



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACIA
LABORATORIO DE NEUROQUÍMICA

TESIS PROFESIONAL

*Efecto de la administración crónica del derivado colestánico
BSS-4 sobre la memoria de reconocimiento, la expresión
del Factor de Crecimiento Neuronal y del receptor TrkA*

Para obtener el título de
Licenciatura en Químico Farmacobiólogo

Presenta:

Lizette Rodríguez Velasco

Asesores de Tesis

Dra. María Isabel Martínez García

Laboratorio de Neuroquímica

M en c. Felix Luna Morales

Laboratorio de Neuroendocrinología

MARZO 2016

AGRADECIMIENTOS

A los directores:

Dra. María Isabel Martínez

M. C Félix Luna Morales

Por su apoyo incondicional, la paciencia y los sabios consejos que me brindaron durante el desarrollo de este trabajo.

A la comisión revisora:

Dra. Liliana Martínez Mendieta

Dr. Daniel Limón Pérez de León

Dr. Victorino Alatríste Bueno

Por las aportaciones, sugerencias y disposición para la realización de este proyecto

Al director del bioterio Claude Bernard de la BUAP:

M.V.Z. Carlos Escamilla Weinmann

Por haber proporcionado los animales de experimentación para la realización de esta tesis.

A mis padres, por ser ese pilar que siempre me da fuerza para seguir adelante y superarme en todos y cada uno de los aspectos que me conforman, me han enseñado que el trabajo constante y la perseverancia siempre te brindarán frutos, todo lo que soy es por ustedes, gracias por nunca perder la paciencia conmigo, por no dejarme caer e impulsarme cuando me pierdo en el camino, son lo más sagrado que tengo en esta vida.

A mis hermanos Andy y Mariel, junto con papá y mamá son las personas más importantes para mí, los amo, su presencia siempre le trae felicidad a mi vida, porque gracias a ustedes sé que no estoy sola.

A mi familia, la que siempre celebró todos los logros que he obtenido hasta ahora, los que me mostraron siempre su apoyo incondicional.

A todas y cada una de las personas con las que compartí este camino, a mis amigos, mis colegas del laboratorio de Neuroendocrinología y el laboratorio de Neurofarmacología, todos siempre dispuestos a ayudarme cuando más lo necesité, y aunque con algunos fue corto el tiempo que compartí, sé que el camino hubiera sido más difícil sin ellos, gracias.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 El hipocampo.....	1
1.2 El aprendizaje y la memoria.....	3
1.2.1 Potenciación a largo plazo.....	3
1.2.2 Memoria de reconocimiento.....	6
1.3 Reconocimiento de objetos.....	7
1.4 El Factor de Crecimiento Neuronal y la memoria.....	11
1.4.1 Señalización del NGF: el receptor TrkA.....	16
1.5 La Diosgenina.....	19
1.6 El derivado colestánico BSS-4.....	24
2. JUSTIFICACIÓN	27
3. HIPÓTESIS	28
4. OBJETIVO GENERAL	28
4.1 Objetivos particulares.....	28
5. DIAGRAMA DE TRABAJO	29
6. METODOLOGÍA	30
6.1 Animales.....	30
6.2 Preparación del BSS-4.....	30
6.3 Administración crónica del BSS-4.....	31
6.4 Prueba de Reconocimiento de objetos.....	31
6.5 Obtención e inclusión de cerebros.....	33
6.6 Técnica Inmunohistoquímica para la detección del factor de crecimiento neuronal y del receptor TrkA.....	34
6.7 Análisis estadístico.....	35
7. RESULTADOS	36
7.1 Efecto de la administración de BSS-4 sobre el aprendizaje y la memoria evaluados en la prueba de reconocimiento de objetos.....	36
7.2 Efecto de la administración crónica de BSS-4 sobre la expresión del NGF.....	39
7.3 Efecto de la administración crónica de BSS-4 sobre la expresión del TrkA.....	44
8. DISCUSIÓN	51
9. CONCLUSIONES	60
10. REFERENCIAS	61

RESUMEN

Las neurotrofinas son proteínas que promueven el crecimiento y la diferenciación celular en el tejido nervioso, esta familia está conformada por el Factor de Crecimiento Neuronal (NGF), el Factor Derivado del Cerebro (BDNF) y las Neurotrofinas 3, 4 y 6 (NT-3, NT-4 y NT-6). El NGF es un dímero compuesto de dos cadenas polipeptídicas de 13 kDa de peso cada una, asociadas a través de interacciones no covalentes, cada cadena posee tres puentes disulfuro intracaternarios. Se sintetiza y ejerce sus funciones a nivel de sistema nervioso central; como el hipocampo, el estriado y la corteza. Dentro de las funciones que se le atribuyen se encuentra la regulación de la proliferación neuronal, apoptosis, modulación de la neurotransmisión, control del apetito y crecimiento de neuritas. Al ser sintetizado en el hipocampo, estructura clave para los procesos mnemónicos, se le ha asociado con el aprendizaje y la memoria. Se ha observado que el aumento de la concentración del NGF en el hipocampo promueve la mejora de la memoria de tipo episódica facilitando la potenciación a largo plazo, el mecanismo molecular del aprendizaje y la memoria. Debido a sus potenciales efectos benéficos, se le ha propuesto como terapia para enfermedades neurodegenerativas, sin embargo estudios preclínicos muestran que la administración sistémica del NGF genera hiperalgesia, por otro lado es una proteína incapaz de atravesar la barrera hematoencefálica, por lo que se ha optado como alternativa el uso de moléculas que promuevan el aumento de la síntesis del NGF de manera endógena como la Diosgenina, una sapogenina esteroideal. Se ha observado que la apertura de la cadena lateral de las sapogeninas esteroidales genera derivados colestánicos con mayor actividad que sus antecesores, el BSS-4 es un derivado colestánico de la Diosgenina, por lo que comparten una estructura similar, estudios previos mostraron que el tratamiento crónico con BSS-4 mejora la memoria de reconocimiento, por lo que el objetivo en este trabajo fue determinar si este efecto estaba asociado con la expresión del NGF. Por otro lado, es sabido que el NGF actúa principalmente a través de la activación del receptor TrkA y que la expresión de dicho receptor está modulada por la expresión del NGF, por lo que nos dimos a la tarea estudiar la expresión de ambos marcadores. Los resultados indican que el BSS-4 aumenta la expresión del NGF y que esta neurotrofina regula la expresión de su receptor, este proceso se asocia con la mejora de la adquisición y recuperación de la memoria en la tarea de reconocimiento de objetos.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El hipocampo

La región hipocampal está formada por dos estructuras subcorticales: la formación hipocampal compuesta de tres divisiones citoarquitectónicas: el giro dentado (GD), el hipocampo propiamente dicho y el subiculum; por otro lado se encuentra la región parahipocampal que comprende cinco áreas: las cortezas perirrinal, entorrinal y postrrinal, el presubiculum y el parasubiculum. Algunos autores agrupan el subiculum, presubiculum y parasubiculum bajo el término “complejo subicular” (Amaral y Lavenex, 2007; Witter, 2012).

En el ratón, la formación hipocampal se extiende en forma de coma desde el núcleo septal del prosencéfalo basal rostródorsal hacia la parte posterior del diencefalo en las porciones temporales del cerebro caudoventral (Witter, 2012).

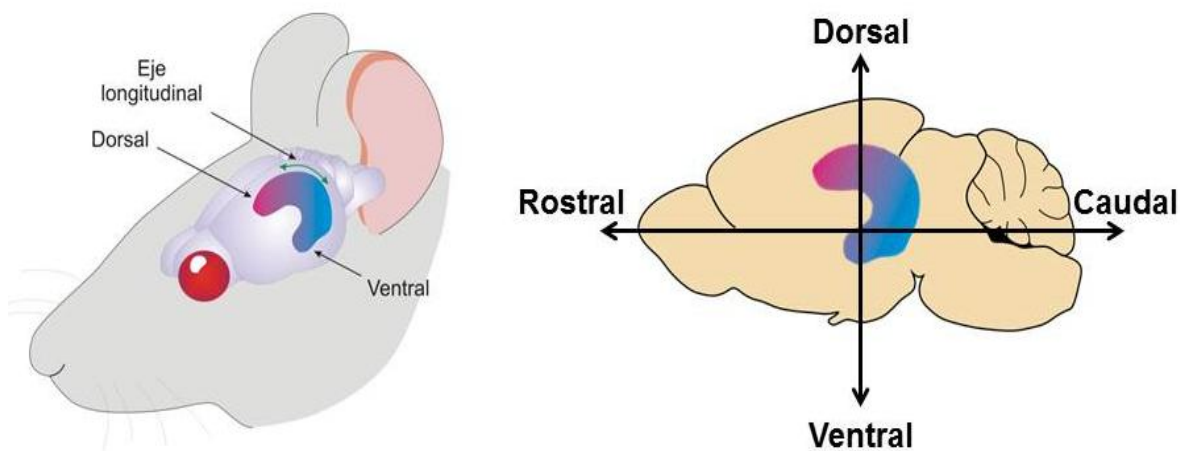


Figura 1. La formación hipocampal en cerebro de ratón se extiende sobre el eje rostro-caudal y posteriormente hacia el eje dorsoventral. En rosa se muestra la región dorsal y en azul la región ventral. Tomado y modificado de Witter, 2012; Bannerman y cols, 2014; Strange y cols, 2014.

El giro dentado es una estructura con forma de “U” que se encuentra seccionado en las capas: *polimórfica* (también denominado *Hilus*), el *stratum granulosum* y el *stratum moleculare*, en ésta última se localizan los cuerpos celulares de las neuronas granulares.

El hipocampo también llamado Cuerno de Amón (CA), es una región curvada incrustada en el giro dentado compuesta por las capas: *stratum lacunosum moleculare*, *stratum radiatum*, *stratum lucidum*, *stratum pyramidale*, *stratum oriens* y el *alveus*. Se subdivide en tres regiones: CA1 adyacente al *subiculum*, CA3 que es adyacente a la fimbria o fornix y CA2, región que conecta al CA1 con el CA3. En el *stratum pyramidale* se localizan los cuerpos celulares de las neuronas piramidales, éstas tienen forma triangular y son más largas en las regiones CA2 y CA3 (Amaral y Lavenex, 2007; Taupin, 2007).

El hipocampo tiene una ruta de señalización trisináptica que empieza con las aferencias provenientes de las neuronas de la capa II de la Corteza Entorrinal; sus axones (fibras perforantes) se extienden y se conectan con las neuronas granulares en el *stratum moleculare* del giro dentado. Las células granulares proyectan las fibras musgosas a las dendritas de las células piramidales del CA3 formando la segunda interacción del circuito. Las neuronas piramidales del CA3 conectan con las neuronas del CA1 por medio de las colaterales de Schaffer formando el tercer enlace del circuito trisináptico en el *stratum radiatum*. La señalización fluye desde la Corteza Entorrinal hacia el hipocampo de manera unidireccional. Además, el *subiculum* envía proyecciones directas hacia el CA3 a través de la vía perforante y hacia el CA1 a través de la vía temporoammónica. Las células piramidales del CA3 proyectan axones colaterales hacia el *subiculum*, la corteza entorrinal e incluso a otras neuronas piramidales del CA3, por otro lado también mandan proyecciones a través del *alveus* hacia la fimbria o fornix. Las células del CA1 extienden proyecciones hacia el *subiculum* y la Corteza Entorrinal (Figura 2) (Amaral y Lavenex, 2007; Taupin, 2007).

Se ha observado que el hipocampo se activa durante ciertos tipos de tareas de memoria y que las lesiones en esta estructura conducen a la incapacidad para formar memorias nuevas, por lo que se le asocia con procesos cognitivos. El hipocampo ha sido el modelo predominante para estudiar la potenciación a largo plazo (PLP), el mecanismo molecular propuesto para explicar el aprendizaje y la memoria. La disposición de las neuronas permite seccionar el hipocampo de tal modo que la mayor parte de los circuitos relevantes quedan intactos además de que los cuerpos neuronales de las células piramidales se ubican en una sola capa densamente empaquetada que se observa con facilidad (Purves, 2004).

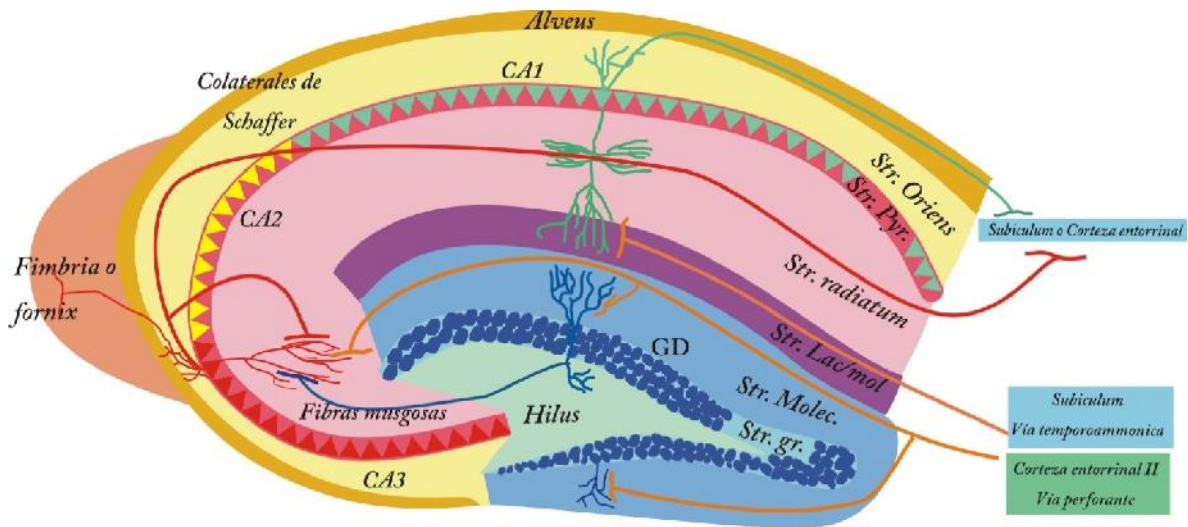


Figura 2. Conexiones del hipocampo. Las neuronas de la capa II de la corteza entorrinal conectan con las células granulares del giro dentado (GD) a través de la vía perforante, las neuronas granulares del GD proyectan hacia las neuronas piramidales del CA3 a través de las fibras musgosas, a su vez las neuronas del CA3 proyectan las colaterales de Schaffer hacia la fimbria o fornix, subículo, neuronas del CA1 y CA3. Las neuronas del CA1 extienden proyecciones hacia el subículo y corteza entorrinal, además reciben proyecciones del subículo a través de la vía temporoammonica. Tomado y modificado de Daumas y cols, 2009.

1.2 El aprendizaje y la memoria

Al hablar de procesos cognitivos es importante definir algunos conceptos, el primero es el aprendizaje el cual es el proceso de adquirir nuevos conocimientos y la memoria que es el mecanismo por el cual ese conocimiento es retenido o almacenado (Lynch, 2004).

1.2.1 Potenciación a largo plazo

La PLP consiste en un incremento estable y duradero en la eficacia de la transmisión sináptica ante un estímulo pre-sináptico debido a una excitación constante. Diferentes trabajos han mostrado que tanto el aprendizaje y la PLP artificialmente inducida en el hipocampo producen cambios morfológicos en las espinas dendríticas que podrían constituir la base estructural de la memoria (Bliss y Collingridge, 1993).

Un evento crítico para la inducción de PLP es el flujo de iones Calcio hacia el líquido intracelular por la activación del receptor post-sináptico de Glutamato, el N-metil-D-Aspartato (NMDA), estudios sugieren que la activación de este receptor juega un papel esencial en la adquisición de memorias. La activación pertinente de la sinapsis da lugar a

la liberación de Glutamato que activa receptores AMPA en la neurona post-sináptica, aumentando así la permeabilidad a iones Na^+ generando la despolarización de la membrana la cual, libera a los canales de los receptores NMDA de los iones Mg^{2+} que los bloquean, permitiendo el influjo post-sináptico de Ca^{2+} que activa cinasas como la proteína cinasa dependiente calcio/calmodulina II (CaMKII) que se une a proteínas del citoesqueleto como la actina o la sinapsina provocando formación de nuevas espinas dendríticas y la liberación de neurotransmisores respectivamente.

Por otro lado se activan proteínas como la Adenilato ciclasa (Ac) dependiente de Calcio que cataliza la producción de 3',5'-adenosín monofosfato cíclico (AMPc) que estimula a la proteína cinasa A (PKA) para activar factores de transcripción como CREB en el núcleo. Por otro lado PKA activa a la cinasa regulada por señal extracelular (ERK) que desencadena rutas de señalización para la modulación de la expresión de genes activando la síntesis de proteínas como los receptores AMPA los cuales migran hacia las membranas de las nuevas espinas dendríticas para contribuir a la estabilización de la transmisión sináptica. ERK también puede ser activado por otras proteínas como PI3K y PKC (Figura 3) (Lynch M.A., 2004; Hansen y Zhang, 2013, Morgado I., 2005; Bliss y Collingridge, 1993).

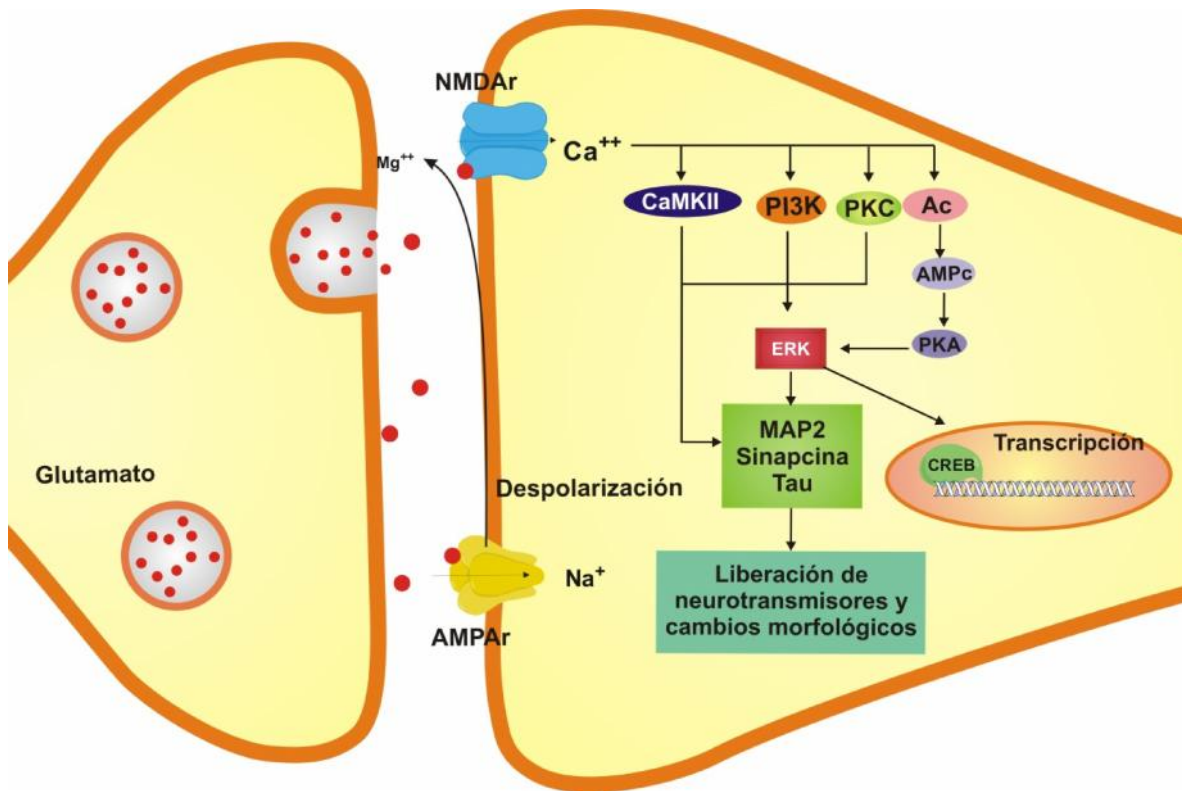


Figura 3. Mecanismos moleculares de la memoria. La activación de los receptores AMPA por la unión de glutamato permite el paso de iones Na^+ generando la despolarización de la membrana post-sináptica, por lo que el ión Mg^{2+} que se encontraba bloqueando al receptor NMDA se pone en movimiento permitiendo así la activación del receptor y el paso de Ca^{2+} al interior de la célula, este flujo favorece la activación de CaMKII que se une a proteínas del citoesqueleto provocando cambios morfológicos además de aumentar la liberación de neurotransmisores. El Ca^{2+} también activa a otras proteínas como la Adenilato ciclasa dependiente de calcio (Ac) que induce la producción de AMPc que estimula a la PKA para accionar factores de transcripción como CREB. Por otro lado PKA, PKC y PI3K activan a ERK que desencadena rutas de señalización para la modulación de la expresión de genes (Lynch M.A., 2004; Hansen y Zhang, 2013, Morgado I., 2005; Bliss y Collingridge, 1993).

La memoria puede ser explícita o implícita. La memoria explícita es el almacenamiento cerebral de hechos y eventos que se expresa de manera consciente, fácil de declarar verbalmente o por escrito (memoria declarativa), su adquisición se relaciona con el sistema hipocampal y otras estructuras del lóbulo temporal, dentro de esta clasificación se encuentra la memoria episódica la cual es el almacenamiento cerebral de eventos concretos y autobiográficos; y la memoria semántica, el almacenamiento cerebral de hechos más generales sobre el medio en el cual se desarrolla el sujeto por lo que se relaciona con la percepción del mundo que nos rodea. Por otro lado, la memoria implícita también llamada procedimental permite la ejecución de habilidades motoras, su expresión es en gran medida automática, inconsciente y difícil de

verbalizar, está relacionada con estructuras subcorticales como el neocórtex (caudado y putamen) (Lynch M.A., 2004; Morgado I., 2005).

Existe otra clasificación que diferencia a la memoria a través de una dimensión temporal. La memoria de corto plazo es la retención de información durante un tiempo breve que se basa en cambios efímeros, eléctricos o moleculares en las redes neuronales implicadas. La memoria de largo plazo es la consecuencia de la repetición de una determinada experiencia, lo que provoca la persistencia de dichos cambios que activan la maquinaria neuronal dando lugar a la síntesis de nuevas proteínas y cambios estructurales (Morgado I., 2005).



Figura 4. Clasificación de los diferentes tipos de memoria. Tomado y modificado de Brem y cols. 2013.

La clasificación anteriormente descrita se basa principalmente en las estructuras que se ven implicadas en la formación de diferentes tipos de memoria, es útil para identificar los procesos neurobiológicos empleados para diagnosticar disfunciones del aprendizaje y la memoria en enfermedades neurodegenerativas.

1.2.2 Memoria de reconocimiento

Como se mencionó anteriormente, la memoria declarativa o explícita se refiere a la memoria de hechos, eventos o lugares. Se ha descrito en modelos animales que el hipocampo está implicado en la formación de este tipo de memoria.

Uno de los ejemplos de memoria declarativa más ampliamente estudiados es la memoria de reconocimiento la cual se ha descrito como la habilidad para reconocer que un estímulo o un evento ya han sido experimentados previamente. Se han identificado al menos dos componentes de la memoria de reconocimiento: la familiarización que

involucra el reconocimiento de que un objeto fue presentado y la recolección de la información contextual (espacial y/o temporal) que implica detalles específicos acerca de dónde y cómo se adquirió el aprendizaje (Squire y cols, 2007). Este tipo de memoria así como su consolidación se asocia a regiones del lóbulo temporomedial, específicamente del hipocampo y la corteza perirrinal. La memoria de reconocimiento ha sido utilizada para evaluar las alteraciones en la memoria posterior a un tratamiento farmacológico (Balderas y cols, 2015).

1.3 Reconocimiento de objetos

Dentro de las pruebas para evaluar la memoria, específicamente la de reconocimiento, se encuentra la prueba de reconocimiento de objetos (RO). Se basa en el comportamiento de los roedores a explorar objetos nuevos, por lo que se evalúa la diferencia en el tiempo de exploración entre un objeto nuevo y un objeto ya conocido (Ennaceur y Delacour, 1988).

Esta prueba no necesita motivación externa, recompensa o castigo, por lo que el sujeto de experimentación no se encuentra en condiciones de estrés. Se ha observado que el estrés podría tener cierto impacto sobre el aprendizaje debido a las hormonas (glucocorticoides) que se liberan. El hipocampo es una estructura que posee una alta concentración de receptores para glucocorticoides, por lo que el estrés puede producir cambios en la neuroquímica, en la excitabilidad y en la morfología neuronal, estos eventos tienen un impacto negativo sobre los procesos cognitivos. En modelos animales sometidos a estrés se ha observado disminución de la arborización dendrítica (Conrad, 2009). Sin embargo, también se ha observado que estos efectos varían dependiendo de la duración del estrés así como también del ambiente en el que se desarrolla el sujeto (Shea y cols, 2015).

A pesar de la variación de los resultados obtenidos en el estudio de la influencia del estrés sobre el aprendizaje y la memoria, es claro que éste debe ser una variable que deba considerarse al evaluar el aspecto molecular de los procesos mnemónicos, ya que existen proteínas que pueden variar su expresión en condiciones de estrés.

Para esta prueba es necesario un entrenamiento, ya que con el fin de que el animal logre diferenciar entre un objeto nuevo y uno ya conocido, éste debe familiarizarse primero con dos objetos idénticos. Tras la sustitución de uno de los objetos familiares por

uno novedoso, si el animal es capaz de reconocer el objeto nuevo dirigirá su atención primordialmente a dicho objeto, lo que significará que el animal mantiene el recuerdo del objeto familiar (Silvers y cols, 2007).

El modelo experimental consiste en tres etapas: habituación, familiarización y la prueba. En la habituación el animal explora la zona de trabajo sin la presencia de objetos, posteriormente el animal es retirado y colocado en su caja de cautiverio por un tiempo determinado. Durante la fase de familiarización, el animal es colocado en la zona de habituación la cual contiene ahora dos objetos idénticos, se permite al animal reconocer por un tiempo determinado dichos objetos. Después de un tiempo determinado, se procede a la fase de prueba en la cual el animal es colocado en la zona ya conocida la cual contiene un objeto familiar y un objeto novedoso (Antunes y Biala, 2012).

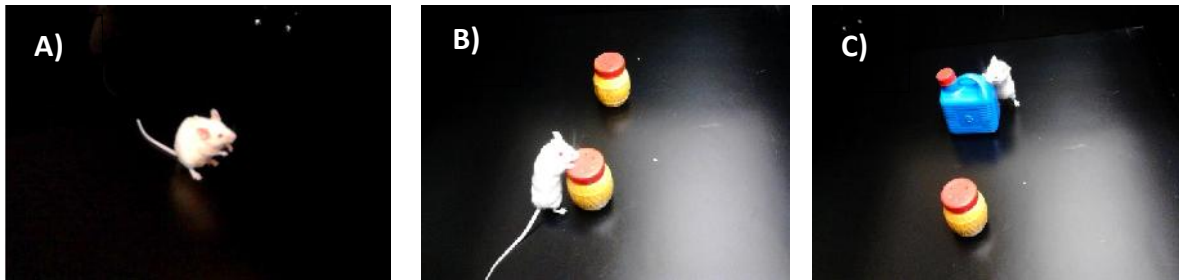


Figura 5. La prueba de reconocimiento de objetos consiste en tres fases. A) En la fase de habituación, se le permite al animal explorar libremente la zona de trabajo sin la presencia de objetos. B) En la fase de familiarización se colocan dos objetos idénticos y se le permite al animal explorarlos. C) En la fase de prueba uno de los objetos familiares es remplazado por uno nuevo.

Para esta prueba se define la exploración como un olfateo directo al objeto a una distancia menor o igual a 2 cm y/o toques con la nariz o las extremidades delanteras, mientras que sentarse o rodear el objeto no se considera como exploración (Antunes y Biala, 2012). Se ha demostrado que el rendimiento en la prueba de reconocimiento de objetos depende del hipocampo y la corteza perirrinal principalmente, ya que experimentos en roedores con lesiones en estas zonas presentan una discriminación pobre entre objetos nuevos y familiares. La corteza perirrinal está asociada al reconocimiento de objetos después de intervalos de retención cortos, mientras que el hipocampo es responsable del reconocimiento de objetos a largo plazo (Clark y cols, 2000; Aggleton y cols, 2010; Antunes y Biala, 2012).

Hammond y cols, en el 2004 se propusieron evaluar el papel del hipocampo sobre la memoria de reconocimiento, para lo cual inactivaron dicha estructura vía intra-hipocámpal con Lidocaína, un anestésico local que bloquea canales de Na⁺ dependientes de voltaje impidiendo así la transmisión sináptica. La lidocaína tiene un área de influencia de inactivación de 0.1 mm³-2 mm³ en un tiempo de 10 a 15 minutos (Gallo, 2007). Las administraciones se realizaron a ratones 5 minutos antes de la sesión de entrenamiento de la prueba de reconocimiento de objetos, posteriormente evaluaron la memoria 5 minutos y 24 horas después del entrenamiento. Observaron que al evaluar la memoria a corto plazo (5 min.) no había diferencias significativas respecto al grupo control, sin embargo 24 horas después se observa una diferencia significativa en el rendimiento de la prueba respecto al grupo control (Figura 6), por lo que concluyen que si bien el hipocampo no es requerido para la recuperación de la memoria de reconocimiento de corto plazo, si lo es para la formación de la memoria de largo plazo (Hammond y cols, 2004).

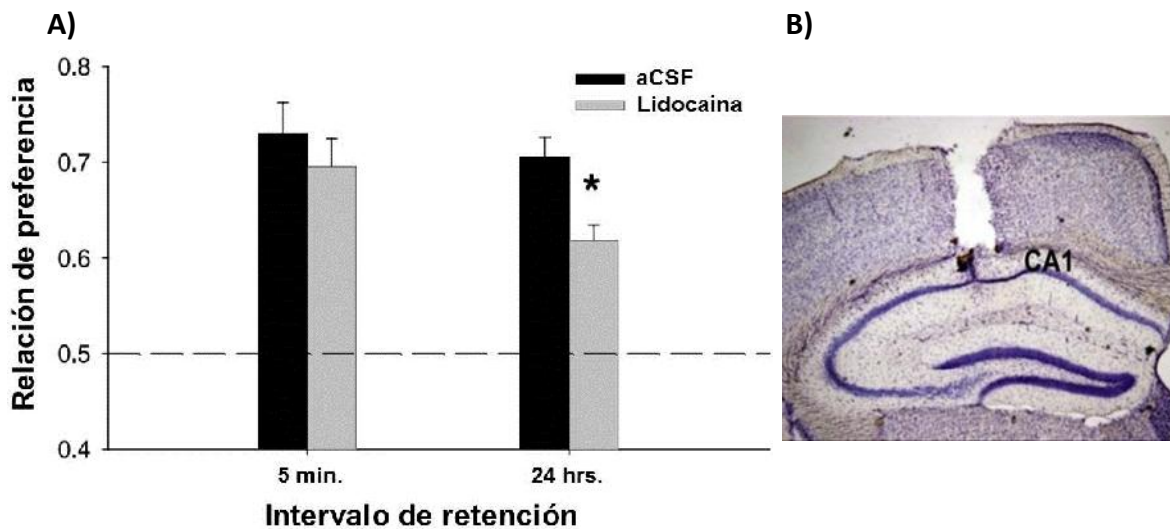


Figura 6. Inactivación neuronal del hipocampo de ratón con lidocaína (0.5 µl al 4%) antes de la fase de entrenamiento disminuye el rendimiento en la prueba de reconocimiento de objetos después de un intervalo de retención de 24 horas en comparación con el grupo al que se le administró Fluido cerebroespinal artificial (aCSF, 5µl). B) Corte histológico de cerebro de ratón teñido con Violeta de cresil, en la imagen se muestra la localización de la cánula guía dirigida hacia la región CA1 del hipocampo a través de la cual realizaron las administraciones (*p 0.05). Tomado y modificado de Hammond y cols, 2004.

En el estudio de Hammond y cols, la región del CA1 del hipocampo se mantuvo inactivada durante la sesión de entrenamiento, el intervalo de retención y la sesión de prueba, por lo que este diseño experimental no permitía explicar si las diferencias

observadas en la prueba fueron debido a un defecto en la formación de la memoria o en la consolidación de ésta.

Para conocer más el papel del hipocampo sobre la memoria evaluada en la prueba de RO, De Lima y colaboradores (2006) usaron ratas sometidas a una inactivación temporal del hipocampo (CA1) con Muscimol vía intrahipocampal después de la sesión de entrenamiento. El Muscimol tiene un área de influencia de inactivación de $0.1 - 2 \text{ mm}^3$ perdurando su efecto hasta varias horas (Lomber, 1999); se une al receptor GABA_A permitiendo el paso de Cl^- hacia el interior de la célula provocando la hiperpolarización de la membrana bloqueando así la transmisión sináptica. Observaron que los animales con la inactivación del CA1, tenían un desempeño menor en la prueba de RO a diferencia de los animales a los que solo se les administró solución salina. De los resultados obtenidos, se observa que no hubo diferencias significativas en el índice de discriminación entre ambos grupos durante la sesión de entrenamiento, sin embargo, al evaluar la memoria de corto y largo plazo, el índice de discriminación es menor en el grupo tratado con Muscimol (Figura 7) por lo que se concluye que el hipocampo juega un papel importante para la consolidación de esta memoria.

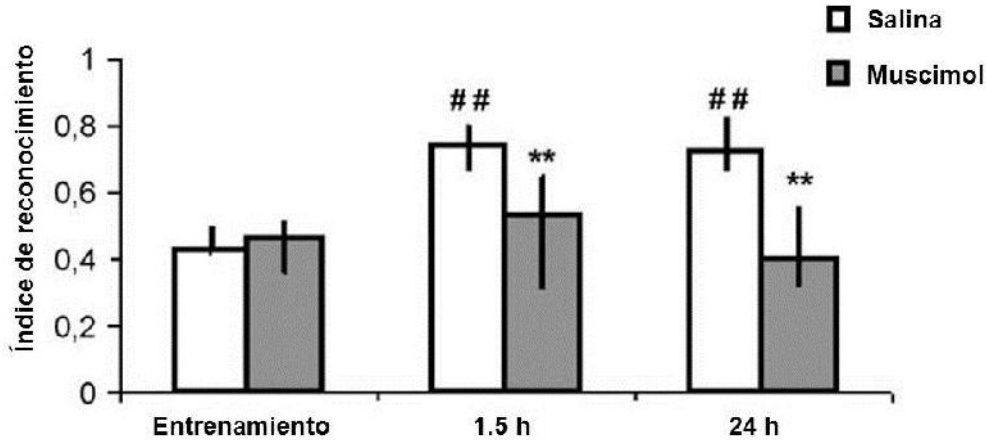


Figura 7. La inactivación temporal con muscimol del hipocampo dorsal de rata después de la sesión de entrenamiento bloquea la consolidación de la memoria evaluada en la prueba de reconocimiento de objetos 1.5 y 24 horas después del entrenamiento (salina $n=9$, muscimol $n=15$). $**p<0.01$, diferencias significativas con respecto al grupo salina, $##p<0.01$, diferencias significativas del ensayo de entrenamiento con el mismo grupo. Tomado y modificado de De Lima y cols, 2006.

1.4 El Factor de Crecimiento Neuronal y la memoria

Los factores de crecimiento son un grupo de proteínas que regulan procesos celulares como la proliferación, la diferenciación y la maduración. Ejemplos de estos son el factor de crecimiento similar a la insulina, factor de crecimiento epidermal y los factores de crecimiento nervioso; como ejemplo de estos últimos están el factor de crecimiento neuronal (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y las neurotrofinas 3, 4 y 6 (NT-3, NT-4 y NT-6 respectivamente). Son necesarios para el mantenimiento del sistema nervioso y regeneración neuronal ya que regulan el desarrollo neuronal y sus funciones, incluyendo la formación de nuevas sinapsis y la plasticidad sináptica. Los genes responsables de la codificación de estas proteínas se expresan en grandes cantidades no solo durante el desarrollo del sistema nervioso, sino también en la etapa adulta (Reichardt, 2006; Razavi y cols, 2015).

El factor de crecimiento neuronal (NGF) fue la primera neurotrofina descubierta en trabajos conducidos por Rita Levi-Montalcini, Viktor Hamburger y Stanley Cohen, que culminaron en el aislamiento de la proteína. Consiste en un dímero de cadenas polipeptídicas de 13 kDa de peso cada una asociadas a través de interacciones no covalentes, cada cadena posee tres puentes disulfuro intracatenarios, dos subunidades , una subunidad y dos subunidades . La subunidad es la responsable de la actividad biológica del NGF (Lorigados-Pedre y Bergado-Rosado, 2004).

El NGF se produce durante el desarrollo y la vida adulta, es esencial para el crecimiento, diferenciación, desarrollo y mantenimiento fenotípico de neuronas tanto del sistema nervioso periférico como del central; regula el tamaño celular, la arborización dendrítica, la expresión de genes y la proliferación celular, incrementa la expresión de su receptor de alta afinidad (TrkA) y de enzimas productoras de neurotransmisores. En el SNC lo producen, en condiciones fisiológicas, mayoritariamente las neuronas y se activa su síntesis glial en casos de lesiones cerebrales. Debido a que desencadena cambios morfológicos, se le considera un mediador molecular de la plasticidad neuronal. Cuando el NGF se une al TrkA activa proteínas que interactúan con componentes del citoesqueleto favoreciendo la liberación de neurotransmisores, cuando se une al p75NTR, promueve la apoptosis. En ensayos clínicos se ha observado que la administración del NGF afecta el apetito de los pacientes, en ratas induce hipofagia y pérdida de peso (Winkler y cols, 2001; Lorigados-Pedre y Bergado-Rosado, 2004).

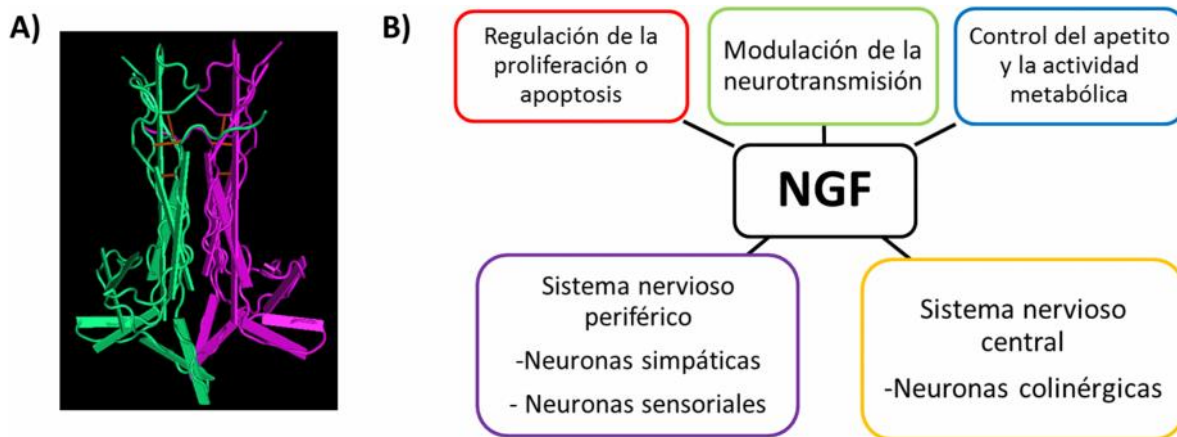
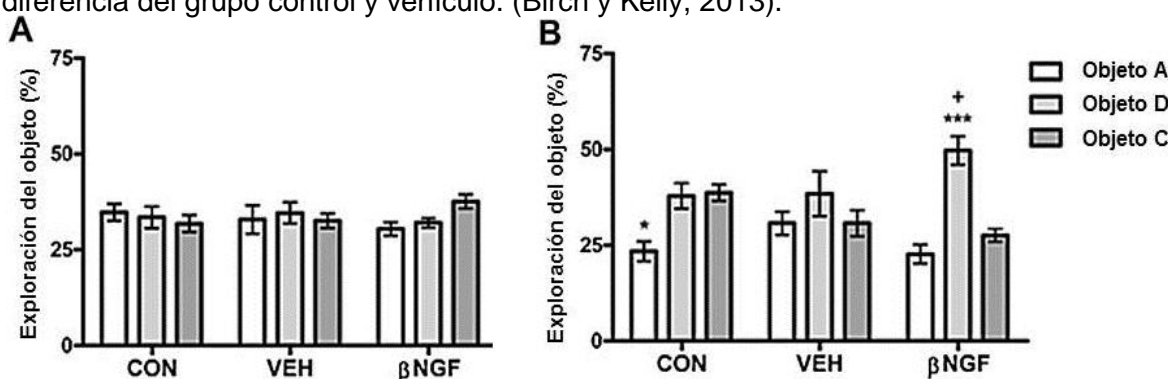


Figura 8. A) Estructura del Factor de Crecimiento Neuronal. El NGF es una glicoproteína que consiste en un dímero de cadenas polipeptídicas de 13 kDa de peso representadas cada una en la imagen con diferentes colores; cada cadena posee tres puentes disulfuro (naranja). B) Principales funciones fisiológicas del NGF en el sistema nervioso. Tomado y modificado de Wiesmann y De Vos, 2001; Niewiadomska y cols, 2011.

Se ha demostrado que es sintetizado por los tejidos diana de fibras sensoriales y simpáticas del Sistema nervioso periférico (SNP) así como de innervaciones colinérgicas como la región cortical y la formación hipocámpal en el SNC cumpliendo con la hipótesis neurotrófica que plantea que la supervivencia neuronal específica depende y está regulada por factores neurotróficos sintetizados por las áreas que actúan como blanco de dichas neuronas específicas (Lorigados-Pedre y Bergado-Rosado, 2004).

La principal estructura blanco de las neuronas colinérgicas provenientes del prosencéfalo basal es el hipocampo, por lo que se ha estudiado la presencia del NGF en las neuronas piramidales de esta estructura. Se ha observado que la expresión es regulada por la actividad neuronal. Los incrementos son causados por neurotransmisiones colinérgicas y glutamatérgicas y su disminución es causada por neurotransmisiones GABAérgicas. La expresión también aumenta debido a convulsiones, isquemia, hipoglicemia y daño a tejidos (Levi-Montalcini R, 1964; Sofroniew y cols, 2001; Wiesmann y De Vos, 2001; Allen y cols, 2013).

Existen reportes que indican que el NGF, el BDNF y la Neurotrofina-3 (NT-3) modulan la aparición de la PLP mediante su interacción con sus respectivos receptores TrkA, TrkB y TrkC (Lynch M.A., 2004), por lo que es posible que jueguen un papel fundamental en el aprendizaje y la formación de la memoria, mejorando así el rendimiento de los animales en pruebas conductuales. Un ejemplo de estos estudios fue llevado a cabo por Birch y cols en el 2013, en donde demostraron que la mejora de la función cognitiva coincidió con el incremento de la expresión del NGF pero no del BDNF en hipocampo, por lo que investigaron el efecto de la administración intracerebroventricular del NGF durante 6 semanas, observaron que los animales que recibían el tratamiento presentaban una mejora de la memoria evaluada en la prueba de reconocimiento de objetos (Figura 9). Si bien durante la sesión de entrenamiento no hubo diferencias significativas en la exploración de los objetos, en la sesión de prueba se observó que los animales tratados con el NGF empleaban más tiempo a explorar los objetos novedosos a diferencia del grupo control y vehículo. (Birch y Kelly, 2013).



*Figura 9 Efecto de la infusión intracerebroventricular de NGF sobre la memoria de reconocimiento. No hubo diferencias significativas en la exploración de objetos entre los grupos en el día de entrenamiento de la prueba NOR (A). Solo el grupo tratado con NGF 42 días 4ng/h exploró el objeto nuevo significativamente más que los objetos familiares durante la prueba 24 horas después del entrenamiento (B; ***p<0.001). Diferencia en la exploración del objeto D entre grupos *p<0.05. n=6 en el grupo CON y NGF, n=5 en el grupo VEH, los datos se expresan como Media ± SEM. Tomado y modificado de Birch y Kelly, 2013.*

Debido a que la memoria de reconocimiento se asocia con el hipocampo, se determinó la concentración del factor en dicha región, observando que los animales tratados con el NGF presentaban una concentración mayor de dicha neurotrofina que los animales pertenecientes al grupo vehículo y control, demostrando así que el factor depositado en el ventrículo lateral migraba hacia el hipocampo. Por otro lado también se observó el aumento de la expresión de la proteína Sinapsina I y el ARNm del receptor TrkA (Figura 10), sugiriendo que el aumento del NGF en la región hipocampal mejoraba la memoria a través del aumento de la síntesis del receptor TrkA, incrementando así su señalización activando la síntesis de proteínas como la Sinapsina I, la cual posee un papel importante en la liberación de neurotransmisores.

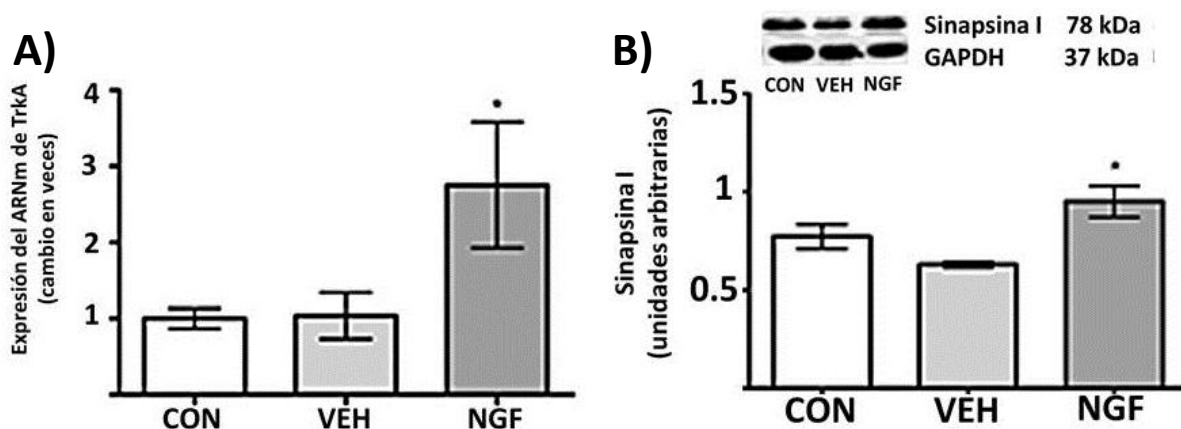


Figura 10. Efecto de la infusión intracerebroventricular del NGF sobre A) la expresión del ARNm del receptor TrkA y B) la proteína Sinapsina I. El tratamiento con el factor de crecimiento neuronal aumentó la expresión de ambos marcadores comparado con los grupos vehículo y control ($p < 0.05$). Para determinar las unidades arbitrarias de sinapsina I se aplicó una relación Sinapsina I/GAPDH. Tomado y modificado de Birch y Kelly, 2013.

En el 2009 Conner y cols, demostraron que el NGF facilita la potenciación a largo plazo en el hipocampo a través de la modulación de sistemas colinérgicos hacia blancos corticales e hipocampales en el cerebro de rata, regulando de esta manera la plasticidad neuronal.

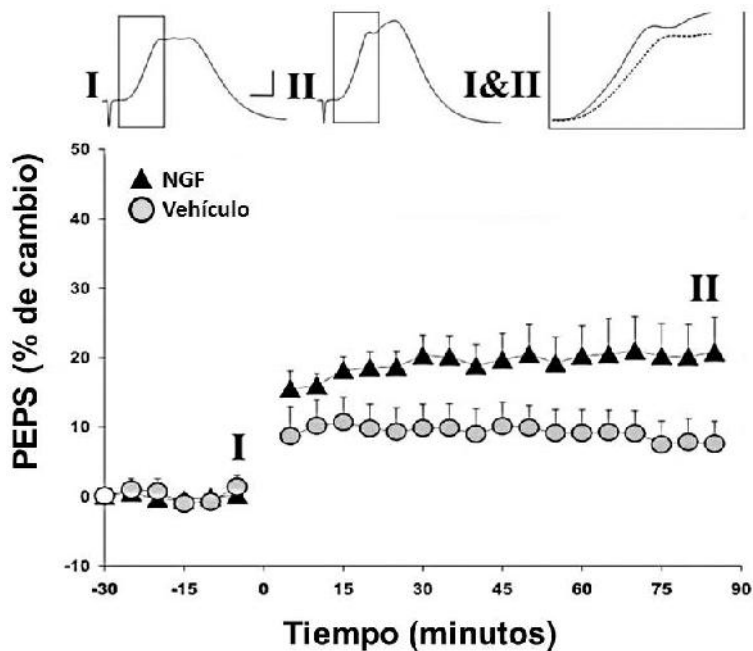


Figura 11. La potenciación a largo plazo (PLP) fue inducida en animales tratados con el factor de crecimiento neuronal (NGF) y vehículo usando una intensidad de estímulo de 150-250 μ A. La PLP fue medida como el porcentaje de cambio desde la línea base en la pendiente inicial del potencial excitatorio postsináptico. Los animales tratados con NGF mostraron un incremento significativo en la inducción del PLP comparado con el grupo tratado con el vehículo. Las administraciones se realizaron vía intraseptal en cerebro de rata con ayuda de una cánula. Se administraron 12 μ l/día de NGF al grupo correspondiente. Tomado y modificado de Conner y cols, 2009.

La potenciación a largo plazo es un mecanismo que inicia con la liberación del neurotransmisor excitador glutamato, la actividad de éste sobre los receptores NMDA post-sinápticos desencadena señalizaciones que favorecen la actividad de factores de transcripción y así la síntesis de proteínas implicadas en cambios morfológicos como el aumento de las espinas dendríticas. La PLP junto con la actividad del NGF promueven el aumento en el número de espinas por lo tanto también aumenta el número de conexiones entre neuronas, por lo que la transmisión de información se amplifica, dando paso al aumento de los potenciales excitatorios post-sinápticos observados en la Figura 11.

A pesar de la evidencia de los efectos benéficos del NGF, las aplicaciones terapéuticas de éste tienen muchas limitaciones ya que en estudios preclínicos, la administración intravenosa o subcutánea del NGF causa hiperalgesia. Por otro lado, al igual que para otros factores tróficos, la barrera hematoencefálica no permite el paso de estas proteínas, por lo que una alternativa es el uso de moléculas que induzcan o mejoren la producción de estos (De Rosa y cols, 2005; Sofroniew y cols, 2001; Kang y cols, 2011). Proponiendo que la administración intranasal pudiese ser una alternativa a la infusión

intracerebroventricular, De Rosa y colaboradores mostraron que la administración mediante esta vía del NGF mejoraba la memoria de reconocimiento y contrarrestaba la atrofia de neuronas colinérgicas en un modelo murino de Alzheimer.

1.4.1 Señalización del NGF: el receptor TrkA

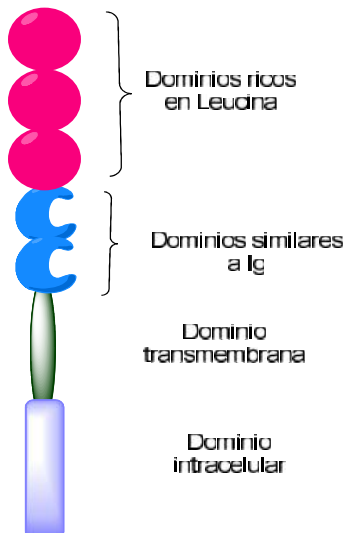


Figura 12. Organización estructural de los receptores pertenecientes a la familia TrkA. De los dominios similares a inmunoglobulinas el más cercano a la membrana celular es el que le dará la especificidad al receptor

La familia de los Trk comprende receptores transmembrana con actividad tirosina quinasa altamente expresados en el sistema nervioso. Esta familia incluye a los receptores para la mayoría de los factores de crecimiento polipeptídicos: TrkA, TrkB y TrkC que responden a NGF, BDNF y NT4 o NT3 respectivamente. Comparten una organización estructural, se encuentran tres dominios ricos en leucina, adyacentes a estos se encuentran dos dominios “similares a inmunoglobulinas” que son seguidos por un dominio transmembrana y posteriormente un dominio citoplasmático responsable de la actividad tirosina quinasa. La fosforilación de los residuos de tirosina en el dominio citoplasmático proporciona sitios de reclutamiento dependientes de la fosforilación de moléculas adaptadoras y de enzimas que median la iniciación

de cascadas de señalización intracelulares. El dominio similar a inmunoglobulina más cercano a la membrana celular es el sitio de unión para el factor de crecimiento (Huang y Reichardt, 2003).

La unión del NGF activa la dimerización de TrkA, induciendo la autofosforilación del receptor que permite la formación de sitios de unión para proteínas Shc o GRB2 que promueve su unión mediante SOS a RAS. El complejo GRB2 y SOS activa a Ras y estimula la señalización a través de la Raf que fosforila a la proteína MEK ya sea 1 y/o 2 para después fosforilar y activar a las quinasas reguladas por señales extracelulares ERK 1 y 2. A su vez ERK activa a Rsk que fosforila a CREB, esto permite que CREB interacte con SRF y Elk-1 a través de la proteína CBP, CREB regula la expresión de genes de productos esenciales para la diferenciación y la supervivencia neuronal. Por otro

lado, ERK puede traslocarse al núcleo y fosforilar a la proteína Elk-1 para favorecer su interacción con SRF y con el sitio de unión CAGGAT del SER con el gen *c-fos*, el cual es un gen de expresión rápida que forma parte de una serie de eventos de transcripción necesarios para la iniciación y el mantenimiento de la diferenciación y supervivencia celular. Otra ruta que se desencadena de la activación de Ras es la ruta de RhoG que activa a Cdc42 y Rac. La expresión de RhoG por si misma induce el crecimiento de neuritas, mientras que las formas activas de Rac1 y Cdc42 inducen la formación de lamelipodios y filopodios respectivamente.

Al fosforilarse los residuos de tirosina del TrkA, también se une la proteína PLC- 1 la cual es fosforilada y activada, una vez activada hidroliza al fosfolípido fosfatidil-inositol 4,5-bisfosfato (PIP2) para formar Inositol trifosfato (IP3) el cual promueve la liberación de Ca^{++} que resulta en la activación de enzimas como la Proteína quinasa C (PKC) el cual ayuda a promover el crecimiento de neuritas así como también la activación de Raf y ERK1/2.

La activación de PI3K genera PIP3 la cual activa a la Proteína quinasa dependiente del fosfatidil inositol (PDK-1), éste activa a la proteína quinasa Akt que tiene como sustratos proteínas relacionadas con rutas de muerte celular como Bad que promueve la apoptosis a través del secuestro de Bcl-X, Bcl-X es una proteína antiapoptótica que inhibe a Bax. La fosforilación de Bad previene su unión con Bcl-XL. En la ausencia de la fosforilación de Bad, esta forma heterodímeros con Bcl-XL favoreciendo así la formación de homodímeros de Bax que se traslocan a la membrana mitocondrial y se insertan en ella alterando su potencial vía formación de canales iónicos y la generación de especies citotóxicas reactivas de oxígeno (Sofroniew y cols, 2001; Huang y Reichardt, 2003; Negishi y Katoh, 2004; Niewiadomska y cols, 2011).

Las neuronas colinérgicas del complejo prosencéfalo septal-basal expresan este receptor durante el desarrollo y la edad adulta disminuyendo en animales de edad avanzada, su expresión es menor en pacientes con enfermedad de Alzheimer; se han encontrado evidencias de la presencia del TrkA en neuronas piramidales del hipocampo (Sofroniew y cols, 2001). En 1992 Holtzman y colaboradores descubrieron que la administración intraventricular de NGF en cerebro de rata por 2 semanas generaba el aumento de la cantidad de ARNm del receptor TrkA en el prosencéfalo basal y núcleo caudado, de la misma forma en cultivos celulares PC12 aumentaba la cantidad de ARNm

48 horas después de la adición del NGF mostrando evidencia de que la expresión del receptor Trka es regulado por incremento por el NGF.

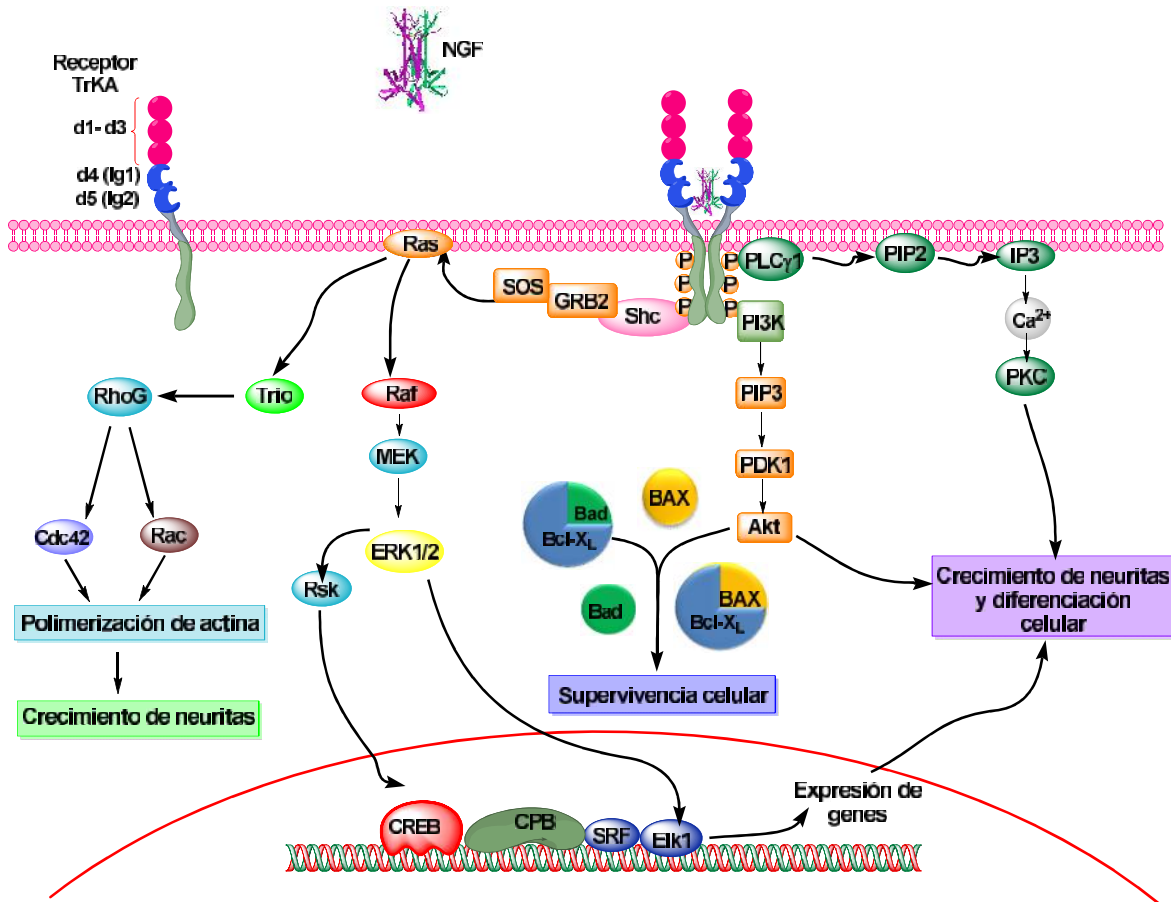


Figura 13. Mecanismo de acción del NGF desencadenada por su interacción con el receptor TrkA. La interacción de la neurotrofina con el receptor TrkA induce la dimerización con otro monómero de TrkA promoviendo la autofosforilación del receptor en los residuos intracelulares, posteriormente fosforila a otras proteínas activándolas y permitiendo que estas desencadenen rutas de señalización que activan factores de transcripción y la expresión de genes para la posterior síntesis de proteínas. La señalización promueve la supervivencia así como el crecimiento de neuritas y diferenciación celular.

Se cree que el mecanismo por el cual el NGF podría promover la plasticidad es a través de la actividad de las proteínas MAP quinasas, PI3K/Akt y posiblemente CAMKII, que se han visto implicadas en el aprendizaje y la memoria. Además, NGF puede mejorar la comunicación sináptica incrementando la liberación de Glutamato y mejorando la sinaptogénesis. Por otro lado, se ha observado que el NGF mejora la supervivencia de las neuronas y aumenta su actividad en neuronas colinérgicas del hipocampo. Estos estudios muestran que NGF puede promover el aprendizaje y la memoria a través de sus efectos sobre la señalización neuronal, la comunicación neuronal y los cambios en morfología

neuronal; el aumento en el número de dendritas implica un reforzamiento de la sinapsis y por lo tanto la facilitación de la PLP (Birch y Kelly, 2013).

Estudios recientes han mostrado que en enfermedades neurodegenerativas es característica la disminución de NGF junto con otros factores neurotróficos como el BDNF y el GDNF, por lo que se ha enfocado la atención en estas proteínas como posible blanco terapéutico contra estas enfermedades (Allen y cols, 2013). Por ejemplo, en la enfermedad de Alzheimer es característica la disminución de neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal ligada con la disfunción del NGF y el receptor TrkA, la disminución del receptor también se ha asociado con el deterioro cognitivo, por lo que se sugiere que la señalización mediada por el NGF es requerida para la supervivencia y el funcionamiento normal de estas neuronas (Niewiadomska y cols, 2011).

1.5 La Diosgenina

Diosgenina, la Hecogenina y la Sarsasapogenina son ejemplos de sapogeninas esteroidales, productos naturales obtenidos de las saponinas, un grupo de glicósidos ampliamente distribuidos en plantas y empleado para la obtención de productos esteroidales biológicamente activos (Fernández-Herrera y cols, 2009).

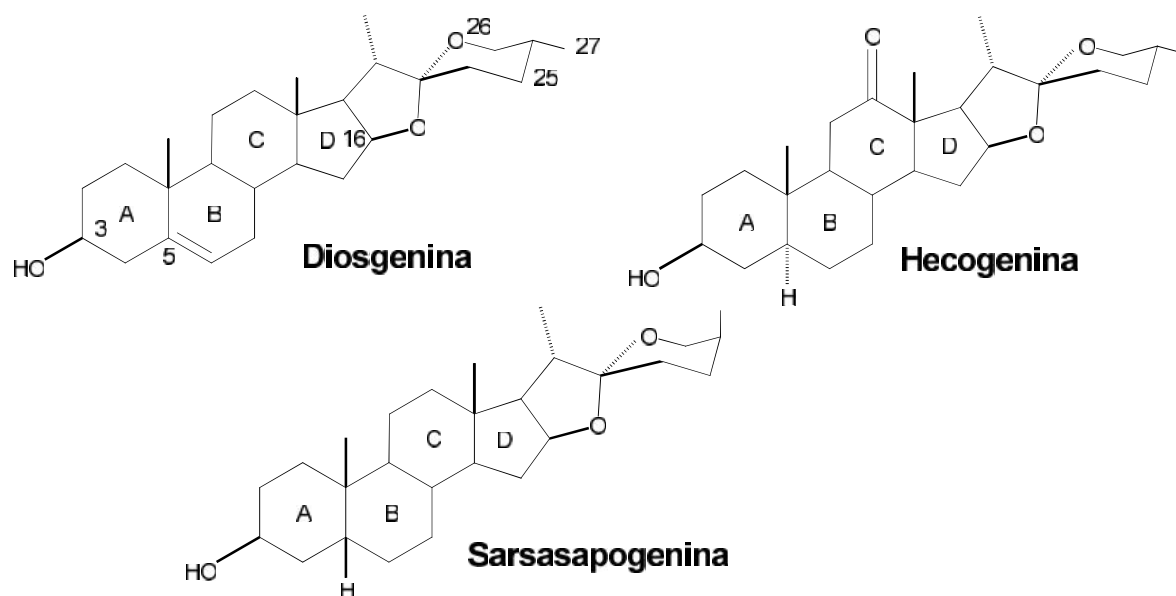


Figura 14. Ejemplos de sapogeninas esteroidales, los compuestos poseen similitud estructural además del núcleo esteroidal ciclopentafenantreno (Anillos A-D). Tomado y modificado de Fernández-Herrera y cols, 2009.

La Diosgenina es un compuesto activo derivado de la saponina Dioscina, se encuentra en las raíces del ñame (*Dioscorea villosa*) perteneciente a la familia *Dioscorea*. En la industria farmacéutica ha sido utilizada como precursora para la síntesis de esteroides, una gran variedad de estudios preclínicos han evidenciado su potencial contra padecimientos como la diabetes, cáncer, hipercolesterolemia, condiciones inflamatorias y el déficit cognitivo causado por el envejecimiento (Al-Matubsi y cols, 2011; Chiu y cols, 2011; Ebrahimi y cols, 2014; Saravanan y cols, 2014; Li y cols, 2015).

En el 2011 Kang y colaboradores realizaron investigaciones en un modelo de neuropatía que se caracteriza por desmielinización y degeneración axonal asociado a niveles bajos del NGF en ratones y ratas diabéticas. El objetivo del estudio fue demostrar el efecto neuroprotector de la Diosgenina. Después dos meses de tratamiento con Diosgenina (DG) y el NGF (como control positivo), observaron que el tratamiento con DG mejoraba significativamente la conductividad nerviosa en comparación con los animales diabéticos sin el tratamiento, los resultados obtenidos en el grupo DG fueron similares a los obtenidos en el grupo NGF, por lo que los autores concluyen que la mejora de la conductividad era causada por el aumento de la concentración del NGF en el nervio (Figura 15).

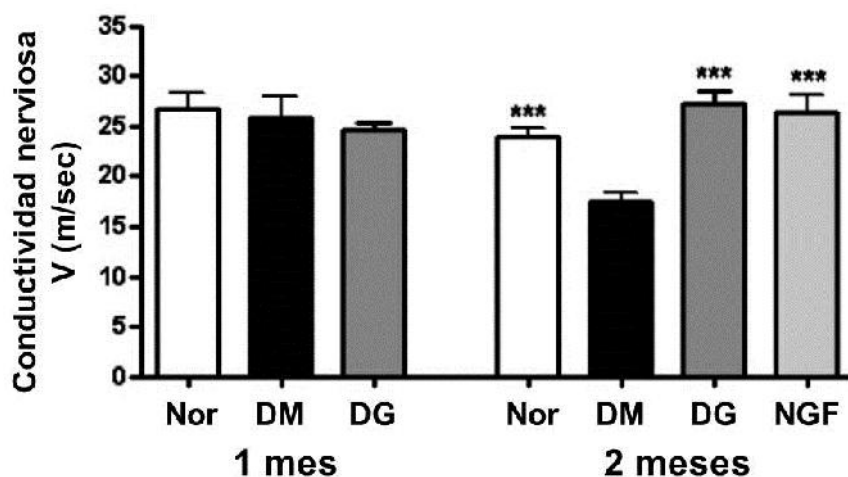


Figura 15. Se muestra la velocidad de conducción nerviosa en nervio ciático. Sujetos normales (Nor), diabéticos (DM), Diosgenina (10 mg/kg) (DG), factor de crecimiento nervioso (1mg/kg) (NGF). El modelo de Diabetes fue inducido con una administración intraperitoneal de Aloxano (150mg/kg). No existen diferencias significativas en el primer mes de tratamiento. A los dos meses se observa una disminución significativa de la conductividad nerviosa en los animales con diabetes, el tratamiento con DG mejoró la conductividad nerviosa, resultados similares se

obtuvieron con animales diabéticos tratados con NGF. Los datos son presentados como media \pm E.E.M. *** $p < 0.001$ comparado con el grupo DM. Tomado y modificado de Kang y cols, 2011.

En el 2011 Chiu y colaboradores investigaron el efecto neuroprotector de Diosgenina en ratones seniles inducidos con D-Galactosa. Observaron que la administración de Diosgenina mejoraba la memoria espacial evaluada en el laberinto acuático de Morris, además de que aumentaba la actividad de enzimas antioxidantes como la Superóxido dismutasa (SOD) y Glutathion peroxidasa (GSH-Px) así como la disminución de la enzima prooxidante Malondialdehído (MDA) (Figura 6).

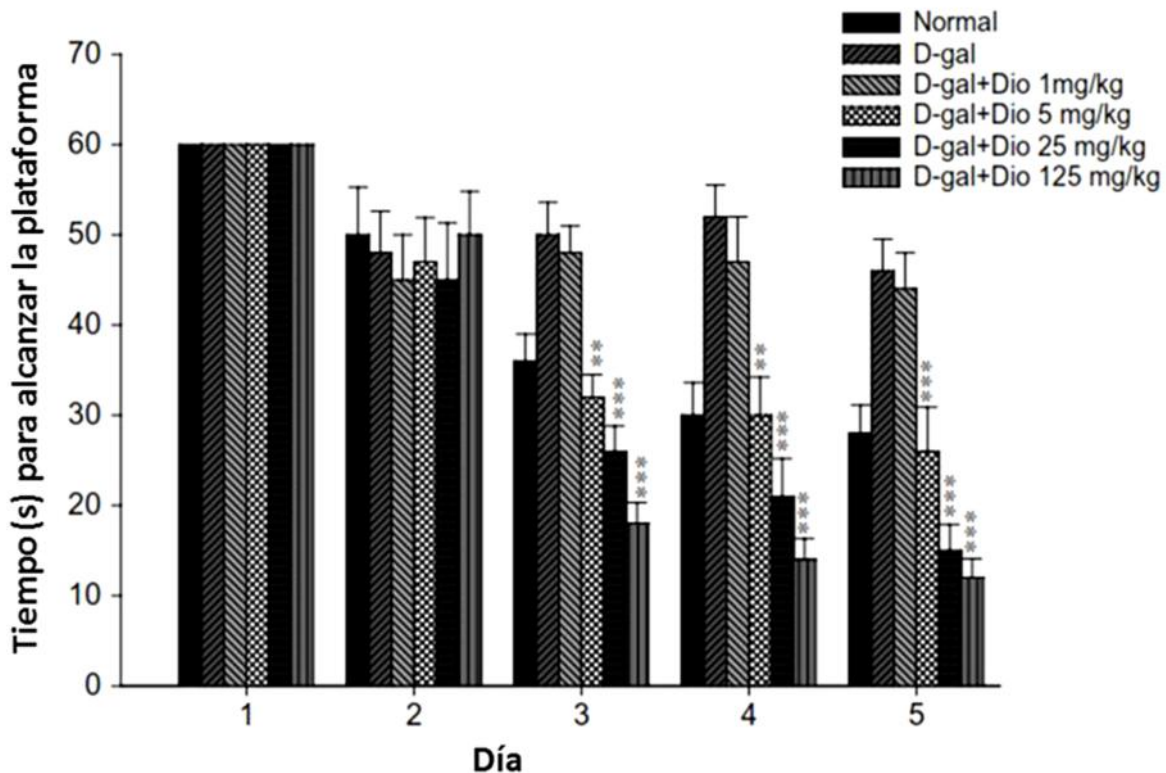


Figura 16. La administración de Diosgenina disminuye el tiempo (seg) para encontrar la plataforma de escape en el laberinto acuático de Morris en ratones seniles, por lo que se concluye que Diosgenina mejora la memoria espacial. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Tomado y modificado de Chiu y cols, 2011.

Por otro lado estudios realizados por Thoda y colaboradores en el 2012 mostraron que la administración crónica de diosgenina vía intraperitoneal mejoraba la memoria de reconocimiento y disminuía los depósitos de proteína Amiloide beta (A β) en corteza cerebral e hipocampo en un modelo de Alzheimer en ratón. Aunado a estos estudios, realizaron pruebas *in vitro* en cultivos primarios de neuronas corticales de ratón donde mostraron que inducía, en neuronas dañadas con A β , el crecimiento y regeneración

axonal a través de la activación del receptor 1-25D₃MARSS desencadenando rutas de señalización como PI3K, MEK, PKC o PKA.

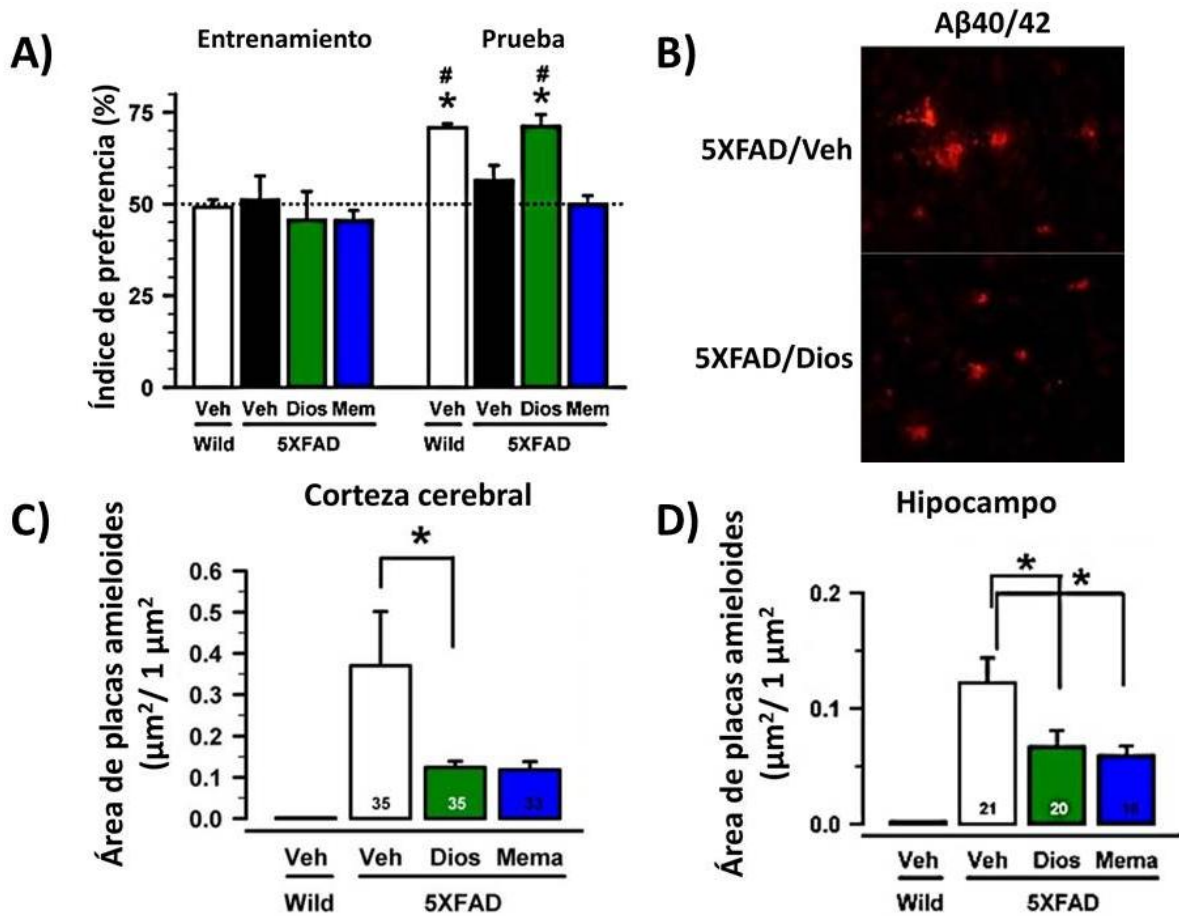


Figura 17. Efecto de la administración crónica por vía intraperitoneal de diosgenina (10 μmol/kg), Memantina (200 μmol/kg) y vehículo en ratón 5XFAD. A) Índice de preferencia en la sesión de entrenamiento y de prueba de reconocimiento de objetos, el tratamiento con diosgenina mejora la memoria de reconocimiento a largo plazo. B) Inmunohistoquímica para placas amiloides, se observa un área mayor marcada correspondiente a las placas amiloides en los animales con Alzheimer, por otro lado esta área disminuye al recibir el tratamiento con Diosgenina. C) y D) La Diosgenina disminuye el área de placas amiloides en la corteza cerebral y en el hipocampo. Tomado y modificado de Thoda y cols, 2012.

Junto con estos estudios, se observó el aumento de la expresión del receptor 1,25D₃-MARSS, el cual se sabe que activa numerosas cascadas de señalización que incluyen la Proteína cinasa C (PKC), la Proteína cinasa A (PKA), la Proteína de respuesta extracelular (ERK) y la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K). Todas estas proteínas juegan un papel fundamental en el mecanismo molecular de la PLP al igual que en la señalización desencadenada por la interacción del NGF y el receptor TrkA (Thoda y cols, 2012)

Debido a los hallazgos obtenidos, realizaron estudios posteriores en ratones sanos evidenciando que la administración crónica de Diosgenina mejoraba la memoria de reconocimiento de objetos y generaba el crecimiento axonal en neuronas, ambos efectos estaban ausentes cuando se administraba un anticuerpo para bloquear el receptor 1,25D₃-MARSS (Figura 18), por lo que se infiere que Diosgenina ejerce sus efectos a través de la activación de dicho receptor. Como se mencionó anteriormente, la señalización del receptor 1,25D₃-MARSS implica proteínas como la PI3K, asociada a la traducción de proteínas, la regeneración axonal y la reorganización del citoesqueleto; la proteína ERK requerida para la formación de axones y la síntesis de proteínas; la proteína PKC que promueve el crecimiento neuronal y la proteína PKA asociada con la extensión axonal. (Thoda y cols 2013).

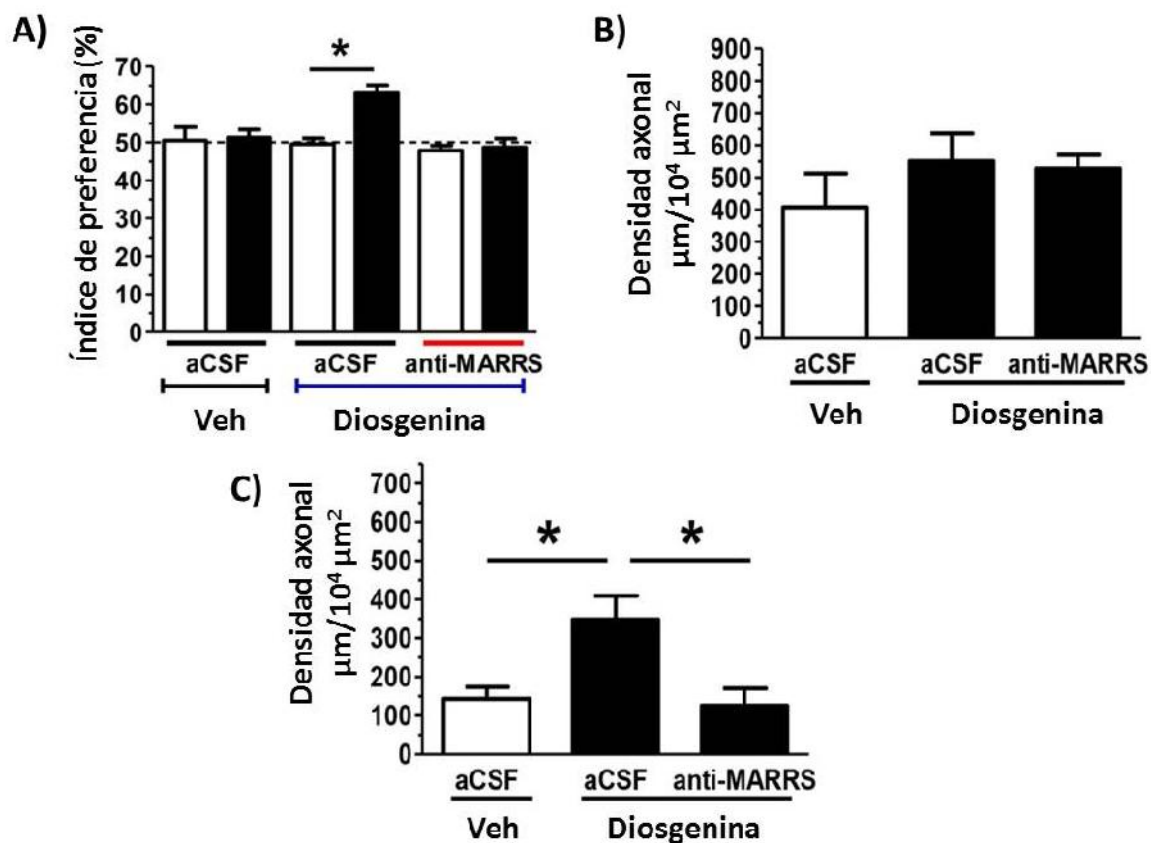


Figura 18. Efecto del bloqueo del receptor 1,25D₃-MARRS sobre los efectos de Diosgenina. A) La infusión crónica del anticuerpo contra 1,25D₃-MARRS en el ventrículo lateral de ratón bloquea la mejora de la memoria, el aumento de la densidad axonal en B) Hipocampo y C) Corteza perirrhinal inducida por la administración de Diosgenina vía intraperitoneal. Tomado y modificado de Thoda y cols, 2013.

1.6 El derivado colestánico BSS-4

Debido a que las sapogeninas esteroidales poseen una amplia variedad de propiedades medicinales, existe un gran interés por la síntesis de compuestos análogos denominados compuestos colestánicos.

El triacetato de 22-oxocolest-5en-3,16,26-triilo (BSS-4) es un derivado colestánico de Diosgenina sintetizado por el equipo de trabajo del Laboratorio de Síntesis y modificación de productos naturales de la Facultad de Ciencias Químicas, BUAP bajo la dirección del Dr. Jesús Sandoval Ramírez. Se obtuvo a partir del tratamiento de Diosgenina con anhídrido acético (Ac₂O) y Eterato de trifluoruro de Boro (BF₃·OET₂) a temperatura de 0 a -5 °C con un rendimiento del 80-85% (Figura 19) (Fernández-Herrera y cols, 2009).

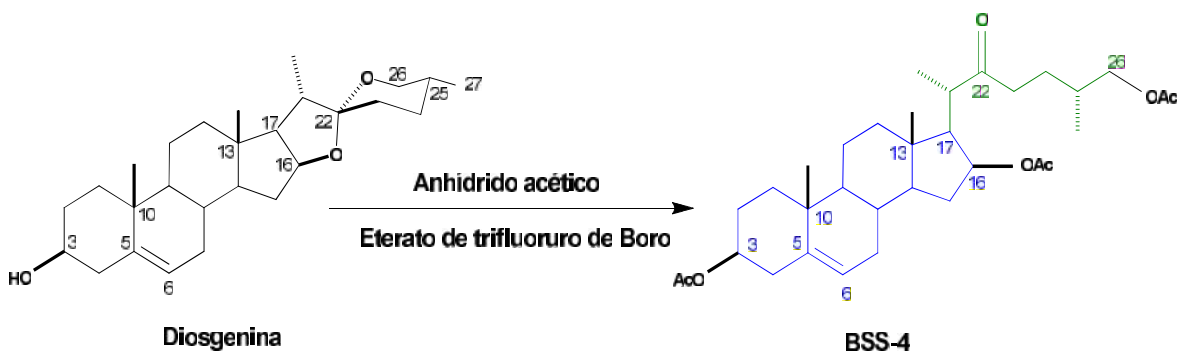


Figura 19. Reacción para la formación de BSS-4. En la estructura se observa el núcleo esteroidal (azul) y la apertura de la cadena lateral espirocetálica (verde), características de un compuesto colestánico. Tomado y modificado de Fernández-Herrera y cols, 2009.

Un estudio realizado por Trejo en el 2013 evidenció que la administración de 1.5 mg/kg de BSS-4 vía intraperitoneal en rata, favoreció el aumento de la longitud dendrítica y del número de dendritas en ratas intactas. Además se observó un efecto neuroprotector en un modelo de lesión excitotóxica.

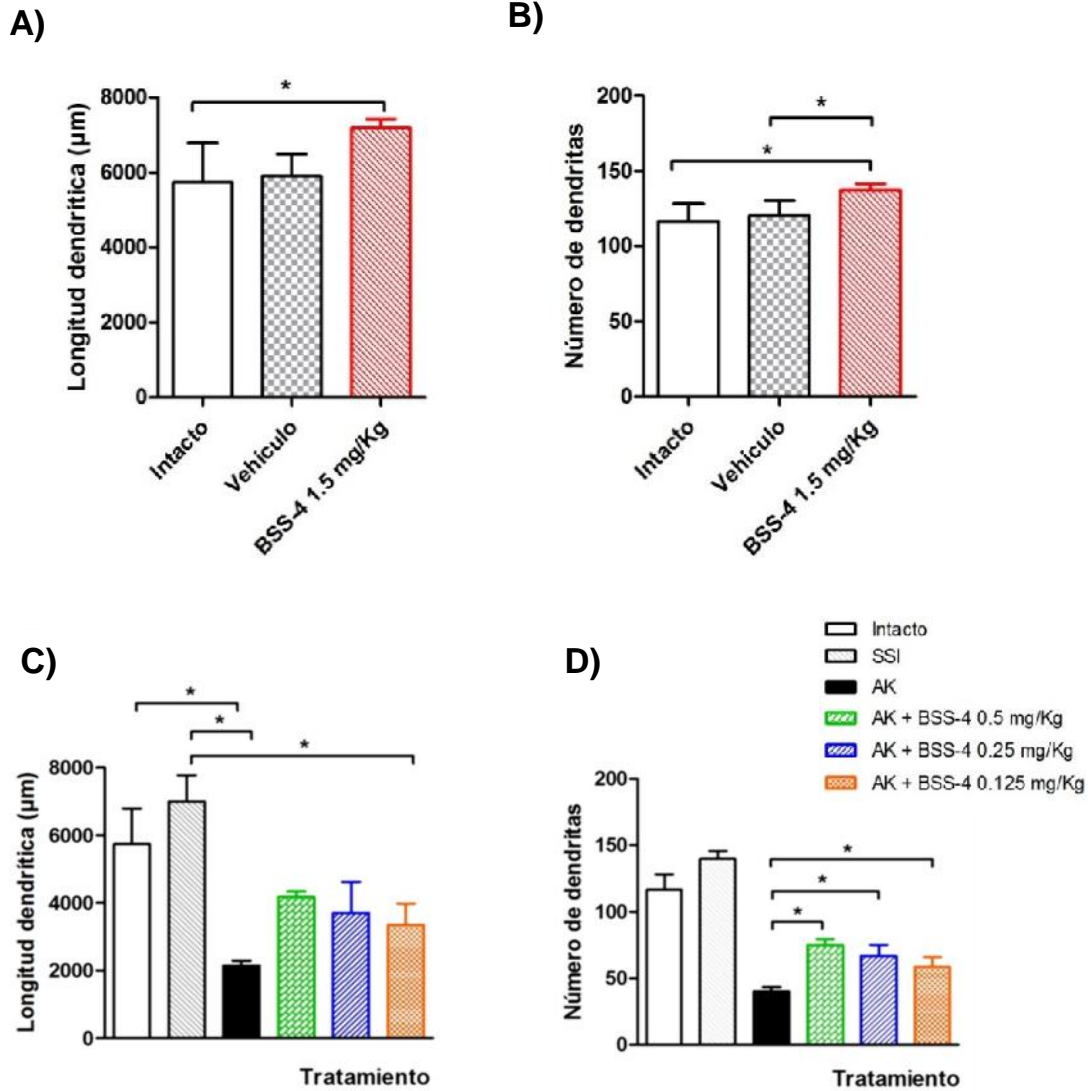


Figura 20. La administración de BSS-4 en dosis de 1.5 mg/kg a ratas hembra de la cepa Wistar vía intraperitoneal ocasionó el aumento en la longitud dendrítica y el número de dendritas (A, ANOVA no paramétrica de Kruskal-Wallis, $*p<0.05$; B, ANOVA paramétrica de una vía post-hoc Tukey $*p<0.05$). La administración de BSS-4 en dosis de 0.5, 0.25 y 0.125 mg/kg a ratas hembra de la cepa Wistar vía intraperitoneal con lesión excitotóxica inducida con ácido kaínico ejerció un efecto neuroprotector (A, ANOVA no paramétrica de Kruskal-Wallis, $*p<0.05$; B, ANOVA paramétrica de una vía post-hoc Tukey $*p<0.05$; Trejo, 2013).

Gil en el 2014 demuestra que la administración crónica de BSS-4 por vía intraperitoneal en dosis de 0.5 y 1 mg/kg mejora la memoria de reconocimiento evaluada en la prueba de reconocimiento de objetos y la memoria espacial evaluada en el laberinto de Barnes; ambos tipos de memoria son ejemplos de memoria episódica pertenecientes a la clasificación de la memoria explícita asociada a estructuras del lóbulo tempomedial de las cuales destaca el hipocampo. En este estudio también se observó el aumento de la actividad de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx) en el hipocampo.

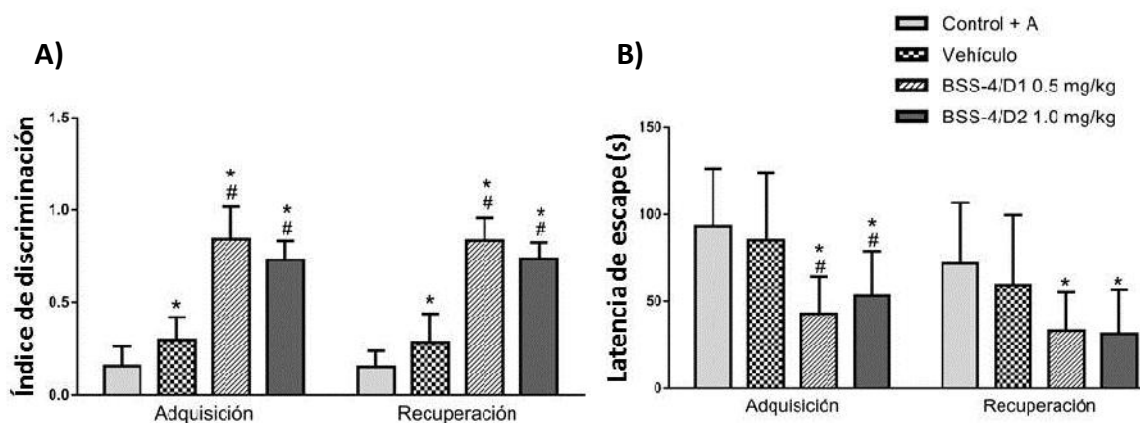


Figura 21. La administración de BSS-4 vía intraperitoneal a ratas hembra de la cepa Sprague Dawley en dosis 0.5 y 1 mg/kg aumentó A) el índice de discriminación evaluado en la prueba de reconocimiento de objetos y B) disminuyó el tiempo de latencia de escape en el laberinto de Barnes. * $p < 0.05$ con respecto al grupo control y # $p < 0.05$ con respecto al grupo vehículo. Tomado y modificado de Gil y cols, 2014.

Estudios posteriores llevados a cabo por Estrella (2015) mostraron que la administración intra-hipocampal del compuesto BSS-4 no mejoraba la adquisición de la información y recuperación de la memoria de largo plazo evaluada en la prueba de reconocimiento de objetos en rata, por lo que se propuso que el posible responsable de dicho efecto neuroprotector fuera un metabolito activo obtenido a partir de la biotransformación del BSS-4.

2. JUSTIFICACIÓN

Se ha demostrado que la Diosgenina mejora el aprendizaje y la memoria en ratones seniles y ratones transgénicos utilizados como modelo de Alzheimer (Tohda y cols, 2012), así mismo hay evidencia de que mejora la conductividad nerviosa en un modelo de neuropatía diabética; por otro lado se comprobó que la administración de Diosgenina en cultivos de astrocitos favorece la secreción del NGF de manera dosis dependiente, por lo que se propone que esta sapogenina esteroideal pudiera ejercer su efecto neuroprotector mediado por la secreción de dicha neurotrofina (Kang y cols, 2011).

En padecimientos o condiciones fisiológicas donde el declive cognitivo es característico, existe disminución de la secreción del NGF, por lo cual la administración sistémica del NGF ha sido considerado como una opción para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, sin embargo la complejidad de la barrera hematoencefálica no permite el paso del factor hacia el SNC, además de que se han observado efectos secundarios como la aparición de hiperalgesia cuando las administraciones son vía intravenosa o subcutánea (Sofroniew y cols, 2011).

Debido a los importantes efectos de la Diosgenina, la síntesis de análogos estructurales y su evaluación experimental es un campo relevante de estudio. Tal es el caso del triacetato de 22-oxocolest-5en-3,16,26-triilo (BSS-4). Se ha observado en estudios previos que esta molécula posee efecto neuroprotector ante lesiones excitotóxicas en el hipocampo de rata así como el aumento de la longitud dendrítica y el número de dendritas en ratas intactas (Trejo, 2013); además de que mejora la adquisición de la información y la recuperación de la memoria a largo plazo evaluada en dos diferentes tareas (Gil, 2014), tales efectos se han observado con dosis menores a las comúnmente usadas con Diosgenina.

Considerando los efectos encontrados con la administración de diosgenina y la relación estructura química-actividad biológica, es posible suponer que el efecto neuroprotector así como de la mejora en la memoria observados con la administración del BSS-4, pudieran estar asociados al aumento de la expresión del NGF, (Birch y cols, 2013) y de su receptor de alta afinidad el TrkA, (Sofroniew y cols, 2011). Por otra parte, es importante destacar que el hipocampo participa en la memoria de reconocimiento la cual tienen como base molecular la PLP (Lynch, 2004).

Por lo antes mencionado, consideramos relevante estudiar el efecto de la administración crónica del BSS-4 sobre la memoria de reconocimiento así como en la expresión del NGF y del receptor TrkA en el hipocampo de ratón.

3. HIPÓTESIS

La administración crónica de BSS-4 por vía intraperitoneal mejora la memoria de reconocimiento y aumenta la expresión del factor de crecimiento neuronal y su receptor de alta afinidad TrkA.

4. OBJETIVO GENERAL

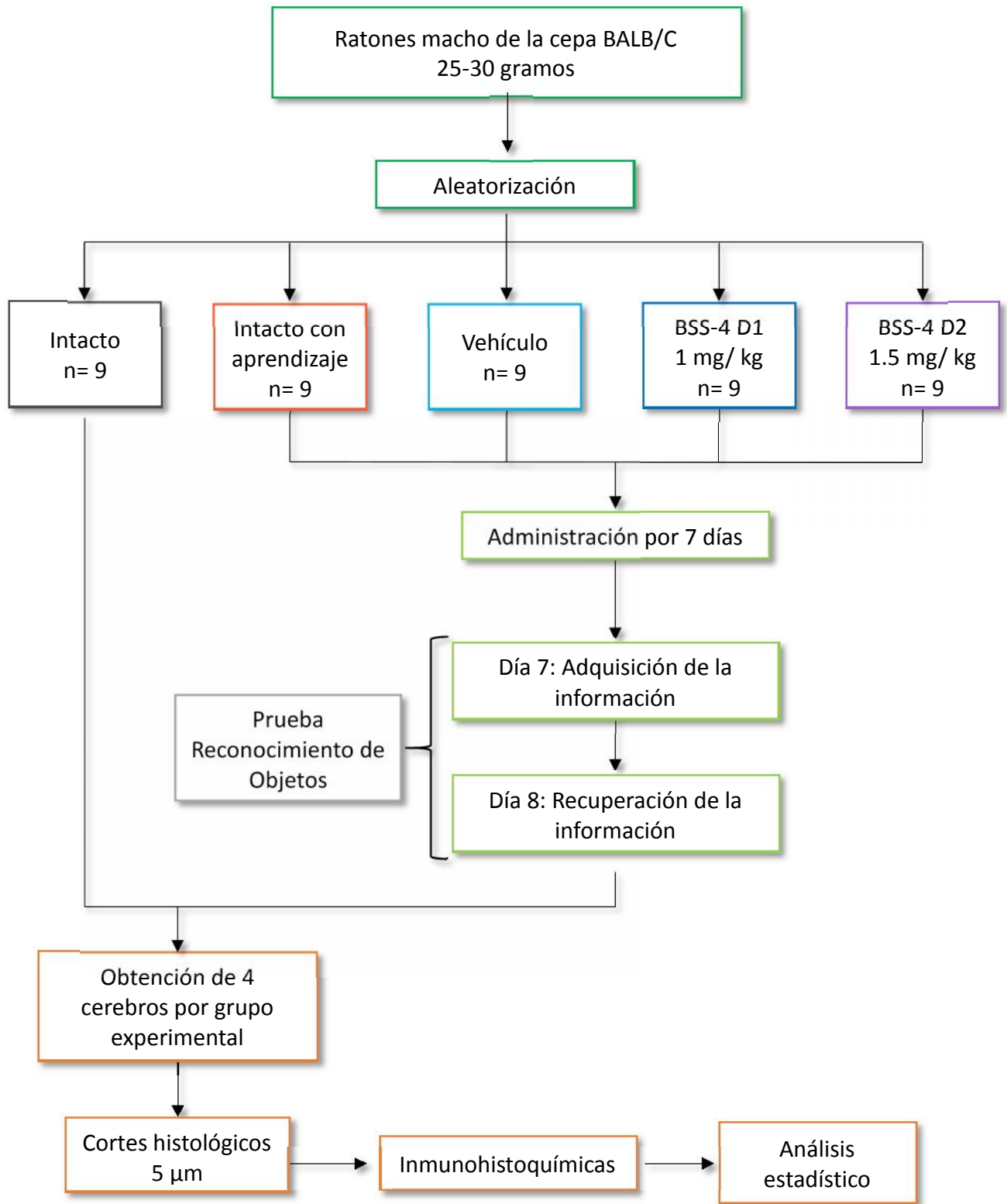
Determinar el efecto de la administración crónica de BSS-4 sobre la memoria de reconocimiento, la expresión del factor de crecimiento neuronal y del receptor TrkA.

4.1 Objetivos particulares

Determinar el efecto de la administración crónica del BSS-4 en dosis de 1 y 1.5 mg/kg sobre la memoria de reconocimiento

Determinar el efecto de la administración crónica del BSS-4 en dosis de 1 y 1.5 mg/kg sobre la expresión del factor de crecimiento neuronal y del receptor TrkA en el hipocampo de ratón.

5. DIAGRAMA DE TRABAJO



6. METODOLOGÍA

6.1 Animales

Los animales que se emplearon en los experimentos fueron ratones de la cepa BALB/c macho adultos provenientes del Bioterio “Claude Bernard” de la BUAP, los cuales fueron alojados en el vivario del Laboratorio de Neuroquímica. El manejo de los animales se llevó a cabo bajo los lineamientos del Reglamento del Comité para el Cuidado y Uso de los Animales del Laboratorio de la BUAP (2007), el cual establece el cumplimiento de la Norma Oficial Mexicana (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, 2001) “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio” (NOM-062-ZOO-1999). Los animales se mantuvieron en cajas individuales de plástico, agua y alimento *ad libitum*, con ciclos de luz-oscuridad de 12/12 h, temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, y con humedad relativa de $50 \pm 5\%$.



Figura 22. Vivario del laboratorio de Neuroquímica

Los animales fueron aleatorizados para formar los grupos experimentales, se repartieron nueve animales en cada grupo. Los grupos formados fueron: intacto, intacto+aprendizaje, vehículo, BSS-4 en dosis 1 mg/kg y BSS-4 en dosis 1.5 mg/kg.

6.2 Preparación del BSS-4

Se preparó una solución madre a una concentración de 1mg/2ml. El vehículo consistió en una mezcla de 1ml de solución de buffer de fosfatos (PBS) a pH 7.4 y 1ml de agua desionizada. Las soluciones se almacenaron a 4°C . La osmolaridad de la solución de BSS-4 fue de 301 mOsm/l.

6.3 Administración crónica del BSS-4

Los animales fueron aleatorizados para la formación de los grupos experimentales. En trabajos realizados anteriormente en el laboratorio de neuroquímica, se ha observado que dosis mayores a 2 mg/kg en rata, provocaba dolor abdominal, por lo que para este trabajo se emplearon las dosis de 1 y 1.5 mg/kg, sin olvidar que el metabolismo del ratón es más rápido que el de la rata y pudiesen tomarse en cuenta dosis mayores, sin embargo, se consideró que las dosis propuestas son aceptables, dado que se han encontrado resultados prometedores con éstas. Estudios previos han mostrado que el tratamiento durante siete días con Diosgenina genera resultados positivos, por otro lado, estudios previos llevados a cabo en el laboratorio han mostrado que se observan efectos con una sola administración de BSS-4, por lo que se eligió un tratamiento crónico de BSS-4 durante siete días consecutivos.

6.4 Prueba de Reconocimiento de objetos

La prueba se llevó a cabo en una caja de acrílico negro con dimensiones de 30x55x60 cm. Antes de la sesión de entrenamiento, los animales fueron sometidos a una fase de habituación en la que cada ratón exploró libremente durante 10 minutos el interior de la caja para permitirle familiarizarse con la zona de trabajo.



Figura 23. Caja de acrílico para la prueba de reconocimiento de objetos

La sesión de entrenamiento se dividió en tres fases, en la primera fase (F1) el ratón se colocó enfrente de dos objetos idénticos dentro de la caja y se le permitió la exploración durante 5 minutos, una vez terminado el tiempo, el animal regresó a su caja de cautiverio. En la segunda fase (F2), el ratón se colocó nuevamente en la caja de

observación la cual contenía dos objetos; uno de ellos nuevo y el otro uno de los objetos previamente presentados, el tiempo asignado en esta fase fue de 5 minutos. Una vez cumplido el tiempo, el animal regresó a su caja de alojamiento donde permaneció un tiempo determinado para posteriormente realizar un reforzamiento de la F2 (F3) con un objeto familiar y un objeto novedoso, el tiempo entre las sesiones fue de 10 min. En cada fase se cuantificó el tiempo en segundos que el animal exploraba el objeto nuevo y el objeto viejo.

Veinticuatro horas después de la sesión de adquisición, se realizó la segunda y tercera fase siguiendo el mismo procedimiento anteriormente descrito. Se cuantificó el tiempo que el ratón exploró cada uno de los objetos presentados durante 5 minutos.

Con los tiempos registrados, se determinaron los Índices de discriminación (ID) a partir de la siguiente fórmula:

$$ID = \frac{T_N - T_V}{T_N + T_V}$$

Donde T_N corresponde al tiempo que el animal pasó explorando el objeto nuevo, y T_V el tiempo de exploración del objeto viejo ambos en segundos. El índice de discriminación abarcará valores que van desde -1 (cuando exista preferencia hacia el objeto familiar) y 1 (preferencia hacia el objeto novedoso).

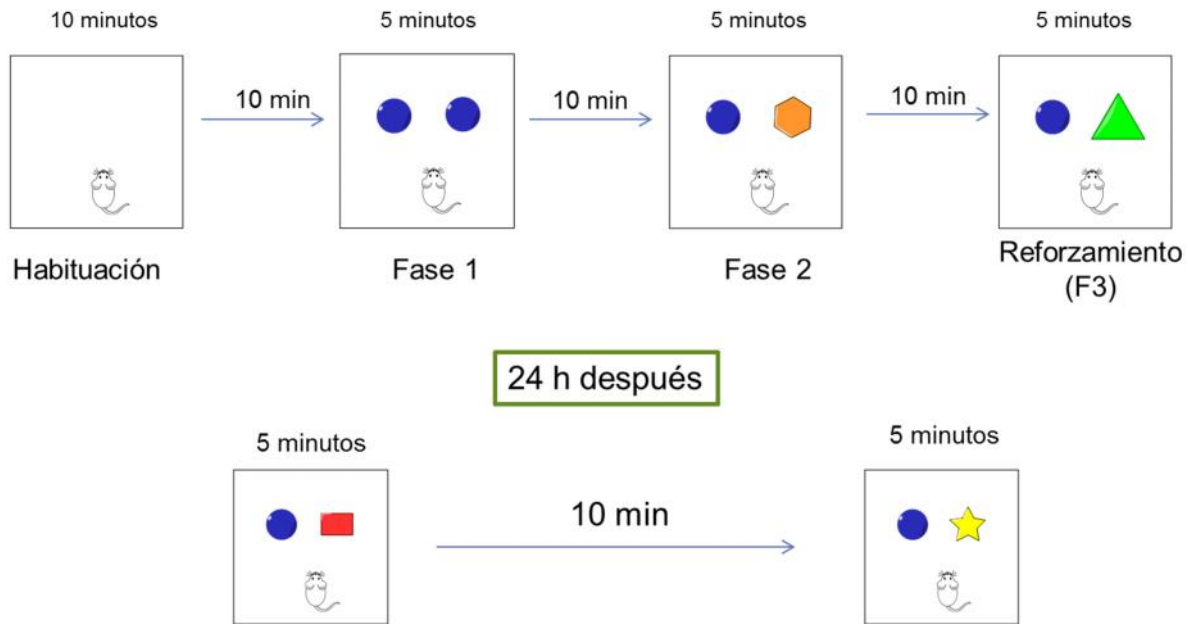


Figura 24. Protocolo seguido para la prueba de reconocimiento de objetos

En la figura 24 se representa de manera esquemática el protocolo que se siguió para la prueba de reconocimiento de objetos. Durante la fase 2 y la fase de reforzamiento, se cuantificó el tiempo en segundos que el animal dedicaba a explorar el objeto nuevo y el objeto viejo. Veinticuatro horas después de la sesión de entrenamiento se evaluó la memoria de reconocimiento mediante dos pruebas de 5 minutos cada una con un espacio de 10 minutos entre ellas, en ambas pruebas se cuantificó el tiempo en segundos que el animal dedicó a la exploración del objeto viejo y el objeto novedoso. Los datos recolectados se utilizaron para determinar los índices de discriminación en la adquisición de la información (Fase 2 y reforzamiento) y la recuperación de la información (24 horas después).

6.5 Obtención e inclusión de cerebros

Una vez terminadas las pruebas conductuales, los ratones se anestesiaron con Pentobarbital sódico a una dosis de 40 mg/kg vía intraperitoneal, posteriormente fueron perfundidos vía intracardiaca con Paraformaldehído al 4% en PBS durante 8 minutos, posteriormente se obtuvieron los cerebros y se mantuvieron en Paraformaldehído al 4% en PBS durante 24 h. Al día siguiente los cerebros fueron deshidratados sumergiéndolos en etanol a concentraciones crecientes desde etanol al 50% hasta etanol absoluto, una hora cada cambio; en seguida se aclararon con 2 cambios en xilol, una solución miscible

en alcohol y parafina, por lo que se facilita su entrada al tejido previamente deshidratado permitiendo posteriormente la entrada de la parafina, se le denomina aclaramiento ya que el tejido se torna transparente. La inclusión en parafina se realiza a 55°C durante dos horas para proveerle soporte al tejido, posteriormente se formaron bloques que sirvieron para la obtención de cortes de 5 µm de espesor con un microtomo de deslizamiento Leica modelo SM2010 R, los cortes fueron montados en portaobjetos gelatinizados al 3%.

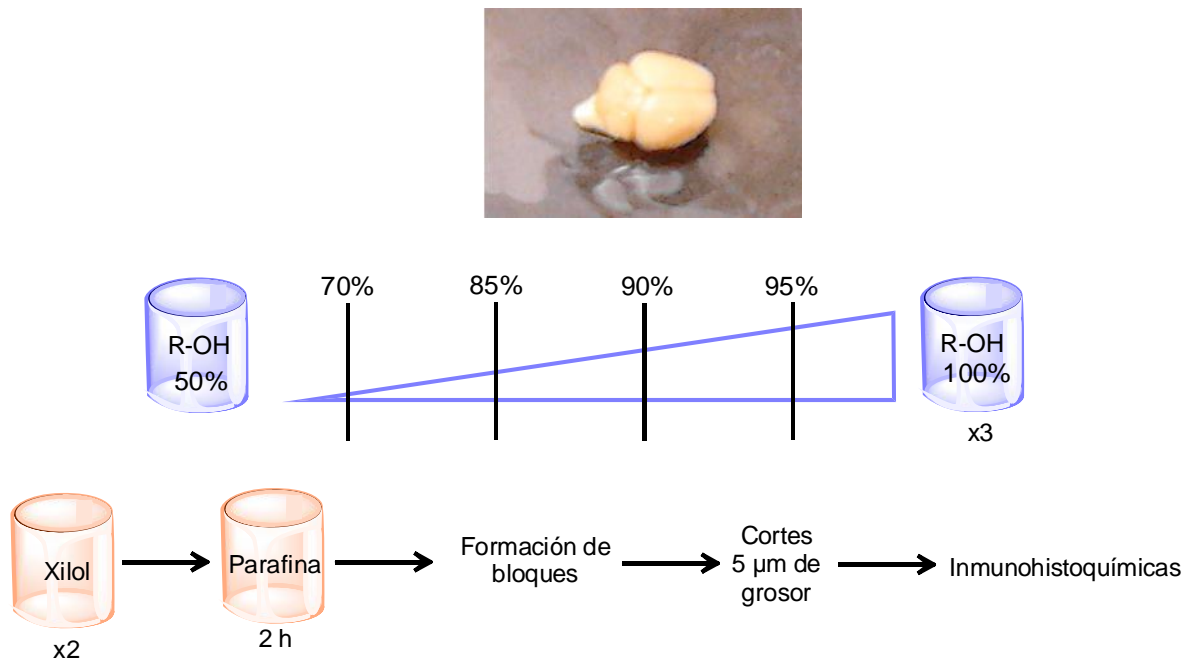


Figura 25. Protocolo de deshidratación e inclusión en parafina de los cerebros obtenidos. Se muestra fotografía de un cerebro de ratón. La deshidratación se realizó con cambios en alcohol a concentraciones crecientes, aclaramiento con Xilol y posteriormente la inclusión en parafina. Se formaron bloques para obtener cortes de 5 µm de grosor los cuales fueron sometidos a las pruebas Inmunohistoquímicas.

6.6 Técnica Inmunohistoquímica para la detección del factor de crecimiento neuronal y del receptor TrkA

Se seleccionaron cuatro cerebros al azar de cada uno de los grupos y de cada cerebro se seleccionaron cuatro cortes al azar para el análisis del hipocampo. El procesamiento de los tejidos consistió en desparafinizar las muestras pasando los tejidos por Xilol, Etanol-Xilol en partes iguales y posteriormente por alcoholes de concentraciones decrecientes hasta llegar a agua destilada, en seguida se incubaron en buffer de fosfatos (PBS) pH 7.4 por 5 minutos, la recuperación antigénica se realizó con buffer de citratos 10 mM pH 6 en baño María a 55°C por 20 minutos, transcurrido el tiempo se dejaron enfriar los cortes y posteriormente se permeabilizaron con PBS-Tritón-100x al 2% por 10

minutos. Para el bloqueo del marcaje inespecífico se utilizó albúmina bovina libre de IgG al 0.5% en PBS-T por 5 minutos. Se realizó la incubación con el anticuerpo primario contra NGF (Santa Cruz Biotechnology, INC, NGF (E-12): sc-365944; dilución 1:50) y TrkA (Santa Cruz Biotechnology, INC; Trk A (763): sc-118, dilución 1:50) por 20 horas en cámara húmeda oscura cerrada a 4°C, se realizaron lavados con PBS-T y posteriormente la incubación con el anticuerpo secundario acoplado al fluorocromo Isotiocianato de Fluoresceína (Santa Cruz Biotechnology, INC; goat anti-IgG-FITC: sc-2456, dilución 1:200) por 2 horas a temperatura ambiente, en cámara húmeda y protegida de la luz, se lavaron con PBS-T y PBS para posteriormente teñir los núcleos con Ioduro de Propidio (dilución 1:1000), el cual es un fluorocromo que se adhiere a los ácidos nucleicos por lo que se utiliza para teñir los núcleos; después de realizar lavados con PBS y PBS-T se cubrieron los tejidos con Vecta Shield y se observaron al microscopio de fluorescencia Leica DM 1000 LED con cámara integrada Capture Pro para Prog Res (C14 plus) y el software de captura versión 2.8.8., el filtro rojo se utilizó para observar los núcleos, mientras que el verde para evidenciar el marcaje de la proteína de interés (NGF o TrkA). Se capturaron fotografías de las regiones CA1, CA2 y CA3 del hipocampo a una magnificación de 40x. Las fotografías se analizaron con el programa NIH Image J.

6.7 Análisis estadístico

Los resultados conductuales mostraron una distribución normal, por lo que fueron analizados con ANOVA de medidas repetidas, seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey para determinar diferencias significativas entre los grupos. Se aceptaron diferencias significativas cuando el valor de p fue menor o igual a 0.05. La comparación de los valores de ID entre la sesión de adquisición y recuperación de cada grupo se llevó a cabo con una t de Student, se aceptaron diferencias significativas cuando el valor de p fue menor o igual a 0.05. En cuanto a los datos obtenidos del análisis de las fotografías de las pruebas Inmunohistoquímicas fueron sometidos a la prueba de ANOVA de Friedman, seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn, se aceptaron diferencias significativas cuando el valor de p fue menor o igual a 0.05, para las comparaciones de la densidad de fluorescencia del NGF con el TrkA en cada región se aplicó la prueba de Prueba U de Mann-Whitney, se aceptaron diferencias significativas cuando el valor de p fue menor o igual a 0.05.

7. RESULTADOS

7.1 Efecto de la administración de BSS-4 sobre el aprendizaje y la memoria evaluados en la prueba de reconocimiento de objetos

La sesión de entrenamiento de la prueba de reconocimiento de objetos se realizó el séptimo día media hora después de la última administración de los tratamientos dependiendo del grupo al cual pertenecía el animal, 24 horas después de la sesión de entrenamiento se evaluó la recuperación de la memoria.

El primer parámetro que se evaluó fue el índice de discriminación (ID) el cual puede poseer un valor en un rango de -1 a +1; los valores negativos indican que el sujeto experimental dedicó más tiempo a explorar el objeto familiar, los valores positivos indican una mayor exploración del objeto novedoso. Cuando el valor del ID es de 0, significa que no hubo diferencias en el tiempo de exploración entre el objeto nuevo y el objeto viejo.

Durante la sesión de adquisición se evaluó el ID en la Fase 2 y la Fase 3 (reforzamiento) (Figura 24), se observó que los animales tratados con BSS-4 en dosis de 1.5 mg/kg presentaron un índice de discriminación aproximadamente tres veces mayor que el ID del grupo vehículo+aprendizaje y del grupo Intacto+aprendizaje, dicha diferencia es estadísticamente significativa tanto con el grupo Vehículo ($***p<0.001$) como con el grupo Intacto+aprendizaje ($**p<0.01$). En el grupo BSS-4 en dosis 1 mg/kg se observa que el ID es dos veces mayor que el ID de los grupos Vehículo e Intacto+aprendizaje, sin embargo al aplicar la prueba estadística no se observan diferencias significativas. Entre los valores del ID del grupo Intacto+aprendizaje y del grupo Vehículo no se observan diferencias estadísticamente significativas (Figura 26).

En la sesión de recuperación de información se evaluó la memoria a largo plazo. Esta sesión consistió en dos ensayos por animal para determinar el índice de discriminación. Los datos obtenidos nos muestran que el ID del grupo BSS-4 1.5 mg/kg es aproximadamente dos veces mayor que el grupo Intacto+aprendizaje y Vehículo, al comparar los datos estadísticamente se observan diferencias significativas tanto con el grupo Intacto+aprendizaje ($**p<0.01$) y como con el grupo vehículo+aprendizaje ($**p<0.01$). En el grupo BSS-4 en dosis 1mg/kg el ID no presenta un aumento estadísticamente significativo al compararlo con el grupo Vehículo e Intacto+aprendizaje, ya que el valor de su ID sólo aumentó una unidad con respecto a los grupos controles. No

existen diferencias significativas entre el grupo Intacto+aprendizaje y Vehículo, siendo los ID de 0.298 y 0.302 respectivamente (Figura 26).

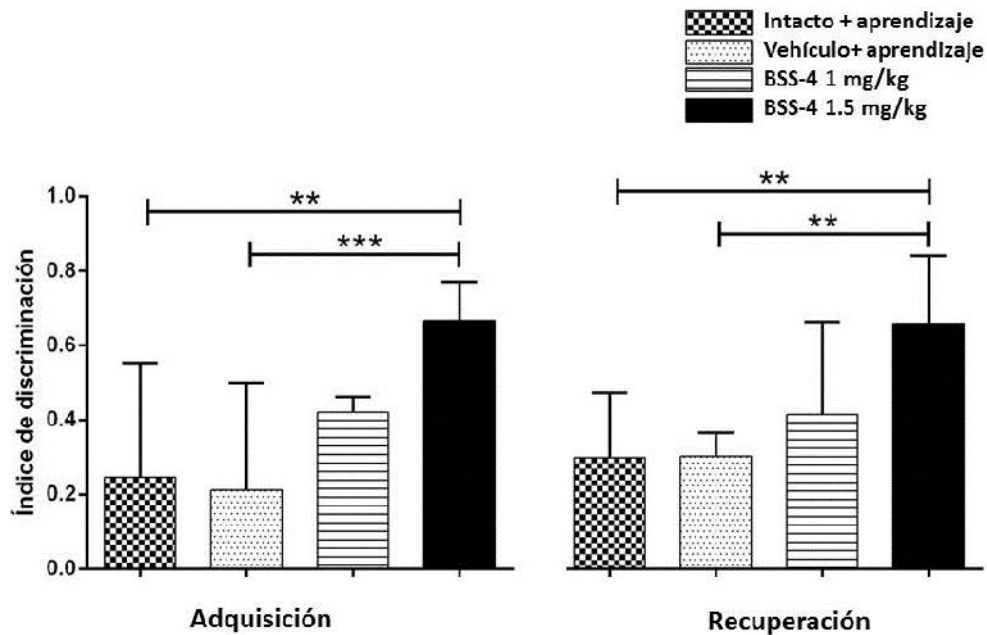
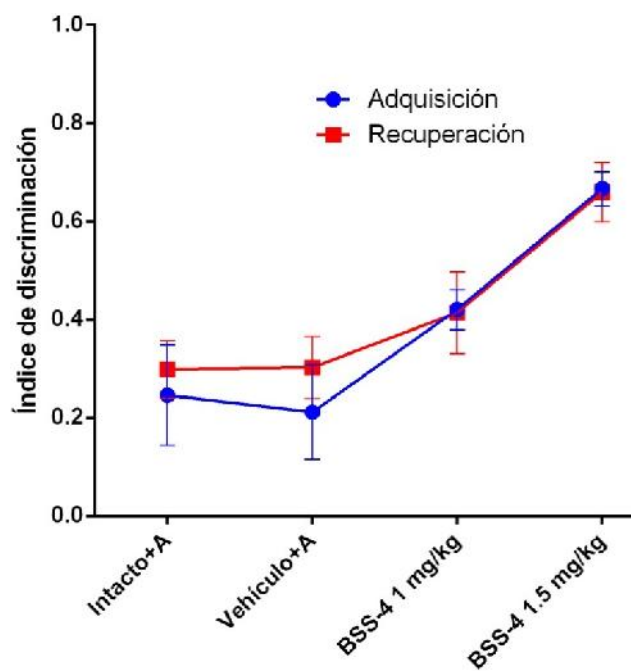


Figura 26. La administración crónica de BSS-4 mejora la adquisición y facilita la recuperación de la memoria de largo plazo. En la gráfica se observa que en la sesión de entrenamiento, el índice de discriminación (ID) es mayor en el grupo al que se le administró BSS-4 en dosis de 1.5 mg/kg con respecto al grupo intacto y el grupo vehículo. Se observa un comportamiento similar en la sesión de recuperación de la memoria. El aumento del ID observado en el grupo BSS-4 en dosis 1mg/kg, no es significativamente diferente. Las barras muestran el valor de las medias \pm DE (n=9). ANOVA de medidas repetidas y prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***).

Se analizaron los ID de la sesión de adquisición y se compararon contra los datos obtenidos en la sesión de recuperación de información. En cada grupo experimental los valores del ID de cada sesión se compararon estadísticamente por medio de una t de Student. La gráfica de dispersión (Figura 27) nos permite observar el rendimiento de los animales tratados con BSS-4 en ambas dosis. Tanto en la sesión de adquisición como la de recuperación de la información se observa un mejor rendimiento en los animales que recibieron la dosis de 1.5mg/kg. No se observaron diferencias significativas en ninguno de los grupos. En la gráfica se observa que los valores de ID en la sesión de adquisición de los grupos Vehículo e intacto+aprendizaje son ligeramente mayores que el ID de la sesión de recuperación, sin embargo esta diferencia no es estadísticamente significativa.



GRUPO EXPERIMENTAL	ÍNDICE DE DISCRIMINACIÓN	
	ADQUISICIÓN	RECUPERACIÓN
Intacto+aprendizaje	0.246	0.298
Vehículo+aprendizaje	0.211	0.302
BSS-4 1mg/kg	0.420	0.414
BSS-4 1.5 mg/kg	0.666	0.659

Figura 27. Gráfica de dispersión que muestra el comportamiento de los animales en la sesión de Adquisición y recuperación de la información de la prueba de reconocimiento de objetos. Se observa el aumento del índice de discriminación en los animales tratados con BSS-4 en dosis de 1 mg/kg y 1.5 mg/kg en ambas sesiones. Se aplicó *t* de Student para comparar los valores de ID de la sesión de adquisición contra el ID en la sesión de recuperación de cada grupo. No existen diferencias significativas en ninguno de los grupos.

7.2 Efecto de la administración crónica de BSS-4 sobre la expresión del NGF

De cada uno de los 5 grupos experimentales se seleccionaron cuatro animales al azar y se obtuvieron los cerebros, los cuales fueron procesados e incluidos en parafina para hacer cortes histológicos de 5 μm de grosor. De cada cerebro se seleccionaron cuatro cortes al azar que se emplearon para las pruebas Inmunohistoquímicas. En la Figura 28 se muestran los datos de un grupo.

Cerebros	Cortes	Fotografías		
		CA1	CA2	CA3
4	16	128	32	96

Figura 28. Resumen del número de fotos obtenidas por grupo experimental. Se muestra el número de fotos obtenidas por cada región del hipocampo.

El análisis del NGF fue realizado para determinar si existe alguna relación entre la expresión de esta proteína con la mejora del aprendizaje y la memoria, dado que se ha reportado en estudios anteriores que el aumento de la concentración de éste en el hipocampo mejora la memoria de reconocimiento.

Debido a que se ha reportado que la expresión del NGF depende de la actividad neuronal, fue necesario introducir un grupo intacto sin aprendizaje para descartar un resultado falso positivo debido a la prueba de aprendizaje y memoria a la cual fueron sometidos los animales. Se cuantificó la expresión del NGF en dicho grupo y se comparó con la expresión en el grupo Intacto más aprendizaje.

En la región del CA1 no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos, de igual forma no se encontraron diferencias estadísticas significativas al comparar con el grupo Vehículo. En el grupo BSS-4 1mg/kg la expresión del NGF es aproximadamente cinco veces mayor que el grupo Intacto ($****p$ 0.0001) y tres veces mayor que los grupos Intacto+aprendizaje y Vehículo ($****p$ 0.0001). Mientras en el grupo BSS-4 en dosis de 1.5 mg/kg la expresión del NGF es aproximadamente trece veces mayor que el grupo Intacto, siete veces mayor que los grupos Intacto+aprendizaje y Vehículo, y aproximadamente 3 veces mayor que el grupo BSS-4 en dosis de 1 mg/kg ($****p$ 0.0001) (Figura 29).

En la región del CA2 no se presentan diferencias significativas en la expresión del NGF entre el grupo Intacto e Intacto+aprendizaje. Por otro lado, la expresión en el grupo

Vehículo es significativamente dos veces mayor con respecto al grupo Intacto (*p 0.05) sin mostrar diferencias significativas respecto al grupo Intacto+aprendizaje. La expresión en el grupo BSS-4 en dosis 1mg/kg es cuatro veces mayor a comparación del grupo Intacto y tres veces respecto al grupo Intacto+aprendizaje (****p 0.0001) mientras que con respecto al grupo Vehículo es aproximadamente el doble (*p 0.05). En el grupo BSS-4 en dosis 1.5 mg/kg la expresión del NGF es nueve veces mayor que el grupo Intacto, siete veces mayor que el grupo Intacto+aprendizaje y cuatro veces mayor que el grupo Vehículo (****p 0.0001). A pesar de que la expresión del NGF en el grupo BSS-4 1.5 mg/kg es el doble de la expresión en el grupo BSS-4 1mg/kg, al aplicar la prueba estadística no se presentaron diferencias significativas (Figura 30).

En la región CA3 del hipocampo, no existen diferencias significativas en la expresión del NGF entre los grupos Intacto e Intacto+aprendizaje. En el grupo Vehículo es tres veces mayor que el grupo Intacto (**p 0.001) sin observarse diferencias con el grupo Intacto+aprendizaje, mientras que en el grupo BSS-4 1mg/kg la expresión es aproximadamente cuatro veces mayor que el grupo Intacto (****p 0.0001), dos veces mayor que el grupo Intacto+aprendizaje (**p 0.01) y casi el doble que el grupo Vehículo (**p 0.01). En el grupo BSS-4 en dosis 1.5 mg/kg la expresión del NGF es ocho veces mayor que el grupo Intacto (****p 0.0001), cinco veces mayor que el grupo Intacto+aprendizaje y tres veces más que el Vehículo (****p 0.0001). La expresión en el grupo BSS-4 1.5 mg/kg es poco más del doble con respecto al grupo BSS-4 en dosis 1mg/kg (****p 0.0001) (Figura 31).

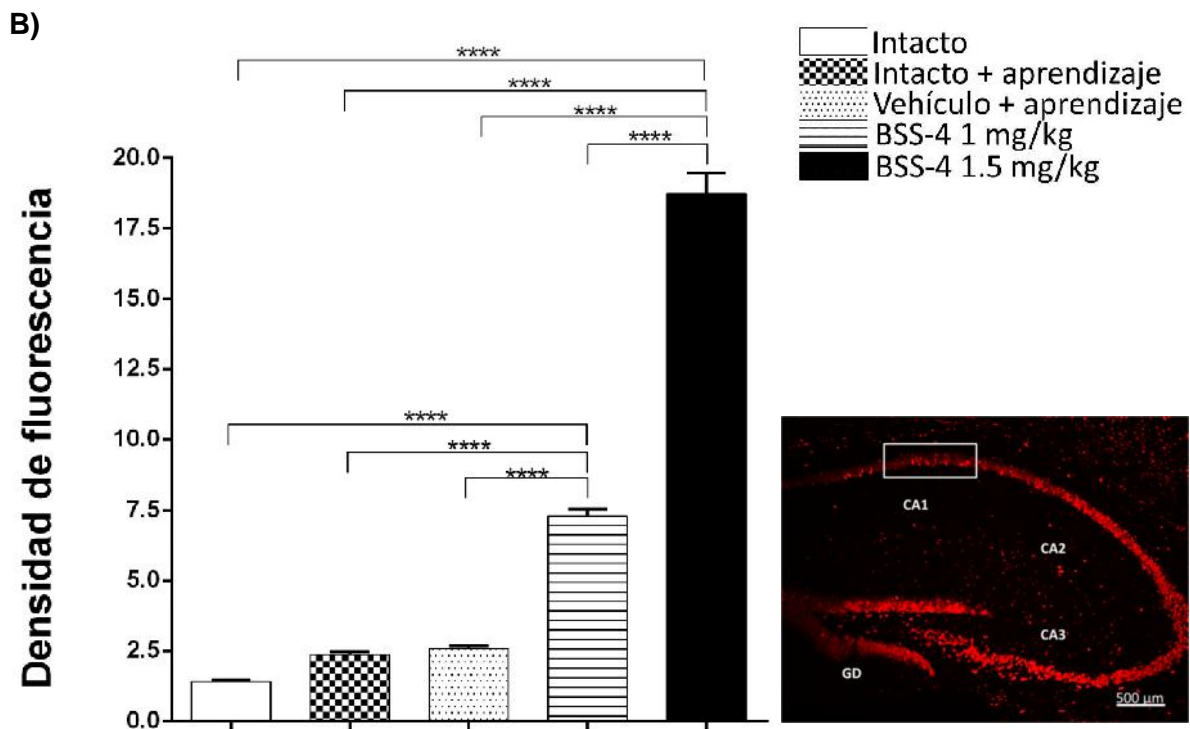
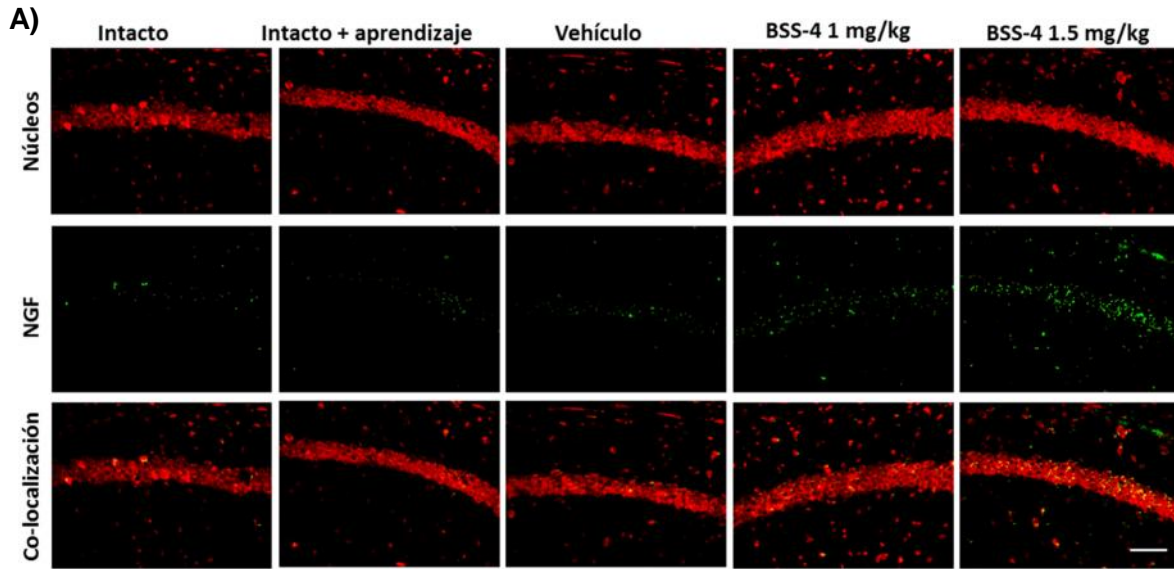


Figura 29. La administración crónica del BSS-4 aumenta la expresión del NGF. A) Se muestran fotografías representativas de las inmunohistoquímicas para el NGF de la región CA1 del hipocampo izquierdo. Barra de escala correspondiente a 50µm. B) El marcaje positivo fue cuantificado como densidad de fluorescencia con el programa ImageJ. Se observa el aumento de la expresión del NGF en los grupos tratados con BSS-4. Las barras muestran el valor de las medias \pm EEM (n=4). Prueba de ANOVA de Friedman post hoc comparaciones múltiples de Dunn (p 0.0001 ****). Los valores se encuentran en una escala de 1×10^5 .

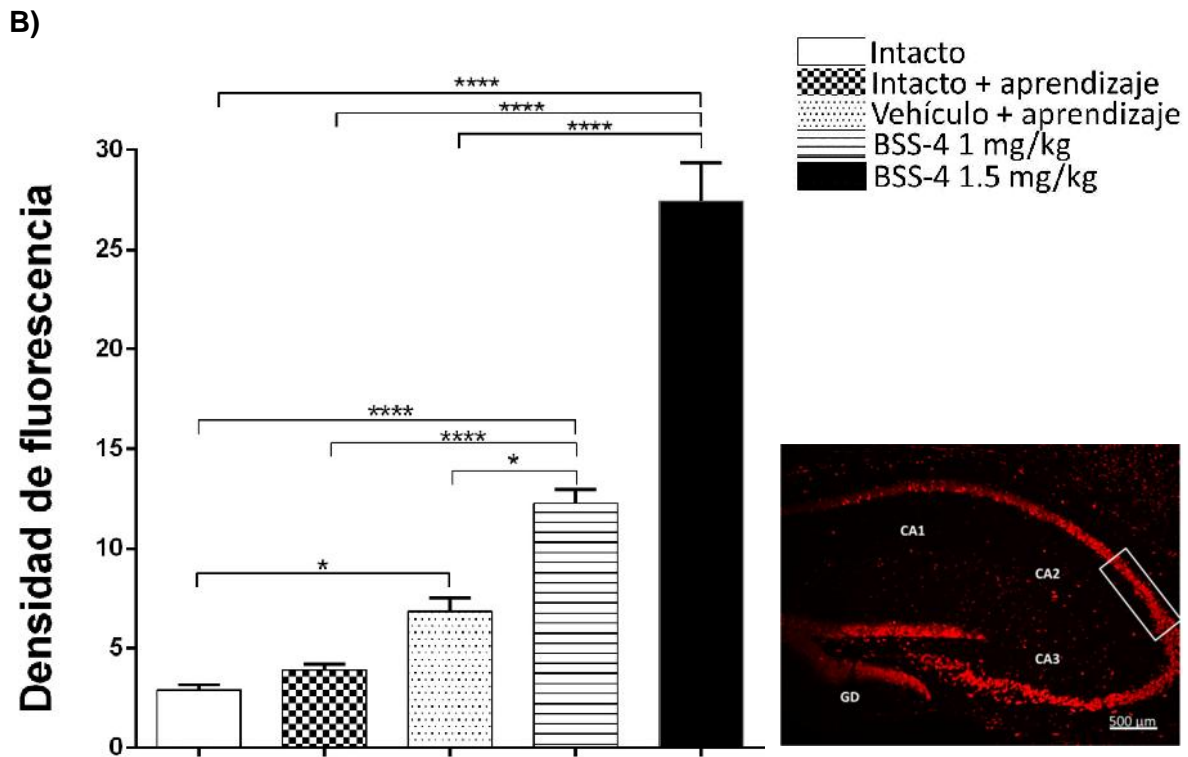
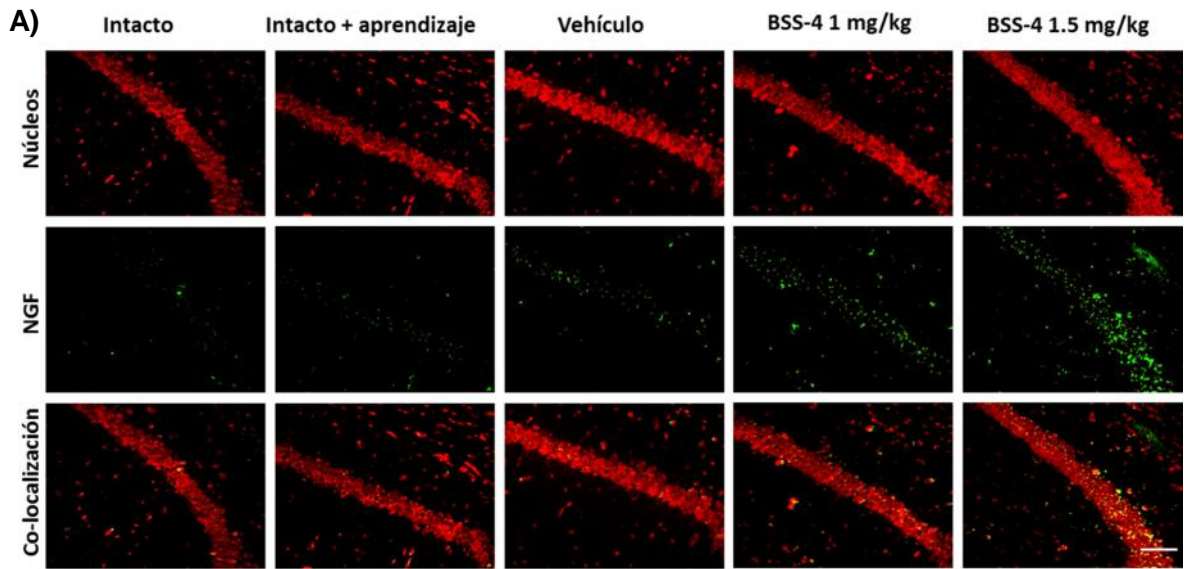


Figura 30. La administración crónica del BSS-4 aumenta la expresión del NGF. A) Se muestran fotografías representativas de las inmunohistoquímicas para el NGF de la región CA2 del hipocampo izquierdo. Barra de escala correspondiente a 50 μ m. B) El marcaje positivo fue cuantificado como Densidad de fluorescencia con el programa ImageJ. Se observa el aumento de la expresión del NGF en los grupos tratados con BSS-4. Las barras muestran el valor de las medias \pm EEM (n=4). Prueba de ANOVA de Friedman post hoc comparaciones múltiples de Dunn (* p 0.05, **** p 0.0001). Los valores se encuentran en una escala de 1×10^5 .

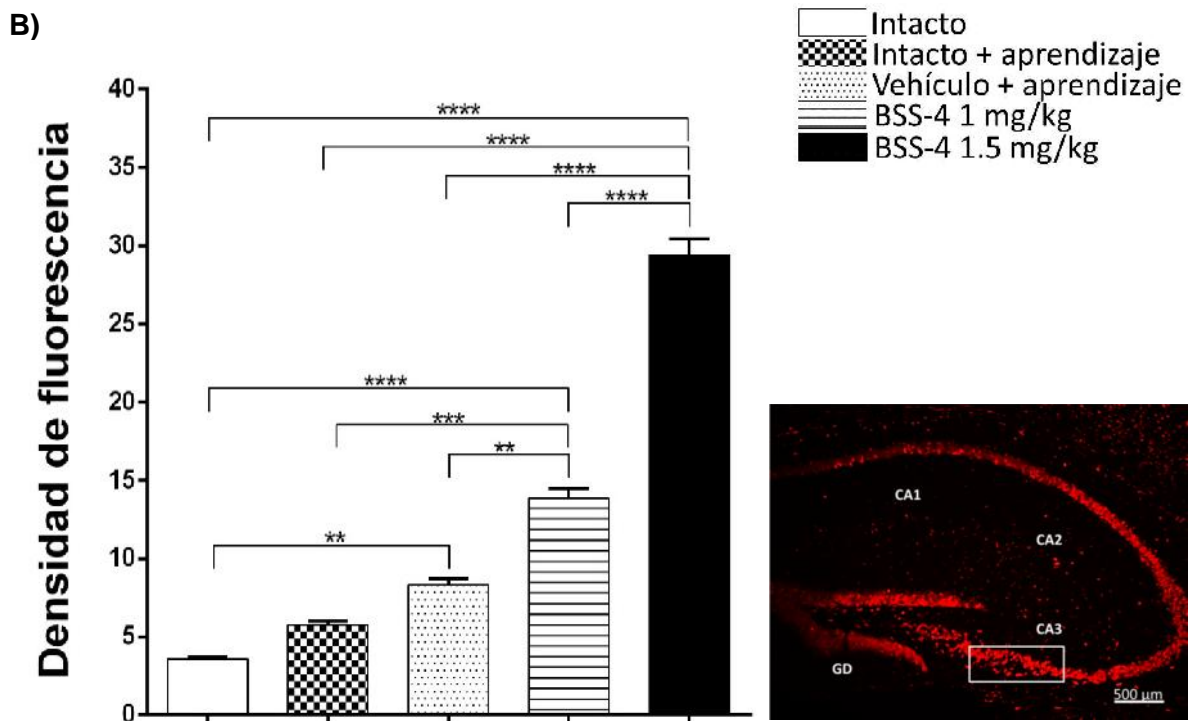
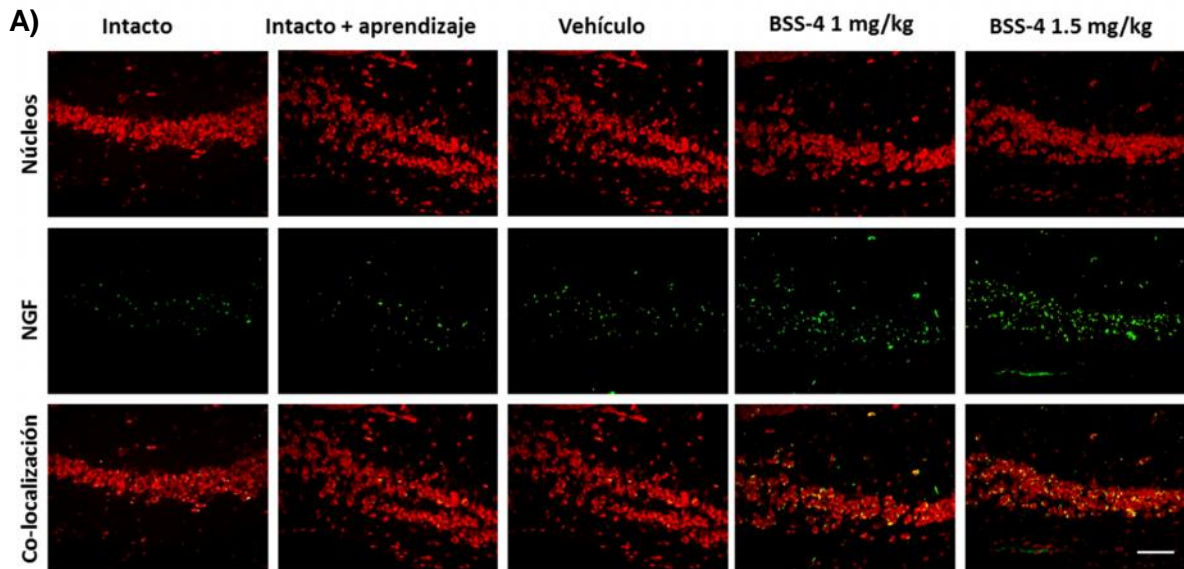


Figura 31. La administración crónica del BSS-4 aumenta la expresión del NGF. A) Se muestran fotografías representativas de las inmunohistoquímicas para el NGF de la región CA3 del hipocampo izquierdo. Barra de escala correspondiente a 50 μ m. B) El marcaje positivo fue cuantificado como Densidad de fluorescencia con el programa ImageJ. Se observa el aumento de la expresión del NGF en los grupos tratados con BSS-4. Las barras muestran el valor de las medias \pm EEM (n=4). Prueba de ANOVA de Friedman post hoc comparaciones múltiples de Dunn (**p 0.01, ***p 0.001, ****p 0.0001). Los valores se encuentran en una escala de 1×10^5 .

7.3 Efecto de la administración crónica de BSS-4 sobre la expresión del TrkA

El NGF actúa a través de la activación de su receptor de alta afinidad, el TrkA, por lo que es necesaria su presencia para que se presenten los efectos benéficos de esta neurotrofina. Al igual que para el análisis del NGF, se tomaron al azar cuatro cortes por cada cerebro para someterlos a la prueba inmunohistoquímica (ver Fig. 28).

En la región del CA1 no se encontraron diferencias significativas entre los grupos Intacto e Intacto+aprendizaje. Se observaron diferencias significativas entre el grupo Intacto y el Vehículo, siendo la expresión del receptor de casi el doble que el Intacto (*p 0.05), no se observan diferencias con respecto al grupo Intacto+aprendizaje. El grupo BSS-4 1mg/kg presenta una expresión del TrkA cuatro veces más que el grupo Intacto, casi tres veces más que el grupo Intacto+aprendizaje y dos veces más que el grupo vehículo (****p 0.0001). La expresión del TrkA en el grupo BSS-4 en el grupo 1.5 mg/kg es 7 veces mayor que el grupo Intacto, 4 veces mayor que en el Intacto+aprendizaje, y tres veces más que el grupo Vehículo (****p 0.0001). No se encuentran diferencias significativas entre los dos grupos de BSS-4 (Figura 32).

En la región del CA2 no se observan diferencias significativas entre el grupo Intacto e Intacto+aprendizaje. El vehículo presenta una expresión del doble que el grupo Intacto (*p 0.05) pero no presenta diferencias significativas con respecto al grupo Intacto+aprendizaje. El grupo BSS-4 1mg/kg presenta una expresión del TrkA cuatro veces más que el grupo Intacto, tres veces más que el grupo Intacto+aprendizaje (****p 0.0001) y dos veces más que el grupo Vehículo (**p 0.01). Por otro lado, el grupo BSS-4 1.5 mg/kg presenta una expresión del TrkA siete veces más que el grupo Intacto, casi seis veces más que el grupo Intacto+aprendizaje y 4 veces más que el grupo Vehículo (****p 0.0001). No existen diferencias significativas con respecto al grupo BSS-4 1mg/kg (Figura 33).

En la región del CA3 no se observaron diferencias significativas entre el grupo Intacto e Intacto+aprendizaje. El vehículo presentó una expresión del doble que el grupo Intacto (*p 0.05) pero no muestra diferencias significativas con respecto al grupo Intacto+aprendizaje. El grupo BSS-4 1mg/kg presenta una expresión del TrkA cuatro veces más que el grupo Intacto, tres veces más que el grupo Intacto+aprendizaje (****p 0.0001) y casi dos veces más que el grupo Vehículo (**p 0.001). Por otro lado, el grupo BSS-4 1.5 mg/kg presenta una expresión del TrkA siete veces más que el grupo

Intacto, seis veces más que el grupo Intacto+aprendizaje y casi 4 veces más que el grupo Vehículo (***p 0.0001). Existen diferencias significativas entre la expresión del TrkA en el grupo BSS-4 1 mg/kg y 1.5 mg/kg (Figura 34).

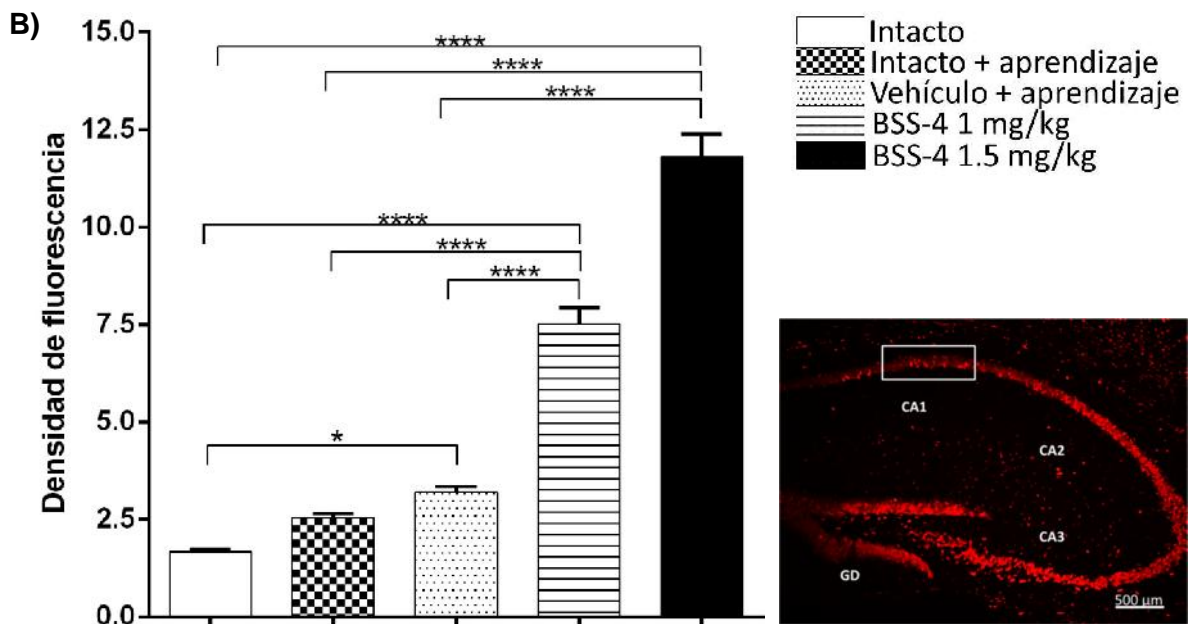
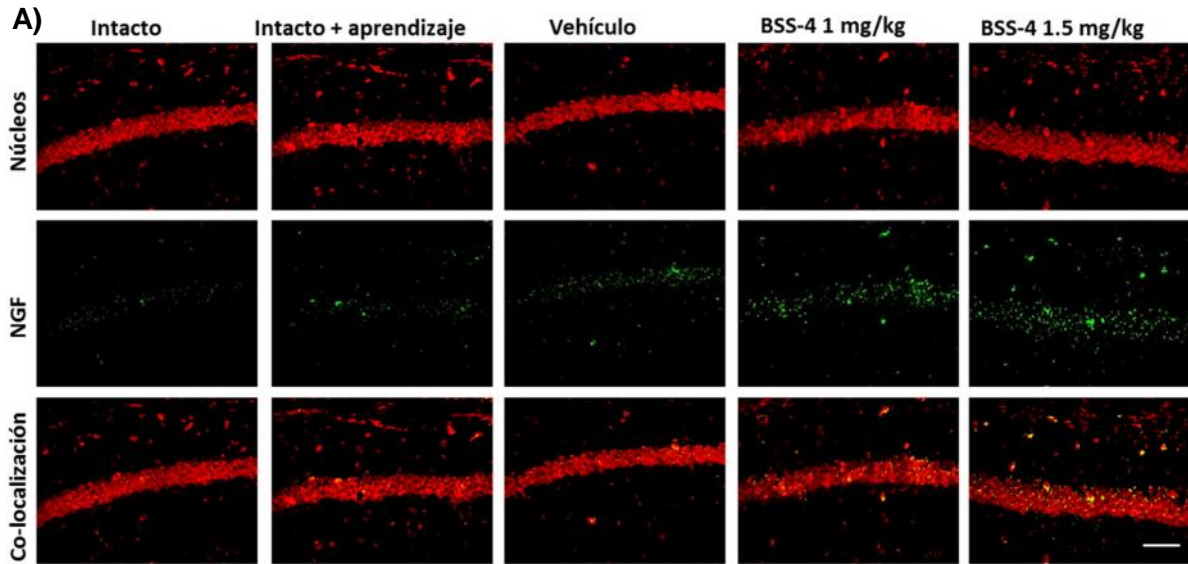


Figura 32. La administración crónica del BSS-4 aumenta la expresión del TrkA. A) Se muestran fotografías representativas de las inmunohistoquímicas para el TrkA de la región CA1 del hipocampo izquierdo. Barra de escala correspondiente a 50 μ m. B) El marcaje positivo fue cuantificado como densidad de fluorescencia con el programa ImageJ. Se observa el aumento de la expresión del TrkA en los grupos tratados con BSS-4. Las barras muestran el valor de las medias \pm EEM, (n=4). Prueba ANOVA de Friedman, post hoc comparaciones múltiples de Dunn (*p 0.05, ****p 0.0001). Los valores se encuentran en una escala de 1x10⁵.

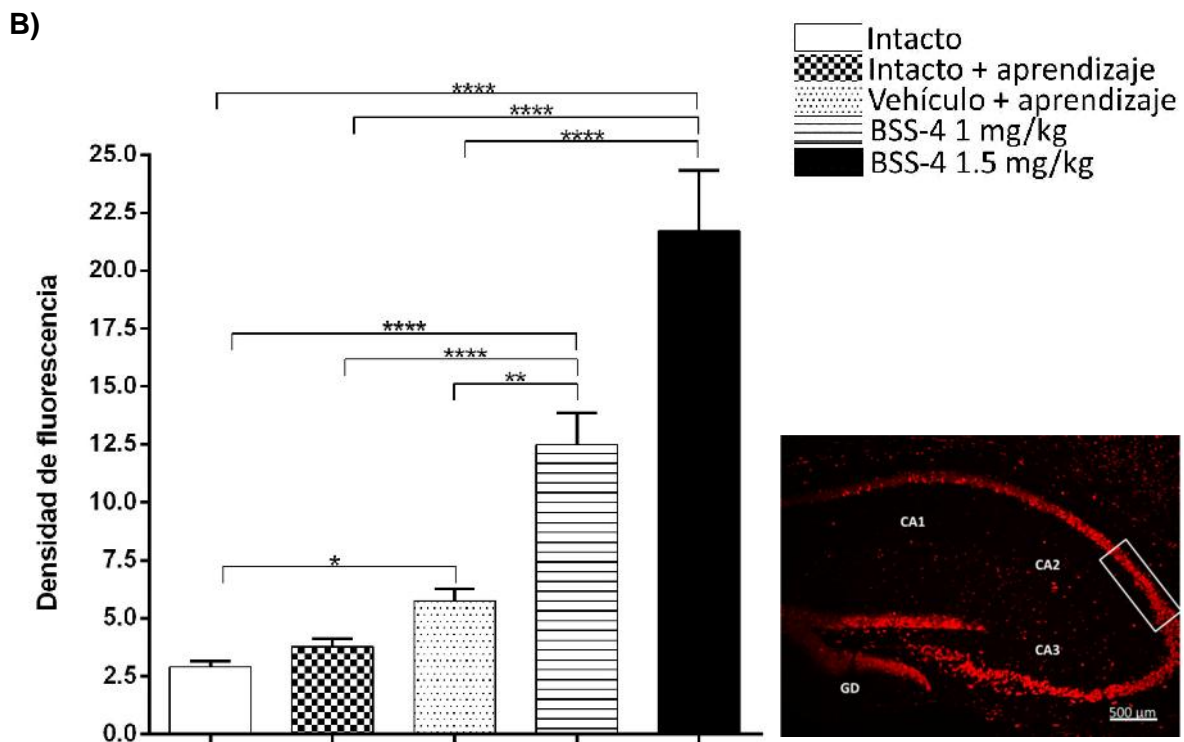
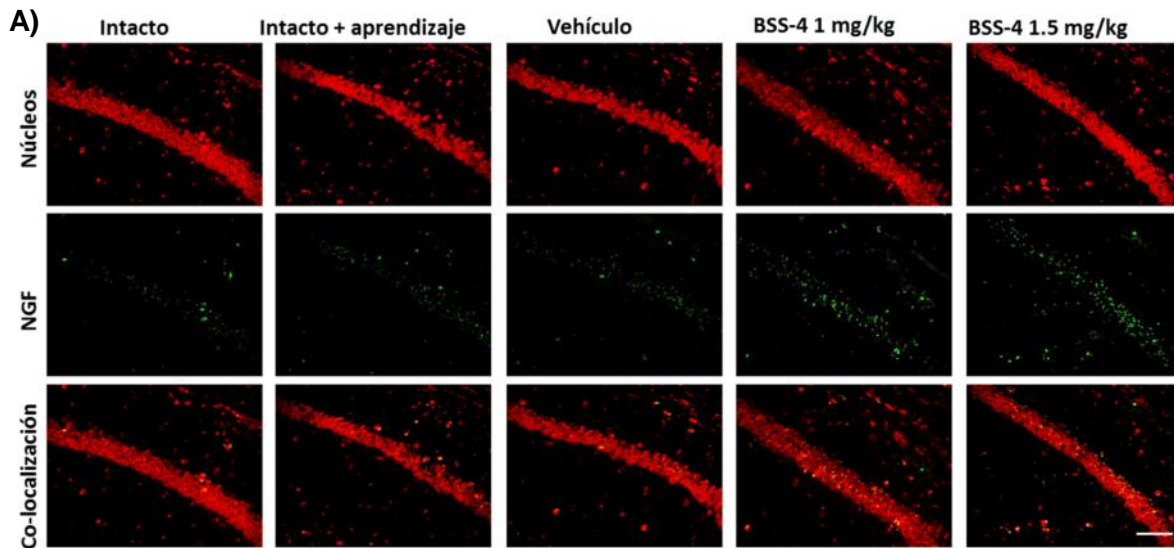


Figura 33. La administración crónica del BSS-4 aumenta la expresión del TrkA. A) Se muestran fotografías representativas de las inmunohistoquímicas para el TrkA de la región CA1 del hipocampo izquierdo. Barra de escala correspondiente a 50 μm . B) El marcaje positivo fue cuantificado como densidad de fluorescencia con el programa ImageJ. Se observa el aumento de la expresión del TrkA en los grupos tratados con BSS-4. Las barras muestran el valor de las medias \pm EEM (n=4). Prueba de ANOVA de Friedman, post hoc comparaciones múltiples de Dunn (*p 0.05, **p 0.01, ****p 0.0001). Los valores se encuentran en una escala de 1×10^5 .

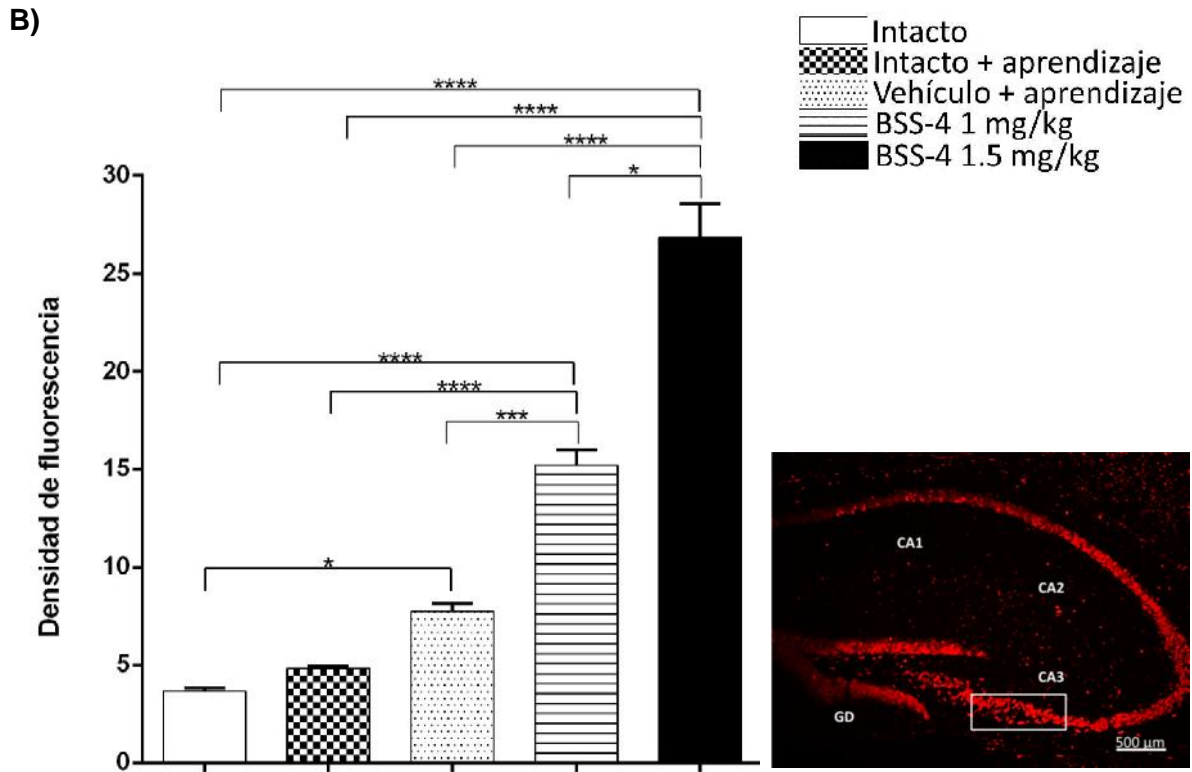
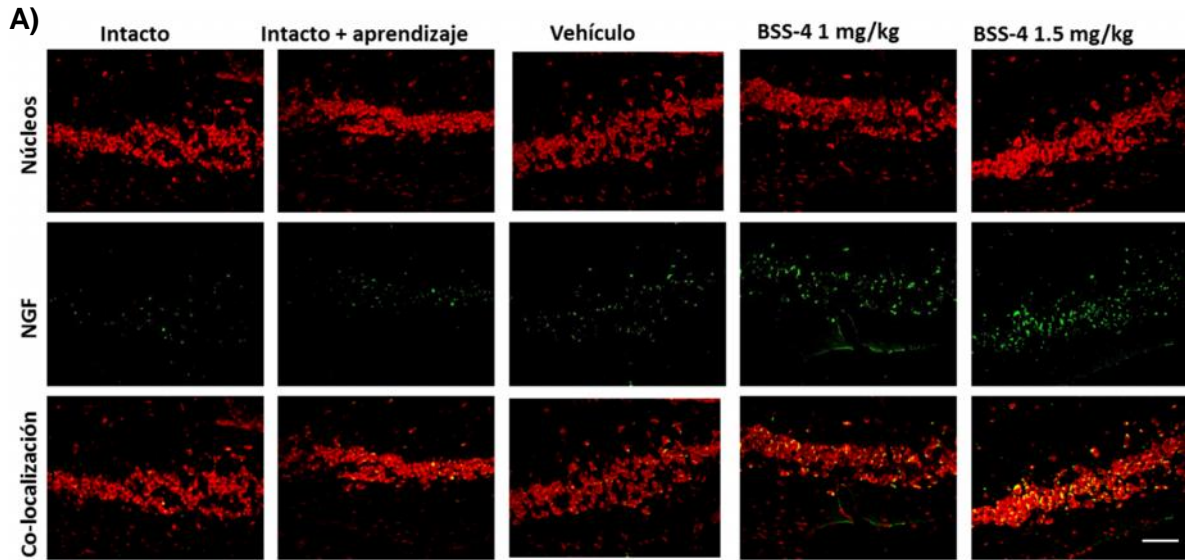


Figura 34. La administración crónica del BSS-4 aumenta la expresión del TrkA. A) Se muestran fotografías representativas de las inmunohistoquímicas para el TrkA de la región CA1 del hipocampo izquierdo. Barra de escala correspondiente a 50µm. B) El marcaje positivo fue cuantificado como densidad de fluorescencia con el programa ImageJ. Se observa el aumento de la expresión del TrkA en los grupos tratados con BSS-4. Las barras muestran el valor de las medias \pm EEM (n=4). Prueba de ANOVA de Friedman, post hoc comparaciones múltiples de Dunn (*p 0.05, ***p 0.001, ****p 0.0001). Los valores se encuentran en una escala de 1×10^5 .

Se comparó el nivel de expresión del NGF con la expresión del TrkA en cada uno de los grupos. En la Figura 35 se observa una expresión muy similar de los dos marcadores en los grupos Intacto, Intacto+aprendizaje, Vehículo y BSS-4 en dosis 1mg/kg en las tres regiones del hipocampo. Por otro lado en el grupo BSS-4 en dosis 1.5 mg/kg la expresión del TrkA es significativamente menor un 37% en la región del CA1 y 20% menos en la región del CA2 con respecto a la expresión del NGF (*p 0.05).

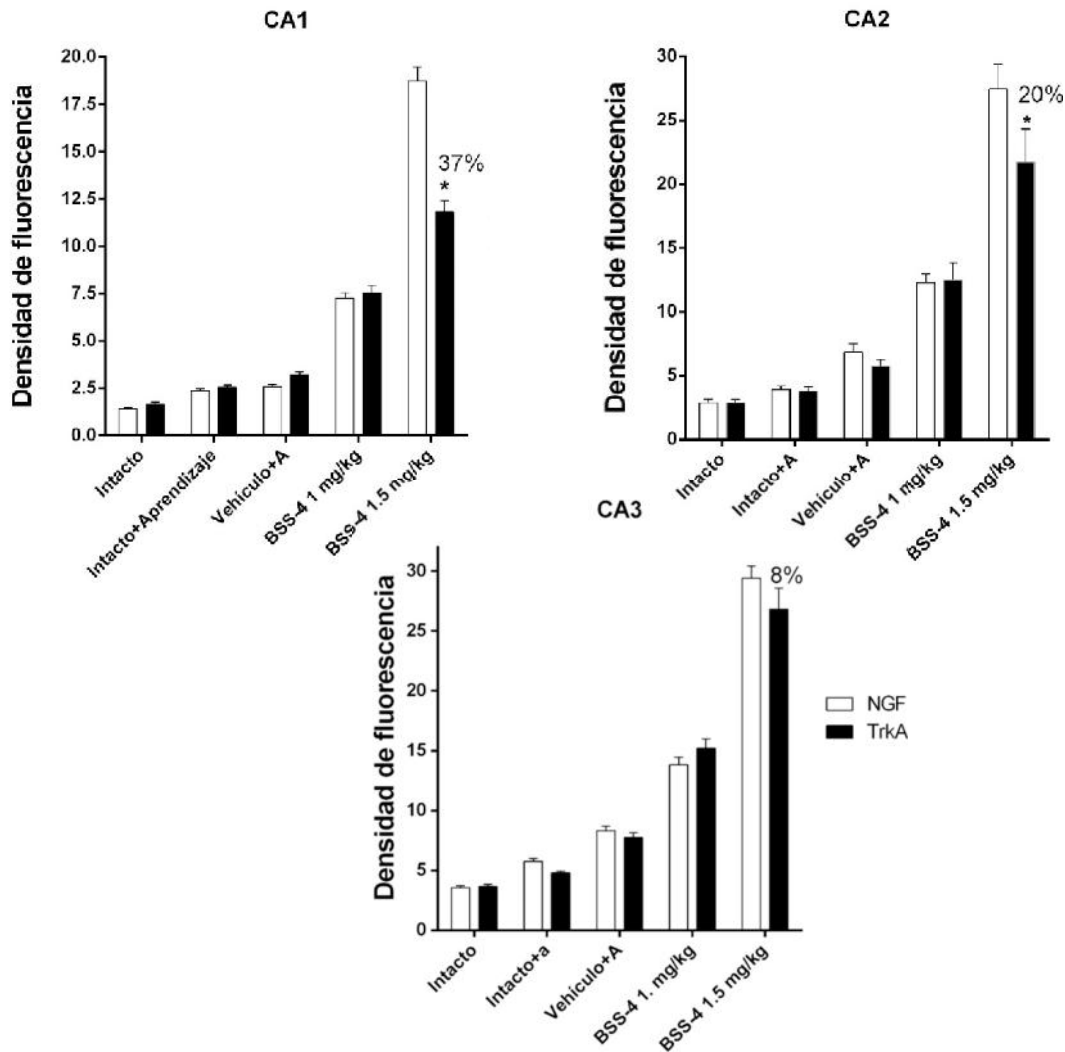


Figura 35. Comparación de la expresión del NGF contra la expresión de su receptor TrkA en las regiones CA1, CA2 y CA3 del hipocampo de ratón. Se observa aumento de la expresión de ambos marcadores en los grupos tratados con BSS-4. Existen diferencias significativas en las expresiones del NGF y el TrkA en el grupo tratado con BSS-4 en dosis 1.5 mg/kg (*p 0.05). Las barras muestran el valor de las medias \pm EEM. Prueba U de Mann-Whitney. Los valores se encuentran en una escala de 1×10^5 .

Por otro lado, también se comparó la expresión del NGF y el TrkA en cada una de las regiones de los grupos BSS-4 en ambas dosis. Se observó que la expresión en la región CA3 es mayor en un que en la región CA1. No se pueden realizar comparaciones estadísticas debido a que el número de datos no es igual en las diferentes regiones (Figura 28). En la expresión del NGF se observa un comportamiento similar, en el grupo BSS-4 la expresión en el CA2 es un 69% mayor y en el CA3 90% ambos con respecto a la región CA1; en el grupo BSS-4 en la región CA2 la expresión es un 46% mayor y en el CA3 un 57% mayor con respecto a la región CA1. La expresión del TrkA en el CA3 es un 102% mayor que en la región CA1 en el grupo BSS-4 en dosis 1 mg/kg, la expresión en las regiones CA2 y CA3 en ambos grupos es muy similar. En el grupo BSS-4 1.5 mg/kg la expresión del TrkA en el CA3 es un 127% mayor que en la región CA1, mientras que en el CA2 es un 84% mayor (Figura 36).

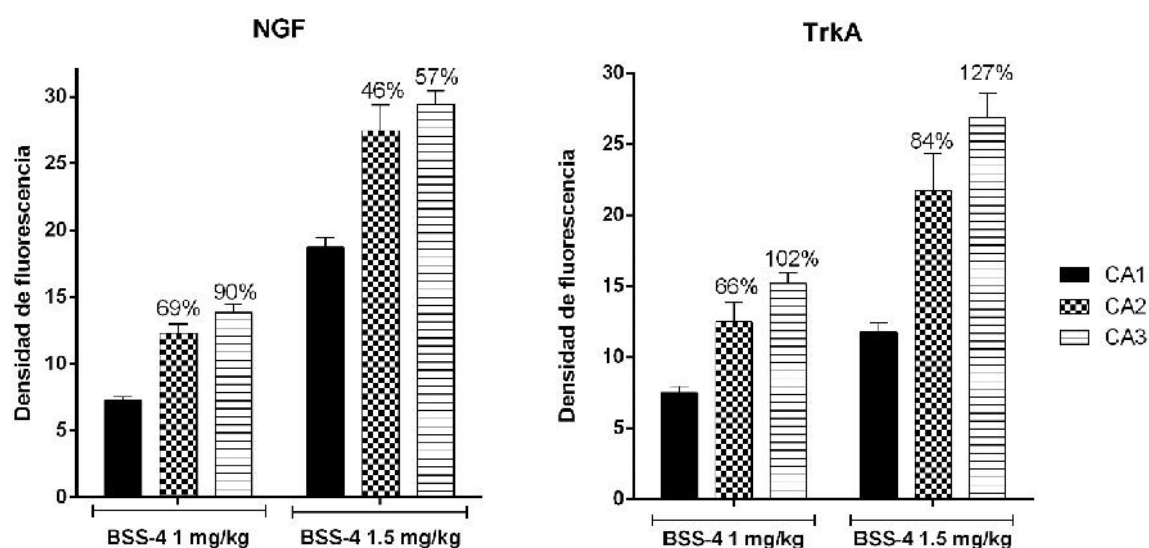


Figura 36. Comparación de la expresión del NGF en las diferentes regiones del hipocampo de los grupos tratados con BSS-4 en dosis de 1 y 1.5 mg/kg. Los datos no pueden compararse entre sí debido a que no se tiene el mismo número de datos entre las diferentes regiones. Se observa una mayor expresión tanto del NGF como del TrkA en la región CA3 del hipocampo. Los valores se encuentran en una escala de 1×10^5 . Las barras muestran el valor de las medias \pm EEM.

8. DISCUSIÓN

En la prueba de reconocimiento de objetos el Índice de discriminación (ID) con valor positivo indica que el sujeto de experimentación empleó más tiempo en explorar el objeto novedoso prestándole menos atención al objeto familiar, entre más cercano sea al valor a 1 la discriminación entre ambos objetos es mayor, por otro lado si el ID es negativo indica que dedicó mayor tiempo de exploración al objeto viejo, cuando el ID presenta es 0, significa que el tiempo de exploración fue igual para ambos objetos, por lo que no hubo discriminación entre ambos (Antunes y Biala, 2012). Este efecto puede observarse en los animales tratados con el BSS-4 en dosis de 1.5 mg/kg, ya que el ID es significativamente mayor comparado con el grupo Intacto+aprendizaje y vehículo+aprendizaje tanto al evaluar la adquisición como la recuperación de la memoria 24 horas después (memoria a largo plazo). Si bien también se observa el aumento del ID en el grupo tratado con BSS-4 en dosis de 1 mg/kg, este no es estadísticamente mayor al compararlo con el grupo vehículo+aprendizaje e intacto+aprendizaje, esta ausencia de diferencia estadística puede ser atribuida a la rapidez del metabolismo del ratón, lo que indica que la dosis de 1mg/kg no es suficiente para observar un efecto marcado a comparación de la dosis 1.5 mg/kg, lo que nos sugiere que en ratón es posible el uso de dosis mayores, las cuales nos ayudarían a observar de manera más clara el efecto del BSS-4 sobre el aprendizaje y la memoria en animales sanos.

La memoria de reconocimiento es un modelo de estudio de la memoria declarativa, la cual es altamente dependiente de estructuras del lóbulo temporomedial (Squire y cols, 2007; Balderas y cols, 2015). Se ha observado en diferentes estudios que la memoria de reconocimiento se ve comprometida al inactivar temporalmente el hipocampo con Lidocaína (Hammond y cols, 2004), la lidocaína es un anestésico local que bloquea la conducción nerviosa de manera específica, temporal y reversible, actúa bloqueando los canales de Na^+ , con la consiguiente disminución de la entrada de Na^+ y la inhibición de la despolarización de la membrana, que producen el bloqueo de la transmisión del impulso nervioso a través de las neuronas (López y Gasco, 2005). Por otro lado, también se reportó que la inactivación temporal del hipocampo con muscimol perjudica la formación de la memoria en la prueba de reconocimiento de objetos (De Lima y cols, 2006), el muscimol, principio activo de la seta *Amanita muscaria*, es un agonista de los receptores GABA_A , este receptor se encuentra en neuronas y consiste en un canal iónico de Cl^- activado por ligando, interviene en los procesos rápidos de transmisión de tipo inhibitor

que conduce a la reducción de la excitabilidad de la membrana celular (Fuentes y Ruiz. 2005). Estos estudios indican que la integridad y la función del hipocampo ayudan a la formación de la memoria de reconocimiento, sobre todo para la consolidación de la memoria (formación de la memoria a largo plazo).

Los resultados obtenidos en este estudio son similares a los obtenidos por Gil en el 2014, en dicho estudio se evaluó el efecto de la administración crónica durante 25 días del BSS-4 en ratas sobre la memoria de reconocimiento y la memoria espacial. Ambos tipos de memoria pertenecen a la clasificación de memoria episódica perteneciente a la memoria declarativa, por lo que ambas dependen de la integridad del hipocampo (Lynch, 2004; Morgado, 2005; Squire y cols, 2007; Balderas y cols, 2015). Se observó que el tratamiento con BSS-4 mejoraba el rendimiento en ambas pruebas y que el ID era significativamente mayor comparados con los grupos intacto y vehículo, además de que esta mejora se observaba tanto en la sesión de adquisición como en la de recuperación.

El BSS-4 es un derivado colestánico de la diosgenina, estudios previos llevados a cabo con la diosgenina han mostrado que el tratamiento crónico mejora la memoria de reconocimiento en ratones sanos (Thoda y cols, 2013) o ratones transgénicos usados como modelo de la enfermedad de Alzheimer caracterizados por el aumento de depósitos de placas amiloideas en corteza cerebral e hipocampo (Thoda y cols, 2012) además mejora la memoria espacial evaluada en el laberinto acuático de Morris y aumenta la actividad de enzimas antioxidantes como la Superóxido Dismutasa y Glutación peroxidasa siendo este efecto un posible mecanismo de neuroprotección en el modelo de ratones seniles inducidos con D-Galactosa (Chiu y cols, 2011). Sin embargo, los efectos de la mejora de la memoria solo son observados al evaluar la memoria a largo plazo 24 horas después de la sesión de entrenamiento, sin haber diferencias en la sesión de entrenamiento o adquisición de la información. Por otro lado, los resultados obtenidos en el presente trabajo y el de Gil en el 2014 se ha observado que el BSS-4 mejora la adquisición de la información, efecto que no se observa con diosgenina. En la figura 27 se realizó la comparación del ID en la sesión de adquisición contra el ID en la sesión de recuperación de la información en cada uno de los grupos experimentales, observando que el ID aumentaba en la sesión de adquisición de la información de los animales tratados con BSS-4 siendo este aumento mayor en el grupo BSS-4 con dosis 1.5 mg/kg, el ID en ambas sesiones es similar entre los grupos Intacto y Vehículo, por lo que sugerimos que el BSS-4 pueda estar actuando en otras estructuras como la Corteza

prefrontal, una estructura altamente implicada en los procesos atencionales (Sigurdsson y Duvarci, 2016), de ahí que al existir una mejora de la atención, la adquisición de la información sea más asequible permitiendo una mejor consolidación de la memoria y facilitando la recuperación de ésta 24 horas después.

Kang y colaboradores en el 2011, observaron que el tratamiento con Diosgenina mejoraba la conductividad nerviosa además de que promovía el crecimiento de neuritas en un modelo de neuropatía diabética, un padecimiento que se caracteriza por desmielinización y degeneración axonal en tejido nervioso asociado a niveles bajos de NGF, por lo que realizaron pruebas en cultivos celulares observando que el tratamiento con diosgenina aumentaba la secreción del NGF de manera dosis-dependiente, proponiendo así que la Diosgenina ejercía un efecto neuroprotector mediante la inducción del NGF.

Como se ha demostrado en diferentes estudios, el aumento de la concentración del NGF en el hipocampo promueve la mejora de la memoria evaluada en la prueba de reconocimiento de objetos (Birch y Kelly, 2013) y de facilita la potenciación a largo plazo, el mecanismo molecular propuesto para los procesos mnemónicos (Conner y cols, 2009). Por otro lado Wang y colaboradores (2012) observaron que el NGF promueve la formación de la memoria mediante la activación de proteínas como la Poli ADP ribosa polimerasa I (PARP1), la cual induce una rápida y transitoria descondensación de la cromatina y permite la transcripción necesaria para la formación de la memoria a largo plazo. Por otro lado el NGF activa factores de transcripción que promueven la síntesis de proteínas, evento que es indispensable para la formación de la memoria a largo plazo (Lynch, 2004). Así mismo, se ha sugerido que la estimulación continua con el NGF promueve la liberación de glutamato (Knipper y cols, 1994), el principal neurotransmisor excitador presente en las neuronas piramidales del hipocampo y que se encuentra altamente implicado en la potenciación a largo plazo (Lynch, 2004). Debido a los potenciales efectos del NGF sobre la plasticidad neuronal, se decidió comprobar si la mejora de la memoria observada en la prueba de reconocimiento de objetos tenía alguna relación con la expresión del NGF, por lo que se midió la expresión de dicha proteína mediante inmunohistoquímica.

La Inmunohistoquímica es un método usado para determinar la expresión de biomarcadores en cortes histológicos (embebidos en parafina o congelados) que se basa

en una interacción antígeno-anticuerpo. La localización del anticuerpo primario se visualiza haciendo uso del microscopio apropiado, en este trabajo la técnica se llevó a cabo de manera indirecta ya que se utilizaron dos anticuerpos, el anticuerpo primario que interactúa la presencia de la proteína de interés y el anticuerpo secundario que se encuentra marcado con un fluorocromo (isotiocianato de fluoresceína, FITC) y que identifica al anticuerpo primario (Clive y Phil, 2013).

Los animales tratados con BSS-4 aumentaron la expresión del NGF de manera dosis-dependiente, dicho aumento era estadísticamente mayor al compararlos con los grupos intacto+aprendizaje y vehículo, por otro lado se ha reportado que la expresión del NGF depende de la actividad neuronal (Sofroniew, 2001), por lo que para descartar que el aumento observado era debido a la prueba de memoria a la cual estaban siendo sometidos los animales, utilizamos un grupo intacto sin aprendizaje, al comparar los niveles de NGF con el grupo intacto con aprendizaje, los niveles entre los dos grupos no eran estadísticamente diferentes en ninguna de las regiones del hipocampo, por lo que aseguramos que el aumento observado es debido a la acción del BSS-4. El uso de un grupo vehículo nos ayudó a determinar que quien estaba ejerciendo el efecto era el BSS-4 y no dicho vehículo, se puede observar que este grupo presenta un aumento significativo de la expresión del NGF a comparación del grupo Intacto, sin embargo al comparar con el grupo Intacto+aprendizaje, la expresión es mayor pero no es significativo, por lo que pensamos que dicho aumento pudiese ser debido a que la administración intraperitoneal genera cierto estrés en el animal. Se ha observado que en condiciones de estrés, como exponer a los roedores en campo abierto con luz blanca, se genera un incremento del NGF en las regiones CA1, CA2 y CA3 puesto que se ha relacionado al hipocampo a procesos emocionales y de estrés (Badowska y cols, 2015). Sin embargo al comparar la expresión del NGF en el grupo Vehículo contra los grupos tratados con BSS-4 la expresión es significativamente mayor en los grupos BSS-4 que en el grupo Vehículo, por lo que una vez más se asegura que dicho efecto es debido a la actividad de la molécula aun en presencia estrés debido a la administración.

Para tratar de esclarecer cómo es que el BSS-4 puede estar aumentando la expresión del NGF, es importante considerar que al ser este un derivado de la Diosgenina, ambos compuestos comparten una similitud estructural muy estrecha. Thoda y colaboradores en el 2012 observaron que el tratamiento con Diosgenina mejoraba la memoria de reconocimiento e inducía el crecimiento axonal, dichos efectos benéficos

desaparecían cuando el receptor 1,25D3-MARRS era bloqueado con un anticuerpo, por lo que se cree que Diosgenina ejerce sus efectos a través de la activación de dicho receptor (Thoda y cols, 2013).

La proteína 1,25D3-MARRS es un receptor de membrana que desencadena respuestas rápidas (segundos a minutos) al ser activado por la Vitamina D. Se le encuentra en células intestinales, osteoblastos y odontoblastos, donde regula el transporte de iones fosfato y calcio. La activación del receptor estimula numerosas cascadas que incluyen a proteínas como fosfolipasa C (PLC), proteínas quinasas como PKC y ERK además de la apertura de canales de calcio. La unión del ligando al receptor 1,25D3-MARRS activa por medio de la proteína G a la fosfolipasa C la cual cataliza la reacción para la formación de diacilglicerol (DAG) y el inositol 1,4,5-trifosfato (IP3). El DAG activa a proteínas quinasas como la PKC, las cuales desempeñan un papel importante en el control del crecimiento y diferenciación celular; el IP3 activa la liberación de calcio de depósitos intracelulares como el retículo endoplasmico aumentando así la concentración interna de calcio, lo que permite la activación de proteínas quinasas dependientes de calcio (Norman y cols, 1999; Turano y cols, 2011; Khanal y Nemere, 2007).

Dentro de las proteínas quinasas que se activan, se encuentran la PKA, CAMKII y PKC (Chen y cols, 2013; Norman y cols, 1999; Turano y cols, 2011) es importante mencionar que el tratamiento con diosgenina aumenta la actividad de dichas proteínas (Thoda, 2012). Aunque la función del receptor en neuronas y enfermedades neurodegenerativas aún es desconocido, se ha reportado la expresión de la proteína PDIA3 en neuronas del hipocampo (Uhlén y cols, 2005). Así mismo Pendyala y colaboradores en el 2012 observaron que el tratamiento con metanfetamina aumentaba la expresión de PDIA3 en el hipocampo de ratón, siendo este un posible mecanismo de neuroprotección. El estudio de Thoda y colaboradores en el 2013 demostró que el tratamiento con diosgenina aumentaba la longitud axonal mediante la activación del receptor 1,25D3-MARRS. Resultados semejantes fueron obtenidos por Trejo (2013) en el cual se observó que la administración aguda de BSS-4 generaba el aumento de la longitud dendrítica y el número de dendritas.

Las rutas de señalización PKA, PKC y CAMKII promueven la síntesis de proteínas en neuronas (Bliss y Collingridge, 1993; Lynch, 2004) dentro de las cuales podría

encontrarse el NGF. Existe evidencia que demuestra que el NGF es sintetizado en neuronas piramidales del hipocampo (Sofroniew y cols, 2011), estructura blanco de neuronas colinérgicas (Whittemore y cols, 1988; Ernfors, 1990; Zhang y cols, 2007) asociada a memorias de tipo episódica como la memoria de reconocimiento (Squire y cols, 2007; Balderas y cols, 2015), además de que se ha demostrado que la ruta de señalización desencadenada por la activación de PKC promueve la síntesis de NGF en neuronas del hipocampo (Lim y Alkon, 2012). Es posible que el BSS-4 active al receptor 1,25D3-MARRS desencadenando así las rutas de señalización PKA, PKC y CAMKII que promueven la síntesis de proteínas como el NGF. Por otro lado se ha observado que la activación del receptor promueve la internalización de calcio (Nemere y cols, 2010; Turano y cols, 2011) aumentando su concentración en el medio intracelular; la entrada de calcio es un evento importante para la potenciación a largo plazo ya que como se ha visto, activa proteínas dependientes de calcio como la CAMKII además de que moviliza vesículas cargadas con glutamato (Lynch, 2004). El glutamato liberado por la neurona presináptica interactúa con los receptores AMPA y NMDA en la neurona postsináptica, evento que permite la entrada de Ca^{++} y la posterior activación de proteínas dependientes de Ca^{++} como la CAMKII, PKC y Ac, estas proteínas desencadenan señalizaciones que coinciden en la activación de ERK el cual modula la activación de factores de transcripción para la posterior síntesis de proteínas (Lynch, 2004; Morgado, 2005).

Para que el NGF pueda llevar a cabo sus efectos neurotróficos, es de vital importancia la presencia de su receptor de alta afinidad TrkA, ya que es mediante la activación de este que se accionan proteínas que promueven la síntesis de proteínas del citoesqueleto y más receptores NMDA Y AMPA. En este trabajo se observó que el tratamiento con BSS-4 aumentó la expresión del receptor TrkA en las tres regiones del hipocampo en una proporción muy similar a la observada en la expresión del NGF. Se ha demostrado que el TrkA se encuentra en neuronas piramidales del hipocampo (Sofroniew y cols, 2001) y que su expresión es modulada por la expresión del NGF ya que cuando éste aumenta, incrementa la cantidad de receptores TrkA (Holtzman y cols, 1992; Birch y Kelly, 2013), este comportamiento se observó en el presente trabajo, ya que al incrementar la expresión del NGF, la expresión del TrkA también aumentó.

El factor de crecimiento neuronal interactúa con el receptor TrkA que puede estar localizado tanto en la neurona post-sináptica como pre-sináptica, al ser activado, este activa a proteínas como CAMKII, PI3K, PKC y Ac, todas conducen a la activación de ERK

que modula la activación de factores de transcripción para la posterior síntesis de proteínas, por otro lado las proteínas CAMKII y PI3K son capaces de interactuar con proteínas del citoesqueleto como MAP2, Sinapsina y Tau promoviendo cambios morfológicos y la liberación de neurotransmisores. Dentro de los cambios morfológicos que se generan, está el aumento de la densidad dendrítica, por lo que incrementan las conexiones neuronales, evento que promueve la facilitación de la potenciación a largo plazo.

Por otro lado, en la figura 35, se compara el aumento de la expresión del NGF y el TrkA, si bien, los comportamientos son muy similares, se observa que en el grupo BSS-4 en dosis 1.5 mg/kg la expresión del receptor TrkA es menor que la expresión del NGF, lo que nos hace suponer que la expresión del receptor no es regulada directamente por la actividad del BSS-4, sino que es regulada posiblemente por la expresión del NGF, es por eso que la expresión en este grupo es diferente. Siendo que el grupo BSS-4 1.5 mg/kg es el grupo con la dosis mayor, nos permite observar mejor dicho efecto a comparación del grupo BSS-4 en dosis 1mg/kg.

En la región del CA1 se observa de manera evidente la diferencia de la expresión del NGF con el TrkA, siendo significativamente menor el TrkA (37%, respecto al grupo intacto). Las neuronas del CA1 reciben proyecciones de las neuronas del CA3 (Amaral y Lavenex, 2007; Taupin, 2007), es sabido que las neurotrofinas pueden transportarse de manera retrógrada a través de los axones de las neuronas pre-sinápticas (Niewiadowska y cols, 2011) , por lo que suponemos que el NGF sintetizado por las neuronas del CA1 esté siendo captado por los axones de las neuronas del CA3 y transportado de manera retrógrada hacia el soma de estas neuronas cerca del núcleo (región CA3), por lo que la actividad de los receptores TrkA en la región del CA1 es menor y por ende menor su expresión, esta idea también ayudaría a explicar por qué se encuentra menor expresión en la región del CA1 que en la región del CA2.

Se realizó una comparación de los niveles de NGF entre las regiones del hipocampo en los grupos tratados con BSS-4 (Figura 36). Debido a que no se tienen el mismo número de datos de la región CA1, CA2 y CA3 (Figura 28), no es posible comparar la expresión entre regiones de manera estadística, sin embargo, se observa que la expresión del NGF en las regiones CA2 y CA3 son mayores que en la región CA1, este dato coincide con los resultados obtenidos por Zhang y colaboradores en el 2007, en

donde demuestran que la expresión del NGF es menor en la región CA1 del hipocampo, la expresión del TrkA es muy similar a la del NGF, por lo que se sugiere que la expresión del receptor está regulada por la presencia del NGF.

Por otro lado se ha observado que el tratamiento con NGF en cultivos celulares aumenta la actividad de enzimas antioxidantes como la Glutación peroxidasa (GPX) (Sampath y Perez, 1997), además de que el aumento del NGF a nivel del SNC en ratones transgénicos, aumenta la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y glutación transferasa (GT) (Guégan y cols, 1999). En el trabajo de Gil (2014) se observó que el tratamiento crónico con BSS-4 aumenta la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y GPX, al observar que el tratamiento con BSS-4 aumenta la expresión del NGF, puede ser que esta neurotrofina esté ayudando al aumento de la actividad de dichas enzimas.

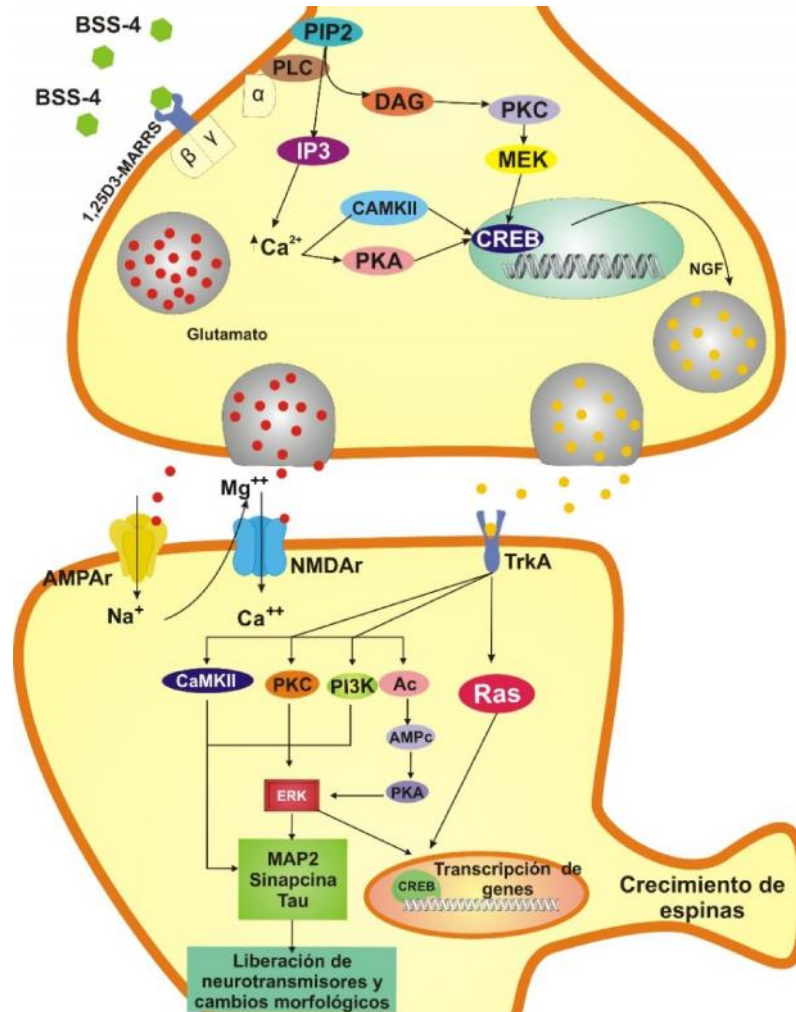


Figura 37. Posible mecanismo de acción del BSS-4. El BSS-4 activa al receptor 1,25D3-MARRS permitiendo la separación de la subunidad alfa de la proteína G a la cual se encuentra acoplado el receptor. La subunidad α activa a la fosfolipasa C (PLC) que cataliza la reacción para la formación de diacilglicerol (DAG) y el inositol 1,4,5-trifosfato (IP3). El DAG activa a proteínas quinasas como la PKC, la cual desencadena señalizaciones que activan factores de transcripción como CREB aumentando la transcripción del gen del NGF; el IP3 activa la liberación de calcio de depósitos intracelulares como el retículo endoplasmico aumentando así la concentración interna de calcio, lo que permite la activación de proteínas quinasas como CAMKII y PKA que desencadenan señales que activan factores de transcripción. Por otro lado el aumento interno de Ca^{++} pone en movilización vesículas que contienen glutamato que es liberado al espacio sináptico junto con el NGF. El glutamato activa el receptor AMPA que permite la entrada de Na^{+} provocando la despolarización de la neurona y por ende la liberación del receptor NMDA del ion Mg^{++} que lo bloqueaba, permitiendo la entrada de Ca^{++} que activa la proteína CAMKII que interactúa con proteínas del citoesqueleto permitiendo cambios morfológicos así como la liberación de neurotransmisores, por otro el NGF activa a TrkA y posteriormente se activan proteínas como la PKC, PI3K, Ras y Ac que activan a ERK el cual se transporta al núcleo para activar factores de transcripción para la síntesis de proteínas del citoesqueleto y como consecuencia la formación de nuevas espinas dendríticas así como también receptores NMDA, AMPA y TrkA los cuales serán transportados a las membranas de las nuevas espinas.

9. CONCLUSIONES

- La administración crónica del BSS-4 en dosis de 1.5 mg/kg mejora la adquisición y recuperación de la memoria evaluada en la prueba de reconocimiento de objetos.
- La expresión del factor de crecimiento neuronal (NGF) aumenta en el hipocampo de ratones tratados con BSS-4 de manera dosis dependiente.
- El aumento de la expresión del NGF inducido por la administración del BSS-4 promueve el aumento de la expresión del receptor TrkA en hipocampo de ratón.
- El aumento de la señalización del NGF podría ser la vía mediante la cual el BSS-4 promueve la mejora del aprendizaje y la memoria.

10. REFERENCIAS

- Aggleton J.P., Albasser M.M., Aggleton D.J., Poirier G.L. y Pearce J.M. (2010). Lesions of the rat perirhinal cortex spare the acquisition of a complex configural visual discrimination yet impair object recognition. *Behavioral Neuroscience*; 124(1):55-68.
- Al-Matubsi H.Y., Nasrat N.A., Oriquat G.A., Abu-Samak M., Al-Mzain K.A. y Salim M. (2011). The hypocholesterolemic and antioxidative effect of dietary diosgenin and chromium chloride supplementation on high-cholesterol fed Japanese quails. *Pakistan Journal of Biological Sciences*; 14: 425–432
- Allen S.J., Watson J.J., Shoemark D.K., Barua N.U. y Patel N.K. (2013). GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. *Pharmacology and Therapeutics*; 138(2): 155-75.
- Amaral D. y Lavenex P. (2007) Hippocampal Neuroanatomy. En: The hippocampus book (pp. 37-139). Nueva York: Oxford University Press.
- Antunes M. y Biala G. (2012). The novel objects recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cognitive Processing*; 13(2):93-110.
- Badowska-Szalewska E., Krawczyk R., Ludkiewicz B. y Mory J. (2015). The effect of mild stress stimulation on the nerve growth factor (NGF) and tyrosine kinase receptor A (TrkA) immunoreactivity in the paraventricular nucleus (PVN) of the hypothalamus and hippocampus in aged vs. adult rats. *Neuroscience*; 290:346-56.
- Balderas I., Rodríguez-Ortiz C.J. y Bermudez-Rattoni F. (2015). Consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Behavioural Brain Research*; 285: 213-22.
- Bannerman D.M., Sprengel R., Sanderson D.J., McHugh S.B., Rawlins J.N., Monyer H. y Seeburg P.H. (2014). Hippocampal synaptic plasticity, spatial memory and anxiety. *Nature Reviews Neuroscience*; 15(3): 181-92.
- Birch A.M. y Kelly Á.M. (2013). Chronic intracerebroventricular infusion of nerve growth factor improves recognition memory in the rat. *Neuropharmacology*; 75:255-61.
- Birch A.M., McGarry N.B. y Kelly A.M. (2013). Short-term environmental enrichment in the absence of exercise improves memory and increases NGF concentration, early neuronal survival and synaptogenesis in the dentate gyrus in a time-dependent manner. *Hippocampus*; 23(6):437-50.
- Bliss T.V. y Collingridge G.L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*; 361(6407): 31-9.

- Brem A.K., Ran K. y Pascual-Leone A. (2013). Learning and memory. *Handbook of Clinical Neurology*; 116: 693-737.
- Chen J., Lobachev K.S., Grindel B.J., Farach-Carson M.C., Hyzy S.L., El-Baradie K.B., Olivares-Navarrete R., Doroudi M., Boyan B.D. y Schwartz Z. (2013). Chaperone properties of pdia3 participate in rapid membrane actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Molecular Endocrinology*; 27(7):1065-77.
- 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):551-63.
- 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): 8853-60.
- Clive R. T. y Phil D. (2013). Introduction to immunohistochemistry. En: *Immunohistochemical Staining Methods* (pp. 11-18). Canadá: Dako.
- Conner J.M., Franks K.M., Titterness A.K., Russel K., Merril D.A, Christie B.R., Sejnowski T.J. y Tuszynski M.H. (2009). NGF is essential for hippocampal plasticity and learning. *The Journal of Neuroscience*; 29(35): 10883-9.
- Conrad C.D. (2009). A critical review of chronic stress effects on spatial learning and memory. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*; 34(5):742-55
- Daumas S., Ceccom J., Halley H., Francés B. y Lassalle J.M. (2009) Activation of metabotropic glutamate receptor type 2/3 supports the involvement of the hippocampal mossy fiber pathway on contextual fear memory consolidation. *Learning & Memory*; 16(8):504-7.
- De Lima M.N., Luft T., Roesler R. y Schröder N. (2006). Temporary inactivation reveals an essential role of the dorsal hippocampus on consolidation of object recognition memory. *Neuroscience Letters*; 405(1-2):142-6.
- De Rosa R., Garcia A.A., Braschi C., Capsoni S., Maffei L., Berardi N. y Cattaneo A. (2004). Intranasal administration of nerve growth factor (NGF) rescues recognition memory deficits in AD11 anti-NGF transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 102(10):3811-6.
- Ebrahimi H., Badalzadeh R., Mohammadi M. y Yousefi B. (2014) Diosgenin attenuates inflammatory response induced by myocardial reperfusion injury: role of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels. *The Journal of Physiology and Biochemistry*; 70(2):425-32.

- Ennaceur A. y Delacour J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioural Brain Research*; 31(1): 47-59.
- Ernfors P., Wetmore C., Olson L. y Persson H. (1990). Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family. *Neuron*; 5(4):511-26.
- Estrella, M. E. (2015) Efecto de la administración intrahipocampal del derivado colestánico BSS-4 sobre la memoria espacial. Tesis de licenciatura. FCQ-BUAP.
- 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.
- Fuentes J. A. y Ruiz M. G. (2005) Introducción a la farmacología del sistema nervioso central. Neurotransmisores y receptores. En: Farmacología básica y clínica Madrid, España: Editorial Panamericana. Ed. 17. p 193-215.
- Gallo M. (2007). Reversible Inactivation of Brain Circuits in Learning and Memory Research. *Frontiers in Neuroscience*; 157-170.
- 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.
- Guégan C., Ceballos-Picot I., Chevalier E., Nicole A., Onténiente B. y Sola B. (1999). Reduction of ischemic damage in NGF-transgenic mice: correlation with enhancement of antioxidant enzyme activities. *Neurobiology of Disease*; 6(3):180-9.
- Hammond R.S., Tull L.E. y Stackman R.W. (2004). On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory*; 82(1): 26-34.
- Hansen R.T. y Zhang H.T. (2013). Senescent-induced dysregulation of cAMP/CREB signaling and correlations with cognitive decline. *Brain Research*; 1516:93-109.
- Holtzman D.M., Li Y., Parada L.F., Kinsman S., Chen C.K., Valletta J.S., Zhou J., Long J.B. y Mobley W.C. (1992). p140trk mRNA marks NGF-responsive forebrain neurons: evidence that trk gene expression is induced by NGF. *Neuron*; 9(3):465-78.
- Huang E.J. y Reichardt L.F. (2003). Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annual Review of Biochemistry*; 72: 609-42.

- 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. *The Journal Biological and Pharmaceutical Bulletin*; 34(9):1493-8.
- Khanal R.C. y Nemere I. (2007). The ERp57/GRp58/1,25D3-MARRS receptor: multiple functional roles in diverse cell systems. *Current Medicinal Chemistry*; 14(10):1087-93.
- Knipper M., Leung L.S., Zhao D. y Rylett R.J. (1994). Short-term modulation of glutamatergic synapses in adult rat hippocampus by NGF. *NeuroReport*; 5(18): 24333-6.
- Levi-Montalcini R. (1964). The nerve growth factor. *The New York Academy of Sciences*; 118: 149-70.
- Li Y., Wang X., Cheng S., Du J., Deng Z., Zhang Y., Liu Q., Gao J., Cheng B. y Ling C. (2015). Diosgenin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Oncology Reports*; 33(2):693-8.
- Lim C.S, Alkon D.L. (2012). Protein kinase C stimulates HuD-mediated mRNA stability and protein expression of neurotrophic factors and enhances dendritic maturation of hippocampal neurons in culture. *Hippocampus*; 22(12):2303-19.
- Lomber S.G. (1999). The advantages and limitations of permanent or reversible deactivation techniques in the assessment of neural function. *The Journal of Neuroscience Methods*; 86(2):109-17.
- Lorigados-Pedre L.y Bergado-Rosado J. (2004). Nerve growth factor in neurodegeneration and neurorestorative therapy. *Revista de neurología*; 38(10): 957-71.
- López F. T y Gasco M. C. (2005). Fármacos anestésicos locales. En (Ed. 17) *Farmacología básica y clínica* (181-191). Madrid, España: Editorial Panamericana.
- Lynch M.A. (2004). Long-term potentiation and memory. *Physiological Reviews*; 84 (1): 87-136.
- Morgado I. (2005). The psychobiology of learning and memory: fundamentals and recent advances. *Revista de Neurología*; 40(5):289-97.
- Negishi M. y Katoh H. (2004). Rho family GTPases as key regulator for neuronal network formation. *Tanpakushitsu kakusan koso*; 49(3 Suppl):331-6
- Nemere I., Garbi N., Hämmerling G.J. y Khanal R.C. (2010) Intestinal cell calcium uptake and the targeted knockout of the 1,25D3-MARRS (membrane-associated, rapid

- response steroid-binding) receptor/PDIA3/Erp57. *The Journal of Biological Chemistry*; 285(41):31859-66.
- Niewiadomska G, Mietelska-Porowska A, Mazurkiewicz M. (2011). The cholinergic system, nerve growth factor and the cytoskeleton. *Behavioural Brain Research*; 221(2):515-26.
- Norman A.W., Song X., Zanello L., Bula C. y Okamura W.H. (1999). Rapid and genomic biological responses are mediated by different shapes of the agonist steroid hormone, 1 α ,25(OH) $_2$ vitamin D $_3$. *Steroids*; 64(1-2):120-8.
- Pendyala G., Ninemire C. y Fox H.S. (2012). Protective Role for the Disulfide Isomerase PDIA3 in Methamphetamine Neurotoxicity. *Plos One*; 7(6): e38909.
- Purves D. (2004). Memory. En: *Neuroscience* (pp. 733-753). U.S.A: Sinauer Associates.
- Razavi S., Nazem G., Mardani M., Esfandiari E., Salehi H. y Esfahani S.H. (2015). Neurotrophic factors and their effects in the treatment of multiple sclerosis. *Advanced Biomedical Research*; 4:53.
- Reichardt L.F. (2006). Neurotrophin-regulated *signalling* pathways. *Philosophical transactions of the Royal Society*; 361(1473):1545-64.
- Sampath D. y Perez-Polo R. (1997). Regulation of antioxidant enzyme expression by NGF. *Neurochemical Research*; 22(4):351-62.
- Saravanan G., Ponmurugan P., Deepa M.A. y Senthilkumar B. (2014). Modulatory effects of diosgenin on attenuating the key enzymes activities of carbohydrate metabolism and glycogen content in streptozotocin-induced diabetic rats. *Canadian Journal of Diabetes*; 38(6):409-14.
- Shea C.J., Carhuatanta K.A., Wagner J., Bechmann N., Moore R., Herman J.P. y Jankord R. (2015). Variable impact of chronic stress on spatial learning and memory in BXD mice. *Physiology & Behavior*; 150:69-77.
- Sigurdsson T, y Duvarci S. (2016). Hippocampal-Prefrontal interactions in cognition, behavior and psychiatric disease. *Frontiers in Systems Neuroscience*; 9:190.
- Silvers J.M., Harrod S.B., Mactutus C.F. y Booze R.M. (2007). Automation of the novel object recognition task for use in adolescent rats. *The Journal of Neuroscience Methods*; 166(1):99-103.
- Sofroniew M.V., Howe C.L. y Mobley W.C. (2001). Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *The Annual Review of Neuroscience*; 24: 1217-81.

- Squire L.R., Zola-Morgan J.T. y Clark R.E. (2007). Recognition memory and the medial temporal lobe: a new perspective. *Nature Reviews Neuroscience*; 8(11):872-83
- Strange B.A., Witter M.P., Lein E.S. y Moser E.I. (2014). Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nature Reviews Neuroscience*; 15(10):655-69.
- Taupin P. (2007). The hippocampus. En: *The hippocampus: Neurotransmission and plasticity in the nervous system* (pp. 4-12). New York: Nova Biomedical Books.
- 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.
- 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.
- Trejo, C. 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.
- Turano C., Gaucci E., Grillo C. y Chichiarelli S. (2011). ERp57/GRP58: a protein with multiple functions. *Cellular & Molecular Biology Letters*; 16(4):539-63.
- Uhlén M., Björling E., Agaton C., Szigartyo C.A., Amini B., Andersen E., Andersson A.C., Angelidou P., Asplund A., Asplund C., Berglund L., Bergström K., Brumer H., Cerjan D., Ekström M., Elobeid A., Eriksson C., Fagerberg L., Falk R., Fall J., Forsberg M., Björklund M.G., Gumbel K., Halimi A., Hallin I., Hamsten C., Hansson M., Hedhammar M., Hercules G., Kampf C., Larsson K., Lindskog M., Lodewyckx W., Lund J., Lundeberg J., Magnusson K., Malm E., Nilsson P., Odling J., Oksvold P., Olsson I., Oster E., Ottosson J., Paavilainen L., Persson A., Rimini R., Rockberg J., Runeson M., Sivertsson A., Sköllerö A., Steen J., Stenvall M., Sterky F., Strömberg S., Sundberg M., Tegel H., Tourle S., Wahlund E., Waldén A., Wan J., Wernérus H., Westberg J., Wester K., Wrethagen U., Xu L.L., Hober S., y Pontén F. (2005). A human protein atlas for normal and cancer tissues based on antibody proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*; 4(12):1920-32
- Wang S.H., Liao X.M., Liu D., Hu J., Yin Y.Y., Wang J.Z. y Zhu L.Q. (2012). NGF promotes long-term memory formation by activating poly(ADP-ribose)polymerase-1. *Neuropharmacology*; 63(6):1085-92.
- Wiesmann C., y De Vos A.M. (2001). Nerve growth factor: structure and function. *Cellular and Molecular Life Science*; 58(5-6): 748-59.

- Winkler J., Ramirez G.A., Thal L.J. y Waite J.J. (2001). Nerve growth factor (NGF) augments cortical and hippocampal cholinergic functioning after p75NGF receptor-mediated *deafferentation* but impairs inhibitory avoidance and induces fear-related behaviors. *The Journal of Neuroscience*; 20(2):834-44.
- Whittemore S.R., Friedman P.L., Larhammar D., Persson H., Gonzalez-Carvajal M. y Holets V.R. (1998). Rat Beta-nerve growth factor sequence and site of synthesis in the adult hippocampus. *Journal of Neuroscience Research*; 20(4):403-10.
- Witter M. (2012). *Hippocampus*. En: Wattson C., Paxinos G., y Puelles L. (Ed.), *The Mouse Nervous System* (pp. 112-136). London: Academic Press.
- Zhang H.T., Li L.Y., Zou X.L., Song X.B., Hu Y.L., Feng Z.T. y Wang T.T. (2007). Immunohistochemical distribution of NGF, BDNF, NT-3, and NT-4 in adult Rhesus monkey brains. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*; 55(1):1-19.