

Efecto de *Spirulina platensis* en la neuropatía axonal inducida por acrilamida en ratones

Effect of *Spirulina platensis* on acrylamide-induced axonal neuropathy in mice

Nora Sánchez Rodríguez^I; Margarita Bu Wong^I; Héctor Manuel Pérez-Saad^{II}; Niurka León Rodríguez^{III}; Jorge Daniel García Salmán^{IV}

^I Máster en Bioenergética y Medicina Natural. Licenciada en Bioquímica. Departamento de Neurología Experimental, Instituto de Neurología y Neurocirugía (INN), Ciudad de La Habana, Cuba.

^{II} Doctor en Ciencias Médicas. Departamento de Neurología Experimental, INN. Ciudad de La Habana, Cuba.

^{III} Licenciada en Farmacia. Empresa Productora y Comercializadora de Microalgas y sus Derivados Genix. Ciudad de La Habana, Cuba.

^{IV} Doctor en Ciencias de la Salud. Centro Nacional de Medicina Tradicional y Natural. Ciudad de La Habana, Cuba.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: *Spirulina platensis* es una microalga verde-azul de alto valor nutricional, la cual ha sido empleada como suplemento dietético. Varios de sus constituyentes ayudan al mantenimiento de la estructura y función de los tejidos nerviosos.

OBJETIVO: determinar el efecto de esta microalga en un modelo de neuropatía axonal inducida por acrilamida, en ratones.

MÉTODOS: el modelo consistió en la administración diaria de 70 mg/kg de acrilamida, por vía subcutánea, durante 3 semanas consecutivas; con la estimación del efecto neurotóxico de este compuesto mediante el registro, en los músculos de la pierna, del potencial de acción muscular compuesto, durante la estimulación supramáxima del nervio ciático. Después de finalizar las inyecciones de acrilamida, *S. platensis* se administró por vía oral, en dosis de 400 mg/kg, durante 5 semanas.

RESULTADOS: al concluir la administración de acrilamida los animales presentaron una disminución estadísticamente significativa de los potenciales, acompañada de signos motores de neuropatía. La administración de *S. platensis* acortó el período recuperativo, lo que se evidenció por un restablecimiento más rápido del valor de

los potenciales, así como por una disminución progresiva de la proporción de animales afectados.

CONCLUSIONES: los resultados demuestran un efecto beneficioso de *S. platensis* en la neuropatía axonal inducida por acrilamida.

Palabras clave: acrilamida, nervio ciático, neuropatía axonal, neuroregeneración, *Spirulina platensis*.

ABSTRACT

INTRODUCTION: *Spirulina platensis* is a green-blue microalga of a high nutritional value, which has been used as dietary supplement. Some of its constituents help in maintenance of structure and function of nerve tissues.

OBJECTIVE: to determine the effect of this microalga on a model of acrylamide-induced axonal neuropathy in mice.

METHODS: model included daily administration of 70 mg/kg of acrylamide (subcutaneous route) during 3 consecutive weeks; with estimation of neurotoxic effect of this compound by means of registry, in leg muscles, of composed muscular action potential, during supramaximal stimulation of sciatic nerve. After injections of acrylamide, *S. platensis* was administered per os, in doses of 400 mg/kg during 5 weeks.

RESULTS: at the end of acrylamide administration animals showed a significance decrease of potentials, accompanied by the motor signs of neuropathy.

Administration of *S. platensis* shortens recovery period, evidenced by a quicker restoration of potential values, as well as by a progressive decrease of affected animals' ratio.

CONCLUSIONS: findings showed a beneficial effect of *S. platensis* on acrylamide-induced axonal neuropathy.

Key words: acrylamide, sciatic nerve, axonal neuropathy, neuroregeneration, *Spirulina platensis*.

INTRODUCCIÓN

Spirulina platensis (*Sp*) es un alga pluricelular, minúscula (microalga), de color verde-azul, que se desarrolla de manera análoga a los vegetales, por medio de la fotosíntesis. Es considerada como una de las fuentes más completas de proteínas, vitaminas, minerales y otros nutrientes. Su nombre proviene del latín *spirulina* que significa espiral pequeña, referida a la forma de su estructura. Su color verde-azul obedece a la clorofila y a la ficocianina, pigmento de color azul.¹ Además de sus propiedades como suplemento nutricional se le han atribuido acciones terapéuticas en un grupo numeroso de enfermedades, como la diabetes mellitus, anemias de diversa etiología, obesidad, depresión inmunológica, etc.²⁻⁴ Llama la atención, sin embargo, la ausencia de reportes sobre su posible utilidad en los desórdenes neuropáticos, a pesar de la presencia en esta de un grupo de constituyentes con reconocida importancia en el mantenimiento de la estructura y función de los tejidos nerviosos, como son las proteínas; ácidos grasos esenciales como el gamma

linolénico; aminoácidos (arginina, cistina, glicina, metionina); vitaminas del complejo B, provitamina A, vitamina E; minerales (zinc, cobre, selenio), entre otros.^{5,6}

Considerando estos antecedentes se decidió investigar el efecto de la *Spirulina* en un modelo de neuropatía axonal distal provocado por la administración diaria de acrilamida.⁷⁻¹¹

MÉTODOS

Animales: se utilizaron ratones machos adultos OF1 de 20 a 24 g de peso corporal, provenientes del CENPALAB (Centro de Producción de Animales de Laboratorio), con certificado de calidad y control veterinario, los cuales fueron adaptados a las condiciones de laboratorio con agua y comida *ad libitum*, humedad relativa de 60 %, temperatura de 26 ± 2 °C, y ciclo luz-oscuridad 12 x 12 h. La alimentación consistió en pienso CMO 1 000 suministrado por este centro. En todo momento se garantizó el bienestar de los animales y se redujo al mínimo el dolor asociado a los procedimientos empleados, de acuerdo con las regulaciones del CENPALAB, así como a las Normas Éticas fijadas por el Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas (CIOMS, siglas en inglés) para el uso y cuidado de los animales de laboratorio.¹²

Spirulina platenses: fue suministrada, en forma liofilizada, por la Empresa Genix (Empresa Productora y Comercializadora de Microalgas y sus Derivados).

Modelo de neuropatía axonal por acrilamida

La acrilamida (calidad reactivo, Bayer) se administró diariamente por vía subcutánea, durante 3 semanas consecutivas, en dosis de 70 mg/kg, el peso corporal entre 20 y 24 g, modificando el método de *Watanabe*, descrito en ratas.⁷ Se emplearon 3 grupos de 15 animales cada uno:

1. Control (sin acrilamida).
2. Acrilamida.
3. acrilamida + *Spirulina*.

Esta última se administró diariamente, por vía oral, en dosis de 400 mg/kg, durante 5 semanas consecutivas después de finalizar las inyecciones de acrilamida.

Electrofisiología

La evaluación del efecto neurotóxico se realizó mediante el registro de la amplitud del potencial de acción muscular compuesto (PAMC). El PAMC se registró en la pierna durante la estimulación supramáxima (25 V, 1 Hz, 0,1 ms) del nervio ciático, con el empleo de electrodos de aguja inoxidable (descubiertos). Para ello los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina (100 mg/kg) y clorpromacina (10 mg/kg), introduciendo el electrodo positivo en los músculos de la pierna y el de referencia de manera transcutánea en el espacio interdigital. Los electrodos de estimulación se introdujeron atravesando un pliegue cutáneo de los bordes rostral y caudal de la región más proximal del muslo. Los potenciales se registraron antes y después del tratamiento con acrilamida y cada semana durante el período recuperativo. Se empleó un set electrofisiológico compuesto por un osciloscopio VC-11 y un estimulador de la marca Nihon Khoden, transferidos a una

computadora dotada de una tarjeta análogo-digital. Los animales fueron pesados cada semana durante todo el experimento.

Al final de este experimento los animales fueron sacrificados mediante eutanasia con el empleo de una cámara con éter etílico.

Estadística

Para el análisis estadístico se empleó la U de *Mann-Witney* para series pareadas, así como la prueba de la probabilidad exacta de *Fischer* para determinar la diferencia intergrupo en la proporción de sanos y enfermos cada día de registro. Se consideró animal enfermo aquel cuyo PAMC difiriera de la media de los controles en más de 2 DE.

RESULTADOS

El tratamiento con acrilamida produjo una reducción de la amplitud de los PAMC entre 50 a 65 % de sus valores iniciales ([fig. 1](#)), lo que se acompañó de una marcada afectación de la actividad motora, expresada fundamentalmente por hipotonía muscular, flacidez de la cola, caída del tren posterior o arrastre de una de las extremidades traseras, con dificultad para la marcha.

En la [figura 2](#) está representada la proporción de animales afectados cada semana durante la fase recuperativa. En la comparación intergrupos, las diferencias en las proporciones de animales recuperados comenzaron a ser estadísticamente significativas a partir de la séptima semana del experimento, y en el grupo tratado con *Spirulina* la proporción de animales afectados se redujo a 0 % en la octava semana, mientras que en el grupo no tratado la proporción de animales recuperados se mantuvo en 20 % hasta la décima semana.

En la [figura 3](#) se muestra la variación del PAMC durante la fase recuperativa. El análisis estadístico reflejó que en el grupo tratado con *Spirulina* los PAMC alcanzaron su nivel inicial a la octava semana del experimento, a diferencia de los que recibieron solo acrilamida, los cuales permanecieron significativamente diferentes de su control interno hasta la última semana.

DISCUSIÓN

Los resultados indican que existe una recuperación más rápida en los animales que recibieron *Spirulina*, tanto en el porcentaje de animales recuperados como en el valor de la amplitud de los PAMC. Según *Watanabe*,⁷ estos potenciales son la expresión del número de fibras motoras activas durante la estimulación supramáxima del nervio correspondiente, y la correlación entre la afectación electrofisiológica y los cambios histopatológicos provocados por la acrilamida ha sido bien fundamentada.^{7-11,13,14}

La más rápida recuperación no parece estar relacionada con posibles efectos de *Spirulina* sobre el estado metabólico general de los animales, porque no hubo diferencias significativas en el peso corporal entre los diferentes grupos a lo largo del experimento, sino probablemente por acciones más específicas sobre los mecanismos de la neuroregeneración que pudieran dar lugar a efectos sinérgicos

de varios de los constituyentes de la microalga, como son los oligoelementos selenio, zinc, cobre y calcio, que participan en funciones bioquímicas importantes para la preservación de las estructuras y funciones de los tejidos del sistema nervioso;^{15-17,18} las vitaminas del complejo B, principalmente B₁ y B₁₂, de reconocidas acciones neurotróficas;^{19,20} los 8 aminoácidos esenciales presentes en la *Spirulina*, y en particular, la abundante cantidad de metionina, la cual puede propiciar remielinización más rápida de los nervios afectados, porque este aminoácido participa en la formación de colina, precursor de la mielina.²¹

Aunque la mayoría de los componentes de la *Spirulina*, en particular las vitaminas y los minerales, constituyen la base de varios preparados farmacéuticos conocidos, se sabe que el consumo de estos en su fuente natural presenta ventajas, porque se encuentran enlazados a complejos de proteínas, hidratos de carbono, lípidos y quelatos, los que son más fácilmente asimilables y reconocidos por el organismo, a diferencia de sus análogos sintéticos.⁵

Se puede concluir que los presentes resultados demuestran que el tratamiento con *Spirulina* contribuye a la recuperación de los nervios periféricos afectados por la acción neurotóxica de la acrilamida.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dillon JC, Phuc AP, Dupacq JP. Nutritional value of the alga *Spirulina*. *Word Rev Nut Diet*. 1995;77:32-46.
2. Johnson P, Shubert E. Iron bioavailability and prevention of anemia. *Nutr Res*. 1986;6:85-94.
3. Bharathi P, Salimath GS. Dietary components inhibit lipid peroxidation in erythrocyte membrane. *Nutr Res*. 1986;6:1171-8.
4. Hirjashi T, Matsumoto M, Hazekli K, Saeki Y, Vi M, Seya T. Activation of the human innate immune system by *Spirulina*: Augmentation of interferon production and NK cytotoxicity by oral administration of hot water extract of *Spirulina platensis*. *Int Immunopharmacol*. 2002;2:423-34.
5. Henrikson R. *Spirulina*. Superalimento del futuro. Barcelona: Ed. Uranio S.A.; 1994. p. 81-91.
6. Bellilay A, Ota Y. Current knowledge of potential health benefits of *Spirulina*. *J Appl Phycol*. 1993;5:235-41.
7. Watanabe T, Kaji R, Oka N, Bara W, Kimura J. Ultra high dose methylcobalamin promotes nerve regeneration in experimental acylamide neuropathy. *J Neurol Sci*. 1994;122:140-3.
8. Tilson HA, Spencer PS, Cape PA. Acrylamide neurotoxicity in rats: a correlated neurobehavioral and pathological study. *Neurotoxicology*. 1979;1:89-104.
9. Saita K, Hanaoka Y, Furukawa S, Furukawa Y, Hayashi K, Matsukura S. A catechol derivative (4-methylcatechol) accelerates the recovery from experimental acrylamide-induced neuropathy. *J Pharmacol Exp Ther*. 1996;276:231-7.

10. Acevedo ME, León N, Pérez-Saad H, García JD. Efecto protector de una mezcla de gangliósidos en la neuropatía por acrilamida en ratones. *Rev Neurol*. 2000; 30: 1096-100.
11. Joseph KH, Walter BP. Statistical analysis of developmental toxicity data. *Development toxicology*. In: Principles and methods of toxicology. Wallace Hayes A, editor. 3th ed. New York: Raven Press; 1994. p. 349-61.
12. CIOMS: Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas. Principios Guías Internacionales para la Investigaciones Biomédicas que implique animales. Normas, documentos y ética médica. Ginebra; 1985, p. 97-107.
13. Crofton KM, Padilla S, Tilson HA, Anthony DC, Raymer JH, MacPhail RC. The impact of dose rate on the neurotoxicity of acrylamide: interaction of administered dose target tissue concentrations, tissue damage, and functional effects. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1996; 139: 163-76.
14. Belai A, Burnstock G. Acrylamide-induced neuropathic changes in enteric nerves: similarities with effects of streptozotocin-diabetes. *J Auton Nerv Syst*. 1996; 58: 56-62.
15. Pérez R, Fleitas P. Análisis y discusión de la hipótesis tóxico-nutricional como posible etiología de la epidemia ocurrida en Cuba. En: Almirall Hernández P, Antelo Pérez J, Ballester Santovenia J, Borrajero Martínez I, Cabrera Hernández A, Calcagno Tey E, et al., editores. *Neuropatía Epidémica en Cuba 1992-1994*. Ciudad de La Habana: Ed. Ciencias Médicas; 1995. p. 117-58.
16. Rotruck JT. Selenium biochemical role as a component of glutation peroxidase. *Science*. 1973; 179: 558-90.
17. Salonen JT. Risk of cancer in relation to serum concentrations of selenium and Vitamins A and E. Matched case control analysis of prospective data. *Brit Med J*. 1995; 290: 417.
18. Hayakawa Y, Hayashi T, Hayashi K, Ozawa T, Niiya K, Sakuragawa N. Heparin cofactor II-dependent antithrombin activity of calcium spirulan. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1966; 7: 554-60.
19. Pita G. Acido fólico y vitamina B₁₂ en la nutrición humana. *Rev Cubana Alim Nutr*. 1998; 12(2): 107-20.
20. Tokai Y. Effects of *Spirulina* on caecum content in rats. *Chiba Hyg Coll Bull*. 1987; 5(2).
21. Lehninger A. *Bioquímica*. 2da. ed. Edición Revolucionaria. La Habana; 1981. p. 358.

Recibido: 12 de enero de 2009.

Aprobado: 3 de febrero de 2009.

M. C. *Nora Sánchez Rodríguez*. Departamento de Neurología Experimental, Instituto de Neurología y Neurocirugía. 29 y D, Vedado, CP 10 400. Ciudad de La Habana, Cuba. Teléf.: 834-5563. Correo electrónico: nora.sanchez@infomed.sld.cu

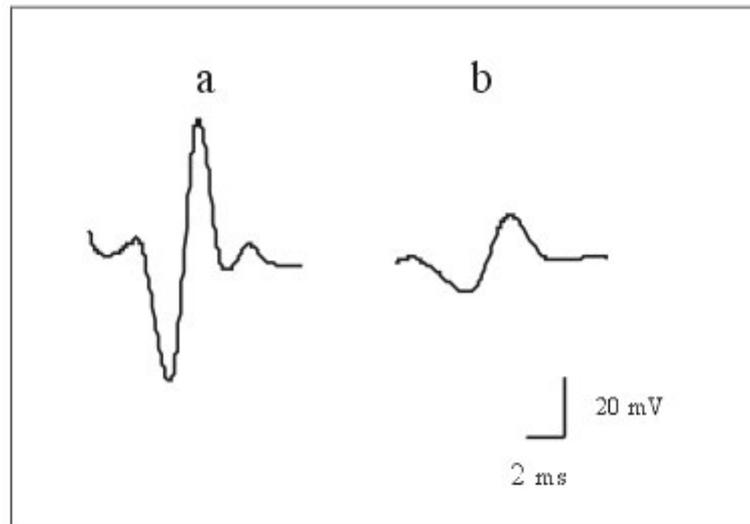


Fig. 1. Potencial de acción muscular compuesto durante la estimulación supramáxima del nervio ciático, antes (a) y después (b) del tratamiento con inyecciones subcutáneas diarias de acrilamida (70 mg/kg) durante 3 semanas consecutivas.

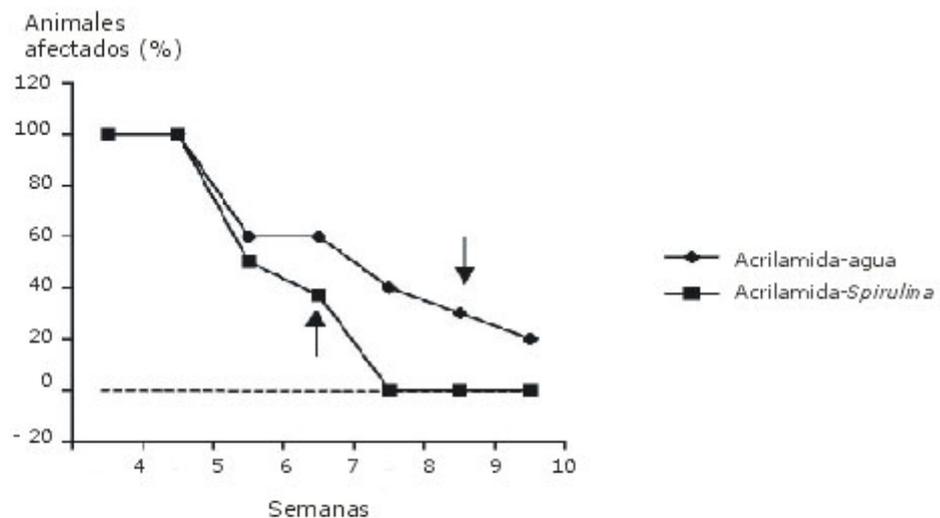


Fig. 2. Proporción de animales afectados por la acrilamida (70 mg/kg diarios por vía subcutánea durante 3 semanas) en 2 grupos de animales, tratados con agua o *S. platensis* (400 mg/kg por vía oral durante 5 semanas). Las flechas indican la última semana de diferencias estadísticamente significativas entre los 2 grupos ($p < 0,05$), según probabilidad exacta de Fischer.

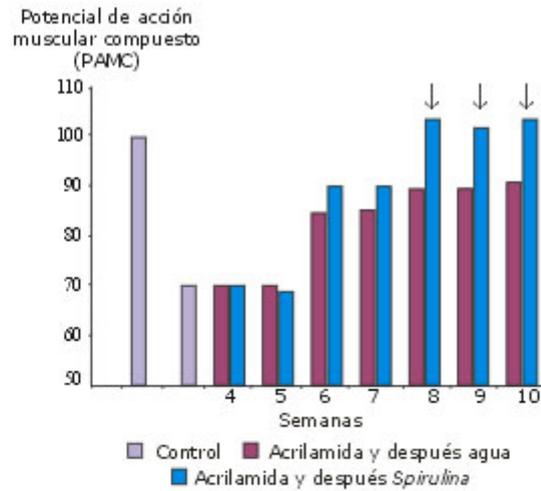


Fig. 3. Efecto de *S. platensis* sobre el potencial de acción muscular compuesto en animales intoxicados con acrilamida (70 mg/kg diarios vía subcutánea durante 3 semanas). Los controles aparecen antes y después de la administración de acrilamida; los pares de columnas representan la fase recuperativa durante el tratamiento con agua o *S. platensis*. Las flechas indican diferencias no significativas ($p > 0,05$) con respecto a los controles sanos intragrupo, según el método de *Wilcoxon* para series pareadas.