



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE PUEBLA**

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

LICENCIATURA EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

DEPARTAMENTO DE FARMACIA

SEMINARIO DE RESULTADOS:

**EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DEL BSS- 4 Y DE CAFÉINA SOBRE LA
RECUPERACIÓN DE LA MEMORIA ESPACIAL DE LARGO PLAZO Y LA ACTIVIDAD
DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EN EL HIPOCAMPO DE RATA**

PRESENTA

pQFB. ELVI GIL LIEVANA

DIRECTORES DE TESIS

DRA. MARÍA ISABEL MARTÍNEZ GARCÍA

LABORATORIO DE NEUROQUÍMICA

DR. JESÚS SANDOVAL RAMÍREZ

LABORATORIO DE SÍNTESIS Y MODIFICACION DE PRODUCTOS NATURALES

ABRIL 2014

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Estrés oxidativo	1
1.2 Enzimas antioxidantes.....	3
1.2.1 Superóxido dismutasa	3
1.2.2 Glutación peroxidasa.....	3
1.2.3 Catalasa	4
1.2.4 Regulación transcripcional de las enzimas antioxidantes	4
1.3 Sapogeninas esteroideas	6
1.4 El compuesto colestánico BSS-4.....	9
1.5 La cafeína	11
1.6 La memoria y el aprendizaje.....	17
1.7 El hipocampo y la memoria espacial	18
1.7.1 Laberinto de Barnes	19
1.7.2 Reconocimiento de objetos.....	20
2. JUSTIFICACIÓN	21
3. HIPÓTESIS	22
4. OBJETIVO GENERAL	22
4.1 Objetivos particulares	22
5. DIAGRAMA DE TRABAJO	23
6. MÉTODO GENERAL	24
6.1 Animales	24
6.2 Preparación del BSS-4 y cafeína.....	24
6.3 Administración crónica	25
6.4 Pruebas conductuales	25
6.4.1 Laberinto de Barnes	25
6.4.2 Prueba de reconocimiento de objetos.....	26

6.5 Pruebas bioquímicas	27
6.5.1 Preparación de las muestras	27
6.5.2 Determinación de la actividad enzimática de la superóxido dismutasa	27
6.5.3 Determinación de la actividad enzimática de la glutatión la peroxidasa	29
6.5.4 Determinación de la actividad enzimática de la catalasa	30
6.6 Análisis estadístico	31
7. RESULTADOS	32
7.1 Experimento 1	32
7.2 Experimento 2	38
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	¡Error! Marcador no definido.
9. CONCLUSIONES	50
10. REFERENCIAS	51

1. INTRODUCCIÓN

A continuación se brindan conocimientos básicos de temas relacionados con el trabajo de tesis.

1.1 Estrés oxidativo

Un radical libre se define como cualquier especie química que posee uno o más electrones desapareados en el último orbital de la capa de electrones, por lo tanto son especies altamente reactivas; tal es el caso de las especies reactivas de oxígeno (ROS) que son compuestos oxidantes que derivan del oxígeno molecular (O_2).

El grupo de las ROS incluye radicales libres como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxilo (HO^{\cdot}), hidroperóxido (HO_2^{\cdot}), óxido nítrico (NO^{\cdot}), así como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). En las neuronas y en las células gliales las ROS pueden ser generadas a partir de varias fuentes; la cadena transportadora de electrones es la principal contribuyente a nivel mitocondrial. Las ROS participan en las reacciones de Fenton, Haber-Weiss y la activación de las enzimas óxido nítrico sintasa (NOS), NADPH oxidasa, monoamino oxidasa (MAO) y xantina oxidasa (XO). En la reacción de Fenton el H_2O_2 es catalizado y produce radicales HO^{\cdot} . En la reacción de Haber-Weiss se generan radicales HO^{\cdot} a partir de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 (figura 1) (Dias y cols., 2013).

El estrés oxidativo es definido como el desequilibrio que existe entre la producción de radicales libres y los mecanismos de defensa antioxidante (Noworyta-Sokolowska y cols., 2013). El estrés oxidativo produce diferentes respuestas celulares, la principal es el daño a nivel del ácido desoxirribonucleico (ADN), y en la mitocondria daño que activa vías de señalización que promueven mecanismos de muerte celular por apoptosis o necrosis (Halliwell, 2012). Un indicador del estrés oxidativo es la inducción de las defensas antioxidantes y/o el aumento de los niveles de ROS endógenos.

La lipoperoxidación de las membranas de donde los radicales libres sustraen átomos de hidrógeno a las moléculas de los ácidos grasos poliinsaturados genera efectos sobre la transducción de señales, la plasticidad y la capacidad de recuperación celular (Steckert y cols., 2010). La formación de ROS puede acelerarse debido a diversas condiciones de estrés ambiental como la radiación ultravioleta, altas intensidades de luz o temperaturas extremas.

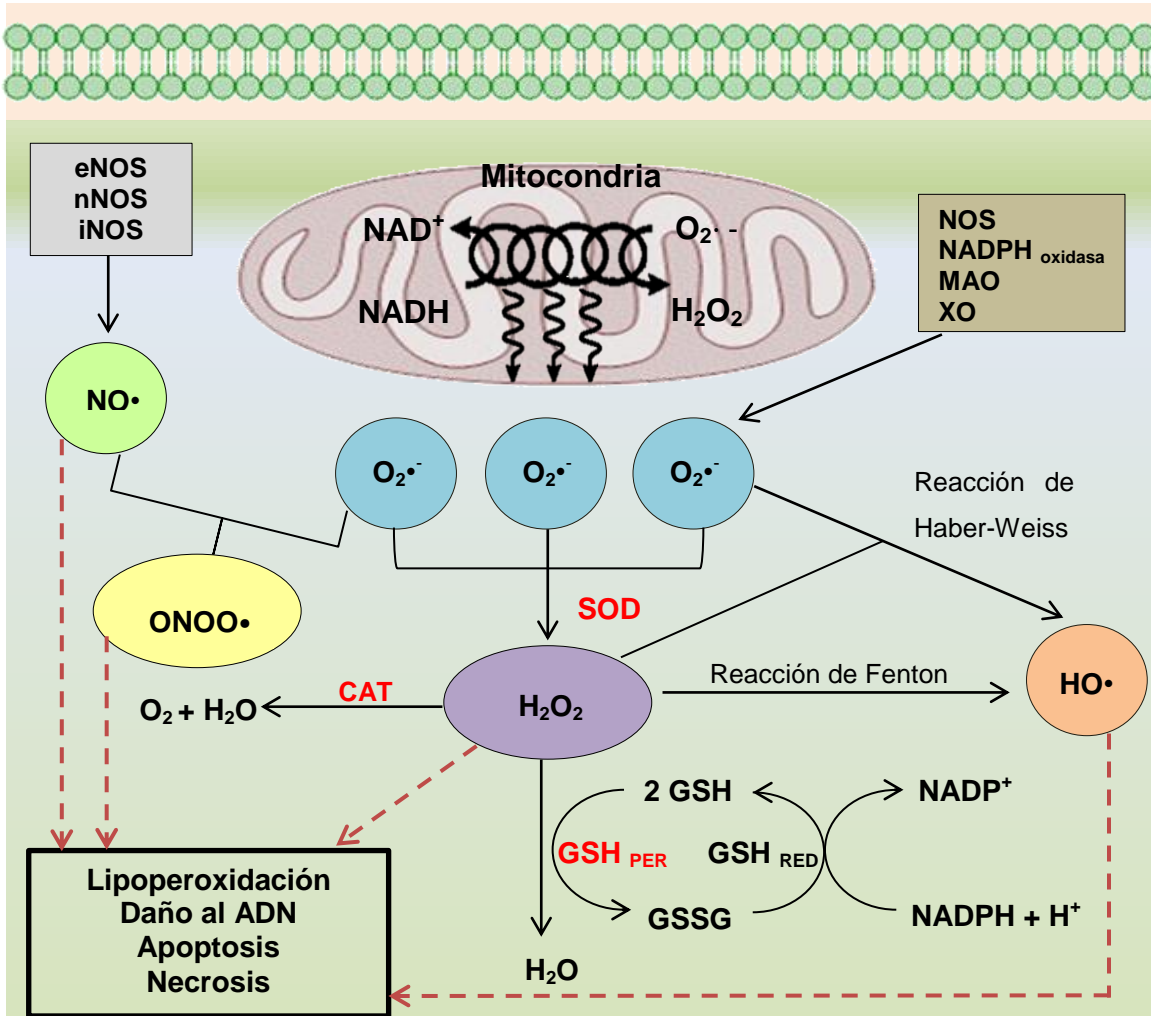


Figura 1. Esquema del mecanismo de acción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en la neurona. Óxido nítrico sintasa (NOS), monoamino oxidasa (MAO), xantina oxidasa (XO), nicotinamida adenina dinucleótido en su forma oxidada (NAD) y reducida (NADH), anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroxilo (HO^{\bullet}), peróxido de hidrogeno (H_2O_2), óxido nítrico (NO^{\bullet}), anión peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$), catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG), glutatión peroxidasa (GSH_{PER}), glutatión reductasa (GSH_{RED}), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma oxidada ($NADP^+$) y reducida ($NADPH^+$) (Modificado de Zecca y cols., 2004).

La producción y acumulación de ROS se incrementa por el envejecimiento y es un denominador común en muchas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson, Alzheimer y la esquizofrenia, ya que conduce al daño celular severo que origina una disfunción fisiológica y muerte celular (Scandalios, 2005).

1.2 Enzimas antioxidantes

Un antioxidante es cualquier sustancia que en concentraciones bajas, en comparación con la de un sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de ese sustrato (Halliwell, 2012).

En condiciones fisiológicas los radicales libres son inmediatamente desactivados por enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GPX) y la catalasa (CAT). Los β -carotenos, tocoferoles, flavonoides y el ácido ascórbico, son antioxidantes no enzimáticos que también participan en la degradación de especies oxidantes (Noworyta-Sokolowska y cols., 2013).

1.2.1 Superóxido dismutasa

La función de la superóxido dismutasa (SOD) es acelerar la dismutación del radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), producido durante un proceso oxidativo energético, en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. Como la diferencia entre el oxígeno molecular y el radical superóxido es un solo electrón, la enzima debe tener especificidad para realizar su función catalizadora. Existen cuatro isoformas de SOD en células eucariotas, la Cu/Zn-SOD se encuentra en el citosol, Mn-SOD en las mitocondrias, Fe-SOD en células procariontas y Ni-SOD en bacterias. (Perry y cols., 2010).

1.2.2 Glutatión peroxidasa

La enzima glutatión peroxidasa (GPX) protege a las células de los radicales libres que se forman por la descomposición del peróxido. Los componentes lipídicos de la célula son especialmente susceptibles a las reacciones con los radicales libres, lo que da como resultado la lipoperoxidación. La enzima GPX reduce los peróxidos de alcoholes utilizando glutatión, por lo tanto previene la formación de radicales libres; además, cataliza la reducción del H_2O_2 y una amplia variedad de peróxidos orgánicos (R-OOH) a alcoholes estables (R-OH) y agua, usando al glutatión celular como agente reductor. La GPX es una enzima tetramérica que consta de cuatro monómeros de 22 kDa; cada uno de ellos contiene una selenocisteína en el sitio activo. La selenocisteína participa directamente en la donación de electrones al sustrato de peróxido y se oxida en el proceso, después la enzima utiliza al glutatión reducido como un donador de hidrogeno para regenerar la selenocisteína (Flohé y Günzler, 1984).

1.2.3 Catalasa

La catalasa (CAT) es una enzima antioxidante presente ubicuamente en las células aeróbicas de mamíferos y no mamíferos que contienen un sistema de citocromo. Se aisló inicialmente en el hígado de buey y más tarde de otras fuentes como la sangre, bacterias y plantas. La enzima contiene 4 grupos de ferrihemoproteína por cada molécula, tiene una masa molecular de 240 kDa; su actividad varía mucho entre los diferentes tejidos, la actividad más alta la presenta el hígado y el riñón, la más baja la presentan los tejidos conectivos. En células eucariotas la catalasa se concentra en los peroxisomas (microcuerpos). Esta enzima cataliza la descomposición de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. El peróxido de hidrógeno se forma en la célula eucariota como un subproducto de diversas reacciones de oxidación y por la acción de la SOD. El peróxido de hidrógeno es altamente perjudicial para la célula y su acumulación provoca la oxidación del ADN, proteínas y lípidos, lo que conduce a mutagénesis y muerte celular. La eliminación del H₂O₂ de la célula por la acción de la catalasa proporciona protección contra el estrés oxidativo (Zámocký y Koller, 1999).

1.2.4 Regulación transcripcional de las enzimas antioxidantes

Las modificaciones del estado oxido-reducción en la célula activan diversos factores de transcripción que regulan la respuesta antioxidante. El mecanismo de defensa implica la inducción coordinada de un número de genes que codifican a enzimas antioxidantes, factores neurotróficos y proteínas de supervivencia celular; incrementando los niveles de expresión en respuesta al estrés oxidativo (Huang y cols., 2000; Texel y Mattson, 2011).

Cuando los ligandos correspondientes se unen a los receptores acoplados a proteínas G (GPCR), receptores del factor de crecimiento (TGF) y receptores de insulina (IR) se desencadenan diferentes respuestas moleculares en las neuronas. La activación del factor de transcripción NFR2 se da cuando las cinasas PERK, PKC, MAPK y la vía de señalización del fosfatidilinositol-3-quinasa y la proteína quinasa B (PI3K/AKT) actúan sobre el complejo formado por la proteína citoplasmática y el factor de transcripción Keap1-NRF2, liberando así NRF2 que se trasloca al núcleo donde se une al elemento de respuesta antioxidante (ARE). Por otro lado, PI3K/AKT también activa al factor nuclear kappa B (NFkB) e inhibe al factor de transcripción FOXO3 para poder reducir la respuesta al estrés celular. El incremento del estrés oxidativo, generado principalmente por el

aumento en los niveles de ATP y ROS en la mitocondria, induce la fosforilación de FOXO3 y permite su traslocación al núcleo donde se une con un promotor. La activación de todas estas vías de señalización permite que los factores de transcripción NRF2, NFkB y FOXO3 codifiquen la expresión de enzimas antioxidantes como Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, GPX y CAT (figura 2) (Martin y cols., 2004; Min y cols., 2011; Dal-Cim y cols., 2012).

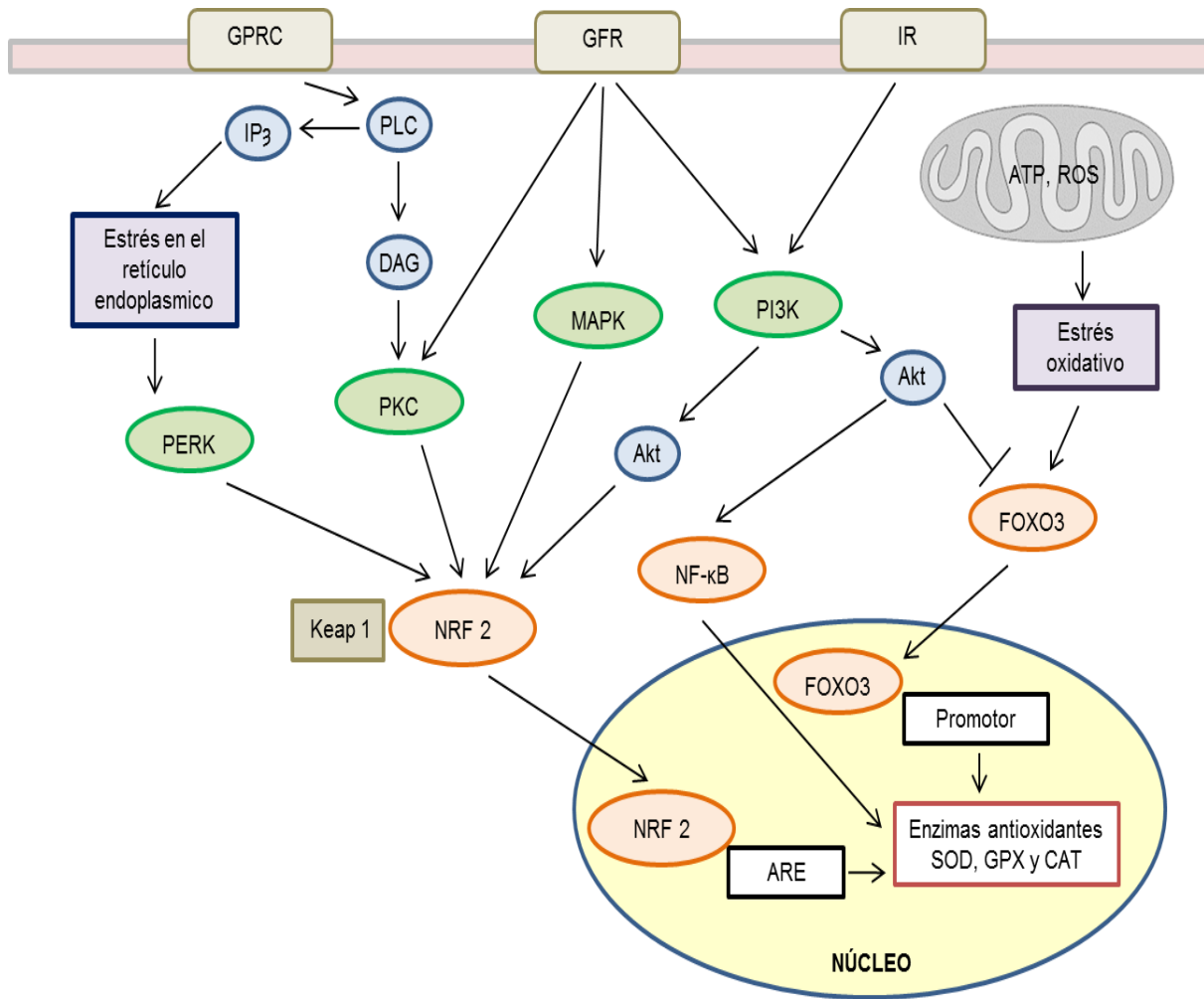


Figura 2. Vía de señalización para la regulación transcripcional de las enzimas antioxidantes. En las neuronas, cuando los ligandos correspondientes se unen a los receptores acoplados a proteínas G (GPCR), receptores del factor de crecimiento (TGF) y receptores de insulina (IR) se desencadenan diferentes vías de señalización a través de las cinasas PKC, MAPK, PI3K y PERK para activar a los factores de transcripción como NRF2, NFkB y FOXO3 que se translocan al núcleo y codifican la expresión de SOD, GPX y CAT. (Modificado de Mattson y Cheng, 2006).

1.3 Sapogeninas esteroidales

Las saponinas son compuestos que se encuentran ampliamente distribuidos en plantas, la mayoría de ellas presentan propiedades medicinales, por esta razón existe un gran interés en este tipo de compuestos y sus análogos, así como en el estudio de su caracterización estructural y propiedades biológicas. Las sapogeninas esteroidales como diosgenina (1), hecogenina (2) y sarsasapogenina (3) (figura 3) son productos naturales obtenidos a partir de saponinas (Fernández-Herrera y cols., 2009).

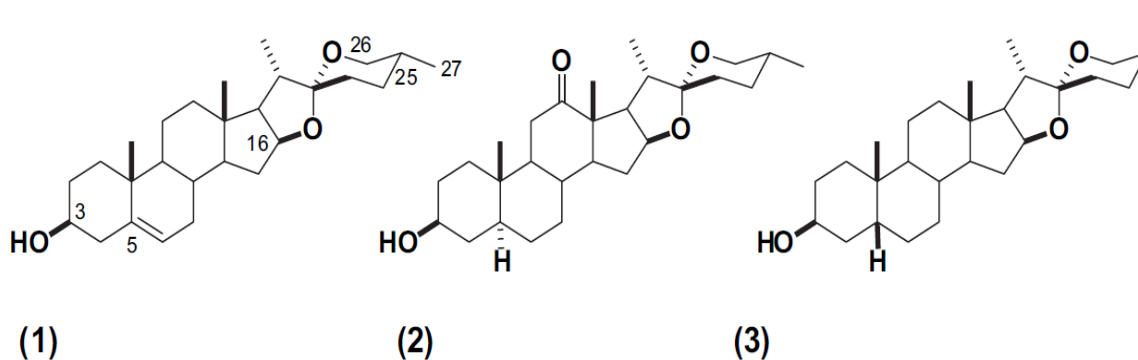


Figura 3. Estructura química de sapogeninas esteroidales.

En los experimentos realizados por Chiu y cols., (2011), la administración de diosgenina por vía oral durante 4 semanas mostró un efecto neuroprotector en ratones seniles inducidos con D-galactosa. En el laberinto acuático de Morris, los animales administrados con diosgenina tuvieron un menor tiempo de latencia para encontrar la plataforma de escape, mostrando una mejora en el aprendizaje y la memoria espacial en comparación con los ratones seniles sin tratamiento (figura 4).

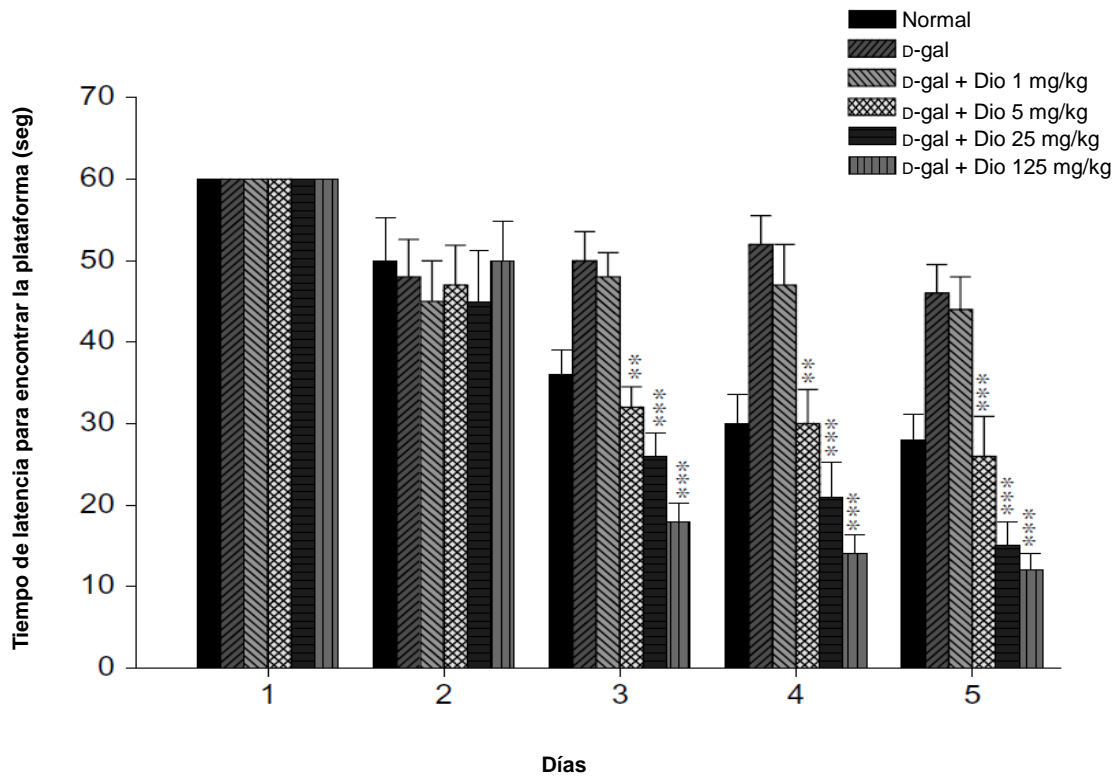


Figura 4. Tiempo de latencia para encontrar la plataforma de escape en el laberinto acuático de Morris. Los resultados indican la mejora en la memoria y aprendizaje de los ratones seniles administrados con diosgenina (Chiu y cols., 2011).

La diosgenina disminuye los niveles de malondialdehido (MDA) y aumenta la actividad de enzimas antioxidantes como SOD y GPX en el cerebro de ratones tratados con D-galactosa (figura 5).

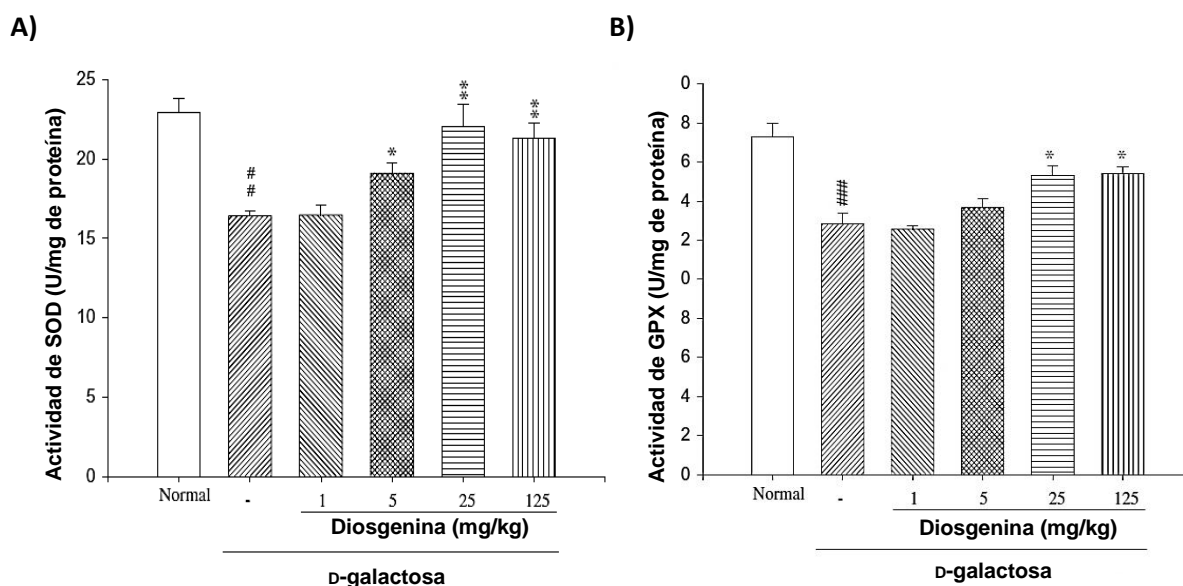


Figura 5. Efecto de la diosgenina sobre la actividad de enzimas antioxidantes en el cerebro de ratones seniles inducidos con D-galactosa. **A)** Superóxido dismutasa (SOD). D-gal ^{##} $p < 0.01$ comparado con el grupo normal. ^{**} $p < 0.01$ comparado con el grupo D-galactosa ($n=10$). **B)** Glutación peroxidasa (GPX). D-gal ^{###} $p < 0.001$ comparado con el grupo normal. ^{*} $p < 0.05$ comparado con el grupo D-galactosa ($n=10$) (Chiu y cols., 2011).

Por otro lado, Pari y cols., (2012) reportaron que la diosgenina administrada por vía oral durante 28 días, disminuye el estrés oxidativo en el tejido aórtico de ratas diabéticas. Los autores encontraron una disminución de la lipoperoxidación y una mejora en el estado antioxidante debido a un aumento en la actividad de enzimas antioxidantes, como catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutación peroxidasa (GPX), glutación reductasa (GR) y glutación S-transferasa (GST) (figura 6).

Grupos	Unidades/mg de proteína				
	CAT	SOD	GPX	GR	GST
Control normal	5.80	6.38	4.11	2.91	0.96
Normal + Dg (40 mg/kg)	5.41	5.91	4.22	2.44	0.86
Control diabética	3.51	4.37	1.97	0.79	0.55
Diabética + Dg (40 mg/kg)	5.41	5.75	3.15	1.97	0.75

Figura 6. Aumento de la actividad de enzimas antioxidantes en ratas diabéticas administradas con diosgenina (Pari y cols., 2012).

1.4 El compuesto colestánico BSS-4

El triacetato de 22-oxocolest-5-en-3 β ,16 β ,26-triilo (BSS-4), es un compuesto colestánico que se obtiene cuando sapogeninas esteroidales como la diosgenina son tratadas con anhídrido acético (Ac_2O) y eterato de trifluoruro de boro ($\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$), a temperatura de 0 a 5 °C (rendimiento del 80-85%) (Figura 7) (Fernández-Herrera y cols., 2009).

El compuesto colestánico BSS-4, se obtuvo en el Laboratorio de síntesis y modificación de productos naturales, de la Facultad de Ciencias Químicas, bajo la dirección del Dr. Jesús Sandoval Ramírez.

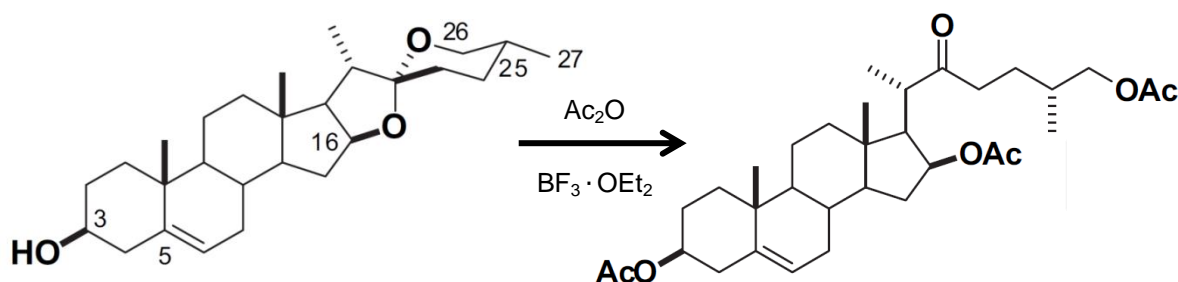


Figura 7. Síntesis de BSS-4 a partir de diosgenina (Fernández-Herrera y cols., 2009).

Estudios realizados en el laboratorio de Neuroquímica, indican que la administración intraperitoneal de 1.5 mg/kg de BSS-4 en ratas íntegras aumenta la longitud dendrítica y el número de dendritas produciendo un probable efecto trófico (figura 8). Por otro lado, en un modelo excitotóxico la administración intraperitoneal de 0.5, 0.25 y 0.125 mg/kg de BSS-4 detiene el daño, con un probable efecto neuroprotector que se deduce del incremento en la longitud dendrítica y número de dendritas (figura 9) (Trejo, 2013).

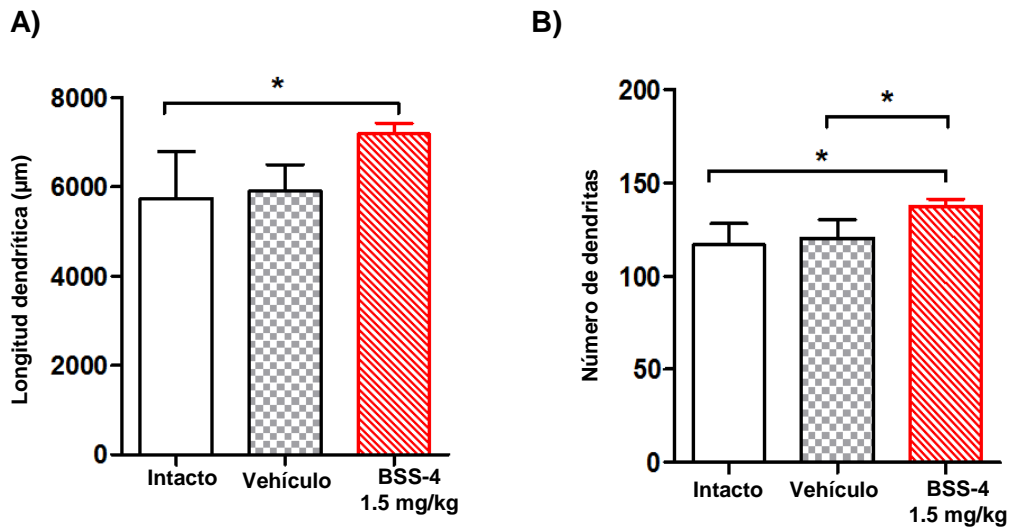


Figura 8. Los grupos de ratas íntegras administradas con dosis de 1.5 mg/kg de BSS-4 presentan un aumento en longitud dendrítica (**A**, ANOVA no paramétrica de Kruskal–Wallis de comparaciones múltiples, $*p < 0.05$) y número de dendritas (**B**, ANOVA paramétrica de una vía post-hoc Tuckey $*p < 0.05$) (Trejo, 2013).

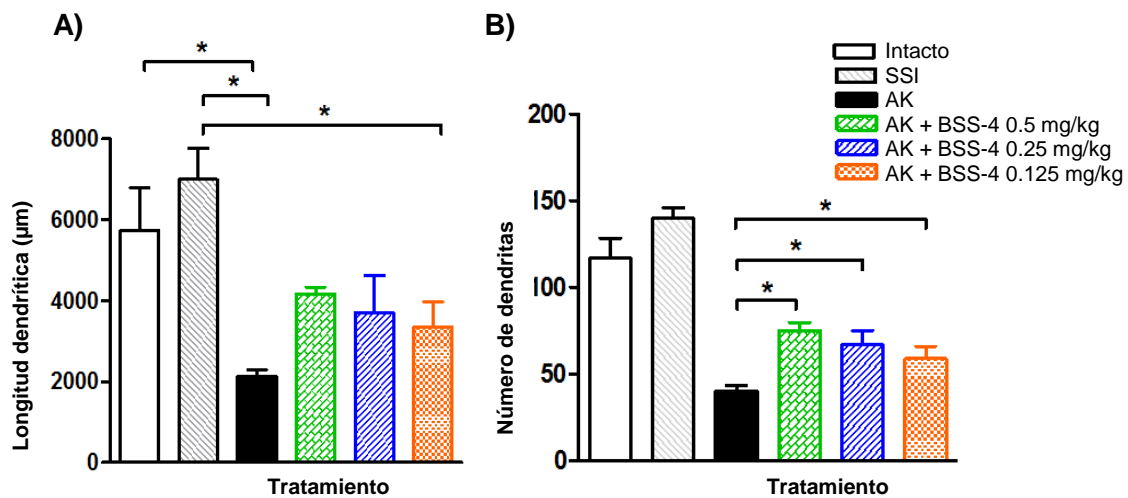


Figura 9. A) Longitud dendrítica (ANOVA no paramétrica de Kruskal–Wallis de comparaciones múltiples, $*p < 0.05$) y **B)** número de dendritas (ANOVA paramétrica de una vía post-hoc Tuckey $*p < 0.05$) en los grupos de ratas lesionadas que fueron administradas con dosis de 0.5, 0.25 y 0.125 mg/kg de BSS-4 (Trejo, 2013).

1.5 La cafeína

La cafeína es la sustancia psicoactiva más estudiada en el mundo, sin embargo continúa provocando controversia si su uso está asociado con consecuencias adversas o benéficas para la salud. Se ha demostrado que la cafeína y sus metabolitos (figura 10) tienen efectos antioxidantes y estas propiedades están relacionadas con sus acciones neuroprotectoras. Por otro lado, se ha postulado que existe una relación entre el consumo de cafeína y el riesgo de desarrollar enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer o Parkinson. Los estudios *in vivo* con administraciones crónicas de cafeína sugieren que este compuesto aumenta la actividad de enzimas antioxidantes en el cerebro, el hígado y el corazón (Noschang y cols., 2009; Prasanthi y cols., 2010; Abreu y cols., 2011).

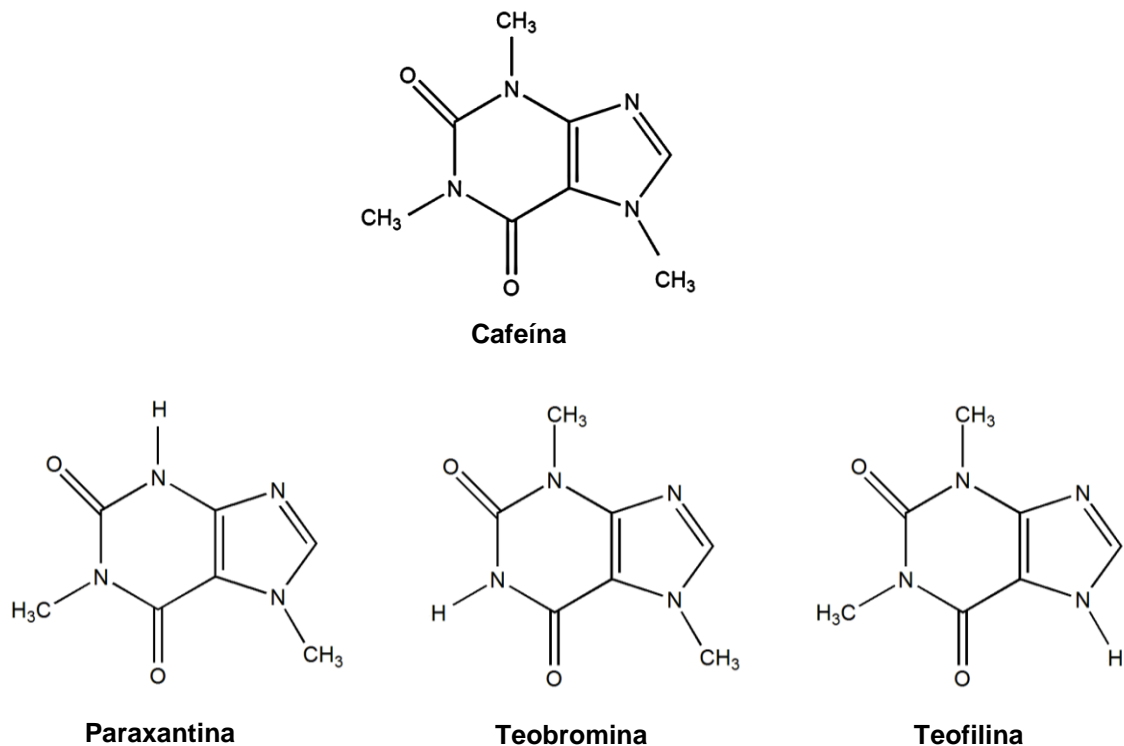


Figura 10. Estructura química de cafeína y sus metabolitos (Tomado de Lee, 2000).

La absorción de cafeína es completa y la vía de administración no altera las concentraciones plasmáticas en animales. Para dosis menores de 10 mg/kg la vida media de cafeína va de 0.7-1.2 h en rata y ratón. Se metaboliza en el hígado para formar dimetil y monometil xantinas, ácido úrico, alantoína y derivados de uracilo. La cafeína por su característica hidrofóbica, atraviesa todas las membranas biológicas incluyendo barrera hematoencefálica y placentaria. La dosis letal 50 (DL₅₀) para rata es de 200 mg/kg (Fredholm y cols., 1999).

La cafeína es un antagonista no selectivo de los receptores de adenosina A₁ y A_{2A}, y muestra menor afinidad por los receptores A_{2B} y A₃ (Agostinho y cols., 2000). Cuando la cafeína se une a los receptores A₁ y A_{2A} acoplados a proteínas G_i y G_s respectivamente, provoca la inhibición de la adenilato ciclasa, aumentando los niveles de ATP que bloquean a los canales de K⁺, el aumento de K⁺ intracelular provoca un cambio en el potencial de membrana que permite la apertura de los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje, lo que desencadena la liberación de glutamato, éste al ser vertido en la sinapsis se une a los receptores NMDA y AMPA. La activación del receptor AMPA permite la entrada de Na⁺ que despolariza a la célula, este cambio de potencial de membrana libera al receptor NMDA del ion Mg²⁺ que lo mantenía bloqueado facilitando la entrada de Ca²⁺. La activación de CaMKII por el Ca²⁺ desestabiliza los filamentos de actina que son reorganizados y elongados por la Arc. Por otro lado, la cafeína inhibe a la fosfodiesterasa 3 que hidroliza a AMPc a sus formas no cíclicas por lo tanto, el AMPc se acumula en las células y activa a PKA que fosforila a los factores de transcripción como CREB, c-Fos, IEGs y AP-1 que codifican la expresión de enzimas antioxidantes y la estimulación de neurotrofinas que participan en los mecanismos moleculares del aprendizaje y la memoria promoviendo la plasticidad neuronal (figura 11) (Fisone y cols., 2004; Landolt y cols, 2012; Bekinschtein y cols., 2014).

Los receptores A₁ y A_{2A} son altamente expresados en el sistema nervioso central; los A₁ se encuentran ampliamente distribuidos en el hipocampo, la corteza cerebral y el cerebelo mientras que los A_{2A} son abundantes en el cuerpo estriado dorsal, el núcleo *accumbens* y el tubérculo olfatorio (Kalda y cols., 2006).

Noschang y cols. (2009) estudiaron el efecto de la administración crónica de cafeína (40 días) sobre el sistema antioxidante en diferentes regiones en cerebro de ratas estresadas y no estresadas. La administración se llevó a cabo por vía oral (0.3 y 1.0 g/l), la cafeína fue disuelta en el agua que se les ofreció a los animales para beber. Fueron evaluadas las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), la actividad de enzimas antioxidantes como la SOD, GPX y CAT en el hipocampo, el cuerpo estriado y la corteza cerebral. En ese estudio no se encontró diferencia significativa en la determinación de TBARS y la actividad de las enzimas antioxidantes en el hipocampo, sin embargo la administración crónica de cafeína induce un aumento en la actividad de SOD y CAT en esta estructura cerebral (figura 12), mientras que en el cuerpo estriado y en la corteza cerebral aumenta la actividad SOD y GPX respectivamente.

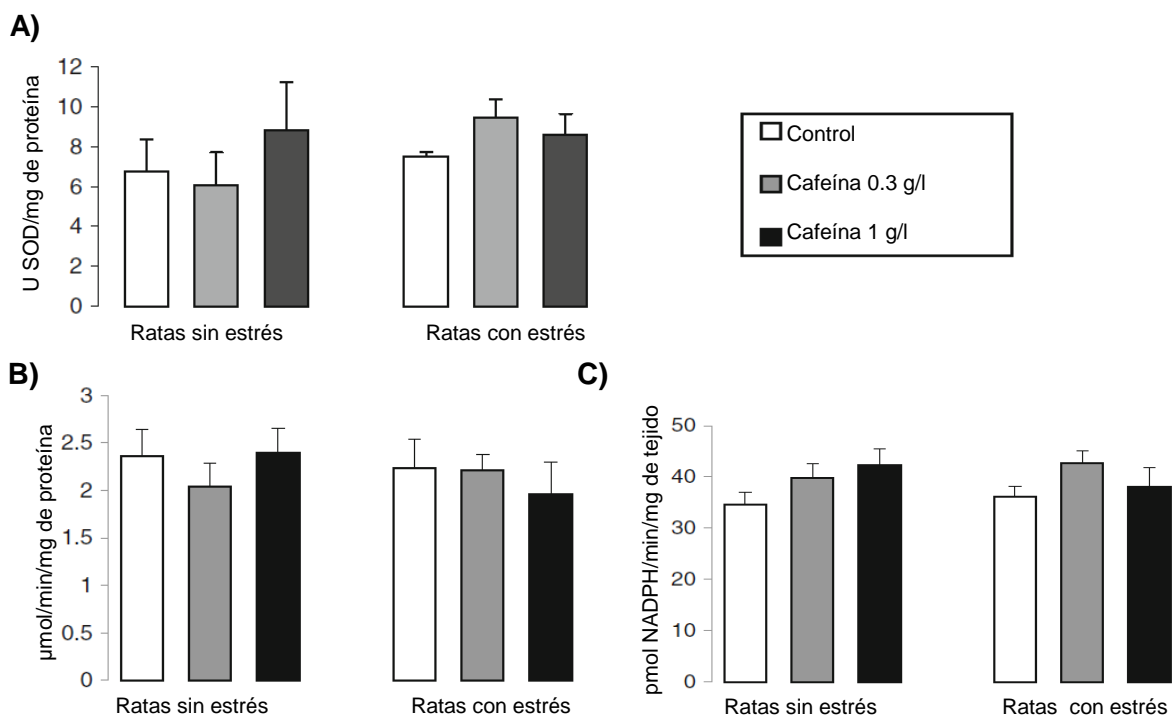


Figura 12. Efecto del consumo crónico de la cafeína sobre la actividad de enzimas antioxidantes: **A)** SOD, **B)** CAT y **C)** GPX en el hipocampo de ratas sin estrés y con estrés. La prueba estadística ANOVA de dos vías no muestra diferencia significativa entre los grupos ($p > 0.05$) (Noschang y cols. 2009).

El estudio desarrollado por Abreu y cols. (2011) evaluó el efecto de la administración crónica de café (3% y 6%) y cafeína (0.04% y 0.08%) sobre la función cognitiva y la modulación del sistema antioxidante. Los resultados muestran que los grupos con tratamiento presentaron una mejor consolidación en la memoria espacial de largo plazo en comparación con el grupo control (figura 13). El índice de discriminación de objetos se calculó dividiendo el tiempo empleado por los animales para reconocer el objeto nuevo entre el tiempo total dedicado a explorar los dos objetos, el objeto viejo y el nuevo.

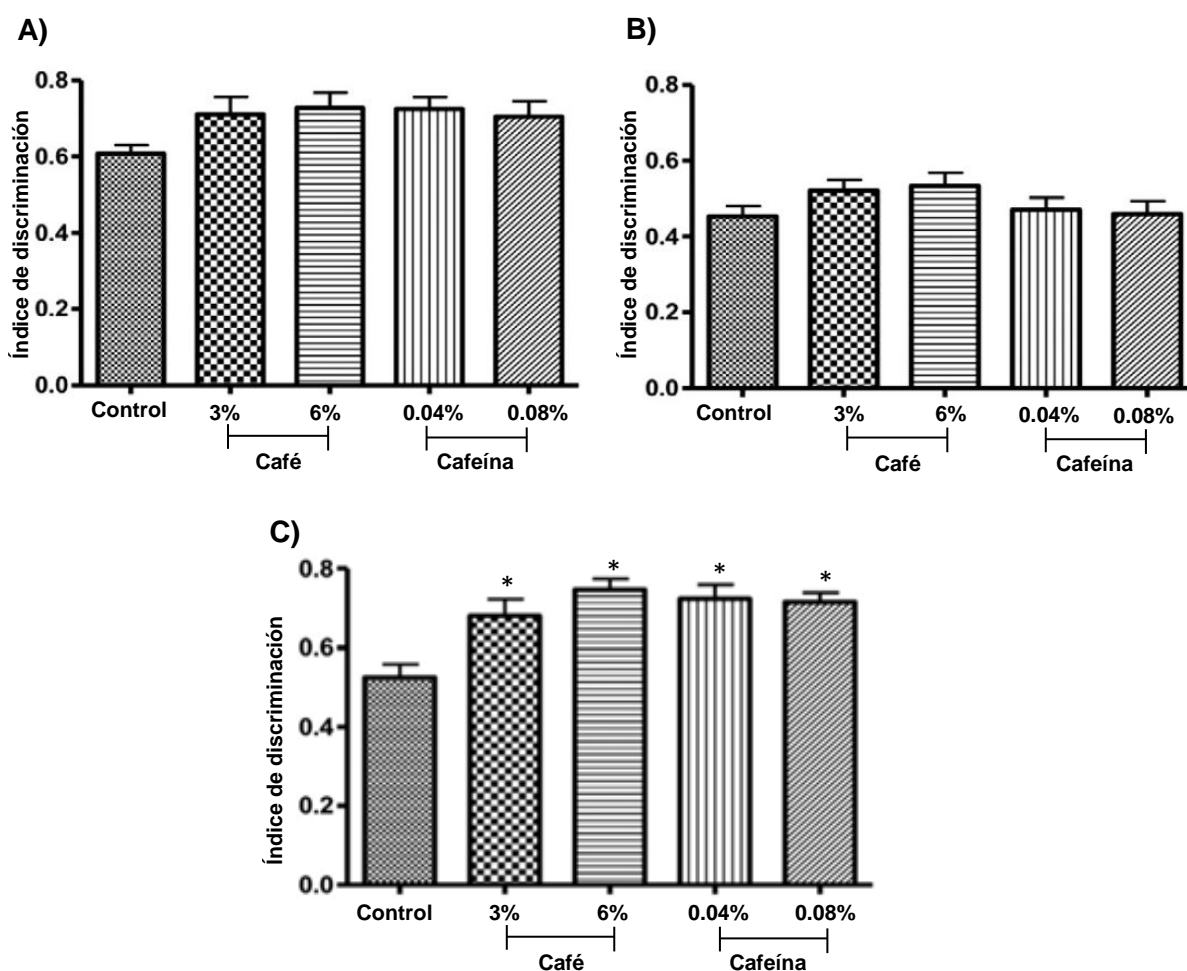


Figura 13. Efecto de la administración crónica de café y cafeína por vía oral en la tarea de reconocimiento de objetos. **A)** Primer ensayo, **B)** segundo ensayo, 90 min después y **C)** tercer ensayo, 24 h después. El índice de discriminación se calculó como el tiempo empleado por cada animal que explora el objeto nuevo dividido entre el tiempo total dedicado a explorar los dos objetos (Abreu y cols., 2011).

El consumo crónico de cafeína disminuye la lipoperoxidación de las membranas, aumenta la concentración de glutatión, un potente antioxidante endógeno e incrementa la actividad de GSH, GR y SOD (figura 14). Se ha demostrado que la cafeína se une a los receptores de adenosina, los cuales están involucrados en la regulación de la producción de radicales libres en las neuronas y otros sistemas biológicos. La cafeína presenta una acción protectora ante el estrés oxidativo y mejora la ejecución en la prueba de reconocimiento de objetos.

Grupos	TBARS	GSH	GPX	GR	SOD
	(nmol/mg de proteína)	(nmol/mg de proteína)	(μ mol/mg de proteína)	(μ mol/mg de proteína)	(U/mg de proteína)
Control	2.37 \pm 0.22	7.55 \pm 0.67	10.28 \pm 0.99	31.23 \pm 3.20	1.56 \pm 0.09
3% café	1.33 \pm 0.07 *	8.44 \pm 0.68	9.96 \pm 0.77	47.20 \pm 3.76 *	1.73 \pm 0.13
6% café	1.31 \pm 0.08 *	12.66 \pm 0.52 *	12.01 \pm 1.01	47.55 \pm 4.56 *	2.29 \pm 0.18 *
0.04% cafeína	1.48 \pm 0.09 *	9.88 \pm 0.55	10.55 \pm 0.72	49.76 \pm 1.66 *	2.52 \pm 0.25 *
0.08% cafeína	1.79 \pm 0.12 *	11.99 \pm 1.13 *	12.30 \pm 1.01	50.58 \pm 4.97 *	2.42 \pm 0.20 *

Figura 14. La administración crónica de café y cafeína en ratas disminuye las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) e incrementa la actividad de las enzimas antioxidantes como GSH, GR y SOD. (ANOVA y prueba de Duncan * p <0.05) (Abreu y cols., 2011).

Los efectos benéficos de la cafeína sobre la memoria, se deben principalmente a los receptores A_1 y su capacidad de modular la transmisión glutamatérgica, especialmente en la plasticidad dependiente del receptor de NMDA, en el control de la apoptosis y en el metabolismo cerebral. Todo lo anterior, sugiere que el consumo de cafeína es una estrategia profiláctica y puede ser una opción terapéutica para muchas enfermedades neurodegenerativas crónicas que producen déficits de memoria (Ferre y cols, 2008).

Sin embargo, Shukitt-Hale y cols., (2013) reportan que la administración por vía oral de cafeína no muestra efectos en la mejora de la memoria y el aprendizaje en ratas de edad avanzada, por lo tanto sugieren que los beneficios neuroprotectores del café no se deben a la cafeína por sí sola, sino más bien a los polifenoles y a otros compuestos bioactivos contenidos en él. Concluyen que el café tiene efectos positivos sobre la cognición y el comportamiento psicomotor en el envejecimiento.

Así mismo, Jang y cols., (2013) reportaron que la administración oral por sonda nasogástrica de café instantáneo descafeinado inhibe el deterioro de la memoria inducido por la escopolamina, la cual se evaluó en la tarea del laberinto acuático de Morris y la prueba de evitación pasiva. El café instantáneo descafeinado suprime la elevación del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y la estimulación del factor nuclear kB (NF-kB) inducidos por la escopolamina en el hipocampo de rata. Estos hallazgos sugieren que el café descafeinado puede prevenir la pérdida de memoria a través de la inhibición de la activación del TNF- α y NF-kB.

1.6 La memoria y el aprendizaje

El aprendizaje es el proceso mediante el cual se adquieren conocimientos sobre el entorno y la memoria es el proceso por el cual el conocimiento del entorno es codificado, almacenado y recuperado. El aprendizaje modifica el comportamiento posterior, mientras que la memoria permite recordar experiencias pasadas. Por otro lado, la cognición es un término muy amplio que se aplica a los procesos como la memoria, la asociación, el lenguaje, la atención, la formación de conceptos y la resolución de problemas (Sharma y cols., 2010).

Existen dos clases de aprendizaje, asociativo y no asociativo. En el aprendizaje asociativo el sujeto aprende una relación entre dos estímulos o entre un estímulo y un comportamiento. El laberinto de Barnes y el reconocimiento de objetos son tareas conductuales que permiten evaluar el aprendizaje asociativo. El aprendizaje no asociativo se produce cuando se expone al animal, una o varias veces a un solo tipo de estímulo. Hay dos tipos de aprendizaje no asociativo: la habituación y sensibilización (Squire y Zola, 1996; Talpos y cols., 2008).

En términos generales la memoria puede ser clasificada en dos grandes grupos: declarativa y no declarativa. La memoria declarativa se refiere a la información que se transmite o expresa convencionalmente y la memoria no declarativa representa las habilidades de percepción que no se pueden transmitir verbalmente. La memoria declarativa depende del hipocampo y el lóbulo temporal medial, mientras que la no declarativa está relacionada con la amígdala, el cerebelo, el estriado y las vías reflejas (Squire y Zola, 1996; Eichenbaum, 2004).

Otra clasificación frecuente de la memoria es de corto y de largo plazo. La memoria de corto plazo permite el almacenamiento de una cantidad limitada de información durante un periodo corto de tiempo, por otro lado la memoria de largo plazo activa mecanismos neuronales que permiten almacenar una gran cantidad de información durante un periodo de tiempo indefinido (Moscovitch y cols., 2006).

1.7 El hipocampo y la memoria espacial

El hipocampo es una estructura cerebral que participa en los procesos de aprendizaje y memoria, así como en el déficit cognitivo relacionado con la edad (Stefanacci y cols., 2000; Corkin, 2002).

La memoria espacial involucra a la memoria no declarativa (procesal), declarativa (semántica y recuerdos episódicos), así como la memoria de corto y largo plazo. Cuando un animal explora un nuevo espacio, las neuronas del hipocampo emiten un patrón de despolarización, lo que permite codificar el sentido de ubicación y reflejar la información mediante una representación interna del espacio que lo rodea (Van Dam y cols., 2006). Las conexiones que el hipocampo establece, permiten mediar los pasos iniciales en la conversión de la memoria espacial de corto plazo a memoria de largo plazo. Durante el aprendizaje de una nueva tarea, el giro dentado y la región de CA3 del hipocampo, reciben la información proveniente de los lóbulos temporal y parietal a través de la corteza entorrinal. El giro dentado produce una representación dispersa del aprendizaje, favoreciendo que la región de CA3 codifique la información para elaborar una nueva representación. La región de CA3, también participa en la memoria de corto plazo, permitiendo la recuperación de la información. Por último, las conexiones de las neuronas de CA1 recodifican la información de la región de CA3 permitiendo que se lleve a cabo el proceso de consolidación, por medio de las colaterales de Schaffer (figura 15) (Carrillo-Mora y cols., 2009; Rendeiro y cols., 2009).

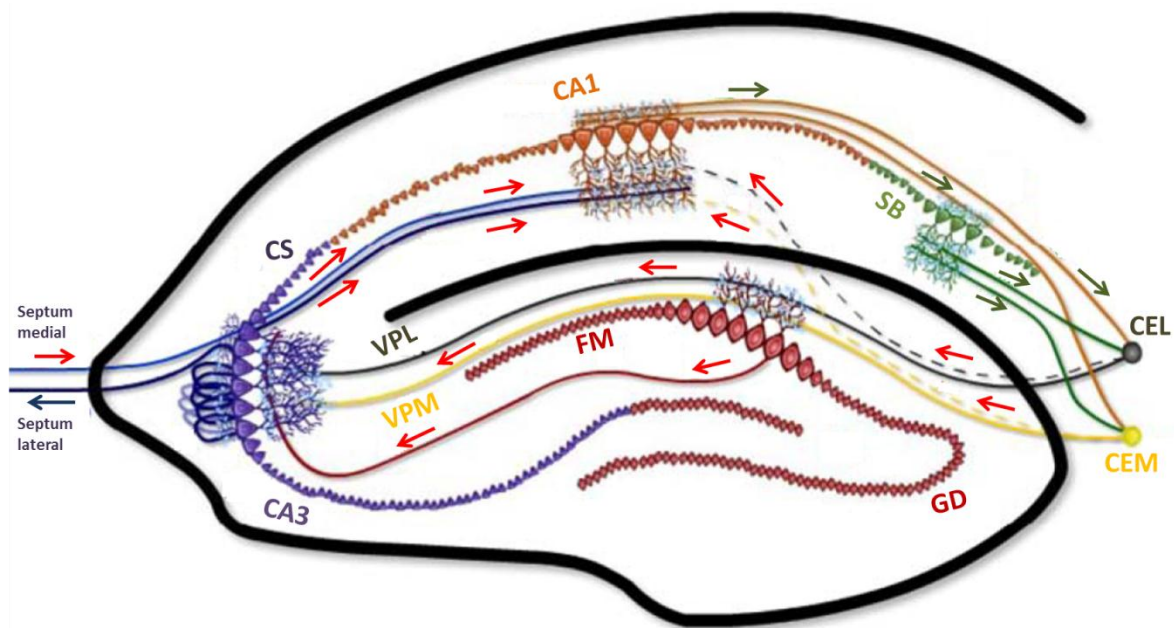


Figura 15. Las neuronas de la capa II de la corteza entorrinal, formada por la corteza entorrinal medial (CEM) y lateral (CEL), envían proyecciones hacia el giro dentado (GD) y la región CA3 a través de la vía perforante medial (VPM) y lateral (VPL). Las neuronas granulares del GD proyectan hacia la región CA3 a través de las fibras musgosas (FM). Las neuronas piramidales del CA3 conectan a la región CA1 por medio de las colaterales de Schaffer (CS). (Tomado de Rendeiro y cols., 2009).

1.7.1 Laberinto de Barnes

El laberinto de Barnes creado por Carol Barnes, es una tarea que evalúa el aprendizaje y memoria espacial en roedores; se compone de una plataforma elevada con agujeros en la periferia. En el centro de la superficie se expone al animal a un estímulo aversivo, luz o ruido intenso, y debido a esto los animales buscan y entran a la caja de escape ubicada debajo del agujero elegido (Dawood y cols., 2004). Los sujetos experimentales aprenden la localización de la caja de escape usando puntos espaciales de referencia (señales extra laberínticas) que se colocan cerca del laberinto. El fundamento conductual de la prueba se basa en la preferencia innata de los roedores a los espacios cerrados y a la obscuridad (Barnes, 1979).

1.7.2 Reconocimiento de objetos

La tarea de reconocimiento de objetos evalúa la memoria espacial a través de la exploración de objetos. La prueba adaptada para ratas y ratones, se basa en la preferencia que tienen los animales por explorar un objeto nuevo sobre un objeto conocido. El desarrollo de la tarea consiste en tres etapas: habituación, primera y segunda fase. Durante la habituación se permite que el animal explore libremente el área en donde se realizará la prueba. En la primera fase, se coloca al animal en el centro del área para que reconozca dos objetos idénticos, después de un tiempo determinado, el animal regresa a su caja de cautiverio. En la segunda fase, el sujeto experimental regresa nuevamente al área que contiene dos objetos, uno de ellos es nuevo y el otro es uno de los objetos previamente presentados (Antunes y Biala, 2012).

2. JUSTIFICACIÓN

Los organismos aeróbicos son altamente susceptibles al estrés oxidativo, la mayoría de las especies reactivas de oxígeno (ROS) son producidas por las mitocondrias durante la respiración celular. En las neuronas el incremento de las ROS contribuye a desarrollar enfermedades neurodegenerativas provocando disminución de las capacidades cognitivas como el aprendizaje y la memoria. El cerebro es particularmente vulnerable a la producción de ROS, ya que metaboliza el 20% del total de oxígeno del cuerpo, posee un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados y bajos niveles antioxidantes endógenos en comparación con otros tejidos (Patten y cols., 2010; Steckert y cols., 2010).

Estudios realizados con diosgenina muestran un efecto neuroprotector, aumento en la actividad de enzimas antioxidantes, disminución del estrés oxidativo, así como una mejora en la memoria y aprendizaje en roedores (Chiu y cols., 2011; Pari y cols., 2012). El BSS-4, un compuesto colestánico sintetizado a partir de diosgenina, aumenta la longitud dendrítica y el número de dendritas en ratas intactas, y muestra un efecto neuroprotector en un modelo de lesión excitotóxica en el hipocampo de rata (Trejo, 2013).

Por otro lado, existen evidencias que sugieren que la cafeína mejora el aprendizaje y la memoria, disminuye la lipoperoxidación y aumenta la actividad de enzimas antioxidantes en el cerebro de rata (Ferre y cols., 2008; Noschang y cols., 2009; Cunha y Agostinho., 2010; Abreu y cols., 2011), por el contrario, otros estudios indican que la cafeína provoca un déficit en la memoria y aprendizaje teniendo un efecto negativo sobre la cognición en roedores (Shukitt-Hale y cols., 2013; Jang y cols., 2013).

Por último, pruebas electrofisiológicas y tareas conductuales realizadas en animales indican que el hipocampo es una región que participa en la recuperación de la memoria espacial (Lisman y cols., 2005).

Tomando en cuenta lo anterior, existe la posibilidad que la administración crónica de BSS-4 y cafeína mejore la recuperación de la memoria espacial evaluada en las tareas conductuales de laberinto de Barnes y reconocimiento de objetos y aumente la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX) en el hipocampo de rata.

3. HIPÓTESIS

La administración crónica de BSS-4 y cafeína mejora la recuperación de la memoria espacial de largo plazo y aumenta la actividad de enzimas antioxidantes en el hipocampo de rata.

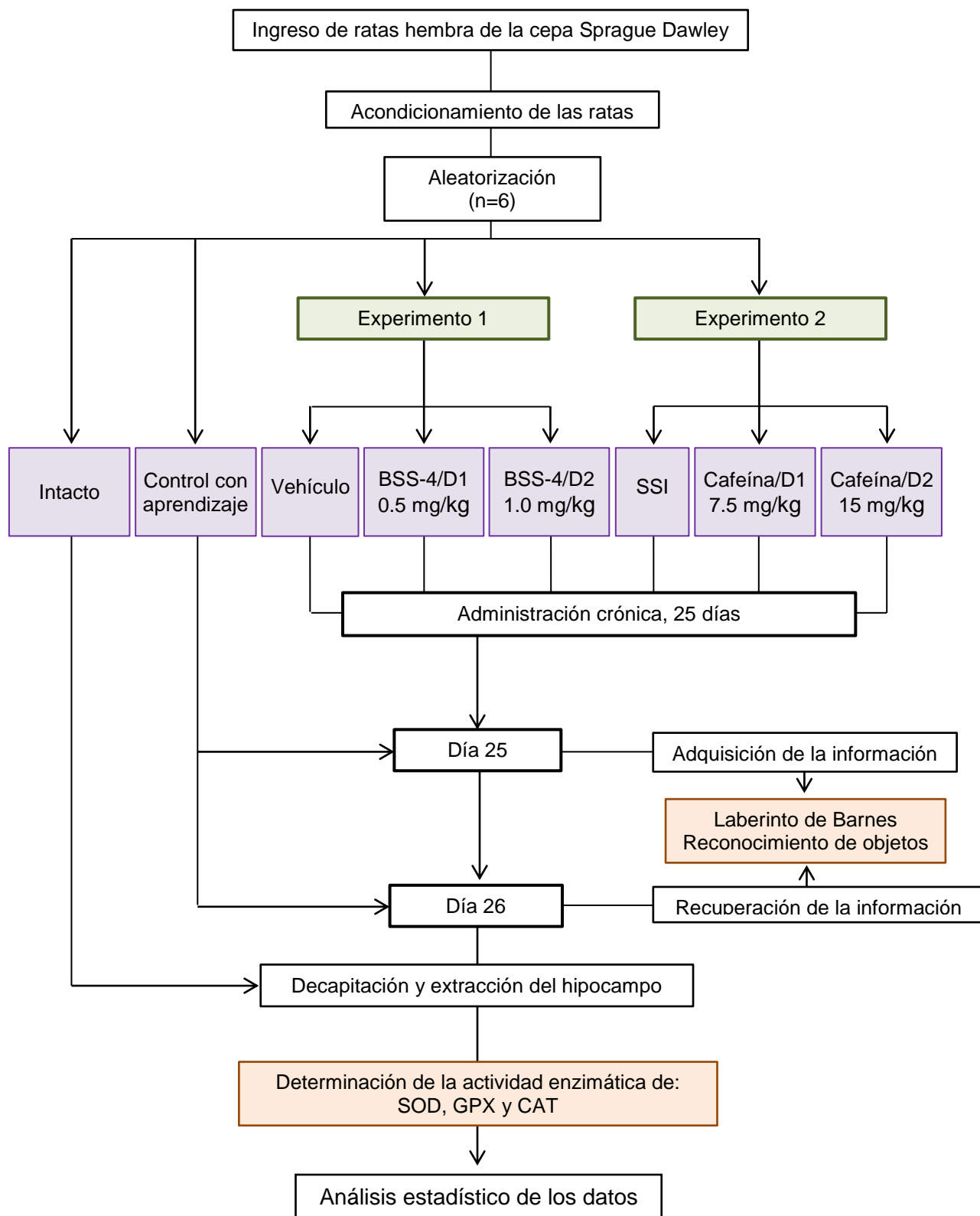
4. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la administración crónica de BSS-4 y cafeína a diferentes dosis sobre la recuperación de la memoria espacial de largo plazo y la actividad de enzimas antioxidantes en el hipocampo de rata.

4.1 Objetivos particulares

- Determinar el efecto de la administración crónica de 0.5 y 1.0 mg/kg de BSS-4, sobre la recuperación de la memoria espacial de largo plazo en las tareas de laberinto de Barnes y reconocimiento de objetos.
- Determinar el efecto de la administración crónica de 0.5 y 1.0 mg/kg de BSS-4, sobre la actividad enzimática de la superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa en el hipocampo de rata.
- Determinar el efecto de la administración crónica de 7.5 y 15 mg/kg de cafeína, sobre la recuperación de la memoria espacial de largo plazo en las tareas de laberinto de Barnes y reconocimiento de objetos.
- Determinar el efecto de la administración crónica de 7.5 y 15 mg/kg de cafeína, sobre la actividad enzimática de la superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa en el hipocampo de rata.

5. DIAGRAMA DE TRABAJO



6. MÉTODO GENERAL

6.1 Animales

Los sujetos de experimentación fueron ratas hembra de la cepa Sprague-Dawley con un peso de 200-260 g, provenientes del bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. En el vivario del Laboratorio de Neuroquímica, los animales fueron alojados individualmente en cajas de acrílico transparentes con alimento y agua *ad libitum*, con ciclo luz/oscuridad de 12/12 h, temperatura de 22 ± 2 °C, y humedad relativa de $50 \pm 5\%$.

Durante su estancia, los sujetos fueron manipulados durante 3 min todos los días, para habituarlos al experimentador y reducir el nivel de estrés. Todos los experimentos cumplieron los lineamientos del Reglamento del Comité para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Universidad Autónoma de Puebla (2007) el cual establece el cumplimiento de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) acerca de las “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio” (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación; 2001).

La experimentadora recibió capacitación teórica y práctica en: “Manejo y vías de administración en ratas de laboratorio” que se acreditó el 1 de marzo de 2013, así como en “Principios de anestesia, analgesia y cirugía en ratas de laboratorio” el 19 de julio de 2013, por el bioterio “Claude Bernard”.

6.2 Preparación del BSS-4 y cafeína

Se preparó una solución estándar de BSS-4 con una concentración de 1 mg/2 ml, empleando 1 ml de buffer de fosfatos (pH= 7.4) y 1 ml de agua desionizada. La solución de cafeína (Sigma-Aldrich[®]) tuvo una concentración de 15 mg/ml.

6.3 Administración crónica

Los grupos experimentales y los grupos controles fueron administrados durante 25 días por vía intraperitoneal, bajo el siguiente protocolo:

	Grupo (n=6)	Dosis
Experimento 1	Vehículo BSS-4/D1 BSS-4/D2	0.5 ml 0.5 mg/kg 1.0 mg/kg
Experimento 2	SSI Cafeína/D1 Cafeína/D2	0.25 ml 7.5 mg/kg 15 mg/kg

Tabla 1. Protocolo de la administración crónica a los diferentes grupos experimentales

6.4 Pruebas conductuales

6.4.1 Laberinto de Barnes

Consiste en una superficie circular de acrílico blanco con un diámetro de 100 cm, en su periferia tiene 18 agujeros de un diámetro de 8.5 cm, los agujeros se encuentran abiertos, excepto el agujero de escape al cual se le coloca una caja de acrílico negro de 9x12x14 cm. El área de conducta cuenta con cuatro señales extra laberínticas y en la parte superior del laberinto se encuentra una lámpara, la cual emite una luz blanca que cumple con la función de estímulo aversivo.

- **Sesión de adquisición de la información**

El día 25 después de la última administración (BSS-4 o cafeína), los grupos experimentales fueron colocados en la zona de habituación 30 min antes de iniciar la sesión de adquisición. En la primera etapa de ésta tarea, los animales recibieron un total de tres sesiones de entrenamiento. El sujeto de experimentación se colocó en el centro del laberinto bajo una caja de "inicio" en la cual permaneció 30 seg, transcurrido este tiempo se encendió la lámpara y se levantó la caja, permitiendo que el animal iniciara la exploración en la superficie del laberinto, el tiempo máximo de latencia de escape fue 120 seg, si transcurrido este tiempo el animal no encontraba la caja de escape, se le conducía

a ella y permaneció dentro durante 60 seg, una vez finalizado este periodo de tiempo, el roedor regreso a su caja de alojamiento. Si el animal encontró la caja de escape y entró, la luz fue apagada, permitiendo que el sujeto de experimentación permaneciera 15 seg dentro de ella; se registró el tiempo de latencia, al momento de entrar a la caja. Posteriormente el animal regresó a su caja de cautiverio donde permaneció hasta la siguiente sesión, el tiempo de descanso entre las sesiones fue de 20 min.

- **Sesión de recuperación de la memoria de largo plazo**

La segunda etapa se realizó 24 h después de la adquisición, siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente. Se registró el tiempo de latencia de entrada a la caja de escape.

6.4.2 Prueba de reconocimiento de objetos

Esta tarea consiste en la exploración de objetos colocados en una caja de acrílico negro con dimensiones de 30x55x60 cm. El desarrollo de esta prueba consistió en tres etapas: habituación, primera y segunda fase.

- **Sesión de adquisición de la información**

El día 25 después de terminar la tarea del laberinto de Barnes los sujetos experimentales realizaron la prueba de reconocimiento de objetos. Durante la habituación se permitió que el animal explorara libremente la caja de acrílico, en un tiempo asignado de 5 min. En la primera fase, se colocó a la rata en el centro de la caja para que reconociera dos objetos idénticos, después de 180 seg de exploración, el animal regresó a su caja de cautiverio. En la segunda fase el sujeto experimental se colocó nuevamente en la caja de observación la cual contenía dos objetos; uno de ellos era nuevo y el otro era uno de los objetos previamente presentados, el tiempo asignado en esta tarea fue de 180 seg, los animales recibieron un total de tres sesiones de entrenamiento. Posteriormente el animal regresó a su caja de alojamiento donde permaneció hasta la siguiente sesión, el tiempo transcurrido entre las sesiones fue de 20 min.

- **Sesión de recuperación de la memoria de largo plazo**

Se realizó la segunda fase de esta tarea 24 h después de la adquisición, siguiendo el mismo procedimiento anteriormente descrito. Se cuantificó el tiempo que la rata exploró cada uno de los objetos presentados a través del tacto y el olfateo durante 180 seg.

6.5 Pruebas bioquímicas

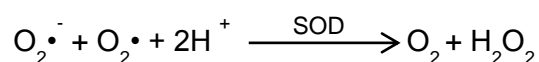
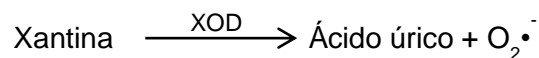
6.5.1 Preparación de las muestras

Después de la prueba de reconocimiento de objetos, todos los animales fueron decapitados, posteriormente se extrajo el hipocampo completo. Para la determinación de la actividad de superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPX), el tejido fue homogeneizado en una relación de 20% peso/volumen, es decir, 20 mg del tejido en 100 μ l de PBS 50 mM (pH=7.4) y 1 mM de EDTA. El peso del tejido fue estandarizado para todas las muestras. Para la determinación de la actividad de catalasa (CAT), se homogeneizó 1 mg del tejido en 100 μ l de PBS 500 mM (pH=7.4). Todos los homogeneizados fueron centrifugados a 12, 000 rpm durante 30 min a 4 °C, en una microcentrífuga refrigerada (Hettich Mikro 200R). Se recuperaron los sobrenadantes y se mantuvieron a -20 °C. Todas las muestras fueron procesadas por duplicado. Las reacciones colorimétricas fueron leídas en el espectrofotómetro (Varian Cary 50 UV-Vis). En todas las determinaciones la medición para calibrar el espectrofotómetro fue frente al aire.

6.5.2 Determinación de la actividad enzimática de la superóxido dismutasa

La función de la superóxido dismutasa es acelerar la dismutación del radical tóxico superóxido ($O_2\cdot^-$) en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular.

La actividad enzimática de la SOD, expresada en U/mg de proteína, fue determinada usando el kit de diagnóstico RANSOD (RANDOX). Este método emplea xantina y xantina oxidasa (XOD) para formar radicales superóxido, los cuales reaccionan con el cloruro de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-fenil tetrazolio (INT) para producir formazán rojo. Se mide la actividad de la superóxido dismutasa por el grado de inhibición de esta reacción. Una unidad de SOD es la que a 505 nm causa un 50% de inhibición del valor de reducción de INT bajo las condiciones del análisis.



Se realizó la curva de calibración de SOD usando diluciones del patrón proporcionado en el kit de diagnóstico RANSOD (RANDOX) (figura 16). En los microtubos correspondientes, se colocaron 25 µl del sobrenadante de las muestras y el blanco (solución tampón). Se adicionaron 850 µl del sustrato mixto, se mezcló y se incubó junto con 125 µl de xantina oxidasa a 37 °C. Al cabo de 30 seg se realizó la lectura de la absorbancia inicial a 505 nm (A1) y 3 min después la absorbancia final (A2). Se calculó el incremento de la absorbancia por min para cada muestra.

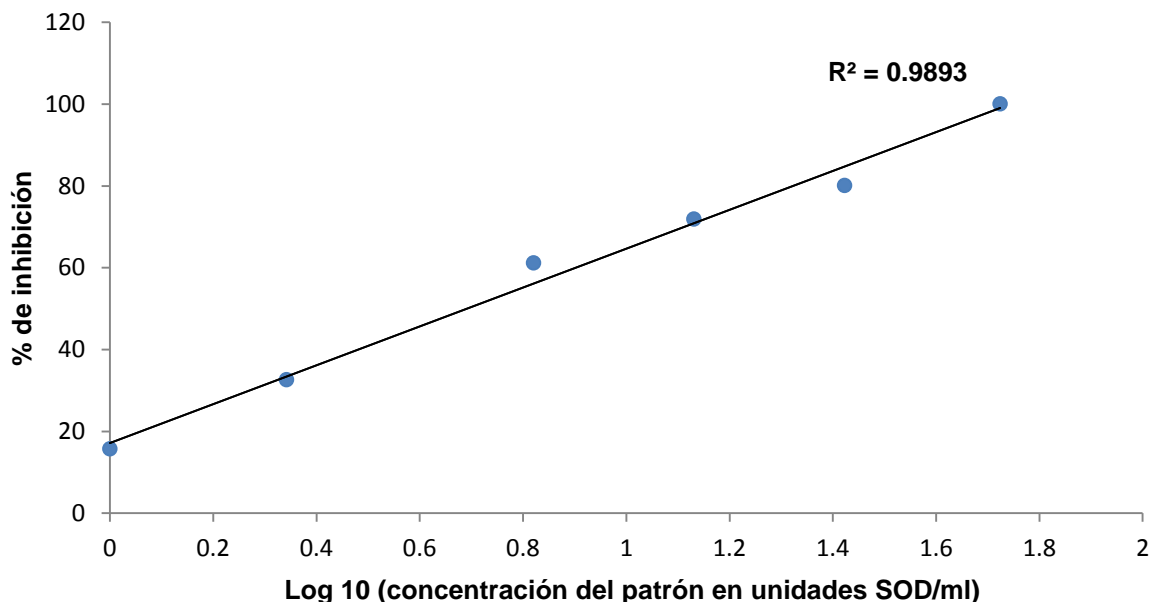
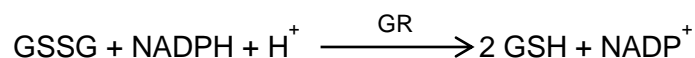
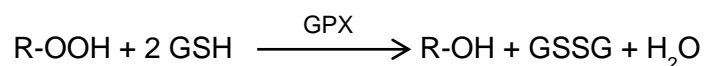


Figura 16. Curva de calibración para la determinación de SOD. El % de inhibición y la concentración del patrón son directamente proporcionales, es decir, a mayor % de inhibición mayor concentración de la enzima.

6.5.3 Determinación de la actividad enzimática de la glutatión peroxidasa

La glutatión peroxidasa cataliza la reducción del peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y una amplia variedad de peróxidos orgánicos (R-OOH) a alcoholes estables (R-OH) y agua, usando al glutatión celular como el agente reductor.

La actividad enzimática de GPX, expresada en mmol/min/mg del tejido, fue determinada usando el kit de ensayo de actividad celular Glutatión peroxidasa (Sigma-Aldrich®). Este método utiliza una determinación indirecta. Está basado en la reacción de oxidación, que sufre el glutatión (GSH) a glutatión oxidado (GSSG), catalizada por la GPX. La reacción entre GSSG y NADPH (b-nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, en su forma reducida) en presencia de la glutatión reductasa (GR) da como resultado GSH y $NADP^+$ en su forma oxidada. La disminución de la absorbancia, medida a 340 nm, durante la oxidación de NADPH a $NADP^+$ indica la actividad de la GPX.



La reacción se realizó a 25 °C y pH 8.0, y fue iniciada por la adición del peróxido orgánico *ter*-butil hidroperóxido (*t*-Bu-OOH). Este sustrato es adecuado para la determinación, ya que su reacción espontánea con el GSH es baja y no se metaboliza por la catalasa.

En los microtubos del control positivo y la muestra del tejido, se colocaron 890 μ l del buffer de GPX que contenía 50 mM Tris HCl (pH 8.0), con 0.5 mM EDTA, mientras que para el blanco se adicionaron 940 μ l del buffer. Se añadieron 50 μ l de 5 mM NADPH y 50 μ l del sobrenadante de las muestras o 50 μ l de la enzima en el control positivo; se mezcló por inversión. La reacción inició cuando se adicionaron 10 μ l de la solución 30 mM *ter*-butil hidroperóxido. Nuevamente se mezcló por inversión y a los 60 seg se realizó la lectura a 340 nm.

6.5.4 Determinación de la actividad enzimática de la catalasa

La catalasa (CAT) cataliza la descomposición de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y oxígeno. La actividad enzimática de la CAT, expresada en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ del tejido, fue determinada usando el kit de actividad Catalasa (Sigma-Aldrich[®]). Este kit proporciona un ensayo colorimétrico para el estudio de la actividad de catalasa en diversos tejidos y organelos celulares. Una unidad de catalasa descompone 1 μmol de H_2O_2 y agua por min a pH 7.0 a 25 °C en un sustrato de 50 mM de H_2O_2 ; la absorbancia fue medida a 520 nm.

Se realizó la curva de calibración de CAT usando diluciones de la solución estándar del kit de actividad Catalasa (Sigma-Aldrich[®]) (figura 17). Reacción enzimática: en microtubos por duplicado se mezclaron 20 μl del sobrenadante de las muestras y 75 μl del buffer que contenía 50 mM de fosfato de sodio (pH 7.0), en el blanco solo se agregó el buffer. La reacción empezó cuando se adicionaron 25 μl de la solución colorimétrica (200 mM H_2O_2). Se mezcló por inversión y se incubó durante 5 min a 25 °C. Posteriormente se agregaron 900 μl de la solución stop, que contenía 15 mM de azida de sodio en agua.

Se tomó una alícuota de 10 μl de la reacción enzimática y se añadió 1 ml de la solución cromógena, compuesta por 150 mM buffer de fosfatos de potasio (pH 7.0), 0.25 mM 4- aminoantipirina y 2 mM de ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibencenosulfónico. La lectura se realizó 15 min después, a 520 nm.

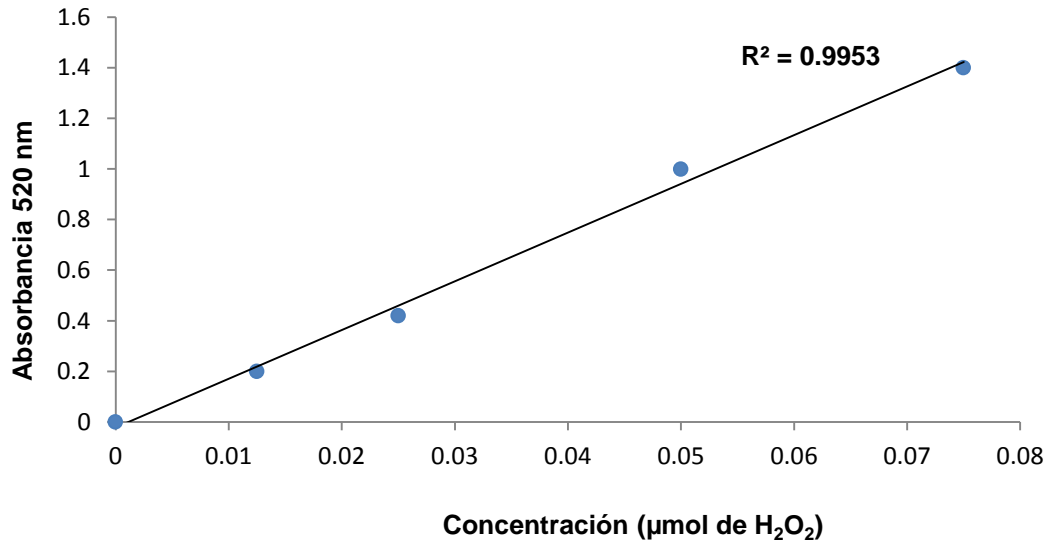


Figura 17. Curva de calibración para la determinación de CAT. Entre mayor sea la absorbancia existe mayor concentración del radical libre H₂O₂ y una menor actividad de la enzima.

6.6 Análisis estadístico

Los datos de las tareas conductuales laberinto de Barnes y reconocimiento de objetos fueron analizados con una ANOVA de medidas repetidas y una prueba de comparaciones múltiples de Tuckey. Los resultados obtenidos en la actividad enzimática de SOD, GPX y CAT, se analizaron con una ANOVA de una vía y una prueba de comparaciones múltiples de Tuckey.

7. RESULTADOS

De acuerdo al diseño experimental, los resultados obtenidos se abordarán en el siguiente orden:

7.1 Experimento 1

Administración de BSS-4

7.2 Experimento 2

Administración de cafeína

7.1 Experimento 1

- **Laberinto de Barnes**

El análisis estadístico para evaluar el tiempo de latencia para encontrar la caja de escape en el laberinto de Barnes fue una ANOVA de medidas repetidas y para investigar las diferencias entre los tratamientos se usó la prueba de comparaciones múltiples de Tuckey.

Los animales realizaron la sesión de adquisición el día 25 inmediatamente después de la última administración de BSS-4, la sesión de recuperación de la información se realizó 24 h después. Los sujetos experimentales recibieron un total de tres sesiones de entrenamiento, el tiempo máximo de latencia de escape fue de 120 seg.

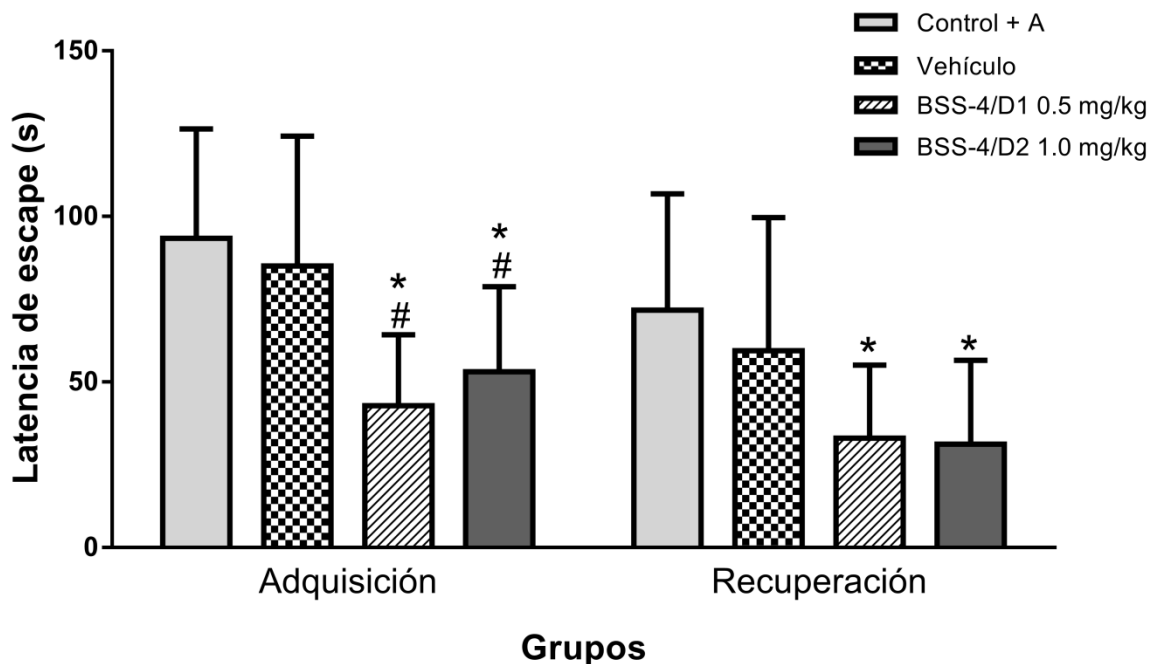


Figura 18. Variación de las medias del tiempo de latencia para localizar la caja de escape expresado en segundos. En los grupos administrados con BSS-4 mejora la adquisición de la información y facilita recuperación de la memoria espacial de largo plazo, en comparación con el grupo control + A (* $p < 0.05$) y con el grupo vehículo (# $p < 0.05$); mientras que en la sesión de recuperación de la información los grupos administrados con BSS-4 solo presentan diferencia significativa en comparación con el control + A (* $p < 0.05$). (ANOVA de medidas repetidas y prueba de comparaciones múltiples de Tuckey, $p < 0.05$).

- **Reconocimiento de objetos**

El análisis estadístico para evaluar el índice de discriminación de objetos fue una ANOVA de una vía y una prueba de comparaciones múltiples de Tuckey, debido a que solo se tiene una variable y los datos siguen una distribución normal. El índice de discriminación de objetos se determinó por medio de la ecuación:

$$ID = \frac{ON - OV}{\sum ON OV}$$

Donde (ID) representa el índice de discriminación de objetos, (ON) objeto nuevo y (OV) objeto viejo. Se cuantificó el número de tactos y olfateos que realizaron los animales para reconocer los objetos durante 180 seg. La calificación otorgada al ID abarca un intervalo de 0 a 1, en donde 1 significa que los animales emplearon más tiempo

reconociendo el objeto nuevo debido a que recordaban el objeto viejo presentado en la fase uno del experimento.

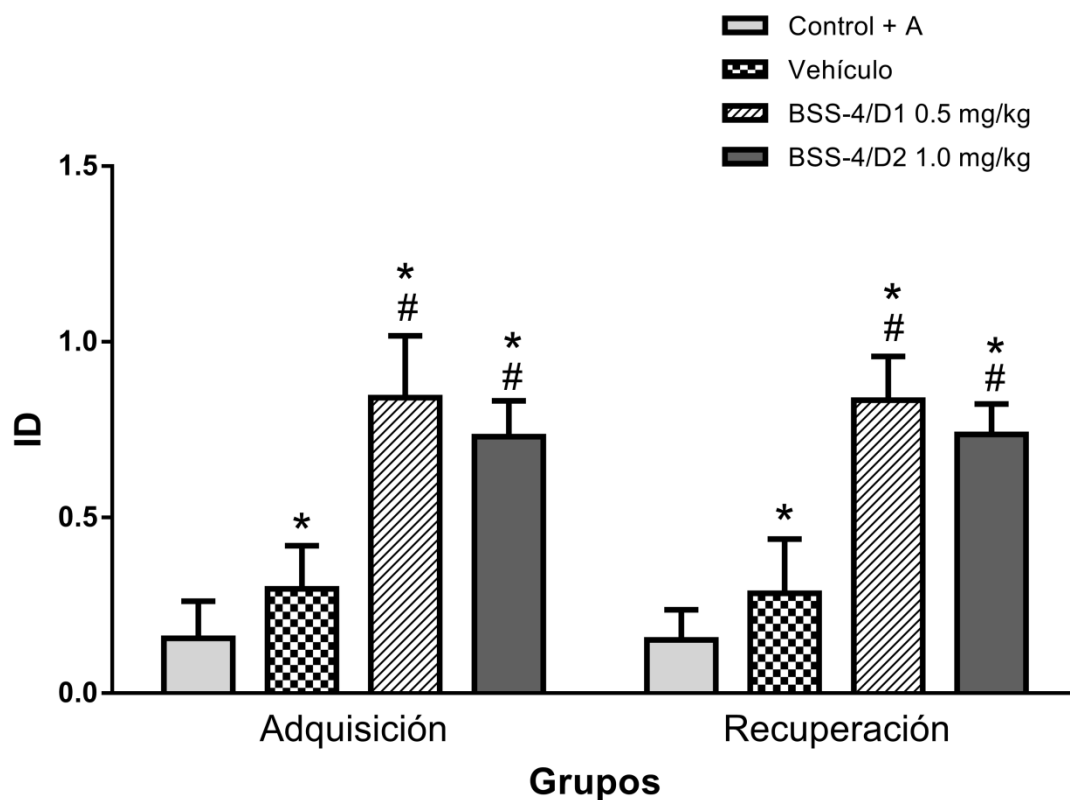


Figura 19. Variación de las medias del índice de discriminación de objetos durante la fase 2 del experimento. Los grupos administrados con BSS-4 presentan una mejora en la adquisición y recuperación de la memoria espacial de largo plazo, en comparación con el grupo control + A ($*p<0.05$) y con el grupo vehículo ($^{\#}p<0.05$); mientras que el grupo vehículo solo presenta diferencia significativa en comparación con el control + A ($*p<0.05$). (ANOVA de medidas repetidas y prueba de comparaciones múltiples de Tuckey, $p<0.05$).

- **Superóxido dismutasa**

El día 26 fue evaluada la actividad total de SOD en el hipocampo de los animales pertenecientes a todos los grupos experimentales. La actividad enzimática se reporta como Unidades/mg del tejido. Todas las determinaciones fueron procesadas por duplicado.

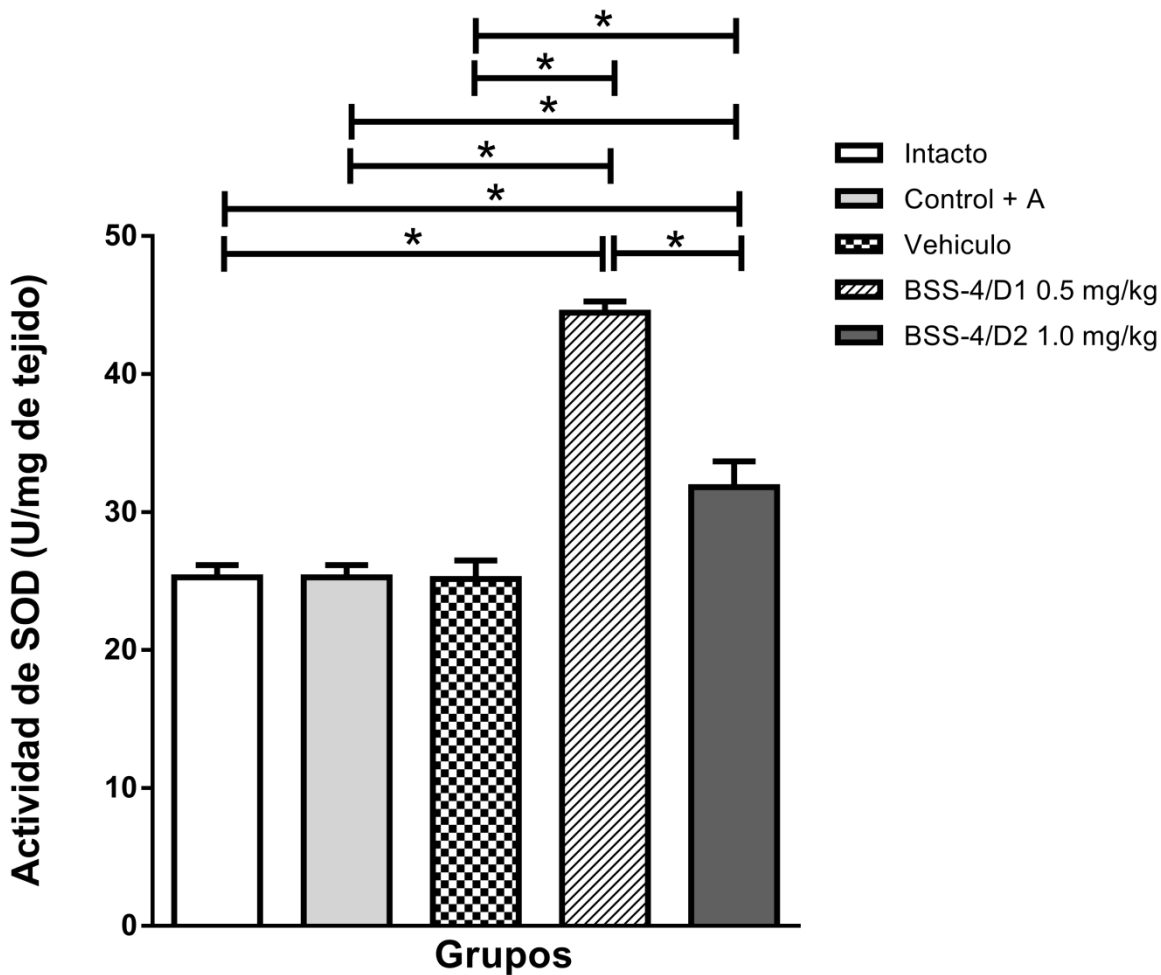


Figura 20. Variación de las medias de la actividad de SOD. En los grupos de animales administrados crónicamente con BSS-4 a dosis de 0.5 y 1.0 mg/ kg aumenta la actividad de la superóxido dismutasa en comparación con los grupos intacto, control + A y vehículo. Al existir diferencia entre los grupos BSS-4/ D1 y BSS-4/ D2, se sugiere que en los animales administrados con BSS-4/ D1 existe mayor aumento en la actividad de SOD. (ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tuckey, $p < 0.05$).

❖ **Glutación peroxidasa**

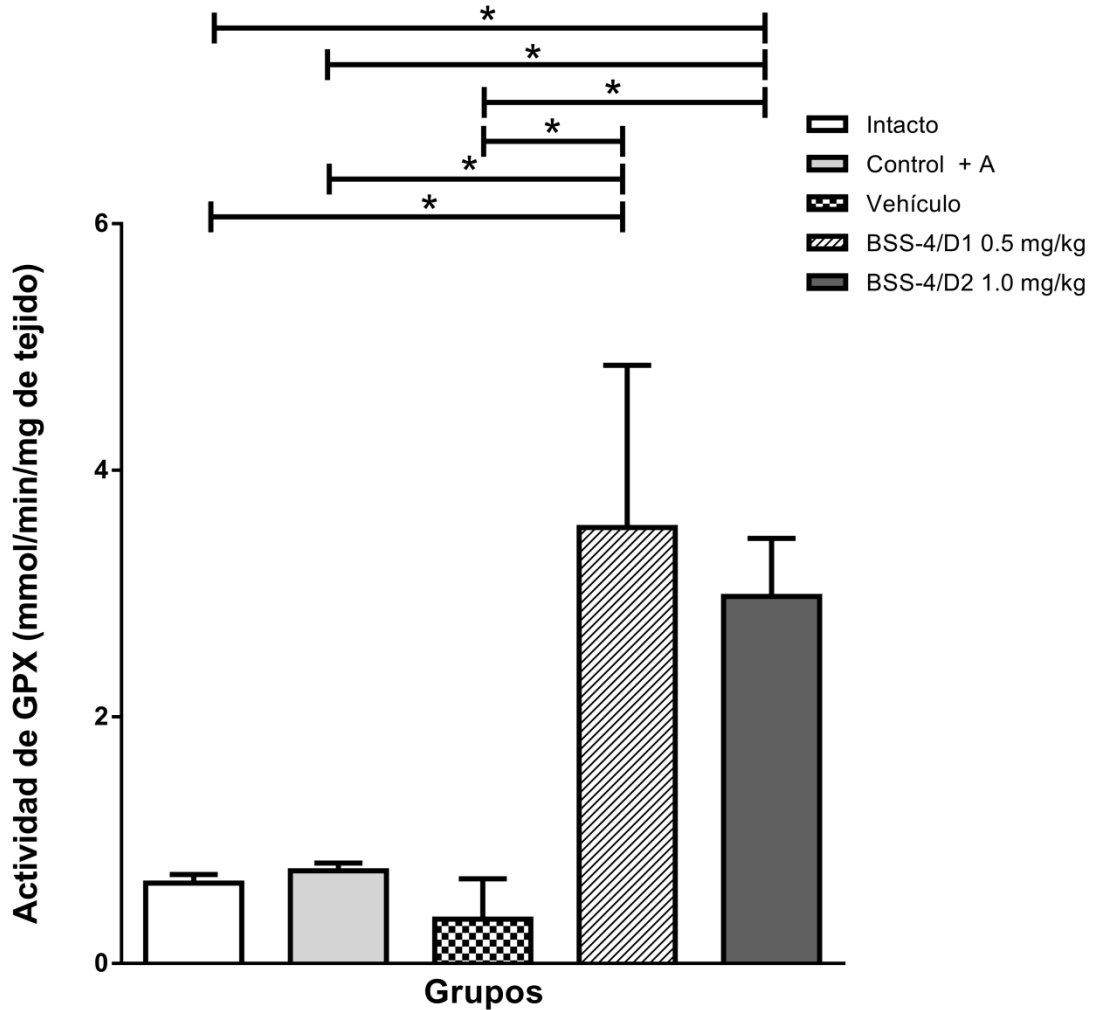


Figura 21. Variación de las medias de la actividad de GPX. En la gráfica se muestra que los grupos de animales administrados crónicamente con BSS-4 a dosis de 0.5 y 1.0 mg/ kg aumentan la actividad de glutatión peroxidasa en comparación con los grupos intacto, control + A y vehículo (* $p < 0.05$). (ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tuckey, $p < 0.05$).

❖ Catalasa

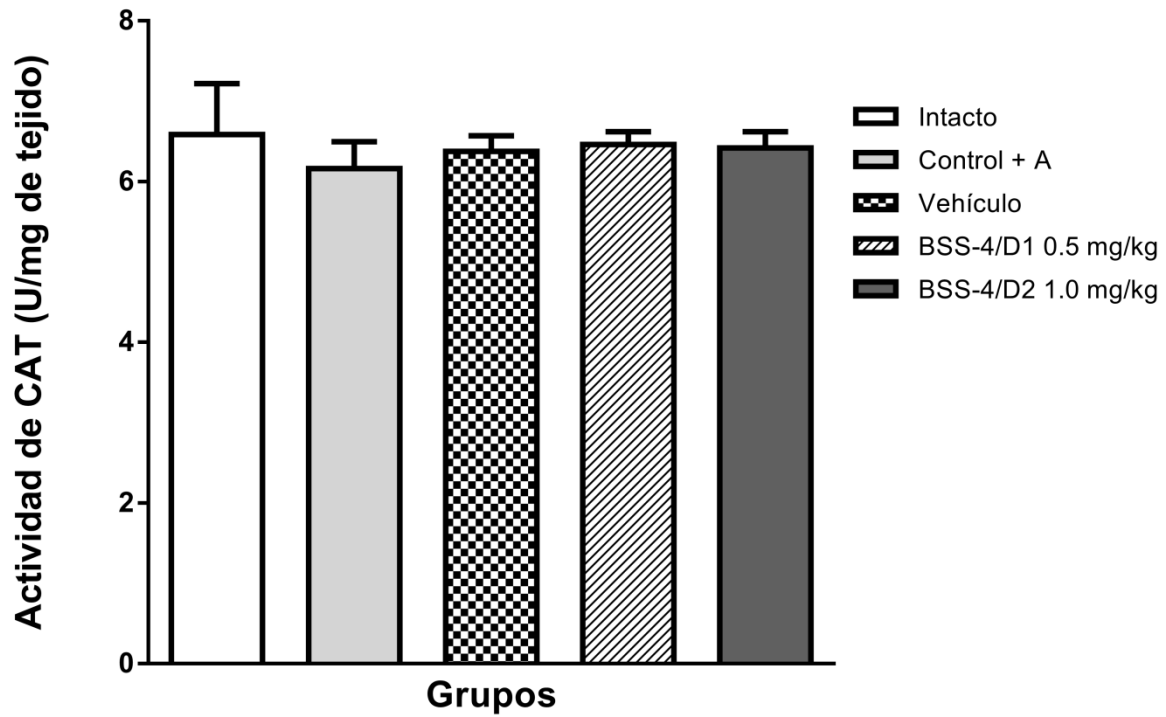


Figura 22. Variación de las medias de la actividad de la CAT. En la gráfica los grupos experimentales no muestran diferencia significativa. (ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tuckey, $p < 0.05$).

7.2 Experimento 2

- **Laberinto de Barnes**

Los animales realizaron la sesión de adquisición el día 25 inmediatamente después de la última administración de cafeína, la sesión de recuperación de la información se realizó 24 h después. Los sujetos experimentales recibieron un total de tres sesiones de entrenamiento, el tiempo máximo de latencia de escape fue de 120 seg.

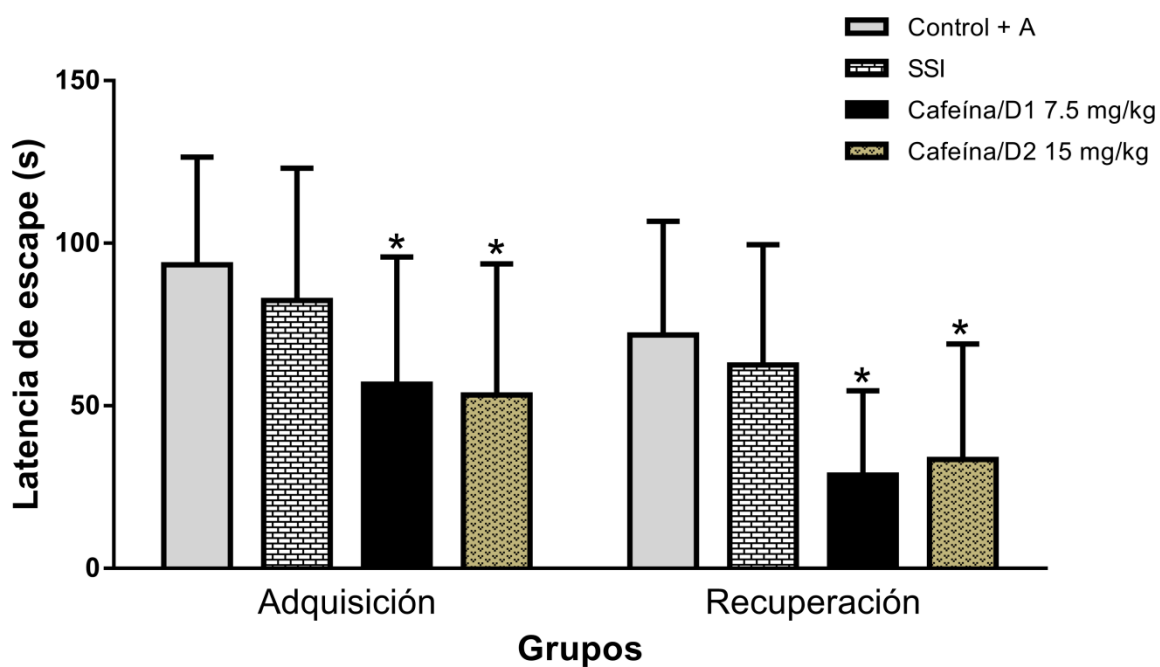


Figura 23. Variación de las medias del tiempo de latencia para localizar la caja de escape expresado en segundos. Los grupos administrados crónicamente con cafeína a dosis de 7.5 y 15 mg/ kg presentaron una mejora en la adquisición y recuperación de la memoria espacial de largo plazo en comparación con el grupo control + A (* $p < 0.05$). (ANOVA de medidas repetidas y prueba de comparaciones múltiples de Tuckey, $p < 0.05$).

❖ Reconocimiento de objetos

El índice de discriminación de objetos se determinó por medio de la ecuación:

$$ID = \frac{ON - OV}{\sum ON OV}$$

Donde (ID) representa el índice de discriminación de objetos, (ON) objeto nuevo y (OV) objeto viejo. Se cuantificó el número de tactos y olfateos que realizaron los animales para reconocer los objetos durante 180 seg. La calificación otorgada al ID abarca un intervalo de 0 a 1, en donde 1 significa que los animales emplearon más tiempo reconociendo el objeto nuevo debido a que recordaban el objeto viejo presentado en la fase uno del experimento.

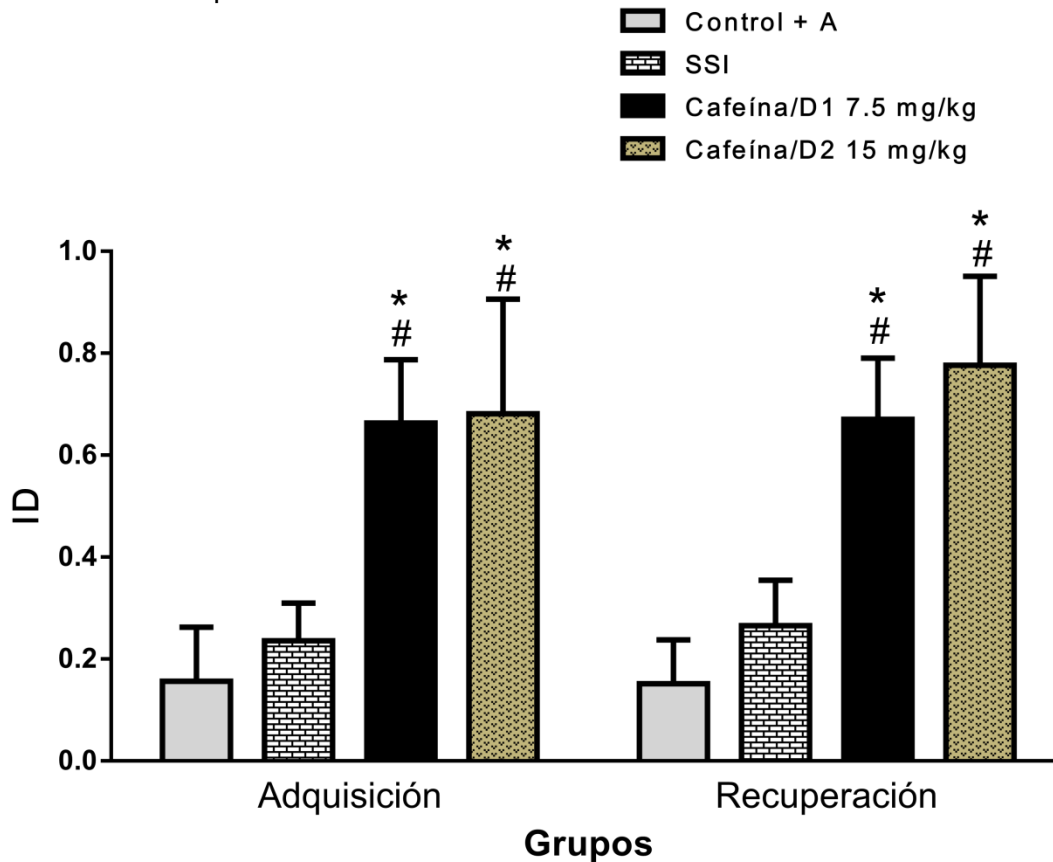


Figura 24. Variación de las medias del índice de discriminación de objetos durante la segunda fase del experimento. Los grupos administrados con cafeína presentan una mejora en la adquisición y recuperación de la memoria espacial de largo plazo, en comparación con el grupo control + A (* $p < 0.05$) y con el grupo vehículo (# $p < 0.05$). (ANOVA de medidas repetidas y comparaciones múltiples de Tuckey, $p < 0.05$).

- Superóxido dismutasa

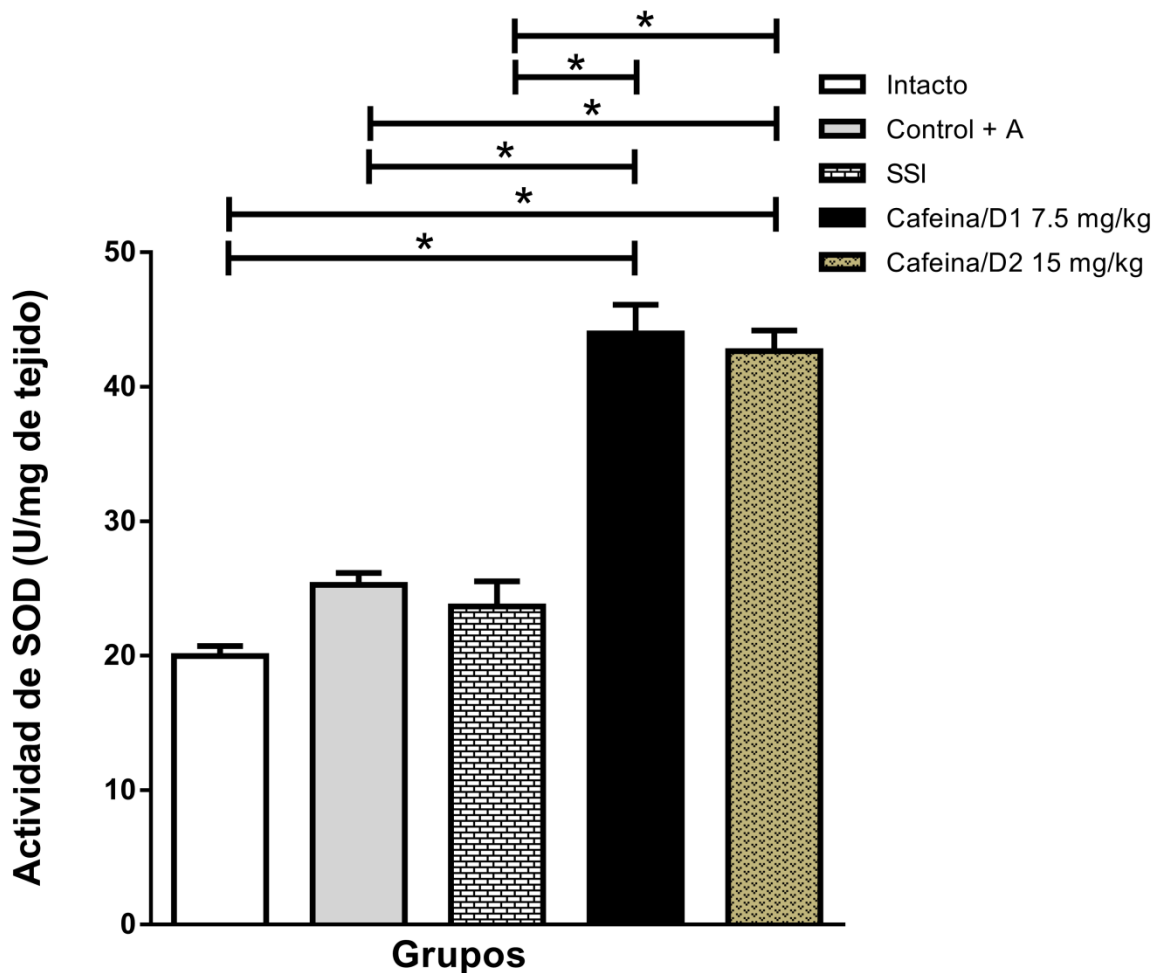


Figura 25. Variación de las medias de la actividad de SOD. Los resultados muestran que en los grupos de animales administrados crónicamente con cafeína a dosis de 7.5 y 15 mg/ kg aumenta la actividad de superóxido dismutasa en comparación con los grupos intacto, control + A y vehículo (* $p < 0.05$). (ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tuckey, $p < 0.05$).

❖ Glutación peroxidasa

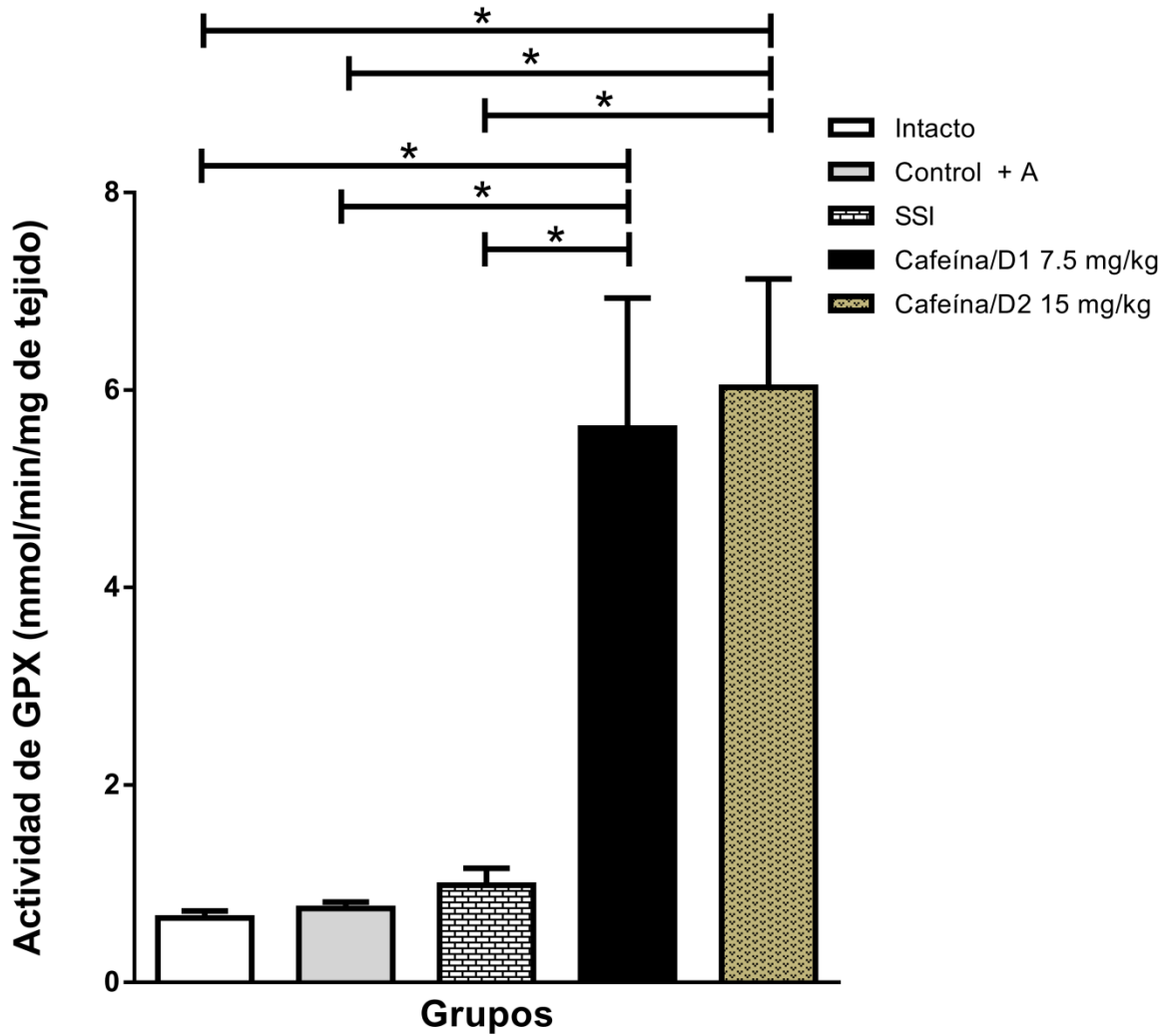


Figura 26. Variación de las medias de la actividad de GPX. En la gráfica se muestra que en los grupos de animales administrados crónicamente con cafeína a dosis de 7.5 y 15 mg/ kg aumenta la actividad de glutación peroxidasa en comparación con los grupos intacto, control + A y SSI (* $p < 0.05$). (ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tuckey, $p < 0.05$).

❖ Catalasa

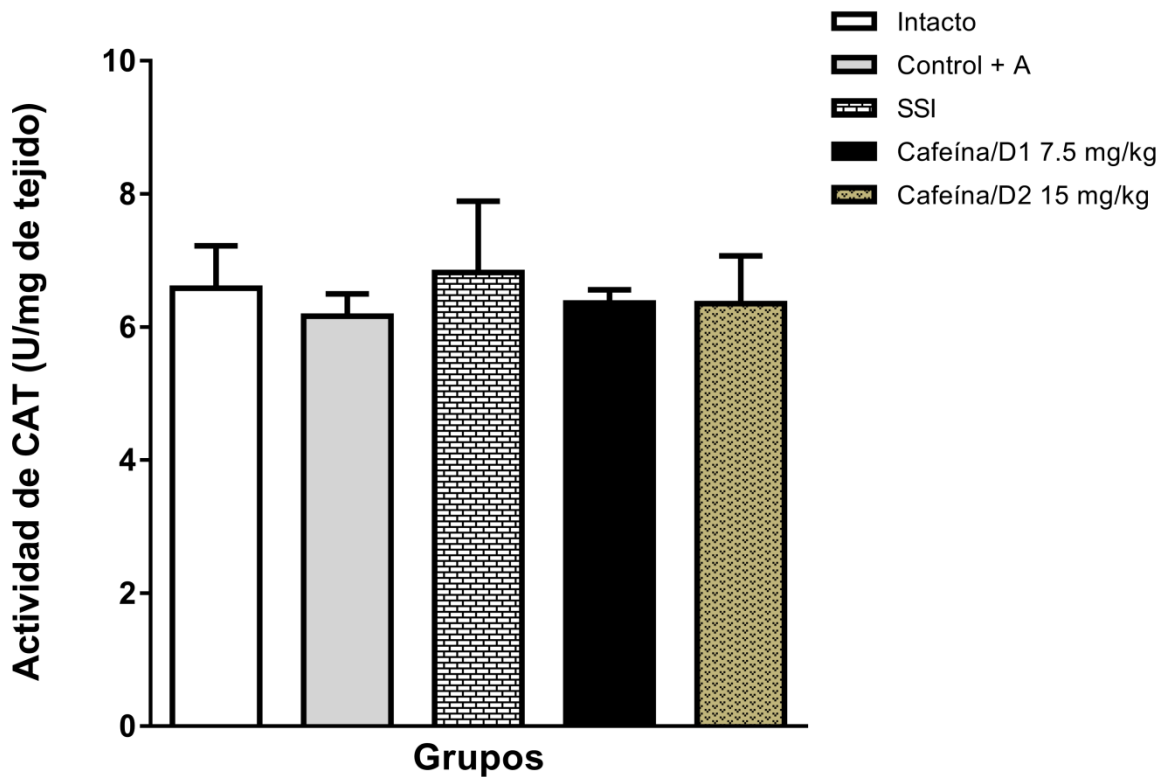


Figura 27. Variación de las medias de la actividad de la CAT. En la gráfica los grupos experimentales no muestran diferencia significativa. (ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tuckey, $p < 0.05$).

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La producción y acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células se incrementa por diversas condiciones y es un denominador común en muchas enfermedades neurodegenerativas, provocando deterioro en el aprendizaje y la memoria (Scandalios, 2005). Todos los seres vivos que utilizan el oxígeno para generar energía, liberan radicales libres y en las células existen sistemas de defensa, principalmente enzimas antioxidantes que actúan para neutralizarlos; otras especies no enzimáticas

como los β -carotenos, tocoferoles, flavonoides y el ácido ascórbico, también producen un efecto antioxidante.

Experimento 1

En la tarea del laberinto de Barnes la administración crónica de BSS-4 a dosis de 0.5 y 1.5 mg/ kg mejora la adquisición de la información y facilita la recuperación de la memoria espacial de largo plazo, esto se puede observar en la figura 18, los sujetos experimentales disminuyen el tiempo de latencia para encontrar la caja de escape en la sesión de adquisición y recuperación de la información, este resultado es similar al reportado por Chiu y cols., (2011); donde la administración crónica de diosgenina mejora la adquisición y recuperación de la memoria espacial evaluada en el laberinto acuático de Morris. La diferencia entre estas tareas conductuales es que el laberinto de Barnes no implica natación y por lo tanto se considera menos ansiogénico que el laberinto acuático de Morris, sin embargo ambas evalúan la memoria espacial en roedores.

Por otro lado, la tarea de reconocimiento de objetos es muy útil para evaluar la memoria de largo plazo en función del tiempo de duración y del número de ensayos que reciban los roedores para consolidar la información. Se ha reportado que el modelo de reconocimiento de objetos es más eficaz cuando el tamaño de dichos objetos es similar al tamaño del animal en posición erguida, otra característica que deben poseer estos objetos es un peso que impida que el animal los mueva durante el experimento. Por otro lado, una característica fundamental es que los objetos sean de forma y textura diferente y que estén elaborados del mismo material (Antunes y Biala, 2012). La figura 19 muestra que en los grupos administrados con BSS-4 hay una mejora en la adquisición y recuperación de la memoria espacial de largo plazo en la segunda fase del experimento. Los resultados son semejantes a los reportados por Tohda y cols., (2013) en donde animales íntegros administrados con diosgenina muestran una mejora en la adquisición y recuperación de la memoria espacial. Los autores proponen que la diosgenina se une al receptor de membrana $1,25D_3$ -MARRS en las neuronas provocando un aumento en el crecimiento axonal y la expresión de c-Fos. Se propone que los factores de crecimiento que actúan a través de receptores tipo tirosina quinasas, así como los neuromoduladores que activan a los receptores acoplados a proteínas G y la entrada de calcio a través de los canales NMDA sean estímulos que conducen a la activación transcripcional de c-Fos en el hipocampo, dando lugar a cambios en la actividad neuronal y una mejora en la memoria

espacial a través de la potenciación a largo plazo (LTP) (West y cols., 2002; Fleischmann y cols., 2003; Méndez-Couz y cols., 2014). Tomando en cuenta esta propuesta, los resultados obtenidos en la presente tesis en los grupos administrados con el BSS-4 están relacionados a la activación del receptor de membrana asociado a la respuesta rápida de unión a esteroides (1,25D₃-MARRS) aumentando el crecimiento axonal y la expresión de c-FOS, factor de transcripción que participa en los mecanismos moleculares del aprendizaje y la memoria a través de la estimulación de neurotrofinas (BDNF, NGF) y neuromoduladores (figura 28) (Tohda y cols., 2013).

Por otro lado, en el hipocampo de los animales que fueron administrados a dosis de 0.5 y 1.0 mg/ kg de BSS-4 aumentó la actividad de las enzimas antioxidantes SOD (figura 20) y GPX (figura 21), pero no se incrementó la actividad de CAT (figura 22) en ningún grupo experimental.

Estos resultados son similares a los reportados por Chiu y cols., (2011) en los cuales la administración crónica de diosgenina aumenta la actividad de SOD y GPX en el cerebro de ratones. En otro estudio mostraron que la administración crónica por vía oral del ñame (*Dioscorea pseudojaponica Yamamoto*) que contenía 5.49 mg de diosgenina por g de extracto, aumento la actividad de SOD y GPx en cerebro de ratones tratados D-gal (Chiu y col., 2009). La vía de señalización para transcripción de enzimas antioxidantes es activada por las cinasas PKC, MAPK, PI3K y PERK (Mattson y Cheng, 2006). Tohda y cols., (2012) determinaron que la diosgenina se une al receptor de membrana 1,25D₃-MARRS y estimula a PI3K, ERK, PKC y PKA.

Es posible que el BSS-4 se una al mismo receptor y a través de las cinasas correspondientes estimule a los factores de transcripción NRF2 y FOXO3 para aumentar la actividad de SOD y GPX (figura 28). Sin embargo los resultados no mostraron un aumento en la actividad de CAT; se ha reportado que la actividad enzimática de catalasa se encuentra disminuida en el cerebro en comparación con otros tejidos (Gilgun-Sherki y cols., 2001), esta podría ser la razón por la cual no se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales.

A continuación se muestra un esquema hipotético de esta ruta de señalización.

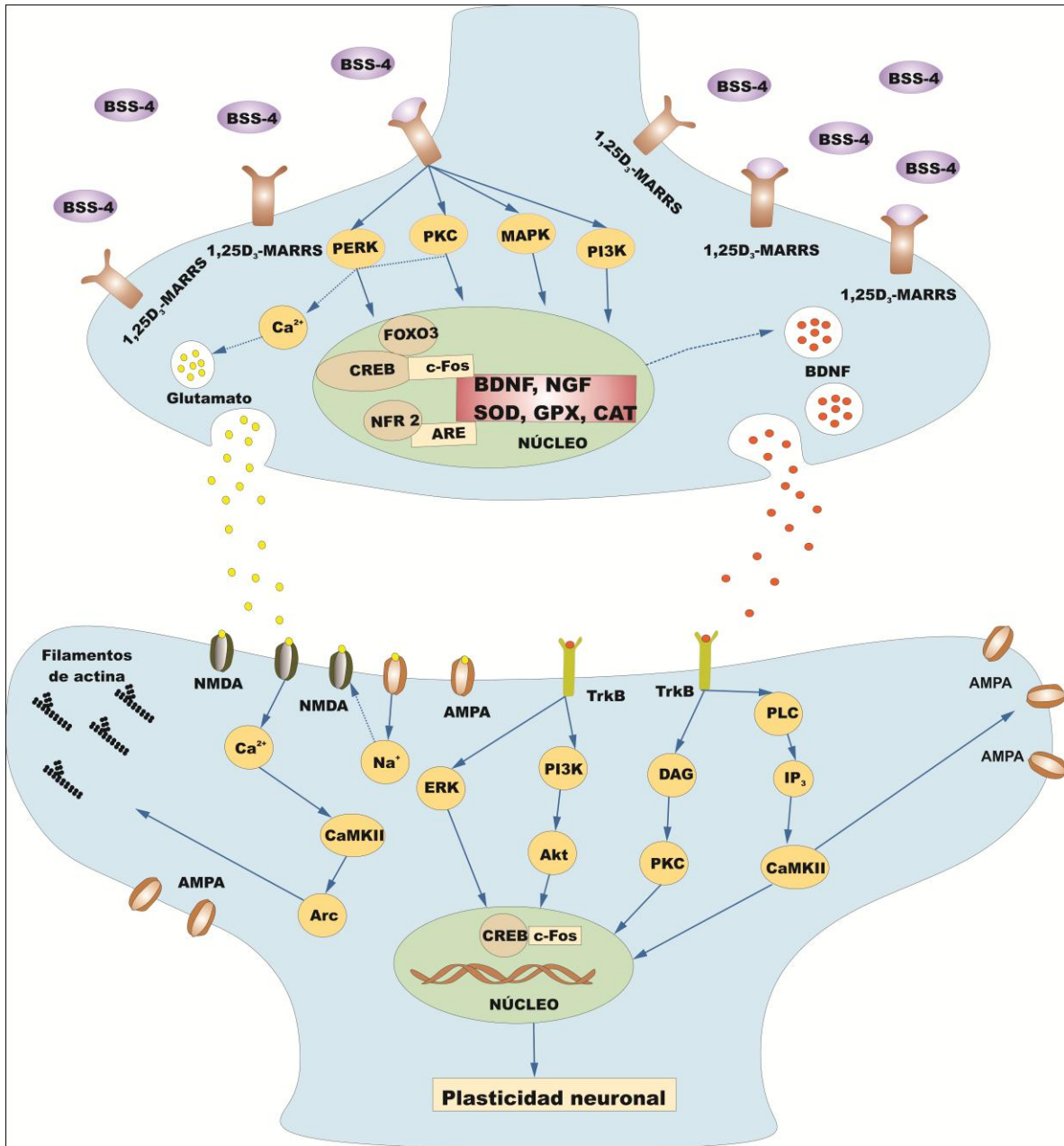


Figura 28. Esquema hipotético del efecto del BSS-4 sobre la memoria espacial a través de la LTP y el aumento de la actividad de enzimas antioxidantes en el hipocampo. En la neurona presináptica la unión del BSS-4 al receptor de membrana asociado a la rápida respuesta de unión a esteroides (1,25D₃-MARRS) desencadena diferentes vías de señalización a través de las cinasas PKC, MAPK, PI3K y PERK para activar a los factores de transcripción NRF2, CREB, c-Fos y FOXO3 que se translocan al núcleo para codificar la estimulación de neurotrofinas (BDNF y NGF) y la expresión de enzimas antioxidantes (SOD, GPX y CAT). Por otro lado la activación de PERK y PCK aumentan la concentración de Ca²⁺ intracelular lo que permite movilizar a las vesículas que contienen el neurotransmisor glutamato. El glutamato al ser vertido en la sinapsis se une a los

receptores NMDA y AMPA, mientras que el BDNF se une a los receptores TrkB en la neurona postsináptica. La activación del receptor AMPA permite la entrada de Na^+ que despolariza a la célula, este cambio de potencial de membrana libera al receptor NMDA del ion Mg^{2+} que lo mantenía bloqueado facilitando la entrada de Ca^{2+} . La activación de CaMKII por el Ca^{2+} desestabiliza los filamentos de actina que son reorganizados y elongados por la Arc. Por otro lado, la unión del BDNF al receptor TrkB activa a la CaMKII a través de PLC, provocando un aumento de la inserción de los receptores AMPA en la membrana. La fosforilación de CREB por medio de las cinasas ERK, PI3K y PKC induce la expresión de factores de transcripción como c-Fos que participa en los mecanismos moleculares del aprendizaje y la memoria promoviendo la plasticidad neuronal.

Experimento 2

Los resultados obtenidos en la tarea de laberinto de Barnes (figura 23) muestran una disminución el tiempo de latencia para encontrar la caja de escape en la sesión de adquisición y recuperación de la información, sugiriendo que la administración crónica de cafeína a dosis de 7.0 y 15 mg/ kg mejora la adquisición de la información y facilita la recuperación de la memoria espacial de largo plazo. Resultados contrarios a estos fueron reportados por Han y cols., (2007), Shukitt-Hale y cols., (2013) y Jang y cols., (2013); estos autores concluyen que la administración de cafeína deteriora el aprendizaje y la memoria espacial.

En la tarea de reconocimiento de objetos los animales administrados crónicamente con cafeína a dosis de 7.5 y 15 mg/ kg (figura 24), muestran un aumento en el índice de discriminación de objetos durante la segunda fase del experimento, esto indica que los roedores emplean más tiempo reconociendo el objeto nuevo con respecto al objeto ya conocido (viejo), presentado en la fase uno del experimento; se acepta que esta conducta es debida a que los sujetos experimentales recuerdan el objeto viejo, por lo que ya no emplean tiempo en reconocerlo, los resultados obtenidos son similares a los de Costa y cols., (2008) y Abreu y cols., (2011) quienes reportan que la cafeína mejora la recuperación de la memoria espacial de largo plazo.

Tomando en cuenta lo anterior se confirma que la administración crónica de cafeína mejora el aprendizaje y la memoria espacial, este efecto podría estar relacionado principalmente con el aumento de la expresión de los receptores TrkB y los niveles de BDNF a través de la fosforilación del factor de transcripción CREB dependiente de AMPc, debido a que la cafeína tiene una estructura similar a los nucleótidos cíclicos, inhibe a la

fosfodiesterasa 3 (Costa y cols., 2008; Fisone y cols., 2004). El BDNF se une a TrkB desencadenando la activación de las principales vías de señalización a través de PI3K, PKC y ERK que activan a los factores de transcripción en el núcleo e inducen la LTP en el hipocampo (figura 29) (Ying y cols., 2002; Bekinschtein y cols., 2014).

En el hipocampo de los animales que fueron administrados con 7.5 y 15 mg/kg de cafeína aumento la actividad de las enzimas antioxidantes SOD (figura 25) y GPX (figura 26), pero no la actividad de CAT (figura 27). Respecto a la superóxido dismutasa Abreu y cols. (2011), reportan resultados similares; el consumo crónico de cafeína incrementa la actividad de ésta enzima. El mecanismo de acción de la cafeína en las neuronas explica los resultados obtenidos en este trabajo; el bloqueo de los receptores A₁ inhibe la acción de las fosfodiesterasa 3, activa los canales de Ca⁺ permitiendo la liberación de neurotransmisores y la fosforilación de CREB, NRF2, y FOXO3 que modulan la transcripción de genes que codifican las enzimas antioxidantes como SOD y GPX (figura 29) (Mattson y Cheng, 2006; Fisone y cols., 2004; Landolt y cols, 2012). Sin embargo los resultados presentados en la figura 27 no mostraron diferencia significativa, probablemente porque la actividad de CAT fue compensada por el incremento de GPX, neutralizando al H₂O₂ generado por la acción de SOD (Noschang y cols., 2009).

Tomando en cuenta lo anterior, se presenta el siguiente esquema hipotético del efecto de la cafeína sobre la adquisición y la recuperación de la memoria espacial de largo plazo.

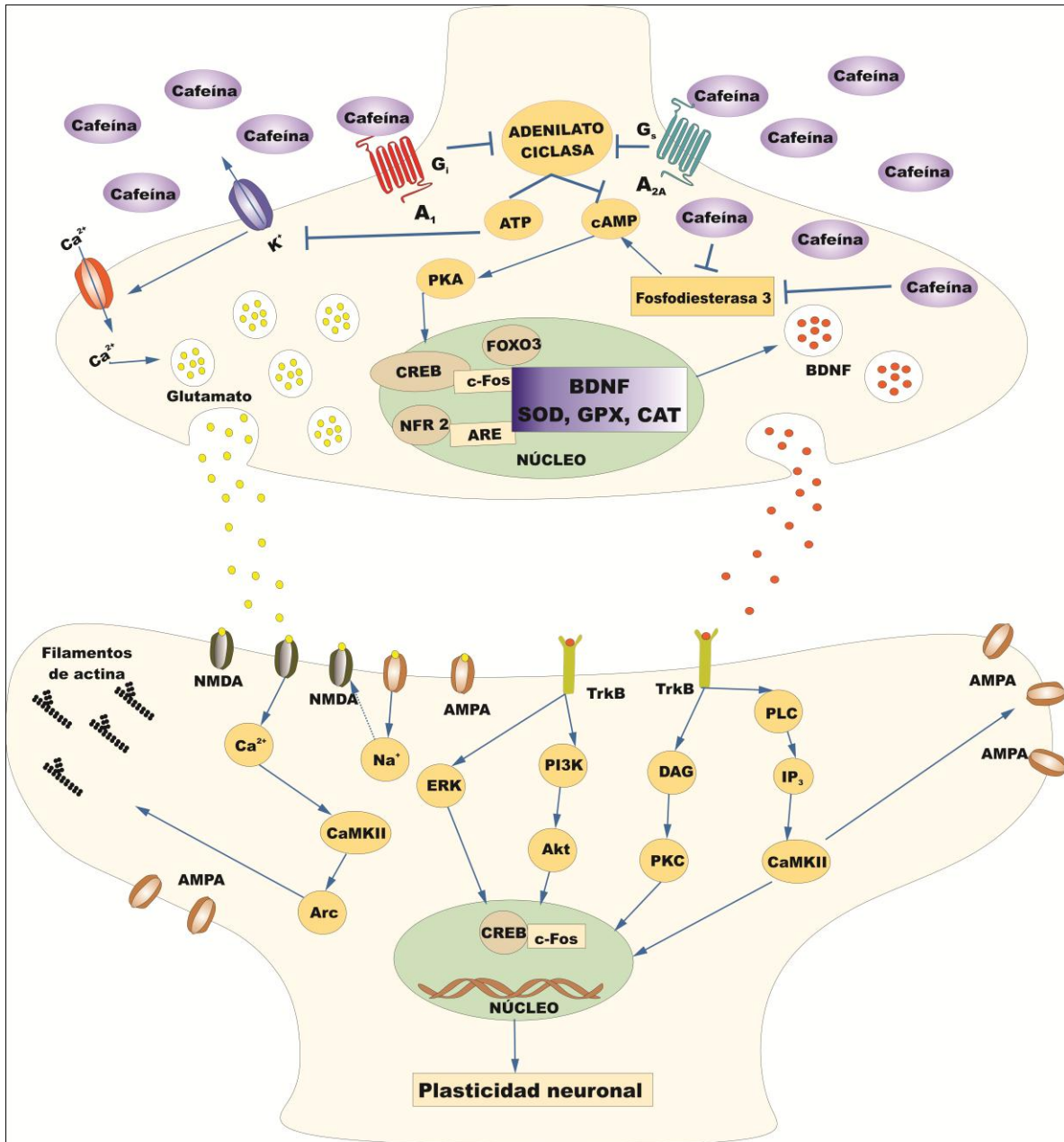


Figura 29. Esquema hipotético del efecto de la cafeína sobre la memoria espacial a través de la LTP y el aumento de la actividad de enzimas antioxidantes en el hipocampo. En la neurona presináptica, cuando la cafeína se une a los receptores A_1 y A_{2A} acoplados a proteínas G_i y G_s y A_{2A} respectivamente, provoca la inhibición de la adenilato ciclasa, aumentando los niveles de ATP que bloquean a los canales de K^+ , el aumento de K^+ intracelular provoca un cambio en el potencial de membrana que permite la apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, lo que desencadena la liberación de glutamato. Por otro lado, la cafeína inhibe a la fosfodiesterasa 3 que hidroliza a AMPc a sus formas no cíclicas por lo tanto, el AMPc se acumula en las células y activa a PKA que fosforila a los factores de transcripción como NRF2, CREB, c-Fos y FOXO3 que se

translocan al núcleo para codificar la estimulación BDNF y la expresión de enzimas antioxidantes (SOD, GPX y CAT). Así mismo el bloqueo de los receptores acoplados a proteínas disminuye la actividad de la adenilato ciclasa. El glutamato al ser vertido en la sinapsis se une a los receptores NMDA y AMPA, mientras que el BDNF se une a los receptores TrkB en la neurona postsináptica. La activación del receptor AMPA permite la entrada de Na^+ que despolariza a la célula, este cambio de potencial de membrana libera al receptor NMDA del ion Mg^{2+} que lo mantenía bloqueado facilitando la entrada de Ca^{2+} . La activación de CaMKII por el Ca^{2+} desestabiliza los filamentos de actina que son reorganizados y elongados por la Arc. Por otro lado, la unión del BDNF al receptor TrkB activa a la CaMKII a través de PLC, provocando un aumento de la inserción de los receptores AMPA en la membrana. La fosforilación de CREB por medio de las cinasas ERK, PI3K y PKC induce la expresión de genes de factores de transcripción como c-Fos que participa en los mecanismos moleculares del aprendizaje y la memoria promoviendo la plasticidad neuronal.

9. CONCLUSIONES

- Los animales administrados crónicamente con BSS-4 a dosis de 0.5 y 1.0 mg/kg muestran una mejora en la adquisición y recuperación de la memoria espacial de largo plazo en las tareas conductuales laberinto de Barnes y reconocimiento de objetos.
- En el hipocampo de los animales administrados crónicamente con BSS-4 a dosis de 0.5 y 1.0 mg/ kg aumenta la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPX), sin embargo no aumenta la actividad de catalasa (CAT).
- La administración crónica de cafeína a dosis de 7.5 y 15 mg/ kg mejora la adquisición y facilita la recuperación de la memoria espacial de largo plazo en la prueba laberinto de Barnes y en la tarea de reconocimiento de objetos.
- En el hipocampo de los animales administrados crónicamente con cafeína a dosis de 7.5 y 15 mg/ kg aumenta la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPX), sin embargo no aumenta la actividad de catalasa (CAT).

10. REFERENCIAS

- Abreu R. V., Silva-Oliveira, E. M., Moraes, M. F., Pereira, G. S. y Moraes-Santos, T. (2011). Chronic coffee and caffeine ingestion effects on the cognitive function and antioxidant system of rat brains. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, (4), 659-664.
- Agostinho P., Caseiro, P., Rego, A. C., Duarte, E. P., Cunha, R. A. y Oliveira, C. R. (2000). Adenosine modulation of D-[3H] aspartate release in cultured retina cells exposed to oxidative stress. *Neurochemistry International*, 36(3), 255-265.
- Antunes M. y Biala, G. (2012). The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cognitive Processing*, 13(2), 93-110.
- Barnes C. A. (1979). Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 93(1), 74-104.
- Bekinschtein P., Cammarota, M. y Medina, J. H. (2014). BDNF and memory processing. *Neuropharmacology*, 76 (2014): 677-683.
- Carrillo-Mora P., Giordano, M. y Santamaría, A. (2009). Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. *Behavioural Brain Research*, 203(2), 151-164.
- Chiu C. S., Chiu, Y. J., Wu, L. Y., Lu, T. C., Huang, T. H., Hsieh, M. T., Lu, C. Y. y Peng, W. H. (2011). Diosgenin ameliorates cognition deficit and attenuates oxidative damage in senescent mice induced by D-galactose. *The American Journal of Chinese Medicine*, 39(3), 551-563.
- Corkin S. (2002). What's new with the amnesic patient H.M.? *Nature Reviews. Neuroscience*, 3(2), 153-160.
- Costa, M. S., Botton, P. H., Mioranza, S., Ardais, A. P., Moreira, J. D., Souza, D. O. y Porciúncula, L. O. (2008). Caffeine improves adult mice performance in the object recognition task and increases BDNF and TrkB independent on phospho-CREB immunocontent in the hippocampus. *Neurochemistry International*, 53(3-4):89-94.

- Cunha R. A. y Agostinho, P. M. (2010). Chronic caffeine consumption prevents memory disturbance in different animal models of memory decline. *Journal of Alzheimer's Disease*, 20, 95-116.
- Dal-Cim T., Molz, S., Egea, J., Parada, E., Romero, A., Budni, J., Martín de Saavedra, M. D., Del Barrio, L., Tasca, C. I. y López, M. G. (2012). Guanosine protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against mitochondrial oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via PI3K/Akt/GSK-3 β pathway. *Neurochemistry International*, 61(3):397-404.
- Dawood M. Y., Lumley L. A., Robison C. L., Saviolakis G. A. y Meyerhoff J. L. (2004). Accelerated Barnes maze test in mice for assessment of stress effects on memory. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1032, 304-307.
- Dias V., Junn, E. y Mouradian, M. M. (2013). The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Journal of Parkinson's Disease*, 3(4), 461-491.
- Eichenbaum H. (2004). Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. *Neuron*, 44(1),109-120.
- Fernández-Herrera M. A., Sandoval-Ramírez, J., Meza-Reyes, S. y Montiel-Smith, S. (2009). Side-chain opening of steroidal sapogenins to form 22-oxocholestanic skeletons. An approach to analogues of the aglycone of the potent anticancer agent OSW-1. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 53(3), 126-130.
- Ferre S., Ciruela, F., Borycz, J., Solinas, M., Quarta, D., Antoniou, K., Quiroz, C., Justinova, Z., Lluís, C., Franco, R. y Goldberg, S. R. (2008). Adenosine A₁-A_{2A} receptor heteromers: new targets for caffeine in the brain. *Frontiers in Bioscience*, 13, 2391-2399.
- Fisone, G., Borgkvist, A. y Usiello, A. (2004). Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(7-8):857-872.
- Fleischmann A., Hvalby, O., Jensen, V., Strekalova, T., Zacher, C., Layer, L. E., Kvello, A., Reschke, M., Spanagel, R., Sprengel, R., Wagner, E. F. y Gass, P. (2003). Impaired long-term memory and NR2A-type NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in mice lacking c-Fos in the CNS. *The Journal of Neuroscience*, 23(27):9116-922.

- Flohé L. y Günzler, W. A. (1984). Assays of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*, 105, 114-121.
- Fredholm B. B., Bättig, K., Holmén, J., Nehlig, A. y Zvartau, E. E. (1999). Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacological Reviews*, 51(1), 83-133.
- Halliwell B. (2012). Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutrition Reviews*, 70(5), 257-265.
- Han, M. E., Park, K. H., Baek, S. Y., Kim, B. S., Kim, J. B., Kim, H. J. y Oh, S. O. (2007). Inhibitory effects of caffeine on hippocampal neurogenesis and function. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 356(4):976-980.
- Huang H. C., Nguyen, T. y Pickett, C. B. (2000). Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(23):12475-12480.
- Jang Y. J., Kim, J., Shim, J., Kim, C. Y., Jang, J. H., Lee, K. W. y Lee, H. J. (2013). Decaffeinated coffee prevents scopolamine-induced memory impairment in rats. *Behavioural Brain Research*, 245,113-119.
- Kalda A., Yu, L., Oztas, E. y Chen, J. F. (2006). Novel neuroprotection by caffeine and adenosine A_{2A} receptor antagonists in animal models of Parkinson's disease. *Journal of the Neurological Sciences*, 248(1-2), 9-15.
- Landolt H. P., Rétey, J. V. y Adam, M. (2012). Reduced neurobehavioral impairment from sleep deprivation in older adults: contribution of adenosinergic mechanisms. *Frontiers in Neurology*, 3(62):1-11.
- Lee C. (2000). Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorbing capacity and inhibition of LDL peroxidation. *Clinica Chimica Acta*, 295(1-2):141-154.
- Lisman J. E., Talamini, L. M. y Raffone, A. (2005). Recall of memory sequences by interaction of the dentate and CA3: a revised model of the phase precession. *Neural Networks*, 18(9):1191-1201.

- Martin D., Rojo, A. I., Salinas, M., Diaz, R., Gallardo, G., Alam, J., De Galarreta, C. M. y Cuadrado, A. (2004). Regulation of heme oxygenase-1 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and the Nrf2 transcription factor in response to the antioxidant phytochemical carnosol. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(10):8919-8929.
- Mattson M. P. y Cheng, A. (2006). Neurohormetic phytochemicals: Low-dose toxins that induce adaptive neuronal stress responses. *Trends in Neurosciences*, 29(11):632-639.
- Méndez-Couz M., Conejo, N. M., Vallejo, G. y Arias, J. L. (2014). Spatial memory extinction: a c-Fos protein mapping study. *Behavioural Brain Research*, 1(260):101-110.
- Min K. J., Lee, J. T., Joe, E. H., y Kwon, T. K. (2011). An I κ B α phosphorylation inhibitor induces heme oxygenase-1(HO-1) expression through the activation of reactive oxygen species (ROS)-Nrf2-ARE signaling and ROS-PI3K/Akt signaling in an NF- κ B-independent mechanism. *Cellular Signalling*, 23(9):1505-1513.
- Moscovitch M., Nadel L., Winocur G., Gilboa A. y Rosenbaum R. S. (2006). The cognitive neuroscience of remote episodic, semantic and spatial memory. *Current Opinion in Neurobiology*, 16(2), 179-190.
- Noschang C. G., Krolow R., Pettenuzzo L. F., Ávila M. C., Fachin A., Arcego D. von Pozzer Toigo, E., Crema, L. M., Diehl, L. A., Vendite, D. y Dalmaz, C. (2009). Interactions between chronic stress and chronic consumption of caffeine on the enzymatic antioxidant system. *Neurochemical Research*, 34(9), 1568-1574.
- Noworyta-Sokolowska K., Górska A. y Golembiowska K. (2013). LPS-induced oxidative stress and inflammatory reaction in the rat striatum. *Pharmacological Reports*, 65(4), 863-869.
- Pari L., Monisha P. y Mohamed, J. A. (2012). Beneficial role of diosgenin on oxidative stress in aorta of streptozotocin induced diabetic rats. *European Journal of Pharmacology*, 691(1-3), 143-150.

- Patten D. A., Germain, M., Kelly, M. A. y Slack, R. S. (2010). Reactive oxygen species: stuck in the middle of neurodegeneration. *Journal of Alzheimer's Disease*, 20 (2):357-367.
- Perry J. J., Shin, D. S., Getzoff, E. D. y Tainer, J. A. (2010). The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804(2), 245-262.
- Prasanthi J. R., Dasari, B., Marwarha, G., Larson, T., Chen, X., Geiger, J. D. y Ghribi, O. (2010). Caffeine protects against oxidative stress and Alzheimer's disease-like pathology in rabbit hippocampus induced by cholesterol-enriched diet. *Free Radical Biology & Medicine*, 49(7), 1212-1220.
- Rendeiro C., Spencer, J. P., Vauzour, D., Butler, L. T., Ellis, J. A. y Williams, C. M. (2009). The impact of flavonoids on spatial memory in rodents: from behaviour to underlying hippocampal mechanisms. *Genes and Nutrition*, 4, 251–270.
- Scandalios J. G. (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38(7), 995-1014.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación; 2001. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. *Diario Oficial de la Federación de México*. Estados Unidos Mexicanos.
- Sharma S., Rakoczy, S. y Brown-Borg, H. (2010). Assessment of spatial memory in mice. *Life Sciences*, 87(17-18), 521-536.
- Shukitt-Hale B., Miller, M. G., Chu, Y. F., Lyle, B. J. y Joseph, J. A. (2013). Coffee, but not caffeine, has positive effects on cognition and psychomotor behavior in aging. *Age (Dordrecht, Netherlands)*, 35(6), 2183-2192.
- Squire L. R. y Zola, S. M. (1996). Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(24), 13515-13522.
- Steckert A. V., Valvassori, S. S., Moretti, M., Dal-Pizzol, F. y Quevedo, J. (2010). Role of oxidative stress in the pathophysiology of bipolar disorder. *Neurochemical Research*, 35(9):1295-1301.

- Stefanacci L., Buffalo, E. A., Schmolck, H. y Squire, L. R. (2000). Profound amnesia after damage to the medial temporal lobe: A neuroanatomical and neuropsychological profile of patient E. P. *The Journal of Neuroscience*, 20(18), 7024-7036.
- Talpos J. C., Dias, R., Bussey, T. J. y Saksida, L. M. (2008). Hippocampal lesions in rats impair learning and memory for locations on a touch-sensitive computer screen: the "ASAT" task. *Behavioural Brain Research*, 192(2), 216-225.
- Texel S. J. y Mattson, M. P. (2011). Impaired adaptive cellular responses to oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 14(8):1519-34.
- Tohda C., Urano, T., Umezaki, M., Nemere, I. y Kuboyama, T. (2012). Diosgenin is an exogenous activator of 1,25D₃-MARRS/Pdia3/ERp57 and improves Alzheimer's disease pathologies in 5XFAD mice. *Scientific Reports*, 2:535.
- Tohda, C., Lee, Y. A., Goto, Y. y Nemere, I. (2013). Diosgenin-induced cognitive enhancement in normal mice is mediated by 1,25D₃-MARRS. *Scientific Reports*, 3:3395.
- Trejo R. (2013). Efecto del BSS-4 sobre la morfología dendrítica en un modelo de lesión excitotóxica en el hipocampo dorsal de rata. Tesis de licenciatura. FCQ-BUAP.
- Van Dam D., Lenders, G. y De Deyn, P. P. (2006). Effect of Morris water maze diameter on visual-spatial learning in different mouse strains. *Neurobiology of Learning and Memory*, 85(2), 164-172.
- West A. E., Griffith, E. C. y Greenberg, M. E. (2002). Regulation of transcription factors by neuronal activity. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(12):921-931.
- Ying S. W., Futter, M., Rosenblum, K., Webber, M. J., Hunt, S. P., Bliss, T. V. y Bramham, C. R. (2002). Brain-derived neurotrophic factor induces long-term potentiation in intact adult hippocampus: requirement for ERK activation coupled to CREB and upregulation of Arc synthesis. *The Journal of Neuroscience*, 22(5):1532-1540.
- Zámocký M. y Koller, F. (1999). Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and *in vitro* mutagenesis. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 72(1), 19-66.

Zecca L., Youdim, M. B., Riederer, P., Connor, J. R. y Crichton, R. R. (2004). Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(11):863-873.

Chiu C. S., Deng J. S., Hsieh M. T., Fan M. J., Lee M. M., Chueh F. S., Han C. K., Lin Y. C., y Peng W. H. (2009). Yam (*Dioscorea pseudojaponica* Yamamoto) ameliorates cognition deficit and attenuates oxidative damage in senescent mice induced by D-galactose. *The American Journal of Chinese Medicine*, 37(5):889-902.