantes, en particular los fitoquímicos, que mitigan los efectos de la excitotoxicidad y daño oxidativo en el hipocampo (Parihar y Hemnani, 2003). Se ha reportado evidencia experimental que el consumo de frutas y hortalizas reduce la neurodegeneración (Bickford y cols., 2000; Galli y cols., 2002; Sweeney y cols., 2002; Wang y cols., 2005;

Youdim y cols., 2000). Sin embargo, el mecanismo por el cual se obtiene este beneficio, aun no se ha establecido.

En este trabajo, se evaluaron las propiedades neuroprotectoras de *Spirulina* contra los daños causados por la administración sistémica de ácido kaínico.

Se han sugerido que las proyecciones de excitación del hipocampo ventral al núcleo accumbens modulan la actividad locomotora en ratones (Whishaw y Mittleman, 1991; Schaub y cols., 1997) debido a la gran inervación dopaminérgica que se encuentran en el núcleo accumbens (Bardgett y Henry, 1999; Wilkinson y cols., 1993; Bardgett y cols., 1995), aunado a las neuronas serotoninérgicas que se proyectan hacia el hipocampo, facilitando el control en la locomoción (Takahashi y cols., 2000).

Diversos estudios han demostrado que el daño por ácido kaínico en el cerebro se asocia con deterioro de la actividad locomotora (Bardgett y cols., 1998). La alteración en la cantidad de dopamina y serotonina en el cerebro conlleva a lesiones tisulares que terminan en la pérdida del control de los movimientos, siendo esto reflejado en el grupo administrado con ácido kaínico, que provocó la falta de coordinación motora, observándose la caída de los animales en la prueba del rotarod.

El tratamiento con *Spirulina* en las tres dosis empleadas en este estudio mostraron un efecto neuroprotector. Aunque no hay evidencia directa sobre los posibles mecanismos neuroprotectores de la *Spirulina*, sin embargo podría estar relacionado sus propiedades antioxidante (Dartsch, 2008). Esta propuesta es coherente con el trabajo de Wang y cols., (2005), quien reportó que tras la administración de dietas enriquecidas con antioxidantes, los animales se

desempeñaron mejor en la prueba de rotación y otros índices de equilibrio y coordinación.

Por otra parte los neurotransmisores juegan un papel primordial en las funciones de aprendizaje y memoria. Sin embargo, de manera paradójica, las estructuras cerebrales que se consideran sustrato anatómico para el aprendizaje y la memoria pueden ser particularmente vulnerables a la acción neurotóxica de los neurotransmisores excitadores (McEntee y Crook, 1993).

Se sabe que el hipocampo está involucrado en eventos que permiten la formación de asociaciones entre los estímulos espaciales y de comportamiento, que juegan un papel fundamental en el aprendizaje y la memoria (Bardgett y cols., 1998). Las lesiones en neuronas del hipocampo involucran ciertas enfermedades como es el caso de la EA, aunado a la vulnerabilidad de estas neuronas a episodios de isquemias y ciertos tipos de epilepsia, debido a la gran expresión de receptores de glutamato, cuya actividad se asocia a cambios en la permeabilidad del Ca^{2+} , que influyen en el rendimiento de diversas tareas de memoria y aprendizaje. El exceso de la actividad de los receptores de glutamato ha formulado la hipótesis de ser un mecanismo que involucra pérdida neuronal (Coyle, 1983; Coyle y Puttfarcken, 1993; Hynd y cols., 2004).

Varios estudios han sugerido que un aumento del estrés oxidativo provoca anomalías induciendo deterioro de la memoria o déficit de concentración que pueden evitarse a través de dietas con un alto contenido de antioxidantes (Kleijnen y Knipschild, 1992).

En el presente estudio, una sola inyección de ácido kaínico (35mg/kg ip) produjo un déficit en la adquisición de memoria espacial, observándose un

aumento en la latencia en la prueba del laberinto acuático de Morris (Brown-Croyts, 2000). La administración de *Spirulina* mejoró la adquisición de la memoria espacial, que una vez se apoya por su efecto antioxidante (Dartsch, 2008). Estos resultados se suman a la literatura que demuestran que el tratamiento con dietas enriquecidas de arándanos, espinacas y/o *Spirulina* aumenta los niveles glutatión del cerebelo, reduce los niveles de MDA, disminuye las citoquinas pro-inflamatorias, mejorando la memoria y el aprendizaje espacial, protegiendo la degeneración neuronal y el deterioro cognitivo mediado por excitotoxicidad y el estrés oxidativo (Joseph y cols., 1999; Duffy y cols., 2008), aunado a la protección contra neurotrauma, como al accidente cerebrovascular (Sweeney y cols., 2002; Wang y cols., 2005).

Cabe mencionar que la ficocianina que inhibe la COX-2 y disminuye las citoquinas pro-inflamatorias, mejorando tanto el aprendizaje espacial como motor en ratas envejecidas (Wang y cols., 2005). Es posible que el efecto protector se deba tanto a la actividad antioxidante como a la anti-inflamatoria.

Por lo anterior, existe la posibilidad que la intervención dietética enriquecida con antioxidantes contribuya como una estrategia eficaz para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

Por otro lado, el dolor crónico neuropático a nivel periférico es el resultado de una actividad anormal en los nervios sensoriales, disfunción que es una manifestación frecuente de las enfermedades neurodegenerativas.

Este enfoque identifica los mecanismos específicos de la mitocondria y del citoesqueleto, previamente implicadas en la fisiopatología de las enfermedades neurodegenerativas del SNC, que podría contribuir a la

disfunción neuropática periférica de las fibras nerviosas sensoriales (Reichling y Levine, 2011).

Se han relacionado a neurotransmisores como el glutamato con la hiperalgesia en los tejidos periféricos, aunque los mecanismos por los cuales el glutamato produce este efecto son aún desconocidos (Jackson y cols., 1995).

Algunos datos indican que el número de receptores ionotrópicos de glutamato, aumentan durante la inflamación, lo que puede ser un factor que contribuye a la sensibilización periférica (Carlton y Coggeshall, 1999). Sin embargo, los presentes resultados no coinciden con esta idea, ya que la administración de ácido kaínico no indujo hiperalgesia.

Respecto a los modelos actuales de la función del hipocampo subrayan su papel en las funciones cognitivas, históricamente también ha sido visto como un mediador neuronal en la emoción. Estudios recientes han demostrado una importante participación del hipocampo en la modulación de la conducta de ansiedad en ratones (Pentkowski y cols., 2006).

Los resultados muestran un efecto ansiogénico por la administración de ácido kaínico, ya que los animales disminuyeron el tiempo empleado en los brazos abiertos en la prueba de laberinto en cruz elevado.

Este resultado puede ser debido al daño del hipocampo inducido por ácido kaínico, provocando una alteración en la concentración de neurotransmisores como es el caso de la serotonina, un componente importante en la modulación de la ansiedad. Los sistemas serotoninérgicos facilitan o atenúan los estados ansiosos, dependiendo del sitio de acción y el subtipo de receptor de la serotonina (Lowry y Hale, 2010).

La administración de *Spirulina* aumentó el tiempo de permanencia en los brazos abiertos, lo que sugiere que protege contra el daño del hipocampo, lo que está en concordancia con las propiedades antioxidantes de la *Spirulina* (Deng y Chow, 2010).

Al considerar los efectos ansiolíticos de la *Spirulina* en la prueba anterior, se decidió investigar el papel de esta alga en un modelo de estrés.

Con este fin, se realizó la prueba de nado forzado, un modelo útil para determinar estado depresivo.

Los resultados muestran que el ácido kaínico aumenta el tiempo de inmovilidad, lo que sugiere un comportamiento depresivo. El tratamiento con *Spirulina*, en todas las dosis empleadas, no bloqueó este comportamiento. Es probable que el comportamiento de ansiedad inducida por ácido kaínico no está relacionado con el daño del hipocampo.

Por otra parte considerando que existe una gran cantidad de evidencia experimental sobre el estrés oxidativo siendo una causal en la neuropatología de los trastornos neurodegenerativos, así mismo, la activación excesiva o persistente de los receptores iónicos de glutamato puede causar la degeneración neuronal en estas mismas condiciones (Coyle y Puttfarcken, 1993).

En este estudio, como se esperaba, el ácido kaínico aumentó significativamente la peroxidación lipídica. Se sabe que el ácido kaínico se une y activa un subtipo del receptor ionotrópico de glutamato y de esta manera induce una lesión cerebral, probablemente por el efecto de excitación y la acción de los radicales libres (Bindokas y cols., 1996).

Informes recientes muestran que el receptor de glutamato-ácido kaínico neuronal induce la liberación del óxido nítrico y el aumento de la actividad de la sintasa del óxido nítrico. Estos efectos pueden proteger contra el daño a través de un aumento en el flujo sanguíneo cerebral durante un ataque. Sin embargo, al aumentar los niveles de NO, el peroxinitrito se produce por la reacción con el ion superóxido, siendo los radicales libres de oxígeno y nitrógeno causantes de daños neuronales (Delen y cols., 2005).

La *Spirulina* empleada en las dos dosis más altas redujo la lipoperoxidación, un resultado que es consistente con otros estudios realizados por nuestro grupo de trabajo (Paniagua-Castro y cols., 2011). Esta actividad antioxidante se atribuye a los componentes de la *Spirulina* principalmente por la presencia de β -caroteno, la vitamina C, E, enzima SOD, el selenio y la ficocianina (Deng y Chow, 2010; Upasani y Balaraman, 2003).

Con respecto a la actividad de la SOD y considerando que se pueden generar en el cerebro ROS por varios mecanismos, como la excitotoxicidad (McCord, 1995), pero tomando en cuenta que el superóxido puede ser metabolizado por la SOD, que está presente tanto en el citosol (isoforma de cobre, zinc) como en las mitocondrias (isoforma de manganeso) (Hussain y cols., 1995). Los resultados aquí encontrados muestran que la administración de *Spirulina* ni del ácido kaínico modifica la actividad de la enzima SOD, sin embargo, no se descarta la posible participación de ambas sustancias sobre su actividad, ya que la SOD podría haber sido mayor por sólo unos días después de la exposición al ácido kaínico. La determinación de su actividad se efectuó diez días después de la exposición al ácido kaínico, y para entonces es probable que tuviera una participación más baja (Salo y cols., 1988).

Thaakur y Sravanthi (2010), reportaron que la *Spirulina* protegió contra el daño causado por la isquemia vascular en ratas. Los autores proponen que el efecto protector se debe a la actividad antioxidante de la *Spirulina*, y atribuye esa actividad al contenido de carotenoides, principalmente β -caroteno que actúa como antioxidante al eliminar los radicales libres, eliminando el oxígeno reactivo, y la cadena de la peroxidación lipídica (como ficocianina). La ficocianina es más potente que el ácido ascórbico como antioxidante, e inhibe los radicales libres como el hidroxilo, peróxido y peroxinitrito, reduciendo el daño celular oxidativo.

Se ha demostrado que las células madre tienen una reducida capacidad de regeneración (Semba y cols., 2005) y son más susceptibles a la oxidación (Ito y cols., 2006) y juegan un importante papel en la patología de diversas enfermedades (Kuhn y cols., 1996; Hattiangady y cols., 2008).

La disminución de las células madre neuronales reduce la capacidad proliferativa aunado a la disminución de los procesos en la neurogénesis principalmente en el envejecimiento, relacionándose con el deterioro cognitivo y con diversas enfermedades neurodegenerativas (Taupin, 2005; Bizon y cols., 2004). Así mismo, el proceso de inflamación en el cerebro, es un inhibidor de la neurogénesis, e incrementa el estrés oxidativo.

Sin embargo, diversos trabajos indican que ciertos nutrientes, como: vitaminas y flavonoides podría tener un papel importante en la proliferación y el mantenimiento de una continua sustitución de las células madre en la sangre, el cerebro y otros tejidos (Douglas y cols., 2010).

Se ha demostrado que la *Spirulina* promueve la neurogénesis en el hipocampo de ratas jóvenes disminuyendo la inflamación (Vila y cols., 2005,

2006). Esta neuroprotección se atribuye a sus componentes antioxidantes como vitaminas, minerales y la ficocianina (Deng y Chow, 2010; Bermejo-Bescós y cols., 2008).

Estos trabajos sustentan los resultados encontrados en el presente trabajo donde se observa diferencias significativas en el número de neuronas atroficas del grupo tratado con *Spirulina* con respecto a los grupos testigo y de ácido kaínico, indicando que esta alga es un alimento con un gran potencial para muchas acciones en el SNC, contrarrestando el daño conductual en ratones dañados con ácido kaínico, además de disminuir el estrés oxidativo y el número de neuronas atroficas en el hipocampo.

Se encontró que el tratamiento con *Spirulina* disminuye el efecto neurotóxico del ácido kaínico probablemente debido a sus propiedades antioxidantes, aunque cabe mencionar que es necesario investigar los efectos de la *Spirulina* sobre la citoarquitectura del hipocampo.

8. CONCLUSIONES

- Las dosis empleadas de *Spirulina*, contrarrestaron el efecto causado por el ácido kaínico en las pruebas neurofarmacológicas de coordinación motora, memoria-aprendizaje y ansiedad.
- La administración de *Spirulina* a 400 mg/kg previene el 87% de protección de lipoperoxidación inducida por el ácido kaínico.
- La actividad de la enzima SOD no mostro alteraciones en ningún grupo con respecto al grupo testigo.
- El tratamiento con *Spirulina* en la dosis de 400 y 800 mg/kg aumento la cantidad de células normales con respecto al grupo de ácido kaínico en hipocampo.

9. BIBLIOGRAFIA

- Ames BN, Bruce N, Mark K, Shigenaga T, Hagen MT. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci* 90; 7915-7922
- Amin , Hamza AA, Daoud S y Hamza W. (2006). Spirulina protects against cadmium-induced hepatotoxicity in rats. *American J Pharmacol Toxicol.* 1:21-25
- Ando N, Morimoto K, Watanabe T, Ninomiya T, Suwaki H. (2004). Enhancement of Central Dopaminergic Activity in the Kainate Model of Temporal Lobe Epilepsy: Implication for the Mechanism of Epileptic. *Psychosis Neuropsychopharmacol* 29: 1251–1258
- Ankarcrona M, Dypbukt MJ, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton AS, Nicotera P. (1995). Glutamate-induced neuronal death: A succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 15: 961-973
- Arkhipov V, Kuleskaja N, Lebedev D. (2007). Perseveration and impairment of long-term memory in rats after intrahippocampal injection of kainic acid in subconvulsive dose. *Pharmacol Biochem Behav* 2: 34-39
- Bachstetter AD, Jernberg J, Schlunk A, Vila JL, Hudson C, Cole MJ, Shytle RD, Tan J, Sanberg PR, Sanberg CD, Borlongan C, Kaneko Y, Tajiri N, Gemma C, Bixkford PC. (2010). SP promotes stem cell genesis and protects against LPS induced declines in neural system cell proliferation. *PLoS One* 5: e10496. doi:10.1371/journal.pone.0010496
- Baran H, Gramer M, Hönack D, Löscher W. (1995). Systemic administration of kainate induces marked increases of endogenous kynurenic acid in various brain regions and plasma of rats. *European J Pharmacol* 286: 167-175
- Bardgett ME y Henry JD. (1999). Locomotor activity and accumbens Fos expression driven by ventral hippocampal stimulation require D1 and D2 receptors. *Neurosci* 94: 59-70

- Bardgett ME, Jackson JL Taylor BM, Csernansky JG. (1998). The effects of kainic acid lesions on locomotor responses to haloperidol and clozapine. *Psychopharmacol (Berl)* 135: 270-278
- Bardgett ME, Jackson JL, Taylor GT, Csernansky JG. (1995). Kainic acid decreases hippocampal neuronal number and increases dopamine receptor binding in the nucleus accumbens: an animal model of schizophrenia. *Behav Brain Res* 70:153–164
- Barron BL, Torres-Valencia JM, Chamorro-Cevallos G, Zuñiga-Estrada A. (2008). Spirulina as a antiviral agent. En *Spirulina in human nutrition and health* Ed. Gershwin, Belay, CRS 227-242.
- Bashandy SA, Alhazza IM, El-Desoky GE y Al-Othman ZA. (2011). Hepatoprotective and hypolipidemic effects of *Spirulina platensis* in rats administered mercuric chloride. *African J Pharmacy Pharmacol* 5: 175-182
- Bausch S, y McNamara JO. (2004). Contributions of Mossy Fiber and CA1 Pyramidal Cell Sprouting to Dentate Granule Cell Hyperexcitability in Kainic Acid–Treated Hippocampal Slice Cultures. *J Neurophysiol* 92: 3582–3595.
- Beckman K y Ames B. (1998).The Free Radical Theory of Aging Matures. *Physiol Rev* 78:547-581.
- Belay A, Kato T, Ota Y. (1996). Spirulina (Arthospira): potential application as an animal feed supplement. *J Appl Phycol*. 8: 303-311
- Belay A, Ota Y, Miyakawa K, Shimamatsu H. (1993). Current knowledge on potential health benefits of Spirulina. *J Appl Phycol* 5: 235-241
- Benedetti S, Benvenuti F, Pagliarani S, Francogli S, Scoglio S, Canestrari F. (2004). Antioxidant properties of a novel phycocyanin extract from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*. *Life Sci* 75: 2353-2362
- Bermejo P, Piñero E, Villar MA. (2008). Iron-chelating ability and antioxidant properties of phycocyanin isolated from a protean extract of *Spirulina platensi*. *Food Chem* 110: 436–445
- Berns D. y MacColl R. (1989). Phycocyanin in physical chemical studies. *Chem Rev* 89: 807-825

- Bickford PC, Gould T, Briederick L, Chadman K, Pollock A, Young D, Shukitt-Hale B, Joseph J. (2000). Antioxidant-rich diets improve cerebellar physiology and motor learning in aged rats. *Brain Res* 866: 211-217
- Bindokas VP, Jordan J, Lee ChC, Miller RJ. (1996). Superoxide Production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *J Neurosci* 16:1324-1336
- Boissier JR, Simon P, Zaczinska M, Fichelle J. (1972). *Therapie VII*, 325-338
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72(1-2): 248-254
- Brown-Croyts L, Caton P, Radecki D, McPherson S. (2000). Phenobarbital pretreatment prevents kainic acid-induced impairments in acquisition learning. *Life Sci* 67:643–650
- Burtin P. (2003). Nutritional Value of Seaweeds. *EJEAF Che* 2:498-503.
- Butterfield A, Pocernich B, Drake J. (2002). Elevated Glutathione as a Therapeutic Strategy in Alzheimer's Disease. *Drug Develop Res* 56: 428-437
- Calderon GD, Bratoeff E, López RGE, Salinas CM, Brizuela ON, Alvarez GR, Garcia HE. (2007). Efecto antioxidante de nuevo esteroide sintético (4-cloro-17 α -acetoxi-4-prenen-3,20-diona) en cerebro de ratas adultas. *Arch Neurocién (Mex)* 12 (2): 95-99
- Candelario-Jalil E, Mhadu NH, Al-Dalain SM, Martínez G, León OS. (2001). Time course of oxidative damage in different brain regions following transient cerebral ischemia in gerbils. *Neurosci Res* 41: 233-241
- Carlton SM y Coggeshall RE. (1999). Inflammation-induced changes in peripheral glutamate receptor populations. *Brain Res* 820: 63-70
- Cartford MC, Gemma C, Bickford PC. (2002). Eighteen-Month-Old Fischer 344 Rats Fed a Spinach-Enriched Diet Show Improved Delay Classical Eyeblink Conditioning and Reduced Expression of Tumor

- Necrosis Factor (TNF) and TNF in the Cerebellum. *J Neurosci* 22: 5813–5816.
- Castro-Sierra E, Ponce de León CF, Gordillo LFD, Rivera AP. (2007a). Neurotransmisores del sistema límbico. Hipocampo, Gaba y memoria. primera parte. *Salud Mental* 30: 7-15
 - Castro-Sierra E, Ponce de León CF, Gordillo LFD, Rivera AP. (2007b). Neurotransmisores del sistema límbico. Hipocampo. Gaba y memoria. segunda parte. *Salud Mental* 30: 47-54
 - Chamorro G, Perez-Albiter M, Serrano-García N, Mares-Sámano JJ, Rojas P. (2006) Spirulina maxima pretreatment partially protects against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity. *Nutritional Neurosci* 6: 207-212
 - Chamorro G, Salazar M, Favila L, Bourges H. (1996). Farmacología y toxicología del alga Spitulina. *Rev Invest Clin.* 48: 389-399
 - Chamorro G, Salazar M, Gómez de Lima K, Pereira C, Ceballos G, Castillo F. (2002). Actualización en al farmacología de Spirulina (Arthrospira), un alimento no convencional. *ALAN* 52:119-125
 - Chamorro-Cevallos G, Garduño-Siciliano L, Barrón BL, Madrigal-Bujaidar E, Cruz-Vega DE, Pages N. (2007). Chemoprotective effect of Spirulina (Arthrospira) against cyclophosphamide-induced in mice. *Food Chem Toxicol* 46: 567-574
 - Cheong SH, Kim MY, Sok DE, Hwang SY, Kim JH, Kim HR, Lee JH, Kim YB, Kim MR. (2010). Spirulina prevents atherosclerosis by reducing hypercholesterolemia in rabbits fed high-cholesterol diet. *J Nutr Sci Vitaminol* 56, 34-40
 - Cheong SH, Kim MY, Sok DE, Hwang SY, Kim JH, Kim HR, Lee JH, Kim YB, Kim MR. (2010). Spirulina prevents atherosclerosis by reducing hypercholesterolemia in rabbits fed high-cholesterol diet. *J Nutr Sci Vitaminol* 56, 34-40
 - Christen Y. (2000). Oxidative stress and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr* 71: 621-629

- Chu WL, Lim YW, Radhakrishnan AK, Lim PE. (2010). Protective effect of extract of *Spirulina platensis* against cell death induced by free radicals. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 21: 10-3
- Cingi C, Conk-Dalay M, Cakli H, Bal C. (2008). The effects of *Spirulina* on allergic rhinitis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 265:1219-1223
- Colla LM, Furlong EB, Vieira CJA. (2007). Antioxidant Properties of *Spirulina* (*Arthospira*) *platensis* Cultivated Under Different Temperatures and Nitrogen Regimes *Brazilian Arch Biol Technol* 50: 161-167
- Cood GA, Bell SG, Brooks WP. (1989). Cyanobacterial toxins in water. *Wat Sci Tech* 21:1-13
- Cood GA. (1995). Cyanobacterial toxins: occurrence, properties and biological significance. *Wat Sci Technol* 32: 149-156
- Coyle JT y Puttfarcken P. (1993). Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Sci* 262: 689–695
- Coyle JT. (1983). Neurotoxic action of kainic acid. *J Neurochem* 41:1–11
- Dartsch P. (2008). Antioxidant potential of selected *Spirulina platensis* preparations. *Phytotherapy Res* 22:627-633
- Delen AY, Yalcin A, Yildirim SE. (2005). The effect of melatonin on lipid peroxidation and nitrite/nitrate levels, and superoxide dismutase and catalase activities in kainic acid-induced injury. *Cell Mol Biol Letters* 10: 321-329
- Deng R y Chow TJ. (2010). Hypolipidemic, antioxidant, and antiinflammatory activities of microalgae *Spirulina*. *Cardiovasc Ther* 28: 33-45
- Dorado MC, Rugerio VC, Rivas AS. (2003). Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Rev Fac Med UNAM* 6: 229-235
- Duffy KB, Spangler LE, Devan DB, Guob Z, Jonna L, Bowker A, Janas A, Hagepanos A, Minor RK, DeCabo R, Moutona PR, Shukitt-Hale B, Joseph J, Ingram KD. (2008). A blueberry-enriched diet provides cellular protection against oxidative stress and reduces a kainate-induced learning impairment in rats *Neurobiol Aging* 29: 1680–1689
- Eisenberg T, Carmona-Gutierrez D, Buttner S, Tavernarakis N, Madeo F. (2010). Necrosis in yeast. *Apoptosis* 15:257–268

- Elejalde-Guerra. (2001). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *An Med (Madrid)* 18: 326-335
- Fink LS y Cookson TP. (2005). Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infection and Immunity* 73: 1907–1916
- Finkel T. (1998). Oxygen radicals and signaling. *Current Opinion in Cell Biology* 10: 248–253
- Gad AS, Khadrawy YA, El-Nekeety AA, Mohamed SR, Hassan NS, Abdel-Wahhab MA. (2011). Antioxidant activity and hepatoprotective effects of whey protein and *Spirulina* in rats. *Nutrition* 27:582-9
- Galli RL, Shukitt-Hale B, Youdim KA, Joseph JA. (2002). Fruit polyphenolics and brain aging: nutritional interventions targeting age-related neuronal and behavioral deficits. *Ann. NY Acad Sci* 959: 128–132
- Gemma C, Michael H, Mesches B, Sepesi K, Choo D, Holmes B, Bickford PC. (2002). Diets Enriched in Foods with High Antioxidant Activity Reverse Age-Induced Decreases in Cerebellar α -Adrenergic Function and Increases in Proinflammatory Cytokines. *J Neurosci* 22: 6114–6120
- Gilgu- Sherki Y, Melamed E, Offen D. (2001). Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacol* 40: 959-975
- Golechha M, Chaudhry U, Bhatia J, Saluja D, Arya DS. (2011). Naringin Protects against Kainic Acid-Induced Status Epilepticus in Rats: Evidence for an Antioxidant, Anti-inflammatory and Neuroprotective Intervention. *Biol Pharma Bull* 34:360-365
- Gotay D y Mederos G. (2006). Estrés oxidativo y muerte neuronal. Una visión biomolecular. *Rev Mex Neuroci* 7: 330-337
- Hernández-Corona A, Nieves I, Meckes M, Chamorro G, Barron BL. (2002). Antiviral activity of *Spirulina maxima* against herpes simplex virus type 2. *Antiviral Res* 56: 279-285
- Hussain W, Sikker W, Ali SF. (1995). Age-related changes in antioxidant enzymes superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and

- glutathione in different regions of mouse brain. *Int J Dev Neurosci* 13:811-817
- Hynd MR, Scott HL, Dodd PR. (2004). Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 45: 583–595
 - Islam MS, Awal MA, Mostofa M, Begum F, Khair A, Myenuddin M. (2009). Effect of *Spirulina* on Toxic Signs, Body Weight and Hematological Parameters in Arsenic Induced Toxicities in Ducks. *Int J Poul Sci* 8: 75-79
 - Ismail MF, Ali DA, Fernando A, Abdraboh ME, Gaur RL, Ibrahim WM, Raj MH, Ouhtit A. (2009). Chemoprevention of rat liver toxicity and carcinogenesis by *Spirulina*. *Int J Biol Sci* 2: 377-387
 - Jackson DL, Graff CB, Richardson JD, Hargreaves KM. (1995). Glutamate participates in the peripheral modulation of thermal hyperalgesia in rats. *Eur J Pharmacol* 284: 321-325
 - James R, Sampath K, Nagarajan R, Vellaisamy P y Manikandan MM. (2009). Effect of dietary *Spirulina* on reduction of copper toxicity and improvement of growth, blood parameters and phosphatases activities in carp, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton, 1822). *Indian J Exper Biol.* 47: 754-759
 - Jeyaprash K y Chinnaswamy P. (2005). Effect of *Spirulina* and Liv-52 on cadmium induced toxicity in albino rats. *Indian J Exp Biol* 43, 773
 - Johnston GAR, Sue ME, Kennedy E, Twitchi B. (1979). Action of the neurotoxin kainic acid on high affinity uptake of L-glutamic acid in rat brain slices. *Joirrnul OJ Nrsrodwniisrri* 32: 121-127
 - Jong-Seon B, Sang-Hyun L, Seong-Ho J, Yong-Soo K, Hee Jae , Sung-Soo, Young-Myeong K, Myong-Jo K, Wanjo C. (2009). Kainic Acid-induced Neuronal Death is Attenuated by Aminoguanidine but Aggravated by L-NAME in Mouse Hippocampus. *Korean J Physiol Pharmacol* 13: 265 –271
 - Joseph JA, Shukitt-Hale B, Denisova NA, Bielinski D, Martin A, McEwen JJ, Bickford PC. (1999). Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive, and motor behavioral deficits with

- blueberry, spinach, or strawberry dietary supplementation. *J Neurosci* 19: 8114-8121
- Juárez-Oropeza MA, Mascher D, Torres-Durán PV, Farias JM, Paredes-Carbajal MC. (2009). Effects of dietary *Spirulina* on vascular reactivity. *J Med Food* 12: 15-20
 - Kalafati M, Jamurtas AZ, Nikoilaidis MG, Paschalis V, Theodorou AA, Sakellariou GK, Koudetakis, Y, Kouretas D. (2010). Ergogenic antioxidant effects of *Spirulina* supplementation in humans. *Med Sci Sports Exerc* 42: 142-151
 - Karaca T, y Simsek, N. (2007). Effects of *Spirulina* on the number of ovary mast cells in lead-induced toxicity in rats. *Phytother Res* 21- 44.
 - Karadeniz Cemek M, Simsek N. (2009). The effects of *Panax ginseng* and *Spirulina platensis* on hepatotoxicity induced by cadmium in rats. *Ecotoxicol Environ Saf.* 72: 231-215
 - Karkos, PD, Leong SC, Karkos CD, Sivaji N, y Assimakopoulos DA. (2011). *Spirulina* in Clinical Practice: Evidence-Based Human Applications. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* Article ID 531053, 1-4
 - Kim MY, Cheong SH, Lee JH, Kim MJ, Sok DE, Kim MR. (2010). *Spirulina* improves antioxidant status by reducing oxidative stress in rabbits fed a high-cholesterol diet. *J Med Food* 13: 420-426
 - Kleijnen J y Knipschild P. (1992). Ginkgo biloba for cerebral insufficiency. *Br J clin Pharmac* 34: 352-358
 - Klionsky JD y Emr DS. (2000). Autophagy as a Regulated Pathway of Cellular Degradation. *Sci* 290: 1717-1721
 - Krick, R, Muehe Y, Prick T, Bremer S, Schlotterhose P, Eskelinen EL, Millen DS, Goldfarb J, Thumm M. (2008). Piecemeal Microautophagy of the Nucleus Requires the Core Macroautophagy Genes. *Mol Biol Cell* 19: 4492–4505
 - Kroemer GL, Galluzzi P, Vandenabeele J, Abrams ES, Alnemri EH, Baehrecke MV, Blagosklonny WS, El-Deiry P, Golstein DR, Green M,

- Hengartner RA, Knight S, Kumar SA, Lipton W, Malorni G, Nuñez ME, Peter J, Tschopp J, Yuan M, Piacentini B, Zhivotovsky G, y Melino T. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation* 16: 3–11
- Kumar M, Sharma KM y Kumar A. (2005). *Spirulina fusiformis*: A food supplement against Mercury Induced Hepatic Toxicity. *J Health Sci* 51: 424-430
 - Kumar M, Samarth R, Kumar Madhu, Selvan RS, Saharan B y Kumar A. (2007). Protective Effect of *Adhatoda vasica* Ness Against Radiation-Induced Damage at Cellular, Biochemical and Chromosomal Levels in Swiss Albino Mice *Ecam* 4: 343-350
 - Lassmann H. (2011). Mechanisms of neurodegeneration shared between multiple sclerosis and Alzheimer's disease. *J Neural Transm* DOI 10.1007/s00702-011-0607-8
 - Levine B y Kroeme G. (2008). Autophagy in the Pathogenesis of Disease *Cell* 132: 27-42
 - Lin MT y Beal MF. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443:787-789
 - Lipton P. (1999). Ischemic Cell Death in Brain Neurons *Physiological Reviews* 79: 1431-1568
 - Lister RG. (1987). The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacol* 92: 180-185
 - Lowry AC, y Hale WM. (2010). Serotonin and the Neurobiology of Anxious States. *Handbook of Behavioral Neuroscience* 21: 379-397
 - Majdoub H, Mansour MB, Chaubet F, Roudesli MS, Maaroufi RM. (2009). Anticoagulant activity of a sulfated polysaccharide from the green alga *Arthrospira platensis*. *Biochim Biophys Acta* 1790:1377-1381
 - Mandel S y Youdim M. (2004). Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. *Free Radical Biol Med* 37: 304-317
 - Mascher D, Paredes-Carbajal C, Torres-Durán PV, Zamora-Gonzalez J, Días-Zagoya JC, Juárez-Oropeza MA. (2006). Ethanolic extract of

- spirulina máxima alters the vasomotor reactivity of aortic rings from obese rats. Arch Med Res 37: 50-57
- Mayeux R. (2003). Epidemiology of neurodegeneration. Annu. Rev. Neurosci 26: 81–104
 - McCord JM. (1995). Superoxide radical: controversies, contradiction and paradoxes. Proc Soc Exp Biol Med 209:112-117
 - McCord N JM. (2000).The Evolution of Free Radicals and Oxidative Stress The American J Med 108: 652-659
 - McEntee JM y Crook HT. (1993). Glutamate: its role in learning, memory, and the aging brain. Psychopharmacol 111: 391-401
 - Meldrum BS. (2000). Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. J Nutr. 130: 1007-1015
 - Meyer JS, Terayama Y, Konno S, Akiyama H, Margishvili GM, Mortel KF. (1998). Risk factors for cerebral degenerative changes and dementia. Euro Neurol 39: 7-16
 - Misbahuddin M, Islam AZM, Khandker S, Al-Mahmud I, Islam N, Anjumanara. (2006). Efficacy of *Spirulina* extract plus zinc in patients of chronic arsenic poisoning: a randomized placebo-controlled study, Clin. Toxicol 44 135-141
 - Misra PH y Fridovich I. (1972).The role of Superoxide Anion in the Autoxidation of Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase. J Biol Chem 247: 3170-3175
 - Morris RGM. (1984). Development of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. J Neurosci Met 11: 47-60
 - Navarrete E, Prospero O, Hudson R, Guevara R. (2000). Enfermedades neurodegenerativas que cursan con demencia. Gac Med Mex. 136: 189-200
 - Olney WJ. (1969). Brain Lesions, Obesity, and Other Disturbances in Mice Treated with Monosodium Glutamate. Sci 3880: 719-721
 - Ozdemir G, Karabay NU, Dalay MC, Pazarbasi B. (2004). Antibacterial activity of volatile component and various extracts of *Spirulina platensis*. Phytother Res 18: 754

- Paniagua-Castro N, Escalona-Cardoso G, Hernández-Navarro G, Pérez-Pastén R, Chamorro-Cevallos G. (2011). Spirulina (*Arthrospira*) protects against cadmium-induced teratogenic damage in mice. *J Med Food* 14:398-404
- Parihar MS y Hemnani T. (2003). Phenolic antioxidants attenuate hippocampal neuronal cell damage against kainic acid induced excitotoxicity. *J Biosci* 28: 121-128
- Pentkowski SN, Blanchard DC, Lever C, Litvin Y, Blanchard JR. (2006). Effects of lesions to the dorsal and ventral hippocampus on defensive behaviors in rats. *Eur J Neurosci* 23: 2185–2196
- Pérez AM y Arancibia RS. (2007). Estrés oxidativo y neurodegeneración: ¿causa o consecuencia? *Arch Neurocién (Mex)*. 12: 45-54
- Ponce-Canchihuaman JC, Pérez-Méndez O, Hernández-Muñoz R, Torres-Duran PV, Juárez-Oropeza MA. (2010). Protective effects of *Spirulina maxima* on hyperlipidemia and oxidative stress induced by lead acetate in the liver and kidney. *Lipids Health Ddis* 31: 9-35
- Pong K, Doctrow SR, Tocco G, Baudry M. (1999). EUK-134, a synthetic superoxide dismutase and catalase mimetic, prevents oxidative stress and attenuates kainate-induced neuropathology. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96: 9897-9902
- Proskuryakov S y Konoplyannikov AG. (2003). GABA_A VL, Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp Cell Res* 238: 1-16.
- Racine RJ. (1972). Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroenceph Clin Neurophysiol* 32: 281-294
- Ramírez-Moreno L y Olvera-Ramírez R. (2006). Uso tradicional y actual de spirulina sp. (*arthrospira* sp.). *INCI Caracas* 31: 9-14
- Reichling BD, y Levine DJ. (2011). Pain and Death: Neurodegenerative Disease Mechanisms in the Nociceptor *Ann Neurol* 69:13–21
- Rimbau V, Camins A, Romay C, Gonzalez R, Palla AM. (1999). Protective effects of C-phycoerythrin against kainic acid-induced neuronal damage in rat hippocampus *Neurosci Lett* 276: 75-78

- Rojas LM y Ramírez A MD. (2010). La necrosis, un mecanismo regulado de muerte celular. *Iatreia* 23: 166-177
- Romay C, Ledón N, Gonzalez R. (1999). Phycocianin extract reduces leukotriene B4 levels in arachidonic acid-induced mouse-ear inflammation test. *J Pharm Pharmacol* 51: 641-642
- Romay CH, Armesto J, Ramirez D, Gonzalez R, Ledon N, Garcia I. (1998). Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycoyanin from blue-green algae. *Inflamm Res* 47:36-41
- Saha SK, Misbahuddin M, Khatun R, Mamun IR. (2005). Effect of hexane extract of *Spirulina* in the removal of arsenic from isolated liver tissues of rat. *Meymensingh Med J* 14: 191-195
- Salo DC, Lin RE, Pacifici RE, Davies KJA. (1988). Superoxide dismutase is preferentially degraded by proteolytic system from red blood cells following oxidative modification by hydrogen peroxide. *Free Rad Biol Med* 5:335-339
- Sanon N, Carmant L, Emond M, Congar P, Lacaille JC. (2005). Short-term effects of kainic acid on CA1 hippocampal interneurons differentially vulnerable to excitotoxicity. *Epilepsia* 46:837-48
- Shastri D, Kumar M y Kumar A. (1999). Modulation of lead toxicity by *Spirulina fusiformis*, *Phytother. Res.*, 13, 258
- Saxena PS y Kumar N.(2004). Modulatory potential of *Spirulina fusiformis* on testicular phosphatases in Swiss albino mice against mercury intoxication. *Indian J Exp Biol* 42, 998.
- Schaub CL, Schmelzeis CM y Mittleman G. (1997). The effects of limbic lesions on locomotion and stereotypy elicited by dopamine agonists in the rat. *Behavioural Brain Res* 84:129-143
- Sharma KM, Sharma A, Kumar A y Kumar M. (2007). *Spirulina fusiformis* provides protection against mercuric chloride induced oxidative stress in Swiss albino mice. *Food Chem Toxicol* 45: 2412-2419

- Sharma KM, Sharma A, Kumar A, Kumar M. (2007). Evaluation of protective efficacy of *Spirulina fusiformis* against mercury induced nephrotoxicity in Swiss albino mice. *Food Chem Toxicol* 45: 879-887
- Schwob JE, Fuller T, Price JL, Olney JW. (1980). Widespread patterns of neuronal damage following systemic or intracerebral injections of kainic acid: a histological study. *Neurosci* 5: 991-1014
- Segura T, Galindo MF, Rallo-Gutierrez B, Ceña V, Jordan J. (2003). Dianas farmacológicas en las enfermedades neurodegenerativas. *Rev Neurol* 36: 1047-1057
- Selmi C, Leung PS, Fischer L, German B, Yang CY, Kenny TP, Cysewski GR, Gershwin ME. (2011). The effects of *Spirulina* in anemia and immune function in senior citizens. *Cell Mol. Immunol.* Epub ahead
- Sharma MK, Sharma A, Kumar M, Kumar A. (2007). Evaluation of protective efficacy of *Spirulina fusiformis* against mercury induced nephrotoxicity in Swiss albino mice. *Food Chem Toxicol* 45: 879-887
- Shi H y Liu K. (2007). Cerebral tissue oxygenation and oxidative brain injury during ischemia and reperfusion *Frontiers Biosci* 12: 1318-1328
- Simon JR, Contrera JF, Kuhar MJ. (1976). Binding of 3H Kainic acid an analogue of L glutamate, to brain membranes. *J Neurochem* 26:141-147
- Sok DE, Oh SH, Kim YB, Kang HG, Kim MR. (2005). Links Neuroprotection by extract of *Petasites japonicus* leaves, a traditional vegetable, against oxidative stress in brain of mice challenged with kainic acid. *Eur J Nutr* 45:61-9
- Sperk, G. (1994). Kainic acid seizures in the rat. *Prog. Neurobiol.* 42: 1-32
- Stein JR y Borden CA. (1984). Causative and beneficial algae in human disease conditions. *A rev Phycol* 23: 485-501
- Strömberg I, Gemma C, Vila J, Bickford PC. (2005). Blueberry-and spirulina-enriched diets enhance striatal against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity. *Exp Neurol* 196: 298-307
- Sweeney MI, Kalt W, MacKinnon SL, Ashby J, Gottschall-Pass KT. (2002). Feeding rats diets enriched in lowbush blueberries for six weeks decreases ischemia-induced brain damage. *Nutr Neurosci* 5:427-431

- Sweeney, MI, Kalt, W, MacKinnon SL, Ashby J, Gottschall-Pass KT, (2002). Feeding rats diets enriched in lowbush blueberries for six weeks decreases ischemia-induced brain damage. *Nutr Neurosci* 5: 427–431
- Takahashia H, Takada Y, Nagaia N, Uranoa T, Takadaa A. (2000). Serotonergic neurons projecting to hippocampus activate locomotion. *Brain Res* 869:194-202
- Takeda A, Minami A, Seki Y, Nakajima S, Oku N. (2004). Release of amino acids by zinc in the hippocampus. *Brain Res Bull* 63: 253-257
- Thaakur S y Sravanti R. (2010). Neuroprotective effect of *Spirulina* in cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *J Neurol Transm* 117: 1083-1091
- Thaakur SR y Jyothi B. (2007). Effect of spirulina maxima on the haloperidol induced tardive dyskinesia and oxidative stress in rats. *J Neural Transm* 114: 1217-1225
- Toledo AJ. (2011). Epidemiologia descriptiva y analítica de la enfermedad de Alzheimer. *Alzheimer Real Invest Demenc* 47: 16-23
- Torres-Durán PV, Ferreira-Hermosillo A, Juárez-Oropeza MA. (2007). Antihyperlipemic and antihypertensive effects of *Spirulina maxima* in an open sample of mexican population: a preliminary report. *Lipids Health Dis* doi:10.1186/1476-511X-6-33
- Upasani CD, Balarman R. (2003). Protective effect of *Spirulina* on lead induced deleterious changes in the lipid peroxidation and endogenous antioxidants in rats. *Phytother Res* 17:330-334
- Vadiraja B, Bhat K, Madyastha M. (2001). Scavenging of Peroxynitrite by Phycocyanin and Phycocyanobilin from *Spirulina platensis*: Protection against Oxidative Damage to DNA: *Biochem Biophys Res* 285: 262–266
- Venkataraman LV, Suvarnalatha G, Krishnakumari MK Joseph P. (1994). *Spirulina platensis* as retinol supplement for protection against hexachlorocyclohexane toxicity in rats. *J Food Sci Tech* 31: 430-432
- Vila JL, Gemma C, Hudson C, Cole MJ, Bickford PC. (2006). Effect of long-term spirulina administration on hippocampal neurogenesis in the aged rat. *Society for Neuroscience Abstracts online*.

- Viswanadha VP, Sivan S, Sheno R. (2011). Protective effect of Spirulina against 4-nitroquinoline-1-oxide induced toxicity. *Mol Biol Rep* 38: 309-317
- Wang X, Le-Nong L, Chang WR, Zhang J, Gui L, Guob B, Lianga D. (2001). Structure of C-phycoocyanin from *Spirulina platensis* at 2.2 Å resolution: a novel monoclinic crystal form for phycobiliproteins in phycobilisomes *Acta Cryst* 57: 784-792
- Wang Y, Chang CF, Chen HL, Deng X, Harvey BK, Cadet JL, Bickford PC. (2005). Dietary supplementation with blueberries, spinach or spirulina reduces ischemic brain damage. *Exp Neurol* 193:75–84
- Whishaw IQ y Mittleman G. (1991). Hippocampal modulation of the nucleus accumbens: behavioral evidence from amphetamine-induced activity probes. *Behav Neur Biol* 55:289–306
- Wilkinson LS, Mittleman G, Torres E, Humby T, Hall FS, Robbins TW. (1993). Enhancement of amphetamine-induced locomotor activity and dopamine release in the nucleus accumbens following excitotoxic lesions of the hippocampus. *Behav Brain Res* 55:143–150
- Xiang-Yu Z, Hong-Liang Z, Qi L, Jie Z. (2011). Kainic Acid-Induced Neurodegenerative Model: Potentials and Limitations. *Journal of Biomed Biotech* 2011:1-10
- Yoshida A, Takagaki Y, Nishimune T. (1996). Enzyme immunoassay for phycocyanin as the main component of spirulina color in foods. *Biosci Biotech Biochem* 60: 57-60
- Youdim, KA, Shukitt-Hale B, Martin A, Wang H, Denisova N, Bickford, PC, Joseph JA. (2000). Short-term dietary supplementation of blueberry polyphenolics: beneficial effects on aging brain performance and peripheral tissue function. *Nutr.Neurosci* 3: 383–397