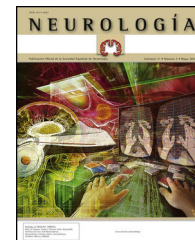




NEUROLOGÍA

www.elsevier.es/neurologia



ORIGINAL

Alteraciones motoras inducidas por la microinyección de linamarina en el hipocampo dorsal de la rata Wistar



E. Rivadeneyra-Domínguez^{a,*} y J.F. Rodríguez-Landa^{a,b}

^a Facultad de Química Farmacéutica Biológica, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México

^b Instituto de Neuroetología, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México

Recibido el 19 de octubre de 2014; aceptado el 27 de octubre de 2014

Accesible en línea el 15 de diciembre de 2014

PALABRAS CLAVE

Yuca;
Linamarina;
Neuropatía atáxica
tropical;
Konzo;
Nado lateral;
Incoordinación motriz

Resumen

Introducción: La yuca, *cassava* o mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) constituye uno de los alimentos básicos en regiones tropicales y subtropicales, por ser fuente importante de hidratos de carbono. No obstante, contiene compuestos cianogénicos, como linamarina y lotaustralina, que a nivel experimental se ha encontrado que afectan a estructuras cerebrales como el tálamo, la corteza piriforme y el hipocampo, entre otras, lo cual podría explicar algunas enfermedades neurológicas, como el konzo y la neuropatía atáxica tropical. Sin embargo, la participación del hipocampo en las alteraciones neurológicas asociadas a los componentes químicos de la yuca aún no ha sido identificada.

Método: Se incluyeron ratas macho de 3 meses de edad (cepa Wistar), distribuidas en 4 grupos (n=8 cada grupo): un grupo vehículo (1 µl de solución inyectable) y 3 grupos con linamarina (10, 15 y 20 mM). Las sustancias fueron microinyectadas intrahipocámpalmente (CA1) durante siete días consecutivos (cada 24 h) y los efectos fueron evaluados diariamente en las pruebas de actividad locomotora, rota-rod y nado.

Resultados: La microinyección de linamarina en el hipocampo dorsal produjo hiperactividad e incoordinación motora que fue acentuándose con los días de tratamiento. En la prueba de nado desplegaron la conducta de giro sobre su propio eje, a partir del cuarto día de microinyección.

Conclusión: La microinyección de linamarina en el hipocampo dorsal de la rata se asocia a alteraciones en la coordinación motora, lo cual indica la participación del hipocampo dorsal, entre otras estructuras cerebrales, en las alteraciones neurológicas asociadas al consumo inapropiado de la yuca en el ser humano.

© 2014 Sociedad Española de Neurología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: edrivadeneyra@uv.mx (E. Rivadeneyra-Domínguez).

KEYWORDS

Cassava;
Linamarin;
Tropical ataxic
neuropathy;
Konzo;
Lateral swimming;
Motor impairment

Motor impairments induced by microinjection of linamarin in the dorsal hippocampus of Wistar rats**Abstract**

Introduction: Cassava, also known as *yuca* or manioc (*Manihot esculenta* Crantz), is a staple food in tropical and subtropical regions since it is an important source of carbohydrates. Nevertheless, it contains cyanogenic compounds including lotaustralin and linamarin, which have been shown by experimental models to affect brain structures such as the thalamus, the piriform cortex, the hippocampus, and others. These findings may explain the presence of such neurological diseases as konzo and tropical ataxic neuropathy. However, hippocampal involvement in the neurological alterations associated with the chemical compounds in cassava has yet to be explored.

Method: Male Wistar rats (3 months old), were assigned to 4 groups (n = 8 per group) as follows: a vehicle-control group (receiving injectable solution 1 μ l) and three groups receiving linamarin (10, 15, and 20 mM). The substances were microinjected intrahippocampally (CA1) every 24 hours for 7 consecutive days, and their effects on locomotor activity, rotarod, and swim tests were assessed daily.

Results: Linamarin microinjected into the dorsal hippocampus produced hyperactivity and loss of motor coordination which became more evident as treatment time increased. In the swim test, rats treated with linamarin displayed lateral rotation beginning on the fourth day of microinjection.

Conclusions: Microinjection of linamarin into the dorsal hippocampus of the rat is associated with impaired motor coordination, suggesting that the dorsal hippocampus, among other brain structures, may be affected by the neurological changes associated with inappropriate consumption of cassava in humans.

© 2014 Sociedad Española de Neurología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

La yuca, *cassava* o mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) es uno de los alimentos básicos de origen vegetal en diversas regiones tropicales y subtropicales alrededor del mundo. Su cultivo es relativamente fácil y sus raíces son una fuente importante de hidratos de carbono y algunos micronutrientes indispensables para la nutrición¹. Desafortunadamente, también contiene heterósidos cianogénicos, como la linamarina (en un 90%) y la lotaustralina (en un 10%)², cuyo consumo en altas concentraciones se relaciona con enfermedades neurológicas caracterizadas por alteraciones en la motricidad y la cognición, principalmente³.

El consumo excesivo o inapropiado de yuca ha sido asociado con 2 enfermedades neurológicas: la neuropatía atáxica tropical (TAN) y la paraparesia epidémica espástica (konzo). La TAN es un síndrome de polineuropatía sensorial, ataxia sensorial, atrofia óptica bilateral y sordera bilateral descrito en Tanzania⁴, Sierra Leona⁵, Nigeria^{6,7} y en la India⁸. El konzo es una alteración neurológica caracterizada por daño en las motoneuronas superiores. Inicialmente, se produce una paratetraparesia espástica irreversible, no progresiva y simétrica⁹, caracterizada por espasticidad y debilidad progresiva de los miembros inferiores, produciendo incoordinación motora. Estas alteraciones neurológicas también han sido asociadas al consumo constante e inadecuado de yuca¹⁰. La toxicidad de los componentes cianogénicos de la yuca afectan principalmente a estructuras cerebrales involucradas en el procesamiento y la integración

de la memoria, las emociones, el control de las funciones viscerales, la olfacción y la motricidad, tales como el tálamo, la corteza piriforme, el hipotálamo y el hipocampo, entre otras¹¹.

El hipocampo es una estructura involucrada en la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas; por pertenecer al sistema de memoria emocional, parece tener una participación importante en la integración de respuestas motoras asociadas a eventos motivados^{12,13}. En este sentido, estudios en ratas han reportado que el consumo de semillas de la cíada *Dioon spinulosum*^{14,15} o la microinyección intrahipocampal de uno de sus metabolitos neurotóxicos (metilazoximetanol) inducen alteraciones motoras caracterizadas por el hundimiento y el giro sobre su propio eje en la prueba de nado^{15,16}. Similarmente, las ratas que recibieron un tratamiento con el jugo de la raíz de yuca (con un contenido de linamarina de 0,30 mg/2 ml) también desarrollaron alteraciones motoras, tales como incoordinación motora y nado lateral¹⁷, lo cual, al parecer, estuvo asociado, al menos parcialmente, con la disminución del número de neuronas en el área CA1 del hipocampo¹⁸. Sin embargo, el efecto de la microinyección de linamarina en el hipocampo dorsal sobre la actividad y la coordinación motora aún no ha sido explorado, por lo que en el presente trabajo se determinó el efecto de la microinyección intrahipocampal de linamarina sobre la actividad motora espontánea (prueba de actividad locomotora) y la coordinación motora (pruebas de rota-rod y nado) en la rata Wistar.

Métodos

Sujetos

Se utilizaron 32 ratas macho de 3 meses de edad de la cepa Wistar, con un peso entre 250-300 g al inicio de los experimentos. Se alojaron en cajas de acrílico translúcidas en un bioterio de estancia con temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) y ciclo de luz oscuridad de 12/12 h (la luz se encendió a las 7:00 am). El acceso al agua y al alimento fue *ad libitum*. Todas las manipulaciones experimentales se realizaron de acuerdo con los estándares éticos internacionales basados en la *Guide for Care and Use of Laboratory Animals*¹⁹ y nacionales basados en las *Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio*²⁰.

Cirugía estereotáxica

El implante unilateral de la cánula guía se realizó bajo anestesia profunda de acuerdo con estudios previos²¹. La cabeza de la rata fue fijada en un aparato estereotáxico (Stoelting, Wood Dale, Illinois, EE. UU.) y se procedió a realizar una incisión longitudinal en la piel para dejar al descubierto el cráneo. Tomando como referencia la sutura bregma, y de acuerdo con las coordenadas estereotáxicas del atlas de Paxinos y Watson²², se realizó un trépano en el cráneo con un taladro dental (Saeshin Dental Lab 35000 RPM, Corea del Sur) para implantar la cánula en el hipocampo dorsal ($A_p = -3,8\text{ mm}$, $L = -2\text{ mm}$, y $H = -2\text{ mm}$), área CA1. Después se descendió una cánula guía de acero inoxidable (8 mm de longitud, 0,7 mm de diámetro), la cual fue fijada al cráneo con acrílico dental (Arias Distribuidora Dental, Tlalnepan, México). Después del implante de la cánula transcurrieron 4 días de recuperación y se procedió a la microinyección intra-hipocámpal del vehículo o linamarina para evaluar su efecto en las pruebas conductuales.

Grupos experimentales y tratamientos

Las ratas fueron asignadas aleatoriamente a 4 grupos ($n = 8$, cada grupo): un grupo que recibió el vehículo (solución inyectable) y 3 grupos más que recibieron las diferentes concentraciones de linamarina (10, 15 y 20 mM), las cuales fueron calculadas considerando los estudios de Soler-Martín et al.². El vehículo o la linamarina fueron microinyectados durante 7 días consecutivos, cada 24 h, mediante una cánula guía (10 mm de longitud, 0,7 mm de $\varnothing$) construida a partir de una aguja calibre 32 $\times$ 7 (0,7 $\times$ 32 mm) 22 G $\times$ 1 1/4' de acero inoxidable, conectada a una jeringa Hamilton de 10 μl por medio de un tubo de polietileno. Mediante una bomba de infusión automatizada (KD Scientific, Holliston, Massachusetts, EE. UU.), se microinyectó un volumen de 1 μl a una velocidad constante de 0,1 $\mu\text{l}/\text{min}$, durante 10 min; bajo este procedimiento, las ratas se mantuvieron en libre movimiento. Al concluir la microinyección, se dejó reposar la cánula inyectora durante 5 min más para permitir la difusión de la sustancia microinyectada y evitar que regresara por capilaridad. Inmediatamente, las ratas fueron evaluadas en las pruebas de actividad locomotora, rota-rod o nado, según correspondiera.

Actividad locomotora

Consistió en colocar a la rata en una caja de acrílico opaco ($44 \times 33 \times 20\text{ cm}$), cuya base está dividida en cuadros de $11 \times 11\text{ cm}$. Se evaluaron: a) número de cuadros cruzados durante los 5 min de prueba. Se consideró como cuadro cruzado cuando la rata pasó al menos 3 cuartas partes de su cuerpo de un cuadro a otro, y b) número de conducta vertical, definida como los periodos en los que la rata adquiere una postura vertical con respecto al piso, apoyada en sus extremidades posteriores. Los cuadros cruzados se tomaron como un indicador de actividad motora espontánea, mientras que la conducta vertical se utilizó además para detectar posibles alteraciones en la coordinación motora.

Rota-rod

Las ratas fueron entrenadas en un rota-rod (LE 8300, LSI Letica, Panlab Scientific Instruments, Barcelona, España), durante 5 días, previos a la microinyección de los tratamientos, a una velocidad de 18 rpm. El día de la microinyección los animales fueron colocados en el rota-rod, donde se evaluó la latencia a la caída, que es el periodo que transcurre desde que la rata fue colocada en el rota-rod hasta que cayó del aparato. Esta variable permite identificar alteraciones en la coordinación motora y el equilibrio.

Prueba de nado

Consistió en colocar a la rata en un estanque de vidrio ($26 \times 29\text{ cm}$ de base, por 50 cm de altura) con agua a una temperatura de 25°C (± 1). El nivel de agua se ajustó de manera que la rata pudiera tocar el fondo del estanque con las extremidades posteriores y la cola. En esta prueba se evaluó el número de giros, definidos como los periodos en los cuales la rata no tiene desplazamiento y nadó girando sobre su propio eje^{14,16}.

Todas las sesiones de prueba en actividad locomotora y nado fueron videograbadas. La cuantificación de las variables en campo abierto fue realizada por 2 observadores independientes hasta llegar a una concordancia de al menos el 95%. La cuantificación de la variable en la prueba de nado se realizó mediante un software (ANY-maze 4.73. Stoelting, Wood Dale, Illinois, EE. UU.), en el cual se analizaron los vídeos.

Verificación del sitio de microinyección

Al finalizar las pruebas conductuales, todos los animales fueron eutanizados por sobredosis de pentobarbital (PISA-Agropecuaria, Guadalajara, México). Fueron perfundidos por vía intracardiaca con 100 ml de solución salina fisiológica (NaCl al 0,9%), seguido de 100 ml de formaldehído al 30% (J.T. Baker, Ecatepec, México). Se marcó el sitio de microinyección con azul de Evans; se extrajeron los cerebros y se realizaron cortes gruesos para verificar el sitio de microinyección bajo microscopio de luz y tomando como referencia el atlas estereotáxico de Paxinos y Watson²². Solo los datos obtenidos de las ratas en las que se identificó el correcto implante de las cánulas en CA1 de hipocampo fueron incluidos para el análisis estadístico.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante ANOVA de 2 vías para muestras repetidas tomando como factores el tratamiento y los días de tratamiento. Cuando se alcanzaron valores de $p \leq 0,05$, se aplicó la prueba *post hoc* de Student-Newman-Keuls. Los resultados son presentados como la media $\pm$ el error estándar.

Resultados

Actividad locomotora

El análisis del número de cuadros cruzados reveló diferencias significativas de acuerdo con el tratamiento ($F [3,168] = 2,735$, $p < 0,010$), días de tratamiento ($F [6,168] = 1,687$, $p < 0,050$) y en la interacción de factores ($F [18,168] = 4,835$, $p < 0,010$). La prueba *post hoc* reveló que las diferentes concentraciones de linamarina incrementaron significativamente ($p < 0,05$) el número de cuadros cruzados a partir del día 4 de tratamiento respecto al día uno y al grupo vehículo en la sesión correspondiente. El grupo vehículo redujo significativamente esta variable a partir del día 4 y se mantuvo así hasta el final del experimento (fig. 1a).

Por otro lado, el análisis del número de conducta vertical reveló diferencias significativas de acuerdo al tratamiento ($F [3,168] = 3,618$, $p < 0,015$), días de tratamiento ($F [6,168] = 2,367$, $p < 0,050$) y en la interacción de factores ($F [18,168] = 15,689$, $p < 0,001$). La prueba *post hoc* mostró, que independientemente de la concentración de linamarina, significativamente ($p < 0,05$) se incrementó el número de conducta vertical a partir del día 4 de tratamiento respecto al grupo vehículo en la sesión correspondiente, mientras que en los días 5 a 7 también lo fue respecto al día uno del mismo grupo. El grupo vehículo redujo significativamente esta variable a partir del día 4 y se mantuvo así hasta el día 7 (fig. 1b).

Rota-rod

El análisis de la latencia a la caída del rota-rod reveló diferencias significativas de acuerdo al tratamiento ($F [3,168] = 28,585$, $p < 0,001$), los días de tratamiento ($F [6,168] = 3,162$, $p < 0,050$) y a la interacción de factores ($F [18,168] = 2,735$, $p < 0,011$). La prueba *post hoc* reveló que, independientemente de la concentración de linamarina, la latencia a la caída del rota-rod se acortó significativamente ($p < 0,05$) a partir del día 3 con respecto al día uno de tratamiento y del grupo vehículo en la sesión correspondiente, un efecto que se acentuó con los días de tratamiento. El grupo vehículo no modificó esta variable durante los 7 días de tratamiento (fig. 2).

Prueba de nado

El análisis del número de giros sobre el propio eje en la prueba de nado reveló diferencias significativas de acuerdo al tratamiento ($F [3,168] = 2,793$, $p < 0,040$) y días de tratamiento ($F [6,168] = 12,566$, $p < 0,050$), así como en la

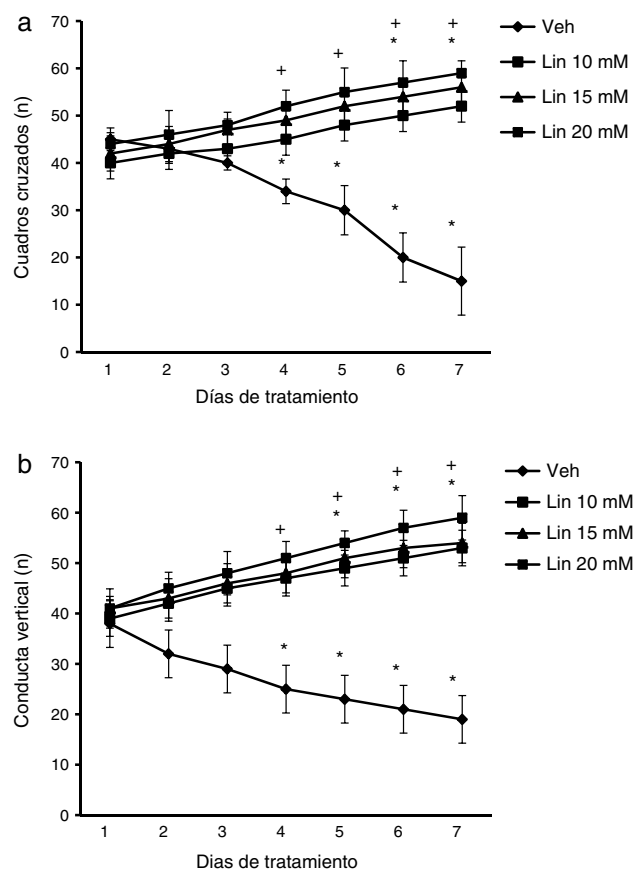


Figura 1 Actividad locomotora. Independientemente de la concentración de linamarina (Lin), a partir del cuarto día de tratamiento incrementó el número de cuadros cruzados (a) y el número de conducta vertical (b), un efecto contrario al observado en el grupo vehículo (Veh).

* $p < 0,05$ vs. primer día de tratamiento del mismo grupo.

** $p < 0,05$ vs. sesión respectiva del grupo vehículo. ANOVA de 2 vías para muestras repetidas, *post hoc* Student-Newman-Keuls.

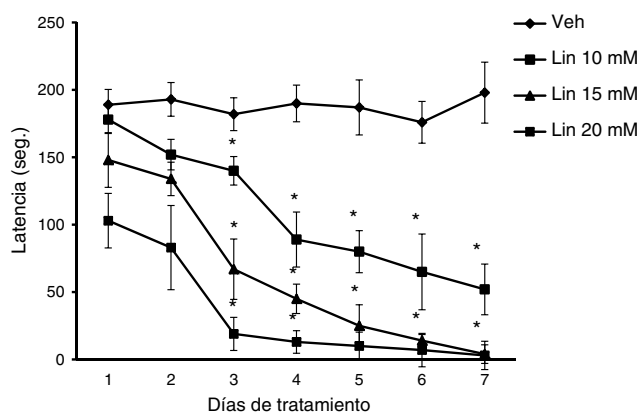


Figura 2 Rota-rod. Independientemente de la concentración de linamarina (Lin) microinyectada en el hipocampo dorsal, la latencia a la caída del rota-rod se acortó gradualmente a lo largo del estudio, un efecto que no ocurrió en el grupo vehículo (Veh).

* $p < 0,05$ vs. grupo vehículo en la sesión correspondiente y el día uno de cada grupo experimental. ANOVA de 2 vías para muestras repetidas, *post hoc* Student-Newman-Keuls.

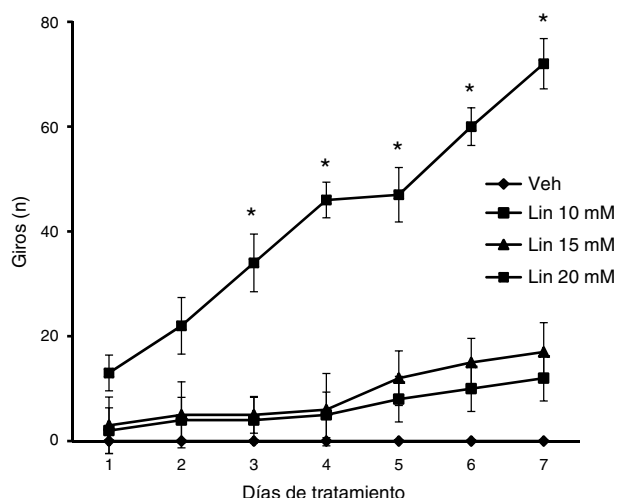


Figura 3 Prueba de nado. Solo la concentración de linamarina (Lin) 20 mM incrementó significativa y gradualmente la conducta de giro, siendo significativo a partir del día 3 de tratamiento. El grupo vehículo (Veh) no desplegó esta conducta a lo largo del estudio.

* $p < 0,05$ vs. día uno de tratamiento del mismo grupo y de la sesión respectiva del grupo vehículo. ANOVA de 2 vías para muestras repetidas, *post hoc* Student-Newman-Keuls.

interacción de factores ($F [18,168] = 2,370$, $p < 0,025$). La prueba *post hoc* reveló que solo la concentración de 20 mM de linamarina incrementó gradual y significativamente ($p < 0,05$) la conducta de giro a partir del día 3 de tratamiento respecto al día uno del mismo grupo y al resto de los grupos en la sesión correspondiente. El grupo vehículo no desplegó la conducta de giro a lo largo del estudio (fig. 3).

Discusión

En el presente estudio, la administración intrahipocámpal de linamarina produjo deterioro de la actividad y la coordinación motora, lo cual podría estar reproduciendo a nivel experimental las alteraciones motoras identificadas en el ser humano que ha desarrollado enfermedades neurológicas asociadas al consumo inadecuado de la yuca. La actividad motora es utilizada frecuentemente para cuantificar el desplazamiento, la exploración y la ansiedad, bajo ciertas circunstancias experimentales^{23,24}. En el presente estudio, el uso de la prueba de actividad motora permitió identificar un estado de hiperactividad en las ratas, caracterizado por el incremento en el número de cuadros cruzados y en el número de conducta vertical. Estas modificaciones conductuales fueron producidas por la microinyección de linamarina en el hipocampo dorsal, un efecto que no estuvo relacionado con la manipulación quirúrgica o la microinyección, puesto que el grupo vehículo no presentó estas alteraciones; lo que concuerda con estudios previos^{16,21}. El aumento de estas 2 conductas indica que la microinyección de linamarina en el hipocampo dorsal produjo daño neuronal que impide posiblemente la consolidación de la memoria visuoespacial, lo cual podría relacionarse con el aparente estado de «hiperactividad motora»; lo anterior

puede sustentarse en el hecho de que los animales intactos o tratados con vehículo y evaluados repetidamente en la prueba de actividad locomotora gradualmente reducen la actividad motora y la conducta vertical²⁵, como ocurrió en el grupo vehículo del presente trabajo. Esto ha sido explicado como un proceso de aprendizaje y adaptación de la rata a las condiciones de la caja, por lo que deja de ser novedosa, disminuye la exploración y, por lo tanto, la actividad motora espontánea²⁶. Sin embargo, es posible que las ratas tratadas con linamarina, al tener daño neuronal en el hipocampo, deterioren la capacidad de aprendizaje y la consolidación de la memoria. De ser el caso, la rata no reconocería las condiciones de la caja de prueba y la exploraría como si fuera un ambiente novedoso o desconocido. Cabe señalar que el incremento de la actividad locomotora en sesiones repetidas en la prueba de locomoción también ha sido identificado en ratas microinyectadas en el hipocampo dorsal con neurotóxicos derivados de las cicadas o con la administración oral del jugo de yuca que contiene linamarina^{15–17,27}. Estas observaciones en la rata podrían coincidir con los reportes clínicos en pacientes que han desarrollado enfermedades neurológicas asociadas al consumo inadecuado de yuca, que, además de presentar alteraciones motoras, también desarrollan deterioro del aprendizaje y la memoria^{3,28}.

Como se mencionó anteriormente, los pacientes con neuropatías asociadas al consumo de yuca desarrollan problemas de coordinación motriz^{29,30}, entre otras cosas. En el presente estudio las ratas tratadas con las diferentes concentraciones de linamarina tuvieron una corta latencia a la caída del rota-rod, lo cual fue dependiente del tiempo de tratamiento. En esta prueba se evalúan la coordinación motora y el equilibrio de las ratas. Se acepta que un animal intacto (sano) permanecerá más tiempo sobre el rodillo al mantener la coordinación de sus extremidades y el equilibrio³¹. Es por ello que esta prueba es usada para medir el grado de lesiones en el sistema nervioso central y del efecto que producen las sustancias que interfieren en la coordinación motora y el equilibrio³². En este caso, un animal con alguna lesión del sistema nervioso central o tratado con neurotóxicos o sedantes, que interfieren en la actividad motora, tendrán una corta latencia a la caída del rota-rod^{33,34}, como ocurrió en el presente estudio. En efecto, cuando las ratas recibieron las diferentes microinyecciones de linamarina en el hipocampo dorsal, desarrollaron la conducta de giro en la prueba de nado. Esta conducta ha sido propuesta como un indicador de incoordinación motriz en la cual el animal no puede controlar sus extremidades para nadar normalmente, como lo hace una rata control¹⁴. Cabe señalar que la conducta de giro sobre su propio eje también es detectada cuando se microinyectan en el hipocampo dorsal neurotóxicos derivados de las cicadas, como el metilazoximetanol^{15,16}. Es importante comentar que la conducta de giro en la prueba de nado no estuvo relacionada con algún daño en el sistema vestibular, debido a que cuando ocurre este daño se puede detectar la conducta de giro en la prueba de nado, pero también en la prueba de actividad locomotriz, donde las ratas caminan en círculos^{12,35}, lo cual no ocurrió en el presente estudio. Este hecho indica que la alteración conductual identificada en el nado está relacionada con algún daño a nivel motor y no vestibular. La conducta de giro ha sido asociada a alteraciones en la

coordinación motora de las extremidades posteriores de la rata³⁵, por lo que los datos encontrados en el presente trabajo podrían estar reproduciendo las alteraciones motoras que presentan los pacientes con TAN y konzo inducidos, aparentemente, por el consumo inadecuado de yuca^{3,10,30}.

Finalmente, aunque en el presente estudio no se identificó el mecanismo por el cual ocurren las alteraciones motoras tras la microinyección de linamarina en el hipocampo dorsal, es factible ofrecer una posible explicación. La linamarina y otros compuestos cianogénicos tienen la capacidad de producir una sobreexcitación neuronal en hipocampo producida por este neurotóxico, ya que sobreestimula al hipocampo, lo que a su vez sobreactiva los receptores NMDA de tipo ionotrópico, conduciendo a la excitotoxicidad y, por lo tanto, a la muerte neuronal, lo que podría explicar parcialmente lo que ocurre en humanos con las patologías de TAN y konzo^{36–38}. Estas observaciones abren nuevas perspectivas de estudio que permitan identificar los mecanismos neuronales que subyacen a las alteraciones neurológicas producidas por los componentes químicos de la yuca y sus derivados.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Este estudio fue apoyado parcialmente por el Cuerpo Académico Biología, Química y Funcionalidad Molecular de Metabolitos Vegetales (UV-GC-235) de la Universidad Veracruzana.

Bibliografía

- Cock JH. Cassava: A basic energy source in the tropics. *Science*. 1984;4575:755–62.
- Soler-Martin C, Riera J, Seoane A, Cutillas B, Ambrosio S, Boadas-Vaello P, et al. The targets of acetone cyanohydrin neurotoxicity in the rat are not the ones expected in an animal model Konzo. *Neurotoxicol Teratol*. 2010;2:289–94.
- Adamolekun B. Neurological disorders associated with cassava diet: A review of putative etiological mechanisms. *Metab Brain Dis*. 2011;26:79–85.
- Haddock DR, Ebrahim GJ, Kapur B. Ataxic neurological syndrome found in Tangayika. *Br Med J*. 1962;2:1442–3.
- Rowland H. Neuropathy in Sierra Leone. *J Trop Med Hyg*. 1963;66:181–7.
- Monekosso GL, Annan WG. Clinical epidemiological observations on an ataxic syndrome in Western Nigeria. *Trop Geogr Med*. 1964;4:316–23.
- Osuntokun BO. An ataxic neuropathy in Nigeria: A clinical, biochemical and electrophysiological study. *Brain*. 1968;91:215–48.
- Madhusudan M, Menon MK, Ummer K, Radhakrishnan K. Clinical and etiological profile of tropical ataxic neuropathy in Kerala, South India. *Eur Neurol*. 2008;60:21–6.
- Nzwalo H, Cliff J. Konzo: From poverty, cassava and cyanogen intake to toxic-nutritional neurological disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5:1051–71.
- Tylleskär T, Howlett WP, Rwiza HT, Aquilonius SM. Konzo: A distinct disease entity with selective upper motor neuron damage. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*. 1993;56:638–43.
- Boadas-Vaello P, Riera J, Llorens J. Behavioral and pathological effects in the rat define two groups of neurotoxic nitriles. *Toxicol Sci*. 2005;88:456–66.
- Richter-Levin G, Akirav I. Emotional tagging of memory formation in the search for neural mechanisms. *Brain Res Rev*. 2003;43:247–56.
- García-Becerra AM. Efectos de la inyección intrahipocampal de escopolamina sobre el comportamiento en el laberinto en cruz elevado. *Suma Psicol*. 2009;16:19–29.
- Rivadeneira-Domínguez E, Saavedra M, Rodríguez-Landa JF. El tratamiento con progesterona previene las alteraciones motoras inducidas por la intoxicación con semillas de cicada (*Dioon spinulosum*) en la rata macho. *Rev Toxicol*. 2009;26:36–40.
- Rivadeneira-Domínguez E, Rodríguez-Landa JF. Las cícadas y su relación con algunas enfermedades neurodegenerativas. *Neurología*. 2013;29:517–22.
- Saavedra M, Rivadeneira-Domínguez E, Rodríguez-Landa JF. Alteraciones motoras inducidas por la microinyección intrahipocampal de metilazoximetanol en ratas macho forzadas a nadar. *Arch Neurol (Méx)*. 2011;16:186–92.
- Rivadeneira-Domínguez E, Vázquez-Luna A, Rodríguez-Landa JF, Díaz-Sobac R. Neurotoxic effect of linamarin in rats associated with cassava (*Manihot esculenta* Crantz) consumption. *Food Chem Toxicol*. 2013;59:230–5.
- Rivadeneira-Domínguez E, Vázquez-Luna A, Rodríguez-Landa JF, Díaz-Sobac R. A standardized extract of *Ginkgo biloba* prevents locomotion impairment induced by cassava juice in Wistar rats. *Front Pharmacol*. 2014;5:213, <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2014.00213>.
- National Research Council Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: A report of the Institute of Laboratory Animal Resource Committee on the care and Use of Laboratory Animals. NIH Publication No. 85-23. Washington D.C.: U.S. Department of Health and Human Services; 1996.
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. México D.F.: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación; 1999.
- Rodríguez-Landa JF, Contreras CM, García-Ríos RI. Allopregnanolone microinjected into the lateral septum or dorsal hippocampus reduces immobility in the forced swim test: Participation of the GABA_A receptor. *Behav Pharmacol*. 2009;20:614–22.
- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic Press; 1998.
- Bronikowski AM, Carter PA, Swallow JG, Girard IA, Rhodes JS, Garland T. Open-field behavior of house mice selectively bred for high voluntary wheel-running. *Behav Genet*. 2001;31:309–16.
- Adjene JO, Ezenwanne EB. The effects of chloroquine on the open field locomotion in adult Wistar rats. *Afr Scientist*. 2008;9:25–30.
- Shors TJ, Townsend DA, Zhao M, Kozorovitskiy Y, Gould E. Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal dependent learning. *Behav Neurosci*. 2001;115:1175–87.
- Markowska A, Lukaszewska I. Open-field behavior in rats with frontomedial cortical, neostriatal or hippocampal lesions. *Acta Neurobiol Exp*. 1981;41:197–210.
- Eilam D. Open-field behavior withstands drastic changes in arena size. *Behav Brain Res*. 2003;142:53–62.
- Adamolekun B. Etiology on Konzo, epidemic spastic paraparesis associated with cyanogenic glycosides in cassava: Role of thiamine deficiency. *J Neurol Sci*. 2010;296:30–3.

29. Ernesto M, Cardoso AP, Nicala D, Mirione E, Massaza F, Cliff J, et al. Persistent konzo and cyanide toxicity from cassava in northern Mozambique. *Acta Trop*. 2002;82: 357–62.
30. Llorens J. Enfermedades neurológicas asociadas al consumo de variedades de mandioca con alto contenido en gluconitrilos. *Endocrinol Nutr*. 2004;51:418–25.
31. Carter RJ, Morton J, Dunnet SB. Motor coordination and balance in rodents. *Curr Protoc Neurosci*. 2001;8:8–12.
32. Bonilla C, Otero L, Aguayo C, Rodríguez A, Zurita M, Vaquero J. Terapia celular para el tratamiento del daño cerebral traumático: utilidad de diferentes escalas de valoración funcional. *Rev Trauma*. 2009;20:4.
33. Deacon Robert MJ. Measuring motor coordination in mice. *J Vis Exp*. 2013;75:e2609, <http://dx.doi.org/10.3791/2609>.
34. Abada YK, Nguyen HP, Schreiber R, Ellenbroek B. Assessment of motor function, sensory motor gating and recognition memory in a novel BACHD transgenic rat model for Huntington disease. *PLoS One*. 2013;8:e68584, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0068584>.
35. Ritcher A, Ebert U, Nobrega JN, Vallbacka JJ, Fedrowitz M, Loscher W. Immunohistochemical and neurochemical studies on nigral and striatal functions in the circling (ci) rat, a genetic animal model with spontaneous rotational behavior. *Neuroscience*. 1999;89:461–71.
36. Schwarcz R, Foster AC, French ED, Whetsell C. Excitotoxic models for neurodegenerative disorders. *Life Sci*. 1984;35:19–32.
37. Peña F, Tapia R. Seizures and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus *in vivo*; role of glutamate and GABA mediated neurotransmission and of ion channels. *Neuroscience*. 2003;101:547–61.
38. Ayala GX, Tapia R. Expression of heat shock protein 70 induced by 4-aminopyridine through glutamate-mediated excitotoxic stress in rat hippocampus *in vivo*. *Neuropharmacology*. 2003;45:649–60.