



EFFECTO DEL ÁCIDO PALMÍTICO SOBRE LAS CONEXIONES AMÍGDALINO-SEPTALES

D.I. Vásquez-Hernández ^a, A.G. Gutiérrez-García ^{a,b}, T. Molina-Jiménez ^a, C.M. Contreras ^{a,c}

^aLaboratorio de Neurofarmacología del Instituto de Neuroetología, Universidad Veracruzana. Xalapa, Veracruz. México, dianai10@hotmail.com, lorien586@hotmail.com

^bFacultad de Psicología, Universidad Veracruzana. Xalapa, Veracruz. México, angutierrez@uv.mx

^cUnidad Periférica Xalapa, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Xalapa, Veracruz. México, ccontreras@uv.mx

RESUMEN

El líquido amniótico, el calostro y la leche contienen feromonas de afinidad en especies como el conejo, el cerdo y quizás el humano. Estas feromonas parecen mediar el reconocimiento entre la madre y su descendencia y producir tranquilidad en el recién nacido. En experimentos previos hemos demostrado la presencia constante de 8 ácidos grasos en los tres fluidos biológicos antes mencionados; dentro de ellos, el ácido palmítico es el más abundante, por un lado y, es el precursor de muchos de los demás ácidos grasos encontrados, por el otro. Desde el punto de vista neurofisiológico, algunas estructuras cerebrales como la amígdala medial y el núcleo septal lateral participan en el miedo y el hedonismo, respectivamente y por lo tanto en el reconocimiento social; así, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del ácido palmítico sobre la responsividad de la conexión amigdalina-septal. Se utilizaron 12 ratas macho Wistar adultas, asignadas a dos grupos: grupo control-vehículo (n=7; 1 ml/rata, i.p.) y otro grupo tratado con ácido palmítico (n=5; 153 µg/ml/rata, i.p.). Se obtuvo el registro unitario extracelular del núcleo septal lateral, antes, durante y después de la estimulación eléctrica de la amígdala medial. Los histogramas periestímulo indicaron que el ácido palmítico prolongó la latencia de la respuesta neuronal del núcleo septal y disminuyó la actividad neuronal espontánea. Concluimos que el ácido palmítico promueve una disminución de la responsividad de las conexiones amigdalino septales, lo que podría relacionarse con algún efecto tranquilizante, a la vez que también podría producir alguna acción sedante.

INTRODUCCIÓN

Las interacciones sociales, principalmente en mamíferos, parecen estar mediadas por una comunicación química que permite a los organismos comunicarse entre sí mediante sustancias o mezclas de compuestos, llamadas feromonas (Regnier, 1971). Entre las conductas sociales influidas por feromonas, se encuentra el reconocimiento de conoespecíficos y de las crías, lo que constituye una conducta de afinidad mediada químicamente. Por ejemplo, en conejos *Oryctolagus cuniculus*, se identificó una feromona contenida en la leche, la 2-metilbut-2-enal que promueve la búsqueda y localización del pezón (Schaal et al., 2003). Asimismo, las crías del cerdo *Sus scrofa*, son atraídas por los olores maternos (Morrow-Tesch y McGlone, 1990; Parfet y Gonyou, 1991). Los componentes de la feromona que ejerce dicha atracción ya fueron identificados en el cerdo (Pageat, 2001) y aislados a partir de fluidos maternos, el líquido amniótico, el calostro y la leche, estos ácidos grasos son el palmítico, el oleico, el linoleico, el láurico, el mirístico y el cáprico (Guiraudie-Capraz et al., 2005). A su vez, los recién nacidos del ser humano desarrollan una orientación positiva hacia la leche, el calostro y el líquido amniótico (Lévy et al., 1983; Marlier et al., 1998). Debido a que las sustancias odoríferas en el líquido amniótico entran en contacto con los quimiorreceptores nasales, los cuales son funcionales antes del nacimiento, se cree que los recién



nacidos retienen una memoria olfativa de dicha experiencia prenatal y consecuentemente responden, orientándose hacia las mismas señales durante el periodo postnatal temprano (Hepper, 1995). Al igual que en el cerdo (Guiraudie-Capraz et al., 2005), en los seres humanos también se han encontrado dichos ácidos grasos en los tres fluidos biológicos maternos (Contreras et al., 2009a), lo que sugiere que dichos compuestos podrían ser feromonas maternas que facilitan el reconocimiento madre e hijo y que contribuyen al éxito de la transición entre la vida pre y postnatal del recién nacido. Inclusive, la administración de líquido amniótico humano a ratas Wistar produce efectos tipo ansiolítico en la prueba de enterramiento defensivo (Contreras et al., 2009b), un modelo animal para el estudio experimental de la ansiedad. En el líquido amniótico, calostro y leche humanos, los ácidos grasos más abundantes son el ácido oleico, el linoleico y el palmítico. Pero este último es el ácido graso de mayor concentración en el líquido amniótico (Contreras et al., 2009a). Por cierto, el ácido palmítico, es el producto final del sistema de síntesis de los ácidos grasos en las células animales, pero también es el precursor de otros ácidos grasos de cadena larga, una vez sintetizado, mediante procesos de elongación o desaturación, puede dar lugar a grasos saturados e insaturados de cadena de mayor longitud, como el ácido esteárico y el ácido oleico (Nelson y Cox, 2005).

Sin embargo las bases neurofisiológicas de estas conductas de afinidad son desconocidas. En este sentido, la amígdala y el septum son dos estructuras implicadas en la regulación de los estados emocionales (Amico et al., 2004; Dalgleish, 2004). La amígdala medial tiene proyecciones directas con el núcleo septal lateral, por lo que se ha propuesto que forman un circuito que podría mediar información feromonal u olfativa (Sheehan y Numan, 2000). A su vez, las eferencias del septum lateral hacia algunos núcleos del hipotálamo, regulan respuestas autónomas y algunas conductas sociales como la sexual y las respuestas maternas; además, el núcleo septal lateral participa en el reconocimiento social (Dantzer et al., 1988). Por lo que el propósito del presente trabajo fue evaluar el efecto del ácido palmítico utilizando una concentración equivalente a la presente en el líquido amniótico humano sobre la actividad neuronal del núcleo septal lateral ante la estimulación eléctrica de la amígdala medial.

MATERIAL Y MÉTODO

Sujetos

Se utilizaron 19 ratas macho de la cepa Wistar de 3 meses de edad, con un peso de 300-350 g. Las ratas se mantuvieron en un bioterio en cajas de acrílico translúcidas (45 x 30 cm de base y 30 cm de altura) en grupos de 6 a 8 por caja, con un ciclo de luz/oscuridad de 12 x 12 h (7:00 AM a 7:00 PM) y con acceso libre a agua y alimento. Se siguió de forma estricta el Manual de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Fármacos

El vehículo fue una mezcla de propilenglicol (96 %, J.T. Baker, México) y alcohol absoluto (4 %, J.T. Baker, México). El ácido palmítico (Sigma-Aldrich CO. PO St. Louis, MO USA) se disolvió en dicho vehículo y se inyectó por vía intraperitoneal en dosis de 153 µg/rata (la concentración equivalente a la detectada en el líquido amniótico humano), 1 h antes del registro unitario extracelular.

Grupos experimentales

Las ratas macho se asignaron aleatoriamente a dos grupos experimentales: el grupo control (n=12), al cual se le administró vehículo 1 h antes del registro electrofisiológico unitario extracelular (1.0 ml/rata, i.p.). Al grupo ácido palmítico (n=7) se le inyectó ácido palmítico en dosis de 153 µg/rata (1.0 ml/rata, i.p), 1 h antes de someterlos a registro electrofisiológico unitario extracelular.



Estudio electrofisiológico

Cirugía estereotáxica

Las ratas fueron anestesiadas con etilcarbamato (uretano 1gr/kg i.p. SIGMA), anestesia que no interfiere con la actividad neuronal (Contreras et al., 1991). Luego se fijaron a un aparato estereotáxico (Stoelting). Posteriormente se realizó un corte en la piel para exponer el cráneo y visualizar la sutura de bregma, la cual fue el punto de referencia para localizar la amígdala medial (AP= 2.8 mm, L= 3.1 mm, H= -9.0 mm, por debajo de la superficie de la corteza) y el núcleo septal lateral (AP= 0.2 mm, L= \pm 0.5 mm, H= -3.0 a .4.5 mm, por debajo de la superficie de la corteza).

Registro unitario extracelular

Para el registro de la actividad neuronal del núcleo septal lateral, se conectó la micropipeta a un preamplificador GRASS 7P511L, donde las señales registradas fueron enviadas a un amplificador 7P511K, después esta señal se envió en paralelo a un osciloscopio Tektronix TDS3052B (para su visualización) y a un estimulador GRASS S88 que convirtió la señal en pulsos cuadrados de amplitud y duración constantes (4V, 0.6 ms). Posteriormente, la señal se envió a la interfase (CED MICRO 1401) para que el programa Spike2 proporcionara el análisis de la frecuencia de disparo y los histogramas periestímulo. El registro electrofisiológico de la actividad neuronal del núcleo septal lateral incluyó: a) un registro basal de la actividad espontánea del núcleo septal lateral durante 1 min; b) estimulación eléctrica de la amígdala medial durante 1 min y registro simultáneo de la actividad neuronal del núcleo septal lateral y; c) registro post-estimulación de la actividad neuronal del núcleo septal lateral durante 1 min.

Control histológico

Al término de cada sesión, se marcó el sitio de estimulación (amígdala medial) dejando pasar corriente directa durante 1 min a través del electrodo de estimulación. El sitio de registro (núcleo septal lateral) se marcó con un preamplificador (DAGAN 2400) aplicando corriente de polaridad positiva de 20 μ A durante 20 min (Sánchez-Álvarez et al., 1988). Los animales fueron perfundidos por vía intracardiaca (ventrículo izquierdo) con 200 ml de solución salina 0.9% y después con 200 ml de formaldehído al 30%. Posteriormente, se extrajeron los cerebros y se colocaron en 30 ml de formaldehído por 48 h. Se colocaron en una solución de sacarosa 10% en buffer de fosfatos 30 min antes de realizar el corte. Con un microtomo (Criostato Leica CN 1510S) los cerebros fueron congelados (-22 °C) y seccionados (40 micras). Los cortes se tiñeron con la técnica de Nissl para la verificación histológica del sitio de registro.

Análisis estadístico

Se emplearon dos formas de análisis de la actividad unitaria extracelular del núcleo septal lateral: 1) Registro basal de la actividad espontánea del núcleo septal lateral, sin estimulación (1 min), y 2) Registro periestímulo de base 25 ms. Esta forma de análisis, permite detectar algún cambio en la respuesta neuronal que involucre unas cuantas sinapsis. Los datos obtenidos fueron analizados con la prueba t-Student para comparar el grupo control vs el grupo tratado con ácido palmítico. Se aceptaron como diferencias significativas, aquellas que alcanzaron $p \leq 0.05$. Los datos se representan como la media \pm el error estándar.

RESULTADOS

La administración de ácido palmítico no modificó la actividad neuronal del núcleo septal lateral basal (minuto previo a la estimulación eléctrica de la amígdala medial: [t = -0.664, 60 gl, p = 0.51, NS]). En cambio, el análisis de los histogramas periestímulo base 25 ms indicaron que la actividad neuronal del núcleo septal lateral fue significativamente menor en el grupo que recibió ácido



palmítico en comparación con el grupo control [$t = 2.14, 33 \text{ gl}, p < 0.03$]. Además la administración de ácido palmítico prolongó la latencia de la respuesta neuronal del núcleo septal lateral ante la estimulación de la amígdala medial [$t = 3.22, 33 \text{ gl}, p < 0.003$].

DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la administración del ácido palmítico empleando una concentración equivalente a la encontrada en el líquido amniótico humano, sobre la actividad neuronal del núcleo septal lateral ante la estimulación eléctrica de la amígdala medial. Se parte de la base de que estas estructuras están relacionadas con a) la respuesta a feromonas; b) participan en la integración de conductas emocionales, en especial las afiliativas; y, c) un aumento de la responsividad de esta conexión podría estar relacionada con situaciones de alarma, mientras que lo opuesto podría indicar alguna acción sedante y quizá ansiolítica. El análisis de la actividad basal y de los histogramas periéstimulo indicó que la administración de ácido palmítico redujo de manera significativa la actividad neuronal del núcleo septal lateral. Esta acción sobre la actividad neuronal espontánea se asemeja a las acciones de algunos fármacos ansiolíticos como el diazepam el cual produce una marcada atenuación de la actividad espontánea del septum y del hipotálamo lateral (Robinson y Wang, 1979), o bien el azolpidem que también disminuye la actividad neuronal septal por aumento en la actividad GABAérgica (Ujfalussy et al., 2007). En estudios previos de nuestro grupo de trabajo hemos demostrado que el líquido amniótico ejerce una acción tipo ansiolítica en ratas Wistar y que el ácido palmítico está presente en el líquido amniótico humano (Contreras et al., 2009a; 2009b). En el presente estudio se demuestra que este ácido graso disminuye la responsividad de las conexiones amigdalino septales, lo cual podría relacionarse con alguna acción o bien sedante o bien ansiolítica, posibilidades que quedan por explorar en diseños experimentales *ad hoc*.

*Agradecimiento: Donativo CONACyT (CB-2006-1, 61741); Beca CONACyT de posgrado para DIVH-235961y TMJ-205773; y, SNI 32755-AGGG y 754-CMC.

BIBLIOGRAFÍA

1. F. E. Regnier, "Semiochemicals-structure and function", Biol. Repro., Vol. 4, 3, 1971, pp. 309-326.
2. B. Schaal, G. Coureaud, D. Langlois, C. Giniès, E. Sémon, G. Perrier, "Chemical and behavioural characterization of the rabbit mammary pheromone", Nature, Vol. 424, 6944, 2003, pp. 68-72.
3. J. Morrow-Tesch, J.J. McGlone, "Sensory system and nipple attachment behavior in neonatal pigs", Physiol. Behav., Vol. 47, 1, 1990, pp.1-4.
4. K.A. Parfet, H.W. Gonyou, "Attraction of newborn piglets to auditory, visual, olfactory and tactile stimuli", J. Anim. Sci., Vol. 69, 1, 1991, pp.125-133.
5. P. Pageat, "Pig appeasing pheromones to decrease stress, anxiety and aggressiveness", US Patent No. 6,169,113, 2001.
6. G. Guiraudie-Capraz, M.C. Clomianny, P. Pageat, C. Malosse, A.H. Cain, P. Orgeur, P. Nagnan-Le Meillour, "Biochemical and chemical supports of a transnatal olfactory continuity", Chem. Senses, Vol. 30, 3, 2005, pp. 241-251.
7. F. Levy, P. Poindron, P. Le Neindre, "Attraction and repulsion by amniotic fluids and their olfactory control in the ewe around parturition", Physiol. Behav., Vol. 31, 5, 1983, pp. 687-692.



8. L. Marlier, B. Schaal, R. Soussignan, "Neonatal responsiveness to odor of amniotic and lacteal fluids: a test of perinatal chemosensory continuity", *Child. Dev.*, Vol. 69, 3, 1998, pp. 611-623.
9. P.G. Hepper, "Human fetal olfactory learning", *Int. Prenatal Perinatal Psychol. Med.*, Vol. 7, 2, 1995, pp.147-151.
10. C.M. Contreras, A.G. Gutiérrez-García, R. Mendoza-López, C. Díaz-Marte, "Similarities between fatty acid content in human amniotic fluid, colostrum, and milk", *En arbitraje*, 2009a.
11. C.M. Contreras, J.F. Rodríguez-Landa, A.G. Gutiérrez-García, R. Mendoza-López, J. Cueto-Escobedo, R.I. García-Ríos, C. Díaz-Marte, D. López-Muñoz, "Anxiolytic effect of human amniotic fluid in female wistar rats in the defensive burying test". *En arbitraje*, 2009b.
12. D.L. Nelson, M.M. Cox, "Lehninger Principles of Biochemistry", (Omega, Barcelona, 2005).
13. J.A. Amico, R.C. Mantella, R.R. Vollmer, X. Li, "Anxiety and stress responses in female oxytocin deficient mice", *J. Neuroendocrinol.*, Vol. 16, 4, 2004, pp. 319-324.
14. T. Dalgleish, "The emotional brain", *Nat. Rev. Neurosci.*, Vol. 5, 7, 2004, pp. 583-589.
15. T.P. Sheehan, M. Numan, "The septal region and social behavior", en *The behavioral neuroscience of the septal region* (Springer, New York, 2000), pp. 175-209.
16. R. Dantzer, G.F. Koob, R.M. Bluthé, M. Le-Moal, "Septal vasopressin modulates social memory in male rats", *Brain. Res.*, Vol. 457, 1, 1988, pp. 143-147.
17. C.M. Contreras, M.L. Marván, H. Lara-Morales, A. Barradas, J. Cachón, M.A. Guzmán-Sáenz, C. Márquez-Flores. "Clomipramine actions on firing rate in septal nuclei of the rat are not related to anaesthesia (urethane)". *Bol. Estud. Med. Biol.*, Vol. 39, 1-4, 1991, pp. 3-8.
18. J.H. Robinson, S.C. Wang, "Unit activity of limbic system neurons: effects of morphine, diazepam and neuroleptic agents", *Brain. Res.*, Vol. 166, 1, 1979, pp. 149-159.
19. B. Ujfalussy, T. Kiss, G. Orbán, W. E. Hoffmann, P. Erdi, M. Hajós, "Pharmacological and computational analysis of alpha-subunit preferential GABA (A) positive allosteric modulators on the rat septo-hippocampal activity", *Neuropharmacology*, Vol. 52, 3, 2007, pp. 733-743.