



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN PSICOLOGIA
NEUROCIENCIAS DE LA CONDUCTA

LOS EFECTOS DEL ARANDANO AZUL
EN LA MEMORIA DURANTE
EL ENVEJECIMIENTO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN PSICOLOGIA
P R E S E N T A

MARIA DEL PILAR GOYARZU CARVAJAL

JURADO DE EXAMEN DE GRADO
DIRECTORA: DRA SELENE CANSINO ORTIZ
COMITE: DR DAVID H MALIN
DR MARIO RODRIGUEZ CAMACHO
DR GIULIO TAGLIALATELA
DRA DOLORES RODRIGUEZ ORTIZ
DRA SARA CRUZ MORALES
DR GERMAN PALAFOX PALAFOX



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A TI SEÑOR

**En Memoria †
Manuel Goyarzu y Alfredo Goyarzu**

**A mi queridísima madre,
Celia Carvajal de Goyarzu
con todo mi corazón, respeto, admiración
y agradecimiento por todo su apoyo,
cariño y principios que siempre
me ha brindado.**

**A mis queridísimos hijos
Andrea, Mari Pili y Juan Pablo
con todo mi agradecimiento por su paciencia y apoyo
para lograr esta meta en nuestras vidas
con todo mi amor**

**A mis queridísimos hermanos y sus familias
con cariño y agradecimiento por todo su apoyo
Manolo, Sergio, Chela, Marilu, Nacho y Memo**

AGRADECIMIENTOS

Los miembros de mi comité tutoral IA me apoyaron para lograr esta meta tan importante en mi vida. Compartieron sus conocimientos y su tiempo para que se finalizara este documento. Cada uno de ellos influyó mi vida de una forma muy especial y personal. Asimismo favorecieron el crecimiento de mi desarrollo profesional. Por todo esto les estoy infinitamente agradecida a Selene Cansino Ortiz, David H Malin, Mario Rodríguez Camacho, Dolores Rodríguez Ortiz, Sara Cruz Morales, Germán Palafox Palafox y Giulio Tagliatela.

Agradezco de manera muy especial a Selene Cansino, mi directora de tesis, por haber aceptado ser mi tutora del proyecto. Sus conocimientos y su apoyo incondicional durante mis estudios fueron primordiales para concluir este documento y esta etapa de mi vida profesional.

Quiero agradecer a David H Malin por permitirme realizar mi investigación en su laboratorio, por su participación en la elaboración de la tesis y por su apoyo a lo largo de mi carrera. Agradezco a Giulio Tagliatela por su participación en mi investigación y permitirme llevar a cabo mi proyecto en su laboratorio y a Jim Joseph y Barbara Shukitt-Hale por haber proporcionado las dietas necesarias para la realización de este proyecto.

Muchas horas de trabajo intenso se requirieron para realizar este proyecto. Gracias a la participación de todos los miembros del laboratorio esta investigación fue posible. Les agradezco a Will Moon, Ed Moy, Debbie Moy, Steven Lippold y Ryan Jennings, por su cooperación en este proyecto. En especial agradezco a Francis Lau, por compartir sus conocimientos y su participación tan importante en la presente investigación.

Sin duda alguna el apoyo de mi familia fue el impulso y la base para comenzar y concluir esta etapa de mi vida. A mi mami, a todos mis hermanos y sus familias, con todo mi cariño les agradezco el apoyo que cada uno de ellos me brindó. Especialmente a mi querida hermana Chela por su inagotable ayuda en todos aspectos, y principalmente con los numerosos trámites, ya que sin su apoyo en particular, no hubiera logrado esta meta.

Incontables horas mis tres hijos, Andrea, Mari Pili y Juan Pablo apoyaron mi investigación y mis estudios, no solamente en esta etapa, sino a lo largo de toda mi carrera profesional. A mis tres porristas favoritos les agradezco con todo mi corazón. Logramos nuestra meta.

A todos mis amigos, familiares y personas que durante esta etapa me apoyaron, les agradezco infinitamente el impacto que tuvieron en la realización de mis estudios profesionales.

**Esta investigación recibió apoyo por parte del CONACYT (36203H)
y del Programa de Apoyo de Proyectos de Investigación e Innovación
Tecnológica (IN304202) de la Dirección General de Asuntos del Personal
Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México, México,
D.F. También recibió apoyo de la Universidad de Houston-Clear Lake,
Houston TX, EE.UU. del Centro Médico de la Universidad de Texas,
Galveston, TX, EE.UU., y de la Universidad de Tufts, Boston, MA, EE.UU.**

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	13
Procesos Mentales y El Envejecimiento	14
La Memoria y el Envejecimiento	17
<i>La memoria</i>	
<i>Sistemas Mnemónicos</i>	
<i>El envejecimiento y los procesos mnemónicos.</i>	
Teorías del envejecimiento biológico	23
<i>Teorías Moleculares</i>	
<i>Teorías Sistémicas</i>	
<i>Teorías Celulares</i>	
Teoría de los Radicales Libres	32
<i>Antioxidantes</i>	
<i>Dieta y antioxidantes</i>	
<i>El arándano azul</i>	
Estrés oxidativo durante el envejecimiento	46
<i>Indicadores del estrés oxidativo durante el envejecimiento</i>	
<i>Factores de transcripción relacionados al estrés oxidativo.</i>	
Factor de transcripción: Factor nuclear-κB	52
Paradigmas Experimentales de la Memoria en Roedores	60
<i>Paradigmas experimentales:</i>	
<i>Aprendizaje discriminativo por recompensa de un ensayo cada día.</i>	
<i>Exploración de objetos novedosos</i>	
Regiones Cerebrales	66
<i>Hipocampo</i>	
<i>Corteza frontal</i>	
<i>Cerebro basal anterior</i>	
<i>Estriado</i>	
<i>Cerebelo</i>	
Justificación y Propósito de esta investigación	78
Hipótesis	81

MÉTODO	83
<i>Sujetos</i>	
<i>Alimentación</i>	
<i>Manipulación de los sujetos</i>	
Experimento I	86
<i>Aprendizaje discriminativo por recompensa de un ensayo cada día</i>	
Experimento II	92
<i>Exploración de objetos novedosos</i>	
Análisis Bioquímicos	100
<i>Fraccionamiento de las proteínas</i>	
<i>Concentración de las proteínas</i>	
<i>Inmunotransferencia Western</i>	
RESULTADOS	103
Experimento I	104
Experimento II	109
Análisis Bioquímicos	112
DISCUSIÓN	118
Conclusiones	139
Investigaciones futuras	142
REFERENCIAS	146
APÉNDICES	196
Apéndice A	196
<i>Elaboración y Composición de la Dieta NIH-31</i>	
<i>Cálculo del Consumo Diario del Arándano Azul</i>	
Apéndice B	198
<i>Protocolo: Fraccionamiento de las proteínas</i>	
Apéndice C	199
<i>Protocolo: Concentración de las proteínas</i>	

Apéndice D	200
<i>Protocolo: Electroforesis</i>	
Apéndice E	202
<i>Glosario</i>	

TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Genes inducidos por NF- κ B	54
Tabla 2. Proteínas del NF- κ B	55
Tabla 3. Número de errores (M \pm EE)	105
Tabla 4. Latencia para encontrar la recompensa (M \pm EE).....	109
Tabla 5. Niveles de expresión del NF- κ B	113
Tabla 6. Comparación de pares de los niveles de expresión del NF- κ B	114
Tabla 7. Correlación de los niveles del NF- κ B y las pruebas conductuales ----	116
Figura 1. Activación del NF- κ B	58
Figura 2. Laberinto del paradigma de aprendizaje discriminativo	88
Figura 3. Acercamiento del callejón con la recompensa	89
Figura 4. Representación de la prueba de exploración de objetos	96
Figura 5. Aparato de la exploración de objetos novedosos	97
Figura 6. Ensayo de familiarización	98
Figura 7. Ensayo de retención	99
Figura 8. Número de errores	106
Figura 9. Latencia para encontrar la recompensa	108
Figura 10. Porcentaje de la exploración de objetos novedosos	111
Figura 11. Expresión normalizada del NF- κ B	115
Figura 12. Correlación del NF- κ B con las pruebas conductuales	117

Resumen

La teoría del estrés oxidativo sobre el envejecimiento postula que los efectos deletéreos de los radicales libres son los responsables del proceso de envejecimiento. Existe evidencia de que una dieta balanceada con el suplemento del arándano azul (AA) puede retardar los procesos del envejecimiento en los roedores. El presente estudio investigó si el suplemento del AA podía prevenir el decaimiento de la memoria espacial y de la memoria de reconocimiento, así como la elevación del nivel de la proteína del factor de transcripción factor nuclear-kappa B (NF-κB) en ratas adultas mayores de la cepa Fischer 344. Se alimentó a 12 ratas con la dieta que contenía el suplemento del AA por doce semanas antes de la tarea de memoria espacial y por 17 semanas antes de la tarea de memoria de reconocimiento. Al mismo tiempo se alimentó a doce ratas adultas mayores y a doce ratas jóvenes con la dieta control. La memoria espacial se estudió mediante el paradigma de aprendizaje discriminativo por recompensa de un ensayo cada 24 horas. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos durante el ensayo muestra. Asimismo no hubo una diferencia significativa en el número de errores (entrada a los callejones sin recompensa) entre los tres ensayos experimentales o en la interacción de ensayos por grupo. Sin embargo, en el promedio del número de errores de los tres ensayos experimentales se encontró una diferencia significativa únicamente entre el grupo control de ratas jóvenes y el grupo control de ratas adultas mayores. No hubo una diferencia significativa entre el grupo control de jóvenes y el grupo experimental de adultos mayores, ni entre los dos grupos de adultos mayores. No se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos en la latencia para encontrar la recompensa durante el ensayo muestra y los tres ensayos experimentales. Asimismo en la latencia para encontrar la recompensa no hubo una diferencia significativa entre

los grupos en el ensayo muestra, en los ensayos experimentales, ni en la interacción de ensayos por grupo. Sin embargo, se reveló una tendencia lineal negativa y significativa en el número de errores y la latencia de los ensayos experimentales del grupo control de jóvenes y del grupo experimental de adultos mayores. En contraste, esta tendencia no se mostró en ninguna de las dos variables del grupo control de adultos mayores. También se utilizó el paradigma de exploración de objetos novedosos para medir la memoria de reconocimiento después de un intervalo de 30 s y de uno de una hora entre el ensayo muestra y el ensayo experimental. Durante el ensayo experimental de 30 s no se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos, pero en el ensayo experimental con una hora de intervalo, el grupo control de adultos mayores realizó la tarea en un nivel inferior al nivel de azar. El grupo experimental de adultos mayores y el grupo control de jóvenes ejecutaron la tarea de manera similar, la cuál fue significativamente diferente a la del grupo control de adultos mayores. El nivel de expresión del NF- κ B se determinó mediante el método de inmunotransferencia de Western. El grupo control de adultos mayores mostró un nivel de expresión del NF- κ B significativamente más alto que el grupo control de jóvenes en cuatro de las regiones estudiadas (corteza frontal, hipocampo, cerebro basal anterior y cerebelo). El nivel de expresión del NF- κ B en cuatro de las regiones (corteza frontal, hipocampo, estriado y cerebelo) fue significativamente más bajo en el grupo experimental de adultos mayores que en el grupo control de adultos mayores. Los niveles promedio normalizados de la proteína del NF- κ B en hipocampo, cerebelo y el índice total de expresión se correlacionaron negativa y significativamente con el porcentaje de exploración del objeto novedoso.

Abstract

The oxidative stress theory of aging postulates that the deleterious effects of free radicals are responsible for the aging process. It has been reported that an antioxidant-rich, blueberry-supplemented rat diet may retard brain aging in the rat. The present study determined whether such supplementation could prevent impaired spatial memory and object recognition memory, as well as elevated levels of the oxidative stress-responsive protein, nuclear factor-kappa B (NF- κ B) in aged Fischer-344 rats. Twelve aged rats had been fed a 2% blueberry supplemented diet for 12 weeks prior to the spatial task and 17 weeks prior to the object recognition testing. At the same time twelve aged rats and twelve young rats had been fed a control diet. The rats were tested for spatial reference memory task with the one trial per day reward learning paradigm. There were no significant differences between the groups during baseline training. Also there was no significant difference between the groups in the number of errors (entrance to the alleys without the reward) among the three experimental trials or in the interaction of trials by group. However, there was a significant difference among the groups on the averaged trials. This difference was only between the young control group and the aged control group. In contrast, there was no significant difference between the young control group and the aged blueberry group. There was no significant difference between the two aged groups. There was no significant difference among the three groups during the baseline training or during the three experimental trials in latency to reach reward. Also there was no significant effect in latency among the three experimental trials, or in the interaction of trials by group. However, linear trend analyses revealed a significant negative linear trend in number of errors and latency, as a function of trial in the aged-blueberry group and the young control group,

indicating learning over the course of the experiment. In contrast, the linear trend analyses of the aged-control group did not reveal a significant linear trend in neither one of the variables. The rats were also tested for object recognition memory using the novel object exploration task with 30 s and 1 hour delays, between the training trial and the experimental trial. With a one-hour delay, aged control diet rats performed no better than chance. Young rats and aged blueberry diet rats performed similarly and significantly better than the aged control diet group. NF- κ B is a protein whose levels tend to increase as a function of cellular stress, particularly oxidative stress. Levels of NF- κ B in five brain regions of the above subjects were determined by western blott assay. In four regions, (frontal cortex, hippocampus, basal forebrain and cerebellum), aged control diet rats had significantly higher average NF- κ B levels than young animals on the control diet. In four regions, (frontal cortex, hippocampus, striatum and cerebellum), aged blueberry diet rats had significantly lower levels of NF- κ B than aged control diet rats. Normalized NF- κ B levels (averaged across regions, the hippocampus and the cerebellum) correlated negatively and significantly with the object exploration percentage scores.

INTRODUCCIÓN

El envejecimiento es un proceso gradual y continuo, durante el cual se deteriora la capacidad de adaptación del organismo a su medio interno y a su ambiente externo. Existen varios términos para identificar a las personas de edad avanzada, el Comité de Derechos Económicos, Sociales y Culturales de las Naciones Unidas (ONU, 1995) recomienda el término de “personas mayores”.

La vejez posee ciertas características propias: es universal entre los seres humanos, progresiva e irreversible, homogénea entre los seres de la misma especie (ya que cada especie tiene una velocidad característica de envejecimiento y una esperanza de vida específica), es un proceso intrínseco (ya que la esperanza de vida no está regulada por factores ambientales modificables y aún en las mejores condiciones ambientales tiene un límite), y existe un descenso en la eficiencia biológica que lleva a una pérdida progresiva de tales funciones.

Sin embargo, a pesar de las características propias de la senectud, el proceso del envejecimiento no es uniforme en todos los seres humanos; la velocidad del declive funcional varía enormemente de sujeto a sujeto, y de órgano a órgano dentro del organismo de la misma persona. La expectativa de vida es específica del individuo y es modificable a diferencia de la esperanza de vida que no lo es. La edad cronológica de las personas mayores no necesariamente coincide con la edad biológica de su organismo, sino que existe una variabilidad considerable entre ambas (Collier y Coleman, 1991; Craik, 1987; Heaton, Grant, y Mathews, 1986).

No se puede precisar en qué momento termina la edad mediana y comienza el envejecimiento. Se utilizan parámetros como la edad cronológica, la edad biológica y la edad funcional para determinar el comienzo de la vejez de una persona (Stuart-

Hamilton, 2000). La mayoría de los gerontólogos concuerdan que la edad cronológica del comienzo de la vejez se encuentra entre los 60 o 65 años (por ejemplo, Decker, 1980; Kermis, 1983; Rebok, 1987). La edad biológica es un concepto fisiológico del estado de los órganos, que implica la determinación de diferentes parámetros comparados con patrones estándar establecidos para cada edad o grupo de edades, por ejemplo: las medidas de tipo antropométrico, índice de masa corporal, tensión arterial, capacidad vital, metabolismo basal, tasas de recuperación, etc. La edad funcional mide el rendimiento de las personas mayores en relación con su grupo de edad (Stuart-Hamilton, 2000). Para determinar la edad funcional de las personas mayores se utilizan parámetros como la capacidad de las personas para mantener su integración social, sus roles personales y el nivel de su calidad de vida.

Procesos Mentales y el Envejecimiento

Actualmente se considera que las consecuencias del envejecimiento son notablemente selectivas, principalmente en el sistema nervioso central (Eichembaum, 2002). El decaimiento de los procesos cognoscitivos en las personas mayores está relacionado estrechamente con la disminución de la eficacia de los sistemas corporales (Birren, Woods y Williams, 1980). Por ejemplo, el debilitamiento de los sistemas cardiovascular y respiratorio afecta el aporte de sangre y de oxígeno al cerebro y por lo tanto, disminuye la energía de la que dispone este órgano. Birren, et al. (1980) propusieron que el enlentecimiento de los procesos mentales que se observa en las personas mayores, se debe a los cambios en el flujo sanguíneo y en el oxígeno al cerebro. El debilitamiento de los sistemas sensoriales (por ejemplo, la disminución de la agudeza visual y auditiva) afecta el contacto de la persona mayor con el medio

ambiente, por lo tanto se priva al cerebro de una experiencia directa y completa.

Algunos investigadores han propuesto que las personas mayores que ejercitan constantemente sus capacidades mentales (teoría del desuso, Milne, 1956) y mantienen una condición física saludable, generalmente cambian menos en algunos parámetros de su rendimiento intelectual (Bunce, Barrowclough y Morris, 1996; Hawkins, Kramer y Capaldi, 1992).

Se ha demostrado que dentro del grupo de las personas mayores con una misma edad cronológica, existen diferencias significativas en varias medidas de destrezas cognoscitivas (Albert, 2003), y se ha sugerido que esta característica de la vejez se debe a la gran variación del estado fisiológico y morfológico del SNC entre las personas mayores (Rabbitt, 1984, 1993). Sin embargo, existen ciertos parámetros indicativos del decaimiento cognoscitivo durante el envejecimiento que se observan en la mayoría de las personas mayores, aunque en diferente magnitud:

- En las pruebas de destrezas especializadas como la inteligencia cristalizada y la inteligencia fluida (Cattell, 1971; Horn, 1978) se observan cambios. En general, las destrezas cristalizadas (por ejemplo, los conocimientos adquiridos y los procedimientos habituales) se ven menos afectadas por la edad que las destrezas fluidas (por ejemplo, la capacidad para resolver problemas en situaciones nuevas). Para una descripción detallada ver las revisiones de Christensen, Henderson, Griffiths, y Levings, 1999; Rabbit, 1993.
- El coeficiente intelectual (CI) de las personas no se altera con la edad, en general, una persona mantiene su CI en el mismo nivel que las personas de su edad durante todo su ciclo vital (Stuart-Hamilton, 2000).
- Una de las medidas más confiables del decaimiento mental son los tiempos de reacción, los cuales se hacen proporcionalmente más lentos con la edad (Birren

y Fisher, 1995; Lindeberger, Mayr y Kliegl, 1993). Los tiempos de reacción se correlacionan negativamente con las medidas del rendimiento intelectual (Ferraro y Moody, 1996).

- Otro indicador del decaimiento mental son los cambios en la capacidad de atención. La atención sostenida no disminuye significativamente (Salthouse, 1982), pero cuando la atención se dirige a diferentes estímulos (atención selectiva y atención dividida) existe un déficit (Lajoie, Teasdale, Bard y Fleury, 1996; Rabbit, 1975; Vaneste y Pouthas, 1999).
- El pensamiento abstracto también se ve afectado. Frecuentemente se observa en las personas mayores un decaimiento de la organización conceptual, por ejemplo, en la categorización de palabras complejas mediante varios atributos (Kramer, Humphrey, Larish y Logan, 1995). Asimismo, el pensamiento divergente se encuentra disminuido. Esto se observa en la dificultad que tienen las personas mayores para resolver tareas que requieren creatividad (Stuart-Hamilton, 2000).
- Algunas personas mayores muestran dificultad para realizar tareas piagetanas, como la de conservación de la materia (Papalia, 1972), razonamiento moral y animismo (McDonald y Stuart-Hamilton, 1996, 2000).
- Durante el envejecimiento los procesos mnemónicos también sufren cambios. A pesar de que algunos tipos de procesos mnemónicos se conservan durante el envejecimiento y de que existe una variación individual significativa, el debilitamiento de los procesos mnemónicos aumenta con la edad.

La Memoria y el Envejecimiento

En todos los procesos mentales de nuestra vida diaria utilizamos información adquirida a través de nuestra experiencia pasada. La memoria es una destreza mental que nos permite conservar y evocar dichos sucesos e informaciones pasadas. El flujo de estímulos que se transforman en los trazos mnemónicos sigue un proceso secuencial que se divide en las fases de codificación, almacenamiento y recuperación.

En la actualidad, la memoria no se considera un proceso unitario (Mishkin, 1978; Squire, 1986) ni difuso en todo el cerebro, sino un conjunto de sistemas bien definidos y distintos (Cohen, 1994; Squire, 1987).

Sistemas Mnemónicos

La clasificación de los multisistemas mnemónicos no se basa en las modalidades sensoriales (memoria sensorial) o temporales (memoria a corto plazo y memoria a largo plazo). Todos los sistemas tienen acceso a todas las modalidades sensoriales y utilizan rutas múltiples para la recuperación y expresión de las memorias. Las características que distinguen a cada sistema mnemónico son la representación de la información, su organización y la flexibilidad en la recuperación de la información (Squire, Bloom, McConnell, Roberts, Spitzer y Zigmond, 2003).

Diversos estudios han demostrado la disociación entre los sistemas mnemónicos así como las estructuras críticas de cada uno (McDonald y White, 1993; Packard y McGaugh, 1996). Actualmente, se consideran tres sistemas que apoyan diferentes tipos de memoria: memoria declarativa, memoria no declarativa o de procedimiento y memoria emocional. (Cohen y Eichenbaum, 1993; McDonald y White, 1993; Squire et al., 2003). Asimismo cada sistema contiene varios tipos de memorias. Todos los sistemas reciben y

mandan información a las diferentes áreas corticales asociativas: cortezas temporal, parietal, olfativa, prefrontal y el giro cingular (Eichenbaum, 2002; Squire et al., 2003; Squire y Zola-Morgan, 1991).

Memoria Declarativa

Es la capacidad de recordar eventos y sucesos. La información de la memoria declarativa se expresa explícitamente, está al alcance de la persona en una forma consciente y tiene un componente temporal a largo plazo (Squire et al., 2003). La información se recupera a través del recuerdo libre y el reconocimiento (memoria de evocación libre y memoria del reconocimiento, respectivamente). La memoria de evocación libre se lleva a cabo sin indicios externos en contraste con la memoria del reconocimiento que se activa en respuesta a una indicación externa.

Numerosos investigadores han sugerido que la memoria semántica y episódica (Tulving, 1972) son componentes de la memoria declarativa (Cermak, Talbot, Chandler y Wolbarst, 1985; Cohen, 1994; Schacter y Tulving, 1983; Squire, 1986, 1987, Squire, Knowlton y Musen, 1993; Squire y Zola-Morgan, 1991). La memoria semántica consiste en el aprendizaje de datos y conocimientos generales y la memoria episódica en el aprendizaje de información personal.

Las estructuras específicas del sistema de la memoria declarativa son el hipocampo (la estructura crítica en el sistema de la memoria declarativa) y la región parahipocampal (la corteza entorrinal, la corteza peririnal y la corteza parahipocampal o postrinal). El hipocampo tiene circuitos aferentes y eferentes que lo conectan con la región parahipocampal y ésta a su vez recibe información sensorial de la corteza asociativa. Por lo tanto esta región es un punto de convergencia entre la corteza asociativa y el hipocampo (Squire et al., 2003).

Memoria No-Declarativa o de Procedimiento

El tipo de memoria de este sistema consiste en la adquisición de hábitos y habilidades, los cuales se expresan en forma inconsciente e implícita por medio de una gran variedad de comportamientos (Eichembaum, 2002). Este tipo de memoria se utiliza en nuestra vida rutinaria y se modifica continuamente con la experiencia y la práctica diaria.

Al contrario del sistema de la memoria declarativa la anatomía de éste sistema es muy compleja y no se ha definido aún claramente (Eichembaum, 2002; Squire et al., 2003). Los componentes principales de este sistema que se han identificado son: el estriado, compuesto por el núcleo caudado, el putamen y el núcleo acumbens; el cerebelo y la corteza cerebral, especialmente la corteza motora (Squire et al., 2003; Thompson y Kim, 1996).

Memoria Emocional

Evoca emociones que están asociadas con experiencias pasadas y produce un cambio inconscientemente en el comportamiento, aún antes de que se recuerde dicha asociación. Asimismo, la memoria emocional influye en el desarrollo de las preferencias y las aversiones que sentimos hacia un evento y en la adquisición de juicios positivos o negativos, creando así, los prejuicios que afectan el comportamiento de las personas (Mc Donald y White, 1993; Squire et al, 2003).

La memoria emocional es independiente de la memoria declarativa y de la memoria de procedimiento. Las estructuras principales implicadas en la memoria emocional son la amígdala y el circuito neuronal entre el hipotálamo y la hipófisis (McDonald y White, 1993).

El envejecimiento y los procesos mnemónicos.

El envejecimiento no afecta de manera uniforme a todos los sistemas mnemónicos (por ejemplo, Albert, 2003; Kramer et al., 1995; Markowska et al., 1989). Una investigación reciente con individuos entre las edades de 35 y 90 años (los adultos mayores que participaron gozaban de un estado de salud óptimo), utilizó una tarea de recuerdo libre y demostró dos puntos muy importantes: una declinación de la memoria declarativa con la edad y una gran variabilidad de este efecto entre las personas mayores, ya que hubo individuos mayores que realizaron la tarea tan bien como los jóvenes (Albert, 2003).

La mayor diferencia entre los adultos mayores y los jóvenes se observa en la capacidad para formar memorias nuevas. Los adultos mayores muestran una disminución en esta capacidad y se piensa que puede deberse a problemas en la consolidación y en la transferencia de la información de la memoria a corto plazo a la memoria a largo plazo (Albert, 1994). También se ha propuesto que esta incapacidad puede deberse a la falta de estrategias de las personas mayores para aprender la información que se les presenta. Por ejemplo, se encontró que la mayoría de las personas mayores no usaban estrategias de asociación para aprender una lista de palabras apareadas; y por lo tanto, necesitaban un número mayor de ensayos para aprender los pares (Ardilla y Rosselli, 1989).

La dificultad para formar memorias nuevas se presenta tanto en la modalidad verbal como la no verbal (Crook et al., 1986). Sin embargo, se ha encontrado que la memoria viso espacial suele estar más afectada que la memoria verbal (Eslinger, Pepin y Benton, 1988). Este hecho se ha demostrado a través del menor desempeño de las personas mayores en las subescalas de ejecución de la Prueba de Inteligencia para

Adultos de Weschler Revisada (WAIS-R) (1945) en comparación con los jóvenes; mientras que su desempeño es normal en la subescala de vocabulario (Botwinick y Storandt, 1973). Asimismo, existe un déficit mayor en los adultos mayores cuando se les pide que reproduzcan una figura previamente vista por medio del recuerdo libre que cuando la copian directamente (Ardilla y Rosselli, 1989).

Del mismo modo, existe una disminución en la velocidad del proceso de codificación (Cerella, Poon y Fozard, 1982), que se muestra en el aumento de los tiempos de reacción en distintas pruebas neuropsicológicas (Ardilla y Roselli, 1989; Ferris, Crook, Sathananthan y Gershon, 1976). La diferencia entre los jóvenes y adultos mayores en los tiempos de reacción aumenta conforme incrementa la rapidez de la presentación de la información. Esta diferencia se vuelve insignificante cuando disminuye la velocidad de la presentación de la información (Arenberg, 1980).

Los procesos de recuperación mediante el recuerdo libre y el reconocimiento se ven afectados de manera diferente. Los sujetos mayores ejecutan más pobremente las pruebas de recuerdo libre que las pruebas de reconocimiento (Craik, 1987). Incluso, algunos autores sugieren que las pruebas de recuerdo facilitado o reconocimiento tienden a ser normales en las personas mayores (Petersen, Smith, Kokmen, Ivnik y Tangalos, 1992). Sin embargo, otros autores han encontrado que la memoria de reconocimiento declina con la edad y de forma muy variable (Squire et al., 2003) durante el envejecimiento normal de los seres humanos (Joyce, Paller, McIsaac, y Kutas, 1998; Minamoto, Tachibana, Sugita y Okita, 2001; Pilotti, Meade y Gallo, 2003; Rabbitt y Lowe, 2000; Verhaeghen, Vandenbroucke y Dierckx, 1998) primates (Moss, Killiany, Rosene y Herndon, 1997), roedores (Bartolini, Casamenti y Pepeu, 1996; Delli, Mayo, Vallee, Le Moal y Simon, 1994; Delli, Mayo, Cherkaoui, Le Moal y Simon, 1992; Scali, Giovannini, Bartolini, Prosperi, Hinz, Schmidt y Pepeu, 1997), y en

enfermedades neurodegenerativas (Chen, Ratcliff, Belle, Cauley y DeKosky, 2001; Fleischman, Gabrieli, Reminger, Rinaldi, Morrell y Wilson, 1995; Gill y Josman 2001; Lee, Rahman, Hodge, Sahakian y Graham, 2003; Lekeu et al., 2003; Pilotti et al., 2003).

La memoria semántica se mantiene relativamente estable con la edad (Huppert, 1991). Especialmente cuando la información tiene un aspecto emocional o cultural importante en la vida de la persona (LaRue, 1992). Algunos autores sugieren que la memoria semántica presenta un aumento conforme avanza la edad (Eustache et al., 1995).

Existe un decremento notable en los procesos centrales de la memoria episódica en las personas mayores (Allen et al 2002; Mitchell, 1989). Los adultos jóvenes son por lo general más rápidos en la producción de recuerdos y pueden narrar los eventos con mayor precisión de detalles que las personas mayores (Rabbit y Winthorpe, 1988). El adulto mayor recuerda los puntos principales y la esencia de las historias de su vida pero la evocación de los detalles tiende a disminuir (Field, 1981). Algunos autores sugieren que la mayoría de los recuerdos autobiográficos proceden de los acontecimientos claves en la vida de las personas (Rubin y Schulkind, 1997) y la nitidez del recuerdo depende de la intensidad de los sentimientos del evento (Damasio, 1994; Allen, Kaut, Lord, Hall, Grabbe y Bowie, 2005) y la frecuencia con que se hayan recordado los mismos (Cohen y Faulkner, 1988). Posiblemente estas variables, la nitidez del recuerdo y la intensidad de los sentimientos disminuyen durante el envejecimiento.

Teorías del envejecimiento biológico

Existen muchas teorías sobre los cambios biológicos que suceden durante el envejecimiento. Sin embargo, existe un consenso general que el envejecimiento biológico tiene una naturaleza multicausal y compleja (Kowald y Kirkwood, 1996). Por lo tanto una sola teoría no puede explicar el proceso del envejecimiento y la mayoría de las teorías no son independientes entre si. Las teorías principales del envejecimiento biológico se pueden dividir en tres categorías: teorías moleculares, teorías celulares y teorías sistémicas (Sharma, 1994):

Teorías Moleculares

Toda la información genética se guarda en el ácido desoxirribonucleico (DNA) de las células de un organismo. Los genes son los segmentos nucleótidos que se encuentra en el DNA y son las unidades genéticas. La información genética se transcribe a la molécula de ácido ribonucleico (RNA) y posteriormente se inicia el proceso de traducción o síntesis de las proteínas. Estas proteínas, ya sea estructural o funcionalmente, gobiernan la forma y las funciones del organismo. De acuerdo a las teorías moleculares, la longevidad (la duración de vida de un organismo independientemente de la esperanza de vida según su especie) de cualquier especie depende de la interacción de los genes y los factores ambientales. Estas teorías parten de dos conceptos básicos: todos los organismos dentro de una especie poseen la capacidad de una longevidad muy similar y entre las diferentes especies se denota una longevidad diferente. Por ejemplo, las cachipollas viven únicamente un día, las moscas 30 días, las ratas 3 años, los perros 12 años, los caballos 25 años (Comfort, 1979) y los seres humanos 122 años ([http:// en, wikipedia.org/ wiki/ Jeanne_Calment](http://en.wikipedia.org/wiki/Jeanne_Calment)). Se cree que existe

un programa genético que determina la longevidad máxima para cada especie. Otro argumento a favor de esta teoría es la herencia genética, por ejemplo, los individuos más longevos suelen tener descendientes con una longevidad más larga que los que nacen de padres con una longevidad mediana (Dublín, 1949; Murphy, 1978). Asimismo, el promedio de vida de las mujeres es generalmente más alto que el de los hombres, y esta diferencia entre los sexos también se observa en miembros de otras especies (Rockstein, 1974). Un estudio reciente ha identificado genes en el cromosoma 4 que promueven una longevidad más larga, apoyando así la hipótesis que la longevidad tiene un componente genético (Puca et al., 2001). Sin embargo, la expresión de la programación genética que regula la longevidad puede ser alterada por varios factores ambientales, como las radiaciones ionizantes, la dieta, el ejercicio, etc.

Brevemente, entre las principales teorías moleculares del envejecimiento se encuentran:

Envejecimiento programado: las células se pueden reproducir un número programado de veces (el fenómeno de Hayflick) (Hayflick y Moorhead (1961). Las Investigaciones con células tomadas de organismos vivos y cultivadas *in vitro* han demostrado que éstas se duplican solamente un número determinado de veces y después se mueren (ver revisión: Hayflick, 1997). El número de duplicaciones disminuye conforme aumenta la edad del organismo (Martin, Spregue y Epsteins, 1970).

Acortamiento de los telómeros: en cada división celular se pierden los telómeros, los fragmentos finales de los cromosomas (Olovnikov, 1996). El telómero (del griego telos: final y meros: parte) se acorta cada vez que una célula se duplica, hasta que ya no se puede acortar más, por lo tanto la célula no puede seguir duplicándose y muere (Greider y Blackburn, 1996). Se ha demostrado que al reactivar

los telómeros *in vitro* se prolonga considerablemente la vida celular, más allá del los límites naturales especificados por Hayflick (Johnson, Marciniak y Guarente, 1998). Sin embargo, otros investigadores (Johnson et al. 1998) sugieren que, por sí solos, los mecanismos del telómero, no son los responsables del proceso del envejecimiento, sino que forman parte de las múltiples anormalidades del material genético que se observan durante el envejecimiento.

Restricción de los codones: la información genética para las proteínas está codificada en unidades independientes de tres bases llamadas codones o tripletes de bases. La lectura exacta de los codones la realizan dos moléculas: el RNA de transferencia (tRNA) y la sintetasa de aminoacil-tRNA. La teoría de la restricción de los codones sugiere que la exactitud del proceso de traducción del RNA mensajero (mRNA) se deteriora durante la vejez. Las moléculas de tRNA y la aminoácido-tRNA-ligasa no pueden descifrar las unidades de codones en las moléculas de mRNA y por lo tanto se producen alteraciones críticas en el mRNA (Strehler, 1977). Existe evidencia experimental en varias especies, como la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (Hosbach y Kubli, 1979), los roedores (Yang, 1971), las plantas (Bick y Strehler, 1972), los conejos (Efstratiadis, Kafatos y Maniatis, 1977) y los seres humanos (Agris, Boak, Basler, Voorn, Smith y Reichin, 1985), de que la eficacia y la actividad de las moléculas de tRNA disminuyen durante el envejecimiento. Por lo tanto se altera la velocidad del proceso de traducción y la habilidad de las células para traducir la información genética.

Mutación somática: fue propuesta por Szilard (1959) y sostiene que el envejecimiento es el resultado de la acumulación de mutaciones en el DNA nuclear de las células somáticas debido a su exposición a radiaciones. Como consecuencia, las células hijas no se duplican de manera exacta sino que su DNA contiene errores. Por lo tanto, se elevan la incidencia de mutaciones y la pérdida de genes funcionales, y como

consecuencia la vida de las personas se acorta (Curtis, 1964; Failla, 1960; Szilard, 1959). Sin embargo, se ha demostrado que ciertas mutaciones somáticas causadas por las radiaciones tienen una incidencia muy baja durante el envejecimiento (Maynard-Smith, 1996). Algunos investigadores (Evans, 1990; Vijg y Gossen, 1993) sostienen que la acumulación de mutaciones somáticas es una consecuencia en lugar de una causa del envejecimiento.

Error catastrófico: el proceso del envejecimiento se debe a la duplicación defectuosa de las proteínas debida a errores en la información transferida del DNA a las proteínas (Medvedev, 1961; Orgel, 1963, 1970). Dicha duplicación defectuosa continúa hasta llegar a una pérdida catastrófica de la homeostasis celular que lleva a la muerte celular. Existen evidencias que muestran inconsistencias con esta hipótesis y que sugieren que los errores en la duplicación proteica no ocurren únicamente como consecuencia de la edad (Goldstein, Wojtyk, Harley, Pollard, Chamberlain y Stanners, 1985; Kanungo y Gandhi, 1972). Las alteraciones en la replicación de algunas proteínas se deben al proceso de oxidación (Fleming, Meinikoff, Latter, Chandra y Bensch, 1986).

Regulación genética: la senectud es el resultado del cambio en la expresión genética después de los años reproductores del organismo. El periodo de vida de un organismo está dividido en tres etapas (el desarrollo, la reproducción y el envejecimiento) y existe la activación y la supresión específica de diferentes genes de acuerdo a cada etapa (Kanungo, 1975).

Soma desechable: Kirkwood (1988) sugiere que la prioridad de un organismo es reproducirse cuantas veces le sea posible. Sostiene que la mejor estrategia evolutiva es utilizar toda la energía y recursos para el mantenimiento de los órganos reproductores que son los responsables de la supervivencia de la especie. Lo más importante es que

los genes del organismo sobrevivan, la supervivencia personal es secundaria, por lo que se considera al envejecimiento un subproducto accidental de una necesidad de mantener los órganos reproductores en la mejor condición (Kirkwood, 1988). En estudios de laboratorio se ha demostrado que los animales cuya reproducción es retardada, tienden a vivir más años en comparación con animales de su misma especie que tienen descendientes a una edad más temprana, y que existe una correlación entre el tiempo que un organismo tarda en alcanzar la edad reproductora y su longevidad (Segall, Timiras y Watson, 1983).

Daño al genoma mitocondrial (DNAm_t): esta hipótesis sugiere que los radicales libres causan una inestabilidad del DNAm_t, lo que conlleva al envejecimiento celular (Miquel, Economos, Fleming y Johnson, 1980). Con la edad disminuye el número de mitocondrias con un funcionamiento adecuado, y por lo tanto, se afectan los procesos necesarios para la regeneración de las poblaciones mitocondriales, la producción de la energía celular y la síntesis de las proteínas. Posteriormente, la hipótesis de la mutagénesis mitocondrial intrínseca (Fleming, Miquel, Cottrell, Yengoya y Economos, 1982) afirmó que las alteraciones en la DNAm_t causan los daños irreversibles que se observan durante el envejecimiento. Las mutaciones del DNAm_t ocurren con mayor rapidez que las que suceden en el DNAn y su proceso de reparación es más lento (Berneburg, 1999).

Teorías Sistémicas

Estas teorías argumentan que el envejecimiento se debe a alteraciones en los sistemas claves que ocasionan un deterioro general en el funcionamiento del organismo; este decaimiento puede ser programado genéticamente durante las primeras fases del desarrollo o puede ser la consecuencia de daños ambientales (Sharma, 1994).

Entre las teorías sistémicas principales se encuentran:

Control neuroendocrinológico: Dilman y Dean propusieron en 1960 que el envejecimiento era el resultado de un programa regulado por señales neuronales y hormonales. Este programa comienza desde la fertilización y termina con la muerte (Walker y Timiras, 1982). Estos periodos están regulado por el circuito neuronal entre el hipotálamo y la hipófisis, el cual es considerado el regulador central y su función principal es mantener la homeostasis del organismo (Cannon, 1932). La disminución de los ajustes homeostáticos genera fallas de los mecanismos de adaptación, lo que conlleva a la vejez y finalmente a la muerte (Frolkis, 1982). Recientemente esta teoría ha sido apoyada por investigaciones en el laboratorio que han demostrado la existencia de un circuito neuronal que controla, entre otras funciones, la longevidad del nematodo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) (Kawano, Ito, Ishiguro, Takuwa, Nakajima y Kimura, 2000).

Sistema Inmunológico: la respuesta inmune disminuye con la edad, no puede combatir las infecciones eficientemente e identifica incorrectamente las células del propio cuerpo como agentes infecciosos y las ataca (Stenberg, 1998). Lo cual lleva a un incremento marcado de enfermedades autoinmunitarias y un decremento en los mecanismos de defensas del organismo. (Ginaldi y Stenberg, 2003; Franceschi, Monti, Sansoni y Cossarizza, 1995; Makinodan y Kay, 1983; Schmoll, Tewes y Plotnikoff, 1992). Estos cambios en los mecanismos inmunológicos producen el decaimiento varios sistemas del organismo que conllevan a la vejez y a la muerte. Por ejemplo, se ha demostrado claramente que con la edad disminuye la capacidad de proliferación de las células T (Timo) ante estímulos extraños (George y Ritter, 1996). Se ha mostrado que en las personas centenarias con buena salud se conserva un nivel normal de las actividades de varios tipos de linfocitos (Franceschi et al., 1995). Asimismo en el

laboratorio se demostró que ratones con una dieta de calorías reducidas desde el momento de su nacimiento, vivieron más allá de la expectativa de su vida, y mantuvieron un nivel alto de células T (Miller y Harrison, 1995).

Teorías Celulares

Estas teorías proponen que los cambios que se observan en la estructura y en los elementos funcionales de las células ocurren con el paso del tiempo y bajo la influencia de ciertos factores ambientales, como por ejemplo la nutrición y el estrés. Entre las principales teorías celulares se encuentran:

Uso: esta teoría fue introducida por August Weismann en 1882, y compara los organismos con máquinas y sostiene que con el uso, las células del organismo se desgastan y funcionan defectuosamente (Sacher, 1977). La hipótesis de esta teoría se basa en las observaciones de que la longevidad de ciertas especies es proporcionalmente inversa al ritmo de su metabolismo basal (Sohal, 1976).

Acumulación de productos de desecho: el envejecimiento celular es el resultado de la acumulación de la ruptura de productos citoplásmicos perjudiciales para la célula, por ejemplo, el pigmento de lipofuscina se acumula causando deficiencias a nivel celular, las cuáles producen complicaciones fisiopatológicas (Sheldrake, 1974). Por ejemplo, existe un aumento de la lipofuscina, esta toxina se observa principalmente en las neuronas, pulmones, y en el tejido cardíaco. Existe un aumento de lipofuscina en las neuronas de pacientes con la enfermedad de Alzheimer (Keller, 2006). La cantidad de lipofuscina se ha correlacionado positivamente con la muerte de las neuronas durante el envejecimiento. Se ha sugerido que el estrés oxidativo promueve la formación de lipofuscina. Esto se demuestra por el alto contenido de metales que se encuentran en

este pigmento y por la reducción del mismo con el tratamiento de antioxidantes (Kato, Maruyama, Naoi, Hashizume y Osawa, 1998).

Teoría de la reticulación del envejecimiento: se presenta con la edad un aumento de entrecruzamientos entre moléculas (proteínas o cadenas de ácidos nucleicos) que alteran las propiedades químicas y físicas de dichas moléculas (Brownlee, 1991; Verzar, 1964). Por ejemplo, con el entrecruzamiento las fibras de colágena se vuelven menos elásticas y más quebradizas (Verzar), y aumenta la rigidez en la membrana celular y en los tejidos musculares (Zs-Nagy, 1988). Se ha sugerido que la hipótesis de los radicales libres y el entrecruzamiento de ciertas moléculas son componentes de los mismos procesos bioquímicos, ya que los productos generados por ambos procesos aumentan de forma similar con la edad (Kristal y Yu, 1992).

Teoría del envejecimiento de los radicales libres: Commoner y sus colaboradores mostraron por primera vez evidencias de la existencia de los RL en los sistemas biológicos (Commoner, Townsend y Pake, 1954). Dennis Harman en 1956, postuló la teoría de los radicales libres del envejecimiento sugiriendo que el daño celular ocasionado por los RL era la causa principal del proceso del envejecimiento (Harman, 1956). Esta teoría recibió mucha atención por dos eventos claves, el descubrimiento de la enzima superóxido dismutasa en el organismo (McCord y Fridovich, 1969) y la demostración de que la acumulación de proteínas oxidadas en varios tejidos dependía de la edad del organismo (Stadman, 1992). En la última década, la teoría de Harman ha recibido numerosas confirmaciones experimentales, y es la de mayor aceptación. Posiblemente por que la hipótesis básica de esta teoría puede explicar numerosos cambios que se observan durante el envejecimiento a nivel tisular, celular y molecular, y por la posibilidad de emplear mecanismos de intervención durante la senescencia, por ejemplo, el uso de antioxidantes. Se ha establecido claramente la

existencia *in vivo* de los compuestos conocidos como especies reactivas de oxígeno (ERO) y las especies reactivas de nitrógeno (ERN) y el daño que causan a las células (Beyer, Imlay, y Fridovich, 1991; Chance, Siess, y Boveris, 1979, Davies, 1995; Fridovich, 1995; Halliwell, 1989).

Teoría de los Radicales Libres

Las reacciones de los radicales libres con otras moléculas han sido implicadas en varias de las teorías del envejecimiento mencionadas anteriormente (por ejemplo: el error catastrófico, el daño al genoma mitocondrial, el entrecruzamiento de moléculas, la mutación somática). Los radicales libres (RL) son átomos o moléculas que contienen al menos un electrón impar en su último orbital (Ames, Shigenaga y Hagen, 1993). Esta composición química los hace extremadamente reactivos, y tienden a formar enlaces covalentes con otros átomos o moléculas que les transfieren un electrón, apareando así el electrón libre. Este mecanismo crea una cadena de reacciones altamente tóxicas que producen alteraciones a nivel molecular, celular y tisular en los organismos (Ames et al., 1993). Diariamente, el organismo humano durante los procesos metabólicos normales produce unos diez billones de radicales libres que son eliminados generalmente por los mecanismos naturales de defensa del organismo (Ames et al., 1993). Las reacciones múltiples de oxidación-reducción crean un equilibrio conocido como REDOX, el cual es esencial para el funcionamiento homeostático del organismo (Sohal, 1993).

Los organismos aeróbicos utilizan una gran cantidad de oxígeno en el metabolismo de sus funciones fisiológicas básicas. Durante este proceso el oxígeno forma las especies reactivas de oxígeno (ERO) y las cuales son en su mayoría RL

(Halliwell y Gutteridge, 1985). Existen otras fuentes de compuestos oxidantes, por ejemplo las reacciones de las especies reactivas de nitrógeno (ERN). Las ERO y las ERN pueden ser inducidas por una gran variedad de eventos endógenos y exógenos. La bioquímica de estas moléculas y sus reacciones es muy compleja. Para una descripción detallada sobre este tema, se recomiendan, entre otros, los siguientes documentos: Beckman y Ames, 1998; Halliwell, 1991; Knight, 2001.

La acumulación excesiva de los RL produce lesiones y un deterioro en el organismo que se conoce como el estrés oxidativo (EO). El EO (Floyd, 1984; Hayflick, 1994) se define como el desequilibrio entre las moléculas ERO y ERN y los sistemas antioxidantes (sistemas de defensa que se oponen a la acción tóxica de los radicales libres) y determina el envejecimiento biológico a que un organismo se encuentra sometido. Las ERO y ERN que producen mayor toxicidad se encuentran el anión superóxido (O_2^-), hidroxilo (OH^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), peroxinitrito ($ONOO^-$), óxido nítrico (NO) y dióxido de nitrógeno (NO_2) (Halliwell, 1991). Las ERO/ERN se pueden generar por fuentes endógenas o exógenas. Las fuentes endógenas son el resultado de procesos fisiológicos normales en el interior de la célula, como por ejemplo la respiración celular de la mitocondria. Miquel et al. (1980) postularon que la mitocondria es una fuente continua de RL, ya que consume el 90 por ciento del oxígeno total celular. Ejemplos de las fuentes exógenas de ERO/ERN son contaminantes en el medio ambiente, radiaciones ionizantes y ultravioletas, los tóxicos como el alcohol, el humo del tabaco, y medicamentos (Halliwell y Gutteridge, 1985). La exposición del organismo a dichas fuentes aumenta la formación de las ERO/ERN en los mismos (Hoidal, Fox, LeMarbre, Perri y Repine, 1981). Por ejemplo, entre los oxidantes que se encuentran en el humo del tabaco están el ácido nítrico y el peroxinitrito (Pryor y Stone, 1993).

Antioxidantes

El organismo cuenta con diferentes niveles y sistemas de protección celular en contra del estrés oxidativo. La primera defensa del organismo es bloquear la formación de los radicales libres como una medida preventiva; el siguiente nivel es disminuir o eliminar los radicales libres, cuando éstos ya están formados, por medio de mecanismos antioxidantes (Halliwell, 1991; Halliwell y Guttridge, 1985). Cuando la acción de los antioxidantes no es suficiente, entra en juego el último nivel de protección que consiste en reparar las lesiones o destruir las proteínas severamente dañadas mediante el mecanismo de apoptosis: muerte celular programada (Anderson, 1996). El proceso por el cual los antioxidantes ejercen sus efectos es complejo. Brevemente, la célula posee mecanismos antioxidantes de defensa. Los antioxidantes son compuestos químicos que reducen el índice de reacciones oxidantes en un contexto específico. La estructura de los antioxidantes les permiten capturar radicales libres y reducir los productos de las oxidaciones en cadena. Por ejemplo, la enzima antioxidante del glutatión peroxidasa convierte el radical H_2O_2 en agua (Beckman y Ames, 1998). Los antioxidantes se pueden dividir en dos tipos: los enzimáticos y los no enzimáticos.

Los antioxidantes enzimáticos son producidos en el organismo y tienen funciones importantes en la homeostasis del organismo (Beckman y Ames, 1998). Entre los sistemas enzimáticos se encuentran el sistema de superóxido dismutasas (SOD), que incluyen el superóxido de dismutasa (SOD) en la matriz extracelular, la enzima de manganeso superóxido dismutasa (MnSOD) en la mitocondria y la enzima de superóxido dismutasa de cobre y zinc (Cu-ZnSOD) en el citosol; catalasa (CAT); glutatión peroxidasa (GPx); y glutatión reductasa (GR). Recientemente se reconoció un sistema nuevo, el heme-heme-oxigenasa (HO), que es un potente antioxidante (Maines,

1997). Entre los antioxidantes no enzimáticos se encuentran: el glutatión (Shan, As, y Jones, 1990). las vitaminas como el ácido ascórbico o vitamina C (Niki, Yamamoto, Komury y Sato, 1991), los tocoferoles incluyendo tocoferol α o vitamina E y tocoferol gamma (Bunker, 1992; Halliwell, 1991); los carotenoides como el β -caroteno, el α -caroteno, el licopeno, y la luteína (Bunker, 1992; Odin, 1997; Niki, Noguche, Tsuchihashi y Gotoh, 1995), minerales (por ejemplo, zinc, selenio, niacina, manganeso, fósforo), L-carnisine, CO-enzima Q 10, y los fitoquímicos como los polifenoles y flavonoides. (Halliwell, 1997; Joseph et al., 1996). Los antioxidantes no-enzimáticos necesitan ser ingeridos a través de dietas ricas en frutas y verduras o suplementos vitamínicos para mantener un nivel adecuado de los mismos en el organismo.

Estrés oxidativo, antioxidantes y el envejecimiento

Investigadores han mostrado constantemente que el EO se eleva durante el envejecimiento normal, a pesar de que los mecanismos causantes de este fenómeno no se han establecido claramente (Harman, 1956, 1992; Joseph et al., 1996; Mattson et al., 2000; Sohal et al., 1995). Por ejemplo, roedores de 22 meses de edad mostraron mayor sensibilidad al EO que los roedores de 3 meses de edad (Argawal y Sohal, 1996). Un estudio comparativo entre cinco especies diferentes, mostraron una correlación inversa entre la longevidad de los organismos y su susceptibilidad al EO (Argawal y Sohal, 1996; Sohal, Sohal y Brunk, 1990).

El daño inducido por el EO durante en envejecimiento incluyen: peroxidación lípídica de la membrana celular y de las proteínas (Chevion, Berenstein, y Stadman, 2000; Dubey, Foserster y Sohal, 1995; Paolisso, Tagliamonte, Rizzo, Manzella, Gambardella y Varricchio, 1998), oxidación del DNA nuclear y de la mitocondria (Ames et al., 1993; Chung et al., 1992; Fleming et al., 1982) aumento en la actividad de

ciertos factores de transcripción (Lavrovsky, Chatterjee, Clark, y Roy, 2000), y alteraciones en los mecanismos del funcionamiento del calcio (Joseph, Strain, Jimenez y Fisher, 1997). Los daños mencionados anteriormente causan un declive de la capacidad funcional de las células que es característico del envejecimiento y en situaciones crónicas puede producir necrosis o apoptosis celular (Halliwell, 1991). El órgano más vulnerable en el organismo durante el envejecimiento es el cerebro, ya que utiliza la mayor cantidad de oxígeno de todos los órganos; contiene una cantidad abundante de lípidos; y su habilidad para neutralizar los efectos del EO declina (Ames et al., 1993; Benzi y Moretti, 1995; Harman, 1994).

Los organismos jóvenes producen más radicales libres que los envejecidos, pero poseen sistemas antioxidantes más eficientes, y por lo tanto pueden reducir la expresión del EO (Argawal y Sohal, 1996). Mediante mecanismos aún no bien establecidos, en la senectud se produce un deterioro de los sistemas antioxidantes, y por lo tanto un incremento del estrés oxidativo (Harman, 1992; Joseph, Villalobos-Molina, Denisova, Erat, Jimenez y Strain, 1996; Mattson, Duan, Lee y Guo, 2000; Sohal, Agarwal, Agarwal y Orr, 1995). Se ha demostrado que los sistemas de antioxidantes endógenos son dependientes de la edad del organismo. En un estudio de laboratorio, se aumentó la longevidad de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* con el tratamiento de dos enzimas antioxidantes, la catalasa y el Cu-ZnSOD (Sohal et al., 1995).

La relación entre estrés oxidativo, antioxidantes, envejecimiento y longevidad ha sido el foco de numerosas investigaciones (por ejemplo, Joseph et al., 1998a; Meydani et al., 1998; Siess, 1991). Sus resultados han demostrado que la ingesta de antioxidantes puede prevenir o reducir el estrés oxidativo.

Sin embargo, numerosas investigaciones recientes han sugerido que la defensa en contra del estrés oxidativo y la neurodegeneración durante la senectud se obtiene a través de una dieta baja en grasas saturadas y rica en verduras y frutas con una alta capacidad antioxidante (Joseph, Denisova, Bielinski, Fisher y Shukitt-Hale, 2000).

Dieta y antioxidantes

La enorme heterogeneidad que caracteriza a los seres humanos, y la complejidad de las experiencias individuales del entorno en que viven, crean variaciones cuantitativas y cualitativas durante la senectud. El régimen alimenticio de las personas mayores, tanto su alimentación actual como la que han llevado toda su vida, es definitivamente uno de los factores con mayor influencia en la calidad del proceso del envejecimiento. En el laboratorio, hasta la fecha, la única forma de incrementar la longevidad de los organismos, como los insectos (Sohal y Weindruch, 1996), los roedores (Weindruch y Walford, 1998), y los primates (Roth, Ingram y Lane, 1999), ha sido a través de las dietas con restricción calórica (Masoro, 1990; Mattson et al., 2000; McCay, Crowell y Maynard, 1935; Yu, Masoro y McMahan, 1985). Los mecanismos de acción de éste régimen alimenticio aún no se encuentran claramente establecidos. Investigaciones intensas han producido evidencia de que los efectos benéficos sobre la longevidad se deban a sus acciones antioxidantes. Entre los mecanismos que se desencadenan durante la restricción calórica (RC) se encuentra un aumento en las defensas antioxidantes en el sistema nervioso y por lo tanto una disminución del EO (Lee, Weindruch y Prolla, 2000; Mattson, Chan y Duan, 2002; Reddy-Avula y Fernández, 2002; Sohal y Weindruch). Por ejemplo, Koisumi et al. (1997) encontraron un aumento en la actividad de la enzima antioxidante catalasa y una disminución de peroxidación de lípidos en el hígado de ratones que recibieron por un tiempo

prolongado un régimen alimenticio bajo en calorías. La dieta de RC también suprime la producción de ERO en diferentes tejidos. Roedores que recibieron una dieta de RC por 18 meses, mostraron un aumento de las enzimas antioxidantes SOD, GPx y el del GHS en el tejido cardíaco de estos roedores (Kim et al., 1996). En otra investigación, daños al DNA nuclear y de la mitocondria disminuyeron significativamente en roedores que recibieron una dieta de RC, en comparación con el grupo control que se alimento *ad libitum* (Chung et al., 1992).

Se ha mostrado los efectos de la RC en numerosas investigaciones en el laboratorio, pero no existen datos experimentales en los seres humanos, sino únicamente evidencias indirectas. En la isla de Okinawa, Japón, se ha reportado el mayor número de centenarios de la población japonesa, quienes, al parecer consumen alrededor del 30% menos de calorías, que los demás habitantes del Japón (Kagawa, 1978). Sin embargo, se ha sugerido que la ingesta de antioxidantes también ha tenido un efecto benéfico en centenarios que no consumieron una dieta de restricción calórica. Un estudio reciente mostró la misma correlación de los niveles de la vitamina A y la vitamina E, en un grupo de sujetos centenarios que tenían buena salud con un grupo de sujetos jóvenes, pero esta correlación no se encontró en el grupo control de centenarios que no gozaban de buena salud. Los investigadores sugieren que la diferencia en el estado de salud entre los centenarios se debe a los niveles de antioxidantes en sus organismos (Basile et al., 2003). Las defensas antioxidantes exógenas se pueden obtener a través de las vitaminas (Alessio, Goldfarb y Cao, 1997; Socci, Crandall y Arendash, 1995; Sram et al., 1993), los extractos naturales (Kanowski, Herrmann, Stephan, Wierich y Horr, 1996) o por medio de una dieta rica en antioxidantes (Bickford et al., 2000; Joseph et al., 1998a; Joseph et al., 1999).

Hace tiempo se demostraron los efectos benéficos de la dieta en la prevención de enfermedades cardiovasculares (Hughes, 1995; Mayne, 1996; Muldoon y Kritchevsky, 1996) y cancerosas (Willet, 1994). Actualmente, numerosas investigaciones han abordado la posibilidad del uso terapéutico de las dietas en los mecanismos cerebrales durante el envejecimiento especialmente el uso de alimentos o suplementos vitamínicos con capacidad antioxidante (Joseph et al, 1998, 1999, 2003; O'Donnell y Lynch, 1998; Youdim y Joseph, 2001). Sin embargo, se han reportado conclusiones contradictorias acerca de los efectos de la ingesta de suplementos vitamínicos. Se han reportado efectos benéficos de la ingesta de vitaminas antioxidantes, como la vitamina C (Enstrom, Kanim y Klein, 1992), la vitamina E (Guerrero-Lechuga, Dorado-Martinez, Rodriguez, Pedroza-Ríos, Borgonio-Pérez, G. y Rivas-Arancibia, 1999), vitamina E y beta-caroteno. Pero, también se ha demostrado que algunos antioxidantes tienen efectos pro-oxidantes indeseados cuando la dosis no es la adecuada, o cuando se ingieren junto con otros compuestos. Por ejemplo, el estudio epidemiológico, Muestreo de la Eficiencia del Alfa-Beta-Caroteno y Retinol (Ommen, Goodman y Thornquist, 1996) demostró que ciertas combinaciones de suplementos antioxidantes como los β -carotenos y el retinol aumentaban la incidencia de cáncer pulmonar. El estudio conocido como el Estudio de Arteriosclerosis y Colesterol (Hodis et al., 1995) demostró efectos benéficos dependientes de la dosis de la vitamina E (alpha-tocoferol). Asimismo el Estudio de Antioxidantes y el Corazón de Cambridge (Stephens, Parsons y Schofield, 1996), mostró mejores resultados en los pacientes que recibieron diariamente una dosis de 400 UI de vitamina E (alpha-tocoferol) que en los pacientes que recibieron 800 UI de la misma vitamina.

Las vitaminas antioxidantes pueden convertirse en pro-oxidantes cuando se encuentran en compañía de metales como el cobre y el hierro (Campbell, Smith,

Lawrence, Bondy y Perry, 2001). Sin embargo, estas reacciones pro-oxidantes no se observaron cuando las frutas o las verduras se utilizaron en conjunto con estos metales (Havsteen, 1983), sino que se ha demostrado que los compuestos fitoquímicos, como los flavonoides, contienen propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, por lo que se les atribuye una excelente capacidad antioxidante (Havsteen, 1983).

Además de las vitaminas las frutas y verduras contienen otros fitonutrientes que contribuyen significativamente a su capacidad antioxidante (Cao, Sofic, y Prior, 1996; Prior et al., 1998; Velioglu, Mazza, Cao y Oomah, 1998; Wang et al., 1996). Por ejemplo, los polifenoles y los flavonoides son antioxidantes muy potentes (Aheme y O'Brian, 2002; Kinsella, Frankel, German y Kanner, 1993; Rice-Evans y Packer, 1998). Su estructura química les permite bloquear la acción nociva de los radicales libres en las células (Havsteen, 1993; Saskia, van Accker y Bast, 1998). Además sus efectos citoprotectores, estos compuestos también proveen una variedad de efectos benéficos, que incluyen acciones antivirales (Vrijssen, Everaert y Boete, 1988), antialérgicas (Swies, Robak, Dabrowski, Duniec, Michalska, y Gryglewski, 1984) y antiinflamatorias (Krischer, Eiseman, Bock, y Mueller, 1997; Alcazar y Jiménez, 1988). En apoyo a lo anterior, varios estudios epidemiológicos y clínicos han encontrado que el consumo de alimentos con un alto contenido de flavonoides y polifenoles disminuyeron el índice de enfermedades coronarias mortales (por ejemplo, Hertog, Feskens, Hollman, Katan y Kromhout, 1993; Knekt, Jarvinen, Reunanen y Maatela, 1996).

Las frutas y verduras contienen varios nutrientes y por lo tanto estos alimentos poseen una capacidad antioxidante muy diversa (Cao, Sofic y Prior, 1996; Joseph et al., 1998; Meydani et al., 1998; Prior y Cao, 2000). Por ejemplo, las antocianinas, los

flavonoides y el ácido fenólico se encuentran abundantemente en frutas pequeñas como los arándanos azules, fresas, zarzamoras, frambuesas moras, y arándanos rojos (Heinonen, Meyer, y Frankel, 1998; Rice-Evans y Miller, 1996; Wang y Lin, 2000). Estos compuestos han demostrado una capacidad antioxidante muy potente para nulificar los efectos de las ERO (Wang y Lin, 2000). La capacidad antioxidante total de las frutas y verduras se puede medir a través del índice de la capacidad de absorción de los radicales libres de oxígeno (ORAC), y éste es el resultado de la combinación de las acciones de los fitonutrientes (Cao et al 1995; Wang et al., 1995). El ORAC predice la habilidad de frutas y verduras para neutralizar los oxidantes (Joseph et al., 1998; Rice-Evans y Miller, 1996). Sin embargo, a pesar de que las frutas y verduras tengan el mismo nivel del ORAC, sus efectos biológicos pueden ser diferentes. Por ejemplo, Joseph y sus colegas (1998, 1999) mantuvieron constante el ORAC de varios suplementos de frutas y verduras, y los efectos en las neuronas y pruebas de comportamiento de las ratas adultas mayores fueron diversos. Estos resultados sugieren que los fitonutrientes activos en cada fruta y verdura actúan de manera diferente y la ingesta conjunta de diferentes fitonutrientes resulta en un efecto sinérgico. Los fitonutrientes que se encuentran en mayor abundancia en la dieta humana son los polifenoles y los flavonoides (Aheme y O'Brian, 2002; Kinsella, Frankel, German y Kanner, 1993; Rice-Evans y Packer, 1998).

Dentro de los alimentos ricos en flavonoides se encuentra el arándano azul (AA).

El arándano azul

El arándano azul (AA), pertenece al género *Vaccinium* de la familia de la Ericáceas, es uno de los alimentos con mayor capacidad antioxidante de acuerdo al método de ORAC (Cao, Verdon, We, Wang y Prior, 1995) y numerosas investigaciones

lo han confirmado (por ejemplo, Kalt, Forney, Martin y Prior, 2000; Prior et al., 1998; Wang, Cao y Prior, 1996). Entre los nutrientes que contiene el AA se encuentran vitamina C, minerales, fibras y fitonutrientes. Los fitonutrientes son los que le confieren la mayor capacidad antioxidante al AA (Prior et al., 1998; Wang et al., 1996). Aparentemente existen más de 40 tipos de fitonutrientes en el AA, entre los que se encuentran los polifenoles, las antocianinas (flavonoides) y el ácido hidroxicinámico (Mazza, Kay, Cottrell, y Holub, 2002). La cantidad de estos compuestos se correlaciona positivamente con la capacidad antioxidante del AA, de acuerdo al ORAC (Ehlenfeldt y Prior, 2000; Mazza et al., 2002.; Prior et al., 1998). Sin embargo, las antocianinas mostraron la correlación más robusta (Wang y Mazza, 2002).

Hay una gran variedad en la cantidad de antocianinas, polifenoles y vitamina C en a través de los diferentes especies del AA (Ehlenfeldt y Prior, 2000; Gao y Mazza, 1995; Mazza y Maniati, 1993). Por ejemplo, la especie del arándano ojo de conejo (*Vaccinium ashei* Raede) tiene un contenido de antocianinas de 210mg/100g y la especie Tif-Blue tiene 272/100g, (Ballinger, Galletta, y Maness, 1979; Gao y Mazza, 1994). En contraste, la especie del arándano alto (*Vaccinium corymbosum* L) tiene 100mg/100g y el arándano bajo (*Vaccinium angustifolium*) tiene 138mg/200mg (Gao y Mazza 1994; Kalt y McDonald, 1996). Las antocianinas se concentran en la cáscara del arándano azul y son las que le confieren su color azulado al AA (Mazza y Maniati, 1993). La concentración de las antocianinas aumenta con la maduración del AA (Prior et al., 1998). Por ejemplo, la especie Tif-Blue mostró un nivel más alto de antocianinas cuando se cosechó al final de la temporada (Prior et al., 1998). Por lo tanto, la especie y la madurez del AA pueden influenciar la capacidad antioxidante del mismo.

Los fitonutrientes en el AA tienen propiedades que permiten ejercer su capacidad antioxidante en una variedad de células, incluyendo las neuronas. Por

ejemplo, ambos antocianinas y el ácido hidroxicinámico proveen protección intracelular y a la membrana de las células (Youdim et al., 2002). El AA tiene una gran biodisponibilidad con propiedades hidrofílicas y lipofílicas que le permiten una alta absorción intestinal y vascular (Paganga y Rice Evans, 1997; Mazza et al., 2002; Miyazawa, Nakagawa, Kudo, Muraishi y Someya, 1999; Youdim, Shukitt-Hale, MacKinnon, Kalt y Joseph, 2000). Las antocianinas penetran con facilidad la membrana celular de diferente tipos de células (Galli, Shukitt-Hale, Youdim y Joseph, 2002; Ishige, Schubert y Sagara, 2001) y pueden atravesar la barrera hematoencefálica (Youdim, Dobbie, Kuhnle, Proteggente, Abbott, y Rice-Evans, 2003). Se ha mostrado una correlación significativa entre las antocianinas y la concentración antioxidante plasmática de sujetos que recibieron un suplemento alimenticio con AA (Mazza et al., 2002). Se especula que también contiene propiedades anticarcinogénicas (Miyazawa et al., 1999) y antiinflamatorias (Galli et al., 2002; Youdim, McDonald, Kalt y Joseph, 2002). La eficacia de las propiedades antioxidantes del AA se demostró en diferentes estudios *in vitro* (Bickford et al., 2000; Galli et al., 2002; Joseph et al., 1999; Joseph et al., 2000; Youdim et al., 2000), *in vivo* en animales del laboratorio (Cao, Shukitt-Hale, Bickford, Joseph, McEwen y Prior, 1999; Galli et al., 2002; Joseph et al. 1999) y en seres humanos (Mazza et al., 2002).

Joseph et al. (1998a) mostraron que varios parámetros, indicadores del estrés oxidativo, disminuyeron en ratas adultas de la cepa Fischer 344 (F344) que recibieron dietas con suplementos alimenticios de espinacas o fresas, en comparación con ratas que recibieron una dieta que contenía el suplemento de vitamina E. Posteriormente, Joseph et al. (1999) realizaron otra investigación en la que administraron a ratas adultas (F344) suplementos alimenticios de fresas, espinacas y AA por dos meses. Al mismo tiempo otro grupo únicamente recibió la dieta control. Su objetivo fue mostrar si estas dietas

podían regenerar el déficit ocasionado por EO en varios indicadores neuroquímicos (como la recuperación de la homeostasis del calcio), locomotores (el sistema de rotación con aceleración constante y el sistema de rotación) y cognoscitivos (el laberinto de agua de Morris). El grupo experimental que recibió la dieta del AA obtuvo los resultados siguientes:

- En los efectos neuroquímicos, en relación al grupo control, el grupo del AA no exhibió ningún déficit en la homeostasis del calcio y mostró una recuperación de la misma después de que los tejidos fueron expuestos a H_2O_2 ; los grupos con dietas de espinacas y fresas no mostraron una recuperación rápida de la homeostasis.
- En las pruebas locomotoras no se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y los grupos con dietas de espinacas y fresas. Mientras que el grupo que recibió AA no mostró déficit en ambas pruebas locomotoras y su desempeño fue estadísticamente diferente al de los otros grupos. Los investigadores concluyeron que las ratas del grupo con la dieta del AA habían recuperado las destrezas necesarias para el desarrollo de ambas tareas locomotoras, basados en los resultados de una investigación anterior en la que ya que en un estudio anterior, Shukitt-Hale, Mouzakis y Joseph (1998), reportaron que ratas de la cepa F344 de 19 meses de edad mostraron un déficit importante en las mismas tareas locomotoras.
- En las pruebas cognoscitivas: en el laberinto de Morris, los tres grupos de dietas (espinacas, fresas y arándano azul) se comportaron estadísticamente diferente al grupo control y no mostraron diferencia entre ellos.

Posteriormente, Youdim et al. (2000) utilizaron la dieta base NIH-31 (dieta balanceada y fortificada con vitamina E) del Instituto Nacional de la Salud, Bethesda, Massachussets, EE.UU. para elaborar las dietas NIH-31 con el suplemento del AA

(NIH-31-AA) y su dieta control (NIH-31-Control). Un estudio longitudinal demostró que la ingesta de la dieta base NIH-31 suministra los nutrientes necesarios para un desarrollo adecuado de los roedores (Sumien, Forster y Sohal, 2003). Algunos autores la consideran equivalente a una dieta balanceada y completa para los seres humanos (Youdim et al., 2000). Para preparar la dieta NIH-31-AA, se agregó a la dieta NIH-31 el suplemento del AA de acuerdo al método de Youdim et al. (2000). El objetivo de su investigación fue ver si los efectos antioxidantes del AA se sumaban a los beneficios antioxidantes de la vitamina E y a los nutrientes de una dieta balanceada. El grupo que recibió la dieta experimental con el suplemento del AA de la especie *Tif Blue* comparado con el grupo control, mostró un mejor desempeño en pruebas motoras, en el laberinto de agua de Morris (en la velocidad para encontrar la plataforma), así como mejores resultados en los parámetros de estrés oxidativo como la liberación de dopamina en las neuronas del estriado.

Indicadores del estrés oxidativo durante el envejecimiento

Actualmente no existe consenso sobre si existe un marcador ideal del estrés oxidativo (EO). Hay varios indicadores del EO en el cerebro senil que incluyen, alteraciones en el nivel de antioxidantes, daños al DNA nuclear y mitocondrial, biomarcadores de la peroxidación lípidica, el aumento de las especies reactivas de oxígeno (ERO) y las especies reactivas de nitrógeno (ENO), aumento de carbonilos, alteraciones en los niveles de proteínas y factores de transcripción. Entre los indicadores del EO se encuentran:

Los niveles de defensa antioxidante: se ha establecido claramente que existen alteraciones en las actividades de los antioxidantes endógenos durante la vejez. Se considera que hay un aumento en el nivel de antioxidantes endógenos en respuesta a la acumulación excesiva de radicales libres. Al mismo tiempo existe una disminución de algunos de éstos sistemas, debido a que los mecanismos celulares durante el envejecimiento no pueden mantener un nivel adecuado de antioxidantes endógenos para proteger las células. Durante la senectud ocurre, por ejemplo, un aumento de la actividad de las enzimas SOD y Cu-ZnSOD y una disminución de la actividad de CAT, GSH y GPx (Alvira y Villalba, 1988; Sohal et al., 1995). A pesar de que hay acuerdo sobre el hecho de que los niveles de los sistemas antioxidantes intrínsecos cambian, existen posiciones contradictorias sobre los cambios que ocurren. Por ejemplo, algunos investigadores encontraron un aumento en la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) (Choi, 1995; Wagner, 1994) mientras que otros una disminución en la misma (Vanella et al., 1982). Paolisso y sus colegas (1998) utilizaron las concentraciones de la vitamina C, vitamina E y glutatión en el plasma como marcadores del estrés oxidativo. Encontraron una disminución importante de estos indicadores en sujetos mayores, comparados con un grupo de centenarios que gozaban de una buena salud. Se ha mostrado que la disminución del GSH es un indicador de que se ha perdido el equilibrio de REDOX en la célula (Benzi y Moreti, 1995; Meister, 1988; Sohal et al., 1990).

Las lesiones oxidativas del DNA mitocondrial y celular: existe un aumento en estas lesiones paralelo a la edad del organismo, ocurre por ejemplo, la fragmentación del DNA (Chung, Kasai, Nishimura y Yu, 1992). Estas lesiones se pueden medir a través del incremento de indicadores como la formación del 8-hidroxiguanosina en el DNA nuclear y mitocondrial (Hamilton et al., 2001; Izzotti, Cartiglia, Taningher, De Flora y Balansky, 1999).

Productos de la peroxidación lipídica: una de las consecuencias de la exposición crónica al EO son cambios en la composición de los lípidos de la membrana celular (Zs-Nagy, 1994). Por ejemplo, existen evidencias *in vitro* de que la concentración de lipoperóxidos aumento paralelamente con la edad del organismo (por ejemplo, Chevion, Berenstein y Stadtman, 2000, Floyd y Hensley, 2002, Hamilton et al., 2001, Zhang et al., 1993). Los lipopéroxidos se consideran como un exponente directo del daño causado por las ERO a la célula (Benzi y Moretti, 1995; Floyd, 1984; Joseph, Denisova, Villalobos-Molina, 1996; Sohal, 1993). Durante la peroxidación lipídica se producen compuestos como el malondialdehido (MDA) y la medición plasmática del MDA es un buen marcador indirecto del nivel de lipoperoxidación (Ohkawa, Ohishi y Yagi, 1979). Otros productos de la degradación metabólica de los lipoperóxidos son los isoprostanos (Robert y Morrow, 2000; Vassale, Botto, Andreassi, Berti, y Biagini, 2003; Wang et al., 1995). Se producen *in vivo* en los organismos, por lo cual se han considerado en los últimos años como uno de los marcadores más confiables del estrés oxidativo (Montuschi, Barnes y Robers, 2004). Otro indicador de la peroxidación lipídica es la acumulación de lipofuscina, la cual se mantiene dentro del citoplasma durante el envejecimiento (Kato et al., 1998)

La cuantificación de las ERO: los niveles de las ERO muestran un aumento con la edad (Driver, Kodavanti, y Mundy, 2000). Por ejemplo los niveles de los radicales de hidroxilo (Zhang et al., 1993) y del anión superóxido (Trolliet, Rudd y Loscalzo, 2001) dependen de la edad del organismo.

La pérdida de la biodisponibilidad del óxido nítrico (NO): ésta es causada por la interacción del NO con los radicales libres, principalmente cuando hay un aumento del anión de superóxido. El NO es un factor vasodilatador que tiene un papel fundamental en el endotelio y la pérdida de su biodisponibilidad indica un incremento del EO (van

der Loo et al., 2000).

Formación de carbonilos proteicos: las ERO/ENO inducen la formación de carbonilos proteicos (la oxidación de los residuos de los aminoácidos produce estos compuestos que contienen metal combinado con monóxido de carbono). Durante el envejecimiento y las enfermedades neurodegenerativas los niveles de carbonilos proteicos son los que más se utilizan como indicadores del EO. Se ha demostrado una correlación robusta entre los daños a las proteínas y el envejecimiento, asimismo entre dichos daños y las enfermedades neurodegenerativas (Chevion et al., 2000; Stadman y Berlett, 1998). Por ejemplo, se encontró un nivel elevado de carbonilos en pacientes con la enfermedad de Alzheimer y la de esclerosis lateral amiotrófica (Hensley et al., 1995). La nitrotirosina es otro marcador de EO ampliamente reconocido y es el producto de la oxidación del radical peroxinitrito (Di Stasi et al., 1999). Se han encontrado niveles elevados de nitrotirosina en primates adultos mayores (Sloane, Hollander, Moss, Rosene, y Abraham, 1999).

Alteración de los niveles de las proteínas: El aumento de ciertas proteínas inducido por las especies reactivas de oxígeno ha sido usado como indicador del EO. Por ejemplo, la familia de proteínas de Bcl-2 se encuentra en la membrana de la mitocondria y su función es proteger a la célula del proceso de apoptosis. La expresión de Bcl-2 aumenta durante el envejecimiento en el cerebro humano (Migheli et al., 1994) y en ratas envejecidas (Kaufmann, Bickford y Taglialatela, 2001) en respuesta a la falta del equilibrio homeostático de REDOX

Alteraciones en los factores de transcripción: un índice importante del EO celular es la activación de factores de transcripción (Lavrosky et al., 2000). Los factores de transcripción son proteínas esenciales para la iniciación o la regulación del proceso de transcripción de las células eucariota. Estas proteínas se adhieren a las regiones

promotoras del DNA y así iniciando el proceso de transcripción. Brevemente, el proceso de transcripción es el primer paso de la síntesis de las proteínas. Las secuencias de DNA son copiadas a una molécula de RNA y posteriormente se produce el RNA mensajero (RNAm). El segundo paso es el proceso de translación, durante el cual el RNAm se convierte en la secuencia de aminoácidos creando así las proteínas. La actividad de los factores de transcripción es crítica para el mantenimiento de la homeostasis celular. Durante el envejecimiento el funcionamiento de estos factores se altera (Fukagawa, Timblin, Buder-Hoffman y Mossman, 2000; Roy, Oh, Rivera, Mubiru, Song y Chatterjee, 2002). Las ERO/ENO funcionan como mensajeros segundos y activan una cascada de eventos intracelulares influyendo de una manera importante la activación de los factores de transcripción. Asimismo, bajo condiciones de estrés celular, crónico o agudo, los factores de transcripción disminuyen su capacidad de respuesta a los daños celulares, así como su capacidad para recuperar el nivel homeostático celular. (Esposito et al., 2002; Tong, Toliver-Kinsky, Edwards, Rassin, Werrbach-Perez y Perez-Polo, 2002).

Factores de transcripción relacionados al estrés oxidativo

Las alteraciones funcionales de los factores de transcripción conllevan a modificaciones en la regulación y la expresión de los genes. La alteración genética representa uno de los factores esenciales del proceso de envejecimiento (Lavrovsky et al., 2002) Las funciones e interacciones de los factores de transcripción con el EO y el envejecimiento son complejas, para una revisión detallada ver los siguientes documentos: Fukagawa et al., 2000; Kim, Jung, Yu, Cho, Choi y Chung, 2002; Lavrovsky et al., 2002; Tong et al., 2002. Entre los factores de transcripción claramente alterados por la influencia del EO durante el envejecimiento se encuentran:

La proteína activadora 1 (AP-1): AP-1 consiste es una a familia de proteínas que se unen al DNA para inducir genes involucrados en la proliferación y diferenciación celular, en los procesos inflamatorios y en el estrés celular. AP-1 esta compuesta por homodímeros o heterodímeros de los miembros de los complejos de c-Jun y c-Fos (ver revisión: Shaulian y Karin, 2002).

El factor promotor de la transcripción Sp1 (Sp1): Sp1 induce la transcripción de numerosos genes. Su actividad se altera directamente por el REDOX del organismo y declina con la edad (Ammendola, Mesuraca, Russo y Cimino, 1994; Bouwman y Philipsen, 2002). Se ha demostrado que alteraciones de los procesos normales de este factor se encuentran implicadas directamente en el Síndrome de Werner (o envejecimiento prematuro) (Motonaga et al., 2006) y la enfermedad de Huntington (Dunah et al., 2002).

Los factores receptores de hormonas: estos factores influyen sobre los receptores corticoideos (GR), el receptor androgénico (AR), el receptor estrogénico (ER) y el receptor de progesterona (PR) (ver revisión: Larrea y Chirinos, 2003). Estos receptores interactúan con otros factores de transcripción alterando la acción de éstos últimos. Por ejemplo, el GR puede inhibir las funciones de la AP-1 mediante su interacción con las subunidades de Fos y Jun, o puede inhibir el EO a través de su influencia moduladora sobre el factor nuclear-kappaB (NF-κB) (Karin, 1998; Okamoto et al., 1999).

Los receptores activados proliferados de peroxisomas (PPARs): regulan la expresión genética en respuesta a su activación a través de los ácido graso y sus derivados (Hihi, Michalik y Wahli, 2002). Por lo tanto tienen funciones esenciales en la regulación del metabolismo de los lípidos y el almacenamiento de las grasas dietéticas (Willson, Brown, Sternbach y Henke, 2000). Los miembros de esta superfamilia, por

ejemplo PPAR α , PPAR β , y PPAR γ , regulan numerosas funciones que incluyen reacciones inflamatorias, la homeostasis de la glucosa y la proliferación celular (Devchand et al., 1996; Poynter y Daynes, 1998). Estos factores ayudan a mantener la nutrición de la célula y el metabolismo dentro de un marco de funcionamiento estable y adecuado (Spielgelman y Flier, 1996). Asimismo los PPARs interactúan con los factores AP-1 y NF- κ B, alterando la expresión genética (Delerive et al., 1999; Ricote, Li, Willson, Nelly y Glass, 1998). Los efectos de PPARs durante el envejecimiento y el estrés celular se mostraron a través de ratones con deficiencias genéticas manipuladas de PPARs, mostraron un nivel elevado de estrés oxidativo y del factor de transcripción nuclear factor-kappa B (Poynter y Daynes, 1998).

El factor nuclear-kappaB (NF- κ B): Existe actualmente el consenso de que el NF- κ B es un mediador central y un indicador por excelencia del EO (Baeuerle y Baltimore, 1996; Baeuerle y Hankel, 1994; Kaufman, Bickford y Tagliatela, 2002; Li y Stark, 2002; Mattson et al., 2000; Mattson y Simonetta, 2001; Pahl, 1999; Tagliatela, Kaufmann, Trevino y Perez-Polo, 1998; Toledano y Leonard, 1991). Este factor es activado por las especies reactivas de oxígeno. Asimismo su activación se intensifica durante el envejecimiento en varios órganos, por ejemplo, el cerebro (Paolisso et al., 1998; Toliver-Kinsky et al., 1997), el hígado (Helenius et al., 2001) y el bazo (Spencer, Poynter, Im y Daynes, 1997).

Factor de Transcripción: Factor nuclear-kappaB

Anteriormente, el NF κ B se consideraba un mediador innato del sistema inmunológico, la respuesta inflamatoria y la diferenciación celular. Actualmente se ha demostrado que el NF κ B también tiene las siguientes funciones:

- Es un mediador central del estrés celular (Li y Stark, 2002).
- Sus vías de activación son extremadamente sensibles a los cambios en el estado oxidativo celular (Baeuerle y Baltimore, 1996; Baeuerle y Hankel, 1994; Kaufman et al., 2002; Li y Karin, 1999; Li y Stark, 2002; Mattson et al., 2000; Mattson y Simonetta, 2001; Pahl, 1999; Schreck, Alberman y Baeuerle, 1992; Tagliatela et al., 1998; Toledano y Leonard, 1991).
- La mayoría de los estímulos que activan el NFκB también tienden a desencadenar la formación de las ERO o son agentes oxidantes (Baeuerle y Henkel, 1994).
- Los tratamientos con antioxidantes disminuyen o inhiben su activación (Li y Karin, 1999; Schenk, Klein, Erdebrugger y Droge, 1994; Schreck et al., 1992; Toledano y Leonard, 1991). Lo que sugiere que las ERO son mediadores de todos o casi todos los procesos de activación del NFκB (Li y Karin, 1999; Schreck et al.; Van den Berg, Haenen, Van den Berg y Bast, 2001).

El NFκB se identificó originalmente en los linfocitos B, donde estimula la transcripción de la cadena de inmunoglobulina κ (Sen y Baltimore, 1986). En la actualidad se ha descrito su presencia en casi todos los tipos de células. Este factor induce numerosos genes (Tabla 1) que se codifican para la respuesta inflamatoria, la división celular, las funciones inmunológicas, el proceso de apoptosis y la regulación del REDOX. Lo anterior muestra que el NFκB está implicado en la transcripción de un número importante de genes funcionales en los procesos patológicos de diferentes tejidos y en la homeostasis del organismo (Baeuerle y Henkel, 1994; Mattson et al., 2000).

Tabla 1. Ejemplos de los genes que pueden ser inducidos por el NFκB: Interleuquinas (IL), Ciclooxygenasa inducible (COX-2), interferón (IFN), factor B transformante del crecimiento (TGFβ), factor de necrosis tumoral α (TNFα), manganeso superóxido dismutasa (MnSOD), kinasa inhibidora α (IκBα), óxido nítrico sintetasa inducible (NOSi) (Mattson et al., 2000; Baeuerle y Henkel, 1994).

Genes	Tipo de célula
GEN A 20	
IL 1, IL 3, IL 6, y IL 8	linfocitos y células gliales
TNFα	linfocitos, neuronas, astrocitos, microglia
IFN	Endoteliales y otras
MnSOD	neuronas, astrocitos y otras
Calbidin	neuronas y astrocitos
Bcl-2	neuronas, astrocitos y otras
APP	Neuronas
p53	varios
COX-2	varios
IκBα	varios
NOSi	varios
TGFβ	Macrófagos y células gliales

El NFκB en su forma inactiva se localiza habitualmente en el citoplasma de las células en su forma inactiva (Flohe, Brigelius-Flohe, Saliou, Traber y Packer, 1997).

Esta compuesto por varias subunidades, las cuales se dimerizan para dar lugar a distintas isoformas sensibles a numerosos factores según el tipo de célula, su estado de desarrollo, su función y los factores ambientales (Tabla 2). Su composición más prevalente en estado inactivo es un complejo citoplasmático formado por tres subunidades: IκBα, p50, y p65 (1:1:1). Las subunidades p50 (50kD) y p65 o Rel A (65kD) forman una unidad heterodimérica y se encuentran asociadas a una proteína inhibidora IκB (IκBα o IκBβ) (Baeuerle y Baltimore, 1996; Mattson y Simonetta, 2001).

Tabla 2. Ejemplos de las proteínas del NF κ B, proteínas I κ B y su expresión celular (Baeuerle y Baltimore, 1996; Mattson et al. 2000; Moerman, Mao, Lucas y Barger, 1999; Verma, Stevenson, Schwarz, Van Antwerp y Miyamoto, 1996).

Subunidad	Función	Parejas	Expresión celular
p65 (Rel A)	Activación del proceso de transcripción	P50	General
p50	Activación del proceso de transcripción	P65, p50, p52	General
p52	Activación del proceso de transcripción	P50, p52	Linfocitos, células epiteliales
c-Rel	Activación del proceso de transcripción	P65, p50, p52	Sistema inmunológico
Rel-B	Activación del proceso de transcripción	P50, p52	Sistema inmunológico
NKBF	No se ha establecido		Neuronas
I κ B α	Subunidad inhibidora	P50, p65	General
I κ B β	Subunidad moduladora	P65, p50,	Sistema inmunológico y otros
	Subunidad inhibidora	P65, c-Rel	General
I κ B α			
I κ B β	Subunidad inhibidora	c-Rel, p50, p65	Sistema inmunológico
Bcl-3	Subunidad inhibidora	P50, p52	Ganglios linfáticos y bazo
p105	Subunidad precursora de p50 y I κ B α		General
p100	Subunidad precursora de p52 y I κ B β		General

La activación del NF- κ B puede ser inducida a través de varios mecanismos intracelulares o extracelulares. Por ejemplo, el lipopolisacárido bacterial (Bermejo y Duarte, 2003), virus, condiciones con mucho estrés (físico, exposición a las radiaciones ionizantes, alcohol, etc.) pueden inducir la activación del NF- κ B. También entre los mecanismos extracelulares se encuentran la cascada de eventos del receptor tipo Toll (Bermejo y Duarte, 2003; Medshhitov et al., 1997); los neurotróficos, por ejemplo, el factor de crecimiento nervioso (Carter et al., 1996); las citoquinas, como el factor de

necrosis tumoral α (Cheng, Christakis y Mattson, 1994); los neurotransmisores, por ejemplo, el glutamato (Guerrini, Blasi y Denis-Donini, 1995; Kaltschmidt, Kaltschmidt y Baeuerle, 1993) hipoxia (Koong et al., 1994); el péptido β -amiloide (A β P). Entre los mecanismos intracelulares se encuentran los oxiradicales, por ejemplo, $\cdot\text{O}_2$ —, $\cdot\text{OH}$ —, H_2O_2 , $\cdot\text{ONOO}$ —; el péptido β -amiloide (A β P), la elevación del calcio intracelular (Mattson y Calándola, 2001; Schmidt et al., 1995). La activación del NF- κ B es compleja (por ejemplo, Zandi et al., 1997; Regnier et al., 1997).

A través del proceso de transducción, los estímulos pueden inducir muchas señales que convergen en la familia de las proteínas de las kinasas I κ B (IKKs). La activación de dicho complejo, IKK, IKK α e IKK β (subunidades catalíticas) e IKK γ (unidad reguladora), conduce a la fosforilación de la subunidad I κ B del complejo heterodimérico del NF- κ B, p50:p65: I κ B α (Rothwarf, Zandi, Natoli y Karin, 1998; Verma y Stevenson, 1997; Yamaoka et al., 1998). Después del proceso de fosforilación se lleva a cabo la ubiquitinización de la subunidad I κ B, y finalmente se degrada por la vía proteosomal (Woronicz, Gao, Cao, Rothe y Goeddel, 1997). La secuencia anterior comienza la activación de la unidad heterodimérica p50:p65 del NF- κ B.

Aparentemente, la separación de la proteína I κ B constituye el evento central en la activación del NF κ B (Schreck et al., 1992) y este proceso se lleva a cabo en el citoplasma de la célula. Cuando el heterodímero p65:p50 se encuentra libre, se activa, se traslada al núcleo de la célula y se une a la región promotora de los genes que responden específicamente al NF κ B. La secuencia en dicha región es 5'-GGGACTTTCC-3' (Sen y Baltimore, 1986), comenzando el proceso de transcripción. Ambas unidades, p65:p50, pueden adherirse al DNA como homodímeros pero existe una afinidad mayor cuando se unen al DNA como unidades heterodiméricas.

Únicamente la subunidad p65, por sí sola, tiene el potencial necesario para activar el proceso de transcripción (Schmitz y Baeuerle, 1991). Se ha demostrado que la subunidad p65 es esencial para el funcionamiento del NF- κ B (Baeuerle y Baltimore, 1996; Flohe et al., 1997). Por ejemplo, los ratones mutantes sin la subunidad p65, perdieron su habilidad de inducir NF- κ B (Beg, Sha, Bronson, Ghosh y Baltimore, 1995).

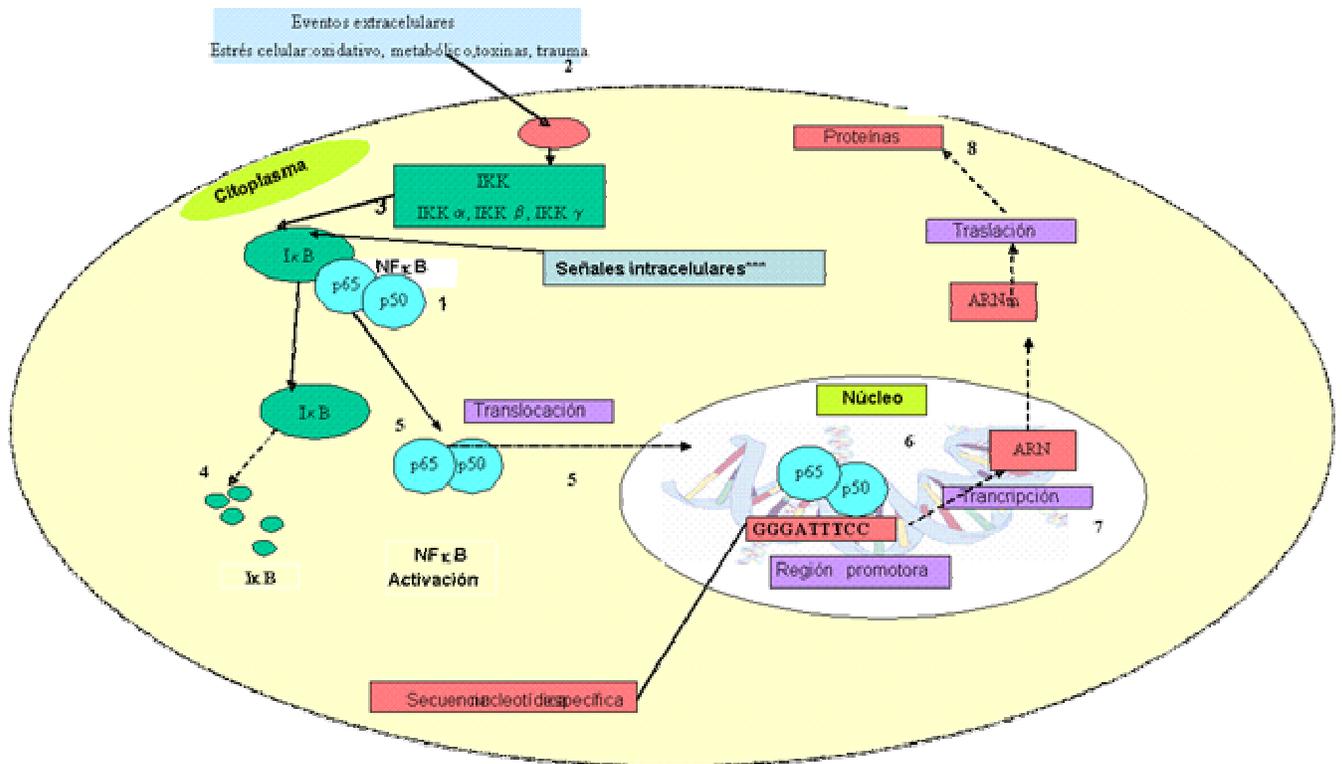


Figura 1. Muestra el proceso simplificado de activación del NF-κB. 1) La forma inactiva del p50:p65 se encuentra en el citoplasma de la célula con la subunidad de la proteína inhibidora IκB. 2) Eventos extracelulares o intracelulares (citoquinas, neurotransmisores, factores neurotróficos, calcio, ERO) inducen la activación del NF-κB. 3) Con la estimulación adecuada se libera el NF-κB de la subunidad IκB. 4) La fosforilación y la ubiquitinización de la subunidad IκB, la cual se degrada por la vía proteosomal. 5) El heterodímero p65:p50 se traslada al núcleo. 6) Se adhiere a la región promotora de genes específicos. 7) Comenzando así la transcripción de las proteínas 8) NF-κB activa la transcripción de proteínas que incluyen factores neurotróficos, glutamato, miembros de la familia Bcl-2, proteínas inhibidores del proceso de apoptosis, enzimas antioxidantes como el Cu-ZnSOD, etc. 8) La imagen del DNA fue obtenida por cortesía del Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano

Bethesda, MA, EE.UU. Los datos del diagrama se obtuvieron en la literatura correspondiente, por ejemplo, Bermejo y Duarte, 2003; Mattson y Camandola, 2001; Mattson y Meffert, 2006; Sen y Baltimore, 1996.

Diferentes condiciones interfieren en las funciones del NF- κ B en el sistema nervioso central, por ejemplo:

- 1) En las enfermedades neurodegenerativas agudas como la isquemia cerebral (Clemens, Stephenson, Samlstig, Dixon y Little, 1997), la isquemia cardiaca (Gabriel, Justicia, Amins y Planas, 1999), las convulsiones (Rong y Baudry, 1996) o el traumatismo cerebral (Yang, Mu y Hayes, 1995).
- 2) En las enfermedades neurodegenerativas crónicas como la enfermedad de Alzheimer (Boissiere et al., 1997; Guo, Robinson y Mattson, 1998; Kaltschmidt, Uherek, Volk, Baeuerle y Kaltschmidt, 1997), la enfermedad de Parkinson (Hunot et al., 1997) y la enfermedad de esclerosis lateral amiotrófica (Migheli et al., 1997).
- 3) En el estrés oxidativo (EO). Existe evidencia de que la activación del NF κ B constituye una respuesta amortiguadora a los efectos del EO, a los procesos inflamatorios, a la disfunción mitocondrial y a la apoptosis (Barger et al., 1996; Barger y Mattson, 1995; Beg y Baltimore, 1996; Mattson y Camandola, 2001; Taglialatela et al., 1997).

NF-κB y antioxidantes

Varios investigadores han mostrado que los antioxidantes pueden alterar la activación excesiva del NF-κB (Bauerle y Henkel, 1994; Flohe et al., 1997; Li y Karin, 1999; Lin y Lin, 2001; Natarajan et al., 1996). Por ejemplo, estudios *in vitro* con el antioxidante glutatión han mostrado que éste bloquea la activación del NF-κB en las células eucariontes (Schreck et al., 1992). Como se mencionó anteriormente, entre los estímulos que activan el NF-κB se encuentran las ERO/ENO y los efectos de éstos pueden ser reversibles por el tratamiento de antioxidantes (Li y Karin, 1999; Schreck et al.). Por lo que se sugirió que la actividad neuroprotectora del NFκB aumenta su nivel de expresión cuando la célula o el organismo se encuentra en un estado pro-oxidante (Mattson y Camandola, 2001; Mattson et al., 2000; Schreck et al.,) y la elevación del NF-κB puede constituir un efecto neuroprotector para producir las proteínas necesarias para proteger la célula, prevenir o producir apoptosis (Mattson y Camandola, 2001).

Paradigmas Experimentales de la Memoria en Roedores

Los sistemas de memoria de los seres humanos coinciden, hasta cierto punto, con los sistemas de memoria de otros mamíferos. Las funciones mnemónicas de seres humanos, primates, y roedores están apoyadas por estructuras cerebrales homólogas (Eichenbaum, 2000; Squire et al., 2003). Lo cual ha permitido el desarrollo de diferentes paradigmas en el laboratorio que puedan proveer información importante en el estudio de la memoria en seres humanos. En el laboratorio, los investigadores pueden controlar las experiencias y el aprendizaje previo de los sujetos experimentales, lo cual les permite conducir experimentos con una alta validez interna y minimizar los

efectos de variables externas. La meta de las investigaciones en el laboratorio es el estudio preliminar de hipótesis que se puedan aplicar a los seres humanos. Existen una gran variedad de paradigmas para evaluar procesos mnemónicos en roedores. Para el desarrollo de esta investigación se seleccionaron los paradigmas de aprendizaje discriminativo por recompensa de un ensayo cada día y el de exploración de objetos novedosos.

Aprendizaje discriminativo por recompensa con un ensayo por día (aprendizaje discriminativo)

Este paradigma fue introducido por Malin et al. (1990). Esta tarea utiliza un laberinto en semicírculo con cinco callejones cuatro al nivel del piso y uno con una rejilla inclinada que lleva a la parte superior del callejón, donde se coloca la recompensa (Figura 2). Esta tarea fue diseñada para medir el aprendizaje (adquisición de un nuevo conocimiento) y la memoria espacial (almacenamiento de dicho conocimiento utilizando señales espaciales para su recuperación) del sujeto. Se especula que el sujeto recuerda su experiencia anterior en el laberinto (aprendizaje) y dónde se encuentra la recompensa (memoria espacial). Están motivados para alcanzarla a la brevedad posible (latencia para encontrar la recompensa), por lo cual evita perder tiempo al cometer errores (entrar a los callejones sin la recompensa). También se especula que los sujetos no van a subir aleatoriamente un plano inclinado que exige un esfuerzo físico mayor, especialmente los roedores adultos mayores (Malin et al., 1993, 2001). Los ensayos se realizan con un intervalo de 24 horas, lo que crea una demanda en la memoria del sujeto, principalmente en los sujetos adultos mayores. Para el desarrollo de esta tarea se necesita de la memoria de referencia espacial los sujetos tienen que aprender una regla

para realizarla). La posición de la recompensa y la apariencia del laberinto no cambian durante los ensayos. Los sujetos simplemente pueden aprender la regla y encontrar la recompensa (Cohen y Eichenbaum, 1993).

Se ha demostrado en primates que las tareas de aprendizaje discriminativo con un ensayo diario y con intervalos de 24 horas (el mismo paradigma básico utilizado en la tarea de Malin et al., 1990) dependen del hipocampo durante los primeros ensayos/días (Malamut, Saunders y Mishkin, 1984). Esto concuerda con los resultados obtenidos por Malin et al. (2001) en la ejecución de la tarea de aprendizaje discriminativo, en este estudio se lesionó el hipocampo de ratas jóvenes y éstas mostraron una diferencia significativa con respecto al grupo control durante los primeros ensayos, que desaparecía en los ensayos posteriores. Asimismo, se propuso que el sistema colinérgico (compuesto por neuronas que sintetizan el neurotransmisor acetilcolina) forma parte de las estructuras y circuitos críticos en la ejecución de esta tarea (Malin et al., 1990, 1992, 1993). Ratas adultas mayores obtuvieron un número de errores significativamente menor cuando se les administró el inhibidor de colinesterasa, fluoruro de metanesulfonido (Malin et al., 1990, Malin et al., 1993). Asimismo, el tratamiento con galanina, un modulador negativo de la acetilcolina, dificultó la ejecución de los ensayos experimentales (Malin et al., 1992).

Se ha propuesto que esta tarea es sensible al proceso de envejecimiento: ratas de la cepa Sprague Dawley de tres meses de edad realizaron esta tarea con una reducción significativa de errores, en comparación con ratas de 18 y 24 meses de edad (Malin et al., 1990; 1993).

Exploración de objetos novedosos

La exploración espontánea hacia los estímulos novedosos forma parte del repertorio de comportamientos innatos de los seres humanos (Fantz, 1964; Fagan, 1970), los primates (Bachevalier, 1990; McKee y Squire, 1993) y los roedores (Clark, Zola-Morgan y Squire, 2000; Corey, 1978; Joubert, y Vauclair, 1986; O'Keefe y Nadel, 1978). Esta actividad cognoscitiva requiere de la interacción continua del mundo externo y los conocimientos individuales de cada sujeto (Hermann, Bahr, Bremmer y Ellen, 1982; Neisser, 1976; Toates, 1983; Tolman, 1948). El paradigma de exploración de objetos novedosos para roedores desarrollado originalmente por Ennaceur y Delacour (1988) utiliza una tarea experimental basada en la tendencia innata de los roedores de explorar los objetos novedosos. Dicha tarea no utiliza castigos, ni recompensas, para motivar a los sujetos. Asimismo, los sujetos no tienen que aprender una regla para resolver la tarea. . En este paradigma el sujeto tiene que formar un trazo mnemónico de un objeto, y recuperarlo para poder reconocer ese mismo objeto después de un intervalo. Estas pruebas experimentales tienen componentes de la memoria de reconocimiento y de la memoria de trabajo, y su ejecución depende de la integridad de las estructuras del lóbulo temporal (Clark, et al., 2000; McKee y Squire, 1993). Por lo tanto, esta tarea se considera una medida de la memoria declarativa (Bachevalier, 1990; Bachevalier, Beauregard y Alvarado, 1999; Clark et al., 2000; Ennaceur y Delacour, 1988; Manns et al., 2000; Reed y Squire 1997).

Esta tarea es muy valiosa en el laboratorio porque permite que sus resultados se puedan extrapolar y sean las bases para investigaciones con seres humanos. Las características propias del paradigma de exploración de objetos novedosos “es comparable con pruebas de memoria utilizadas actualmente con seres humanos” (Ennaceur y Delacour, 1988), porque las capacidades de la memoria de los seres

humanos generalmente no se miden bajo condiciones adversas, de castigo, o después de privarlos de alimentos, etc. (Ennaceur y Delacour, 1988).

El paradigma de exploración de objetos novedosos se diferencia de la tarea de memoria utilizada con monos, la tarea de reconocimiento visual sin emparejamiento con la muestra después de un intervalo (DNMS), en que esta última utiliza comida como recompensa. Los sujetos tienen que aprender la regla para encontrar la recompensa y desarrollar una estrategia (Mishikin, 1978; Squire y Zola-Morgan, 1983). Asimismo, la tarea de exploración de objetos se diferencia con otros paradigmas en que los sujetos reciben una puntuación de acuerdo al porcentaje total de exploración de los objetos y no solamente basada en la exploración inicial al comienzo del ensayo experimental (Dember, 1956; Gaffan, 1972).

Ennaceur y Delacour (1988) nombraron a su paradigma “Tarea de reconocimiento espontáneo de objetos” y Clark y sus colaboradores (2000) se refieren a la misma tarea como “Tarea visual de comparación de pares”. Asimismo, esta tarea se conoce como “Exploración de objetos novedosos” y en la presente investigación nos referimos a esta tarea de esta manera. El paradigma básicamente consiste en dos ensayos conductuales. Durante el primer ensayo se les presenta simultáneamente dos estímulos idénticos y se les permite a los roedores explorarlos libremente. Después de un intervalo, escogido previamente por los investigadores, se lleva a cabo el segundo ensayo que consiste en la presentación del estímulo previamente visto junto con un estímulo totalmente nuevo. Se demostró consistentemente que los roedores jóvenes pasan la mayoría del tiempo explorando el objeto novedoso (Clark et al., 2000; Dello et al., 1992; Ennaceur y Delacour, 1988). Por lo que se infiere que el sujeto ha formado la memoria del estímulo previamente exhibido y al presentárselo nuevamente, lo reconoce y su interés se dirige hacia el estímulo novedoso.

Se considera una tarea mnemónica porque la ejecución de la misma se dificulta conforme se aumenta el lapso entre los intervalos (McKee y Squire; Bachevalier; Bachevalier et al., 1993). Ennaceur y Delacour (1988) encontraron que la exploración del objeto novedoso fue significativa cuando utilizaron intervalos de 1 min. a 1 hora. Pero cuando utilizaron un intervalo de 24 horas no se mostró el mismo patrón de exploración. Sin embargo, Clark et al., (2000) encontraron que pesar de que las ratas exploraron menos después de 24 horas, su exploración total del objeto novedoso fue mayor al nivel del azar. Los intervalos utilizados fueron 10 s, 1 min., 10 min., 1 hr. y 24 hrs., y los porcentajes de exploración fueron respectivamente, 65.8, 65, 62.8, y 58.5%.

Dellu et al. (1992) mostraron un déficit en un grupo de ratas de 18 meses de edad comparado con un grupo control de ratas de dos meses de edad, en una tarea de reconocimiento espacial en la que utilizaron un laberinto en forma de “Y”. Durante el ensayo de aprendizaje, se permitió a las ratas visitar un callejón mientras que el otro estaba inaccesible. En el ensayo de recuperación experimental, las ratas tuvieron acceso a ambos callejones y las ratas adultas mostraron una preferencia por el callejón previamente visitado, al contrario de lo que observaron en las ratas jóvenes. Los resultados confirmaron una disminución significativa en la ejecución conforme se aumentó el tiempo del intervalo entre el ensayo de aprendizaje y los ensayos experimentales. Para el intervalo de 1 min., el porcentaje de selección del callejón novedoso en la primera visita fue del 90% en el grupo de ratas jóvenes. En el grupo de ratas mayores, el número de visitas al callejón novedoso fue de 79%, 60%, 60% 30% y 30% en los intervalos de 1 min., 30 min., 2 hrs., 4 hrs., y 6 hrs., respectivamente (Dellu et al., 1992). La memoria de reconocimiento de tipo espacial en las ratas adultas se vio claramente afectada por el aumento del intervalo entre el ensayo de aprendizaje y experimental. En cambio, en las ratas jóvenes el porcentaje fue de 81%, 100 %, 68%, y

73% para los intervalos de 30 min., 2 hrs., 4 hrs., y 6 hrs., respectivamente.

Regiones Cerebrales, los procesos mnemónicos y el envejecimiento

Las estructuras que se seleccionaron para la presente investigación fueron el hipocampo, la corteza frontal, el cerebro basal anterior, el estriado y el cerebelo.

Hipocampo: La importancia del hipocampo en los procesos mnemónicos se ha estudiado ampliamente a partir de la publicación de Scoville y Milner (1957) sobre el paciente HM (Eichenbaum, 1992; Parkin, 1997; Squire, 1992; Suzuki y Eichenbaum 2000). Este paciente sufría crisis epilépticas intratables desde su juventud y con el fin de suprimirlas, Scoville le extirpó bilateralmente una porción considerable del hipocampo, entre otras estructuras. Como resultado, HM presentó después de la cirugía una incapacidad para registrar memorias nuevas (amnesia anterógrada) y pérdida de algunos recuerdos pasados (amnesia retrograda). Scoville y Milner sugirieron que el hipocampo era esencial para la memoria reciente y para la formación de memorias nuevas. Numerosas investigaciones sobre las funciones del hipocampo se realizaron a partir de este dicho incidente.

En la actualidad existe un consenso que el hipocampo es la estructura crítica para la ejecución de los procesos de la memoria declarativa o explícita. Entre dichos procesos se encuentra la memoria del reconocimiento. Las investigaciones con roedores han demostrado que cuando se lesiona el hipocampo, la memoria del reconocimiento es altamente dependiente de un componente temporal. Por ejemplo, en ratas con lesión en el hipocampo se ha encontrado que la memoria está intacta y muestran una ejecución correcta en tareas conductuales de reconocimiento en las que los ensayos

experimentales se realizan con intervalos cortos, de 10 s a 1 min. (Clark, et al., 2000). Sin embargo, cuando el intervalo entre los ensayos experimentales aumenta, la memoria se deteriora severamente (Squire, 1993; Manns, Stark y Squire, 2001). Esto demuestra la capacidad del hipocampo para transferir la información aprendida a la memoria a largo plazo y formar así una memoria nueva. Daño en el hipocampo también produce un déficit en las habilidades para desempeñar tareas mnemónicas espaciales como la tarea del laberinto de agua de Morris y, en general, las tareas que utilizan laberintos radiales (Malin et al., 2001; O'Keefe, 1979; O'Keefe y Nadel, 1978; Olton, Becker y Handelman, 1979). En un estudio previo, ratas de la cepa Sprague-Dawley recibieron varias inyecciones bilateralmente en el hipocampo del péptido de beta-amiloideo, demostraron déficit significativos en las tareas del paradigma de aprendizaje discriminativo por recompensa de un ensayo cada día (Malin et al., 2003). Subsecuentemente, exámenes patológicos demostraron que el hipocampo había sufrido un proceso de inflamación y muerte neuronal. Estos resultados sugieren que la integridad del hipocampo es necesaria para ejecutar la tarea de aprendizaje discriminativo.

En el hipocampo el proceso de neurogénesis continúa a lo largo de la etapa adulta. Estudios de laboratorio muestran que la población neuronal precursora en el hipocampo se mantiene estable durante la etapa adulta. De hecho, nuevas neuronas se producen en el hipocampo del hombre adulto todos los días. Esta producción se correlaciona con el aprendizaje y la riqueza sensorial y motora con que la persona interactúa con su entorno (Gould, Beylin, Tanapat, Reeves y Shors, 1999; Praag, Van Kempermann y Cage, 1999). Este tipo de neurogénesis participa en ciertos tipos de memoria en las que interviene el hipocampo (Shors, Miesegaes, Beylin, Zhao, Rydel y Gould, 2001). La falta de aprendizaje y estimulación ambiental, a través de tareas en las

que se necesita la participación del hipocampo, contribuye al decaimiento de la neurogénesis del hipocampo (Gould et al., 1999). Sin embargo, la producción de neuronas nuevas en el hipocampo decrece durante el proceso de envejecimiento, especialmente bajo condiciones degenerativas y estrés celular. Por ejemplo, Cameron y McKay (1999) encontraron en estudios con ratas de laboratorio que esta reducción está estrechamente relacionada con los niveles de corticoesteroides, y observaron que al reducir los niveles de corticoides circulantes en las ratas viejas se incrementaron los niveles de producción de neuronas nuevas en el hipocampo de las mismas. Estos autores concluyeron que la producción de neuronas precursoras en el hipocampo permanece estable con la edad y que son los factores hormonales o externos, los que limitan la producción de neuronas nuevas. Estudios recientes sugieren que las neuronas hipocampales sufren una degeneración más temprana que las de otras áreas del cerebro durante el envejecimiento, debido a su mayor exposición a las ERO (Rodríguez-Capote, Céspedes, Arancibia y González-Hoyuela, 1998). En apoyo a esta aseveración, en el hipocampo se han encontrado altos niveles de actividad de la catalasa (Williams, 1995), bajos niveles de glutatión (Benzi y Moretti, 1995) y un aumento en la concentración de lipoperóxidos (Jackson, Werrbarck-Perez y Pan, 1994; Williams, 1995). Estos hallazgos podrían explicar la gran susceptibilidad del hipocampo al estrés oxidativo, y al deterioro temprano en el envejecimiento normal y en las enfermedades degenerativas.

Corteza Frontal: esta región, la cual es muy extensa, se encuentra subdivida en varias regiones de acuerdo a su función, que incluyen, la corteza primaria motora, la corteza pre-motora, el operculum frontal, la corteza frontal, y la zona subcallosa. La corteza frontal en los seres humanos se considera el cerebro ejecutivo debido a su extensa participación en los procesos de pensamientos y comportamientos complejos,

organización temporal y planeamiento de actividades. Entre los comportamientos que dependen de la corteza frontal se encuentran las acciones guiadas por la motivación de las personas, la habilidad de interactuar positivamente con otros seres humanos y la inhibición de comportamientos socialmente inaceptables, movimientos voluntarios y expresión del lenguaje. El lóbulo frontal contribuye a los procesos cognitivos necesarios para ejecutar actividades que incluyen la atención dirigida, almacenamiento y creación de memorias. Los hemisferios y las subregiones de la corteza frontal tienen funciones específicas. En estudios de potenciales evocados con resonancia magnética se ha demostrado la lateralización de la corteza frontal. Por ejemplo, en un estudio utilizando esta técnica encontraron que durante la búsqueda de información en una tarea de la memoria episódica de material no verbal, se activaron el hipocampo del hemisferio derecho y la corteza prefrontal izquierda (Cansino, Maquet, Dolan y Rugg, 2002).

Lesiones en la corteza frontal ocasionan déficit en el proceso de búsqueda en la memoria, en el mantenimiento de la información en la memoria de trabajo (Baddeley et al., 1974; Baddeley et al., 1988; Grafman, Holyoak y Boller, 1995), en la planificación de secuencias, en la memoria fuente y en el recuerdo del orden en que se produjeron los eventos (Fuster, 1989; Gallagher y Rapp, 1997).

Existe evidencia clara de que las personas mayores presentan deficiencias en las funciones que dependen de la corteza frontal (Tisserand y Jolles, 2003). Algunos investigadores (Duncan, Emslie, Williams, Johnson y Freer, 1996) sugirieron que el cambio en las destrezas intelectuales que se observa con la edad es principalmente, consecuencia del declive físico de los lóbulos frontales. Por ejemplo durante el envejecimiento se observa una disminución en la densidad de las sinapsis, cambios anatómicos en las dendritas y anormalidades en la mielinización de los axones en los lóbulos frontales (Peters, Morrison, Rosene y Hyman, 1998).

Un déficit notorio en primates adultos mayores ha sido demostrado en estudios con tareas experimentales que enfatizan componentes mnemónicos espaciales y temporales (Gallagher y Rapp, 1997), por ejemplo tareas que implican una demanda explícita en la memoria espacial a corto plazo dependen de la integridad de la corteza frontal (Gallagher y Rapp, 1997). Otros déficit incluyen una perseveración marcada y rigidez conductual cuando las tareas requieren de cambios durante la tarea experimental (Squire et al., 2003).

Estudios recientes de resonancia magnética han mostrado un incremento en la actividad de la corteza prefrontal durante el envejecimiento debido a una compensación funcional (Grady et al., 1994, Madden et al., 1996; Rypma y D'Eposito, 2000). Un ejemplo de este efecto, es el que se observa durante tareas perceptuales en las cuales, la corteza frontal trata de compensar por la pérdida de facultades sensoriales que son controladas por otras regiones cerebrales, y resulta en las actividades conjuntas que muestran un aumento en la corteza prefrontal y una disminución en la corteza occipital (Grady et al., 1994; Li y Linderberg, 2002).

La compensación funcional de la corteza frontal se ha mostrado, consistentemente, a través de diferentes tareas cognoscitivas, incluyendo memoria del reconocimiento, memoria episódica, memoria de trabajo, y atención sostenida (Grady et al., 1994). Por lo tanto la lateralización de funciones sufre cambios durante el envejecimiento. Estudios de neuroimagen han demostrado que la tarea de trabajo induce una actividad mayor en la corteza prefrontal izquierda en adultos jóvenes. Sin embargo, adultos mayores mostraron un patrón de actividad bilateral durante la misma tarea (Cabeza et al., 2004), confirmando el efecto relacionado al envejecimiento conocido como la reducción asimétrica de los hemisferios en los adultos mayores, conocida con la sigla de HAROLD (Cabeza, 2002). Este patrón de actividad se observa a través de la

ejecución de tareas cognoscitivas y en diferentes regiones cerebrales.

Cerebro Basal Anterior: esta formado por un grupo de estructuras entre las que se encuentran el núcleo basalis de Meynert, la banda diagonal, el septum medial y la sustancia innominata. Dichas estructuras están involucradas en la producción del neurotransmisor acetilcolina (Ach). Este neurotransmisor afecta las funciones del sistema nervioso periférico (es liberado en todas las uniones neuromusculares) y del sistema nervioso central. Las estructuras del cerebro basal anterior distribuyen la Ach a múltiples regiones de la corteza cerebral, influyendo en la comunicación de las neuronas y en la plasticidad de las mismas y por lo tanto en los procesos de aprendizaje y memoria (Kandel, 1997). La participación de la Ach en los procesos mnemónicos se confirmó en varios estudios clínicos y de laboratorio (Bartus, Dean y Lipp, 1982). Por ejemplo, el uso de drogas anticolinérgicas afectó la ejecución de las ratas jóvenes en tareas mnemónicas de laberinto y de evitación pasiva realizando las tareas de una manera similar a las ratas adultas mayores (Bartus et al., 1982.; Olton, 1982). Lippa y sus colegas (1980) demostraron una correlación importante entre la retención de una tarea de condicionamiento del miedo y la actividad de los receptores muscarínicos, ambos mostraron un decremento significativo de acuerdo a la edad de los sujetos.

En el campo clínico, se demostró que existe una deficiencia severa en el cerebro basal anterior en la producción de la Ach en la enfermedad de Alzheimer (Kihara y Shimohama, 2004). Es claro que el riesgo de desarrollar esta enfermedad aumenta drásticamente con el envejecimiento: 5% de la población desarrolla esta enfermedad a la edad de 70 años, 18% a los 80 años y 50% a los 90 años (Herbert et al., 1995; Esposito, Rotilio, Di Matteo, Di Giulio, Cacchio y Algeri, 2002).

Además de su participación en los procesos mnemónicos, el cerebro basal

anterior se seleccionó en este estudio porque varias investigaciones recientes han sugerido que es una de las áreas más vulnerables al daño del estrés oxidativo (Toliver-Kinsky et al., 2002; Perry, Cash y Smith, 2002).

Estriado: es una estructura subcortical que forma parte de los ganglios basales. Consiste de la cabeza del núcleo caudado, el putamen (neostriatum) y el núcleo acumbens (también se le conoce como el estriado ventral). El estriado recibe información de la corteza cerebral, y los núcleos talámicos y éstos a su vez tienen interconexiones muy específicas con los demás núcleos que forman parte de los ganglios bs. También se comunica con la sustancia negra.

Funcionalmente, el estriado está implicado en las funciones cognoscitivas implícitas asale (por ejemplo aprendizaje con claves, las reacciones emocionales (Devan, Goad y Petri, 1996; Kandel, 1997; McDonald y White, 1994), .el control motor, ejecución de programas motores complejos, los movimientos oculares, varias funciones motoras que incluyen, balance, postura, y movimientos involuntarios. El estriado recibe información de varios neurotransmisores, principalmente de la dopamina.

Durante el envejecimiento ocurren varios cambios en los sistemas dopaminérgicos del estriado. Existe una disminución en el sistema de transporte de la dopamina (van Dyck et al., 1995), la actividad dopaminérgica en el estriado disminuye un promedio del 6% al 10% por década, en las personas adultas mayores (Kausler, 1994). Se encontraron decrementos de la actividad de los receptores dopaminérgicos cuando se realizaban tareas de velocidad (Volkow et al., 1995) y motoras (Wang et al., 1998).

Numerosos estudios han demostrado un aumento en la susceptibilidad del estriado al estrés oxidativo durante el envejecimiento (Joseph et al, 1998c; Joseph et al., 1999; Kim y Chan, 2001; Perez-Severiano, Esclante, Vergara, Rios y Segovia, 2002). El estriado es altamente vulnerable a los efectos de los antioxidantes (Balu, Sangeetha, Murali y Pannerselvam, 2005; Joseph et al., 1999; Youdim et al., 2001). Índices de estrés oxidativo (liberación inducida de dopamina) en el estriado disminuyeron significativamente en ratas que recibieron una dieta con el suplemento de antioxidantes (Joseph et al., 1999). Se encontró una correlación entre los déficits en la ejecución de una tarea de memoria y la producción de las ERO y proteínas oxidadas en el estriado de ratas adultas mayores. Estas ratas recibieron una dieta con un extracto de semillas de uvas (altamente antioxidante). Después de este periodo, se mostró un decremento de las ERO y de los carbonilos proteicos en el estriado y un mejoramiento en la ejecución de la tarea de memoria (Balu et al., 2005).

Cerebelo: la palabra cerebelo significa “pequeño cerebro”. Esta estructura contiene la mayor densidad de neuronas y conexiones muy complejas. El cerebelo recibe y manda información a un número muy extenso de poblaciones neuronales en las áreas asociativas y en las estructuras subcorticales del lóbulo temporal (Schmahmann, 1991). El cerebelo regula directamente diferentes aspectos de los movimientos voluntarios (Snider, 1951) incluyendo la sincronización de la ejecución y percepción de los movimientos (Keele e Ivry, 1990); los ajustes necesarios para realizar los movimientos con precisión (Thach, Goodkin y Keating, 1992); la coordinación de los reflejos, el equilibrio y las adaptaciones sensorio-motoras. Desde hace mucho tiempo que se ha descrito ampliamente la regulación del cerebelo en las funciones anteriores (Schmahmann, 1991; Snider, 1951).

Sin embargo los últimos años se ha estudiado el concepto del cerebelo como regulador de procesos cognoscitivos complejos (Bracke-Tolkmitt, Linden y Canavan, 1989; Leiner, Leiner, y Dow, 1986, 1989), como el aprendizaje (Ito, 1984), el lenguaje (Märien, Saerens, Nanhoe, Monees Nagels y Pickut, 1996), la planificación motora y el seguimiento de una secuencia lógica (Botez, Botez, Cardu, y Leveille, 1989), los procesos de adquisición y discriminación sensorial (Gao, Parsons, Bower, Xiong, Li y Fox, 1996), y la memoria de tipo declarativo (Schmahmann, 1991, 2003). Estudios de resonancia magnetica funcional (Kim, Ugurbil y Strik, 1996; Weis, Klaver, Reul, Elger y Fernández, 2004) y de emisión de positrones (Petersen y Fiez, 1993) mostraron la activación del cerebelo durante la adquisición y discriminación de tareas sensoriales (Gao et al., 1996). Cuando los sujetos resolvieron un rompecabezas a través de la manipulación de pinzas el cerebelo mostró una actividad significativamente mayor que cuando solamente manipulaba las pinzas en una tarea motora (Kim et al., 1994). El resultado de pruebas neuropsicológicas de individuos con daños en el cerebelo mostraron la participación de esta estructura en la planeación y programación de secuencias lógicas, la velocidad para procesar información y la organización visuo-espacial en tareas concretas (Botez, Botez, Elie, Attig, 1989). Individuos con lesiones cerebelosas padecen de afasia, lo que sugiere la participación de esta estructura en los procesos del lenguaje (Märien et al., 1996)

La participación del cerebelo en procesos cognoscitivos en roedores se ha estudiado utilizando el paradigma del condicionamiento del parpadeo (Cartford, Gemma y Bickford, 2002). El cerebelo forma parte de las estructuras que forman el circuito neuronal involucrado en dicho condicionamiento (Chapman et al. 1990; Gruart et al. 1997; Thompson, 1986; Thompson y Krupa, 1994). Este tipo de aprendizaje es considerado como uno de los más sencillos pero requiere de la participación de un

número considerable de estructuras cerebrales para su ejecución. En general, la cinética del condicionamiento del parpadeo es similar para diferentes especies de mamíferos como los roedores, el conejo o los seres humanos. Estudios con emisión de positrones mostraron la activación del cerebelo, entre otras estructuras, en adultos jóvenes durante el aprendizaje de este tipo de condicionamiento (Logan y Grafton, 1995) mientras que individuos con daño cerebeloso no pudieron aprender esta tarea (Woodruff-Pak, 1996). 1984).

Se ha demostrado que el condicionamiento del parpadeo es una tarea sensible al envejecimiento (Powell et al., 1981; Harrison y Buchwarld, 1983; Graves et al., 1985; Woodruff-Pak y Thompson, 1988; Weiss y Thompson, 199). El déficit de este condicionamiento en los seres humanos es evidente a partir de los 40 años (Woodruff-Pak y Thompson, 1986). Conejos adultos mayores necesitaron un número mayor de ensayos para aprender esta tarea en comparación con conejos jóvenes (Woodruff-Pak et al., 1988).

Otros índices asociados con el envejecimiento en el cerebelo son la pérdida del balance y coordinación motora fina (Gould y Bickford 1996); disminución en el número y en la densidad de las células de Purkinje en la corteza cerebelosa y en las funciones que modulan el sistema noradrenérgico en el cerebelo (Bickford, Shukitt-Hale y Joseph, 1999; Freedman, Hoffer, Puro y Woodward, 1976; Gould y Bickford, 1996).

Varias investigaciones con roedores han mostrado la vulnerabilidad del cerebelo al estrés oxidativo durante el envejecimiento y los efectos de antioxidantes exógenos en esta estructura (Kaufmann et al., 2001). Daño oxidativo en las mitocondrias en el cerebelo se correlacionó con la pérdida de coordinación motora, la cual incrementaba con la edad de los sujetos (Forster et al., 1996). En ratas ancianas se ha mostrado un aumento importante en marcadores de estrés oxidativo, por ejemplo, en la

concentración de lipofuscina en las mitocondrias de las células de Purkinje (Rogers, Silver, Shoemaker y Bloom, 1980) y de la proteína Bcl-2 (Kaufman et al., 2001).

Bickford et al. (1999) usaron el modelo de hiperoxigenación descrito en Taglialatela, et al. (1997) para inducir estrés oxidativo en el cerebelo y estudiar los efectos preventivos de la ingesta de diferentes dietas con suplementos antioxidantes (fresas, espinacas, arándano azul o vitamina E) o la ingesta de una dieta con restricción calórica. Los autores concluyeron que ambas dietas retrasaron o previnieron los efectos del estrés oxidativo en el cerebelo medidos por las funciones del sistema noradrenérgico. Asimismo Bickford et al. (2000) con el empleo de la dieta AIN-93 con el suplemento alimenticio del arándano azul, espinacas o fresas, encontraron una tendencia importante, pero no significativa, hacia el aprendizaje de diversas pruebas motoras en los grupos experimentales y una diferencia significativa entre los grupos control y el grupo que recibió la dieta del arándano azul en la expresión del estrés oxidativo medido por el nivel de glutatión.

Cartford et al. (2002) alimentaron un grupo experimental de ratas de 18 meses con una dieta enriquecida con un suplemento de espinacas, (las cuales contienen un nivel alto de antioxidantes), al mismo tiempo el grupo control recibió la misma dieta sin el suplemento de las espinacas. Al término del periodo alimenticio de seis semanas, las ratas fueron entrenadas con el paradigma del condicionamiento del parpadeo. El grupo experimental que recibió la dieta con espinacas aprendió la respuesta condicionada con mayor rapidez que el grupo control. Asimismo, los estudios bioquímicos revelaron una reducción significativa del nivel de las citoquinas pro-inflamatorias, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y el factor de necrosis tumoral beta (TNF- β), en la corteza cerebelosa de las ratas experimentales en comparación a las ratas que no recibieron la dieta con el suplemento de las espinacas.

Propósito de la presente investigación

El objetivo del presente estudio fue evaluar si los efectos antioxidantes de la dieta experimental NIH-31 del Instituto Nacional de la Salud, Bethesda, Maryland, EE.UU., con el suplemento alimenticio del arándano azul producen cambios significativos en la ejecución de ratas adultas de la cepa Fischer 344 en las tareas de aprendizaje discriminativo por recompensa de un ensayo cada día y en la de exploración de objetos novedosos. Así como, determinar y comparar el deterioro cerebral de los ratas experimentales mediante un indicador del estado oxidativo de los tejidos: el nivel de expresión de la proteína del NFκB p65 en el hipocampo, la corteza frontal, el estriado, el cerebro basal anterior y el cerebelo.

Justificación de esta investigación

1) La expectativa de vida de los seres humanos en los países occidentales ha aumentado (Tuijapurkar, Li y Boe, 2000). Sin embargo, datos estadísticos actuales no muestran un incremento a la par de una vida saludable con la expectativa de vida. Un estudio conducido por la Oficina de Estadísticas Nacionales del Gobierno de Gran Bretaña (1998) encontró un aumento de los 70.9 a 74.9 años de vida para los hombres y de 76.8 a 79.8 para las mujeres de 1981 a 1998. Sin embargo, durante ese mismo periodo, la expectativa de vida saludable aumentó de 64.4 a 66.9 años para el hombre y de 66.7 a 68.7 para las mujeres. Los resultados de esta investigación son comparables con los datos de la mayoría de los países industrializados. Lo anterior sugiere que los avances científicos que han logrado un aumento modesto en la longevidad de los humanos no han obtenido los mismos resultados en la calidad de vida. Un padecimiento cardiaco que gracias a las técnicas modernas puede ser atendido, curado o controlado, prolonga la vida de un individuo. Sin embargo, el modo de vida cotidiana de una persona mayor (nivel socioeconómico, entorno, dieta, ejercicio, consumo de tabaco, etc.) puede causar daños irreparables al SNC y consecuentemente, en su calidad de vida. Por lo anterior son relevantes las investigaciones enfocadas al estudio de los factores que pueden incidir en el mejoramiento de la calidad de vida de las personas mayores.

2) La dieta puede tener un impacto en la producción de defensas antioxidantes. Actualmente existe más información sobre los efectos neuroquímicos de los antioxidantes y de los fitonutrientes a un nivel celular, que de los efectos sobre los procesos cognoscitivos en el cerebro senil. Por ello, son necesarias las investigaciones que aborden el efecto de los antioxidantes en los procesos cognoscitivos.

3) El decaimiento de los procesos mnemónicos en las personas mayores no es uniforme. Lo que sugiere que ciertos factores en el modo de la vida cotidiana (por ejemplo la dieta) del individuo pueden ser la causa de dicha variación individual. Por lo tanto, es importante estudiar los efectos de dietas ricas en antioxidantes sobre los procesos mnemónicos.

4) No se han realizado estudios que hayan investigado los efectos del arándano azul en las tareas conductuales de los paradigmas de Aprendizaje Discriminativo por Recompensa de Ensayo cada Día y de Novedad: Exploración de Objetos.

5) Se seleccionaron las ratas de la cepa Fischer 344 (F344) porque se utilizan frecuentemente en las investigaciones sobre el envejecimiento (Weindruch y Masoro, 1991) y por lo tanto existe un banco de datos amplios sobre esta cepa en los procesos del envejecimiento (Shukitt-Hale, et al., 1998). Estas ratas envejecen a una edad más temprana en comparación con otras cepas (Spangler et al., 1994) y el tamaño y peso de su cuerpo se mantiene relativamente estable.

6) Varios investigadores han confirmado que los déficit en tareas cognoscitivas se observan en 100% de los sujetos de la raza F344 a partir de los 18 o 19 meses de edad (Frick, Baxter, Markowska, Olton y Price., 1995; Shukitt-Hale et al., 1998; Wallace, Krauter y Campbell, 1980), lo que sugiere que las medidas preventivas contra el deterioro del cerebro se pueden llevar a cabo antes de dichas edades. Por lo anterior, es importante estudiar la capacidad antioxidante preventiva del arándano azul en el envejecimiento en sujetos entre los 12 y 18 meses de edad. En base a estos hallazgos se

seleccionaron ratas de 15 meses para el comienzo de la presente investigación.

7) Las investigaciones sobre la regulación transcripcional y el EO son más reducidas en comparación con la documentación sobre los efectos del EO en los diferentes organelos celulares (Tong et al., 2002). Por lo tanto, las investigaciones sobre los efectos del EO en los factores transcripcionales son justificadas.

8) Existen alteraciones en la actividad nuclear del NF- κ B con la edad (Kaufman, Bickford y Tagliatela, 2002; Korhonen, Heleneius y Salminen 1997; Toliver-Kinsky, Papaconstantinou y Perez-Polo 1997; Toliver-Kinsky, Rassin y Perez-Polo 2002; Tong et al., 2002). Sin embargo, es el estado oxidativo del citoplasma lo que induce la fosforilación y la degradación de la proteína inhibidora I κ B, y en consecuencia, la activación del NF κ B. Asimismo, debido a que la subunidad crítica para la activación del NF κ B es la p65. En base a lo anterior, en el presente estudio se midieron los niveles en el citoplasma de la subunidad p65 del NF κ B como indicador del EO.

9) Hasta donde es de nuestro conocimiento, no existe literatura acerca de los efectos antioxidantes del arándano azul en la expresión de la proteína NF κ B relacionada con el proceso del envejecimiento.

Hipótesis

- Habrá un incremento del nivel de expresión del NF- κ B en todas las regiones cerebrales en las ratas del grupo control de adultos mayores, en comparación con las ratas del grupo control de jóvenes que recibirán la misma dieta.
- Habrá un incremento del nivel de expresión del NF- κ B en todas las regiones cerebrales en las ratas del grupo experimental adulto, (que recibirán la dieta con el suplemento del arándano azul), en comparación con el grupo de ratas adultas mayores que recibirán la dieta control.
- Se mostrará una relación entre el nivel de estrés oxidativo y la ejecución de las tareas de memoria. El promedio del nivel de expresión normalizado del NF- κ B se correlacionará negativamente con los resultados de las pruebas conductuales de los sujetos de ambos grupos de adultos mayores.
- El grupo control de adultos mayores mostrará déficit en las tareas de memoria del aprendizaje discriminativo y la exploración de objetos novedosos en comparación con el grupo control de jóvenes. Estos resultados indicarán que ambas tareas son sensibles al envejecimiento. El déficit en la tarea de exploración de objetos novedosos será mayor conforme se aumente el intervalo entre el ensayo muestra y el ensayo experimental.
- El grupo experimental de adultos mayores recibirá los beneficios de la acción

antioxidante del arándano azul por un periodo de tres meses (a partir de los 15 meses de edad); se espera que esta alimentación tendrá un efecto preventivo contra el estrés oxidativo. Los beneficios de la dieta se reflejarán en los sujetos a los 18 meses de edad durante la ejecución de la tarea de aprendizaje discriminativo.

- El grupo experimental de adultos mayores recibirá los beneficios de la acción antioxidante del arándano azul por un periodo de cuatro meses (a partir de los 15 meses de edad). Esta alimentación tendrá un efecto preventivo contra el estrés oxidativo, y el cual se reflejará en los sujetos a los 19 meses de edad, durante la ejecución de la tarea de exploración de objetos novedosos con el intervalo de una hora entre los ensayos experimentales.
- La integridad del hipocampo (y posiblemente la de otras de las regiones cerebrales analizadas) será relevante en la ejecución de la tarea de exploración de objetos novedosos, la cual se mostrará a través de una correlación negativa entre el nivel de expresión del NF- κ B en esta estructura cerebral y el porcentaje de exploración de los estímulos novedosos.

MÉTODO

Sujetos

Los sujetos fueron 36 ratas albinas macho de la cepa Fischer 344(F344): 12 ratas con cuatro meses de edad y 24 ratas con 15 meses de edad al comienzo de la investigación. El peso medio de los sujetos jóvenes al comienzo del experimento fue de 120g y el peso medio de los sujetos adultos fue de 420g. Todas las ratas eran experimentalmente ingenuas y se obtuvieron de la colonia de Harlan Sprague-Dawley (Indianápolis, Indiana, EE.UU.). Estas ratas son descendientes de la colonia del Instituto Nacional de la Salud, Bethesda, Maryland, EE.UU. (www.harlan.com/us/). Cada sujeto se mantuvo en jaulas individuales de acrílico transparente con libre acceso a comida y agua (*ad libitum*) y bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas cada uno. El cuidado y el mantenimiento de las ratas experimentales se llevaron a cabo en el laboratorio de la Universidad de Houston-Clear Lake, Houston, TX, EE.UU., y de acuerdo a las reglas de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales en el Laboratorio de la Academia Nacional de Ciencias de los EE.UU. (2000).

Registro de peso de los sujetos

Al inicio del experimento se registró el peso pre-experimental de los sujetos; posteriormente, se pesaron semanalmente. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) del promedio de aumento de peso de cada grupo. Esta variable se obtuvo mediante la diferencia del peso pre-experimental y el post-experimental.

Grupos

Se asignaron aleatoriamente los sujetos de 15 meses de edad a dos grupos: grupo experimental de adultos mayores (EA) y grupo control de adultos mayores (CA). Los 12 sujetos de cuatro meses formaron el tercer grupo, grupo control de jóvenes (CJ). Se le asignó una identificación personal a cada uno de los sujetos a través de marcas de colores. Esto se hizo con el objetivo de identificar a las ratas y de mantener el anonimato del grupo al que pertenecieron. Únicamente las personas que llevaron a cabo la alimentación de los sujetos sabían con precisión el grupo al que pertenecía cada sujeto.

Alimentación

Los alimentos utilizados en este experimento, la dieta control, (NIH-31 Control), y la dieta experimental con el 2% del suplemento alimenticio del arándano azul de la variedad Tif-Blue, (NIH-31-AA), fueron preparados por el laboratorio de Harlan Teklad, Madison, Wisconsin, EE.UU. Las formulas de las dietas fueron desarrolladas por Youdim y sus colaboradores (2000), Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA por sus siglas en inglés), Centro de la Investigación de la Alimentación Humana durante el Envejecimiento, Centro Médico de la Universidad de Tufts, Boston, Massachusetts, EE.UU. Ambas dietas incluyeron como base la dieta estandarizada para roedores NIH-31-con vitaminas, del NIH, la cual es una dieta balanceada, fortificada con vitaminas y minerales, incluyendo la vitamina E (un antioxidante). Para la preparación de la dieta experimental se utilizó el arándano azul congelado de la variedad Tif-Blue, el cual fue homogenizado en agua, centrifugado y liofilizado, finalmente se le agregó a la dieta base NIH-31, de acuerdo al método utilizado en Joseph et al. (1998). Ambas dietas son isocalóricas, dentro de un margen de error

atribuible a las variaciones naturales del valor nutritivo de los ingredientes que se encuentran en la dieta base NIH-31. Los alimentos utilizados en esta investigación fueron donados por Jim Joseph y Barbara Shukitt-Hale (USDA). El apéndice A muestra la composición detallada de las dietas. Cada sujeto recibió 200 g de su dieta asignada semanalmente y se pesaron los residuos del alimento para evaluar la ingesta de la dieta.

Los sujetos se alimentaron *ad libitum* de acuerdo al grupo al que pertenecían: grupo EA: dieta NIH-31 arándano azul Tif-Blue (NIH-31 AA); grupo CA: dieta control, (NIH-31 control); grupo CJ: dieta NIH-31-control. Se utilizó el ANOVA para evaluar la ingesta de las dietas de los tres grupos.

Manipulación de los sujetos

Una vez que los sujetos fueron colocados en sus jaulas individuales, éstos fueron manipulados por cinco minutos dos veces semanalmente para acostumbrarlos al tacto humano y a la experiencia de ser removidos de su jaula para ser colocados en otro lugar. Dos semanas antes de los experimentos se manipularon diariamente hasta concluir los experimentos.

Experimento 1: Aprendizaje discriminativo por recompensa con un ensayo por día

Las ratas se alimentaron con las dietas especiales por un periodo de tres meses antes de comenzar las pruebas conductuales con este paradigma.

Materiales

- 1) *Aparato*: El aparato consiste en un laberinto de acrílico negro que contiene cinco callejones que se bifurcan desde un pasillo central formando un semicírculo. Cuatro callejones se encuentran al nivel del piso y no se coloca ninguna recompensa en ellos. El otro callejón tiene una rejilla de acrílico negro en posición ascendente a 45 grados y en la parte superior tiene una plataforma, en la cual se coloca una pequeña vasija donde se pone la recompensa. La recompensa consiste en diez pastillas de 45 mg manufacturadas por Bioserve. Para evitar que los sujetos se guíen por el olor de las pastillas para encontrar la recompensa, se colocó en la parte superior de cada callejón un envase inaccesible a los sujetos, en el cual se colocaron diez pastillas permitiendo de esta manera un olor uniforme de la recompensa en todos los callejones. El laberinto contiene una caja de iniciación de acrílico transparente enfrente de los callejones. Esta caja se separa del pasillo central por medio de una puerta en forma de guillotina de acrílico negro.
- 2) *Cronómetro*
- 3) *Básculas*: se utilizaron dos, una para pesar a las ratas y otra para los alimentos
- 4) *Pastillas de recompensa*: de 45 mg manufacturadas por los laboratorios de Bioserve.

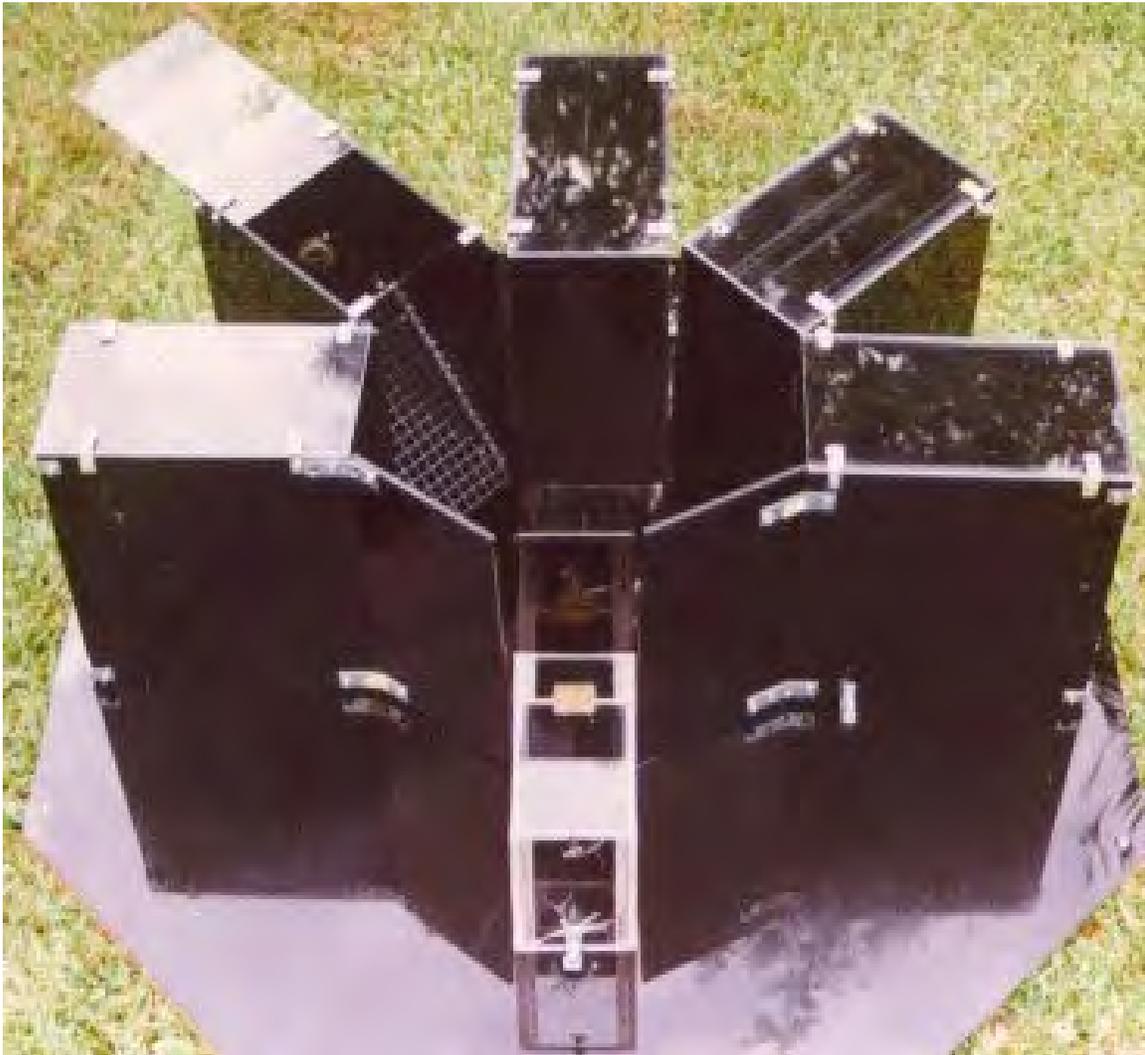


Figura 2. Laberinto del paradigma de aprendizaje discriminativo por recompensa con un ensayo por día.

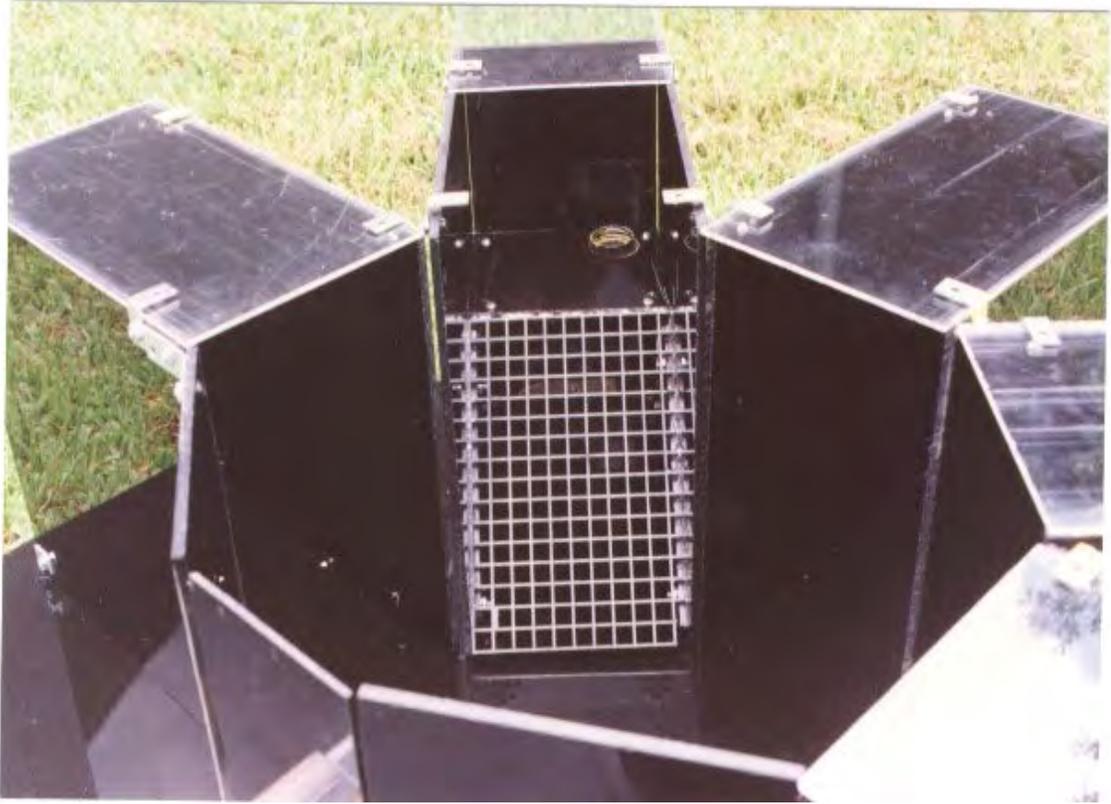


Figura 3. Acercamiento del callejón con la rejilla ascendiente y la plataforma en la parte superior donde se coloca la recompensa.

Procedimiento

Habitación: cinco días antes del experimento, los sujetos se habituaron al laberinto. Este procedimiento se realizó solamente una vez por un periodo de tres minutos. Se colocó al sujeto en la caja de iniciación por 30 s. Al transcurrir dicho tiempo, se abrió lentamente la puerta de guillotina y se le permitió al sujeto caminar libremente en el laberinto por tres minutos.

Privación alimenticia: cinco días antes de empezar el ensayo muestra, todos los sujetos fueron sometidos a un programa de privación alimenticia. El primer día se les retiró el alimento y se pesaron diariamente. Se calculó el porcentaje de la pérdida de peso de cada sujeto. Dependiendo de su pérdida de peso cada sujeto recibió una cantidad limitada del alimento hasta que todos los sujetos alcanzaron un peso aproximado del $82 \pm 2\%$ de su peso al iniciar el programa de privación. También recibieron 10 pastillas Bioserve para acostumbrarlos al sabor y textura de las pastillas de la recompensa.

Ensayo muestra: el sujeto fue colocado en la caja de iniciación por 30 segundos, se levantó la puerta de guillotina y se le permitió salir. Por medio de un cronómetro, se registraron los segundos que tardó en alcanzar la recompensa. Este periodo inició desde el momento en que el sujeto salió completamente de la caja de iniciación hasta el momento en que comenzó a comer la recompensa. Una vez que el sujeto salió completamente de la caja de iniciación, se colocó una puerta de acrílico negro en lugar de la puerta de guillotina transparente que se usa en la caja de iniciación para crear uniformidad entre todas las paredes del laberinto. Esto se llevó a cabo para evitar que el sujeto se distrajera y/o que intentara volver a la caja de iniciación una vez iniciado el registro del cronómetro. Al salir de la caja de iniciación se le permitió caminar libremente por el laberinto. Se anotó el número de errores de cada sujeto. Se consideró

la entrada a uno de los callejones sin recompensa como un error. Cuando el sujeto alcanzó la recompensa se le permitió comer todas las pastillas. Se registró el número de pastillas que el sujeto ingirió. Es importante mantener este registro para asegurarse que todos los sujetos del experimento consumieron la recompensa, ya que ésta es el estímulo motivante. Al terminar de ingerir las pastillas, suavemente se removió al sujeto del aparato y se le colocó nuevamente en su jaula.

Ensayos experimentales: comenzaron 24 horas después del ensayo de muestra. Se llevaron a cabo tres pruebas de retención durante tres días consecutivos con un intervalo de 24 horas entre cada prueba, por lo que los ensayos experimentales se llevaron a cabo a las 24 h, 48 h y 72 h después del ensayo muestra. Se siguió exactamente el mismo procedimiento que en el ensayo muestra.

Análisis estadístico

Se obtuvieron dos variables:

- 1) *Número de errores:* número de entradas a los callejones sin recompensa. Se les asignaron un puntaje en el ensayo muestra y en cada uno de los tres ensayos experimentales. Para analizar la tendencia en el número de errores de cada grupo se realizó un análisis de tendencia lineal de esta variable de los ensayos experimentales (ensayo muestra y los tres ensayos experimentales).
- 2) *Latencia:* los segundos para encontrar la recompensa. Para analizar la latencia de los ensayos (ensayo muestra y los tres ensayos experimentales) se realizó un análisis de tendencia lineal por separado para cada uno de los grupos.

- 3) Cada una de las variables, mencionadas anteriormente, se analizó independientemente con un análisis de varianza (ANOVA) con medidas repetidas (grupo x ensayos experimentales) y se empleó la prueba de comparación de pared de *post hoc* de Fisher.

Experimento II: Exploración de objetos novedosos

En este experimento se utilizaron las mismas ratas del Experimento I. El lapso entre la realización de los dos experimentos fue de cuatro semanas posteriores al término del Experimento I, a fin de que las ratas recuperaran el 100% de su peso. De este modo, las ratas se mantuvieron cinco semanas más en la dietas control y experimental en comparación con el Experimento I.

Materiales

- 1) *Aparato*: Consiste en una arena de acrílico negro de 93 cm. x 93 cm. y con una altura de 61 cm. (Clark et al., 2000). La iluminación del cuarto consistió en una lámpara con un foco de 25 W colocada aproximadamente a un metro de altura del centro de la arena.
- 2) *Estímulos*: Los ítems que se utilizaron fueron cuatro objetos de cerámica entre una y dos veces más grandes al tamaño de los sujetos. Los estímulos eran lo suficientemente pesados para que las ratas no los pudieran mover cuando los exploraban. Se utilizaron tres copias idénticas de cada objeto.

Procedimiento

Habitación al aparato: Los sujetos fueron colocados en el aparato vacío durante cinco minutos por cinco días consecutivos.

Tarea Experimental: consistió de cuatro fases diferentes:

- 1) *Re-habitación:* el sujeto era puesto en el aparato sin los ítems durante un minuto. Posteriormente se removía del aparato y era devuelto a su jaula.
- 2) *Familiarización:* Esta fase es el ensayo muestra. Inmediatamente después de la re-habitación, dos objetos idénticos (objetos familiares) eran colocados en el aparato en un lugar predeterminado. Se introducía al sujeto en el aparato nuevamente colocándolo con su mirada hacia los objetos, como lo muestra el diagrama en la Figura 4. Se permitió la exploración cercana de cualquiera de los objetos por un tiempo acumulado de 30 s o un tiempo máximo de diez minutos en el aparato. El tiempo de exploración fue registrado usando un programa de cómputo diseñado para esta tarea, en el cual se oprimían diferentes teclas (izquierda o derecha) de acuerdo con el objeto que estaba explorando el sujeto. Cuando se alcanzaba cualquiera de las dos medidas mencionadas anteriormente, el programa se terminaba automáticamente. Los sujetos que no acumularon un mínimo de 12 segundos de exploración cercana durante el ensayo muestra se descalificaron (2 sujetos del grupo control de adultos y 2 del grupo experimental de adultos). Los parámetros que se siguieron para registrar la exploración cercana de los objetos fueron: a) el sujeto se encuentra cuando menos a un centímetro de distancia del objeto, mira hacia el objeto y mueve sus bigotes, el sujeto explora el objeto con su nariz o tocándolo. Si el sujeto toca el objeto con otra parte de su cuerpo y su mirada no está dirigida al

objeto no se considera como exploración cercana.

- 3) *Intervalo*: Al término del ensayo muestra, se removió al sujeto y se le regresó a su jaula por el intervalo pre-determinado de acuerdo al ensayo experimental. Los intervalos que se utilizaron fueron 30 s y una hora.
- 4) *Ensayo Experimental*: Durante el intervalo se removieron los objetos usados en el ensayo muestra y se colocó la tercera copia idéntica al objeto familiar y el objeto novedoso en los lugares premarcados. Para evitar la contaminación de los efectos de una preferencia espacial o de determinado ítem, durante los ensayos experimentales se contrabalancearon las siguientes variables:
 - a) Asignación del ítem como objeto novedoso o familiar.
 - b) La localización del ítem novedoso del lado derecho o izquierdo.

Cada sujeto recibió únicamente una prueba por cada intervalo, las cuales se realizaron en días separados. Al terminar cada ensayo se limpiaba el aparato y los objetos utilizados con etanol (70%) para neutralizar cualquier olor que pudiera contaminar la tarea mnemónica.

Análisis estadístico

La variable dependiente fue el porcentaje de exploración, el cual indica el porcentaje de tiempo (en segundos) dedicado a la exploración del objeto novedoso del tiempo total de exploración cercana de los objetos. Se realizó un ANOVA, (porcentaje de exploración x grupo), con medidas repetidas (ensayos experimentales: 30 s y 1 h). Se utilizó la prueba *post hoc* de Fisher.

Para asegurarse que la preferencia hacia el objeto novedoso no era únicamente por casualidad, se comparó el porcentaje de exploración de cada grupo durante los ensayos experimentales con el 50% (el nivel casual en los ensayos experimentales). Se utilizó la prueba t student para muestras relacionadas para realizar dicha comparación.

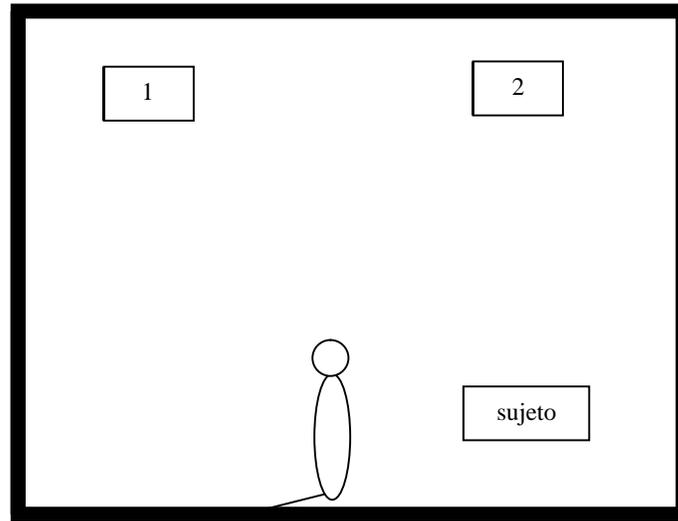


Figura 4: representación de la posición del sujeto al ser introducido en el aparato.

Todos los sujetos se colocaron con la misma posición, mirando hacia los objetos. Los números 1 y 2 representan los ítems utilizados, los cuales siempre fueron colocados en el mismo lugar y en la misma posición. Se utilizó una plantilla para marcar el lugar exacto de los ítems. Esta figura es una adaptación de la utilizada por Ennaceur y Delacour (1988).



Figura 5. Aparato del paradigma de exploración de objetos novedosos. El aparato mide 93 cm. x 93 cm. x 61 cm. La figura muestra la habituación del sujeto al aparato.



Figura 6.Ensayo de familiarización,
el sujeto esta explorando dos estímulos idénticos



Figura 7. Ensayo de retención. Se colocan en la arena una copia idéntica del estímulo previamente visto y un objeto nuevo. El sujeto está explorando el estímulo novedoso

Análisis Bioquímicos

Al término de las pruebas conductuales, los sujetos fueron anestesiados profundamente y sometidos a una perfusión cardiaca con solución salina. Se decapitaron y se removieron los cerebros de todos los sujetos. Cada cerebro fue dividido por la mitad para separar los dos hemisferios. El hemisferio derecho se dividió en varias regiones y se colocaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ donde se mantuvieron hasta que se realizaron los análisis. Las regiones cerebrales que se seleccionaron para este estudio fueron el hipocampo, la corteza frontal, el estriado, el cerebro basal anterior, y el cerebelo. En ellas se realizó la cuantificación de los niveles de expresión del NF κ B p65, utilizando las siguientes técnicas:

- 1) *Fraccionamiento de las Proteínas*: Se separaron las células de los tejidos para obtener células individuales utilizando el homogenizador de Dounce. Posteriormente se separaron la fracción citoplásmica y la nuclear de las células (Taglialatela et al., 1998). Este fraccionamiento de la célula es necesario ya que las proteínas tienen diferentes niveles de expresión y funciones en el citoplasma y en el núcleo (Apéndice B).
- 2) *Concentración de la Proteína*: Una vez separadas las fracciones, se determinó la concentración molecular de los extractos de las proteínas utilizando el método del ácido de bicinonínico (BCA) manufacturado por el Laboratorio Químico de Pierce (Rockford, IL, EE.UU.). Las proteínas reaccionan con el Cu^{+2} lo transforman a Cu^{+1} , el cual reacciona con el BCA y forma un color púrpura (Smith et al, 1985). La intensidad del púrpura indica la concentración proteica (Wiechelman et al., 1988). El apéndice C muestra el protocolo utilizado.
- 3) Se utilizó el método de inmunotransferencia de Western para la identificación,

cuantificación, separación y caracterización de las proteínas de las muestras en las fracciones citoplásmicas.

- a) Una vez determinada la concentración se realizó la técnica de electroforesis (apéndice D) utilizando geles desnaturalizantes de Poliacrilamida-Sulfato Sódico (PAGE-SDS) siguiendo la metodología de Lammeli (1970). Este procedimiento se llevó a cabo para la diferenciación de las proteínas en el citoplasma o en el núcleo de acuerdo a su peso molecular. En esta fase, las proteínas se separaron de acuerdo a su peso molecular y se formaron bandas.
- b) Transferencia: Una vez que se terminó la migración electroforética de las proteínas, se realizó la transferencia de los geles a las membranas de nylon polivinilo difluorado (PVDF), durante 4 horas, a 400 mA, bajo una temperatura de -4°C . (Apéndice D).
- c) Al término de la transferencia para fijar la banda de proteínas a la membrana, se realizó el bloqueo de la membrana por una hora a temperatura ambiente mediante el amortiguador de bloqueo (5% leche en polvo diluida en TBS-T [TBS con 0.1% de Tween-20]).
- d) Inmediatamente, se realizó el reconocimiento inmunológico con la incubación de la membrana (por 24 horas a -4°C) y con el antisuero primario NF κ B p65 (NF- κ Bp65, rabbit polyclonal; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE.UU.) diluido en el amortiguador de bloqueo (2.5% de leche en polvo diluida en TBS-T [TBS con 0.1% de Tween-20]) en una concentración de 1:2000.
- e) Para fijar el antisuero primario se colocó la membrana en la solución de amortiguador de bloqueo (por una hora a 37°C) y se incubó con el anticuerpo secundario (horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit secondary, BioRad, Hercules, CA, EE.UU) diluido en el amortiguador de bloqueo (2.5% leche en polvo

diluida en TBS-T [TBS con 0.1% de Tween-20]) con una concentración de 1:5000.

- f) Después se realizó la autoradiografía con el equipo de detección para inmunotransferencia de los Laboratorios de Amersham, Piscataway, NJ, EE.UU.
 - g) Esta radiografía de las membranas se llevó a cabo para producir la imagen de la banda con la proteína de interés. La banda se determinó a través de comparar la banda de la proteína específica con un patrón de proteínas de pesos moleculares conocidos. Posteriormente se cuantificó la concentración de la proteína mediante la densitometría de las bandas, que mide la densidad óptica, utilizando un escáner y el programa de Alpha Ease ©.
- 4) Los resultados de la cuantificación de la proteína NF- κ B p65 (densidad óptica) de cada región se normalizaron (densidad de la expresión de la proteína dividida por el promedio de las muestras estandarizadas en cada uno de los bloques de inmunotransferencia). La normalización de los resultados se realizó para poder comparar las diferentes regiones. Los resultados de cada región se analizaron por separado mediante un ANOVA con los factores grupo x densidad normalizada del NF- κ B, seguidos por la prueba de *post hoc* de Fisher.
 - 5) Se correlacionó la expresión de NF- κ B p65 de cada una de las regiones con el porcentaje del tiempo total dedicado a la exploración del objeto novedoso con el coeficiente de correlación de Pearson. Se le asignó a cada sujeto un índice de la expresión total de NF κ B p65 en el encéfalo, el cual se obtuvo mediante el promedio de todas las regiones cerebrales de cada sujeto. Se correlacionó el índice total de NF- κ B y el porcentaje del tiempo total dedicado a la exploración del objeto novedoso en los dos grupos de sujetos adultos y se realizó otra correlación por separado del grupo CJ. Todos los análisis estadísticos se consideraron significativos a un nivel de $p < .05$.

RESULTADOS

Peso de los sujetos y consumo de la dieta:

El promedio del aumento de peso ($M \pm EE$) de los sujetos en cada grupo fue: grupo control de jóvenes 88.6 ± 14.6 g, grupo control de adultos 14.4 ± 4.5 g, grupo experimental de adultos 11.7 ± 3.2 g. El ANOVA mostró diferencias significativas entre los grupos ($F(2,32) = 121.7, p < 0.001$). El análisis *post-hoc* de Fisher reveló que el grupo control de jóvenes aumentó de peso significativamente en comparación con los dos grupos de adultos ($p < 0.001$). Entre los dos grupos de adultos no se encontró una diferencia significativa ($p = 0.63$).

El consumo medio semanal de los sujetos del grupo experimental de adultos fue de 394 mg/día de la dieta con arándano azul (AA), cada sujeto en este grupo consumió, aproximadamente, el equivalente a 4.4 g/día de AA (Apéndice A). La ingesta semanal de la dieta ($M \pm EE$) de cada grupo fue: grupo control de jóvenes 130.3 ± 2.3 g, grupo control de adultos 147.2 ± 1.7 g, grupo experimental de adultos 137.8 ± 3.0 g. El ANOVA mostró una diferencia significativa entre los grupos ($F(2,32) = 11.78, p < 0.001$).

El análisis *post-hoc* reveló que el consumo semanal del grupo control de adultos fue significativamente mayor en comparación con el grupo control de jóvenes ($p < 0.001$) y el grupo experimental de adultos ($p = 0.011$). El consumo semanal del grupo experimental de adultos fue significativamente mayor que el grupo control de jóvenes ($p = 0.035$). El porcentaje de exploración del objeto novedoso de ambos grupos de ratas adultas mostró una correlación mínima con la ganancia de peso ($r = 0.17, p > .05$) y el consumo del alimento ($r = 0.22, p > .05$).

Experimento I. Aprendizaje discriminativo por recompensa de un ensayo cada día.

Durante el ensayo muestra 8 sujetos no realizaron errores por lo que se eliminaron del análisis estadístico. El número de sujetos que se incluyeron en cada grupo fue: grupo CJ n =10, grupo CA n =9, grupo EA n =9.

En la variable número de errores (Tabla 3 y Figura 8), el ANOVA no reveló diferencias significativas entre los grupos en el ensayo muestra ($F(2,28) = 2.971$, $p = 0.07$). El ANOVA de medidas repetidas no reveló diferencias en los errores entre los tres ensayos experimentales ($F(2, 52) = .371$, $p = 0.69$), ni en la interacción de ensayos x grupo ($F(2, 26) = .362$, $p = 0.62$). Sin embargo si se encontró una diferencia entre los grupos en el promedio de los tres ensayos experimentales ($F(2, 26) = 3.467$, $p = 0.046$). y la prueba de comparación de pares reveló una diferencia significativa únicamente entre el grupo CJ y el grupo CA ($p = .016$). No hubo diferencia entre el grupo CJ y el grupo EA ($p = 0.089$), ni entre los grupos de CA y EA ($p = 0.475$).

El grupo CJ demostró aprendizaje durante el curso de este experimento, como lo indican la tendencia lineal negativa y significativa que se demostró en los ensayos incluyendo el ensayo muestra y los experimentales, ($F(1,36) = 9.05$, $p = 0.005$). Los sujetos del grupo de adultos mayores que recibieron la dieta del AA también demostró aprendizaje como lo indica la tendencia lineal negativa y significativa de los ensayos ($F(1,32) = 4.62$, $p = 0.039$). En contraste el grupo CA no mostró una tendencia lineal significativa ($F(1,36) = .104$, $p = 0.630$).

Tabla 3. Número de errores ($M \pm EE$) en los tres ensayos experimentales (24 hrs., 48 hrs. y 72 hrs. después del ensayo muestra).

ENSAYOS	GRUPOS		
	Control de Jóvenes	Control de Adultos Mayores	Experimental de Adultos Mayores
Ensayo Muestra	2.1 ± 0.378	3.3 ± 0.448	3.8 ± 0.730
Ensayo Experimental 1	1.1 ± 0.481	2.5 ± 0.687	2.7 ± 1.37
Ensayo Experimental 2	0.8 ± 0.200	2.1 ± 0.752	2.0 ± 0.600
Ensayo Experimental 3	0.6 ± 0.305	3.0 ± 1.42	1.3 ± 0.552

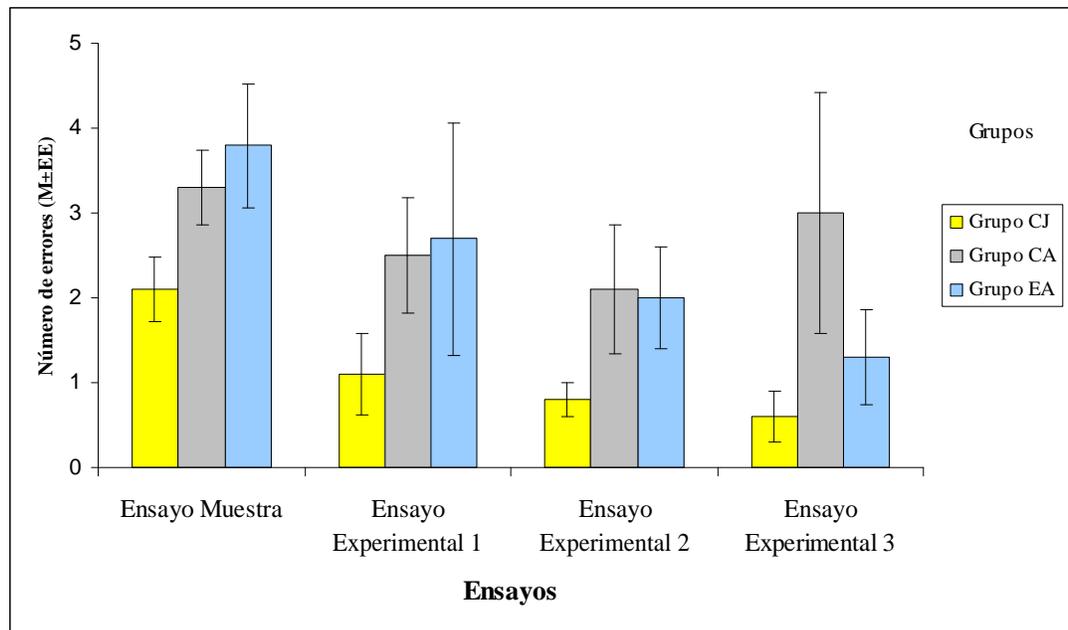


Figura 8. Número de errores (entrada a los callejones sin recompensa), en el ensayo muestra y en cada uno de los ensayos experimentales de los tres grupos (24 hrs., 48 hrs. y 72 hrs. después del ensayo muestra). CJ = grupo control de jóvenes, CA = grupo control de adultos mayores y EA = grupo experimental de adultos mayores.

El ANOVA de medidas repetidas de la latencia (segundos para alcanzar la recompensa) mostró que no hubo una diferencia significativa entre los grupos durante el ensayo muestra ($F(2,28) = 2.299, p = 0.120$). No hubo diferencia significativa entre los tres ensayos experimentales ($F(2,52) = 2.809, p = 0.069$), ni en la interacción de ensayos por grupo ($F(2,26) = 0.073, p = 0.636$). Asimismo no se encontró una diferencia entre los grupos ($F(2,26) = 1.199, p = 0.318$).

El análisis lineal de la latencia para encontrar la recompensa en base a los ensayos (incluyendo el ensayo muestra y los tres ensayos experimentales) no encontró una tendencia significativa del grupo control de adultos mayores, lo que sugiere que la latencia de este grupo no se mejoró a través de los ensayos. En contraste, se encontró una tendencia negativa y significativa en la latencia para encontrar la recompensa del grupo de adultos mayores experimental y el grupo control de jóvenes.

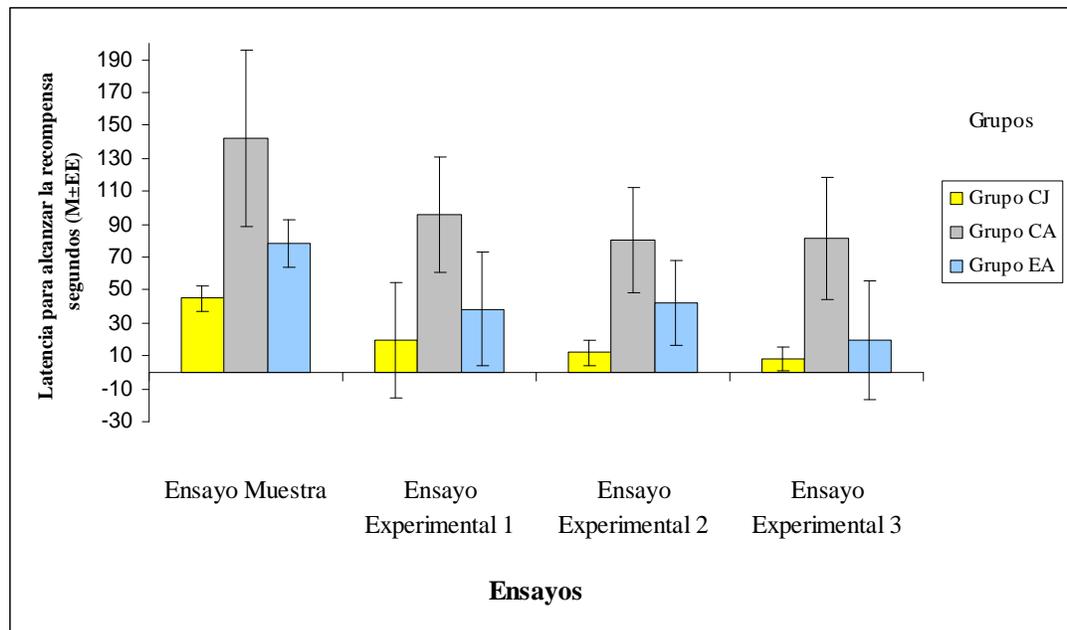


Figura 9. Latencia para alcanzar la recompensa (segundos) durante el ensayo muestra y los tres ensayos experimentales (24 hrs., 48 hrs. y 72 hrs. después del ensayo muestra). No hubo diferencias significativas entre los grupos. El análisis de tendencia lineal reveló una tendencia negativa y significativa del grupo experimental de adultos mayores (EA) y el grupo control de jóvenes (CJ) en la latencia. En contraste esta tendencia no fue significativa para el grupo control de adultos mayores (CA).

Tabla 4. Latencia para encontrar la recompensa ($M \pm EE$) en el ensayo muestra y en los tres ensayos experimentales (24 hrs., 48 hrs. y 72 hrs. después del ensayo muestra).

ENSAYOS	GRUPOS		
	Control de Jóvenes	Control de Adultos Mayores	Experimental de Adultos Mayores
Ensayo Muestra	44.8 \pm 7.07	142.3 \pm 53.47	78.1 \pm 14.55
Ensayo Experimental 1	19.5 \pm 34.79	95.9 \pm 35.34	38.5 \pm 34.28
Ensayo Experimental 2	11.7 \pm 8	80.8 \pm 32	42.0 \pm 26.1
Ensayo Experimental 3	8.0 \pm 7	81.0 \pm 37.25	19.7 \pm 36.13

Experimento II: Exploración de objetos novedosos

Se eliminaron 5 sujetos de los análisis estadísticos por los siguientes motivos: 1 sujeto del grupo control de adultos falleció; 2 sujetos del grupo control de adultos y 2 sujetos del grupo experimental de adultos no alcanzaron el criterio mínimo de exploración durante el ensayo muestra (12 s). El número final de sujetos que se incluyeron en cada grupo fue: grupo control de jóvenes $n = 12$, grupo control de adultos $n = 9$, grupo experimental de adultos $n = 10$. En el ensayo experimental 1 hora después del ensayo muestra todas las ratas alcanzaron este criterio.

La figura 10 muestra el porcentaje de exploración de los tres grupos durante los dos ensayos experimentales: 30 s (lado izquierdo) y una hora (lado derecho). Durante el ensayo experimental de 30 s el porcentaje de exploración (porcentaje en segundos) de cada grupo fue: grupo control de jóvenes, $75 \pm 5.8 \%$ ($M \pm EE$); grupo control de adultos, $64 \pm 6.7 \%$ ($M \pm EE$); y grupo experimental de adultos, $66 \pm 6.3\%$ ($M \pm EE$). Durante el ensayo experimental-1 hora el porcentaje de exploración de cada grupo fue:

grupo control de jóvenes, $64 \pm 4.6\%$ ($M \pm EE$); grupo control de adultos, $44 \pm 5.5\%$ ($M \pm EE$); y grupo experimental de adultos, $69 \pm 5.2\%$ ($M \pm EE$).

Los resultados de la prueba t de student para muestras relacionadas revelaron que la comparación del porcentaje de exploración fue significativamente mayor que el nivel de casualidad (50%) para los tres grupos durante el ensayo experimental 30 s: grupo control de jóvenes, $p < .01$, grupo control de adultos y grupo experimental de adultos, $p < .05$. Sin embargo, en el ensayo experimental de una hora, esta preferencia se mostró únicamente en el grupo control de jóvenes y en el grupo experimental de adultos, $p < .01$.

El ANOVA de medidas repetidas con dos factores mostró una diferencia significativa entre los ensayos experimentales ($F(1,28) = 4.33$, $p = 0.047$) y entre los grupos ($F(2,28) = 9.003$, $p = 0.001$). La interacción ensayo x grupo no fue significativa ($F(2,28) = 2.41$, $p = 0.108$). Los resultados de los análisis *post-hoc* revelaron diferencias significativas entre el grupo control de adultos y el grupo control de jóvenes ($p < .001$) y el grupo experimental de adultos ($p = .002$). No se encontró una diferencia significativa entre el grupo experimental de adultos y el grupo control de jóvenes ($p = .727$).

Los análisis *post hoc* entre los grupos en el ensayo experimental 30 seg. no revelaron diferencias significativas ($p > 0.05$). Sin embargo en el ensayo experimental de una hora, los análisis *post-hoc* revelaron una diferencia significativa entre el grupo control de jóvenes y el grupo control de adultos ($p < .01$) y entre el grupo control de adultos y el grupo experimental de adultos ($p < .01$).

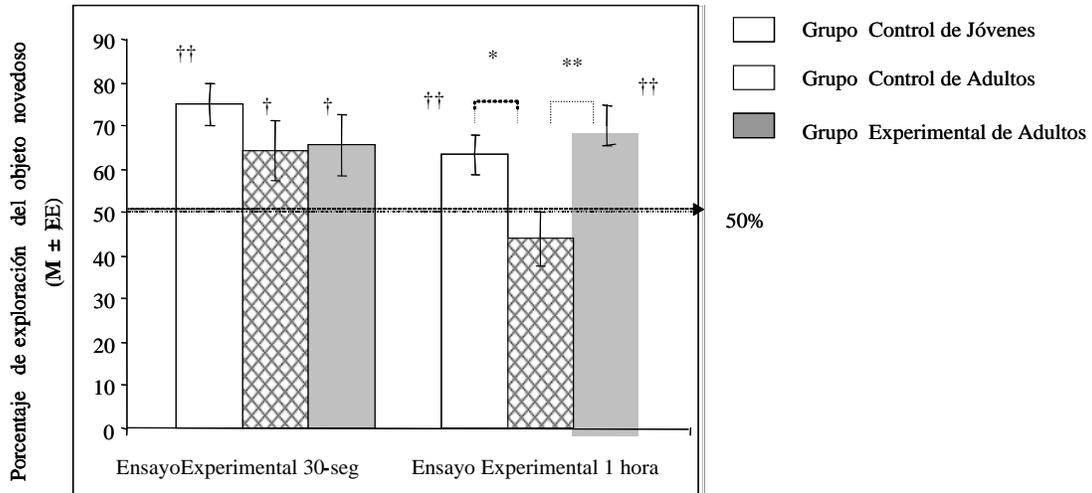


Figura 10. Porcentaje de exploración de objetos novedosos. Porcentaje del tiempo total dedicado a la exploración del objeto novedoso durante los dos ensayos experimentales:

* $p < .05$ grupo control de jóvenes vs. el grupo control de adultos en el ensayo de 1 hora

** $p < .01$ grupo control de adultos vs. el grupo experimental de adultos en el ensayo de 1 hora.

† $p < .05$ comparación del porcentaje total de exploración del grupo con el 50% (nivel del chance) en ambos ensayos.

†† $p < .01$, comparación del porcentaje total de exploración del objeto novedoso con el 50%. (nivel del chance) en ambos ensayos.

Análisis Bioquímicos

Se midió la densidad óptica de las muestras y los resultados fueron convertidos en densidad normalizada. La Tabla 6 muestra los resultados del ANOVA realizado en la densidad normalizada del nivel de expresión de la proteína NF- κ B en cada una de las regiones cerebrales evaluadas. Los resultados de la prueba *post hoc* se muestran en la Tabla 5.

Los análisis bioquímicos mostraron un nivel de expresión de la proteína NF- κ B mayor en el grupo control de adultos que en el grupo control de jóvenes en todas las regiones. En cuatro de las regiones: hipocampo, cerebelo, corteza frontal y cerebro basal anterior las diferencias fueron significativas. El estriado fue la única región que no mostró una diferencia significativa entre el grupo control de jóvenes y el grupo control de adultos. En cuatro de las regiones analizadas (hipocampo, cerebelo, corteza frontal y el estriado) el grupo experimental de adultos mostró un nivel significativamente menor de NF- κ B que el grupo control de adultos. En el cerebelo y el hipocampo el grupo experimental adulto mostró un nivel significativamente mayor de NF- κ B que el grupo control de jóvenes (Tabla 6).

Tabla 5. Resultados del ANOVA en la expresión de la proteína NF- κ B en las diferentes regiones cerebrales.

Región Cerebral	<u>Grados de</u> <u>Libertad</u>	<u>F</u>	<u>P</u>
Corteza Frontal	2, 29	5.260	0.01
Hipocampo	2, 31	3.850	0.03
Cerebro Basal Anterior	2, 31	4.864	0.02
Estriado	2, 32	3.796	0.03
Cerebelo	2, 32	37.441	< 0.001

Tabla 6. Resultados de las pruebas *post-hoc* de Fisher del nivel de expresión del NF- κ B en las diferentes regiones cerebrales. Los números indican la densidad normalizada (unidades arbitrarias) ($M \pm EE$) que se obtuvo a través de los análisis de la inmunotransferencia de Western. Los valores de p indican los resultados de las pruebas *post-hoc* con una diferencia significativa entre los dos grupos que se indican.

Regiones Cerebrales	Grupo Control de Jóvenes ($M \pm EE$)	Grupo Control de Adultos ($M \pm EE$)	Grupo Experimental de Adultos ($M \pm EE$)
Corteza Frontal	0.91 \pm 0.12	1.31 \pm 0.17	0.77 \pm 0.11
	p=0.047		p=0.01
Hipocampo	0.84 \pm 0.06	1.15 \pm 0.10	0.88 \pm 0.09
	p=0.017		p=0.035
Cerebro Anterior Basal	0.51 \pm 0.18	1.27 \pm 0.20	1.01 \pm 0.16
	p=0.005		
Estriado	0.99 \pm 0.05	1.15 \pm 0.05	0.88 \pm 0.08
	p=0.086		p=0.005
Cerebelo	0.44 \pm 0.12	1.78 \pm 0.08	0.85 \pm 0.12
	p=0.009		
	p<0.001		p<0.001

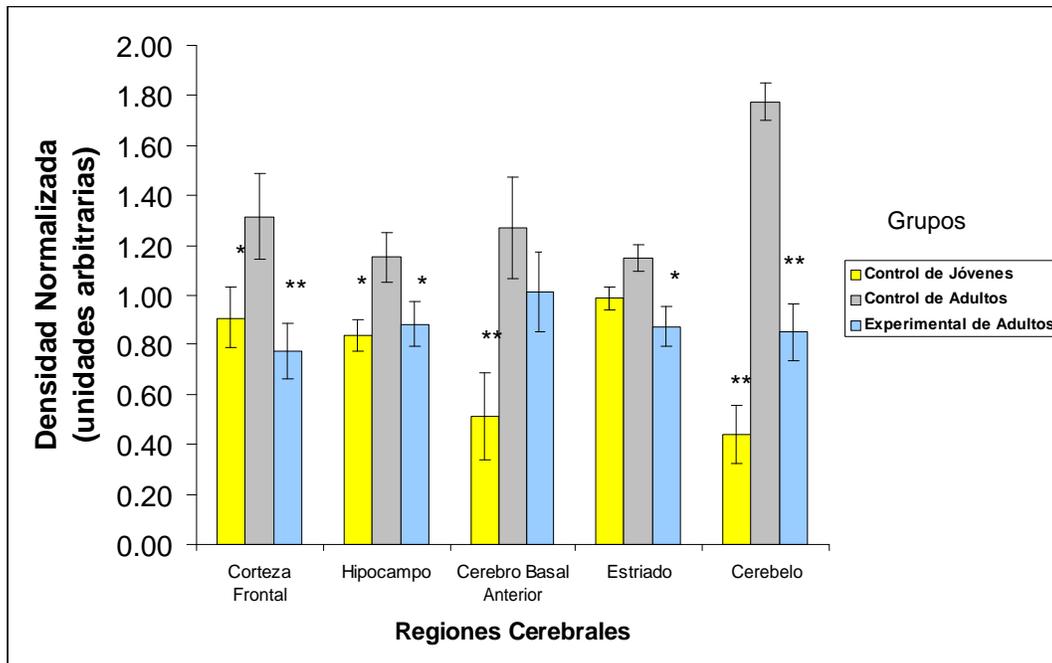


Figura 11. Expresión normalizada del NF- κ B en las diferentes regiones cerebrales. Las unidades de medida fueron asignadas arbitrariamente con valores del 0 al 2, equivalentes de menor a mayor densidad respectivamente. La altura de las barras representa la densidad normalizada ($M \pm EE$), la densidad óptica de las bandas dividida por el promedio de las muestras estandarizadas en cada uno de los bloques de la inmunotransferencia de Western, las cuales se reportan en la Tabla 6. Los resultados de las comparaciones de pares *post-hoc* se muestran con los siguientes símbolos:

* $p < 0.05$ del grupo de la barra correspondiente en comparación con el grupo control de adultos.

** $p < 0.01$ del grupo de la barra correspondiente en comparación con el grupo control de adultos.

Las correlaciones entre NFκB p65 y las diferentes regiones analizadas de ambos grupos de las ratas adultas se muestra en la Tabla 8 y en la Figura 8. La correlación entre el índice total de la expresión del NFκB p65 del grupo control de ratas jóvenes con el porcentaje de exploración del objeto novedoso en el ensayo experimental de una hora, fue mínima, $r = -0.02$, y no fue significativa.

Tabla 7. Muestra la correlación entre la expresión del NF-κB p65 en cada una de las regiones cerebrales y el índice total del nivel de expresión con el porcentaje de exploración del objeto novedoso en el ensayo experimental-1 hora en los dos grupos de sujetos adultos.

Área	r	p
Hipocampo	-0.360	0.049
Cerebelo	-0.528	0.005
Cerebro anterior	-0.092	0.3
Corteza frontal	-0.071	0.4
Estriado	-0.156	0.2
Índice Total	-0.520	0.006

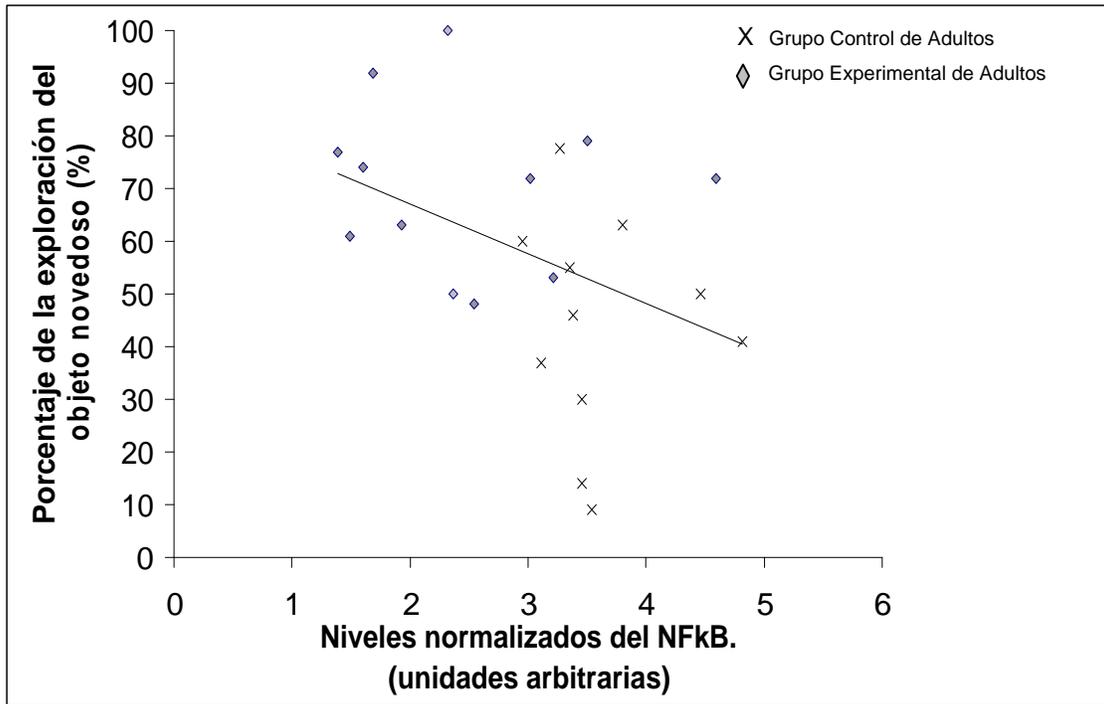


Figura 12. Correlación entre el índice total de la expresión del NF-κB p65 que es el promedio de la expresión de la densidad normalizada del NF-κB p65 (unidades arbitrarias) en todas las regiones cerebrales: hipocampo, cerebro basal anterior, corteza frontal, estriado y cerebelo y el porcentaje del tiempo total (%) dedicado a la exploración del objeto novedoso en el ensayo experimental realizado una hora después del ensayo muestra en ambos grupos: adulto control y experimental ($r = -.520$, $p = 0.006$).

DISCUSIÓN

Los resultados al término de la presente investigación nos mostraron diferencias importantes en la exploración de objetos novedosos y en el nivel de expresión del NF- κ B entre los grupos de ratas adultas. Lo anterior nos podría sugerir, que la ingesta de la dieta NIH-31-AA, provee al cerebro senil con defensas que posiblemente inciden en los mecanismos que subyacen a los procesos de la memoria de reconocimiento y en la expresión del nivel de la proteína NF- κ B. Los beneficios de los antioxidantes para disminuir los efectos deletéreos del EO durante el envejecimiento se han demostrado anteriormente (Joseph et al., 1998a; Lavrovsky et al., 2000; Meydani et al., 1998; Siess, 1991). Nuestros resultados son consistentes con dichas investigaciones. Una posible explicación para los resultados de la presente investigación es la que propone la teoría del envejecimiento de los radicales libres propuesta por Harman (1956), que sugiere que el estrés oxidativo es la causa principal del proceso del envejecimiento.

Dietas antioxidantes

La edad en que los roedores comienzan a ingerir antioxidantes (Bezlepkin, Sirota y Gabsiev, 1996) es un factor importante que puede afectar su longevidad, ya que se ha sugerido que uno de los mecanismos que previene la vejez prematura es la acción de los antioxidantes (Casadesus, Shukitt-Hale y Joseph, 2003; Mattson y Camandola, 2001; Mattson et al., 2002). Estudios anteriores con ratas de la misma cepa (F344) han confirmado que el déficit en tareas cognoscitivas (por ejemplo, la tarea del laberinto de agua de Morris) se observa en 100% de éstas ratas a partir de los 19 meses de edad (Frick et al., 1995; Shukitt-Hale et al., 1998; Wallace et al., 1980), por lo tanto, en la

presente investigación se utilizaron sujetos de 15 meses de edad. Tomando en cuenta lo anterior los resultados de esta investigación sugieren que el tratamiento con la dieta experimental NIH-31-AA tuvo un efecto preventivo o demoró los efectos nocivos del estrés oxidativo en las ratas del grupo experimental.

Es poco probable que los resultados, tanto los conductuales como los bioquímicos, se deban a las diferencias que se observaron en el aumento de peso y en la cantidad del consumo de la dieta, ya que se encontró una diferencia insignificante entre el aumento medio del peso de los sujetos de ambos grupos de adultos. Sin embargo, la diferencia en el consumo medio semanal de las dietas fue significativa. El grupo experimental consumió menos alimento que el grupo control de adultos, el promedio de esta diferencia fue únicamente del 6.3%. Esta fracción es mínima en comparación al porcentaje (40%-60%) que se usa en las investigaciones sobre los efectos del régimen alimenticio con calorías reducidas en el envejecimiento el cual sugiere que la vejez prematura se puede prever con un régimen alimenticio adecuado (Casadesus et al., 2003; Heilbronn y Ravussin, 2003; Mattson et al., 2000). Asimismo ni el aumento de peso, ni el consumo de la dieta de los grupos adultos mostraron una correlación importante con los resultados de las pruebas mnemónicas.

Para mantener la dieta control y la experimental isocalóricas, se le agregaron 20g/Kg. de maíz a la dieta control, la misma cantidad del arándano azul (AA) que se le añadió a la dieta experimental. Por lo que la diferencia en los resultados entre los grupos adultos no es atribuible a una diferencia en las calorías de las dietas. Todos los sujetos del ambos grupos de adultos mayores recibieron los beneficios de la dieta base, la cual es considerada un alimento completo para el desarrollo y el mantenimiento adecuado de los roedores en todas las etapas de su vida (Lewis, Johnson, Mayhugh y Duffy, 2003). Algunos investigadores opinan que esta dieta es comparable a una dieta balanceada y

completa para los seres humanos (Youdim et al., 2000). Por lo tanto se aumentó el suplemento alimenticio del AA a la dieta experimental, no fue para corregir una dieta inadecuada, sino para proveer a los sujetos con los beneficios adicionales del suplemento del AA.

La inclusión de la vitamina E (alfa-tocoferol) en la dieta base es importante. En la actualidad existe una tendencia hacia el consumo de la misma por su asociación benéfica que previene las enfermedades cardiovasculares (Stys, Stys, Nelly y Lawson, 2004; Paolisso, et al., 1995), cancerosas (Goodwin y Brodwick, 1995; Olson, 1992; Omenn, 1996), inmunológicas (Buzina-Suboticaneć, Buzina, Stavljenic y Farley, 1998; Grimble, 1997) y neurodegenerativas en los seres humanos (Meydani, 2001). Pero los efectos de este suplemento son motivo de controversias en la comunidad científica. Varios estudios epidemiológicos y clínicos apoyan la ingesta de la vitamina E y proponen que ésta retarda los efectos perjudiciales del estrés oxidativo en los mecanismos mencionados anteriormente (Meydani, 2001). Asimismo se ha observado una correlación significativa entre los resultados de pruebas de memoria y las concentraciones plasmáticas de la vitamina E en personas mayores (La Rue et al., 1997; Perkins et al., 1999). Sin embargo, en múltiples investigaciones se han obtenido efectos nocivos, inconsistentes o inconclusos sobre el uso de la vitamina E (Czernichow, Blacher y Hercber, 2004; Shekelle et al., 2004; ver revisiones Ferns y Lamb, 2004). Incluso algunos investigadores cuestionan la validez de la teoría de los radicales libres y el envejecimiento porque la ingesta de la vitamina E no repercutió en los mecanismos cerebrales inducidos por el estrés oxidativo, ni alargó la vida de los sujetos (Roth, 1993). Sano et al. (1997) en un estudio clínico demostraron que la ingesta de 2000 UI de vitamina E diariamente por dos años incrementó la autonomía de pacientes con la enfermedad de Alzheimer pero al mismo tiempo, no mejoró los procesos cognoscitivos

de los mismos. La misma inconsistencia de resultados se ha encontrado en estudios con roedores (Sumien et al., 2003; ver revisión en Meydani et al., 1998). Socia et al. (1995) encontraron que el suministro de la vitamina E a ratas adultas por un periodo de dos meses favoreció su ejecución en el laberinto de agua de Morris. Por otra parte, Takahashi (1995) encontró que dosis altas de los cuatro tipos de tocoferoles, (alfa, beta-gamma-, delta-) causan hemorragias severas en roedores.

Youdim y Joseph (2001) sugirieron que a veces los parámetros bioquímicos o conductuales utilizados no son los más adecuados para medir el efecto antioxidante de la vitamina E o de cualquier otro antioxidante. Las inconsistencias de los métodos crean problemas en la interpretación de las investigaciones. Por lo tanto, son necesarias las investigaciones con procedimientos que sigan un determinada estándar, para evaluar los efectos benéficos o nocivos de la vitamina E en los seres humanos y en otras especies.

Es importante sobresaltar que los efectos benéficos del suplemento del AA fueron adicionales a los beneficios antioxidantes de la vitamina E, ya que ambas dietas contenían la misma cantidad de la vitamina E (17.15/Kg.). La dieta control NIH-31 no fue suficiente para prevenir el aumento del nivel del NF- κ B que se observa durante el envejecimiento o el déficit en la ejecución de las tareas de memoria del reconocimiento. La adición del extracto del AA significativamente mejoró ambas variables. Estos resultados se asemejan a investigaciones previas (Youdim et al., 2000; Joseph et al., 2003) que utilizaron las mismas dietas. Estos investigadores encontraron diferencias entre los grupos de ratas adultas en parámetros del estrés oxidativo y en la prueba mnemónica del laberinto de agua de Morris. Dichos autores atribuyeron sus resultados a los beneficios que les confirió a los sujetos la ingesta del AA, particularmente su capacidad antioxidante superpuesta a la de la vitamina E.

No es sorprendente que la dieta con el suplemento del AA confirió una protección antioxidante mayor que la dieta control sólo con vitamina E. Los fitoquímicos del AA conocidos como antocianinas contienen una capacidad antioxidante más potente que la vitamina E (Esterbauer, Dieber-Rotheneder, Striegl y Waeg, 1991). Por ejemplo, estudios *in vitro* encontraron que las antocianinas ejercieron una protección antioxidante más potente en la peroxidación lipídica que la vitamina E (Narayan, Naidu, Ravishankar, Srinivas y Venkataraman, 1999). Entre otros compuestos que se encuentran en el AA, y no en la vitamina E, que reducen la acción de los radicales libres se encuentra el ácido hidroxicinámico (Youdim et al., 2002) y los flavonoides como el quercetina y el catechin (Law et al., 1999). Sin embargo, se ha comprobado numerosas veces que los antioxidantes trabajan en conjunto y se influyen entre si conjuntamente (Perkins et al., 1999; Joseph et al., 2000; Youdim y Joseph, 2001). Por ejemplo, la vitamina E y el AA son liposolubles y ambos pueden prevenir efectos deletéreos de la membrana celular. La fluidez de la membrana lipídica disminuye con la edad y se ha sugerido que la peroxidación lipídica de la misma se puede prevenir a través de distintos tipos de dietas, incluyendo la ingesta del AA (Galli et al., 2002; Joseph et al., 1998b; Yu, Suescun y Yang, 1992). También se ha encontrado que el AA (Youdim et al., 2000) y la vitamina E (Perkins et al., 1999) cuando ingieren separadamente, proveen protección antioxidante contra las enfermedades vasculares, y dicho efecto puede incidir en los procesos mnemónicos. Por lo tanto es posible que la interacción de la vitamina E y el AA (bajo los parámetros utilizados en esta investigación) produjera un efecto protector mayor debido a la suma de sus efectos antioxidantes y/o a la acción sinérgica de ambos

Numerosas investigaciones recientes (por ejemplo, Cantuti-Castelvetri, Shukitt-Hale y Joseph, 2000; Joseph et al., 2001; Youdim et al., 2001) sugieren que la

capacidad antioxidante de las frutas y verduras junto con otras propiedades, trabajan de una manera sinérgica para producir sus beneficios en el organismo. Estos efectos protectores no se observan claramente, con la ingesta exclusiva de vitaminas antioxidantes. Nuestros resultados parecen ser consistentes con los anteriores.

En la investigación presente, es importante tomar en consideración que las tareas conductuales de ambos experimentos se ejecutaron después de un periodo alimenticio diferente (12 semanas antes de la tarea de aprendizaje discriminativo y 17 semanas antes de la tarea de exploración de objetos novedoso). Específicamente, los sujetos consumieron las dietas cinco semanas adicionales antes del comienzo del segundo experimento. Investigaciones previas que utilizaron dietas con el suplemento del AA han encontrado efectos protectores después de 6 semanas (Sweeney et al., 2002), 8 semanas (Cao et al., 1999; Rabin, Shukitt-Hale, Szprengiel y Joseph, 2002; Youdim et al., 2000), 24 semanas (Joseph et al., 2003) o solamente una toma de dichos suplementos (Mazza et al., 2002). En el presente estudio, los datos conductuales de la tarea de exploración de objetos demostraron un efecto significativo importante después de 17 semanas de la ingesta de la dieta con el AA. En contraste, se encontró únicamente una tendencia lineal significativa en la tarea de aprendizaje discriminativo después de 12 semanas. Lo anterior nos sugiere que éste intervalo de la ingesta de la dieta tiene un efecto moderado en comparación del efecto observado después de 17 semanas. Los datos conductuales de ambas tareas del grupo que recibió la dieta con el AA, sugieren que el periodo de ingesta es importante para observar los efectos benéficos de la dieta con el suplemento del AA.

Experimento I: Aprendizaje discriminativo por recompensa de un ensayo cada día

Para medir el aprendizaje de esta tarea se utilizaron dos variables: número de errores (entrada a los callejones sin la recompensa) y la latencia para encontrar la

recompensa. Se esperaba una disminución en el número de errores indicando que el sujeto ha aprendido cual es el callejón que contiene la recompensa (memoria espacial) y por lo tanto evita la entrada a los callejones sin recompensa. No se encontró una diferencia significativa entre los grupos de adultos en esta variable. Se encontró una diferencia significativa entre el grupo CJ y el grupo CA, pero no entre el grupo CJ y el de EA. Los sujetos de los grupos EA y CJ disminuyeron sus errores en todos los ensayos a diferencia del grupo control de adultos que aumentó sus errores en el tercer ensayo experimental. El análisis de tendencia lineal confirmó una tendencia negativa y significativa a través de los ensayos del grupo EA y del CJ, indicando claramente que ambos grupos aprendieron la tarea conductual. En contraste, el grupo CA no demostró una tendencia lineal significativa a través de los ensayos, lo que nos sugiere que los sujetos de este grupo no aprendieron la tarea conductual o que el aprendizaje fue mínimo.

En los tres ensayos experimentales (ensayos posteriores al ensayo muestra) se esperaba una disminución del número de errores en base a los realizados durante el ensayo, indicando que los sujetos aprendieron la regla (la recompensa se encuentra en el callejón con la rejilla ascendiente y hacia la derecha de la caja de iniciación) y por lo tanto la diferencia entre el ensayo muestra y los ensayos subsecuentes aumenta conforme realizan, en comparación al ensayo muestra, un número menor de errores. A pesar de que los análisis estadísticos no mostraron una diferencia entre los tres grupos, el grupo CJ y el grupo EA, mostraron una reducción constante en el número de errores del ensayo muestra (figura 8), a diferencia del grupo CA que no demostró una disminución continua. Durante el tercer ensayo experimental más errores que en los ensayos anteriores, indicando que los sujetos en este grupo no formaron un trazo mnémico o éste era muy débil. Este punto es importante, ya que se ha demostrado que

la repetición de las tareas de memoria espacial ayuda a las ratas en la ejecución de los ensayos subsecuentes (Beatty, Bierley y Bard, 1985; Bierley, Rixen, Troster y Beatty, 1986; Caprioli, Ghirardi, Giuliani, Ramacci y Angelucci, 1991; Pitsikas, Biagini y Algieri, 1991). En experimentos previos con el paradigma de aprendizaje discriminativo, se observó que las ratas adultas mayores tenían una gran dificultad en la ejecución de esta tarea en los ensayos experimentales, al menos que recibieran tratamientos farmacológicos (Malin et al., 1993; Malin et al., 2001). Nuestros resultados sugieren que las ratas adultas mayores del grupo experimental se beneficiaron de la exposición repetida al laberinto, es decir aprendieron la regla para encontrar al recompensa (memoria de referencia) como lo indican la tendencia lineal significativa.

Se puede proponer que no se alcanzó una diferencia significativa en las variables de número de errores entre los grupos de adultos debido a la gran variabilidad observada y lo cual se aprecia claramente en el tercer ensayo experimental (figura 8). Estos resultados no son sorprendentes, ya que son el producto de la misma naturaleza del procedimiento de este paradigma y del proceso normal del envejecimiento. Al explorar libremente el laberinto (durante la habituación y el ensayo muestra), cada sujeto desarrolla una experiencia distinta en cuanto a la secuencia de la tarea y del patrón mnemónico del laberinto. Algunas ratas realizan un número mayor de entradas a los callejones sin recompensas, mientras que otras encuentran el callejón de la recompensa después de muy pocos errores. Los diferentes patrones del ensayo muestra crean una gran diversidad en la ejecución de los ensayos experimentales ulteriores.

Durante el envejecimiento normal se ha demostrado que entre los miembros de la misma especie existe una gran variabilidad en las funciones mnémicas. Este fenómeno se observa en los seres humanos (Albert, 2003) en los primates no humanos (Zola-Morgan y Squire, 1985) y en los roedores (Gallagher et al., 1993). Por ejemplo,

Albert (2003) demostró una variabilidad en la ejecución en una tarea de recuerdo libre en grupo de personas mayores. En un estudio realizado por Gallagher et al., (1993) con roedores jóvenes y ancianos con el laberinto de agua de Morris, encontró que en general el grupo de ancianos obtuvo un promedio mayor en la distancia para alcanzar la plataforma, pero dentro de este grupo hubo roedores ancianos que ejecutaron la tarea a la par de los sujetos jóvenes. Los resultados también nos muestran que los sujetos en los grupos EA y CJ mantuvieron el mismo patrón de ejecución de la tarea conductual de aprendizaje discriminativo, una disminución constante del número de errores y en la latencia para encontrar la recompensa, en contraste con los sujetos del grupo CA cuyo patrón de ejecución fue diferente. Lo anterior sugiere que los sujetos de los grupos CJ y EA aprendieron la tarea y recordaron el lugar de la recompensa, lo cual es indicativo que los sujetos de ambos grupos desarrollaron un trazo mnémico similar, a pesar de la diferencia de edades. Es posible que si se hubieran realizado más ensayos experimentales, el patrón de disminución de errores observado en los grupos EA y CJ llegara a mostrar en ensayos posteriores diferencias significativas entre los grupos de ratas adultas mayores.

La ejecución de la tarea de forma similar de los grupos EA y CJ plantea la posibilidad de que la ingesta de la dieta experimental incidió modestamente en los mecanismos cerebrales que subyacen la memoria espacial y memoria de referencia utilizados en esta tarea.

La literatura previa ha mostrado que los déficits motores en ratas adultas mayores son difíciles de revertir (Shukitt-Hale et al., 1998). Por lo tanto, se esperaba que las ratas jóvenes realicen la tarea con mayor rapidez que las adultas mayores. De acuerdo a lo anterior, se utilizó la variable de latencia, la cual indica cuanto tiempo se tardaron los sujetos en alcanzar la recompensa. Esta medida es más representativa de la

memoria de los adultos mayores, en lugar de medir la velocidad de los sujetos, porque éstos aunque quieran alcanzar la recompensa rápidamente, lo más seguro es que sus habilidades motoras no se los permitan (especialmente comparándolos con los sujetos jóvenes). Sin embargo, los datos conductuales mostraron que desde el ensayo muestra, los sujetos del grupo EA alcanzaron la recompensa en un tiempo menor que los adultos del grupo control.

Asimismo, los resultados de la latencia para alcanzar recompensa, mostraron una gran variabilidad, al igual que el número de errores, lo cual pudo haber prevenido alcanzar una diferencia significativa entre los grupos. En contraste, el análisis de tendencia lineal en función de los ensayos reveló que las ratas en el grupo EA alcanzó la recompensa en un tiempo significativamente menor que el grupo CA. Lo que sugiere que las ratas del grupo EA aprendieron la regla y alcanzaron la recompensa en un tiempo menor.

En conclusión, las diferencias entre el grupo CA y el grupo CJ confirman la sensibilidad del paradigma de aprendizaje discriminativo durante el envejecimiento, medida por precisión (sin errores) y latencia. Estas diferencias son consistentes con las investigaciones anteriores que utilizaron esta tarea en las que se demostró un déficit en ratas de la cepa Sprague-Dawley de 24 y 18 meses de edad (Malin et al., 1990; Malin et al., 1993). Los resultados conductuales de este paradigma también dan un apoyo marginal a la hipótesis de que la dieta enriquecida con el suplemento del AA disminuye los efectos nocivos del envejecimiento.

Experimento II: Exploración de Objetos Novedosos

El tiempo de exploración cercana de los estímulos durante el ensayo de familiarización afecta su reconocimiento en el ensayo experimental (Ennaceur y

Delacour, 1988), los sujetos necesitan haber formado una huella de memoria del ítem familiar lo suficientemente clara para poder reconocerlo (Parkin y Walter, 1992). Por lo tanto era necesario establecer un tiempo mínimo de exploración durante el ensayo de familiarización.

En esta tarea se encontró una diferencia significativa entre los grupos cuando se utilizó un intervalo de una hora y no con el de 30 s. En este último, todos los grupos realizaron la tarea de una manera similar y el porcentaje de tiempo de exploración del objeto novedoso fue mayor al 50% lo cual indica que el porcentaje de la exploración de los objetos no fue únicamente resultado del azar. Aparentemente los sujetos de todos los grupos reconocieron los objetos novedosos después del intervalo de 30 s, lo que indica que las ratas de 19 meses de edad de la cepa F344 no han perdido las capacidades visuales o motoras necesarias para reconocer dichos ítems. Estos resultados concuerdan con las investigaciones análogas realizadas con ratas de la misma cepa de 21-24 meses de edad, las cuales reconocieron los objetos novedosos después de tres minutos del ensayo muestra (Shukitt-Hale, Casadesus, Cantuti-Castelvetri y Joseph, 2001). De acuerdo con la percepción visual intacta de las ratas de los grupos de adultos, los resultados del ensayo experimental realizado con una hora de intervalo sugieren que las ratas del grupo control adulto mostraron un déficit mnemónico y no simplemente un problema de percepción.

Una medida usada frecuentemente para evaluar la formación del trazo mnemónico esta basada en la tendencia innata de los sujetos de investigar los estímulos novedosos en lugar de los que hayan visto anteriormente (Eichenbaum, 2002; Squire et al., 2002). Los investigadores han utilizado las tareas de reconocimiento con roedores como medida de la memoria porque la dificultad para realizarlas aumenta cuando se incrementa el tiempo entre el ensayo muestra y el ensayo experimental, por lo que se

piensa que la diferencia en la ejecución se debe a un déficit mnemónico (Ennaceur y Delacour, 1988; Clark et al., 2000; Squire et al., 2002). Consistente con lo anterior, nuestros aportan información temporal sobre el proceso de la memoria del reconocimiento, ya que los resultados varían de acuerdo a los diferentes intervalos entre los ensayos muestra y prueba.

La preferencia del grupo control de jóvenes fue del $64\% \pm 5\%$ ($M \pm SEM$) en el ensayo con una hora de intervalo y estos resultados son comparables con los de Clark, Zola y Squire (2000), quienes utilizaron la misma tarea con ratas de la cepa Long-Evans de 3 meses de edad, y reportaron una preferencia del 68.3% por el objeto novedoso con el mismo intervalo. La diferencia significativa de los resultados entre el grupo CJ y el grupo CA sugiere que el paradigma de exploración de objetos novedosos es sensible a los efectos del envejecimiento sobre los procesos mnemónicos en roedores. Los hallazgos de este estudio concuerdan con los resultados de Dellsu et al. (1992), quienes mostraron que las ratas de 18 meses de edad se desempeñaron más pobremente que las ratas control de 2 meses de edad en una tarea de reconocimiento espacial en un laberinto en forma de Y. Estos autores también utilizaron objetos familiares y novedosos para determinar la preferencia de las ratas. Sin embargo, la medida de la memoria de reconocimiento fue basada en la primera visita que realizaron a los callejones, y no en el porcentaje de la exploración cercana de los objetos. Shukitt-Hale et al., (2001), quien mostró un déficit en ratas de 22-24 meses de edad en una tarea de reconocimiento de tipo espacial cuando los objetos previamente vistos por las ratas eran movidos de su lugar original. Estos autores no reportaron un déficit en la exploración de objetos novedosos en estas mismas ratas. Sin embargo, las ratas fueron expuestas al objeto familiar varias veces por varios minutos cada vez, antes de ser expuestas al objeto novedoso. En nuestra investigación, a diferencia de los autores anteriores, los sujetos

fueron expuestos únicamente una vez y por un máximo tiempo de exploración cercana de 30 s a los objetos familiares y la medida de la memoria fue basada en el porcentaje de exploración, ambas variables nos dan una medida mas robusta acerca de la memoria del reconocimiento. Por lo tanto, nuestros resultados aportan datos diferentes acerca del envejecimiento y la memoria del reconocimiento en roedores. Esta aportación se suma al extenso banco de información existente sobre el envejecimiento de los roedores pertenecientes a esta cepa (Shukitt-Hale et al., 1998).

Análisis Bioquímicos

Los resultados bioquímicos sólo se analizaron en conjunto con los resultados obtenidos en la tarea exploración de objetos novedosos, ya que las muestras bioquímicas se obtuvieron al término de los ensayos conductuales de esta tarea y un tiempo considerable después del primer experimento (cinco semanas).

De acuerdo a nuestra hipótesis en el estudio presente el índice total de expresión del NF- κ B p65 se incrementó en todas las regiones (significativamente en 4 de las 5 regiones) en el grupo CA comparado con el grupo CJ. Las ratas que se mantuvieron con la dieta del AA mostraron niveles del NF- κ B significativamente más bajos en 4 de las 5 regiones que las ratas del grupo CA. La dieta control no fue suficiente para mejorar el estrés neuronal que se observa durante el envejecimiento. De hecho, las ratas en el grupo EA no mostraron niveles del NF- κ B significativamente diferentes a los del grupo CJ en 4 de las 5 regiones analizadas. El índice total de expresión del NF- κ B que se observó en los sujetos de grupo experimental adulto sugiere que la dieta con el suplemento del AA tuvo un efecto general importante en el encéfalo. Al mismo tiempo se observó que los efectos de los fitoquímicos actuaron de manera selectiva en las distintas regiones cerebrales, lo cual ya ha sido reportado en numerosas investigaciones

que utilizaron dietas con suplementos alimenticios (Joseph et al 1998; Youdim et al., 2000).

De acuerdo a la hipótesis esperada se sugiere que la diferencia del índice total de la expresión de la proteína NF- κ B p65 entre el grupo CA y el grupo CJ (que recibieron la misma dieta), es un efecto del envejecimiento. Estos resultados apoyan investigaciones previas que han demostrado que el nivel del NF- κ B se eleva en función de la edad (Kaufman et al., 2002; Toliver-Kinsky et al., 1997; Paolisso et al., 1998). Sin embargo, el grupo EA mostró un nivel de expresión del NF- κ B p65 significativamente menor que el grupo control de adultos. Consistente con nuestra hipótesis se sugiere que la dieta con el AA tuvo un efecto importante en el nivel de expresión del NF- κ B p65 en el grupo experimental.

Considerando que la proteína NF- κ B es un indicador por excelencia del estado oxidativo de las neuronas (Schreck, et al., 1992, Li y Karin, 1999; Mattson et al., 2000), se propone que el mecanismo de acción de los beneficios observados en el grupo adulto que recibió la dieta con el AA, es el efecto antioxidante del arándano azul. Sin embargo, se debe tomar en consideración que el AA también contiene propiedades antiinflamatorias que pueden también favorecer los mecanismos durante el envejecimiento (Galli et al., 2002; Lau, Shukitt-Hale y Joseph, 2005). Numerosas investigaciones han demostrado que el EO y los procesos inflamatorios suceden conjuntamente y que el cerebro senil es susceptible a ambos (Youdim y Joseph, 2001; Casadesus et al., 2003; Roy et al., 2002), Los análisis bioquímicos utilizados en este proyecto no nos permiten separar los efectos antioxidante y antiinflamatorios del AA ya que entre los procesos que inducen la expresión del NF- κ B durante el envejecimiento se encuentran el EO (Schreck, et al., 1992, Li y Karin, 1999; Mattson et al., 2000), y la producción de citoquinas inflamatorias (Baeuerle y Henkel, 1994; Li y Stark 2002;

Mattson et al., 2000; Sizemore et al., 1999). En concordancia con los puntos anteriores se sugiere que los resultados benéficos que se observaron en el nivel de la expresión del NFκB se deben tanto a las propiedades antioxidantes (Prior et al., 1998) como a las antiinflamatorias del AA (Galli et al., 2002; Lau, Shukitt-Hale y Joseph, 2005). Youdim y Joseph (2001) plantean que la capacidad antioxidante de las frutas y verduras es solamente una de las propiedades protectoras de estos alimentos.

Se puede argumentar que la disminución general del nivel del NF-κB en el grupo EA es el resultado de una condición estable y general en las neuronas, en comparación del grupo CA. Ciertos investigadores (Youdim y Joseph, 2002) sugieren que la ingesta diaria de frutas y verduras crea un condicionamiento en las células para resistir el deterioro típico del envejecimiento y reaccionar a él con defensas adecuadas. Se ha mostrado que varios mecanismos celulares que ocurren durante el envejecimiento mejoran con la ingesta de dietas con el suplemento del AA (Lau, Shukitt-Hale y Joseph, 2005), por ejemplo, el nivel de la dopamina en las células del estriado (Joseph et al., 1999; Youdim et al., 2000), la actividad de las células Purkinje (Bickford et al., 2000), la pérdida de fluidez de la membrana celular (Youdim et al., 2000), comunicación neuronal (Joseph et al., 2003) y neurogénesis en el hipocampo (Casadesus et al., 2004). El mantenimiento estable de estos parámetros (entre otros) ayuda a resistir los efectos crónicos del estrés celular, como el EO y los procesos inflamatorios. Por lo tanto, se sugiere que la dieta con el AA ayudo a conservar un estado general de condicionamiento celular adecuado en los sujetos del grupo EA, y lo cual resultó en una disminución del nivel de expresión del NF-κB. Se ha sugerido que el nivel del NF-κB se eleva para poder responder a los efectos crónicos del EO (Toliver-Kinsky et al., 2002).

En el presente estudio, se propone que las neuronas en las regiones estudiadas de los sujetos del grupo control de adultos, se encontraban en un estado crónico de EO e inflamación y en respuesta al mismo, el nivel del NFκB p65 se incrementó significativamente, en todas las regiones de dichos sujetos en comparación con el grupo CJ y en cuatro de dichas regiones, en comparación con el grupo EA. La dieta control no fue suficiente para mejorar el estrés neuronal y por el contrario, el nivel de expresión del NFκB p65 que se observó en los sujetos del grupo experimental fue el resultado del condicionamiento de las células al recibir la dieta NIH-31 AA durante 17 semanas.

Existe un efecto heterogéneo del EO a través de las diferentes estructuras cerebrales. Por ejemplo, Zhang et al. (1993) encontraron en jerbos de 15, 20 y 24 meses un aumento progresivo en los indicadores del estrés oxidativo radical de hidróxilo y glutatión oxidado, en el hipocampo, en la corteza cerebral y en el estriado en función de la edad. Asimismo, estos autores mostraron diferencias regionales no solamente en los niveles de EO, sino también en la expresión de antioxidantes en dichas regiones. Dichos investigadores sugirieron que el incremento específico del EO en estas regiones estimulaba la acumulación de los antioxidantes en estas áreas. El hipocampo fue el área que demostró el nivel más alto de las vitaminas alfa-tocoferol y del ácido ascórbico; mientras que el estriado, el nivel más alto del glutatión. Los resultados del presente estudio apoyan lo anterior y muestran que regiones como el hipocampo, la corteza frontal y el estriado son vulnerables al estrés oxidativo.

Se encontraron distintos niveles de expresión de la proteína NF-κB p65 en las regiones analizadas. La región que mostró el mayor nivel de expresión de dicha proteína en el grupo CA, la secuencia de mayor a menor nivel de expresión fue cerebelo, corteza frontal, cerebro basal anterior, estriado e hipocampo. Las regiones que expresaron mayor expresión en el grupo experimental de adultos fue el cerebro basal anterior,

seguido por el hipocampo, el estriado y el cerebelo; mientras que el menor nivel se encontró en la corteza frontal. Mientras que el patrón de secuencia de expresión del NF- κ B p65 en el grupo control de jóvenes fue diferente a ambos grupos de adultos, de mayor a menor: estriado, corteza frontal, hipocampo, cerebro basal anterior y cerebelo. Los datos anteriores nos sugieren la interacción de la dieta con la edad influyó en el nivel de expresión del NF- κ B p65, produciendo un patrón diferente en los tres grupos.

Algunos investigadores han sugerido que el hipocampo es la estructura más crítica para la ejecución de tareas de novedad en diferentes especies: humanos (Squire et al., 1993; McKee y Squire, 1993), primates (Zola-Morgan, Squire, Rempel, Clower y Amaral, 1992) y roedores (Clark et al., 2000). En concordancia con estas investigaciones, nuestros resultados muestran una correlación negativa y significativa entre el nivel de expresión del NF κ B p65 y los porcentajes de exploración en el ensayo experimental realizado una hora después del ensayo muestra. A pesar de no ser una correlación robusta sino una correlación tenue y marginalmente significativa, esta correlación apoya nuestra hipótesis y confirma los resultados de Clark et al. (2000) que el hipocampo tiene un papel crítico en la ejecución de esta tarea.

Se ha sugerido que el hipocampo es extremadamente sensible al EO (Benzi y Moretti, 1995; Jackson et al., 1995; Williams, 1993). Investigadores también han demostrado un deterioro prematuro de esta región, en comparación a otras regiones (Rodríguez-Capote, et al., 1998). El hipocampo posee una alta sensibilidad a las propiedades protectoras del AA. Por ejemplo, Sweeney et al. (2002) mostraron que la ingesta del suplemento del AA (14.3%) por seis semanas previno un ataque isquémico cerebral inducido en roedores, y la protección más relevante se observó selectivamente en las regiones CA1 y CA2 del hipocampo. Consistente con lo anterior, nuestros resultados sugieren que los compuestos del AA actuaron con mayor potencia y

probablemente de una manera preventiva, en esta región cerebral en los sujetos del grupo EA comparado con los del grupo CA.

En la presente investigación se puede apreciar un efecto selectivo de la dieta experimental del AA en la corteza frontal, ya que comparando todas las regiones del grupo adulto experimental, esta área mostró el nivel más bajo de expresión del NFκB p65. Es posible que la protección del AA en esta región beneficiara la integridad del tejido neuronal. Subsecuentemente, la capacidad antioxidante del AA previno un estado crónico del EO, medido por el nivel del NF-κB. Se puede sugerir que la intervención del AA promueve la conservación de las funciones cognitivas. La corteza frontal se ha considerado una estructura importante en la memoria del reconocimiento (Miskin y Murray, 1994). Por ejemplo, en las tareas de reconocimiento se necesita de la memoria de trabajo para su ejecución (Ennecaeur y Delacour, 1988) la cual depende de la integridad de los lóbulos frontales. Se ha demostrado que las lesiones de la corteza prefrontal alteran la memoria de trabajo (Baddeley et al., 1974; Baddeley et al., 1988). Sin embargo, en la presente investigación, en contraste a la correlación del hipocampo, los niveles del NFκB p65 en la corteza frontal no se correlacionaron significativamente con los ensayos conductuales y únicamente se observó una tendencia mínima en la dirección esperada. Este resultado no es sorprendente. Existen numerosas investigaciones que han mostrado que aparentemente no existe una correlación robusta a través de las pruebas conductuales que miden las funciones de los lóbulos frontales (por ejemplo la memoria de trabajo) y el lóbulo temporal. Por ejemplo, Gallagher y Rapp (1997), en una revisión de la literatura mostraron que cuando déficits cognoscitivos atribuibles ya sea al lóbulo frontal o al temporal concurren en el mismo sujeto, no existe una correlación significativa entre dichos déficits. Es importante considerar que aparentemente la integridad de la corteza frontal es importante para las

tareas de memoria de reconocimiento, pero se sugiere que los resultados de la presente investigación apoyan la aseveración propuesta anteriormente (Clark et al., 2000) que la estructura crítica para la memoria de reconocimiento es el hipocampo.

Varios estudios (Joseph et al., 1999; Youdim et al., 2000; Joseph et al., 2003) han demostrado que la alimentación con un suplemento del AA produjo un incremento importante en la transmisión sináptica de las células del estriado (medida por la liberación de la dopamina). Este hallazgo ha sido constante a través de varias investigaciones (Joseph et al. 1999; Joseph et al., 2003; Youdim et al.2000). Asimismo, la literatura reciente ha sugerido que el estriado está involucrado de una manera importante en los procesos mnemónicos (Devan et al, 1996; Joseph et al., 2003; Lazaris, Cassel, Stemmelin, Cassel y Kelche, 2003; McDonald y White, 1994; Nenadic, Gaser, Volz, Rammsayer, Hager y Sauer, 2003; Packard y Knowlton, 2002).

Curiosamente, en nuestra investigación, el estriado fue la única región que no mostró una diferencia significativa en la expresión del NF- κ B p65 entre los grupos que recibieron la misma dieta control, CJ y CA. Este fue un resultado inesperado. Aunque en el grupo CJ se encontró un nivel de expresión menor, no es estadísticamente diferente al grupo CA. No existe una variabilidad excesiva que pudiera explicar este resultado. Estos hallazgos no apoyan nuestra hipótesis, ya que se esperaba encontrar una diferencia significativa entre los grupos CJ y el grupo CA en todas las regiones. Se espera que investigaciones futuras ayuden a clarificar este resultado.

En el estriado, el grupo EA tuvo el nivel menor de NF- κ B p65 de todos los grupos. Lo que nos sugiere que a pesar de que el estriado es particularmente sensible a los efectos de los antioxidantes exógenos (Joseph et al., 1999, Joseph et al, 1998, Joseph et al., 2003; Youdim et al., 2000), la vitamina E por sí sola no fue suficiente para incidir en los efectos del envejecimiento sobre el estriado. Por lo que es posible que esta región

es sensible a un nivel más alto de antioxidantes, por ejemplo, a la suma de la vitamina E y el AA, o al efecto sinérgico de los compuestos del AA.

El cerebro basal anterior fue la única región en la que no se encontró una diferencia significativa entre los grupos de adultos. Sin embargo, si se observó el mismo patrón de expresión del NF- κ B p65 que en las otras regiones. En comparación con las demás regiones, los tres grupos muestran en esta región particularmente, la mayor variabilidad de expresión del NF- κ B. Lo cual pudo influir en los análisis estadísticos.

Se ha demostrado que el cerebelo es altamente sensible al estrés oxidativo y a los antioxidantes exógenos (Bickford et al., 2000). La investigación presente concuerda con estos resultados, ya que de todas las regiones analizadas el efecto más robusto se encontró en el cerebelo. En concordancia con las demás regiones, el grupo CA mostró el nivel de expresión mayor del NF- κ B en comparación al nivel de los otros dos grupos. Dicho nivel fue aproximadamente el doble del que se observó en el grupo EA. Los resultados anteriores apoyan las investigaciones previas (Bickford et al., 1999; Bickford et al.; Joseph et al., 1999; Kaufmann et al., 2001; Youdim et al., 2000) y sugieren que el cerebelo es muy vulnerable a los efectos del estrés oxidativo durante el envejecimiento, medidos por el nivel del NF κ B.

Nuestros los resultados demuestran que el cerebelo responde altamente a las defensas adquiridas a través de la dieta NIH-31 AA. Investigaciones anteriores apoyan esta aseveración. Por ejemplo, Youdim et al. (2000) encontraron un aumento significativo en la fluidez de la membrana neuronal en el cerebelo del grupo experimental que recibió la dieta experimental NIH-31 AA comparado con el grupo control. Más relevante fue el hecho de que este aumento no se encontró en las neuronas de la corteza cerebral. Estos hallazgos y el hecho de que en esta investigación se utilizaron las mismas dietas que Youdim et al. (2000), permiten plantear que el AA

incide de forma particular en la estructura del cerebelo en comparación con las otras regiones estudiadas, por lo que será interesante que investigaciones futuras ayuden a esclarecer los mecanismos que producen este efecto selectivo.

Los grupos de adultos mostraron una correlación moderada y en la dirección esperada entre el nivel de expresión del NF- κ B en el cerebelo y el porcentaje de exploración del objeto novedoso en el ensayo experimental con el intervalo de una hora. De todas las regiones analizadas, el cerebelo presentó la correlación más robusta. Esto sugiere que dentro de las funciones reguladoras del cerebelo se encuentran algunas que son importantes para los procesos involucrados en la memoria de reconocimiento, medida por la tarea de exploración de objetos novedosos. A diferencia de esta última aseveración, la literatura actual sobre la disociación de los procesos mnemónicos no considera el cerebelo como una estructura involucrada en la memoria declarativa (McDonald y White, 1993; Packard y McGaugh, 1996; Squire et al., 2003). Sin embargo datos de investigaciones recientes también proponen que el cerebelo se encuentra involucrado en los procesos de la memoria declarativa. Weis et al. (2004) realizó un estudio muy reciente con resonancia magnética funcional que demostraron la activación del cerebelo durante una tarea de memoria de reconocimiento (identificar estímulos nuevos y viejos). Esta tarea es análoga a la tarea utilizada en esta investigación, ya que involucra el reconocimiento de estímulos previamente vistos y de estímulos novedosos. Investigaciones previas (Leiner et al., 1986; Leiner et al., 1989; Schmahmann, 1991, 2003) han mostrado las interconexiones estrechas entre el cerebelo y diversas regiones de la corteza cerebral, llevando a la conclusión de que el cerebelo está involucrado en la regulación de los procesos cognoscitivos complejos.

RESULTADOS

Peso de los sujetos y consumo de la dieta:

El promedio del aumento de peso ($M \pm EE$) de los sujetos en cada grupo fue: grupo control de jóvenes 88.6 ± 14.6 g, grupo control de adultos 14.4 ± 4.5 g, grupo experimental de adultos 11.7 ± 3.2 g. El ANOVA mostró diferencias significativas entre los grupos ($F(2,32) = 121.7, p < 0.001$). El análisis *post-hoc* de Fisher reveló que el grupo control de jóvenes aumentó de peso significativamente en comparación con los dos grupos de adultos ($p < 0.001$). Entre los dos grupos de adultos no se encontró una diferencia significativa ($p = 0.63$).

El consumo medio semanal de los sujetos del grupo experimental de adultos fue de 394 mg/día de la dieta con arándano azul (AA), cada sujeto en este grupo consumió, aproximadamente, el equivalente a 4.4 g/día de AA (Apéndice A). La ingesta semanal de la dieta ($M \pm EE$) de cada grupo fue: grupo control de jóvenes 130.3 ± 2.3 g, grupo control de adultos 147.2 ± 1.7 g, grupo experimental de adultos 137.8 ± 3.0 g. El ANOVA mostró una diferencia significativa entre los grupos ($F(2,32) = 11.78, p < 0.001$).

El análisis *post-hoc* reveló que el consumo semanal del grupo control de adultos fue significativamente mayor en comparación con el grupo control de jóvenes ($p < 0.001$) y el grupo experimental de adultos ($p = 0.011$). El consumo semanal del grupo experimental de adultos fue significativamente mayor que el grupo control de jóvenes ($p = 0.035$). El porcentaje de exploración del objeto novedoso de ambos grupos de ratas adultas mostró una correlación mínima con la ganancia de peso ($r = 0.17, p > .05$) y el consumo del alimento ($r = 0.22, p > .05$).

Experimento I. Aprendizaje discriminativo por recompensa de un ensayo cada día.

Durante el ensayo muestra 8 sujetos no realizaron errores por lo que se eliminaron del análisis estadístico. El número de sujetos que se incluyeron en cada grupo fue: grupo CJ n =10, grupo CA n =9, grupo EA n =9.

En la variable número de errores (Tabla 3 y Figura 8), el ANOVA no reveló diferencias significativas entre los grupos en el ensayo muestra ($F(2,28) = 2.971$, $p = 0.07$). El ANOVA de medidas repetidas no reveló diferencias en los errores entre los tres ensayos experimentales ($F(2, 52) = .371$, $p = 0.69$), ni en la interacción de ensayos x grupo ($F(2, 26) = .362$, $p = 0.62$). Sin embargo si se encontró una diferencia entre los grupos en el promedio de los tres ensayos experimentales ($F(2, 26) = 3.467$, $p = 0.046$). y la prueba de comparación de pares reveló una diferencia significativa únicamente entre el grupo CJ y el grupo CA ($p = .016$). No hubo diferencia entre el grupo CJ y el grupo EA ($p = 0.089$), ni entre los grupos de CA y EA ($p = 0.475$).

El grupo CJ demostró aprendizaje durante el curso de este experimento, como lo indican la tendencia lineal negativa y significativa que se demostró en los ensayos incluyendo el ensayo muestra y los experimentales, ($F(1,36) = 9.05$, $p = 0.005$). Los sujetos del grupo de adultos mayores que recibieron la dieta del AA también demostró aprendizaje como lo indica la tendencia lineal negativa y significativa de los ensayos ($F(1,32) = 4.62$, $p = 0.039$). En contraste el grupo CA no mostró una tendencia lineal significativa ($F(1,36) = .104$, $p = 0.630$).

Tabla 3. Número de errores ($M \pm EE$) en los tres ensayos experimentales (24 hrs., 48 hrs. y 72 hrs. después del ensayo muestra).

ENSAYOS	GRUPOS		
	Control de Jóvenes	Control de Adultos Mayores	Experimental de Adultos Mayores
Ensayo Muestra	2.1 ± 0.378	3.3 ± 0.448	3.8 ± 0.730
Ensayo Experimental 1	1.1 ± 0.481	2.5 ± 0.687	2.7 ± 1.37
Ensayo Experimental 2	0.8 ± 0.200	2.1 ± 0.752	2.0 ± 0.600
Ensayo Experimental 3	0.6 ± 0.305	3.0 ± 1.42	1.3 ± 0.552

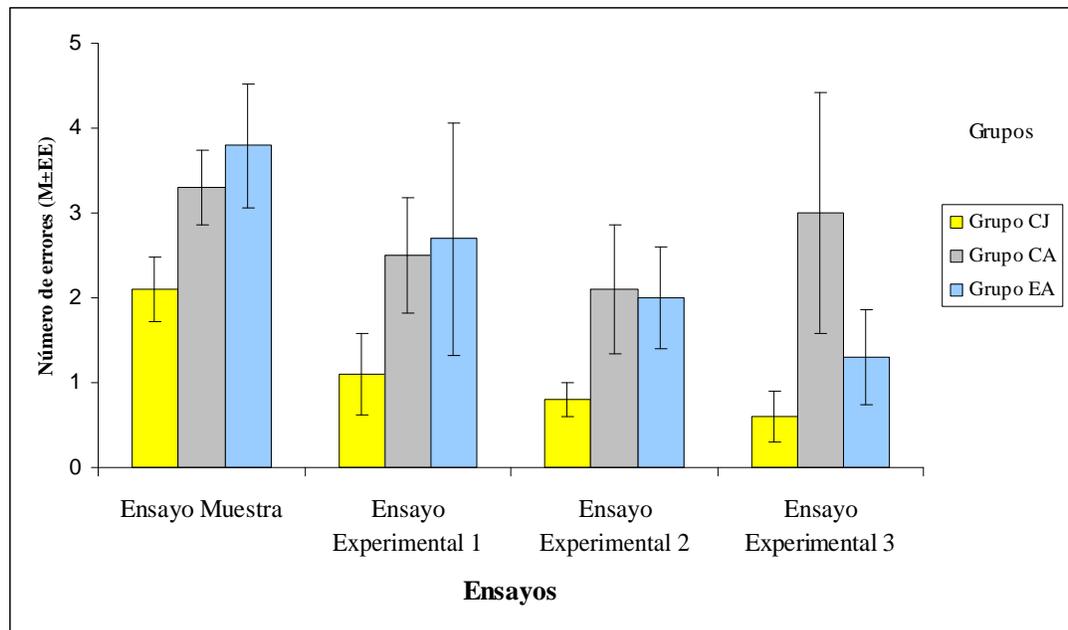


Figura 8. Número de errores (entrada a los callejones sin recompensa), en el ensayo muestra y en cada uno de los ensayos experimentales de los tres grupos (24 hrs., 48 hrs. y 72 hrs. después del ensayo muestra). CJ = grupo control de jóvenes, CA = grupo control de adultos mayores y EA = grupo experimental de adultos mayores.

El ANOVA de medidas repetidas de la latencia (segundos para alcanzar la recompensa) mostró que no hubo una diferencia significativa entre los grupos durante el ensayo muestra ($F(2,28) = 2.299, p = 0.120$). No hubo diferencia significativa entre los tres ensayos experimentales ($F(2,52) = 2.809, p = 0.069$), ni en la interacción de ensayos por grupo ($F(2,26) = 0.073, p = 0.636$). Asimismo no se encontró una diferencia entre los grupos ($F(2,26) = 1.199, p = 0.318$).

El análisis lineal de la latencia para encontrar la recompensa en base a los ensayos (incluyendo el ensayo muestra y los tres ensayos experimentales) no encontró una tendencia significativa del grupo control de adultos mayores, lo que sugiere que la latencia de este grupo no se mejoró a través de los ensayos. En contraste, se encontró una tendencia negativa y significativa en la latencia para encontrar la recompensa del grupo de adultos mayores experimental y el grupo control de jóvenes.

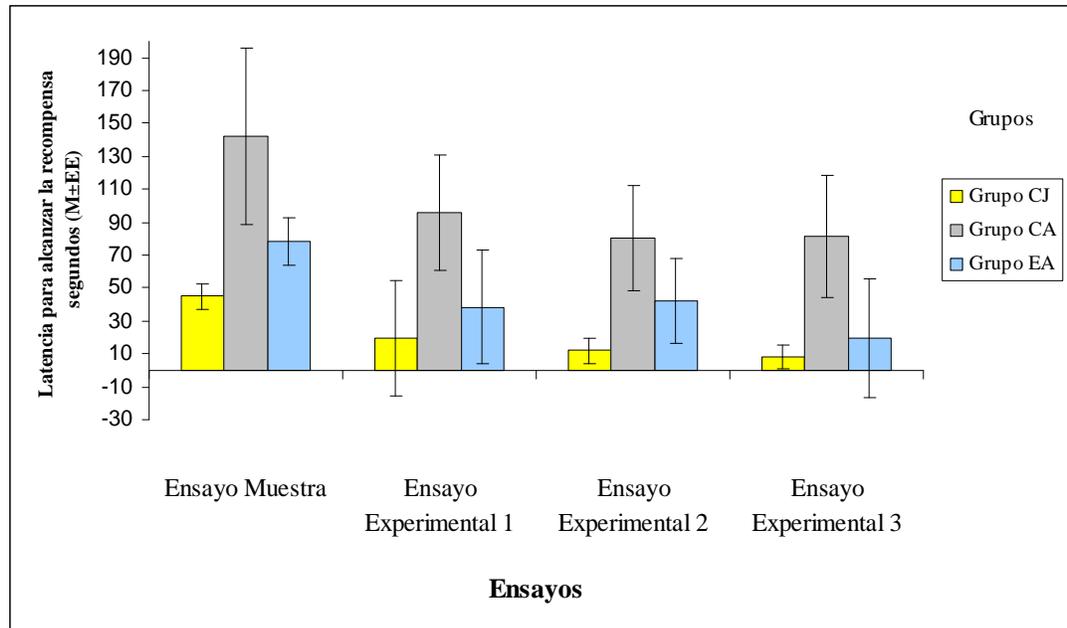


Figura 9. Latencia para alcanzar la recompensa (segundos) durante el ensayo muestra y los tres ensayos experimentales (24 hrs., 48 hrs. y 72 hrs. después del ensayo muestra). No hubo diferencias significativas entre los grupos. El análisis de tendencia lineal reveló una tendencia negativa y significativa del grupo experimental de adultos mayores (EA) y el grupo control de jóvenes (CJ) en la latencia. En contraste esta tendencia no fue significativa para el grupo control de adultos mayores (CA).

Tabla 4. Latencia para encontrar la recompensa ($M \pm EE$) en el ensayo muestra y en los tres ensayos experimentales (24 hrs., 48 hrs. y 72 hrs. después del ensayo muestra).

ENSAYOS	GRUPOS		
	Control de Jóvenes	Control de Adultos Mayores	Experimental de Adultos Mayores
Ensayo Muestra	44.8 \pm 7.07	142.3 \pm 53.47	78.1 \pm 14.55
Ensayo Experimental 1	19.5 \pm 34.79	95.9 \pm 35.34	38.5 \pm 34.28
Ensayo Experimental 2	11.7 \pm 8	80.8 \pm 32	42.0 \pm 26.1
Ensayo Experimental 3	8.0 \pm 7	81.0 \pm 37.25	19.7 \pm 36.13

Experimento II: Exploración de objetos novedosos

Se eliminaron 5 sujetos de los análisis estadísticos por los siguientes motivos: 1 sujeto del grupo control de adultos falleció; 2 sujetos del grupo control de adultos y 2 sujetos del grupo experimental de adultos no alcanzaron el criterio mínimo de exploración durante el ensayo muestra (12 s). El número final de sujetos que se incluyeron en cada grupo fue: grupo control de jóvenes $n = 12$, grupo control de adultos $n = 9$, grupo experimental de adultos $n = 10$. En el ensayo experimental 1 hora después del ensayo muestra todas las ratas alcanzaron este criterio.

La figura 10 muestra el porcentaje de exploración de los tres grupos durante los dos ensayos experimentales: 30 s (lado izquierdo) y una hora (lado derecho). Durante el ensayo experimental de 30 s el porcentaje de exploración (porcentaje en segundos) de cada grupo fue: grupo control de jóvenes, $75 \pm 5.8\%$ ($M \pm EE$); grupo control de adultos, $64 \pm 6.7\%$ ($M \pm EE$); y grupo experimental de adultos, $66 \pm 6.3\%$ ($M \pm EE$). Durante el ensayo experimental-1 hora el porcentaje de exploración de cada grupo fue:

grupo control de jóvenes, $64 \pm 4.6\%$ ($M \pm EE$); grupo control de adultos, $44 \pm 5.5\%$ ($M \pm EE$); y grupo experimental de adultos, $69 \pm 5.2\%$ ($M \pm EE$).

Los resultados de la prueba t de student para muestras relacionadas revelaron que la comparación del porcentaje de exploración fue significativamente mayor que el nivel de casualidad (50%) para los tres grupos durante el ensayo experimental 30 s: grupo control de jóvenes, $p < .01$, grupo control de adultos y grupo experimental de adultos, $p < .05$. Sin embargo, en el ensayo experimental de una hora, esta preferencia se mostró únicamente en el grupo control de jóvenes y en el grupo experimental de adultos, $p < .01$.

El ANOVA de medidas repetidas con dos factores mostró una diferencia significativa entre los ensayos experimentales ($F(1,28) = 4.33$, $p = 0.047$) y entre los grupos ($F(2,28) = 9.003$, $p = 0.001$). La interacción ensayo x grupo no fue significativa ($F(2,28) = 2.41$, $p = 0.108$). Los resultados de los análisis *post-hoc* revelaron diferencias significativas entre el grupo control de adultos y el grupo control de jóvenes ($p < .001$) y el grupo experimental de adultos ($p = .002$). No se encontró una diferencia significativa entre el grupo experimental de adultos y el grupo control de jóvenes ($p = .727$).

Los análisis *post hoc* entre los grupos en el ensayo experimental 30 seg. no revelaron diferencias significativas ($p > 0.05$). Sin embargo en el ensayo experimental de una hora, los análisis *post-hoc* revelaron una diferencia significativa entre el grupo control de jóvenes y el grupo control de adultos ($p < .01$) y entre el grupo control de adultos y el grupo experimental de adultos ($p < .01$).

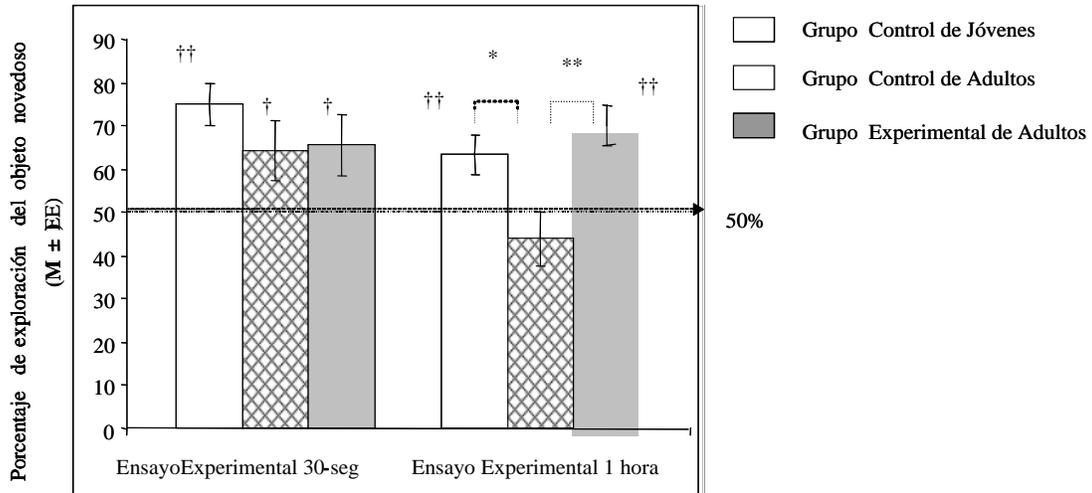


Figura 10. Porcentaje de exploración de objetos novedosos. Porcentaje del tiempo total dedicado a la exploración del objeto novedoso durante los dos ensayos experimentales:

* $p < .05$ grupo control de jóvenes vs. el grupo control de adultos en el ensayo de 1 hora

** $p < .01$ grupo control de adultos vs. el grupo experimental de adultos en el ensayo de 1 hora.

† $p < .05$ comparación del porcentaje total de exploración del grupo con el 50% (nivel del chance) en ambos ensayos.

†† $p < .01$, comparación del porcentaje total de exploración del objeto novedoso con el 50%. (nivel del chance) en ambos ensayos.

Análisis Bioquímicos

Se midió la densidad óptica de las muestras y los resultados fueron convertidos en densidad normalizada. La Tabla 6 muestra los resultados del ANOVA realizado en la densidad normalizada del nivel de expresión de la proteína NF- κ B en cada una de las regiones cerebrales evaluadas. Los resultados de la prueba *post hoc* se muestran en la Tabla 5.

Los análisis bioquímicos mostraron un nivel de expresión de la proteína NF- κ B mayor en el grupo control de adultos que en el grupo control de jóvenes en todas las regiones. En cuatro de las regiones: hipocampo, cerebelo, corteza frontal y cerebro basal anterior las diferencias fueron significativas. El estriado fue la única región que no mostró una diferencia significativa entre el grupo control de jóvenes y el grupo control de adultos. En cuatro de las regiones analizadas (hipocampo, cerebelo, corteza frontal y el estriado) el grupo experimental de adultos mostró un nivel significativamente menor de NF- κ B que el grupo control de adultos. En el cerebelo y el hipocampo el grupo experimental adulto mostró un nivel significativamente mayor de NF- κ B que el grupo control de jóvenes (Tabla 6).

Tabla 5. Resultados del ANOVA en la expresión de la proteína NF- κ B en las diferentes regiones cerebrales.

Región Cerebral	<u>Grados de</u> <u>Libertad</u>	<u>F</u>	<u>P</u>
Corteza Frontal	2, 29	5.260	0.01
Hipocampo	2, 31	3.850	0.03
Cerebro Basal Anterior	2, 31	4.864	0.02
Estriado	2, 32	3.796	0.03
Cerebelo	2, 32	37.441	< 0.001

Tabla 6. Resultados de las pruebas *post-hoc* de Fisher del nivel de expresión del NF- κ B en las diferentes regiones cerebrales. Los números indican la densidad normalizada (unidades arbitrarias) ($M \pm EE$) que se obtuvo a través de los análisis de la inmunotransferencia de Western. Los valores de p indican los resultados de las pruebas *post-hoc* con una diferencia significativa entre los dos grupos que se indican.

Regiones Cerebrales	Grupo Control de Jóvenes ($M \pm EE$)	Grupo Control de Adultos ($M \pm EE$)	Grupo Experimental de Adultos ($M \pm EE$)
Corteza Frontal	0.91 \pm 0.12	1.31 \pm 0.17	0.77 \pm 0.11
		p=0.047	p=0.01
Hipocampo	0.84 \pm 0.06	1.15 \pm 0.10	0.88 \pm 0.09
		p=0.017	p=0.035
Cerebro Anterior Basal	0.51 \pm 0.18	1.27 \pm 0.20	1.01 \pm 0.16
		p=0.005	
Estriado	0.99 \pm 0.05	1.15 \pm 0.05	0.88 \pm 0.08
		p=0.086	p=0.005
Cerebelo	0.44 \pm 0.12	1.78 \pm 0.08	0.85 \pm 0.12
		p=0.009	
		p<0.001	p<0.001

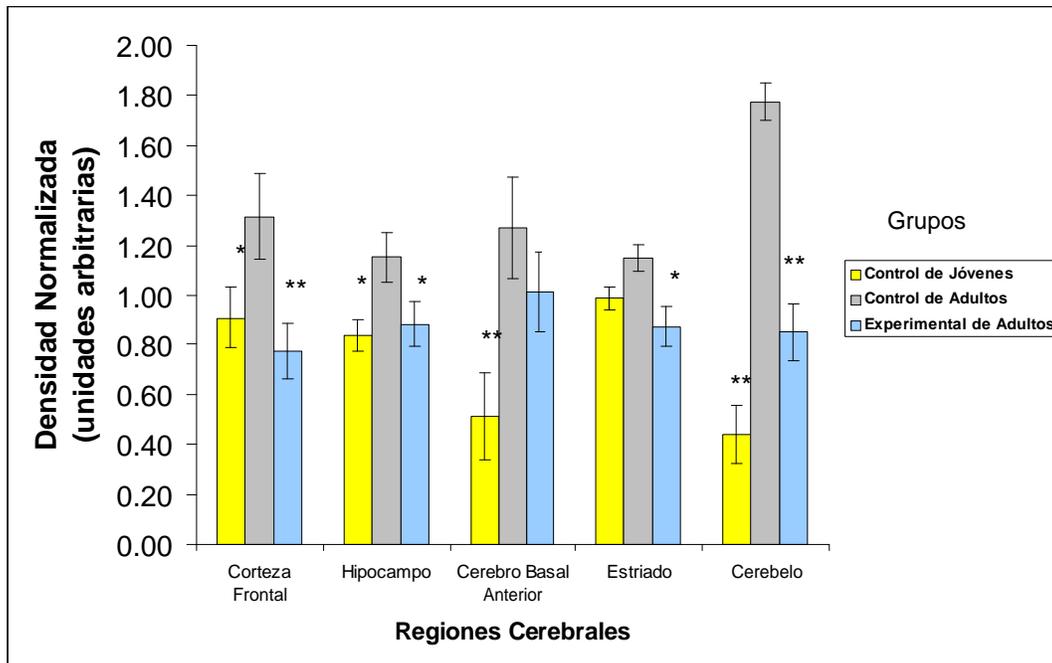


Figura 11. Expresión normalizada del NF- κ B en las diferentes regiones cerebrales. Las unidades de medida fueron asignadas arbitrariamente con valores del 0 al 2, equivalentes de menor a mayor densidad respectivamente. La altura de las barras representa la densidad normalizada ($M \pm EE$), la densidad óptica de las bandas dividida por el promedio de las muestras estandarizadas en cada uno de los bloques de la inmunotransferencia de Western, las cuales se reportan en la Tabla 6. Los resultados de las comparaciones de pares *post-hoc* se muestran con los siguientes símbolos:

* $p < 0.05$ del grupo de la barra correspondiente en comparación con el grupo control de adultos.

** $p < 0.01$ del grupo de la barra correspondiente en comparación con el grupo control de adultos.

Las correlaciones entre NFκB p65 y las diferentes regiones analizadas de ambos grupos de las ratas adultas se muestra en la Tabla 8 y en la Figura 8. La correlación entre el índice total de la expresión del NFκB p65 del grupo control de ratas jóvenes con el porcentaje de exploración del objeto novedoso en el ensayo experimental de una hora, fue mínima, $r = -0.02$, y no fue significativa.

Tabla 7. Muestra la correlación entre la expresión del NF-κB p65 en cada una de las regiones cerebrales y el índice total del nivel de expresión con el porcentaje de exploración del objeto novedoso en el ensayo experimental-1 hora en los dos grupos de sujetos adultos.

Área	r	p
Hipocampo	-0.360	0.049
Cerebelo	-0.528	0.005
Cerebro anterior	-0.092	0.3
Corteza frontal	-0.071	0.4
Estriado	-0.156	0.2
Índice Total	-0.520	0.006

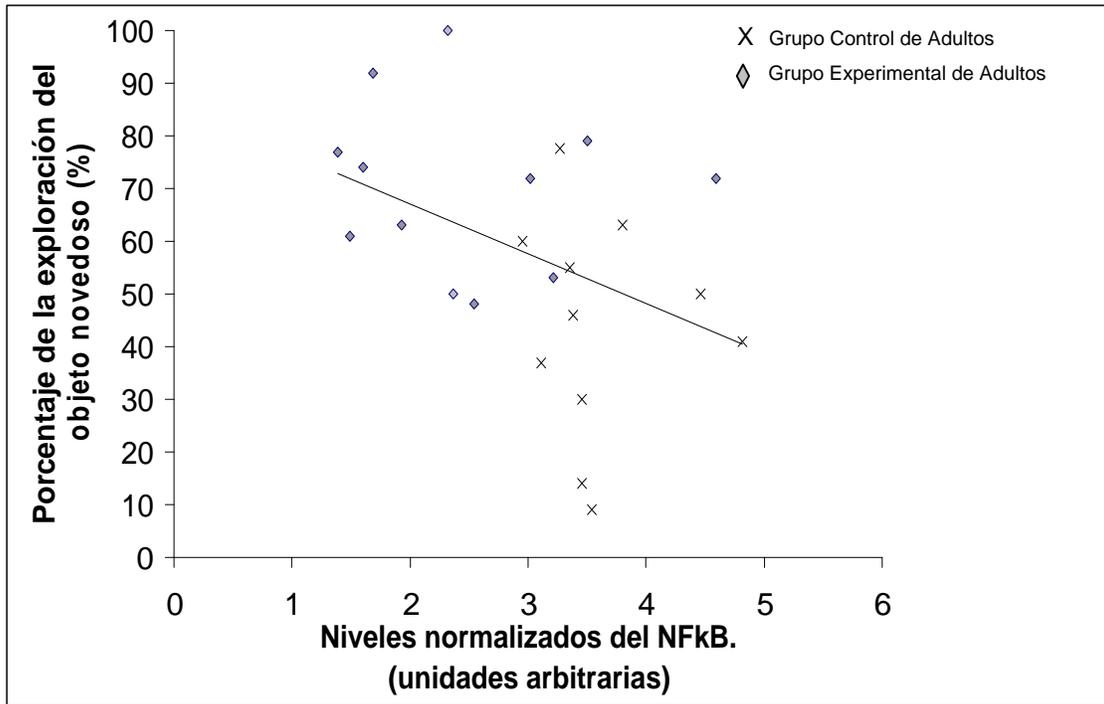


Figura 12. Correlación entre el índice total de la expresión del NF-κB p65 que es el promedio de la expresión de la densidad normalizada del NF-κB p65 (unidades arbitrarias) en todas las regiones cerebrales: hipocampo, cerebro basal anterior, corteza frontal, estriado y cerebelo y el porcentaje del tiempo total (%) dedicado a la exploración del objeto novedoso en el ensayo experimental realizado una hora después del ensayo muestra en ambos grupos: adulto control y experimental ($r = -.520$, $p = 0.006$).

DISCUSIÓN

Los resultados al término de la presente investigación nos mostraron diferencias importantes en la exploración de objetos novedosos y en el nivel de expresión del NF- κ B entre los grupos de ratas adultas. Lo anterior nos podría sugerir, que la ingesta de la dieta NIH-31-AA, provee al cerebro senil con defensas que posiblemente inciden en los mecanismos que subyacen a los procesos de la memoria de reconocimiento y en la expresión del nivel de la proteína NF- κ B. Los beneficios de los antioxidantes para disminuir los efectos deletéreos del EO durante el envejecimiento se han demostrado anteriormente (Joseph et al., 1998a; Lavrovsky et al., 2000; Meydani et al., 1998; Siess, 1991). Nuestros resultados son consistentes con dichas investigaciones. Una posible explicación para los resultados de la presente investigación es la que propone la teoría del envejecimiento de los radicales libres propuesta por Harman (1956), que sugiere que el estrés oxidativo es la causa principal del proceso del envejecimiento.

Dietas antioxidantes

La edad en que los roedores comienzan a ingerir antioxidantes (Bezlepkin, Sirota y Gabsiev, 1996) es un factor importante que puede afectar su longevidad, ya que se ha sugerido que uno de los mecanismos que previene la vejez prematura es la acción de los antioxidantes (Casadesus, Shukitt-Hale y Joseph, 2003; Mattson y Camandola, 2001; Mattson et al., 2002). Estudios anteriores con ratas de la misma cepa (F344) han confirmado que el déficit en tareas cognoscitivas (por ejemplo, la tarea del laberinto de agua de Morris) se observa en 100% de éstas ratas a partir de los 19 meses de edad (Frick et al., 1995; Shukitt-Hale et al., 1998; Wallace et al., 1980), por lo tanto, en la

presente investigación se utilizaron sujetos de 15 meses de edad. Tomando en cuenta lo anterior los resultados de esta investigación sugieren que el tratamiento con la dieta experimental NIH-31-AA tuvo un efecto preventivo o demoró los efectos nocivos del estrés oxidativo en las ratas del grupo experimental.

Es poco probable que los resultados, tanto los conductuales como los bioquímicos, se deban a las diferencias que se observaron en el aumento de peso y en la cantidad del consumo de la dieta, ya que se encontró una diferencia insignificante entre el aumento medio del peso de los sujetos de ambos grupos de adultos. Sin embargo, la diferencia en el consumo medio semanal de las dietas fue significativa. El grupo experimental consumió menos alimento que el grupo control de adultos, el promedio de esta diferencia fue únicamente del 6.3%. Esta fracción es mínima en comparación al porcentaje (40%-60%) que se usa en las investigaciones sobre los efectos del régimen alimenticio con calorías reducidas en el envejecimiento el cual sugiere que la vejez prematura se puede prever con un régimen alimenticio adecuado (Casadesus et al., 2003; Heilbronn y Ravussin, 2003; Mattson et al., 2000). Asimismo ni el aumento de peso, ni el consumo de la dieta de los grupos adultos mostraron una correlación importante con los resultados de las pruebas mnemónicas.

Para mantener la dieta control y la experimental isocalóricas, se le agregaron 20g/Kg. de maíz a la dieta control, la misma cantidad del arándano azul (AA) que se le añadió a la dieta experimental. Por lo que la diferencia en los resultados entre los grupos adultos no es atribuible a una diferencia en las calorías de las dietas. Todos los sujetos del ambos grupos de adultos mayores recibieron los beneficios de la dieta base, la cual es considerada un alimento completo para el desarrollo y el mantenimiento adecuado de los roedores en todas las etapas de su vida (Lewis, Johnson, Mayhugh y Duffy, 2003). Algunos investigadores opinan que esta dieta es comparable a una dieta balanceada y

completa para los seres humanos (Youdim et al., 2000). Por lo tanto se aumentó el suplemento alimenticio del AA a la dieta experimental, no fue para corregir una dieta inadecuada, sino para proveer a los sujetos con los beneficios adicionales del suplemento del AA.

La inclusión de la vitamina E (alfa-tocoferol) en la dieta base es importante. En la actualidad existe una tendencia hacia el consumo de la misma por su asociación benéfica que previene las enfermedades cardiovasculares (Stys, Stys, Nelly y Lawson, 2004; Paolisso, et al., 1995), cancerosas (Goodwin y Brodwick, 1995; Olson, 1992; Omenn, 1996), inmunológicas (Buzina-Suboticaneć, Buzina, Stavljenic y Farley, 1998; Grimble, 1997) y neurodegenerativas en los seres humanos (Meydani, 2001). Pero los efectos de este suplemento son motivo de controversias en la comunidad científica. Varios estudios epidemiológicos y clínicos apoyan la ingesta de la vitamina E y proponen que ésta retarda los efectos perjudiciales del estrés oxidativo en los mecanismos mencionados anteriormente (Meydani, 2001). Asimismo se ha observado una correlación significativa entre los resultados de pruebas de memoria y las concentraciones plasmáticas de la vitamina E en personas mayores (La Rue et al., 1997; Perkins et al., 1999). Sin embargo, en múltiples investigaciones se han obtenido efectos nocivos, inconsistentes o inconclusos sobre el uso de la vitamina E (Czernichow, Blacher y Hercber, 2004; Shekelle et al., 2004; ver revisiones Ferns y Lamb, 2004). Incluso algunos investigadores cuestionan la validez de la teoría de los radicales libres y el envejecimiento porque la ingesta de la vitamina E no repercutió en los mecanismos cerebrales inducidos por el estrés oxidativo, ni alargó la vida de los sujetos (Roth, 1993). Sano et al. (1997) en un estudio clínico demostraron que la ingesta de 2000 UI de vitamina E diariamente por dos años incrementó la autonomía de pacientes con la enfermedad de Alzheimer pero al mismo tiempo, no mejoró los procesos cognoscitivos

de los mismos. La misma inconsistencia de resultados se ha encontrado en estudios con roedores (Sumien et al., 2003; ver revisión en Meydani et al., 1998). Socia et al. (1995) encontraron que el suministro de la vitamina E a ratas adultas por un periodo de dos meses favoreció su ejecución en el laberinto de agua de Morris. Por otra parte, Takahashi (1995) encontró que dosis altas de los cuatro tipos de tocoferoles, (alfa, beta-gamma-, delta-) causan hemorragias severas en roedores.

Youdim y Joseph (2001) sugirieron que a veces los parámetros bioquímicos o conductuales utilizados no son los más adecuados para medir el efecto antioxidante de la vitamina E o de cualquier otro antioxidante. Las inconsistencias de los métodos crean problemas en la interpretación de las investigaciones. Por lo tanto, son necesarias las investigaciones con procedimientos que sigan un determinada estándar, para evaluar los efectos benéficos o nocivos de la vitamina E en los seres humanos y en otras especies.

Es importante sobresaltar que los efectos benéficos del suplemento del AA fueron adicionales a los beneficios antioxidantes de la vitamina E, ya que ambas dietas contenían la misma cantidad de la vitamina E (17.15/Kg.). La dieta control NIH-31 no fue suficiente para prevenir el aumento del nivel del NF- κ B que se observa durante el envejecimiento o el déficit en la ejecución de las tareas de memoria del reconocimiento. La adición del extracto del AA significativamente mejoró ambas variables. Estos resultados se asemejan a investigaciones previas (Youdim et al., 2000; Joseph et al., 2003) que utilizaron las mismas dietas. Estos investigadores encontraron diferencias entre los grupos de ratas adultas en parámetros del estrés oxidativo y en la prueba mnemónica del laberinto de agua de Morris. Dichos autores atribuyeron sus resultados a los beneficios que les confirió a los sujetos la ingesta del AA, particularmente su capacidad antioxidante superpuesta a la de la vitamina E.

No es sorprendente que la dieta con el suplemento del AA confirió una protección antioxidante mayor que la dieta control sólo con vitamina E. Los fitoquímicos del AA conocidos como antocianinas contienen una capacidad antioxidante más potente que la vitamina E (Esterbauer, Dieber-Rotheneder, Striegl y Waeg, 1991). Por ejemplo, estudios *in vitro* encontraron que las antocianinas ejercieron una protección antioxidante más potente en la peroxidación lipídica que la vitamina E (Narayan, Naidu, Ravishankar, Srinivas y Venkataraman, 1999). Entre otros compuestos que se encuentran en el AA, y no en la vitamina E, que reducen la acción de los radicales libres se encuentra el ácido hidroxicinámico (Youdim et al., 2002) y los flavonoides como el quercetina y el catechin (Law et al., 1999). Sin embargo, se ha comprobado numerosas veces que los antioxidantes trabajan en conjunto y se influyen entre si conjuntamente (Perkins et al., 1999; Joseph et al., 2000; Youdim y Joseph, 2001). Por ejemplo, la vitamina E y el AA son liposolubles y ambos pueden prevenir efectos deletéreos de la membrana celular. La fluidez de la membrana lipídica disminuye con la edad y se ha sugerido que la peroxidación lipídica de la misma se puede prevenir a través de distintos tipos de dietas, incluyendo la ingesta del AA (Galli et al., 2002; Joseph et al., 1998b; Yu, Suescun y Yang, 1992). También se ha encontrado que el AA (Youdim et al., 2000) y la vitamina E (Perkins et al., 1999) cuando ingieren separadamente, proveen protección antioxidante contra las enfermedades vasculares, y dicho efecto puede incidir en los procesos mnemónicos. Por lo tanto es posible que la interacción de la vitamina E y el AA (bajo los parámetros utilizados en esta investigación) produjera un efecto protector mayor debido a la suma de sus efectos antioxidantes y/o a la acción sinérgica de ambos

Numerosas investigaciones recientes (por ejemplo, Cantuti-Castelvetri, Shukitt-Hale y Joseph, 2000; Joseph et al., 2001; Youdim et al., 2001) sugieren que la

capacidad antioxidante de las frutas y verduras junto con otras propiedades, trabajan de una manera sinérgica para producir sus beneficios en el organismo. Estos efectos protectores no se observan claramente, con la ingesta exclusiva de vitaminas antioxidantes. Nuestros resultados parecen ser consistentes con los anteriores.

En la investigación presente, es importante tomar en consideración que las tareas conductuales de ambos experimentos se ejecutaron después de un periodo alimenticio diferente (12 semanas antes de la tarea de aprendizaje discriminativo y 17 semanas antes de la tarea de exploración de objetos novedoso). Específicamente, los sujetos consumieron las dietas cinco semanas adicionales antes del comienzo del segundo experimento. Investigaciones previas que utilizaron dietas con el suplemento del AA han encontrado efectos protectores después de 6 semanas (Sweeney et al., 2002), 8 semanas (Cao et al., 1999; Rabin, Shukitt-Hale, Szprengiel y Joseph, 2002; Youdim et al., 2000), 24 semanas (Joseph et al., 2003) o solamente una toma de dichos suplementos (Mazza et al., 2002). En el presente estudio, los datos conductuales de la tarea de exploración de objetos demostraron un efecto significativo importante después de 17 semanas de la ingesta de la dieta con el AA. En contraste, se encontró únicamente una tendencia lineal significativa en la tarea de aprendizaje discriminativo después de 12 semanas. Lo anterior nos sugiere que éste intervalo de la ingesta de la dieta tiene un efecto moderado en comparación del efecto observado después de 17 semanas. Los datos conductuales de ambas tareas del grupo que recibió la dieta con el AA, sugieren que el periodo de ingesta es importante para observar los efectos benéficos de la dieta con el suplemento del AA.

Experimento I: Aprendizaje discriminativo por recompensa de un ensayo cada día

Para medir el aprendizaje de esta tarea se utilizaron dos variables: número de errores (entrada a los callejones sin la recompensa) y la latencia para encontrar la

recompensa. Se esperaba una disminución en el número de errores indicando que el sujeto ha aprendido cual es el callejón que contiene la recompensa (memoria espacial) y por lo tanto evita la entrada a los callejones sin recompensa. No se encontró una diferencia significativa entre los grupos de adultos en esta variable. Se encontró una diferencia significativa entre el grupo CJ y el grupo CA, pero no entre el grupo CJ y el de EA. Los sujetos de los grupos EA y CJ disminuyeron sus errores en todos los ensayos a diferencia del grupo control de adultos que aumentó sus errores en el tercer ensayo experimental. El análisis de tendencia lineal confirmó una tendencia negativa y significativa a través de los ensayos del grupo EA y del CJ, indicando claramente que ambos grupos aprendieron la tarea conductual. En contraste, el grupo CA no demostró una tendencia lineal significativa a través de los ensayos, lo que nos sugiere que los sujetos de este grupo no aprendieron la tarea conductual o que el aprendizaje fue mínimo.

En los tres ensayos experimentales (ensayos posteriores al ensayo muestra) se esperaba una disminución del número de errores en base a los realizados durante el ensayo, indicando que los sujetos aprendieron la regla (la recompensa se encuentra en el callejón con la rejilla ascendiente y hacia la derecha de la caja de iniciación) y por lo tanto la diferencia entre el ensayo muestra y los ensayos subsecuentes aumenta conforme realizan, en comparación al ensayo muestra, un número menor de errores. A pesar de que los análisis estadísticos no mostraron una diferencia entre los tres grupos, el grupo CJ y el grupo EA, mostraron una reducción constante en el número de errores del ensayo muestra (figura 8), a diferencia del grupo CA que no demostró una disminución continua. Durante el tercer ensayo experimental más errores que en los ensayos anteriores, indicando que los sujetos en este grupo no formaron un trazo mnémico o éste era muy débil. Este punto es importante, ya que se ha demostrado que

la repetición de las tareas de memoria espacial ayuda a las ratas en la ejecución de los ensayos subsecuentes (Beatty, Bierley y Bard, 1985; Bierley, Rixen, Troster y Beatty, 1986; Caprioli, Ghirardi, Giuliani, Ramacci y Angelucci, 1991; Pitsikas, Biagini y Algieri, 1991). En experimentos previos con el paradigma de aprendizaje discriminativo, se observó que las ratas adultas mayores tenían una gran dificultad en la ejecución de esta tarea en los ensayos experimentales, al menos que recibieran tratamientos farmacológicos (Malin et al., 1993; Malin et al., 2001). Nuestros resultados sugieren que las ratas adultas mayores del grupo experimental se beneficiaron de la exposición repetida al laberinto, es decir aprendieron la regla para encontrar al recompensa (memoria de referencia) como lo indican la tendencia lineal significativa.

Se puede proponer que no se alcanzó una diferencia significativa en las variables de número de errores entre los grupos de adultos debido a la gran variabilidad observada y lo cual se aprecia claramente en el tercer ensayo experimental (figura 8). Estos resultados no son sorprendentes, ya que son el producto de la misma naturaleza del procedimiento de este paradigma y del proceso normal del envejecimiento. Al explorar libremente el laberinto (durante la habituación y el ensayo muestra), cada sujeto desarrolla una experiencia distinta en cuanto a la secuencia de la tarea y del patrón mnemónico del laberinto. Algunas ratas realizan un número mayor de entradas a los callejones sin recompensas, mientras que otras encuentran el callejón de la recompensa después de muy pocos errores. Los diferentes patrones del ensayo muestra crean una gran diversidad en la ejecución de los ensayos experimentales ulteriores.

Durante el envejecimiento normal se ha demostrado que entre los miembros de la misma especie existe una gran variabilidad en las funciones mnémicas. Este fenómeno se observa en los seres humanos (Albert, 2003) en los primates no humanos (Zola-Morgan y Squire, 1985) y en los roedores (Gallagher et al., 1993). Por ejemplo,

Albert (2003) demostró una variabilidad en la ejecución en una tarea de recuerdo libre en grupo de personas mayores. En un estudio realizado por Gallagher et al., (1993) con roedores jóvenes y ancianos con el laberinto de agua de Morris, encontró que en general el grupo de ancianos obtuvo un promedio mayor en la distancia para alcanzar la plataforma, pero dentro de este grupo hubo roedores ancianos que ejecutaron la tarea a la par de los sujetos jóvenes. Los resultados también nos muestran que los sujetos en los grupos EA y CJ mantuvieron el mismo patrón de ejecución de la tarea conductual de aprendizaje discriminativo, una disminución constante del número de errores y en la latencia para encontrar la recompensa, en contraste con los sujetos del grupo CA cuyo patrón de ejecución fue diferente. Lo anterior sugiere que los sujetos de los grupos CJ y EA aprendieron la tarea y recordaron el lugar de la recompensa, lo cual es indicativo que los sujetos de ambos grupos desarrollaron un trazo mnémico similar, a pesar de la diferencia de edades. Es posible que si se hubieran realizado más ensayos experimentales, el patrón de disminución de errores observado en los grupos EA y CJ llegara a mostrar en ensayos ulteriores diferencias significativas entre los grupos de ratas adultas mayores.

La ejecución de la tarea de forma similar de los grupos EA y CJ plantea la posibilidad de que la ingesta de la dieta experimental incidió modestamente en los mecanismos cerebrales que subyacen la memoria espacial y memoria de referencia utilizados en esta tarea.

La literatura previa ha mostrado que los déficits motores en ratas adultas mayores son difíciles de revertir (Shukitt-Hale et al., 1998). Por lo tanto, se esperaba que las ratas jóvenes realicen la tarea con mayor rapidez que las adultas mayores. De acuerdo a lo anterior, se utilizó la variable de latencia, la cual indica cuanto tiempo se tardaron los sujetos en alcanzar la recompensa. Esta medida es más representativa de la

memoria de los adultos mayores, en lugar de medir la velocidad de los sujetos, porque éstos aunque quieran alcanzar la recompensa rápidamente, lo más seguro es que sus habilidades motoras no se los permitan (especialmente comparándolos con los sujetos jóvenes). Sin embargo, los datos conductuales mostraron que desde el ensayo muestra, los sujetos del grupo EA alcanzaron la recompensa en un tiempo menor que los adultos del grupo control.

Asimismo, los resultados de la latencia para alcanzar recompensa, mostraron una gran variabilidad, al igual que el número de errores, lo cual pudo haber prevenido alcanzar una diferencia significativa entre los grupos. En contraste, el análisis de tendencia lineal en función de los ensayos reveló que las ratas en el grupo EA alcanzó la recompensa en un tiempo significativamente menor que el grupo CA. Lo que sugiere que las ratas del grupo EA aprendieron la regla y alcanzaron la recompensa en un tiempo menor.

En conclusión, las diferencias entre el grupo CA y el grupo CJ confirman la sensibilidad del paradigma de aprendizaje discriminativo durante el envejecimiento, medida por precisión (sin errores) y latencia. Estas diferencias son consistentes con las investigaciones anteriores que utilizaron esta tarea en las que se demostró un déficit en ratas de la cepa Sprague-Dawley de 24 y 18 meses de edad (Malin et al., 1990; Malin et al., 1993). Los resultados conductuales de este paradigma también dan un apoyo marginal a la hipótesis de que la dieta enriquecida con el suplemento del AA disminuye los efectos nocivos del envejecimiento.

Experimento II: Exploración de Objetos Novedosos

El tiempo de exploración cercana de los estímulos durante el ensayo de familiarización afecta su reconocimiento en el ensayo experimental (Ennaceur y

Delacour, 1988), los sujetos necesitan haber formado una huella de memoria del ítem familiar lo suficientemente clara para poder reconocerlo (Parkin y Walter, 1992). Por lo tanto era necesario establecer un tiempo mínimo de exploración durante el ensayo de familiarización.

En esta tarea se encontró una diferencia significativa entre los grupos cuando se utilizó un intervalo de una hora y no con el de 30 s. En este último, todos los grupos realizaron la tarea de una manera similar y el porcentaje de tiempo de exploración del objeto novedoso fue mayor al 50% lo cual indica que el porcentaje de la exploración de los objetos no fue únicamente resultado del azar. Aparentemente los sujetos de todos los grupos reconocieron los objetos novedosos después del intervalo de 30 s, lo que indica que las ratas de 19 meses de edad de la cepa F344 no han perdido las capacidades visuales o motoras necesarias para reconocer dichos ítems. Estos resultados concuerdan con las investigaciones análogas realizadas con ratas de la misma cepa de 21-24 meses de edad, las cuales reconocieron los objetos novedosos después de tres minutos del ensayo muestra (Shukitt-Hale, Casadesus, Cantuti-Castelvetri y Joseph, 2001). De acuerdo con la percepción visual intacta de las ratas de los grupos de adultos, los resultados del ensayo experimental realizado con una hora de intervalo sugieren que las ratas del grupo control adulto mostraron un déficit mnemónico y no simplemente un problema de percepción.

Una medida usada frecuentemente para evaluar la formación del trazo mnemónico esta basada en la tendencia innata de los sujetos de investigar los estímulos novedosos en lugar de los que hayan visto anteriormente (Eichenbaum, 2002; Squire et al., 2002). Los investigadores han utilizado las tareas de reconocimiento con roedores como medida de la memoria porque la dificultad para realizarlas aumenta cuando se incrementa el tiempo entre el ensayo muestra y el ensayo experimental, por lo que se

piensa que la diferencia en la ejecución se debe a un déficit mnemónico (Ennaceur y Delacour, 1988; Clark et al., 2000; Squire et al., 2002). Consistente con lo anterior, nuestros aportan información temporal sobre el proceso de la memoria del reconocimiento, ya que los resultados varían de acuerdo a los diferentes intervalos entre los ensayos muestra y prueba.

La preferencia del grupo control de jóvenes fue del $64\% \pm 5\%$ ($M \pm SEM$) en el ensayo con una hora de intervalo y estos resultados son comparables con los de Clark, Zola y Squire (2000), quienes utilizaron la misma tarea con ratas de la cepa Long-Evans de 3 meses de edad, y reportaron una preferencia del 68.3% por el objeto novedoso con el mismo intervalo. La diferencia significativa de los resultados entre el grupo CJ y el grupo CA sugiere que el paradigma de exploración de objetos novedosos es sensible a los efectos del envejecimiento sobre los procesos mnemónicos en roedores. Los hallazgos de este estudio concuerdan con los resultados de Dellsu et al. (1992), quienes mostraron que las ratas de 18 meses de edad se desempeñaron más pobremente que las ratas control de 2 meses de edad en una tarea de reconocimiento espacial en un laberinto en forma de Y. Estos autores también utilizaron objetos familiares y novedosos para determinar la preferencia de las ratas. Sin embargo, la medida de la memoria de reconocimiento fue basada en la primera visita que realizaron a los callejones, y no en el porcentaje de la exploración cercana de los objetos. Shukitt-Hale et al., (2001), quien mostró un déficit en ratas de 22-24 meses de edad en una tarea de reconocimiento de tipo espacial cuando los objetos previamente vistos por las ratas eran movidos de su lugar original. Estos autores no reportaron un déficit en la exploración de objetos novedosos en estas mismas ratas. Sin embargo, las ratas fueron expuestas al objeto familiar varias veces por varios minutos cada vez, antes de ser expuestas al objeto novedoso. En nuestra investigación, a diferencia de los autores anteriores, los sujetos

fueron expuestos únicamente una vez y por un máximo tiempo de exploración cercana de 30 s a los objetos familiares y la medida de la memoria fue basada en el porcentaje de exploración, ambas variables nos dan una medida mas robusta acerca de la memoria del reconocimiento. Por lo tanto, nuestros resultados aportan datos diferentes acerca del envejecimiento y la memoria del reconocimiento en roedores. Esta aportación se suma al extenso banco de información existente sobre el envejecimiento de los roedores pertenecientes a esta cepa (Shukitt-Hale et al., 1998).

Análisis Bioquímicos

Los resultados bioquímicos sólo se analizaron en conjunto con los resultados obtenidos en la tarea exploración de objetos novedosos, ya que las muestras bioquímicas se obtuvieron al término de los ensayos conductuales de esta tarea y un tiempo considerable después del primer experimento (cinco semanas).

De acuerdo a nuestra hipótesis en el estudio presente el índice total de expresión del NF- κ B p65 se incrementó en todas las regiones (significativamente en 4 de las 5 regiones) en el grupo CA comparado con el grupo CJ. Las ratas que se mantuvieron con la dieta del AA mostraron niveles del NF- κ B significativamente más bajos en 4 de las 5 regiones que las ratas del grupo CA. La dieta control no fue suficiente para mejorar el estrés neuronal que se observa durante el envejecimiento. De hecho, las ratas en el grupo EA no mostraron niveles del NF- κ B significativamente diferentes a los del grupo CJ en 4 de las 5 regiones analizadas. El índice total de expresión del NF- κ B que se observó en los sujetos de grupo experimental adulto sugiere que la dieta con el suplemento del AA tuvo un efecto general importante en el encéfalo. Al mismo tiempo se observó que los efectos de los fitoquímicos actuaron de manera selectiva en las distintas regiones cerebrales, lo cual ya ha sido reportado en numerosas investigaciones

que utilizaron dietas con suplementos alimenticios (Joseph et al 1998; Youdim et al., 2000).

De acuerdo a la hipótesis esperada se sugiere que la diferencia del índice total de la expresión de la proteína NF- κ B p65 entre el grupo CA y el grupo CJ (que recibieron la misma dieta), es un efecto del envejecimiento. Estos resultados apoyan investigaciones previas que han demostrado que el nivel del NF- κ B se eleva en función de la edad (Kaufman et al., 2002; Toliver-Kinsky et al., 1997; Paolisso et al., 1998). Sin embargo, el grupo EA mostró un nivel de expresión del NF- κ B p65 significativamente menor que el grupo control de adultos. Consistente con nuestra hipótesis se sugiere que la dieta con el AA tuvo un efecto importante en el nivel de expresión del NF- κ B p65 en el grupo experimental.

Considerando que la proteína NF- κ B es un indicador por excelencia del estado oxidativo de las neuronas (Schreck, et al., 1992, Li y Karin, 1999; Mattson et al., 2000), se propone que el mecanismo de acción de los beneficios observados en el grupo adulto que recibió la dieta con el AA, es el efecto antioxidante del arándano azul. Sin embargo, se debe tomar en consideración que el AA también contiene propiedades antiinflamatorias que pueden también favorecer los mecanismos durante el envejecimiento (Galli et al., 2002; Lau, Shukitt-Hale y Joseph, 2005). Numerosas investigaciones han demostrado que el EO y los procesos inflamatorios suceden conjuntamente y que el cerebro senil es susceptible a ambos (Youdim y Joseph, 2001; Casadesus et al., 2003; Roy et al., 2002), Los análisis bioquímicos utilizados en este proyecto no nos permiten separar los efectos antioxidante y antiinflamatorios del AA ya que entre los procesos que inducen la expresión del NF- κ B durante el envejecimiento se encuentran el EO (Schreck, et al., 1992, Li y Karin, 1999; Mattson et al., 2000), y la producción de citoquinas inflamatorias (Baeuerle y Henkel, 1994; Li y Stark 2002;

Mattson et al., 2000; Sizemore et al., 1999). En concordancia con los puntos anteriores se sugiere que los resultados benéficos que se observaron en el nivel de la expresión del NFκB se deben tanto a las propiedades antioxidantes (Prior et al., 1998) como a las antiinflamatorias del AA (Galli et al., 2002; Lau, Shukitt-Hale y Joseph, 2005). Youdim y Joseph (2001) plantean que la capacidad antioxidante de las frutas y verduras es solamente una de las propiedades protectoras de estos alimentos.

Se puede argumentar que la disminución general del nivel del NF-κB en el grupo EA es el resultado de una condición estable y general en las neuronas, en comparación del grupo CA. Ciertos investigadores (Youdim y Joseph, 2002) sugieren que la ingesta diaria de frutas y verduras crea un condicionamiento en las células para resistir el deterioro típico del envejecimiento y reaccionar a él con defensas adecuadas. Se ha mostrado que varios mecanismos celulares que ocurren durante el envejecimiento mejoran con la ingesta de dietas con el suplemento del AA (Lau, Shukitt-Hale y Joseph, 2005), por ejemplo, el nivel de la dopamina en las células del estriado (Joseph et al., 1999; Youdim et al., 2000), la actividad de las células Purkinje (Bickford et al., 2000), la pérdida de fluidez de la membrana celular (Youdim et al., 2000), comunicación neuronal (Joseph et al., 2003) y neurogénesis en el hipocampo (Casadesus et al., 2004). El mantenimiento estable de estos parámetros (entre otros) ayuda a resistir los efectos crónicos del estrés celular, como el EO y los procesos inflamatorios. Por lo tanto, se sugiere que la dieta con el AA ayudo a conservar un estado general de condicionamiento celular adecuado en los sujetos del grupo EA, y lo cual resultó en una disminución del nivel de expresión del NF-κB. Se ha sugerido que el nivel del NF-κB se eleva para poder responder a los efectos crónicos del EO (Toliver-Kinsky et al., 2002).

En el presente estudio, se propone que las neuronas en las regiones estudiadas de los sujetos del grupo control de adultos, se encontraban en un estado crónico de EO e inflamación y en respuesta al mismo, el nivel del NFκB p65 se incrementó significativamente, en todas las regiones de dichos sujetos en comparación con el grupo CJ y en cuatro de dichas regiones, en comparación con el grupo EA. La dieta control no fue suficiente para mejorar el estrés neuronal y por el contrario, el nivel de expresión del NFκB p65 que se observó en los sujetos del grupo experimental fue el resultado del condicionamiento de las células al recibir la dieta NIH-31 AA durante 17 semanas.

Existe un efecto heterogéneo del EO a través de las diferentes estructuras cerebrales. Por ejemplo, Zhang et al. (1993) encontraron en jerbos de 15, 20 y 24 meses un aumento progresivo en los indicadores del estrés oxidativo radical de hidróxilo y glutatión oxidado, en el hipocampo, en la corteza cerebral y en el estriado en función de la edad. Asimismo, estos autores mostraron diferencias regionales no solamente en los niveles de EO, sino también en la expresión de antioxidantes en dichas regiones. Dichos investigadores sugirieron que el incremento específico del EO en estas regiones estimulaba la acumulación de los antioxidantes en estas áreas. El hipocampo fue el área que demostró el nivel más alto de las vitaminas alfa-tocoferol y del ácido ascórbico; mientras que el estriado, el nivel más alto del glutatión. Los resultados del presente estudio apoyan lo anterior y muestran que regiones como el hipocampo, la corteza frontal y el estriado son vulnerables al estrés oxidativo.

Se encontraron distintos niveles de expresión de la proteína NF-κB p65 en las regiones analizadas. La región que mostró el mayor nivel de expresión de dicha proteína en el grupo CA, la secuencia de mayor a menor nivel de expresión fue cerebelo, corteza frontal, cerebro basal anterior, estriado e hipocampo. Las regiones que expresaron mayor expresión en el grupo experimental de adultos fue el cerebro basal anterior,

seguido por el hipocampo, el estriado y el cerebelo; mientras que el menor nivel se encontró en la corteza frontal. Mientras que el patrón de secuencia de expresión del NF- κ B p65 en el grupo control de jóvenes fue diferente a ambos grupos de adultos, de mayor a menor: estriado, corteza frontal, hipocampo, cerebro basal anterior y cerebelo. Los datos anteriores nos sugieren la interacción de la dieta con la edad influyó en el nivel de expresión del NF- κ B p65, produciendo un patrón diferente en los tres grupos.

Algunos investigadores han sugerido que el hipocampo es la estructura más crítica para la ejecución de tareas de novedad en diferentes especies: humanos (Squire et al., 1993; McKee y Squire, 1993), primates (Zola-Morgan, Squire, Rempel, Clower y Amaral, 1992) y roedores (Clark et al., 2000). En concordancia con estas investigaciones, nuestros resultados muestran una correlación negativa y significativa entre el nivel de expresión del NF κ B p65 y los porcentajes de exploración en el ensayo experimental realizado una hora después del ensayo muestra. A pesar de no ser una correlación robusta sino una correlación tenue y marginalmente significativa, esta correlación apoya nuestra hipótesis y confirma los resultados de Clark et al. (2000) que el hipocampo tiene un papel crítico en la ejecución de esta tarea.

Se ha sugerido que el hipocampo es extremadamente sensible al EO (Benzi y Moretti, 1995; Jackson et al., 1995; Williams, 1993). Investigadores también han demostrado un deterioro prematuro de esta región, en comparación a otras regiones (Rodríguez-Capote, et al., 1998). El hipocampo posee una alta sensibilidad a las propiedades protectoras del AA. Por ejemplo, Sweeney et al. (2002) mostraron que la ingesta del suplemento del AA (14.3%) por seis semanas previno un ataque isquémico cerebral inducido en roedores, y la protección más relevante se observó selectivamente en las regiones CA1 y CA2 del hipocampo. Consistente con lo anterior, nuestros resultados sugieren que los compuestos del AA actuaron con mayor potencia y

probablemente de una manera preventiva, en esta región cerebral en los sujetos del grupo EA comparado con los del grupo CA.

En la presente investigación se puede apreciar un efecto selectivo de la dieta experimental del AA en la corteza frontal, ya que comparando todas las regiones del grupo adulto experimental, esta área mostró el nivel más bajo de expresión del NFκB p65. Es posible que la protección del AA en esta región beneficiara la integridad del tejido neuronal. Subsecuentemente, la capacidad antioxidante del AA previno un estado crónico del EO, medido por el nivel del NF-κB. Se puede sugerir que la intervención del AA promueve la conservación de las funciones cognitivas. La corteza frontal se ha considerado una estructura importante en la memoria del reconocimiento (Miskin y Murray, 1994). Por ejemplo, en las tareas de reconocimiento se necesita de la memoria de trabajo para su ejecución (Ennecaeur y Delacour, 1988) la cual depende de la integridad de los lóbulos frontales. Se ha demostrado que las lesiones de la corteza prefrontal alteran la memoria de trabajo (Baddeley et al., 1974; Baddeley et al., 1988). Sin embargo, en la presente investigación, en contraste a la correlación del hipocampo, los niveles del NFκB p65 en la corteza frontal no se correlacionaron significativamente con los ensayos conductuales y únicamente se observó una tendencia mínima en la dirección esperada. Este resultado no es sorprendente. Existen numerosas investigaciones que han mostrado que aparentemente no existe una correlación robusta a través de las pruebas conductuales que miden las funciones de los lóbulos frontales (por ejemplo la memoria de trabajo) y el lóbulo temporal. Por ejemplo, Gallagher y Rapp (1997), en una revisión de la literatura mostraron que cuando déficits cognoscitivos atribuibles ya sea al lóbulo frontal o al temporal concurren en el mismo sujeto, no existe una correlación significativa entre dichos déficits. Es importante considerar que aparentemente la integridad de la corteza frontal es importante para las

tareas de memoria de reconocimiento, pero se sugiere que los resultados de la presente investigación apoyan la aseveración propuesta anteriormente (Clark et al., 2000) que la estructura crítica para la memoria de reconocimiento es el hipocampo.

Varios estudios (Joseph et al., 1999; Youdim et al., 2000; Joseph et al., 2003) han demostrado que la alimentación con un suplemento del AA produjo un incremento importante en la transmisión sináptica de las células del estriado (medida por la liberación de la dopamina). Este hallazgo ha sido constante a través de varias investigaciones (Joseph et al. 1999; Joseph et al., 2003; Youdim et al.2000). Asimismo, la literatura reciente ha sugerido que el estriado está involucrado de una manera importante en los procesos mnemónicos (Devan et al, 1996; Joseph et al., 2003; Lazaris, Cassel, Stemmelin, Cassel y Kelche, 2003; McDonald y White, 1994; Nenadic, Gaser, Volz, Rammsayer, Hager y Sauer, 2003; Packard y Knowlton, 2002).

Curiosamente, en nuestra investigación, el estriado fue la única región que no mostró una diferencia significativa en la expresión del NF- κ B p65 entre los grupos que recibieron la misma dieta control, CJ y CA. Este fue un resultado inesperado. Aunque en el grupo CJ se encontró un nivel de expresión menor, no es estadísticamente diferente al grupo CA. No existe una variabilidad excesiva que pudiera explicar este resultado. Estos hallazgos no apoyan nuestra hipótesis, ya que se esperaba encontrar una diferencia significativa entre los grupos CJ y el grupo CA en todas las regiones. Se espera que investigaciones futuras ayuden a clarificar este resultado.

En el estriado, el grupo EA tuvo el nivel menor de NF- κ B p65 de todos los grupos. Lo que nos sugiere que a pesar de que el estriado es particularmente sensible a los efectos de los antioxidantes exógenos (Joseph et al., 1999, Joseph et al, 1998, Joseph et al., 2003; Youdim et al., 2000), la vitamina E por sí sola no fue suficiente para incidir en los efectos del envejecimiento sobre el estriado. Por lo que es posible que esta región

es sensible a un nivel más alto de antioxidantes, por ejemplo, a la suma de la vitamina E y el AA, o al efecto sinérgico de los compuestos del AA.

El cerebro basal anterior fue la única región en la que no se encontró una diferencia significativa entre los grupos de adultos. Sin embargo, si se observó el mismo patrón de expresión del NF- κ B p65 que en las otras regiones. En comparación con las demás regiones, los tres grupos muestran en esta región particularmente, la mayor variabilidad de expresión del NF- κ B. Lo cual pudo influir en los análisis estadísticos.

Se ha demostrado que el cerebelo es altamente sensible al estrés oxidativo y a los antioxidantes exógenos (Bickford et al., 2000). La investigación presente concuerda con estos resultados, ya que de todas las regiones analizadas el efecto más robusto se encontró en el cerebelo. En concordancia con las demás regiones, el grupo CA mostró el nivel de expresión mayor del NF- κ B en comparación al nivel de los otros dos grupos. Dicho nivel fue aproximadamente el doble del que se observó en el grupo EA. Los resultados anteriores apoyan las investigaciones previas (Bickford et al., 1999; Bickford et al.; Joseph et al., 1999; Kaufmann et al., 2001; Youdim et al., 2000) y sugieren que el cerebelo es muy vulnerable a los efectos del estrés oxidativo durante el envejecimiento, medidos por el nivel del NF κ B.

Nuestros los resultados demuestran que el cerebelo responde altamente a las defensas adquiridas a través de la dieta NIH-31 AA. Investigaciones anteriores apoyan esta aseveración. Por ejemplo, Youdim et al. (2000) encontraron un aumento significativo en la fluidez de la membrana neuronal en el cerebelo del grupo experimental que recibió la dieta experimental NIH-31 AA comparado con el grupo control. Más relevante fue el hecho de que este aumento no se encontró en las neuronas de la corteza cerebral. Estos hallazgos y el hecho de que en esta investigación se utilizaron las mismas dietas que Youdim et al. (2000), permiten plantear que el AA

incide de forma particular en la estructura del cerebelo en comparación con las otras regiones estudiadas, por lo que será interesante que investigaciones futuras ayuden a esclarecer los mecanismos que producen este efecto selectivo.

Los grupos de adultos mostraron una correlación moderada y en la dirección esperada entre el nivel de expresión del NF- κ B en el cerebelo y el porcentaje de exploración del objeto novedoso en el ensayo experimental con el intervalo de una hora. De todas las regiones analizadas, el cerebelo presentó la correlación más robusta. Esto sugiere que dentro de las funciones reguladoras del cerebelo se encuentran algunas que son importantes para los procesos involucrados en la memoria de reconocimiento, medida por la tarea de exploración de objetos novedosos. A diferencia de esta última aseveración, la literatura actual sobre la disociación de los procesos mnemónicos no considera el cerebelo como una estructura involucrada en la memoria declarativa (McDonald y White, 1993; Packard y McGaugh, 1996; Squire et al., 2003). Sin embargo datos de investigaciones recientes también proponen que el cerebelo se encuentra involucrado en los procesos de la memoria declarativa. Weis et al. (2004) realizó un estudio muy reciente con resonancia magnética funcional que demostraron la activación del cerebelo durante una tarea de memoria de reconocimiento (identificar estímulos nuevos y viejos). Esta tarea es análoga a la tarea utilizada en esta investigación, ya que involucra el reconocimiento de estímulos previamente vistos y de estímulos novedosos. Investigaciones previas (Leiner et al., 1986; Leiner et al., 1989; Schmahmann, 1991, 2003) han mostrado las interconexiones estrechas entre el cerebelo y diversas regiones de la corteza cerebral, llevando a la conclusión de que el cerebelo está involucrado en la regulación de los procesos cognoscitivos complejos.

Conclusiones

- La hipótesis de que el cerebro de las ratas adultas mayores está expuesto al estrés oxidativo, fue apoyada por la expresión elevada del NF- κ B en las ratas adultas mayores del grupo control en comparación con las ratas jóvenes que recibieron la misma dieta.
- La hipótesis de que la dieta enriquecida con el arándano azul reduciría el nivel del estrés oxidativo en el cerebro senil de las ratas F344, fue apoyada por la reducción de expresión del NF- κ B en el cerebro de las ratas adultas mayores, que recibieron esta dieta, en comparación con las ratas adultas mayores que recibieron la dieta control. Asimismo esta hipótesis fue apoyada por la similitud de los niveles de expresión del NF- κ B que se mostraron en el grupo control de ratas jóvenes y el grupo de las ratas adultas mayores que recibieron la dieta con el arándano azul.
- La hipótesis de que las ratas F344 de 19 meses de edad tendrían dificultad para realizar la tarea de exploración de objetos novedosos fue apoyada por la ejecución del grupo control de ratas mayores adultas, ya que el porcentaje de exploración del objeto novedoso durante el ensayo experimental con una hora de intervalo fue menor que el nivel del azar. Asimismo este porcentaje fue significativamente diferente al del grupo control de ratas jóvenes.
- La ejecución similar de los tres grupos en la tarea de exploración de objetos novedosos durante el ensayo experimental con 30 segundos de intervalo, nos

indica que las ratas de los tres grupos no tenían impedimentos motores o visuales para la ejecución de esta tarea. Por lo tanto la diferencia significativa entre los grupos de ratas adultas mayores en el ensayo experimental con una hora de intervalo nos sugiere un déficit mnémico.

- La hipótesis de que cuatro meses de ingesta de la dieta con el suplemento del arándano azul previniera el deterioro mnémico de las ratas adultas mayores, fue apoyada por la ejecución significativamente mejor en la tarea de exploración de objetos novedosos con el intervalo de una hora del grupo experimental de ratas adultas mayores, en comparación con el grupo control de ratas adultas mayores.
- La hipótesis de que el estrés oxidativo influye en la funciones mnemónicas de las ratas ancianas, fue apoyada por la correlación del porcentaje de exploración del objeto novedoso de las ratas adultas mayores y el promedio del nivel de expresión del NF- κ B en todas las regiones cerebrales analizadas.
- La hipótesis de que el hipocampo es una estructura importante en la tarea de exploración de objetos novedosos, fue apoyada por la correlación negativa entre el porcentaje de exploración de objetos novedosos y el nivel de expresión del NF- κ B en el hipocampo de las ratas adultas mayores.
- La correlación negativa y significativa entre el nivel de expresión del NF- κ B en el cerebelo y el porcentaje de exploración de objeto novedoso de las ratas adultas mayores, sugiere que el cerebelo tiene un papel importante en la memoria del reconocimiento.

- Se validó la tarea del aprendizaje discriminativo por recompensa por ensayo cada día como una tarea conductual mnemónica sensible al envejecimiento en sujetos de la raza Fischer 344. Los sujetos del grupo control de adultos mayores realizaron la tarea con un número mayor de errores y una latencia mayor para alcanzar la recompensa que los sujetos del grupo control de jóvenes que recibieron la misma dieta.
- Los resultados no nos permiten confirmar la hipótesis de que tres meses de la ingesta de la dieta con el suplemento del AA, previnieran el decaimiento de los procesos mnemónicos necesarios para realizar la tarea de aprendizaje discriminativo por recompensa en los grupos de ratas adultas. Sin embargo, hay evidencia que nos sugiere un efecto benéfico. El promedio de errores a través de los tres ensayos experimentales del grupo EA no fue significativamente diferente que el promedio del grupo CJ, a diferencia del grupo CA que si lo fue. También, los sujetos de los grupos EA y CJ demostraron aprendizaje de esta tarea, de acuerdo a la tendencia lineal negativa y significativa que mostraron en el número de errores y la latencia para encontrar la recompensa. En contraste las ratas del grupo CA no mostraron dicha tendencia en ninguna de estas variables.

Investigaciones futuras

Numerosas investigaciones han aportado evidencia que sugiere un papel muy importante del homodímero del NF- κ B p65 en el aprendizaje y la memoria. El heterodímero del NF- κ B p50:p65 se encuentra abundantemente en la sinapsis. Ratones genéticamente alterados y deficientes del NF- κ B, no pudieron ejecutar una tarea

espacial en un laberinto (Meffert et al., 2003). Estos resultados y los de la presente investigación sugieren la importancia del NF- κ B en el aprendizaje y memoria. Por lo tanto, es necesario realizar investigaciones que aporten información de los mecanismos del NF- κ B en los procesos cognoscitivos.

La tarea conductual de exploración de objetos novedosos utiliza tendencias innatas, y es un paradigma idóneo para manipulaciones experimentales múltiples. Este paradigma ha sido utilizado ampliamente. Esta tarea resultó ser muy sensible al envejecimiento y por lo tanto es un paradigma importante para los estudios en el laboratorio con roedores ancianos. Sin embargo, hasta donde es de mi conocimiento, no existe ningún estudio que muestre los cambios cronológicos en la memoria, utilizando la tarea conductual de este paradigma. Por lo que se sugiere un estudio cronológico detallado utilizando la tarea de exploración de objetos novedosos, siguiendo el método utilizado en esta investigación.

El paradigma de aprendizaje discriminativo por recompensa con un ensayo por día es una tarea sensible para evaluar los procesos mnemónicos, así como la evaluación de intervenciones farmacológicas durante el envejecimiento. Sin embargo, para reducir los efectos de la variabilidad propia de este paradigma, se recomienda incorporar varios cambios a dicho paradigma cuando se utilizan roedores adultos mayores. Por ejemplo, incrementar el número de sujetos, aumentar el número de ensayos conductuales hasta que las ratas jóvenes no cometan errores, o proporcionar la misma experiencia a todos los sujetos durante el ensayo muestra.

Los beneficios de la dieta con el suplemento del AA pueden ser el resultado de otras propiedades, además de la capacidad antioxidante del AA. Las propiedades anti-inflamatorias del AA trabajan conjuntamente con sus propiedades antioxidantes. La expresión de proteínas que responden a los procesos inflamatorios como el factor de

necrosis tumoral α y las citoquinas puede ser evaluada después de la ingesta de una dieta con el suplemento del AA. Ambos procesos, el estrés oxidativo y la inflamación, se observan durante el envejecimiento normal. Por lo tanto investigaciones que aporten datos sobre ambos procesos son importantes.

La ingesta de una dieta con el suplemento del 2% del AA durante cuatro meses confirió un beneficio importante en las ratas de 19 meses de edad. Diferentes lapsos de alimentación de dietas con antioxidantes se han reportado en diversas investigaciones. Es importante estudiar diferentes lapsos de alimentación con el suplemento del AA en una forma sistemática, particularmente con adultos mayores. Se necesitan investigaciones que aporten información acerca del tiempo de los lapsos de alimentación que necesitan, por ejemplo, los roedores adultos mayores para favorecer sus mecanismos mnemónicos. También es importante determinar el tiempo que perduran los beneficios del AA, después de que se ha dejado de ingerir el AA por un lapso determinado. Es también necesario aportar datos acerca de los efectos sinérgicos de los diferentes alimentos que contienen un nivel de antioxidantes alto, por ejemplo, arándano azul, frambuesas, zarzamoras, fresas, espinacas, etc. Este tipo de investigaciones permitirá realizar estrategias dietéticas para ayudar al cerebro envejecido.

Se espera que los resultados de la investigación presente se puedan extrapolar a los seres humanos. Existe la necesidad de estudios controlados sobre la inclusión de los diversos alimentos naturales ricos con antioxidantes en las dietas de la población adulta. Estos estudios son posibles, ya que, en contraste con fármacos o suplementos vitamínicos, aparentemente, no existe un riesgo para la salud al consumir frutas y verduras.

La edad en la que se comienza un régimen alimenticio con alto contenido de antioxidantes puede determinar la intensidad de los beneficios de dichos alimentos. Aparentemente, los mejores resultados se obtienen cuando el cambio alimenticio sucede antes de que se manifieste el déficit mnemónico. Se sugieren investigaciones longitudinales que permitan comparar las relaciones entre el tipo de dieta, la edad de iniciación y los efectos en los procesos cognoscitivos.

Otro régimen que puede ayudar a retardar los efectos del envejecimiento es la restricción calórica. Investigaciones que han utilizado este régimen generalmente comienzan la ingesta de este tipo de dieta a una edad temprana. Sin embargo, los efectos protectores de la restricción calórica en humanos se han observado únicamente cuando se comienza este proceso sistemáticamente antes de los 40 años de edad (Casadesus et al., 2003). Desafortunadamente, de acuerdo con lo anterior, la RC no ayudaría a un gran porcentaje de la población humana que ya han rebasado el límite de 40 años (Casadesus et al., 2003) y la cual aumentará en los años próximos (Tuljapurkar et al., 2000). Por lo tanto, una opción más realista para la población adulta mayor es un régimen alimenticio rico en frutas, verduras, etc., en lugar de la restricción calórica. Ambos tipos de dietas, restricción calórica o rica en antioxidantes, han demostrado su capacidad para proteger el cerebro en contra los mecanismos naturales del envejecimiento (Casadesus et al., 2003). Existe una necesidad urgente de realizar estudios clínicos que puedan aportar información sobre alimentos o suplementos que puedan crear una diferencia y mejorar la calidad de vida de los adultos mayores. Principalmente, el fin de estas investigaciones es la diseminación de los resultados para que la población humana pueda utilizar estos conocimientos para una vejez productiva (preservando su procesos cognoscitivos) y saludable.

REFERENCIAS

Agarwal, S., & Sohal, R.S. (1996). Relationship between susceptibility to protein oxidation, aging, and maximum life span potential of different species. *Experiental Gerontology*, 31, 365-372.

Agris, P. F., Boak, A., Basler, J. W., Voorn, C. V., Smith, C., & Reichlin, M. (1985). Analysis of cellular senescence through detection and assessment of RNAs and proteins important to gene expression: transfer RNAs and autoimmune antigens. En D. Salk, Y. Fujiwara, y G. Martin (Eds.). *Werners Syndrome and Human Aging*, New York: Plenum Press.

Aheme, S.A., & O'Brien, N.M. (2002). Dietary flavonols: chemistry, food content and metabolism. *Nutrition*, 18, 75-81.

Albert, M.S. (1994). Age-related changes in cognitive functions. In: M.L. Albert & J.E. Knoefel (Eds.). *Clinical Neurology of Aging*. Oxford University Press, New York. 2nd Edition.

Albert, M.S. (2003). Data Courtesy of M.S. Albert, Massachusetts General Hospital, Harvard University. In: L.R. Squire, F. E. Bloom, S.K. McConnell, J. L. Roberts, N. C., Spitzer, & M.L. Zigmond (Eds). *Fundamental Neuroscience*, Academic Press, New York. 2nd Edition.

Albright, T.D., Kandel, E.R., & Posner, M. (2000). Cognitive neuroscience. *Current Opinion in Neurology*, 10, 612-624.

Alcázar, M.J., & Jiménez, M.J. (1988) Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Fitoterapia*, 59, 25-38.

Alessio, H. M., Goldfarb, A. H., & Cao, G. (1997). Exercise-induced oxidative stress before and after vitamin C supplementation. *International Journal of Sport Nutrition*, 7(1), 1-9.

Allen PA, Kaut KP, Lord RG, Hall RJ, Grabbe JW, Bowie T. (2005). An emotional mediation theory of differential age effects in episodic and semantic memories. *Experimental Aging Research*. 31(4):355-91

Alpha-Tocopherol, beta-Carotene Cancer Prevention Study Group (1994). The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *New England Journal of Medicine*, 330, 1029-1035.

Alvira, D. R., y Villalba, M. P., (1988). Radicales libres y especies activadas del oxígeno. Química, biología e implicaciones en patología médica. Sistemas defensivos ante los radicales libres y sistemas antioxidantes enzimáticos. *Annals of Medicine Internal*, 5, 143-151.

Ames, B.N., Shigenaga, M.K., & Hagen, T.M. (1993). Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America*, 90, 7915-7922.

Ammendola, R., Mesuraca, M., Russo, T., & Cimino, F. (1994). The DNA-binding efficiency of Sp-1 is affected by redox changes. *European Journal of Biochemistry*, 225, 483-489.

Anderson, D. (1996). Antioxidant defenses against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutation Research*, 350, 103-108.

Ardilla, A., & Roselli, M. (1989). Neuropsychological characteristics of normal aging. *Developmental Neuropsychology*, 5, 307-320.

Arenberg, D. (1982). Change with age in problem-solving. In F.I.M. Craik & S. Trehub (Eds). *Aging and Cognitive Processes*, Plenum Press, New York.

Bachevalier, J. (1990). Ontogenetic development of habit and memory formation in primates. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 608, 457-77, (discussion 477-84).

Bachevalier, J., Beauregard, M., & Alvarado, M.C. (1999). Long-term effects of neonatal damage to the hippocampal formation and amygdaloid complex on object discrimination and object recognition in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Behavioral Neuroscience*, 113 (6), 1127-51.

Baddeley, A. (1992a). Working memory. *Science*, 255, 556-559.

Baddeley, A. (1992b). Working memory: The interface between memory and cognition. *Journal of Cognitive Neuroscience*, 4, 281-288.

Baeuerle, P.A., & Baltimore, D. (1996). NF- κ B: ten years later. *Cell*, 87, 13-20.

Baeuerle, P.A., & Henkel, T. (1994). Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annual Review of Immunology*, 12, 141-179.

Ballinger, W.E., Galletta, G.J., & Maness, E.P. (1979) Anthocyanins of fruits of *Vaccinium*, Sub-genera *Cyanococcus* and *Polycodium*. *Journal of the American Society of Horticulture Science*, 104, 554-557.

Balu, M., Sangeetha, P., Murali, G., & Panneerselvam, C.(2005). Age-related oxidative protein damages in central nervous system of rats:modulatory role of grape seed extract. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 23(6),501-507.

Barger, S.W., Horster, D., Furukawa, K., Goodman, Y., Kriegstein, J., & Mattson, M.P. (1995). Tumor necrosis factors alpha and beta protect neurons against amyloid beta-peptide toxicity: evidence for involvement of a kappa B-binding factor and attenuation of peroxide and Ca²⁺ accumulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92 (20), 9328-9332

Barger, S.W., & Mattson, M.P. (1996). Induction of neuroprotective kappa B-dependent transcription by secreted forms of the Alzheimer's beta-amyloid precursor. *Brain research. Molecular Brain Research*, 40 (1), 116-126.

Bartolini, L., Casamenti, F., & Pepeu, G. (1996). Aniracetam restores object recognition impaired by age, scopolamine, and nucleus basalis lesions. *Pharmacological Biochemical Behavior* 53, 277-283.

Bartus, R.T., Dean, R.L., & Lipps, A.S. (1982). The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science*, 217, 408-417.

Basile, G., gangemi, S., Lo Balbo, C., Mento, A., Micita-Masuro, C., Crisafulli, G., Merendino, R.A., Lentile, R., & Nicita-Mauro, V. (2003). Correlation between serum retinol and alpha-tocopherol levels in centenarians. *Journal of Nutritional Science Vitaminology (Tokyo)*. 49(4), 287-288.

Beatty, W.W., Bierley, R.A., & Boyd, J.G. (1985). Preservation of accurate spatial memory in aged rats. *Neurobiology of Aging*, 6, 219-225.

Beckman, K.B., & Ames, B.N.(1998). The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews*, 78 (2), 547-581.

Beg, A.A., & Baltimore, D. (1996). An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science*, 274 (5288), 782-784.

Beg, A.A., Sha, W.C., Bronson, R.T., Ghosh, S., & Baltimore, D. (1995). Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. *Nature*, 376 (6536):167-170.

Berneburg, M., Grether-Beck, S., Kürten, V., Ruzicka, T., Briviba, K., Sies, H., & Krutmann, J. (1999). Singlet oxygen mediates the UVA-induced generation of the photoaging-associated mitochondrial common deletion. *Journal of Biological Chemistry*, 274(22), 15345-15349.

Benzi, G., & Moretti, A. (1995). Age and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system. *Free Radicals Biological Medicine*, 19-77.

Bermejo, A., & Duarte, J. (2003). Mechanisms of transduction of lipopolysaccharide. *Archives of Pharmaceutics*, 44 (2), 121-139.

Bertone, E.R., Hankinson, S.E., Newcomb, P.A., Rosner, B., Willet, W.C., Stampfer, M.J., & Egan, K.M. (2001). A population-based case-control study of carotenoid and vitamin A intake and ovarian cancer (United States). *Cancer Causes Control*, 12 (1), 83-90.

Beyer, W., Imlay, J., & Fridovich, I. (1991). Superoxide dismutases. *Prog. Nucleic Acids Research*, 40, 221-253.

Bezlepkin, V.G., Sirota, N.P., & Gzsiev, A.I. (1996). The prolongation of survival in mice by dietary antioxidants depends on their age by the start of feeding this diet. *Mechanisms of Ageing and Development*, 92, 227-234.

Bick, M. C., & Strehler, B. L. (1972) Leucyltransfer RNA synthetase activity in old cotyledons: evidence on repressor accumulation. *Mechanism of Ageing and Development*, 1, 33.

Bickford, P.C., Gould, T., Briederick, L., Chadman, K., Pollock, A., Young, D., Shukitt-Hale, B., & Joseph, J. (2000). Antioxidant-rich diets improve cerebellar physiology and motor learning in aged rats. *Brain Research*, 866, 211-217.

Bickford P, Heron C, Young DA, Gerhardt GA, De La Garza R. (1992) Impaired acquisition of novel locomotor tasks in aged and norepinephrine-depleted F344 rats. *Neurobiol Aging*. 1992 Jul-Aug;13(4):475-81.

Bickford, P.C., Shukitt-Hale, B., Joseph, J. (1999). Effects of aging on cerebellar noradrenergic function and motor learning: nutritional interventions. *Mechanisms of Ageing and Development*, 111 (2-3), 141-154.

Bierley, R.A., Rixen, G.J., Troster, A.J., & Beatty, W.W. (1986). Preserved spatial memory in old rats survives 10 months without training. *Behavioral Neurological Biology*, 45, 223-229.

Birren, J.E., & Fisher, L.M. (1995). Aging and speed of behavior: possible consequences for psychological functioning. *Annual Review of Psychology*, 46, 329-353.

Birren, J.E., Woods, A.M., & Williams, M.V. (1980). Behavioral slowing with age: Causes, organization and consequences. In L.W. Poon (Ed.), *Aging in the 1980s: Psychological Issues*. Washington DC: American Psychological Association.

Boissiere, F., Hunot, S., Faucheux, B., Cuychaerts, C., Hauw, J. J., Agid, Y., & Hirsch, E. C. (1997). Nuclear translocation of NF- κ B in cholinergic neurons of Alzheimer's disease. *Neuroreport*, 8, 2849-2852.

Botez, M.I., Botez, T., Elie, R., & Attig, E. (1989). Role of the cerebellum in complex human behavior. *Italian Journal of Neurological Sciences*, 10(3), 291-300.

Botez, T., Botez, M.I., Cardu, B., & Leveille, J. (1989). Speed of information processing and its relationship to intelligence at various levels of the central nervous system. *Neurology*, 35 (Suppl. 1), 1151-1157.

Botwinick, J., & Storandt, M. (1973). Speed functions, vocabulary ability, and age. *Perceptual and Motor Skills*, 36 (3), 1123-1128.

Bouwman P, & Philipsen S. (2002). Regulation of the activity of Sp1-related

transcription factors. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 195, (1-2), 27-38.

Bracke-Tolkmitt, R., Linden, A., & Canavan, A.G. M. (1989). The cerebellum contributes to mental skill. *Behavioral Neuroscience*, 103, 442-446.

Brownlee, M. (1991). Glycosylation products as toxic mediators of diabetic complications. *Annual Review of Medicine*, 42, 159-166.

Bunce, D.J., Barrowclough, A., & Morris, I. (1996). The moderating influence of physical fitness on age gradients in vigilance and serial choice responding tasks. *Psychology and Aging*, 11(4), 671-682.

Bunker, V.W. (1992). Free radicals, antioxidants and ageing. *Medical Laboratory of Science*, 49, 299-312.

Buzina-Suboticanec, K., Buzina, R., Stavlejenic, A., Farley, T., & Haller, J. (1998). Ageing, nutritional status and immune response. *International Journal of Vitamins, Nutrition Research*. 68, 133-141.

Cabeza, R. (2002). Hemispheric asymmetry reduction in old adults: the HAROLD model. *Psychology of Aging*, 17, 85-100.

Cabeza, R., Daselaar, S.M., Dolcos, F., Prince, S.E., Budde, M., & Nyberg, L. (2004). Task-independent and task-specific age effects on brain activity during working memory, visual attention and episodic retrieval. *Cerebral Cortex*, 14, 364-375.

Cameron, H.A., & McKay, R.D.G. Restoring production of hippocampal neurons in old age. *Nature Neurosciences*, 2, 894-897.

Campbell, A., Smith, M.A., Lawrence, M.S., Bondy, S.C., & Perry, G. (2001) Mechanisms by which metals promote events connected to neurodegenerative diseases. *Brain Research Bulletin*, 55 (2), 125-132.

Cannon, W.B. (1932). *The Wisdom of the Body*. New York: Norton.

Cansino, S., Maquet, P., Dolan, R.J., & Rugg, M.D. (2002). Brain activity underlying encoding and retrieval of source memory. *Cerebral Cortex*, 12 (10), 1048-1056.

Cantuti-Castelvetri, I., Shukitt-Hale, B., & Joseph, J.A. (2000). Neurobehavioral aspects of antioxidants in aging. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 18, 367-381.

Cao, G., Shukitt-Hale, B., Bickford, P.C., Joseph, J.A., McEwen, J., & Prior, R.L. (1999). Hyperoxia-induced changes in antioxidant capacity and the effect of dietary antioxidants. *Journal of Applied Physiology*, 86(6), 1817-22.

Cao, G., Sofic, E., & Prior, R. (1996). Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1738-1744.

Cao, G., Verdon, C.P., We, A., Wang, H., & Prior, R.L. (1995). Automated oxygen radical absorbance capacity assay using the COBAS FARA II. *Clinical Chemistry*, 41, 1738-1744.

Caprioli, A., Ghirardi, O., Giuliani, A., Ramacci, M.T. & Angelucci, L. (1991). Spatial learning and memory in the radial maze: a longitudinal study in rats from 4 to 25 months of age. *Neurobiology of Aging*, 12, 605-607.

Cartford, M.C., Gemma, C & Bickford, P.C. (2002). Eighteen-month-old Fischer 344 rats fed a spinach-enriched diet show improved delay classical eyeblink conditioning and reduced expression of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) and TNFbeta in the cerebellum. *Journal of Neuroscience*, 22(14), 5813-5816.

Cartford MC, Gould T, Bickford PC.(2004). A central role for norepinephrine in the modulation of cerebellar learning tasks. *Behavior Cognitive Neuroscience Review*, 3(2),131-138.

Carter, B. D., Kalschmidt, C., Kalschmidt, B., Offenhauser, N., Bohm-Matthaei, R., Baeuerle, P. A., & Barde, Y. A. (1996). Selective activation of NFkB by nerve growth factor through the neurotrophin receptor. *Science*, 272, 542-545.

Casadesus, G., Shukitt-Hale, B., & Joseph, J.A. (2003). Qualitative versus quantitative caloric intake: are they equivalent paths to successful aging? *Neurobiology of Aging* 23(5):747-69

Cattell, R.B. (1971). *Abilities: their structure, growth and action*, Boston: Houghton Mifflin.

Cerella, J., Poon, L.W., Fozard, J.L. (1982). Age and ichonic read out. *Journal of Gerontology*, 37, 197-202.

Cermak, L.S., Talbot, N., Chandler, K., & Wolbarst, L. R. (1985). The perceptual priming phenomenon in amnesia. *Neuropsychologia*, 23 (5), 615-622.

Chance, B., Sies, H., & Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Review*, 59, 527-605.

Chen, P., Ratcliff, G., Belle, S. H., Cauley, J.A., DeKosky, S.T., & Ganguli, M. (2001) Patterns of cognitive decline in presymptomatic Alzheimer disease: a prospective community study. *Archives of General Psychiatry* 58, 859-860.

Chen PS, Yang YK, Lee YS, Yeh TL, Lee IH, Chiu NT, Chu CL.(2005). Correlation between different memory systems and striatal dopamine D2/D3 receptor density: a single photon emission computed tomography study. *Psychological Medicine*, 35(2), 197-204.

Cheng, B., Christakis, S., y Mattson, M. P. (1994). Tumor necrosis factors protect neurons against excitotoxic/metabolic insults and promote maintenance of calcium homeostasis. *Neuron*, 12, 139-153.

Chevion, M., Berenstein, E., & and Stadtman, E. R. (2000). Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radical Research*, 33 suppl, S99-108.

Choi, B.H. (1995). Oxidative stress and Alzheimer's Disease. *Neurobiology of Aging*, 16, 675-678.

Christensen, H., Henderson, A.S., Griffiths, K., & Levings, C. (1997). Does ageing inevitably lead to declines in cognitive performance? A logintudinal study of elite academics. *Personlaity and Individual Differences*, 23, 67-78.

Chung, M.H., Kasai, H., Nishimura, S., & Yu, B. P. (1992). Protection of DNA damage by dietary restriction. *Free Radical Biological Medicine*, 12, 523-525.

Clark, R.E., Zola, S. M., & Squire, L.R. (2000). Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 20(23), 8853-8860.

Clemens, J. A., Stephenson, D. T., Samlstig, E. B., Dixon, E. P., & Little, S. P. (1997). Global ischemia activates nuclear factor kB in forebrain neurons of rats. *Stroke*, 28, 1073-1080.

Cohen, N. (1994). Preserved leRNAing capacity in amnesia: Evidence for multiple

memory systems. In L.R. Squire & N. Butters (Eds.), *Neuropsychology of Memory* (pp. 83-103). New York: Guilford Press.

Cohen, N., & Eichenbaum, H. (1993). *Memory, amnesia and the hippocampal system*. Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts.

Cohen, N.J., Poldrack, R.A., & Eichenbaum, H. (1998). Memory for items and memory for relations in the procedural/declarative memory framework. *Memory*, 5 (1-2), 131-178

Collier, T.J., & Coleman, P.D. (1991). Divergence of biological and chronological aging: evidence from rodent studies. *Neurobiology of Aging*, 12, 685-693.

Comfort, A. (1979). *The Biology of Senescence*, 3era Edición. New York: Elsevier.

Commoner, B., Townsend, J., & Pake, G. E. (1954). Free radicals in biological materials. *Nature*, 174, 689-691.

Corey, D:T: (1978). The determinants of exploration and neophobia. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2, 235-253.

Craik, F.I. (1987). Age differences in human memory. In J.E. Birren & K. W. Schaie (Eds). *Handbook of psychology of aging*. Van Norstrand Reinhold, New York.

Crook, T., Bartus, R.T., Ferris, S. F., Whitehouse, P., Cohen, G.D., & Gershon, S. (1986). Age associated memory impairment: proposed diagnostic criteria and measures of clinical change report of a National Institute of Mental Health Work Group. *Developmental Neuropsychology*, 2, 261-276.

Curtis, H. J. (1964). Cellular processes involved in aging. *Federal Proceedings*, 23, 662.

Czernichow, S., Blacher, J., & Hercberg, S. (2004). Antioxidant vitamins and blood pressure. *Current Hypertension Reports*, 6 (1), 27-30.

Davies, K.J. (1995). Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochemistry Society Symposium*, 61, 1-31.

Di Stasi, A.M., Mallozzi, C., Macchia, G., Petrucci, T.C., & Minetti, M. (1999) Peroxynitrite induces tyrosine nitration and modulates tyrosine phosphorylation of synaptic

proteins. *Journal of Neurochemistry*, 73(2), 727-735.

Decker, D.L. (1980). *Social Gerontology*, Boston: Little, Brown and Company.

Delerive, P., De Bosscher, K., Besnard, S., Vanden Berghe, W., Peters, J.M., Gonzalez, F.J., Fruchart, J.C., Tedgui, A., Haegeman, G., & Staels, B. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *Journal of Biological Chemistry*, 274(45), 32048-32054.

Dellu, F., Mayo, W., Cherkaoui, J., Le Moal, M., & Simon H. (1992). A two-trial memory task with automated recording: study in young and aged rats. *Brain Research*, 588, 132-139.

Dellu, F., Mayo, W., Vallee, M., Le Moal, M., & Simon, H. (1994). Reactivity to novelty during youth as a predictive factor of cognitive impairment in the elderly: a longitudinal study in rats. *Brain Research*, 653, 51-56.

Devan, B.D., Goad, E.H., & Petri, H.L. (1996). Dissociation of hippocampal and striatal contributions to spatial navigation in the water maze. *Neurobiology of Learning and Memory*, 66 (3), 305-323.

Devchand, P.R., Keller, H., Peters, J.M., Vazquez, M., Gonzales, F.J., & Wahli, W. (1996). The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature*, 384 (6604), 39-43.

Driver, A.S., Kodavanti, P.R.S., & Mundy, W. (2000). Age-related changes in reactive oxygen species production in rat brain homogenates. *Neurotoxicology Teratol*, 22, 175-181.

Dublin, L.I. (1949). *Length of life: A study of the life table*. New York: Ronald Press.

Dubey, A., Forster, M.J., & Sohal, R.S. (1995) Effect of the spin-trapping compound n-tert-butyl-phenylnitron on protein oxidation and life span. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 324, 249-254.

Dunah, A.W., Jeong, H., Griffin, A., Kim, Y., Standaert, D.G., Hersch, S.M., Mouradian, M.M., Young, A.B., Tanese, N., & Krainic, D. (2002). Sp1 and TAFII130 transcriptional activity disrupted in early Huntington's disease. *Science*, 296, 2238-2243.

Duncan, J., Emslie, H., Williams, P., Johnson, R., & Freer, C. (1996). Intelligence and the frontal lobe: the organization of goal-directed behavior. *Cognitive Psychology*, 30 (3), 257-303.

Eichenbaum, H. (1992). The hippocampal system and declarative memory in animals. *Journal of Cognitive Neuroscience*, 4, 217-231.

Eichenbaum, H. (2002). *The cognitive neuroscience of memory*. Oxford University Press: London, England.

Eichenbaum, H., Kuperstein, M., Fagan, A., & Nagode, J. (1987). Cue-sampling and goal-approach correlates of hippocampal unit activity in rats performing an odor discrimination task. *Journal of Neuroscience*, 7, 716-732.

Eichenbaum, H., Otto, T., & Cohen, N.J. (1992). The hippocampus-What does it do? *Behavioral and Neural Biology*, 57, 2-36.

Efstratiadis, A., Kafatos, F. C., & Maniatis, T. (1977). The primary structure of rabbit B-globin mRNA as determined from cloned DNA. *Cell*, 10, 571.

Ehlenfeldt, M.K., & Prior, R.L. (2000). Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and phenolic and anthocyanin concentrations in fruit and leaf tissues of highbush blueberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (26), 7731-7737.

Ennaceur, A., & Aggleton, J.P. (1997). The effects of neurotoxic lesions of the perirhinal cortex combined to fornix transection on object recognition memory in the rat. *Behavioural Brain Research*, 88, 181-193.

Ennaceur, A., & Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats: behavioural data. *Behavioral Brain Research*, 31, 47-59.

Ennaceur, S., Neave, N., & Aggleton, J.P. (1996) Neurotoxic lesions of the perirhinal cortex do not mimic the behavioural effects of fornix transaction in the rat. *Behavioural Brain Research*, 80, 9-25.

Enstrom, J. E., Kanim, L. E., & Klein, M. A. (1992). Vitamin C intake and mortality among a sample of the United States population. *Epidemiology*, 3, 194-202.

Eslinger, P.J., Pepin, L., & Benton, A. (1988). Different patterns of visual memory errors occur with aging and dementia. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology*, 10, 60-61.

Esposito E, Rotilio D, Di Matteo V, Di Giulio C, Cacchio M, Algeri S. (2002). A review of specific dietary antioxidants and the effects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative processes. *Neurobiology of Aging*, 23(5), 719-735.

Esterbauer, H., Dieber-Rotheneder, M., Striegl, G., & Waeg, G. (1991). Role of vitamin E in preventing the oxidation of low density lipoprotein. *American Journal of Clinical Nutrition*, 53, 314S-321S.

Eustache, F., Rioux, P., Desgranges, B., Marchal, G., Petit-Taboue, M.C., Dary, M., Lechevalier, B., & Baron, J.C. (1995). Healthy aging, memory subsystems and regional cerebral oxygen consumption. *Neuropsychologia*, 33 (7), 867-887.

Evans, H. J. (1990). Cytogenetics: overview. En M. L. Mendelson, y R. J. Albertini (Eds.). *Metabolism Testing Methods and Chromosomes*. New York: Wiley Liss.

Fagan, J.F. (1970). Memory in infants. *Journal of Experimental Child Psychology*, 9, 217-226.

Failla, G. (1960) The aging process and somatic mutation. En B.L. Strehler (Ed.). *The Biology of Aging*. Washington, D.C: American Institute of Biological Sciences.

Fantz, R. L. (1964). Visual experience in infants. Decrease attention to familiar pattern relative to novel ones. *Science*, 146, 668-670.

Ferns, G.A. & Lamb, D.J. (2004). What does the lipoprotein oxidation phenomenon mean? *Biochemical Society Transactions*, 32(Pt 1), 160-163.

Ferraro, F.R., & Moody, J. (1996). Consistent and inconsistent performance in young and elderly adults. *Developmental Neuropsychology*, 12, 429-452.

Ferris, S., Crook, T., Sathanathan, G., & Gershon, S. (1976). Reaction time as a diagnostic measure in senility. *Journal of the American Geriatrics Society*, 24 (12), 529-533.

Fleischman, D. A., Gabrieli, J. D., Reminger, S., Rinaldi, J., Morrell, F., & Wilson, R. (1995) Conceptual priming in perceptual identification for patients with Alzheimer's disease and

a patient with right occipital lobectomy. *Neuropsychology*, 9, 187-197.

Fleming, J. E., Meinikoff, P. S., Latter, G. T., Chandra, D., & Bensch, K. G. (1986). Age-dependent changes in the expression of *Drosophila* mitochondrial proteins. *Mechanisms of Ageing and Development*, 34, 63.

Fleming, J. E., Miquel, J., Cottrell, S. F., Yengoya, L. A., & Economos, A. C. (1982). Is aging caused by respiration dependent injury to the mitochondrial genome? *Gerontology*, 28, 44-53.

Flohe, L., Brigelius-Flohe, R., Saliou, C., Traber, M. G., & Packer, L. (1997). Redox regulation of NF-kappa B activation. *Free Radical Biological Medicine*, 22, 1115-1126.

Floyd, R. A. (1984). Free radicals in molecular biology, aging and disease. In D. Armstrong (Ed.). New York: Raven Press.

Floyd, R.A., & Hensley, K. (2002). Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiology of Aging*, 23 (5), 795-807.

Forster, M.J., Dubey, A., Dawson, K.M., Stutts, W.A., Lal, H., & Sohal, R.S. (1996). Age-related losses of cognitive function and motor skills in mice are associated with oxidative protein damage in the brain. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the U. S. A.*, 93(10), 4765-4769.

Fraser HB, Khaitovich P, Plotkin JB, Paabo S, Eisen MB.(2005). Aging and gene expression in the primate brain. *PLoS Biology*, 3(9), e274.

Freedman, R., Hoffer, B.J., Puro, D., & Woodward, D.J. (1976). Noradrenaline modulation of the responses of the cerebellar Purkinje cell to afferent synaptic activity. *British Journal of Pharmacology*, 57(4), 603-605.

Frick, K.M., Baxter M.G., Markowska, A.L., Olton, D.S., & Price, D.L. (1995). Age-related spatial reference and working memory deficits assessed in the water maze. *Neurobiology of Aging* 16(2), 149-160.

Fridovich, I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry*. 64, 97-112.

Frolkis, V. V. (1982). *Aging and life-Prolonging Processes*. New York: Springer-

Verlag.

Fukagawa, N.K., Timblin, C.R., Buder-Hoffman, S., & Mossman, B.T. (2000). Strategies for evaluation of signaling pathways and transcription factors altered in aging. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2 (3), 379-389.

Fukumoto, L.R., & Mazza, G. (2000). Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48, 3597-3604.

Fuster, J.M. (1989). *The prefrontal cortex. Anatomy, physiology and neuropsychology of the frontal lobes* (2nd ed.). New York: Raven Press.

Gabriel, C., Justicia, C., Camins, A., & Planas, A. M. (1999). Activation of nuclear factor-kB in rat brain after transient focal ischemia. *Molecular Brain Research*, 65, 61-69.

Gallagher, M., Burwell, R., & Burchinal, M. (1993). Severity of spatial learning impairment in aging: development of a learning index for performance in the Morris water maze. *Behavioral Neuroscience*, 107 (4), 618-626.

Gallagher, M. & Rapp, P. R. (1997). The use of animal models to study the effects of aging on cognition. *Annual Review of Psychology*, 48, 339-370.

Galli, R.L., Casadesus, G., Rottkamp, C., Shukitt-Hale, B., Denisova, N.A., & Smith, M.A. (2000). Immunocytochemical effects in the brains of blueberry supplemented rats showing reversals of age-related cognitive and motor deficits. *Society of Neuroscience Abstracts*, 26, 2078.

Galli, R.L., Shukitt-Hale, B., Youdim, K.A., & Joseph, J.A. (2002). Fruit polyphenolics and brain aging. Nutritional interventions targeting age-related neuronal and behavioral deficits. *Annals of the New York Academic of Science*, 959, 128-132.

Gao, L., & Mazza, G. (1994). Quantitation and distribution of simple and acylated anthocyanins and other phenolics blueberries. *Journal of Food Science*, 59, 1057-1059.

Gao, L., & Mazza, G. (1995). Characterization of acylated anthocyanins in lowbush blueberries. *Journal of Liquid Chromatography*, 18, 245-259.

Gao, J.H., Parsons, L.M., Bower, J. M., Xiong, J., Li, J., & Fox, P.T. (1996). Cerebellum implicated in sensory acquisition and discrimination rather than motor control.

Science, 272, 545-547.

Gill, N., & Josman, N. (2001) Memory and metamemory performance in Alzheimer's disease and healthy elderly: the Contextual Memory Test (CMT). *Aging* 13, 309-315

Goldstein, S., Wojtyk, R. I., Harley, C. B., Pollard, J. W., Chamberlain, J. W., & Stanners, C. P. (1985). Protein synthetic fidelity in aging human fibroblasts. En D. Salk, Y. Fujiwara, y G. W. Martin (Eds.). *Werners Syndrome and Human Aging*, New York: Plenum Press.

Goodwin, J.S., & Brodwick, M. (1995). *Clinical Geriatric Medicine*, 11, 577-589.

Gould, E., Beylin, A., Tanapat, P., Reeves, A., & Shors, R.J. (1999). LeRNAing enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nature Neuroscience*, 2, 260-265.

Grady, C.L., Maisog, J.M., Horwitz, B., Ungerleider, L.G., Mentis, M.J., Salerno, J.A., Pietrini, P., Wagner, E., & Haxby, J.V. (1994). Age-related changes in cortical blood flow activation during visual processing of faces and location. *Journal of Neuroscience*, 3 Pt 2, 1450-1462.

Grafman, J., Holyoak, K., & Boller, F. (1995). Structure and functions of the human prefrontal cortex. Vol 769. New York: New York Academy of Sciences.

Greider, C.W., & Blackburn, E.H. (1996). Telomeres, telomerase and cancer. *Scientific American*, 274(2),92-97.

Grimble, R.F. (1997). Effect of antioxidative vitamins on immune function with clinical applications. *International Journal of Vitamin Nutrition Research*, 67, 312-320.

Guerrero-lechuga, A., Dorado-Martinez, C., Rodriguez, A., Pedroza-Rios, Borgonio-Perez, G., & Rivas-Arancibia, S. (1999). Effects of vitamin E on ozone-induced memory and lipid peroxidation in rats. *NeuroReport*, 10, 1689-1692.

Guerrini, L., Blasi, F., & Denis-Donini, S. (1995). Synaptic activation of NFkB by glutamate in cerebellar granule neurons in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America*, 92, 9077-9081.

Gunderson, V.M., & Sackett, G.P. (1984). Developmental of pattern recognition in infant pigtailed macaques. *Developmental Psychology*, 20, 418-426.

Guo, Q., Robinson, N., & Mattson, M. P. (1998). Secreted APPa counteracts the proapoptotic action of mutant presenilin-1 by activation of NF- κ B and stabilization of calcium homeostasis. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 12341-12351.

Halliwell, B. (1989). Free radicals, reactive oxygen species, and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *British Journal of Experimental Pathology*, 70, 737-757.

Halliwell, B. (1997). Antioxidants and human disease. *Nutritional Review*, 55, S44-S52.

Halliwell, B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. *American Journal of Medicine*, 91, 14S-22S.

Halliwell, B., & Gutteridge, J.M. (1985). Oxygen radicals and the nervous system. *Trends in Neuroscience*, 6, 22-26.

Halvorsen, B.L., Holte, K., Myhrstad, C.W., Barikmo, I., Hvattum, E., Rember, S.F., Wol, A., Haffner, K., Bugerod, H., Andersen, L.F., Moskaug, J.O., Jacobs, D.R., & Blomhoff, R. (2001). A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *Journal of Nutrition*, 132, 461-471.

Hamilton, M.L., Van Remmen, H., Drake, J.A., Yang, H., Guo, Z.M., Kewitt, K., Walter, C.A., & Richardson, A. (2001). Does oxidative damage to DNA increase with age? *Proceedings of the National Academy of Science*, 18, 10469-10474.

Harman, D. (1956). Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology*, 11, 68-94.

Harman, D. (1992). Free radical theory of aging. *Mutation Research*, 275, 257-266.

Hamilton, M. L., Van Remmen, H., Drake, J. A., Yang, H., Guo, Z. M., Kewitt, K., Walter, C. A., & Richardson, A. (2001). Does oxidative damage to DNA increase with age? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98 (18), 10469-10474.

Havsteen, B. (1983). Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemical Pharmacology*, 32 (7), 1141-1148.

Hawkins, H.L., Kramer, A.F., & Capaldi, D.(1992). Aging, exercise, and attention. *Psychology and Aging*, 7 (4), 643-653.

Hayflick, L.H. (1994). *How and why do we age*. Nueva York: Random House.

Hayflick, L.H. (1997). Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry*, 62, 1180-1190.

Hayflick, L.H., & Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25, 585-621.

Heaton, R.K., Grant, I., & Matthews, C.G. In Grant and K.M. Adams (Eds.), *Neuropsychiatric Disorders*, Oxford University Press, 100-120, 1986.

Hebert, L.E., Scherr, P.A., Beckett, L.A., Albert, M.S., Pilgrim, D.M., Chown, M.J., Funkenstein, H.H., & Evans, D.A. (1995). Age-specific incidence of Alzheimer's disease in a community population. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 273(17), 1354-1359.

Heilbronn, L.L., and Ravussin, E. (2003) Calorie restriction and aging: review of the literature and implications for studies in humans. *American Journal of Clinical Nutrition* 78, 361-369.

Heinonen, I., Meyer, A.S., & Frankel, E.N. (1998). Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46, 4107-4112.

Helenius, M., Krylenko, S., Vehvilainen, P., & Salminen, A. (2001). Characterization of aging –associated up-regulation of constitutive Nuclear Factor-kappa B binding activity. *Antioxidants and Redox Signaling*, 3(1), 147-156.

Hensley, K., Hall, N., Subramaniam, R., Cole, P., Harris, M., Aksenov, M., Aksenova, M.,

Gabbita, S.P., Wu, J.F., & Carney, J.M. (1995). Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation. *Journal of Neurochemistry*, 65(5), 2146-2156.

Hermann, T., Bahr, E., Bremmer, B., & Ellen, P. (1982). Problem solving in the rat:

stay vs shift solutions on the three-table task. *Animal Learning & Behavior*, 10, 39-45.

Hertog, M. G. L., Feskens, E. J. M., Hollman, P. C. H., Katan, M. B., & Kromhout, D. (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *Lancet*, 342, 1007-1011.

Hihi, A.K., Michalik, L., & Wahli, W. (2002). PPARs: transcriptional effectors of fatty acids and their derivatives. *Cell Molecular Life Science*, 59(5), 790-798.

Hodis, H. N., Mack, W. J., LaBree, L., Cashin-Hemphill, L., Sevanian, A., Johnson, R., & Azen, S. P. (1995). Serial coronary angiographic evidence that antioxidant vitamin intake reduces progression of coronary artery arteriosclerosis. *Journal of the American Medical Association*, 273, 1849-1854.

Hoidal, J.R., Fox, R.B., LeMarbre, P.A., Perri, R. & Repine, J.E. (1981) Altered oxidative metabolic responses in vitro of alveolar macrophages from asymptomatic cigarette smokers. *American Review of Respiratory Diseases*, 123, 85-89.

Horn, J.L. (1978). Human ability systems. In P.B. Baltes (Ed.), *Life span development and Behavior Volume 1* (pp. 211-256). Nueva York: Academic Press.

Hosbach, M.A. ,& Kubil, E. (1979). Transfer RNA in aging *Drosophila* extent of aminoacylation. *Mechanism of Ageing and Development*, 10, 131.

Hughes, K. (1995). Diet and coronary heart disease--a review. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore*, 24 (2), 224-229.

Hunot, S., Brugg, B., Ricard, D., Michel, P. P., Muriel, M. P., Ruberg, M., Fucheux, B. A., Agid, Y., & Hirsch, E. C. (1997). Nuclear translocation of NF- κ B is increased in dopaminergic neurons of patients with Parkinson disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 7531-7536.

Huppert, F.A. (1991). Age-related changes in memory: learning and remembering new information. In F. Boller & J. Grafman (Eds). *Handbook of Neuropsychology*, vol 5, 123-147. Elsevier, Amsterdam.

Ishige, K., Schubert, D., & Sagara, Y. (2001). Flavonoids protect neuronal cells from

oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free radical biology & medicine*, 30 (4), 433-446.

Izzotti, A., Cartiglia, C., Taningher, M., De Flora, S., & Balansky, R. (1999). Age-related increases of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and DNA-protein crosslinks in mouse organs. *Mutation Research*, 446, 215-223.

Jackson, G.R., Werrbarck-Perez, K., & Pan, Z. (1994). Neurtrophin regulation of energy homeostasis in the central nervous system. *Developmental Neuroscience*, 16, 364-390.

Johnson, F.B., Marciniak, R.A., & Guarente, L. (1998). Telomeres the nucleolus and aging. *Current Opinions in Cell Biology*, 10, 332-338.

Joseph, J.A., Denisova, N.A., Arendash, G., Gordon, M., Diamond, D., Shukitt-Hale, B., Morgan, D. (2003). Blueberry supplementation enhances signaling and prevents behavioral deficits in an Alzheimer disease model. *Nutritional Neuroscience*, 6 (3), 153-162.

Joseph, J.A., Denisova, N., Bielinski, D., Fisher, D.R., & Shukitt-Hale, B. (2000). Oxidative stress protection and vulnerability in aging: putative nutritional implications for intervention. *Mechanism of Ageing and Development*, 116 (2-3), 141-53.

Joseph, J.A., Denisova, N., Fisher, D., Shukitt-Hale, B., Bickford, P., Prior, R., & Cao, G. (1998a). Age-related neurodegeneration and oxidative stress. Putative Nutritional Intervention. *Neurologic Clinics of North America*, 16(3), 747-752.

Joseph, J.A., Denisova, N., Fisher, D., Shukitt-Hale, B., Bickford, P., Prior, R., & Cao, G. (1998b). Membrane and receptor modifications of oxidative stress vulnerability in aging. Nutritional considerations. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 854, 268-76.

Joseph, J.A., Denisova, N., & Villalobos-Molina, R., (1996). Oxidative stress and age-related neuronal deficits. *Molecular Chemical Neuropathology*, 38, 35-37.

Joseph, J.A., Erat, S., Denisova, N., & Villalobos-Molina, R. (1998c). Receptor- and age-selective effects of dopamine oxidation on receptor-G protein interactions in the striatum. *Free Radical Biological Medicine*, 24(5), 827-834.

Joseph, J.A., Shukitt-Hale, B., Denisova, N., Prior, R., Cao, G., Martin, A.,

Taghialatela, G., & Bickford, P.C. (1998). Long-term dietary strawberry, spinach, or vitamin E supplementation retards the onset of age-related neuronal signal transduction and cognitive behavioral deficits. *The Journal of Neuroscience*, 18(19), 8047-8055.

Joseph, J.A., Shukitt-Hale, B., Denisova, N., Bielinski, D., Martin, A., McEwen, J.J., & Bickford, P.C. (1999). Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive, and motor behavioral deficits with blueberry, spinach, or strawberry dietary supplementation. *The Journal of Neuroscience*, 19(18), 8114-8121.

Joseph, J.A., Strain, J.G., Jimenez, N.D., & Fisher, D. (1997). Oxidant injury in PC12 cells, a possible model of calcium "deregulation" in aging. Selectivity of protection against oxidative stress. *Journal of Neurochemistry*, 69, 1252,1258.

Joseph, J.A., Villalobos -Molina, Denisova, N. Erat, S., Jimenez, N.D., & Strain, J. (1996). Increased sensitivity to oxidative stress and the loss of muscarinic receptor responsiveness in senescence. Free radicals in aging and neurodegenerative disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 112-119.

Joubert, A., & Vauclair, J. (1986). Reaction to novel objects in a troop of guinea baboons, approach and manipulations. *Behaviour*, 96, 92-104.

Joyce, C. A., Paller, K. A., McIsaac, H. K. & Kutas, M. (1998). Memory changes with normal aging: behavioral and electrophysiological measures. *Psychophysiology* 35, 669-678.

Kagawa, Y. (1978). Impact of westernization on the nutrients of Japanese:change in physique, cancer, longevity, and centenarians. *Preventive Medicine*, 7, 127-130.

Kalt, W., Forney, C.F., Martin, A., & Prior, R.L. (1999). Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 47(11), 4638-44.

Kalt, W., & McDonald, J.E. (1996). Chemical composition of lowbush blueberry cultivars. *Journal of the American Society of Horticultural Sciences*, 121, 142-146.

Kaltschmidt, C., Kaltschmidt, B., & Baeuerle, P. A. (1993). Stimulation of ionotropic glutamate receptors activates transcription factor NF-kB in primary neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 9618-9622.

Kaltschmidt, B., Uherek, M., Volk, B., Baeuerle, P. A., & Kaltschmidt, C. (1997). Transcription factor NF- κ B is activated in primary neurons by amyloid β peptides and in neurons surrounding early plaques from patients with Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 2642-2647.

Kandel, E.R.(1997). *Cerebro y Conducta*. En E.R. Kandel, J.H.Schwartz, & T.M. Jessell (Eds.) *Neurociencia y Conducta*, Prentice Hall, Madrid, España

Kanowski, S., Herrmann, W.M, Stephan, K., Wierich, W., & Horr, R. (1996). Proof of efficacy of the ginkgo biloba special extract EGb 761 in outpatients suffering from mild to moderate primary degenerative dementia of the Alzheimer type or multi-infarct dementia. *Pharmacopsychiatry*, 29 (2), 47-56.

Kanowski, S. & Hoerr, R. (2003). Ginkgo biloba extract EGb 761 in dementia: intent-to-treat analyses of a 24-week, multi-center, double-blind, placebo-controlled, randomized trial. *Pharmacopsychiatry*, 36 (6), 297-303.

Kanungo, M. S. (1975). A model for ageing. *Journal of Theory in Biology*, 53, 290.

Kanungo, M. S. & Gandhi, B. S. (1972). Induction of malate dehydrogenase isoenzymes in livers of young and old rats. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 69, 2035.

Karin, M. (1998). New twists in gene regulation by glucocorticoid receptor: DNA binding dispensable?. *Cell*, 93, 487-490.

Kato Y, Maruyama W, Naoi M, Hashizume Y, Osawa T. (1998). Immunohistochemical detection of dityrosine in lipofuscin pigments in the aged human brain. *FEBS Letter*, 439(3), 231-234.

Kaufmann, J.A., Bickford, P.C., & Tagliatela, G. (2001). Oxidative-stress-dependent up regulation of Bcl-2 expression in the central nervous system of aged Fisher-344 rats. *International Society for Neurochemistry, Journal of Neurochemistry*, 76, 1099-1108.

Kaufmann, J.A., Bickford, P.C., & Tagliatela, G. (2002). Free radical-dependent

changes in constitutive Nuclear factor kappa B in the aged hippocampus. *Neuroreport*, 13 (15), 1917-1920.

Kausler, D.H. (1994). *LeRNAing and Memory in Normal Aging*. San Diego: Academic Press.

Kawano, T., Ito, Y., Ishiguro, M., Takuwa, K., Nakajima, T., & Kimura, Y. (2000). Molecular cloning and characterization of a new insulin/IGF-like peptide of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 273, 431-436.

Keele, S.W. & Ivry, R. (1990). Does the cerebellum provide a common computation for diverse tasks? A timing hypothesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 608, 179-207. Keller, J.N. (2005). Age-related neuropathology, cognitive decline, and Alzheimer's disease. *Ageing Research Reviews*, 5(1), 1-13.

Kermis, M.D. (1983). *The Psychology of Human Aging: Theory, Research and Practice*, Boston: Allyn and Bacon.

Kerppola, T., & Curran, T. (1995). Transcription, Zen and the art of Fos and Jun. *Nature*, 373, 199-200.

Kihara, T., & Shimohama, S. (2004). Alzheimer's disease and acetylcholine receptors. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 64(1), 99-105.

Kim, G.W. & Chan, P.H. (2001). Oxidative stress and neuronal DNA fragmentation mediate age-dependent vulnerability to the mitochondrial toxin, 3-nitropropionic acid, in the mouse striatum. *Neurobiology Disease*, 8(1), 114-126.

Kim, H. J., Jung, K. J., Yu, B. P., Cho, C. G., Choi, J. S., & Chung, H. Y. (2002). Modulation of redox-sensitive transcription factors by calorie restriction during aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, 123 (12), 1589-1595.

Kim, S.G., Ugurbil, K., & Strik, P. L. (1996). Activation of a cerebellar output nucleus during cognitive processing. *Science*, 265, 949-951.

Kim, J.D., Yu, B.P., McCarter, R. J., Lee, S., & Herlihy, J. (1996). Exercise and diet

modulated cardiac lipid peroxidation and anti-oxidant defences. *Free Radicals Biological Medicine*, 20, 83-88.

Kinsella, J. E., Frankel, E., German, B., & Kanner, J. (1993). Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Technology*, 85-89.

Kirkwood, T. B. L. (1988). The nature and causes of ageing. In *Research and the Ageing Population*, CIBA Foundation Symposium 134. (pp. 193-207). Chichester: Wiley.

Knight, J. A. (2001). The biochemistry of aging. *Advances in Clinical Chemistry*, 35, 1-62.

Koizumi, A., Weindruck, R., & Walford, R.L. (1987). Influences of dietary restriction and age on liver enzyme activities and lipid peroxidation in mice. *Journal of Nutrition*, 117, 361-367.

Korhonen, P., Helenius, M., and Salminen, A. (1997) Age-related changes in the regulation of transcription factor NF-kappa B in rat brain. *Neuroscience Letter* 225, 61-64.

Kowald, A., & Kirkwood, T.B. (1996). A network theory of ageing: the interactions of defective mitochondria, aberrant proteins, free radicals and scavengers in the ageing process. *Mutation Research*, 316, 209-236.

Knekt, P., Jarvinen, R., Reunanen, A., & Maatela, J. (1996). Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *British Medical Journal*, 312, 478-481.

Kramer, A.F., Humphrey, D.G., Larish, J.F., Logan, G.D., & Strayer, D.L. (1995). Aging and inhibition: beyond a unitary view of inhibitory processing in attention. *Psychology and Aging*. 9 (4), 491-512.

Krischer, S.M., Eisenmann, M., Bock, A., & Mueller, M.J. (1997). Protein-facilitated export of arachidonic acid from pig neutrophils. *The Journal of Biological Chemistry*, 272 (16), 10601-10607.

Kristal, B. S., & Yu, B. P. (1992). An emerging hypothesis synergistic induction of aging by free radicals and maillard reactions. *Journal of Gerontology*, 47 (4), B107-B114.

La Rue, A., Koehler, K.M., Wayne, S.J., Chiulli, S.J., Haaland, K.Y., & Garry, P.J. (1997). Nutritional status and cognitive functioning in a normally aging sample: a 6-y

reassessment. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 65(1):20-9.

Labouvie-Vief, G. (1992). A neo-Piagetian perspective on adult cognitive development. En R. J. Sternberg y C. A. Berg (Eds.). *Intellectual Development*. Cambridge: Cambridge University Press.

Lajoie, Y., Teasdale, N., Bard, C., & Fleury, M. (1996). Upright standing and gait: Are there changes in attentional requirements related to normal aging?. *Experimental Aging Research*, 22, 185-198.

Lammeli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

Larrea, F., & Chirinos, M. (2003). The control of gene transcription by steroid hormones: contributions of molecular biology to reproductive medicine. *Revista de Investigación Clínica; Organo del Hospital de Enfermedades de la Nutrición*, 55 (2), 148-54.

LaRue, A. (1992). Adult Development. En A. E. Puente & R. J. Mc Caffrey (Eds). *Handbook of Neuropsychological assessment: a Biopsychosocial perspective*, Plenum, New York.

Lau, F.C., Shukitt-Hale, B., & Joseph, J.A. (2005). The beneficial effects of fruit polyphenols on brain aging. *Neurobiology of Aging*, 26 Suppl 1, 128-132. Lavrovsky, Y., Chatterjee, B., Clark, R. A., & Roy, A. K. (2000). Role of redox-regulated transcription factors in inflammation aging and age-related diseases. *Experimental Gerontology*, 35, 521-532.

Lazaris, A., Cassel, S., Stemmelin, J., Cassel, J.C., & Kelche, C. (2003). Intraatrial infusions of methoctramine improve memory in cognitively impaired aged rats. *Neurobiology of Aging*, 24 (2), 379-383.

Lee, A.C., Rahman, S., Hodge, J.R., Sahakian, B.J. and Graham, K.S. (2003) Associative and recognitions memory for novel objects in dementia: implications for diagnosis. *European Journal of Neuroscience* 18, 1660-1670.

Lee, C.K., Weindruch, R., & Prolla, T.A. (2000). Gene expression profile of the aging brain in mice. *Nature Genetics*, 25, 294-297.

Leiner, H.C., Leiner, A.L., & Dow, R.S. (1986). Does the cerebellum contribute to

mental skills? *Behavioral Neuroscience*, 100, 443-454.

Leiner, H.C., Leiner, A.L., & Dow, R.S. (1989). Reappraising the cerebellum: what does the hindbrain contribute to the forebrain? *Behavioral Neuroscience*, 103, 998-1008.

Lekeu, F., Van der Linden, M., Degueldre, D., Lemaire, C., Luxen, A., Franck, G., Moonen, G. & Salmon, E. (2003) Effects of Alzheimer's disease on the recognition of novel versus familiar words: neuropsychological and clinico-metabolic data. *Neuropsychology* 17, 143-154.

Lewis, S.M., Johnson, Z.J., Mayhugh, M.A., & Duffy, P.H. (2003). Nutrient intake and growth characteristics of male Sprague-Dawley rats fed AIN-93M purified diet or NIH-31 natural-ingredient diet in a chronic two-year study. *Aging Clinical and Experimental Research*, 15 (6),460-468.

Li, N., & Karin, M. (1999). Is NFkB the sensor of oxidative stress? *The FASEB Journal*, 13, 1137-1143.

Li, K.Z., & Lindenberger, U. (2002). Relations between aging sensory/sensorimotor and cognitive functions. *Neuroscience Biobehavioral Review*, 26 (7), 777-783.

Li, X., & Stark, G. R. (2002). NFkB-dependent signaling pathways. *Experimental Hematology*, 30, 285-296.

Li, D., Zhang, W., Zhu, J., Chang, P., Sahin, A., Singletary, E., Bondy, M., Hazra, T., Mitra, S., Lau, S.S., Shen, J., & DiGiovanni, J. (2001). Oxidative DNA damage and 8-hydroxy-2-deoxyguanosine DNA glycosylase/apurinic lyase in human breast cancer. *Molecular Carcinogenic*, 31 (4), 214-223.

Lippa, A.S., Pelham, R.W., Beer, B., Critchett, D.J., Dean, R.L., Bartus, R.T.(1980). Brain cholinergic dysfunction and memory in aged rats. *Neurobiology of Aging*, 1(1), 13-19.

Lindenberger, U., & Baltes, P. (1997). Intellectual functioning in old and very old age: Cross-sectional results from the Berlin Aging Study. *Psychology and Aging*, 12, 410-432.

Lindenberger, U., Mayr, U., & Kliegl, R. (1993). Speed and intelligence in old age. *Psychology and Aging*, 8 (2), 207-220.

Madden, D. J., Turkington, T.G., Coleman, R.E., Provenzale, J.M., DeGrado, T.R., & Hoffman, J.M. (1996). Adult age differences in regional cerebral blood flow during visual world identification: evidence from H215O PET. *Neuroimage*, 3(2), 127-142.

Maines, M. D. (1997). The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 37, 517-554.

Makinodan, T., & Kay, M. M. B. (1983). Age influence on the immune system. *Advance Immunology*, 29, 287.

Malamut, B.L., Saunders, R.C., & Mishkin, M. (1984). Monkeys with combined amygdalo-hippocampal lesions succeed in object discrimination leRNAing despite 24-hour intervals. *Behavioral Neuroscience*, 98, 759-769.

Malin, D.H., Toups, P.J., Osgood, L.D., Fowler, D. E., Hunter, C.L., Arcangeli, K. R., & Moss, D. E. (1990). Methanesulfonyl fluoride enhances one-trial reward leRNAing in mid-aged rats. *Neurobiology of Aging*, 12, 181-183.

Malin, D.H., Novy, B. J., Lett Brown A., Plotner, B., May, B., Radulescu, S., Crothers, M.K., Osgood, L., & Lake, J.R. (1992). Galanin attenuates retention of one-trial reward leRNAing. *Life Sciences*, 50, 939-944.

Malin, D. H., Plotner, R., Radulescu, S., Ferebee, R. N., Lake, J. R., Negrete, P., Schaefer, P., Crothers, M., & Moss, D. (1993). Chronic mehtanesulfonyl fluoride enhances one-trial per day reward leRNAing in aged rats. *Neurobiology of Aging*, 14, 393-395.

Malin, D.H., Crothers, M.K., Lake, J.R., Goyarzu, P., Plotner, R.E., Garcia, S., Spell, B., Giordano, T., & Kowall, N. W. (2001). Hippocampal Injections of Amyloid Beta-Peptide 1-40 impair subsequent one-trial per day reward leRNAing. *Neurobiology of LeRNAing and Memory*, 76, 125-137.

Manns, J.R., Stark, C. E. L., & Squire, L. R. (2000). The visual paired-comparison task as a measure of declarative memory. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 97, 12375-12379.

Märien, P., Saerens, J., Nanhoe, R., Moens, E., Nagels, G., & Pickut, B.A. (1996). Cerebellar induced aphasia: case report of cerebellar induced prefrontal aphasic language

phenomena supported by SPECT findings. *Journal of Neuroscience*, 144, 13-34.

Markowska, A.L., Stone, W.S., Ingram, D.K., Reynolds, J., Gold, P.E., Conti, L.H., Pontecorvo, M.J., Wenk, G.L., & Olton, D.S. (1989). Individual differences in aging: behavioral and neurobiological correlates. *Neurobiology of Aging*, 10, 31-43.

Martin, G. M., Spregue, C. A., & Epsteins, C. J. (1970). Replicative lifespan of cultivated human cells. Effects of donor's, age, tissue and genotype. *Laboratory Investigations*, 23, 86-92.

Masoro, E.J. (1990). Assessment of nutritional components in prolongation of life and health by diet. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine*, 193 (1), 31-34.

Mattson, M.P. (2000). Neuroprotective signaling and the aging brain: take away my food and let me run. *Brain Research*, 886 (1-2), 47-53.

Mattson, M.P., & Camandola, C. (2001). NF κ B in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *The Journal of Clinical Investigation*, 107 (3), 247-254.

Mattson, M.P., Chan, S.L., & Duan, W. (2002). Modification of brain aging and neurodegenerative disorders by genes, diet, and behavior. *Physiological Reviews*, 82 (3), 637-672.

Mattson, M.P., Culmsee, C., Yu, Z., & Camandola, S. (2000). Roles of nuclear factor kappaB in neuronal survival and plasticity. *Journal of Neurochemistry*, 74, 443-456.

Mattson, M. P., Duan, W., Lee, J., & Guo, Z. (2000). Suppression of brain aging and neurodegenerative disorders by dietary restriction and environmental enrichment: molecular mechanisms. *Mechanisms of Ageing and Development*, 122, 757-778.

Mattson, M.P. & Meffert, M.K. (2006). Roles of NF- κ B in nerve cell survival, plasticity, and disease. *Cell Death and Differentiation*, 13, 852-860.

Maynard-Smith, J. (1996). Theories of aging. In P. L. Krohn (Ed.). *Topics in Biology of Aging*. New York: Interscience.

Mayne, S.T. (1996). Beta-carotene, carotenoids, and disease prevention in humans. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 10 (7), 690-701.

Mazza, G., Kay, C.D., Cottrell, T., & Holub, B.J. (2002). Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (26), 7731-7717.

Mazza, G., & Miniati, E. (1993). *Anthocyanins in Fruits and Vegetables, and Grains*. CRC Press, Boca Raton, FL: Chapter 4, pp 85-130.

McCay, C.M., Crowell, M.F., & Maynard, L.A. (1989). The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. 1935. *Nutrition*, 5 (3), 155-171.

McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, 244, 6049-6055.

McDonald, L., & Stuart-Hamilton, I. (2000). The meaning of life: animism in the classificatory skills of older adults. *The International Journal of Aging & Human Development*, 51 (3), 231-242.

McDonald, L., & Stuart-Hamilton, I. (1996). Older and more moral?--age-related changes in performance on Piagetian moral reasoning tasks. *Age Ageing*. 25(5):402-404.

McDonald, R, J., & White, N.M. (1993). A triple dissociation of memory systems: Hippocampus, amygdala and dorsal striatum. *Behavioral Neuroscience*, 107, 3-22.

McGeer, P.L., & McGeer, E.G. (1995). The inflammatory response system of the brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Research Reviews*, 21, 195-218.

McKee, R.D., & Squire, L.R. (1993). On the development of declarative memory. *Journal of experimental psychology. Learning, Memory, and Cognition*, 19 (2), 397-404.

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., & Janeway, C.A. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388-394.

Medvedev, A. A. (1961). The molecular processes of aging. *Sovjet-wiss Naturwiss*, Beltv, 12, 1273.

Meister, A. (1988). Glutathione metabolism and its selective modifications, *Journal of Biological Chemistry*, 263, 13905-13908.

Meffert, M.K., Chang, J.M., Willtgen, B.J., Fanselow, M.S., & Baltimore, D. (2003). NF-kappa B functions in synaptic signaling and behavior. *Nature Neuroscience*, 6, 1072-1078.

Meydani, M. (2001). Nutrition interventions in aging and age-associated disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 928, 226-235.

Meydani, M., Lipman, R.D., Han S.N., Wu, D., Beharka, A., Martin K.R., Bronson, R., Cao, G., Smith, D., & Meydani, S.N. (1998). The effect of long term dietary supplementation with antioxidants. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 854, 352-360.

Meydani, S.N., Meydani, M., Blumberg, J.B., Leka, L.S., & Siber, G. (1998). Vitamin E supplementation enhances cell-mediated immunity in healthy elderly, a dose response study. *JAMA*, 277, 1380-1386.

Migheli, A., Cavalla, P., Piva, R., Giordana, M.T., & Schiffer, D. (1994) bcl-2 protein expression in aged brain and neurodegenerative diseases. *Neuroreport*, 5(15), 1906-1908.

Miller, R. A., & Harrison, D. E. (1984). Delayed reduction in T cell precursor frequencies accompanies diet-induced lifespan extension. *Journal of Immunology*, 136, 977-983.

Milne, G.G. (1956). Deterioration and over leRNAing. *Australian Journal of Psychology*, 8 (2), 163-172.

Minamoto, H., Tachibana, H., Sugita, M., and Okita, T. (2001). Recognition memory in normal aging and Parkinson's disease: behavioral and electrophysiologic measures. *Cognitive Brain Research* 11, 23-32.

Miquel, J., Economos, A. C., Fleming, J., y Johnson, J. R. Jr. (1980). Mitochondrial role in cell aging. *Experimental Gerontology*, 15, 575-591.

Mishkin, M. (1978). Memory in monkeys severely impaired by combined but not by separate removal of amygdala and hippocampus. *Nature*, 273(5660), 297-298.

Mishkin, M., & Murray, E.A. (1994). Stimulus recognition. *Current Opinion in Neurobiology*, 4, 200-206.

Mislin, R., & Ropartz, R., (1981). Response in mice to a novel object. *Behaviour*, 78,169-177.

Miyazawa, T., Nakagawa, K., Kudo, M., Muraishi, K., & Someya, K. (1999). Direct intestinal absorption of red fruit anthocyanins, cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3,5-diglucoside, into rats and humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (3), 1083-1091.

Moerman, A. M., Mao, X., Lucas, M. M., & Barger, S. W. (1999). Characterization of a neuronal k B binding factor distinct from NFkB. *Molecular Brain Research*, 67, 303-315.

Montuschi, P., BRNAes, P.J., & RObers, J. (2004) Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *The FASEB Journal*, 18, 1791-1800.

Morris, R.G., Garrard, P., Rawlins, J.N., & O'Keefe, J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*, 297, 681-683.

Moss, M.B., Killiany, R.J., Li, Z.C., Rosene, D.L., & Herndon, J.G. (1997) Recognition memory span in rhesus monkeys of advanced age. *Neurobiology of Aging* 18, 13-19.

Motonaga, K., Itoh, M., Hchiya, Y., Endo, A., Kato, K., Ishijura, H., Sito, Y., Mori, S., Takashima, S., & Goto, Y. (2002). Age related expression of Werner's syndrome protein in selected tissues and coexpression of transcription factors. *Journal of Clinical Pathology*, 55, 195-199.

Muldoon, M. F., & Kritchevsky, S. B. (1996). Flavonoids and heart disease. *Brithish Medical Journal*, 312, 453-459.

Murphy, E.A. (1978). Genetics of longevity in man. En E.L. Schneider (Ed.) *The Genetics of Aging*, Nueva York: Plenum Press.

Narayan, M.S., Naidu, K.A., Ravishankar, G.A., Srinivas, L., & Venkataraman, L.V. (1999). Antioxidant effect of anthocyanin on enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, 60 (1), 1-4.

National Human Genome Research Institute, DNA, ilustración detallada. En Recursos Educativos: Glosario de términos. Obtenida el 30 de julio del 2002, en <http://www.nhgri.nih.gov/Pages/Hyperion//DIR/VIP/Glossary/Illustration/dna2.shtml>.

Neisser, U. (1976). *Cognition and Reality*. San Francisco: Freeman.

Nenadic, I., Gaser, C., Volz, H.P., Rammsayer, T., Hager, F., & Sauer, H. (2003). Processing of temporal information and the basal ganglia: new evidence from fMRI. *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Experimentation Cerebrale*, 148 (2), 238-246.

Niki, E., Noguche, N., Tsuchihashi, H., & Gotoh, H. (1995). Interaction among vitamin C, vitamin E, and beta-carotene. *American Journal of Clinical Nutrition*, 62, 1322S-1326S.

Niki, E., Yamamoto, Y, Komury, E., & Sato, E. (1991). Membrane damage due to lipid oxidation. *American Journal of Clinical Nutrition*, 53, 201S-205S.

O'Keefe, J. (1979). A review of hippocampal place cells. *Progress in Neurobiology*, 13, 419-439.

O'Keefe, J., & Nadel, L. (1978). *The Hippocampus as a Cognitive Map*, Oxford University Press, (Clarendon), London.

Odin, A.P. (1997). Vitamins and antimutagens. Advantages and some possible mechanisms of antimutagenic action, 386, 39-67.

Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Essay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95, 351-358.

Okamoto K, Tanaka H, Ogawa H, Makino Y, Eguchi H, Hayashi S, Yoshikawa N, Poellinger L, Umesono K, & Makino I. (1999). Redox-dependent regulation of nuclear import of the glucocorticoid receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 274 (15),10363-10371.

Olovnikov, A. M. (1996). Telomeres, telomerase, and aging: origin of the theory. *Experimental Gerontology*, 31, 443-448.

Olton, D.S., Becker, D.T., & Handelmann, G.E. (1979). Hippocampus, space and memory. *The Behavioral and Brain Sciences*, 2, 313-322.

Olson, R.E. (1992). Vitamins and carcinogenesis, an overview. *Journal of Nutritional Sciences*, 313-316.

Omenn, G.S., Goodman, G.E. & Thornquist, M.D. (1996). Effects of a combination of

beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *New England Journal of Medicine*, 334, 1150-1155.

ONU - Consejo Económico y Social. Comité de Derechos Económicos, Sociales y Culturales. Aplicación del Pacto Internacional de derechos económicos, sociales y culturales: Observación General No. 6, 1995, E/C. 12/1995/16/Rev 1.

Orgel, L. E. (1963). The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to ageing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 49, 517-521.

Orgel, L. E. (1970). The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to ageing: A correction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76, 1476.

Packard, M.G., & Knowlton, B.J. (2002). LeRNAing and memory functions of the Basal Ganglia. *Annual Review of Neuroscience*, 25, 563-593.

Packard, M.G., & McGaugh, J.L. (1996). Inactivation of hippocampus or caudate nucleus with lidocaine differentially affects expression of place and response leRNAing. *Neurobiology of LeRNAing and Memory*, 65, 65-72.

Paganga, G., & Rice-Evans, C.A. (1997). The identification of flavonoids as glycosides in human plasma. *FEBS letters*, 401 (1), 78-82.

Pahl, H.L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kB transcription factors. *Oncogene*, 18, 6853.

Paolisso, G., Gambardella, A., Giugliano, D., Galzerano, D., Amato, L. (1995). Chronic intake of pharmacological doses of vitamin E might be useful in the therapy of elderly patients with coronary heart disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 61, 848-852.

Paolisso, G., Tagliamonte, M. R., Rizzo, M. P., Manzella, D., Gambardella, A., & Varricchio, M. (1998). Oxidative stress and advance age: results in healthy centenarians. *Journal of American Geriatric Society*, 46, 833-838.

Papalia, D.E. (1972). The status of several conservation abilities across the life-span. *Human Development*, 15, 229-243.

Parkin, A.J. (1997). Human memory: novelty, association and the brain. *Current Biology*, 7, R768-R769.

Parkin, A.J. & Walter, B.M. (1992). Recollective experience, normal aging and frontal dysfunction. *Psychology and Aging*, 7, 290-298.

Perez-Severiano F, Escalante B, Vergara P, Rios C, Segovia J. (2002). Age-dependent changes in nitric oxide synthase activity and protein expression in striata of mice transgenic for the Huntington's disease mutation. *Brain Research*, 951(1), 36-42.

Perkins, A.J., Hendrie, H.C., Callahan, C.M., Gao, S., Unverzagt, F.W., Xu, Y., Hall, K.S., & Hui, S.L. (1999). Association of antioxidants with memory in a multiethnic elderly sample using the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *American Journal of Epidemiology*, 150 (1), 37-44.

Perry, G., Cash, A.D., & Smith, M.A. (2002). Alzheimer Disease and Oxidative Stress. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2(3), 120-123.

Peters, A., Morrison, J.H., Rosene, D.F., & Hyman, B.T. (1998). Are neurons lost from the primate cerebral cortex during normal aging? *Cerebral Cortex*, 8, 295-300.

Petersen, S.E., & Fiez, J.A. (1993). The processing of single words studied with positron emission tomography. *Annual Review of Neuroscience*, 16, 509-530.

Petersen, R.C., Smith, V.C., Kokmen, E., Ivnik, R.J., & Tangalos, E.G., (1992). Memory function in normal aging. *Neurology*, 42, 396-401.

Pilotti, M., Meade, M.L. and Gallo, D.A. (2003) Implicit and explicit measures of memory for perceptual information in young adults, healthy older adults, and patients with Alzheimer's disease. *Experimental Aging Research* 29, 15-32.

Pitsikas, N., Biagini, L., & Algeri, S. (1991). Previous experience facilitates preservation of spatial memory in the senescent rat. *Physiological Behavior*, 49, 823-825.

Poynter, M. E., & Daynes, R. A. (1998). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation modulates cellular redox status, represses nuclear factor-kappa B signaling, and reduces inflammatory cytokine production in aging. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 32833-32841.

Praag, H., Van Kempermann, G., & Cage, F.H. (1999). Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature Neuroscience*, 2, 266-270.

Prior, R.L., & Cao, G. (2000). Analysis of botanicals and dietary supplements for antioxidant capacity: A review. *Journal of AOAC International*, 83 (4), 950-956.

Prior, R. L., Cao, G., Martin, A., Sofic, E., McEwen, J., O'Brien, C., N. Listener, N., Ehlenfeldt, M., Kalt, W., Krewer G., & Mainland, M. (1998). Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity and variety of *Vaccinium* species. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 46, 2586-2593.

Pryor, W.A., & Stone, K. (1993). Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate, and peroxyxynitrite. *Annals of the New York Academy of Science*, 686,12-27.

Puca, A.A., Daly, M.J., Brewster, S.J., Matise, T.C., Barrett, J. S., Shea-Drinkwater, M., Kang, S., Joyce, E., Nicoli, J., Benson, E., Kunkel., & Perls, T. A genome-wide scan for linkage to human exceptional longevity identifies a locus on chromosoma 4. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 98, 10505-10508.

Rabin, B.M., Shukitt-Hale, B., Szprengiel, A., & Joseph, J.A., (2002). Effects of heavy particle irradiation and diet on amphetamine- and lithium chloride-induced taste avoidance leRNAing in rats. *Brain Research*, 953(1-2), 31-36.

Rabbitt, P. (1975). Some experiments and a model for changes in attentional selectivity with old age. En F. Hoffmeister y C. Muller (Eds.). *Bayer Symposium VII, Evaluation of Change*. Bonn: Springer.

Rabbit, P. (1984). Memory impairment in the elderly. En P.E. Bebbington y R. Jacoby (Eds). *Psychiatric Disorders in the Elderly*. Londres: Mental Health Foundation, pp. 101-119.

Rabbitt, P. (1993). Does it all go together when it goes?. *Quarterly Journal of Experimental Psychology*, 46A, 385-434.

Rabbitt, P., & Lowe, C. (2000). Patterns of cognitive ageing. *Psychological Research* 63, 308-316.

Rabin, B.M., Shukitt-Hale, B., Szprengiel, A., & Joseph, J.A. (2002). Effects of heavy particle irradiation and diet on amphetamine- and lithium chloride-induced taste avoidance mRNA in rats. *Brain Research*, 953 (1-2), 31-36.

Rebok, G.W. (1987). *Life-Span Cognitive Development*, Nueva York: Holt, Rinehart and Winston.

Reddy-Avula, C. P., & Fernández, G. (2002). Inhibition of H₂O₂ induced apoptosis of lymphocytes by calorie restriction during aging. *Microscopy Research and Technique*, 59, 282-292.

Reed, J.M., & Squire, L.R. (1997). Impaired recognition memory in patients with lesions limited to the hippocampal formation. *Behavioral Neuroscience*, 111 (4), 667-675.

Regnier, C.H., Song, H.Y., Gao, X., Goeddel, D.V., Cao, Z., & Rothe, M. (1997). Identification and characterization of an I κ B kinase. *Cell*, 90, 373.

Renner, M. J. (1986). Experience-dependent changes in exploratory behavior in the adult rat: overall activity level and interactions with objects. *Journal Comparative Psychology*, 101, 94-100.

Renner, M.J., & Rosenzweig, M.R. (1986). Object interactions in juvenile rats: effects of different experiential histories. *Journal of Comparative Psychology*, 100, 229-236.

Rice-Evans, C., & Miller, N.J. (1996). Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochemical Society Trans*, 24, 790-795.

Rice-Evans, C., & Packer L. *Flavonoid in Health*. En M. Dekker (Ed.), *Flavonoids in Health and Disease* (pp.447-467). New York, NY: Marcel Dekker INC.

Ricote, M., Li, A.C., Willson .T.M., Kelly, C.J., & Glass, C.K. (1998). The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature*,

391(6662), 79-82.

Roberts, L.J., & Morrow, J.D. (2000). Measurement of F(2)-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radicals Biology Medicine*, 28(4), 505-513.

Rockstein, M. (1974). *Aspects of Aging*. New York: Academic Press.

Rodriguez-Capote, D., Céspedes, E., Arencibia, R., & González-Hoyuela, M. (1998). Indicadores de estrés oxidativo en el cerebro de rata durante el envejecimiento. Efecto del factor de crecimiento nervioso. *Revista de Neurología*, 27(157), 494-500.

Rogers, J., Silver, M.A., Shoemaker, W.J., & Bloom, F.E. (1980). Senescent changes in a neurobiological model system: cerebellar Purkinje cell electrophysiology and correlative anatomy. *Neurobiology of Aging*, 1(1), 3-11.

Rong, Y., & Baudry, M. (1996). Seizure activity results in a rapid induction of nuclear factor- κ B in adult but not juvenile rat limbic structures. *Journal of Neurochemistry*, 67, 662-668.

Rosene, D.L., & Van Hoesen, G.W. (1987). The hippocampal formation of the primate brain. A review of some comparative aspects of cytoarchitecture and connections. In E. G. Jones and A. Peters (Eds.), *Cerebral cortex, Vol 6: Further aspects of cortical function, including hippocampus*. New York: Plenum Press.

Roth, G.S. (1993). Are free radicals causes or effects of aging? The entropy theory. *Aging (Milano)*, 5 (3), 41-42.

Roth, G.S., Ingram, D.K., & Lane, M.A. (1999). Calorie restriction in primates: will it work and how will we know? *Journal of the American Geriatrics Society*, 47 (7), 896-903.

Rothwarf, D. M., Zandi, E., Natoli, G., & Karin, M. (1998). IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the IkappaB kinase complex. *Nature*, 395, 297-300.

Roy, A. K., Oh, T., Rivera, O., Mubiru, J., Song, C.S., & Chatterjee, B. (2002). Impacts of transcriptional regulation on aging and senescence. *Ageing Research and Review*, 1(3), 367-380.

Rypman, B., & D'Eposito, M. (2000). Isolating the neural mechanisms of age-related changes in human working memory. *Nature Neuroscience*, 3, 509-515.

Sacher, G. A. (1977). Life table modification and life prolongation,. En C. E. Finch, y L. Hayflick (Eds.). New York: Van Nostrand Reinhold.

Salthouse, T. (1982). Adult Cognition. Nueva York, Springer.

Sano, M., Ernesto, C., Thomas, R.G., Klauber, M.R., Schafer, K., Grundman, M., Woodbury, P., Growdon, J., Cotman, C.W., Pfeiffer, E., Schneider, L.S., Thal. L.J. (1997). A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for AD. The Alzheimer's Disease Cooperative Study. The New England Journal of Medicine, 336 (17), 1216-1222.

Saskia, A.B.E., van Accker, y Bast, A.A.L.T. (1998). Structural Aspects of antioxidant activiy of flavonoids. En M. Dekker (Ed.), Flavonoids in health and Disease (pp.221-251). New York, NY: Marcel Dekker INC.

Scali, C., Giovannini, M.G., Bartolini, L., Prosperi, C., Hinz, V., Schmidt, B. & Pepeu, G. (1997) Effect of metrifonate on extracellular brain acetylcholine and object recogniton in aged rats. European Journal of Pharmacology 325, 173-180.

Schacter, D. L., & Tulving, E. (1983). Memory, amnesia and the episodic/semantic distinction. En R.L. Issacson & N.E. Spear (Eds.), Expression of knowledge. New York: Plenum Press.

Schreck, R., Albermann, K.J., Baeuerle, P.A. (1992). Nuclear Factor k B: an oxidative stress response transcription factor of eukaryotic cells (a review). Free Radical Research Communications, 17 (4), 221-237.

Schenk, H., Klein, M., Erdebrugger, W., & Droge, W. (1994). Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NFkB and Ap-1. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 91, 1672-1676.

Schmahmann, J.D. (1991). An emerging concept: The cerebellar contribution to higher function. Archives of Neurology, 48, 1178-1187.

Schmahmann, J.D. (2003). Cerebellum- The true thinking machine. In Squire, L.R , Bloom, F. E., McConnell, S. K., Roberts, J. L., Spitzer, N. C., & Zigmond, M.L., (Eds.). *Fundamental Neuroscience (2003)*., Academic Press, New York. 2nd Edition.

Schmitz, M. L., & Baeuerle, P. A. (1991). The p65 subunit is responsible for the strong activating potential of NF-kB. *EMBO Journal*, 10, 3805-3817.

Schmoll, H.J., Tewes, U., & Plotnikoff, N.P. (Eds.), *Psychoneuro- immunology: Interactions Between Brain, Nervous System, Behavior, Endocrine, and Immune System*, Lewiston, NY: Hogrefe and Heber, 1992.

Scoville, W.B. & Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 20, 11-21.

Segall, P. E., Timiras, P. S., & Watson, J. R. (1983). Low tryptophan diets delay reproductive aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, 23, 245.

Sen, R. & Baltimore, D. (1986). Inducibility of a k immunoglobulin enhancer-binding protein NFkB by a postranslational mechanism. *Cell*, 47, 921-928.

Shan, X.Q., Aw, T.Y., & Jones, D.P. (1990). Glutathione-dependent protection against oxidative injury. *Pharmacological Therapy*, 47, 61-71.

Sharma, R. (1994). *Theories of Aging*. En *Physiological basis of aging and geriatrics*, CRC Press Inc.

Shaulian E, & Karin, M. (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Natural Cell Biology*, 4 (5), E131-E136.

Shekelle, P.G., Morton, S.C., Jungvig, L.K., Udani, J., Spar, M., Tu, W. J., Suttorp, M., Coulter, I., Newberry, S.J., & Hardy, M. (2004). Effect of supplemental vitamin E for the prevention and treatment of cardiovascular disease. *Journal of general internal medicine: official journal of the Society for Research and Education in Primary Care Internal Medicine*, 19 (4), 380-389.

Sheldrake, A. R. (1974). The ageing, growth, and death of cells. *Nature*, 250, 381-385.

Shors, T.J., Miesegaes, G., Beylin, A., Zhao, M., Rydel, T., & Gould, E. (2001).

Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature*, 410, 372-376.

Shukitt-Hale, B., Mouzakis, G., & Joseph, J. A. (1998). Psychomotor and spatial memory performance in aging male Fischer 344 rats. *Experimental Gerontology*, 33(6), 615-624.

Shukitt-Hale, B., Casadesus, G., Cantuti-Castelvetri, I., & Joseph, J. A. (2001). Effect of age on object exploration, habituation, and response to spatial and nonspatial change. *Behavioral Neuroscience*, 115(5), 1059-1064.

Siess, H. (1991). *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*. New York: Academic Press.

Sloane, J.A., Hollander, W., Moss, M.B., Rosene, D.L., Abraham, C.R. (1999). Increased microglial activation and protein nitration in white matter of the aging monkey. *Neurobiology of Aging*, 20(4), 395-405.

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., & Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Annals of Biochemistry*, 150, 76-85.

Snider, R.S. (1950). Recent contribution to anatomy and physiology of the cerebellum. *Archives of Neurological Psychiatry*, 64, 196-219.

Socci, D.J., Crandall, B.M., & Arendash, G.W. (1995). Chronic antioxidant treatment improves the cognitive performance of aged rats. *Brain Research*, 639, 88-94.

Sohal, R. S. (1976). Metabolic rate and lifespan. In R. G. Cutler (Ed.). *Interdisciplinary Topics in Gerontology*, Vol. 9. Basel: Karger.

Sohal, R.S. (1993). The free radical hypothesis of aging: an appraisal of the current status. *Aging Clinical Experimental Research*, 5, 3-17.

Sohal, R.S., Agarwal, A., Agarwal, S., & Orr, W.C. (1995). Simultaneous overexpression of copper- and zinc- containing superoxide dismutase and catalase retards age-

related oxidative damage and increases metabolic potential in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biology and Chemistry*, 270, 15671-15674.

Sohal, R. S., RNAold, L. A., & Sohal, B. H. (1990). Aged related changes in antioxidants enzymes and pro-oxidant generation in tissues of the rat with special reference to parameters in two insect species. *Free Radical Biological Medicine*, 10, 500-505.

Sohal, R.S., Sohal, B.H., & Brunk, U.T. (1990). Relationship between antioxidant defenses and longevity in different mammalian species. *Mechanism of Ageing and Development*, 53, 217-227.

Sohal, R.S., & Weindruch, R. (1996). Oxidative stress. Caloric restriction and aging. *Science*, 273, 59-63.

Spencer, F.F., Poynter, M.E., Im, S-Y., & Daynes, R.A. (1997). Constitutive activation of NF-kappaB in an animal model of aging. *International Immunology*, 9, 1581-1588.

Squire, L.R. (1986). Mechanisms of memory. *Science*, 232, 1612-1619.

Squire, L.R. (1997). *Memory and brain*. New York: Oxford University Press.

Squire, L.R. (1987). *Prefrontal Cortex. Memory and brain*. Oxford: Oxford University Press.

Squire, L.R. (1992). Declarative and nondeclarative memory: Multiple brain systems supporting learning and memory. *Journal of Cognitive Neuroscience*, 4, 232-243.

Squire, L.R., Bloom, F. E., McConnell, S. K., Roberts, J. L., Spitzer, N. C., & Zigmond, M.L., (2003). *Fundamental Neuroscience*, (2nd ed.). New York: Academic Press.

Squire, L.R., Knowlton, B., & Musen G. (1993). The structure and organization of memory. *Annual Review of Psychology*, 44, 435-495.

Squire, L.R., & Zola-Morgan, S. (1983). The neurology of memory: the case for correspondence between the findings for human and nonhuman primates. En: *The physiological basis of memory*, Ed J.A. Deutsch JA. New York: Academic, pp199-268.

Squire, L.R., & Zola-Morgan, S. (1985). The neuropsychology of memory: new link between human and experimental animals. *Annals of the New York Academy of Science*, 444, 137-149.

Squire, L.R., & Zola-Morgan, S. (1991). The medial temporal lobe memory system. *Science*, 253, 1380-1386.

Sram, R.J., Binkiova, B., Topinka, J., Kotesovec, F., Fojtikova, I., Hanel, I., Klaschka, J., Kocisova, J., Prosek, M., & Machalek, J. (1993). Effect of antioxidant supplementation in an elderly population. In *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms III*. Bronzetti, G., (ed). Plenum Press, New York, pp.459-477.

Stadman, E. R. (1992). Protein oxidation and aging. *Science*, 257, 1220-1224.

Stenberg, R.J. (1998). A balance theory of wisdom. *Review of General Psychology*, 2, 347-365.

Stephens, N.G., Parsons, A., & Schofield, P.M. (1996). Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet*, 347, 781-786.

Spiegelman, B.M. & Flier, J.S. (1996). Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. *Cell*, 87(3), 377-389.

Stadtman, E.R., & Berlett, B.S. (1998). Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Drug Metabolism Reviews*, 30(2), 225-243.

Strehler, B.L. (1977). *Time, cells and aging*. New York: Academic Press.

Strehler, B.L., Hendley, D.D., & Hirsch, G.P. (1967). Evidence on a codon restriction hypothesis of cellular differentiation: multiplicity of mammalian leucyl-srns-specific synthetases and tissue-specific deficiency in an alanyl-srna synthetase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 57, 1751-1758.

Stuart-Hamilton, I. (2000). *The Psychology of Ageing, An Introduction*. London: Kingsley Publishers.

Stys, T., Stys, A., Kelly, P., & Lawson, W. (2004). Trends in use of herbal and nutritional supplements in cardiovascular patients. *Clinical Cardiology*, 27 (2), 87-90.

Sumien, N., Forster, M.J., & Sohal, R.S. (2003). Supplementation with vitamin E fails to attenuate oxidative damage in aged mice. *Experimental gerontology*, 38 (6), 699-704.

Suzuki, W. A., & Eichenbaum, H. (2000). The neurophysiology of memory. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 175-191.

Sweeney, M.I., Kalt, W., MacKinnon, S.L., Ashby, J., & Gottschall-Pass, K.T. (2002). Feeding rats diets enriched in lowbush blueberries for six weeks decreases ischemia-induced brain damage. *Nutritional Neuroscience* 5 (6), 427-431.

Swies, J., Robak, J., Dabrowski, L., Duniec, Z., Michalska, Z., Gryglewski, R.J. (1984). Antiaggregatory effects of flavonoids in vivo and their influence on lipoxygenase and cyclooxygenase in vitro. *Polish Journal of Pharmacology and Pharmacy*, 36 (5), 455-463.

Szilard, L. (1959). On the nature of the aging process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 45, 30.

Tagliatela, G., Kaufmann, J.A., Trevino, A., Perez-Polo, J.R. (1998). Central nervous system DNA fragmentation induced by the inhibition of nuclear factor kappa B. *Neuroreport*. 9 (3), 489-493.

Tagliatela, G., Perez-Polo, J.R., & Rassin, D.K. (1998). Induction of apoptosis in the CNS during development by the combination of hyperoxia and inhibition of glutathione synthesis. *Free Radical Biological Medicine*, 25(8), 936-942.

Tagliatela, G., Robinson, R., Perez Polo, J. R. (1997). Inhibition of nuclear factor kB activity induces nerve growth factor resistant apoptosis in PC 12 cells. *Journal of Neuroscience Research*, 47, 155-162.

Takashaki, O. (1995). Haemorrhagic toxicity of a large dose of alpha-, beta-, gamma- and delta-tocopherols, ubiquinone, beta-carotene, retinol acetate and L-ascorbic acid in the rat. *Food Chemistry Toxicology*, 33 (2), 121-128.

Thatch, W.T., Goodkin, H.P., & Keating, J.G. (1992). The cerebellum and the adaptive coordination of movement. *Annual Reviews of Neuroscience*, 15, 403-442.

Thompson, R.F. (1986). The neurobiology of l⁺RNAing and memory. *Science*, 233, 941-947.

Thompson, R.F., & Kim, J.J. (1996). Memory systems in the brain and localization of a memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93

(24), 13438-13444.

Tisserand, D.J., & Jolles, J. (2003). On the involvement of prefrontal networks in cognitive ageing. *Cortex*, 39(4-5), 1107-1128.

Toates, F.M. (1983). Exploration as a motivational and learning system: A cognitive incentive view. En J. Archer y I.A. Birke (Eds.), *Exploration in Animals and Humans*. New York: Van Nostrand Reinhold.

Toledano, M. B., & Leonard, W. J. (1991). Modulation of transcription factor NF κ B binding activity by oxidation-reduction in vitro. . *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 88, 4328-4332.

Toliver-Kinsky, T., Papaconstantinou, J., and Perez-Polo, J.R. (1997) Age-associated alterations in hippocampal and basal forebrain nuclear factor kappa B activity. *Journal of Neuroscience Research* 48, 580-587.

Toliver-Kinsky, T., Rassin, D., and Perez-Polo, J.R. (2002) NF-kappaB activity decreases in basal forebrain of young and aged rats after hyperoxia. *Neurobiology of Aging* 23, 899-905.

Tolman, E.C. (1948). Cognitive maps in rats and men. *Psychology Reviews*, 55, 189-208.

Tong, L., Toliver-Kinsky, T., Edwards, M., Rassin, D. K., Werrbach-Perez, K., & Perez-Polo, J. R. (2002). Attenuated transcriptional responses to oxidative stress in the aged rat brain. *Journal of Neuroscience Research*, 70, 318-326.

Trollet, M. R., Rudd, M. A., & Loscalzo, J. (2001). Oxidative stress and renal dysfunction in salt-sensitive hypertension. *Kidney Blood Press Research*, 24, 116-123.

Tuijapurkar, S., Li N., & Boe, C. (2000). A universal pattern of mortality decline in G/countries. *Nature*, 405,789-792.

van den Berg, R., Haenen, G. R., Van den Berg, H., & Bast, A. (2001). Transcription factor NF-kappaB as a potential biomarker for oxidative stress. *British Journal of Nutrition*, 86, S121-S127.

van der Loo B, Labugger R, Skepper JN, Bachschmid M, Kilo J, Powell JM, Palacios-Callender M, Erusalimsky JD, Quaschnig T, Malinski T, Gygi D, Ullrich V, Luscher TF. (2000). Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging. *The Journal of Experimental Medicine*, 192(12), 1731-1744.

van Dyck, C.H., Seibyl, J.P., Malison, R.T., Laruelle, M., Wallace, E., Zoghbi, S.S., Zea-Ponce, Y., Baldwin, R.M., ChRNAey, D.S., & Hoffer, P.B. (1995). Age-related decline in striatal dopamine transporter binding with iodine-123-beta-CITSPECT. *Journal of Nuclear Medicine*, 36, 1175–1181.

Vanella, A., Geremia, E., D'Urso, G., Tiriolo, P., Di Silvestro, I., Grimaldi, R., & Pinturo, R. (1983). Superoxide dismutase activities in aging brain. *Gerontology*, 38, 108-113.

Vaneste, S., & Pouthas, V., (1999). Timing in aging: the role of attention. *Experimental Aging Research*, 25, 49-67.

Vassale, C., Botto, N., Andreassi, M. G., Berti, S., & Biagini, A. (2003). Evidence for enhanced-8-isoprostane plasma levels, as index of oxidative stress in vivo, in patients with coronary artery disease. *Coronary Artery Disfunctions*, 14, 213-218.

Velioglu, Y.S., Mazza, G., Cao, L., & Oomah, B. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46, 4113-4117.

Verhaeghen, P., Vandenbroucke, A. and Dierckx, V. (1998) Growing slower and less accurate: adult age differences in time-accuracy functions for recall and recognition from episodic memory. *Experience Aging Research* 24, 3-19.

Verma, I.M., & Stevenson, J.K. (1997). I κ B kinase: beginning, not the end. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 11758-11760.

Verma, I.M., Stevenson, J.K., Schwarz, E.M., Van Antwerp D., & Miyamoto, S. (1996). Rel/ NF- κ B/I- κ B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Development*, 9, 2723-2735.

Verzar, F. (1964). Aging of the collagen fiber. *International Reviews of Connective*

Tissue Research, 2, 243-300. Academic Press: New York

Vijg, J., & Gossen, J.A. (1993). Somatic mutations and cellular aging. *Comparative Biochemical and Physiology*, 104, 429.

Volkow, N.D., Gur, R.C., Wang, G.J., Fowler, J.S., Moberg, P.J., Ding, Y.S., Hitzemann, R., Smith, G., & Logan, J. (1998). Association between decline in brain dopamine activity with age and cognitive and motor impairment in healthy individuals. *American Journal of Psychiatry*, 155, 344–349.

Vrijisen, R., Everaert, L., & Boeye, A. (1988). Antiviral activity of flavones and potentiation by ascorbate. *The Journal of General Virology*, 69 (Pt 7), 1749-1751.

Walker, R. F., & Timiras, P. S. (1982). Pacemaker insufficiency and the onset of aging. In D. O. Carpenter (Ed.). *Cellular Pacemakers*, Vol 2, pp 345, New York: John Wiley & Sons.

Wallace, J.E., Krauter, E.E., & Campbell, B.A. (1980). Animal models of declining memory in the aged: short term and spatial memory in the aged rat. *Journal of Gerontology*, 35, 355-363.

Wang, H., Cao, G., & Prior, R.L. (1996). Total antioxidant capacity of fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 01-705.

Wang, Y., Chan, G.L., Holden, J.E., Dobko, T., Mak, E., Schulzer, M., Huser, J.M., Snow, B.J., Ruth, T.J., Calne, D.B., & Stoessl, A.J. (1998). Age-dependent decline of dopamine D1 receptors in human brain: a PET study. *Synapse*, 30, 56–61.

Wang, Z., Ciabattini, G., Creminon, C., Lawson, J., Fitzgerald, G.A., Patrono, C., & MacLouf, J. (1995). Immunological characterization of urinary 8-epi-prostaglandin F2 alpha excretion in man. *Journal of Pharmacological Experimental Therapy*, 275, 94-100.

Wang, J., & Mazza, G. (2002). Inhibitory effects of anthocyanins and other phenolic compounds on nitric oxide production in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (4), 850-857.

Wang, S.Y., & Lin, H.S. (2000). Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry,

raspberry, and strawberry is affected by cultivar and maturity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48, 140-146.

Wagner, H. R. (1994). SOD, aging and degenerative diseases. *Free Radicals Biological Medicine*, 17, 249-258.

Weindruch, R., & Masoro, E. J. (1991). Concerns about rodent models for aging research. *Journal of Gerontology: Psychological Sciences*, 46B, 87-88.

Weindruch, R., & Walford, R.L. (1998). *The retardation of aging and disease by dietary restriction*. Thomas Springfield, Ill. USA.

Weschler, D.A. (1945). Standardized memory scale for clinical use. *Journal of Psychology*, 19, 87-95.

Weis, S., Klaver, P., Reul, J., Elger, C.E., & Fernández, G. (2004). Temporal and cerebellar brain regions that support both declarative memory formation and retrieval. *Cerebral Cortex*, 14(3), 256-67.

Weiskrantz, L. (1956). Behavioral changes associated with ablation of the amygdala complex in monkeys. *Journal of Comparative Physiology and Psychology*, 49, 381-391.

Wiechelmann, K., Braun, R., & Fitzpatrick, J. (1988). Investigation of the bicinchoninic acid protein assay identification of the groups responsible for color formation. *Annals of Biochemistry*, 175, 231-237.

Willet W. (1994). Coffee and coronary heart disease. A new problem with old brew? *Annals of Epidemiology*, 4(6), 497-498.

Williams, L.R. (1995). Oxidative stress, age-related neurodegeneration and the potential for neurotrophic factors. *Cerebrovascular Brain Metabolism Reviews*, 7, 55-73.

Willson, T.M., Brown, P.J., Strnabach, D.D., & Henke, B.R. (2000). The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*, 43 (4), 527-550.

Woodruff-Pak, D.S., Steinmetz, J.E., & Thompson, R.F. (1988). Classical conditioning of rabbits 2-1/2 to 4 years old using mossy fiber stimulation as a CS. *Neurobiology of Aging*, 9(2), 187-193.

Woodruff-Pak, D.S., & Thompson, R.F.(1988).Classical conditioning of the eyeblink response in the delay paradigm in adults aged 18-83 years. *Psychology of Aging*, 3(3), 219-229.

Woronicz, J.D., Gao, Z., Cao, Z., Rothe, M., & Goeddel, D. V. (1997). I κ B kinase-beta: NF κ B activation and complex formation with I κ B kinase-a and NIK. *Science*, 278, 866-869.

Yamaoka, S., Courtois, G., Bessia, C., Whiteside, S. T., Weil, R., Agou, F., Kirk, H. E., Kay, R. J., & Israel, A. (1998). Complementation cloning of NEMO, a component of the I κ B kinase complex essential for NF κ B activation. *Cell*, 93, 1231-1240.

Yang, W. K. (1971). Isoaccepting transfer RNAs in mammalian differentiated cells and tumor tissues. *Cancer Research*, 31, 639.

Yang, K., Mu, X. S., & Hayes, R. L. (1995). Increased cortical nuclear factor- κ B DNA binding activity after traumatic brain injury in rats. *Neuroscience Letters*, 197, 101-104.

Youdim, K.A., Dobbie, M.S., Kuhnle, G., Proteggente, A.R., Abbott, N.J., & Rice-Evans, C. (2003). Interaction between flavonoids and the blood-brain barrier: in vitro studies. *Journal of Neurochemistry* , 85 (1), 180-192.

Youdim, K.A. & Joseph, J.A. (2001). A possible emerging role of phytochemicals in improving age-related neurological dysfunctions: a multiplicity of effects. *Free Radical Biology & Medicine*, 30 (6), 583-594.

Youdim, K.A., Martin, A., & Joseph, J.A. (2000). Incorporation of the elderberry anthocyanins by endothelial cells increases protection against oxidative stress. *Free Radical and Biology Medicine*, 29, 51-60.

Youdim, K.A., McDonald, J., Kalt, W., & Joseph, J.A. (2002). Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults (small star, filled). *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13 (5), 282-288.

Youdim, K.A., Qaiser, M.Z., Begley, D.J., Rice-Evans, C.A., Abbott, N.J. (2004). Flavonoid permeability across an in situ model of the blood-brain barrier. *Free Radical Biology & Medicine* 36(5):592-604

Youdim, K. A., Shukitt-Hale, B., Mackinnon, S., Kalt, W & Joseph, J. A. (2000).

Polyphenolics enhance red blood cell resistance to oxidative stress: in vitro and in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1519(1), 117-122.

Youdim, K.A., Shukitt-Hale, B., Martin, A., Wang, H., Denisova, N., Bickford, P. C. and Joseph, J.A. (2000) Short-term dietary supplementation of blueberry polyphenolics: beneficial effects on aging brain performance and peripheral tissue function, *Nutritional Neuroscience* 3, 383-397.

Yu, B.P., Kan, C., Han, J., & Dim, D.S. (1998). Can antioxidant supplementation slow the aging process? *Biofactors*, 7, 93-101.

Yu, B.P., Masoro, E.J., & McMahan, C.A. (1985). Nutritional influences on aging of Fischer 344 rats: I. Physical, metabolic, and longevity characteristics. *Journal of Gerontology*, 40 (6), 657-670.

Yu, B. P., Suescun, E. A., & Yang, S. Y. (1992). Effect of age-related lipid peroxidation on membrane fluidity and phospholipase A2: modulation by dietary restriction. *Mechanisms of Ageing and Development*, 65, 17-33.

Zandi, E., Rothwarf, D.M., Delhase, M., Hayakawa, M., & Karin, M. (1997). The I κ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunit, Ikk α and IKK β , necessary for I κ B phosphorylation and NF- κ B activation. *Cell*, 91, 243.

Zhang, J.R., Andrus, P.K., & Hall, E.D. (1993). Age-related regional changes in hydroxyl radical stress and antioxidants in gerbil brain. *Journal of Neurochemistry*, 61, 1640-1647.

Zola-Morgan, S., & Squire, L.R. (1985). Medial temporal lesions in monkeys impair memory on a variety of tasks sensitive to human amnesia. *Behavioral Neuroscience*, 99, 22-34.

Zola-Morgan, S., & Squire, L.R. (2001). Relationship between magnitude of damage to the hippocampus and impaired recognition memory in monkeys. *Hippocampus*, 11 (2), 92-98.

Zola-Morgan, S., Squire, L.R., Rempel, N.L., Clower, R.P., & Amaral, D.G. (1992). Enduring memory impairment in monkeys after ischemic damage to the hippocampus. *The*

Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 12 (7, 2582-2596.

Zs-Nagy, I. (1978). A membrane hypothesis of aging. *Journal of Theoretical Biology*, 75 (2), 189-195.

Apéndice A

Elaboración y Composición de la Dietas NIH-31 Control y NIH-31 Arándano Azul

Elaboración

La dieta se preparó siguiendo el procedimiento detallado en Youdim et al. (2000). El extracto del arándano azul (AA) de la variedad Tif-Blue se obtuvo del laboratorio del Centro de Investigación de la Nutrición Humana en el Envejecimiento, Universidad de TUFTS, Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, Boston, MA, EE.UU. El extracto liofilizado se mandó al laboratorio de Harland Tekland (Madison, WI, EE.UU.) donde se le agregó a la dieta base NIH-31 del Instituto Nacional de la Salud (NIH, Bethesda, MD, EE.UU.) para obtener la dieta experimental del arándano azul.

Composición de las dietas para roedores NIH-31:

Ingredientes (gm/Kg.)	Control	Arándano Azul
Trigo molido grueso	355.50	355.50
Trigo	99.96	99.96
Avena molida	99.96	99.96
Alimento a base de pescado, Menhaden, 60%	89.96	89.96
Alimento a base de soya, 48%	49.98	49.98
Alimento a base de alfafa deshidratada, 17%	19.99	19.99
Alimento a base de gluten de maíz, 60%	19.99	19.99
Fosfato dicalcio, 18.5%	14.99	14.99
Aceite de soya	14.99	14.99
Levadura de cerveza seca	10.00	10.00
Sal, (NaCl) Yodatada	5.00	5.00
Carbonato de Calcio, 38%	4.75	4.75
Mezcla de Vitaminas NIH-31(a)	3.50	3.50
Mezcla de Minerales NIH-31(b)	1.50	1.50
Maíz amarillo molido	209.92	189.92
Extracto de arándano azul Tif-Blue (c)		20.00
TOTAL	1000	1000

(a) **Mezcla de vitaminas** contiene (en un g/Kg mezcla de vitaminas):
Maíz molido (316.24), Cloruro de Colina (423.50), Complejo MSB (135.30), Mononitrato de Tiamina 26), Pantotenato de Calcio (24.37), Vitamina B12 (19.05), Vitamina E (17.15), Niacina (12.65), Acetato de Vitamina A (10.65), Riboflavina (7.14), Biotina (3.78), Vitamina D3 (2.99), Ácido Fólico (0.32) y Pyridoxina· HCl (1.60).

(b) **Mezcla de minerales** (en un g/Kg de mezcla de minerales):
Óxido de Magnesio (487.10), Carbonato de calcio (219.23), Sulfato Ferroso (146.85), Óxido Manganoso (122.40), Sulfato de Cobre (11.84), Óxido de Zinc (10.20), Iodato de Calcio (1.74) y Carbonato de Cobalto (0.64).

(c) Elaboración y composición del extracto del arándano azul *Tif Blue*: ver el artículo de Youdim, et al. (2000).

Cálculo del Consumo Diario del Arándano Azul (David Malin, PhD)

1) Consumo diario de la dieta liofilizada

- 2% = cantidad incluida del arándano azul en la dieta NIH-31 AA
 - = 2% X consumo diario del alimento
 - = 0.02 X 19.68 g (promedio del consumo diario del grupo experimental)
 - = 0.394 g del AA liofilizado.

2) Proporción del AA liofilizado con el fruto completo del AA

Cantidad al comienzo de la preparación de la dieta
13.6 Kg del AA = 1,202.8 g del AA liofilizado

- = $\frac{1.2028 \text{ kg AA liofilizado}}{13.6 \text{ fruto completo del AA}}$
- = 0.08844

3) Cálculo del equivalente del consumo diario del fruto completo del AA

- = $\frac{0.394 \text{ g (consumo diario del AA liofilizado)}}{0.08844 \text{ (proporción del AA liofilizado: AA completo)}}$
- = 4.45 g equivalente del fruto completo del AA.

Apéndice B

Fraccionamiento de Proteínas

Materiales:

- Solución Tampón A, (buffer A) 1.8 ml
- Solución Tampón B, (buffer B) 900 μ l
- Cóctel de proteasas
- DTT 100mM
- PMSF
- 1-ml homogenizador de Dounce
- Tubos de Eppendorf.
- A cada muestra se le asignó un número de identificación. El record se mantuvo en el libro del laboratorio.

Preparación de Soluciones:

- Solución tampón A agregar:
 - 20 μ l cóctel de proteasas
 - 20 μ l DTT
 - 10 μ l PMSF (se agrega justo antes de usar la solución tampón A)
- Solución tampón B agregar:
 - 100 μ l cóctel de proteasas
 - 10 μ l DTT
 - 10 μ l PMSF (se agrega justo antes de usar la solución tampón B)

Procedimiento: La homogenización se lleva a cabo para obtener células individuales y separar las fracciones citosólica y nuclear.

- 1) Se coloca el homogenizador en hielo y se mantiene frío hasta el momento de usarse.
- 2) Agregarle 300 μ l de la solución tampón A. Esta solución se utiliza para separar la fracción citosólica.
Se agrega la muestra y se dan 15 golpes suaves para separar el tejido. Los golpes separan suavemente las células de cualquier tejido o enlaces químicos.
- 3) Remover la sustancia obtenida y ponerla en los tubos de eppendorf.
- 4) Dejar la muestra 15 min. en hielo después de la homogenización. Durante este proceso la solución tampón A ocasiona que se rompa la membrana celular y que el citosol fluya fuera de la célula.
- 5) Limpiar el homogenizador con ddh₂O antes de usarlo nuevamente.
- 6) Repetir los mismos pasos con cada muestra.
- 7) Enfriar la centrifugadora hasta alcanzar -4°C.
- 8) Colocar las muestras en la centrifugadora. Centrifugar las muestras por 10 minutos a 830, FCR (fuerza centrífuga relativa), en -4°C.
- 9) Remover únicamente la parte líquida, el sobrenadante, y transferirlo a los tubos marcados, y guardarla a -80°C. Esta es la fracción citosólica.

Apéndice C

Concentración de la Proteína

Este protocolo se desarrolló de acuerdo al método del ácido de bicinonínico (BCA) descrito por Smith et al., 1985.

Materiales:

ácido de bicinonínico (BCA) manufacturado por el Laboratorio Químico de Pierce

Procedimiento:

- 1) Diluir la muestra en ddH₂O. Generalmente se usa una proporción de 1:20 o 1:10 según sea necesario. Se puede diluir directamente en la placa de 96-pocillos o utilizar tubos premarcados con el número de la muestra.
- 2) En los dos primeros pocillos, A1 y A2, Pipeta 25µl de la solución tampón A utilizado en la homogenización del tejido. Después se depositan 25 µl de cada una de las muestras de la curva del patrón general de las proteínas con las siguientes concentraciones: 1000; 800; 600; 400; 200; 100; 50 µg/ml. Este paso se realiza en duplicado en las dos primeras hileras de la placa.
- 3) Agregar las muestras en duplicado comenzando con la fila A3 y A4, y continuando en B3-B4 hasta que se han transferido todas las muestras. Es importante anotar en que depósito se ha colocado cada una.
- 4) Agregar 200 µl de la solución de reacción del BCA en la proporción siguiente: 50 parte A a 1 parte B, en cada depósito. No se debe mezclar, únicamente se pueden dar golpecitos ligeros a la placa.
- 5) Incubar la placa a temperatura ambiente por 45 a 60 minutos o en una incubadora a 37°C por 30 minutos.
- 6) Leer la placa en el aparato de ELISA. Si las muestras se colocaron en triplicado utilizar el programa # 4 (BCA 963) y en duplicado utilizar el programa # 5 (BCA 962). Estos programas darán el resultado final en mg/ml, pero se asume que la curva de las proteínas esta localizada en los depósitos A a la G en duplicado o triplicado, con la concentración mayor (1000 µg/ml) en el depósito H; también se asume que la solución tampón A está en el depósito H.

Apéndice D

Electroforesis

El proceso de electroforesis descrito por Laemmli (1970) es un método que se utiliza para el fraccionamiento molecular de las proteínas y esta basado en las diferencias de movilidad de las proteínas en un campo eléctrico. Si las proteínas se encuentran en un medio que tenga un pH diferente al de su punto isoelectrico se presenta una carga eléctrica neta que les permite desplazarse cuando se someten a un campo eléctrico.

La electroforesis utilizada en este proyecto se conoce como geles desnaturizantes de Poliacrilamida-Sulfato Sódico (PAGE-SDS), en la cual las proteínas han sido previamente desnaturizadas (proteínas que han perdido su estructura tridimensional).

Este tipo de geles de poliacrilamida son transparentes por lo que permiten apreciar el movimiento de las proteínas, son químicamente inertes por lo que no alteran la composición de la proteína, y estables en un amplio rango de pHs, temperatura y fuerza iónica, por lo que se pueden usar a temperatura ambiente o a - 45 °C con campos eléctricos de diferentes intensidades.

Soluciones:

I Gel resolutivo de poliacrilamida al 10% y Sulfato Sódico, 50mL: 20ml ddH₂O
16.6 ml 30% mezcla de acrilamida (29.2% acrylamide y 0.8% *N,N'*-methylene-bis-acrylamide)
12.5 ml 1.5 M Tris (pH 8.8)
500 µl 10% SDS
500 µl 10% persulfato amónico (APS)
20 µl 8% *N,N,N',N'*- tetrametilnediamina (TEMED)

II Gel de apilamiento 10mL:

6.8 ml ddH₂O
1.7 ml 30% mezcla de acrilamida
1.25 ml 1.0 M Tris (pH 6.8)
100 µl 10% SDS
100 µl 10% APS
10 µl TEMED
Solución tampón para las muestras: 100 ml
3g Tris
8g SDS
2.5 g dithiothreitol (DTT)
0.05 g bromophenol blue
40% (v:v) glicerol

Procedimiento:

- 1) Se ensambla la matriz (consiste en las dos laminillas de cristal donde se vierten los geles) del aparato de electroforesis (BioRad Pharmaceuticals, Hercules, CA, EE.UU.).
- 2) Se prepara la solución del gel resolutivo y se vierte entre los cristales para formar la matriz. Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización de la acrilamida y por la acción de la bis-acrilamida. Como activador se utiliza el TEMED, por lo

que no se añade hasta que todo este listo para verter el gel. Como catalizador se utiliza APS. La velocidad de polimerización se determina por la concentración de persulfato (catalizador) y TEMED (activador). Generalmente se necesitan de 30 a 45 minutos.

- 3) Se prepara la solución del gel de apilamiento. Se coloca el peine para formar los posillos (donde se coloca la muestra). Se vierte la solución en la parte superior del gel resolutivo y se espera de 30 a 45 minutos para su la polimerización.
- 4) Se preparan las muestras. De acuerdo a la concentración proteica se calcula la cantidad necesaria de la muestra, ddH₂O y 4x solución tampón. Se mezclan y se calientan. Dicho calentamiento a 90°C desnaturiza a la proteína: pérdida de su estructura tridimensional al desbaratar su doble helix por el calentamiento en presencia de agentes desnaturizantes. Como resultado se separan las proteínas en cadenas polipeptídicas aisladas. Este proceso permite que la migración de la proteína en la matriz sea proporcional a la carga y al tamaño de la molécula y no a su forma. El agente desnaturizante empleado es el detergente SDS.
- 5) Cuando los geles están listos, se traslada la matriz ensamblada al aparato de electroforesis y se llena con la solución tampón.
- 6) Se vierten las muestras en los pocillos y se comienza la electroforesis con un voltaje de 110 volts durante 12 o 14 horas a una temperatura de -4 °C (para evitar la renaturalización de la proteína: formación espontánea de la doble hélice).

Transferencia Electroforética

Solución:

Solución tampón de la transferencia electroforética:

3.0285 g Tris Base

14.4 g Glicina

800 ml. ddh₂o

200 ml. 100% Metanol.

Glosario

Abreviaturas utilizadas en el texto, tablas y figuras:

AA: arándano azul

AMPC: adenosín monofosfato cíclico.

AP-1: proteína activadora 1

β-APP: proteína precursora del péptido β-amiloide

CAMs: moléculas de adhesión celular

CAT: catalasa

CA: grupo control de adultos mayores, este grupo recibió la dieta control

CJ: grupo control de jóvenes que recibieron la dieta control

Cu-ZnSOD: superóxido dismutasa de cobre y zinc

DNA: ácido desoxirribonucleico.

DNAm: ADN mitocondrial

EA: grupo experimental de adultos mayores que recibieron la dieta con el suplemento del arándano azul

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

HCA: ácido hidroxicinámico

HO: heme-heme-oxygenasa

GSH: glutatión

GPx: glutatión peroxidasa

GR: glutatión reductasa

MDA: malondialdehído

MnSOD: manganesio superóxido dismutasa

NFAT: factor nuclear de las células T activadas.

NF-κB: factor de transcripción factor nuclear-kappa B

NGF: factor de crecimiento nervioso.

NGFI: factor inducible por el NGF.

NMDA: N-metil-D-aspartato.

NO: óxido nítrico

·O₂—: anión superóxido

·OH—: hidróxilo

·ONOO—: peroxinitrito

ORAC: *oxygen radical absorbance capacity assay*

RNA: ácido ribonucleico

RNA_m: ácido ribonucleico mensajero.

RNA_t: ARN de transferencia

SOD: superóxido dismutasas

Sp1: factor promotor de la transcripción Sp1

Glosario de Términos

ácido ascórbico: su término genérico es vitamina C. Es un antioxidante importante y además esta involucrado en la síntesis de numerosas moléculas y proteínas. No es sintetizado en el ser humano. Es hidrosoluble, se absorbe rápidamente por la vasculatura del cuerpo humano.

α tocoferol (Alfa tocoferol): su término genérico es vitamina E. Es liposoluble. Es un potente antioxidante y protege principalmente las membranas celulares y a las lipoproteínas.

almacenamiento de la memoria: parte del proceso de la memoria. El almacenamiento de la memoria sucede “después del proceso de codificación cuando el trazo mnémico se almacena y se retiene por un tiempo variable. La disponibilidad de la información almacenada va desde unos pocos milisegundos hasta meses y años, dependiendo entre otras cosas del tipo de codificación que se ha producido”. (Manuel de la Vega, 1998, pg. 60)

apoptosis: muerte programada de las células.

cachipolla: insecto arquíptero (con cuatro alas membranosas y reticuladas) que habita junto a los ríos y vive solamente un día.

codificación: de acuerdo a Manuel de Vega (1998) “la codificación tiene lugar cuando el flujo de estímulos que llega a los receptores es analizado, organizado o transformado generándose un determinado código simbólico que constituye una replica cognitiva del input. La codificación es un conjunto de procesos imprescindibles para el almacenamiento de la información de la memoria. Los procesos de codificación son responsables de la transformación de los estímulos sensoriales en pautas de información significativas y asimilables por los sistemas de memoria. La codificación implica operaciones o (niveles) muy variados que se seleccionan de modo flexible en cada situación o tarea particular. Los procesos de codificación corresponden al momento inicial de la actividad mnémica”. (Pag 60 y 173). Los procesos de codificación y recuperación no pueden analizarse independientemente ya que están estrechamente interconectados

codón: (codones) “Codón es un término que define las palabras que utiliza el ADN para especificar el código genético. El ADN está compuesto por cuatro bases: guanina, adenosina, timina y citosina, las cuales codifican toda la información genética. Las palabras que se usan son de tres letras y están siempre compuestas por tres de esas cuatro bases, y pueden traducirse en aminoácidos específicos que son las unidades que forman las proteínas. Así que un codón es la palabra de tres letras que especifica, bien sea el comienzo de una proteína, el final de una proteína o uno de los aminoácidos o unidades” (Instituto Nacional de Investigaciones del Genoma Humano, EE.UU.).

complejo de kinasas I κ B (IKK): consiste de dos subunidades catalíticas: IKK α y IKK β y una unidad regulatoria: IKK γ , (Rothwarf, Zandi, Natoli, y Karin, 1998; Yamaoka et al., 1998).

dimerización: formación de una molécula doble.

esperanza de vida específica: el promedio de años que puede vivir un individuo de determinada especie

expectativa de vida: el número de años que puede vivir un individuo en un momento determinado de la historia

fosforilación: introducción de un grupo fosfato en una molécula

genes: entidades responsables de la transmisión de los caracteres hereditarios.

genoma: es el conjunto de toda la información genética de cada especie que se encuentra codificada en una o varias moléculas de AND.

liofilizar: separación del agua de una sustancia creando un material esponjoso. Posteriormente este material se disuelve con facilidad. Se utiliza para deshidratar los alimentos.

longevidad: la duración de vida de un organismo independientemente de la esperanza de vida según su especie

malondialdehído (MDA): se utiliza ampliamente como marcador del proceso de lipoperoxidación. Es el producto más importante de la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados.

nucleótido: es la unidad estructural del ADN o ARN. Existen cuatro nucleótidos en el ADN unidos por una molécula de azúcar fosfato: adenina, citosina, guanina y timina. El ARN tiene también 4 nucleótidos: adenina, citosina, guanina, y uracilo.

perseveración: es la tendencia patológica de repetir una actividad determinada sin ninguna razón fisiológica.

proteína activadora: se une a lugares específicos del ADN y estimula la transcripción.

proteínas desnaturalizadas: proteínas que han perdido su estructura tridimensional.

proteosoma: representa un amplio conjunto de vesículos que absorben los materiales de desperdicio de la célula. Entre sus funciones se encuentra la degradación de la mayoría de las proteínas oxidadas por las especies reactivas del oxígeno.

redox: son las reacciones en las que se transfieren electrones entre especies químicas. Las especies en estas reacciones se conocen como oxidante y reductor. El oxidante gana los electrones y el reductor los cede.

telómero: los extremos del cromosoma.

trazo de memoria: cuando escuchamos o leemos una palabra es razonable suponer que en nuestra memoria se ha registrado un trazo que representa a dicho ítem. la codificación de un ítem genera varios posibles códigos o trazos que corresponden a otros tantos aspectos o atributos informacionales

ubiquitinización: proceso de unión de la ubiquitina a las proteínas. La ubiquitina es un polipéptido muy conservado en los organismos eucariotes. Las proteínas ubiquitinadas son rápidamente degradadas por el proteosoma de la célula.