
INTERACCIÓN ENTRE EL EXTRACTO DE *Hygrophila tytttha* Y LA ESCOPOLAMINA EN UNA PRUEBA DE MEMORIA EPISÓDICA EN RATAS

Interaction Between *Hygrophila tytttha* Extract and Scopolamine in a Episodic Memory Test in Rats

LAMPREA N¹, GUERRERO M², MÚNERA A¹, LAMPREA M¹

¹Grupo de Neurofisiología Comportamental, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

²Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia

Correspondencia: Marisol Lamprea, mlamprear@unal.edu.co,
Departamento de Psicología, oficina 122. Edificio 212, Ciudad
Universitaria, Avenida carrera 30 N.º 45-03, Bogotá, Colombia.

Presentado 11 de marzo de 2009, aceptado 15 de abril de 2009, correcciones 28 de mayo de 2009.

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la interacción entre el extracto etanólico concentrado de la planta *Hygrophila tytttha* (500 mg/kg, vía oral) y el antagonista colinérgico escopolamina (0,3 mg/kg, intraperitoneal) en un modelo animal de memoria episódica. El extracto de la planta se obtuvo mediante percolación a partir del material vegetal fresco y se administró 30 minutos antes que la escopolamina. Treinta minutos después de ésta los animales se entrenaron en la tarea de reconocimiento del contexto espacial y una hora más tarde se evaluó la exploración del campo y de los objetos en él contenidos. Los resultados mostraron que la administración de escopolamina, asociada o no al extracto de *Hygrophila tytttha*, deterioró el reconocimiento del contexto espacial, impidió la habituación al campo abierto, pero no afectó la exploración de los objetos. El único efecto de la asociación del extracto con escopolamina fue un aumento significativo de la actividad exploratoria del campo abierto. Estos resultados sugieren que el extracto de *Hygrophila tytttha* no tuvo interacciones significativas sobre el efecto amnésico de la escopolamina, pero sí potenció su actividad estimulante de la actividad exploratoria.

Palabras clave: *Hygrophila tytttha* extracto, escopolamina, memoria episódica, rata

ABSTRACT

The main objective of this study was to evaluate the interaction between the concentrated ethanolic extract of *Hygrophila tytttha* (500 mg/kg, per os) and the cholinergic antagonist scopolamine (0.3 mg/kg, intraperitoneal) in an animal model of episodic memory. The extract was obtained by percolation from fresh vegetal

material and was administered 30 minutes before scopolamine. Thirty minutes after the scopolamine the subjects were trained in a spatial context recognition task. One hour after the training the exploration of both the open field and the objects. The results showed that scopolamine administration, associated or not to *Hygrophila tyttha* extract, impaired both spatial context recognition and open field habituation but did not affect object exploration. The only effect of *Hygrophila tyttha* extract and scopolamine joint administration was a significant increase in open field exploratory behavior. Such results suggest that *Hygrophila tyttha* extract did not have significant interactions with scopolamine amnesic effect, while it did potentiate the exploratory behavior stimulant effect of scopolamine.

Key words: *Hygrophila tyttha* extract, scopolamine, episodic memory, rats

INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud ha estimado que cerca del 80% de la población mundial usa plantas medicinales directa o indirectamente para el tratamiento de problemas básicos de salud (World Health Organization, 2000). En Colombia existen entre 45.000 y 55.000 especies de plantas, con lo que el país se ubica como el segundo más rico en biodiversidad del mundo. Aquí varias comunidades hacen uso de plantas y extractos vegetales para el tratamiento de diversas enfermedades y recientemente se ha observado un renovado interés por el uso de extractos crudos o parcialmente purificados de plantas para el control de afecciones del sistema nervioso central. Este interés se contrapone a la estrategia tradicional de obtención de moléculas puras a partir de extractos naturales, pues se ha demostrado que los efectos observados con el uso de éstos pueden deberse al efecto simultáneo de varias sustancias que se podrían perder en el proceso de aislamiento (Carlini, 2003; Tildesley *et al.*, 2003).

Al género *Hygrophila* pertenecen gran cantidad de especies ampliamente utilizadas en la medicina tradicional de países como India, Malasia y Nepal para el tratamiento de inflamación, afecciones hepáticas e infección urinaria (Shanmugasundaram y Venkataraman, 2006). Igualmente se han demostrado las propiedades antinociceptivas de algunas especies de este género a través de mecanismos centrales y periféricos (Shanmugasundaram y Venkataraman, 2005). La especie *Hygrophila tyttha* se encuentra en regiones tropicales y subtropicales especialmente en Centro y Sudamérica. En Colombia es conocida por su uso popular como insecticida y aromatizante. La sociedad indígena Awá que se encuentra distribuida en una amplia zona del Pacífico nariñense utiliza esta planta con fines medicinales y para la realización de rituales mágicos (Chaves *et al.*, 2006). En otras regiones esta especie se utiliza con fines tranquilizantes y se conoce bajo el nombre popular de “amansaguapos”, “amansamachos” o “amansatoros”.

En un primer estudio llevado a cabo en el Departamento de Farmacia de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia se evaluó el efecto del extracto etanólico concentrado de esta planta sobre la actividad del sistema nervioso central en ratones. En dicho estudio se analizaron diversos parámetros conductuales (efectos ansiolítico, antidepresivo, anticonvulsivante e hipnótico) dentro de los que cabe resaltar una reducción dependiente de la dosis de los comportamientos asociados con la

ansiedad tras la aplicación por vía oral del extracto (Ariza *et al.*, 2006). Para complementar estos resultados, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del extracto etanólico concentrado de *Hygrophila tyttha* en el reconocimiento de un contexto espacial (memoria episódica) y la interacción de este extracto con el antagonista colinérgico muscarínico escopolamina, el cual tiene efecto amnésico en diversas tareas de memoria en ratas (Lee *et al.*, 2006; Prus *et al.*, 2006). Dados los resultados obtenidos en los estudios previos, este estudio pretende verificar si la aplicación del extracto es capaz de modificar (bien sea potencializando o disminuyendo) los efectos amnésicos de la escopolamina.

MATERIALES Y MÉTODOS

SUJETOS

Se utilizaron 32 ratas Wistar macho con un peso de 237 ± 50 g procedentes del Bioterio del Departamento de Farmacia de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia. Los animales fueron llevados posteriormente al Laboratorio de Aprendizaje y Comportamiento Animal del Departamento de Psicología donde permanecieron bajo condiciones ambientales controladas con una temperatura ambiente de 20 ± 2 °C, un ciclo luz-oscuridad 12/12 h (con luces encendidas desde las 7:00 a.m.) y libre acceso a agua y comida durante todo el experimento. Una vez recibidos los animales en el laboratorio, se les permitió la aclimatación durante un periodo de tres días antes de cualquier procedimiento experimental.

PREPARACIONES FARMACOLÓGICAS

Escopolamina HBr SIGMA (St. Louis, MS, EUA). Para su administración por vía intraperitoneal (i.p.) se vehiculizó en solución salina (0,9%) con una concentración de 0,3 mg/mL. La dosis utilizada (0,3 mg/kg) fue seleccionada a partir de estudios que utilizan dosis entre 0,1 y 1 mg/kg (Wirsching *et al.*, 1984; Bartolini y Casamenti, 1996) y de trabajos previos realizados por los autores.

Extracto etanólico de *Hygrophila tyttha*. La parte aérea de la planta (tallos y hojas) se recolectó en el municipio de Palmira (Valle). Un ejemplar se envió al Herbario Nacional Colombiano de la Universidad Nacional de Colombia, donde, con el código 511937 COL, se confirmó su clasificación taxonómica. El material fresco se secó en estufa de aire circulante a una temperatura de 50 °C durante 72 h y luego se trituró en un molino de discos. El polvo obtenido se percoló con etanol al 96% (4 L) con un goteo aproximado de 20 gotas/min. El extracto obtenido se filtró y concentró en un rotavapor a temperatura < 40 °C. Finalmente se almacenó en una cápsula de porcelana que se introdujo en un desecador al vacío a temperatura ambiente. Para su administración por vía oral (v.o), el extracto se vehiculizó en polietilenglicol, glicerol, Tween 80 y agua destilada con una concentración de 166 mg/mL. La dosis utilizada (500 mg/kg) fue administrada por vía oral con la ayuda de una jeringa de acuerdo a lo descrito por Ariza *et al.*, 2006.

APARATOS

La prueba de reconocimiento del contexto espacial se llevó a cabo en un campo abierto elaborado en acrílico negro opaco compuesto por una superficie cuadrada de 90 cm

de lado rodeada por paredes de 90 cm de altura fabricadas con el mismo material. Para el registro de la actividad locomotora de los animales, el piso del campo se dividió en 36 cuadrantes de 15 cm de lado. Los objetos incorporados al contexto espacial fueron dos prismas rectangulares de 10 x 5 x 3 cm, localizados a una distancia de 10 cm de dos esquinas opuestas del campo.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Al cabo del período de aclimatación, los animales fueron asignados al azar a uno de cuatro grupos: 1) Vehículo-vehículo (V-v) o control (N=7); 2) Vehículo-escopolamina (V-e; N=7); 3) Extracto-escopolamina (Ex-e; N=7); y 4) Extracto-vehículo (Ex-v; N=7). El día del experimento, los animales de cada grupo recibieron dos tratamientos farmacológicos sucesivos, separados entre sí por un intervalo de 30 min (Tabla 1). Treinta minutos después de la última administración, los animales se colocaron en el centro del campo abierto y se les permitió explorar libremente el campo y los objetos durante cinco minutos (sesión 1). Posteriormente fueron llevados a su caja hogar por un periodo de una hora, luego del cual nuevamente se colocaron en el centro del campo abierto y se permitió su exploración por un periodo adicional de cinco minutos (sesión 2).

Grupo	Tratamiento 1	Tratamiento 2
V-v	Vehículo del extracto (3 mL/kg, v.o.)	vehículo de la escopolamina (1 mL/kg, i.p.)
V-e	Vehículo del extracto (3 mL/kg, v.o.)	Escopolamina (0,3 mg/kg, i.p.)
Ex-e	Extracto (500 mg/kg, v.o.)	Escopolamina (0,3 mg/kg, i.p.)
Ex-v	Extracto (500 mg/kg, v.o.)	vehículo de la escopolamina (1 mL/kg, i.p.)

Tabla 1. Tratamientos farmacológicos. Para cada grupo se señalan los dos tratamientos farmacológicos administrados antes de la evaluación comportamental. Entre paréntesis se indica la dosis y la vía de administración.

ADQUISICIÓN, PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Las sesiones se grabaron en video y posteriormente se registró la ejecución de cada individuo con ayuda del programa X-plorat® (Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil). En cada sesión y para cada individuo, se evaluó el número de cruzamientos totales (indicador de actividad locomotriz), el número de cruzamientos en el área central y periférica del campo abierto (indicador de tigmotaxis) y la frecuencia y el tiempo de exploración de cada uno de los objetos (indicador de actividad exploratoria del contexto espacial). Estas medidas se registraron globalmente y discriminadas por minuto. Los datos arrojados por el programa X-plorat® se analizaron con el paquete estadístico SIGMA STAT® (versión 3.1, Systat Software Inc., San José, CA, USA). Las diferencias de la ejecución global entre grupos fueron determinadas por medio de la prueba ANDEVA para grupos independientes, y se utilizó la prueba de Dunnet para el análisis *post-hoc* de diferencias múltiples. Para evaluar los cambios de la ejecución a lo largo de cada sesión (indicador de habituación), para cada grupo se comparó el número total de cruzamientos realizados en los minutos uno y cinco mediante una prueba t de Student pareada. Para evaluar las diferencias de habituación entre grupos en cada uno de los minutos uno y cinco, se utilizó la prueba de ANDEVA para grupos independientes. El grado de significatividad para todas las pruebas fue de 0,05.

RESULTADOS

Durante la primera sesión de exploración se observó una diferencia significativa en el total de cruzamientos entre los grupos ($F_{(3, 24)} = 3,499$; $p = 0,028$), el análisis *post-hoc* evidenció que esta diferencia estaba dada exclusivamente por un aumento significativo en total de cruzamientos de los animales del grupo Ex-e con respecto a los del grupo V-v ($p < 0,05$; Fig. 1A). Al discriminar los cruzamientos entre el centro y la periferia se encontraron diferencias significativas entre grupos ($F_{(3, 24)} = 3,483$; $p = 0,031$) y se determinó que el grupo Ex-e tuvo un aumento significativo en los cruzamientos en la periferia con respecto al control ($p < 0,05$; Fig. 1A). Las comparaciones entre los grupos para la exploración del centro del campo abierto no mostraron diferencias significativas ($F_{(3, 24)} = 1,765$; $p = 0,181$; Fig. 1A).

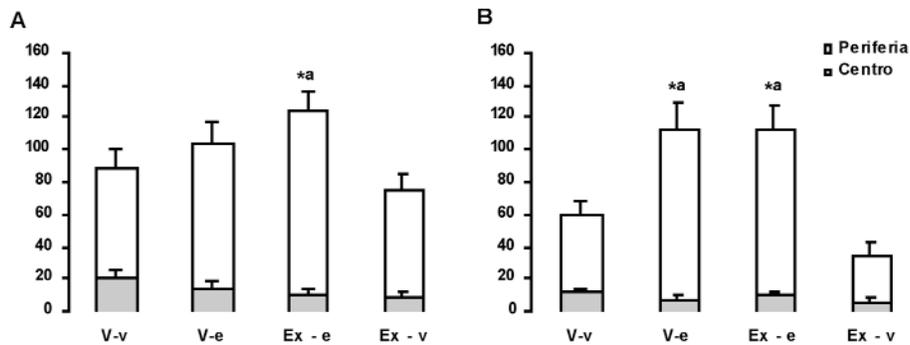


Figura 1. Cruzamientos totales y por área para cada grupo durante la primera (A) y segunda (B) sesiones de exploración. Las barras de error ilustran el error estándar de la media. Símbolos: (*) Diferente de los cruzamientos totales del grupo V-v. (a) Diferente de los cruzamientos en la periferia del grupo V-v.

Durante la segunda sesión de exploración se encontraron diferencias significativas en el total de cruzamientos entre los grupos ($F_{(3, 24)} = 6,517$; $p = 0,002$), dadas por un aumento significativo en el total de cruzamientos de los animales de los grupos V-e y Ex-e con respecto al grupo control ($p < 0,05$; Fig. 1B). Al discriminar los cruzamientos entre el centro y la periferia se encontraron diferencias significativas entre grupos ($F_{(3, 24)} = 7,361$; $p = 0,001$) y se determinó que los grupos V-e y Ex-e tuvieron un aumento significativo en los cruzamientos en la periferia con respecto al control ($p < 0,05$; Fig. 1B). Las comparaciones entre los grupos para la exploración del centro del campo abierto no mostraron diferencias significativas ($F_{(3, 24)} = 1,522$; $p = 0,234$).

El análisis de los cambios en la ejecución global durante la primera sesión (indicador de habituación) mostró una disminución en el número de cruzamientos totales en el minuto cinco con respecto al minuto uno solamente en el grupo V-v ($V-v: t_{(7)} = 2,442$, $p = 0,028$; $V-e: t_{(7)} = -0,0322$, $p = 0,975$; $Ex-e: t_{(7)} = -0,689$, $p = 0,502$; $Ex-v: t_{(7)} = 2,101$, $p = 0,069$; Fig. 2A). En esta sesión, los animales de los grupos tratados con escopolamina (Ex-e, V-e) mostraron mayores niveles de exploración durante el minuto cinco comparados con los animales de los grupos V-v y Ex-v ($F_{(3, 24)} = 7,361$, $p < 0,01$).

Durante la segunda sesión se encontró una disminución significativa en el número de cruzamientos totales en el minuto cinco con respecto al minuto uno en los sujetos de los grupos tratados con el extracto de *Hygrophila tyttha* (Ex-e: $t_{(7)} = 2,650$, $p = 0,019$; Ex-v: $t_{(7)} = 2,32$, $p = 0,049$; V-v: $t_{(7)} = 0,193$, $p = 0,850$; V-e: $t_{(7)} = 1,314$, $p = 0,213$; Fig. 2B). Es notorio, además, que durante el primer minuto de la segunda sesión los animales del grupo Ex-e mostraron una exploración del campo abierto significativamente mayor que los demás grupos ($F_{(3, 24)} = 4,564$, $p = 0,011$). En cuanto a la exploración de los objetos dentro del contexto, no se encontraron diferencias significativas entre grupos para cada una de las sesiones, ni entre las sesiones para cada uno de los grupos (factor grupo: $F_{(3, 24)} = 1,463$, $p = 0,249$; factor sesión: $F_{(1, 24)} = 1,882$, $p = 0,183$).

DISCUSIÓN

De los tratamientos experimentales empleados, solo la combinación del extracto de *Hygrophila tyttha* con escopolamina incrementó la locomoción de los animales en las regiones periféricas del campo abierto durante la primera sesión de exploración (Fig. 1A). Los animales del grupo V-e tuvieron una tendencia no significativa hacia el aumento de la actividad exploratoria con respecto al grupo control, lo cual sugiere que el extracto potenció la acción estimulante de la escopolamina.

De otra parte, ni el extracto, ni la escopolamina, ni la combinación de los dos fármacos tuvieron efectos sobre la exploración de las áreas centrales del campo abierto, regiones que son consideradas análogas a los brazos abiertos del laberinto en cruz elevado (Boguszewski y Zagrodzka, 2002). Estos resultados difieren de lo observado por Ariza *et al.*, 2006, quienes en su estudio anterior con el extracto de *Hygrophila tyttha* describieron un aumento en la exploración de los brazos abiertos del laberinto en cruz elevado.

En la segunda sesión de exploración, los animales inyectados con escopolamina antes de la primera sesión mostraron niveles de exploración significativamente mayores que los de los grupos que no recibieron este fármaco (Fig. 1B), sugiriendo una incapacidad para discriminar que el campo abierto ya había sido explorado una hora antes. La administración del extracto de *Hygrophila tyttha* no modificó este efecto amnésico de la escopolamina. Finalmente, la aplicación del extracto sin la escopolamina no afectó la capacidad de los animales para identificar una situación conocida, lo que se puede evidenciar por la reducción en la exploración del campo abierto durante la segunda sesión en los animales del grupo Ex-v.

Por otro lado, la comparación entre el minuto uno y el minuto cinco durante la primera sesión mostró que los animales que recibieron la combinación del extracto y la escopolamina no presentaron la disminución en la locomoción observada en los animales que recibieron vehículo o solamente el extracto (Fig. 2A). Efecto semejante fue observado en la segunda sesión, en la cual los animales que recibieron el extracto y la escopolamina iniciaron la exploración a niveles incluso superiores a los observados en la primera sesión (Fig. 2B). Estos resultados indican que el antagonista colinérgico muscarínico escopolamina produjo un déficit en la habituación de los animales al campo abierto de manera semejante a lo observado tras la lesión selectiva de las neuronas colinérgicas del núcleo septal medial (Lamprea *et al.*, 2000); no obstante, este efecto no fue modificado significativamente por la coadministración del extracto de *Hygrophila tyttha*.

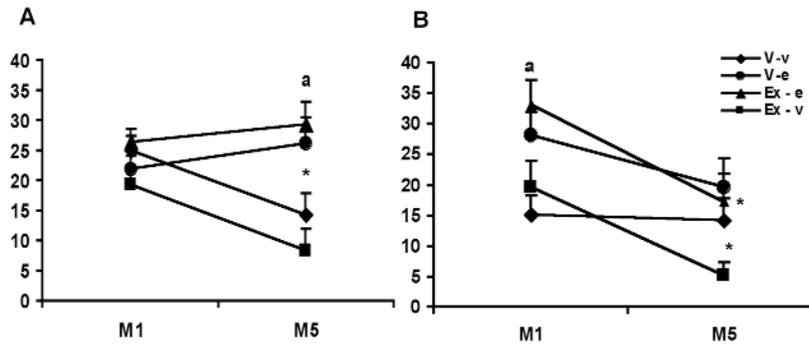


Figura 2. Cruzamientos totales durante los minutos uno y cinco de las dos sesiones de exploración. Símbolos: (*) Diferente del minuto uno del mismo grupo. (A) Diferente del minuto cinco del grupo V-v (en la Fig. A) y del minuto 1 del grupo V-v (en la Fig. B). Abreviaturas: M1, minuto uno; M5 minuto cinco.

Resulta llamativo el hecho de que ninguno de los tratamientos experimentales tuvo efecto sobre la exploración de objetos. Una observación cuidadosa del comportamiento de los animales mostró que dedicaron un porcentaje relativamente bajo del tiempo de las sesiones en la exploración de los objetos (inferior al 20% en ambas sesiones). Esta situación podría deberse al gran tamaño del campo abierto y a la ausencia de una sesión de habituación previa a la primera sesión de exploración. Otros autores han mostrado que la introducción de una sesión de habituación aumenta la probabilidad de exploración de los objetos (Ennaceur *et al.*, 2005). Finalmente, consideramos que estudios posteriores con el extracto purificado o en fracciones permitirán resultados más conclusivos. Sin embargo, los métodos diseñados y estandarizados en el presente estudio, así como los resultados obtenidos son una fase importante en este proceso.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al grupo “Principios Bioactivos de Plantas” y a las estudiantes Liliana Mora, Janeth López y Cristina López por su ayuda técnica.

BIBLIOGRAFÍA

- ARIZA SY, RINCÓN J, GUERRERO MF. Efectos sobre el sistema nervioso central del extracto etanólico y fracciones de *Hygrophila tytttha* Leonard. Rev Colomb Cienc Quim Farm. 2006;35:106-119.
- BARTOLINI L, CASAMENTI F. Aniracetam restores object recognition impaired by age, scopolamine, and nucleus basalis lesions. Pharmacol Biochem Behav. 1996;53:277-283.
- BOGUSZEWSKI P, ZAGRODZKA J. Emotional changes related to age in rats—a behavioral analysis. Behav Brain Res. 2002;133(2):323-332.
- CARLINI EA. Plants and the central nervous system. Pharmacol Biochem Behav. 2003;75:501-512.
- CHAVES ALP, GARZÓN NC, CUCA LE. Uso y manejo de la flora entre los Awa

de Cuambi-Yaslambi, Barbacoas (Nariño, Colombia), Etnobotánica y Botánica económica. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2006.

ENNACEUR A, MICHALIKOVA S, BRADFORD A, AHMED S. Detailed analysis of the behavior of Lister and Wistar rats in anxiety, object recognition and object location tasks. *Behav Brain Res.* 2005;159(2):247-266.

LAMPREA MR, CARDENAS F, SILVEIRA R, MORATO S, WALSH TJ. Dissociation of memory and anxiety in a repeated elevated plus maze paradigm: forebrain cholinergic mechanisms. *Behav Brain Res.* 2000;117(1-2):97-105.

LEE KY, JEONG EJ, LEE HS, KIM YC. Acteoside of *Callicarpa dichotoma* attenuates scopolamine-induced memory impairments. *Biol Pharm Bull.* 2006;29(1):71-74.

PRUS AJ, PHILIBIN SD, PEHRSON AL, PORTER JH. Discriminative stimulus properties of the atypical antipsychotic drug clozapine in rats trained to discriminate 1.25 mg/kg clozapine vs. 5.0 mg/kg clozapine vs. vehicle. *Behav Pharmacol.* 2006;17(2):185-194.

SHANMUGASUNDARAM P, VENKATARAMAN S. Anti-nociceptive activity of *Hygrophila auriculata* (Schum) Heine. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 2005;2:62.

SHANMUGASUNDARAM P, VENKATARAMAN S. Hepatoprotective and antioxidant effects of *Hygrophila auriculata* (K. Schum) Heine Acanthaceae root extract. *J Ethnopharmacol.* 2006;104:124-128.

TILDESLEY NTJ, KENNEDY DO, PERRY EK, BALLARD CG, SAVELEV S, WESNES KA, SCHOLEY AB. *Salvia lavandulaefolia* (Spanish Sage) enhances memory in healthy young volunteers. *Pharmacol Biochem Behav.* 2003;75:669-674.

WIRSCHING BA, BENINGER RJ, JHAMANDAS K, BOEGMAN RJ, EL-DEFRAWY SR. Differential Effects of scopolamine on working and reference memory of rats in the radial maze. *Pharmacol Biochem Behav.* 1984;20:659-662.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine, Ginebra: World Health Organization; 2000.