



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

---

**Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias**

**Caracterización de isoflavonoides en extractos metanólicos purificados de *Lupinus mexicanus* y su efecto en la memoria visual espacial en ratas.**

**Tesis  
que para obtener el grado de**

**Doctor en Ciencias en Biosistemática, Ecología y  
Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas**

**Presenta  
José de Jesús Uribe Gómez**

**Zapopan, Jalisco**

**26 de enero de 2015**



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

---

**Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias**

**Caracterización de isoflavonoides en extractos metanólicos purificados de *Lupinus mexicanus* y su efecto en la memoria visual espacial en ratas**

**Tesis**

**que para obtener el grado de**

**Doctor en Ciencias en Biosistemática, Ecología y Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas**

**Presenta**

**José de Jesús Uribe Gómez**

**DIRECTOR**

**Dr. Juan Francisco Zamora Natera**

**CODIRECTOR**

**Dr. Jacinto Bañuelos Pineda**

**Asesor**

**Dr. Mario Alberto Ruiz López**

**Zapopan, Jalisco**

**26 de enero de 2015**

## **AGRADECIMIENTOS**

Es un placer expresar mi gratitud al Dr. Juan Francisco Zamora Natera, investigador del Departamento de Botánica y Zoología del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara como Director de Tesis por su asesoramiento técnico, consejos prácticos, supervisión y disposición continuada, apoyo moral, que han hecho mucho más agradable el desarrollo y conclusión del presente trabajo.

De manera inequívoca mi eterno agradecimiento al Dr. Jacinto Bañuelos Pineda Investigador del Laboratorio de Morfología de la División de Cs. Veterinarias del CUCBA, por la Co-dirección de este proyecto, en referencia a las pruebas conductuales y los análisis morfométricos. Además y por la gestión de recursos económicos ante las correspondientes instituciones para la ejecución del proyecto. Pero sobre todo por su amistad y paciencia que me ha brindado él y su equipo de trabajo; que contribuyeron en este importante logro en mi formación en la investigación. Especialmente, quiero agradecer al Biólogo Efraín Rivas Celis, por las muchas horas de ayuda en los procesos histológicos y morfometría y en la selección de fotos que ilustran esta tesis. A la Dra. Carmen C. Rodiles Gómez y a la Lic Paula por gran apoyo en el proceso de evaluación conductual.

Al para mi Dr. Pedro Macedonio García López mi eterno agradecimiento por ser un excelente asesor incondicional, promotor del análisis cromatográfico ante el Dr. Maciej Stobiecki, en el Institute of Plant Genetics PAS, Strzeszynska 34 y el Institute of Bioorganic Chemistry Pas, Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań, Polonia.

Mi gratitud, al Dr. Mario Noa Pérez y al Biólogo Patricio Severiano, por su apoyo incondicional en el desarrollo de la obtención y purificación y liofilización de los extractos polifenólicos en el Departamento de Salud Pública de la División de Ciencias Veterinarias del CUCBA.

Mil gracias Dra. Laura Guzmán Dávalos Coordinadora del Posgrado y a su grupo de apoyo por su excelente desempeño que ha permitido que los doctorandos sintamos orgullo de poder ser egresados de un doctorado que nació grande y sigue siéndolo ya que es doblemente acreditado ante el Conacyt.

Por este medio agradecerle a mi cuerpo tutorial, al Dr. Mario López Ruiz, Dr. Jacinto Bañuelos Pineda, Dr. Juan Francisco Zamora Natera y al Dr. Ramón Rodríguez como

Jefe del Departamento de Botánica y Zoología por su apoyo en la obtención artículo de investigación publicado en la revista Histology and Histopatology.

Gracias Ximena por tu apoyo en la consecución de mis metas.

A mis hijos Mayra, Laura, Gersom y Braulio.

Por último y no menos importante a Iñaki Alarcón, por inspirarme a buscar este proyecto de vida.

## INDICE

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
JUSTIFICACIÓN	20
HIPÓTESIS	21
OBJETIVOS	22
MATERIAL Y MÉTODOS	23
RESULTADOS PERFIL ISOFLAVONOIDES	33
RESULTADOS PRUEBA CONDUCTUAL	35
RESULTADOS PRUEBA BIOLÓGICA	38
DISCUSIÓN PERFIL DE ISOFLAVONOIDES	47
DISCUSIÓN PRUEBA CONDUCTUAL	49
DISCUSIÓN PRUEBA BIOLÓGICA	51
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	53
LITERATURA CITADA	54
ANEXOS	70

## **Resumen.**

El propósito del estudio fue determinar el perfil de flavonoides del extracto de semillas germinadas de *Lupinus mexicanus* (PE) y evaluar su efecto fitoestrógeno sobre la memoria visual espacial y parámetros morfométricos de neuronas de la región CA3 de hipocampo. Para esto, de semillas germinadas de *L. mexicanus* se obtuvo un extracto metanólico purificado y se analizó su contenido de flavonoides mediante un sistema HPLC/MS-MS. Para la prueba conductual se utilizaron 40 ratas de la cepa Wistar (200 ± g), distribuidas al azar en cuatro grupos: sham (S), con manipulación quirúrgica sin extirpación de ovarios y tratado con el vehículo; OVX-PE ovariectomizado (ovx); y tratado con 1250 µg del PE, (OVX-BE) ovx y tratado con 5 µg de benzoato de estradiol (be); y grupo OVX; ovx y tratado con vehículo. La vía de administración en todos los casos fue subcutánea diariamente por 28 días. El día 29 y 30 los animales fueron sometidos a la prueba de reconocimiento de objeto en el laberinto en Y (para esta prueba se incluyó un grupo control intacto (CTR). Inmediatamente después los animales fueron sacrificados, perfundidos con solución Bouin y sus cerebros se parafinaron para obtener cortes histológicos para teñirlos con hematoxilina-eosina. Los resultados mostraron que el PE presentó nueve diferentes flavonoides (particularmente del tipo isoflavonas). La prueba conductual mostró mayor número de ingresos al brazo A de los animales S, OVX-PE y OVX-BE con respecto a los animales OVX. El análisis microscópico mostró mayor espesor del *Stratum oriens* y diámetro nuclear de las neuronas de CA3 en los grupos OVX-BE y S, en comparación a los grupos OVX-PE y OVX. Mayor densidad celular en CA3 del grupo OVX que en el resto de los grupos. Estos resultados muestran que la administración subcutánea de PE de *L. mexicanus* no tuvo efectos benéficos sobre las neuronas de la región CA3, evidenciado por los aspectos morfométricos analizados y ausencia de mejora de la conducta de memoria de trabajo viso-espacial.

## **INDICE DE ABREVIATURAS.**

[M+H] Iones moleculares protonados positivos.

5-HT: Serotonina.

ACTH: Hormona Adreno Corticotropa.

BDNF: Factor de crecimiento derivado del cerebro.

BE: benzoato de estradiol.

C18 u ODS: columna o cartucho de silica octadecil o fase reversa.

CA3: Región Cuerno de Amón del hipocampo.

CC: Cuerpo calloso.

CONAPO: Consejo Nacional de Población.

-COOH: Grupo carboxilo.

ESI: Ionización por electro spray.

ESI-MS: Espectrometría de masas en tándem con ionización por Electro spray.

FM: Fibras musgosas.

GABA: Ácido gamma-aminobutírico.

GC-MS: Cromatógrafo de gases- espectrometría de masas.

GDNF: Factor neurotrófico derivado de las células gliales.

Gr: Células granulares.

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución.

HPLC-MS: Cromatografía líquida de alta resolución acoplado a espectrómetro de masas.

HPLC-UV: Cromatografía líquida de alta resolución con detector UV.

INBIOMED: Índice Mexicano de Revistas Biomédicas Latinoamericanas.

INEGI: Instituto Nacional de Estadística y Geografía.

ISO: isoflavonoides.

LBD: Dominio de unión a ligando.

LC: Cromatografía líquida.

LMol: *Stratum lacunosum moleculare*.

m/z: relación carga- masa.

Mol: Capa molecular.

MS/MS: Espectrometría de masas en tándem.

MVE: Memoria visual espacial.

NGF: Factor de crecimiento nervioso.

nM: nanoMolar

NMDA: N-Metil -D - Aspartato.

NO: Óxido nítrico.

Or: *Stratum oriens*.

OVX: ovaeteriomía bilateral.

P/V: Peso volumen.

Po: Capa polimorfa.

Py: *Stratum Pyramidale*.

QqTOF: analizador Cuadrupolo-Tiempo de Vuelo.

Rad: *Stratum radiatum*.

RE $\alpha$ : Receptor estrogénico alfa.

RE $\beta$ : Receptor estrogénico beta.

RP: Cromatografía líquida, fase reversa.

RRLC: Cromatografía Líquida de Rápida Resolución.

S: sham

SCX: Columna o cartucho de Fuerte extracción catiónica.

SERMs: Moduladores selectivos del receptor estrogénico.

SLu: *Stratum lucidum*.

SNC: Sistema nervioso central.

SPE: Extracción en Fase Sólida



THS: Terapia Hormonal Sustitua.

TLC: Cromatografía de capa fina.

TOF: Analizador tiempo de vuelo.

TTR: Proteína transtiterina.

UPLC/ESI-QTOF-MS: Cromatografía Líquida de Ultra Desempeño acoplado a un ionizador por electro spray y un analizador Quadrapolo de Tiempo de Vuelo acoplado a Espectrómetro de Masas.

UPLC: Cromatografía líquida de ultra desempeño.

v/v: volumen/volumen.

## Introducción

En la actualidad el incremento del promedio de vida en el ser humano, ha incidido negativamente tanto en la calidad de esta, como, en el incremento de gastos por pensiones, servicios médicos y fármacos. En el futuro cercano esta situación será rebasada al pronosticarse que se incrementara la población mundial de mayores de 60 años. Para el 2009 fue de 700 millones (11%), para el año 2050, será de 2000 millones de personas (22%). En México de acuerdo a la United Nations, 2010 los mayores de 60 años representan el 9.5% de sus habitantes y la proporción se elevará a 25.9% para el 2050 (CONAPO 2004; Luebke *et al.*, 2010; Mural, 2013; Scott *et al.*, 2000; Ypsilantini *et al.*, 2008; United Nations, 2010).

En el ser humano a partir de los 35 años comienza la disminución de la síntesis de hormonas esteroidales (testosterona, estrógenos, progesterona), presentando su mínima o nula producción, al llegar la vejez (60 años o más). En esta etapa se afecta la función cognitiva, el metabolismo y la homeostasis del cerebro (Morán *et al.*, 2013), presentándose afecciones como: el síndrome climatérico, depresión, osteoporosis, cardiopatías, pérdida de la memoria, déficit en el proceso cognitivo, desorientación, y predisposición a la enfermedad de Alzheimer, entre otras (Filardo *et al.* 2006; Frick *et al.*, 2000; Katzenellenbogen *et al.*, 2000; Krishnan *et al.*, 2001; Kuiper *et al.*, 2006; Luine *et al.*, 1998; Maroulis *et al.*, 2000; Roof *et al.*, 2000; Sirtori *et al.*, 2004; Sughrue *et al.*, 2000; Vega-Rivera 2012; Whitehead *et al.*, 1996).

Dichas hormonas, no solo tienen actividades relacionadas con la reproducción y conductas propias del género, también, en el dimorfismo sexual del cerebro y su activación en la pubertad (García-Segura, 2001; Warren, 1997; Williams, 1997), además en actividades neurotróficas y neuroprotectoras (María-Ángeles, *et al.*, 2010). Estas últimas actividades cerebrales son afectadas conforme disminuye la síntesis de las mencionadas hormonas, y con este la de factores neurotróficos, neurotransmisores, y la modulación de la apoptosis neuronal, en consecuencia se produce una lenta y progresiva disminución del volumen y actividad de las estructuras cerebrales, primordialmente el hipocampo. Estructura neural relacionada con el aprendizaje y la memoria espacial, memoria a corto plazo, y participa en la consolidación de la memoria a largo plazo. (Carsweu *et al.*, 2004; Genazzani *et al.*, 2000; Leuner *et al.*, 2004; Korol, 2003; Ojeda-Sahagún, 2004)

En la menopausia, para prevenir los síntomas característicos, la mujer utiliza la Terapia Hormonal Sustitutiva (THS), (estrógenos-progestágenos). Se ha observado que se mejora la memoria verbal (explícita) y la capacidad de aprender nuevas asociaciones. Sin embargo, en algunas mujeres el utilizar la (THS) por más de 5 años, pueden presentar trombo-embolismo pulmonar, cáncer uterino y de glándula mamaria. Por lo tanto, es imprescindible no sólo la búsqueda de tratamientos alternativos de carácter preventivo y sin efectos colaterales, sino que provean efectos neurotróficos y neuroprotectores en el Sistema Nervioso Central (SNC) (Genazzi *et al.*, 2003; Henderson, 2002; María-Ángeles, *et al.*, 2010; Morrison *et al.*, 2006; Veiga *et al.*, 2004).

Para lo anterior, se ha optado por una terapia preventiva nutricional y fitoterapéutica. Los metabolitos secundarios más utilizados son los fitoestrógenos (lignanos e isoflavonoides), de los cuales destacan los isoflavonoides de la soya (polifenoles análogos al dietilestilbestrol), por sus propiedades: estrogénica débil, antiestrogénica, antiangiogénica y antioxidante (Dixon, 2003; Dixon y Ferreira, 2002; Umland, 2000; Yousef, 2004). Estas propiedades son debidas a su estructura química semejante, a los estrógenos (anillos bencénicos y grupos hidroxilo) que facilita su unión a los receptores  $\beta$  estrogénicos (García-Solís *et al.*, 2005). En las bases de datos hay una importante cantidad de literatura científica publicada al respecto, sobre todo de la soya (extractos) y sus isoflavonoides (genisteína, daidzeína, gliciteína) (Ludueña *et al.*, 2007; Stobiecki y Kachlicki, 2006).

Sin embargo, México al no ser un productor de soya, la investigación se ha orientado a otras especies vegetales que contengan fitoestrógenos y que requieren de evaluación de su contenido y de su posible actividad neuroprotectora y neurotrófica. Entre estas plantas, se encuentran diversas especies del género *Lupinus*, perteneciente a la misma familia de la soya (*Fabaceae*). Este género lo constituyen más de 400 especies, distribuidas en todo el planeta; alrededor de 80 especies se encuentran en 26 estados de la República Mexicana y en el occidente 15 se encuentran en Jalisco (Bañuelos-Pineda y Jiménez-Vallejo 2006; *et al.*, 2006; Gulewicz and Pilarski, 2006; Kurlovich and Stankevich, 2006; Stobiecki *et al.*, 1997). A pesar de su gran diversidad, solo se ha reportado escasa información, fitoquímica, nutricional y toxicológica (alcaloides quinolizidinicos más del 1%) para algunas de estas especies (García-López y Ruiz-López. 2006). Se ha demostrado que algunas de estas especies contienen isoflavonoides que podrían coadyuvar en la prevención de afecciones relativas a la disminución y/o deficiencia de estrógenos (García-López, *et al.*, 2010; Xiao-Wu *et al.*, 2008; Stobiecki *et al.*, 1997 - 2010; Zeng and Zhao, 2004).

## **ANTECEDENTES.**

### **Estrógenos.**

La estrona, estriol y estradiol, son sintetizados a partir del colesterol en ovarios, glándulas adrenales y placenta en diferentes proporciones. Los estrógenos producen una amplia gama de efectos biológicos en todo el cuerpo, incluyendo el (SNC) donde actúan como neuroprotectores al desempeñar un papel importante en la regulación de procesos neuronales (Vega-Rivera 2012).

El estradiol, es el compuesto más activo de su grupo, se le considera un factor de transcripción específico en neuronas y en células gliales, actividad que realiza a través de receptores estrogénicos membranales e intranucleares. Este compuesto modula la actividad genómica, dependiendo de su unión al ligando y en respuesta específica a señales fisiológicas y patológicas, dimerizando con su receptor nuclear. Por otro lado se sabe que tiene actividades no genómicas por efectos indirectos, sobre los receptores de la membrana celular (Aranda y Pascual, 2001; Couse *et al.*, 1999; Krishnan *et al.*, 2001).

La actividad del  $17\beta$  estradiol, varía acorde al tipo de receptor estrogénico sea alfa o beta ( $RE\alpha$ ,  $RE\beta$ ) y a su órgano blanco (célula). El  $RE\alpha$  actúa en útero, glándula mamaria, hígado y el (SNC), mientras que el  $RE\beta$ , se expresa en hueso, endotelio vascular, pulmones, tracto urogenital, ovario, prostata y SNC. La actividad del estradiol depende de la región carboxilo terminal (-COOH) de los receptores ( $\beta$  o  $\alpha$ ) y constituye el dominio de unión al ligando (LBD), el cual reconoce a este tipo de esteroide, endógeno. Ha sido mostrado que los estrógenos modulan la función hipocámpal a través de los receptores  $RE\alpha$  y  $RE\beta$  (McEwen and Alves, 1999) los cuales están involucrados en procesos de aprendizaje y conducta y aprendizaje (O'Neil *et al.*, 1996).

Las células cerebrales (neuronas y de la glía), son sensibles a las hormonas sexuales, debido a que contienen una amplia distribución de receptores estrogénicos. Por lo que las hormonas exógenas, pueden ejercer influencia estructural como fisiológica en áreas cerebrales específicas, con efectos clínicamente medibles. Por otro lado, es posible que también actúen en la cinética y apoptosis neuronal. Los estrógenos inducen plasticidad sináptica, evidente en la pubertad y durante el ciclo ovárico. Se ha demostrado que en caso de deficiencia de estos, los estrógenos exógenos remodelan los circuitos; lo que ha sido demostrado en el hipotálamo, hipocampo y corteza (Genazzani, 2000; Morrison, 2006; Vega-Rivera 2012; Woolley, 1998).

Así como a ligandos sintéticos como antagonistas totales o Moduladores Selectivos del Receptor Estrógeno (SERMs), que pueden activar o inhibir al receptor dependiendo del contexto celular (Katzenellenbogen *et al.*, 2000; Kuiper *et al.*, 1996; Nilsson *et al.*, 2001; Palmieri *et al.*, 2002).

Los estrógenos participan en: la reproducción, la conducta asociada al sexo (género), la síntesis ósea, el metabolismo en hígado, el mantenimiento del sistema cardiovascular, la modulación del desarrollo y diferenciación del SNC, y como neuroprotectores y neurotróficos (Guyton, 1996; Fink, 1986; García-Segura, 2001).

En el hipocampo dicho esteroide es neurotrófico y neuroprotector al modular la actividad colinérgica y glutamatérgica, (Fink, 1986). Es neurotrófico, al modular el crecimiento, desarrollo, y mantenimiento funcional de las células nerviosas al intervenir en la síntesis de factores neurotróficos: (BDNF) Factor de Crecimiento Derivado del Cerebro, (GDNF) Factor Neurotrófico Derivado de Células Gliales y (NGF) Factor de Crecimiento Nervioso (Scott, and Zsarnovszky, 2001). Además actúa como neuroprotector de las células nerviosas en agresiones exógenas como traumatismos, estrés oxidativo, neurotoxicidad excitatoria e isquemia) (Beyer *et al.*, 1999; Dingledine *et al.*, 1999; Fei *et al.*, 2009; Henderson, 2002; Maher *et al.*, 2006; Marriott *et al.*, 2003; Sarkaki, *et al.*, 2008; Toran-Allerand, 1999; Ypsilantini *et al.*, 2008; Wise *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2008).

Por otro lado, las células nerviosas (neuronas y de la glía) sintetizan neuroesteroides de liberación paracrina sobre las células nerviosas anexas, con la misma estructura molecular que las hormonas esteroideas endógenas (María-Ángeles *et al.*, 2010; Veiga *et al.*, 2004).

Ambos tipos de esteroideas al actuar sobre las células nerviosas, son denominados esteroideas. De los neuroesteroides, el estradiol, participa en el desarrollo y la diferenciación sexual del cerebro. En la etapa adulta en conjunción con los esteroideas endógenos, regulan: la síntesis de neurotransmisores, la expresión de sus receptores neuronales, la transmisión sináptica, la plasticidad sináptica, así como la modulación de la apoptosis fisiológica (García-Segura, 2001; Marriott *et al.*, 2003).

La importancia de estos efectos se refleja en la mejora de los procesos cognitivos, la consolidación de la memoria, y por ende el efecto positivo sobre la densidad espinal dendrítica de las neuronas del hipocampo a través la activación de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), (García-Segura, 2001; Veiga *et al.*, 2004).

La disminución en la concentración sérica del (NMDA), es directamente proporcional a la de las habilidades cognitivas y a la modulación de patologías vinculadas con el envejecimiento como Alzheimer y accidentes cerebrovasculares (Woolley *et al.*, en 1994 -1998).

Además, el déficit de estradiol en la vejez incide negativamente la síntesis de neurotransmisores glutamato, (GABA) ácido gamma amino-butírico, y acetilcolina) y en la relación neurogénesis - apoptosis fisiológica, con adelgazamiento de la corteza cerebral, disminución de la materia blanca (mielina) (Morán *et al.*, 2013).

Las neuronas en el hipocampo son particularmente sensitivas a los niveles del estradiol, reflejándose en la inducción de cambios fisiológicos significantes en esta estructura, particularmente en la región CA3, la cual recibe información de medioambientes internos y externos a través de dos vías principales: fibras musgosas y la Vía perforante (Amaral and Witter, 1989; Dolorfo and Amaral 1998). Además, la región CA3 es considerada un sistema de auto-asociación para el almacén y recuperación de información, particularmente en procesos de la memoria de trabajo (Treves and Rolls, 1992; Rolls and Treves, 1998; Stupien *et al.*, 2003) Lo anterior incide en los procesos de aprendizaje-memoria a corto y largo plazo y sobre todo en la memoria visual espacial (desorientación), debido al decremento en las sinapsis del Cuerno de Amón CA3 (Adams *et al.*, 2001; Florian y Roulet, 2004; Luebke *et al.*, 2010; Marriott *et al.*, 2003; Ojeda-Sahagún 2004; Whitehouse *et al.*, 1982; Xu *et al.*, 2008). Stupien y colaboradores en el año 2003 demostraron que la región hipocampal CA3 está implicada el procesamiento y consolidación de la información espacial, para lo cual bloquearon con dietilditiocarbamato las sinapsis de esta región y de las fibras musgosas. En otro estudio realizado por Florian y Roulet en el 2004 al utilizar dicha sustancia para bloquear la región CA3 encontraron que esta sustancia inhibe la adquisición de la memoria, pero no la evocación de la información espacial, coincidiendo con la conclusión del estudio de Stupien en el 2003 en que la región hipocampal CA3 es esencial para la adquisición y específicamente para la consolidación de la memoria de información espacial.

## ASPECTOS MORFOFUNCIONALES DEL HIPOCAMPO.

Debido a que existe una estrecha relación entre la morfología y fisiología de un órgano con su eficiencia, se es imprescindible conocer lo relativo al hipocampo, siendo esta estructura de las más estudiadas del cerebro, y junto con la amígdala forma el eje central del Sistema Límbico. En el humano el hipocampo tiene forma parecida al caballito de mar y/o al Cuerno de Amón (Iniesta 2010; 2012) (Fig.1.1) Por otro lado en la rata, especie utilizada en nuestro estudio tiene forma de banana (Fig. 1.2).

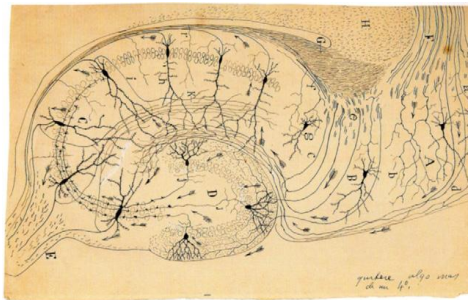


Fig 1.1 Esquema de la estructura y conexiones del asta de Amón según Cajal.

Herederos de D. Santiago Ramón y Cajal.

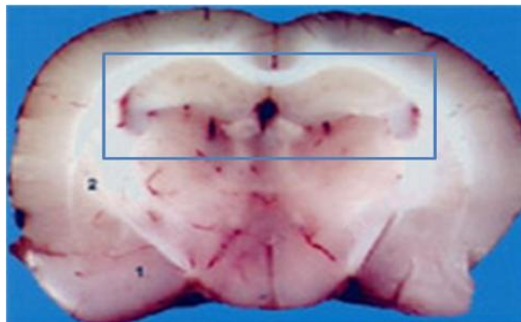


Fig. 1. Corte coronal de cerebro de rata a nivel de hipocampo donde se muestra la forma de banana Amígdala (1) y el cuerpo estriado (2) en recuadro los hipocampos izquierdo y derecho (INBIOMED, 2011).

Es una estructura neural de la porción medial e interna de la corteza del lóbulo temporal. Pertenece a la formación hipocámpica que comprende tres regiones citoarquitectónicas, conectadas de forma unidireccional a la corteza entorrinal: el hipocampo o Cuerno de Amón 1, 2, 3 y 4 (CA1, CA2, CA3, y CA4), y el *Gyrus dentatus*, separados por la fisura hipocámpica; el complejo subicular (*presubiculum*, *subiculum* y *parasubiculum*) (Fig. 2) (Andersen, 2007).

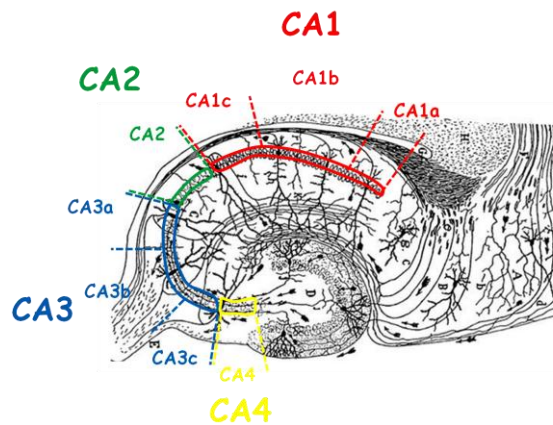
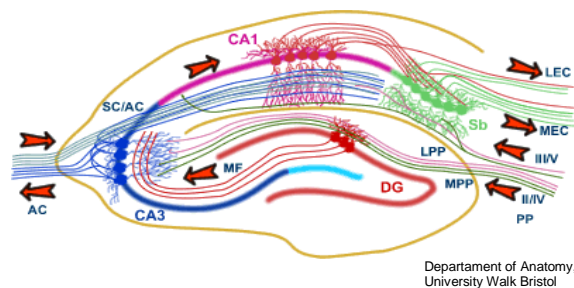


Fig. 2. Hipocampo en el humano, mostrando las regiones y subregiones Andersen P, *et al.*, 2007.

En el hombre la región CA1 es la zona más distal y de mayor tamaño, se caracteriza por estar formada por células piramidales pequeñas, mientras en la zona más proximal, la conforman las regiones CA2 y CA3, es rica en células piramidales de mayor tamaño (Fig. 3) (Amaral, 2006).

El hipocampo se relaciona con la memoria espacial – memoria de trabajo, la memoria a corto plazo, el aprendizaje y participa en la consolidación de la memoria a largo plazo (Guyton, 1996; O'Kane, 2004).

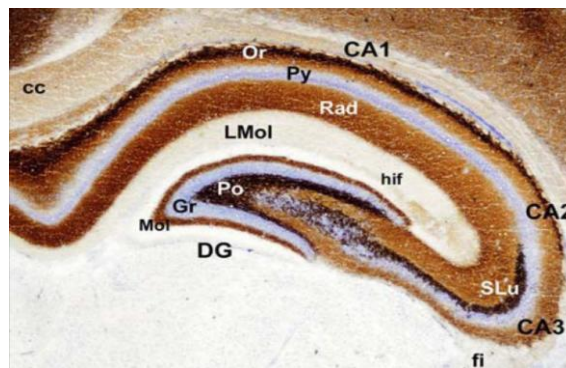


Department of Anatomy,  
University Walk Bristol

Fig. 3. El hipocampo tiene una red de conexiones unidireccional, con una conexión de entrada desde la Corteza Entorrinal (EC) a través de la Vía perforante (PP), que conecta con el Giro dentado (DG) y hacia CA3. Las neuronas piramidales de la CA3 reciben conexión del Giro dentado vía las Fibras musgosas (MF). Ellas a su vez emiten sus axones a las células de la CA1 por la **Vía colateral de Schaffer**, del mismo modo que las células de la CA1 reciben conexión **directa** por la **Vía perforante** y mandan sus axones al **Subículo** (Sb). Estas neuronas devuelven la información hipocampal de nuevo a la Corteza Entorrinal, **cerrando** de esta forma el ciclo de información.



El hipocampo está dividido en varias zonas histológicas estratificadas, la capa más interna es un estrato rico en fibras, el *Alveus* o sustancia blanca. Luego, encontramos, el *Stratum oriens* (*Or*), formado esencialmente por las dendritas basales de las células piramidales, que conforman el *Stratum pyramidale* (*Py*), de naturaleza glutamatérgica. El *Stratum radiatum* (*Rad*), formado por las dendritas apicales de las neuronas piramidales. Cercana a la fisura hipocámpica, se encuentra el *Stratum lacunosum moleculare* (*LMol*), que contiene las ramificaciones más distales de las dendritas apicales de las neuronas piramidales. Únicamente en el área CA3, entre los *Stratum pyramidale* y *radiatum*, es posible encontrar un estrecho estrato acelular, formado por las dendritas apicales de las piramidales de CA3 y en el cuál se establecen conexiones con las fibras musgosas procedentes del giro dentado, el *Stratum lucidum* (*SLu*) (Fig.4), (Amaral y Witter, 1998; Duvernoy, 2005; Domínguez, 2010; Squire, 1991).



Amaral and Witter 1989.

Fig. 4 Microfotografía de una sección cerebral del hipocampo de ratón, teñido por la doble tinción de Timm-Nissl. En las regiones CA1-CA3 se identifican una serie de estratos celulares y fibrosos: (*Or*), (*Py*), (*Rad*) y (*LMol*). Únicamente en la CA3, hay otra capa denominada (*SLu*). En el Giro dentado, justo por debajo de la fisura hipocámpica (*hif*), vemos la capa molecular (*Mol*), y hacia el interior la capa de Células granulares (*Gr*), seguida de la Capa Polimorfa (*Po*), fimbria (*fi*), *Corpus callosum* (*cc*) (Domínguez 2010; Duvernoy, 2005).

## **ESTRÓGENOS, CA3 y MEMORIA VISUAL ESPACIAL**

La memoria espacial registra la información sobre el entorno y la orientación espacial, necesaria para navegar por una ciudad conocida. Se le considera un mapa cognitivo y tiene representaciones de memoria a corto plazo y memoria a largo plazo, la investigación científica que existen regiones del hipocampo implicadas o asociadas con la memoria visual espacial.

Balderas, *et al.*, en el año 2004 encontraron que los animales que se entrenaron durante 5 días en el laberinto acuático son los que recordaban mejor la tarea una semana y hasta un mes después, comparados con aquellos animales que se habían entrenado uno o dos días. Además, correlacionan positivamente sus resultados, con un incremento sustancial de las proyecciones de las FM (fibras musgosas) hacia el (SO) en CA3, sugiriendo que estas proyecciones podrían relacionarse con la formación de la memoria a largo plazo y la representación espacial.

#### Actividad neuroprotectora de los estrógenos

Modulan los procesos de aprendizaje y memoria relacionados con la navegación espacial al actuar en hipotálamo, hipocampo y corteza cerebral con efectos que inciden en la cinética y apoptosis neuronal, plasticidad sináptica, tanto en ratas ovariectomizadas tratadas con estas hormonas, como en hembras con ciclo estral, (Arjmandi *et al.*, 2001; Marriott *et al.*, 2003).

La deficiencia de estrógenos incide en: la disminución de neurotransmisores (glutamato, ácido gamma amino-butírico (GABA) y acetilcolina), la sinaptogénesis, en la plasticidad neuronal y en la memoria visual espacial (MVE), memoria a corto plazo y consolidación a largo plazo de esta. Esto impide la identificación de lugares y la orientación en lugar y espacio a través de objetos o señales, (estímulos neutros) (Ojeda-Sahagún 2004; Trullier, *et al.*, 1997). En la vejez, los efectos del déficit es manifiesto y exacerbado conforme avanza esta etapa, afectando las actividades biológicas mencionadas e incidiendo en el peso del cerebro por adelgazamiento de la corteza cerebral y de la sustancia blanca (axones mielinizados), (Luebke, 2010; Ojeda-Sahagún 2004; Whitehouse, 1982; Xu, 2008). Estudios previos en modelos animales han revelado que cualquier dieta ingerida rica en fitoestrógenos o la administración parenteral repetida de estos compuestos mejora la memoria (Monteiro *et al.*, 2008). Los fitoestrógenos también tienen un efecto neuroprotector contra la neurodegeneración causada por hipofunción de los ovarios (Xu *et al.*, 2008), y probablemente también tengan propiedades neurotróficas (Gleason *et al.*, 2005; Jahamandas *et al.*, 2001; Pan *et al.*, 1999)

Sakarki y colaboradores en año 2008 demostraron que la ovariectomía bilateral, como método de privación de estrógenos, afecta la densidad dendrítica de las células piramidales del Cuerno de Amón (CA1). También demostraron que sus derivados sintéticos presentan efectos positivos sobre la plasticidad sináptica.

Otros autores corroboran que dicha deficiencia, afecta el árbol dendrítico de las neuronas de las subregiones CA1 (Xiao-Wu, 2008) y CA3 (Adams *et al.*, 2001) de la estructura referida, ambas sensibles a la neurodegeneración.

Con referencia a la subregión CA3, se afecta negativa y significativamente la (MVE), no permitiendo a un individuo identificar un lugar, al perder la capacidad de orientarse en el espacio a través de objetos o señales, (estímulos neutros) (Daniel and Dohanich, 2001; Florian y Roullet, 2004; Gilbert, and Kesner. 2006; Stupien and Roullet, 2003; Trullier *et al.*, 1997; Veiga *et al.*, 2004).

Cabello y colaboradores en el año 2010 utilizando con un análisis de inmunoreactividad de los astrocitos en el (SLu) del área CA3 y el giro dentado; calcularon la densidad de astrocitos en ambas estructuras. Para lo cual utilizaron ratas ovariectomizadas y tratadas con 17  $\beta$  Estradiol. Encontraron que en el (SLu) del área CA3 del hipocampo dorsal una mayor densidad de astrocitos en las ratas tratadas, en comparación al grupo ovariectomizado pero no tratado con estrógenos.

## **MEMORIA ESPACIAL Y ALTERNANCIA ESPONTÁNEA (innata)**

La alternancia espontanea es una estrategia desarrollada por los mamíferos para la búsqueda de alimento. La rata para tal efecto utiliza procesos cognitivos pero principalmente la (MVE). Esta capacidad disminuye por factores como: estrés, vejez o por lesiones en estructuras neurales como el hipocampo, corteza entorrinal, el septum, tálamo y el cuerpo estriado. (Arankowsky, 2001; Bats, *et al.*, 2001; Senechal, 2007; Ulloa, 2004), cualquier afección o fármaco que sea antagonista disminuye esta estrategia innata de exploración (Lalonde, 2002; Ragozzino, 1996).

Esta estrategia de búsqueda o exploración se puede medir con el Laberinto Y, considerando la preferencia innata en animales sanos para elegir de manera secuencial los brazos del laberinto no visitados previamente.

Hughes en el 2004, define a la prueba de alternancia espontánea en Laberinto en Y, como una herramienta sencilla para estudiar la memoria y su relación con sus estructuras neuronales y/o la utilización de fármacos que influyan en algún tipo de memoria (memoria de trabajo, MVE).

## **FITOESTRÓGENOS.**

Estos compuestos son metabolitos secundarios producidos por las plantas al reaccionar contra elicitores de tipo biótico (hongos, bacterias e insectos) y/o abióticos (radiación ultravioleta, heridas, descenso de la temperatura y a químicos). Así como por factores endógenos producto de la hidrólisis enzimática de su pared celular (García-Mateos *et al.*, 2003; Katagiri, *et al.*, 2000; Setchell *et al.*, 1999; Subramanian *et al.*, 2007; Wojtaszek *et al.*, 1997).

Son sustancias difenólicas no esteroideas derivadas de las plantas, con actividades semejantes a los estrógenos, se encuentran con mayor en las leguminosas, con potenciales beneficios para el ser humano y clasificados de acuerdo a su estructura química, siendo los más comunes los denominados isoflavonoides y los lignanos (Rodney, 2013).

El anterior conocimiento se inicia de estudios comparativos epidemiológicos entre las poblaciones occidentales y asiáticas, y los estudios clínicos muestran que son compuestos promisorios para mejorar la salud y función cerebral (Sumien *et al.*, 2013).

Ciertas plantas contienen concentraciones variables de fitoestrógenos: alfalfa, (*Medicago sativa*), el trébol rojo (*Trifolium pratense*), el trébol subterráneo (*Trifolium subterraneum*), algodón (*Gossypium hirsutum*), la salvia (*Salvia officinalis*), Cohosh negro (*Cimifuga racemosa*), la semilla de lino (*Linum usitatissimum*). Desde hace algunos años los investigadores han enfocado su atención en las semillas de la soya (*Glycine max*) y sus metabolitos secundarios genisteína y daidzeína (isoflavonoides), aunque también son producidos por otras plantas de la misma familia leguminosas (*Fabaceae*) como el trébol rojo y lupinos. (Lin y Weng, 2006; Marais *et al.*, 2006; Dixon, 1999; 2004; Messina, 2002; Stobiecki y Kachlicki, 2006; Wu, *et al.*, 2004).

## **COMPUESTOS FENÓLICOS**

Estos constituyen una de las principales familias de metabolitos secundarios sintetizados por las plantas; están clasificados como solubles y no solubles e incluye ácidos fenólicos, fenilpropanoides, quinonas y flavonoides (Nicolas *et al.*, 2005).

### **FLAVONOIDES.**

De acuerdo a su estructura química, son clasificados dentro de varias subclases, tales como auronas, citroflavonoides, chalconas, flavonas, isoflavonoides, flavanonas, dihidroflavonoles, flavonoles, antocianidinas rotenoides, catequinas e isoflavonoides entre otros. Esta clasificación basada en la estructura del anillo C y los grupos funcionales en C-3 y C-4. Generalmente, son conjugados con azúcares (glucósidos) en las vacuolas (Aoki *et al.*, 2000; Surinder, 2006.).

Los flavonoides son comunes en la mayoría de plantas vasculares, cereales, hortalizas, en el vino tinto, cerveza y whisky. Son particularmente importantes debido a los múltiples roles que juegan, como la defensa de las plantas contra microorganismos patógenos y como señales químicas en la fijación simbiótica de nitrógeno. Además, debido a sus actividades biológicas, los flavonoides tienen impacto positivo en la salud humana (Harborne, 1994, 1997; Harborne and Williams, 2000; Preedy, 2013). Considerando lo anterior, la genisteína y daidzeína han sido empleados como fitoestrógenos para prevenir enfermedades crónicas degenerativas y procesos relacionados con el proceso cognitivo (Lephart *et al.*, 2002; Cline *et al.*, 2004; Wood *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2008)

### **ISOFLAVONOIDES.**

Estos metabolitos se han descrito ampliamente como productos que benefician la salud y por efectos sobre la fisiología del organismo (Preedy, 2013). Estos metabolitos al poseer la característica destacable de ser potentes antioxidantes, y actividad estrogénica débil son capaces de tener actividades: antiestrogénica, antiangiogénica y anticancerígena, (Carlaya *et al.*, 2001; Dixon *et al.*, 2003; Preedy, 2013; Romero *et al.*, 2003; Stobiecki and Kachlicki 2006).

Los isoflavonoides pueden ser una alternativa de tratamiento no esterooidal, por ser estructural y funcionalmente similares a los estrógenos, al tener actividad estrogénica débil, ser hidrofóbicos, y contener en su estructura química, anillos aromáticos, y al menos un grupo hidroxilo (Fig. 5). Lo que los hace agonistas o antagonistas del estradiol (García-Solís, *et al.*, 2005; Haya *et al.*, 2002; Setchell, 1999).

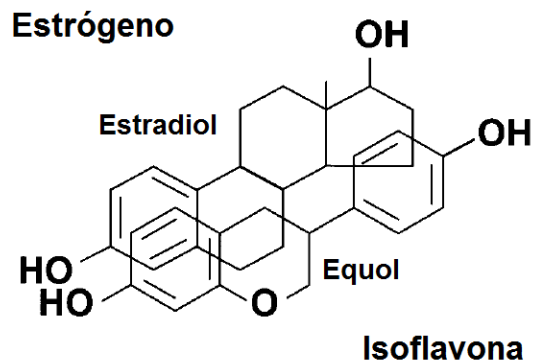


Fig. 5. Disposición plana espacial de las dos estructuras químicas: Estradiol y el metabolito Equol (Setchell, 1999).

Las estructura químicas de los isoflavonoides les permiten interactuar con los receptores estrogénicos  $\alpha$  y  $\beta$  aunque con afinidad relativa más baja que la del estradiol. Actúan como (SERMs) (Kuiper *et al* 1997, 1998; Brzezinski and Debi 1999) Por dicha similitud los isoflavonoides son afines a los receptores estrogénicos  $\beta$ , con la ventaja de tener mayor distribución y biodisponibilidad, tisular (cerebro, hueso, próstata, ovario y endotelio vascular). Sin embargo en la circulación sanguínea tienen menor afinidad a las globulinas y albuminas sanguíneas que el estrógeno, por lo que su consumo deberá continuo y en mayor cantidad a través de ingredientes que los contengan (Hu y Aizawa, 2003; Kaufman, *et al.*, 1997; Ludueña *et al.*, 2007).

## ISOFLAVONOIDES Y CEREBRO.

Existe actualmente una gran cantidad de publicaciones de los efectos de estos metabolitos extraídos de la soya, no solo en pruebas biológicas en animales, sino también en seres humanos.

En relación a su efecto sobre el (SNC) como neuroprotectores, los fitoestrógenos de la soya han sido utilizados en el tratamiento de los síntomas menopáusicos, tales como el humor, función cognitiva y la conducta (Vega-Rivera 2012). Zaho, en el año 2002 en pruebas *in vitro* mostraron que los isoflavonoides tenían actividad antioxidante en cultivos de neuronas hipocampales a través de la inhibición de la enzima lactato deshidrogenasa.

Azcoitia, (2006) realizó pruebas con extractos de soya vía intraperitoneal o genisteína inyectada en ratas Wistar ovariectomizadas y posteriormente tratadas con ácido kaínico 7mg/kg de peso de peso, buscando producir daño cerebral, y se demostró que el extracto de soya fue más efectivo que la genisteína, sugiriendo que tal vez otros componentes del extracto, están involucrados en el efecto neuroprotector,

Zeng *et al.*, (2004), refieren que la genisteína de la soya 100 (nM) previene diversos tipos de daños celulares, en cerebro y demostraron (efecto antioxidante) que esta, protege a las neuronas de la enfermedad de Alzheimer al disminuir el la formación de la proteína beta-amiloide y la apoptosis neuronal. Otros autores coinciden con estas conclusiones al referir que la este isoflavonoide, seria loable para futuros estudios preclínicos ya que *in vitro* es un excelente inhibidor de la proteína transtiretina (TTR) en la amiloidogénesis (Green, 2005). En otros estudios, utilizando daidzeína en ratones, encontraron que podría ser un producto potencial candidato en medicina para la terapia de la neurodegeneración y muerte celular (Mao, 2007).

Yong y Wong (2008) probando genisteína y sus efectos protectores proinflamatorios en cerebros humanos, sugieren que puede atenuar la secuencia proinflamatoria, al inhibir las citocinas en células endoteliales microvasculares. Hua-Wei en 2008 refieren que utilizando 15 mg/kg de este isoflavonoide, vía intraperitoneal se atenúa la muerte neuronal en hipocampo de ratas a las que se les indujo isquemia y sugieren que este compuesto previene la muerte neuronal por estrés oxidativo y la peroxidación lipídica.

## **ISOFLAVONOIDES Y EL PROCESO COGNITIVO.**

El mecanismo por el cual los isoflavonoides mejoran la memoria y la capacidad de aprendizaje todavía es desconocido; aunque ha sido sugerido que estos metabolitos incrementan los niveles de mRNA de factores neurotróficos derivados del cerebro, colina acetiltransferasa, y factores de crecimiento nervioso en la corteza cerebral e hipocampo (Pan *et al.*, 1999; Jhamandas *et al.*, 2001).

Fournier (2007), buscando demostrar el efecto de la leche de soya (72 mg/día) y leche de vaca con 70 mg de isoflavonas por 16 semanas, sobre la función cognitiva de mujeres posmenopáusicas de entre 48 y 65 años de edad, concluyeron que no la mejoraron apreciablemente. En otro estudio donde se utilizó formonononetina 25 mg, biochanina 2.5

mg y menos de 1 mg de daidzeína y genisteína de Trébol rojo (*Trifolium pratense*), en mujeres posmenopáusicas mayores de 60 años de edad, durante seis meses, concluyeron que no mejora a corto plazo la función cognitiva. Sin embargo, sugieren que se requiere experimentar a largo plazo para determinar si ocurren efectos positivos en el mencionado objetivo de estudio (Bernal-Alcocer, 2005).

Dicho efecto neuroprotector, de los extractos de derivados naturales, se deba a que el aceite de la soya contiene lecitina, fosfolípido vital para las membranas celulares. Y que fitoestrógenos debido a la significativa afinidad a los receptores  $\beta$ -estrogénicos: se incrementan el flujo sanguíneo en cerebro; la actividad antiinflamatoria y la sinapsis neuronal (Haya, 2002, Lund, 2001).

Sin embargo, en un estudio realizado por Hwang en el 2006, reportan que administrando isoflavonoides de soya a ratas hembras, por largos periodos, produce una reducción del nivel de la proteína parvalbúmina interneuronas a nivel del hipocampo y el *Gyrus dentatus*. Lo que sugiere que puede causar cambio en la homeostasis del calcio en dichas zonas. En otro de estudio en ratas hembras alimentadas con los mismos metabolitos, estas redujeron su peso de manera significativa, el umbral al dolor por estímulo de calor no se vio influenciado, pero si se incrementaron los receptores a glucocorticoides en el hipocampo, afectando el eje hipotalámico-pituitario-adrenal al momento de estrés, con una liberación alta de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) después de su activación (Azcoitia, 2006).

Al utilizar el isoflavonoide puerarina (*Kudzu*) por largos periodos, en ratas ovariectomizadas, se mejoró su déficit en el aprendizaje y memoria. Sin embargo se afectó la actividad del sistema glutamatérgico/gabaérgico en el hipocampo (Xu, 2004).

Lund *et al.*, (2001) utilizando fitoestrógenos (Phyto-600 y Phyto-free) y dietarios en ratas hembras y machos utilizando el métodos del laberinto radial de ocho brazos para determinar la variación en relación a la memoria visual espacial reportaron que las ratas expuestas por largos periodos al Phyto-600 adquirieron mayor rapidez en el laberinto que las que recibieron la dieta con Phyto free. Concluyen que la utilización que el Phyto-600 si actúa mejorando la memoria visual espacial en hembras, mientras que en machos esta fue inhibida con la misma dieta, lo que sugiere que los fitoestrógenos de la soya pueden influenciar el aprendizaje y memoria, al alterar positivamente la expresión de las proteínas involucradas en la protección e inflamación neural.



Luine en el año 2006, tratando ratas ovariectomizadas por 9 semanas con alimentos con altos niveles de fitoestrógenos de harina de proteína de soya (810  $\mu\text{g/g}$ ), y con niveles mínimos de estos compuestos, demostró que el primer tratamiento fue asociado, con mejor desempeño en tareas que requerían la memoria espacial e incremento de la densidad dendrítica en la región CA1 del hipocampo y en corteza prefrontal. Sin embargo ni el peso de los animales, la ansiedad, memoria y reconocimiento de objeto en la prueba de laberinto en cruz fueron afectados por los niveles de fitoestrógenos de la dieta.

### **CARACTERÍSTICAS DE LOS LUPINUS.**

Los lupinos como se les conoce a las diferentes especies del Género *Lupinus* son plantas que pertenecen la familia (*Leguminosae=Fabaceae*), subfamilia *Papilionoideae*, Tribu *Genisteae*, Subtribu *Lupininae*, agrupa a más de 400 especies en el mundo, México cuenta con aproximadamente 80 especies diferentes y en el estado de Jalisco se han descrito la presencia de 12 de ellas, entre las que se encuentra el *L. mexicanus* Cerv. ex Lag. Fig.6. (Bañuelos y col., 2006; De Felipe, 2006).



Fig. 6 *L. mexicanus* Cerv. ex Lag, en un predio ubicado en la población de Matanzas, Jalisco.

De acuerdo con Calderón y Rzedowski (2005) esta especie es una planta anual o bienal, de 2 a 6 dm de alto, tallos huecos cubiertos con pelos extendidos abundantes de 4 a 6 mm de largo tamaño; estípulas de 15 a 25 mm de largo, peciolo de 4 a 10 cm de largo con pelos análogos a los del tallo, foliolos 7-9, linear o blanceolados, vellosos en el envés, generalmente glabros en el haz o con algunos pelos cerca del margen, foliolos más grandes de 3 a 3.5 cm de largo, de 5 a 9 mm de ancho; racimos de 10 a 30 cm de largo, con flores esparcidas o subverticiladas, brácteas subuladas, vellosas, de 10 a 14 mm de largo; cáliz piloso, con pelos de 2 a 4 mm de largo, labio inferior finamente tridentado, labio inferior bidentado, bracteolas de 2 a 3 mm de largo, insertas lateralmente sobre la copa del cáliz, corola glabra, estandarte suborbicular, de 13 a 16 mm de largo, de 12 a 16 mm de ancho, alas de 13 a 17 mm, el extremo redondeado o en forma de hacha (el ápice algo puntiagudo), ángulo de la quilla de 90 a 95°, óvulos 8 o 9; legumbres de 3 a 4 cm de largo, de 6 a 8 mm de ancho, con pubescencia pilosa abundante, de 2 a 3 mm de largo, además de una cubierta inferior canescente. Se ha colectado en campos y a orillas de caminos en varios municipios del Estado de Jalisco, como Zapopan, más ampliamente hacia el Noroeste del Estado: Acatic, Arandas, Cuquío, Juanatlán, Lagos de Moreno, Ojuelos, Villa Obregón y Yahualica), (Ruiz-Moreno, 2006; Zamora-Natera, 2008).

En general, los lupinos al igual que otras leguminosas, se caracterizan por el alto contenido de proteína en sus semillas (30-42 %). Presentan capacidad para fijar nitrógeno atmosférico y sintetizar metabolitos secundarios como alcaloides y compuestos polifenólicos (isoflavonoides). Estos los utiliza la planta como defensa química contra insectos, herbívoro y otras plantas (alelopatía), protección contra rayos ultravioleta, además para atraer a agentes polinizadores y diseminadores de semillas (Surinder, 2006).

## **EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ISOFLAVONOIDES.**

Los perfiles de flavonoides sintetizados en tejidos de lupinos del viejo mundo, además de sus patrones de glucosilación y malonilación de estos compuestos, han sido plenamente investigados utilizando técnicas de HPLC-MS (Kachlicki *et al.*, 2005).

Se han realizado determinaciones de los perfiles y cuantificación de estos metabolitos utilizando técnicas de purificación y concentración (partición y fraccionamiento) con procedimientos de derivación como la metilación, metanólisis y

acetilación. Posteriormente se aplican técnicas analíticas utilizando Cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG-MS) (Frański, 1999; Stobiecki, 1993).

Stobiecki, y Kachlicki, en el año 2006, refieren que la presencia de carbohidratos y sustancias lipofílicas en los extractos de plantas, pueden influir el perfil cuantitativo y cualitativo de flavonoides, y sus derivados. Considerando lo anterior, la preparación extracción de muestras en muchos casos, es requerida una purificación adicional basada en la Extracción en Fase Sólida (SPE), utilizando en tándem, cartuchos de fuerte extracción catiónica (SCX) y de fase reversa, con grupos octadecil (C18). Este autor en 1997 estandarizo y aplico esta técnica, para la extracción de compuestos polifenólicos de *Lupinus albus*.

Bednarek, en el año 2001, utilizo la SPE, previa a la utilización de Cromatografía líquida/Ionización con Ionización por Electro spray/Espectrometría de masas (LC/ESI/MS) para la caracterización del perfil y cuantificación de isoflavonoides: glucósidos acetilados y no acetilados en *Lupinus luteus*).

Sin embargo, el conocimiento de la presencia de estos compuestos en el género *Lupinus* en el Nuevo Mundo es bastante limitado, y un análisis sistemático de isoflavonoides glucoconjugados solo han sido reportados en pocas especies silvestres del Occidente de México y de estas, solamente perfiles de flavonoides de órganos vegetativos (hojas, raíces, tallo, e inflorescencia) han sido reportados (Wojakowska *et al.* 2013).

García-López *et al.*, (2006), al caracterizar isoflavonoides en *Lupinus exaltatus* Zucc., utilizo la (SPE) previa a la utilización de HPLC-UV y HPLC-ESI/MS<sup>n</sup>, para demostrar la presencia de derivados de genisteína glucosilada, diglucosilada y glucosilada-malonilada.

Stobiecki en el año 2010, utilizó (SPE) como preparación para la caracterización y cuantificación de compuestos polifenólicos, en extractos de raíces y hojas de *Lupinus reflexus* Rose. Utilizó dos métodos de análisis cuantitativo de CL-MS, Cromatografía Líquida de Alta Resolución, con trampa de iones-Espectrometría de masas como analizador operando con baja resolución y Cromatografía Líquida de Rápida Resolución (RRLC). Este último fue hifenado con un analizador de espectrometría de masas de alta resolución e identificó 62 compuestos principalmente derivados de genisteína.

Cabe mencionar que no existe información referente a la extracción de los isoflavonoides de semillas germinadas de ninguna de las especies silvestres de México. El *L. mexicanus* Cerv. ex. Lag., una de las 15 especies que se desarrollan en el estado de Jalisco, representa una potencial fuente de isoflavonoides debido a su abundancia y amplia distribución. Sin embargo, el conocimiento de su actividad biológica de estas especies es limitado, aunque se puede suponer tengan actividad estrogénica. Además, la pretensión de este estudio fue determinar el perfil de flavonoides del extracto de semilla germinada de *L. mexicanus* y evaluar su efecto neuroprotector en estructuras neurales que se relacionan con la memoria espacial - memoria de trabajo en un modelo de rata ovariectomizada.

## JUSTIFICACIÓN

Según el INEGI en el año (2010), en México la población de la tercera edad rebasa los 10 millones. De estos 671,323 habitan el Estado de Jalisco. Se espera que con el incremento del promedio de vida, se eleve la aparición de enfermedades crónico-degenerativas y sus efectos directos en la economía por pensiones y servicios médicos especializados (geriatras).

En esta etapa, disminuye la eficiencia del eje hipotalámico-hipófisis-gonadal, presentándose afecciones como: el síndrome climatérico, osteoporosis, cardiopatías, predisposición a la enfermedad de Alzheimer, depresión, pérdida de la memoria, desorientación, déficit en el proceso cognitivo, entre otras (Luebke, *et al.*, 2010; Moran *et al.*, 2013; Morrison, *et al.*, 2006; Rodney, 2013; Ypsilantini, *et al.*, 2008).

En este déficit de esteroides, la síntesis de neuroesteroides, y esteroides por glándulas adrenales es insuficiente para evitar dichas afecciones. Estos esteroides tienen actividad neurotrófica y neuroprotectora, en la corteza prefrontal, la formación hipocampal, principalmente en el hipocampo.

Los tratamientos con (THS), pueden mejorar la memoria y paliar la progresión de las enfermedades crónico-degenerativas. Pero su utilización puede ser riesgo de cáncer de mama, cardiopatías, de trastornos cognitivos y demencia.

La mayoría de los estudios que involucran efectos de los fitoestrógenos han sido realizados con isoflavonoides de la soya. Sin embargo, no hay estudios en México sobre el género *Lupinus* y el efecto de los isoflavonoides como neuroprotectores o neurotróficos. No así en el Viejo Mundo. Entre las especies de mayor distribución en México se encuentra *L. mexicanus* del que existe escasa información referente al perfil de isoflavonoides y nada se conoce sobre sus actividades biológicas (antioxidantes, estrogénicas) y de su efecto en el aprendizaje y memoria. Por lo que en este estudio se determinara el perfil de estos compuestos, probar su posible actividad biológica, como neuroprotector. Conocer sus efectos sobre los procesos cognitivos. Así como los cambios morfométricos en el encéfalo de las ratas.

## **HIPÓTESIS.**

La especie *L. mexicanus* sintetiza isoflavonoides, como la genisteína y la daidzeína con actividad fitoestrogénica y por tanto con efecto positivo sobre el aprendizaje y memoria y la integridad neuronal en la región CA3 del hipocampo de ratas ovariectomizadas

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general:**

Determinar el perfil de isoflavonoides, en semillas germinadas de *L. mexicanus* y evaluar la actividad biológica de los extractos purificados, específicamente su efecto sobre el aprendizaje y memoria e integridad neuronal de la región CA3 hipocampal en ratas cepa Wistar.

### **Objetivo Particulares:**

1. Obtener un extracto metanólico purificado a partir de semilla germinada de *L. mexicanus* y caracterizar su perfil de isoflavonoides.
2. Determinar la capacidad de aprendizaje y memoria (Memoria Visual Espacial) en ratas ovariectomizadas tratadas con el extracto purificado de isoflavonoides utilizando el Laberinto en Y.
3. Valorar los cambios morfológicos y morfométricos de neuronas de la región CA3 del hipocampo debidos al tratamiento con extractos purificados de *L. mexicanus*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Colecta de material vegetal.

El presente estudio fue llevado a cabo en el Laboratorio de Biotecnología del Departamento de Botánica y Zoología, el Laboratorio de Morfofisiología del Departamento de Medicina Veterinaria del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara, así como en el Laboratorio de Fitoquímica del Instituto de Química Orgánica en Poznań, Polonia.

Se colectaron plantas de *L. mexicanus* Cerv, en un predio ubicado en la localidad de Matanzas, municipio de Ojuelos Jalisco, México. Localizado a una altura de 2205 msnm, dentro de las coordenadas  $21^{\circ} 33. '00''$  a  $22^{\circ} 02' 00''$  de latitud norte a  $101^{\circ} 02' 30''$  a  $101^{\circ} 53' 00''$  de longitud oeste (Fig. 7). Predomina el clima seco en invierno y primavera. Lluvia entre los meses de mayo a agosto con una precipitación media de 473.5 mm. Se considera templado, con una temperatura media anual de  $17.1^{\circ}\text{C}$ , con una máxima de  $25^{\circ}\text{C}$  y una mínima de  $-3.9^{\circ}\text{C}$ .



Fig. 7. Mapa de ubicación de la localidad de Matanzas, municipio de Ojuelos, Jalisco. Señalada con un círculo. El cual limita con los estados de Aguascalientes, Zacatecas, San Luis Potosí y Guanajuato.



Las plantas colectadas se herborizaron, clasificaron y se procesaron por expertos, del Instituto de Botánica, del Departamento de Botánica y Zoología del (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara. El resto de las plantas se deshidrataron a temperatura ambiente y se obtuvo 1.200 kg de semilla. Después las semillas obtenidas se limpiaron y almacenaron a temperatura ambiente en un contenedor sellado.

## **EXTRACCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ISOFLAVONOIDES DE SEMILLAS GERMINADAS DE *L. mexicanus***

Después se germinaron y se les aplicó el método de extracción metanólica utilizando metanol al 80%. De inmediato el extracto obtenido fue sometido a (SPE) para su concentración y purificación (Stobiecki *et al.*, 1997), el método analítico utilizado para la identificación de los compuestos polifenólicos fue Cromatografía Líquida de Ultra Desempeño acoplado a un ionizador por electroespray y un sistema Quadropolo de Tiempo de Vuelo con Espectrómetro de Masas (UPLC/ESI-QTOF-MS) (Stobiecki 2013).

### **Germinación.**

1 kg de semilla, higienizadas de *L. mexicanus* Cerv., se pesaron en paquetes de 50g, cada uno. Entonces las semillas fueron escarificadas con ácido sulfúrico al 95% por 60 min, el cual fue eliminado posteriormente por decantación y se lavaron las semillas por 10 veces con agua destilada ultrapura obtenida utilizando un sistema modelo miliporo MiliQ plus. La germinación igual fue en condiciones estériles. Para su desarrollo, las semillas se colocaron en charolas conteniendo perlita hortícola. Posteriormente se colocaron en contenedores de vidrio en papel filtro (20 X 30 X 5 cm) humedeciendo constantemente con agua destilada y bajo condiciones controladas en la cámara de crecimiento con temperatura promedio de 25°C, 50% de humedad, con un fotoperiodo de 16 horas utilizando lámparas de mercurio y sodio.

### **Extracción de compuestos fenólicos de los germinados de semillas.**

Para el análisis de flavonoides glucoconjugados, a las semillas germinadas se le

adiciono 100 ml metanol al 80% en una proporción de 1:5 P/V y se homogenizaron, agregando solvente hasta completar 250 ml. Se sometió a un baño ultrasónico durante 30 min. Posteriormente la suspensión obtenida se filtró con un embudo Büchner, lavando los residuos con 10 ml de metanol. Los filtrados se concentraron en un rotavapor con vacío y a una temperatura de 40°C y una vez evaporado el solvente el residuo se congelo a menos - 20°C.

## **AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS EXTRAIDOS.**

Posteriormente se procedió a aislar, concentrar, purificar los extractos a través de la (SPE) (método propuesto por Stobiecki *et al.*, 1997), utilizando cartuchos BOND ELUT, VARIAN de (SCX) y C-18 (Fase reversa) ambos de 20 cc y 5 g. Específicos para alcaloides quinolizidínicos y para compuestos fenólicos, respectivamente. Estos fueron colocados en columna y pre-acondicionados con 20 cc de metanol grado HPLC y luego con 20 cc de agua. Después cada muestra fue percolada a través de la columna (SXC - C-18). Se lavaron los compuestos más polares con 20 cc agua y los compuestos fenólicos retenidos en ambos cartuchos, fueron con fracciones de 2 ml de metanol HPLC.

Para el monitoreo de la presencia de compuestos fenólicos (flavonoides) se utilizó, cromatografía en capa fina (TLC). Para lo cual se utilizó genisteína como estándar indicador y como revelador el reactivo de Gibbs.

El extracto concentrado se almaceno en refrigeración a – 20°C sin exposición a la luz. Acto seguido los extractos congelados se liofilizaron y envasaron al vacío. Todas las muestras se mantendrán a una temperatura de – 20°C, sin exponerlos a la luz.

Para la identificación de flavonoides y sus compuestos derivados en los extractos metanólicos purificados de germinados de la semilla de *L. mexicanus* se utilizó el sistema utilizado UPLC/ESI/qToF-MS (Stobiecki. 2013).

### Identificación y cuantificación de los metabolitos.

Para el análisis e identificación de los compuestos fenólicos de los extractos purificados se utilizaron dos sistemas LC-UV-MS. El primer sistema consistio en un

HPLC Agilent 1100 (Waldbronn, Germany) combinado con una trampa de iones (IT) espectrómetro de masas modelo Esquire 3000 (Bruker Daltonics, Bremer, Germany); El segundo fue un sistema Agilent RR1200 conectado a un espectrómetro micrOTOF-Q de Bruker. Fueron utilizadas dos tipos de columnas: una columna C-18 X-Bridge (150 x 2.1 mm; 3.5  $\mu\text{m}$  de diámetro de partícula, Waters) y una columna Zorbax Eclipse XBD-C-18 (100x2.1 mm; con un grano de 3.5  $\mu\text{m}$ , Agilent). Las corridas cromatográficas en el sistema fueron desarrolladas a un flujo estimado de 0.5 mL/minuto utilizando mezclas de dos solventes: A (99.5% H<sub>2</sub>O, 0.5% HCOOH, v/v) y B (99.5% MeCN, 0.5% HCOOH, v/v). La columna efluente de separación fue 3:2, de esta manera se entregó como fuente de iones al (ESI) a 0.2 mL/minuto. Las etapas de elución fueron como sigue: 0-8 min de gradiente lineal a 5 a 30 % B, 8-10 min de gradiente lineal a 95 % B; 10-12 min isocrática 95 % B; y el equilibrio fue obtenido 3 min después regresando a las condiciones iniciales. Los mismos solventes fueron utilizados en el sistema Agilent 1100 a un flujo de 0.2 mL/minuto y el gradiente fue: 0-35 min de gradiente lineal a 5 a 30 % B; 35-45 min; arriba 95% B; 45-52 min isocrática a 95% B; el re-equilibrio ocurrió 60 min después el regreso a las condiciones iniciales. Los ajustes del espectrómetro de masas IT fueron: para (ESI) voltaje + 4 Kv (modo ion positivo), nebulización con nitrógeno a 1.7 Bar, con flujo de gas secante de 7 L/minuto, temperatura de gas de 310 °C, separador I con voltaje + 12.4 o -11.2 V, y la energía de colisión a I V, e impulsado dentro del 40-200 % de este valor. El número de iones acumulado en la trampa fue desarrollado a 10000 y el tiempo de máxima acumulación fue 200 ms.

De acuerdo a resultados de experimentos preliminares, los espectros fueron grabados en forma dirigida en el rango de masa  $m/z$  50-1500. El instrumento fue manipulado bajo con el Control Esquire, versión 5.1, y los datos fueron analizados utilizando el software de Análisis de Datos, versión 3.1 (Bruker). El espectrómetro micrOTOF-Q consistió de ESI operado a un voltaje de +4.5 kV, nebulización con nitrógeno a 1.6 Bar, fluido de gas seco de 8.0 L/min. A una temperatura de 220 °C. El sistema fue calibrado externamente utilizando una mezcla conteniendo bloques de formiato de sodio. Una calibración adicional interna fue desarrollada para cada corrida por inyección inyectando la mezcla de calibración durante la separación con Cromatografía Líquida (LC) utilizando la válvula derivadora. Todos los cálculos fueron utilizando el algoritmo cuadrático HPC. Esta calibración dio una precisión de al menos 5 ppm. El espectro de MS/MS fue adquirido a la frecuencia de un análisis por segundo para iones

seleccionados en base a experimentos preliminares, con argón utilizado como gas de colisión. La energía de colisión dependió de las masas moleculares de los compuestos y fue establecido en modo de ion positivo entre 15 y 30 eV. El instrumento se manejó a una resolución alta que 10000 (FWHM-anchura a altura media) bajo la intervención del Control del Programa micrOTOF versión 2.3. Los datos fueron analizados utilizando el software de Análisis de Datos, versión 4 (Bruker). Los perfiles de metabolitos fueron registrados en modo de ion positivo y negativo. Para la identificación de compuestos, el instrumento fue operado modo seleccionado MS/MS y fueron grabados cromatogramas iónicos individuales para masas exactas de  $[M+H]^+$  iones (+ 0.005 Da).

## **PRUEBA CONDUCTUAL.**

### **Material y Métodos.**

Para evaluar el efecto de los extractos de isoflavonas sobre la capacidad cognitiva de los animales, se utilizó un total de 48 ratas hembra de la cepa Wistar, con pesos entre los  $200 \pm 10$  g y/o 2.5 meses de edad. Los animales fueron obtenidos del bioterio del Centro de Investigación Biomédica de Occidente del Instituto Mexicano del Seguro Social (CIBO, IMSS). Estos fueron alojados en un espacio en condiciones controladas de luz-oscuridad con ciclos de 12 x 12 horas, temperatura de  $22^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ , y se les proporcionó agua y alimento balanceado para roedores (Rodent Laboratory Chow 500) a libre acceso.

### **Consideraciones de ética**

El protocolo seguido para la utilización de animales en este estudio fue aprobado por el comité institucional de bioética y todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con la producción, cuidado y utilización de animales de laboratorio establecido en la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999; Aluja, 2002).

### **Procedimiento quirúrgico.**

Las ovariectomías bilaterales y análisis conductual de los animales se llevó a cabo en una habitación anexa al animalario del Laboratorio de Neuromorfología del Departamento de Medicina Veterinaria del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara.

Para las cirugías de las ratas cepa Wistar se les inyectó vía intramuscular (IM) 0.12 ml de sulfato de atropina (Tropigenol®) como preanestésico, seguido por la anestesia mediante la administración (IM) de (0.20 ml) 10mg/kg de peso de Xylacina (Procin®) y

(0.12 ml) 50 mg/ kg de peso de ketamina (Inoketam®). De acuerdo al protocolo de experimentación; 30 animales fueron sometidos a ovariectomía y a 10 de ellos se les practico la cirugía sin retirar los ovarios y se incluyo un grupo control (CTR) con una n=8 . Concluido el procedimiento quirúrgico se realizó un proceso post operatorio con antibiótico, manteniéndolos en manta térmica hasta su recuperación.

### **Evaluación de la actividad estrogénica del extracto fenólico.**

Después del periodo post- operatorio de 4 días todos los animales fueron distribuidos completamente al azar dentro de los siguientes grupos: Ovx (OVX) tratado con 0.04 ml/animal/día de dimetilsulfóxido (vehículo); Ovx-estradiol (OVX-BE), administrando 5 µg/animal/día de benzoato de estradiol; Ovx-ISO (OVX-ISO), tratados con 1250 µg /animal/día de extracto de isoflavonoides, (de acuerdo con Xu *et al.*, 2007); y el grupo sham (S) tratado con solo vehículo. Los cuatro grupos de ratas fueron inyectados vía subcutánea diariamente a las 8 A.M. por 28 días.

Una vez concluidos los tratamientos, los animales fueron evaluados conductualmente mediante la aplicación de la prueba de laberinto en Y, en la cual se evaluó la actividad de alternancia espontanea.

Además, se utilizó el paradigma de reconocimiento de objeto novedoso el cual permitió evaluar la capacidad de aprendizaje y memoria en los animales expuestos a los diferentes tratamientos. La prueba conductual en el laberinto en Y (Hughes, 2004), se llevó a cabo en un área cercana al animalario del Laboratorio de Morfofisiología del Departamento de Medicina Veterinaria del mismo Centro Universitario.

El laberinto en Y, está elaborado con paredes de acrílico color negro, con ángulos levemente pronunciados, consta de tres brazos denominados A, B, y C, los cuales convergen en un área central denominada vestíbulo. Cada brazo presenta las siguientes medidas: longitud de 46 cm, altura de 16 cm y 14 cm de ancho (Fig.8). Este dispositivo se colocó sobre una superficie de 70 cm de altura. Se colocó una cortina oscura alrededor del laberinto con el propósito de evitar el contacto visual de los animales con el personal encargado.

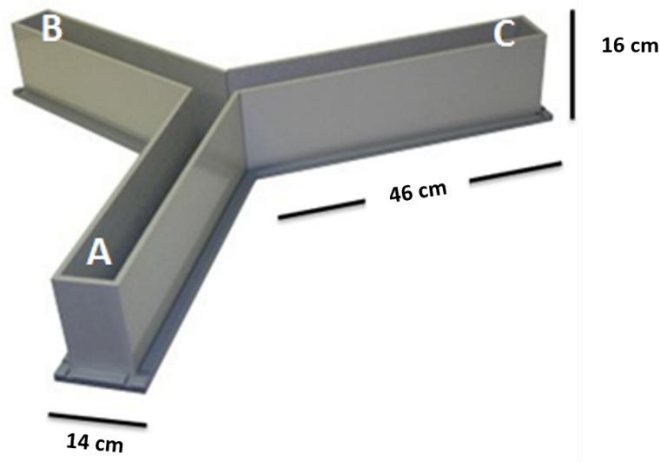


Figura 8. Diagrama que muestra la disposición y dimensiones de los brazos del laberinto en Y.

En la cortina, se colocaron marcadores espaciales (señales de referencia) a una altura aproximada de 90 cm sobre el límite superior del laberinto en Y, que le sirvieron al animal para orientarse espacialmente. La prueba se llevó a cabo en un total de dos ensayos de 10 min cada uno y con una diferencia de 30 min entre cada ensayo. Las sesiones se grabaron en video para su análisis posterior. Cabe señalar, que las pruebas se llevaron a cabo entre las 16:00 a 19:00 h; y las manipulaciones se efectuaron por el mismo personal responsable. Con el propósito de evitar cambios conductuales atribuidos a señales químicas de alarma por los animales en su orina y/o heces, entre cada ensayo se llevó a cabo una cuidadosa limpieza del laberinto con una solución de alcohol al 70%. Los parámetros que se evaluaron fueron la adquisición, consolidación y reconocimiento del objeto novedoso.

### **Descripción del procedimiento.**

Fase I (adquisición); el animal se introdujo de espaldas al laberinto en el brazo A y se le permitió su exploración libre durante 10 min. Al finalizar el ensayo, el animal fue regresado a su jaula en la cual permanecerá durante 30 min.

Fase II (consolidación); en esta fase el animal se mantuvo en su jaula por 30 min antes de iniciar su segundo ensayo de exploración en el laberinto. Antes de iniciar la fase de reconocimiento, se colocó un objeto nuevo en el brazo C del laberinto, el cual debió ser reconocido como novedoso por el animal.

Fase III (reconocimiento); durante este periodo se permitió la exploración libre de

los animales por un periodo de 10 min (segundo ensayo) durante este tiempo, el animal debió identificar o reconocer la presencia del objeto novedoso, lo cual fue evaluado por el número de visitas y el tiempo de permanencia en el brazo que contiene el objeto novedoso.

La evaluación de la memoria de trabajo de los animales se obtuvo a partir del análisis de las siguientes variables:

1. Número de visitas a cada brazo.
2. Duración de las visitas.
3. Primer brazo visitado.
4. Latencia para salir del brazo inicial (A).
5. Latencia para entrar al brazo con el objeto novedoso.
6. Número de reentradas.
7. Duración de la primera visita a cada brazo.
8. Duración de la visita más larga.
9. Duración de la primera visita al brazo novedoso.
10. Número total de visitas a todos los brazos.

#### **DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES.**

**Número de visitas a cada brazo:** se registró como entrada a un brazo cuando el animal haya introducido las 4 patas dentro de él, y la salida del brazo será registrada cuando las 4 patas del animal abandonen el brazo visitado. Al procesar la información se consideró una visita cada vez que se registre una entrada del sujeto a cualquiera de los brazos, después de haber realizado una visita a otro brazo. Así, cuando el animal solo visite la zona neutral y reingrese al brazo del cual se acaba de salir se consideró como una sola visita (reentrada).

**Tiempo total en cada brazo:** es la suma del tiempo en segundos que el sujeto permanece en un determinado brazo durante cada etapa de la prueba (adquisición o reconocimiento). Se espera que el animal con una memoria íntegra visite en más ocasiones el brazo que contiene el objeto novedoso (segundo ensayo).

**Primer brazo visitado:** primer brazo que visita la rata después de salir del brazo inicial (A).

**Latencia para salida del brazo inicial (A):** es el tiempo (s) transcurrido entre el inicio de la prueba y la primera vez que el animal deja de tener las 4 patas en el brazo A (puede representar una medida de estrés al inicio del experimento).

**Latencia para entrar al brazo con objeto novedoso:** es el tiempo (s) de la prueba que transcurre antes de que el animal visite por primera vez el brazo que contiene el objeto novedoso. Se espera que animales con memoria íntegra registren menor tiempo.

**Número de reentradas:** es la cantidad de veces (frecuencia) que la rata sale de un brazo y vuelve a entrar en él, sin haber visitado otro brazo en el intermedio; es decir, cuando el animal sale al vestibulo (zona neutral) y regresa al brazo en el que estaba. Esta actividad puede asociarse a aspectos conductuales como desorientación, indecisión o estrés.

**Duración de la primera visita al brazo con objeto novedoso:** es el tiempo que el animal emplea en el brazo con el objeto novedoso en la primera ocasión que lo visitó. Al comparar esta variable con la duración de la primera visita al objeto conocido se espera que la primera visita sea mayor en los sujetos con memoria íntegra.

**Duración de la visita más larga:** sirve para evaluar la actividad global de cada sujeto y su conducta exploratoria.

**Número total de visitas a los brazos:** es la suma de las visitas a los brazos A, B, y C. Esta variable servirá también, para evaluar la actividad motriz global de cada animal y su conducta de exploración.

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.**

Los datos obtenidos de la prueba conductual se analizaron mediante la prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una vía y las diferencias significativas entre los promedios fueron obtenidas a partir de la aplicación de la prueba de Tukey con un intervalo de confianza del 95% ( $p < 0.05$ ) para ser consideradas como estadísticamente significativas.



## **PRUEBA BIOLÓGICA.**

### **Material y métodos.**

Después de la prueba conductual todos los animales fueron anestesiados y sacrificados con pentobarbital sódico (63mg/ml) vía intraperitoneal según la NOM-062-200-1999 y perfundidos intracardialmente con 100 ml solución salina heparinizada tibia (37°C) por cuatro minutos, acto seguido para fijar el encéfalo *in situ* se utilizaron 250 ml de solución de paraformaldehído al 4% en buffer fosfato 0.1 M, con pH 7.4. El cerebro de cada animal fue removido y posteriormente fijado por inmersión durante 24 horas utilizando la solución de paraformaldehído 0.1 M. con buffer fosfato, pH 7.4.

Los cerebros fueron luego lavados en una solución salina buffer fosfato, deshidratados en concentraciones crecientes de alcohol 70°, 80°, 90°, 96° y 100°. La extracción del alcohol fue realizada con xilol y posteriormente empotrados en parafina. Después a todos los cerebros se les realizaron cortes coronales de 10 µm a nivel de la formación hipocampal con un micrótopo rotatorio (Leica®) y subsecuentemente teñidos con la técnica hematoxilina – eosina. Entonces, los cortes fueron analizados histológicamente a nivel de la región CA3 para la cuantificación del espesor del (OS) que incluyo el *alveus*, el diámetro nuclear de las neuronas piramidales, y la densidad del (PS), para lo cual se utilizo un microscopio de luz (Leica®) conectado a un analizador de imágenes (QWin500®).

## RESULTADOS.

### Perfil de isoflavonoides.

La técnica analítica empleada en el estudio para determinar el perfil de flavonoides de semillas germinadas de *L. mexicanus*, fue capaz de inequívocamente, establecer la presencia de 10 flavonoides glucoconjugados (mono y diglucósidos), acilados o no. Las agliconas presentes en estos compuestos fueron las flavonas acacetina, apigenina, y crisoeriol; las isoflavonas genisteína y 2'-hidroxigenisteína; y un compuesto desconocido con un peso molecular de 694 (Cuadro 1). Basados sobre el peso molecular y en algunos fragmentos observados en el espectro del acople MS/MS, el compuesto desconocido, podría ser acacetina - diglucósido malonilado; aunque los datos no fueron suficientes para inequívocamente identificar este metabolito.

Los flavonoides glucoconjugados acilados fueron crisoeriol malonilado C-glucósido; dos malonilados diglucósidos de 2'-hidroxigenisteína; y dos malonilados diglucósidos de genisteína, pero una de estas con dos fracciones contenidas de ácido malónico con la genisteína 4', 7-O-diglucósido dimalonilada. En contraste, la acetilación estuvo ausente en los siguientes flavonoides glucoconjugados: genisteína 8-C-glucósido, acacetina 8-C glucósido y crisoeriol C glucósido. Apigenina 6, 8 - di -glucósido -7 -O -apiosido, un compuesto encontrado en semillas de varias especies de lupinus, que no están presentes en órganos de las plantas, también fue encontrado (Cuadro 1).

Cuadro 1. Flavonoides y sus derivados identificados en el extracto de semillas germinadas de *Lupinus mexicanus* utilizando UPLC/ESI/qToF-MS (Cromatografía Líquida de Ultradeseño acoplada Ionización por electroespray, cuadrupolo Tiempo de vuelo-espectrómetro de masas).

No	RT (min)	Compound	MW	Elemental composition of [M+H] <sup>+</sup> ion	Exact mass of [M+H] <sup>+</sup> ion			Fragmentation pathway (products ions obtained from precursor ion)	
					Calculated	Observed	Error (ppm)	Positive ions [M+H] <sup>+</sup> (m/z)	Negative ions [M-H] <sup>-</sup> (m/z)
1	2.5	Apigenin 6,8- <i>di-C</i> -glucoside-7- <i>O</i> -apioside	726	C <sub>32</sub> H <sub>39</sub> O <sub>19</sub>	727.2080	727.2076	-0.6	727, 709, 595, 577, 559, 499, 481, 409, 391	725, 605, 455, 335
2	3.8	2'-hydroxygenistein <i>C,O</i> -diglucoside malonylated	696	C <sub>30</sub> H <sub>33</sub> O <sub>19</sub>	697.1611	697.1617	0.9	697, 535, 491, 449, 431	695, 489, 447
3	3.9	Genistein 4',7- <i>O</i> -diglucoside malonylated	680	C <sub>30</sub> H <sub>33</sub> O <sub>18</sub>	681.1661	681.1670	0.2	681, 519, 433, 287	nr
4	4.0	Genistein 6- <i>C</i> -glucoside	432	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>10</sub>	433.1129	433.1136	-1.6	433, 415, 397, 379, 313	431, 311, 283
5	4.1	2'-hydroxygenistein 4',7- <i>O</i> -diglucoside malonylated	696	C <sub>30</sub> H <sub>33</sub> O <sub>19</sub>	697.1611	697.1611	0.0	697, 535, 449, 287	651, 489
6	4.4	Chrysoeriol 8- <i>C</i> -glucoside	462	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> O <sub>10</sub>	463.1235	463.1227	-1.7	463, 445, 427, 409, 397, 385, 381, 373, 367, 353, 343	461, 341, 326
7	4.8	Unknown	694						
8	5.4	Acacetin 8- <i>C</i> -glucoside	446	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> O <sub>10</sub>	447.1286	447.1282	-0.9	447, 429, 411, 381, 351, 327, 397	445, 355, 325, 297, 282
9	5.6	Chrysoeriol - <i>O</i> -glucoside malonylated	548	C <sub>25</sub> H <sub>25</sub> O <sub>14</sub>	549.1239	549.1237	-0.4	549, 463, 301	547, 299
10	5.6	Genistein 4',7- <i>O</i> -diglucoside dimalonylated	766	C <sub>33</sub> H <sub>35</sub> O <sub>21</sub>	767.1665	767.1646	-2.5	767, 681, 519, 433, 271	765, 473, 431, 269/268

## **RESULTADOS PRUEBA CONDUCTUAL.**

### **Prueba en el Laberinto en Y.**

#### **Número de entradas a los brazos del laberinto en Y**

La prueba ANOVA para la variable frecuencia de ingresos a los brazos de laberinto en Y (brazo A, B ó C) arrojó un valor de  $F= 23.297$ ;  $p=0.00$  para la frecuencia de ingresos al brazo A, mientras el numero de ingresos al brazo B mostraron un valor de  $F= 13.02$ ;  $p= 0.00$  y para el brazo C, se obtuvo un valor de  $F= 15.668$ ;  $p=0.00$ . El valor promedio de la frecuencia de ingresos en los brazos de laberinto en Y  $\pm$  ES de los promedios se presenta en la Fig.9. Post Hoc, la prueba de Tukey mostro diferencias significativas en la frecuencia de ingresos a los diferentes brazos del laberinto en Y entre el grupo CTR y el resto de tratamientos; registrando promedios de  $3.0 \pm 0.73$  entradas al brazo A;  $2.87 \pm 0.7452$  ingresos al brazo B; y  $2.3750 \pm 0.6529$  ingresos al brazo C. Además, la prueba de Tukey evidencio diferencias significativas ( $p= 0.007$ ) en la frecuencia de entradas al brazo A entre los grupos (S) y (ISO), los cuales registraron un promedio de entradas de  $7.78 \pm 0.5471$  y  $10.78 \pm 0.6620$ , respectivamente (Fig. 8). De igual manera la frecuencia de ingresos al brazo A del grupo (BE) mostro diferencia significativa ( $p= 0.05$ ) con un valor promedio de  $8.44 \pm 0.6260$ , con respecto al grupo ISO (Fig. 9).

Los resultados muestran una frecuencia significativa en el número de ingresos a los diferentes brazos de laberinto de todos los grupos experimentales con respecto al grupo (CTR). La actividad mostrada por los animales sugiere el desarrollo de hiperactividad, es decir, una actividad locomotriz muy alta en comparación con el control.

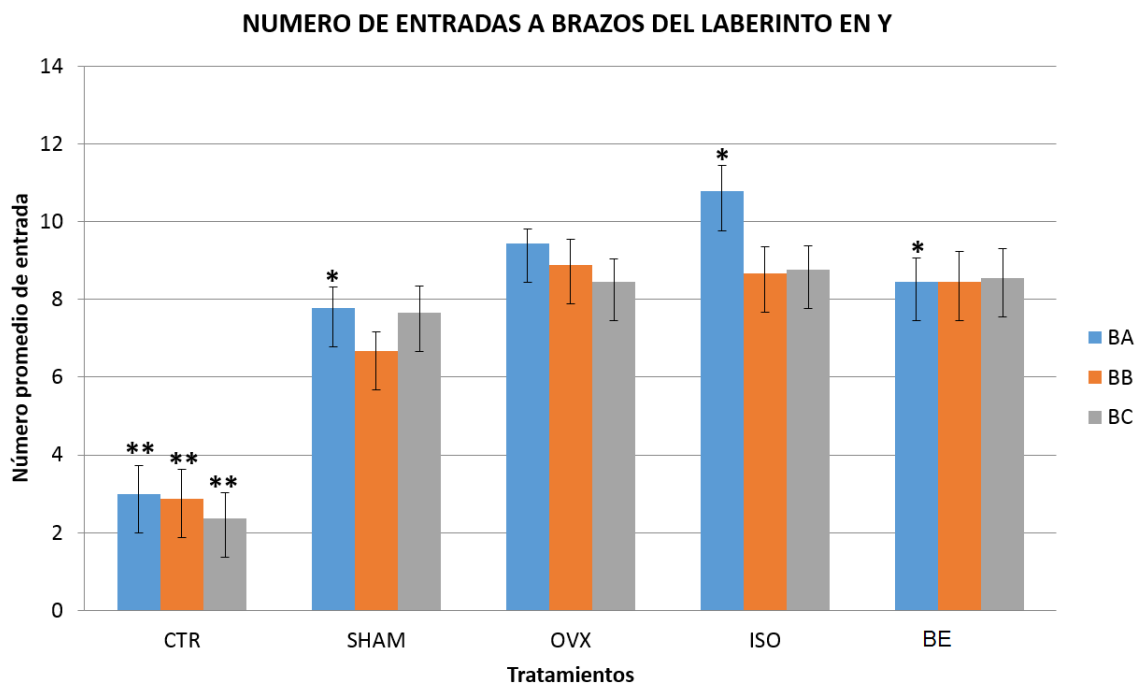


Figura 9. Número promedio de entradas a los brazos A, B o C del laberinto en Y. Las barras representan el número promedio de ingresos a los brazos de laberinto de los animales de las diferentes condiciones experimentales, monitoreado durante una prueba de 10 min (600 s). La línea sobre las barras indica el error estándar (ES); el asterisco sobre las barras indica diferencias significativas a un valor de  $p \leq 0.05$  y el doble asterisco indica diferencias a ( $p=0.00$ ) para una  $n=8$  del grupo CTR y  $n=9$  para los grupos restantes. CTR, control; SHAM, grupo sham; OVX, ovariectomía; ISO, isoflavonas; BE, benzoato de estradiol; BA, brazo A; BB, brazo B; BC, brazo C.

### Tiempo de permanencia en los brazos del Laberinto en Y.

La prueba ANOVA para mostró diferencias significativas para el tiempo de permanencia en los brazos A y B con valores de  $F=6.509$ ;  $p=0.000$  y  $F=5.085$ ;  $p=0.002$ , respectivamente. Post hoc, la prueba de Tukey solo mostro diferencias significativas entre los promedios del grupo CTR con respecto al resto de tratamientos registrando tiempos promedio de permanencia de  $72.8475 \pm 25.7$  s ( $p=0.003$ ) en el brazo A;  $303.57 \pm 66.2$  s, en el brazo B; y un

tiempo promedio en C de  $210.42 \pm 65.9$  s. En la figura 10 se presenta el tiempo promedio de permanencia  $\pm$  ES de las medias para cada uno de los grupos analizados.

Los resultados sugieren que los animales del grupo CTR dedicaron más tiempo a la exploración en cada uno de los brazos del laberinto, cabe señalar que el brazo B contenía el objeto novedoso, por lo que el tiempo promedio registrado indica que los animales dedicaron tiempo a la exploración de dicho objeto. Por su parte, el tiempo promedio registrado para la exploración en el brazo que contenía el objeto novedoso es bajo y similar entre los grupos restantes lo cual, aunado a la hiperactividad mostrada en la frecuencia de ingresos (Fig. 10) sugiere el desarrollo de conductas asociadas a ansiedad y el déficit en el reconocimiento del objeto novedoso, evidenciado por el menor tiempo empleado en la exploración del brazo B (Fig. 10).

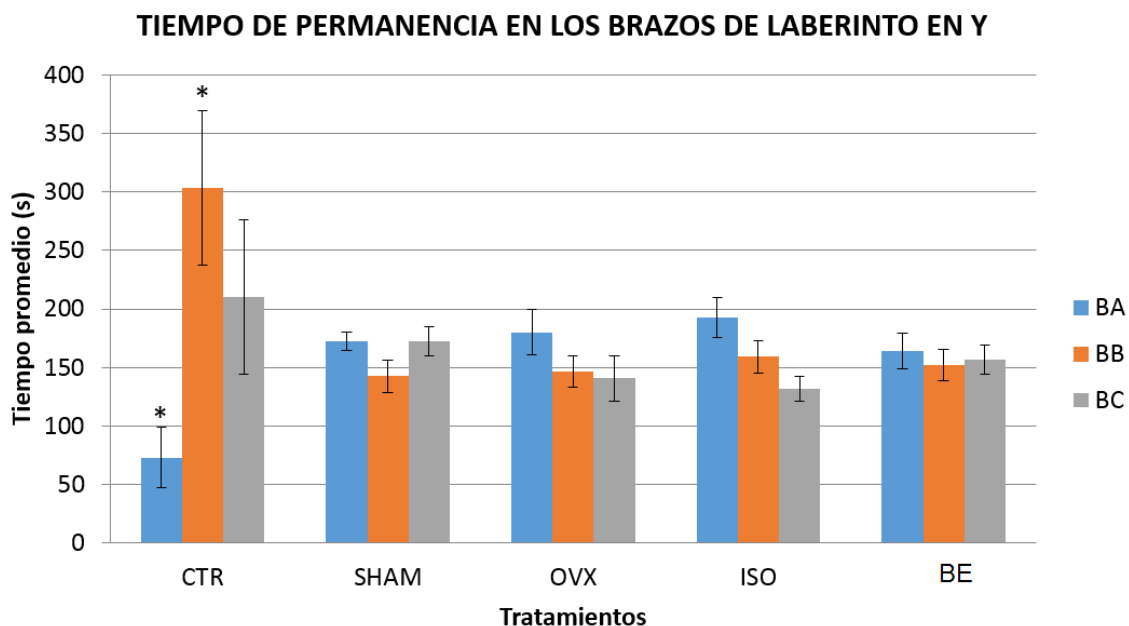


Fig. 10. Tiempo de permanencia en los brazos del laberinto en Y. Las barras presentan el tiempo promedio en segundos empleado por los animales en la exploración de los brazos A, B ó C del laberinto durante una prueba de 10 min (600 s). La línea sobre las barras representa el error estándar (ES) de los promedios y el asterisco indica diferencias estadísticamente significativas a ( $p \leq 0.05$ ) para una  $n= 8$  animales del grupo CTR y una  $n= 9$  animales para cada uno de los tratamientos. CTR, control; (S), grupo sham; OVX, ovariectomía; ISO, isoflavonas; BE, benzoato de estradiol; BA, brazo A; BB, brazo B; BC, brazo C.

## **PRUEBA BIOLÓGICA.**

### **Resultados.**

#### **Descripción histológica.**

El análisis microscópico de las preparaciones histológicas de la región CA3 del hipocampo los resultados fueron que las neuronas encontradas en el grupo OVX-BE fueron las más grandes; mientras, las más pequeñas fueron encontradas en el grupo OVX-ISO. En los grupos (S) y OVX-BE, las neuronas mostraron nucléolos redondeados, fueron ligeramente basofílicos, con uno u ocasionalmente dos nucléolos prominentes en su parte central. En los grupos OVX y OVX-ISO los núcleos fueron en forma oval. Los nucléolos fueron claramente definidos con cromatina granular en el grupo OVX; mientras en el grupo OVX-ISO no fueron claramente definidos con cromatina estaba condensada.

En suma, los grupos OVX-ISO y OVX, las neuronas mostraron cambios degenerativos como una picnosis, cavitación y eosinofilia; mientras, estos cambios fueron solo ocasionalmente observados en los grupos S y OVX-BE. Los citoplasmas neuronales fueron densos en todos los grupos, la excepción del grupo OVX-BE, los cuales mostraron un color rosa pálido. Este citoplasma denso fue eosinofílico en los grupos OVX y OVX-ISO, y ligeramente eosinofílico en el grupo S. La parte más grande del neuropilo fue uniforme en color y textura en los grupos S y OVX-BE; aunque hubo pequeñas áreas con textura grumosa. Por otro lado, los grupos OVX y OVX-ISO mostraron neuropilo grumoso texturizado. Las características descritas arriba se muestran en la Fig. 11.

#### **Análisis macroscópico cuantitativo.**

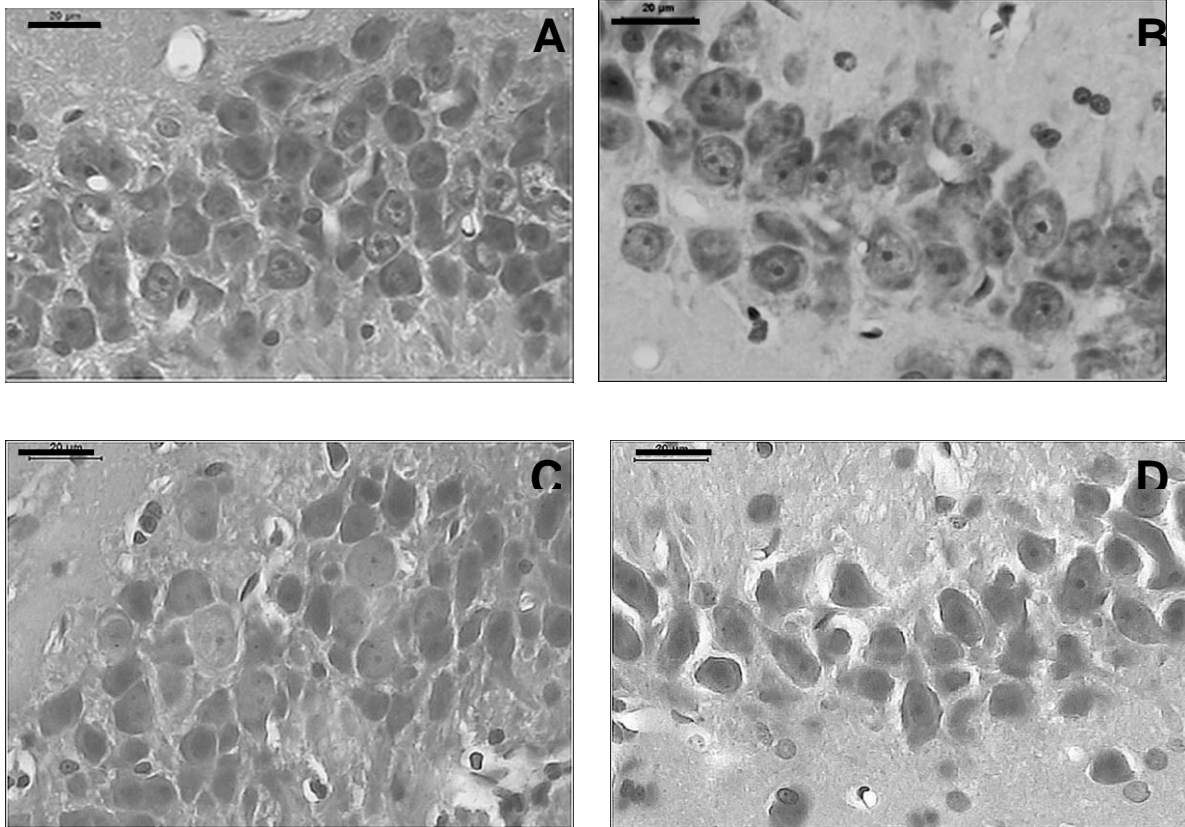
En *SO* que incluye el *Stratum alveus*, significativamente más denso (85.68  $\mu\text{m}$ ) en los cerebros del grupo OVX-BE) que en los cerebros de otros grupos ( $p \leq 0.05$ ). El orden descendente de las densidades en los otros grupos fueron: (S) (71.75  $\mu\text{m}$ ), OVX-ISO (63.66  $\mu\text{m}$ ), y OVX (59.32  $\mu\text{m}$ ). Fig 16 Con atención a las neuronas piramidales, los diámetros nucleares en el grupo OVX-BE fue 14.25  $\mu\text{m}$ ; este valor fue más grande ( $p < 0.05$ ) que los encontrados en los grupos S (11.82  $\mu\text{m}$ ), OVX (9.95  $\mu\text{m}$ ), and OVX-ISO (8.89  $\mu\text{m}$ ), respectivamente Fig. 15. Finalmente con respecto a la densidad neuronal, el grupo OVX tuvo el valor más elevado (10.34 neuronas/0.01  $\text{mm}^2$ ) y el grupo OVX-ISO el valor más bajo (6.0 neuronas/0.01  $\text{mm}^2$ ) Los valores intermedios de densidad neuronal fueron registrados en los

grupos OVX-BE (8.21 neuronas/0.01 mm<sup>2</sup>) y el S (7.75 neuronas /0.01 mm<sup>2</sup>) (p<0.05) como se muestra en el Fig. 15 y Cuadro 2.

### **Análisis estadístico.**

Los datos fueron analizados por análisis de varianza de una sola vía y los valores de las medias fueron comparados, con significancia establecida de  $p < 0.05$ . Post hoc para las diferencias entre medias se utilizó la prueba de Tukey. Fue utilizado el software SPSS 10.0 (Statistical Package for the Social Sciences).



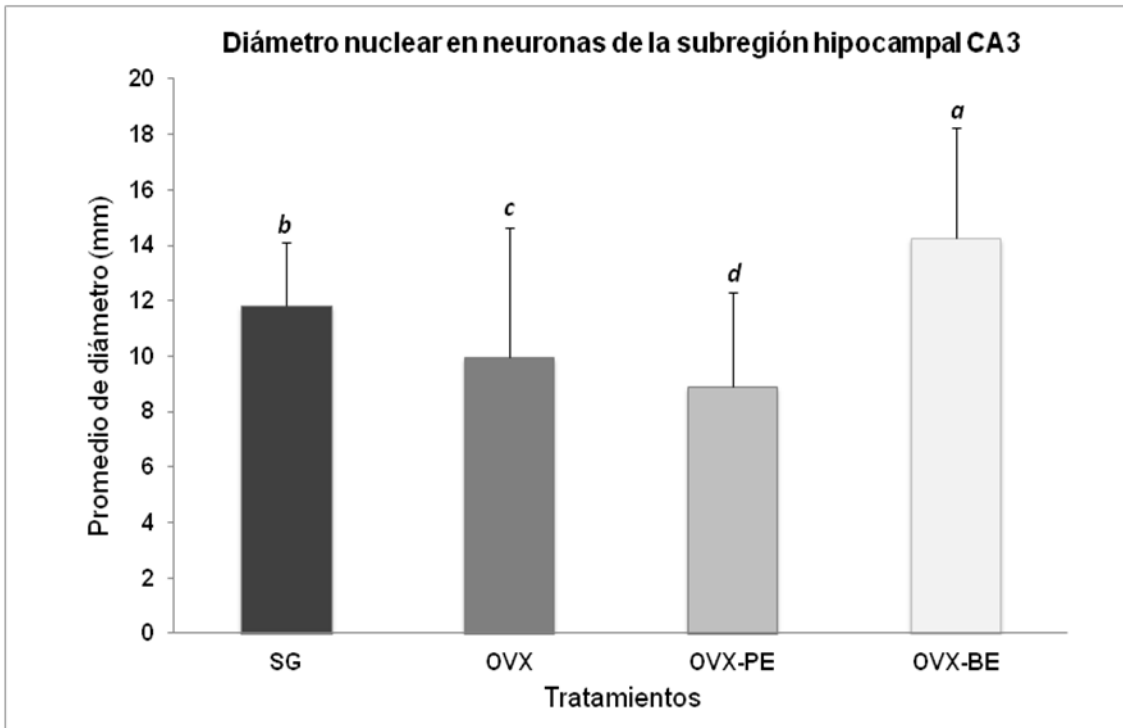


**Fig. 11.** Muestra el aspecto, magnitud y densidad de somas de neuronas hipocampales de CA3 de los diferentes grupos. A) Grupo S; muestra neuronas con características morfológicas normales, aunque con ligera eosinofilia y densidad celular alta, B) Grupo BE; sus neuronas fueron las de mayor tamaño en relación a los demás grupos y con características morfológicas normales, C) Grupo OVX; su densidad celular fue la más alta, aunque con numerosas neuronas eosinófilas y leve picnosis y cavitación, D) Grupo ISO; tanto la densidad como tamaño celular fue reducido, además se observó cavitación perineuronal y eosinofilia intensa acompañada de picnosis (tinción HE, aumento 40X ). La barra indica 20 µm.

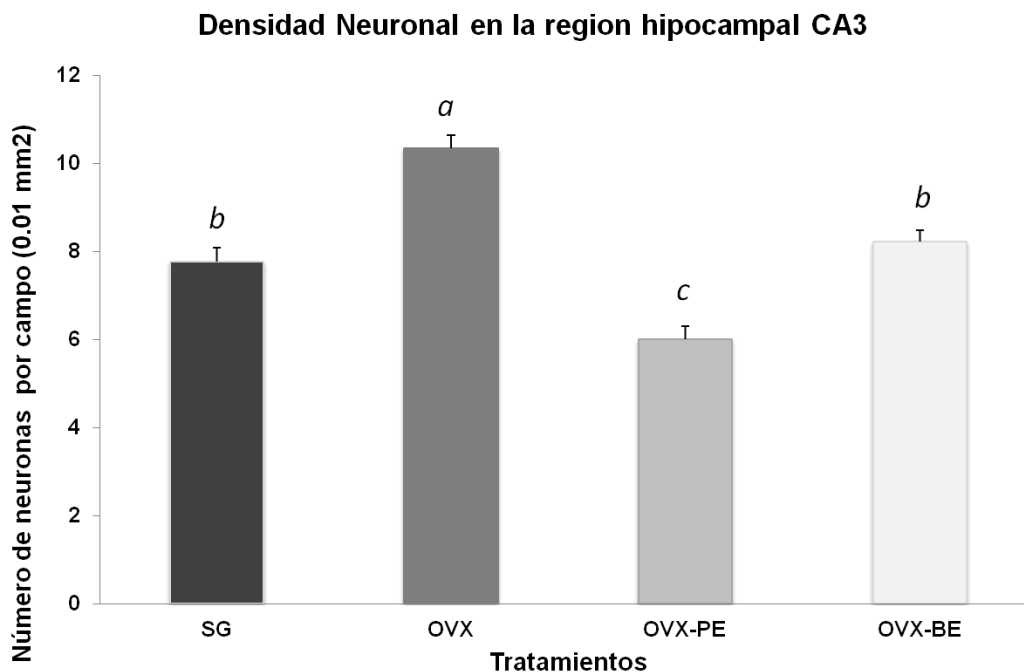
Cuadro 2 Efecto de benzoato de estradiol y extracto de flavonoides sobre la formación hipocampal CA3 del cerebro de ratas ovariectomizadas.

Tratamientos (Grupos)	Diámetro Nuclear ( $\mu\text{m}$ )	Densidad Neuronal (neuronas/0.01 $\text{mm}^2$ )	Espesor <i>Stratum Oriens</i> ( $\mu\text{m}$ )
S	11.82 <sup>b</sup>	7.75 <sup>b</sup>	71.75 <sup>b</sup>
OVX-I	9.95 <sup>c</sup>	10.34 <sup>a</sup>	59.32 <sup>c</sup>
OVX-BE	14.25 <sup>a</sup>	8.21 <sup>b</sup>	85.68 <sup>a</sup>
OVX-ISO	8.89 <sup>d</sup>	6.0 <sup>c</sup>	63.66 <sup>c</sup>

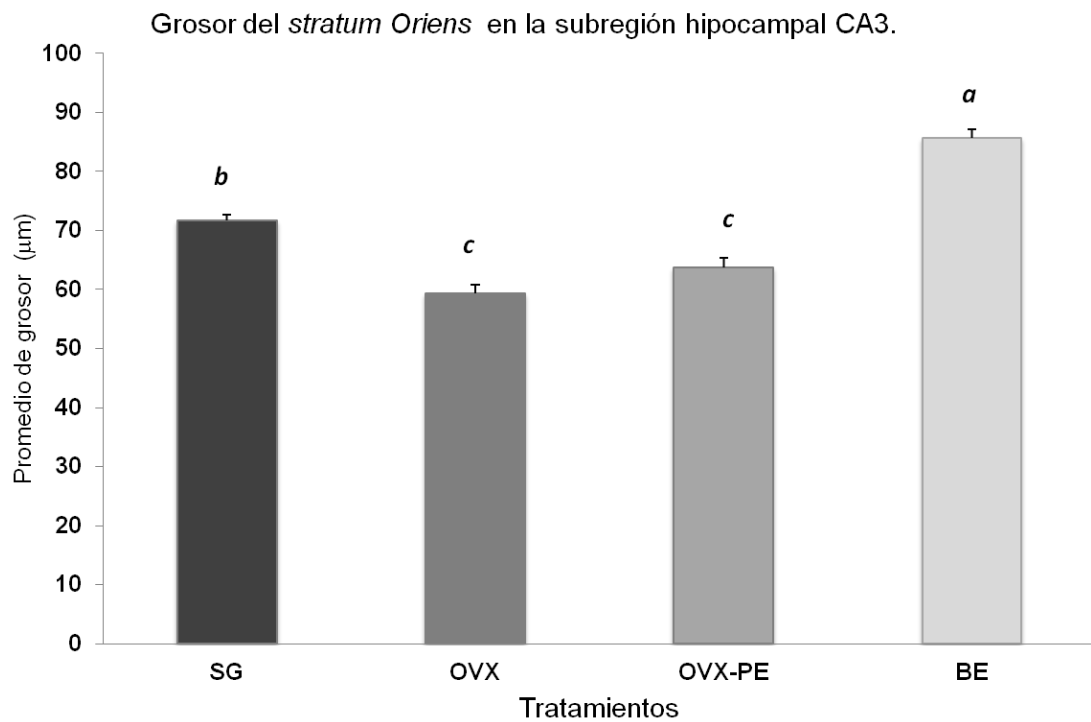
Diferentes letras en las columnas indican diferencia estadística ( $p < 0.05$ ). n=10



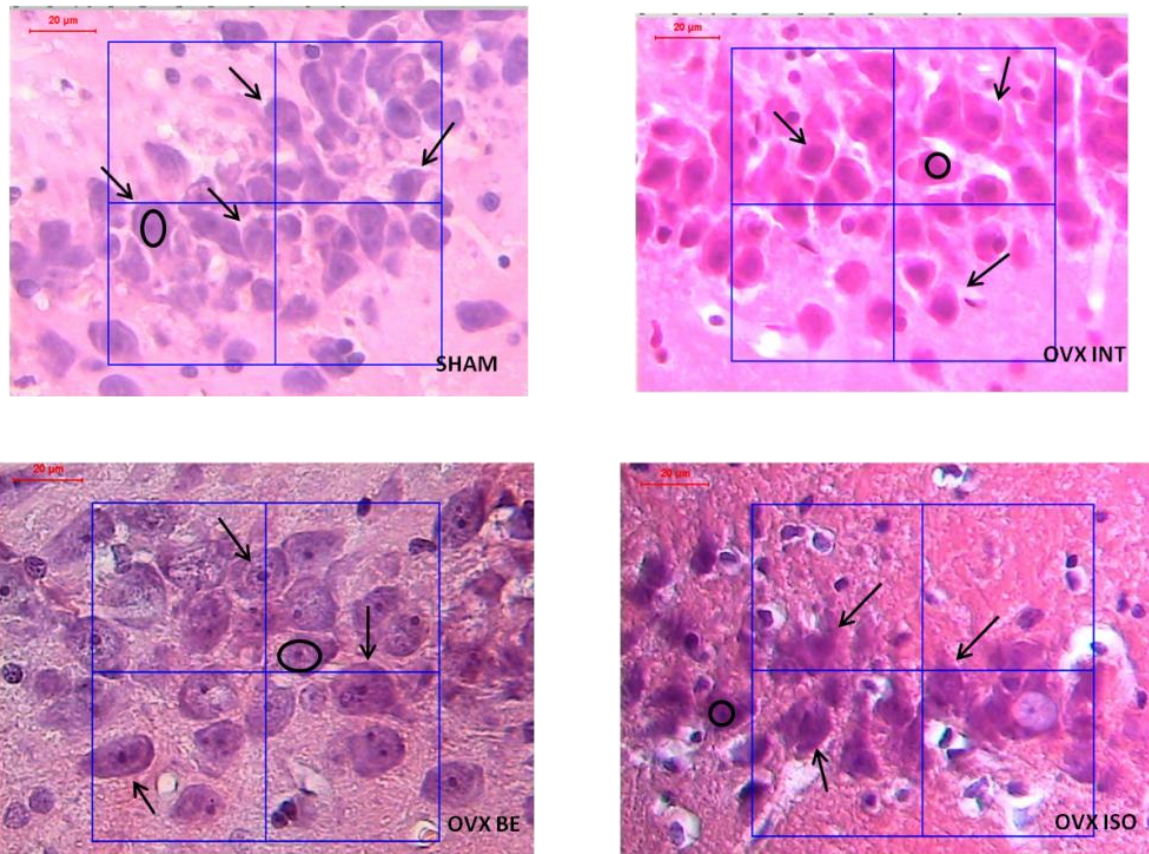
**Fig. 12** Muestra las medias  $\pm$  error estándar del diámetro nuclear de neuronas del área CA3 de los diferentes grupos de animales. El grupo OVX-BE mostro diferencia significativa en relación al diámetro nuclear ( $14.25\mu\text{m}$ ) ( $p<0.05$ ), que los otros grupos, S ( $11.82\mu\text{m}$ ), OVX ( $9.95\mu\text{m}$ ) y OVX-ISO ( $8.89\mu\text{m}$ ). Las barras con literales diferentes indican diferencias significativas  $p<0.005$  entre grupos, para una n entre 500 a 850 células/tratamiento.



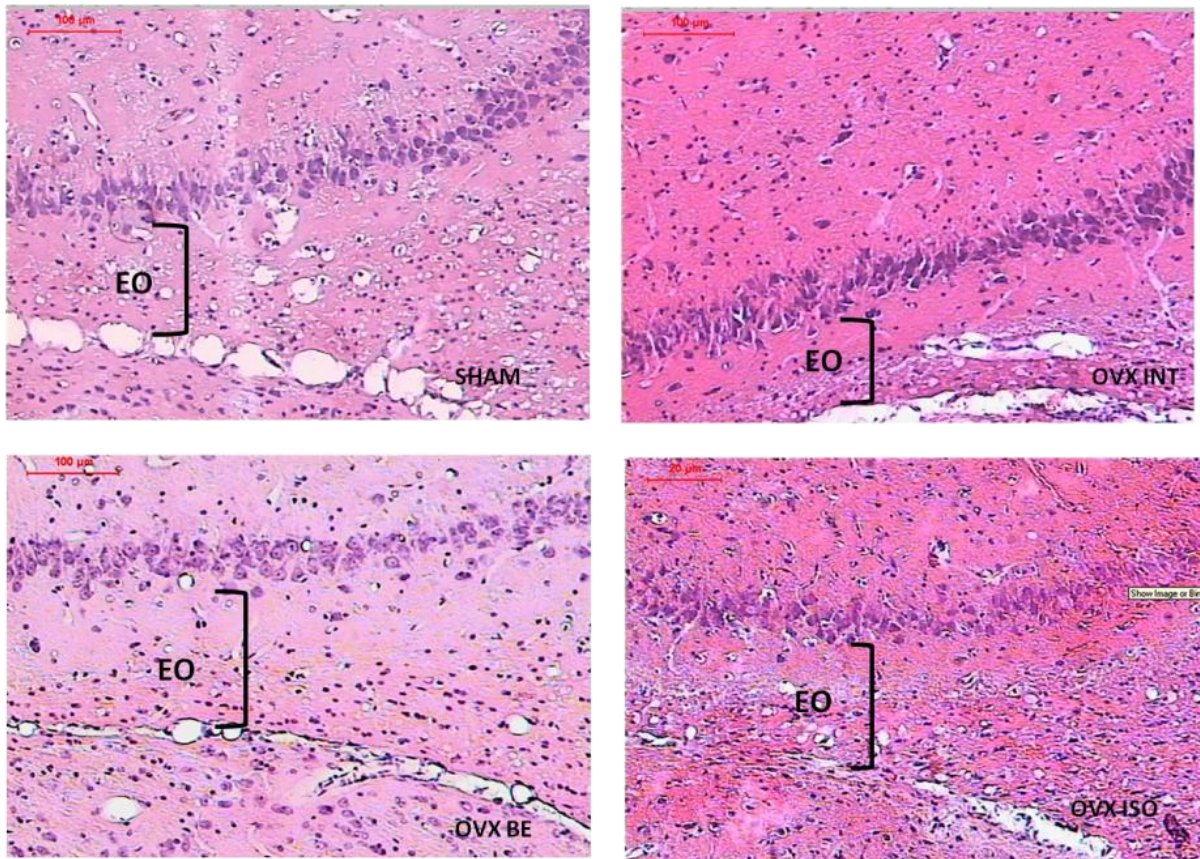
**Figura 13.** Muestra las medias  $\pm$  error estándar de la densidad celular de la región CA3 de hipocampo. La densidad celular fue significativamente mayor en el grupo OVX (10.34 neuronas/0.01 mm<sup>2</sup>) con respecto a los grupos S (7.75 neuronas/0.01 mm<sup>2</sup>), OVX-BE (8.21 neuronas/0.01 mm<sup>2</sup>) y OVX-ISO (6.0 neuronas/0.01 mm<sup>2</sup>). Encontrándose diferencia significativa entre los grupos OVX-BE y el grupo S, con respecto al grupo OVX-ISO. Las barras con literales diferentes indican diferencias significativas a ( $p < 0.05$ ) para una n entre 60 a 90 campos por tratamiento.



**Fig. 14.** Muestra las medias±error estándar del espesor del *SO* de la región CA3 del hipocampo. El grupo OVX-BE mostro el mayor espesor (85.68 µm) que en los otros grupos ( $p < 0.05$ ), siguiendo en orden descendente los grupos S (7.75 µm), OVX-ISO (63.66 µm) y OVX (59.32 µm), para una n entre 60 a 90 cortes por grupo. Las barras con literales diferentes indican diferencias significativas a ( $p < 0.05$ ) para una n entre 60 a 90 cortes por grupo.



**Fig. 15.** Fotomicrografía que muestra el efecto de cada tratamiento sobre la densidad de neuronas por campo. La cuadrícula equivale a  $0.01 \text{ mm}^2$ . La imagen muestra que el grupo OVX-BE un evidente aumento de diámetro nuclear en contraste con los grupos restantes. Las flechas señalan neuronas del estrato piramidal, el ovalo indica la circunferencia del núcleo (Tinción H-E, 40x).



**Fig. 16.** Fotomicrografía que muestra el efecto de cada tratamiento sobre el espesor del (OS de CA3 hipocampal. El grupo OVX-BE muestra un mayor espesor debido al efecto del benzoato de estradiol. La barra negra indica el espesor del (OS) . (Tinción H-E, 10x).



## DISCUSIÓN

### Perfil de flavonoides de los extractos fenólicos

Deberá hacerse notar que los perfiles de flavonoides conjugados presentan en las hojas y raíces de las distintas especies son distintos y difieren de los observados en los que no provienen de semillas germinadas (García *et al.*, 2006; Stobiecki *et al.*, 2010; Siger *et al.*, 2012; Wojakowska *et al.*, 2013).

Los compuestos abundantes en semillas, tal como apigenina 6,8-*di-C*- glucoside-7-*o*.*apioside*, están todavía presentes a etapas tempranas de la germinación y desaparecen completamente en las hojas y raíces de plantas de tres semanas de edad. En contraste con semillas de lupinus europeos (*Lupinus albus*) que contiene 2'-hidrogenisteína y genisteína como agliconas libres (Stobiecki *et al.*, 2010), en los extractos fenólicos de *L. mexicanus*, no fueron detectados flavonoides agliconas libres. Sin embargo, fueron detectadas 2'-hidroxigenisteína y genisteína como agliconas libres en raíces, tallos, hojas e inflorescencias de *Lupinus exaltatus* (García *et al.*, 2006). Como con los flavonoides de lupinos europeos, la malonilación es una importante característica estructural en algunos lupinos mexicanos. En esta observación, genisteína 4'-7-*O*-diglucosido malonilatado ha sido encontrado en raíces, tallos e inflorescencias de *L. exaltatus* y en raíces de *L. reflexus*. También hay otros flavonoides dimalonilatados es estas especies, *i.e.* 2'-hidroxigenisteína y 4' 7-*O*-diglucosido malonilatada (García *et al.*, 2006; Stobiecki *et al.*, 2010) Es importante señalar que cuando se experimentamos con *L. exaltatus* (García *et al.*, 2006), Nosotros no nos dimos cuenta de la existencia de estos compuestos. Sin embargo, posteriormente que determinamos estos compuestos identificados como derivados de la biochanina en *L. reflexus* (Stobiecki *et al.*, 2010) fueron derivados de acetina. Esto fue corregido en una investigación reciente (Wojakowaska *et al.*, 2013).

Es interesante que la genisteína, como aglicona libre, estuvo ausente en los extractos fenólicos de *L. mexicanus*; aunque, es bien conocido que este isoflavonoide es encontrado en pequeñas cantidades en semillas de lupinos comparada con las de soya (Nakamura *et al.*, 2001) Esta aglicona y otros flavonoides encontrados en plantas leguminosas (lupinos, chicharos, fríjoles, trébol, fríjoles mung) poseen actividades estrogénicas y anti-carcinogénicas



y también existen reportes acerca de sus roles en la prevención de enfermedades cardiovasculares y osteoporosis.

## DISCUSION

En el presente estudio, se analizó el efecto de isoflavonas de *Lupinus mexicanus* sobre el desempeño conductual y la capacidad de retención de memoria en ratas, tras la privación de estrógenos endógenos mediante ovariectomía bilateral. Para su evaluación las ratas fueron sometidas a la prueba de laberinto en Y (Arankowsky, 2001), la cual consistió en evaluar la respuesta conductual de los sujetos ante un objeto de novedoso.

Tras el análisis estadístico que evaluo a los grupos experimentales ISO, OVX, BE y S contra el grupo control CTR se encontraron resultados contradictorios; sin embargo, no se evidenció mejoría con respecto a la no intervención.

Respecto al primer objetivo de nuestro estudio que fue evaluar el efecto del extracto fenólico (fitoestrogeno) de lupinus sobre la adquisición de información y consolidación de memoria, se observó que los grupos experimentales ISO, OVX, BE y S manifestaron estrés que presentaron como índice de un alto grado de hiperactividad en las frecuencias de ingresos a los brazos de laberinto en Y. Los animales de estos grupos mostraron conductas anormales estereotípicas como girar en círculos, menear la cabeza, acicalamiento y repeticiones de visitas muy rápidas de los brazos en laberinto en Y. Las posibles causas se deben a la alteración en el exceso de manipulación como tratamiento diario (inyección subcutánea), ovariectomía, lesión cerebral por la toxicidad debido a alta concentración de isoflavonas y respuesta como una amenaza potencial ante un objeto novedoso.

De acuerdo al estudio realizado por Ajdzanovic *et al.*, 2011, reveló que la daidzeína, moduló negativamente las características inmuno-histomorfométricas de las células ACTH productoras de la hormona adrenocorticotropa y que probablemente el estradiol disminuyó la secreción de la hormona y de corticosterona en un modelo de ratas machos andropáusicos que sufrieron estrés y que previamente habían sido sometidos a la orquidectomía y al tratamiento diario de daizeína.

Así mismo, otros estudios mostraron que el efecto del estrés agudo puede interferir sobre la recuperación y extinción de la memoria espacial lo que coincide con Ragozzino en 1996, que refiere que lesiones en el hipocampo por estrés de ratas les dificulta la capacidad de alternar. Arankowsky en el año 2002 coincide en que esta capacidad de alternancia disminuye por factores como: estrés y vejez. Lo cual hace a las ratas incapaces de tener resultado positivos en el Laberinto en Y.

En el estudio donde los animales fueron sometidos a restricción del movimiento durante una hora, los resultados indicaron que el estrés deteriora el proceso de memoria espacial ya que observaron que cometieron mayores números de errores en el proceso de exploración de los agujeros en el laberinto de Barnes (Troncoso *et al.*, 2009).

Es de considerarse la actividad prooxidante de los flavonoides. Ya que la ejercen a través de mecanismos que incluyen la reducción temporal de Cu (II) a Cu (I), la generación de especies reactivas al oxígeno (ERO), así como la afectación de las funciones de los componentes del Sistema de defensa antioxidante nuclear: glutatión y glutatión S transferasa (Perez-Trueba, 2003).

Aunque Martínez-Flores, en el 2002, refiere que solo a dosis elevadas los flavonoides ejercen efectos prooxidantes. Perez-Trueba, en el 2003 señala los mecanismos prooxidantes, entre los que se incluyen la reducción temporal de Cu (II) a Cu (I), la generación de especies reactivas al oxígeno (ERO), así como la afectación de las funciones de los componentes del Sistema de defensa antioxidante nuclear: glutatión y glutatión S transferasa (Perez-Trueba, 2003).

En estudios realizados por Choi y Lee en el año 2004, evaluaron que en el tratamiento crónico a dosis elevadas de genisteína en ratas, se incremento la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), y observaron pérdida de la función de las mitocondrias en el tejido homogenizado cerebral de las ratas.

De misma forma, la elevada concentración de genisteína y dadzeína son toxicos en el cultivo primario de ratas. El tratamiento de neuronas (cultivo) con 50 µg de genisteína y

daidzeína durante 24 hrs, incremento el nivel de la liberación de LDH (deshidrogenasa lactate) en 90% y 67% respectivamente con daño celular significativo (Jin *et al.*, 2007).

## **Discusión.**

### **Hallazgos histológicos.**

Es este estudio, fue evidente que el tratamiento con extracto fenólico tuvo un efecto no favorable en neuronas de la región CA3 del hipocampo las cuales fueron en tamaño las más pequeñas y mostraron signos de neurodegeneración (un gran número de neuronas encogidas con núcleos picnoticos). Sin embargo, las condiciones estresantes del procedimiento quirúrgico y la manipulación de los animales (El tratamiento y manejo diario) durante el experimento deberán ser consideradas.

La densidad de neuronas hipocampales de la región CA3 fue diferente en los grupos experimentales: el grupo (S) muestra las neuronas de mayor tamaño y con densidad celular alta, el grupo OVX mostro la densidad celular más alta de todos los grupos, aunque con neuronas de menor tamaño, en el grupo BE las neuronas fueron las de mayor tamaño pero de menor densidad que las del grupo OVX en relación a los demás grupos y con características morfológicas normales, no así en el grupo ISO que mostro densidad y tamaño celular reducido con eosinofilia intensa acompañada de picnosis Fig. 11.

Por el contrario, el tratamiento BE mostro un efecto benéfico sobre las neuronas de la región CA3, las cuales mostraron un diámetro nuclear incrementado debido a una mejoría directa de la actividad de las neuronas (Srebro *et al.*, 1988) Fig. 15. El espesor del SO, también fue más grande, lo cual esta directamente relacionado al crecimiento dendrítico (Woolley and McEwen, 1994) Fig.16. Estos parámetros son indicativos de un efecto neurotrófico del benzoato de estradiol BE sobre las neuronas del hipocampo (McEwen, 2002). Así el efecto negativo anticipado de la ausencia de esteroides después de la ovariectomía fue sustituido por la administración. Los efectos negativos obtenidos con el tratamiento de extracto fenólico (OVX-ISO) podría ser explicado por la estructura química de sus flavonoides (glucoconjugados), y su administración subcutánea.

Es bien conocido que los fitoestrógenos deberán someterse a una transformación

química para obtener alta actividad estrogénica, lo que sucede después de la administración oral de fitoestrógenos (Casanova *et al.*, 1999 Murkies *et al.*, 1998). Por lo tanto, es posible que después de la administración subcutánea del extracto fenólico (ISO) no ocurrió transformación química o buena absorción. Adicionalmente ha sido demostrado que los flavonoides como la genisteína y la daidzeína tiene muy baja afinidad para los receptores en el cerebro y útero que los estrógenos endógenos y el 17 $\beta$  estradiol (Wink, 2005). En el presente estudio, fue evidente que el tratamiento con extracto fenólico (ISO) no fue capaz de proteger las neuronas de la región CA3, después de la ovariectomía como lo fue el tratamiento con Benzoato de estradiol (BE) como podían los estrógenos endógenos.

## CONCLUSIONES

1. La determinación cromatográfica del extracto purificado de flavonoides de semilla germinadas de *L. mexicanus* mostro 10 compuestos flavonoides, de los cuales cinco de ellos se identificaron como isoflavonoides del tipo genisteína glucosilada.
2. La prueba conductual en el laberinto en Y mostro el desarrollo de hiperactividad en todos los grupos de animales, con excepción del grupo control no manipulado. Este resultado sugiere que el manejo continuo de los animales provoco estrés, que se evidencio por el mayor número de ingresos a los brazos del laberinto y menor tiempo de permanencia en los mismos.
3. El análisis histológico de hipocampo evidencio que la administración subcutánea del extracto purificado de flavonoides de *L. mexicanus* en ratas ovariectomizadas no presento efectos sobre los parámetros morfométricos de espesor del OS, diámetro nuclear y en la densidad celular de la región CA3 del hipocampo.

## PERSPECTIVAS

Sin embargo, nos permitió comprobar que la dosificación del benzoato de estradiol si tuvo efectos positivos en las células neuronales. Este trabajo nos tiene un avance substancial en relación a la utilización de estos metabolitos encontrados, ya que no existen estudios relativos a estos y su efecto biológico.

Pero estos hallazgos en esta planta *Lupinus mexicanus* nativa del Occidente de la República mexicana, permitirá ampliar las expectativas para en el futuro cercano se hagan extractos más purificados con las propiedades estrogénicas no esteroideas que pudieran ser utilizadas tal como los isoflavonoides de la soya.

## LITERATURA CITADA.

Adams, M.M., Shah A.R., Janssen W.G.M., and Morrison H.J. (2001). Different modes of hippocampal plasticity in response to estrogen in young and aged female rats. PNAS vol. 98 No. 14 8071-8076

Ajdzanovic V.Z., Sosic-Jurjevic B.T., Filipović B.R., Trifunovic S.L., Milosevic V.L. (2011). Daidzein effects on ACTH cells: immunohistomorphometric and hormonal study in an animal model of the andropause. *Histol. Histopathol.* 10, 1257-64

Aluja A.S. (2002). Animales de laboratorio y la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). *Gac Méd Méx.* 138 (3): 295-8.

Amaral D.G. and Witter M.P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*; 31 (3): 571-591.

Andersen P. Morris R. Amaral D. Bliss T. and O'keefe (2007). *The Hippocampus Book*. Oxford University Press pp 83-91 ISBN 13:9780195100273.

Aoki T., Akashi T., and Ayabe S. (2000). Flavonoids of Leguminous Plants: Structure, Biological Activity, and Biosynthesis. *J. Plant Res.* 85, 47-51.

Aranda A. and Pascual A. (2001). Nuclear hormone receptors and gene expresión. *Physiol Rev* 81 1269-1340.

Arankowsky-Sandoval G. y Solis Rodriguez F. (2001). Alternancia Espontánea. *CIR-Biomédicas Universidad Autónoma de Yucatán*.

Arjmandi B.H. (2001). Review: The role of phytoestrogens in the prevention and treatment of osteoporosis in ovarian hormone deficiency. *Journal of the American College of Nutrition*, Vol. 20 (5): pp. 398S-402S

Azcoitia I., Moreno A., Carrero P., Palacios S, and García-Segura L.M. (2006). Neuroprotective effects of soy phytoestrogens in the rat brain. *Gynecol Endocrinol.* 22 (2): 63-69.

Balderas I., Ramírez-Amaya V. and Bermúdez-Rattoni F. (2004). MEMORY-LINKED MORPHOLOGICAL CHANGES (Cambios morfológicos asociados a la memoria). *REV NEUROL*; 38, (10) Pags. 944-948.

Bañuelos-Pineda J. Jiménez Vallejo S. 2006 La importancia y el estado actual del género *Lupinus*. *Lupinos del Occidente de México* Colección Fomento de la producción académica de profesores con perfil PROMEP. Universidad de Guadalajara. Capítulo 1. Págs. 13-31.

Bats S., Thomas J.L., Lordi B., Tonon M.C., Lalonde R., Caston, J. (2001). The effects of a mild stressor on spontaneous alternations in mice. *Behav Brain Res* Vol. 118, Págs. 11-15.

Bednarek P., Frański R., Kerhoas L., Einhorn J., Wojtaszek P., Stobiecki M. (2001). Profiling changes in metabolism of isoflavonoids and their conjugates in *Lupinus* Cees G.B., Udo A., Brinkman Th. (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids *Journal of Chromatography A*, 1112, 31–63.

Bernal-Alcocer A., Zamora-Natera J.F., Virgen-Calleros G., Nuño-Romero R. (2005) *In vitro* biological activity of extracts of *Lupinus spp.* on phytopathogenic fungi. *Revista Mexicana de Fitopatología* Vol. 23 No. 2 140-146 ISSN 0185-3309.

Beyer C. (1999). Estrogen and developing mammalian brain. *Anat Embryol*, 199 pp 379 – 390.

Brzezinski A., and Debi A. (1999). Phytoestrogens: the “natural” selective estrogen receptor modulators? *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 85, 47-51.

Burke GL, Vitolins MZ, Bland D. 2000 Soybean isoflavones as an alternative to traditional hormone replacement therapy: are we there yet? *J. Nutr.* 130: 664S-5S.

Cabello I.R., Padilla-Gómez E., Aguilar-Vázquez, A. y Díaz-Miranda, S.Y. (2010). Efecto de la suplementación con 17 $\beta$ -estradiol en la inmunoreactividad de astrocitos en giro dentado y *Stratum lucidum* del área CA3 del hipocampo dorsal de la rata. 12 Verano de la Ciencia Universidad Autónoma de Aguascalientes, México.

Calderón G. y Rzedowski J. (2005). FLORA DEL BAJÍO Y DE REGIONES ADYACENTES. Instituto de Ecología, A.C. Centro Regional del Bajío. Fascículo 135. [www1.inecol.edu.mx/publicaciones/.../Flora%20135-Rosaceae.pdf](http://www1.inecol.edu.mx/publicaciones/.../Flora%20135-Rosaceae.pdf).

Carlaya O. and Ives R. (2001). Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultivos tropicales* Vol. 22 No. 2 Págs. 5 – 14.

Casanova M., You L., Gaido K.W., Archibeque-Engle S., Janszen D.B. and Heck H.A. (1999). Developmental effects of dietary phytoestrogens in Sprague-Dawley rats and



interactions of genistein and daidzein with rat estrogen receptors alpha and beta in vitro. *Toxicol. Sci.* 51, 236-244.

Choi E.J. and Lee B.H. (2004). Evidence for genistein mediated cytotoxicity and apoptosis in rat brain *Life Sciences.* 75, 499-509.

Cline J.M., Franke A.A., Register T.C., Golden D.L. and Adams M.R. (2004). Effects of dietary isoflavone aglycones on the reproductive tract of male and female mice. *Toxicol. Pathol.* 32, 91-99.

CONAPO (2004). Día mundial del adulto mayor, Comunicado de prensa 43/04 27 de agosto del 2004 SEGOB (Secretaría de Gobernación).

Couse J.F. and Korach K.S. (1999). Estrogen receptor null mice: What have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev* 20: 358-417.

Daniel J.M., Fader A.J., Spencer A.L., Dohanich G.P. (1997). Estrogens enhances performance of female rats during acquisition of a radial arm maze. *Horm Behav.* 32: 217-225.

De Felipe M.R. (2006). El lupino en la Agricultura Sostenible y el Medio Ambiente. *En Revista Schironia* No. 5, pp 32-40.

Dingledine R., Borges K., Bowie D., Traynelis S.F. (1999). “The glutamate receptor ion channels” *Pharmacol Rev.* 51 (1): 7 – 61

Dixon A.R. (2004). PHYTOESTROGENS *Annu. Rev. Plant Biol.* 2004. Vol. 55: 225–26.

Dixon A.R. and Sumner L.W. (2003). Legume natural products: Understanding and manipulating complex pathways for human and animal health. *Plant Physiology*, Vol. 131. Págs. 878-885.

Dixon R.A. y Ferreira D. (2002) Molecules of interest: genistein. *Phytochemistry* Vol. 60: Pages 211 - 205.

Dolorfo C.L. and Amaral D.G. (1998). Entorhinal cortex of the rat: Topographic organization of the cells of origin of the perforant path projection to the dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 398, 25-48.

Domínguez-Escriba L. (2010). EFECTOS DE LA COCAÍNA Y DEL TOLUENO SOBRE LA NEUROGÉNESIS EN EL HIPOCAMPO DE LA RATA. Tesis doctoral Facultad de Biología Universidad de Valencia. Valencia España.

Duvernoy Henri M. (2005). The Human Hippocampus: Functional Anatomy, Vascularization and Serial Sections with MRI. Springer. Third Edition. ISBN 3-540-23191-9 Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2005 Printed Germany Chapter 3. Pages 6-7.

Fei L. and Tsien Z. (2009) Clinical Implications of Basic Research: Memory and the NMDA receptors, *J. Med*, 361: 302.

Filardo E.J., Graeber, C.T., Quinn J.A.; Resnick M.B.; Giri D., Delellis R.A., Steinhoff M.M., Sabo, E. (2006). Distribution of GPR30, a seven membrane-spanning estrogen receptor, in primary breast cancer and this association with clinicopathologic determinants of tumor progression. *Clin Cancer Res*. 12: 6359-6366.

Fink G., (1986). *Sci Prog*.70, 403-423. In Adams *et al.*, 2001 Different modes of hippocampal plasticity in response to estrogen in young and aged female rats. *PNAS* vol. 98 No. 14 8071-8076.

Florian, C., and Rouillet P., (2004). Hippocampal CA3-region is crucial for acquisition and memory consolidation in Morris water maze task in mice. *Behavioural Brain Research*. 154 365-374

Fournier L.R.; Ryan-Borchers, T.A., Robinson, L.M., Wiediger M., Park J.S., Chew B.P., McGuire, M.K., Sclar D.A., Skaer T.L. and Berman, K.A. (2007). The effects of soy milk and isoflavone supplements on cognitive performance in healthy, postmenopausal women. *Journal of Nutrition Health & Aging*, 11(2): pp. 155-164.

Frański R., Bednarek, P., Wojtaszek P., and Stobiecki M. (1999). Identification of flavonoid diglycosides I yellow lupin. (*Lupinus luteus* L.) with mass spectrometric techniques. *Spectrometry*. Volume 34, Issue 5 486-495. DOI: 10.1002. (SICI) 1096-9888 (199905) 34:5 <486::AID-JMS789>3.0. CO;2.

Frick K.M., Burlingame L.A., Arters J.A., Berger-Sweeney J. (2000). Reference memory, anxiety and estrous cyclicity in C57BL/6NIA mice are affected by age and sex. *Neuroscience*. 95: 293-307.

García-López P.M. y Ruiz-López M. (2006). Los aspectos químicos y nutricionales de lupinus silvestres. Lupinos del Occidente de México Colección Fomento de la producción académica de profesores con perfil PROMEP. Universidad de Guadalajara. Capítulo 3. Págs. 53-74.

García-López P.M., Kachlicki P., Zamora N.F., Ruiz M.J. and Stobiecki M. (2006). Profiling isoflavona conjugates in different organs of *Lupinus exaltatus* Zucc. *Phytochemical. Anal.* 17: 184-191.

García-López P.M., Muzquiz M., Ruiz-López M.A., Zamora-Natera J.F., Burbano C., Pedrosa M.M., Cuadrado C., Garzón-De la Mora P. (2001). Chemical Composition and Fatty Acid Profile of Several Mexican Wild Lupins, *Journal of Food Composition and Analysis*, Volume 14, Number 6, pp. 645-651.

García-Mateos R. y Pérez-Leal R. (2003). Fitoalexinas: mecanismo de defensa de las plantas. *Rev. Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente*, Vol. 9 (1) pp. 5-10

García-Solís P. y Aceves, C. (2005). Estudio de factores nutricionales asociados a la prevención de cáncer mamario. Importancia de los modelos animales. (ALAN) *Archv Lat de Nutr.* Vol. 5 No. 3 [http://www.alanrevista.org/ediciones/2005-3/factores\\_nutricionales\\_prevenccion\\_cancer\\_mamario.asp](http://www.alanrevista.org/ediciones/2005-3/factores_nutricionales_prevenccion_cancer_mamario.asp) ISSN 0004-0622.

Genazzani A.R., Somaagens N., Morittu A., Bernardi F., Monteleone P., Casarosa E., Gallo R. and Luisi, M. (2000). Progesterone, progestagens and the central nervous system. *Human Reproduction*, Vol. 15, (Suppl.1) Pags. 14-27. [http://humrep.oxfordjournals.org/content/15/suppl\\_1/14.full.pdf?origin=publication\\_detail](http://humrep.oxfordjournals.org/content/15/suppl_1/14.full.pdf?origin=publication_detail).

Genazzi A., Gambacciani M., and Simoncini T. (2003). Hormone replacement therapy in climateric and aging brain. *Climateric.* 6: 188-2003.

Gilbert E.P., and Kesner P.R. (2006). The role of the dorsal CA3 hippocampal subregion in spatial working and pattern separation. *Behavioural Brain Research*, Volume 169 Issue 1 Pages 142-149.

Gleason C.E., Cholerton B., Carlsson C.M., Johnson S.C. and Asthana S. (2005). Neuroprotective effects of female sex steroids in humans: current controversies and future directions. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 299-312.

Gulewicz Krzysztof and Pilarski R. (2006). Biological Activity of  $\alpha$  Galactosides from Lupin and other legumes. Where Old and New World Meet. Eleventh International Lupin Conference. Guadalajara, Jalisco México. In E. van Santen and Hill G.D. (eds) ISBN 0-86476-165-1

Guyton C.A. and Hall E.J. (2006). Fisiología Médica 11<sup>a</sup> Edición, editorial Elsevier Saunders, Madrid España Págs 731-738. ISBN 978-84-8174-926-7.

Harborne J.B. (1994). Introduction to Ecological Biochemistry. 4th ed. Academic Press. London.

Harborne J.B. (1997). Introduction to ECOLOGICAL BIOCHEMISTRY. Fourth Edition. Academic Press ISBN 0 - 12-324686-5 Great Britain Págs 108 -109.

Harborne J.B. and Williams C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. Phytochemistry. 55, 481-504.

Haya J., Castelo-Branco C. y Pérez-Medina, T. (2002). Phytoestrogens: basic knowledge and clinical utility. Toko-Gin Pract, Vol. 61 (6), 337-363.

Henderson V. (2002). Estrogen Therapy and the Brain Menopause: Biology and Pathology Chapter 21: 315-325 (SIIC) Sociedad Iberoamericana de Información Científica.

<http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/ccpv/cpv2010/Default.aspx>

Hu J.Y., Aizawa, T. (2003). Quantitative structure-activity relationships for estrogen receptor binding affinity of phenolic chemicals. Water Res Vol. 37 Págs. 1213- 1222

Hua-Wei L., Shui-Feng Q., Jia Sh., Li-Na S., Ying-Ye W., Lain C.B., Quiang, X. (2008). Genistein attenuates oxidative stress and neuronal damage following transient global cerebral ischemia in rat hippocampus. Neuroscience Letters Volume 438. Issue 1. Pages 116-120.

Hughes R.N. (2004). The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory Neurosci and Biobehav Rev. 28 Págs. 497-505.

Hwang I.K., Lee Y.B., Yoo K.Y., Kang T.C., Lim S.S., Kim S.M., Sohn H.S., Kim W.J., Shin H.K., Won M.H. (2006). Soy bean isoflavones alter parvalbumin in hippocampus of mid-aged

normal female, ovariectomized female, and normal male rats. *Acta Pharmacol Sin.* 27 (1):59-65.

INBIOMED (2011). Banco de imagenes Visitado 06 de julio del 2011 [http://www.imbiomed.com/1/1/banco.php?method=showClasificaciones&pathUser=12%7CNeurolog%EDa%3E13%7CHistopatolog%EDa&id\\_clas=13](http://www.imbiomed.com/1/1/banco.php?method=showClasificaciones&pathUser=12%7CNeurolog%EDa%3E13%7CHistopatolog%EDa&id_clas=13).

INEGI (2010) Censo de Población y Vivienda.

Iniesta I. (2012). Sobre el origen del Cuerno de Amón\* Apunte histórico. *NEUROLOGÍA*. Press. Doi: 10.1016/j.nrl.2012.03.015.

Jhamandas J.H., Cho C., Jassar B., Harris K., MacTavish D. and Easaw J. (2001). Cellular mechanisms for amyloid beta-protein activation of rat cholinergic basal forebrain neurons. *J. Neurophysiol.* 86, 1312-1320.

Jin Y., Wu H., Cohen E.M., Wei J., Prentice H. Wu J.Y. Genistein and daidzein induce neurotoxicity at high concentrations in primary rat neuronal cultures. *J. Biomed Sci.* 14, (2): 275-284

Kachlicki P., Marczak L., Kerhoas L., Einhorn J. and Stobiecki M. (2005). Profiling isoflavone conjugates in root extracts of lupine species with LC/ESI/MSn systems. *J. Mass Spectrom.* 40, 1008-1103.

*Katagiri Y., Ibrahim R.K. and Tahara S. (2000). HPLC, analysis of white lupin. Biosci Biotechnol Biochem. Vol. 64 1118*

Katzenellenbogen B.S., Choi I., Delague-mourroux R., Ediger T.R., Martini P.G.V., Montano M., Sun J., Weis, K. (2000) Molecular mechanism of estrogen action: selective ligands receptor pharmacology. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 74 279-285.

Kaufman P.B., Duke J.A., Brielmann H., Boik J., Hoyt J.E. (1997). "A comparative survey of leguminous plants as sources of the isoflavones genistein and daidzein: Implications for human nutrition and health" *J Altern Compl Med* 3:7-12

Krishnan V., Health H., and Bryant U.H. (2001). Mechanism of action of estrogen and selective estrogen receptors modulators. *Vitam and Horm* 1, 123-147.

- Kuiper G.G., Carlsson B., Gradien K., Enmark E., Haggblad J., Nilsson S. and Gustafsson J.A. (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138, 863-870.
- Kuiper G.G., Enmark E., Peltö-Huikko M., Nilsson S., Gustafsson J. A. (1996). Cloning of novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93, 5925-5930.
- Kuiper G.J.M., Lemmen G. J., Carlsson B., Corton J.C., Safe H.S., Safe Van Der P.T., Burg Van Der B. and Gustafsson J. A. (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor  $\beta$ . *Endocr Vol.* 139, No. 10 pp 4252 – 4263.
- Kurlovich B.S., Stankevich A.K. (2006). Classification of Lupins 38–81. In Kurlovich BS. (Ed) *Lupins: Geography, Classifications, Genetic Resources and Breeding*. Editorial OY International North Express. St Petersburg, Russia- Pellosoiniemi, Finland, 486 p.
- Lalonde R. (2002). The neurobiological basis of spontaneous alternation. *Neurosci and Biobehav Rev.* 26 Págs. 91-104.
- Lephart D.E., West W.T., K. Scott Weber., Reuben W., Rhee Kenneth., D.R. Satchell., Herman Adlercreutz. and Trent D. Lund. (2002). Neurobehavioral effects of dietary soy phytoestrogens *Neurotoxicology and Teratology* Volume 24, Issue 1, 5-16
- Lephart ED, Galindo E, Bu LH. 2003 Stress (hypothalamic-pituitary-adrenal axis) and pain response in male rats exposed lifelong to high vs. low phytoestrogen diets. *Neurosci Lett.* 15; 342 (1-2):65-68.
- Lien L.L., Lien E.J. (1996). Hormone therapy and phytoestrogens. *J. Clin. Pharm Ther*; 21 (2): 101-11.
- Luebke J., Barbas H. and Peters, A. (2010). Effects of normal aging on prefrontal area 46 in the rhesus monkey. *Brain Research Reviews* Vol. 62 Issue 2, Págs. 212-232.
- Luine V.N., Atalla S., Mohan G., Costa A., Frankfurt, M. (2008). Dietary phytoestrogens enhance spatial memory and spine density in the hippocampus and prefrontal cortex of ovariectomized rats. *Short Communications. Brain Research.* 1126. 183-187.

Luine V.N., Richards S.T., Wu V.Y., Beck K.D. (1998). Estradiol enhances learning and memory in a spatial memory task and effects levels of monoaminergic neurotransmitters. *Hom and Behav.* 34: 149-162.

Lund T.D., West T.W., Tian L.Y., Bu L.H., Simmons D.L., Setchell K.D., Adlercreutz H., Lephart E.D. (2001). Visual spatial memory is enhanced in female (but inhibited in males) by dietary soy phytoestrogens. *BMC (BioMed Central) Neuroscience* 2:20.

Mackey R., Eden J. (1998). Phytoestrogens and menopause. *Climateric*, 1: 302-308.

*Maher P., Tatsuhiro A. and Kazuho A. (2006). Flavonoid fisetin promotes ERK-dependent long-term potentiation and enhances memory. PNAS, Vol. 103, No. 44 Pags. 16568-16573.*

María-Angeles A., Santos-Galindo M., Maria-José B., Azcoitia, I., García-Segura, L.M. (2010). Review. Actions of estrogens on glial cells: Implications for neuroprotection *Biochimica et Biophysica Acta* 1800 1106-1112.

Maroulis G.B. (2000). Alternatives to estrogen replacement therapy. *Ann. N. Acad Sci*, 900: 413-5.

Marriott L.K., and Korol D.L. (2003). Acetylcholine: Cognitive and Brain Functions. Short-term estrogen treatment in ovariectomized rats augments hippocampal acetylcholine release during place learning. *Neurobiology of Learning and Memory*. Vol. 80 Issue 3 pp. 315 – 322.

Martínez-Flores S., Gonnzález-Gallego J., Culebras J.M. y Tuñón M<sup>a</sup>.J. (2002). Los Flavonoides: propiedades y acciones antioxidants. *Nutr.Hosp.* XVII 6, 271-278.

McEwen B.S. (2002). Estrogen actions throughtout the brain. *Recent. Prog. Horm.* 57, 357-384.

McEwen B.S. and Alves S.E. (1999). Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr. Rev.* 20, 279-307.

Monteiro S.C., De Mattos C.B., Ben J., Netto C.A. and Wyse A.T.S. (2008). Ovariectomy impairs spatial memory: prevention and reversal by a soy isoflavone diet. *Metab. Brain .Dis.* 23, 243-43.

Morán P., Garrido P., Alonso A., Cabello E., González C. (2013). 17 $\beta$ - Estradiol and genistein acute treatments improve some cerebral cortex homeostasis aspects deteriorated by aging in female rats. *Experimental Gerontology* 48 414-421.

Morrison H.J., Brinton D.R., Schmidt, J.P. and Gore C.A. (2006). Estrogen, Menopause, and the Aging Brain: How Basic Neuroscience Can Inform Hormone Therapy in Women. *The Journal of Neuroscience*. Symposium October 11, 26 (41): 10332 – 10348.

Mural (2013). Periódico sección Nacional pag. 8 12 julio 2013.

Murkies A.L., Wilcox G., Davis S.R. (1998). Clinical review. 92: Phytoestrogens. *J. Clin Endocrinol Metab.* 83 (2) 297-303.

Nakamura A., Furuta H., Maeda H., Nagamatsu Y. and Yoshimoto A. (2001). Analysis of structural components and molecular construction of soybean soluble polysaccharides by stepwise enzymatic degradation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65, 2249-2258.

Nicolas R., Morris P. and Webb K. J. (2005). Phenolic compounds: extraction and analysis. In: *Lotus japonicus Handbook*. Márquez A.J. (ed) Springer. Germany. Pp 349-355.

Nilsson S., Mäkela S., Treuter E., Tjuange M., Thomsen J., Anderson G. (2001). Mechanism of estrogen action *Physiol Rev* 81, 1535-1565.

NOM-062-ZOO-1999 Academia Nacional de Medicina de México (2002). Animales de laboratorio y la Norma oficial Mexicana *Gaceta de México Gac Med Mex*, Vol. 138 No. 3 Págs. 295-298.

*O’Kane G., Kensinger E.A., Corkin S. (2004). Evidence for semantic learning in profound amnesia: An investigation with patient H. M. Hippocampus 14 (4): 417-425. PMID 15224979.*

*O’Neil M.F., Means L.V., Poole M.C., and Hamn R.J. (1996). Estrogen affects performance of ovariectomized rats in two-choice water-escape working memory task. Psychoneuroendocrinology 21, 51-65.*

Ojeda-Sahagún J.L., Icardo de la Escalera, J.M. (2004). *Neuroanatomía Humana Aspectos funcionales y clínicos*. Editorial Masson. Barcelona, España ISBN: 84-458-1408-7.

Palmieri C., Cheng G.J., Saji S., Zelada-Hedman M., Warri A., Weiu Z. (2002). Estrogen receptor beta in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 9 1-13.

Pan Y., Anthony M. and Clarkson T. B. (1999). Evidence for up-regulation of brain- derived neurotrophic factor mRNA by soy phytoestrogens in the frontal cortex of retired breeder female rats. *Neurosci. Lett.* 261, 17-20.



Pérez-Trueba G. (2003). LOS FLAVONOIDES: ANTIOXIDANTES O PROOXIDANTES. *Rev Cubana Invest Biomed.* 22 (1), 48-57.

Preedy R.V. (2013) *Isoflavones: Chemistry, Analysis, Function and Effects*. RSC Publishing, Royal Society of Chemistry. ISBN 978-1-84973-419-6 DOI : 10.1039/9781849735094.

Ragozzino M.E., Unick K.E., Gold P.E. (1996). Hippocampal acetylcholine release during memory testing in rats: augmentation by glucose. *Proc Natl Acad. Sci. USA* Vol. 93, Págs. 4693-4698.

Rodney J.B. 2013 *Phytoestrogens in Health: The role of Isoflavones*. Chapter *In* Preedy R.V. (2013) *Isoflavones: Chemistry, Analysis, Function and Effects*. RSC Publishing, Royal Society of Chemistry. ISBN 978-1-84973-419-6 DOI : 10.1039/9781849735094.

Rolls E.T. and Treves A. (1998). *Neural networks and brain function*. Oxford University Press. Oxford, UK. Pp 1-428.

Romero R. (2005). Actividad biológica *in vitro* de extractos de *Lupinus, spp.* sobre hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, Vol. 23(1) pp. 140-146.

Roof R.L., Hall E.D. (2000). Gender differences in acute CNS trauma and stroke: neuroprotective effects of estrogen and progesterone. *J. Neurotrauma*, 17: 367-388.

Ruiz-Moreno J.J. y Zamora-Natera J.F. (2006). Distribución de algunos lupinos silvestres en la zona occidente de México Págs. 33-52. *Lupinos del Occidente de México: Estudios biológico, bioquímico y toxicológico*, Colección Fomento de la producción académica de profesores con perfil PROMEP. Universidad de Guadalajara.

Sarkaki A., Amani R., Badavi M., Safahani M., and Aligholi, H. (2008). Effect of Ovariectomy on Reference Memory Version of Morris Water in Young Adult Rats. *J Irian Biomed* Vol. 12 No. 2, Págs 123-128.

Scott M.B. and Zsarnovszky A. (2001). Estrogenic Actions in the Brain: Estrogen, Phytoestrogens, and Rapid Intracellular Signaling Mechanisms. *Pharmacology and Experimental therapeutics*, Vol. 299, Issue 2, 408- 414.

Scott S.K., Blank C.C., Rosen S. and Wise R.J.S. (2000). Identification of a pathway for intelligible speech in the left temporal lobe. *Brain* Vol. 123 No. 12 2400-2406.

Senechal Y., Kelly P.H., Cryan J.F., Natt F., Dev K.K. (2007). Amyloid precursor protein Knockdown by siRNA impairs spontaneous alternation in adult mice. *J Neurochem* Vol. 102, Págs. 1928-1940.

Setchell K.D.R. and Cassidy, A. (1999). Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *J Nutr* 129: 129 (3): Págs. 758 – 767.

Siger A., Czubinski J., Kachlicki P., Dwiecki k., Lampart-Dzczapa E., Algorzata Nogala-Kalucka M. (2012). Antioxidant activity and phenolic content in three lupin species. *J. Food Comp. Anal.* 25, 190-197.

Squire L.R., and Cave C.B. (1991). The hippocampus, memory, and space. *Hippocampus* 1 (3), 269 – 271.

Srebro Z., Lach H. and Plackowoska M. (1988). A parametric study of the supraoptic and paraventricular nuclei of the hypothalamus of kainic acid treated mice. *Folia Biol.* 36, 53-58.

Stobiecki M. and Kachlicki (2006). Isolation and Identification of Flavonoids *In The Science of Flavonoids* de Grotewold Erich Springer Science + Business Media, Inc. USA. pp 47 – 69 ISBN-13: 978-0387-28821.

Stobiecki M., Malosse Ch., Kerhoas, L., Wojlaszek P. and Einhorn J. (1999). Detection of isoflavonoids and their glycosides by Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Mass Spectrometry in root extracts of Lupin (*Lupinus albus*). *Phytochem Anal.* 10: pp 198-207.

Stobiecki M., Staszów A., Piasecka A., García L.P.M., Zamora N.F. and Kachlicki P. (2010). LC-MSMS Profiling Conjugates in Wild Mexican Lupine, *Lupinus reflexus* (2010) *J. Nat. Prod.* 23; 73 (7: 1254-1260.

Stobiecki M., Wojtaszek P. and Gulewicz K. (1997). Application of Phase Extraction for Profiling Quinolizidine Alkaloids and Phenolic Compounds in *Lupinus albus*. *Physic. Anal.* 8 pp 153 – 158.

Stupien G., Florian C. and Rouillet P. (2003). Involvement of the hippocampal CA3-region in acquisition and in memory consolidation of spatial but not in objet information in mice. *Neurobiology of Learning and Memory.* Volume 80, Issue 1, Pages 32-41.

*Subramanian S., Stacey G. and Yu, O. (2007). Distinc, crucial roles of flavonoids during legume nodulation. Trends Plant Sci. Vol. 12 282.*

Sughrue P.J. Merchenthaler I. (2000) Estrogen is more than a “sex hormone”: novel sites for estrogens action in hippocampus and cerebral cortex. *Front Neuroendocrinol.* 21, 95-101.

Sumien N., Chaudhari K., Sidhu A., Forster M.J. (2013). Does phytoestrogen supplementation affect cognition differentially in males and females? *Brain Research Volume 1514 Pages 123-127.*

Surinder CH., Atsuchi H., Jayanand B., and Shigeru II. (2006). Flavonoid pigments as tools in molecular. Chapter 6. *In The Science of Flavonoids de Grotewold Erich Springer Science + Business Media, Inc. USA. pp Pags. 147-173 ISBN-13: 978-0387-28821.*

Toran-Allerand C.D., Singh M., and Setalo G.J. (1999). Novel mechanism of estrogen action in the brain: new players in an old story. *Front Neuroendocrinol, Vol. 20 pp. 97-121.*

Treves A. and Rolls E.T. (1992). Computational constraints suggest the need for two distinct inputs systems to the hippocampal CA3 network. *Hippocampus 2.* 189-200.

Troncoso J., La/mprea M., Cuestas D.M. y Múnera A. (2009). EL ESTRÉS AGUDO INTERFIERE CON LA EVOCACIÓN Y PROMUEVE LA EXTINCIÓN DE LA MEMORÍA ESPACIAL EN EL LABERINTO DE BARNES. *OPEN JOURNAL SYSTEMS, ISSN: 0120-548x (impreso) ISSN 1900-1649 (en línea) indexada en LILACS, CABI: Biological Abstracts Biosis; Latindex; Periódica; UrlishWeb. Universidad Nacional de Colombia.*

Trullier O. and Arcady M.J. (1997). Biomimetic navigation models and strategies in animals. *AI Communications, Vol. 10 Issue, 2 pp 79 – 92 en Tesis doctoral Olvera-Cortés M. E. Estudio experimental sobre la modulación serotoninérgica del ritmo theta hipocampal durante el curso temporal del aprendizaje espacial. Instituto de Neurociencias Universidad de Guadalajara, México.*

Ulloa R.E., Nicolini H., Fernández-Guasti A. (2004). Sex differences on spontaneous alternation in prepubertal rats: implications for an animal model of obsessive-compulsive disorder. *Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry Vol. 28 Págs 687-692.*

Umland E.M., Cauffield J.S., Kirk J.K., Thomason T.E. (2000). Phytoestrogens as therapeutic alternatives to traditional hormone replacement in postmenopausal women. *Pharmacotherapy 20: 981-90.*

United Nations. (2010). World Population Ageing 2009. Department of Economic and Social Affairs, Population Division New York ISBN 978-92-1-151468-1.

University of Bristol (2012) MRC Centre for Synaptic Plasticity School of Medical Sciences, Department of Anatomy, University Walk, Bristol <http://www.bristol.ac.uk/synaptic/>.

Vega-Rivera N.M., Fernández-Guasti J.A., Ramírez-Rodríguez G.B., Castro-García M., Estrada-Camarena Erika. (2012). Regulación de la Neurogénesis Hipocámpica por los estrógenos: su relación con la depression. Salud Mental: 35: 527-533 Redalyc <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=58225137011>.

Veiga S., García-Segura L.M. Azcoitia I. (2004). The neuroprotective properties of sex steroids and neurosteroids. Rev Neurol. 39 (11): pags 1043-1051.

Warren S.G., Juraska J.M. (1997). Spatial and nonspatial learning across the rat estrous cycle. Behav Neurosc. 111: 259-266.

Whitehead, M. (1996). Treatments for menopausal and post menopausal problems: present and future. Baillieres Clin.Obstet. Gynaecol; 10 (3): 515-30.

Whitehouse P.J., Struble R.G., Clark A.W. and Price D.L. (1982) Alzheimer disease: plaques tangles and basal forebrain. Ann Neurol. Vol. 12 No.5, Pág. 494.

Williams C.L., Merck W.H. (1991). The organizational effects of gonadal steroids on sexually dimorphics spatial ability. Psych Neuroendocr. 16: 155-176.

Wink M. 2005. /Wie funktionieren Phytopharmaka? Wirkmechanismen der Vielstoffgemische. Z. Phytotherapie 26, 262-279.

Wise P.M., Dubal D.B., Wilson M.E., Rau S.W., Böttner M. (2001). Minireview: neuroprotective effects of estrogen-new insights into mechanisms and action. Endocrinology 142: 969-973.

Wise P.M., Dubal D.B., Wilson, M.F., Rau Sh. W., and Liu Ying. (2001). Estrogens: Trophic and Protective Factors in the Adult Brain. Front Neuroendocrinol. Vol. 22, Issue 1 pp. 33 – 66.

Wojakowska A., Piasecka A., García-López P.M., Zamora-Natera F., Krajewski P., Marczak L., Kachlicki P. and Stobiecki M. (2013). Structural analysis and profiling of phenolic

secondary metabolites of mexican lupine species using LC-MS techniques. *Phytochemistry* 92: 71-83.

Wojtaszek P. (1997). Review. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.* 322, pp. 681-692.

Wood E.C., Register C.T., and Cline J.M. (2007). Soy isoflavonoid effects on endogenous estrogen metabolism in postmenopausal female monkeys. *Carcinog.* 28, 801-808.

Woolley S.C. (1998). *Horm Behav.* 34, 140-148. In Adams *et al.*, 2001 Different modes of hippocampal plasticity in response to estrogen in young and aged female rats. *PNAS* vol. 98 No. 14 8071-8076.

Woolley S.C. and McEwen S.B. (1994). Estradiol Regulates Hippocampal Dendritic Spine Density via an N-Methyl-D- Aspartate Receptor-Dependent Mechanism. *Jour Neurosci* Vol. 14 (12) 7680-7687.

Xiao-Wu Xu., Shi Ch., Zhen-Quan H., Chun-Mei M., Wen-Hua Ch. Yi-Ping Sh., Guo Q., Chuan-Jun Sh. and Jie Xu. (2008). Effects of Phytoestrogen on Mitochondrial Structure and Function of Hippocampal CA1 Region of Ovariectomized Rats. *Cell Mol Neurobiol* Vol. 28 875-886

Xu J., Zhu J., Shi C., Guo K. and Yew D. T. 2007. Effects of genistein on hippocampal neurodegeneration of ovariectomized rats. *J. Mol. Neurosci.* 31, 101-112.

Xu X., Hu Y., Ruan Q. (2004). Effects of puerarin on learning-memory and aminotransmitters of brain in ovariectomized mice. *Planta Med* 70(7): 627-31.

Xu X.W., Shi C., He Z.Q., Ma C.M., Chen W.H., Shen Y.P., Guo Q., Shen C.J. and Xu J.(2008). Effects of phytoestrogen on mitochondrial structure and function of hippocampal CA1 region of ovariectomized rats. *Cell. Mol. Neurobiol.* 28, 875-886.

Yong, W.L. and Wong H.L. (2008). Protective effects of genisteína on proinflammatory pathways in human brain microvascular endothelial cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry.* Volume 19. Issue 12. Pages 819-825.

Yousef M.I., Kamel K.I., Esmail A.M., Baghdadi H.H. (2004). Antioxidant activities and lipid lowering effectsof isoflavone in male rabbits. *Food Chem Toxicol* 2004;42:1497-503.

Ypsilantini A.R., Girão da Cruz M.T., Burgess A. and Aubert, I. (2008). Neurobiology of Aging Vol. 29 Issue 11 pp. 1666 – 1679.

Zamora-Natera F., García-López P., Ruiz-López M., Ruiz-Moreno J. Pedrosa M. and Muzquiz M. (2008<sub>a</sub>) Composition of Alkaloids in Seeds of *Lupinus mexicanus* (Fabaceae) and Antifungal Evaluation of the Alkaloid Extract. In J.A. Palta and J.B. Berger (eds) “Lupins for Health and Wealth” Proceedings of the 12<sup>th</sup> International Lupin Conference Fremantle, Western Australia. International Lupin Association, Canterbury, New Zealand. ISBN 0-86476-153-8 pags 216-219.

Zamora-Natera J.F., García-López P. Ruiz-López M., Salcedo-Pérez E. (2008<sub>b</sub>). COMPOSICIÓN DE ALCALOIDES EN SEMILLAS DE *Lupinus mexicanus* (Fabaceae) Y EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA Y ALELOPÁTICA DEL EXTRACTO ALCALOIDEO. *Agrociencia* 42: 185-192.

Zeng H.Y., Chen Q. and Zhao B.L. (2004). Genistein ameliorates beta-amyloid peptide (25-35) induced hippocampal neuronal apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 36 (2): pp. 180-188.

Zhao L., Chen Q., Diaz B.R. (2002) Neuroprotective and Neurotrophic Efficacy of Phytoestrogens in Cultured Hippocampal Neurons. *Exp Biol Med* (Maywood) Vol. 227. 7. 509-519.

## ANEXOS

# Flavonoid profile of *Lupinus mexicanus* germinated seed extract and evaluation of its neuroprotective effect

José de Jesús Uribe-Gómez<sup>1</sup>, Juan Francisco Zamora-Natera<sup>2</sup>, Jacinto Bañuelos-Pineda<sup>1</sup>, Piotr Kachlicki<sup>3</sup>, Maciej Stobiecki<sup>4</sup> and Pedro Macedonio García-López<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Animal Morphophysiology, University of Guadalajara, Las Agujas Nextipac, Zapopan Jalisco, Mexico, <sup>2</sup>Laboratory of Biotechnology, Department of Botany and Zoology, University of Guadalajara, Las Agujas Nextipac, Zapopan Jalisco, Mexico,

<sup>3</sup>Institute of Plant Genetics PAS, Poznan, Poland and <sup>4</sup>Institute of Bioorganic Chemistry PAS, Poznan, Poland

**Summary.** The aim of this study was to determine the flavonoid profile of *Lupinus mexicanus* germinated seed extract (PE) and to evaluate its effect as a phytoestrogen on the morphometric parameters of CA3 hippocampal neurons of ovariectomized rats (OVX). *L. mexicanus* seeds, germinated for 48 h, were homogenized and macerated using an 80% ethanol solution. The extract was analyzed by HPLC/MS-MS. Thirty young Wistar strain female rats (200±10 g) were randomly distributed into four groups: sham operated (S) treated with dimethyl sulfoxide (vehicle); ovariectomized and treated with 1250 µg of PE extract (OVX-PE); ovariectomized and treated with 5 µg estradiol benzoate (OVX-EB); and ovariectomized and vehicle treated (OVX). All substances were injected subcutaneously daily for 28 days. On day 29, the animals were sacrificed, perfused, and fixed to obtain the brains for histological processing. Each brain was cut and stained with hematoxylin and eosin. The thickness of the stratum oriens (SO), the nuclear diameter, and the neuronal density were measured in the hippocampus CA3 area. Nine different flavonoids and one non-identified compound were detected. The histological analysis demonstrated that the thickness of the SO was higher in the OVX-EB and S groups than in the OVX-PE and OVX groups ( $p<0.05$ ); in addition, the nuclear diameters of the neurons in the OVX-EB and S groups were higher compared with the other groups ( $p<0.05$ ). The OVX group had the highest cellular density among groups ( $p<0.05$ ). Based on our results, the PE obtained did not have beneficial effects

on CA3 hippocampal neurons.

**Key words:** *Lupinus mexicanus*, Flavonoids, Solid phase extraction, Chromatography-MS, Seedling

## Introduction

Phenolic compounds make up one of the major families of secondary metabolites in plants; they can be classified into non-soluble and soluble and include phenolic acids, phenylpropanoids, quinones, and flavonoids (Nicolas et al., 2005). According to their chemical structure, flavonoids are classified into several subclasses, such as chalcones, isoflavonoids, flavanones, flavones, dihydroflavonols, flavonols, anthocyanidins, and catechins based on the structure of the C-ring and the functional groups at C-3 and C-4. Generally, they exist as conjugates with sugars (glycosides) in vacuoles (Aoki et al., 2000). Flavonoids are common to most vascular plants and are particularly important because of the multiple roles they play, such as defending the plant against pathogenic microorganisms and as chemical signals in symbiotic nitrogen fixation. In addition, due to their biological activities, flavonoids have a positive impact on human health (Harborne, 1994; Harborne and Williams, 2000). In this regard, genistein and daidzein (isoflavonoids) have been employed as phytoestrogens to prevent both chronic degenerative and cognitive process-related diseases (Lephart et al., 2002; Cline et al., 2004; Wood et al., 2007; Xu et al., 2008). Previous studies in animal models have revealed that either the ingestion of diets rich in phytoestrogens or the repeated parenteral administration of these compounds improves



memory (Monteiro et al., 2008). Phytoestrogens also have a neuroprotective effect against the neurodegeneration caused by ovarian hypofunction (Xu et al., 2008), and likely also have neurotrophic properties (Pan et al., 1999; Jhamandas et al., 2001; Gleason et al., 2005).

The chemical structures of isoflavonoids allow them to interact with both  $\alpha$  and  $\beta$  estrogenic receptors (ER), although with lower relative affinity than estradiol. They act as natural selective estrogen receptor modulators (SERMs) (Kuiper et al., 1997, 1998; Brzezinski and Debi, 1999). It has been shown that estrogens mediate the hippocampal function through ER $\alpha$  and ER $\beta$  (McEwen and Alves, 1999), which are involved in learning and behavioral processes (O'Neil et al., 1996). Hence, the neurons in the hippocampus are particularly sensitive to blood estrogen levels. Therefore, any alteration in the levels of this hormone in the brain induces significant physiological changes on the hippocampus, particularly in the CA3 area, which receives sensorial information from the external and internal environments through two principal pathways: mossy fibers and the perforant path (Amaral and Witter, 1989; Dolorfo and Amaral, 1998). Furthermore, the CA3 area is considered an auto-association network for the storage and retrieval of information, particularly in working memory processes (Treves and Rolls, 1992; Rolls and Treves, 1998; Stupien et al., 2003).

The mechanism by which isoflavonoids improve memory and learning capacity is still unknown; although it has been suggested that isoflavonoids increase mRNA levels of neurotrophic factors derived from the brain, choline acetyltransferase, and nerve growth factors in the cerebral cortex and hippocampus (Pan et al., 1999; Jhamandas et al., 2001). On the other hand, these compounds have shown antioxidant activity in hippocampal neuron cell cultures through the inhibition of lactate dehydrogenase (Zhao et al., 2002).

Most studies involving phytoestrogenic effects have been done employing soybean flavonoids; however, other leguminous plants rich in these compounds have not been studied, including species of the genus *Lupinus*, which are widely distributed in Mexico. Profiles of flavonoids synthesized in tissues of the Old World lupines, as well as the glycosylation and malonylation pattern of these compounds, have been thoroughly investigated using HPLC-MS techniques (Kachlicki et al., 2005). However, knowledge of the presence of these compounds in the New World lupine species is rather limited, and a systematic analysis of isoflavonoid glycoconjugates has only been reported for a few species from North America and only the flavonoid profiles from the vegetative organs (leaves, roots, stem, and inflorescence) of these species have been reported (Garcia et al., 2006; Stobiecki et al., 2010; Wojakowska et al., 2013).

To the best of our knowledge, the extraction and characterization of flavonoids from germinated lupin seeds has not been done in any of the Mexican wild

lupin species. *L. mexicanus*, one of the 15 lupin species that grow in the Mexican state of Jalisco, represents a potential source of flavonoids due to its abundance and wide distribution. However, knowledge of the biological activity of this species is limited, although it can be supposed to be estrogenic. Therefore, the aim of this study was to determine the flavonoid profile of germinated seed extract from *L. mexicanus* and to evaluate it.

## Materials and methods

### Plant material

Seeds of *Lupinus mexicanus* were harvested in March 2008 from a native population growing in the municipality of Matanzas, Ojuelos, Jalisco, Mexico. The collection site is located at 2,205 masl, with an annual pluvial precipitation of 473.5 mm, an average annual temperature of 17.1°C, a maximum of 25°C, and a minimum of -3.9°C. The seeds were cleaned and then stored in a sealed container at room temperature. The identification of herborized plants was carried out by curators of the Instituto de Botanica, Departamento de Botanica y Zoologia, Universidad de Guadalajara.

### Seed germination

Healthy and clean seeds (50 g) were scarified using sulfuric acid (98%) for 30 min. After scarification, the acid was decanted and the seeds were washed ten times with distilled water. Seed germination (defined as having the seeds' radicle protruding through the seed coat) was conducted under laboratory conditions at 25°C using a glass container (20x30x5 cm) on filter paper moistened with distilled water.

### Isolation of phenolic secondary metabolites from plant tissue

For the analyses of flavonoid glycoconjugates, the germinated seeds were homogenized in 80% MeOH, and the suspension was placed in an ultrasonic bath for 30 min. The extract was centrifuged and the alkaloids were removed from the supernatant using SPE SCX (10 g, Supelco) columns. The loaded SPE columns were washed with 10 mL of 10% MeOH and 10 mL of MeOH; in addition, an aliquot of the eluate was evaporated and stored at -80°C prior to the LC-MS analyses. The rest was freeze-dried in a lyophilizer (LAB CONCO Corporation, USA). The lyophilized extract sample was kept at -80°C until its use in animal experiments.

### Liquid chromatography with UV and mass spectrometric detection

Analyses of the seed extract were performed with two LC-UV-MS systems. The first system consisted of

## Neuroprotective effect of lupin flavonoid

an Agilent 1100 HPLC (Waldbronn, Germany) combined with an ion trap (IT) mass spectrometer, model Esquire 3000 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany); the second was an Agilent RR1200 SL system connected to a micrOTOF-Q spectrometer from Bruker. An X-Bridge C-18 column (150x2.1 mm; 3.5  $\mu$ m grain diameter, Waters) and Zorbax Eclipse XDB-C18 column (100x2.1 mm; 1.8  $\mu$ m grain, Agilent) were used. Chromatographic runs in the Agilent 1200 system were performed at a 0.5 mL/min flow rate using mixtures of two solvents: A (99.5% H<sub>2</sub>O, 0.5% HCOOH v/v) and B (99.5% MeCN, 0.5% HCOOH, v/v). The column effluent was split 3:2, so 0.2 mL/min was delivered to the ESI ion source. The elution steps were as follows: 0-8 min linear gradient from 5 to 30% B, 8-10 min linear gradient to 95% B; 10-12 min isocratic at 95% B; and the equilibration was achieved 3 min after returning to the initial conditions. The same solvents were used in the Agilent 1100 system at a 0.2 mL/min flow, and the gradient was: 0-35 min linear gradient from 5-30% B; 35-45 min up to 95% B; 45-52 min isocratic at 95% B; and re-equilibration occurred 60 min after the return to initial conditions. The settings of the IT mass spectrometer were: electrospray ion source (ESI), voltage +4 kV (positive ion mode), nebulization with nitrogen at 1.7 bar, dry gas flow of 7 L/min, gas temperature of 310°C, skimmer 1 voltage +12.4 or -11.2 V, and collision energy set to 1 V and ramped within 40-200% of this value. The number of ions accumulated in the trap was set to 10000 and the maximum accumulation time was 200 ms. According to results of preliminary experiments, spectra were recorded in the targeted mode in the mass range m/z 50-1500. The instrument operated under Esquire Control, version 5.1, and the data were analyzed using the Data Analysis package, version 3.1 (Bruker). The micrOTOF-Q spectrometer consisted of ESI operating at a voltage of +4.5 kV, nebulization with nitrogen at 1.6 Bar, dry gas flow of 8.0 L/min at a temperature of 220°C. The system was calibrated externally using a mixture containing sodium formate clusters. An additional internal calibration was performed for every run by injecting the calibration mixture during the LC separation using the diverter valve. All calculations used the HPC quadratic algorithm. This calibration gave an accuracy of at least 5 ppm. MS/MS spectra were acquired at the frequency of 1 scan per second for ions chosen on the basis of preliminary experiments, with argon used as the collision gas. Collision energy depended on the molecular masses of the compounds and was set between 15 and 30 eV in positive ion mode. The instrument operated at a resolution higher than 10000 (FWHM-full width at half maximum) under the control of the micrOTOF Control Program, ver. 2.3. The data were analyzed using the Data Analysis package, ver. 4 (Bruker). Metabolite profiles were registered in positive and negative ion modes. For the identification of compounds, the instrument was operated in the targeted MS/MS mode and single-ion chromatograms for exact masses of [M+H]<sup>+</sup> ions (+ 0.005 Da) were recorded.

### Surgical procedure

Thirty young Wistar strain female rats (200±10 g), previously anesthetized with an intramuscular injection of ketamine sodium (50 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg), were ovariectomized; while, 10 rats underwent the surgical procedure but the ovaries were not removed (sham group). The protocol followed for animal usage in our study was approved by the institutional ethics committee, and all animal procedures were conducted in accordance with the production, care, and use of laboratory animals established in the Mexican Official Standard (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, 1999).

### Evaluation of the estrogenic activity of the PE extract

After a post-operative period of 4 days, all ovariectomized animals were randomly distributed into the following groups: Ovx (OVX), treated with 0.04 mL of dimethyl sulfoxide (vehicle); Ovx+estradiol (OVX-EB) treated with 5  $\mu$ g/animal/day of estradiol benzoate; Ovx+PE (OVX-PE), treated with 1250  $\mu$ g/animal/day of PE (in accordance with Xu et al., 2007); and the sham group (S), treated with vehicle. All four groups of rats were injected subcutaneously daily at 8:00 A.M. for 28 days. On day 29, all animals were sacrificed and perfused intracardially with 100 mL of warm heparinized saline (37°C) for 4 min, followed by 250 mL of 4% paraformaldehyde in 0.1 M of phosphate buffer, pH 7.4. The brain of each animal was removed and post-fixed for 24 h in 4% paraformaldehyde in 0.1 M of phosphate buffer, pH 7.4.

The brains were then washed in a phosphate buffered saline solution, dehydrated in increasing concentrations of alcohol, and embedded in paraffin. All brains were cut in coronal sections using a rotatory microtome (10  $\mu$ m) and were subsequently stained with hematoxylin and eosin. Then, the sections were analyzed histologically, followed by a quantification of the thickness of the SO, the nuclear diameter of pyramidal neurons, and the neuronal density of the pyramidal stratum, using a Leica light microscope connected to an image analyzer (QWin500).

### Statistical analysis

The data were analyzed by one-way variance analysis and the mean values were compared, with significance set at p<0.05. The SPSS 10.0 software was used.

## Results

### Flavonoid profile

The analytical technique employed in this study to determine the flavonoid profile of germinated seeds of *L. mexicanus* was able to unambiguously establish the presence of 10 flavonoid glycoconjugates (mono- and

diglucosides), acylated or not. The aglycones present in these compounds were the flavones acacetin, apigenin, and chrysoeriol; the isoflavones genistein and 2'-hydroxygenistein; and an unknown compound with a molecular weight of 694 (Table 1). Based on the molecular weight and some fragments observed in the MS/MS spectra, the unknown compound could be acacetin O-diglucoside malonylated; although, the spectral data were not sufficient to unequivocally identify this metabolite.

The identified acylated flavonoid glycoconjugates were chrysoeriol malonylated C-glucoside; two malonylated diglucosides of 2'-hydroxygenistein; and two malonylated diglucosides of genistein, but one of these contained two malonic acid moieties with the genistein 4',7-O-diglucoside dimalonylated. In contrast, acylation was absent in the following flavonoid glycoconjugates: genistein 8-C-glucoside, acacetin 8-C-glucoside, and chrysoeriol C glucoside. Apigenin 6,8-di-C-glucoside-7-O-apioside, a compound found in seeds of several lupin species that is not present in plant organs, was also found.

#### Histological description

The microscopic analysis of the histological preparations of the hippocampus CA3 area indicated the neurons found in the OVX-EB group were the largest; while, the smallest were found in the OVX-PE group. In the S and OVX-EB groups, the neurons showed rounded nuclei, were slightly basophilic, with one or occasionally

two prominent nucleoli in their central part. In the OVX and OVX-PE groups, the nuclei were oval in shape. The nucleoli were clearly defined with granular chromatin in the OVX group; while, they were not evident and the chromatin was condensed in the OVX-PE group.

In addition, in the OVX-PE and OVX groups, the neurons showed degenerative changes such as pyknosis, cavitation, and eosinophilia; while, these changes were only occasionally observed in the S and OVX-EB groups. The neuronal cytoplasm was dense in all groups, with the exception of the OVX-EB group, which showed a pallid pink color. This dense cytoplasm was eosinophilic in the OVX and OVX-PE groups, and slightly eosinophilic in the S group. The largest part of the neuropil was uniform in color and texture in the S and OVX-EB groups; although, there were small areas with lumpy texture. On the other hand, the OVX and OVX-PE groups showed a lumpy-textured neuropil. The features described above are shown in Fig. 1.

#### Quantitative microscopic analysis

The SO, which also includes the stratum alveus, was significantly thicker (85.68  $\mu\text{m}$ ) in the brains of the OVX-EB group than in the brains of other groups ( $p < 0.05$ ). The descending order of thicknesses in the other groups were: S (71.75  $\mu\text{m}$ ), OVX-PE (63.66  $\mu\text{m}$ ), and OVX (59.32  $\mu\text{m}$ ). With regard to the pyramidal neurons, the nuclear diameter in the OVX-EB group was 14.25  $\mu\text{m}$ ; this value was larger ( $p < 0.05$ ) than that found in the S (11.82  $\mu\text{m}$ ), OVX (9.95  $\mu\text{m}$ ), and OVX-PE

**Table 1.** Flavonoids and their derivatives identified in the *Lupinus mexicanus* germinated seed extract using UPLC/ESI/qToF-MS.

No	RT (min)	Compound	MW	Elemental composition of [M+H] <sup>+</sup> ion	Exact mass of [M+H] <sup>+</sup> ion			Fragmentation pathway (product ions obtained from precursor ion)	
					Calculated	Observed	Error (ppm)	Positive ions [M+H] <sup>+</sup> (m/z)	Negative ions [M-H] <sup>-</sup> (m/z)
1	2.5	Apigenin 6,8-di-C-glucoside-7-O-apioside	726	C <sub>32</sub> H <sub>39</sub> O <sub>19</sub>	727.2080	727.2076	-0.6	727, 709, 595, 577, 559, 499, 481, 409, 391	725, 605, 455, 335
2	3.8	2'-hydroxygenistein C, O-diglucoside malonylated	696	C <sub>30</sub> H <sub>33</sub> O <sub>19</sub>	697.1611	697.1617	0.9	697, 535, 491, 449, 431	695, 489, 447
3	3.9	Genistein 4',7-O-diglucosidomalonylated	680	C <sub>30</sub> H <sub>33</sub> O <sub>18</sub>	681.1661	681.1670	0.2	681, 519, 433, 287	nr
4	4.0	Genistein 6-C-glucoside	432	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>10</sub>	433.1129	433.1136	-1.6	433, 415, 397, 379, 313	431, 311, 283
5	4.1	2'-hydroxygenistein 4',7-O-diglucoside malonylated	696	C <sub>30</sub> H <sub>33</sub> O <sub>19</sub>	697.1611	697.1611	0.0	697, 535, 449, 287	651, 489
6	4.4	Chrysoeriol 8-C-glucoside	462	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> O <sub>10</sub>	463.1235	463.1227	-1.7	463, 445, 427, 409, 397, 385, 381, 373, 367, 353, 343	461, 341, 326
7	4.8	Unknown	694						
8	5.4	Acacetin 8-C-glucoside	446	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> O <sub>10</sub>	447.1286	447.1282	-0.9	447, 429, 411, 381, 351, 327, 397	445, 355, 325, 297, 282
9	5.6	Chrysoeriol -O-glucoside malonylated	548	C <sub>25</sub> H <sub>25</sub> O <sub>14</sub>	549.1239	549.1237	-0.4	549, 463, 301	547, 299
10	5.6	Genistein 4',7-O-diglucoside dimalonylated	766	C <sub>33</sub> H <sub>35</sub> O <sub>21</sub>	767.1665	767.1646	-2.5	767, 681, 519, 433, 271	765, 473, 431, 269/268



*Neuroprotective effect of lupin flavonoid*

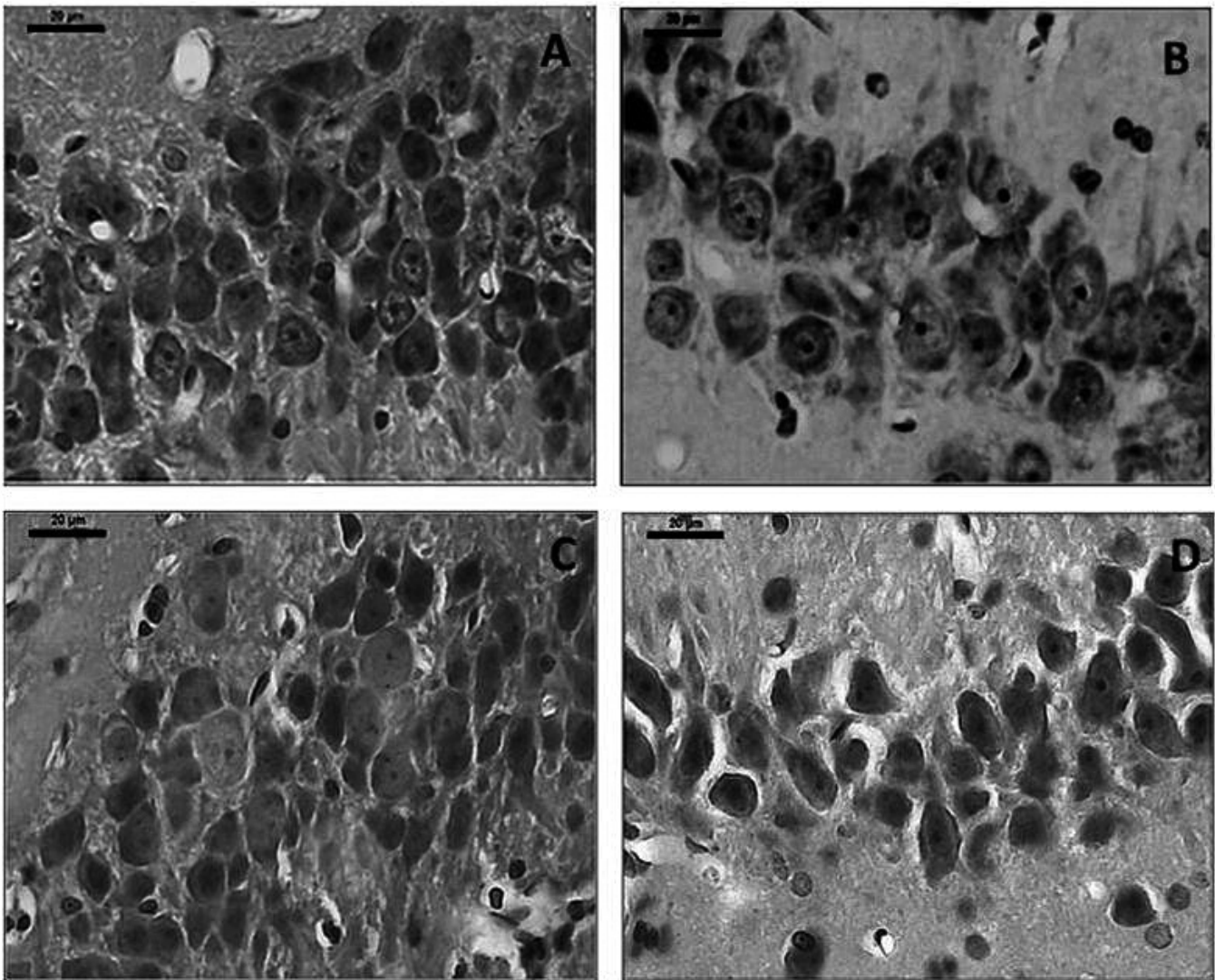
(8.89  $\mu\text{m}$ ) groups, respectively. Finally with respect to neuronal density, the OVX group had the highest value (10.34 neurons/0.01  $\text{mm}^2$ ) and the OVX-PE group (6.0

neurons/0.01  $\text{mm}^2$ ) the lowest value. Intermediate neuronal density values were recorded in the OVX-EB (8.21 neurons/0.01  $\text{mm}^2$ ) and S (7.75 neurons/0.01  $\text{mm}^2$ )

**Table 2.** Effect of estradiol benzoate and PE extract on the CA3 hippocampal brain region of ovariectomized rats.

Treatment (group)	Nuclear diameter ( $\mu\text{m}$ )	Neuronal density (neurons/0.01 $\text{mm}^2$ )	Stratum Oriens thickness ( $\mu\text{m}$ )
S	11.82 $\pm$ 2.30 <sup>b</sup>	7.75 $\pm$ 2.41 <sup>b</sup>	71.75 $\pm$ 4.57 <sup>b</sup>
OVX	9.95 $\pm$ 4.74 <sup>c</sup>	10.34 $\pm$ 2.61 <sup>a</sup>	59.32 $\pm$ 12.98 <sup>c</sup>
OVX-EB	14.25 $\pm$ 3.40 <sup>a</sup>	8.21 $\pm$ 2.85 <sup>b</sup>	85.68 $\pm$ 15.73 <sup>a</sup>
OVX-PE	8.89 $\pm$ 4.02 <sup>d</sup>	6.0 $\pm$ 2.32 <sup>c</sup>	63.66 $\pm$ 13.02 <sup>c</sup>

Different letters in columns indicate a statistical difference ( $p < 0.05$ ),  $n=10$



**Fig. 1.** Hippocampal CA3 neurons. **A.** S group; morphologically normal neurons, slightly eosinophilic, with high cellular density. **B.** OVX-EB group; large neurons with normal morphological features. **C.** OVX group; high neuronal density with many eosinophilic neurons showing slight pyknosis and cavitation. **D.** OVX-PE group; a reduction in both neuronal density and size can be observed, with perineuronal cavitation and intense eosinophilia associated with pyknosis. HE. Bar: 20  $\mu\text{m}$ .

groups ( $p < 0.05$ ), as shown in Table 2.

## Discussion

### PE flavonoid profile

It should be noted that the flavonoid profiles of conjugates present in the leaves and roots of different lupin species are distinct and they differ from those observed in non-germinated seeds (Garcia et al., 2006; Stobiecki et al., 2010; Siger et al., 2012; Wojakowska et al., 2013). Compounds abundant in seeds, such as apigenin 6,8-di-C-glucoside-7-O-aposide, are still present at early stages of germination and completely disappear in the leaves and roots of 3-week old plants. In contrast with European lupin seeds (*Lupinus albus*) that contain 2'-hydroxygenistein and genistein as free aglycones (Stobiecki et al., 2010), there were no free flavonoid aglycones in *L. mexicanus* PE. However, 2'-hydroxygenistein and genistein were detected as free aglycones in the roots, stems, leaves, and inflorescences of *L. exaltatus* (Garcia et al., 2006). As with the European lupine flavonoids, malonylation is an important structural feature in some Mexican lupins. In this regard, genistein 4',7-O-diglucoside malonylated has been found in the roots, stems, and inflorescences of *L. exaltatus* and in the roots of *L. reflexus*. There are also other dimalonylated flavonoids in these species, i.e. 2-hydroxygenistein 4' and 7-O-diglucoside malonylated (Garcia et al., 2006; Stobiecki et al., 2010). It is important to indicate that when studying *L. exaltatus* (Garcia et al., 2006), we were not aware of the existence of these compounds. However, it was later determined that the compounds identified as biochanin derivatives in *L. reflexus* (Stobiecki et al., 2010) were acacetin derivatives. This was corrected in newer research (Wojakowska et al., 2013).

It is interesting that genistein, as a free aglycone, was absent in *L. mexicanus* PE; although, it is well known that this isoflavonoid is found in lower amounts in lupin seeds than in soybeans (Nakamura et al., 2001). This aglycone and other flavonoids found in leguminous plants (lupins, chickpeas, beans, clover, mung beans) possess estrogenic and anticarcinogenic activities, and there are also reports about their roles in the prevention of cardiovascular diseases and osteoporosis.

### Histological findings

In this study, it was evident that the PE treatment had an unfavorable effect on hippocampus CA3 neurons, which were smaller in size and showed signs of neuronal degeneration (a great number of shrunken neurons with pyknotic nuclei). However, the stressful conditions of the surgical procedure and the manipulation of the animals (daily treatment and handling) during the experiment should be considered.

On the contrary, the EB treatment showed a beneficial effect on the CA3 brain area, which showed

an increased cell nuclear diameter due to a direct enhancement of the nuclear activity of the neurons (Srebro et al., 1988). The thickness of the SO was also greater, which is directly related to the growth of dendrites (Woolley and McEwen, 1994). These parameters are indicative of a neurotrophic effect of the EB on the neurons of the hippocampus (McEwen, 2002). Thus, the anticipated negative effect from the absence of steroids after the ovariectomy was overcome by the administration of EB.

The negative effects obtained with the PE treatment could be explained by the chemical structure of their flavonoids (glycoconjugates), and the subcutaneous administration. It is well known that phytoestrogens must undergo a chemical transformation in order to have high estrogenic activity, and this occurs after the oral administration of phytoestrogens (Casanova et al., 1999). Therefore, it is possible that after the subcutaneous administration of PE no chemical transformation or good absorption occurred. Additionally, it has been demonstrated that the flavonoids genistein and daidzein have a lower affinity for estrogenic receptors in the brain and uterus than the endogenous estrogens and 17 $\beta$  estradiol (Wink, 2005). In the present study, it was evident that PE was not capable of protecting the CA3 neurons after ovariectomy, as the BE treatment and endogenous estrogen could.

## Conclusion

The flavonoid profile of the PE evaluated showed the presence of 10 flavonoid glycoconjugates, with 5 compounds being isoflavone derivatives. However, these compounds did not have neurotrophic or neuroprotective effects, based on the small size and signs of neuronal degeneration of the hippocampal CA3 neurons of OVX rats. Further studies are being undertaken in our laboratory to elucidate the effectiveness of extracts from germinating seeds of different Mexican lupine species as phytoestrogens.

---

*Acknowledgements.* This study was financed by grants from COECYTJAL (México), Ref. PS-2009-506.

---

## References

- Amaral D.G. and Witter M.P. (1998). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 3, 571-591
- Aoki T., Akashi T. and Ayabe S. (2000). Flavonoids of leguminous plants: Structure, biological activity, and biosynthesis. *J. Plant Res.* 113, 475-488
- Brzezinski, A. and Debi A. (1999). Phytoestrogens: The "natural" selective estrogen receptor modulators? *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 85, 47-51.
- Casanova M., You L., Gaido K.W., Archibeque-Engle S., Janszen D.B. and Heck H.A. (1999) Developmental effects of dietary phytoestrogens in Sprague-Dawley rats and interactions of genistein

## Neuroprotective effect of lupin flavonoid

- and daidzein with rat estrogen receptors alpha and beta in vitro. *Toxicol. Sci.* 51, 236-244.
- Cline J.M., Franke A.A., Register T.C., Golden D.L. and Adams M.R. (2004). Effects of dietary isoflavone aglycones on the reproductive tract of male and female mice. *Toxicol. Pathol.* 32, 91-99.
- Dolorfo C.L. and Amaral D.G. (1998). Entorhinal cortex of the rat: Topographic organization of the cells of origin of the perforant path projection to the dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 398, 25-48.
- García L.P.M., Kachlicki P., Zamora N.F., Ruiz M.J. and Stobiecki M. (2006). Profiling isoflavone conjugates in different organs of *Lupinus exaltatus* Zucc. *Phytochem. Anal.* 17, 184-191.
- Gleason C.E., Cholerton B., Carlsson C.M., Johnson S.C. and Asthana S. (2005). Neuroprotective effects of female sex steroids in humans: current controversies and future directions. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 299-312.
- Harborne J.B. and Williams C.A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55, 481-504.
- Harborne J.B. (1994). Introduction to ecological biochemistry. 4th ed. Academic Press. London.
- Jhamandas J.H., Cho C., Jassar B., Harris K., MacTavish D. and Easaw J. (2001). Cellular mechanisms for amyloid beta-protein activation of rat cholinergic basal forebrain neurons. *J. Neurophysiol.* 86, 1312-1320.
- Kuiper G.G., Carlsson B., Grandien K., Enmark E., Haggblad J., Nilsson S. and Gustafsson J.A. (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138, 863-870.
- Kuiper G.G., Lemmen J.G., Carlsson B., Corton J.C., Safe S.H., van der Saag P.T., van der Burg B. and Gustafsson J.A. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor  $\beta$ . *Endocrinology* 139, 4252-4263.
- Lephart D.E., West W.T., Weber S.K., Rhees W.R., Setchell D.R.K., Adlercreutz H. and Lund D.T. (2002). Neurobehavioral effects of dietary soy phytoestrogens. *Neurotoxicol. Teratol.* 24, 15-16.
- Kachlicki P., Marczak Ł., Kerhoas L., Einhorn J. and Stobiecki M. (2005). Profiling isoflavone conjugates in root extracts of lupine species with LC/ESI/MSn systems. *J. Mass Spectrom.* 40, 1088-1103.
- McEwen B.S. (2002). Estrogen actions throughout the brain. *Recent. Prog. Horm. Res.* 57, 357-384.
- McEwen B.S. and Alves S.E. (1999). Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr. Rev.* 20, 279-307.
- Monteiro S.C., De Mattos C.B., Ben J., Netto C.A. and Wyse A.T.S. (2008). Ovariectomy impairs spatial memory: prevention and reversal by a soy isoflavone diet. *Metab. Brain Dis.* 23, 243-53.
- Nakamura A., Furuta H., Maeda H., Nagamatsu Y. and Yoshimoto A. (2001). Analysis of structural components and molecular construction of soybean soluble polysaccharides by stepwise enzymatic degradation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65, 2249-2258.
- Nicolas R., Morris P. and Webb K.J. (2005). Phenolic compounds: extraction and analysis. In: *Lotus japonicus Handbook*. Márquez A.J. (ed). Springer. Germany. pp 349-355.
- O'Neil M.F., Means L.V., Poole M.C. and Hamm R.J. (1996). Estrogen affects performance of ovariectomized rats in two-choice water-escape working memory task. *Psychoneuroendocrinology* 21, 51-65.
- Pan Y., Anthony M. and Clarkson T.B. (1999). Evidence for up-regulation of brain-derived neurotrophic factor mRNA by soy phytoestrogens in the frontal cortex of retired breeder female rats. *Neurosci. Lett.* 261, 17-20.
- Rolls E.T. and Treves A. (1998). Neural networks and brain function. Oxford University Press. Oxford, UK. pp 1-428.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (1999). NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- Siger A., Czubinski J., Kachlicki P., Dwiecki K., Lampart-Szczapa E., and Nogala-Kalucka M. (2012). Antioxidant activity and phenolic content in three lupin species. *J. Food Comp. Anal.* 25, 190-197.
- Stobiecki M., Staszko A., Piasecka A., García L.P.M., Zamora N.F. and Kachlicki P. (2010). LC-MS/MS profiling conjugates in wild mexican lupine, *Lupinus reflexus*. *J. Nat. Prod.* 73, 1254-1260.
- Stupien G., Florian C. and Rouillet P. (2003). Involvement of the hippocampal CA3-region in acquisition and in memory consolidation of spatial but not in object information in mice. *Neurobiol. Learn Mem.* 80, 32-41.
- Srebro Z., Lach H. and Plackowska M. (1988). A parametric study of the supraoptic and paraventricular nuclei of the hypothalamus of kainic acid treated mice. *Folia Biol.* 36, 53-58.
- Treves A. and Rolls E.T. (1992). Computational constraints suggest the need for two distinct input systems to the hippocampal CA3 network. *Hippocampus* 2, 189-200.
- Wojakowska A., Piasecka A., García-López P.M., Zamora-Natera F., Krajewski P., Marczak Ł., Kachlicki P. and Stobiecki M. (2013). Structural analysis and profiling of phenolic secondary metabolites of mexican lupine species using LC-MS techniques. *Phytochemistry* 92:71-86.
- Woolley C.S. and McEwen B.S. (1994). Estradiol regulates Hippocampal dendritic spine density via an IV-MethylAspartate Receptor Dependent Mechanisms. *J. Neurosci.* 14, 7680-7687.
- Wood E. C., Register C.T. and Cline J.M. (2007). Soy isoflavonoid effects on endogenous estrogen metabolism in postmenopausal female monkeys. *Carcinog.* 28, 801-808.
- Wink M. (2005). Wie funktionieren Phytopharmaka? Wirkmechanismen der Vielstoffgemische. *Z. Phytotherapie* 26, 262-279.
- Xu J., Zhu J., Shi C., Guo K. and Yew D.T. (2007). Effects of genistein on hippocampal neurodegeneration of ovariectomized rats. *J. Mol. Neurosci.* 31, 101-112.
- Xu X.W., Shi C., He Z.Q., Ma C.M., Chen W.H., Shen Y.P., Guo Q., Shen C.J. and Xu J. (2008). Effects of phytoestrogen on mitochondrial structure and function of hippocampal CA1 region of ovariectomized rats. *Cell. Mol. Neurobiol.* 28, 875-886.
- Zhao L., Chen Q. and Diaz Brinton R. (2002). Neuroprotective and neurotrophic efficacy of phytoestrogens in cultured hippocampal neurons. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 227, 509-519.