



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE PUEBLA**



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
DEPARTAMENTO DE FARMACIA  
LABORATORIO DE NEUROQUÍMICA

TESIS PROFESIONAL  
**EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN INTRAHIPOCAMPAL DEL  
DERIVADO COLESTÁNICO BSS-4 SOBRE LA MEMORIA  
ESPACIAL**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

PRESENTA  
**ELIZABETH ESTRELLA MUÑOZ**

DIRECTORAS  
**DRA. MARÍA ISABEL MARTÍNEZ GARCÍA**  
LABORATORIO DE NEUROQUÍMICA FCQ-BUAP

**DRA. MARÍA ANTONIETA FERNÁNDEZ HERRERA**  
LABORATORIO DE BIOMOLÉCULAS COMPLEJAS  
CINVESTAV-IPN

ABRIL, 2015

*Vinieron los recuerdos  
y saquearon todo:  
se llevaron el olvido,  
me dejaron el amor.*

*Anna Bahena.*

*Dedicado a la persona en quien durante este tiempo encontré la mayor fuente de comprensión, inspiración, fortaleza y consuelo, de quien reconozco el esfuerzo y dedicación, quien a partir de ahora merece solo lo mejor de mí.*

*A Elizabeth Estrella Muñoz*

## **AGRADECIMIENTOS**

### **Dra. María Isabel Martínez García**

Por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo en su laboratorio y por su experiencia adquirida luego de años de investigación. Le agradezco las valiosas aportaciones a mi vida personal y académica. Tiene mi más ferviente admiración.

### **Dra. María Antonieta Fernández Herrera**

Por su confianza y apoyo para la realización de esta tesis, sus comentarios y sugerencias siempre fueron de gran ayuda, le agradezco también su ejemplo de trabajo y dedicación.

A la comisión revisora:

### **Dr. I. Daniel Limón Pérez de León**

#### **M.C. Félix Luna Morales**

#### **Dr. Jesús Sandoval Ramírez**

Por su disposición, aportaciones y sugerencias para la mejora de este trabajo y de mi formación académica.

### **MVZ. Carlos Escamilla Weinmann**

Director del bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por proporcionar los animales de experimentación.

### **M. C. Armando Hernández Meléndez**

Por su valiosa ayuda en el análisis estadístico de los resultados.

## **A mi madre**

Por tu amor y apoyo incondicionales, por tu paciencia con mi forma de ser, por forjar en mí los valores y sentimientos que me motivan a ser mejor persona, todos los días, por tus enseñanzas de lucha y coraje que nunca olvidaré, por estar siempre conmigo.

## **A mi hermana**

Por ser la mejor que pude tener, por entenderme y amarme, por nunca abandonarme, tienes mi completa admiración. Que tu esfuerzo siempre te recompense, mis mejores deseos para tu vida profesional.

## **A mis amigos**

A Ramiro Carrasco, por ser mi hermano elegido y mejor amigo, por hacerte sentir siempre presente aun estando lejos, por tu amor y comprensión incondicionales, por todos los hermosos recuerdos y las próximas aventuras.

A Maricela Galicia, que sin ser consciente de ello, fuiste un motor importante para alcanzar este objetivo. Este logro y mi corazón son tuyos.

A Rosy Trejo, por tu hermosa amistad, consejos, enseñanzas, aportaciones, motivación constante y apoyo incondicional. Te estaré por siempre agradecida.

A Oliva y Maribel Ramírez por hacerme sentir verdaderamente como su hermana desde que nos conocemos.

A todos mis amigos y compañeros del laboratorio de Neuroquímica.

Y por supuesto a todos los animales de experimentación, ya que sin ellos este trabajo y ningún avance científico podrían ser posibles, así como tampoco podríamos gozar de los beneficios de los resultados.

## ÍNDICE

### RESUMEN

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 La formación hipocampal .....	1
1.2 El hipocampo y la célula piramidal .....	1
1.3 Memoria espacial .....	4
1.4 Mecanismo celular de la memoria.....	5
1.5 Reconocimiento de objetos .....	9
1.6 La diosgenina.....	10
1.7 El derivado colestánico, BSS-4.....	14
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b> .....	18
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	19
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b> .....	19
4.1 Objetivos particulares.....	19
<b>5. DIAGRAMA DE TRABAJO</b> .....	20
<b>6. MÉTODO GENERAL</b> .....	21
6.1 Animales .....	21
6.2 Preparación del BSS-4.....	21
6.3 Material .....	21
6.4 Aparatos.....	22
6.5 Sustancias .....	22
6.6 Cirugía Estereotáxica.....	22
6.7 Administración de BSS-4 .....	24
6.8 Reconocimiento de objetos.....	24
6.9 Obtención de los cerebros .....	26
6.10 Tinción de Nissl modificada .....	26
6.11 Análisis estadístico.....	26
<b>7. RESULTADOS</b> .....	27
7.1 Sitio de implantación de las cánulas guía .....	27
7.2 Número de reconocimientos .....	28

7.2.1 Administración del BSS-4 antes de la fase de adquisición de la información .....	28
7.2.2 Administración del BSS-4 antes de la fase de recuperación de la información .....	29
7.3 Índice de discriminación.....	30
<b>8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....</b>	<b>31</b>
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>36</b>
<b>10. REFERENCIAS.....</b>	<b>37</b>

## RESUMEN

Los desórdenes de la memoria son la patología característica de diversas enfermedades neurológicas como la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson. La memoria espacial una de las principales funciones cognitivas en disminuir durante estos padecimientos.

Evidencias experimentales demuestran que la diosgenina, una sapogenina esteroideal, posee efectos neuroprotector, neurotrófico así como reductor de los déficits cognitivos a través del incremento de enzimas antioxidantes. El triacetato de 22-oxocolest-5-en-3 $\beta$ ,16 $\beta$ ,26-triilo (BSS-4) es un compuesto colestánico obtenido a partir de la acetólisis de diosgenina. Experimentos anteriores demuestran que su administración periférica brinda efectos neuroprotector, neurotrófico, antioxidante además de mejorar el aprendizaje y la memoria.

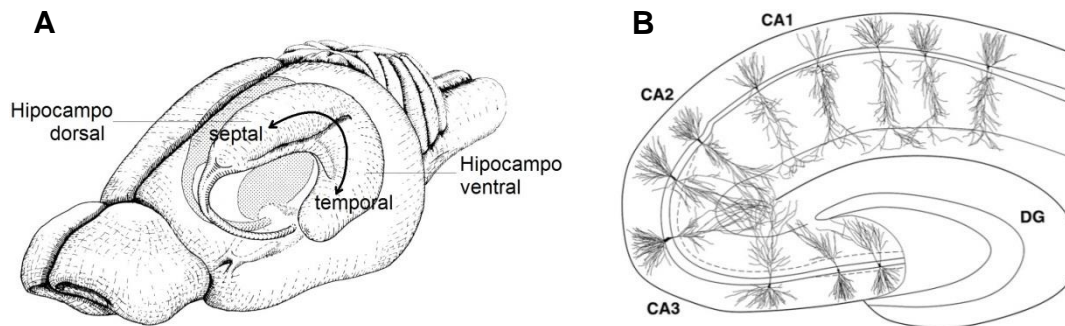
En el presente trabajo, el BSS-4 fue administrado en ratas por medio de cánulas guía implantadas durante cirugía estereotáxica. El objetivo fue determinar el efecto de dos diferentes concentraciones sobre la adquisición de la información y la recuperación de la memoria espacial de largo plazo. De acuerdo a los resultados obtenidos el BSS-4 no mejora la adquisición ni la recuperación de la memoria espacial evaluada en la tarea de reconocimiento de objetos.

Se propone que el responsable de los efectos positivos sobre la memoria y el aprendizaje sea un metabolito activo obtenido a partir de la biotransformación del BSS-4 (mBSS-4) y que la obtención de tal estructura se favorece cuando se administra el BSS-4 de forma crónica y sistémica.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 La formación hipocampal

La formación hipocampal es una estructura elongada, su eje longitudinal denominado eje septotemporal (figura 1A) se extiende en forma de C desde la línea media del cerebro cerca del núcleo septal, pasando encima y por detrás del tálamo hacia el lóbulo temporal. Comprende seis regiones citoarquitectónicas distintas: el giro dentado, el hipocampo propiamente dicho, el subiculum, presubiculum, parasubiculum y la corteza entorrinal (Witter y Amaral, 2004).

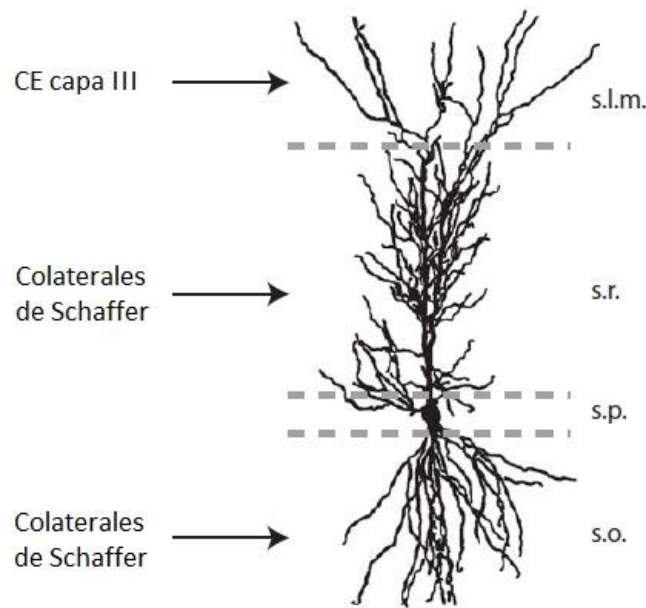


**Figura 1. (A)** Ubicación de la formación hipocampal en el cerebro de rata. Se muestra el eje septotemporal. **(B)** Organización de las células piramidales en las regiones CA3, CA2 y CA1 del hipocampo (Modificado de Amaral y Lavenex, 2007; Witter y Amaral, 2004).

### 1.2 El hipocampo y la célula piramidal

El hipocampo es la región de la formación hipocampal que comprende al CA3, CA2 y CA1 (figura 1B). El principal tipo neuronal de estas regiones es la célula piramidal (figura 2), las cuales constituyen la mayoría de las neuronas presentes en el *stratum pyramidale*. De ella emergen dos árboles dendríticos, las dendritas basales ocupan el *stratum oriens* y las dendritas apicales ocupan el *stratum radiatum* (proximal apical) y el *stratum lacunosum-moleculare* (distal apical; Amaral y Lavenex, 2007). La distancia desde la punta de las dendritas basales a la punta de las dendritas apicales es de menos de 1 mm. En promedio

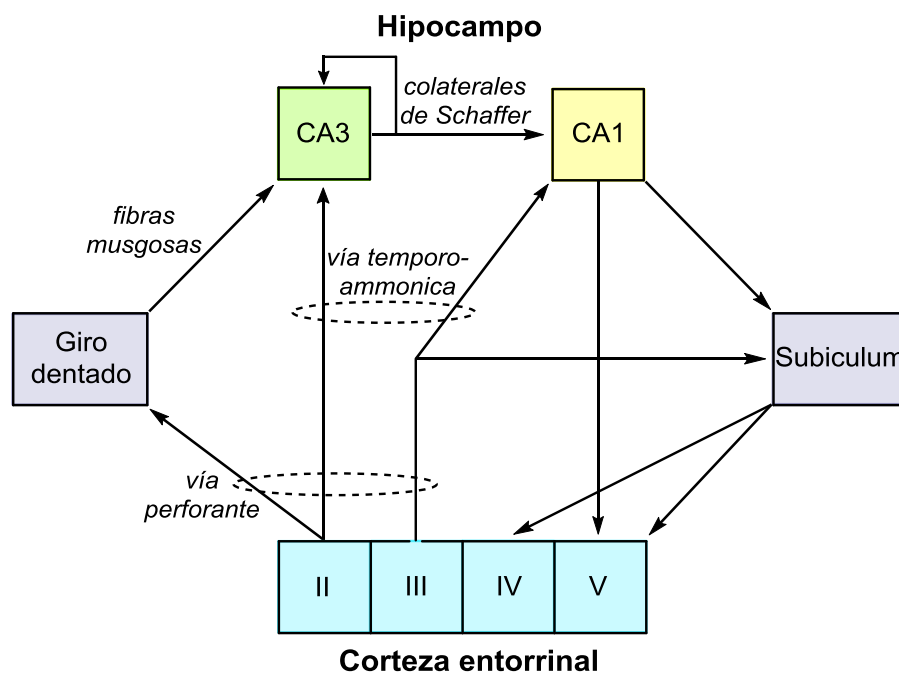
la longitud dendrítica de la célula piramidal del CA1 es de 13.5 mm: las dendritas basales contribuyen con el 36% de la longitud total, las dendritas apicales en el *stratum radiatum* contribuyen con el 40% y las dendritas apicales en el *stratum lacunosum-moleculare* con el 24% restante. El tamaño del soma es de aproximadamente  $193 \mu\text{m}^2$  y tiene  $15 \mu\text{m}$  de diámetro. Las células piramidales del CA1 están cubiertas con alrededor de 30,000 espinas dendríticas, la mayoría de las cuales reciben entradas de información sináptica excitatoria. La densidad de las espinas dendríticas y de sinapsis en estas neuronas es más alta en el *stratum radiatum* y *stratum oriens* y baja en el *stratum lacunosum-moleculare* (Sproust y McBain, 2007).



**Figura 2.** Morfología de la célula piramidal del CA1 muestra el cuerpo celular en el *stratum piramidale* (s.p.), las dendritas basales en el *stratum oriens* (s.o.), las dendritas apicales en el *stratum radiatum* (s.r.) y en el *stratum lacunosum-moleculare* (s.l.m.). Además de las principales entradas de información en cada estrato (Modificado de Sproust y McBain, 2007).

El hipocampo tiene un único patrón de conectividad no recíproco o unidireccional; el circuito trisináptico (figura 3) que está organizado en láminas a lo

largo de su eje septotemporal. Las proyecciones de la capa II de la corteza entorrinal al giro dentado forman parte de la mayor entrada de información hipocampal llamada “vía perforante”. Igualmente, las principales células del giro dentado, las células granulares, dan lugar a los axones llamados “fibras musgosas” que conectan con las células piramidales del CA3 del hipocampo. Las células piramidales del CA3, a su vez proyectan al CA1 a través de las colaterales de Schaffer. El CA1, proyecta principalmente al *subiculum* pero también envía una proyección a la capa V de la corteza entorrinal. Finalmente, el *subiculum* envía una proyección a las capas IV y V de la corteza entorrinal. Existe también una pequeña aferencia directa de la capa II de la corteza entorrinal al CA3 a través de la “vía perforante” y una de la capa III al CA1 del hipocampo a través de la vía temporoammonica (Martin y Clark, 2007).



**Figura 3.** Diagrama del circuito trisináptico que muestra la manera en que la información entra en el hipocampo desde las capas superficiales de la corteza entorrinal y luego fluye unidireccionalmente para volver predominantemente a las capas profundas de la estructura. (Modificado de Martin y Clark, 2007).

### **1.3 Memoria espacial**

La memoria no es estática, aislada o una sola función cerebral; puede ser mejor descrita como una compleja red de diferentes funciones interrelacionadas, trabajando juntas para administrar la información. Así la memoria puede ser definida como una función cerebral cuyo propósito es clasificar, codificar, almacenar y recuperar una amplia diversidad de información relevante para el sujeto. En términos generales, la memoria puede ser clasificada en dos grandes grupos: memoria declarativa, referente a la información que es convencionalmente transmitida o expresada; y memoria no declarativa o procedimental, representando a la información acerca de habilidades motoras y perceptuales que no pueden ser oralmente expresadas. La memoria declarativa es además subdividida en memoria episódica, que es la experimentada en eventos específicos con un contexto particular, como el tiempo o lugar; y la memoria semántica que involucra el conocimiento de estos hechos independientemente del contexto en que se aprendieron (Squire, 2004).

Otra frecuente distinción es la hecha entre memoria de corto y largo plazo. La memoria de corto plazo tiene una limitada capacidad y sólo dura algunos minutos. En contraste, la memoria de largo plazo puede almacenar grandes cantidades de información durante un tiempo ilimitado (Sharma y cols., 2010).

La memoria espacial es conceptualizada como un subtipo de la memoria episódica, porque almacena información dentro de un marco espacio-temporal (Carrillo-Mora y cols., 2009). Es obtenida a través de la conducta exploratoria, una conducta instintiva y ampliamente preservada en todas las especies animales, incluido el hombre. Este tipo de conducta puede ser considerado una expresión de curiosidad natural o puede representar la necesidad de adquirir información cuando el sujeto se enfrenta a un nuevo ambiente o a un nuevo estímulo. Así la memoria espacial puede ser definida como una función cerebral responsable del reconocimiento, codificación, almacenamiento y recuperación de información espacial acerca de la disposición de objetos o rutas específicas y es

extremadamente importante en la vida de un animal, porque le permite la localización del nido o refugio y recursos importantes como la comida y el agua o la pareja sexual (Morellini, 2013).

La mayor estructura cerebral involucrada en la memoria declarativa es el hipocampo junto con otras estructuras del lóbulo temporal (Squire y Zola, 1996). La teoría del mapa cognitivo de O'Keefe y Nadel (1978) sugiere que la memoria espacial es dependiente del hipocampo. La primera evidencia de ello es el caso del paciente H. M. que padecía un deterioro severo en la adquisición de nuevos recuerdos después de la remoción quirúrgica del lóbulo medio temporal. La segunda evidencia es el descubrimiento de las "células de lugar". Éstas pueden ser detectadas por registros extracelulares *in vivo* de neuronas del CA1 y CA3 en animales en libre movimiento (Sharma y cols., 2010). En adición, más estudios han demostrado la relación entre los patrones de descarga de estas neuronas con la conformación espacial de los objetos ambientales o con las dimensiones del campo de exploración (Carrillo-Mora y cols., 2009).

El hipocampo recibe proyecciones desde las cortezas perirrinal, postrinal así como de la corteza entorrinal. En consecuencia, ha habido interés en la posibilidad de que el hipocampo pueda ser especialmente importante en las tareas que dependen de relacionar o combinar información de múltiples fuentes, como en ciertas tareas espaciales. Algunos reportes muestran que lesiones selectivas hipocampales deterioran la memoria de reconocimiento en humanos, monos y roedores (Broadbent y cols., 2004).

#### **1.4 Mecanismo celular de la memoria**

La plasticidad sináptica o los cambios en la estructura y la bioquímica de las sinapsis, son considerados como los mecanismos celulares que subyacen el aprendizaje y la memoria (Sharma y cols., 2010). La potenciación a largo plazo (LTP) es la propuesta de cómo la memoria es almacenada en animales intactos,

ocurre en dos fases: la fase temprana y fase tardía que se definen por la distinción del marco de tiempo con o sin transcripción de genes y síntesis de proteínas durante la plasticidad sináptica (Lynch, 2004).

Se sabe que después de la liberación del glutamato de las vesículas sinápticas desde la presinapsis, este difunde rápidamente a través de la hendidura sináptica y alcanza la membrana postsináptica donde se une a los receptores tipo NMDA y AMPA. Los receptores AMPA son canales iónicos activados por ligando y son permeables a  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , su activación conduce al fuerte influjo de  $\text{Na}^+$  y a un pequeño eflujo de  $\text{K}^+$ , el efecto neto es la despolarización de la membrana postsináptica (Lüscher y Malenka, 2012). El receptor NMDA posee un canal iónico voltaje dependiente permeable a  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Na}^+$ , a potencial de membrana negativo el poro se encuentra bloqueado por el  $\text{Mg}^{+2}$ , por lo tanto el desplazamiento del ion  $\text{Mg}^{+2}$  a través de la despolarización de la membrana postsináptica es necesario para exponer el canal iónico del receptor, lo que permite el influjo de  $\text{Ca}^{+2}$  a través de la membrana postsináptica (He y cols., 2014).

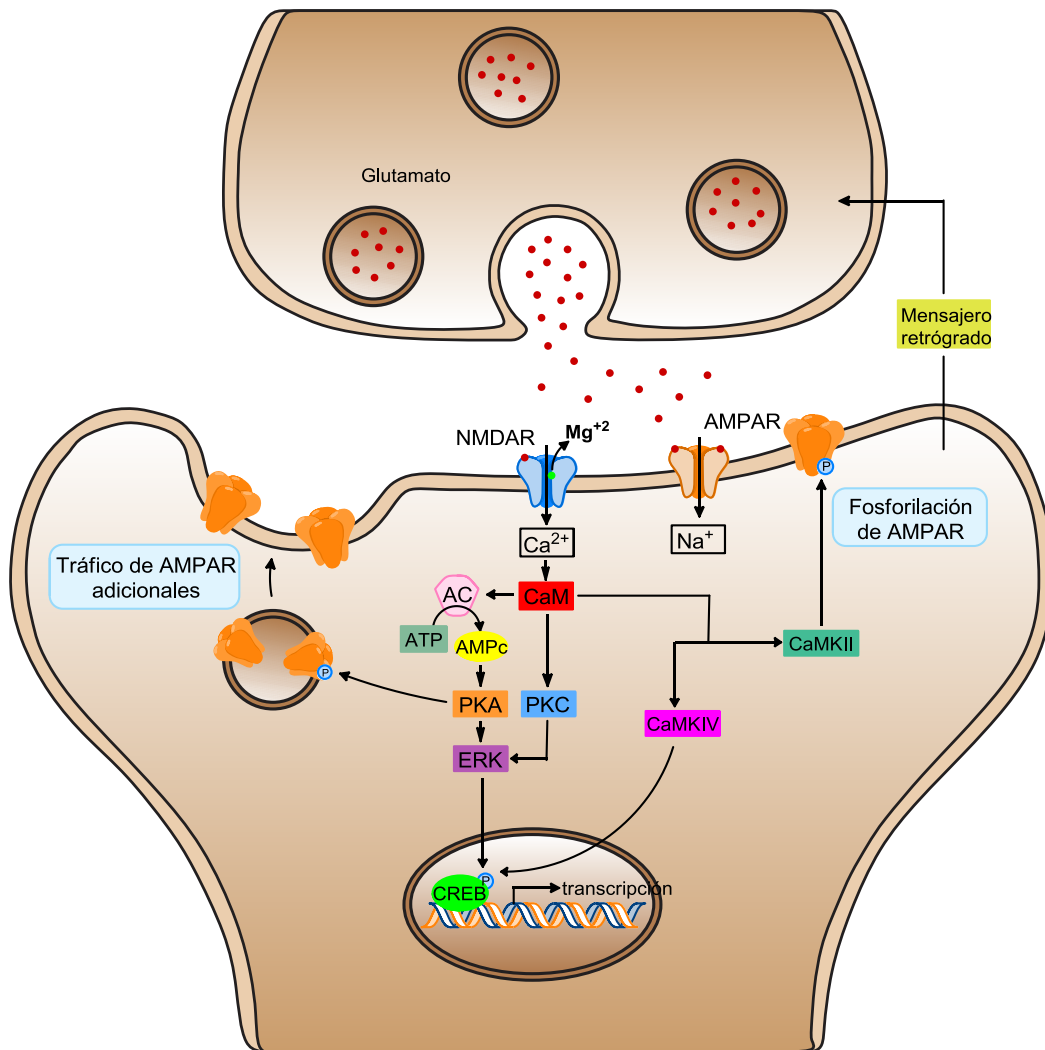
Ambos receptores AMPA y NMDA son tetraméricos, cada receptor AMPA está compuesto por la mezcla de las subunidades GluA1, GluA2, GluA3 y GluA4 (en una nomenclatura alternativa GluRA, GluRB, GluRC y GluRD). En el hipocampo los receptores NMDA están compuestos de dos subunidades GluN1 junto con la combinación de las subunidades GluN2A y GluN2B. Estos receptores median la transmisión sináptica excitatoria en el sistema nervioso central y periférico (Traynelis y cols., 2010).

Con una molécula de glutamato unida al receptor NMDA, el canal iónico se abre y permite el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  debido al gradiente de concentración a través de la membrana ( $0.1 \mu\text{M}$  en el volumen intracelular y  $1800 \mu\text{M}$  en el volumen extracelular; He y cols., 2014). La elevación de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular desencadena la activación de cinasas específicas como la proteína cinasa dependiente calcio/calmodulina II (CaMKII) y la proteína cinasa C (PKC; figura 4). La activación de la PKC en respuesta a la elevación de  $\text{Ca}^{2+}$  es

transitoria, pero puede ser fosforilada de manera autónoma sin la presencia continua del  $\text{Ca}^{2+}$ . La activación de la CaMKII por el  $\text{Ca}^{2+}$  y la calmodulina también puede permanecer activa independientemente de la presencia continua del  $\text{Ca}^{2+}$ . Esta activación de la CaMKII puede contribuir a los cambios morfológicos que acompañan los componentes más persistentes de la LTP, se ha demostrado que tal activación conduce a la fosforilación de la proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP2) y al neurofilamento L, los cuales juegan un papel importante en la regulación del citoesqueleto (Lynch, 2004).

Por otra parte, la excesiva liberación de glutamato y la alta permeabilidad del receptor NMDA pueden conducir a una sobre-estimulación del receptor y a un marcado incremento en la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. El excesivo influjo del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular junto con la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los almacenes intracelulares elevan la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico libre a niveles que exceden la capacidad de los mecanismos regulatorios intracelulares y puede conducir a desajustes metabólicos como la formación de radicales libres y muertes celular (Wang y Qin, 2010).

La expresión de la LTP requiere de la transcripción de genes y la síntesis de proteínas. La elevación fisiológica de la concentración intracelular del  $\text{Ca}^{2+}$  estimula a la adenilato ciclasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  la cual cataliza la producción del 3', 5'-adenosín monofosfato cíclico (AMPc). La elevación del AMPc activa otros grupos de proteínas cinasas, incluyendo la proteína cinasa A (PKA). La PKA fosforilada puede activar proteínas cinasas activadas por mitógenos, específicamente a la cinasa regulada por señal extracelular (ERK). Una vez activada, la ERK fosforila a factores de transcripción como la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB). El CREB fosforilado activa al elemento de respuesta a AMPc, el cual induce cambios en la transcripción de genes y desencadena la síntesis de nuevas proteínas (Kumar, 2011; figura 4).



**Figura 4.** Modelo simplificado de la inducción, expresión y mantenimiento de la LTP. Durante la transmisión sináptica normal el glutamato es liberado desde la terminal presináptica activando los receptores AMPA y NMDA. El influjo de  $\text{Na}^+$  a través del receptor AMPA conduce a la despolarización de la membrana postsináptica que facilita el desplazamiento del ion  $\text{Mg}^{+2}$  del canal del receptor NMDA, permitiendo la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$ . Este influjo de  $\text{Ca}^{+2}$  activa vías de señalización celular que incluyen elementos como la adenilato ciclasa, AMPc, PKA, PKC, CaMKII y CaMKIV, estos interactúan y causan alteraciones en los receptores AMPAR así como en proteínas relacionadas a estos receptores. En adición estas vías de señalización celular inducen la modulación de la expresión de genes regulada por CREB y la síntesis de nuevas proteínas (Modificado de He y cols., 2014; Lüscher y Malenka, 2012; Kumar, 2011).

## **1.5 Reconocimiento de objetos**

Existe una gran diversidad de métodos experimentales para evaluar las habilidades de aprendizaje y memoria en los animales. Los laberintos en “Y”, “T”, el laberinto radial, laberinto de Barnes o el laberinto acuático de Morris son los artefactos más empleados para la evaluación de la memoria espacial en roedores, aunque no son los únicos métodos. La suposición fundamental para el uso de estos laberintos está basada en un principio conductual en el que los animales deben aprender y recordar la localización que les proporcione seguridad, alimento, agua o alguna otra recompensa a través de señales visuo-espaciales (Carrillo-Mora y cols., 2009).

La tarea de reconocimiento de objetos es un modelo ampliamente usado para la investigación de la memoria y sus alteraciones. Ennaceur y Delacour (1988) fueron los primeros en estudiar esta tarea, concluyeron que ésta es una evaluación sencilla de la memoria y que depende principalmente de la conducta exploratoria innata del roedor. Además es una tarea conductual particularmente atractiva debido a que no requiere de motivación externa, refuerzos o castigos y puede ser completada en un tiempo relativamente corto (Mathiasen y DiCamilo, 2010).

La tarea de reconocimiento se basa en la preferencia de los roedores a reconocer significativamente más a los objetos nuevos que a los previamente presentados (objeto muestra) durante un periodo de familiarización, cuando ambos objetos son presentados simultáneamente. Se infiere que esta conducta involucra la memoria de reconocimiento debido a que para reconocer preferencialmente un objeto nuevo los roedores deben ser capaces de detectar la familiaridad en el objeto muestra (Gaskin y cols., 2010).

La manera en que el rendimiento de los animales es evaluado en la tarea de reconocimiento de objetos puede variar; este puede ser calculado a través de diferentes índices, como el índice de discriminación, índice de preferencia o índice global de habituación, dependiendo de los objetivos del estudio (Antunes y Biala,

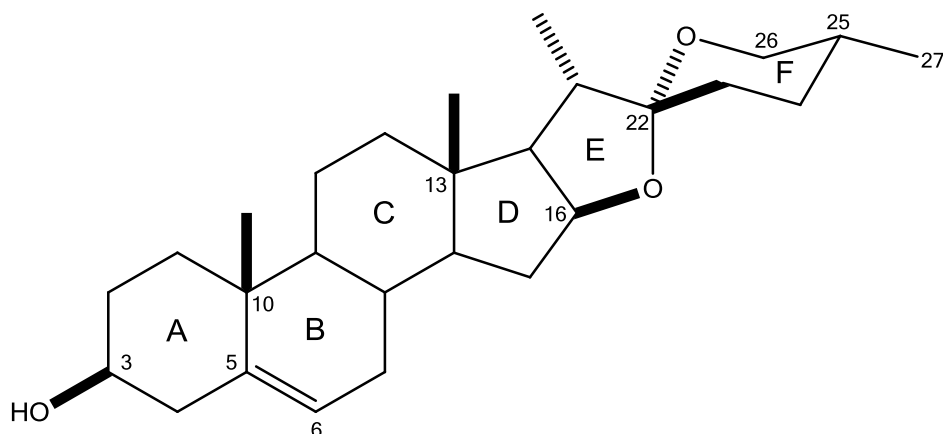
2012). Los efectos del daño cerebral o los tratamientos farmacológicos sobre el rendimiento de los animales puede diferir dependiendo de muchos factores cómo el tiempo de retención entre la familiarización y la prueba o el tiempo invertido en reconocer a los objetos muestra durante la familiarización (Ainge y cols., 2006).

Por otra parte, la habilidad para evaluar un elemento previamente presentado como familiar depende de la integridad del lóbulo medio temporal. Así los resultados de la tarea de reconocimiento de objetos son influenciados por lesiones hipocampales y corticales (Clark y cols., 2000). Es ampliamente aceptado que la corteza perirrinal juega un papel importante en relación con otras áreas del lóbulo temporal en el reconocimiento de objetos (Kealy y Commins, 2011).

## **1.6 La diosgenina**

Las saponinas son metabolitos secundarios de naturaleza glicosídica ampliamente distribuidos en las plantas superiores, pero también se encuentran en algunos invertebrados marinos. La diosgenina es una saponina esteroidea encontrada en plantas del género *Dioscorea* sp y *Trigonella* sp (Patel y cols., 2012) en forma de glicósido, comúnmente conocido como dioscina. Es un típico intermediario para la síntesis de estrógenos sintéticos, anticonceptivos orales y hormonas sexuales. Una serie de estudios pre-clínicos han encontrado un papel benéfico de la diosgenina contra enfermedades metabólicas, inflamación y cáncer (Raju y Rao, 2012).

Estructuralmente, la diosgenina [(25*R*)-spiro-5-en-3β-ol] consiste en una aglicona esteroidea, un esqueleto espiroestérico de 27 átomos de carbono en una estructura policíclica conformada por seis anillos (figura 5).

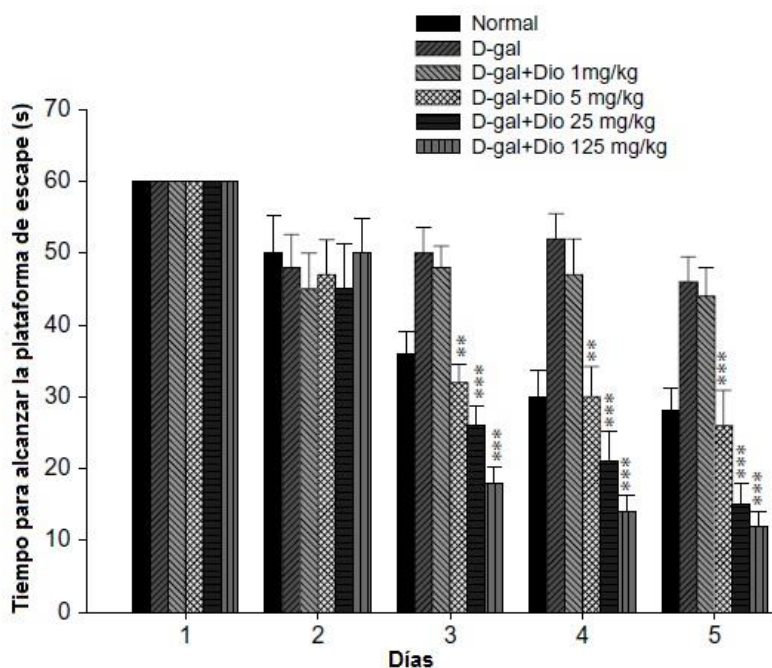


**Figura 5.** Estructura química de la diosgenina, se observan los seis anillos de la estructura (A-F) y se señalan las posiciones de los principales grupos funcionales. (Modificado de Fernández-Herrera y cols., 2009).

Kang y cols. (2011) examinaron el efecto neuroprotector de la diosgenina en modelos de roedores con neuropatía diabética, (inducida por la inyección intraperitoneal de aloxano; 120-150 mg/kg) caracterizada por degeneración axonal, desmielinización y atrofia en asociación con fallas en la regeneración axonal, remielinización y sinaptogénesis deterioradas. Encontraron un incremento del factor de crecimiento neuronal (NGF) 24 horas después de la administración oral con 10 mg/kg de diosgenina. En ratones diabéticos el tratamiento oral con la misma dosis de diosgenina durante dos meses mejora la velocidad de conducción neuronal (NCV). Adicionalmente, en respuesta al tratamiento con 10 µg/mL diosgenina las células PC12 incrementan el crecimiento neurítico. Dado que las neurotrofinas como el NGF son críticos para el desarrollo y fisiología del sistema nervioso, el estudio sugiere que diosgenina incrementa la NCV a través de la inducción de NGF. Así los hallazgos indican que ésta revierte cambios funcionales y estructurales e induce la regeneración neuronal en modelos con neuropatía diabética.

Por otro lado, Chiu y cols. (2011) evaluaron el efecto neuroprotector de la diosgenina en un modelo murino de senescencia inducido con D-galactosa, ocasionado por la acumulación de ROS y la estimulación de la producción de

radicales, indirectamente por la formación de glicación avanzada de productos metabólicos finales, resultando finalmente en estrés oxidativo. El estudio indica que el tratamiento crónico (4 semanas) con diosgenina (5-125 mg/kg, i.p.) mejora significativamente el deterioro de la memoria evaluada en el laberinto acuático de Morris (figura 6), e incrementa las actividades de las enzimas antioxidantes endógenas SOD y GPx, disminuye la lipoperoxidación y mejora los niveles de MDA en el cerebro de ratón, por lo que proponen que la diosgenina tiene potencial uso como terapia anti envejecimiento o como tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

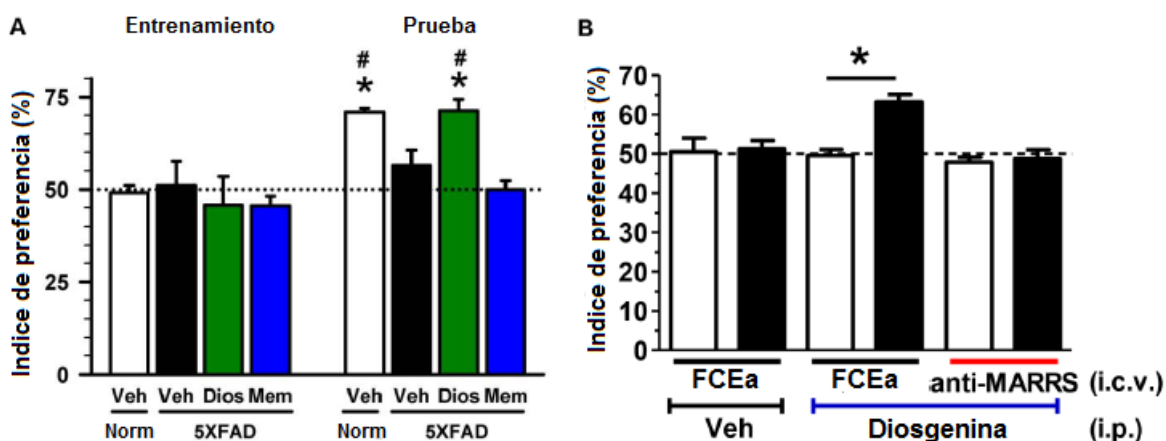


**Figura 6.** Tiempos de latencia para encontrar la plataforma de escape de ratones seniles inducidos con D-galactosa y administrados con diferentes dosis de diosgenina (Modificado de Chiu y cols., 2011).

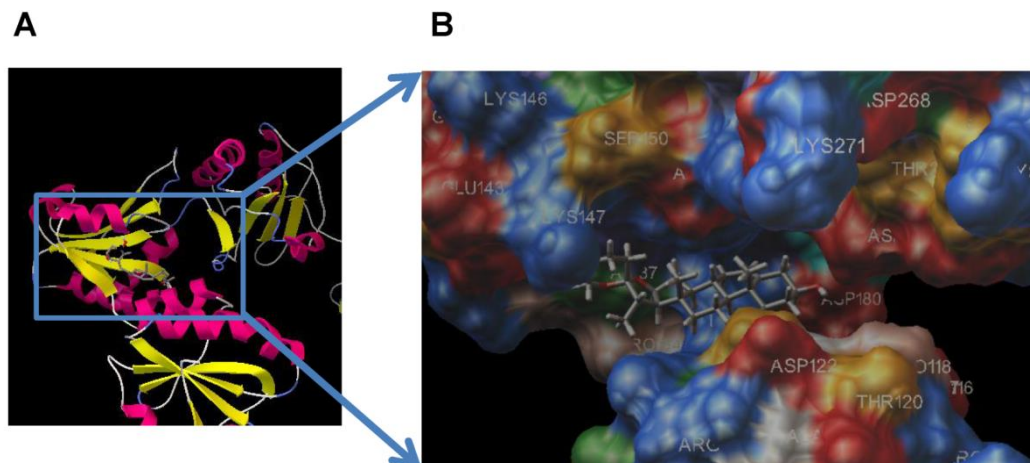
Tohda y cols. (2012) reportaron que la administración crónica de la diosgenina (10 $\mu$ mol/kg; 4.14 mg/kg, i.p.) induce la recuperación de los déficits de la memoria de reconocimiento (figura 7A) además de restablecer la regeneración axonal en la corteza cerebral y el hipocampo en un modelo murino de la enfermedad de Alzheimer (ratones 5XFAD). En adición, durante los estudios *in*

*in vitro* la diosgenina activa al  $1,25D_3$ -MARRS (figura 8) e induce el crecimiento y regeneración axonal en neuronas normales y en neuronas con daños inducidos por el péptido A $\beta$  (1-42).

Se demostró en otro de los reportes de Tohda y cols. (2013) que la administración de la diosgenina en ratones normales, también mejora la memoria de reconocimiento de objetos y la densidad axonal en la corteza prefrontal media y en la corteza perirrinal. En estas regiones la expresión de cFos incrementó, sugiriendo que la activación de la red neuronal puede mejorar en el ratón. Aunque el crecimiento axonal no se observó en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo, la expresión de cFos en el CA1 tendió a incrementar en los ratones administrados con diosgenina. Además confirman con sus estudios *in vivo* que la mejora de la memoria y el crecimiento axonal se inhibieron completamente por el co-tratamiento con un anticuerpo neutralizante específico contra el  $1,25D_3$ -MARRS (figura 7B). En general, los datos sugieren que la activación del  $1,25D_3$ -MARRS provoca una mejora cognitiva y que la administración exógena de diosgenina mejora la memoria.



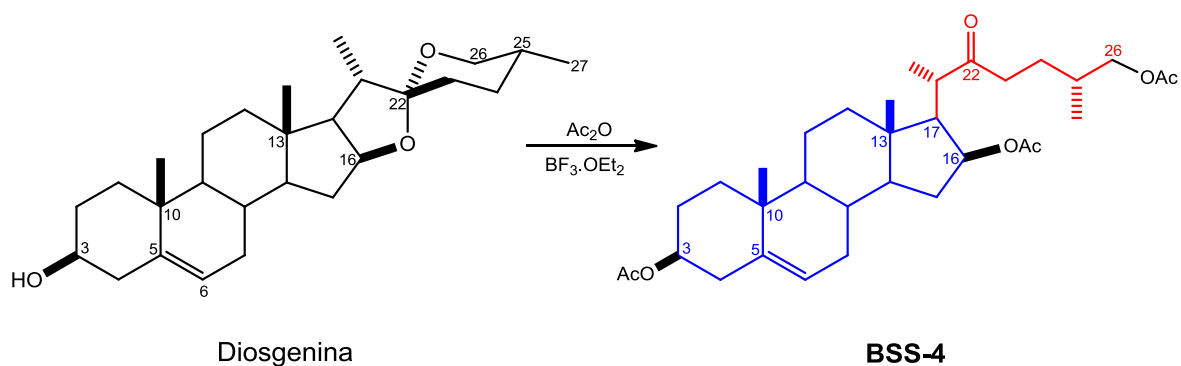
**Figura 7. (A)** Efecto de diosgenina (10  $\mu$ mol/kg, i.p.) sobre la memoria de reconocimiento en ratones 5XFAD. **(B)** Efecto de un anticuerpo neutralizante contra  $1,25D_3$ -MARRS sobre la mejora de la memoria inducida por diosgenina. Mem, memantina; FCEa, fluido cerebro espinal artificial; i.p, intraperitoneal; i.c.v, intracerebro ventricular (Modificado de Tohda y cols., 2013; Tohda y cols., 2012).



**Figura 8.** (A) Simulación del acoplamiento de diosgenina al 1,25D<sub>3</sub>-MARRS. (B) Diosgenina hace contacto con los dominios  $\alpha$  y  $\beta$  del 1,25D<sub>3</sub>-MARRS (Tohda y cols., 2012).

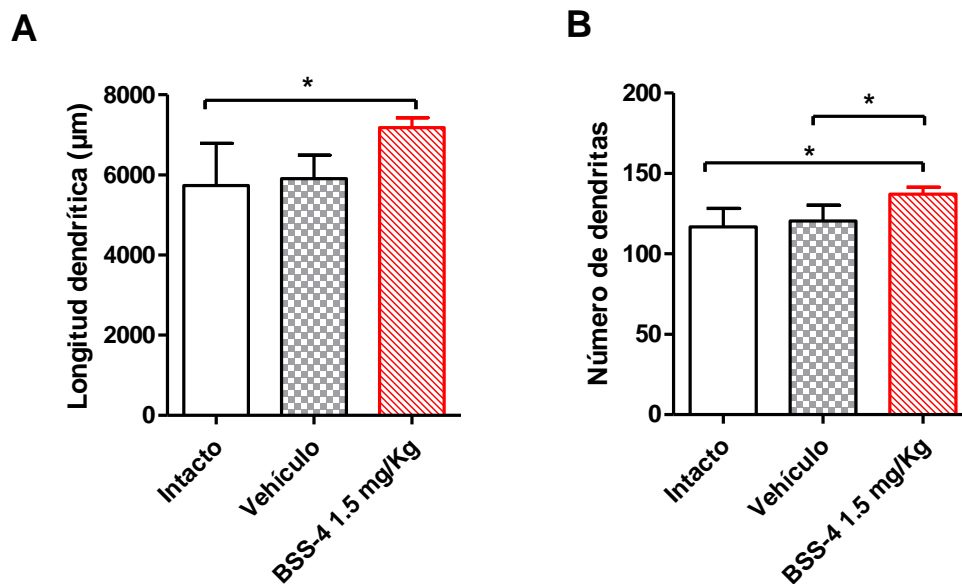
### 1.7 El derivado colestánico, BSS-4

El BSS-4, triacetato de 22-oxocolest-5-en-3 $\beta$ ,16 $\beta$ ,26-triilo, (figura 9) es un compuesto colestánico que se obtiene a partir de la acetólisis de la diosgenina en anhídrido acético (Ac<sub>2</sub>O) y eterato de trifluoruro de boro (BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub>), en un rango de temperatura entre 0 y -5 °C con un rendimiento del 80-85% (Fernández-Herrera y cols., 2009).

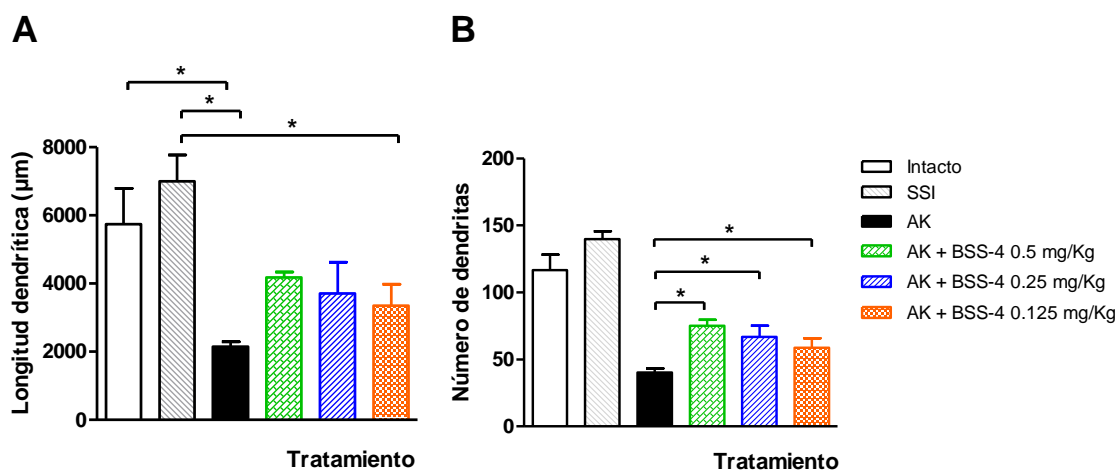


**Figura 9.** Reacción de formación del BSS-4. La estructura permite observar en azul al núcleo esteroidal y en rojo la apertura de la cadena lateral espirocetálica, características de un compuesto colestánico (Modificado de Fernández-Herrera y cols., 2009).

Un estudio realizado por Trejo (2013), demostró que la administración intraperitoneal de 1.5 mg/kg de BSS-4 en ratas íntegras aumenta la longitud dendrítica y el número de dendritas sugiriendo un probable efecto trófico (figura 10). Por otro lado la administración intraperitoneal de 0.5, 0.25 y 0.125 mg/kg de BSS-4 detiene la lesión excitotóxica causada por la inyección bilateral de ácido kaínico en hipocampo de rata, aumentando también la longitud dendrítica y el número de dendritas (figura 11). Además, el empleo de estas dosis disminuye la longitud del cuerpo neuronal sugiriendo un probable efecto antiinflamatorio.

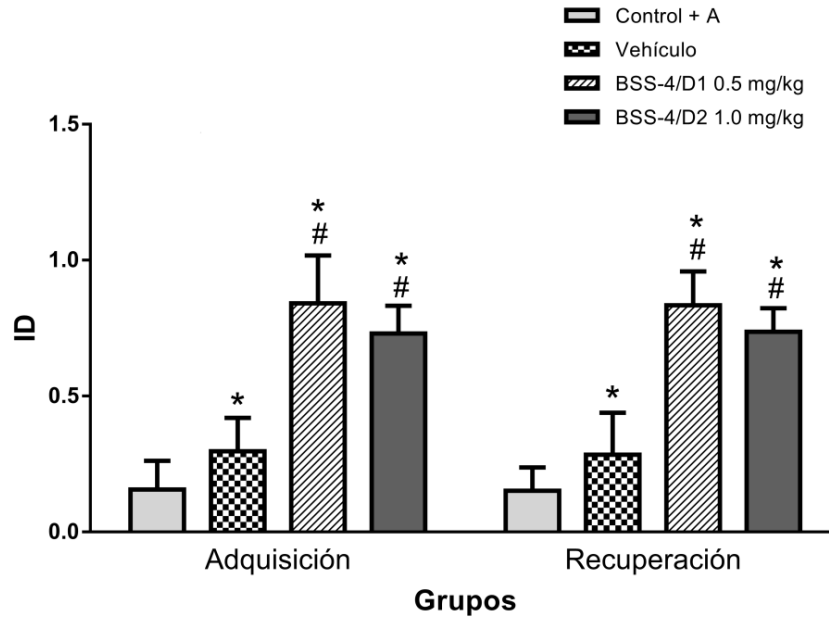


**Figura 10. (A)** Aumento de la longitud dendrítica y **(B)** número de dendritas de grupos de ratas íntegras administradas con 1.5 mg/kg de BSS-4 (Trejo, 2013).



**Figura 11. (A)** Aumento de la longitud dendrítica y **(B)** número de dendritas de grupos de ratas lesionadas con ácido kaínico y administradas con BSS-4 a diferentes dosis (Trejo, 2013).

Por otra parte estudios realizados por Gil (2014) demuestran que la administración intraperitoneal crónica de 0.5 y 1.0 mg/kg de BSS-4 mejora la adquisición de la información y facilita la recuperación de la memoria espacial de largo plazo evaluada en las tareas conductuales laberinto de Barnes y reconocimiento de objetos (figura 12), además de aumentar la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y GPx. Gil propone la unión del BSS-4 al 1,25D<sub>3</sub>-MARRS para desencadenar la activación de las cinasas PI3K, ERK, PKC y PKA quienes a su vez activan la vía de señalización para la transcripción de las enzimas antioxidantes SOD y GPx y en consecuencia la mejora de la memoria a través de un mecanismo antioxidante.



**Figura 12.** Aumento del índice de discriminación de objetos (ID) en grupos de ratas administradas con dos diferentes dosis de BSS-4 (Gil, 2014).

## **2. JUSTIFICACIÓN**

Los desórdenes de la memoria tienen un gran impacto en la calidad de vida de los pacientes afectados y de sus familias con altos costos para la sociedad. Los trastornos de las funciones de la memoria son la patología central y característica asociada de muchas enfermedades neurológicas como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esquizofrenia, autismo, trastorno bipolar y epilepsia. La memoria episódica es particularmente susceptible al declive atribuible a enfermedades neurodegenerativas o al envejecimiento (Morellini, 2013; Sharma y cols, 2010). El uso de modelos animales para el análisis de las funciones de la memoria es particularmente importante para el estudio de los mecanismos moleculares de los desórdenes de la memoria en humanos y para evaluar potenciales terapias.

Estudios realizados con diosgenina en ratones seniles, muestran un efecto neuroprotector así como una mejora en el aprendizaje y la memoria empleando modelos de memoria espacial (Tohda y cols, 2013; Chiu y cols, 2011). El compuesto colestánico, BSS-4 sintetizado a partir de la diosgenina ha mostrado igualmente un efecto neuroprotector ante lesiones excitotóxicas en el hipocampo de rata, así como aumento en la longitud dendrítica y el número de dendritas en ratas intactas (Trejo, 2013). Asimismo, la administración crónica del compuesto ha demostrado una mejora en la adquisición de la información y facilitación en la recuperación de la memoria de largo plazo evaluada en dos diferentes tareas espaciales (Gil, 2014).

En este sentido, se ha establecido la relevancia de la administración bilateral en el CA1 del hipocampo dorsal por medio de cirugía estereotáxica del compuesto colestánico BSS-4 en animales conscientes y en libre movimiento para determinar los posibles efectos sobre la adquisición de la información y la recuperación de la memoria espacial de largo plazo, evaluada en la tarea conductual de reconocimiento de objetos.

### **3. HIPÓTESIS**

La administración bilateral del derivado colestánico BSS-4 en el CA1 del hipocampo favorece la adquisición y la recuperación de la memoria espacial de largo plazo evaluada en la tarea de reconocimiento de objetos en ratas.

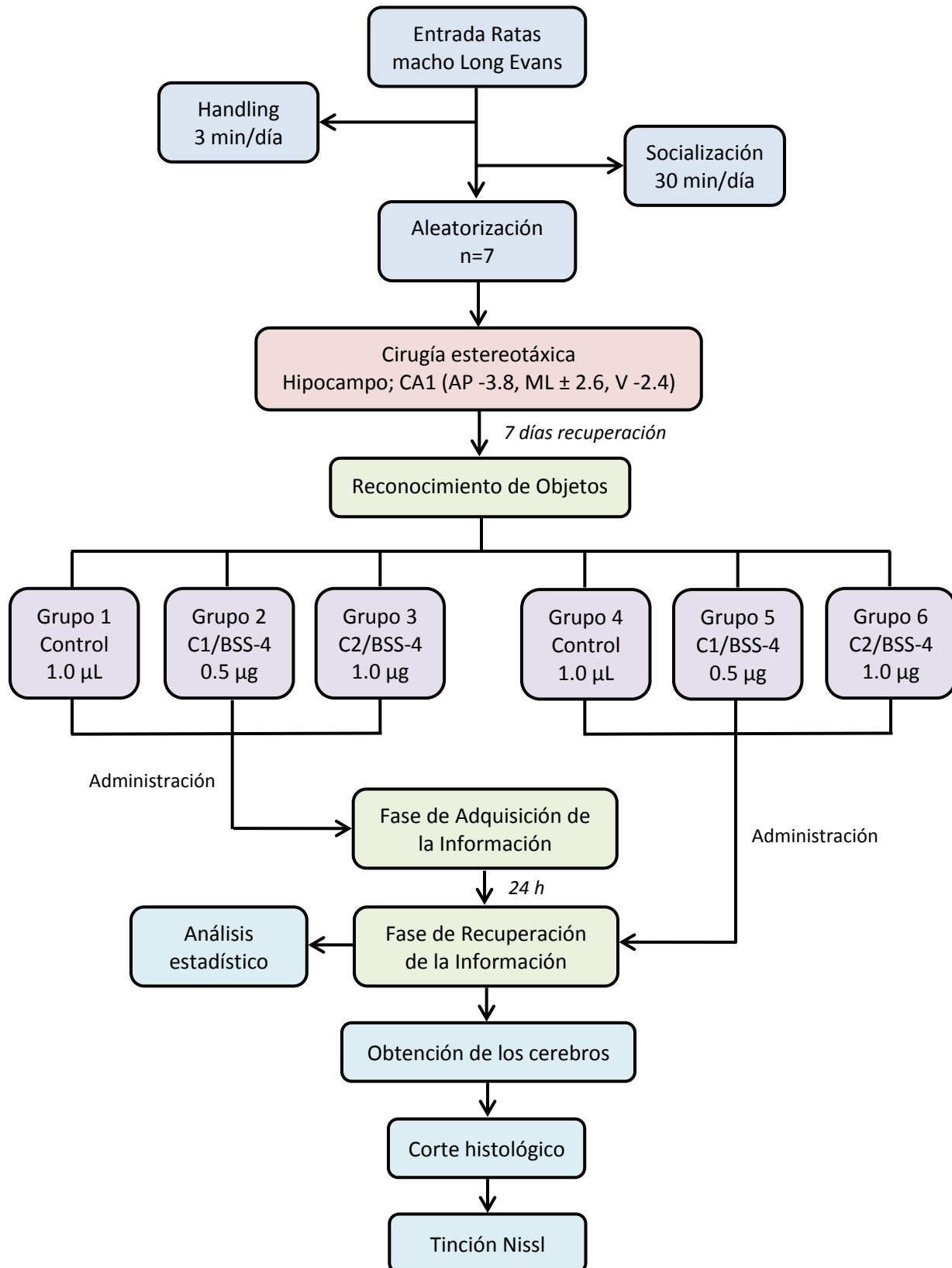
### **4. OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto de la administración bilateral *in situ* del BSS-4 sobre la adquisición de la información y la recuperación de la memoria espacial de largo plazo en rata.

#### **4.1 Objetivos particulares**

- Determinar el efecto de la administración intrahipocampal de 0.5 µg/µL y de 1.0 µg/2.0 µL de BSS-4 sobre la adquisición de la información de la tarea reconocimiento de objetos.
  
- Determinar el efecto de la administración intrahipocampal de 0.5 µg/µL y de 1.0 µg/2.0 µL de BSS-4 sobre la recuperación de la información de la tarea reconocimiento de objetos.

## 5. DIAGRAMA DE TRABAJO



## 6. MÉTODO GENERAL

### 6.1 Animales

Se emplearon 42 ratas macho de la cepa Long Evans con un peso promedio de 320 g provenientes del bioterio *Claude Bernard* de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, que fueron alojadas en el vivario del laboratorio de Neuroquímica en cajas individuales de acrílico transparente con agua y alimento *ad libitum*, con ciclos de luz-oscuridad de 12/12 horas, temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  y humedad relativa de  $50 \pm 5\%$ . A su llegada al vivario se les administró durante 10 días Enrofloxacin 7.5 mg/kg i.p. e Ivermectina 0.4 mg/kg por vía oral cada 7 días durante 3 semanas.

Todos los procedimientos fueron realizados bajo los criterios de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) que establece 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 está capacitada y certificada en el “Manejo y vías de administración en ratas de laboratorio” así como en los “Principios de anestesia, analgesia y cirugía en ratas de laboratorio”, por el personal acreditado del bioterio *Claude Bernard* de la BUAP.

### 6.2 Preparación del BSS-4

La solución madre de BSS-4 de concentración  $1.0 \mu\text{g}/2.0 \mu\text{L}$  ( $0.895 \mu\text{M}$ ) se preparó pesando 4 mg del compuesto para disolverlos completamente en 4 mL de buffer de fosfatos (PBS pH=7.4). Finalmente se agregó 4 mL de agua desionizada y se agitó. La osmolaridad de la solución fue 301 mOsm/mL.

### 6.3 Material

- Instrumental quirúrgico
- Hojas para bisturí estériles #20 Hergom
- Fresa de alta velocidad #106 Dremel

- Agujas estériles 23G × 25mm (cánulas, 9 mm)
- Agujas estériles siliconadas 30G × 25mm, (inyectores y tapones, 10 mm)
- Tubo de polietileno PE-20 0.38mm × 1.09 mm Intramedic Clay Adams Becton Dickinson
- Microjeringa Hamilton 10 µL
- Tornillos
- Gubia Ruskin

#### **6.4 Aparatos**

- Kit Mototool Dremel MultiPro 395
- Aparato Estereotáxico Stoelting 51600 single manipulator
- Bomba de Infusión SP210IW World Precisión Instruments (WPI)
- Caja de acrílico negro de 30 × 55 × 60 cm
- Microtomo de deslizamiento Leica SM2010R
- Microscopio de campo claro Leica DM 750 acoplado a una cámara digital Leica IC50

#### **6.5 Sustancias**

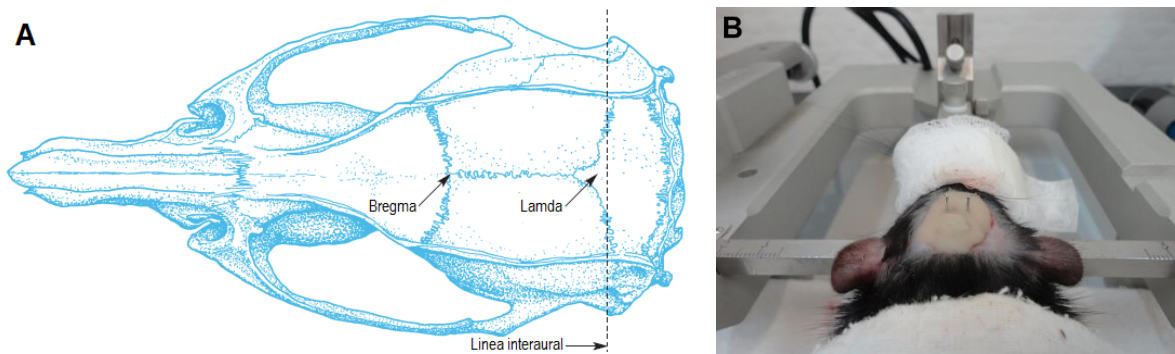
- BSS-4 (sintetizado en el Laboratorio de Síntesis y Modificación de Productos Naturales)
- Enrofloxacin Laboratorios Senosian
- Ivermectina Cheminova de México
- Ketamina Pisa Agropecuaria
- Xilacina Pet's Pharma de México
- Ketoprofeno Merial Lyon-Francia
- Polímero y monómero de metil metacrilato Nic Tone

#### **6.6 Cirugía Estereotáxica**

Para realizar la implantación bilateral de las cánulas guía los animales se anestesiaron con una mezcla de Ketamina 60 mg/kg y Xilacina 11 mg/kg

administrada por vía intraperitoneal. Siguiendo los lineamientos de analgesia y cuidados preoperatorios se administró Ketoprofeno 5 mg/kg por vía subcutánea. Inmediatamente que el animal estuvo anestesiado, se procedió a rasurar la parte superior de la cabeza, los ojos fueron cubiertos con una gasa húmeda de solución salina.

Se montó al animal en el aparato estereotáxico para pequeños roedores (Stoelting 51600 single manipulator) y se realizó la asepsia necesaria aplicando gluconato de clorhexidina al 1% sobre toda el área rasurada. Se procedió a realizar una incisión longitudinal de la piel de aproximadamente 2 cm, se removió el periostio para permitir la visualización sobre el cráneo de los puntos de referencia estereotáxica bregma y lambda (figura 13) para localizar de acuerdo a las coordenadas estereotáxicas AP -3.8, ML  $\pm$  2.6 y DV -2.4 al CA1 del hipocampo dorsal (Paxinos y Watson, 2007). Se continuó colocando dos tornillos en ubicaciones arbitrarias, uno rostral a bregma y otro caudal a lambda.



**Figura 12. (A)** Diagrama del cráneo de rata adulta (290 g), vista dorsal en la que se muestra la posición de bregma, lambda y la línea interaural. **(B)** Animal implantado, colocado aun en el aparato estereotáxico. (Modificado de Paxinos y Watson, 2007).

Una vez colocados los tornillos y ubicadas las coordenadas correctas, se procedió a trepanar el cráneo para colocar las cánulas guía en la masa encefálica, a cuales se fijaron al cráneo con una mezcla de monómero y polímero de metil metacrilato (cemento dental Nic Tone). En cuanto endureció el cemento dental, se

desmontó a la rata del aparato estereotáxico y se regresó al vivario para permitir su recuperación. Se les brindaron como cuidados postoperatorios la administración por vía subcutánea de 50 UI de solución salina isotónica y Ketoprofeno 5 mg/kg cada 24 h durante 3 días.

### **6.7 Administración de BSS-4**

La administración bilateral del compuesto BSS-4 en el CA1 del hipocampo se efectuó de acuerdo al grupo experimental, antes de alguna de las dos fases de la tarea de reconocimiento de objetos; fase de adquisición de la información o antes de la fase de recuperación de la información.

Esta se realizó con apoyo de una bomba de infusión (WPI SP210IW) y empleando una microjeringa de 10  $\mu$ L (Hamilton) acoplada a un tubo de polietileno (Becton Dickinson), en el extremo opuesto se colocó un inyector de 10 mm elaborado con agujas dentales siliconadas 30G  $\times$  25mm.

Se administró a los animales de los grupos experimentales 0.5  $\mu$ g/1.0  $\mu$ L (C1/BSS-4) o 1.0  $\mu$ g/2.0 $\mu$ L (C2/BSS-4) del compuesto colestánico, de acuerdo al grupo que pertenezcan o 1.0  $\mu$ L del vehículo a los animales de los grupos control, siempre considerando una velocidad de infusión de 1.0  $\mu$ L/min. Finalizada la administración se dieron 2 minutos de espera para asegurar la infusión completa del compuesto. Inmediatamente el animal continuó con la tarea conductual.

### **6.8 Reconocimiento de objetos**

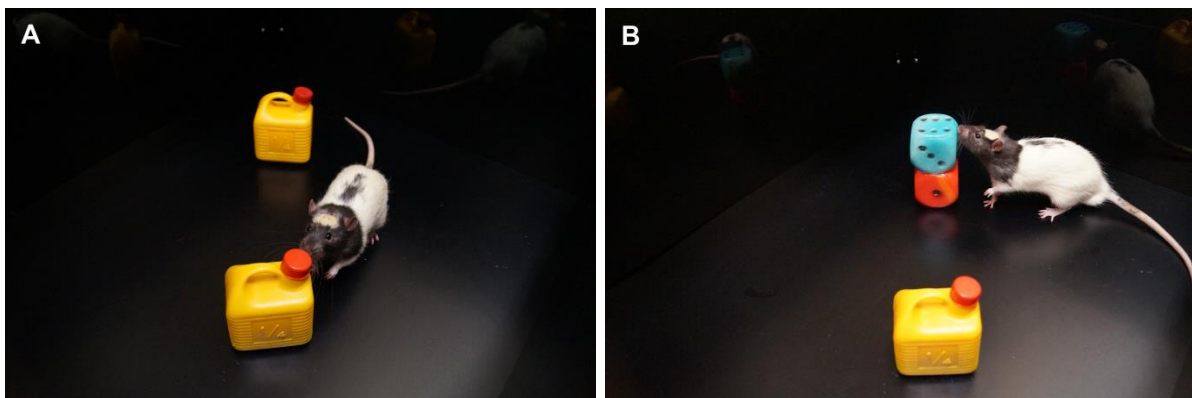
La tarea de reconocimiento de objetos se desarrolló con la exploración de diferentes objetos colocados en una caja de acrílico negro de dimensiones 30  $\times$  55  $\times$  60 cm, evidenciado por la cantidad de tactos y olfateos que realizó el animal sobre los objetos. La tarea consistió en tres etapas; habituación, familiarización (primera etapa) y prueba (segunda etapa; Antunes y Biala, 2012).

- **Fase de adquisición de la información**

El día de la tarea se colocó al animal dentro de la caja de acrílico negro para que la explorara libremente, durante un tiempo asignado de 180 segundos (habituaación), finalizado el tiempo el animal regresó a su caja de alojamiento. En la etapa de familiarización el animal volvió a la caja de exploración la cual contenía dos objetos idénticos (figura 14A), que fueron reconocidos por el animal durante un tiempo asignado de 180 s. En la etapa de prueba se colocó al animal nuevamente en la caja de exploración que ahora contenía un objeto previamente presentado, denominado objeto viejo y un objeto nuevo, los cuales pudo explorar libremente durante un tiempo asignado de 120 s. Los animales recibieron un ensayo de familiarización y tres ensayos de prueba. Los intervalos de tiempo entre ensayos fueron de 20 minutos, tiempo en el cual los animales permanecieron en sus cajas de alojamiento.

- **Fase de recuperación de la información**

La fase de recuperación de la información se realizó a las 24 h después de la adquisición, para evaluar la memoria de largo plazo. El animal se sometió a tres ensayos durante los cuales se le presentó el objeto viejo y un objeto nuevo (figura 14B), bajo las mismas condiciones descritas anteriormente.



**Figura 14. (A)** Etapa de entrenamiento donde se muestra al animal reconociendo a uno de los objetos idénticos. **(B)** Etapa de prueba en donde aparecen el ahora denominado objeto viejo y un objeto nuevo siendo explorado por el animal.

## **6.9 Obtención de los cerebros**

Inmediatamente después de finalizada la tarea conductual, las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico 60 mg/kg i.p. (Aranda Salud animal) para realizar la perfusión intracardiaca con paraformaldehído al 4% a temperatura ambiente. Posteriormente se decapitó a los animales para extraer los cerebros con ayuda de una Gubia Ruskin y se continuó la fijación de los tejidos por inmersión en paraformaldehído al 4% en frascos de plástico individuales.

## **6.10 Tinción de Nissl modificada**

Para verificar el sitio de implantación de las cánulas guía, se eligieron al azar un cerebro de cada uno de los grupos experimentales y control, para ser rebanados con un micrótopo de deslizamiento (Leica SM2010R) y obtener cortes coronales seriados de 100  $\mu$ m que se colocaron en portaobjetos gelatinizados (gretina al 3%). Los cortes histológicos fueron hidratados con agua destilada durante 20 minutos, después fueron teñidos con azul de cresilo al 1.5 % durante 30 minutos, se lavaron con agua destilada durante 5 minutos, se deshidrataron con gradientes de etanol (50, 70, 95 y 100%) por 5 minutos en cada uno, se aclararon con xileno durante 15 minutos y por último se montaron con resina sintética y finalmente se protegieron las preparaciones histológicas con un cubreobjetos.

Se obtuvieron y analizaron microfotografías de los sitios de implantación con un microscopio de campo claro Leica DM 750 acoplado a una cámara digital Leica IC50 con el objetivo 4x.

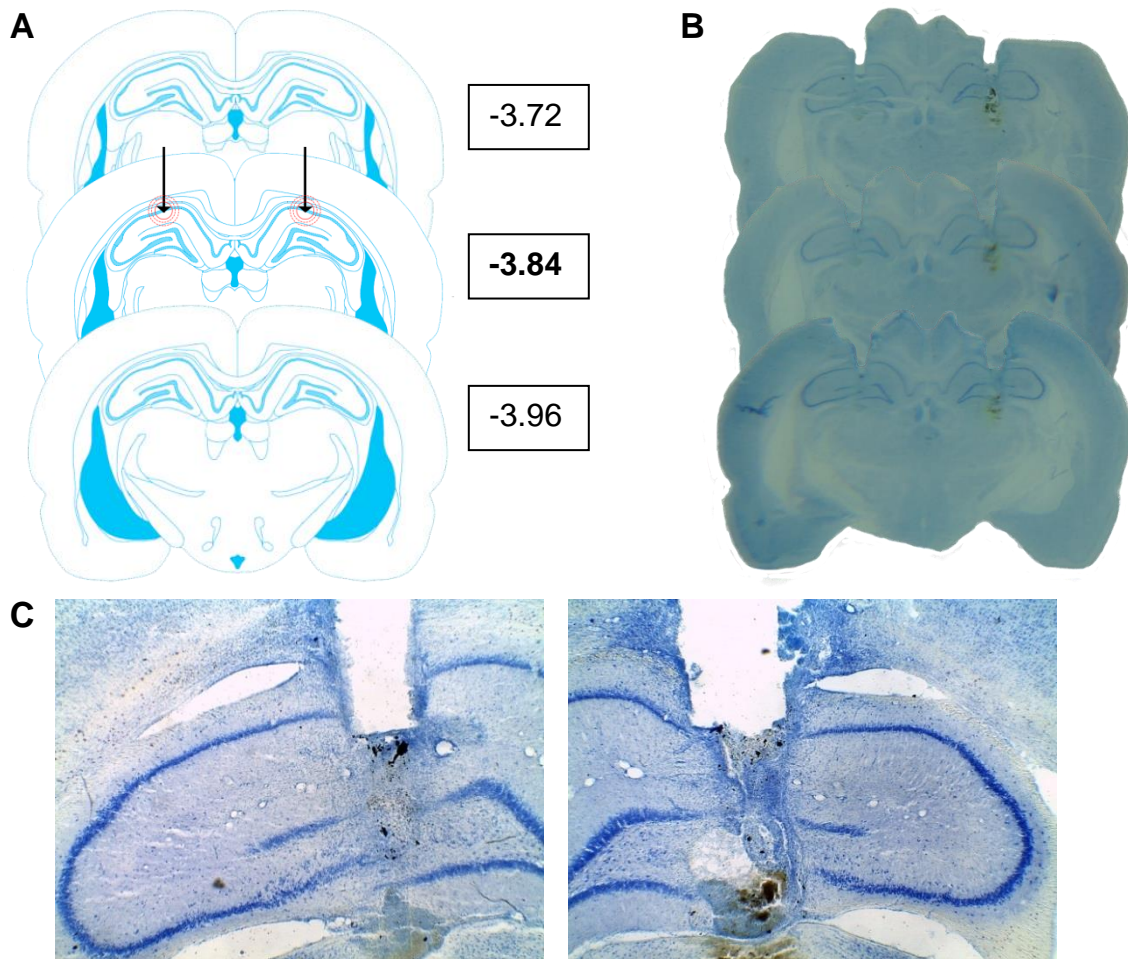
## **6.11 Análisis estadístico**

Dada la participación de los animales de cada grupo en ambas fases de la tarea conductual, se analizaron los datos de la tarea reconocimiento de objetos con un ANOVA de medidas repetidas y una prueba de comparaciones múltiples de Tukey. El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa STATISTICA 8 y las gráficas fueron elaboradas con el programa GraphPad Prism 5.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Sitio de implantación de las cánulas guía

Para verificar que el sitio de implantación bilateral de las cánulas guía fue el elegido (AP -3.8, ML  $\pm$  2.6 y DV -2.4; Paxinos y Watson, 2007), se tomaron al azar un cerebro de cada grupo experimental. Se obtuvieron cortes coronales a los cuales se les realizó la tinción Nissl modificada (figura 15B, C).

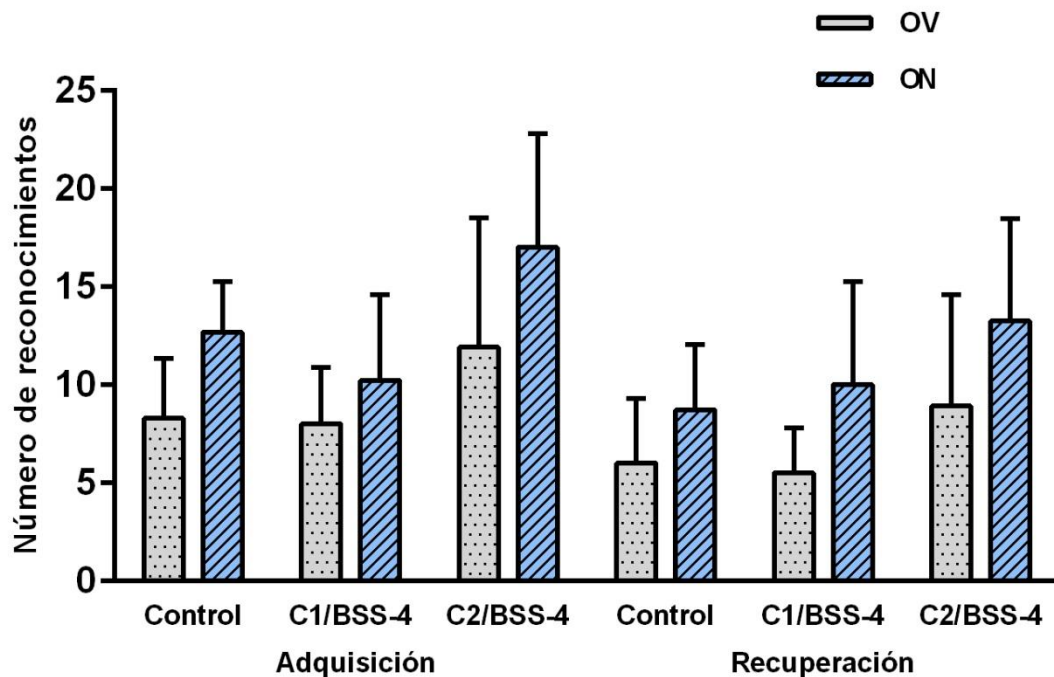


**Figura 15. Determinación del sitio de implantación.** (A) Representación esquemática de cortes coronales que ilustran la ubicación de las cánulas guía en el CA1 del hipocampo en las coordenadas estereotáxicas AP -3.8, ML  $\pm$ 2.6, V -2.4 (Paxinos y Watson, 2007). (B) Fotografías de cortes coronales de 100  $\mu$ m de espesor de cerebro de rata. (C) Microfotografías de los sitios de implantación bilateral en el CA1 del hipocampo, tinción de Nissl modificada, 4X. El número en los recuadros representan la distancia a partir del punto de referencia estereotáxica *bregma*.

## 7.2 Número de reconocimientos

### 7.2.1 Administración del BSS-4 antes de la fase de adquisición de la información

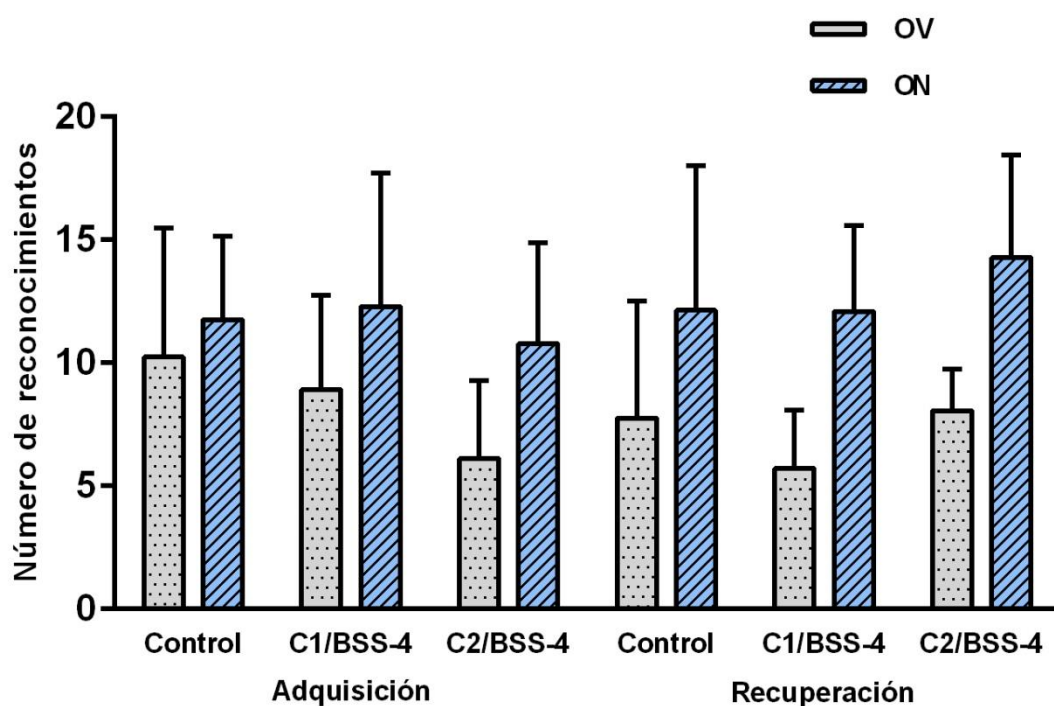
Siete días después de la implantación bilateral de las cánulas guía se realizó la administración intrahipocampal de 0.5  $\mu\text{g}/1.0 \mu\text{L}$  (C1/BSS-4) o 1.0  $\mu\text{g}/2.0 \mu\text{L}$  (C2/BSS-4) del compuesto de acuerdo al grupo experimental, antes de la fase de adquisición de la información de la tarea de reconocimiento de objetos donde se registraron el número de tactos y olfateos que hizo el animal al objeto viejo (OV) y al objeto nuevo (ON) durante esta fase de la tarea



**Figura 16. La administración *in situ* de BSS-4 no mejora la adquisición de la información.** En la gráfica se observa que los grupos administrados con BSS-4 antes de la fase de adquisición de la información de la tarea de reconocimiento de objetos no aumentan el número de reconocimientos de los objetos en comparación con el grupo control. Las barras muestran el valor de las medias  $\pm$  DE ( $n=7$ ). ANOVA de medidas repetidas y prueba de comparaciones múltiples de Tukey,  $p<0.05$ .

### 7.2.2 Administración del BSS-4 antes de la fase de recuperación de la información

A las 24 horas de efectuada la fase de adquisición de la información se realizó la administración intrahipocampal de 0.5  $\mu\text{g}/1.0 \mu\text{L}$  (C1/BSS-4) o 1.0  $\mu\text{g}/2.0 \mu\text{L}$  (C2/BSS-4) del compuesto a los grupos correspondientes, antes de la fase de recuperación de la información de la tarea de reconocimiento de objetos donde igualmente se registraron el número de tactos y olfateos que hizo al animal al objeto viejo (OV) y objeto nuevo (ON) durante esta fase de la tarea.



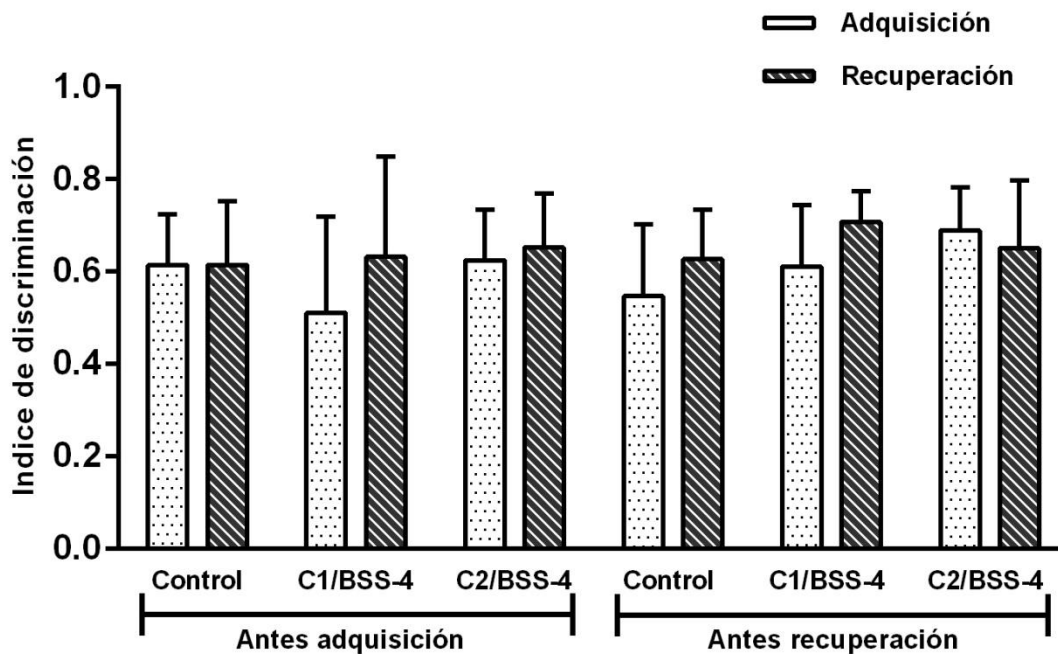
**Figura 17. La administración *in situ* de BSS-4 no mejora la recuperación de la información.** En la gráfica se observa que los grupos administrados con BSS-4 antes de la fase de recuperación de la información de la tarea de reconocimiento de objetos no aumentan el número de reconocimientos de los objetos en comparación con el grupo control. Las barras muestran el valor de las medias  $\pm$  DE ( $n=7$ ). ANOVA de medidas repetidas y prueba de comparaciones múltiples de Tukey,  $p<0.05$ .

### 7.3 Índice de discriminación

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

$$ID = \left| \frac{30N - OV}{30N + OV} \right|$$

Donde ID representa el índice de discriminación de objetos, ON el objeto nuevo y OV el objeto viejo. La calificación otorgada al ID abarca un intervalo de 0 a 1, en donde valores cercanos a 1 significan que los animales emplearon más tiempo reconociendo al objeto nuevo debido a que recordaban al objeto viejo.



**Figura 18. La administración *in situ* de BSS-4 antes de la fase de adquisición o de recuperación de la información no aumenta el índice de discriminación de los objetos.** En la gráfica se observa que los grupos administrados con BSS-4 antes de cualquiera de las dos fases de la tarea de reconocimiento de objetos no aumentan el índice de discriminación de los objetos en comparación con el grupo control. Las barras muestran el valor de las medias  $\pm$  DE (n=7). ANOVA de medidas repetidas y prueba de comparaciones múltiples de Tukey,  $p < 0.05$ .

## **8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

La pérdida de la memoria espacial entre otras funciones cognitivas, es característica de los desórdenes neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson, así como una consecuencia del propio envejecimiento.

En el presente trabajo se determinó los posibles efectos de la administración intrahipocampal de BSS-4 sobre la memoria espacial evaluada en la tarea de reconocimiento de objetos, obteniéndose como resultado que tal administración del compuesto no mejora la adquisición, ni recuperación de la memoria espacial, y de cuyos resultados se obtuvieron las siguientes observaciones.

Durante la tarea conductual, la administración de 0.5 µg/1.0 µL y 1.0 µg/2.0 µL de BSS-4 antes de la fase de adquisición o de recuperación de la información no ejerce efecto alguno sobre ellas, indicando la ausencia de un posible efecto sobre la memoria espacial de largo plazo, como se muestra en las **figuras 16 y 17** (pág. 28 y 29, respectivamente). Si bien no se observa ninguna diferencia estadística cuando el BSS-4 se administra antes de alguna de las fases de la tarea conductual, se puede hacer mención de una tendencia a la mejora de la recuperación de la memoria cuando se administra 0.5 µg/1.0 µL (C1/BSS-4) del compuesto antes de las fases de adquisición y de recuperación de la información, como se observa en las gráficas correspondientes, una disminución del reconocimiento del objeto viejo y la mantención aproximada del reconocimiento del objeto nuevo, respecto a la recuperación de la información de los grupos control.

Igualmente, y por como pudiera vincularse con los primeros resultados, el análisis estadístico demostró que la administración de BSS-4 (0.5 µg/1.0 µL o 1.0 µg/2.0 µL) antes de la adquisición o antes de la recuperación de la información no aumenta significativamente el índice de discriminación en ninguna de estas dos fases de la tarea de reconocimiento de objetos **figura 18** (pág. 30). Aunque, cuando se administran 0.5 µg/1.0 µL (C1/BSS-4) del compuesto antes de

cualquiera de las dos fases de la tarea, se puede observar una tendencia al aumento del índice de discriminación durante la recuperación de la información, respecto a los grupos controles. Esta tendencia es un poco más marcada cuando se administra el compuesto antes de la recuperación de la información.

Si bien se han hecho estas observaciones, debe tenerse en cuenta que estas tendencias pueden deberse estrictamente al proceso de adquisición de información y evocación de la memoria como en cualquier animal intacto, sin necesariamente implicar una facilitación o mejora por parte del BSS-4.

A pesar de la actividad farmacológica de diosgenina y la semejanza estructural con el BSS-4, no se encontraron efectos similares a los reportados con diosgenina; ya que ésta molécula mejora significativamente la memoria espacial como lo reporta Chiu y cols. (2011), un dato relevante es el hecho de que en estos estudios la diosgenina (5-125 mg/kg) se administró por vía intraperitoneal y de forma crónica (4 semanas). De igual forma, los resultados obtenidos carecen de semejanza a los reportados por Tohda y cols. (2013 y 2012) que demuestran que la mejora de la memoria en un modelo murino de enfermedad de Alzheimer y en ratones normales es mediada por la regeneración y crecimiento axonal inducidos por la administración intraperitoneal de diosgenina (4.14 mg/kg).

Más aun, los resultados obtenidos del presente trabajo no coinciden con los obtenidos por Gil (2014), el único trabajo que hasta la fecha ha evaluado el efecto de la administración del BSS-4 sobre la memoria. Gil muestra que la administración intraperitoneal crónica de BSS-4 en dosis de 0.5 y 1.0 mg/kg mejoran la memoria espacial evaluada en la tarea conductual reconocimiento de objetos y laberinto de Barnes. En términos de potencia farmacológica, ahora se sabe por los estudios de Gil, que se requieren de dosis 8-10 veces menores de BSS-4 que las de diosgenina para obtener la mejora de la memoria.

Este análisis da oportunidad a la discusión de considerar factores farmacológicos como las dosis (o cantidades), régimen y vía de administración, al

inferir posibles efectos del BSS-4 sobre la memoria espacial. Una posible explicación a la ausencia del efecto farmacológico esperado durante este trabajo puede deberse, como ya se ha mencionado, al régimen y vía de administración del BSS-4, pues si bien se han reportado la mejora de la memoria inducida por diosgenina, esto solo ha ocurrido cuando se emplea la administración intraperitoneal crónica (5-20 días), inclusive cuando no se administra el día de la prueba de la tarea conductual se muestra una mejora de la memoria. Algunos reportes han sugerido que la administración única de diosgenina no es suficiente para mejorar la memoria (Tohda y cols., 2012). En el caso de la administración de BSS-4, Gil empleó igualmente una administración intraperitoneal crónica (25 días), obteniendo efectos sobre la memoria.

Como se ha mencionado, la vía de administración es un importante factor que bien puede tener un alto impacto sobre todo en cuanto a la biotransformación del BSS-4. Al considerar una administración intraperitoneal el compuesto se enfrenta al metabolismo hepático que bien puede modificar la estructura química de la molécula transformándola en una activa, a la que puede atribuírsele los efectos positivos sobre la memoria reportados por Gil. En un estudio para determinar las propiedades ADME de diosgenina se llevaron a cabo estudios de estabilidad metabólica de fase I y fase II. En cultivos de microsomas hepáticos humanos la diosgenina (100  $\mu$ M) mostró estabilidad metabólica mientras que en fracciones S9 desapareció con un tiempo de vida media de 11.3 minutos. En conclusión no se detectó metabolismo de fase I en los microsomas hepáticos humanos, mientras que la desaparición de la diosgenina en las fracciones S9 indica un metabolismo de fase II. Además se demostró que diosgenina inhibió al CYP3A4 con un valor de IC50 de 9  $\mu$ g/mL (17  $\mu$ M), mientras que otros CYP no fueron afectados (Manda y cols., 2013).

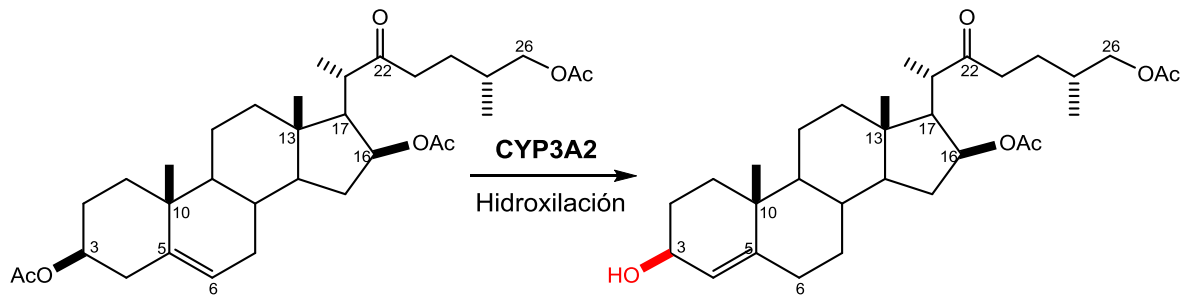
Si bien el CYP3A es la subfamilia más importante involucrada en el metabolismo de xenobióticos en todas las especies animales, cabe mencionar que el CYP3A4 es una isoforma ausente en la rata y presente exclusivamente en el

humano. En ratas se han reportado la presencia del CYP3A1, -3A2, -3A9, -3A18, -3A23 y -3A62. Estas isoformas del CYP3A en rata parecen expresarse de una manera sexo-específicas, por ejemplo el CYP3A2 y -3A18 son las principales enzimas constituyentes del hígado en machos (Martignoni y cols., 2006). El CYP3A2 en rata exhibe 73% de homología de la secuencia aminoácidica, preferencia por algunos sustratos y analogías funcionales con el CYP3A4 humano, el cual es responsable del metabolismo oxidativo de más del 60% de los fármacos actualmente usados como macrólidos, bloqueadores de calcio y psicotrópicos, así como sustratos endógenos incluyendo la testosterona, progesterona y androstendiona. En general la actividad catalítica del CYP3A2 en rata y la actividad catalítica del CYP3A4 humano son similares (Wójcikowski y cols., 2012).

Por otra parte, debido a que el grupo hidroxilo en la posición C3 se encuentra en la mayoría de las saponinas esteroidales como diosgenina (Thakur y cols., 2011) de las cuales algunas se les ha comprobado efectos terapéuticos o a la homología estructural con estrógenos como el estradiol, el cual también se ha caracterizado el efecto de su inyección intrahipocampal sobre la memoria espacial (Fernandez y cols., 2008), es posible que el grupo éster en la posición C3 del BSS-4 esté relacionado con su modificación estructural.

Bajo todas estas observaciones, es plausible considerar que el BSS-4 sufra reacciones de hidroxilación en la posición C3 por parte del CYP3A2 (cuando se es administrado de forma sistémica) para obtener un metabolito activo (mBSS-4; figura 19) y que al interactuar con su respectivo receptor sea el responsable de desencadenar la señalización intracelular que culmine en la mejora del aprendizaje y la memoria reportados por Gil (2014). En el presente trabajo, teniendo en cuenta el diseño bajo el cual se llevaron a cabo los experimentos es muy probable que la ausencia del efecto farmacológico esperado se deba a la propia ausencia de la biotransformación del BSS-4 en el hipocampo de rata y por ende la ausencia de la mejora del aprendizaje y la memoria.

Si bien parece que la estructura química del BSS-4 *per se* no sea la responsable de la mejora de la memoria espacial, es posible que su metabolito activo pueda inducir los cambios morfológicos y funcionales en las neuronas hipocampales que den origen a la mejora cognitiva.



**Figura 19.** Propuesta de la modificación estructural del BSS-4 por el CYP3A2 en rata y que diera lugar al mBSS-4, probable responsable de los efectos cognitivos y morfológicos reportados por Gil (2014) y Trejo (2013).

## **9. CONCLUSIONES**

- La administración intrahipocampal de 0.5 µg/1.0 µL y 1.0 µg/2.0 µL de BSS-4 antes de la fase de adquisición de la información de la tarea de reconocimiento de objetos, no mejora la memoria espacial de largo plazo en ratas.
- La administración intrahipocampal de 0.5 µg/1.0 µL y 1.0 µg/2.0 µL de BSS-4 antes de la fase de recuperación de la información de la tarea de reconocimiento de objetos, no mejora la memoria espacial de largo plazo en ratas.

## 10. REFERENCIAS

- Ainge, J. A., Heron-Maxwell, C., Theofilas, P., Wright, P., de Hoz, L. y Wood, E. R. (2006). The role of the hippocampus in object recognition in rats: Examination of the influence of task parameters and lesion size. *Behavioral Brain Research*, 167, 183–195.
- Amaral, D. y Lavenex, P. (2007). Hippocampal Neuroanatomy. En: Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T. y O'Keefe, J. (Eds). *The Hippocampus Book*. Nueva York: Oxford University Press. pp. 37-114.
- Antunes, M. y Biala, G. (2012). The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cognitive Processing*, 13(2), 93-110.
- Broadbent, N. J., Squire, L. R. y Clark, R. E. (2004). Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 101(40), 14515-14520.
- Carrillo-Mora, P., Giordano, M. y Santamaría, A. (2009). Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. *Behavioral Brain Research*, 203, 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.
- Clark, R.E., Zola, S. M. y Squire, L. R. (2000), Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 20(23), 8853-8866.

- Ennaceur, A. y Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioral Brain Research*, 31(1), 47-59.
- Fernandez, S. M., Lewis, M. C., Pechenino, A. S., Harburger, L. L., Orr, P. T., Gresack, J. E., Schafe, G. E. y Frick, K. M. (2008). Estradiol-induced enhancement of object memory consolidation involves hippocampal extracellular signal-regulated kinase activation and membrane-bound estrogen receptors. *The Journal of Neuroscience*, 28(35), 8660-8667.
- 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.
- Gaskin, S., Tardif, M., Cole, E., Piterkin, P., Kayello, L. y Mumby, D. G. (2010). Object familiarization and novel-object preference in rats. *Behavioural Processes*, 83(1), 61-71.
- Gil, L. E. (2014). Efecto de la administración crónica del BSS- 4 y de cafeína sobre la recuperación de la memoria espacial de largo plazo y la actividad de enzimas antioxidantes en el hipocampo de rata. Tesis de licenciatura. FCQ-BUAP.
- He, Y., Kulasiri, D. y Samarasinghe, D. (2014). Systems biology of synaptic plasticity: a review on N-methyl-D-aspartate receptor mediated biochemical pathways and related mathematical models. *Bio Systems*, 122:7-18.
- Kang, T. H., Moon, E., Hong, B. N., Choi, S. Z., Son, M., Park, J. H. y Kim, S. Y. (2011). Diosgenin from *Dioscorea nipponica* ameliorates diabetic neuropathy by inducing nerve growth factor. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 34(9), 1493-1498.

- Kealy, J. y Commins, S. (2011). The rat perirhinal cortex: A review of anatomy, physiology, plasticity, and function. *Progress in Neurobiology*, 93(4), 522-548.
- Kumar, A. (2011). Long term potentiation at CA3-CA1 hippocampal synapses with special emphasis on aging, disease and stress. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 3:7.
- Lüscher, C. y Malenka, R. C. (2012). NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(6).
- Lynch, M. A. (2004). Long-term potentiation and memory. *Physiological Reviews*, 84(1), 87-136.
- Manda, V. K., Avula, B., Ali, Z., Wong, Y. H., Smilie, T. J., Khan, I. A. y Khan, S. I. (2013). Characterization of in vitro ADME properties of diosgenin and dioscin from *Dioscorea villosa*. *Planta Medica*, 79 (15), 1421-1428.
- Martignoni, M., Groothuis, G. M. y de Kanter, R. (2006). Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 2(6), 874-894.
- Martin, S. J. y Clark, R. E. (2007). The rodent hippocampus and spatial memory: from synapses to systems. *Cellular and Molecular Life Science*, 64(4), 401-431.
- Mathiasen, J. y DiCamilo, A. (2010). Novel object recognition in the rat: a facile assay for cognitive function. *Current Protocols in Pharmacology*, 5.59.1-5.59.15.
- Morellini, F. (2013). Spatial memory task in rodents: what do they model? *Cell and Tissue Research*, 354, 273-286.

- O'Keefe, J. y Nadel, L. (1978). The amnesic syndrome. En: *The hippocampus as a cognitive map*. Clarendon Press, Oxford. pp. 411 - 436.
- Patel, K., Gadewar, M., Tahilyani, V. y Patel, D. K. (2012). A review on pharmacological and analytical aspects of diosgenin: a concise report. *Natural Products and Bioprospecting*, 2, 46-52.
- Paxinos, G. y Watson, C. (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press. pp. X-XXIX, 64-66.
- Raju, J. y Rao, C. V. (2012). Diosgenin, a steroid saponin constituent of yams and fenugreek: Emerging evidence for applications in medicine. En: Rasooli, I. (Ed). *Bioactive Compounds in Phytomedicine*. China: InTech. pp. 125-142.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación 2001. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales 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, 521-536.
- Squire, L. R. (2004). Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiology of Learning and Memory*, 82(3), 171–177.
- Squire, L. R. y Zola, S. M. (1996). Structure and function of declarative and non declarative memory systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(24), 13515-13522
- Sproust, N. y McBain, C. (2007). Structural and Functional Properties of Hippocampal Neurons. En: Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T. y O'Keefe, J. (Eds). *The Hippocampus Book*. Nueva York: Oxford University Press. pp. 133-148.

- Thakur, M., Melzig, M. F., Fuchs, H. y Weng, A. (2011). Chemistry and pharmacology of saponins: special focus on cytotoxic properties. *Botanics: Targets and Therapy*, 1, 19–29.
- Traynelis, S. F., Wollmuth, L. P., McBain, C. J., Menniti, F. S., Vance, K. M., Ogden, K. K., Hansen, K. B., Yuan, H., Myers, S. J. y Dingledine, R. (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological reviews*, 62(3), 405-496.
- Trejo, R. C. (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.
- Tohda, C., Lee, Y. A., Goto, Y. y Nemere, I. (2013). Diosgenin-induced cognitive enhancement in normal mice is mediated by 1,25D<sub>3</sub>-MARRS. *Scientific Reports*, 3:3395.
- Tohda, C., Urano, T., Umezaki, M., Nemere, I. y Kuboyama, T. (2012). Diosgenin is an exogenous activator of 1,25D<sub>3</sub>-MARRS/Pdia3/ERp57 and improves Alzheimer's disease pathologies in 5XFAD mice. *Scientific Reports*, 2:535.
- Wang, Y. y Qin, Z. H. (2010). Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. *Apoptosis*, 15(11), 1382-1402.
- Witter, M. P. y Amaral, D. G. (2004). Hippocampal formation. En: Paxinos, G. (Ed). *The rat nervous system*. San Diego: Elsevier Academic Press. pp. 637-703.
- Wójcikowski, J., Haduch, A. y Daniel, W. A. (2012). Effect of classic and atypical neuroleptics on cytochrome P450 3A (CYP3A) in rat liver. *Pharmacological Reports*, 64(6), 1411-1418.