

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 715 005**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/216** (2006.01)

**A61K 31/192** (2006.01)

**A61K 36/53** (2006.01)

**A61K 36/534** (2006.01)

**A61K 31/56** (2006.01)

**A61K 31/7032** (2006.01)

**A61K 31/7034** (2006.01)

**A61K 36/73** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

**A61P 25/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.08.2013 PCT/US2013/054274**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.02.2014 WO14026081**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.08.2013 E 13828399 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2019 EP 2882443**

54 Título: **Extractos vegetales para mejorar la salud y la función cognitiva**

30 Prioridad:

**09.08.2012 US 201261681414 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**31.05.2019**

73 Titular/es:

**KEMIN INDUSTRIES, INC. (100.0%)  
2100 Maury Street  
Des Moines, Iowa 50317, US**

72 Inventor/es:

**CEDDIA, MICHAEL;  
HERRLINGER, KELLI;  
LEWIS, BRANDON y  
FENG, HARRY**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 715 005 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Extractos vegetales para mejorar la salud y la función cognitiva

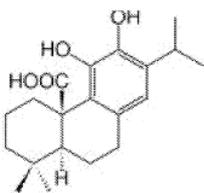
## 5 Antecedentes de la invención

La invención se refiere en general a extractos de plantas que potencian, mejoran o mantienen la salud y la función cognitiva y, más específicamente, a la administración de un extracto acuoso de una planta de hierbabuena que comprende ácido rosmarínico para mejorar el aprendizaje, la memoria, la atención, el estado de alerta, la función ejecutiva, la fluidez en la comunicación verbal, la velocidad de procesamiento y/o la flexibilidad cognitiva y comportamientos asociados.

Existe una fuerte demanda de productos que pueden mejorar la salud o la función cognitiva y el mercado para estos productos ha seguido creciendo en los últimos años a pesar de las presiones económicas desfavorables. Parte de este crecimiento puede atribuirse al crecimiento de la población que envejece, lo que es especialmente cierto en Asia y en los Estados Unidos. Las ventas mundiales de ingredientes para la salud cognitiva son de alrededor de \$ 455 millones. Frost y Sullivan pronosticaron una tasa de crecimiento anual en esta área de 12 % desde 2016 hasta 2019.

Actualmente, los principales ingredientes para la salud cognitiva incluyen fosfatidilserina (PS), CoQ10, omega-3 (aceites marinos/aceites de algas), citicolina, ginko y ginseng. De los ingredientes de la salud cognitiva más extendidos, la fosfatidilserina es la única con un aserto calificado aprobado por la FDA. Con el aumento de la evidencia científica para respaldar el aserto, el ingrediente ha disfrutado de un crecimiento de dos dígitos en las ventas. En 2010, las declaraciones de salud de DHA y EPA para la función cerebral, la salud del corazón y la visión obtuvieron una opinión positiva de la EFSA en Europa. La citicolina se promueve como un ingrediente que previene la degeneración neuronal y mejora la memoria.

El ácido carnósico (CA) es uno de los compuestos polifenólicos más abundantes presentes en *Rosmarinus officinalis* (romero) y *Salvia officinalis* (salvia). Actualmente, el CA está disponible en el mercado como ingrediente o como un suplemento dietético terminado. La pureza de estos productos varía entre el 25 % y el 60 %, con un producto de grado HPLC catalogado como 98 %. Además, hay extractos de romero que se estandarizan para el CA disponible en forma de polvo (estandarizados a 5-30 % de CA) o como suplemento dietético (cápsula de 300 mg estandarizada a 6 % de CA con una dosis recomendada de tres cápsulas por día). El porcentaje de CA en estos extractos de romero varía de 5-60 %. El romero tiene una combinación de diterpenos fenólicos (ácido carnósico y carnosol), ácidos fenólicos (ácido cafeico y ácido rosmarínico), y flavonoides. Un diterpeno es una combinación de 4 unidades de isopreno y se conoce que es antimicrobiano y antiinflamatorio (Bisio y otros. Antimicrobial activity of the ornamental species *Salvia corrugata*, a potential new crop for extractive purposes. *J Agric Food Chem* 56: 10468-10472, 2008; Sato y otros. Antibacterial novel phenolic diterpenes from *Podocarpus macrophyllus* D. Don. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 56: 1691-1697, 2008; Su y otros. Anti-inflammatory activities of furanoditerpenoids and other constituents from *Fibraurea tinctoria*. *Bioorg Med Chem* 16: 9603-9609, 2008; Wang y otros. Triptolide inhibits the differentiation of Th17 cells and suppresses collagen-induced arthritis. *Scand J Immunol* 68: 383-390, 2008). Estas unidades de isopreno pueden unirse entre sí como una cadena lineal u organizarse en una formación de anillo. El CA se considera el ingrediente activo principal en *Rosmarinus officinalis*, junto con su derivado, el carnosol.



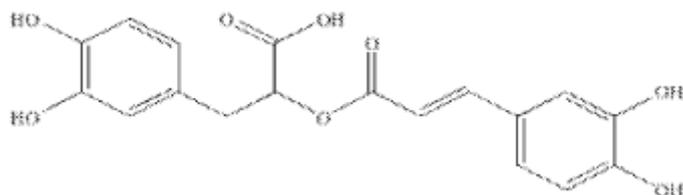
Ácido carnósico (CA)

Una gran parte de los estudios *in vitro* disponibles evaluaron el CA para determinar la protección antioxidante. De hecho, la actividad antioxidante del romero se ha atribuido principalmente al CA (Aruoma y otros. An evaluation of the antioxidant and antiviral action of extracts of rosemary and provençal herbs. *Food and Chemical Toxicology* 34: 449-456, 1996; Pérez-Fons y otros. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) diterpenes affect lipid polymorphism and fluidity in phospholipid membranes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 453: 224-236, 2006; Wang y otros. Augmentation by Carnosic Acid of Apoptosis in Human Leukaemia Cells Induced by Arsenic Trioxide via Upregulation of the Tumour Suppressor PTEN. *The Journal of International Medical Research* 36: 682-690, 2008). Los efectos neuroprotectores del CA se evaluaron mediante el uso del modelo de estrés oxidativo inducido por glutamato. El estudio demostró que el CA protege las neuronas, tanto *in vivo* como *in vitro*, contra las lesiones graves inducidas por glutamato (Sato y otros. Carnosic acid, a electrophilic compound, protects neurons both *in vitro* and *in vivo* through activation of the Keap1/Nrf2 pathway via alkylation of targeted cysteines on Keap1. *Journal of Neurochemistry* 104: 1116-1131, 2008). La literatura más reciente sobre el CA discute sus potenciales propiedades antiinflamatorias. Además del trabajo que mostró que el CA tenía actividad antiinflamatoria debido a la regulación negativa de los factores de transcripción NF-κB, otros estudios evaluaron

5 mecanismos adicionales para las propiedades antiinflamatorias del CA (Laughton y otros. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives: Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability. *Biochemical Pharmacology* 42: 1673-1681, 1991; Poeckel y otros. Carnosic acid and carnosol potently inhibit human 5-lipoxygenase and suppress pro-inflammatory responses of stimulated human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem Pharmacol* 76: 91-97, 2008; Rau y otros. Carnosic Acid and Carnosol, Phenolic Diterpene Compounds of the Labiate Herbs Rosemary and Sage, are Activators of the Human Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma. *Planta Med* 72: 881-887, 2006).

10 Los datos *in vitro* anteriores se sustentan por los datos *en vivo* acerca de las capacidades antioxidantes del CA. La literatura reciente indica los efectos antiglicante y antiobesidad *in vivo* del CA (Alarcon-Aguilar y otros Investigation on the hypoglycaemic effects of extracts of four Mexican medicinal plants in normal and alloxan-diabetic mice. *Phytother Res* 16: 383-386, 2002; Hsieh y otros Low-density lipoprotein, collagen, and thrombin models reveal that *Rosemarinus officinalis* L. exhibits potent antiglycative effects. *J Agric Food Chem* 55: 2884-2891, 2007; Ninomiya y otros Carnosic acid, a new class of lipid absorption inhibitor from sage. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 14: 1943-1946, 2004; Takahashi y otros Carnosic acid and carnosol inhibit adipocyte differentiation in mouse 3T3-L1 cells through induction of phase 2 enzymes and activation of glutathione metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* 382: 549-554, 2009).

20 El ácido rosmarínico (RA) es uno de los componentes principales que se encuentran en la hierbabuena y contribuye de manera importante a su capacidad antioxidante (Fletcher y otros Heat stress reduces the accumulation of rosmarinic acid and the total antioxidant capacity in spearmint (*Mentha spicata* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85: 2429-2436, 2005). El RA, un compuesto fenólico de origen natural, es un éster del ácido cafeico y del ácido 3,4-dihidroxifenil-láctico. Su estructura consiste en un grupo carbonilo, un doble enlace insaturado y un ácido carboxílico entre dos anillos fenólicos. El RA ha mostrado numerosas actividades biológicas, tales como las propiedades antiinflamatorias, antimutagénicas, antibacterianas, antidepresivas, inhibidoras del HIV-1, antioxidantes y antivirales. Estas propiedades han hecho del RA un ingrediente atractivo para las industrias farmacéutica y cosmética. El RA se ha usado tópicamente en Europa como un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (Ritschel y otros. Percutaneous absorption of rosmarinic acid in the rat. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 11: 345-352, 1989). Debido a su uso extensivo como un agente saborizante y conservante en la industria alimentaria, el RA se considera como un ingrediente seguro para el consumo diario (Alkam y otros. A natural scavenger of peroxynitrites, rosmarinic acid, protects against impairment of memory induced by A $\beta$ 25-35. *Behavioural Brain Research* 180: 139-145, 2007).



40 Ácido rosmarínico

45 Se encontró la evidencia de las propiedades protectoras inespecíficas del RA en el cerebro. La actividad antioxidante mejorada del cerebro se demostró después de la administración de RA a ratones envejecidos, que resultó en un aumento de las actividades de la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT) en el cerebro, mientras que disminuyó el malondialdehído (MDA) (Shou y otros. Rosmarinic acid attenuates D-galactose induced behavior impairment in mice and its mechanism. 2010, p. 1723-1726). Estos datos demuestran las propiedades protectoras no específicas del RA como un antioxidante; sin embargo, ningún dato anterior ha demostrado la capacidad del RA para afectar el cerebro en regiones específicas o en resultados clínicos específicos.

55 Tres estudios *in vivo*, evaluaron la administración de RA. Estos estudios administraron el RA oralmente o IP en modelos de lesión intracraneal o en un modelo de estrés que se usaron para representar estados de enfermedad cognitiva específica (Alkam y otros. A natural scavenger of peroxynitrites, rosmarinic acid, protects against impairment of memory induced by A $\beta$ 25-35. *Behavioural Brain Research* 180: 139-145, 2007; Park y otros. Subchronic administration of rosmarinic acid, a natural prolyl oligopeptidase inhibitor, enhances cognitive performances. *Fitoterapia* 81:644-648, 2010; Zhou y otros. Rosmarinic acid attenuates D-galactose induced behavior impairment in mice and its mechanism. *Intl Conf BMEI* 4:1723-1726, 2010). Aunque el RA mostró beneficios en estos modelos, no son un modelo validado para la evaluación de los cambios cognitivos del envejecimiento normal (como en SAMP8). Además, se desconoce si los mecanismos de acción son específicos o no específicos debido a los efectos antioxidantes. Actualmente no hay estudios publicados, en humanos, que evalúen la suplementación con RA solo o mediante el uso de un extracto de hierbabuena.

65 El aprendizaje y la memoria pueden dividirse en dos categorías principales, declarativa y de procedimiento. El declarativo tiene componentes de memoria temporal, espacial y asociativa. Esto se relaciona con el aprendizaje y la memoria que tiene un componente consciente que requiere atención y estado de alerta. En los seres humanos, esto se relaciona con la adquisición, el reconocimiento y la memoria de eventos aislados, lugares, personas y hechos. El aprendizaje declarativo

y la memoria declarativos se miden en el estudio animal descrito actualmente mediante la adquisición en el laberinto en T, la retención en el laberinto en T y el reconocimiento de objetos. El aprendizaje y la memoria de procedimientos pueden formarse cuando una tarea de memoria declarativa se convierte en rutina o habitual y, en el presente estudio en animales, se midió a través de la presión de palanca. Esto se relaciona con el aprendizaje y la memoria que no tienen un componente consciente, que en los humanos es un hábito o habilidad, tal como andar en bicicleta. Las tareas declarativas se consideran iniciadas en el hipocampo, mientras que las tareas de procedimiento se vinculan principalmente a las regiones del caudado del cerebro.

Para la evaluación de los efectos cognitivos resultantes del envejecimiento, el ratón propenso a la senescencia acelerada 8 (SAMP8) es un modelo comprobado de envejecimiento acelerado que desarrolla déficits en el aprendizaje y la memoria a los 8 meses de edad (Yagi H, Kato H, Akiguchi I, Takeda T (1988) Age-related deterioration of ability of acquisition in memory and learning in senescence accelerated mouse: SAM-P/8 as an animal model of disturbances in recent memory. *Neurosci Biobehav Rev.* 474, 86-93; Flood JF, Morley JE (1998) Learning and memory in the SAMP8 mouse. *Neurosci Biobehav Rev.* 22, 1-20). El ratón SAMP8 tiene mutaciones naturales que conducen a aumentos, relacionados con la edad, de la proteína precursora amiloide (A $\beta$ PP) y del beta amiloide (A $\beta$ ) en el cerebro y mayor producción de radicales libres en el sistema nervioso central, que resultan en déficits de aprendizaje y memoria (Butterfield DA, Howard BJ, Yatin S, Akkeb KL, Carney JM (1997) Free radical oxidation of brain proteins in accelerated senescence and its modulation by N-tert-butyl- $\alpha$ -phenylnitron. *Prac Natl Acad Sci USA.* 94, 674-678; Sato E, Kurokawa T, Oda N, Ishibashi S (1996) Early appearance of abnormality of microperoxisomal enzymes in the cerebral cortex of senescence-accelerated mouse. *Mech Ageing Dev.* 92, 175-184). El modelo SAMP8 se ha usado en la literatura para la evaluación de los beneficios cognitivos de diversos ingredientes nutricionales, suplementos y fármacos. Numerosos ejemplos son el ácido alfa lipoico, la n-acetilcisteína (Farr SA, Poon HF, Dogrukol-Ak D, Drake J, Banks WA, Eyerman E, Butterfield DA, Morley JE (2003) The antioxidants  $\alpha$ -lipoic acid and N-acetylcysteine reverse memory impairment and brain oxidative stress in aged SAMP8 mice. *J Neurochemistry.* 84, 1173-1183), ácidos grasos poliinsaturados (Petursdottir AL, Farr SA, Morley JE, Banks WA, Skuladottir GV (2008) Effect of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on brain lipid fatty acid composition, learning ability, and memory of senescence-accelerated mouse. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 63, 1153-1160) y memantina (Zhou, M., Wang, M. -, & Wang, X. -. (2010). Effects of memantine combined with enriched environment therapy on learning and memory abilities and the mental behavior in senescence accelerated mouse. *Journal of Clinical Neurology*, 23(6), 438-441), todos los cuales demostraron beneficios cognitivos positivos en el seguimiento de los ensayos clínicos en humanos (Volchegorskii, I. A., Rassokhina, L. M., Kolyadich, M. I., & Alekseev, M. N. (2011). Comparative study of alpha-lipoic acid and mexidol effects on affective status, cognitive functions and quality of life in diabetes mellitus patients. *Eksperimental'Naya i Klinicheskaya Farmakologiya*, 74(11), 17-23; Chan, A., Remington, R., Kotyla, E., Lepore, A., Zemianek, J., & Shea, T. B. (2010). A Vitamin/nutriceutical formulation improves memory and cognitive performance in community-dwelling adults without dementia. *Journal of Nutrition, Health and Aging*, 14(3), 224-230; Small, G. W., Silverman, D. H. S., Siddarth, P., Ercoli, L. M., Miller, K. J., Lavretsky, H., Phelps, M. E. (2006). Effects of a 14-day healthy longevity lifestyle program on cognition and brain function. *American Journal of Geriatric Psychiatry*, 14(6), 538-545; Litvinenko, I. V., Odinak, M. M., Mogil'Naya, V. I., & Perstnev, S. V. (2010). Use of memantine (akatinol) for the correction of cognitive impairments in Parkinson's disease complicated by dementia. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 40(2), 149-155). Los neurocientíficos que evalúan los ingredientes y/o los fármacos cognitivos reconocen que el SAMP8 es un modelo animal válido que se ha usado exitosamente para predecir su efectividad en el seguimiento de ensayos clínicos en humanos.

El documento WO 2008/090474A describe métodos y composiciones para la producción de alimentos y sustancias nutracéuticas que comprenden ácido rosmarínico de plantas de hierbabuena y su uso en el tratamiento de reacciones alérgicas y enfermedades.

#### Resumen de la invención

La presente invención se refiere a un extracto acuoso de una planta de hierbabuena que comprende ácido rosmarínico al 5 % para usar mediante administración oral en una cantidad de dicho extracto entre 0,01 y 50 mg/kg/día para potenciar, mejorar o mantener terapéuticamente la salud cognitiva y/o la función cognitiva en mamíferos que experimentan los cambios cognitivos normales del envejecimiento.

Se proporciona, además, un extracto acuoso de una planta de hierbabuena que comprende ácido rosmarínico al 5 % para usar mediante administración oral en una cantidad de dicho extracto de entre 0,01 y 50 mg/kg/día en el mantenimiento terapéutico de la función cognitiva normal bajo la interrupción de los ritmos circadianos, como ocurre en una afección seleccionada a partir de la lista que consiste en cambios de zona horaria, embarazo, medicaciones, cambios en la rutina y trabajo por turnos.

En otra modalidad, la invención proporciona un extracto acuoso de una planta de hierbabuena que comprende ácido rosmarínico al 5 % para usar mediante la administración oral en una cantidad de dicho extracto de entre 0,01 y 50 mg/kg/día para tratar o prevenir terapéuticamente un deterioro de la salud cognitiva y/o función cognitiva en un mamífero que experimenta los cambios cognitivos normales del envejecimiento.

La invención se define mediante las reivindicaciones. Cualquier materia que quede fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona solo con propósitos informativos. Cualquier referencia en la descripción a los métodos de

tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para usar en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

La invención consiste en la administración de ácido rosmarínico en un extracto acuoso de una planta de hierbabuena como se define en las reivindicaciones para mejorar el aprendizaje, la memoria, la función ejecutiva (es decir, la memoria de trabajo, el cambio de tareas, la planificación, la flexibilidad, la atención visual, las habilidades matemáticas y su capacidad de reconocer y adaptarse a condiciones, entornos y situaciones nuevas y cambiantes), y comportamientos cognitivos asociados (es decir, concentración, atención, estado de alerta, exploración, motivación y similares) como se define en las reivindicaciones.

El extracto de romero con ácido carnósico muestra una memoria declarativa y un aprendizaje y memoria de procedimientos mejorados. En los mamíferos, esto puede observarse como la memoria potenciada, mejorada o sostenida de eventos aislados, lugares, personas y hechos. Además, puede observarse la capacidad de aprender y retener información o habilidades habituales para mejorar, quizás como un resultado de la capacidad mejorada para hacer asociaciones. El extracto de hierbabuena con ácido rosmarínico muestra una mejoría en el aprendizaje y la memoria declarativos. En los mamíferos, esto puede observarse como un aprendizaje potenciado o mejorado de los eventos aislados, lugares, personas y hechos, junto con una memoria potenciada y sostenida de esas cosas.

El daño oxidativo se considera como una de las características distintivas del proceso de envejecimiento. Se piensa que la disfunción neuronal presente en las alteraciones cognitivas asociadas con el envejecimiento, en gran parte ocurre como consecuencia del estrés oxidativo. Tanto el daño estructural como el funcional en la mitocondria están presentes en los trastornos cognitivos, tales como la enfermedad de Alzheimer, lo que sugiere que los antioxidantes que penetran tanto en la célula como en la mitocondria proporcionarán la mayor protección contra el estrés oxidativo. El presente estudio se diseñó para evaluar si dos ingredientes novedosos, basados en antioxidantes patentados, el extracto de romero y el extracto de hierbabuena estandarizados en base a su contenido de ácido carnósico y ácido rosmarínico respectivamente, podrían mejorar el aprendizaje y la memoria en el modelo de ratón SAMP8 de envejecimiento acelerado. Anteriormente, demostramos la capacidad de los antioxidantes para mejorar los déficits de aprendizaje y memoria en los ratones SAMP8 y revertir los signos de daño oxidativo; por lo tanto, los ratones SAMP8 constituyen un modelo excelente para evaluar estos compuestos antioxidantes. Los ratones SAMP8 se ubicaron para recibir uno de tres extractos. Dos extractos de romero (comparativos) contenían ácido carnósico (60 % de ácido carnósico y 10 % de ácido carnósico) y un extracto de hierbabuena de acuerdo con la invención contenía 5 % de ácido rosmarínico. Se evaluaron tres dosis de cada extracto: 32 mg/kg, 16 mg/kg, 1,6 mg/kg del principio activo (CA o RA, para los extractos de romero y hierbabuena, respectivamente) y control del vehículo. Una cepa de SAMP8 con 50 % de retrocruzamiento sirvió como control que, además, recibió el vehículo. Después de 90 días de tratamiento, los ratones se evaluaron en 3 pruebas conductuales, evitación de choque eléctrico en las patas en el laberinto en T, reconocimiento de objetos y presión de palanca. El extracto de romero que contiene 60 % de ácido carnósico mejoró la adquisición con la dosis de CA de 32 mg/kg y la retención en las tres dosis del principio activo en la evitación del choque eléctrico en las patas en el laberinto en T, y fue capaz de mejorar el reconocimiento de objetos y la presión de palanca con las dosis de CA de 16 y 32 mg/kg. El extracto de romero con 10 % de ácido carnósico mejoró la retención en la evitación del choque eléctrico en las patas en el laberinto en T (dosis de CA de 16 mg/kg) y la presión de palanca con las dosis de CA de 16 y 32 mg/kg. La hierbabuena con 5 % de ácido rosmarínico mejoró la adquisición (dosis de RA de 16 y 32 mg/kg) y la retención (en todas las dosis de RA) en el laberinto en T. Además, la hierbabuena con 5 % de ácido rosmarínico mejoró el reconocimiento de objetos con las dosis de RA de 16 y 32 mg/kg. El 4-hidroxiacetona (HNE) disminuyó en la corteza cerebral después del tratamiento con los tres extractos en comparación con el grupo de SAMP8 tratado con vehículo. Los carbonilos de proteínas disminuyeron en el hipocampo después de la administración de romero con ácido carnósico al 10 % y hierbabuena que contiene ácido rosmarínico al 5 %. Los presentes resultados indican que los extractos de hierbabuena (ácido rosmarínico) y romero (ácido carnósico) tienen efectos beneficiosos en el aprendizaje y la memoria y en los marcadores de oxidación del tejido cerebral que surgen con la edad en los ratones SAMP8.

Breve descripción de las figuras

Las Figuras 1-8 son para referencia.

La Figura 1 presenta los gráficos del efecto del ácido carnósico al 60 % en la adquisición del laberinto en T, la retención en el laberinto en T, el reconocimiento de objetos y la presión de palanca.

La Figura 2 presenta los gráficos de los marcadores de estrés oxidativo en la corteza cerebral después de la administración de extracto de romero que contiene 60 % de ácido carnósico; los resultados se expresan en porcentaje de cambio con respecto al grupo control SAMP8 tratado con vehículo; el \* indica  $P < 0,05$  y el \*\* indica  $P < 0,01$ .

La Figura 3 presenta los gráficos de los marcadores de estrés oxidativo en el cuerpo estriado del cerebro después de la administración de extracto de romero que contiene 60 % de ácido carnósico; los resultados se expresan en porcentaje de cambio con respecto al grupo control de SAMP8 tratado con vehículo; el \* indica  $P < 0,05$  y el \*\* indica  $P < 0,01$ .

La Figura 4 presenta los gráficos de los marcadores de estrés oxidativo en el hipocampo del cerebro después de la administración de extracto de romero que contiene 60 % de ácido carnósico; los resultados se expresan en porcentaje de cambio con respecto al grupo control de SAMP8 tratado con vehículo; el \* indica  $P < 0,05$  y el \*\* indica  $P < 0,01$ .

La Figura 5 presenta los gráficos del efecto del ácido carnósico al 10 % en la adquisición del laberinto en T, la retención en el laberinto en T, el reconocimiento de objetos y la presión de palanca.

La Figura 6 presenta los gráficos de los marcadores de estrés oxidativo en la corteza del cerebro después de la administración de extracto de romero que contiene 10 % de ácido carnósico; los resultados se expresan en porcentaje de cambio con respecto al grupo control de SAMP8 tratado con vehículo; el \* indica  $P < 0,05$  y el \*\* indica  $P < 0,01$ .

5 La Figura 7 presenta los gráficos de los marcadores de estrés oxidativo en el cuerpo estriado del cerebro después de la administración de extracto de romero que contiene 10 % de ácido carnósico; los resultados se expresan en porcentaje de cambio con respecto al grupo control de SAMP8 tratado con vehículo; el \* indica  $P < 0,05$  y el \*\* indica  $P < 0,01$ .

La Figura 8 presenta los gráficos de los marcadores de estrés oxidativo en el hipocampo del cerebro después de la administración de extracto de romero que contiene 10 % de ácido carnósico; los resultados se expresan en porcentaje de cambio con respecto al grupo control de SAMP8 tratado con vehículo; el \* indica  $P < 0,05$  y el \*\* indica  $P < 0,01$ .

10 La Figura 9 presenta los gráficos del efecto del ácido rosmarínico al 5 % en la adquisición del laberinto en T, la retención en el laberinto en T, el reconocimiento de objetos y la presión de palanca.

La Figura 10 presenta los gráficos de los marcadores de estrés oxidativo en la corteza del cerebro después de la administración de extracto de romero que contiene 5 % de ácido rosmarínico; los resultados se expresan en porcentaje de cambio con respecto al grupo control de SAMP8 tratado con vehículo; el \* indica  $P < 0,05$  y el \*\* indica  $P < 0,01$ .

15 La Figura 11 presenta los gráficos de los marcadores de estrés oxidativo en el cuerpo estriado del cerebro después de la administración de extracto de romero que contiene 5 % de ácido rosmarínico; los resultados se expresan en porcentaje de cambio con respecto al grupo control de SAMP8 tratado con vehículo; el \* indica  $P < 0,05$  y el \*\* indica  $P < 0,01$ .

20 La Figura 12 presenta los gráficos de los marcadores de estrés oxidativo en el hipocampo del cerebro después de la administración de extracto de romero que contiene 5 % de ácido rosmarínico; los resultados se expresan en porcentaje de cambio con respecto al grupo control de SAMP8 tratado con vehículo; el \* indica  $P < 0,05$  y el \*\* indica  $P < 0,01$ .

#### Descripción de la invención

25 El presente estudio se diseñó para evaluar si el extracto de romero con CA (comparativo) y el extracto de hierbabuena con RA (de acuerdo con la invención) podrían mejorar todas las facetas de la salud cognitiva y/o el funcionamiento cognitivo, que incluye, pero no se limita a: la atención, el estado de alerta, el reconocimiento, la memoria, el tiempo de reacción, la concentración, la motivación, el comportamiento, la función ejecutiva, el aprendizaje y la memoria. Las moléculas de CA y RA se escogieron específicamente debido a sus propiedades únicas: 1) capacidad de estas moléculas para atravesar la barrera hematoencefálica; 2) diferente solubilidad (aceite vs. agua); y 3) capacidad antioxidante potenciada. Los dos extractos se evaluaron en la cepa de ratón SAMP8 (un modelo de ratón de senescencia acelerada). La cepa de ratón SAMP8 exhibe un inicio temprano de los déficits de aprendizaje y memoria debido a la demencia que resulta del desarrollo de la placa beta amiloide y del estrés oxidativo. El ratón SAM 50 % sirvió como control.

#### Definiciones

35 Como se usó en esta solicitud, los siguientes términos tienen los significados que se detallan más abajo.

Estado de alerta: El estado de prestar una atención cercana y continua, ser vigilante y rápido para enfrentar el peligro o la emergencia, o ser rápido para percibir y actuar.

40 Salud Cognitiva: La salud cognitiva se refiere a la salud del cerebro, los tejidos y el suministro de sangre en general, así como también a su capacidad para funcionar adecuadamente en diversas condiciones. La buena salud cognitiva es vital para que el cerebro realice todos los procesos mentales; conocidos conjuntamente como cognición que incluye, pero no se limita a, el aprendizaje, la intuición, la racionalidad, el lenguaje, la atención, el estado de alerta, la concentración y la memoria (tanto a largo como a corto plazo); en el máximo rendimiento. La mala salud cognitiva debido al envejecimiento, a las enfermedades y/u otros deterioros cognitivos disminuyen la capacidad del cerebro para funcionar adecuadamente, lo que resulta en un deterioro significativo de la función cognitiva y el rendimiento.

50 Función Cognitiva: Cualquier proceso mental o intelectual que involucre operaciones neurológicas o simbólicas, que incluyen, pero no se limitan a, la comunicación, la percepción, la comprensión, el razonamiento, la memoria, el pensamiento, la conciencia, la concentración, la atención, el estado de alerta, la motivación, el sacar conclusiones, la función ejecutiva, la creación de imaginación y la capacidad para el enjuiciamiento. En los sistemas de modelos animales, la función cognitiva puede medirse de diversas maneras convencionales conocidas en la técnica, que incluyen el uso de un laberinto acuático de Morris (MWM), un laberinto circular de Barnes, un laberinto de brazos radiales elevados, un laberinto en T o cualquier otro laberinto en el que los animales usan la información espacial. Otras pruebas conocidas en la técnica pueden usarse, además, para evaluar la función cognitiva, tales como las tareas de reconocimiento de objetos novedosos y de reconocimiento de olores.

60 Función Ejecutiva: Procesos cognitivos que regulan, controlan y administran otros procesos cognitivos, tales como la planificación, la memoria de trabajo, la atención, la resolución de problemas, el razonamiento verbal, la capacidad matemática, la inhibición, la flexibilidad mental, el cambio de tareas, la iniciación, la flexibilidad, la atención visual, las habilidades matemáticas, la adaptabilidad a los ambientes nuevos y cambiantes y el control de las acciones.

65 Aprendizaje: El acto, proceso o experiencia de adquirir conocimiento o habilidad; modificaciones psicológicas o conductuales, especialmente a través de la experiencia o del condicionamiento.

Memoria: La recopilación de información obtenida del aprendizaje o de experiencias pasadas que se almacena en la mente de una persona. Una pieza de información, tal como la imagen mental de una experiencia, que se almacena en la memoria. La capacidad de recordar experiencias pasadas o información aprendida, que involucran procesos mentales avanzados tal como el aprendizaje, la retención, el recuerdo, y el reconocimiento, y que resulta de cambios químicos entre las neuronas en numerosas áreas diferentes del cerebro, que incluye el hipocampo. Se incluyen (1) el aprendizaje declarativo o la memoria, que se refiere a lo que puede recordarse conscientemente, tales como los hechos y el conocimiento, (2) la memoria de trabajo, que se refiere a la retención activa de múltiples piezas de información transitoria en la mente donde pueden manipularse, (3) memoria de referencia, que se refiere a la información obtenida de la experiencia anterior, ya sea reciente o remota, (4) memoria de reconocimiento, que es la capacidad de reconocer eventos, objetos o personas encontrados anteriormente, y (5) memoria asociativa, que es la capacidad de aprender y recordar la relación entre elementos no relacionados. Cada uno de estos tiene un componente inmediato, a corto y largo plazo. La memoria inmediata perdura durante solo unos pocos segundos. La memoria a corto plazo almacena información que se ha procesado mínimamente y está disponible solo durante unos pocos minutos, como recordar un número de teléfono el tiempo suficiente para usarlo. La memoria a corto plazo se transfiere a la memoria a largo plazo, que puede perdurar durante muchos años, solo cuando el uso repetido de la información facilita los cambios neuroquímicos que permiten su retención.

Cantidad con eficacia terapéutica: La cantidad de un compuesto o composición, o derivados de este, de la presente invención es una cantidad que, cuando se administra a un sujeto, tendrá el efecto terapéutico deseado. El efecto terapéutico completo no necesariamente ocurre por la administración de una dosis, y puede ocurrir solo después de la administración de una serie de dosis. Por lo tanto, una cantidad con eficacia terapéutica puede administrarse en una o más administraciones. La cantidad efectiva precisa necesaria para un sujeto dependerá, por ejemplo, del tamaño, la salud y la edad del sujeto, la naturaleza y la magnitud del deterioro cognitivo, y los productos terapéuticos o la combinación de productos terapéuticos seleccionados para la administración, y el modo de administración. El experto puede determinar fácilmente la cantidad efectiva para una situación dada mediante la experimentación de rutina. En una modalidad, el extracto de hierbabuena de acuerdo con la invención es para la administración en una frecuencia diaria o más de una vez al día, por ejemplo, 2, 3 o 4 veces al día. Tratamiento o Terapia: La intervención clínica es un intento por alterar el curso natural del individuo, animal o célula que se trata, y puede realizarse ya sea para la profilaxis o durante el curso de la patología clínica. Los efectos convenientes incluyen prevenir la ocurrencia o la recurrencia de la enfermedad, el alivio de los síntomas, la disminución de cualquiera de las consecuencias patológicas directas o indirectas de la enfermedad, la disminución de la velocidad de progresión de la enfermedad, la mejoría o el alivio del estado patológico, y la remisión o la mejora del pronóstico. Una afección o sujeto se refiere a tomar los pasos para obtener resultados beneficiosos o convenientes, que incluyen los resultados clínicos. Los resultados clínicos beneficiosos o convenientes incluyen, pero no se limitan a, potenciar, mejorar o mantener la función y/o la salud cognitivas, aliviar o mejorar uno o más de los síntomas asociados con el deterioro cognitivo leve, o el deterioro cognitivo relacionado con la edad, retraso o ralentización de ese deterioro, alivio, paliación o estabilización de ese deterioro, y otros resultados beneficiosos, tales como la mejoría de la función cognitiva o una disminución de la velocidad del deterioro de la función cognitiva en sujetos con deterioro cognitivo relacionado con la edad o en riesgo de este

#### Ejemplo 1

El daño oxidativo se considera como una de las características distintiva del proceso de envejecimiento [Harman D (2002) Alzheimer's disease: role of aging in pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 959, 384-395]. Se piensa que la disfunción neuronal presente en las enfermedades asociadas con el envejecimiento, tales como la enfermedad de Alzheimer, en gran parte ocurre a partir del estrés oxidativo. [Markesbery WR (1997) Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med.* 23, 134-147; Polidori MC, Griffiths HR, Mariani E, Mecocci P (2007) Hallmarks of protein oxidative damage in neurodegenerative diseases: focus on Alzheimer's disease. *Amino Acids.* 32, 553-559]. El daño estructural y funcional a la mitocondria está presente en la enfermedad de Alzheimer, lo que sugiere que los antioxidantes que penetran fácilmente tanto en la célula como en la mitocondria proporcionarán la mayor protección contra el estrés oxidativo [Skulachev VP, Anisimov VN, Antonenko YN, Bakeeva LE, Chernyak BV, Elichev VP, Filendo OF, Kalinia NI, Kapelko VI, Kolosova NG, Kopin BP, Korshunova GA, Lichinitser MR, Obukhova LA, Pasyukova EG, Pisarenko OI, Roginsky VA, Ruuge EK, Senin II, Severina II, Skulachev MV, Spivak IM, Tashlitsky VN, Tkachuk VA, Vyssokikh MY, Yaguzhinsky LS, Zorov DB (2009) An attempt to prevent senescence: a mitochondrial approach. *Biochim Biophys Acta.* 1787, 437-461; Suh JH, Shigeno ET, Morrow JD, Cox B, Rocha AE, Frei B, Hagen TM (2001) Oxidative stress in the aging rat heart is reversed by dietary supplementation with (R)-( $\alpha$ )-lipoic acid. *FASEB J.* 15, 700-706]. El ratón propenso a la senescencia acelerada 8 (SAMP8) es un modelo de envejecimiento acelerado que desarrolla déficits en el aprendizaje y la memoria a los 8 meses de edad [Yagi, y otros, 1988; Flood, y otros, 1998]. El ratón SAMP8 tiene una mutación natural que, conduce a aumentos, relacionados con la edad, de la proteína precursora amiloide (A $\beta$ PP) y el beta amiloide (A $\beta$ ) en el cerebro, déficits de aprendizaje y memoria y estrés oxidativo. Además, los antisentido de A $\beta$ PP potencian la memoria y el aprendizaje en estos ratones [Morley JE, Farr SA, Flood JF (2002) Antibody to amyloid beta protein alleviates impaired acquisition, retention, and memory processing in SAMP8 mice. *Neurobiol Learn Mem.* 78, 125-38; Kumar VB, Farr SA, Flood JF, Kamelesh V, Franko M, Banks WA, Morley JE (2000) Site-directed antisense oligonucleotide decreases the expression of amyloid precursor protein and reverses deficits in learning and memory in aged SAMP8 mice. *Peptides.* 21, 1769-1775]. Además, los ratones SAMP8 aumentaron la producción de radicales libres en el sistema nervioso central [Butterfield, y otros, 1997; Sato, y otros, 1996] asociados con disfunción mitocondrial [Fujibayashi Y, Yamamoto S, Waki A, Jibusgu Hm

Yonekura Y (1998) Increased mitochondrial DNA deletion in the brain of SAMP8, a mouse model for spontaneous oxidative stress brain. *Neurosci Lett.* 254, 109-112].

Se encontró que los antioxidantes revierten los déficits de aprendizaje y memoria en ratones SAMP8. El ácido alfa lipoico y la n-acetil cisteína potencian la memoria e invierten los índices de estrés oxidativo en estos ratones [Farr, y otros, 2003]. El ácido alfa lipoico disminuyó significativamente los niveles de carbonilo de la lactato deshidrogenasa B, la proteína similar a la dihidro pirimidasa y la alfa enolasa [Poon HF, Farr SA, Thongboonkerd V, Lynn BC, Banks WA, Morley JE, Klein JB, Butterfield DA (2005) Proteomic analysis of specific brain proteins in aged SAMP8 mice treated with alpha-lipoic acid: implications for aging and age-related neurodegenerative disorders. *Neurochem Int.* 45, 159-68]. Además, se encontró que los polifenoles antioxidantes mejoran el aprendizaje y la memoria en ratones SAMP8 e invierten los índices de estrés oxidativo [Farr SA, Price TO, Domnguez LJ, Motisi A, Saiano F, Niehoff ML, Morley JE, Banks WA, Ercal N, Barbagallo M (2012) Extra virgin olive oil improves learning and memory in SAMP8 mice. *J Alzheimer's Dis* 28, 81-92].

Se encontró que el ácido carnósico (CA) y el ácido rosmarínico (RA) son neuroprotectores y preventivos contra el estrés oxidativo [Fadel O, El Kirat K, Morandat S (2011) The natural antioxidant rosmarinic acid spontaneously penetrates membranes to inhibit lipid peroxidation in situ. *Biochim Biophys Acta* 1808, 2973-2980; Fallarini S, Miglio G, Paoletti T, Minassi A, Amoroso A, Bardelli C, Brunelleschi S, Lombardi G (2009) Clovamide and rosmarinic acid induce neuroprotective effects in invitro models of neuronal death. *Br J Pharmacol* 157, 1072-1084; Hou CW, Lin YT, Chen YL, Wang YH, Chou JL, Ping LY, Jeng KC (2012) Neuroprotective effects of carnosic acid on neuronal cells under ischemic and hypoxic stress. *Nutr Neurosci* [Epub]]. El ácido carnósico tiene, además, un efecto antiinflamatorio después de la administración de LPS [19]. La protección contra el estrés oxidativo y la inflamación se ha asociado con una mejoría de la memoria en las enfermedades del envejecimiento [Farr, y otros, 2012]. El ácido rosmarínico mejoró la memoria en la tarea espacial del laberinto acuático de Morris [Park DH, Park SJ, Kim JM, Jung WY, Ryu JH (2010) Subchronic administration of rosmarinic acid, a natural prolyl oligopeptidase inhibitor, enhances cognitive performance. *Fitoterapia* 81, 644-648].

La memoria se divide en dos categorías principales, declarativa (o memoria explícita) y de procedimiento (o memoria implícita). La memoria declarativa se subdivide, además, en semántica (hechos o significado) y episódica (experiencias específicas). La memoria semántica se deriva generalmente de la memoria episódica. Se piensa que las memorias declarativas se codifican por el hipocampo, mientras que las memorias de procedimiento se piensan que se codifican por el caudado, una estructura dentro del cuerpo estriado. La memoria de procedimiento o implícita proviene de aprender la asociación entre una respuesta y una recompensa. Las memorias de procedimiento con frecuencia comienzan como memorias declarativas hasta que se arraigan o se convierten en un hábito.

La tarea de evitar el choque eléctrico en las patas en el laberinto en T representa la memoria declarativa episódica. Esta tiene componentes de memoria temporal, espacial y asociativa. Los ratones deben aprender a asociar un timbre y la apertura de la puerta con el inicio del choque eléctrico [Farr SA, Banks WA, La Scola ME, Flood JF, Morley JE (2000) Permanent and temporary inactivation of the hippocampus impairs T-maze footshock avoidance acquisition and retention. *Brain Res.* 872, 242-249]. Además, deben saber si giran a la izquierda o a la derecha para escapar o evitar el choque eléctrico. Finalmente, tiene un componente temporal en el que aprenden que, después de la apertura de la puerta y el inicio simultáneo del timbre, tienen 5 segundos para correr hacia la caja que representa la meta (a la izquierda o derecha al final del pasillo) para evitar el choque eléctrico.

La memoria de reconocimiento de objetos es una forma de memoria declarativa o explícita. Es la capacidad de reconocer eventos, objetos o personas encontradas anteriormente [Medina JH, Bekinschtein P, Commarota M, Izquierdo I (2008) Do memories consolidate to persist or do they persist to consolidate? *Behav Br Res* 192:61-69]. En esta tarea, los ratones que recuerdan los objetos anteriores que ellos han visto, dedicarán una mayor cantidad de tiempo en la exploración del objeto nuevo o novedoso en la prueba de retención. Esta prueba es, además, una prueba del hipocampo. Los estudios demostraron que las lesiones dentro del hipocampo resultan en déficits en la memoria 24 horas después de la primera exposición [Hammond RS, Tull LE, Stachman RW (2004) On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition. *Neurobiol Learn Mem* 82, 26-34]. Las pruebas en humanos que evalúan el reconocimiento muestran a los sujetos listas de palabras u objetos y después, luego de las pruebas de retención, cambian algunas de las palabras u objetos y les piden a los sujetos que identifiquen aquellos que encontraron anteriormente.

La presión de la palanca es una tarea operante. Los ratones aprenden a asociar la presión de la palanca con una recompensa de comida. Inicialmente, esta prueba utiliza la memoria declarativa para formar la asociación, pero una vez que se ha formado la asociación, se convierte en una tarea de procedimiento que involucra principalmente la región caudada del cerebro [Beninger RJ, Ranaldi R (1993) Microinjections of flupenthixol into the caudate-putamen but not the nucleus accumbens, amygdala or frontal cortex of rats produce intra-session declines in food-rewarded operant responding *Behav Brain Res* 55, 203-212]. A veces, la presión de la palanca se conoce como una caja de Skinner con posterioridad, por el nombre de su inventor.

El presente estudio se diseñó para evaluar si estos dos antioxidantes novedosos que se encuentran en el extracto de romero y en el extracto de hierbabuena, el ácido carnósico y el ácido rosmarínico, respectivamente, podrían mejorar el aprendizaje y la memoria en el modelo de envejecimiento acelerado del ratón SAMP8. Anteriormente, hemos demostrado la capacidad de los antioxidantes para mejorar los déficits de aprendizaje y memoria en los ratones SAMP8 e invertir los

signos de daño oxidativo [Farr, y otros, 2003; Morley JE, Ambrecht HJ, Farr SA, Kumar VB (2012) The senescence accelerated mouse (SAMP8) as a model for oxidative stress and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1822]; por lo tanto, los ratones SAMP8 constituyen un excelente modelo para evaluar estos compuestos antioxidantes [Farr SA, Yamada KA, Butterfield DA, Abdul HM, Xu L, Miller NE, Banks WA, Morley JE (2008) Obesity and hypertriglyceridemia produce cognitive impairment. *Endocrinology* 149, 2628-2636].

#### Materiales y Métodos

##### Ratones.

Al inicio del tratamiento, los sujetos para los experimentos fueron ratones SAMP8 de 9 meses de edad. El grupo control fue de ratones SAM 50 % de 9 meses de edad, un cruzamiento entre un ratón macho SAMP8 y un ratón hembra CD-1, que no muestra deterioro relacionado con la edad en el aprendizaje y la memoria. Estos estudios se realizaron con la aprobación del Comité para el Cuidado y Uso de Animales en el Centro Médico VA, St. Louis, MO.

##### Tratamiento.

Los ratones SAMP8 de nueve meses de edad recibieron extracto de romero que contenía 60 % o 10 % de CA (en aceite de girasol) o extracto de hierbabuena que contenía 5 % de RA (en agua) durante 12 semanas a través de sonda oral una vez al día.

Los ratones se organizaron en 7 grupos:

1. Ratones SAMP8 a los que se administró extracto de romero que contiene 60 % de CA (CA60);
2. Ratones SAMP8 a los que se administró extracto de romero que contiene 10 % de CA (CA10);
3. Ratones SAMP8 a los que se administró extracto de hierbabuena que contiene 5 % de RA (RA5) (de acuerdo con la invención);
4. Ratones SAMP8 a los que se administró aceite de girasol como un control negativo para los grupos 1 y 2;
5. Ratones SAMP8 a los que se administró agua como un control negativo para el grupo 3;
6. Ratones SAMP con 50 % de retrocruzamiento a los que se les administró aceite de girasol como un control positivo para los grupos 1 y 2; y
7. Ratones SAMP con 50 % de retrocruzamiento a los que se administró agua como un control positivo para el grupo 3.

Se realizaron curvas de dosis-respuesta para cada extracto evaluado. Las dosis evaluadas fueron 1,6 mg/kg, 16 mg/kg, 32 mg/kg del principio activo (ya sea CA o RA, de romero y hierbabuena, respectivamente) y los grupos de vehículo para cada uno de los tres extractos enumerados anteriormente. Los pesos corporales se registraron semanalmente durante todo el estudio y las pruebas conductuales comenzaron en la duodécima semana de alimentación.

##### Evaluaciones Conductuales.

Las pruebas conductuales se iniciaron en la duodécima semana de tratamiento. Primero, durante la semana 12 los ratones se entrenaron en el laberinto en T para evitar el choque eléctrico en las patas (adquisición del laberinto en T) y la retención del laberinto en T de esta tarea se evaluó en la semana 13, seguido del reconocimiento de objetos en la semana 13. La presión de la palanca se realizó durante las semanas 14 y 15.

##### Entrenamiento en el laberinto en T y procedimientos de evaluación

El laberinto en T es una tarea de aprendizaje basada en la memoria de trabajo y una tarea de memoria de referencia declarativa. El laberinto en T consiste en un callejón de plástico negro con una caja de inicio en un extremo y dos cajas que representan la meta en los otros extremos de los brazos en forma de T. La caja de inicio se separa del callejón por una puerta plástica de guillotina que impide el movimiento por el callejón hasta que se levanta al inicio del entrenamiento. Un piso electrizable de varillas de acero inoxidable corre por todo el laberinto para suministrar un leve y enrevesado choque eléctrico en las patas.

A los ratones no se les permite explorar el laberinto antes del entrenamiento. Las pruebas de entrenamiento comienzan cuando se coloca un ratón en la caja de inicio, se levanta la puerta de guillotina y simultáneamente suena un timbre de señal; 5 segundos más tarde se aplica un choque eléctrico en las patas. El brazo del laberinto por el cual ingresa el ratón en la primera prueba se designa como caja "incorrecta" y se continúa con el leve choque eléctrico en las patas hasta que el ratón entra en la otra caja que representa la meta. Esta caja que representa la meta se designa como "correcta" para el ratón particular en todas las pruebas posteriores. Al final de cada prueba, el ratón se devuelve a su jaula de origen hasta la siguiente prueba.

Los ratones se entrenaron hasta que hicieron una evitación (adquisición en el laberinto en T). El entrenamiento se realiza con intervalos de 35 segundos entre las pruebas, el timbre fue del tipo de timbre de puerta, que suena a 55 dB, y el choque eléctrico se establece a 0,35 mA (modelo E13-08 de generación de choque eléctrico de piso en rejilla alambrada de Coulbourn Instruments). La retención del laberinto en T se evaluó una semana después mediante entrenamiento continuo.

Los resultados se describen como el número de ensayos para el criterio para la prueba de retención. El criterio se define como la evitación del choque eléctrico ligero en las patas, 5 veces en 6 intentos consecutivos.

#### Reconocimiento de Objetos y Lugar

5 El reconocimiento de objetos y lugares es una tarea de memoria declarativa que involucra al hipocampo cuando, como se realiza aquí, el intervalo de exposición de retención es de 24 horas después de la exposición inicial a los objetos [Farr, y otros, 2012]. Los ratones se habituaron a un aparato vacío durante 5 minutos al día por espacio de 3 días antes de la  
10 entrada de los objetos. Durante la sesión de entrenamiento, el ratón se expuso a dos objetos similares (ranas de plástico) que se le permitió examinar durante 5 minutos. El aparato y los objetos se limpiaron entre cada ratón. Veinticuatro horas más tarde, el ratón se expuso a uno de los objetos originales y a un objeto novedoso en una nueva ubicación. Se registró el porcentaje de tiempo dedicado a examinar los objetos. El objeto novedoso estaba hecho del mismo material que el  
15 objeto original y del mismo tamaño, pero con una forma diferente. Esto eliminó la posibilidad de que el olor asociado con un objeto particular sea un factor desconcertante. El concepto subyacente de la tarea se basa en la tendencia de los ratones a dedicar más tiempo en la exploración de los objetos nuevos, novedosos, más que a los objetos familiares. Por lo tanto, cuanto mayor sea la retención/memoria a las 24 horas, más tiempo le dedica al nuevo objeto.

#### Presión de la Palanca para Recompensa con Leche

20 La presión de la palanca es una tarea de memoria y aprendizaje asociativo de procedimiento (operante). Los ratones se colocan en una cámara totalmente automatizada para la presión de la palanca. Al presionar una palanca en una pared del compartimiento, aparece, en la pared opuesta, una luz y un cazo para líquido con 100  $\mu$ L de leche. En el día 1, los ratones tienen 11 segundos para obtener la recompensa; en todos los días siguientes, los ratones tienen 6 segundos para  
25 obtener la recompensa. Los ratones recibieron sesiones de entrenamiento de 40 minutos en M, W, F durante dos semanas. Los ratones se privaron de alimentos 16 horas antes del inicio de la prueba para proporcionar la motivación para realizar la tarea. La comida se devuelve inmediatamente después de la terminación de una sesión. La adquisición se midió como el número de presiones de palanca recompensadas [Farr SA, Yamada KA, Butterfield DA, Abdul HM, Xu L, Miller NE, Banks WA, Morley JE (2008) Obesity and hypertriglyceridemia produce cognitive impairment. *Endocrinology* 149, 2628-2636].

#### 30 Estrés Oxidativo del Cerebro

##### Preparación de Muestras

35 Las muestras de cerebro se homogeneizaron brevemente con un homogeneizador de tejidos Wheaton en un tampón de lisis helado (pH 7,4) que contiene sacarosa 320 mM, Tris-HCl 1 % mM (pH 8,8), MgCl<sub>2</sub> 0,098 mM, EDTA 0,076 mM e inhibidores de proteinasa leupeptina (0,5 mg/mL), pepstatina (0,7  $\mu$ g/mL), aprotinina (0,5 mg/mL) y PMSF (40  $\mu$ g/ml) y un coctel inhibidor de la fosfatasa. Después, las muestras homogeneizadas se diluyeron 2X con tampón de lisis. Después de la homogeneización, a una pequeña alícuota de las muestras homogeneizadas se le aplicó ultrasonido durante 10  
40 segundos a una potencia del 20 % con un Desmembrador Sónico Fisher 550 (Pittsburgh, PA, EE.UU.) y se congeló. El homogeneizado restante se centrifugó a 3 000 g durante 5 minutos y las fracciones membranosas y citosólicas del sobrenadante se transfirieron a otro conjunto de tubos. Después de la adición de 400  $\mu$ L de tampón de lisis, la fracción nuclear restante del sedimento se centrifugó a 3 000 g durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. El sedimento se suspendió en 20  $\mu$ L de tampón de lisis e inhibidor. Las fracciones membranosas y citosólicas del sobrenadante se  
45 centrifugaron a 10 000 g durante 10 minutos, y la fracción citosólica del sobrenadante resultante se transfirió a otro conjunto de tubos y se dejó la fracción membranosas del sedimento. Todas las muestras sometidas a ultrasonido y las fracciones se almacenaron a -70 °C hasta que se usaron para experimentos posteriores. Las concentraciones de proteína se midieron a través del Ácido Bicínico de Pierce (BCA)

#### 50 Análisis de transferencia de ranura

##### Carbonilos de proteína

55 Para la detección de los carbonilos de las proteínas, se empleó el análisis de transferencia de ranura del aducto de bases schiff 2,4-dinitrofenil hidrazona (DNP) de los carbonilos. Alícuotas de las muestras de 5  $\mu$ L se incubaron a temperatura ambiente con 5  $\mu$ L de dodecil sulfato de sodio al 12 % y 10  $\mu$ L de 2,4-dinitrofenilhidracina (del kit de oxidación de proteína OxyBlot, Chemicon-millipore, Billerica, MA, EE.UU.) durante 20 minutos, seguidos por la adición, a cada muestra, de 7,5  $\mu$ L de solución de neutralización que contiene Tris (2 M) en glicerol al 30 %. Seguidamente las muestras de derivatización se diluyeron a 1  $\mu$ g/mL mediante el uso de una solución tampón de fosfato (PBS) 1x que contiene cloruro  
60 de sodio, fosfato mono y dibásico de sodio. Las soluciones de la muestra correspondiente (250  $\mu$ L) se cargaron rápidamente como duplicados en una membrana de nitrocelulosa mediante la presión de vacío de agua. Después, la proteína unida a la membrana de nitrocelulosa resultante se bloqueó con una solución de bloqueo recién preparada, que contiene 750 mg de albúmina de suero bovino (BSA) en 25 mL de solución de lavado de transferencia que contiene cloruro de sodio 35,2 g, fosfato de sodio monobásico 1,77 g, fosfato de sodio dibásico 9,61 g y TWEEN 1,6 mL diluidos hasta 4  
65 L con agua desionizada durante 90 minutos. La membrana se incubó después con anticuerpo policlonal RbxDNP (del kit de oxidación OxyBlot Protein, Chemicon-millipore, Billerica, MA, EE.UU., Dilución 1:100) en una solución de lavado de

transferencia durante 2 horas. Después de tres lavados de 5 minutos con solución de lavado de transferencia recién preparada, la membrana se incubó después con IgG policlonal anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina (Chemicon, Temecula, CA, EE.UU., Dilución 1:8000) durante 1 hora y se lavó con solución de lavado de transferencia recién preparada, en tres incrementos de 5, 10 y 10 minutos. Después del lavado, la membrana se desarrolló colorimétricamente mediante el uso de una solución de reactivo de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato/azul de nitro tetrazolio para el anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina. Después del desarrollo, las transferencias se secaron y se escanearon en un escáner CanoScan8800F (Canon) mediante el uso de Adobe Photoshop y se analizaron mediante el uso del programa informático Scion Image (Scion Corporation).

#### 10 4-Hidroxi-2-trans-noneal (HNE)

Los niveles de HNE unidos a proteínas se usan como un marcador de la peroxidación de lípidos y se determinaron como se describió anteriormente [29]. Para análisis de transferencia por ranura de la detección de proteínas unidas al HNE, se incubaron alícuotas de muestra de 5  $\mu$ L a temperatura ambiente con 5  $\mu$ L de dodecilsulfato de sodio al 12 % y 10  $\mu$ L de tampón Laemmli durante 20 minutos, seguido de la dilución a 1  $\mu$ g/mL mediante el uso de Solución tampón de fosfato (PBS) 1x que contiene cloruro de sodio, fosfato mono y dibásico de sodio. Las soluciones de la muestra correspondiente (250  $\mu$ L) se cargaron rápidamente como duplicados en una membrana de nitrocelulosa mediante la presión de vacío de agua. La proteína unida a la membrana de nitrocelulosa resultante se bloqueó con una solución de bloqueo, recién preparada, durante 90 minutos. Después la membrana se incubó con un anticuerpo policlonal anti-HNE (Alpha diagnostic, San Antonio, TX, EE. UU., dilución 1:5000) en solución de lavado de transferencia durante 2 horas. Después de tres lavados de 5 minutos con solución de lavado de transferencia recién preparada, la membrana se incubó después con IgG policlonal anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina (Chemicon, Temecula, CA, EE.UU., Dilución 1:8000) durante 1 hora y se lavó con solución de lavado de transferencia recién preparada, en tres incrementos de 5, 10 y 10 minutos. Después del lavado, la membrana se desarrolló colorimétricamente mediante el uso de una solución de reactivo de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato/azul de nitro tetrazolio para el anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina. Después del desarrollo, las transferencias se secaron y se escanearon en un escáner CanoScan8800F (Canon) mediante el uso de Adobe Photoshop y se analizaron mediante el uso del programa informático Scion Image (Scion Corporation).

#### 30 3-Nitrotirosina (3-NT)

Los niveles de 3-NT se usaron como un marcador adicional de daño oxidativo de las proteínas [Suh, y otros, 2001; Butterfield DA, Stadtman ER (1997) Protein oxidation processes in aging brain. Adv Cell Ageing Gerontol 2, 161-191]. Las muestras (5  $\mu$ L) se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos en 5  $\mu$ L de SDS al 12 % y 10  $\mu$ L de tampón Laemmli (Trizma base 0,125 M, SDS al 4 %, glicerol al 20 %), durante 20 minutos. Las muestras (250 ng de proteína) por ranura se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Se usó un anticuerpo primario de conejo (Sigma-Aldrich) específico para 3-NT (1:1000). El mismo anticuerpo secundario anti-conejo inducido en cabra (Sigma-Aldrich) se usó después para la detección de cada anticuerpo primario. Las transferencias se desarrollaron y cuantificaron como se describió anteriormente para los carbonilos de las proteínas. El desarrollo y la detección se realizaron como se describió anteriormente para los carbonilos de las proteínas.

#### 40 Triglicéridos

Los triglicéridos séricos se cuantificaron mediante el uso de un sistema de ensayo enzimático de Pointe Scientific, Inc. (Canton, MI) que incorporó una reacción de color final lineal. Los triglicéridos en la muestra se hidrolizan a glicerol mediante la lipasa. Después el glicerol se fosforila mediante la glicerol quinasa y ATP para formar glicerol-3-fosfato ( $G_3P$ ) y ADP. El  $G_3P$  se convierte en fosfato de dihidroxiacetona (DAP) y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno reacciona con 4-aminoantipirina (4-AAP) y ácido 3-hidroxi-2,4,6-tribromobenzoico (TBHB) en una reacción catalizada por la peroxidasa para producir un colorante de quinoneimina de color rojo. La intensidad del color que se produce se midió a 540 nm mediante el uso de un lector de microplacas Bio-Rad (Hercules, CA).

#### 50 Estadística

Los resultados se analizaron mediante el uso del análisis de varianza (ANOVA) para examinar la diferencia entre los grupos. La medida de la adquisición y de la retención en el laberinto en T fueron los números de intentos para alcanzar el criterio. Los resultados para el reconocimiento de objetos se presentan en porcentaje del tiempo dedicado a explorar el objeto novedoso con respecto al tiempo total de exploración total. La presión de la palanca se analizó mediante un ANOVA de mediciones repetidas de dos vías. Los resultados se expresan como las medias más/menos los errores estándar. El análisis post hoc de Tukey o Bonferroni se usó para comparar las medias entre los grupos. Para la comparación con el grupo SAMP8 control de vehículo se usó Dunnett. Los parámetros de estrés oxidativo del tejido cerebral se analizaron mediante el uso de una prueba U de Mann-Whitney.

#### Resultados

Extracto de romero comparativo que contiene 60 % de CA (CA60): Los resultados que se discuten más abajo se muestran en la Figura 1.

## Evaluaciones conductuales

5 Laberinto en T: El ANOVA de una vía para los ensayos a criterio de la prueba de adquisición en el laberinto en T mostró un efecto significativo del tratamiento  $F(4,48) = 8,98$ ,  $p < 0,001$ . La prueba post hoc de Bonferroni indicó que los ratones SAMP8 que recibieron la dosis de CA de 32 mg/kg, significativamente, tomaron menos ensayos para alcanzar el criterio con respecto a los ratones que recibieron el vehículo. Además, los ratones que recibieron la dosis de CA de 32 mg/kg no fueron significativamente diferentes con respecto a los ratones controles SAM 50 %. El ANOVA de una vía para los ensayos a criterio de la prueba de retención en el laberinto en T mostró un efecto significativo del tratamiento  $F(4,47) = 7,25$ ,  $p < 0,001$ . El análisis post hoc de Bonferroni indicó que los ratones SAMP8 que recibieron las dosis de CA de 32, 16 y 1,6 mg/kg tomaron significativamente menos ensayos para alcanzar el criterio con respecto a los ratones SAMP8 que recibieron el vehículo. Los ratones que recibieron las dosis de CA de 32, 16 y 1,6 mg/kg no fueron significativamente diferentes con respecto a los ratones SAM 50%.

15 Reconocimiento de Objetos: El ANOVA de una vía para el tiempo dedicado a explorar el objeto novedoso en la prueba de retención de 24 horas produjo un efecto de tratamiento significativo  $F(4,46) = 4,88$ ,  $p < 0,003$ . La prueba post hoc de Bonferroni indicó que los ratones SAMP8 que recibieron las dosis de CA de 32 y 16 mg/kg dedicaron un tiempo significativamente mayor en la exploración del objeto novedoso con respecto a los ratones SAMP8 que recibieron el vehículo. Los ratones SAMP8 que recibieron las dosis de CA de 32 y 16 mg/kg no fueron significativamente diferentes con respecto a los controles SAM 50%.

20 Presión de la palanca: El ANOVA de medidas repetidas de dos vías, para el tratamiento y el día, la evaluación del número de presiones de la palanca recompensadas produjo un efecto significativo para el tratamiento  $F(4,257) = 17,27$ ,  $P < 0,001$  y el día  $F(5,257) = 15,31$ ,  $P < 0,001$ . La interacción tratamiento x día no fue significativo  $F(20,257) = 3,78$ , NS. El análisis post hoc de Tukey indicó que en los días 3, 4, 5 y 6,

25 Los ratones SAMP8 que recibieron la dosis de CA de 32 mg/kg recibieron significativamente más recompensas que los ratones SAMP8 que recibieron el control de vehículo. Los ratones SAMP8 que recibieron la dosis de CA de 16 mg/kg recibieron significativamente más recompensas en los días 4, 5 y 6 en comparación con los ratones SAMP8 que recibieron el control de vehículo.

## 30 Niveles de triglicéridos

El ANOVA de una vía para los niveles de triglicéridos no fue significativo  $F(4,50) = 2,42$  para los ratones a los que se administró CA60.

## 35 Estrés Oxidativo del Cerebro

40 La prueba U de Mann-Whitney indicó que CA60 disminuyó significativamente la concentración de 4-hidroxiilnonenal (HNE) en la corteza, con las dosis de CA de 1,6 y 32 mg/kg, en comparación con los ratones SAMP8 a los que se administró el aceite de girasol como un control de vehículo. No se constató un efecto significativo de CA60 sobre la 3-nitrotirosina (3-NT) o los carbonilos de las proteínas dentro de la corteza (Ver Figura 2). CA60 aumentó significativamente los carbonilos de las proteínas en el cuerpo estriado a las dosis de CA de 16 mg/kg, pero no tuvo efecto en HNE o 3-NT (Ver Figura 3). CA60 aumentó significativamente los carbonilos de las proteínas en el hipocampo a las dosis de CA de 16 mg/kg. CA60 no tuvo ningún efecto sobre 3-NT en el hipocampo (Ver Figura 4).

45 Extracto de romero comparativo que contiene 10 % de CA (CA10): Los resultados discutidos más abajo se muestran en la Figura 5.

## 50 Evaluaciones Conductuales.

55 Laberinto en T: El ANOVA de una vía para los ensayos a criterio durante la adquisición en el laberinto en T produjo un efecto significativo para el grupo  $F(4,44) = 5,914$ ,  $p < 0,001$ . La prueba post hoc de Bonferroni indicó que los ratones SAM 50 % que recibieron vehículo tomaron significativamente menos ensayos para alcanzar el criterio con respecto a los ratones SAMP8 que recibieron las dosis de CA de 32, 1,6 mg/kg o vehículo. Los ratones que recibieron la dosis de CA de 16 mg/kg no fueron significativamente diferentes con respecto a los ratones SAM 50 % que recibieron el vehículo o a los ratones SAMP8 que recibieron el vehículo. El ANOVA para los ensayos a criterio en la prueba de retención en el laberinto en T indicó un efecto significativo del tratamiento  $F(4,44) = 4,04$ ,  $p < 0,007$ . La prueba post hoc de Dunnett indicó que los ratones que recibieron la dosis de CA de 16 mg/kg tomaron significativamente menos ensayos para alcanzar el criterio con respecto a los ratones SAMP8 que recibieron el vehículo.

60 Reconocimiento de Objetos: El ANOVA de una vía para el tiempo dedicado a explorar el objeto novedoso no fue significativo  $F(4,44) = 2,249$ ;  $p < 0,08$ .

65 Presión de la palanca: El ANOVA de medidas repetidas de dos vías, para el tratamiento y el día, para la evaluación del número de presiones de la palanca recompensadas produjo un efecto significativo para el tratamiento  $F(4,253) = 6,74$ ,  $P < 0,001$  y el día  $F(5,253) = 7,53$ ,  $P < 0,001$ . La interacción tratamiento x día no fue significativa  $F(20,253) = 1,83$ . El análisis

post hoc de Tukey indicó que en los días 3, 4, 5 y 6, los ratones que recibieron las dosis de CA de 32 mg/kg y 16 mg/kg recibieron significativamente más recompensas que los ratones que recibieron el vehículo.

#### Niveles de triglicéridos

5 El ANOVA de una vía para los niveles de triglicéridos indicó un efecto significativo  $F(4,47) = 3,11$ ,  $P < 0,02$  después de la administración de CA10. La prueba post hoc de Tukey indicó que los ratones SAM 50 % tenían niveles de triglicéridos significativamente más altos que los ratones SAMP8 que recibieron la dosis de CA de 1,6 mg/kg. No hubo otras diferencias significativas entre ninguno de los otros grupos.

#### 10 Estrés Oxidativo del Cerebro

La prueba U de Mann-Whitney indicó que CA10 disminuyó significativamente el HNE en la corteza con la dosis de CA de 32 mg/kg, 3-NT en la corteza con la dosis de CA de 16 mg/kg y aumentó significativamente los carbonilos de las proteínas con las dosis de CA de 16 y 32 mg/kg (Ver la figura 6) en comparación con los controles de SAMP8 tratados con vehículo. Además, CA10 no tuvo efecto sobre HNE, 3-NT o los carbonilos de las proteínas en el cuerpo estriado (Ver Figura 7). Finalmente, CA10 disminuyó significativamente el 3-NT y los carbonilos de proteínas con la dosis de CA de 16 mg/kg en el hipocampo (Ver Figura 8) en comparación con los controles de SAMP8 tratados con vehículo.

20 Extracto de hierbabuena que contiene 5 % de RA (RA5): Los resultados que se discuten más abajo se muestran en la Figura 9.

#### Evaluaciones Conductuales.

25 Laberinto en T: El ANOVA de una vía para los ensayos a criterio de la prueba de adquisición en el laberinto en T mostró un efecto significativo del tratamiento  $F(4,52) = 6,38$ ,  $p < 0,001$ . La prueba post hoc de Bonferroni indicó que los ratones SAMP8 que recibieron las dosis de RA de 32 y 16 mg/kg tomaron significativamente menos ensayos para alcanzar el criterio con respecto a los ratones que recibieron el vehículo. El ANOVA de una vía para los ensayos a criterio de la prueba de retención en el laberinto en T mostró un efecto significativo del tratamiento  $F(4,50) = 12,77$ ,  $p < 0,001$ . El análisis post hoc de Bonferroni indicó que los ratones SAMP8 que recibieron las dosis de RA de 32, 16 y 1,6 mg/kg tomaron significativamente menos ensayos para alcanzar el criterio que los ratones SAMP8 que recibieron el vehículo. Los ratones que recibieron las dosis de RA de 32, 16 y 1,6 mg/kg no fueron significativamente diferentes de los ratones controles SAM 50%.

35 Reconocimiento de Objetos: El ANOVA de una vía para el tiempo dedicado a explorar el objeto novedoso produjo un efecto de tratamiento significativo  $F(4,47) = 2,79$ ;  $p < 0,03$ . La prueba post hoc de Dunnett indicó que los ratones que recibieron las dosis de RA de 32 y 16 mg/kg dedicaron una cantidad de tiempo significativamente mayor en la investigación del objeto novedoso con respecto a los ratones SAMP8 que recibieron el vehículo.

40 Presión de la palanca: El ANOVA de medidas repetidas de dos vías, para tratamiento y día, para la evaluación del número de las presiones de palanca recompensadas produjo un efecto significativo para el tratamiento  $F(4,257) = 6,18$ ,  $P < 0,001$  y día  $F(5,257) = 40,98$ ,  $P < 0,001$ . La interacción tratamiento x día no fue significativo  $F(20,257) = 2,44$ . El análisis post hoc de Tukey indicó que no hubo diferencias significativas entre los ratones SAMP8 que recibieron RA5 y los ratones SAMP8 que recibieron el vehículo.

#### 45 Niveles de triglicéridos

El ANOVA de una vía para los niveles de triglicéridos después del tratamiento produjo un efecto significativo  $F(4,44) = 4,06$ ,  $P < 0,006$ . El análisis post hoc de Tukey indicó que los ratones controles SAM 50 % tenían niveles de triglicéridos significativamente más altos en comparación con los ratones SAMP8 que recibieron vehículo y los ratones SAMP8 que recibieron 1,6 mg/kg de RA. No hubo otras diferencias entre los grupos.

#### 50 Estrés Oxidativo del Cerebro

55 La prueba U de Mann-Whitney indicó que RA5 disminuyó significativamente el HNE en la corteza de ratones que recibieron las dosis de RA de 16 y 32 mg/kg y disminuyó 3-NT con la dosis de RA de 32 mg/kg. RA5 no tuvo ningún efecto sobre los carbonilos de las proteínas en la corteza (Ver la Figura 10). Además, RA5 no tuvo efecto en HNE o 3-NT dentro del cuerpo estriado. Los ratones que recibieron RA5 tuvieron los niveles de carbonilo de las proteínas significativamente más altos con las dosis de RA de 1,6 y 16 mg/kg en comparación con los ratones SAMP8 de control tratados con vehículo (Ver Figura 11) dentro del cuerpo estriado. RA5 disminuyó significativamente los niveles de 3-NT y los carbonilos de las proteínas en el hipocampo con la dosis de RA de 16 mg/kg (Ver Figura 12).

#### Discusión:

65 En el presente estudio, los extractos que contienen CA o RA mejoraron el aprendizaje y la memoria. En general, CA tuvo un efecto tanto en la memoria declarativa como de procedimiento. El laberinto en T y el reconocimiento de objetos ambos evaluaron la memoria declarativa, mientras que la presión de palanca operante evaluó el aprendizaje y la memoria de

5 procedimientos. Encontramos que el extracto de romero comparativo que contiene 60 % de CA mejoró en ambos, la memoria y el aprendizaje, declarativo y de procedimiento. El extracto de romero comparativo con 10 % de CA mejoró la memoria declarativa y el aprendizaje y la memoria de procedimiento según lo evaluado en la tarea operante de presión de la palanca. El extracto de hierbabuena con 5 % de RA mejoró el aprendizaje y la memoria declarativos. Ninguno de los compuestos tuvo un efecto sobre el peso corporal.

10 Ambos, CA y RA funcionan de manera que la respuesta es dependiente de la dosis. Esto no es sorprendente, debido a que la mayoría de los compuestos que potencian la memoria demuestran el efecto hormesis, los fenómenos donde existe una dosis óptima para la potenciación de la memoria por debajo de la que el compuesto no es efectivo y por encima de la que el compuesto produce deterioro, así se produce lo que se conoce como una curva de respuesta dependiente de la dosis en forma de "U invertida". Esto se informó anteriormente en las evaluaciones en el laberinto acuático con ácido rosmarínico y en su capacidad ansiolítica como se evaluó en un laberinto más elevado [Park, y otros, 2010; Butterfield, y otros, 1997]. Este estudio anterior usó una condición de "estrés" en un modelo de ratón normal, sano no envejecido y encontró una capacidad de potenciación cognitiva. El ácido rosmarínico protege contra la toxicidad de A $\beta$  en los ratones inyectados con A $\beta$  [Pereira P, Tysca D, Oliveria P, da Silva Brum LF, Picada JN, Ardenghi P (2005) Neurobehavioral and genotoxic aspects of rosmarinic acid. *Pharmacol Res* 52, 199-203]. En el presente estudio, encontramos que el ácido rosmarínico impidió la pérdida memoria en un modelo de ratón que produce un exceso A $\beta$  de manera natural.

20 Los hallazgos en el presente estudio son similares a los hallazgos anteriores después de la suplementación con antioxidantes en los ratones SAMP8. El ácido alfa lipoico mejoró el aprendizaje y la memoria después de solo una semana de tratamiento en ratones SAMP8 de 12 meses de edad y después de solo 2 semanas en ratones SAMP8 de 18 meses de edad [Farr, y otros, 2003; Pereira, y otros, 2005]. El ácido docosahexaénico antioxidante, que se encuentra en el aceite de pescado, también mejoró el aprendizaje y la memoria en los ratones SAMP8 [Alkam, y otros, 2007]. La suplementación de extracto de morera, rico en la antocianina antioxidante, resultó en un aprendizaje y memoria de evitación mejorados, disminuyó el colesterol y disminuyó los índices de estrés oxidativo en los ratones SAMP8 [Farr SA, Price TO, Banks WA, Ercal N, Morley JE (2012) Effect of Alpha-Lipoic Acid on Memory, Oxidation and Lifespan in SAMP8 Mice. *J Alzheimer's Dis* (En imprenta)]. Además, estos hallazgos son alentadores, ya que varias de las moléculas/extractos mencionados anteriormente han demostrado efectos positivos en ensayos clínicos humanos de seguimiento para la cognición, lo que indica la naturaleza predictiva y traducible de este modelo de roedor a los humanos [Petursdottir, y otros, 2008; Shih PH, Chan YC, Liao JW, Wang MF, Yen GC (2010) Antioxidant and cognitive promotion effects of anthocyanin-rich mulberry (Morus atropurpurea L.) on senescence-accelerated mice and prevention of Alzheimer's disease. *J Nutr Biochem* 21, 598-605].

35 La oxidación de proteínas y lípidos ocurre en los cerebros de los ratones SAMP8 con la edad [Butterfield, y otros, 1997; Poon, y, 2005; Pereira, y otros, 2005]. Las proteínas y los lípidos juegan un papel importante en la estructura y función normales de las células [Butterfield DA, Reed T, Sultana R (2011) Roles of 3-nitrotyrosine- and 4-hydroxynonenal-modified brain proteins in the progression and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Free Radic Res* 45, 59-72]. La función celular anormal y la muerte celular eventual pueden ocurrir con la modificación oxidativa de las proteínas en las células [Lee HC, Wei YH (2012) Mitochondria and aging. *Adv Exp Med Biol* 942, 311-327]. En el presente estudio, se usaron métodos inmunoquímicos sensibles para determinar si el tratamiento con los antioxidantes tenía algún efecto sobre los niveles de los carbonilos de las proteínas. Nuestros resultados indican que hay una disminución en la oxidación de proteínas en el hipocampo (después de la administración de extracto de romero con 10 % de CA o el extracto de hierbabuena con 5 % de RA) y la oxidación de lípidos en la corteza (después de la administración de todos los extractos). Se encontró que el hipocampo y la corteza son áreas importantes para el aprendizaje y la memoria en el laberinto en T [Farr SA, Banks WA, La Scola ME, Flood JF, Morley JE (2000) Permanent and temporary inactivation of the hippocampus impairs T-maze footshock avoidance acquisition and retention. *Brain Res* 872, 242-249; Farr SA, Uezu K, Creonte TA, Flood JF, Morley JE (2000) Modulation of memory processing in the cingulate cortex of mice. *Pharmacol Biochem Behav* 65, 363-368]. Además, los estudios encontraron que el hipocampo es importante para la memoria en el reconocimiento de objetos cuando se usa un retardo de 24 horas en la retención [Hammond, y otros, 2004]. Nuestros datos muestran que tanto el extracto de romero con extracto de carnósico como el de hierbabuena con ácido rosmarínico pueden ayudar en la reversión de los cambios oxidativos que ocurren con el envejecimiento y el deterioro cognitivo en los ratones SAMP8.

55 En el presente estudio, los extractos antioxidantes de romero con extracto carnósico y el extracto de hierbabuena con ácido rosmarínico se suplementaron por vía oral para determinar si tenían efectos beneficiosos sobre el aprendizaje y la memoria en el modelo de disfunción cognitiva del ratón SAMP8. Los extractos resultaron una curva de respuesta dependiente de la dosis en forma de U invertida, como lo demuestra la mayoría de los compuestos que potencian la memoria y se identificaron dosis eficaces de ambos extractos. Los extractos evaluados demostraron efectos beneficiosos en la memoria tanto declarativa como de procedimiento, y se ha informado que ambas se afectan por el envejecimiento y la enfermedad. Al alcance de nuestro conocimiento, este es el primer estudio que muestra la prevención del deterioro cognitivo después de la administración de extracto de romero con ácido carnósico o extracto de hierbabuena con ácido rosmarínico en un modelo murino de deterioro cognitivo debido al envejecimiento acelerado. Estos hallazgos sugieren que el extracto de romero con extracto carnósico y el extracto de hierbabuena con ácido rosmarínico son tratamientos potenciales para el deterioro cognitivo asociado con la edad.

65 Los tres extractos mejoraron el aprendizaje y la memoria en al menos dos de las tres tareas. El extracto de romero (con CA) tuvo un efecto tanto en la memoria declarativa como en la de procedimiento. El laberinto en T y el reconocimiento de

objetos evaluaron la memoria declarativa. La presión de palanca operante evaluó el aprendizaje y la memoria de procedimiento. El extracto de hierbabuena (con RA) mejoró todas las tareas de memoria declarativa evaluadas (adquisición y aprendizaje en el laberinto en T y reconocimiento de objetos), pero no tuvo ningún efecto en el aprendizaje y la memoria operante de procedimientos. Ninguno de los compuestos tuvo un efecto sobre el peso corporal. El uso de CA y/o RA ahora está directamente vinculado a las medidas de resultado de la cognición. Hay suplementos de romero que analizan la energía y la cognición, pero ninguno está respaldado por estudios científicos y ninguno relaciona directamente la causa con el ácido carnósico. Esto se muestra en nuestro estudio a medida que el aumento del contenido de ácido carnósico aumenta la eficacia del extracto.

Las medidas de resultado de comportamiento cognitivo relacionadas con el aprendizaje o la memoria no se han vinculado a CA, además, las medidas de resultado de aprendizaje no se han vinculado a RA.

Estos resultados son sorprendentes debido a la naturaleza de cómo dos moléculas totalmente diferentes, con diferentes estructuras químicas y polaridades, son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y penetrar en diferentes regiones del cerebro. Una vez que estos compuestos penetran en varias regiones del cerebro, ellos resultan en cambios de rendimiento significativos en el rendimiento cognitivo. Antes de esta investigación, se pensaba que estas moléculas solo tenían efectos antioxidantes no específicos generales en el cerebro. Anteriormente, estas moléculas no se asociaron con efectos funcionales cognitivos específicos resultantes de diferentes regiones del cerebro. Por primera vez, esta investigación demuestra que ellos pueden afectar los resultados del desempeño cognitivo conductual. Además, los dos compuestos afectan diferentes resultados del desempeño de manera diferenciada, lo que demuestra una interacción muy específica con determinadas regiones del cerebro responsables de esos resultados cognitivos. Estos resultados demuestran la especificidad de estas moléculas para actuar independientemente de los efectos antioxidantes no específicos generales atribuidos a otras moléculas.

#### Ejemplo comparativo 2

##### Estudio de toxicidad del Ácido Carnósico de 90 días

El propósito de este estudio fue evaluar la toxicidad del artículo de prueba, una suspensión (en aceite de girasol) de extracto de romero que contiene aproximadamente 10 % de ácido carnósico (el ingrediente activo), cuando se administra una o dos veces al día mediante sonda oral a ratas durante al menos 90 días.

Las ratas Hsd:Sprague Dawley SD machos y hembras se asignaron a los grupos experimentales y se administraron las dosis como se indica en la siguiente tabla. Los animales se dosificaron mediante sonda oral.

| Grupo                                      | Núm. de animales <sup>a</sup> |        | Nivel de dosis de CA <sup>a</sup> |             | Concentración de la dosis de CA <sup>b</sup> |
|--|-------------------------------|--------|-----------------------------------|-------------|--|
|  | Macho                         | Hembra | (mg/kg/dosis)                     | (mg/kg/día) | (mg/mL)                                      |
| 1 (Control, dosificación BID) <sup>c</sup> | 10                            | 10     | 0                                 | 0           | 0  |
| 2 (baja, dosificación BID)                 | 10                            | 10     | 32,5                              | 65          | 6,5  |
| 3 (Media, dosificación BID)                | 10                            | 10     | 65                                | 130         | 13,0   |
| 4 (Media, dosificación SID)                | 10                            | 10     | 130                               | 130         | 13,0   |
| 5 (Alta, dosificación BID)                 | 10                            | 10     | 90                                | 180         | 18,0   |

CA = Ácido carnósico; el ingrediente activo en el artículo de prueba,  
 BID = dos veces al día; las dosis en cada día se administraron con aproximadamente 6 horas de diferencia (en base al último animal dosificado/sexo/grupo),  
 SID = Una vez al día,  
<sup>a</sup> Los animales se dosificaron a 10 mL/kg/día; las dosis para los animales dosificados BID se administraron a 5 mL/kg/dosis,  
<sup>b</sup> Las concentraciones se corrigieron para el contenido de CA específico del lote,  
<sup>c</sup> El grupo 1 recibió solamente el artículo de control del vehículo (aceite de girasol),

La evaluación de la toxicidad se basó en la mortalidad, los signos clínicos, el peso corporal, el cambio de peso corporal, el consumo de alimentos, los exámenes oftalmológicos, la batería de observación funcional (FOB) y la patología clínica y anatómica.

La administración oral de extracto de romero que contiene aproximadamente 10 % de ácido carnósico en aceite de girasol a las ratas Sprague Dawley fue bien tolerada a niveles de dosis de <180 mg/kg/día. La frecuencia de dosificación (SID o BID) en animales a los que se administró 130 mg/kg/día no pareció tener ninguna diferencia sustancial en la naturaleza o magnitud de los efectos. Las dosis >65 mg/kg/día resultaron en efectos no adversos relacionados con el artículo de prueba

en los parámetros hematológicos y de química clínica; cambios en el peso de los órganos; y hallazgos microscópicos en hígado, riñón, estómago no glandular, colon, y ciego. Según este patrón de hallazgos, 180 mg de ácido carnósico/kg/día se consideró el nivel de efecto adverso no observado (NOAEL) cuando se administra por vía oral durante 90 días consecutivos. Con un NOAEL de 180 mg/kg/día de ácido carnósico y una concentración de CA dentro del extracto de exactamente el 11,55 %, el NOAEL se traduciría a 1,558 mg/kg/día del extracto de romero. Mediante el uso de un factor de seguridad de 100 veces, esto se traduciría en una dosis equivalente humana de 15,58 mg/kg/día, o 1091 mg para un humano de 70 kg.

Ejemplo 3

Estudio de toxicidad del ácido rosmarínico de 90 días

El propósito de este estudio fue evaluar la toxicidad del artículo de prueba, un extracto seco de romero que contiene aproximadamente un 15 % (p/p) de ácido rosmarínico (el ingrediente activo) disuelto en agua destilada, cuando se administra una vez al día por sonda oral a las ratas durante al menos 90 días.

Las ratas Hsd:Sprague Dawley SD machos y hembras se asignaron a los grupos experimentales y se administraron las dosis como se indica en la siguiente tabla. Los animales se dosificaron mediante sonda oral.

| Grupo         | Núm. de animales <sup>a</sup> |        | Nivel de dosis de RA <sup>a</sup> | Concentración de la dosis de RA |
|---------------|-------------------------------|--------|-----------------------------------|---------------------------------|
|               | Macho                         | Hembra | (mg/kg/día)                       | (mg/mL)                         |
| 1 (Control) b | 10                            | 10     | 0                                 | 0                               |
| 2 (Bajo)      | 10                            | 10     | 65                                | 6,5                             |
| 3 (Medio)     | 10                            | 10     | 130                               | 13                              |
| 5 (Alto)      | 10                            | 10     | 300                               | 30                              |

RA = Ácido rosmarínico; el ingrediente activo en el artículo de prueba,  
a Los animales se dosificaron a 10 mL/kg/día,  
b El grupo 1 recibió solamente el artículo de control del vehículo (agua destilada),

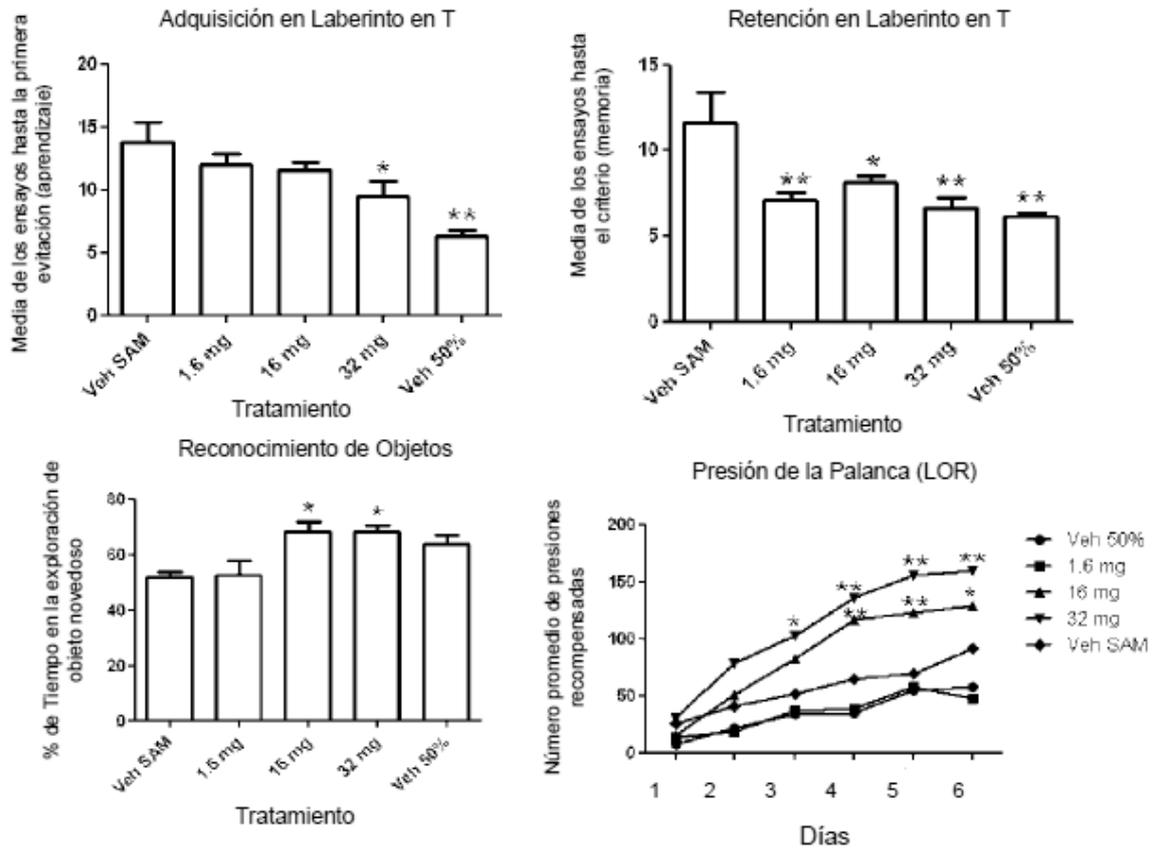
La evaluación de la toxicidad se basó en la mortalidad, los signos clínicos, el peso corporal, el cambio de peso corporal, el consumo de alimentos, los exámenes oftalmológicos, la batería de observación funcional (FOB) y la patología clínica y anatómica.

La administración oral diaria del Extracto de Hierbabuena Seca (que contiene aproximadamente 15 % de RA como ingrediente activo) a las ratas Sprague Dawley machos y hembras con dosis de RA de hasta 300 mg/kg por peso/día durante 90 días fue bien tolerada. No se observaron signos clínicos o efectos adversos relacionados con el tratamiento en ninguno de los parámetros estudiados, que incluye el peso corporal, el consumo de alimentos, los parámetros neurológicos, la hematología, la química clínica, la histopatología general y la histopatología. Se observaron incrementos de peso en las glándulas hipofisarias y tiroideas, sin embargo, se observaron dentro de las normas históricas para la edad y la cepa y no tuvieron cambios histopatológicos correspondientes. Por lo tanto, el "Nivel de efecto adverso no observado (NOAEL)" para el ítem de prueba bajo las condiciones de evaluación y las dosis empleadas, se encontró que eran de 300 mg RA/kg por peso/día (correspondientes a 1948,2 mg/kg por peso/día del Extracto de Hierbabuena Seca). Mediante el uso de un factor de seguridad de 100 veces, esto correspondería a un NOAEL de 19,48 mg/kg/día de extracto de hierbabuena seca para la dosis equivalente humana, que para un humano de 70 kg sería equivalente a 1363,74 mg/día.

La descripción y los dibujos anteriores solamente explican e ilustran la invención.

Reivindicaciones

- 5 1. Un extracto acuoso de una planta de hierbabuena que comprende ácido rosmarínico al 5 % para usar mediante la administración oral en una cantidad de dicho extracto entre 0,01 y 50 mg/kg/día en tratamientos terapéuticos, que potencian, mejoran, o mantienen la salud cognitiva y/o la función cognitiva en mamíferos que experimentan cambios cognitivos del envejecimiento normal.
- 10 2. Un extracto acuoso de una planta de hierbabuena para usar de conformidad con la reivindicación 1, en donde dichos mamíferos se seleccionan a partir de la lista que consiste en seres humanos y animales de compañía.
3. Un extracto acuoso de una planta de hierbabuena para usar de conformidad con la reivindicación 1, en donde la salud cognitiva y/o la función cognitiva para el ácido rosmarínico se refieren al aprendizaje declarativo a través de la mejoría de la concentración, la atención y el estado de alerta.
- 15 4. Un extracto acuoso de una planta de hierbabuena para usar de conformidad con la reivindicación 1, en donde la salud cognitiva y/o la función cognitiva para el ácido rosmarínico se refieren a la memoria declarativa, tanto a corto como a largo plazo.
- 20 5. Un extracto acuoso de una planta de hierbabuena para usar de conformidad con la reivindicación 1, en donde la salud cognitiva y/o la función cognitiva se refieren a la función ejecutiva.
- 25 6. Un extracto acuoso de una planta de hierbabuena que comprende 5 % de ácido rosmarínico para usar mediante administración oral en una cantidad de dicho extracto de entre 0,01 y 50 mg/kg/día en el mantenimiento terapéutico de la función cognitiva normal bajo la interrupción de los ritmos circadianos como ocurre en una afección seleccionada a partir de la lista que consiste en cambios de zona horaria, embarazo, medicación, cambios en la rutina y trabajo por turnos.
- 30 7. Un extracto acuoso de una planta de hierbabuena que comprende ácido rosmarínico al 5% para usar mediante administración oral en una cantidad de dicho extracto de entre 0,01 y 50 mg/kg/día para tratar o prevenir terapéuticamente un deterioro en la salud cognitiva y/o la función cognitiva en un mamífero que experimenta los cambios cognitivos del envejecimiento normal.



El \* indica  $P < 0,05$  y \*\* indica  $P < 0,01$ .

Figura 1

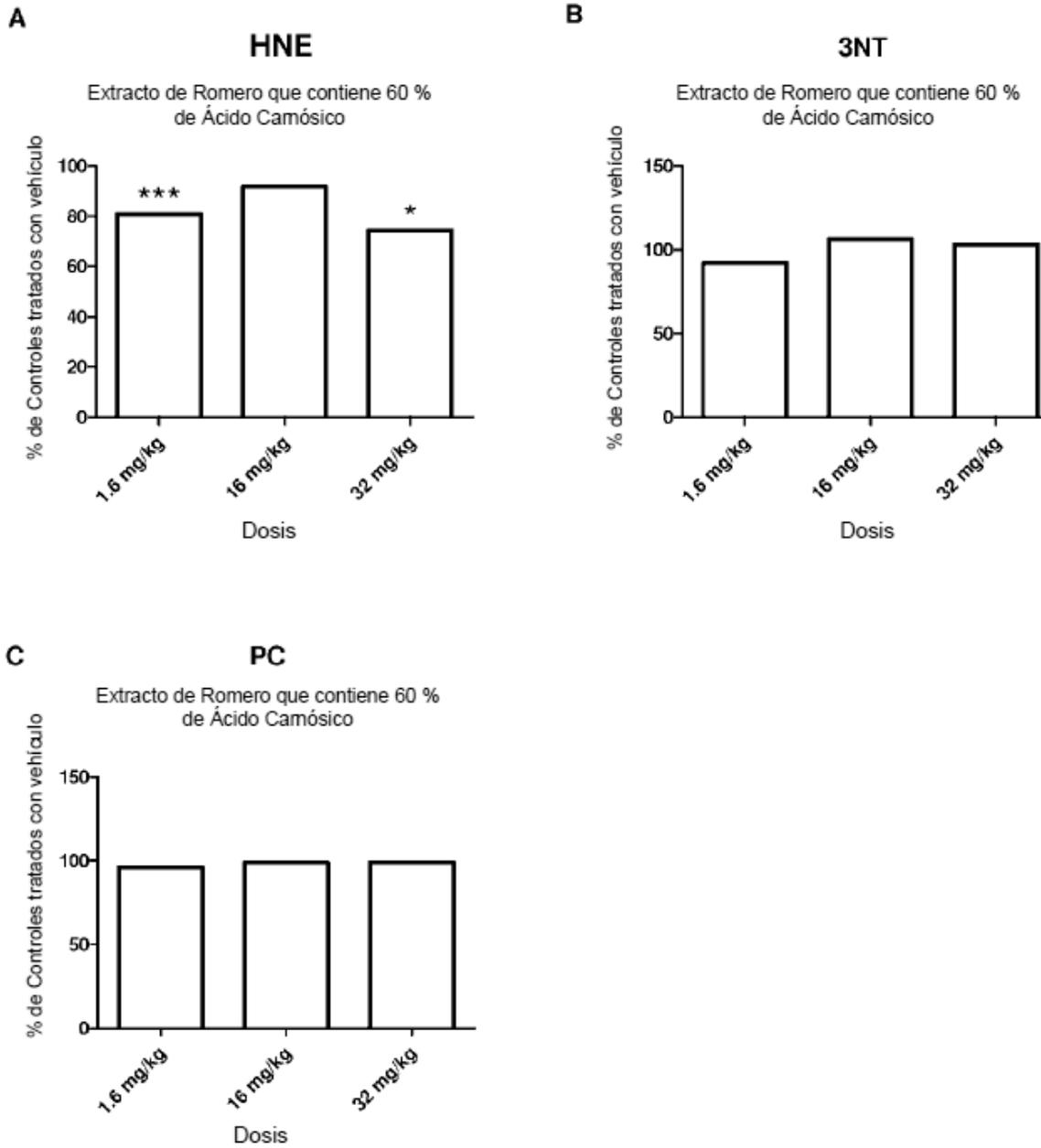


Figura 2

**Estriato**

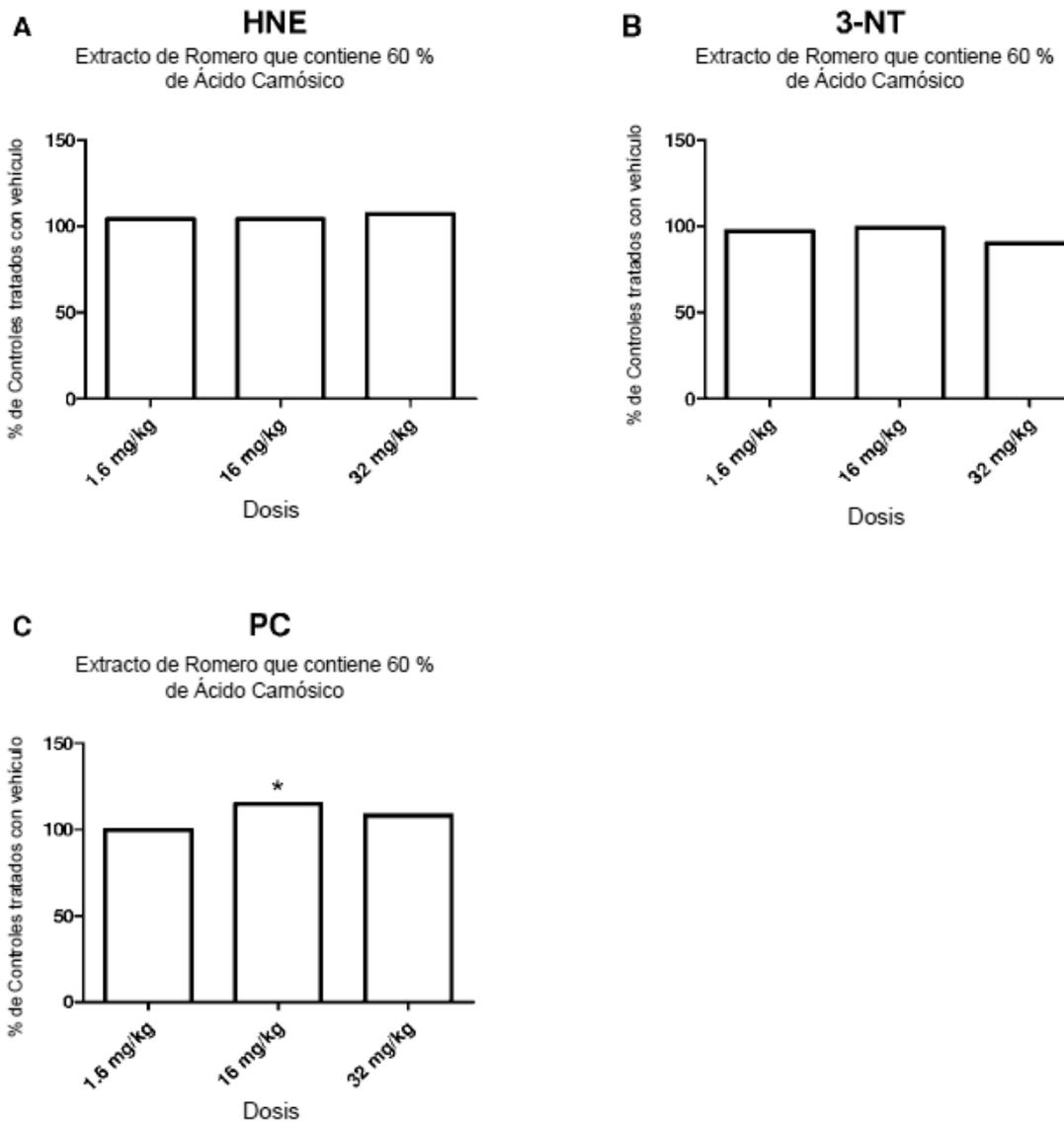


Figura 3

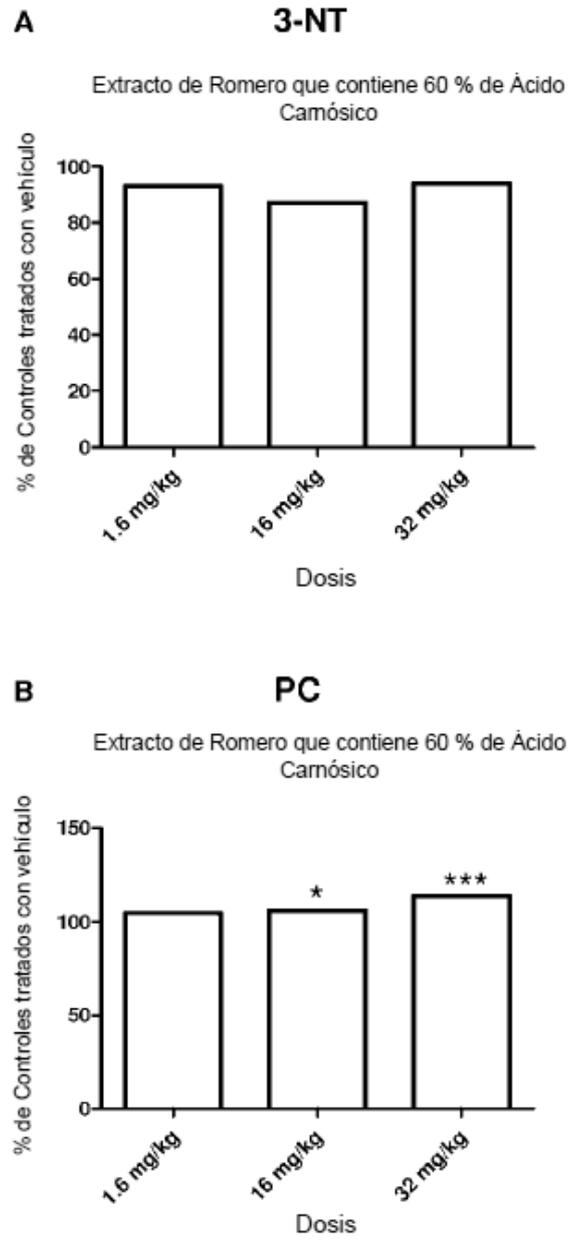
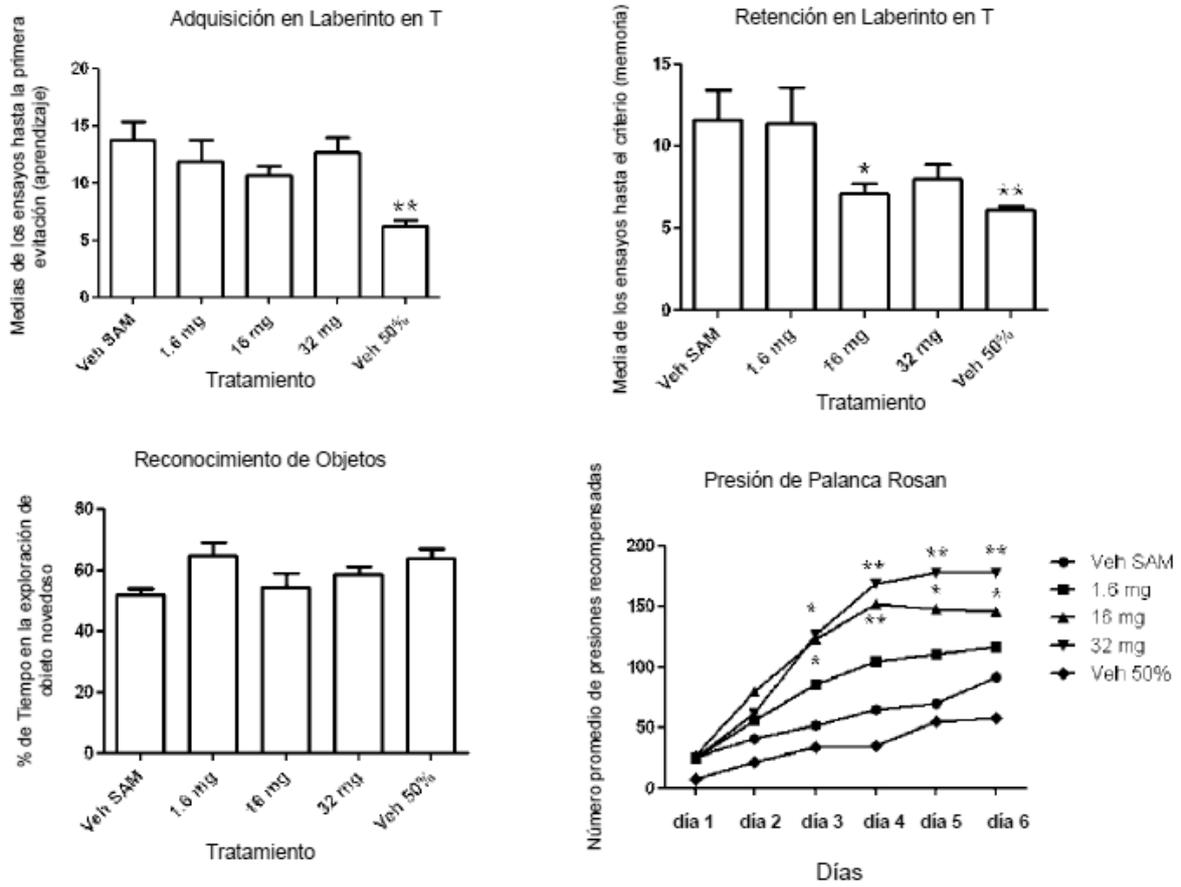


Figura 4



El \* indica  $P < 0,05$  y \*\* indica  $P < 0,01$ .

Figura 5

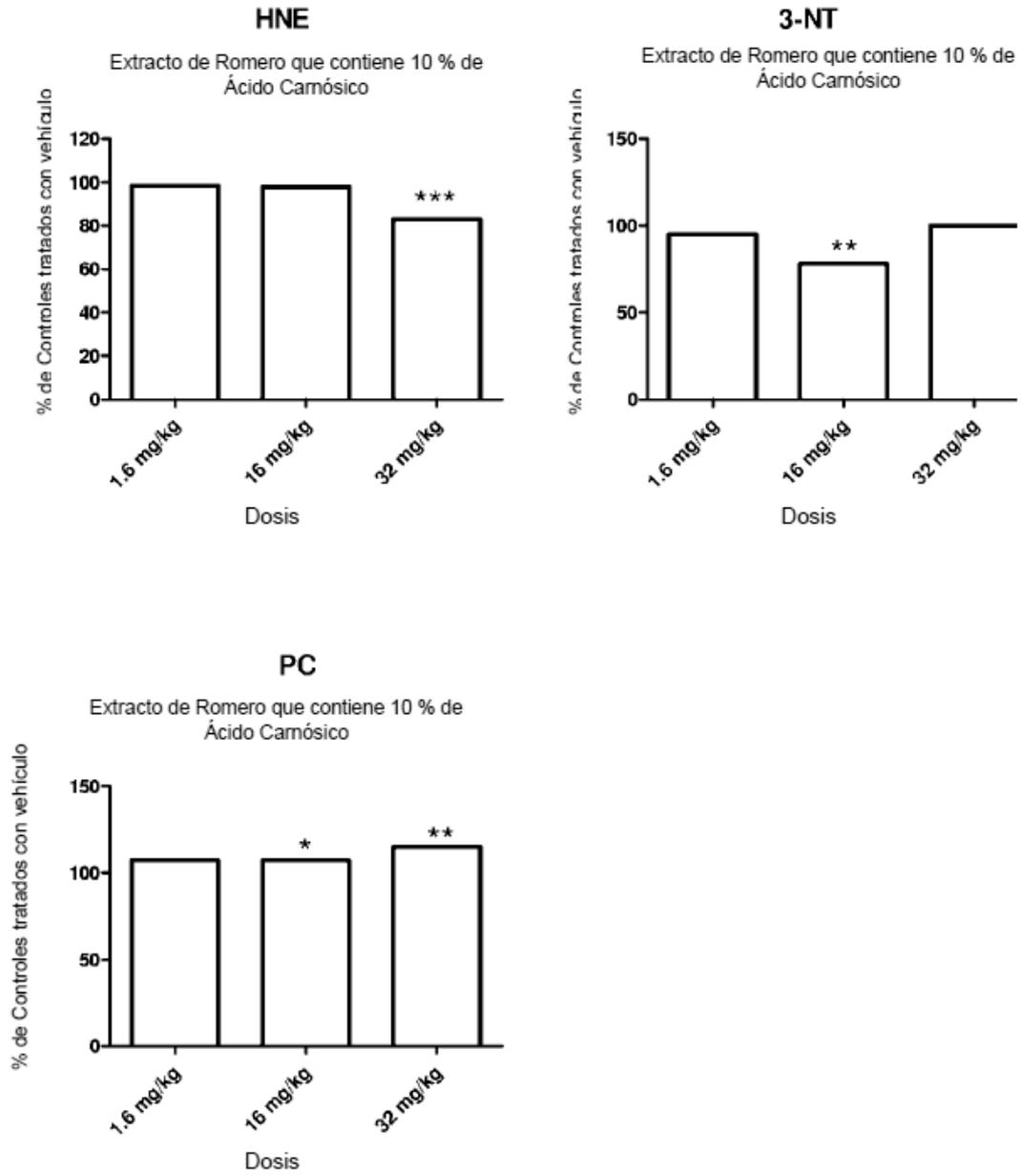


Figura 6

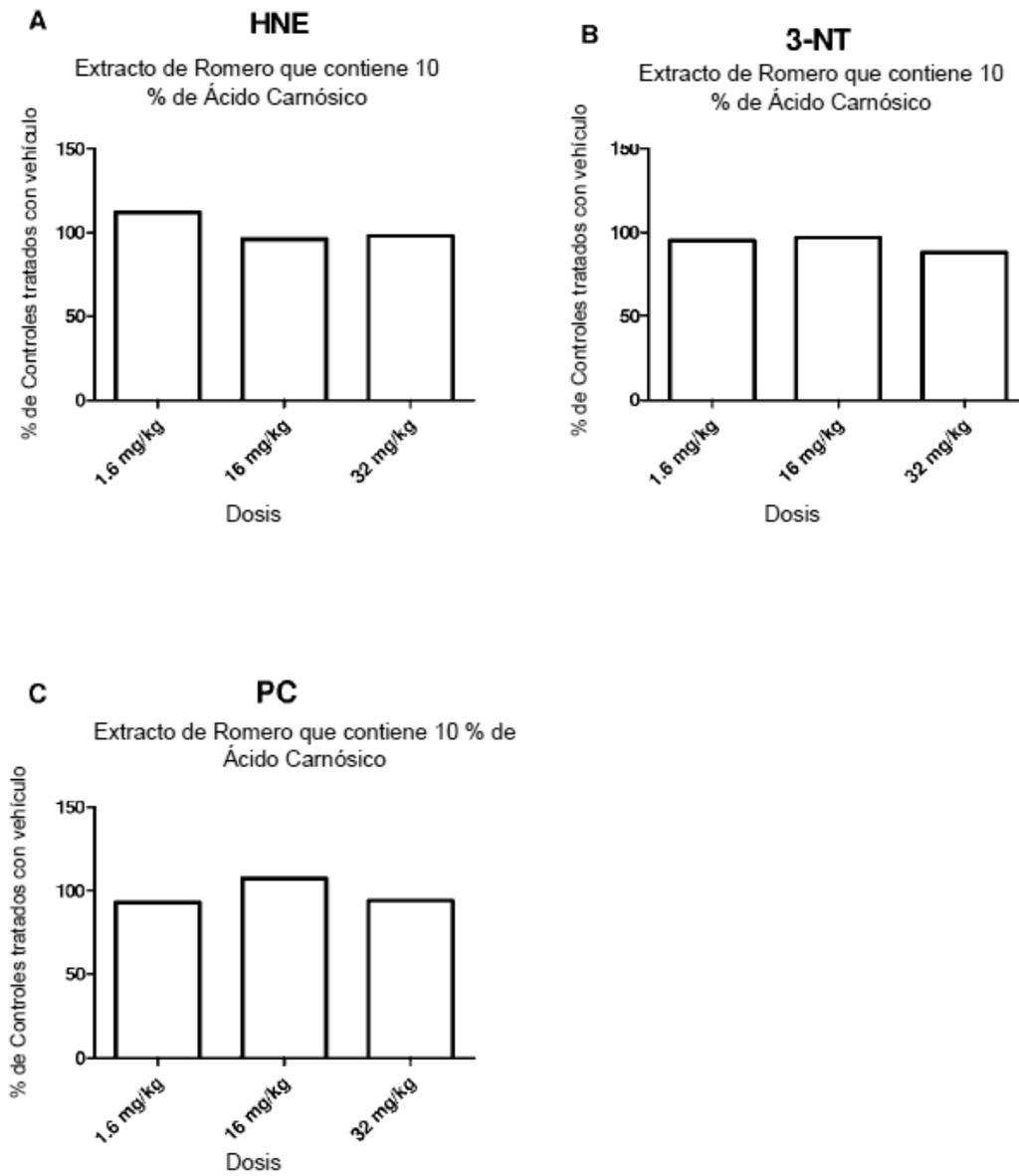


Figura 7

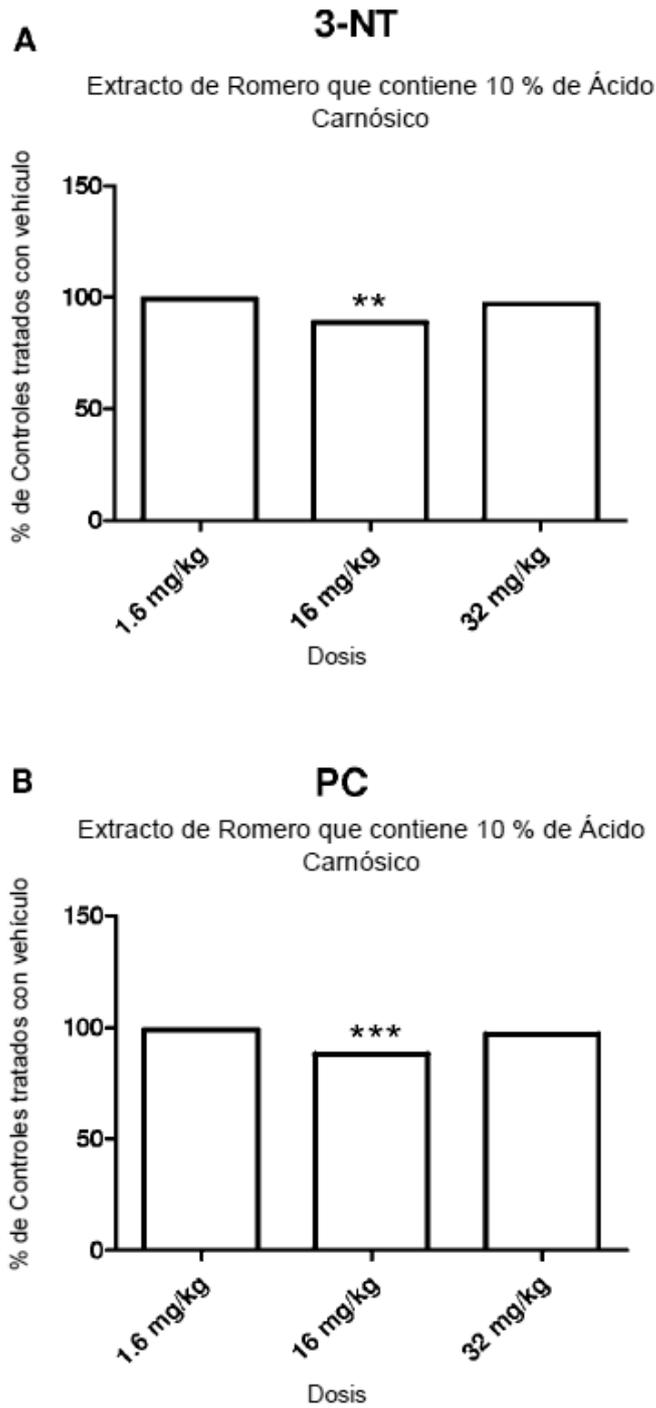


Figura 8

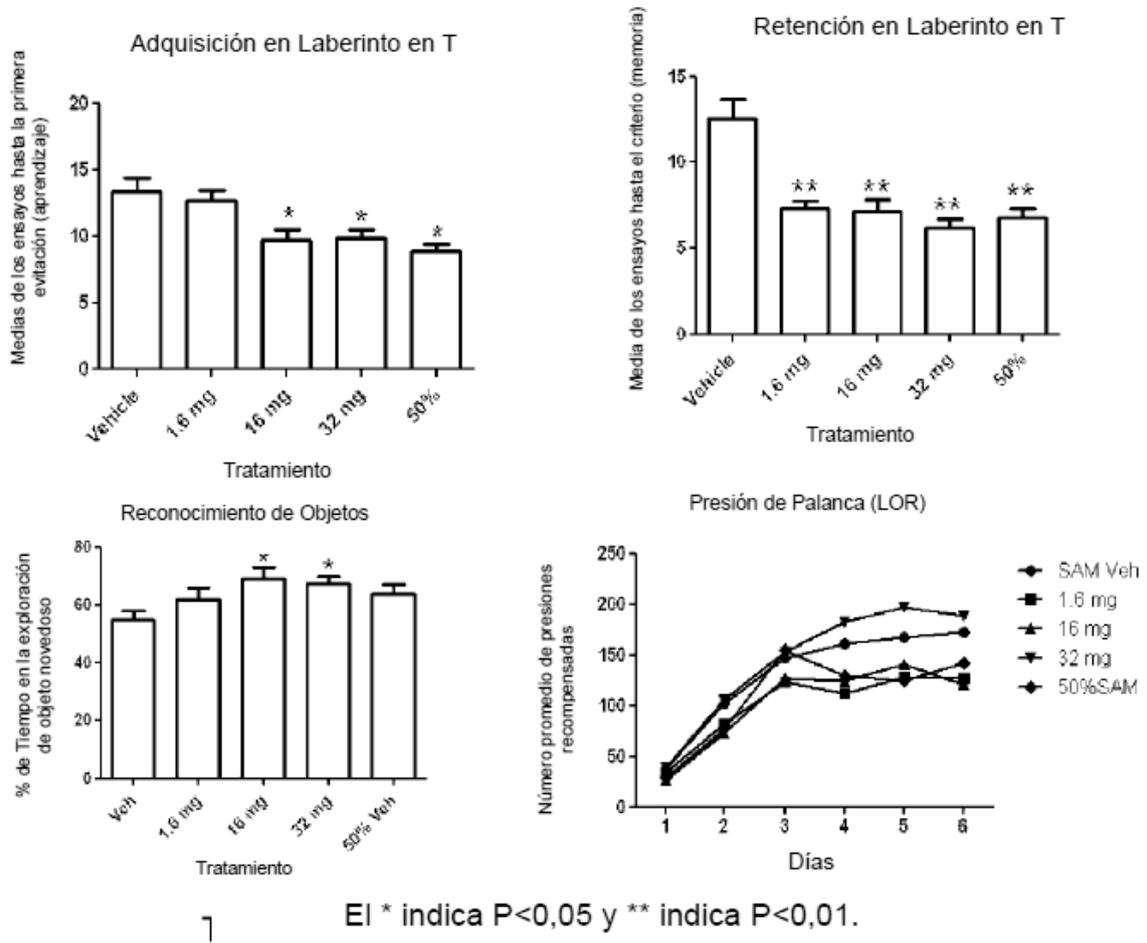


Figura 9

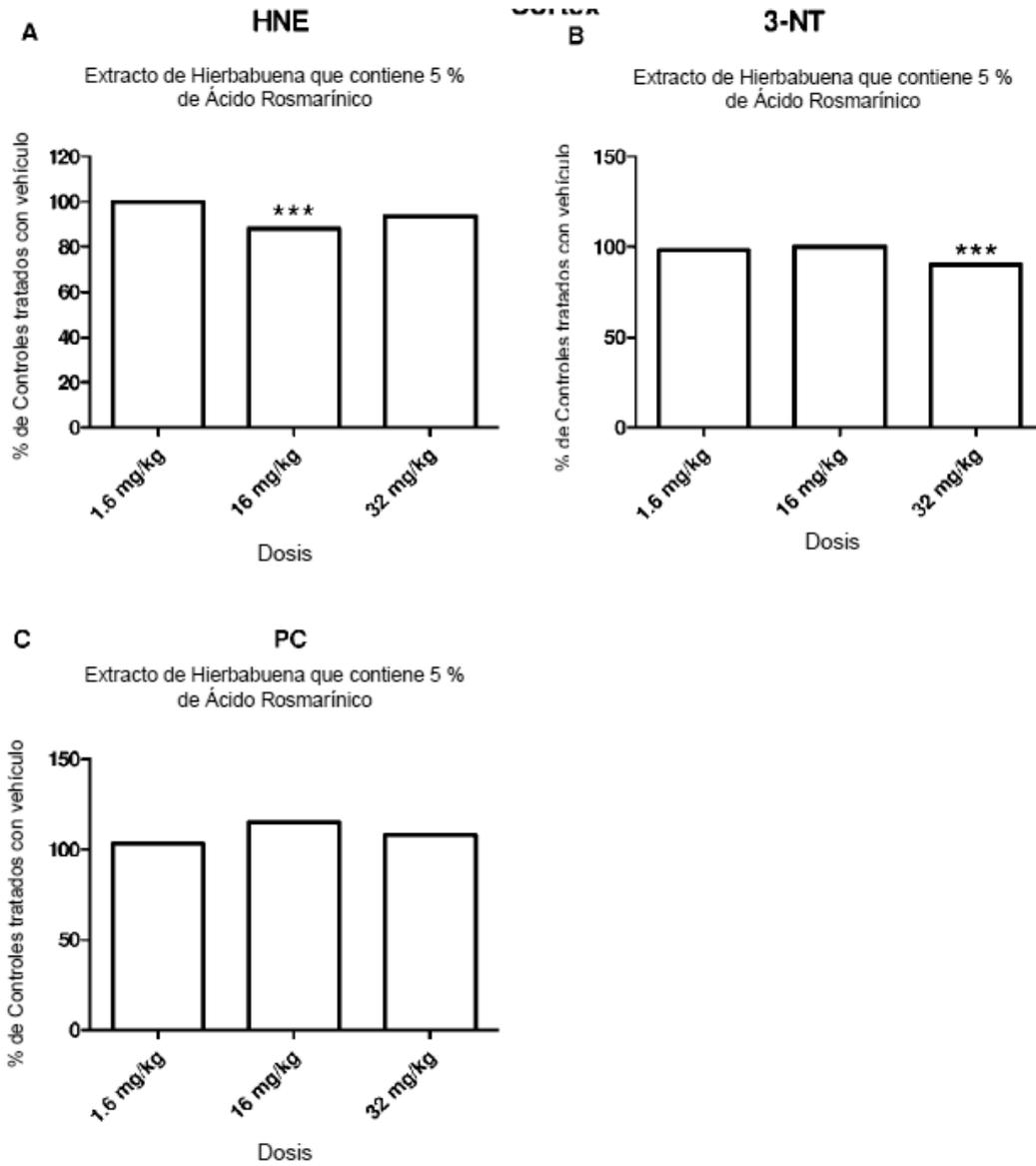


Figura 10

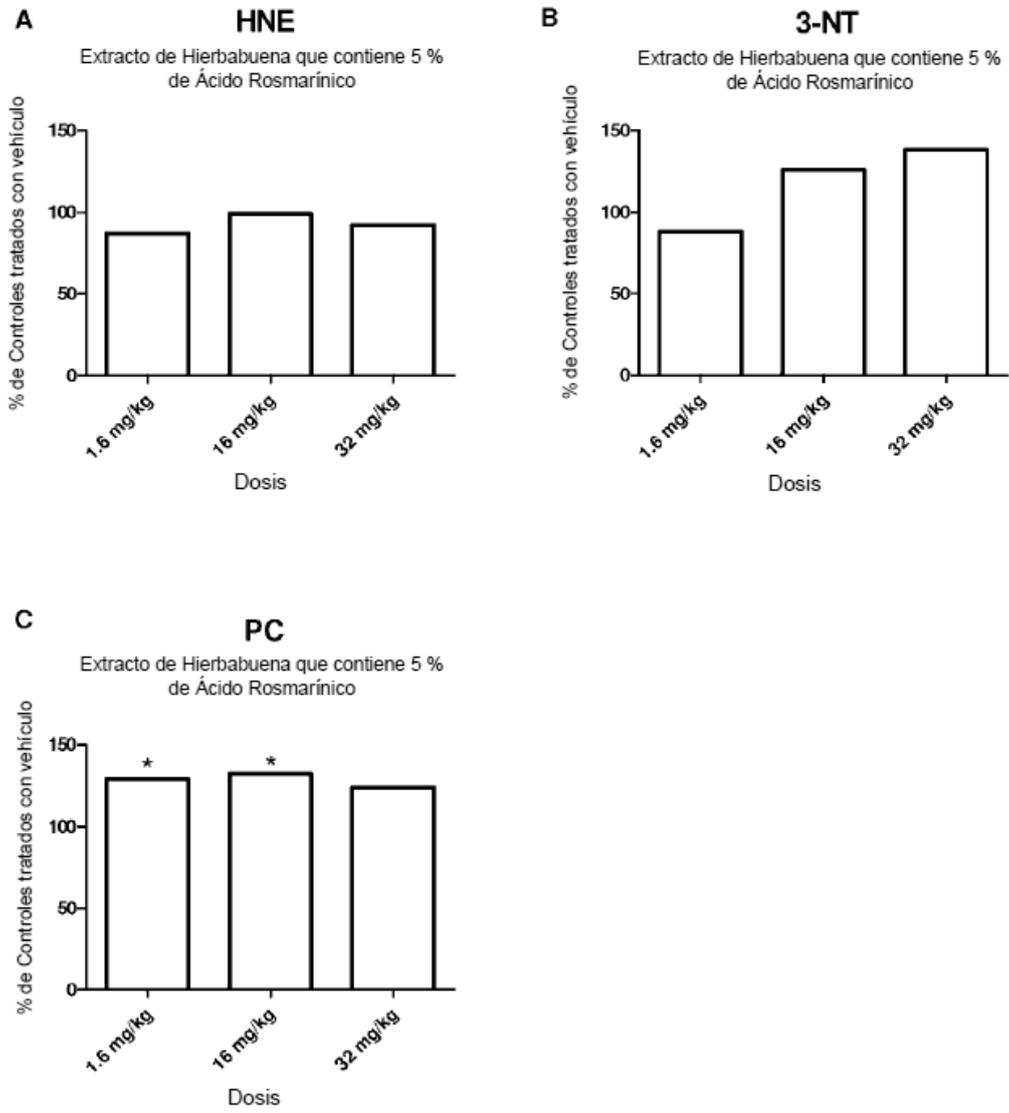


Figura 11

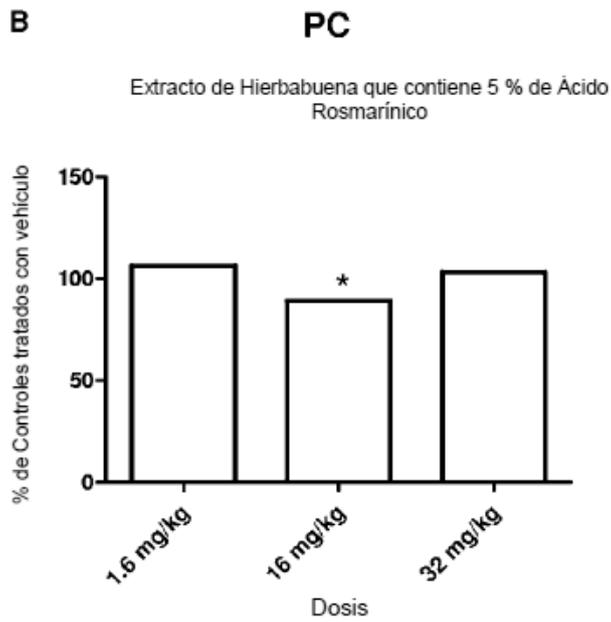
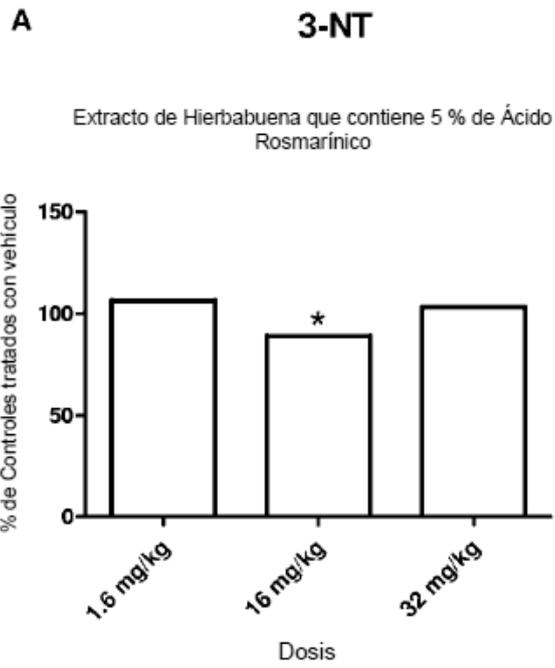


Figura 12