



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD Y TOXICIDAD DE UNA SOLUCIÓN DE
TEOBROMINA CON EFECTO NEUROPROTECTOR PARA ALZHEIMER EN UN
MODELO MURINO.

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA:

L. A. Q. B. CÉSAR ADRIÁN MARTÍNEZ CARRASCO.

DIRIGIDA POR:

DRA. GUADALUPE GARCÍA ALCOCER

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO,

CENTRO UNIVERSITARIO

Diciembre 2019



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD Y TOXICIDAD DE UNA SOLUCIÓN DE
TEOBROMINA CON EFECTO NEUROPROTECTOR PARA ALZHEIMER EN UN
MODELO MURINO.

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestro en Ciencias Químico Biológicas

Presenta:

L. A. Q. B. César Adrián Martínez Carrasco

Dirigido por:

Dra. María Guadalupe García Alcocer

Dra. María Guadalupe García Alcocer
Presidente

Dra. Laura Cristina Berúmen Segura
Secretario

M. en C. Patricia Villalobos Aguilera
Vocal

Dra. Jesica Esther Escobar Cabrera
Suplente

M. en C. Jesús Carlos Mendiola Précoma
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Diciembre 2019

México

Agradecimientos

A mis padres, por ser pilar importante en mi vida y por el apoyo que siempre me brindan, logrando de su mano mis sueños y metas.

Gracias a la Dra. Guadalupe García Alcocer por la oportunidad que me brindó de realizar un trabajo de investigación a su lado, por su tiempo y dedicación a mi formación.

Gracias al maestro Jesús Mendiola por su gran ayuda en la realización de la parte experimental de este trabajo. Por sus consejos y su amistad.

Gracias a la Dra. Laura Berumen por su tiempo dedicado en la revisión exhaustiva de este proyecto, por ser un ejemplo profesional y personal en mi vida. Gracias por compartir su sabiduría, paciencia y atención.

Gracias al maestro Eloy por su colaboración para el desarrollo del método de HPLC, por el tiempo invertido a que se pudiera cumplir uno de los principales objetivos de este proyecto.

Gracias al Instituto de Neurobiología de la UNAM y al doctor Martín, por el abastecimiento de insumos para el mantenimiento de los animales utilizados para el diseño experimental de mi trabajo. Gracias al Dr. Iram por su ayuda y colaboración para la cirugía estereotáxica.

Gracias a farmaUAQ y al QFB Andrés Milchis Álvarez, por la facilitación de la cámara de estabilidad de productos.

Gracias a mis compañeros de laboratorio, que me brindaron su amistad y su apoyo, haciendo amenos los días de trabajo a lo largo de estos dos años. Gracias a Chuy, Jessi Saucedo, Carlos Uribe, Areli Flores, Alejandra Nabi, Ronna Delgado y a todos los que me acompañaron en este proceso dentro del posgrado.

Gracias a mi amiga Andrea Guillen por ser parte importante en mi vida y acompañarme en este camino, por estar conmigo en diversas ocasiones cuando la estaba en Querétaro no era tan favorable. Gracias a Zayda Elias, por impulsarme a la realización de una maestría, por su amistad y su confianza; por demostrarme indirectamente que el trabajo, la dedicación y el esfuerzo son parte importante para lograr nuestras metas.

ACRÓNIMOS

A1	Receptores a adenosina de tipo 1
A2	Receptores a adenosina de tipo 2
Aβ	Péptido β-Amiloide
Ach	Acetil Colina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ApoE	Apolipoproteína E
APP	Proteína precursora amiloide
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Trifosfato de adenosina
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
EA	Enfermedad de Alzheimer
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FDA	Administración de alimentos y medicamentos
GABAA	Ácido gamma-amino butírico
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
IRON	Índice de reconocimiento de objeto nuevo
LCR	Líquido cefalorraquídeo

LDL	Lipoproteína de baja densidad
LPL	Lipasa de lipoproteína
LTP	Potenciación a largo plazo
NFT	Marañas neurofibrilares
NMDA	Glutamato de N-metil-D-Asparato
PDE	Fosfodiesterasas
PS1	Gen de la presenilina 1
PS2	Gen de la presenilina 2
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
TG	Triglicéridos
TGO	Transaminasa glutámico oxalacética
TGP	Transaminasa glutámico pirúvica
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

RESUMEN

La enfermedad del Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa progresiva, la cual se caracteriza por el deterioro funcional y un decremento de neuronas, que resulta en una disminución progresiva de la memoria y otras funciones cognitivas, produciéndose así la demencia. La demencia causada por la EA se caracteriza por acumulaciones cerebrales extra e intraneuronales de las proteínas β -amiloide ($A\beta$) y proteínas tau, respectivamente, que afectan de forma selectiva regiones específicas, en particular, la neocorteza y el hipocampo. La EA es una enfermedad multifactorial y con frecuencia se observa el aumento de pacientes que son atendidos en la clínica con dicha enfermedad. Sin embargo, constantemente se busca implementar medidas preventivas y/o tratamientos específicos que puedan atender a la EA. La teobromina es un derivado de metilxantinas con propiedades antagonistas de los receptores de adenosina, mostrando un efecto neuroprotector, a una dosis de 30 mg/L, restaurando los niveles del receptor A1 y mejorando funciones cognitivas, así como niveles de $A\beta$. En este trabajo se implementó el fenotipo de la enfermedad de Alzheimer por la administración intra-cerebral de $A\beta$ con un sistema estereotáxico. También se llevó a cabo la administración de una solución de teobromina (30 mg/L) durante 9 meses en el modelo de Alzheimer. Se confirma que la concentración de teobromina no es tóxica y permanece estable a humedad y temperatura determinada por una cámara de estabilidad. La molécula de teobromina presenta estabilidad íntegra, medida por medio de un método de análisis implementado en HPLC para su detección y cuantificación.

(Palabras clave: Enfermedad de Alzheimer, β -Amiloide, metilxantinas, teobromina, HPLC).

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disease. It is characterized by functional impairment and a decrease in the number of neurons, resulting in a progressive decline in memory and other cognitive functions, causing dementia. Dementia caused by AD is mainly characterized by extra and intracellular accumulations in brain of β -amyloid ($A\beta$) and tau proteins, respectively, which selectively affect specific regions, particularly neocortex and hippocampus. AD is a multifactorial disease and there is often an increase in patients who are treated in the medical center with this disease. However, we constantly seek to implement preventive measures and / or specific treatments that can address the AD. Theobromine is a derivative of methylxanthines, which has been found to have antagonism properties over adenosine receptors, showing a neuroprotective effect, restoring A1 receptor levels and improving cognitive functions, as well as $A\beta$ peptide levels at a dose of 30 mg / L. In this work, it was implemented the AD phenotype by the intra-cerebral injection of $A\beta$ peptide by means of a stereotactic system. The administration of a theobromine solution (30 mg / L) for 9 months in the Alzheimer's model was also carried out. It's confirmed that theobromine concentration is not toxic and remains stable at humidity and temperature determined by a stability chamber. Theobromine molecule has integral stability, measured by means of an analysis method implemented in HPLC for its detection and quantification.

(Keywords: Alzheimer's disease, β -Amyloid, methylxanthines, theobromine, HPLC)

ÍNDICE

1.0 INTRODUCCIÓN	1
2.0 ANTECEDENTES	2
2.1 Generalidades del sistema nervioso	2
2.1.1 Organización del sistema nervioso	3
2.1.2 Citología del sistema nervioso.....	5
2.2 Memoria y anatomía funcional.....	9
2.3 Enfermedad de Alzheimer	12
2.3.1 Tipos de enfermedad de Alzheimer	14
2.3.2 Tratamientos de la enfermedad de Alzheimer.....	15
2.4 Metilxantinas.....	20
2.4.1 Estructura química.....	22
2.4.2 Efectos benéficos de las metilxantinas.....	23
2.4.3 Farmacocinética de las metilxantinas.....	24
2.4.4 Efectos de la cafeína.....	25
2.5 Teobromina.....	27
2.5.1 Usos benéficos de la teobromina.....	28
2.5.2 Toxicidad de teobromina	29
2.6 Receptores purinérgicos.....	30
2.6.1 Receptores de adenosina.....	31
2.6 Efectos de las metilxantinas en las enfermedades neurodegenerativas.....	33
3.0 JUSTIFICACION	37
4.0 HIPÓTESIS	37
5.0 OBJETIVOS	38
5.1 Objetivo general:.....	38
5.2 Objetivos particulares:	38
6.0 METODOLOGÍA	39
6.1 Modelo biológico.....	39
6.2 Elaboración de una bebida enriquecida con teobromina.....	41
6.3 Evaluación de la toxicidad de la teobromina.....	41
6.3.1 Pruebas de funcionamiento hepático.....	41

6.3.2 Pruebas de funcionamiento renal	42
6.4 Estabilidad de la teobromina.....	44
6.5 Inyección del fenotipo de β -Amiloide por un sistema estereotáxico.....	45
6.6 Análisis de comportamiento.....	46
6.6.1 Prueba de reconocimiento de objeto nuevo.....	46
6.7 Disección de tejido.....	47
6.8 Análisis del péptido A β 42 en corteza frontal por <i>Western Blot</i>	47
6.8.1 Extracción de proteínas a partir de tejido	47
6.8.2 Cuantificación de proteínas por método de <i>Bradford</i>	48
6.8.3 Electroforesis SDS-PAGE	49
6.8.4 <i>Western Blot</i>	49
6.8.5 Detección y revelado	50
7.0 RESULTADOS	51
7.1 Análisis bioquímicos para la evaluación de toxicidad de la teobromina.....	51
7.1.1 Pruebas de funcionamiento hepático.....	51
7.1.2 Pruebas de funcionamiento renal	54
7.2 Determinación de la estabilidad de la teobromina por un método en HPLC.....	56
7.3 Análisis de comportamiento.....	63
7.3.1 Evaluación de la memoria a corto plazo	64
7.4 Expresión de la placa senil amiloide en corteza frontal.	65
8.0 DISCUSIÓN	67
8.0 CONCLUSIONES	78
9.0 REFERENCIAS	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Lóbulos cerebrales.....	1
Figura 2 Ubicación del hipocampo.....	5
Figura 3 Clasificación de las neuronas según el número y distribución de sus prolongaciones.....	7
Figura 4 Proteínas TAU.....	14
Figura 5 Clasificación y estructura de los fármacos antagonistas de calcio.....	20
Figura 6 Estructura química de metilxantinas.....	24
Figura 7 Mecanismo de transducción de señal de los receptores P1.....	34
Figura 8 Gráfica resultante de la cuantificación sérica de TGO en grupos experimentales.....	53
Figura 9 Gráfica resultante de la cuantificación sérica de TGP en grupos experimentales.....	54
Figura 10 Gráfica resultante de la cuantificación sérica de urea en grupos experimentales.....	55
Figura 11 Gráfica resultante de la cuantificación sérica de creatinina en grupos experimentales.....	56
Figura 12 Curva de calibración de método de análisis en HPLC.....	58
Figura 13 Cromatograma de estándar de teobromina 10 mg/L.....	59
Figura 14 Cromatograma de estándar de teobromina 20 mg/L.....	60
Figura 15 Cromatograma de estándar de teobromina 30 mg/L.....	60
Figura 16 Cromatograma de estándar de teobromina 40 mg/L.....	61
Figura 17 Cromatograma de estándar de teobromina 50 mg/L.....	61
Figura 18 Cromatograma de estándar de teobromina 60 mg/L.....	62
Figura 19 Cromatograma de muestra de teobromina contenida en un recipiente ámbar (30 mg/L).....	63
Figura 20 Cromatograma de muestra de teobromina contenida en un recipiente traslúcido (30 mg/L).....	64
Figura 21 Índice de reconocimiento de objeto nuevo (IRON).....	66
Figura 22 Expresión de la placa amiloide en corteza frontal por <i>Western Blot</i>	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Fármacos hipolipidémicos.....	19
Tabla 2 Contenido de metilxantinas en producto de consumo humano.....	23
Tabla 3 Cuantificación de urea.....	43
Tabla 4 Determinación de creatinina.....	44
Tabla 5 Concentraciones utilizadas en la curva de calibración.....	45
Tabla 6 Determinación de curva de calibración para cuantificación de proteínas .	49
Tabla 7 Área bajo la curva dependiente de la concentración.....	57
Tabla 8 Cálculo de límites de cuantificación y detección	58

Dirección General de Bibliotecas UAO

1.0 INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un problema social y sanitario de dimensión pública que afecta tanto a los enfermos, como a su círculo familiar, y que además produce un impacto sobre el conjunto de la sociedad. Es la forma más común de demencia en la población mundial, su incidencia aumenta conforme a la edad. El 10 % de la población de 70 años de edad sufre un cuadro clínico de amnesia notable, del cual el 50 % de los casos totales son causados por la EA.

La amnesia es la pérdida de la memoria, cuyas causas son vulnerables a factores metabólicos nocivos como: convulsiones, hipoglucemia, eventos de hipoxia, así como cuadros neurodegenerativos. Sin embargo, la demencia puede incluir factores como la edad, país de origen, economía y hasta el acceso de la población al sistema de salud. Todos estos factores son importantes en el desarrollo de la EA.

La alteración morfológica y funcional de las células que forman el sistema nervioso, pueden tener un papel importante en la etiología de la EA, la cual se caracteriza por ser neurodegenerativa y progresiva.

El diagnóstico definitivo de la EA es en estado *post mortem* en el estudio cerebral, en donde se observan los daños de forma selectiva en regiones específicas como: neocorteza, hipocampo, núcleo amigdalino y tronco encefálico. Con las clásicas manifestaciones neuropatológicas de placas neuríticas y marañas neurofibrilares, caracterizadas por: la pérdida de neuronas colinérgicas, la acumulación de depósitos de proteínas extracelulares como placas seniles y las proteínas intracelulares.

El interés terapéutico por la demencia evolutiva aumenta con el paso de tiempo, cuando la sintomatología neurodegenerativa se presenta. Gracias al estudio fisiopatológico de la EA, se pueden enumerar ciertos factores específicos que pueden contribuir al posible tratamiento de la patología, sin embargo, se sigue estudiando aspectos etiológicos de la enfermedad.

En este trabajo se pretende estudiar el efecto de la teobromina, que es un derivado de las metilxantinas, encontradas en los granos de cacao. Dicha molécula se ha mostrado con propiedades de neuroprotección a cierta concentración. La utilización de esta concentración en formas farmacéuticas fáciles de administrar, estables y no tóxicas promete un futuro en la prevención de la EA.

2.0 ANTECEDENTES.

2.1 Generalidades del sistema nervioso

El sistema nervioso consiste en una red intrincada y altamente organizada de miles de millones de neuronas y de células gliales. Con un peso de sólo 2 kg, lo cual constituye alrededor del 3% del peso corporal. El sistema nervioso es uno de los más pequeños y más complejos de los sistemas del organismo, está compuesto de varios elementos celulares como tejidos de sostén o mantenimiento llamados neuroglia, un sistema vascular especializado y las neuronas que son células que se encuentran conectadas entre sí de manera compleja y que tienen la propiedad de generar, propagar, codificar y conducir señales por medio de gradientes electroquímicos, a nivel de la membrana axonal y de los neurotransmisores a nivel de sinapsis y receptores (Fox, 2014).

El sistema nervioso lleva a cabo diversas funciones complejas. Su función primordial es la de captar y procesar rápidamente las señales ejerciendo control y coordinación sobre los demás órganos, para lograr una adecuada, oportuna y eficaz interacción con los cambios del medio ambiente. Estas actividades diversas pueden ser agrupadas entre funciones básicas: sensitiva, integradora y motora.

Sensorial: Percibe los cambios (estímulos) internos y externos con los receptores u órganos receptivos. Los cambios incluyen una amplia gama de factores físicos como la luz, presión o concentración de sustancias químicas disueltas.

Integradora: Analiza la información sensorial y toma las decisiones apropiadas. Se activa o modifica por la información que está almacenada y se recupera de la memoria.

Motora: Provoca respuestas de músculos o glándulas. El sistema nervioso puede estimular músculos y glándulas para que actúen o inhibirlos (Berne y Levy, 2006).

2.1.1 Organización del sistema nervioso

El sistema nervioso de los seres humanos se conforma de distintos órganos, los cuales agrupan estaciones por donde pasan las vías neuronales. Para fines de estudio, estos órganos se pueden clasificar según su ubicación en dos componentes: Sistema Nervioso Central (SNC) y Sistema Nervioso Periférico (SNP).

El SNC es el encargado de recibir información y procesarla para controlar funciones corporales; está formado por el encéfalo (cerebro, cerebelo, tallo encefálico) y la médula espinal, se encuentra protegido por tres membranas, las meninges. En su interior existe un sistema de cavidades conocidas como ventrículos, por las cuales circula el líquido cefalorraquídeo (LCR) (Peate y Nair, 2011). El SNP está integrado por el conjunto de nervios que sale del encéfalo (nervios craneales) y de la médula espinal, los cuales se extienden por el resto del cuerpo para llevar señales a SNC.

En el SNC se encuentra la corteza cerebral en donde ocurre la percepción, la imaginación, el pensamiento, el juicio y la decisión. Consta de una serie de capas delgadas constituidas por sustancia gris, las cuales se encuentran por encima de una amplia colección de vías de sustancia blanca. Presenta surcos y circunvoluciones, lo que le permite aumentar su extensión. Se organiza en columnas o módulos verticales que permite la localización de las funciones cerebrales (Figura 1). El SNC se divide en cuatro porciones:

Lóbulo frontal: contiene principalmente la corteza motora primaria, en la cual se encuentran las neuronas que controlan los músculos del cuerpo. Está organizada en función de las partes del cuerpo.

Lóbulo parietal: aloja a la corteza somato-sensorial primaria, compuesta por neuronas relacionadas con el tracto, también se organiza en función de las partes del cuerpo.

Lóbulo occipital: contiene la corteza visual primaria, localizada en la parte inferior, procesa la información visual que llega de la retina.

Lóbulo temporal: contiene neuronas que captan cualidades sonoras en la corteza auditiva primaria. También contiene neuronas relacionadas con la comprensión del lenguaje, memoria y aprendizaje.

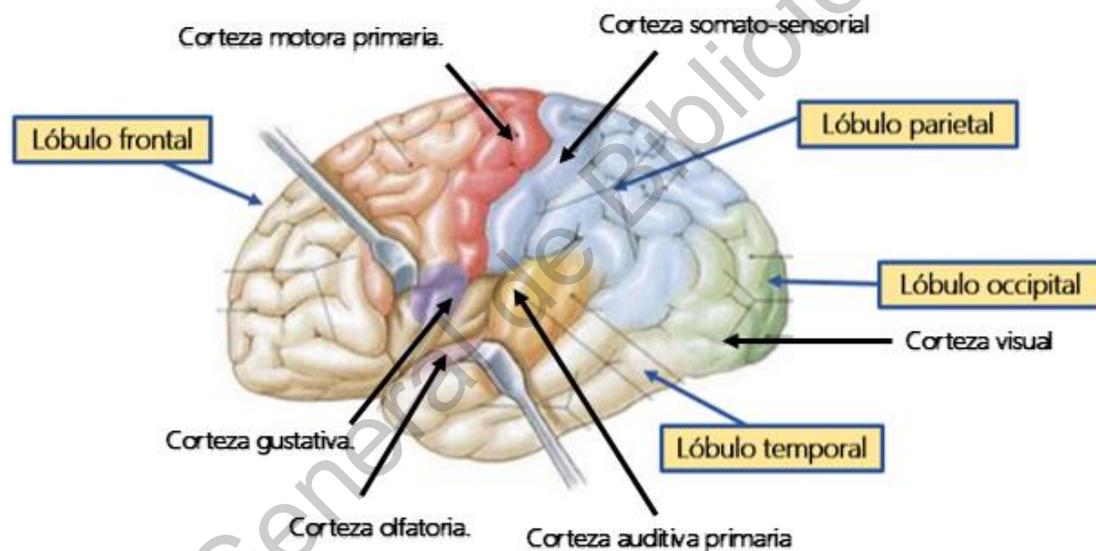


Figura 1 Lóbulos cerebrales.

En la parte inferior del lóbulo temporal, se encuentra un pequeño órgano conocido como “hipocampo” con forma curvada y alargada, el cual va desde el hipotálamo hasta la amígdala (figura 2). Por lo tanto, cada encéfalo tiene dos hipocamos: uno por cada hemisferio del cerebro, izquierdo y derecho (Quiroz, 2002).

El hipocampo forma parte del sistema límbico y está muy relacionado tanto con los procesos mentales asociados a la memoria, como con aquellos que tienen que ver con la producción y regulación de estados emocionales, además de intervenir en la

navegación espacial, es decir, el modo en el que nos imaginamos el movimiento a través de un espacio concreto. El hipocampo aporta el impulso que produce la traducción de la memoria a corto plazo, en memoria a largo plazo: es decir, el hipocampo transmite alguna señal o varias que parecen condicionar en la mente la repetición una y otra vez de la información nueva, hasta que tenga lugar su almacenamiento permanente. La consolidación a largo plazo de los recuerdos de tipo verbal o de pensamiento simbólico no tiene lugar si no existiera el hipocampo (Guyton y Hall, 2012).

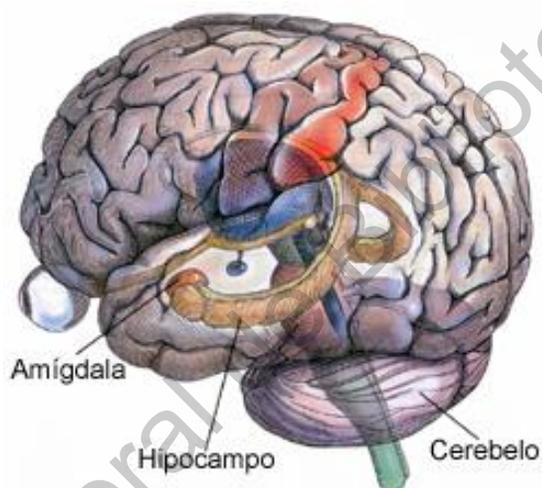


Figura 2 Ubicación del hipocampo.

2.1.2 Citología del sistema nervioso.

Tanto el hipocampo como el resto del sistema nervioso está constituido por dos tipos de células: las nerviosas (neuronas) y las de la neuroglia.

Las **neuronas** son responsables de la mayoría de las funciones propias del sistema nervioso, como la sensibilidad, el pensamiento, los recuerdos, el control de la actividad muscular y la regulación de la secreción glandular. Las neuronas tienen la capacidad de responder a un estímulo y convertirlo en un potencial de acción (excitabilidad eléctrica). Un potencial de acción (impulso nervioso) es una señal eléctrica que se propaga a lo largo de la superficie de la membrana plasmática de

una neurona; se inicia y se desplaza como consecuencia del movimiento de iones (Na^+ y K^+) entre el líquido intersticial y el interior de la neurona, a través de canales iónicos específicos en su membrana plasmática. Una vez que ha comenzado, un impulso nervioso se desplaza rápidamente y con una amplitud constante. (Peate y Nair, 2011).

Existen varios tipos de neuronas de función similar y se clasifican con base en su número de prolongaciones:

Unipolares (neurona sensorial): son aquellas en las que nace una sola prolongación que se bifurca y se comporta funcionalmente como un axón, salvo en sus extremos ramificados en que la rama periférica recibe señales y funcionan como dendritas y transmiten el impulso, sin que este pase por el soma neuronal.

Bipolares (interneurona): poseen un cuerpo celular alargado y de un extremo parte una dendrita y del otro el axón. El núcleo se encuentra ubicado en el centro de la célula, por lo que puede enviar señales hacia ambos polos de la misma.

Multipolares (motoneurona): cuentan con una gran cantidad de dendritas que nacen del cuerpo celular. Representa a la clásica neurona con prolongaciones pequeñas y una prolongación larga (axón).

Piramidales: el axón y la dendrita se fusionan en una sola prolongación que posteriormente se bifurca (figura 3) (Tortora y Derrickson, 2006).

Generalmente, las neuronas reciben información en las pequeñas prolongaciones conocidas como dendritas y transmiten dicha información a lo largo de su axón. La comunicación neuronal se da por el proceso de sinapsis, en la cual se liberan neurotransmisores (sinapsis química), de la parte terminal del axón de la primera neurona, que se une con moléculas receptoras en la superficie de la segunda neurona (célula muscular/glandular) (Patestas y Gartner, 2008).

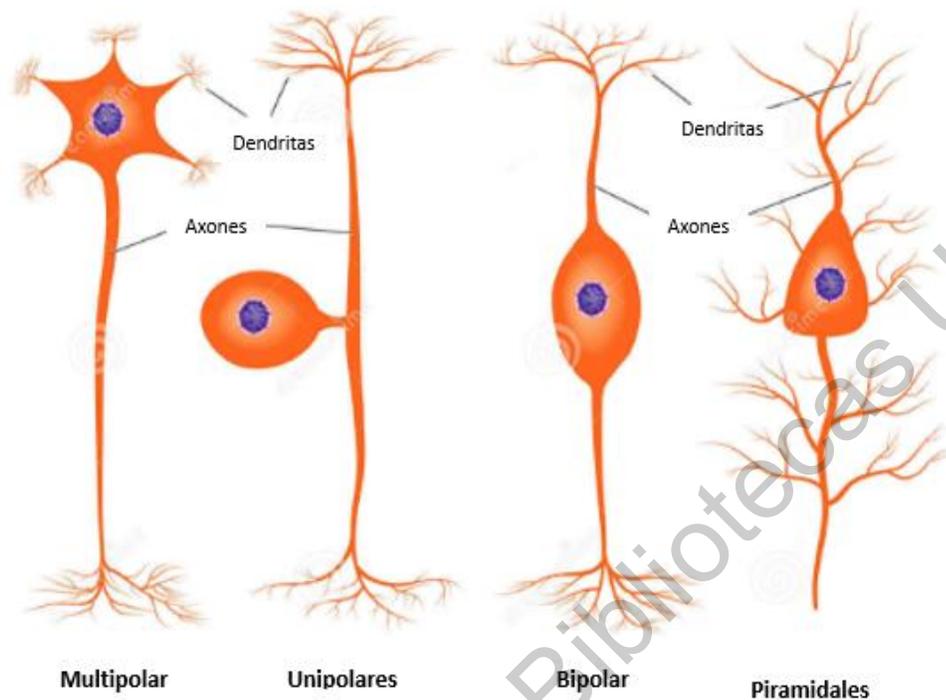


Figura 3 Clasificación de las neuronas según el número y distribución de sus prolongaciones.

Además de las neuronas, las **células gliales** son el otro tipo de células que conforman el SNC y éstas pueden ser clasificadas, sobre la base del tamaño, las prolongaciones citoplasmáticas y la organización intracelular, en cuatro tipos: astrocitos, oligodendrocitos, microglía y células endoteliales.

- **Astrocitos.** Son las células más largas y numerosas de la neuroglia. Tienen forma de estrella debido a sus múltiples prolongaciones celulares. Existen dos tipos: astrocitos protoplasmáticos (prolongaciones cortas ramificadas en sustancia gris) y astrocitos fibrosos (prolongaciones largas no ramificadas en sustancia blanca). Entre las funciones de los astrocitos están:
 - Presentan microfilamentos que les confieren una resistencia considerable y les permite sostener a las neuronas.
 - Las proyecciones de los astrocitos que envuelven a los capilares sanguíneos, aíslan a las neuronas del SNC de diferentes sustancias

potencialmente nocivas de la sangre, mediante la secreción de compuestos químicos que mantienen las características exclusivas de permeabilidad, que tienen las células endoteliales de los capilares.

- Participan en la formación de la barrera hematoencefálica que restringe el paso de sustancias entre la sangre y el líquido intersticial del SNC.
 - En el embrión, los astrocitos secretan sustancias químicas que aparentemente regulan el crecimiento, la migración y la interconexión entre las neuronales cerebrales.
 - Colaboran a mantener las condiciones químicas propias para la generación de impulsos nerviosos.
 - Contribuyen en el aprendizaje y la memoria por medio de la influencia que ejercen sobre la formación de las sinapsis.
- **Oligodendrocitos.** Células similares a los astrocitos, pero más pequeñas y menor cantidad de prolongaciones. Responsables de la formación y mantenimiento de la vaina de mielina (cubierta lipídica y proteica que aumenta velocidad de transmisión de impulsos nerviosos), que se ubica alrededor de los axones del SNC.
- **Microglia.** Células pequeñas y con escasas prolongaciones que emiten numerosas proyecciones con forma de espinas. Cumple funciones fagocíticas, elimina dendritas celulares, que se forman durante el desarrollo normal del sistema nervioso y fagocitan microorganismos y tejido nervioso dañado.
- **Células endimarias.** Tienen forma cuboide o cilíndrica, las cuales tapizan los ventrículos cerebrales y el conducto central de la médula espinal. Producen y contribuyen a la circulación del LCR y también forman parte de la barrera hematoencefálica (Tortora y Derrickson, 2006).

Por otro lado, las células de la glía del SNP rodean por completo a los axones y a los cuerpos celulares. Los dos tipos de células gliales del SNP son:

- **Células de Schwann.** Estas células rodean a los axones del SNP. Como los oligodendrocitos, forman la vaina de mielina que envuelve a los axones en el SNC. Sin embargo, un solo oligodendrocito mieliniza a varios axones, mientras que cada célula de Schwann mieliniza a un único axón. Participan también en la regeneración axónica.
- **Células Satélite.** Son células de forma aplanada que rodean a las neuronas de los ganglios del SNP. Además de proporcionar soporte estructural, las células satélites también regulan el intercambio de sustancias entre los cuerpos de las neuronas y el líquido intersticial. (Tortora y Derrickson, 2006).

2.2 Memoria y anatomía funcional

La memoria es una función compleja del sistema nervioso en que participan algunos elementos de almacenamiento de capacidad y duración diferente. Se divide en tres tipos principales:

- Funcional o inmediata.
- Episódica.
- Largo plazo o memoria remota.

La **memoria funcional o inmediata** dura menos de 30 s y es escasa su capacidad de almacenamiento. Es muy vulnerable a la distracción y obliga a concederle atención y vigilar que no se pierda. Durante las tareas de memoria reciente, se activa el sistema de activación reticular y las redes de los lóbulos prefrontal y parietal.

La **memoria episódica** dura minutos a meses o incluso años y aporta información en cuanto a “qué”, “dónde” y “cuándo”. Las personas sanas acumulan durante todo el día múltiples recuerdos episódicos, que podrán actualizar durante toda su vida,

en relación con experiencias previas. Al incorporarse a este “depósito” de la memoria, la información pasa por un proceso de consolidación. Hay mayor posibilidad de que se consoliden hechos significativos, en forma de un rasgo más permanente. El complejo del hipocampo es de gran importancia para la memoria episódica, y nuevas memorias o recuerdos episódicos se acompañan de cambios fisiológicos en la sinapsis en esa región encefálica. Los recuerdos episódicos se tornan independientes del complejo de hipocampo y se desplazan a la neocorteza. La memoria episódica requiere de la participación del núcleo dorsomedial del tálamo (dañado en la deficiencia de tiamina) y de la parte media de los lóbulos temporales, incluidos el hipocampo y la corteza adyacente. Las lesiones unilaterales del lóbulo temporal, producen una amnesia de intensidad de leve a moderada, mientras que las lesiones bilaterales, producen un trastorno del lenguaje anterógrado grave, es decir, una incapacidad para formar nueva memoria episódica manteniendo la capacidad de recordar la antigua.

La **memoria remota o a largo plazo** almacena información que dura semanas o toda la vida, y contiene gran parte de las experiencias y conocimiento del individuo. Al parecer algunos datos o información son almacenados con exactitud por tiempo indefinido, en tanto que otros poco a poco se distorsionan. Para el almacenamiento más permanente de palabras, fechas, hechos históricos o nombres, se necesita la participación de la corteza del lóbulo temporal anterior izquierdo. La memoria remota o a largo plazo necesita de síntesis de nuevas proteínas, y en el proceso de estabilización quizá intervienen cambios físicos en las sinapsis neuronales. La potenciación a largo plazo (LTP) hace referencia a un refuerzo duradero de la transmisión sináptica, que se produce por la estimulación repetida de sinapsis excitadora. La LTP se produce en el hipocampo, está mediada por los receptores del N-metil-D-aspartato (NMDA), y puede servir como base molecular del almacenamiento de la memoria a largo plazo (Fox, 2014).

La función de la memoria incluye el registro (codificación o adquisición), la retención (almacenamiento o consolidación), la estabilización (consolidación) y la recuperación (decodificación o recordación). El registro y la recuperación son

fenómenos conscientes. El proceso de codificación depende de los lóbulos frontales y del complejo del hipocampo, en tanto que el de recuperación obliga a usar los lóbulos frontales. El complejo mencionado es vulnerable a factores metabólicos nocivos como convulsiones, hipoglucemia, hipoxia y cuadro neurodegenerativos, y ello explica por qué los déficit episódicos de la memoria o lapsos de amnesia son los déficit cognitivos más comunes que aparecen después de esos trastornos.

Se pueden utilizar otros términos para clasificar los tipos de memoria, como los siguientes:

- La **memoria semántica** contiene hechos, principios, asociaciones y normas inmutables (por ejemplo, el número de días de la semana). El daño de la neocorteza temporal anterior hará que se pierda la memoria semántica.
- La **memoria declarativa o explícita** incluye hechos del mundo y hechos personales pasados que deben ser recuperados conscientemente para su recordación. En este sentido el prototipo sería la memoria episódica.
- La **memoria procedural o implícita** interviene en el aprendizaje y la retención de una capacidad o técnica, como montar en bicicleta, vestirse o conducir un vehículo. Las capacidades almacenadas en la memoria procedural terminan siendo automáticas y no necesitan un elemento consciente para ser actualizadas.

La memoria de procedimiento implica a áreas fuera del hipocampo, como los ganglios basales, el cerebelo y la corteza sensitiva (Hauser, 2007).

El término función ejecutiva denota la actividad psíquica que interviene en la conducta de planificación, comienzo y regulación. Se ha considerado como la función organizadora central del encéfalo, que origina actividad sistemática dirigida a objetivos y depende enormemente de la memoria “funcional” o inmediata. Las funciones ejecutivas intervienen en situaciones en que no es adecuado el comportamiento reflejo o automático y en ellas intervienen los lóbulos frontales. En los individuos con demencia senil surge a menudo déficit en la función ejecutiva.

Existen diferentes padecimientos que causan demencia, la aparición de éstos depende de muchos factores como edad, país de origen y acceso de la población al sistema de atención médica y quizá las raíces raciales o étnicas (Ramírez-Díaz *et al.*, 2011).

2.3 Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia en países del mundo occidental; su incidencia aumenta con la edad, alrededor del 10% de la población de 70 años en adelante muestra amnesia notable y en más de la mitad de los casos, tal deficiencia es causada por la EA. Sin embargo, la enfermedad puede aparecer en cualquier decenio de la vida adulta.

La alteración morfológica y funcional de las células que forman el sistema nervioso pueden tener un papel importante en la etiología de la EA, la cual se caracteriza por ser neurodegenerativa y progresiva, con deterioro funcional, así como la disminución de la cantidad de neuronas, que da como resultado la pérdida progresiva de la memoria y otras funciones cognitivas, produciendo demencia con evolución lenta, que dura varios años (Götz *et al.*, 2012).

El diagnóstico definitivo de la EA se da en estado *post mortem* en el estudio cerebral, en donde se observan los daños de forma selectiva en regiones específicas como: la neocorteza, el área entorrinal, el hipocampo, el núcleo amigdalino, el núcleo basal, el tálamo anterior y varios núcleos monoaminérgicos del tronco encefálico, con las clásicas manifestaciones neuropatológicas de placas neuríticas y marañas neurofibrilares (Ramírez-Díaz *et al.*, 2011); éstas se caracterizan por:

- Pérdida de neuronas colinérgicas (neuronas del SNA que segregan acetilcolina como neurotransmisor) y de otros tipos en el hipocampo y la corteza cerebral.
- Acumulación de depósitos de proteína extracelulares conocidos como placas seniles.
- Acumulación de proteínas intracelulares que forman marañas neurofibrilares.

En la EA, una proteína precursora amiloide (APP) puede ser desintegrada por la β -secretasa y después por la γ -secretasa hacia péptidos llamados amiloide- β ($A\beta$). Los péptidos $A\beta$ pueden asociarse hacia dímeros y oligómeros, y después crecer hacia fibras en forma de láminas con plegamiento β que componen las placas seniles amiloides. La evidencia sugiere que son los dímeros y oligómeros solubles de la forma de $A\beta$ de 42 aminoácidos de largo, más que las placas, lo que causa el padecimiento (Mendiola-Précoma *et al.*, 2017).

Aunque los oligómeros $A\beta$ son tóxicos por sí mismos, su capacidad completa para causar EA depende de la proteína tau. Las proteínas tau normales se unen a microtúbulos en axones y los estabiliza (figura 4). En EA, las proteínas tau quedan excesivamente fosforiladas y *redistribuidas* hacia el cuerpo celular de la neurona y las dendritas; ahí se agregan entre sí y se hacen insolubles, lo cual forma las marañas neurofibrilares. Estos cambios parecen ser impulsados por $A\beta$. Evidentemente no son las marañas neurofibrilares, sino más bien, las formas intermedias más solubles de tau que producen efectos tóxicos (Ward *et al.*, 2012).

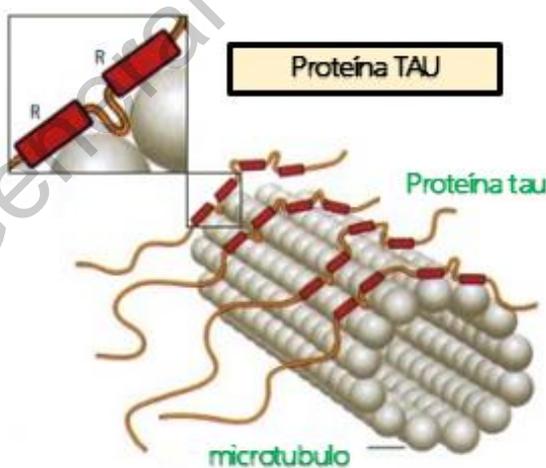


Figura 4 Proteínas TAU.

Los cambios tóxicos en la EA comprenden la pérdida de sinapsis y espinas dendríticas, capacidad reducida para producir potenciación a largo plazo (LTP), excitotoxicidad que causa apoptosis de neurona, así como liberación mitocondrial

de especies reactivas de oxígeno que producen estrés oxidativo y apoptosis (Prasanthi *et al.*, 2010).

Las personas con un alelo particular del gen que codifica para la apolipoproteína E (proteína transportadora de colesterol activa en el cerebro) tienen más probabilidades de presentar EA. Una copia única de este alelo "APOε4", incrementa el riesgo por un factor de 4 y dos copias de este alelo aumentan el riesgo por un factor de 19. Más de 60 % de las personas con EA tiene al menos una copia del alelo APOε4.

2.3.1 Tipos de enfermedad de Alzheimer

La EA con base en la edad de aparición, se puede clasificar en:

- **Presenil, temprana o de inicio precoz**, generalmente con clara relación familiar. Comienza antes de los 65 años, es de curso más rápido y no supera el 1% de los casos en la mayoría de las estadísticas.
- **Senil, tardía, de inicio tardío**, aparece después de los 65 años, en su mayor parte es esporádica y de curso lento. Este tipo representa más del 98 % de los casos.

Según la implicación que tenga el factor genético, la EA puede ser:

- **Familiar**, cuya causa es la alteración en algunos genes que se heredan de forma dominante produciendo alteraciones similares en los descendientes que van a provocar EA, coinciden en la mayoría de los casos con la EA presenil. Este tipo se debe principalmente a mutaciones en tres genes principalmente: el gen de la Proteína Precursora Amiloide (APP) situado en el cromosoma 21; el gen de la Presenilina 1 (PS1), en el cromosoma 14; y el gen de la Presenilina 2 (PS2), en el cromosoma 1.

- **Esporádica.** Coincide generalmente con los casos de EA senil, comienza en personas mayores de 65 años y es el tipo más común. Cuenta con múltiples factores de riesgo de diferente naturaleza como el envejecimiento, factores medio ambientales y susceptibilidad de genes, como es la presencia del alelo 4 de la apolipoproteína E (ApoE), localizado en el cromosoma 19.

La ApoE es el factor de riesgo genético más ampliamente estudiado para la EA. Es producida por el hígado, los macrófagos y el SNC. En el SNC es producido por astrocitos y microglía. Sin embargo, la expresión neuronal de ApoE puede ser inducida en respuesta al estrés o daño neuronal en ciertas condiciones patológicas. La ApoE está implicada en la homeostasis lipídica que unen y transportan lípidos a través del sistema linfático y circulatorio. Es el principal transportador de colesterol en el SNC. Por otro lado, los principales factores de riesgo metabólicos y no genéticos incluyen hipercolesterolemia, obesidad, hiperhomocisteinemia, hipertensión y DM2. (Mendiola-Précoma *et al.*, 2016).

2.3.2 Tratamientos de la enfermedad de Alzheimer

Los fármacos disponibles actualmente para tratar la EA son:

- Inhibidores de acetilcolinesterasa. De modo que la acetil-colina (Ach) liberada por las neuronas colinérgicas sobrevivientes puede ser más eficaz.
- Un antagonista de glutamato. A fin de reducir su capacidad para promover excitotoxicidad.
- Fármacos para tratar depresión.

Otros medicamentos que explotan el entendimiento creciente de la EA se encuentran en estudios clínicos. Por lo que se recomienda mantener actividad mental y física (para construir una “reserva cognitiva” y para promover la salud neuronal), consumir una dieta con restricción de calorías y grasa, ya que los altos niveles de colesterol plasmático, obesidad y la diabetes tipo 2 son factores de riesgo

para la EA, por lo que estas personas deben consumir una dieta rica en frutas y verduras para proporcionar antioxidantes al organismo.

El principal objetivo del tratamiento para EA está basado en la hipótesis de la cascada amiloide. Las investigaciones actualmente implican nuevos fármacos dirigidos a moduladores de secretasa, inmunoterapia, aglutinantes de amiloide, agentes quelantes de metales, agentes anti-inflamatorios, antioxidantes y agentes neuroprotectores (Mendiola-Précoma *et al.*, 2016).

2.3.2.1 Fármacos inhibidores de acetilcolinesterasa

La acetilcolina está formada por dos componentes, acetato y colina, los cuales se unen mediante la acción de la acetiltransferasa de colina (o acetilcolina transferasa) en las terminales nerviosas. La enzima acetiltransferasa es sintetizada en el cuerpo de la neurona y es transportada mediante flujo axoplásmico a los terminales, donde se activa. La colina es sintetizada en primer lugar en el hígado y es transportada a otros órganos por vía sanguínea. La colina libre se capta específicamente en las terminales nerviosas colinérgicas, mediante una bomba de alta afinidad, dependiente de sodio. La colina está presente en el espacio extracelular, como resultado de la hidrólisis externa de la acetilcolina previamente liberada. El acetato se deriva de la glucosa por la vía del piruvato y del complejo piruvato deshidrogenasa mitocondrial, que genera acetil CoA. La acetilcolina transferasa es una proteína globular que se encuentra en el cerebro. La regulación de la síntesis se debe al hecho de que la bomba de colina de alta afinidad resulta inhibida por un exceso de acetilcolina y acelerada por bajos niveles. Por acción de la acetilcolinesterasa, la acetilcolina es hidrolizada rápidamente por un proceso sucesivo de acetilación de la enzima, separación de la colina y separación del grupo acetilo.

Por definición, los inhibidores de la acetilcolinesterasa intervienen en este proceso, al interactuar con la enzima e inactivarla. De la intensidad con que se fijan a la enzima y de la rapidez con que revierte espontáneamente dicha fijación, dependen la intensidad y la duración de la acción colinesterásica. Las acciones farmacológicas

derivan de la inactivación de la acetilcolina, en los sitios donde esta se libere fisiológicamente, tanto en el SNCl, como en las terminaciones nerviosas periféricas, somáticas o vegetativas (Lorenzo, 2015).

De manera que puede producir efectos adversos, debido a diferentes mecanismos:

- Estimulación de los receptores muscarínicos de los órganos efectores vegetativos.
- Estimulación, seguida de depresión o parálisis de todos los ganglios vegetativos y de la musculatura esquelética por acción nicotínica.
- Estimulación con depresión posterior ocasional, de receptores colinérgicos centrales.

Algunos de los efectos en el sistema nervioso central son: desincronización del electroencefalograma, activación generalizada y aumento de la situación de vigilia. Este efecto es el que se aprovecha para el tratamiento de EA, donde la actividad colinérgica está disminuida por la pérdida de neuronas de este tipo.

Los inhibidores de la colinesterasa retrasan la inactivación de la acetilcolina después de su liberación sináptica, y representan el único tratamiento aprobado que resulta en beneficio clínico significativo. Hay cuatro inhibidores de la colinesterasa disponibles para el tratamiento de la EA: tacrina, donepezilo, galantamina y rivastigmina (Sun *et al.*, 2012).

2.3.2.2 Fármacos hipolipidémicos

La expresión de ApoE puede dar lugar a la deposición de A β y la formación de placas amiloides. Hoy en día, el uso de isómeros de ApoE puede reducir eficazmente la formación de placas amiloides (Tabla 1).

Tabla 1 Fármacos hipolipidémicos.

Fármacos y dosis	Clase de lipoproteína afectada	Efectos secundarios comunes.	Contraindicaciones
Derivados de ácido fibríco.	↑ o ↓ LDL	↓ absorción de otros fármacos.	Enfermedad hepática o biliar e insuficiencia renal asociada a alto riesgo de miositis.
- Genfibrozilo, 600 mg cada 12 horas.	↓ TG 20 a 50%	↑ Cálculos biliares, dispepsia, disfunción hepática y mialgias.	
- Fenofibrato, 145 mg cada 24 h	↑ HDL 10 a 20%		
Aceites de pescado, 3 a 6 gramos cada 24 h	↓ TG 5 a 10%	Dispepsia, diarrea.	

Abreviaturas. HDL, Lipoproteína de alta densidad; LDL, Lipoproteínas de baja densidad; TG, Triglicéridos;

2.3.2.3 Fármacos anti-A β

Se ha encontrado que la sobreproducción de A β resulta en un efecto neurotóxico sobre las neuronas. Lo que provoca la disfunción sináptica, la formación de los ovillos fibrilares intraneuronales y finalmente, la pérdida de neuronas. El A β depositado puede causar la retracción de las neuritas y la desnaturalización de las neuronas. A β puede actuar sobre los canales de calcio en la membrana celular, potenciar el flujo de Ca²⁺ y conducir al desequilibrio de calcio. Los fármacos anti-A β pueden ser los medicamentos más eficaces para el tratamiento de la EA, como antagonistas de calcio.

2.3.2.4 Antagonistas de calcio

La concentración de Ca^{2+} en el medio extracelular es más alta que el medio intracelular. El Ca^{2+} es un segundo mensajero en el organismo para la transducción de señales. La proteína A β actúa sobre los canales de calcio en la membrana celular, mejorando la entrada de Ca^{2+} , lo que conduce al desequilibrio de calcio. Una sobrecarga de Ca^{2+} intracelular afectará la capacidad del ciclo de Ca^{2+} en las mitocondrias, por lo que induce a apoptosis (Alberts *et al.* 2010).

La alteración en la homeostasis de calcio puede llevar a distintos efectos secundarios tales como: peroxidación de lípidos y la generación de radicales libres. Con el tiempo, estas acciones relacionadas de A β reducirán la integridad sináptica. Una sobrecarga o insuficiencia de calcio en las células nerviosas afecta a la producción, la transmisión y la liberación de neurotransmisores (Sun *et al.*, 2012).

Algunos medicamentos utilizados para el tratamiento de la EA como antagonistas de calcio se muestran en la Figura 5.

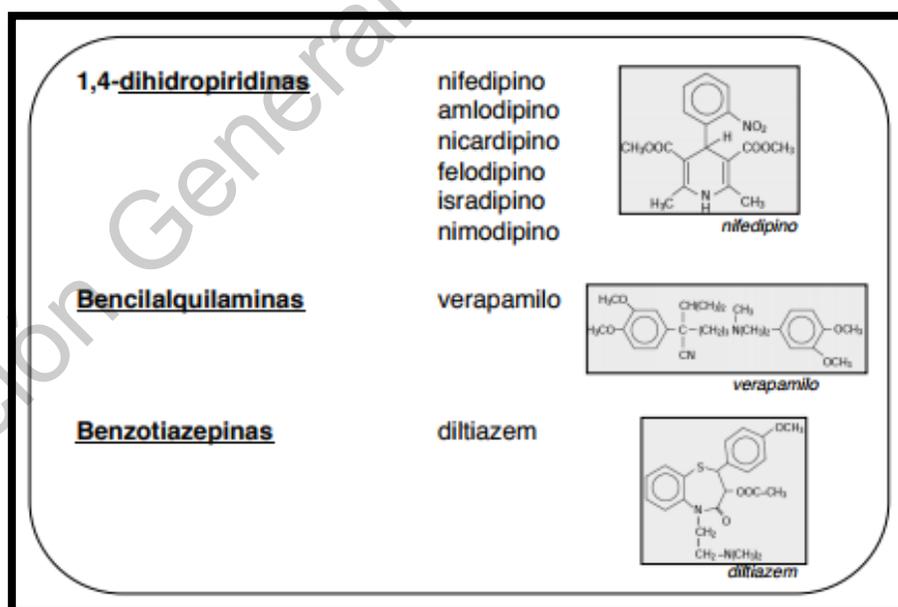


Figura 5 Clasificación y estructura de los fármacos antagonistas de calcio.

2.3.2.5 Agentes antioxidantes

Un antioxidante puede ser cualquier molécula capaz de prevenir o retardar la oxidación (pérdida de uno o más electrones) de otras moléculas, generalmente sustratos biológicos como lípidos, proteínas o ácidos nucleicos. La oxidación de tales sustratos podrá ser iniciada por dos tipos de especies reactivas: los radicales libres, y aquellas especies que sin ser radicales libres, son suficientemente reactivas para inducir la oxidación de estos sustratos. Un radical libre es cualquier especie (átomo, molécula o ion) que contenga por lo menos un electrón desapareado en su orbital más externo, y que sea a su vez capaz de existir en forma independiente (de ahí el término libre) (Mark Berg *et al.*, 2007).

Mediante las propiedades de los antioxidantes, se puede prevenir la degeneración de las células nerviosas mediante la eliminación de especies reactivas de oxígeno o la prevención de la generación de éstos. La vitamina E es el antioxidante más utilizado en la EA por sus propiedades en la prevención de la oxidación. Mediante investigaciones realizadas, se ha observado que el tratamiento con vitamina E disminuye y atenúa la muerte celular inducida por la toxicidad A β en células de neuroblastoma.

Existen otros fármacos antioxidantes clínicos utilizados como selegilina y la melatonina. La selegilina es un antioxidante selectivo de la monoamino oxidasa y ayuda un poco para mejorar la cognición, el comportamiento y estado de ánimo de los pacientes. La melatonina funciona en la regulación de los ritmos circadianos, reduciendo los radicales libres, la mejora de la inmunidad y en general la inhibición de la oxidación de biomoléculas. También tiene una acción significativa anti-amiloidogénica. Se evita fibrologénesis de A β mediante la interrupción del puente de sal imidazol-carboxilo de metilo.

2.4 Metilxantinas

Entre las moléculas que pueden participar en la neuroprotección del SNC se encuentran las metilxantinas, las cuales representan un grupo de alcaloides

estimulantes del Sistema Nervioso Central (SNC). La cafeína, teofilina y la teobromina son los miembros más conocidos de esta familia de compuestos que son consumidos por casi todo el mundo. Durante siglos las bebidas de cola (las cuales frecuentemente poseen cafeína), estuvieron entre los primeros analgésicos prescritos, cuando las herramientas farmacológicas eran virtualmente inexistentes.

En las poblaciones de diferentes países, culturas, razas, edades y géneros, entre otros, se consumen inadvertidamente metilxantinas en el café, el cacao o las bebidas de cola. Las razones detrás de estos hábitos transversales no están relacionadas con la palatabilidad, ya que las metilxantinas en las infusiones de café, té o cacao, no son agradables a nuestro sentido del gusto, por lo que se agrega azúcar o edulcorantes, para aumentar la palatabilidad de estas bebidas. Es más común el uso de metilxantinas por sus propiedades psicoactivas, lo que resulta en una mejor vida cotidiana, pero sin las reacciones adversas de las drogas de abuso (Li *et al.*, 2015).

En dosis moderadas las metilxantinas producen una mejora del rendimiento tanto mental y como físico y reducen el cansancio y el sueño. En un consumo excesivo pueden producir ansiedad y euforia, así como trastornos del sueño. Incluso con un consumo moderado la cafeína puede actuar como estímulo discriminativo. Fisiológicamente, la cafeína aumenta la presión arterial, la frecuencia respiratoria y la diuresis. Produce dependencia física leve y también síndrome de abstinencia. En el SNC la cafeína es un bloqueador no específico de los receptores de adenosina A1 (Moratalla, 2008).

La ingesta de café fue prohibida durante décadas en el siglo XX para los pacientes de casi cualquier enfermedad y hoy día, el uso de metilxantinas es reconocido como uno de los hábitos más inocuos (con pocas excepciones, como la ingesta en pacientes que sufren de ansiedad).

Datos epidemiológicos sólidos muestran que el consumo de metilxantinas puede prevenir enfermedades graves como la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer, así como a la diabetes Mellitus de tipo II (DM2), por lo que estos

alcaloides se consideran agentes preventivos de dichas enfermedades (Oñatibia-Astibia *et al.*, 2017).

2.4.1 Estructura química.

Las xantinas cafeína, teofilina y teobromina son indiscutiblemente los psicoestimulantes más utilizados en todo el mundo. Las xantinas, en una u otra forma, se han utilizado desde la antigüedad, de ahí sus nombres: teofilina (hoja divina) y teobromina (alimento de los dioses). La mayor fuente de cafeína se obtiene de las semillas de la planta *Coffea arabica*, mientras que las hojas de té, de la planta *Thea sinensis*, contienen cafeína y teofilina. Las semillas de cacao *Theobroma cacao*, además de contener teobromina también contienen cafeína, aunque en menores cantidades que las semillas de la planta del café (Tabla 2). Las metilxantinas provienen de plantas de donde se extraen y son distribuidas para la elaboración de productos en el mercado. Las bebidas preparadas con ellas (café, té, chocolate, guaraná o mate) representan las drogas más utilizadas por el hombre en la vida cotidiana.

Tabla 2 Contenido de metilxantinas en productos de consumo humano.

Fuentes	Cafeína	Teobromina	Teofilina
Bebidas:			
- Café	80-100 mg/taza		
- Café descafeinado	3 mg/taza		
- Té	28 mg/taza		
- Chocolate	30 mg/taza	300-400 mg/onza	<10 mg/taza
- Refrescos de cola.	30-50 mg/lata		
Chocolates:			
- Puro	35 mg/onza		
- Con leche.	6 mg/onza		

Varias estadísticas apuntan que el consumo diario de café por la población adulta es de aproximadamente 300 mg por persona. Sin embargo, su ingesta puede aumentar considerablemente en consumidores compulsivos. Incluso los niños

pueden ingerir cantidades considerables de cafeína, principalmente a través del consumo de refrescos con cafeína.

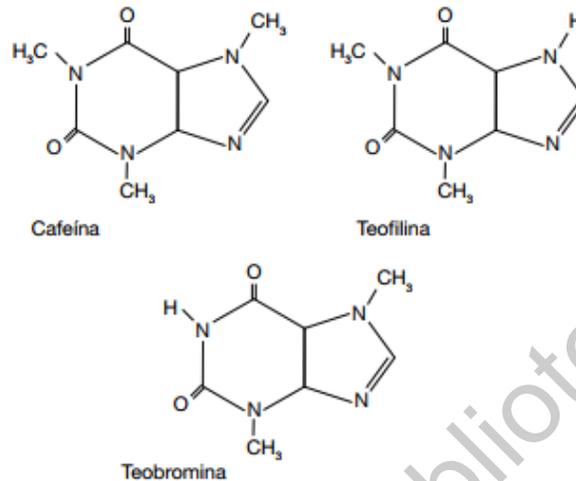


Figura 6 Estructura química de metilxantinas.

Estructuralmente, las xantinas son derivados purinérgicos formados por los heterociclos pirimidina e imidazol condensados, dando lugar a las metilxantinas, **cafeína** (1,3,7 trimetilxantina), **teofilina** (1,3 dimetilxantina) y **teobromina** (3,7 dimetilxantina) (Figura 6). Las sales que forman estos compuestos son fácilmente solubles (Moratalla, 2008).

2.4.2 Efectos benéficos de las metilxantinas

Los efectos farmacológicos de las xantinas son muy similares entre sí, debido a la analogía química. En mamíferos, las metilxantinas actúan a través de una variedad de mecanismos moleculares diferentes:

- Movilización del calcio intracelular.
- Inhibición de las fosfodiesterasas (PDE).
- Modulación de los receptores del ácido gamma-amino butírico (GABA A).
- Inhibición de los transportadores de nucleótidos cíclicos dependientes de ATP de alta afinidad.

- Antagonismo de los receptores de adenosina.

Los niveles plasmáticos que podrían alcanzarse bajo los regímenes dietéticos y el hecho de que las metilxantinas cruzan fácilmente la barrera hematoencefálica, indican que estos fármacos inhiben los receptores de adenosina en el sistema nervioso central (SNC), lo que provoca la existencia de los efectos estimulantes de las metilxantinas, como producto de la interacción con receptores adenosina, molécula activa de la membrana celular y componente esencial para la energía de la célula: el adenosin trifosfato (ATP) (Brailowsky *et al.*, 2008).

Sin embargo, pueden requerirse dosis más elevadas para movilizar el calcio intracelular, inhibir las PDE o modular los receptores GABA A, o inhibir selectivamente los transportadores ABCC5 y ABCC4. Además, a pesar de la relevancia fisiológica, la cafeína, la teobromina y la teofilina son capaces de interactuar con el ADN helicoidal nativo (Moratalla 2008).

Estudios en neonatos que recibieron metilxantinas para tratar alteraciones broncopulmonares, mostraron que la concentración de cafeína en la saliva y en el plasma se correlaciona según su farmacocinética en ambos fluidos. La penetración diferencial en el cerebro humano y las dificultades para evaluar el metabolismo *in vivo* en el SNC humano hacen difícil demostrar el modo de acción específico de cada metilxantinas y cada metabolito para lograr una neuroprotección total (Oñatibia-Astibia *et al.*, 2017). El consumo de la cafeína (como metilxantina) también ha sido propuesto como un factor neuroprotector en el desarrollo de la EA (Marques *et al.*, 2011).

2.4.3 Farmacocinética de las metilxantinas

La farmacocinética de las metilxantinas juega un papel importante para abordar adecuadamente el modo de acción de los fármacos y debe considerarse que existen diferencias en el metabolismo de las metilxantinas en los modelos animales y en el hombre. La paraxantina es el principal metabolito de la cafeína en los seres humanos; aproximadamente el 80% de la cafeína se transforma en paraxantina,

que puede llegar incluso a niveles plasmáticos más altos que la propia cafeína, debido a su vida media más larga (Wyska *et al.*, 2010).

La cafeína, como derivado de metilxantinas, se absorbe rápidamente en el sistema gastrointestinal y se distribuye en la sangre y los tejidos del cuerpo; 45 minutos después de la ingestión, la absorción de cafeína está prácticamente completa. Es importante destacar que la cafeína puede atravesar la barrera hemato-encefálica y entrar al cerebro mediante una difusión simple o facilitada; La teofilina y la teobromina también puede penetrar en el SNC (Machnick *et al.*, 2016).

2.4.4 Efectos de la cafeína.

La cafeína es un alcaloide xantina, sólido cristalino, blanco y de sabor amargo, que actúa como una droga psicoactiva, levemente disociativa y estimulante por su acción antagonista no selectiva de los receptores de adenosina. La cafeína fue descubierta en 1819 por el químico alemán Friedrich Ferdinand Runge: fue él quien acuñó el término Kaffein, un compuesto químico presente en el café, término que pasaría posteriormente al español como cafeína. (Levounis *et al.*, 2017).

La cafeína recibe también otros nombres (guaranina, teína, mateína) relativos a las plantas de donde se puede extraer y porque contiene otras sustancias que aparecen en esos casos. La denominada guaranina de la guaraná, y la teína del té, son en realidad la misma molécula de cafeína, hecho que se ha confirmado en análisis de laboratorio. Estas plantas contienen algunos alcaloides adicionales, como los estimulantes cardíacos teofilina y teobromina y a menudo otros compuestos químicos como polifenoles, que pueden formar complejos insolubles con la cafeína (Levounis, *et al.*, 2017).

La cafeína es el componente principal del café y el psicoestimulante más consumido en el mundo y en dosis no tóxicas actúa como un antagonista no selectivo del receptor de la adenosina. La evidencia epidemiológica sugiere que el consumo de cafeína reduce el riesgo de varias enfermedades neurológicas y neurodegenerativas. Estudios epidemiológicos indicaron que la cafeína está

inversamente relacionada con la EA. De acuerdo con estos datos, el tratamiento a largo plazo de cafeína en ratones transgénicos de EA, reduce la producción de proteína β -amiloide (Boison, 2008), la cual fue cuantificada mediante la técnica de ELISA. El bloqueo de los receptores A_{2A} con cafeína impide el deterioro inducido por β -amiloide, por lo que aumenta el rendimiento cognitivo.

A pesar de los efectos benéficos del consumo de cafeína en la salud y el comportamiento humanos, los mecanismos por los que afecta la fisiopatología de las enfermedades neurodegenerativas aún deben aclararse. Una hipótesis prometedora es que la cafeína controla la respuesta neuroinflamatoria, mediada por microglía asociada con la mayoría de las afecciones neurodegenerativas. Por consiguiente, se ha descrito que la modulación de los receptores de adenosina (el receptor A_{2A}), proporciona neuroprotección a través del control de la reactividad de la microglía y la neuroinflamación (Madeira *et al.*, 2017).

2.4.4.1 Efecto del consumo crónico de cafeína

Aunque el abuso de cafeína no está asociado a los patrones de uso compulsivo característicos de la utilización de otros psicoestimulantes, se observan con alguna frecuencia pacientes que persisten en el consumo de cafeína, a pesar de las contraindicaciones médicas específicas individuales. El consumo crónico de cafeína puede llevar a la ingestión de cantidades elevadas produciendo nerviosismo, insomnio, inquietud y también trastornos fisiológicos como taquicardia. Estas manifestaciones clínicas son similares a las que se observan en trastornos de ansiedad. Con dosis elevadas, más de 1 g de cafeína al día, se observan efectos psicóticos mayores. En cuanto a los efectos adversos del abuso de cafeína, algunos investigadores han observado un cierto riesgo a padecer enfermedades coronarias y en mujeres embarazadas a tener bebés con bajo peso natal.

La existencia del síndrome de abstinencia a la cafeína es hoy en día irrefutable. Existen síntomas psicológicos y físicos, no sólo después de la interrupción del consumo, sino también después de una disminución en el consumo de cafeína. Los síntomas de abstinencia más claros son dolores de cabeza, somnolencia,

cansancio, atenuación de la atención y concentración, dificultad en la coordinación y en algunos casos, ansiedad o depresión leve. También se ha descrito deseo compulsivo por cafeína. Es importante observar que el síndrome de abstinencia a la cafeína, puede ser lo suficientemente severo como para producir trastornos ocupacionales y sociales en grandes consumidores o personas dependientes de la cafeína. Aunque el síndrome de abstinencia se describió en consumidores de elevadas dosis de cafeína (> 600 mg/día), también ocurre en individuos que consumen tan poco como 100 mg al día, que es el equivalente a una taza de café o bien a dos o tres latas de refrescos con cafeína. Las manifestaciones sintomáticas aparecen el primer día de abstinencia de cafeína y pueden durar varios días más. Parece ser que la aparición de la abstinencia, es uno de los factores principales en el consumo crónico de café; en particular en el primer café de la mañana por parte de la población a nivel mundial (Machnik *et al.*, 2016).

Recientemente, se habla acerca de la ingesta del café (cafeína) y la infertilidad masculina. Entre otros factores de estilo de vida, el consumo de café/cafeína se consideró como factor que puede influir en los parámetros de la calidad del semen, pero también en la integridad del ADN del espermatozoide. La literatura sugiere que la ingesta de cafeína, posiblemente a través del daño del ADN espermático, puede afectar negativamente a la función reproductiva masculina. Sin embargo, la evidencia de los estudios epidemiológicos sobre los parámetros del semen y la fertilidad es inconsistente y no concluyente. Los estudios bien diseñados con criterios predefinidos para el análisis del semen, la selección de sujetos y la definición de hábitos de estilo de vida, son esenciales para alcanzar una evidencia consistente acerca del efecto de la cafeína sobre los parámetros del semen y la fertilidad masculina (Ricci *et al.*, 2017).

2.5 Teobromina

La teobromina es un alcaloide de sabor amargo procedente del árbol de cacao. Por ser una metilxantina, está relacionada con la cafeína y teofilina. No contiene bromo, a pesar de su nombre. Éste deriva de *Theobroma*, el género al que pertenece el

árbol de cacao. La palabra *Theobroma* proviene a su vez de las raíces griegas *theo* ("dios") y *broma* ("comida"), significando "comida de los dioses". El sufijo *-ina* es propio de alcaloides y compuestos que contienen nitrógeno (Korolkovas y Burckhalter, 1983).

La teobromina es un compuesto ligeramente soluble en agua (330 mg/L a 25 ° C), que se presenta en forma de polvo blanco cristalino con un característico sabor amargo. A pesar de tratarse de un compuesto incoloro, muestras comerciales pueden presentar un ligero color amarillento debido a las impurezas. Tiene un efecto semejante al de la cafeína en el sistema nervioso humano, pero menos potente. Se sabe que provoca mutaciones en bacterias y en eucariotas simples, pero aparentemente no ocurre así en eucariotas complejas (Lippert, 2017).

El químico ruso Alexander Voskresensky descubrió la teobromina en el año 1841 en los granos del cacao. Su síntesis a partir de la xantina fue reportada por primera vez por el químico alemán Hermann Emil Fischer en 1882, que veinte años más tarde ganaría el Nobel de Química por sus investigaciones sobre proteínas.

La teobromina es una purina derivada de la xantosina, un nucleósido. La ruptura de la ribosa y la N-metilación produce 7-metilxantosina, que es precursora de la teobromina, que a su vez es precursora de la cafeína. (Macnick *et al.*, 2016).

2.5.1 Usos benéficos de la teobromina

La teobromina incrementa la producción de orina. Por su efecto diurético y su habilidad vasodilatadora, la teobromina se ha usado para tratar la hipertensión arterial. La revista *American Journal of Clinical Nutrition* señala que el uso histórico de la teobromina como tratamiento para otros problemas circulatorios incluyendo arteriosclerosis, ciertas enfermedades vasculares, angina de pecho e hipertensión debería ser considerado para futuras investigaciones.

Siguiendo su descubrimiento a finales del siglo XIX, esta molécula se empezó a usar en 1916, cuando fue recomendada por la publicación *Principles of Medical*

Treatment, como un tratamiento para el edema (retención de líquidos en ciertas partes del organismo) y otros problemas.

En el cuerpo humano, los niveles de teobromina se reducen a la mitad entre 6 y 10 horas después de haberse consumido. (Macnick *et al.*, 2016).

La teobromina se ha usado en experimentos sobre defectos en el nacimiento involucrando ratones y conejos. Se detectó un peso fetal por debajo de lo normal en conejos una vez se los alimentó forzosamente con teobromina, pero no después de una nueva administración de la droga. No se detectaron defectos de nacimiento en ratas. Se han patentado posibles usos de este compuesto en futuros tratamientos en campos como la prevención de cáncer.

La teobromina también parece ser efectiva contra la caries, y ha demostrado ser más efectiva que el tradicional fluoruro en algunos estudios. Sus ventajas incluyen la posibilidad de ingerirla fácilmente, pudiéndose obviar los avisos de 'no tragar' de los enjuagues bucales actuales. (Lippert, 2017).

2.5.2 Toxicidad de teobromina

La teobromina se encuentra en concentraciones altas en el chocolate. En ensayos clínicos se han usado dosis de más de 1000 mg sin efectos dañinos, aunque pueden provocar molestias estomacales leves (Smolders *et al.*, 2017). Para tener efectos nocivos sobre los humanos debe de ingerirse una gran cantidad de cacao.

Se produce amplia absorción gastrointestinal (> 90%) en humanos y especies experimentales (rata, ratón, conejo y perro). La teobromina se distribuye por todo el cuerpo, es rápidamente metabolizada y se desconoce si la teobromina y sus metabolitos son excretados por la orina. No hay datos que indiquen acumulación de teobromina.

Sin embargo, la teobromina es altamente tóxica para ciertos animales domésticos, como perros y gatos. Una dosis pequeña de teobromina puede causarles arritmias cardíacas y convulsiones, e incluso la muerte.

A un consumo elevado de teobromina los efectos adversos que se observan en humanos incluyen náuseas y anorexia. Consumos de altas cantidades de teobromina durante largo tiempo de productos de cacao, dan una ingesta de metilxantina de 1,5 g por día, pudiendo aparecer sudoraciones, temblores y severos dolores de cabeza. (Macnick *et al.*, 2016).

2.6 Receptores purinérgicos.

La teobromina como derivado de la familia de metilxantinas, puede actuar sobre los receptores purinérgicos. Dichos receptores son macromoléculas cuyos ligandos pueden ser: el nucleósido adenosina, los nucleótidos ATP, ADP, UTP, UDP y ciertos nucleótidos-azúcares (UDP-glucosa y UDP-galactosa). Éstos ligandos son reconocidos como potentes y selectivos mensajeros extracelulares que controlan, entre otras funciones, el impulso nervioso, la respuesta inflamatoria, la secreción de insulina, la agregación plaquetaria, la hidratación y protección de las mucosas respiratorias, la regulación del tono vascular y la percepción del dolor.

Los receptores purinérgicos se pueden clasificar en dos grupos, los receptores P1 y los receptores P2. Los receptores P1 reconocen como activador (agonista) selectivo al nucleósido adenosina. Las acciones extracelulares de los nucleótidos son mediadas por dos subfamilias de receptores purinérgicos, los receptores P2X y P2Y.

Los receptores P2X conforman poros o canales catiónicos (principalmente canales de Ca^{+2}) que se activan (abren) en presencia de ATP extracelular. Ni el ADP, ni la adenosina, ni los nucleótidos de uridina activan a estos receptores.

Los receptores P2Y para distintos tipos de proteínas G (Gs, Gi, Gq) y los segundos mensajeros generados por las mismas. El grupo mayoritario de receptores PY2 (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ y P2Y₁₁) está acoplado a la proteína Gq, que activa a la fosfolipasa C (PLC) y genera como segundos mensajeros el inositol tri-fosfato (IP3) y el diacil-glicerol (DAG). El IP3 promueve la movilización de Ca^{+2} de

compartimientos intracelulares; el DAG activa a la proteína quinasa C (PKC). El receptor P2Y₁₁, además de acoplarse a G_q, se acopla a G_s, promoviendo la estimulación de la enzima adenilato ciclasa (AC), aumentando la producción de AMPc. Los receptores P2Y₁₂, P2Y₁₃ y P2Y₁₄ están acoplados a la proteína G_i que inhibe la AC, regula ciertos canales iónicos, y activa una quinasa de fosfolípidos, la PI-3 quinasa (PI3K) (Lazarowski *et al.*, 2009).

2.6.1 Receptores de adenosina.

Las metilxantinas actúan como antagonistas de los receptores P1 purinérgicos, también conocidos como receptores de adenosina, porque muestran similitudes estructurales con purinas. Se han identificado cuatro subtipos diferentes (A₁, A_{2A}, A_{2B} y A₃) cuya función depende del tipo de célula en la que se expresan.

La adenosina es un neuromodulador endógeno que influye en muchas funciones en el SNC. No actúa como un neurotransmisor clásico, ya que no es almacenada en vesículas sinápticas, no es liberada por exocitosis, no aparece para transferir información unidireccionalmente de los componentes presinápticos a los postsinápticos y no actúa solo en la sinapsis. Sin embargo, la adenosina tiene doble rol, actúa como mensajero transcelular homeostático y como neuromodulador, controlando la liberación de neurotransmisor y la excitabilidad neuronal (Galindo y Flores, 2006).

La adenosina puede aparecer en el medio extracelular a través de tres mecanismos:

- La liberación de adenosina a través de transportadores de nucleósidos después de un incremento en los niveles intracelulares de adenosina o en contra del gradiente de sodio.
- La formación extracelular de adenosina a través de la ruta de la exonucleotidasa sobre los nucleótidos de adenina libres, especialmente ATP.
- La formación extracelular de adenosina después de la liberación de adenosin monofosfato cíclico (AMPc) (Fredholm *et al.*, 2005).

El bloqueo de los receptores de adenosina por estas moléculas naturales ocurre en casi cualquier región del cuerpo humano. De hecho, los receptores P1 están ampliamente distribuidos y algunos tipos de células son incluso capaces de expresar más de un subtipo de receptor.

La evidencia convergente muestra que el bloqueo de los receptores de adenosina tiene importantes consecuencias sobre la salud humana y, contrariamente a lo que se describió en informes anteriores, el antagonismo del receptor P1 tiene efectos secundarios leves. La administración aguda de metilxantinas naturales es eficaz en estimular el SNC y el tono respiratorio para proporcionar beneficios en la apnea de la prematuridad. En este sentido, la teofilina y la cafeína muestran potencial en el tratamiento de una variedad de enfermedades respiratorias pediátricas. Las metilxantinas también muestran beneficios en hipertensión o en enfermedades cardiovasculares. Por lo tanto, el aumento de la relación colesterol HDL / LDL en plasma mediada por la teobromina puede reducir el riesgo de ataques cardíacos fatales (Scodelaro *et al.*, 2011).

2.6.1.1 Receptores P1 acoplados a proteínas G

Los cuatro receptores P1 de superficie celular que responden a la adenosina mediando una amplia gama de funciones fisiológicas en el organismo, son: A₁, A_{2A}, A_{2B} y A₃. Éstos presentan un dominio corto N-terminal extracelular, siete dominios transmembrana y un dominio N-terminal C-terminal intracelular. Se encuentran acoplados principalmente con la adenilato ciclasa, ya sea de manera negativa (A₁ y A₃) o de manera positiva (A_{2A} y A_{2B}) (Figura 7).

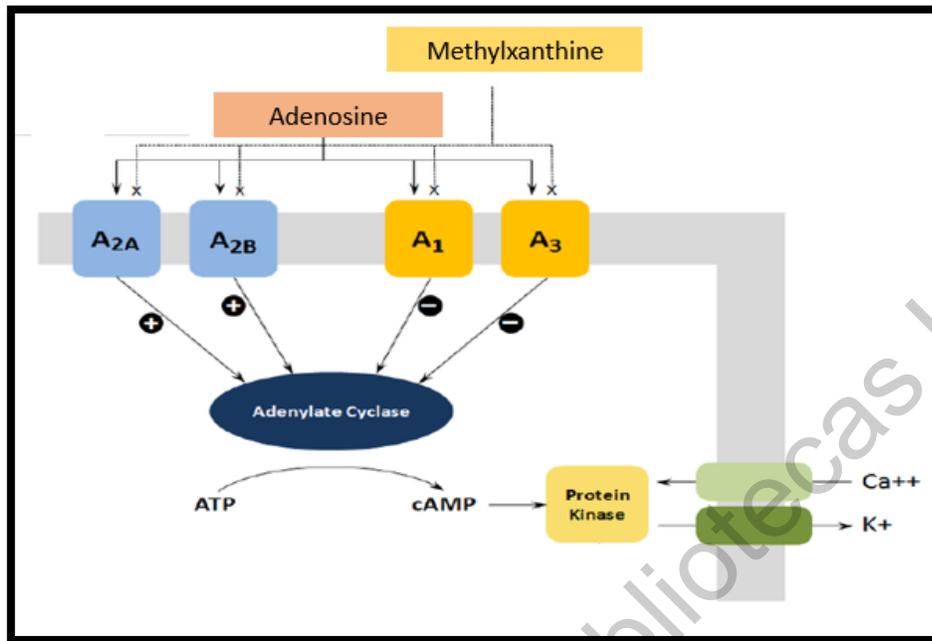


Figura 7 Mecanismo de transducción de señal de los receptores P1.

La adenosina como compuesto biológico altamente activo tiene una variedad de efectos sobre distintos tejidos y células que van desde músculo cardíaco, endotelio de arterias coronarias, músculo liso, plaquetas y glóbulos blancos. A través de la interacción con los receptores A_{2A}, la adenosina está implicada en los efectos anti-agregantes plaquetarios, las respuestas antiinflamatorias por parte de los neutrófilos, así como en la modulación de la función celular inmune (Gessi *et al.*, 2000).

2.6 Efectos de las metilxantinas en las enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas han adquirido dimensiones epidémicas y constituyen un grave problema de salud pública. En 2013, 25 y 37 millones de casos de enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson respectivamente, fueron diagnosticados en todo el mundo. Lamentablemente, se espera que los casos de Alzheimer se multipliquen cuatro veces para 2050 y se ha considerado además de los aspectos sociales, el gasto proyectado para este tipo de patologías en Europa del 18% del presupuesto total de salud (Olesen *et al.*, 2012).

La neurodegeneración consiste en un daño anatómico y / o estructural que conduce a una disfunción de las células nerviosas y una muerte prematura de éstas. La práctica clínica diaria requiere que la neurodegeneración, sea atribuida como la causa de cualquier patología que produzca síntomas neurológicos prematuros, en ausencia de cualquier lesión o evento cardiovascular (hemorragia o *ictus*). La neurodegeneración puede ocurrir en nervios periféricos y centrales, la cual abarca más de 100 enfermedades diferentes. A pesar de la etiología compleja y la fisiopatología diversa, estas enfermedades pueden tener características comunes, por ejemplo, deposición de agregados proteicos, inflamación, discapacidades motoras y déficits cognitivos. Los tratamientos actuales no curan las enfermedades neurodegenerativas. De hecho, el grado de curación de los trastornos del nervio central o periférico es mucho menor que el de cualquier enfermedad que afecta a los tejidos no neurales. Algunas intervenciones son ineficaces para reducir los síntomas debido al grado requerido para mejorar la calidad de vida. Otros alivian o estabilizan algunos síntomas, pero son ineficaces para frenar o detener la progresión de la enfermedad. Finalmente, algunos tratamientos que son útiles en las primeras etapas clínicas se vuelven ineficaces o incluso contraproducentes a medida que avanza la enfermedad.

Encontrar herramientas terapéuticas nuevas y efectivas es el deseo más buscado de pacientes, futuros pacientes y cuidadores. Sin duda, ese deseo constituye un gran desafío para los científicos neurólogos. Las metilxantinas pueden servir para: proporcionar beneficios preventivos para la EA.

La prevalencia de EA está en el rango de 5-8% en personas mayores de 65 años, y se eleva a 25-50% en individuos de 75 años. Se estima que cada 3 segundos, se diagnostica un nuevo paciente en el mundo. Además de un vínculo claro relacionado con la edad, se sabe poco sobre los orígenes de la enfermedad y no hay consenso sobre la estratificación del paciente, es decir, no existen herramientas apropiadas para establecer los biomarcadores que pueden servir para agrupar a los pacientes con síntomas bastante diversos y las tasas de progresión de la enfermedad. El desequilibrio entre aproximadamente el 10% de los pacientes con predisposición

genética, debido a mutaciones en genes clave y el 90% de los pacientes con etiopatología desconocida es una barrera más para encontrar una hipótesis etiológica unificadora. Mientras que el Alzheimer es un trastorno degenerativo caracterizado por una pérdida progresiva de la memoria, el lenguaje y las capacidades de aprendizaje, los síntomas varían de un paciente a otro.

La EA tiene una etapa prodrómica, una etapa clínica que comienza con déficits de cognición sutiles que avanzan hacia una enfermedad de Alzheimer leve a moderada y, con diferentes cinéticas dependiendo del paciente, cae en fases severas e incapacitantes. Sin embargo, el diagnóstico según la escala de Braak y Braak solo puede confirmarse en el tejido neurológico *post mortem*. Los supuestos actuales consideran los agregados proteicos derivados de la proteína tau hiperfosforilada o el procesamiento anormal de la proteína precursora amiloide, como los culpables de la muerte neuronal. La agregación del péptido amiloide ($A\beta$) en las placas seniles (una característica clásica de la enfermedad de Alzheimer), aparentemente ocurre antes de la aparición de déficits cognitivos y conduce al daño temprano de las sinapsis en las corticales frontal / entorrinal. Los enredos neurofibrilares intracelulares (NFT) compuestos por agregados de tau fosforilados, junto con la degeneración neuronal y la pérdida de la sinapsis, aparecen más tarde y están más estrechamente relacionados con la degeneración del sistema límbico.

La Administración de Drogas y Alimentos de EE. UU. (FDA) ha aprobado pocos medicamentos anti-AD. Donepezil, galantamina o rivastigmina son inhibidores de la colinesterasa, los cuales aumentan los niveles de acetilcolina en el SNC. La razón detrás de esta intervención, es que el aumento de la actividad colinérgica puede conducir a un mejor rendimiento cognitivo. La memantina tiene otro modo de acción, es decir, actúa como un bloqueador dependiente del uso de los receptores de glutamato de N-metil-Daspartato (NMDA). Disminuir el nivel general de actividad del receptor NMDA parece mejorar la memoria y las capacidades de aprendizaje, particularmente en los modelos de enfermedad. Con años de uso, estas drogas han mostrado propiedades cognitivas o neuroprotectoras débiles. Paralelamente a la búsqueda de nuevos enfoques para modular a los receptores NMDA, la

investigación intensiva se ha centrado en la búsqueda de nuevos objetivos terapéuticos que podrían prevenir la neurodegeneración y/o mejorar la cognición.

Los ensayos *in vitro* e *in vivo* sugieren que la cafeína puede ser neuroprotector en diferentes enfermedades neurodegenerativas. La identificación de los detalles del modo de acción es una prioridad actual en el campo de la EA. Aunque los subtipos de receptores de adenosina y las vías intracelulares exactas implicadas en las acciones de la cafeína no están claramente definidos, el antagonismo del receptor A_{2A} neuronal en las primeras etapas de la EA previene la pérdida sináptica del hipocampo y mejora los déficits de memoria. Se han descrito resultados similares en el nivel astrogial; el aumento de los niveles de receptores A_{2A} en astrocitos está relacionado con la pérdida de memoria en la enfermedad de Alzheimer y su bloqueo específico puede mejorar la memoria a largo plazo. (Oñatibia-Astibia *et al.*, 2017).

3.0 JUSTIFICACION

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma más común de demencia, siendo las personas de la tercera edad, quienes tienen más susceptibilidad de padecerla. Existen diversos factores causantes de la EA, que por lo general, van de la mano con el estilo de vida que llevan los individuos propensos a ésta, así como factores genéticos de cada organismo. A pesar de la intensa investigación en la búsqueda de la causa de la enfermedad y su tratamiento, la EA se considera una enfermedad progresiva e incurable que lleva al deterioro cognitivo irreversible y que tiene un desenlace fatal. La teobromina es un derivado de metilxantina, cuya molécula se ha encontrado con propiedades capaces de prevenir el daño ocasionado en la EA. En el presente trabajo, se estudia la estabilidad de una solución de teobromina de concentración neuroprotectora (30 mg/L) contenida en un frasco ámbar y en un frasco traslúcido por un período de 9 meses, su efecto neuroprotector en un modelo murino inducido por la administración de β amiloide intra-cerebral y se miden los parámetros bioquímicos que descartan toxicidad hepática y renal del tratamiento con teobromina.

4.0 HIPÓTESIS

La solución de teobromina con efecto neuroprotector conserva su estabilidad por un período de 9 meses y no es tóxica al ser aplicada a un modelo murino para EA.

5.0 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general:

Determinar la estabilidad y toxicidad de una solución de teobromina con efecto neuroprotector en un modelo murino.

5.2 Objetivos particulares:

- Inducir la enfermedad de Alzheimer mediante la administración intra-cerebral de β -Amiloide bajo un sistema estereotáxico.
- Conocer la estabilidad de la solución de teobromina en frasco ámbar y transparente en 9 meses de vida de anaquel.
- Determinar la estabilidad de la solución de teobromina contenida en un frasco ámbar y un frasco traslúcido por medio de un método HPLC implementado.
- Evaluar el efecto de la teobromina sobre la expresión de la placa amiloide en corteza frontal de ratas jóvenes y compararlo con las muestras de corteza frontal de las ratas involucradas en el diseño experimental, mediante la técnica de *Western Blot*.
- Estudiar la toxicidad hepática y renal inducida por una solución de teobromina en un modelo murino en administración *ad libitum* durante 9 meses.

6.0 METODOLOGÍA

6.1 Modelo biológico.

- Se utilizó como modelo biológico ratas *Wistar*.
- Se implementó un modelo de 6 grupos experimentales con 5 ratas de la raza *Wistar* cada uno, bajo las siguientes condiciones: 6 meses de edad, alimento *Rodent diet 5001* y agua *ad libitum*, y ciclos de luz/obscuridad de 12/12h.
- En éstos grupos se evaluó el efecto de la bebida de teobromina elaborada, con la previa inducción de la EA. Dicho modelo se representó de la siguiente manera:

- Grupo 1: Agua *ad libitum*
- Grupo 2: A β / Agua *ad libitum*
- Grupo 3: A β / tratamiento con teobromina ámbar
- Grupo 4: A β / tratamiento con teobromina traslúcida
- Grupo 5: tratamiento con teobromina ámbar
- Grupo 6: tratamiento con teobromina traslúcida

La bebida de teobromina con concentración de 30 mg/L se administró todos los días *ad libitum* por un período de 9 meses. Pasado éste tiempo, las ratas fueron sacrificadas de acuerdo a principios de bioética basados en lo estipulado en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999: “Especificaciones técnicas para la Producción, Cuidado y uso de los Animales de Laboratorio”.

Resguardo de los animales de acuerdo al comité de bioética

Los animales utilizados fueron alojados en cuartos del biotero de la Universidad Autónoma de Querétaro, bajo las siguientes condiciones: 6 meses de edad,

alimento y agua *ad libitum*, y ciclos de luz/obscuridad de 12/12h. El cuarto de alojamiento de éstos tiene una dimensión 6 x 6 m a temperatura ambiente, no fue necesario el control de humedad. Se mantuvieron 3 ratas por caja estándar de acrílico/plástico transparente, cuyas medidas son 30x60 cm. En total se utilizaron 30 ratas, 5 por cada grupo. La ventilación del cuarto de alojamiento fue directa a través de reja y extractor con entrada y salida de aire del cuarto.

La frecuencia de cambio de cama se realizó de 2 a 3 veces por semana y el cambio de agua se realizó diariamente. La condición de alimentación fue de forma *ad libitum* y el retiro de los desechos se realizó de 2 a 3 veces por semana.

Los procedimientos a los que se sometieron los animales se basaron principalmente en: la inyección intra-cerebral de β -Amiloide, la administración *ad libitum* de la bebida de teobromina, así como la extracción de sangre.

Los residuos generados y la disposición de ellos, se presentan de la siguiente forma:

- Residuos de Sangre total o plasma se envasaron en recipiente rojo hermético.
- Residuos patológicos líquidos se envasaron en bolsas de polietileno o recipientes color amarillo.
- Residuos no anatómicos, procedentes de materiales de curación, cama de animales y otros materiales desechables se depositaron en bolsas de polietileno o recipientes color rojo.
- Objetos punzocortantes generados se envasaron en recipientes rígidos de polipropileno color rojo.

Las instrucciones que se llevaron a cabo para el cuidado de los animales fueron de la siguiente forma: animales enfermos y animales muertos se excluyeron del proyecto. Cualquier problema técnico generado en el proceso se notificó al director de tesis.

Al finalizar el proyecto, los animales se sacrificaron mediante la anestesia con pentobarbital sódico y decapitación. Se almacenaron en congelación en el laboratorio y se mandaron a incinerar a una institución externa.

El personal de laboratorio cuenta con la capacitación para la realizar los procedimientos de bioseguridad y uso de animales en el biotero. El personal se comprometió a hacer uso de guantes, mascarillas, lentes de seguridad y uso de protección personal.

6.2 Elaboración de una bebida enriquecida con teobromina.

- Se realizó una solución utilizando concentración fija de teobromina (30 mg/L).

6.3 Evaluación de la toxicidad de la teobromina.

- Durante 9 meses se dosificó agua *ad libitum* con teobromina a 30 mg/L, en modelo murino diariamente.
- Se tomaron muestras sanguíneas para medir:

6.3.1 Pruebas de funcionamiento hepático.

Cuantificación de aminotransferasa de aspartato TGO. La medición se llevó a cabo por método UV optimizado para la determinación de aspartato aminotransferasa en muestra de suero o plasma.

Cuantificación de alaninoamino transferasa TGP. La medición se llevó a cabo por método UV optimizado para la determinación de alanina aminotransferasa en muestras de suero o plasma (Andrade *et al.*, 2016).

- Para ambos parámetros se estableció una reacción que se llevó a cabo a 30 o 37°C. En una cubetilla mantenida a ésta temperatura, se colocaron: 2 mL de reactivo A (kit comercial) y 200 µL. Se mezcló inmediatamente y se continuó a disparar simultáneamente el cronómetro. Luego de 1 minuto se registró la absorbancia inicial. Después, al minuto 1, 2 y 3 de la primera

lectura también se anotaron las absorbancias. Se determinó la diferencia promedio de absorbancia/min ($\Delta A/\text{min}$), restando cada lectura de la anterior y promediando los valores. Se realizaron cálculos para determinar el valor total de parámetro en una cantidad de muestra contenida en una unidad de volumen.

6.3.2 Pruebas de funcionamiento renal

6.3.2.1 Cuantificación de urea

La medición se llevó a cabo por método de reacción enzimática para la determinación de urea en suero o plasma.

En tres tubos marcados como B (Blanco), S (Standard) y D (Desconocido) se colocaron 1 o 2 gotas de agua y se agregó lo siguiente:

Tabla 3. Cuantificación de urea.

	B	S	D
Standard	-	20 μL	-
Suero o plasma	-	-	20 μL
Ureasa	1 gota	1 gota	1 gota

Se mezcló por agitación suave y se incubó 5 minutos a 37°C, para posteriormente agregar:

Reactivo A	1 mL	1 mL	1 mL
Reactivo B	1 mL	1 mL	1 mL

Se mezcló por agitación suave y se incubó por 5 minutos a 37 °C. Luego se agregó:

Agua destilada	10 mL	10 mL	10 mL
-----------------------	-------	-------	-------

Se mezcló por inversión y se retiró del baño. Después de 10 minutos se llevo a cabo la lectura correspondiente en fotocolorímetro con filtro verde (510 a 550 nm) o en espectrofotómetro a 540 nm, llevando a cero con el Blanco.

6.3.2.2 Cuantificación de creatinina.

La medición se llevó a cabo por método cinético para la determinación de creatinina en suero.

Se equilibró el reactivo de trabajo a la temperatura de reacción (25 °C). Antes de agregar la muestra, se llevó el aparato a cero con agua destilada. En dos cubetas espectrofotométricas marcadas S (Standard) y D (Desconocido), se colocó:

Tabla 4 Determinación de creatinina

	S	D
Reactivo de trabajo	1.2 mL	1.2 mL
Standard	0.2 mL	-
Muestra	-	0.2 mL

Se mezcló inmediatamente, iniciando al mismo tiempo el cronómetro y se prosiguió la incubación. A los 30 segundos exactos, se midió la absorbancia (S1 y D1) y se continuó la incubación. Se midió nuevamente la absorbancia (S2 y D2) a los 5 minutos (4 minutos, 30 segundos después de la primera lectura) (Dehnamaki *et al.*, 2018).

Se realizó el mismo procedimiento después de 3 meses.

6.4 Estabilidad de la teobromina.

- La teobromina contenida en la solución elaborada, se dosificó en un modelo murino por 9 meses. Pasado el tiempo se buscó la estabilidad química de la teobromina almacenada en un recipiente ámbar y uno traslúcido, ambos con la concentración estudiada (30 mg/L) mediante HPLC.
- Los análisis de HPLC se realizaron en un equipo de la marca *Agilent* modelo 1260 (Santa Clara, CA, USA) compuesto por una bomba cuaternaria y un detector de arreglo de diodos (DAD). El manejo del equipo, la adquisición de los datos y el procesamiento de los mismos se realizó utilizando el software Openlab ®.
- La identificación y cuantificación de la teobromina se realizó utilizando como fase estacionaria una columna C₁₈ (5 µm, 150 X 4.5 mm); como fase móvil se utilizó acetonitrilo (CH₃CN), y agua acidulada con ácido acético a un pH de 2.5 en modo isocrático en una proporción 10:90 con un flujo de 0.5 mL/min.
- La longitud de onda de detección fue a 274 nm, se utilizó un volumen de inyección de 10 µL y un tiempo de análisis de 7 minutos.
- Para la realización de la curva de calibración se utilizaron las concentraciones mostradas en la siguiente tabla, debido a que la concentración esperada en la muestra era de 30 mg/L.

Tabla 5 Concentraciones utilizadas en la curva de calibración

[mg/L]
0
10
20
30
40
50
60

- A partir del área sobre la curva obtenida con cada concentración, se realizó una curva de calibración.

Evaluación de la estabilidad de la solución de teobromina en cámara de estabilidad de producto.

- Se utilizó una cámara que proporciona ambiente con temperatura y humedad controlada, como lo indica la norma oficial mexicana NOM-073-SSA1-2015.
- La cámara utilizada fue de la marca Lumistell®, de la serie ITH-75. Con temperatura ambiente de 24 °C y humedad relativa de 45 a 50%. La cámara se alimentó continuamente de agua baja en sales y alimentación eléctrica con tierra física.
- Para el control de humedad en el interior de la cámara de estabilidad se determinó mediante un rango de humedad ambiente de 35 a 85%.

6.5 Inyección del fenotipo de β -Amiloide por un sistema estereotáxico.

- Se realizó una preparación de 50 μ g de A β con 50 μ L de solución salina fisiológica, de manera que se obtuvo con una concentración de 1 μ g/ μ L y se alicuotó y almacenó a -20 °C. La solución de A β se incubó durante 5 días a 37 °C.
- Se anestesiaron las ratas con una inyección intraperitoneal, que comprendía una mezcla de Ketamina (100 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg) y se colocaron en un aparato estereotáxico. Los ojos de las ratas se cubrieron con ungüento de vitamina A.
- Se retiró el cuero cabelludo y se realizó un corte a lo largo de la línea media y la región que abarca el bregma se secó y se limpió con algodón estéril.

- Se llevó a cabo una inyección intra-cerebral de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de $\text{A}\beta$ mediante la utilización de un sistema estereotáxico.
- Las coordenadas estereotáxicas para el hipocampo dorsal se elegieron según: -3.8 mm, lateral, \pm 2.2 mm desde la línea central y ventral, -2.7 hacia abajo desde la superficie del cráneo.
- Se inyectó el $\text{A}\beta$ (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) en la región CA1 ventral del hipocampo utilizando jeringa Hamilton de 5 μL . La microinyección se realizó durante 5 minutos, y las agujas se dejaron en su lugar para facilitar difusión de los materiales inyectados (Bahaeddin *et al.*, 2017).

6.6 Análisis de comportamiento

6.6.1 Prueba de reconocimiento de objeto nuevo.

La prueba de reconocimiento de objeto nuevo se realizó a 24 horas después de la habituación al aparato de campo abierto (Espinosa *et al.*, 2013). Se utilizó un aparato de madera *Triplay* de color blanco.

Primeramente, los animales se sometieron a una sesión de entrenamiento, el cual consistió en colocar dos objetos idénticos (A1 y A2) en cada uno de los extremos de la cámara. Las ratas se colocaron individualmente en el campo abierto haciendo que la rata observara la pared opuesta y se esperó a que explorará los objetos por un período de 5 minutos. La sesión de prueba se llevó a cabo 90 minutos después de la sesión de entrenamiento, pero ahora con dos objetos diferentes, los cuales fueron colocados en la misma posición que en la sesión de entrenamiento, un objeto familiar (el mismo que la sesión de entrenamiento) y un objeto nuevo. La exploración de los objetos fue definida cuando el animal acercó la nariz a cualquiera de los dos objetos a una distancia de al menos 2 cm y/o al tocar el objeto con la nariz o patas. El índice de reconocimiento de objeto nuevo se definió como:

$$\text{TN}/(\text{TN} + \text{TF})$$

TN = número de veces en el que el animal explora el objeto nuevo.

TF = número de veces en el que animal explora el objeto familiar.

Se realizó la prueba conductual al tercer y cuarto mes de tratamiento.

(Mendiola-Précoma *et al.*, 2017).

6.7 Disección de tejido

Los animales fueron sacrificados 24 horas después de haber terminado las pruebas conductuales y el tratamiento de acuerdo a principios de bioética. Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico a una dosis de 40 mg/kg vía intraperitoneal y posteriormente se procedió a la decapitación de éstas.

Se extrajo el cerebro y se realizó rápidamente la disección necesaria para la obtención de corteza frontal, hipocampo, cerebelo y restos de corteza, los cuales se llevaron a congelación a -70°C para su posterior análisis de *Western Blot*.

6.8 Análisis del péptido A β ₄₂ en corteza frontal por *Western Blot*.

Se evaluó la expresión del péptido A β ₄₂ mediante la técnica de *Western Blot*, la cual permite la detección de la proteína de interés dentro de una mezcla compleja de otras proteínas debido a la especialidad de la unión antígeno-anticuerpo, con el fin de obtener datos cuantitativos y semicuantitativos.

6.8.1 Extracción de proteínas a partir de tejido

Cada una de las estructuras disectadas y guardadas como se describió anteriormente fue almacenada en hielo previo a la extracción de proteínas. Para su extracción se lisó el tejido y se agregó amortiguador de lisis adicionado de los inhibidores de proteasas, a razón de 1:5 (gramos de tejido: mL de amortiguador). El tejido se homogenizó y la

extracción se realizó durante 1 hora a 4 °C con agitación constante. Posteriormente, se centrifugó el tejido lisado 15 minutos a 3000 rpm a 4 °C y se recuperó el sobrenadante; luego se volvió a centrifugar 15 minutos a 12000 rpm a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante nuevamente para la cuantificación de proteína.

6.8.2 Cuantificación de proteínas por método de *Bradford*

La concentración de proteínas celulares contenidas en los homogeneizados se determinó por el método de *Bradford*. Esta técnica se fundamenta en la fijación del colorante Azul de *Coomasie* a las proteínas, dando lugar a un cambio en el color que es medido espectrofotométricamente.

Se preparó una curva de calibración de albúmina bovina por triplicado a concentraciones de 2.5, 5, 10, 15 y 20 µg/mL como se muestra en la siguiente tabla y se realizó la curva de calibración graficando absorbancia a 595 nm contra concentración de proteína.

Tabla 6 Determinación de curva de calibración para cuantificación de proteínas

Celda	[BSA µg/mL]	Soln Stock BSA (µL)	H ₂ O (µL)	Reactivo de Bradford (µL)
Blanco	0	0	800	200
1	2.5	25	775	200
2	5	50	750	200
3	10	100	700	200
4	20	200	600	200
5	40	400	400	200

Para la realizar la cuantificación de proteínas, se tomaron 2 µL de muestra, los cuales se diluyeron a 798 µL con agua destilada. A esta

solución, se agregaron 200 μL de reactivo de Bradford (azul de *Coomasie*) para cada una de las muestras. Se prepararon muestras por duplicado, las cuales se incubaron durante 5 minutos y se leyeron a una absorbancia de 595 nm, para luego determinar la concentración de proteína en las muestras al interpolar los datos. El rango lineal del ensayo para BSA fue de 1.2 a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

6.8.3 Electroforesis SDS-PAGE

Se realizaron cálculos para cargar 500 μg de proteína en cada pocillo y se adicionó el amortiguador de carga en relación 1:1, de acuerdo a un volumen de carga de 30 μL ; las muestras se hirvieron durante 5 minutos. Se prepararon geles de poliacrilamida al 10%, se cargaron las muestras (150 μg) y los marcadores de peso molecular. Se corrió la electroforesis durante 15 minutos a 100 V para el gel concentrador y 40 minutos a 150 V para el gel separador hasta que el azul de bromofenol llegara al final del gel.

6.8.4 Western Blot

Una vez terminada la separación de las proteínas en función de su peso molecular, éstas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (*Amershan biosciences*®) mediante la aplicación de un campo eléctrico, las proteínas migran fuera del gel de poliacrilamida hacia la superficie de la membrana, donde quedan fuertemente adheridas. Se humedecieron los materiales en el amortiguador de transferencia en el siguiente orden: cassette (cátodo, lado claro), esponja, papel *Whatman*, membrana, gel, *papel Whatman*, esponja, cassette (ánodo, lado oscuro). El cassette se colocó en el aparato de transferencia con el lado oscuro hacia el cátodo. Debido a la carga negativa de las proteínas a causa del SDS, éstas migraron hacia el cátodo y se sometió a transferencia por 1 hora a 200 mA.

Luego de transferir las proteínas a la membrana, ésta se lavó durante 10 minutos en PBS para eliminar restos de poliacrilamida. La membrana se bloqueó con leche al 3% durante las horas determinadas en estudios preliminares, con el fin de evitar la unión inespecífica de los anticuerpos utilizados para la detección de la proteína de interés a la superficie de membrana. Se lavaron tres veces en PBS, estos lavados son necesarios para eliminar los excesos de reactivos no unidos y para reducir el ruido de fondo.

La membrana se incubó toda la noche a temperatura ambiente y con agitación, con el anticuerpo primario (anti-A1 hecho en conejo 1:2000) diluido en solución bloqueadora. Se utilizaron los anticuerpos adecuados a la concentración óptima de acuerdo a los experimentos preliminares. Una vez concluida la incubación, se lavó la membrana en PBS 1X y se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa, anti-conejo, a la concentración óptima de acuerdo a los experimentos preliminares. Se llevó a incubación en obscuridad durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación y luego la membrana se lavó tres veces en PBT 0.5%.

6.8.5 Detección y revelado

La detección se realizó por medio del ensayo de quimioluminiscencia potenciada. La membrana se sumergió el tiempo optimizado en los experimentos preliminares en el reactivo de detección. Esto provoca una oxidación catalizada por peroxidasa de rábano, que produce quimioluminiscencia del luminol, donde se une la proteína HRP marcada para el antígeno a detectar en la membrana. La luz resultante se detectó en la película de autoradiografía.

El proceso de revelado se llevó a cabo en un cuarto oscuro. Se tomó la película de autoradiografía (Amersham Biosciences) y se presionó ligeramente contra la membrana de nitrocelulosa en el HYPERCASSETTE durante 1 minuto, dependiendo de la reacción de la proteína HRP. Pasado el tiempo, se tomó la placa y se sumergió en el

revelador, se enjuagó con agua, se sumergió en el fijador y por último se volvió a enjuagar con agua, la película se sumergió 1 minuto en cada solución.

Terminando el revelado, en la película se observaron señales que indicaron la presencia de la proteína deseada. Dichas señales se compararon guiadas por el marcador de peso molecular y mediante estudio densitométrico se evaluó la diferencia de expresión entre cada tratamiento.

7.0 RESULTADOS

7.1 Análisis bioquímicos para la evaluación de toxicidad de la teobromina

La evaluación de la toxicidad hepática y renal una vez administrada la solución enriquecida con teobromina a una concentración de 30 mg/L contenida en frascos ámbar y traslúcidos, se determinó por medio de la medición de parámetros bioquímicos en suero, los cuales fueron TGO, TGP, urea y creatinina para evaluar funcionamiento hepático y renal, respectivamente.

Las mediciones de los parámetros bioquímicos se realizaron en dos ocasiones durante el tratamiento. La primera se realizó una semana antes de comenzar el tratamiento con teobromina a 30 mg/L *ad libitum* (BASAL). Después de 5 meses de tratamiento y de la inyección intra-cerebral del péptido β -Amiloide, se procedió a la segunda medición de TGO, TGP, Urea y Creatinina (POSTOX).

7.1.1 Pruebas de funcionamiento hepático

Los resultados obtenidos de la primera cuantificación de TGO no presentan diferencia significativa (TGO BASAL). Éstos resultados oscilan entre 100 y 150 UI/L, por lo que todos ellos entran en un rango normal. La segunda medición de TGO, se llevó a cabo 5 meses después del tratamiento con teobromina a 30 mg/L *ad libitum* contenida en frasco ámbar y traslúcido y con la inyección intra-cerebral del péptido

A β (TGO POSTOX). Los resultados obtenidos con la segunda medición de TGO tendieron a disminuir, no obstante se mantuvieron en un rango normal. Para ambas mediciones, no se presenta diferencia significativa en comparación con el grupo CONTROL AGUA (figura 8).

Cuantificación de Aminotransferasa de Aspartato (TGO)

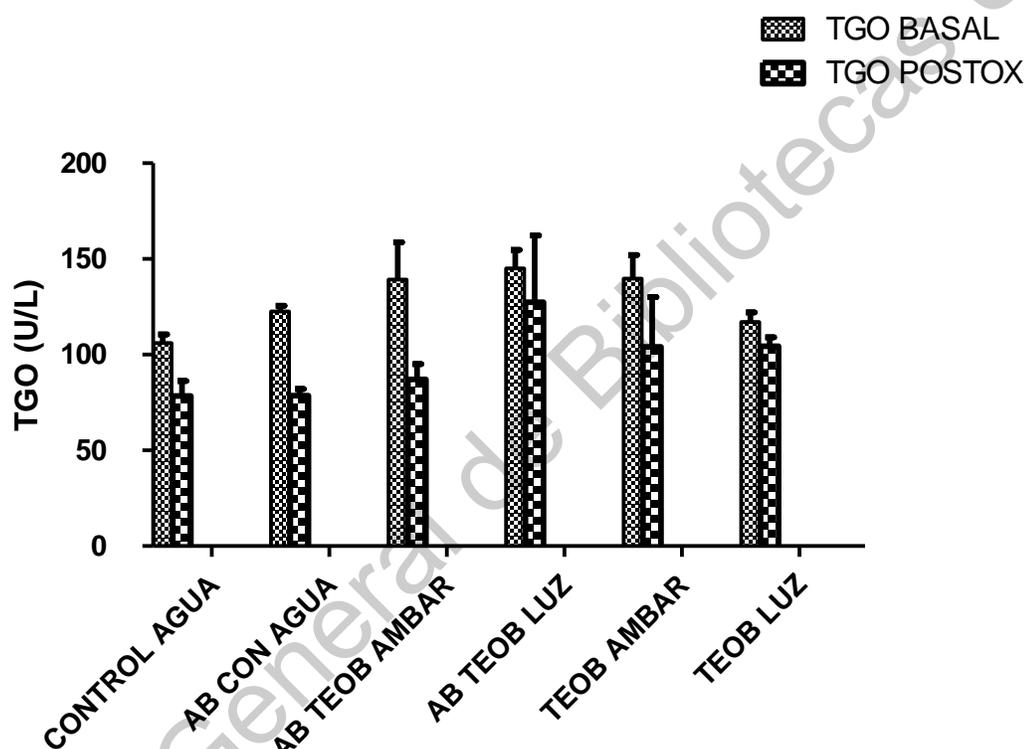


Figura 8 Gráfica resultante de la cuantificación sérica de TGO en grupos experimentales. Se observan dos resultados por cada grupo experimental, uno antes del tratamiento de teobromina (TGO BASAL) y otro después de la administración de teobromina (30 mg/L *ad libitum*) por 9 meses, incluyendo la cirugía estereotáxica (TGO POSTOX). No se presenta diferencia significativa en ninguno de los grupos, manteniéndose los resultados en un parámetro normal. Se realizó análisis estadístico ANOVA de dos vías con la prueba *post hoc* de Bonferroni. Todos los datos se expresan como promedio \pm SEM (n=5 animales por grupo) $p > 0.05$.

La cuantificación basal de TGP llevada a cabo antes del tratamiento, obtuvo datos que oscilan entre 68 a 81 UI/L para los 6 grupos experimentales (TGP BASAL). Los resultados de la primera medición no presentan diferencia significativa en comparación con el grupo CONTROL AGUA. Para la segunda medición de TGP, se obtuvieron resultados que van desde 63 a 85 UI/L para cada uno de los grupos experimentales y éstos no presentaron diferencia significativa en comparación con el grupo CONTROL AGUA (figura 9). Los resultados de ambas mediciones se mantienen dentro de un rango de valores normal.

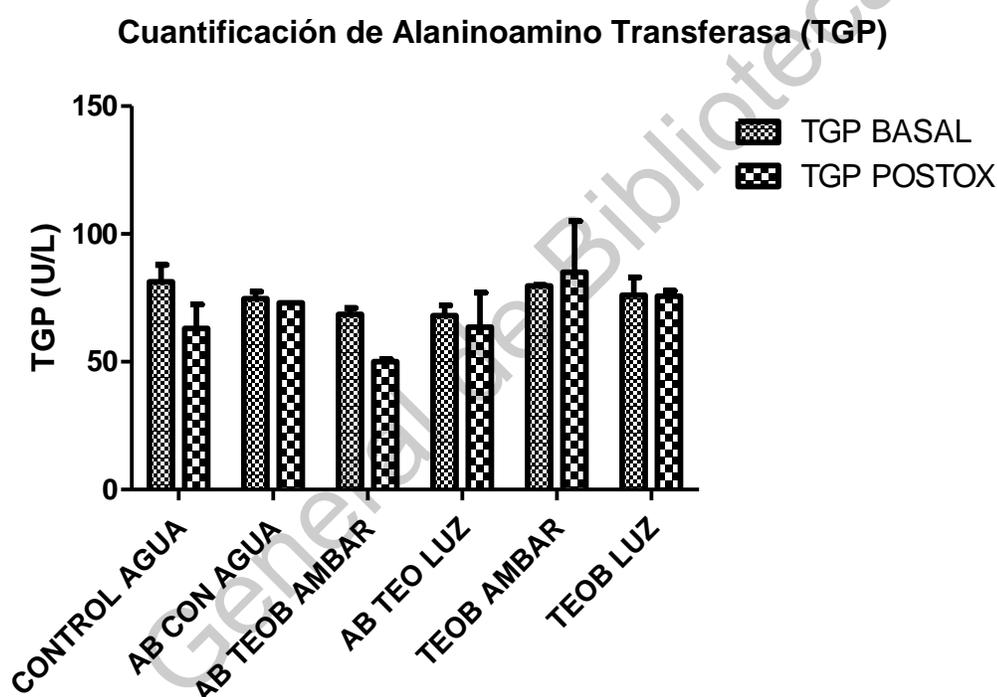


Figura 9 Gráfica resultante de la cuantificación sérica de TGP en grupos experimentales. Se observan dos resultados por cada grupo experimental, uno antes del tratamiento de teobromina (TGP BASAL) y otro después de la administración de teobromina (30 mg/L *ad libitum*) por 9 meses, incluyendo la cirugía estereotáxica (TGP POSTOX). No se presenta diferencia significativa en ninguno de los grupos, manteniéndose los resultados en un parámetro normal. Se realizó análisis estadístico ANOVA de dos vías con la prueba *post hoc* de Bonferroni. Todos los datos se expresan como promedio \pm SEM (n=5 animales por grupo) $p > 0.05$.

7.1.2 Pruebas de funcionamiento renal

Con la primera cuantificación de urea (UREA BASAL) se obtuvieron resultados para cada uno de los 6 grupos experimentales que oscilan entre 37 a 41 mg/dL. Los datos no presentan diferencia significativa, manteniéndose los valores dentro de un rango normal. Los resultados obtenidos de la segunda medición de urea (UREA POSTOX) para cada uno de los grupos experimentales oscilan entre 35 y 47 mg/dL, los cuales se encuentran dentro de un rango normal y sin diferencia significativa. No obstante observamos en los grupos: AB CON AGUA, AB TEOB AMBAR, AB TEOB LUZ y TEOB LUZ, una ligera tendencia en el aumento de valores, pero no lo suficiente para considerar la existencia de toxicidad (figura 10).

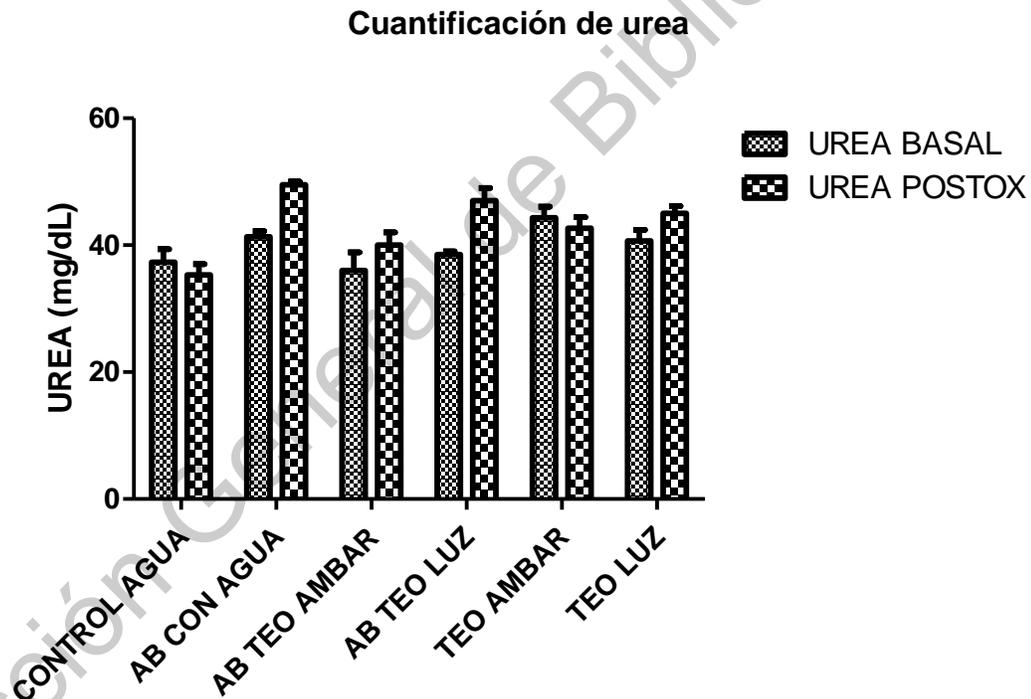


Figura 10 Gráfica resultante de la cuantificación sérica de urea en grupos experimentales. Se observan dos resultados por cada grupo experimental, uno antes del tratamiento de teobromina (UREA BASAL) y otro después la administración de teobromina (30 mg/L *ad libitum*) por 9 meses, incluyendo la cirugía estereotáxica (UREA POSTOX). No se presenta diferencia significativa en ninguno de los grupos, manteniéndose los resultados en un parámetro normal. Se realizó análisis estadístico ANOVA de dos vías con la prueba *post hoc* de

Bonferroni. Todos los datos se expresan como promedio \pm SEM (n=5 animales por grupo) $p>0.05$.

La cuantificación de creatinina (CREATININA BASAL) que se realizó de primera instancia obtuvo resultados para cada uno de los 6 grupos experimentales, los cuales oscilan entre 0.6 y 0.8 mg/dL. Estos datos no presentaron diferencia significativa, manteniéndose los valores dentro de un rango normal.

En la segunda medición de creatinina (CREATININA POSTOX), se obtuvieron resultados para cada uno de los grupos experimentales que van desde 0.6 hasta 0.7 mg/dL, sin embargo, todos estos resultados se encuentran dentro de un rango normal y estadísticamente no presentan diferencia significativa (figura 11).

Cuantificación de Creatinina

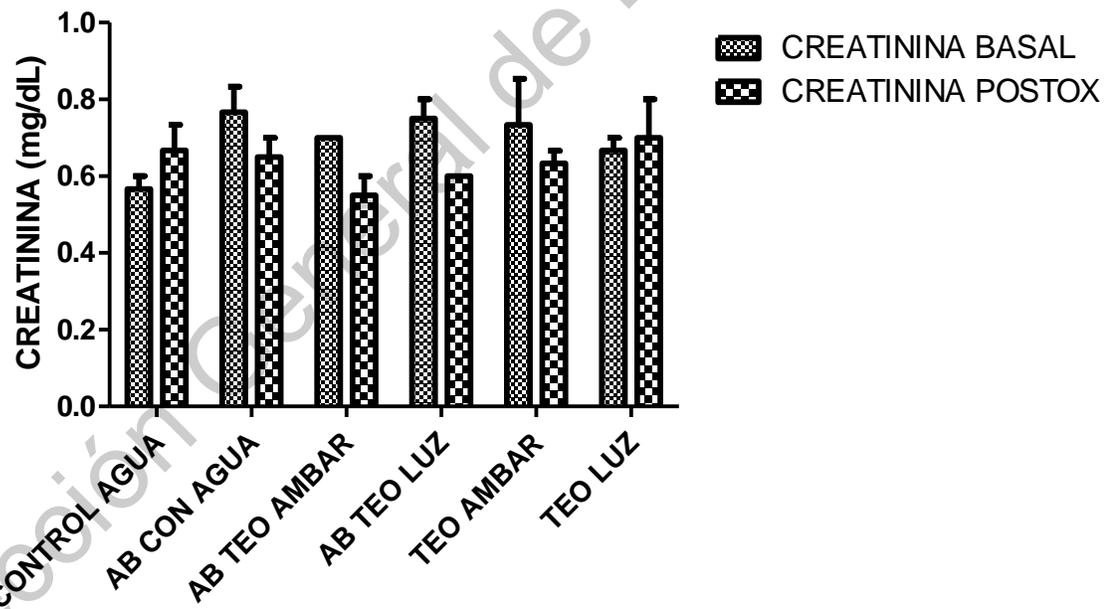


Figura 11 Gráfica resultante de la cuantificación sérica de creatinina en grupos experimentales. Se observan dos resultados por cada grupo experimental, uno antes del tratamiento de teobromina (CREATININA BASAL) y otro después de la administración de teobromina (30 mg/L *ad libitum*) por 9 meses, incluyendo la cirugía estereotáxica (CREATININA POSTOX). No se presenta diferencia significativa en ninguno de los grupos, manteniéndose los resultados en un parámetro normal. Se realizó análisis estadístico ANOVA de dos vías con la prueba

post hoc de *Bonferroni*. Todos los datos se expresan como promedio \pm SEM (n=5 animales por grupo) $p > 0.05$.

7.2 Determinación de la estabilidad de la teobromina por un método en HPLC.

Para la determinación de la estabilidad de la molécula de teobromina en solución (30 mg/L) contenida en dos recipientes, uno ámbar y uno traslúcido, se determinó un método en HPLC para su identificación. Primero se procedió a la realización de una curva de calibración, para poder proceder a su cuantificación. Para lo cual, se utilizaron concentraciones mostradas en la siguiente tabla, debido a que la concentración de la muestra era de aproximadamente 30 mg/L.

Tabla 7 Área bajo la curva dependiente de la concentración

[mg/L]	Área bajo la curva
0	0
10	607.14
20	1214.75
30	1815.97
40	2495.04
50	3127.52
60	3708.35

A partir de los valores obtenidos en la tabla anterior se realizó la curva de calibración en donde se puede observar una $R^2 = 0.9997$ (Figura 12).

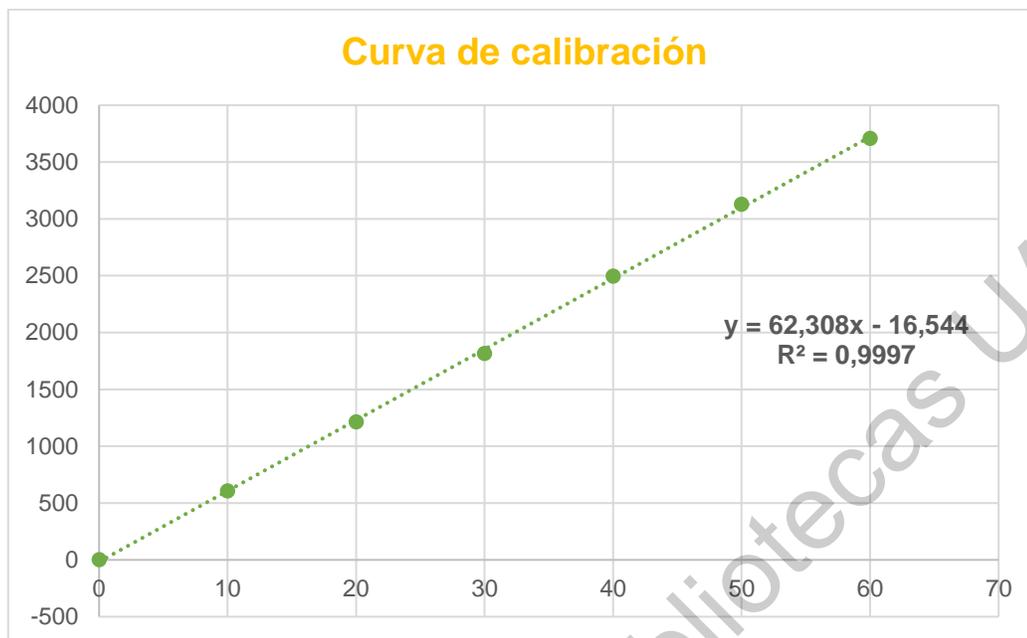


Figura 12 Curva de calibración de método de análisis en HPLC. Se muestra la curva de calibración correspondiente al método que se determinó para la identificación y cuantificación de la molécula de teobromina encontrada en solución a 30 mg/L en un frasco ámbar y uno traslúcido. Las concentraciones utilizadas como puntos de la curva se encuentran disueltas en agua. Se aprecia una R^2 de 0.9997.

Los límites de cuantificación y detección para la realización de la curva de calibración se calcularon utilizando la ecuación de la recta resultante ($y = 62.308x - 16.544$) y con ello, los siguientes los valores mostrados en la tabla

Tabla 8 Cálculo de límites de cuantificación y detección

[mg/L]	Y_{calc}	$(Y_{calc}-Y)^2$
0	-15.98	255.36
10	606.52	0.38
20	1229.02	203.63
30	1851.52	1263.8
40	2474.02	441.84
50	3096.52	536.38
60	3719.02	113.84
Σ		2815.23

En donde la $Sx/y = \sqrt{\frac{2815.23}{5}} = 23.72$; el límite de detección (LD) = $\frac{(3)(23.72)}{62.25} = 1.14$ mg/L

y el límite de cuantificación (LC) = $\frac{(5)(23.72)}{62.25} = 1.90$ mg/L.

A continuación, se presenta una serie de cromatogramas correspondientes a cada punto de la curva de calibración, representando los estándares de teobromina a las siguientes concentraciones: 10, 20, 30, 40, 50 y 60 mg/L.

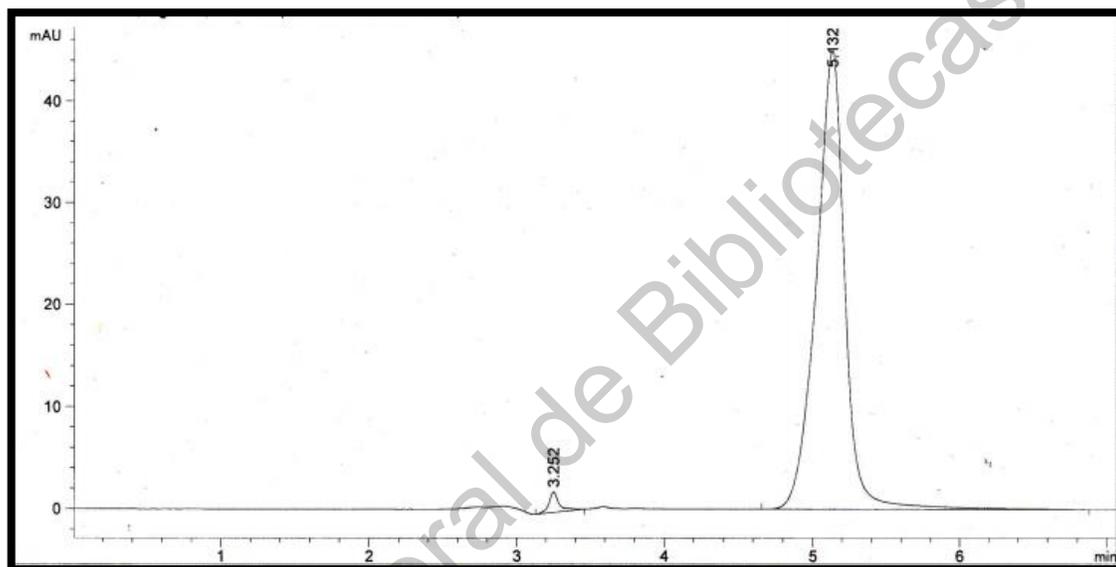


Figura 13 Cromatograma de estándar de teobromina 10 mg/L. Se observa el cromatograma del primer estándar de teobromina correspondiente a la concentración de 10 mg/L disuelto en agua destilada. Se aprecia un pico definido y con base estable con un tiempo de retención de 5.132 minutos. Las condiciones del método de medición se describieron anteriormente.

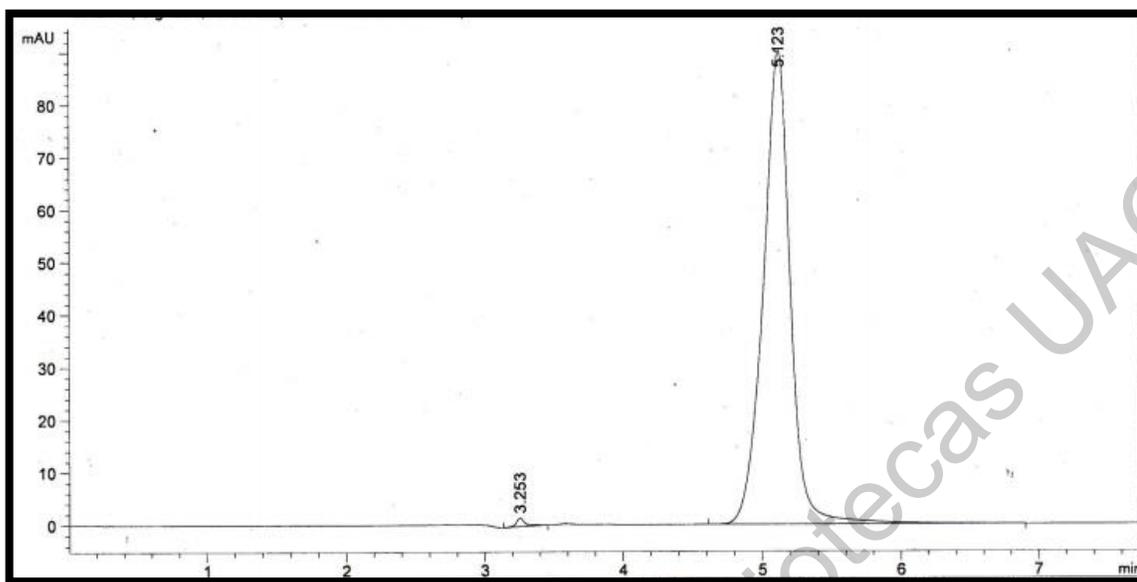


Figura 14 Cromatograma de estándar de teobromina 20 mg/L. Se observa el cromatograma del segundo estándar de teobromina correspondiente a la concentración de 20 mg/L disuelto en agua destilada. Se aprecia un pico definido y con base estable con tiempo de retención de 5.123 minutos. Las condiciones del método de medición se describieron anteriormente.

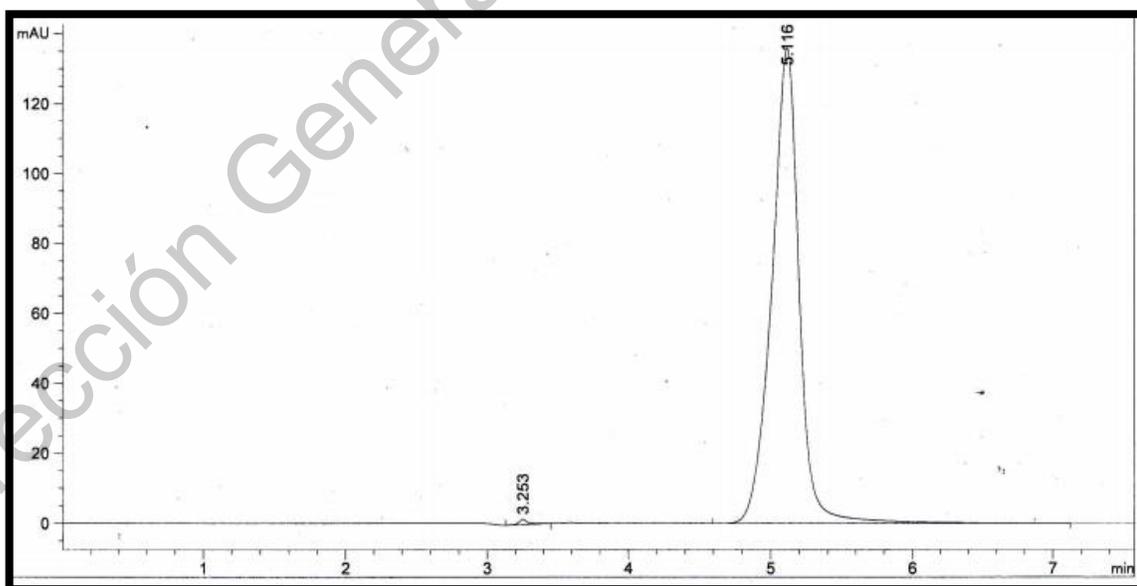


Figura 15 Cromatograma de estándar de teobromina 30 mg/L. Se observa el cromatograma del tercer estándar de teobromina correspondiente a la concentración de 30 mg/L disuelto en agua destilada. Se aprecia un pico estable y

definido con un tiempo de retención de 5.116 minutos. Las condiciones del método de medición se describieron anteriormente.

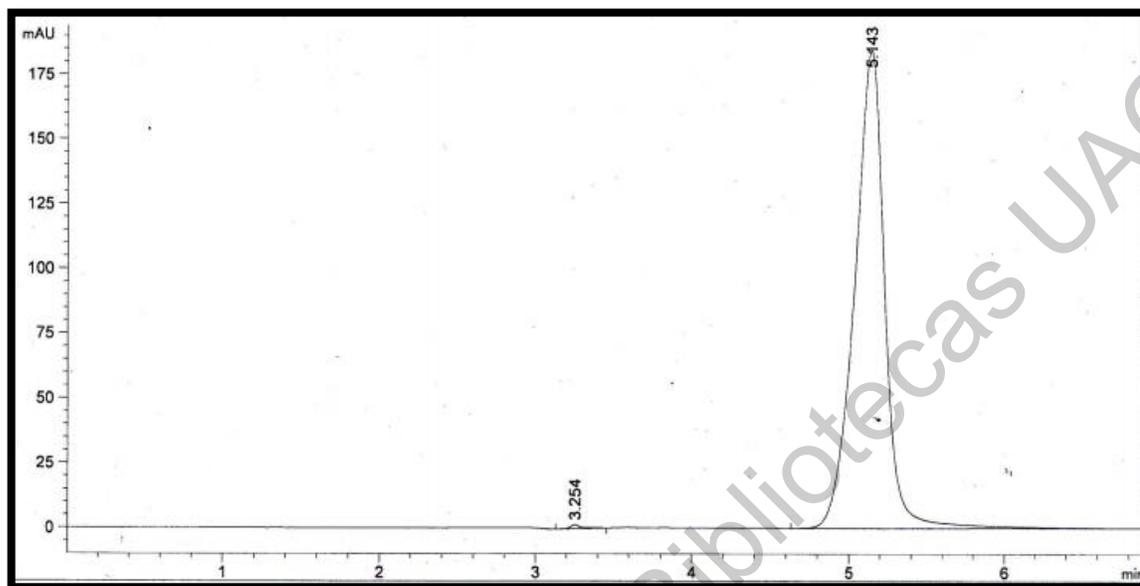


Figura 16 Cromatograma de estándar de teobromina 40 mg/L. Se observa el cromatograma del cuarto estándar de teobromina correspondiente a la concentración de 40 mg/L disuelto en agua destilada. Se aprecia un pico estable y definido con un tiempo de retención de 5.143 minutos. Las condiciones del método de medición se describieron anteriormente.

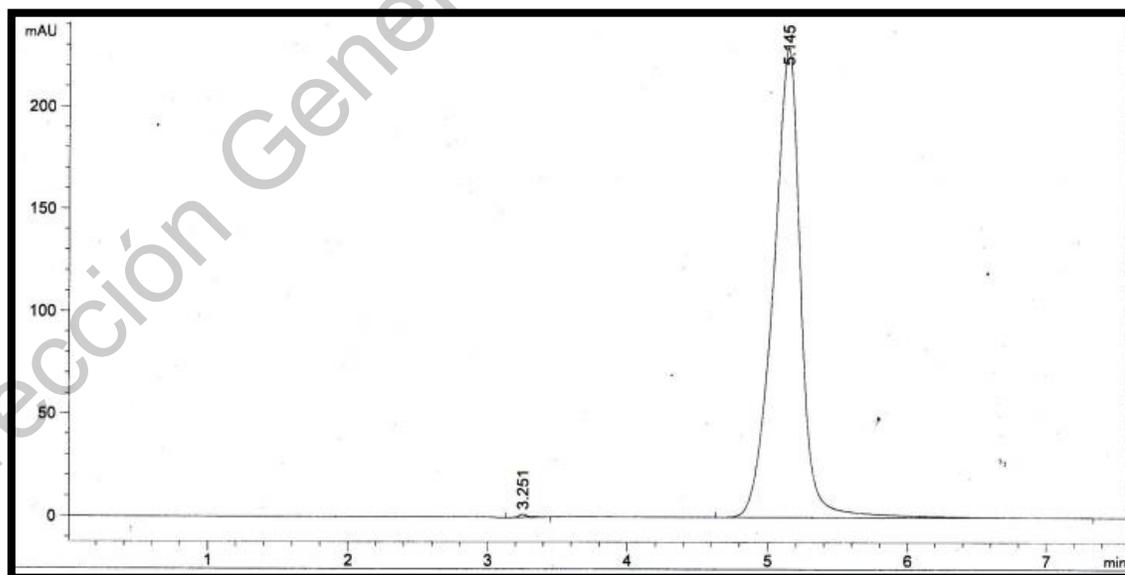


Figura 17 Cromatograma de estándar de teobromina 50 mg/L. Se observa el cromatograma del quinto estándar de teobromina correspondiente a la

concentración de 50 mg/L disuelto en agua destilada. Se aprecia un pico estable y definido con un tiempo de retención de 5.145 minutos. Las condiciones del método de medición se describieron anteriormente.

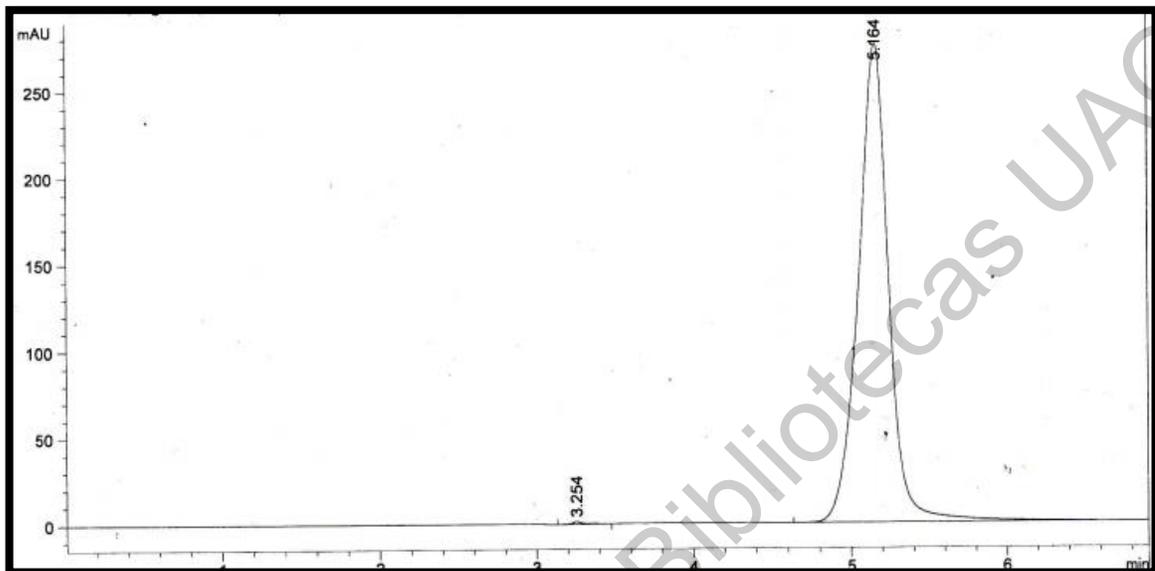


Figura 18 Cromatograma de estándar de teobromina 60 mg/L. Se observa el cromatograma del sexto estándar de teobromina correspondiente a la concentración de 60 mg/L disuelto en agua destilada. Se aprecia un pico de base estable y definido con un tiempo de retención de 5.164 minutos. Las condiciones del método de medición se describieron anteriormente.

El análisis de la solución de teobromina contenida en frasco ámbar obtuvo un área ajustada de 2143.34, lo que representa una concentración de 34.68 mg/L. En el cromatograma se puede observar una pequeña señal detectada sin pico definido y con 3.255 minutos como tiempo de retención. Posterior a esta, se muestra el pico resultante definido y estable de la teobromina, encontrada a un tiempo de retención 5.174 minutos (Figura 19).

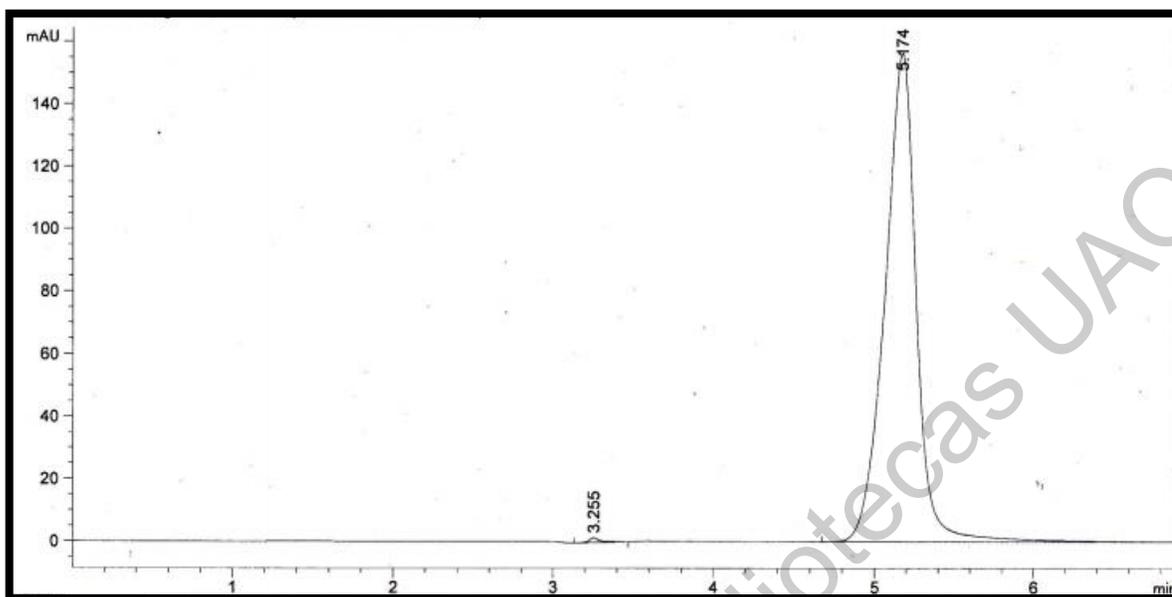


Figura 19 Cromatograma de muestra de teobromina contenida en recipiente ámbar (30 mg/L). Se presenta el cromatograma resultante de la medición de teobromina en recipiente ámbar por medio del método establecido. Se aprecia un pico característico definido y con base estable de 5.174 minutos como tiempo de retención. Las condiciones del método de medición se describieron anteriormente.

En el caso de la solución de teobromina contenida en el envase traslúcido tuvo como área ajustada resultante de 1964.0, lo que indica una concentración para esta muestra de 31.80 mg/L. El cromatograma presenta dos pequeñas señales detectadas a 3.257 y 3.735 minutos como tiempo de retención, sin embargo, no se diferencian como picos estables y definidos. Posterior a estas, se muestra el pico resultante definido y estable de la teobromina, encontrada a un tiempo de retención 5.181 minutos (Figura 20).

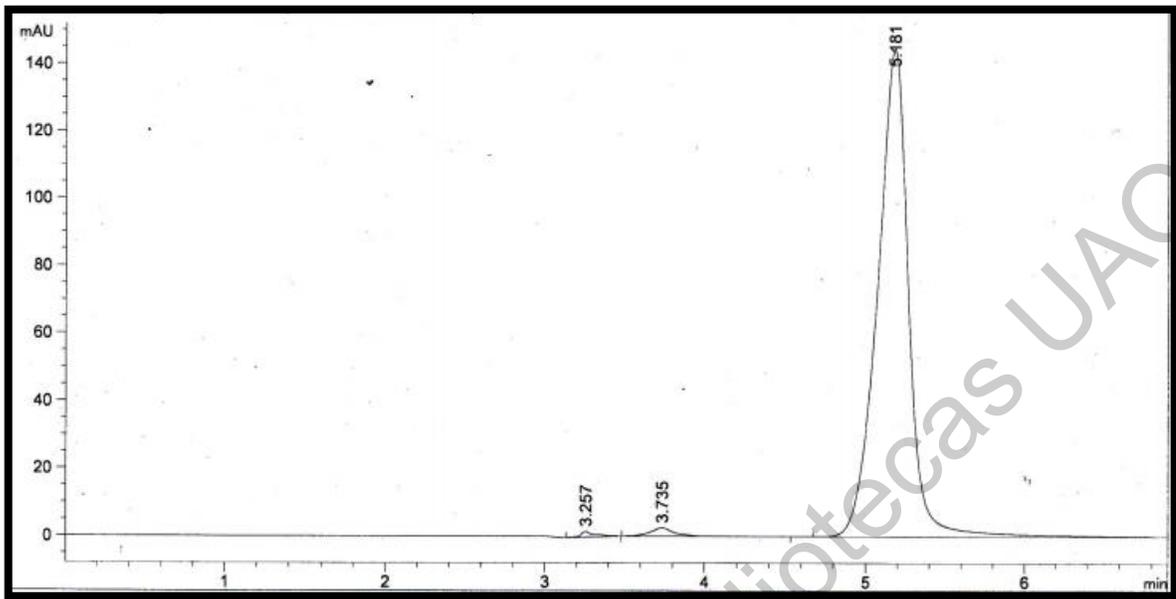


Figura 20 Cromatograma de muestra de teobromina contenida en recipiente traslúcido (30 mg/L). Se presenta el cromatograma resultante de la medición de teobromina en recipiente traslúcido por medio del método establecido. Se aprecia un pico característico definido y con base estable de 5.181 minutos como tiempo de retención. Las condiciones del método de medición se describieron anteriormente.

Después de mantener durante 5 meses las soluciones de teobromina contenidas en recipiente ámbar y uno traslúcido en una cámara de estabilidad, cuya humedad presentaba el 50.5% y 25.3 ° C de temperatura. Se determinó que las soluciones mantuvieron su aspecto transparente normal, las cuales no presentaron sedimentación, ni aspectos turbios.

7.3 Análisis de comportamiento

Después de la inyección intra-cerebral del péptido β -Amiloide, se procedió a la evaluación de la memoria a corto plazo, mediante la prueba de reconocimiento de objeto nuevo. El análisis se realizó por duplicado, con fase de pre-habitación (no reportada).

7.3.1 Evaluación de la memoria a corto plazo

La evaluación de la memoria a corto plazo se procedió a evaluar por medio de la prueba de reconocimiento de objeto nuevo (IRON), después de la inyección del péptido β -Amiloide. Se determinó una relación entre las veces que la rata interactuó con el objeto nuevo y las veces que interactuó con un objeto familiar. El análisis conductual de la prueba de IRON se realizó de manera individual y consistió en una fase de entrenamiento y una fase de prueba, ambas realizadas de la misma manera como ya antes se mencionó. 24 horas antes de comenzar con la fase de entrenamiento, se llevó a cabo una fase de habituación en la que se colocó la rata a campo abierto durante 5 minutos sin objetos, con el fin de proporcionarle a la rata la oportunidad de conocer el espacio.

Los resultados obtenidos en la fase de entrenamiento indican que ninguno de los 6 grupos experimentales es diferente. Sin embargo, en la fase de prueba si existen algunas diferencias significativas entre ciertos grupos. El grupo CONTROL AGUA en su fase de prueba no presenta diferencia significativa con ninguno de los otros grupos experimentales restantes. Por el contrario, la fase de prueba del grupo TEOB AMBAR indica diferencia entre la fase de prueba del grupo AB CON AGUA. Así mismo, el grupo AB TEOB LUZ en su fase de prueba presenta una diferencia significativa con el grupo AB TEOB AMBAR. El grupo TEOB AMBAR en fase de prueba indica diferencia con el grupo de AB TEOB LUZ. Por otro lado, el grupo TEOB LUZ indica diferencia significativa con el grupo TEOB LUZ (figura 21). El análisis estadístico realizado fue ANOVA de dos vías, con *Bonferroni* como prueba *post hoc*.

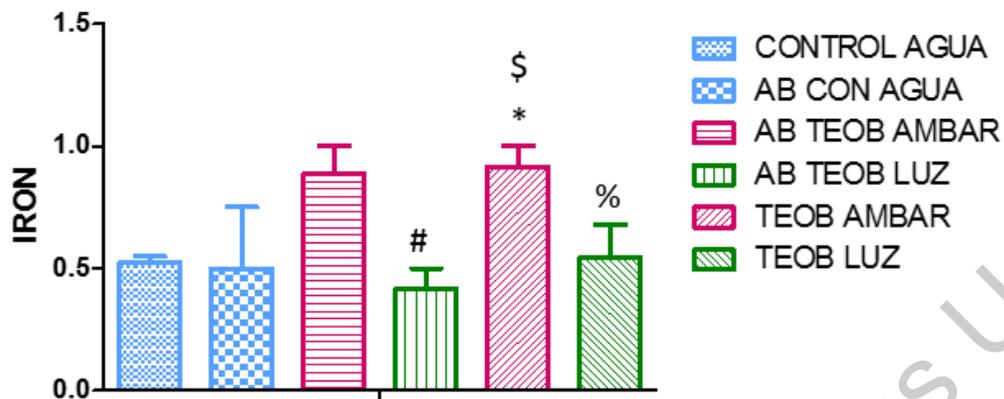


Figura 21. Índice de Reconocimiento de objeto nuevo (IRON). Los resultados del IRON en la fase de prueba realizada por duplicado y de manera individual para cada uno de los grupos experimentales. * Comparación entre grupo AB CON AGUA contra todos los demás grupos. # Comparación entre el grupo AB TEOB AMBAR y todos los demás grupos. \$ Comparación entre el grupo AB TEOB LUZ contra todos los grupos restantes. % Comparación entre TEOB AMBAR y todos los grupos existentes. Los datos expresados se presentan como promedio \pm SEM (n=5 animales por grupo) $p < 0.05$. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de dos vías, con Bonferroni como prueba *post hoc*.

7.4 Expresión de la placa senil amiloide en corteza frontal.

Después de la cirugía estereotáxica y la evaluación conductual de las ratas de cada uno de los grupos experimentales, se procedió a realizar una evaluación molecular en la expresión de la placa senil amiloide mediante una técnica por *Western Blot*. Se compararon todos los grupos experimentales (de la misma edad y mantenidos a las mismas condiciones descritas anteriormente) con un grupo alterno de edad menor a los demás grupos (CONTROL JOVEN), con el propósito de observar el efecto de la edad de los animales involucrados en los grupos experimentales en el desarrollo neuropatológico de la EA. Los resultados obtenidos de la expresión de la placa senil amiloide de 99 kDa de peso, demostraron que la edad influye en la generación de la acumulación extracelular formada por la placa amiloide. El grupo CONTROL AGUA, al cual no se le administró tratamiento de teobromina ni cirugía estereotáxica, mostró una expresión de las placas seniles amiloideas a comparación del grupo CONTROL JOVEN, el cual tuvo una expresión nula de dicho

aglomerado amiloide. De igual manera, se aprecia la expresión de éstas placas seniles amiloides para los grupos a los que se realizó la cirugía estereotáxica (AB CON AGUA, AB TEOB AMBAR Y AB TEOB LUZ), resultando que el grupo AB TEOB LUZ presenta una expresión menor que los otros dos grupos restantes que recibieron la inyección intra-cerebral del péptido A β . Del mismo modo, se aprecia la baja expresión (a comparación de los grupos anteriores) de las placas amiloides en los grupos sin cirugía estereotáxica y con el tratamiento con teobromina traslúcida y ámbar.

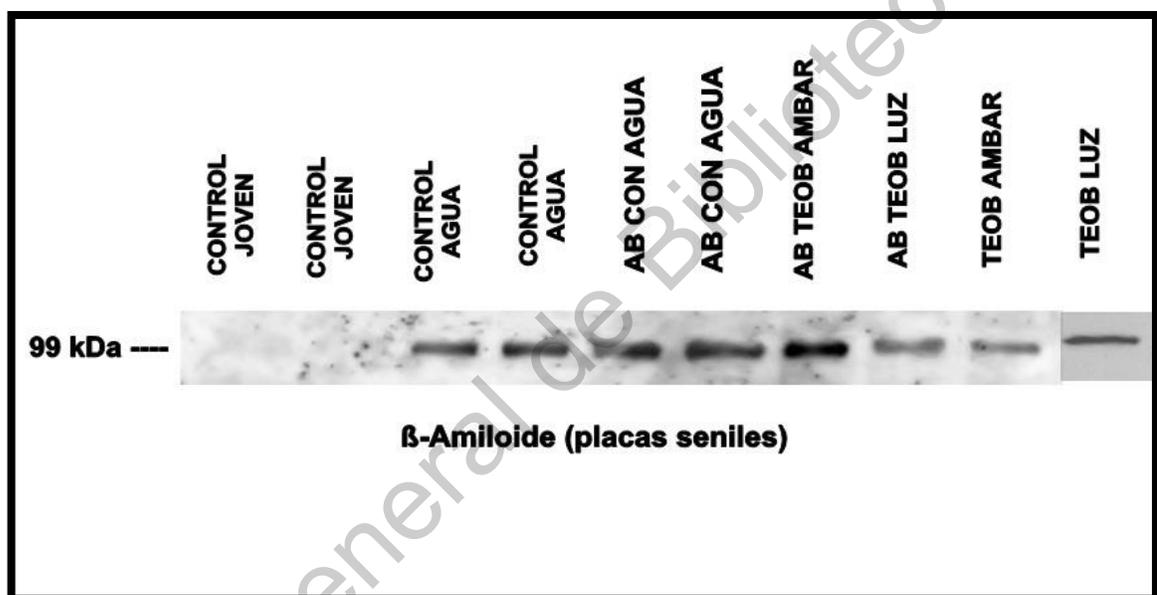


Figura 22 Expresión de la placa amiloide en corteza frontal por *Western Blot*. La edad muestra un efecto directo en la generación de las placas amiloides como efecto neuropatológico de la enfermedad. Además el tratamiento de teobromina a una concentración de 30 mg/L, muestra una menor expresión de la placa amiloide, en comparación a los grupos inyectados con el péptido A β .

8.0 DISCUSIÓN

En este trabajo, se estudió la toxicidad de la bebida de teobromina aplicada a un modelo murino de Alzheimer inducido por la inyección intra-cerebral del péptido A β bajo un sistema estereotáxico. Para ello se sometió a un tratamiento de 9 meses, en la administración *ad libitum* de la solución de teobromina a una concentración de 30 mg/L contenida en un recipiente ámbar y uno traslúcido, con el fin de observar simultáneamente estabilidad de la molécula. Dicha concentración de teobromina, se ha reportado con propiedades neuroprotectoras en un modelo de Alzheimer con dieta enriquecida con manteca de cerdo (Mendiola-Précoma *et al.*, 2017).

El daño hepático se ve influenciado por la exposición directa a productos tóxicos, ya que participa en la desintoxicación metabólica de productos y xenobióticos (Abd-Elhady *et al.*, 2013). Por lo que se considera importante evaluar la toxicidad hepática de la teobromina a esta concentración, además de que no existe otro estudio previo que lo informe. En el hígado se producen múltiples reacciones de transaminación, pero las únicas transaminasas con valor clínico son dos: transaminasa glutámico-oxalacética (TGO), la cual tiene como vida media 48 horas; y la transaminasa glutámico-pirúvica (TGP) con una vida media de 18 horas (Argente y Álvarez, 2008). Para ello se procedió a cuantificar transaminasas glutámico-oxalacética (TGO) y transaminasa glutámico-pirúvica (TGP) en muestras sanguíneas de ratas pertenecientes en nuestro modelo experimental. Se ha determinado la actividad sérica de las enzimas TGO y TGP como parte de pruebas de funcionamiento hepático para determinar si existe toxicidad en un modelo murino (Rivadeneira-Domínguez *et al.*, 2017)

Los resultados de la toxicidad hepática en la que se observó que no había cambios en la transaminasa glutámico oxalacética (TGO) son consistentes con los reportados por Rivadeneira-Dominguez *et al.*, 2018, el cual maneja valores normales de TGO de 63.0-157.0 UI/L. Por otro lado, Leon-Goñi *et al.*, 2011, reporta un estudio realizado para la estandarización de valores normales para distintos parámetros bioquímicos medidos en rata *Wistar*, entre los que se encuentra el analito TGO de

61.4 a 276.2 UI/L, tomado como referencia para los resultados que se obtuvieron para nuestro actual trabajo. Con los datos obtenidos en nuestra experimentación, se determina el correcto funcionamiento de la transaminasa glutámica oxalacética, encontrada en diferentes tejidos del organismo, especialmente en el hígado, corazón y el tejido muscular (Mora, 2002). Cuando su valor se encuentra elevado en sangre se debe principalmente a casos de hepatopatía, infarto agudo de miocardio y tejido muscular (Guyton, 2012). Estos resultados indicaron que no hay toxicidad hepática por esta enzima, debido a que los resultados de su cuantificación se encuentran dentro de los rangos de referencia. Sin embargo, podemos observar una ligera tendencia a disminuir el valor de TGO, mismo que no indica toxicidad, debido a que todos los valores obtenidos del analito se encuentran dentro de un rango normal. No obstante, Leon-Goñi comenta que el valor de TGO de sus animales aumentaba conforme pasaba la edad de los mismos, pero siempre respetaba un rango de referencia (figura 8). Aunque nuestro valor resultante tendió a disminuir, esta disminución no fue significativa y en todo momento se mantuvo dentro de los rangos normales que se tomaron como referencia.

La cuantificación de transaminasa glutámico-pirúvica (TGP) presenta una mayor especificidad como marcador de daño hepático, comparado con la transaminasa glutámico-oxalacética, debido a que la TGP se distribuye casi exclusivamente en el citosol del hepatocito, mientras que la TGO, se presenta con frecuencia en otros tejidos, además del hígado (Peña *et al.*, 2002). Los resultados de la cuantificación de TGP concuerdan con el rango reportado por León-Goñi *et al.*, 2011 de 41.0-83.0 UI/L. A su vez, Rivadeneyra-Domínguez *et al.*, 2018, reporta un valor de referencia para TGP de 19.0-53.0 UI/L. Se toma como estándar el parámetro de León-Goñi y su estudio de estandarización de valores de parámetros bioquímicos en rata *Wistar*. Con este rango normal se determina la ausencia de toxicidad hepática para nuestro tratamiento con teobromina en rata *Wistar*. Además, al comparar nuestros grupos experimentales con los grupos control (CONTROL AGUA y AB CON AGUA) no presentan diferencia significativa en una prueba *Bonferroni post hoc* (figura 9).

La urea es el principal producto terminal del metabolismo de nitrógeno proteico y su medición indica la evaluación del metabolismo genérico de proteínas y aminoácidos a través del ciclo de la urea, el cual se da en el hígado (Gonzales, 1998). Una vez que se encuentra en el torrente sanguíneo, la urea es excretada por los riñones. Después de esta filtración glomerular, un porcentaje se reabsorbe (entre el 40% y el 60%) a nivel tubular, por lo que es considerado un marcador del funcionamiento renal (Rivadeneira-Dominguez *et al.*, 2018).

Los resultados obtenidos de las mediciones de la urea, no arrojan una diferencia significativa entre los datos obtenidos en las mediciones basales y las mediciones realizadas durante el tratamiento crónico con teobromina e incluyendo la operación estereotáxica. Los resultados de urea obtenidos de cada uno de los 6 grupos experimentales oscilan entre 39 y 55 mg/dL (figura 10). León-Goñi *et al.*, 2011, reporta un valor de referencia de 39.6-68.8 mg/dL para ratas *Sprague Dawley* en etapa adulta, lo que nos indica que nuestros valores se encuentran dentro de un rango reportado en condiciones normales controladas. Además que nuestras condiciones de estadía para los animales, también fueron controladas y los valores obtenidos para nuestro grupo control podrían, ser tomados como rango de referencia normal.

De igual manera, el nitrógeno ureico (BUN), es otro indicativo de daño renal. El BUN es la cantidad de nitrógeno que circula en el torrente sanguíneo en forma de urea (Jones, 2013). En condiciones normales, la urea se filtra del plasma por el glomérulo renal; se reabsorbe a través de los túbulos renales, aunque la mayor parte se excreta a través de la orina. Sin embargo, si el riñón no funciona correctamente, entonces no se puede extraer suficiente urea del plasma, lo que produce niveles más altos de BUN en circulación (Guillamás *et al.*, 2017). Aunque este parámetro bioquímico no se reporta como tal en el trabajo, se reporta el valor de la urea. Si bien, con el valor de la urea, se puede determinar el valor del BUN y viceversa, haciendo una relación entre ambos analitos. Una molécula de urea pesa 60.06 g/mol (Y) y una molécula de BUN pesa 28 g/mol (X), haciendo la relación entre ambos pesos resulta 2.14. Este valor lo tomamos como una constante que se utiliza para

determinar la concentración de alguno de los dos analitos correspondientes. En este caso, sólo se midió la urea, si deseamos obtener el BUN, se procedería a dividir el valor total de la urea entre 2.14. No obstante, en este trabajo no se reporta el valor del BUN, debido a que no se obtuvo diferencias significativas utilizando los valores integrales obtenidos con las mediciones de la urea.

El último analito analizado para la determinación de la toxicidad de un tratamiento crónico de teobromina, fue la creatinina. La creatinina es un producto de excreción de la actividad muscular, que circula en la sangre. La eliminación de ésta se da únicamente por vía renal, por lo que existe una relación entre los niveles de creatinina y la función renal. Los resultados obtenidos en las mediciones de la creatinina basales, así como los obtenidos durante el tratamiento crónico y posterior a la inyección intra-cerebral de A β (POSTOX) no presentan diferencia significativa entre los 6 grupos experimentales utilizados. Los resultados obtenidos oscilan entre 0.6 y 0.8 mg/dL. Leon-Goñi *et al.*, 2011 reporta en su artículo de estandarización de parámetros bioquímicos para animales de laboratorio, un valor normal de creatinina de 0.43 a 0.88 mg/dL, lo que nos permite confirmar la ausencia de toxicidad de la solución de teobromina con propiedades neuroprotectoras utilizada en nuestro tratamiento (figura 11).

La determinación de la estabilidad de la molécula de la teobromina en solución se realizó mediante un método de cromatografía líquida isocrática. El cromatógrafo se compuso de una bomba cuaternaria y un detector de arreglo de diodos. Las ventajas de utilizar el detector de arreglo de diodos, respecto a otros, es que éste registra el espectro de cada soluto conforme se va eludiendo por la columna, además que permite seleccionar mejor la longitud de onda, ya que se pueden registrar varias de estas. Por otro lado, el arreglo de diodos realiza la verificación de la pureza del pico resultante, utilizando la absorbancia y las longitudes de onda, en el caso de que la cresta represente un solo compuesto o sea una cresta compuesta (Reges de Serna, *et al.*, 2015). Para el desarrollo de este método de análisis, se utilizó una columna C18 como fase estacionaria y una elución isocrática con una composición de fase móvil de acetonitrilo al 10% con agua al 90%, ajustada a un pH de 2.5 con ácido

acético. Dichas condiciones del método fueron consistentes a lo reportado por Thomas *et al.*, 2004, en donde se estandariza un método de identificación y cuantificación de metilxantinas como: cafeína, teobromina y teofilina en un material de chocolate utilizado como referencia para posteriores mediciones en la industria alimenticia.

Para el método de análisis de las soluciones de teobromina, se determinó un flujo de 0.5 mL/min, ya que fue a este parámetro donde los picos tenían una mejor resolución. El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. El tiempo que tarda un compuesto a ser eluido de la columna se denomina tiempo de retención y se considera una propiedad identificativa característica de un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria (Santiago-Rivas, 2007). Los estándares de teobromina medidos para la curva de calibración tuvieron un pico resultante a los 5.137 minutos (tiempo promedio de las 6 concentraciones de teobromina medidas como puntos de la curva de calibración) como tiempo de retención. El cromatograma de la solución de teobromina contenida en un frasco ámbar tuvo como resultado un tiempo de retención de 5.174 minutos. En el caso de la teobromina en solución contenida en un frasco traslúcido se obtuvo un tiempo de retención de 5.181 minutos. Tanto los tiempos de retención de cada uno de los puntos de la curva de calibración y de las muestras de teobromina en frasco ámbar y traslúcido respectivamente, se obtuvieron tiempos de retención similares a los 5.1 minutos, por lo que se puede decir que este parámetro es característico a la teobromina. Además éstos resultados son congruentes con lo reportado por Bispo *et al.*, 2002, cuyo reporte indica un tiempo de retención de menos de 6 minutos para la identificación de teobromina en HPLC.

Por otro lado, el resultado del coeficiente de correlación de la curva de calibración realizada para la validación del método de medida de teobromina en HPLC es importante, debido a que éste es un indicador de la precisión y confiabilidad de la relación entre las variables involucradas. Si el coeficiente de correlación llegase a ser positivo y elevado (muy cercano a uno), este denotaría que las variables X y Y

tienen comportamientos altamente relacionados, y esta tendencia es explicada por la línea de regresión $Y=mx+b$. Cuando esta línea está perfectamente ajustada, el coeficiente de correlación es igual a 1 (Sapag-Chaín, 2007). El coeficiente de correlación o R^2 resultante de la curva fue de 0.9997, lo que indica que la línea de regresión presenta un 99.97% de confiabilidad y relación entre sus variables, es decir, la relación entre la concentración de los estándares de teobromina en relación y su área bajo la curva resultante de cada una de éstas concentraciones.

El análisis de la muestra de la solución de teobromina a concentración de 30 mg/L en frasco ámbar obtuvo un área bajo la curva de 2143.34, lo que representa una concentración de 34.68 mg/L. Los datos indican una concentración mayor a la inicial, por lo que se atribuye la existencia de evaporación de agua de la solución, sin embargo, este valor no es menor a la concentración estudiada (30 mg/L), lo que permite indicar que la teobromina no está degradándose. El cromatograma resultante de la medición de la solución de la teobromina en frasco ámbar se muestra en la figura 19, en donde se aprecia el pico característico de la teobromina a 5.174 minutos de tiempo de retención; anterior a éste, se muestra una pequeña “grieta” de 3.255 minutos de tiempo de retención, sabemos que no es un pico definido y estable, lo que se descarta como pico característico de alguna sustancia y se toma como ruido encontrado dentro de los 7 minutos de duración del análisis.

Para el caso del análisis de la muestra de la solución de teobromina a concentración de 30 mg/L en frasco traslúcido se obtuvo un área bajo la curva de 1964.0, lo que indica una concentración de 31.80 mg/L. Del mismo modo, se obtiene una concentración extrapolada mayor a la inicial. Sin embargo, no se obtiene un valor menor que indique degradación de la teobromina en frasco traslúcido. El cromatograma resultante de ésta medición se muestra en la figura 20, en donde se puede apreciar el pico característico de la teobromina a 5.181 minutos como tiempo de retención; anterior a éste, se observan dos pequeñas curvaturas de 3.257 y 3.735 minutos cada una de ellas. De igual manera, no las podemos tomar como picos característicos de una sustancia determinada, ya que no alcanza a presentarse

como un pico definido y estable dentro de los 7 minutos que dura el método de análisis implementado para estas mediciones, tomándolas finalmente como ruido.

La memoria es una función compleja del sistema nervioso, la cual consiste en la capacidad de las vías neuronales para retener información obtenida del aprendizaje, y ésta se divide en dos tipos: memoria a corto plazo (retención de la información por un corto periodo de tiempo) y la memoria a largo plazo (retención de la información durante un largo tiempo) (Eriksson *et al.*, 2015). En este trabajo se realizó el análisis de comportamiento con el fin de evaluar la función cognitiva resultante de la memoria a corto plazo.

Los estudios clínicos revelan que las personas que padecen demencia causada por la enfermedad de Alzheimer, presentan deficiencias cognitivas, alteraciones de la personalidad y deficiencias visuales (Pan *et al.*, 2018). Los péptidos A β pueden asociarse (como dímeros y oligómeros), y crecer como fibras en forma de láminas con plegamiento β , las cuales componen las placas seniles amiloides. Se sabe que, los dímeros y oligómeros solubles de la forma de A β de 42 aminoácidos de largo son aquellos que desencadenan el padecimiento. Aunque los oligómeros A β son tóxicos por sí mismos, su capacidad completa para causar la EA depende de la proteína TAU, la cual, en situaciones normales, se une a los microtúbulos de los axones para rendirles estabilidad. Estas proteínas tau se hiperfosforilan y son redistribuidas hacia el cuerpo de la neurona y las dendritas; ahí se agregan entre sí y se hacen insolubles, lo cual forma las marañas neurofibrilares. Estos cambios parecen ser impulsados por A β . Evidentemente no son las marañas neurofibrilares, sino más bien las formas intermedias más solubles de TAU las que tal vez produzcan los efectos tóxicos (Díaz *et al.*, 2018). Por lo que se implementó un modelo de Alzheimer bajo la inyección intracerebroventricular del péptido A β ¹⁻⁴².

La evaluación de la memoria a corto plazo bajo el Índice de reconocimiento de objeto nuevo (IRON). En 1988, Ennauer y Delacour describen una nueva prueba de memoria en ratas en la que se basaban principalmente en la tendencia natural de las ratas a la exploración de la novedad. Está técnica cuenta con numerosas

ventajas a comparación de otras pruebas conductuales más complejas (laberinto elevado de 8 brazos, laberinto acuático de Morris, entre otros). Se realiza de una manera rápida, ya que consiste en una prueba de dos ensayos, es rentable y etiológicamente relevante (debido a que se basa en la preferencia de los roedores por estímulos novedosos), además que no requiere de privación de alimentos o agua y no requiere entrenamiento largo y repetido, confiando en el comportamiento innato (Grayson *et al.*, 2015). Algunas áreas específicas del cerebro están fuertemente involucradas en los déficits de la prueba. La integridad del hipocampo es fundamental para la adquisición y consolidación de la memoria en el IRON. Sin embargo, la corteza frontal de la rata es otra área del cerebro importante en el desarrollo de la técnica, especialmente en señales visuales y olfatorias (Mhillaj *et al.*, 2018).

En este trabajo se evaluó la memoria de trabajo con la prueba IRON, basada en la novedad de objetos en el aparato, en donde se realizó una fase previa de habituación al campo abierto realizada 24 horas antes de comenzar con las siguientes fases (habituación no reportada). Pasado este tiempo, se realizó una fase de familiarización con dos objetos idénticos (fase de entrenamiento) y posteriormente, una fase de prueba con uno de los dos objetos familiares y otro nuevo. Los resultados de esta técnica indican que el grupo AB TEOB AMBAR y TEOB AMBAR, presentan una tendencia en la que se ve aumentado el índice de reconocimiento de la fase de prueba con respecto a la fase de entrenamiento. Por lo que confirmamos que la teobromina ámbar presenta una mayor efectividad neuroprotectora, debido a que a mayor índice de reconocimiento, mejor funcionamiento cognitivo. Estos resultados son consistentes con los ya reportados por Mhillaj *et al.*, 2018, en donde se implementa un modelo de Alzheimer mediante la inyección intracerebroventricular del péptido A β para la evaluación de un antiinflamatorio, y se observó la mejora de funciones cognitivas mediante la técnica IRON y durante el tratamiento con Celecoxib como antiinflamatorio. Mhillaj, observa un aumento del índice de reconocimiento en fase de prueba con respecto a la fase de entrenamiento en dos de sus grupos experimentales: un grupo sham y uno con

A β , ambos tratados con Celecoxib; por lo que indica la prevención del daño cognitivo mediante su tratamiento antiinflamatorio.

Así mismo, el grupo TEOB AMBAR presenta una diferencia significativa con los grupos AB CON AGUA, AB TEOB LUZ y TEOB AMBAR en la fase de prueba. Mientras que el grupo AB TEOB AMBAR presenta diferencia significativa con el grupo AB TEOB LUZ en la fase de prueba. Con los datos obtenidos del IRON, se puede confirmar que los grupos tratados con teobromina ámbar presentan una mejoría en las funciones cognitivas, tanto para grupos con la previa inyección del péptido A β , como los grupos que no pasaron por cirugía estereotáxica. Además, que con la detección del deterioro de la memoria a corto plazo evaluada mediante la prueba de comportamiento IRON, precisa la existencia de la generación de la EA esporádica, ya que la memoria de corto plazo es el dominio de memoria más afectada en ésta (Espinosa *et al.*, 2013).

Las ratas utilizadas en el diseño experimental del presente trabajo contaban con una edad avanzada (17 meses), por lo que se determinó una evaluación en la expresión de la placa amiloide o aglomerado de A β en la corteza frontal de estos animales. Estos valores se compararon con un grupo nuevo de muestras de corteza frontal de ratas jóvenes de 6 meses de edad, con el fin de determinar que tanto el factor edad afecta a las pruebas conductuales de cognición y aprendizaje implementadas en el actual trabajo.

El péptido A β se obtiene por la hidrólisis de su proteína precursora amiloide y sólo el A β agregado es neurotóxico, lo que conduce a una disfunción sináptica y una memoria deteriorada (Tian *et al.*, 2018). Por lo que se determinó la expresión de la placa amiloide mediante la técnica de *Western blot*, para los grupos del diseño experimental y las muestras de corteza frontal jóvenes.

Los resultados indican que la edad es un factor influyente para la generación de depósitos extracelulares del péptido A β . El CONTROL JOVEN muestra una nula expresión en el resultado del revelado del ensayo de *Western Blot* a comparación del grupo CONTROL AGUA, el cual no cuenta con cirugía estereotáxica ni

tratamiento de teobromina, muestra una banda visible y definida como expresión de la placa aglomerada amiloidea, al igual que los grupos con cirugía estereotáxica (AB CON AGUA, AB TEOB AMBAR y AB TEOB LUZ) que muestran una banda totalmente visible y “gruesa” a la expresión de dicha proteína. En el caso de los grupos con tratamiento de teobromina y sin cirugía (TEOB AMBAR y TEOB LUZ), presentan una ligera expresión del aglomerado, lo que permite afirmar la propiedad neuroprotectora de la teobromina para el Alzheimer. Estos dos últimos grupos cuentan con la misma edad (17 meses) por lo que se toman las bandas de expresión resultante como “neurodegeneración natural”, sin embargo, estas bandas se encuentran más “tenues” que el grupo CONTROL AGUA, el cual no se encuentra libre de tratamiento con teobromina y presenta una mayor expresión a simple vista de la banda del aglomerado de $A\beta$, que los propios grupos con TEOB AMBAR y TEOB LUZ. Este resultado, permite comprender que la teobromina retarda el progreso de la EA (figura 23). Estos resultados son consistentes con lo publicado por Wang *et al.*, 2020, en donde muestran que después de la inyección de una vacuna Anti- $A\beta$ a sus ratones, se presenta un aumento de anticuerpos Anti- $A\beta$, la función cognitiva mejora significativamente y los niveles de TAU total y TAU fosforilada se reducen significativamente; de igual manera los resultados de *Western Blot* en la expresión del péptido $A\beta$ se ven disminuidos.

Una posibilidad del incremento de β -Amiloide puede estar asociado a la señalización purinérgica mediada por la adenosina, que es importante en el cerebro por la integración de circuitos entre neuronas y células gliales. Tanto los receptores P1 de adenosina y los receptores a nucleótidos P2Y y P2X, se han visto implicados en la regulación fisiológica de las células nerviosas y neurogliales. Del mismo modo, se dictaminan como factores de estudio en diversas enfermedades neurológicas (Weisman, *et al.*, 2012). Los receptores de adenosina son: A_1 , A_{2A} , A_{2B} y A_3 son acoplados a proteínas G, que se distribuyen en diferentes órganos y controlan diversas funciones. Los receptores A_1 y A_{2A} se encuentran principalmente en el SNC, específicamente en la corteza frontal, hipocampo, cerebelo, así como en el asta dorsal de la médula. Mientras que A_{2B} y A_3 están presentes en el cerebro en

baja cantidad (Poleszak, *et al.*, 2019). Tanto A₁ como A_{2A} presentan una mayor afinidad de unión por adenosina que los A_{2B} y A₃ (Fredholm, *et al.*, 2010). La teobromina, es un derivado de la familia de las metilxantina, que presenta actividad antagónica sobre los receptores P1 de adenosina. La teobromina es la metilxantina que cruza de manera más fácil la barrera hematoencefálica, sin embargo, tiene una baja disponibilidad. El tratamiento crónico con teobromina (de 9 meses), nos asegura que la molécula se mantenga en el encéfalo, en donde encontramos los receptores A₁ y A_{2A}. Al modular la actividad de estos receptores de adenosina mediante la teobromina, se genera neuroprotección a través del control de la reactividad de la microglía y la neuroinflamación (Madeira, *et al.*, 2017).

La microglía activada es un aspecto importante en la generación de la EA y la secreción de citocinas proinflamatorias por la microglía puede dar lugar a un circuito de retroalimentación positiva entre las neuronas y la microglía, resultando un proceso neuroinflamatorio (Webers, *et al.*, 2019). Se sugiere que la teobromina se une a los receptores purinérgicos A₁ y A_{2A}, en células neuronales y microglía, inhibiendo inflamación y mejorando la respuesta cognitiva.

8.0 CONCLUSIONES

- La inyección intracraneal del péptido β -Amiloide causa la generación de placas seniles amiloides extracelulares características de la enfermedad de Alzheimer.
- La disminución del Índice de Reconocimiento de Objeto Nuevo (IRON) resulta del A β administrado bajo la cirugía estereotáxica.
- La edad tiene efecto directo en la generación de placas seniles amiloides y en el aprendizaje.
- La teobromina resulta ser una molécula estable a la luz, presentando la ausencia de desintegración observada por un método de análisis en HPLC.
- La teobromina encontrada en solución a una concentración de 30 mg/L presenta estabilidad a la humedad y a la temperatura.
- La teobromina a una concentración de 30 mg/L, no presenta daños hepatotóxicos y nefrotóxicos.
- La teobromina a 30 mg/L presenta efecto neuroprotector.

9.0 REFERENCIAS

Abd-Elhady, H. K., & Abou-Elghar, G. E. 2013. Abamectin Induced Biochemical and Histopathological Changes in the Albino Rat, *Rattus Norvegicus*. *Journal of Plant Protection Research*, 53(3), 263–270

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Biología molecular de la célula. Quinta Edición. OMEGA. México. 2010:912.

Andrade P, Rodrigues S, Rodrigues-Pinto E, Gaspar R, Lopes J, Lopes S, Macedo G. 2016. Diagnostic Accuracy of Controlled Attenuation Parameter for Detecting Hepatic Steatosis in Patients with Chronic Liver Disease. *Portuguese Journal of Gastroenterology*. 24:161-168.

Argente, H, Álvarez, M. Semiología Médica: fisiopatología, semiotecnia y propedéutica. PANAMERICANA. México. 2008:802.

Bahaeddin Z, Yans A, Khodagholi F, Hajimehdipoor H, Sahranavard S. 2017. Hazelnut and neuroprotection: Improved memory and hindered anxiety in response to intra-hippocampal A β injection. *Nutr Neurosci*. 20(6):317-326.

Berne R, Levy M. Fisiología. Cuarta edición. Elsevier. México. 2006:76-82.

Bispo MS, Veloso MC, Pinheiro HL, De Oliveira RF, Reis JO, De Andrade JB. 2002. Simultaneous determination of caffeine, theobromine and theophylline by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. Sci*. 40:45-48.

Boison D. Adenosine as a neuromodulator in neurological disease. *Curr Opin Pharmacol*. 2008; 8(1):1-7.

Brailowsky S. Las sustancias de los sueños. Neuropsicofarmacología. Tercera edición. Fondo de Cultura económica. México. 2008; 206-209.

Chu L. 2012. Alzheimer's disease: early diagnosis and treatment. *Hong Kong Med J*. 18:228-237.

Dehnamaki F, Karimi A, Pilevarian A, Fatemi I, Kaeidi A, Allahtavakoli M, Reza M, Khademalhosseini M, Bazmandegan G. 2018. Treatment with troxerutin protects against cisplatin-induced kidney injury in mice. *Acta Chir Belg.* 13:1-7.

Díaz A, Escobedo C, Treviño S, Chávez R, Lopez-Lopez G, Moran C, Guevara J, Venegas B, Muñoz-Arenas G. 2018. Metabolic síndrome exacerbates the recognition memory impairment and oxidative-inflammatory response in Rats with an Intrahippocampal injection of amyloid Beta 1-42. *Oxid Med Cell Longev.* 1:13.

Ennaceur A, Delacour J. 1988. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res.* (1):47-59.

Eriksson J, Vogel EK, Lansner A, Bergstrom F, Nyber L. 2015. Neurocognitive architecture of working memory. *Neuron.* 88:33-46.

Espinosa J, Rocha A, Nunes F, Costa MS, Schein V, Kazlauckas V, Kalinine E, Souza DO, Cunha RA, Porciúncula LO. 2013. Caffeine Consumption Prevents Memory Impairment, Neuronal Damage, and Adenosine A2A Receptors Upregulation in the Hippocampus of a rat Model of Sporadic Dementia. *J Alzheimers Dis.* 183-209.

Fox SI. Fisiología humana. Décimotercera edición. *McGraw Hill.* México. 2014:220-221.

Fredholm BB, Fleming WW, Vanhoutte PM, Godfraind T. 2002. The role of pharmacology in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 1(3):237-238.

Fredholm BB. 2010. Adenosine receptors ad drug targets. *Exp Cell Res.* 316(8):1284-1288.

Galindo F, Flores A. 2006. De la energética a la neurotransmisión: el adenosin trifosfato y sus receptores. *Neurológica.* 43:66-677.

Gessi S, Varani K, Merighi S, Ongini E, Borea PA. 2000. Adenosine receptors (2A) in human peripheral blood cells. *Br J Pharmacol.* 129(1):2-11.

Götz J, Matamales M, Götz NN, Ittner LM, Eckert A. 2012. Alzheimer's disease models and functional genomics-How many needles are there in the haystack?. *Front Physiol.* 3:1-14.

Grayson B, Leger M, Piercy C, Adamson L, Harte M, Neill JC. 2015. Assessment of disease-related cognitive impairments using the novel object recognition (NOR) task in rodents. *Behav Brain Res.* 285:176-93.

Guillamás C, Gutiérrez E, Hernando A. Anatomía fisiología y patología del aparato urinario. *EDITEX.* España. 2017:239-241.

Guyton A. Hall J. Tratado de Fisiología Médica. Décimo segunda edición. *McGraw Hill Interamericana*, 2012:555-571, 714-747.

Hauser S. Harrison: Neurología en medicina clínica. Décimo sexta edición. *McGraw Hill.* México. 2007:274-276.

Italiya KS, Sharma S, Kothari I, Chitkara D, Mittal A. 2017. Simultaneous estimation of lisofylline and pentoxifylline in rat plasma by high performance liquid chromatography-photodiode array detector and its application to pharmacokinetics in rat. *CHROMB.* 1061-1062:49-56.

J. Gonzales, A. Ferreiro, M. Rodríguez, A. Sánchez, Bioquímica Clínica, 2nd ed., McGraw-Hill-Interamericana, Madrid, 1998, pp. 345–360.

Jones, T. Lo esencial en sistema renal y urinario. Cuarta edición. *ELSEVIER.* España. 2013:23.

Korolkovas A, Burckhalter J. Compendio esencial de química farmacéutica. *REVERTE.* España. 1983:257.

Li K, Zhou X, Yang X, Shi X, Song X, Ye C, ko CH. 2015. Subacute oral toxicity of cocoa tea (*Camellia ptilophylla*) water extract in SD rats. *Ifst.* 50(11):2391-2401.

Lippert, F. 2017. The effects of fluoride, strontium, theobromine and their combinations on caries lesion rehardening and fluoridation. *Archives of Oral Biology*, 80, 217–221.

León-Goñi, A. C., Blanco, D., Peña, A., Ronda, M., González, B. O., Arteaga, M. E., Mancebo, A. 2011. Valores hematológicos y bioquímicos de las ratas Sprague Dawley producidas en CENPALAB , Cemp : SPRD (Hematological and biochemical parameters in Sprague Dawley laboratory rats breed in CENPALAB , Cemp : SPRD). *Revista Electrónica de Veterinaria*, 12(11), 1–10.

Levounis P. Guía para la evaluación y el tratamiento de las adicciones. *ELSEVIER*. España. 2017:81.

Lorenzo P. Farmacología básica y clínica. *Panamericana*. México. 2015:121

Machnik M, Kaiser S, Koppe S, Kietzmann M, Schenk I, Düe M, Thevis M, Schänzer W, Toutain PL. 2016. Control of methylxanthines in the competition horse: Pharmacokinetic/pharmacodynamic studies on caffeine, theobromine and theophylline for the assessment of irrelevant concentrations. *Drug test anal.* 9(9):1372-1384.

Madeira MH, Boia R, Ambrosio AF, Santiago AR. 2017. Having a coffee break: the impact of caffeine consumption on microglia-mediated inflammation in neurodegenerative diseases. *Hindawi*. 2017:12.

Mark-Berg J, Stryer L, Tymoczko JL. Bioquímica. Sexto edición. *REVERTE*. México. 2007:424

Marques S, Batalha VL, Lopes VL, Outerio TF. 2011. Modulating Alzheimer's disease through caffeine: a putative link to epigenetics. *J Alzheimer Dis.* 24:161-171.

Mendiola-Precoma J, Berumen LC, Padilla K, García-Alcocer G. 2016. Therapies for prevention and treatment of Alzheimer's Disease. *Hindawi*. 2016(2).

Mendiola-Precoma J, Padilla K, Rodríguez-Cruz A, Berumen LC, Miledi R, García-Alcocer G. 2017. Theobromine-Induced changes in A1 purinergic receptor gene expression and distribution in a rat brain Alzheimer's disease model. *Journal of Alzheimer's disease*. 55:1273-1283.

Mhillaj E, Morgese MG, Tucci P, Furiano A, Luongo L, Bove M, Maione S, Cuomo V, Sciafone S, Trabace L. 2018. Celecoxib prevents cognitive impairment and neuroinflammation in soluble Amyloid β -treated rats. *Neuroscience*. 372:58-73.

Mora, R. Soporte nutricional especial. Tercera Edición. PANAMERICANA. México. 2002:33.

Moratalla R. 2008. Neurobiología de las metilxantinas. *Trastornos adictivos*. 10(3):201-207.

Pan Y, Jia X, Song E, Peng X. 2018. Astragaloside IV protects against A β 1-42-induced oxidative stress, neuroinflammation and cognitive impairment in rats. *Chin Med Sci J*. 33:29-37.

Parra P, Limon A, Ferre S, Guix T, Jane F. High-performance liquid chromatographic separation of caffeine, theophylline, theobromine and paraxanthine in rat brain and serum. *CHROMBIO*. 570:185-190.

Patesta M, Gartner L. Neuroanatomía clínica. 1^o Edición. México. *Manual Moderno*, 2008: 3-6.

Peate I, Nair M. Anatomía y fisiología. *McGraw Hill*. México. 2011:154.

Peña A, Arroyo A, Gómez A, Tapia R. Bioquímica. LIMUSA. Segunda edición. México. 2002:311.

Poleszak E, Szopa A, Bogatko K, Wyyska E, Wosko S, Swiader K, Doboszevska U, Wlaz A, Wróbel A, Wlaz P, Serefko A. 2019. Antidepressant-Like activity of typical antidepressant drugs in the forced swim test and tail suspension test in mice is

augmented by DMPX, an adenosine A2A receptor antagonist. *Neurotox Res.* 35(2):344-352.

Prasanthi J, Dasari B, Marwarha G, Larson T, Chen X, Geiger J, Ghribi O. 2010. Caffeine protects against oxidative stress and Alzheimer's disease-like pathology in rabbit hippocampus induced by cholesterol-enriched diet. *Free Radic Biol Med.* 49(7):1212-1220.

Quiroz, F. Tratado de Anatomía Humana: Tomo 1. Trigésimo octava edición. *PORRUA*. México. 2002:51-51.

Ramírez-Díaz SP, Alvert-Meza G, Ávila-Funes JA, Barrientos-Priego ALH, Besga-Basterra A, Campos-Gallegos G, Casanova-Sánchez I, Copca-Arellano A, Cuéllar-Roque F, D'Hiver-de las Deses C, Del Río-Prado AF, Díaz-Gómez JL. 2011. Enfermedad de Alzheimer Presente y Futuro. 1º Edición. *Planeación y Desarrollo*. México. 2011:74-246.

Reges de Serna A, Aparecida de Assis S, Branco A. 2011. Analysis of theobromine and related compounds by Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet detection (RP-HPLC/UV). *Food Technol. Biotechnol.* 49(4):413-423.

Rivadenebra-Domínguez, E., Becerra-Contreras, Y., Vázquez-Luna, A., Díaz-Sobac, R., & Rodríguez-Landa, J. F. (2018). Alterations of blood chemistry, hepatic and renal function, and blood cytometry in acrylamide-treated rats. *Toxicology Reports*, 5(October), 1124–1128.

Rivadenebra-Domínguez, E., J. Rosas-Jarquín, C., Vázquez-Luna, A., Díaz-Sobac, R., & Rodríguez-Landa, J. F. (2017). Efecto de la acetona cianohidrina, un derivado de la yuca, sobre la actividad motora y la función renal y hepática en ratas Wistar. *Neurología*, 1–9.

Ricci E, Viganò P, Cipriani S, Somigliana E, Chiaffarino F, Bulfoni A, Parazzini F. 2017. Coffe and caffeine intake and male infertility: a systematic review. *Nutrition Journal*. 16(1):37.

Sapag-Chaín N. Proyectos de inversión, formulación y evaluación. PEARSON. México. 2007:70.

Santiago-Rivas S. Contribución a la determinación de la fracción de metales traza ligandos a las proteínas similares a las metaloproteínas en muestras de Mellijón. *Universidad de Santiago de Compostela*. 2007:219-220.

Scodelaro P, Katz S, Boland R. 2011. Interaction of purinergic receptors with GPCRs, ion channels, tyrosine kinase y steroid hormone receptors orchestrates cell function. *Purinergic Signalling*. 8:91-103.

Smolders L, Mensink R, Van Den Driessche J, Joris P, Plat J. 2017. Theobromine consumption does not improve fasting and postprandial vascular function in overweight and obese subjects. *European Journal of Nutrition*. 1612:6

Sun X, Jin L, Ling P. 2012. Review of drugs for Alzheimer's disease. *Drugs Discoveries and Therapeutics*. 6(6):285-290.

Thomas JB, Yen JH, Schantz MM, Porter BJ, Sharpless KE. 2004. Determination of caffeine, theobromine and theophylline in standard reference material 2348, backing chocolate, using reversed-phase liquid chromatography. *J Agric Food Chem*. 52(11):3259-3263.

Tortora G, Derrickson B. Principios de Anatomía y Fisiología. Décimo primera edición. Panamericana. México. 2006:412-420

Oñatibia-Astibia A, Franco R, Martínez-Pinilla E. 2017. Health benefits of methylxanthines in neurodegenerative diseases. *Mol. Nutr. Food Res*. 61(6):1-14.

Olesen J, Gustavsson A, Svensson M, Wittchen HU. 2012. The economic cost of brain disorders in Europe. *Eur. J. Neurol*. 19, 155–162.

UAM. 2007. Fármacos antagonistas de calcio. Consultado en: https://www.uam.es/departamentos/medicina/farmacologia/especifica/F_General/F_G_T56.pdf

Villegas-Ruíz X, Ruíz-Espinosa H, Bárcenas-Pozos ME. 2010. Tecnologías de enmascaramiento de sabor amargo en alimentos. *Universidad de las Américas, Puebla.* 27-36.

Wang JC, Zhu K, Zhang HY, Wang GQ, Liu HY, Cao YP. 2020. Early active immunization with A β 3-10-KLH vaccine reduces tau phosphorylation in the hippocampus and protects cognition of mice. *Neural Regen Res.* 15(3):519-527.

Ward S, Himmelstein D, Lancia J, Binder L. Tau oligomers and tau toxicity in neurodegenerative disease. 2012. *Biochem Soc Trans.* 40(4):667-671.

Webers A, Heneka MT, Gleeson PA. The role of innate immune responses and neuroinflammation in amyloid accumulation and progression of Alzheimer's disease. 2019. *Immunol Cell Biol.*

Weisman G, Ajit D, Garrad R, Peterson T, Woods L, Thebeau C, Cademni J, Erb L. 2012. Neuroprotective roles of the P2Y2 receptor. *Purinergic Signalling.* 8:559-578.

Wyska E. 2010. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of methylxanthine derivatives in mice challenged with high-dose lipopolysaccharide. *Pharmacology,* 85(5), 264–271.