



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA

**EVALUACIÓN DEL EFECTO NEUROPROTECTOR DEL EXTRACTO DE MAQUI BERRY
(*ARISTOTELIA CHILENSIS*) EN UN MODELO DE ESTRÉS OXIDATIVO POR EXPOSICIÓN
CRÓNICA A OZONO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. EN C. BRIBIESCA CRUZ IÓSIF IVÁN

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. CHRISTIAN HUMBERTO GUERRA ARAIZA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. SELVA LUCÍA RIVAS ARANCIBIA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
DRA. ALIESHA ARACELI GONZÁLEZ ARENAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. , MAYO, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

**EVALUACIÓN DEL EFECTO NEUROPROTECTOR DEL EXTRACTO DE MAQUI BERRY
(*ARISTOTELIA CHILENSIS*) EN UN MODELO DE ESTRÉS OXIDATIVO POR EXPOSICIÓN
CRÓNICA A OZONO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. EN C. BRIBIESCA CRUZ IÓSIF IVÁN

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. CHRISTIAN HUMBERTO GUERRA ARAIZA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. SELVA LUCÍA RIVAS ARANCIBIA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
DRA. ALIESHA ARACELI GONZÁLEZ ARENAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 2021

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
OFICIO CPCB/281/2021
ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted qué en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **11 de enero de 2021** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del estudiante **BRIBIESCA CRUZ IÓSIF IVÁN** con número de cuenta **302287851** con la tesis titulada **“Evaluación del efecto neuroprotector del extracto de Maqui Berry (*Aristotelia chilensis*) en un modelo de estrés oxidativo por exposición crónica a ozono”**, realizada bajo la dirección del **DR. CHRISTIAN HUMBERTO GUERRA ARAIZA**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. ANA ERIKA RODRÍGUEZ MARTÍNEZ
Vocal: DRA. ANGÉLICA BERENICE COYOY SALGADO
Vocal: DRA. NADIA ALEJANDRA RIVERO SEGURA
Vocal: DR. RODOLFO PINTO ALMAZÁN
Secretario: DRA. SELVA LUCÍA RIVAS ARANCIBIA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 08 de abril de 2021

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Unidad de Posgrado, Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX Tel. (+5255)5623 7002 <http://pbiol.posgrado.unam.mx/>

AGRADECIMIENTOS

Al posgrado en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional Autónoma de México, a todas las personas que, con su esfuerzo, lo construyen y lo configuran como un posgrado que forma científicos de alto nivel académico y ético, comprometidos con el desarrollo de la ciencia y la tecnología al servicio del país.

Al apoyo de manutención otorgado por el CONACYT con el número de registro de becario: 288688 y el número de apoyo: 433337. Este apoyo dio el soporte, que permitió mi dedicación de tiempo completo a mi formación académica, durante el tiempo establecido por los lineamientos del posgrado.

Al apoyo financiero otorgado por el FIS/IMSS a este proyecto con número de registro FIS/IMSS/PROT/PRI0/19/096. A la beca otorgada por el IMSS no. R-2017-785-060.

A mi tutor principal, el Dr. Christian Guerra Araiza por su tiempo invertido para mi formación como científico, por su apoyo en el desarrollo del presente trabajo y por sus enseñanzas que favorecieron mi crecimiento académico.

A los honorables miembros de mi comité tutor, la Dra. Selva Lucía Rivas Arancibia y la Dra. Aliesha Araceli González Arenas, que gracias a sus valiosos consejos, gran profesionalismo académico e infinita paciencia, me permitieron culminar el presente trabajo.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Agradezco a Dios la oportunidad de seguir adelante en la aventura que me ha encomendado.

Agradezco a mi compañera de alegrías, enojos, y lágrimas. La que siempre me ha acompañado al igual que Dios en cada etapa crucial de mi vida, a mi amada esposa Lucia, tu que has sido mi pilar, me has levantado en los momentos más complicados y hemos compartido la felicidad y la tristeza. A ti hermosa te agradezco infinitamente los 3 maravillosos hijos que me has dado.

A mis hijos Kaira, Chris y Chuchín, los amo mis maravillosos enanos. Gracias son el motor de su madre y padre.

A mis amados padres, les agradezco el apoyo y cuidado que me han dado desde el momento que abrí los ojos.

ÍNDICE

	PÁGS.
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUCCIÓN	5
4. OBJETIVOS	7
5. ANTECEDENTES	8
La memoria, sus tipos y características	8
Estructuras asociadas a la memoria	13
Generación de especies reactivas de oxígeno y radicales libres	21
Defensas antioxidantes	28
El Maqui Berry	
6. HIPÓTESIS	50
7. METODOLOGÍA	51
8. RESULTADOS	60
9. DISCUSIÓN	69
10. CONCLUSIONES	75
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
12. APÉNDICE	88
Artículo requisito para la obtención del grado	

1. RESUMEN

El ozono (O_3) es uno de los principales contaminantes oxidantes a nivel mundial, diferentes estudios señalan que la exposición prolongada puede ocasionar un estado de estrés oxidativo, ocasionando alteraciones en la dinámica del cerebro como lo son los procesos de memoria y aprendizaje.

Por otro lado, diferentes investigaciones han demostrado que las bayas especialmente las que contienen alto contenido de flavonoides muestran una gran actividad antioxidante. En este sentido la baya de *Aristotelia chilensis* conocido comúnmente como Maqui Berry, ha demostrado tener el mayor contenido de flavonoides, al ser comparado con otros tipos de bayas comerciales. A su vez, se ha reportado en diversos estudios de estrés oxidativo, la gran capacidad antioxidante de MQ.

En nuestro laboratorio analizamos el posible efecto antioxidante y neuroprotector del extracto de Maqui Berry CHI2 (MQ), en un modelo murino de estrés oxidativo provocado por la exposición crónica a 0.25ppm de O_3 .

Para ello, utilizamos ratas macho de 250-300g de peso de la cepa Sprague Dawley, los cuales fueron expuestos a aire libre de O_3 ó a 0.25 ppm de O_3 por 4 horas diarias, durante 30 días, 1 hora después de cada sesión de exposición, a los animales se les administró via oral una dosis de vehículo (agua) o dosis de 50 ó 100mg/kg de MQ. Al final de los tratamientos se les entreno en una prueba de evitación pasiva (PEP), que mide la memoria de corto y de largo plazo, después de la PEP los animales fueron sacrificados y los cerebros removidos, el hipocampo, la corteza prefrontal y la amígdala fueron disecados.

Se evaluó el efecto antioxidante de MQ en la corteza prefrontal, el hipocampo y la amígdala, sobre algunos marcadores de estrés oxidativo como: 4-hidroxinonenal (4-HNE), nitrotirosina (Nt3), malondialdehído (MDA) y los productos finales de glicación avanzada (AGEs). A su vez, evaluamos el efecto de la administración de MQ sobre la concentración de algunos antioxidantes como: grupos Tiol (-SH), vitamina C (VIT-C) y la actividad enzimática de la superóxido dismutasa total (SOD).

En el presente estudio, observamos que la administración de las dosis de 50 y de 100 mg/kg del extracto de MQ, resultaron efectivas para impedir el déficit cognitivo ocasionado por la exposición crónica a O₃. Aunado a esto, encontramos una disminución de los diferentes marcadores de oxidación analizados, del mismo modo observamos una disminución en la actividad de la SOD en animales expuestos a O₃ y tratados con las dosis de 50 y de 100 mg/kg del extracto de MQ.

En cuanto a la concentración de antioxidantes analizados, observamos que la administración de 50mg/kg y 100 mg/kg de MQ, en animales expuestos a O₃, restablece las concentraciones de -SH a niveles de los grupos control. Mientras que las concentraciones de VIT-C no se ven afectadas por la administración de ninguna de las dosis de MQ.

Con base en lo anterior, sugerimos que existe una relación entre la protección a nivel cognitivo y la actividad antioxidante de la administración de MQ.

Palabras clave: Estrés oxidativo, memoria y aprendizaje, Maqui Berry, marcadores de estrés oxidativo, antioxidantes, superóxido dismutasa.

2. ABSTRACT

Ozone (O₃) is one of the main oxidative pollutants worldwide, different studies indicate that prolonged exposure can cause a state of oxidative stress, causing alterations in the dynamics of the brain such as memory and learning processes.

On the other hand, different investigations have shown that berries, especially those that contain a high content of flavonoids, show great antioxidant activity. In this sense, the *Aristotelia chilensis* berry, commonly known as Maqui Berry (MQ), has been shown to have the highest content of flavonoids, when compared to other types of commercial berries. In turn, the great antioxidant capacity of MQ has been reported in various oxidative stress studies.

In our laboratory we analyzed the possible antioxidant and neuroprotective effect of the Maqui Berry CHI2 (MQ) extract, in a murine model of oxidative stress caused by chronic exposure to 0.25ppm of O₃.

For this, we used male rats weighing 250-300g of the Sprague Dawley strain, which were exposed to free air of O₃ or 0.25 ppm of O₃ 4 hours a day for 30 days, 1 hour after each exposure session, at the animals were orally administered a dose of vehicle (water) or a dose of 50 or 100mg / kg of MQ. At the end of the treatments, they were trained in a passive avoidance test (PEP), which measures short and long-term memory, after PEP the animals were sacrificed and the brains removed, the hippocampus, the prefrontal cortex and the tonsil were dissected.

The antioxidant effect of MQ on the prefrontal cortex, the hippocampus and the amygdala was evaluated, on some oxidative stress markers such as: 4-hydroxynonenal (4-HNE), nitrotyrosine (Nt3), malondialdehyde (MDA) and the final glycation products advanced (AGEs). In turn, we evaluated the effect of MQ administration on the concentration of some antioxidants such as: Tiol groups (-SH), vitamin C (VIT-C) and the enzymatic activity of total superoxide dismutase (SOD).

In the present study, we observed that the administration of the 50 and 100 mg / kg doses of the MQ extract were effective in preventing the cognitive deficit caused by chronic exposure to O₃. In addition

to this, we found a decrease in the different oxidation markers analyzed, in the same way we observed a decrease in the activity of SOD in animals exposed to O₃ and treated with the doses of 50 and 100 mg/kg of the MQ extract.

Regarding the concentration of antioxidants analyzed, we observed that the administration of 50mg/kg and 100mg/kg of MQ, in animals exposed to O₃, restores the -SH concentrations to the levels of the control groups. While the VIT-C concentrations are not affected by the administration of any of the MQ doses.

Based on the above, we suggest that there is a relationship between protection at the cognitive level and the antioxidant activity of the administration of MQ.

Keywords: Oxidative stress, memory and learning, Maqui Berry, oxidative stress markers, antioxidants, superoxide dismutase.

3. INTRODUCCIÓN

En un balance oxido-reducción, las moléculas oxidantes y antioxidantes dentro del organismo se encuentran en equilibrio. Sin embargo, factores endógenos o exógenos pueden alterar este balance, ocasionando un exceso de oxidantes o un déficit en el sistema antioxidante, esta desregulación en el equilibrio oxido-reducción es definida como “estado de estrés oxidativo”, el cual se caracteriza por niveles elevados de especies reactivas de oxígeno (ERO).

Factores ambientales como el ozono (O_3), pueden aumentar el número de ERO dentro del cuerpo provocando un aumento de oxidantes, aumentado así el estado de estrés oxidativo dentro del organismo. El O_3 , es considerado uno de los contaminantes más frecuentes y dañinos a los que se encuentra expuesta la población a nivel mundial. Es un gas que en su mayoría se genera por las interacciones fotoquímicas entre los rayos ultravioletas provenientes del sol y las emisiones vehiculares. La exposición a O_3 incluso en concentraciones bajas (0.05 ppm), puede provocar malestares que van desde irritación en los ojos y dolores de cabeza hasta la exacerbación de enfermedades preexistentes como el asma. Mientras que concentraciones por encima de las normas recomendadas (0.11ppm), puede ocasionar el deterioro en las capacidades intelectuales.

El sistema nervioso central (SNC), particularmente el cerebro es vulnerable al efecto oxidativo producido por la exposición a O_3 , debido a que contiene gran cantidad de lípidos, consume gran cantidad de oxígeno y tiene bajas cantidades de enzimas antioxidantes. En el ser humano, todos estos efectos adversos pueden ocasionar alteraciones en los procesos cognitivos como lo son la memoria y el aprendizaje debido a que las ERO regulan la plasticidad cerebral.

Por otro lado, el modelo murino de estrés oxidativo por exposición a O_3 , es ampliamente aceptado para poder analizar los efectos oxidantes del O_3 en el SNC. La exposición a 0.25ppm de O_3 por 4 horas diarias durante 30 días, genera lipoperoxidación en la membrana celular, oxidación de proteínas, inactivación enzimática, destrucción del DNA y apoptosis celular. En este mismo modelo, se han hallado alteraciones en las funciones cerebrales relacionadas con los procesos de memoria y aprendizaje.

Hoy en día existen diferentes productos de origen natural con propiedades antioxidantes. Sin embargo, dentro de toda esta gama de productos naturales, las bayas debido a su alto contenido de polifenoles y en especial de antocianinas han demostrado poderosos efectos antioxidantes.

El fruto de *Aristotelia chilensis* conocido comúnmente como maqui Berry (MQ), es considerado un potente antioxidante natural. El MQ se ha utilizado para el tratamiento de diversas dolencias como el dolor de garganta, fiebre, inflamación, lesiones, migrañas y para la cura de cicatrices, mientras que en diferentes estudios de estrés oxidativo, tanto in vivo como in vitro, ha demostrado tener efectos antioxidantes. Por otro lado, a diferencia de otro tipo de bayas, el MQ ha demostrado tener el mayor contenido de flavonoides, especialmente de antocianinas, al ser comparado con otros tipos de bayas comerciales. Por lo que el MQ resulta ser un excelente candidato para evaluar sus efectos antioxidantes y posiblemente neuroprotectores, en un modelo de estrés oxidativo provocado por la exposición crónica a O₃.

4. OBJETIVOS

Objetivo general:

Analizar el efecto neuroprotector y antioxidante del extracto de MQ, en un modelo de estrés oxidativo por exposición a O₃.

Objetivos particulares:

- Analizar el efecto del extracto de MQ sobre la memoria de corto y de largo plazo, por medio de la prueba de evitación pasiva, en las ratas expuesta a O₃.
- Determinar el efecto antioxidante del extracto de MQ, en el hipocampo, la corteza prefrontal y la amígdala, sobre el contenido de algunos marcadores de daño oxidativo (4-HNE, MDA, AGEs y Nt3) en los animales expuestos a O₃.
- Evaluar si el extracto de MQ, modula la actividad de la SOD en el hipocampo, la corteza prefrontal y la amígdala de los animales expuestos a O₃.
- Evaluar si el extracto de MQ, altera la concentración de la vitamina C y de los grupos tiol (-SH) en el hipocampo, la corteza prefrontal y la amígdala de los animales expuestos a O₃.

5. ANTECEDENTES

La memoria, sus tipos y características.

La memoria es la capacidad para usar nuestro conocimiento adquirido como producto de las experiencias. Es uno de los atributos más importantes que poseen los organismos y cuya ausencia puede resultar devastadora [1]. El aprendizaje y la memoria son propiedades del cerebro que nos permiten adquirir, retener y evocar diferentes tipos de información. Por definición el aprendizaje es la adquisición de nueva información, mientras que la memoria es la capacidad de retener la información adquirida y de evocarla ya sea de manera consciente o inconsciente [1-3].

Como resultado de los procesos de aprendizaje y memoria, los animales pueden modificar su conducta cuando se exponen a estímulos relevantes a los que se han enfrentado anteriormente [4], permitiéndoles tomar ventajas de las experiencias y situaciones previas y ayudándoles a resolver los problemas de manera más eficiente, en el caso del ser humano, el aprendizaje y la memoria nos permiten reconocer hechos familiares, predecir eventos, reconocer lugares particulares y nos permite poder evaluar las consecuencias de nuestros actos [1].

La memoria en cuanto a su temporalidad se puede clasificar en:

Memoria de corto plazo, la cual es una información en un principio almacenada de forma lábil (vulnerable a interferencias e interrupciones) y transitoria la cual puede ser desechada al cabo de algunos minutos u horas (menos de 4 horas) [4].

Memoria de largo plazo, es de duración más prolongada va de días, meses, años o durar para toda la vida [1]. Ésta memoria, se subdivide en dos tipos principales: La memoria declarativa o explícita y la memoria no declarativa o implícita, que gracias a estudios realizados en primates y en pacientes amnésicos se han delineado algunas de las estructuras implicadas en sus procesos generando un modelo taxonómico (Figura 1) [5-8].

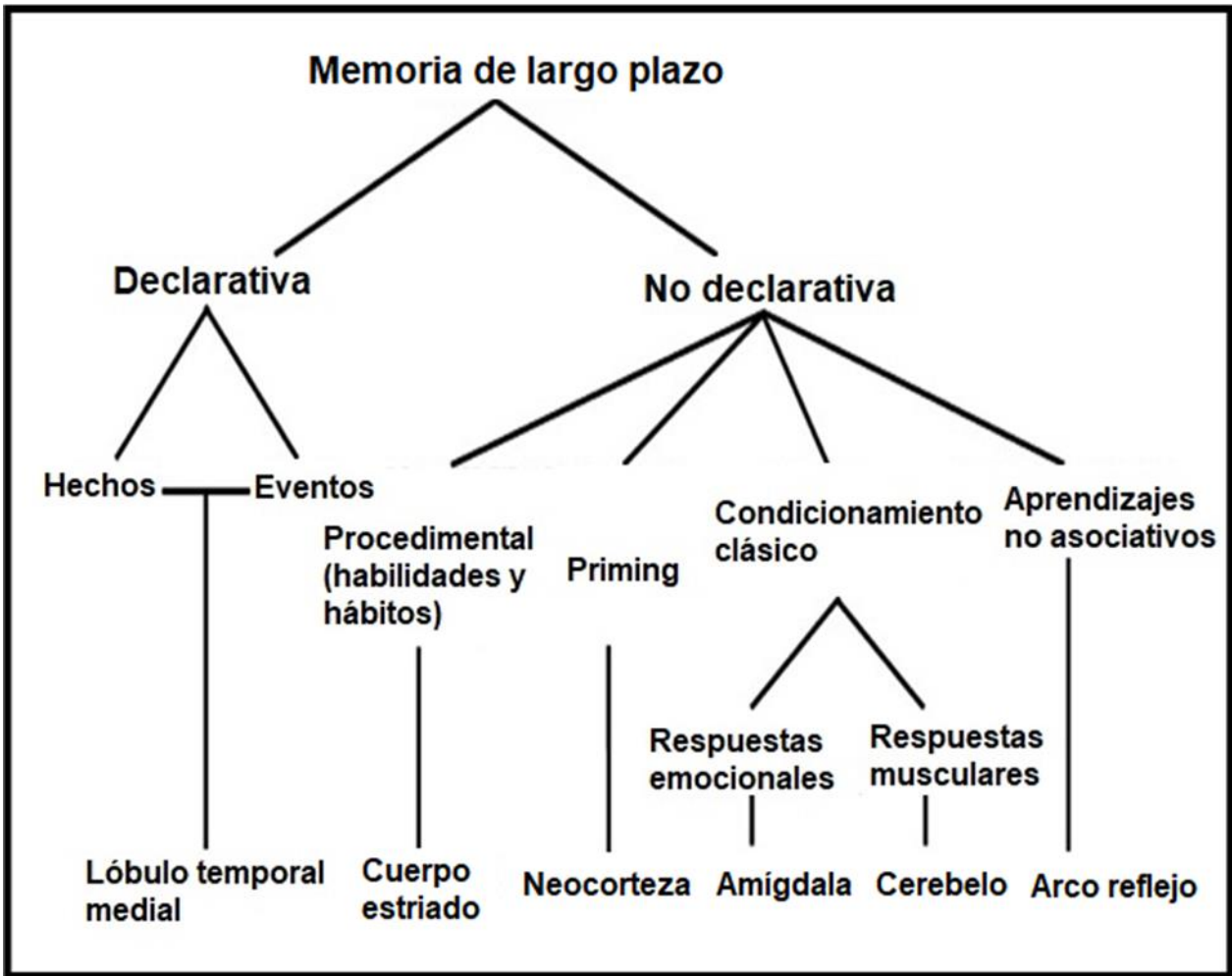


Figura 1. Taxonomía de los sistemas de la memoria de largo plazo en los mamíferos [9]. La taxonomía enumera las estructuras cerebrales que se consideran especialmente importantes para cada forma de memoria declarativa y no declarativa.

La memoria declarativa (explícita): es la memoria de eventos, lugares, hechos y personas y depende en gran medida del lóbulo temporal medio del diencefalo [2,6,10], otra característica de este tipo memoria es que la evocación de la información se realiza de forma consciente, ya que se puede describir con palabras [1]. A su vez la memoria declarativa se puede subdividir en memoria episódica y en la memoria semántica [2].

La memoria episódica se refiere a la capacidad de volver a experimentar un evento personal en el contexto, en el cual ocurrió originalmente (por lo tanto, también es conocida como memoria autobiográfica) [9-11]. Este tipo de memoria contiene el "qué", "dónde" y "cuándo" de la información y es el tipo principal de memoria codificada en nuestra vida diaria [2]. La duración de su almacenamiento depende en gran medida de la atención personal de cada individuo, como ejemplo, se puede recordar la cena que se tuvo con un amigo y su familia durante años, sin embargo, se puede olvidar otros detalles (como el nombre de sus hijos) que están asociados con el evento [11].

Por otro lado, la memoria semántica está condicionada por la educación y es el conocimiento enciclopédico del mundo que nos rodea, incluye lenguaje y conocimiento de habilidades especializadas, en los cuales no necesariamente se pueda evocar el dónde y cuándo se adquirió esa información [1,2,12]. Ayuda al individuo a asignar una función (darle su significado) a una palabra. Por ejemplo, si a un niño se le da una tiza y una pizarra, el jugará con ellos en lugar de escribir; familiarizándose con estos elementos formando una memoria con respecto al color y la forma de la tiza y la pizarra (aunque desconozca sus funciones). Y entonces, cuando se le enseña al niño a conocerlos por sus nombres, 'pizarra' y 'tiza', mientras se le instruye a usarlos para escribir, la memoria semántica comenzará a formarse [11].

La adquisición de la memoria declarativa es un proceso en el cual se requiere de tres fases [6,12]:

1. Codificación. Este es el procesamiento inicial de la información en la cual se capturan detalles sobre los estímulos y el entorno para su posterior consolidación (procesamiento de la información para almacenarla).
2. Almacenaje. Retención de la información codificada que permite mantenerla a largo plazo de tiempo.
3. Recuperación o evocación. Utilizar la información retenida para su posterior uso, creando una representación consciente del suceso o para ejecutar una respuesta motora aprendida.

Durante la última década se han tratado de establecer con mayor especificidad que áreas del lóbulo temporal medio, son las que se encuentran mayormente involucradas con el almacenamiento de la información en la memoria declarativa [1,5]. Se han propuesto que la formación hipocampal (compuesta por el hipocampo propiamente dicho, la circunvolución dentada, el complejo subicular, y la corteza entorrinal) así como a las cortezas perirrinal adyacente y parahipocámpicas, como estructuras clave en los procesos de la memoria declarativa [5]. Sin embargo, estudios en los cuales se realizaron lesiones selectivas de dichas estructuras, han demostrado que las deficiencias nemónicas resultantes no son de la misma magnitud [13]. Lo que sugiere que ciertas estructuras se encuentran mayormente implicadas en la memoria declarativa que otras, por ejemplo, la lesión de la corteza perirrinal produce una mayor alteración sobre la memoria que cuando se lesiona el hipocampo, a pesar que muchos autores le adjudiquen una importancia primordial a este último [1].

La memoria no declarativa (implícita): se refiere a situaciones en las cuales el aprendizaje adquirido, se refleja en el rendimiento, en lugar de recuerdos manifiestos [14]. Esta memoria es el resultado de procesos de aprendizaje no conscientes realizados a través de hábitos y habilidades, mediante estimulación o sensibilización previa, y en los que interviene la musculatura esquelética o bien respuestas emocionales y de aprendizaje no asociativo [1,6], para ejemplo, de lo anterior se encuentran el realizar tareas, como el abotonar una camisa, atar un cordón de zapato, nadar o andar en bicicleta, son tareas que no dependen de un esfuerzo consciente pero están basadas en memorias motoras previamente aprendidas [11].

La memoria implícita se puede dividir en cuatro subsistemas, los cuales son: procedimental (habilidades y hábitos), el del primming, condicionamiento clásico o aprendizajes asociativos básicos (que a su vez se puede subdividir en respuestas emocionales y musculares), y el de los aprendizajes no asociativos [8,14].

La memoria procedimental se refiere a las tendencias adquiridas gradualmente que son específicas de un conjunto de estímulos y que con el tiempo pueden guiar el comportamiento. La ejecución de los movimientos adquiridos se realiza cada vez de forma más rápida y precisa con la práctica. La memoria procedimental a menudo se le relaciona con el estriado, la corteza motora y el cerebelo [1,10].

El primming es un efecto por el cual la exposición a un estímulo previo puede facilitar o entorpecer una ejecución, debido a la información a la cual se tuvo acceso recientemente [1,15]. Por ejemplo, si una persona lee una lista de palabras, incluida la palabra “tabla”, y luego se le pide completar una palabra comenzando con tab , la probabilidad de que ese individuo escriba tabla es mayor que si no hubiera leído anteriormente la lista de palabras [5]. Varios autores [1,5,6], coinciden que el sustrato neuronal implicado con el primming, es la neocorteza.

El condicionamiento clásico (condicionamiento pavloviano) es una forma de aprendizaje en la cual un estímulo, el estímulo condicionado (CE), viene a indicar la ocurrencia de un segundo estímulo, el estímulo no condicionado (NCE). Los NCE, suelen ser estímulos biológicamente significativos, como la comida o el dolor, que pueden provocar una respuesta desde el inicio (respuesta no condicionada o NCR). El CE generalmente no produce una respuesta particular al principio, pero después de acondicionarla provoca la respuesta condicionada (CR). Por ejemplo, si se hace sonar una campana (CE) emparejado repetidamente con carne (NCE), estímulo que provoca salivación a un perro, el animal con el simple hecho de escuchar la campana llegará a evocar la misma respuesta (salivación) (CR), que con la carne (NCR) [15]. En el condicionamiento clásico se han asociado principalmente estructuras del cerebro, como el cerebelo y la amígdala además de verse involucrada la musculatura esquelética [1].

Aprendizaje no asociativo se refiere al comportamiento recién aprendido a través de la exposición repetida a un estímulo aislado. El nuevo comportamiento se puede clasificar en dos procesos: habituación y la sensibilización [1].

La habituación se encuentra ligada a la repetición de un estímulo, lo que conduce a una disminución en la respuesta. Mientras que la sensibilización consiste en un aumento de la respuesta a un estímulo debido a la introducción repetida del mismo [15].

Estructuras asociadas a la memoria

Como se mencionó en el apartado anterior, existen diferentes formas de clasificación de la memoria, como la memoria de largo plazo (declarativa y no declarativa) y la memoria de corto plazo [4-6]. Se ha descrito que sus diferentes tipos se almacenan en distintas regiones del cerebro interconectadas entre sí. Para la memoria de largo plazo declarativa, que se refiere a eventos, así como hechos e información generales, hay tres áreas importantes del sistema límbico asociados a ella: el hipocampo, el neocórtex y la amígdala. Mientras que la memoria no declarativa, se basa principalmente en los ganglios basales y el cerebelo [1-6]. Finalmente la corteza prefrontal, se encuentra implicada en la regulación de la memoria de corto plazo [4].

El hipocampo

La palabra hipocampo proviene del latín hippocampus cuyo significado etimológico es “caballito de mar” por su similitud con la especie marina. El hipocampo es una estructura perteneciente al sistema límbico, el cual forma parte del lóbulo temporal medial, se encuentra localizado en ambos hemisferios cerebrales debajo de la neocorteza [16].

Al hipocampo se le incluye en la formación hipocampal, la cual está formada por: el giro dentado (GD), el subiculum (S), el presubiculum, el parasubiculum y la corteza entorrinal (CE). Anatómicamente el hipocampo se divide en dos regiones principales el GD y los cuernos de Ammón (CA) que se numeran del 1 al 4 (CA1-CA4) (Figura 2) [17].

A nivel morfológico el hipocampo se encuentra conformado por dos tipos principales de células: las granulares del GD y las células piramidales de los CA. El GD se localiza por debajo de las células piramidales. El hilus (Hil) es la región que se encuentra entre las dos hojas de células granulares del GD. En los CA existe una subdivisión, en la cual a la capa de las células piramidales se le denomina stratum pyramidale, la zona basal de estas neuronas se nombra stratum oriens, y la zona apical se denomina stratum lucidum [16-18].

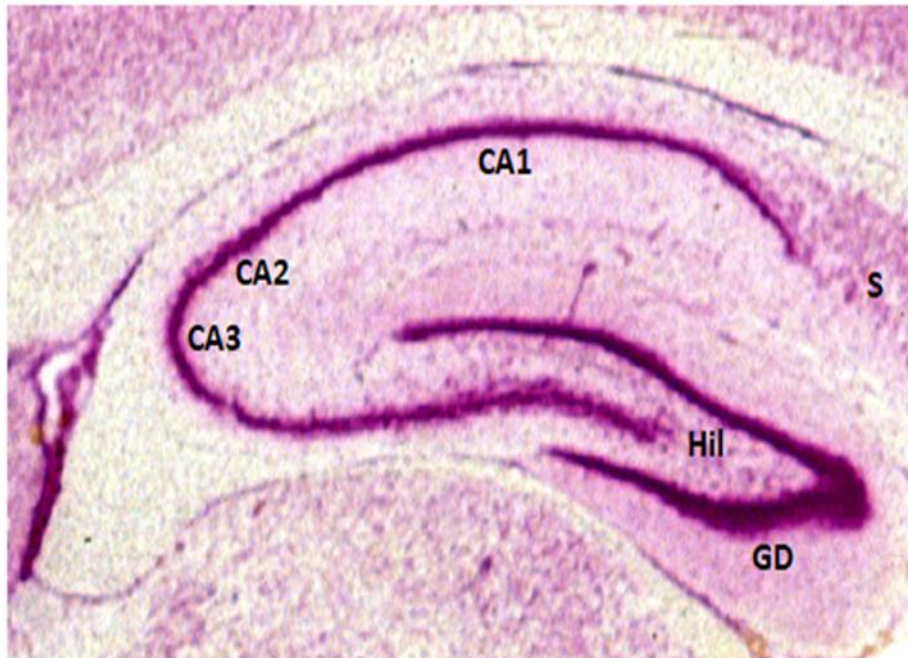


Figura 2. Esta es una sección sagital del cerebro de una rata, que muestra el hipocampo, CA: cuernos de Ammón 1-3, GD: giro dentado, Hil: hilus y S: subiculum [19].

El hipocampo recibe dos fuentes de información: las aferencias subcorticales, que proyectan del septum medial a través del fornix, y las aferencias neocorticales que convergen en la CE llegando al hipocampo por la denominada vía perforante. La CE recibe la mayoría de sus aferencias de la corteza perirrinal y la corteza parahipocampal. La principal eferencia del hipocampo es el S, quien a su vez envía proyecciones a la CE. La CE está compuesta por subdivisiones mediales y laterales, además recibe información sensorial que se proyecta al GD a través de la vía perforante. Esta información se envía del GD a los CA de la siguiente forma: el conjunto de axones de las células granulares forman las fibras musgosas, las cuales forman una proyección hasta llegar a las células piramidales de CA3, los axones de CA3 emiten colaterales denominadas “colaterales de Schaffer”, que inervan a las células piramidales de CA1 [16,18]. Las sinapsis entre la CE con GD, GD con CA3 y CA3 con CA1, forman el circuito trisináptico del hipocampo (Figura 3).

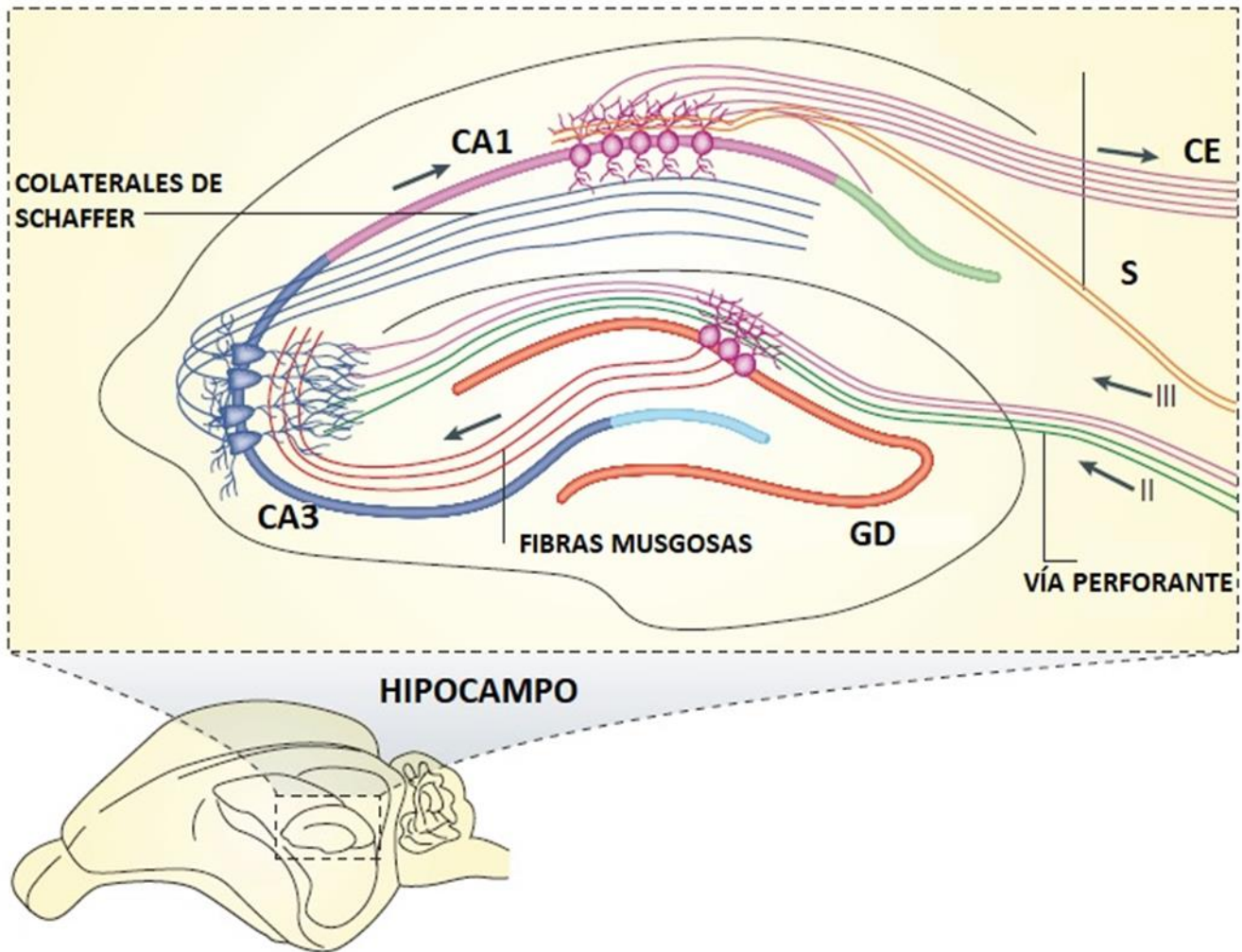


Figura 3. Se observa la comunicación del hipocampo, la cual es una red mayoritariamente unidireccional con aferencias de la CE y forma conexiones con el GD y las células piramidales de CA3 por medio de la vía perforante. A su vez, las neuronas de CA3 también reciben aferencias del GD por medio de las fibras musgosas. Ellas mandan axones a las células piramidales de CA1 a través de las colaterales de Schaffer. Por otro lado, CA1 también recibe aferencias de la vía perforante y envía axones hacia el S. Estas neuronas a su vez envían la principal eferencia del hipocampo hacia la CE imagen modificada de [20].

Por otro lado, el hipocampo es una estructura del cerebro ampliamente relacionada con la memoria [1]. Lesiones en el hipocampo producen efectos severos sobre la consolidación de la memoria declarativa, la cual como se ha descrito en apartados anteriores involucra las asociaciones entre hechos y eventos [2,6,10]. Además se ha descrito que la memoria de tipo espacial, también se encuentra relacionada con el hipocampo [1].

Una de las primeras evidencias sobre la relación del hipocampo y la memoria fue descrita por Brenda Milner y William Scoville en 1957 quienes describieron, el caso de un paciente llamado H.M. (siglas ficticias del paciente). Este paciente sufría de un caso muy grave de epilepsia y fue intervenido quirúrgicamente con el objetivo de aliviar sus convulsiones. La cirugía practicada a este individuo de 27 años consistió en la ablación del lóbulo temporal. Como consecuencia las crisis epilépticas desaparecieron, pero también presentó la deficiencia nemónica más devastadora jamás observada: era incapaz de formar nuevas memorias. El nivel intelectual del paciente H.M. no se vio alterado, pero olvidaba los eventos de la vida diaria tan pronto ocurrían era incapaz de recordar a las personas que lo rodeaban cotidianamente (las enfermeras y los médicos, por ejemplo, a quienes olvidaba tan pronto salían de su habitación) y no recordaba dónde se encontraba o cómo había llegado hasta ese lugar. Un dato importante a señalar del caso del paciente H.M. es que podía hacer uso de su memoria de corto y de largo plazo. Su verdadero problema radicaba en que no podía consolidar la nueva información [1,7].

Los investigadores a partir de las evidencias del caso H.M., se dieron a la tarea de replicar en modelos animales, la lesión de este paciente y además se interesaron por lesionar selectivamente las estructuras del lóbulo temporal para evaluar sus efectos sobre la memoria [21,22]. El hipocampo es una de las estructuras que más atención ha recibido, debido a que reportes clínicos han vinculado las lesiones del hipocampo con una pérdida de la capacidad nemónica declarativa [24]. Además en animales las lesiones selectivas de esta área causa un déficit en el aprendizaje y la memoria en un gran rango de tareas espaciales [25].

Una de las pruebas para evaluar la memoria espacial es el laberinto acuático de Morris, la cual consiste en una tina grande de 1-2 metros de diámetro, llena de agua con una plataforma sumergida en su interior que el animal no puede ver. La tarea consiste en varios ensayos en los cuales el animal es colocado en el agua y éste debe encontrar la plataforma con el fin de evitar seguir nadando. Después de varios intentos el animal aprende a localizar más rápidamente la plataforma. Lo que se mide en el ensayo es el tiempo (latencia) en el que el animal tarda en encontrar la plataforma. Los animales con lesiones en el hipocampo tienen dificultades en ubicar la plataforma [1].

La corteza prefrontal

En los mamíferos la corteza prefrontal esta definida como el área cortical que recibe proyecciones del núcleo talámico medial dorsal, además ésta área abarca una gran extensión del lóbulo frontal de la corteza. La corteza prefrontal recibe aferencias del área ventral tegmental y de la sustancia nigra, así como una vía proveniente del núcleo magnocelular [25]. En la rata, la corteza prefrontal se divide en: prefrontal medial (CPFm), orbital (CPFo) y en lateral (CPFo); a su vez la CPFm puede subdividirse en: área anterior del cíngulo (aCg), prelímbica (PL) e infralímbica (IL) (Figura 4) [26].

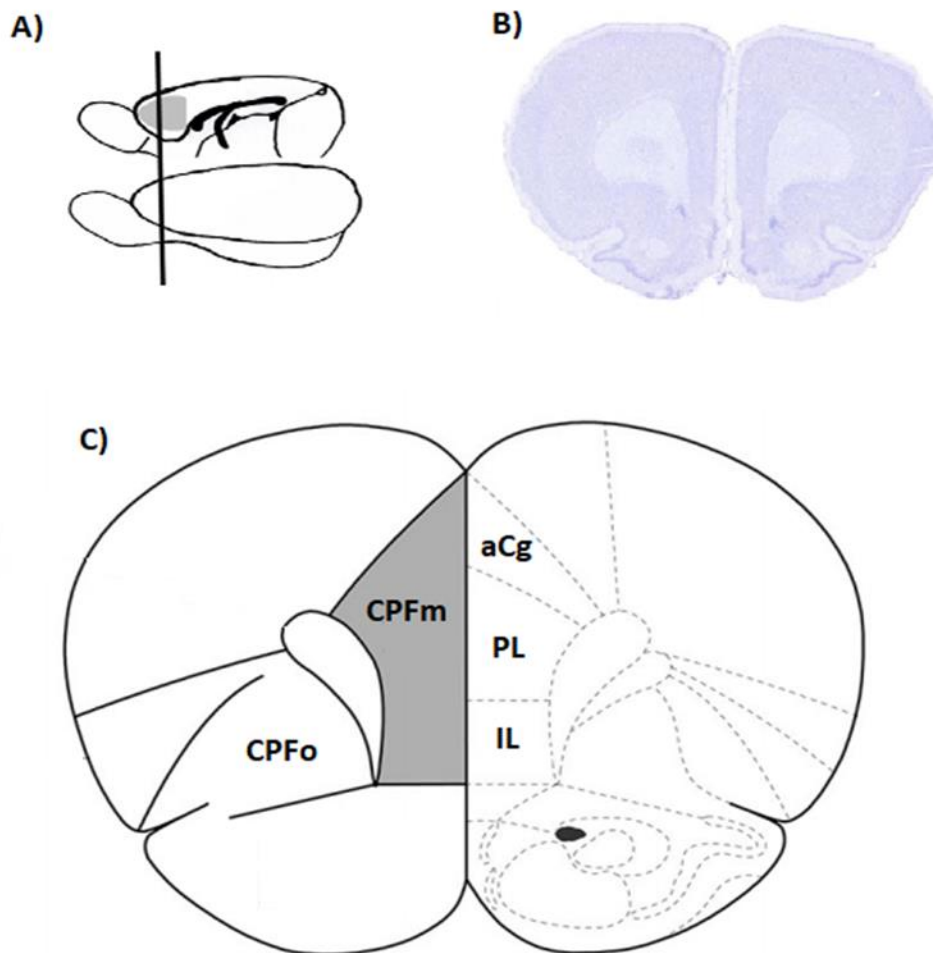


Figura 4. En la imagen A) se observa un esquema del cerebro de la rata en donde la imagen sombreada corresponde a la corteza prefrontal. La línea negra muestra el plano aproximado de sección para el corte coronal que se aprecia en la imagen B). En la imagen C), se ilustran las divisiones de la corteza prefrontal: la corteza prefrontal orbital (CPFo), la corteza prefrontal medial (CPFm) y sus

subdivisiones área anterior del cíngulo (aCg), prelímbica (PL) e infralímbica (IL). Modificado de [25, 26].

La corteza prefrontal es un área asociada a diferentes funciones que van desde el control oculomotor, el proceso de atención, la toma de decisiones, el aprendizaje y la memoria de corto plazo [1]. La CPFm, ha sido relacionada con la memoria contextual, asociada también con el hipocampo [27]. A su vez, se encuentra implicada en procesos emocionales cognoscitivos, como la modulación de la memoria asociada con estímulos aversivos [28]. Es importante señalar que la modulación de la memoria por medio de estímulos aversivos se realiza conjunto con la amígdala, con la cual existe una comunicación de vías aferentes y eferentes [29].

La amígdala

La palabra amígdala, proviene del griego “almendra” y es una estructura que se localiza en el lóbulo temporal medial. En la rata, la amígdala es estructuralmente diversa y comprende 13 núcleos, los cuales además presentan varias subdivisiones. Sin embargo, se pueden clasificar en tres grandes grupos: 1) el grupo basolateral (nBLA), que incluye al núcleo lateral (nL), al núcleo basal (nB) y al núcleo basal accesorio (nBa); 2) el grupo superficial o semejante a cortical (nSC), constituido por el núcleo cortical (nCo) y el núcleo del tracto olfatorio lateral (nTOL); y 3) el grupo centromedial (nCM), compuesto de los núcleos medial (nM) y central (nC) (Figura 5). Además, existe un conjunto de núcleos que se consideran de forma separada, estos incluyen a las masas celulares intercaladas y el área amígdalo-hipocampal [30].

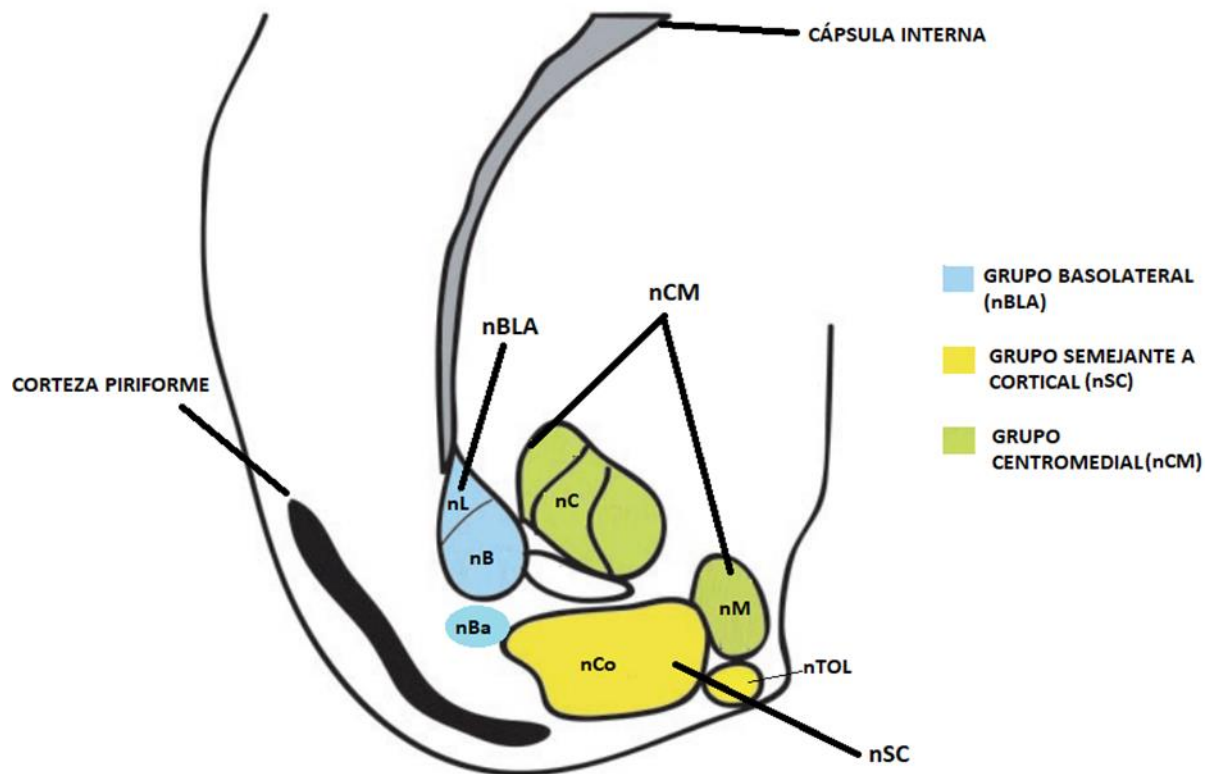


Figura 5. Los principales núcleos principales de la amígdala: 1) el nBLA, que incluye al núcleo lateral (nL), al núcleo basal (nB) y al núcleo basal accesorio (nBa); 2) el nSC, formado por el núcleo cortical (nCo) y el núcleo del tracto olfatorio lateral (nTOL); y 3) el nCM, compuesto de los núcleos medial (nM) y central (nC). Imagen modificada de [30].

La principal vía aferente que llega a la amígdala es a través de del nL, el cual recibe información de varias modalidades: somato-sensorial (incluyendo el dolor), gustativa, olfatoria, auditiva y visual, provenientes de áreas tálamicas, corticales, hipotalámicas y del tallo cerebral. Esta información es transmitida al nC, quien es la principal vía eferente hacia otras regiones cerebrales, que modulan a su vez la expresión de respuestas emotivas innatas y respuestas fisiológicas asociadas [31]. Estas respuestas involucran entre otras, a las conexiones con el mesencéfalo, el puente, la medula y el hipotálamo, que se caracterizan por controlar las respuestas de congelamiento, la reacción de sobresalto, y el aumento en la presión sanguínea, así como reacciones autónomas y de tipo neuroendocrino [32].

La amígdala ha sido asociada a diferentes aspectos conductuales de aprendizaje, como la respuesta condicionada al miedo y la evitación pasiva o inhibitoria [31]. Además se ha descrito que la modulación de estos procesos también dependen de la comunicación de la amígdala con el hipocampo, la corteza prefrontal, el núcleo acumbens, el núcleo caudado y el estriado, quienes forman sistemas de memoria cuya actividad depende del tipo de información percibida [33,34]. A su vez, se ha descrito que en los paradigmas de evitación pasiva y activa, tareas que involucran la memoria de referencia, las ratas con lesiones en la amígdala, presentan dificultad en el aprendizaje de dichas pruebas [1].

Por otro lado, en diferentes estudios se ha señalado una relación entre el déficit cognitivo (memoria y aprendizaje) y el incremento de radicales libre y especies reactivas de oxígeno [35-38].

Generación de especies reactivas de oxígeno y radicales libres.

La mayor cantidad de especies reactivas de oxígeno (ERO), algunas de las cuales no son radicales libres (RL) debido a que no tienen un electrón (e^-) desapareado dentro de su estructura, se generan en la cadena de transporte de electrones (CTE), como productos secundarios de la fosforilación oxidativa [39].

Durante la fosforilación oxidativa los electrones pasan a través de una serie de moléculas transportadoras, dispuestas en complejos enzimáticos multiproteicos, embebidos dentro de la membrana interna mitocondrial [39,40]. Una pequeña parte de los e^- que pasan por la CTE logra salir y puede ser captada por el dioxígeno (O_2) generando el radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), esto ocurre principalmente en el complejo I (NADH deshidrogenasa) y el complejo III (citocromo oxidoreductasa) [41]. El $O_2^{\bullet-}$ generado, es dismutado en H_2O_2 , por la enzima superóxido dismutasa (SOD) este último también puede ser generado por otras enzimas como las monoxigenasas y las oxidasas [42].

El H_2O_2 , se puede reducir parcialmente a el radical hidroxilo ($\bullet OH$) en presencia de metales de transición como el Fe^{2+} , por medio de la reacción de Fenton [42]. El $\bullet OH$ es sumamente reactivo e interacciona con lípidos, proteínas y ADN haciendo de su formación sumamente dañina para las células [41,43].

Por otro lado, el $O_2^{\bullet-}$ puede interactuar con el radical óxido de nitrógeno ($NO\bullet$), produciendo especies reactivas de nitrógeno (ERN). El $NO\bullet$ se genera a partir de L-arginina por una familia de enzimas llamadas óxido nítrico sintasas (NOS), que incluyen NOS neuronal (nNOS), NOS endotelial (eNOS) y NOS inducible (iNOS), ubicados en el citosol. En contraste con estos, la NOS mitocondrial (mtNOS), la α -isoforma de nNOS, se encuentra en la mitocondria, donde la coexistencia de $NO\bullet$ y $O_2^{\bullet-}$ resulta en la formación de peroxinitrito ($ONOO^-$), a su vez el $NO\bullet$ puede reaccionar con el O_2 generando $NO_2\bullet$ [44]. El $NO_2\bullet$ puede interactuar con los grupos tioles de las proteínas, mientras que el $ONOO^-$ puede unirse al aminoácido tirosina resultando en la nitración de esta, formando la nitrotirosina (Nt3), además pueden iniciar reacciones de lipoperoxidación [40]. Cuando se incrementa la generación de ERO de manera prolongada [45], se ocasiona daño oxidativo en diferentes órganos y sistemas [43].

Daño oxidativo en el cerebro

El cerebro es muy susceptible al daño por ERO y RL, debido a que las neuronas presentan un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados PUFAs = Poly- Unsaturated Fatty Acids, que son susceptibles a la peroxidación lipídica (LP) [43].

La LP, es el resultado del ataque de ERO en el doble enlace de ácidos grasos como el ácido araquidónico o ácido linoleico. El proceso de LP se puede dividir en tres etapas: iniciación, propagación y terminación (Figura 6) [46].

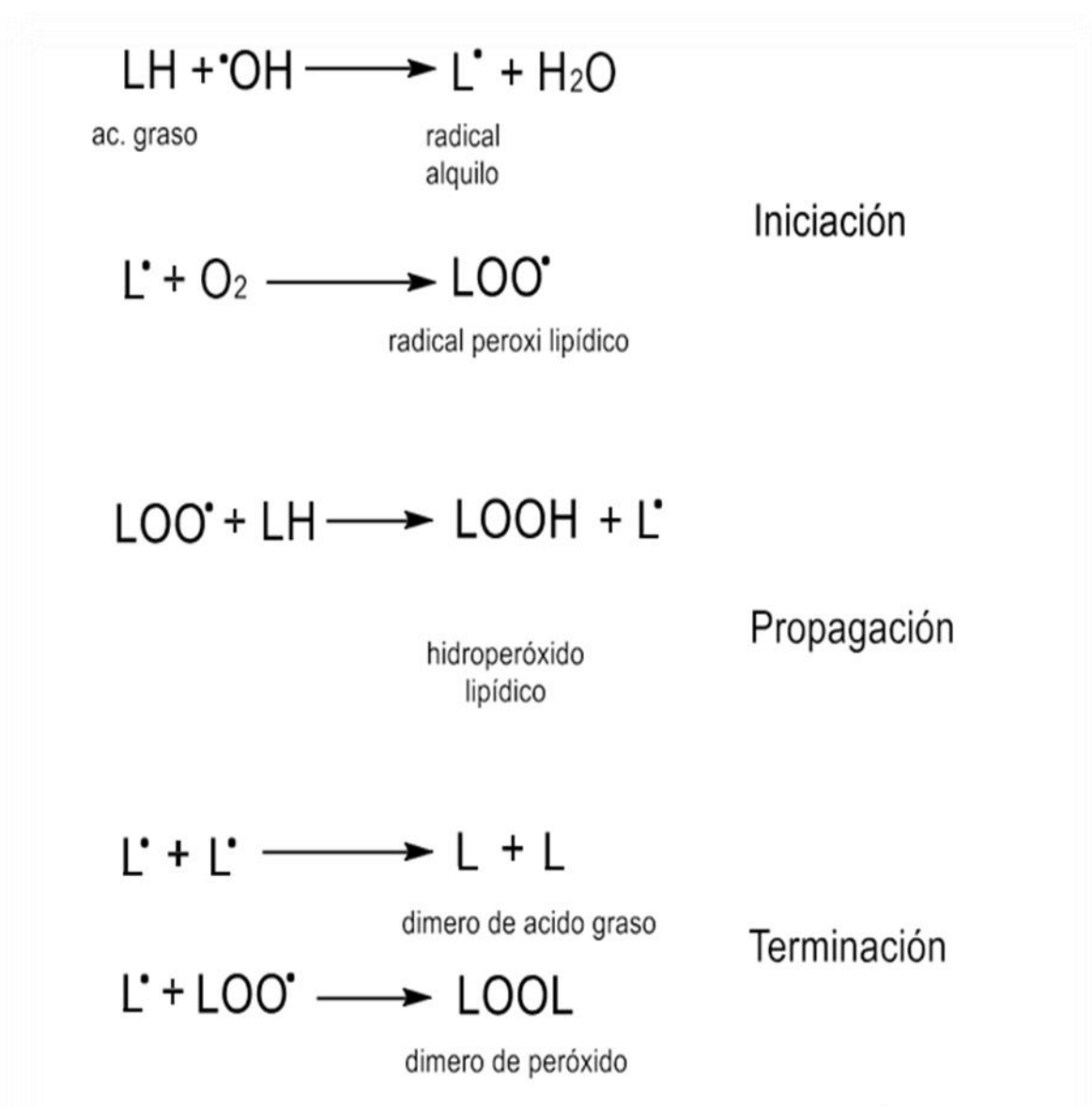


Figura 6. En la imagen se aprecian las etapas de iniciación, propagación y terminación del proceso de oxidación de lípidos.

En la fase de iniciación algunos radicales como el $\bullet\text{OH}$ o el $\text{NO}_2\bullet$ pueden sustraer un electrón del ácido graso insaturado (LH) transformándolo en un radical alquilo ($\text{L}\bullet$), el cual puede reaccionar con el O_2 para generar radicales peroxi lipídicos ($\text{LOO}\bullet$). En la fase de propagación los radicales $\text{LOO}\bullet$ se transforman en hidroperóxidos lipídicos (LOOH) al reaccionar con los dobles enlaces de otros ácidos grasos adyacentes, que a su vez se transforman en más radicales $\text{L}\bullet$, generando reacciones en cadena [47-50]. Los LOOH son relativamente estables, sin embargo, en presencia de metales de transición pueden sufrir reacciones semejantes a la de Fenton, produciendo diferentes endoperóxidos que al descomponerse forman aldehídos como el 4-hidroxi-2-nonenal (4HNE) o el malondialdehído (MDA), que son capaces de unirse a los aminoácidos de las proteínas y al ADN, modificando su estructura y alterando su funcionalidad [51,52]. Por último, la fase de terminación se da entre dos radicales para formar un no radical [43].

Además de los procesos de lipoperoxidación antes mencionados, las proteínas y carbohidratos también son susceptibles de sufrir alteraciones por las ERO y ERN. Para ejemplo de lo anterior, se ha reportado que el aumento en las ERN como el ONOO- puede generar la nitración de los residuos de tirosina en las proteínas, produciendo Nt3, este último interfiere con la función de las macromoléculas y promueve la agregación de otras proteínas. Se ha reportado que las concentraciones elevadas de Nt3 son neurotóxicas para las neuronas motoras [53,54], además ha sido reportado que la nitración de proteínas asociadas al citoesqueleto, como los neurofilamentos, actina o tubulina ocasionan modificaciones en los mecanismos de transporte intracelular, que conllevan a la muerte neuronal [54].

A su vez, se ha descrito que moléculas tóxicas como los productos finales de glicación avanzada (AGEs) contribuyen al daño en muchas enfermedades como la diabetes, enfermedades cardiovasculares y enfermedades neurodegenerativas [55-57]. Los AGEs, son un grupo heterogéneo de productos irreversibles resultantes de glicación y oxidación de proteínas, ácidos nucleicos y lípidos [55]. Los AGEs se forman por glicación, que es una reacción no enzimática entre cetonas o aldehídos y los grupos amino de varias proteínas [56]. La glicación de proteínas ocurre tanto en condiciones normales como hiperglucémicas. Este proceso comienza con la conversión de aductos de base de Schiff reversibles en compuestos de Amadori (fructosaminas y cetoaminas), los cuales al oxidarse

forman los AGEs [58]. Concentraciones altas de ERO contribuyen a la formación de AGEs, los cuales han sido asociados a la disfunción mitocondrial y muerte celular [59].

Por otro lado, la generación excesiva de ERO en el cerebro bajo condiciones patológicas produce que en la neurona pre-sináptica se libere un exceso de glutamato, un neurotransmisor excitador, el cual es captado por el receptor NMDA en la neurona post-sináptica [45]. Generando un incremento en el nivel intracelular de Ca^{2+} , el incremento de Ca^{2+} puede hacer que se forme un poro de transición mitocondrial interna (PTM), reduciendo el potencial electroquímico de protones, lo que conlleva a una disminución de adenosín trifosfato (ATP) [60]. La disminución de ATP disminuye la actividad de la ATPasa Na^+/K^+ , esto provoca una salida de iones K^+ y una entrada masiva de agua y Na^+ a la célula, causando edema y muerte neuronal por necrosis [61].

Aunado a lo anterior, la LP de los ácidos grasos de la membrana neuronal puede disminuir su fluidez y aumentar su permeabilidad para diferentes iones incluidos el Ca^{2+} . El aumento en la concentración de Ca^{2+} , activa proteasas, lipasas y endonucleasas. Al activarse las proteasas estas pueden generar daño en proteínas membranales y de citoesqueleto, mientras que las lipasas y endonucleasas, favorecen la hidrólisis de lípidos y la fragmentación del ADN respectivamente [45].

Por otro lado, en el cerebro procesos inflamatorios son otro detonante en el daño neuronal, el incremento de ERO puede activar el factor de transcripción nuclear κB (NF κB). El cual juega un papel fundamental en la regulación de la expresión de genes pro inflamatorios, como la iNOS o la enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2) las cuales pueden contribuir al daño en el cerebro [46].

A su vez, tanto la microglía como los astrocitos se pueden activar por cambios en el microambiente, una vez activados liberan citocinas y otros mediadores, que se han relacionado con la muerte apoptótica de las neuronas. En particular, la interleucina-1 β (IL-1 β), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y NO \bullet [45,46]. Los efectos dañinos en el cerebro, se encuentran resumidos en la Figura 7.

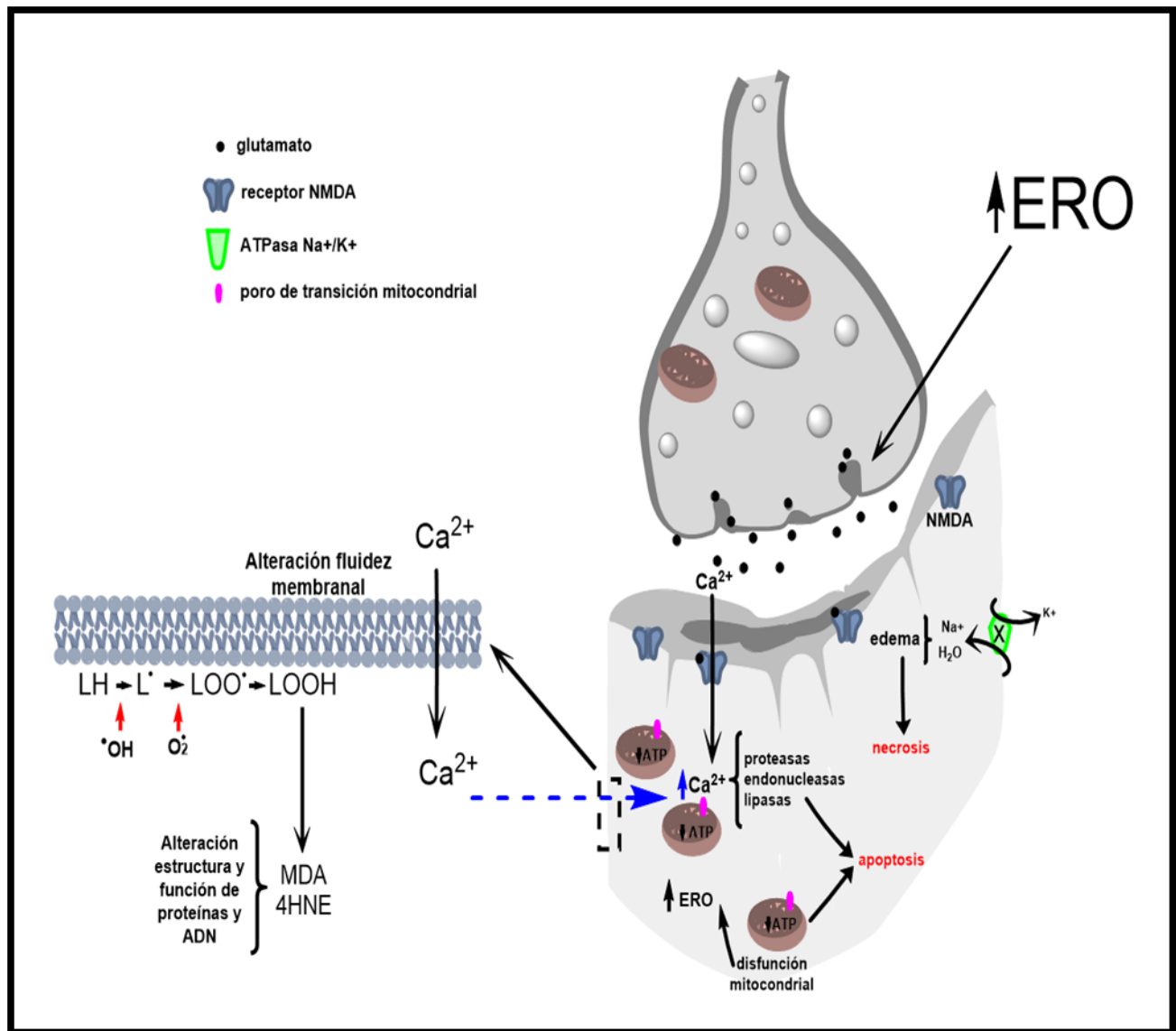


Figura 7. Imagen que muestra el daño producido por el aumento de ERO, que llevan a la neurona a la muerte adaptado de [45]. El aumento de ERO produce un aumento en la liberación de glutamato, el cual incrementa los niveles de Ca²⁺ intracelular disminuyendo los niveles de ATP y propiciando la formación de un poro de transición en la mitocondria, el déficit de ATP disminuye la actividad en las bombas de ATP Na⁺/K⁺, lo que provoca una entrada masiva de agua y sodio, causando edema celular y muerte necrótica. A su vez, la oxidación de la membrana, altera su fluidez contribuyendo al paso de más iones Ca²⁺ exacerbando el daño. El incremento de daño mitocondrial y la activación de proteasas, lipasas y endonucleasas llevan a la neurona a la muerte por apoptosis.

Se ha descrito que factores ambientales, como la contaminación del aire, pueden incrementar la producción de ERO y de RL [38, 62].

El Ozono (O₃)

A nivel de la superficie terrestre, el ozono (O₃) es considerado uno de los contaminantes del aire más frecuentes a los que se encuentra expuesta la población a nivel mundial. El O₃ es un gas altamente oxidante considerado una ERO, cuya molécula está compuesta por tres átomos de oxígeno. El O₃ se forma a partir de las interacciones entre la luz solar (rayos UV) y los óxidos de nitrógeno e hidrocarburos provenientes de emisiones de los vehículos y de las fábricas. [62].

En el ser humano, la exposición a O₃ puede ocasionar daño en diferentes órganos, el cual varía dependiendo de la concentración del mismo [63]. Actualmente en México, existen límites permisibles sobre las concentraciones de O₃, con el fin de evitar efectos dañinos en la salud de la población y son: 0.095 ppm x 1h de exposición o de 0.07 ppm x 8h de exposición [64]. Las afecciones por la exposición a O₃ incluyen el incremento de enfermedades respiratorias [65], inflamación en los pulmones, disminución en la función pulmonar [66,67], fatiga y dolor de cabeza [68], además se ha reportado que puede ocasionar el deterioro en las capacidades intelectuales como la memoria [69,70]. La concentración de O₃ y los daños en la salud se encuentran resumidos en la Tabla 1.

Concentración de O ₃ (ppm)	Efectos dañinos a la salud
0.05	Incremento de afecciones respiratorias
0.13-0.22	Inflamación en pulmones Disminución en la función pulmunoar
0.37	Fatiga y dolor de cabeza
0.2-0.3	Deterioro en la memoria

Tabla 1. Se pueden observar diferentes concentraciones de O₃ y el daño que causan a la salud humana.

Por otro lado, en modelos animales, se han evaluado los efectos nocivos de la inhalación de O_3 y se ha reportado que este gas causa daños severos al epitelio pulmonar alveolar [71, 72]. Además, se ha propuesto que durante la fase aguda de exposición a O_3 , predomina la necrosis celular debido a la citotoxicidad directa de la generación de RL, los RL a su vez incrementan la generación de ERO y de especies reactivas de nitrógeno (ERN), exacerbando el daño [73]. Cuando la producción de EROS y ERN excede los sistemas de defensa antioxidante de los pulmones [74], estas especies reactivas pueden llegar a diferentes partes del cuerpo a través del torrente sanguíneo, incluido el cerebro, y causar un estado de estrés oxidativo (EO) generalizado (Figura 8) [75,76].

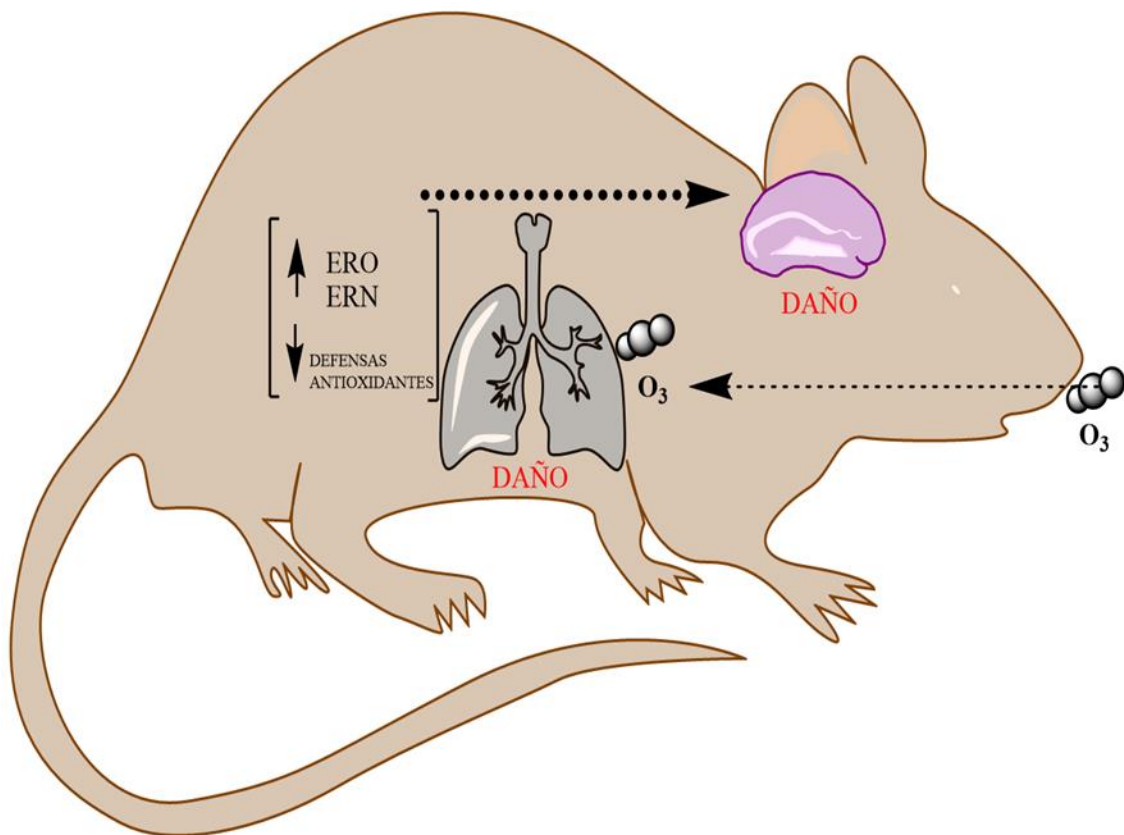


Figura 8. Imagen que muestra la vía por la cual el O_3 causa daño en el cerebro. Al ser inhalado el O_3 , llega a los pulmones incrementando las ERO y ERN, las cuales al sobrepasar los sistemas de defensa, pueden viajar a través del torrente sanguíneo y llegar hacia el cerebro.

Estrés Oxidativo inducido por el O₃ en el cerebro

El cerebro es particularmente vulnerable al EO generado por la exposición al O₃, debido a su gran contenido de ácidos grasos polinsaturados susceptibles a la oxidación y a una baja cantidad de defensas antioxidantes [46]. En este sentido, los efectos adversos de la exposición a 0.25ppm de O₃ en el cerebro resultan en la lipoperoxidación de la membrana celular, oxidación de proteínas, alteraciones en la actividad enzimática antioxidante, destrucción del DNA y apoptosis celular [35,36]. En el mismo modelo, se han observado otras características como el aumento en la activación de procesos inflamatorios, la acumulación de las proteínas β-amiloide y de la forma hiperfosforilada de Tau en el hipocampo [77]. A su vez, se han reportado alteraciones en las concentraciones de los neurotransmisores, así la exposición a O₃ por largos periodos de tiempo afecta los niveles de la serotonina (5HT) produciendo alteración del ciclo sueño y vigilia en ratas macho [78], disminución en la concentración de ACh [79], mientras que la exposición a corto y largo plazo de O₃ produce disminución de la actividad motora en ratas macho, modulada por dopamina (DA) [37].

En este contexto, se ha sugerido que los cambios bioquímicos y estructurales observados en el modelo del animal expuesto a O₃ pueden converger en problemas de plasticidad cerebral, que conducen a déficits en la memoria y el aprendizaje [38,77].

Defensas antioxidantes.

Los antioxidantes son definidos como sustancias que, en bajas concentraciones respecto a un sustrato oxidable, puede retrasar o inhibir la oxidación [80]. Pueden actuar de diferentes formas:

- a) Disminuyendo las concentraciones de los oxidantes.
- b) Evitando la iniciación de reacción en cadena, deteniendo la actividad de los radicales libres o especies reactivas que se forman.
- c) Uniéndose a metales de transición para evitar la formación de especies reactivas.
- d) Transformando peróxidos en productos con menos reactividad.
- e) Deteniendo la propagación y el aumento de radicales libres y especies reactivas [81].

Las defensas antioxidantes encargadas de mantener el equilibrio oxido-reducción en el organismo se pueden clasificar en antioxidantes de tipo endógenos como la SOD, la glutatión peroxidasa (GPx) y la catalasa (CAT) y los exógenos los cuales provienen de la dieta: vitaminas, aminoácidos e incluso metabolitos secundarios de productos naturales [82].

Superóxido dismutasa (SOD)

En los mamíferos la SOD se presenta en diferentes formas y con diferente localización celular (Figura 9).

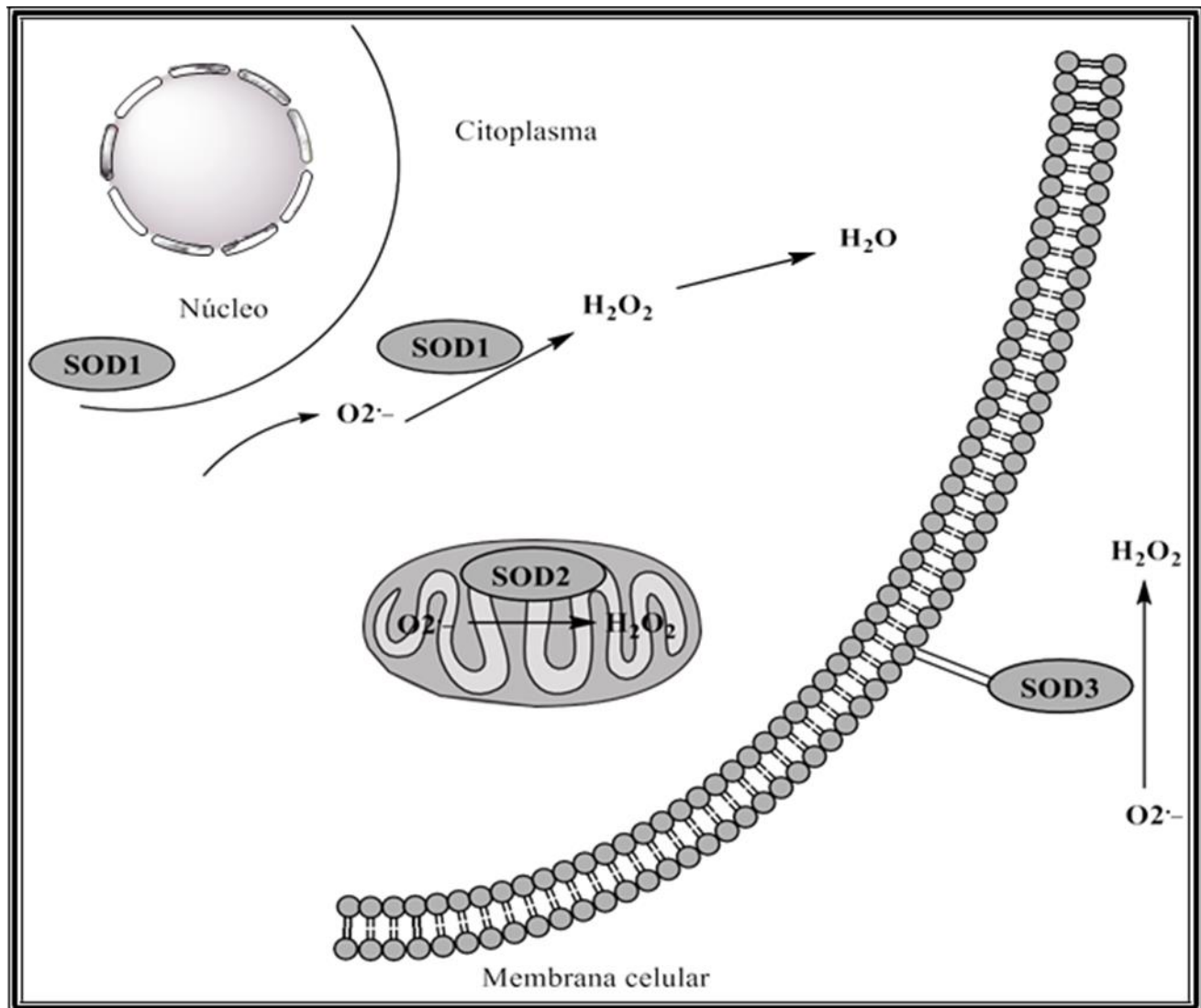


Figura 9. Imagen que muestra la distribución de las diferentes subunidades de la SOD en la célula. La SOD1 se encuentra en el núcleo y el citoplasma, la SOD2 se encuentra dentro de la mitocondria y la SOD3 se encuentra a nivel extracelular.

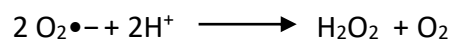
La SOD1 es una molécula de 32 kDa con un Cu y un Zn por cada subunidad de 153 aminoácidos, con un centro catalítico de cobre-zinc (SOD Cu-Zn), sin embargo, solo el cobre tiene importancia catalítica, mientras que el zinc le confiere estabilidad a esta enzima [83]. Esta enzima se encuentra en el citoplasma, y en la membrana externa de la mitocondria.

El gen de esta enzima en el humano se encuentra en el cromosoma 21, en la región 21q22; está compuesto por 5 exones y 4 intrones [84].

La SOD2 manganeso (SOD Mn), es un homotetrámero con un peso de 22 kDa por subunidad y posee un Mn³⁺ por monómero [85]. Se encuentra ubicada en la membrana interna mitocondrial. El gen de la SOD2, en el ser humano se encuentra ubicado en el cromosoma 6 en la región 6q25, y al igual que la SOD1 se encuentra compuesto de 5 exones y 4 intrones [86].

Finalmente la SOD3, que al igual que la SOD1 tiene un centro catalítico de cobre-zinc, se localiza en la matriz extracelular [87]. La SOD3 es la única proteína extracelular que puede eliminar el O₂•⁻, es una proteína tetramérica de 135 kDa y 22 aminoácidos, posee una homología del 60% con la SOD1, su gen se encuentra organizado en 3 exones y 2 intrones.

La familia de enzimas SOD catalizan la reacción de dismutación del O₂•⁻:



Si tomamos en cuenta a la SOD1, el mecanismo de la reacción, se lleva a cabo en dos pasos y es el siguiente:

Primera parte de la reacción (Eliminación del primer superóxido y reducción del cobre) (Figura 10). En esta primera parte el O₂•⁻ llega al centro de reacción y se une por una interacción electrostática, a la arginina 143, una vez aquí, el O₂•⁻ puede transferir su e⁻ desapareado al Cu²⁺ que transforme al metal en su estado de menor oxidación (Cu⁺), esta transferencia ocasiona que el enlace entre el Cu y la histidina 63 se protone. El O₂ formado se disocia de la arginina 143 y se libera [88].

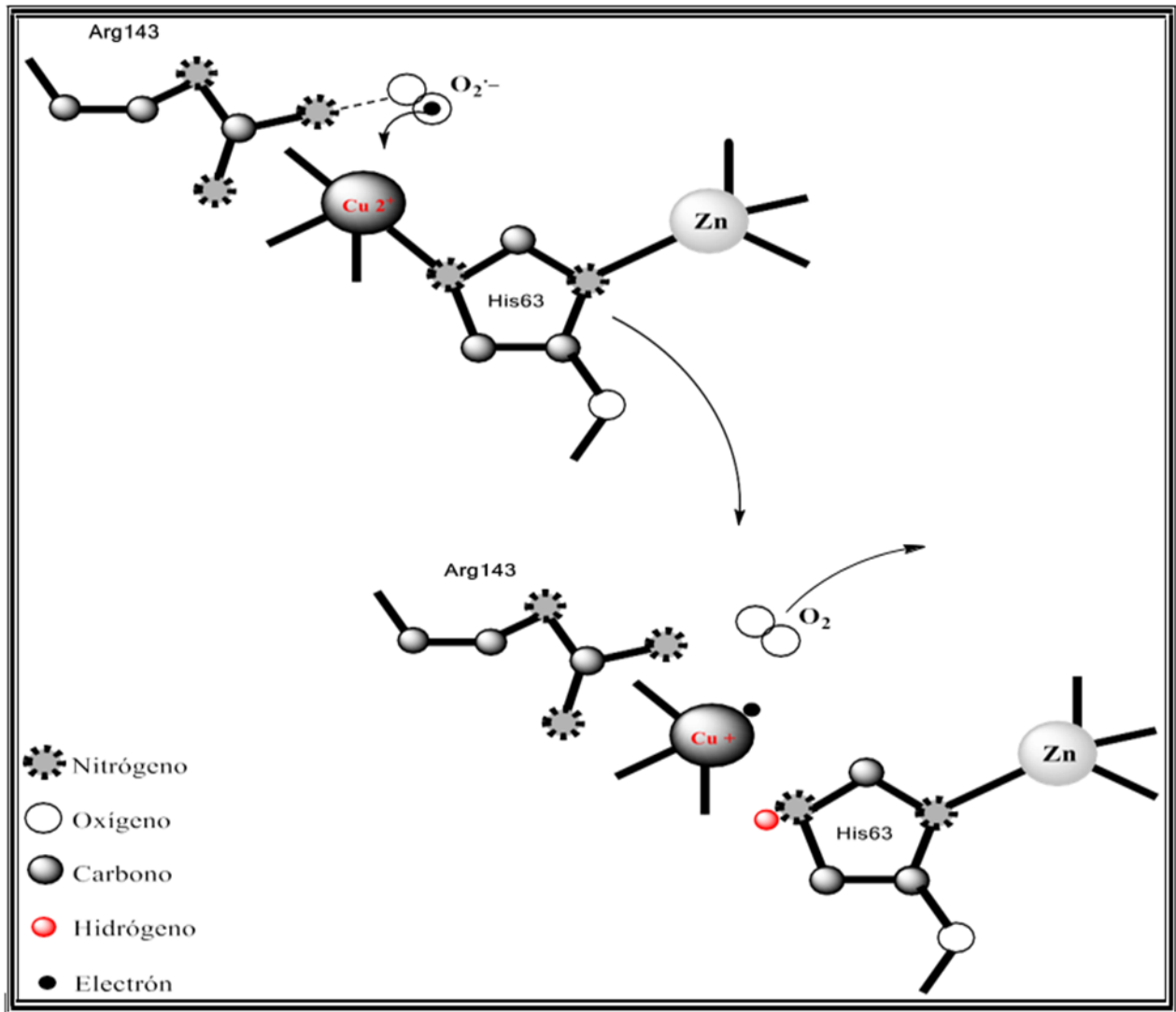


Figura 10. Imagen que muestra la primera parte de la reacción de dismutación (Eliminación del primer superóxido y reducción del cobre).

Segunda parte de la reacción. Transformación del segundo anión peróxido en peróxido de hidrógeno y regeneración del centro catalítico. (Figura 11). La segunda parte de la reacción de dismutación inicia de manera similar a la primera, una vez más un $O_2^{\bullet-}$ se une a la arginina 143 por medio de una interacción electrostática, aunado a esto, se genera en la proximidad del centro catalítico, la protonación de una molécula de agua (H_3O^+). El e^- recibido por el Cu en la primera parte de la reacción, es ahora transferido al segundo $O_2^{\bullet-}$, permitiendo la oxidación del Cu a Cu^{2+} . Los dos e^- que posee en este momento el superóxido puede formar dos enlaces covalentes con dos protones, uno de ellos es donado por la molécula del agua protonada, y el otro por la histidina 63, lo que favorece que

se restablezca el enlace que originalmente formaba con el Cu^{2+} , esto permite la liberación del H_2O_2 y la regeneración de la enzima la cual queda preparada para otro ciclo catalítico [88].

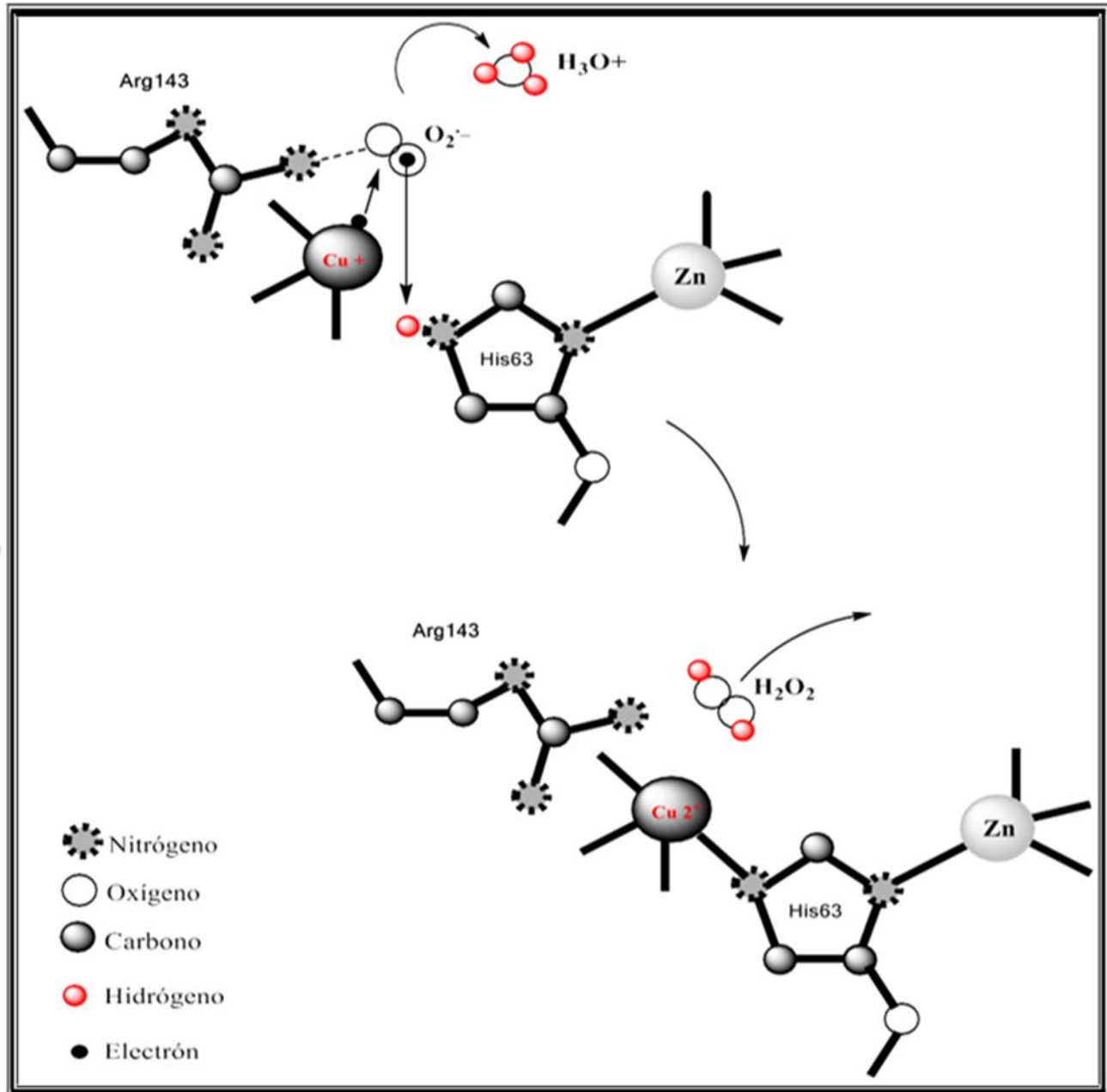


Figura 11. Segunda parte de la reacción de dismutación (Transformación del segundo anión peróxido en peróxido de hidrógeno y regeneración del centro catalítico).

Glutación peroxidasas (GPx):

La GPx es el nombre genérico que se le da a una familia de isoenzimas que se caracterizan por estar constituidas de una triada catalítica compuesta de selenocisteína, glutamina y triptófano, debido a la selenocisteína a este grupo de enzimas se les conoce como selenoproteínas. La selenocisteína es un análogo de la cisteína, sin embargo, en lugar del grupo tiol característico de la cisteína, la selenocisteína contiene un grupo selenol que posee selenio, este grupo es indispensable para llevar a cabo la catálisis redox [89]. Se han descrito 4 isoenzimas de GPx en los mamíferos: la GPx clásica (GPx-1), la cual se localiza en el citosol de casi todos los tejidos, la GPx gastrointestinal (GPx-2), se localiza en el hígado y tracto intestinal, la GPx de tipo plasmática (GPx-3), se encuentra en fluidos extracelulares de varios tejidos principalmente en el riñón y la GPx de fosfolípidos (GPx-4), se localiza en la membrana y citosol de varios tejidos principalmente en testículos, hígado, riñón y pulmón [90].

En se han descrito cuatro isoformas de GPx, se muestran en la siguiente tabla:

Isoenzima de GPx	Localización en la célula	Estructura que presenta	Peso molecular kDa
GPx-1	Citosol	Homotetrámero	88
GPx-2	Citosol	Homotetrámero	88
GPx-3	Fluidos extra-celulares	Homotetrámero	92
GPx-4	En citosol y membrana celular	Monómero	19.7

Tabla 2. Se observa la distribución, la estructura y el peso molecular de las diferentes Isoenzimas de la GPx.

La GPx requiere de un tripéptido llamado glutación reducido (GSH), para poder reducir el H_2O_2 a agua. El GSH es uno de los grupos tiol más estudiados se encuentra conformado por: ácido glutámico, cisteína y glicina (Figura 12), se ha descrito que la capacidad reductora de las isoenzimas de GPx dependen de las concentraciones del GSH. El grupo sulfhidrilo (-SH) del GSH que contiene en su residuo de cisteína puede utilizarse para inactivar especies reactivas tanto de oxígeno como de nitrógeno [90].

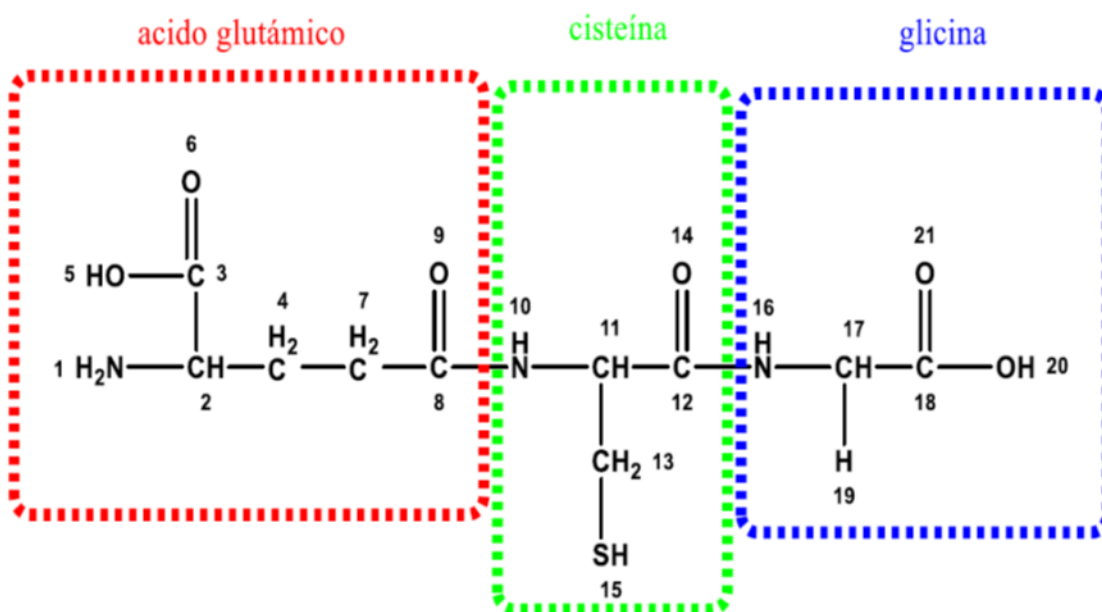
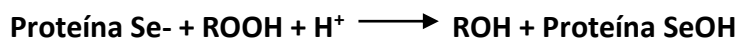
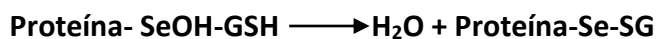


Figura 12. Estructura del tripéptido glutatión, formado por: ácido glutámico, cisteína y glicina.

Durante el mecanismo catalítico de las GPx, un selenol (proteína Se-) reacciona con H₂O₂ o con ONOO- para dar origen a un ácido selénico (proteína SeOH):



El primer GSH es entonces enlazado:



El segundo GSH es enlazado:



La forma resultante del GSH oxidado es el GSSG, consiste en dos moléculas de disulfuro unidas entre sí (Figura 13).

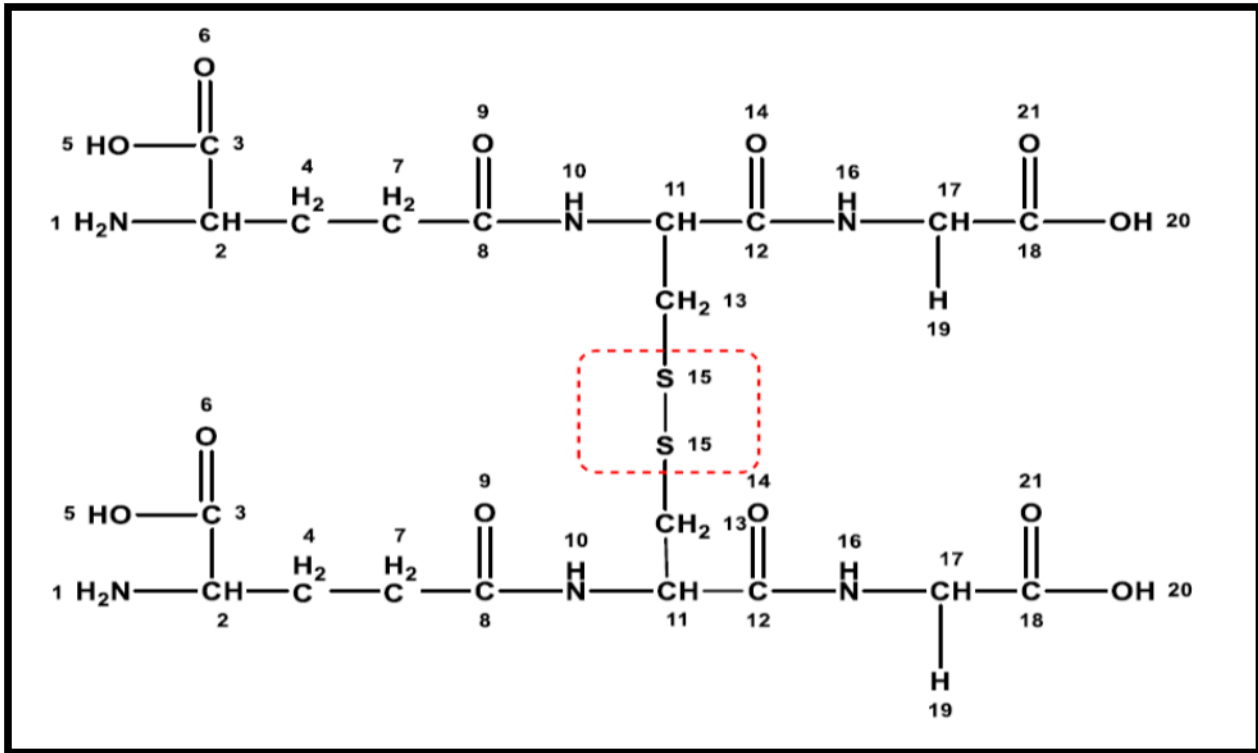
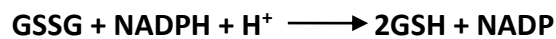


Figura 13. Se observa la estructura del GSSG, que consiste en dos moléculas unidas de disulfuro.

El GSSG es vuelto a su forma reducida por medio del glutati6n disulfuro reductasa (GSR). La GSR utiliza NADPH como cofactor para reducir GSSG a dos moléculas de GSH. El NADPH requerido por la GSR es proporcionado principalmente por la vía de las pentosas fosfato en su fase oxidativa [89], en la siguiente reacción se observa el proceso anterior:



Catalasa (CAT):

La CAT, es una de las enzimas más rápidas que existen. Una molécula de CAT cataliza la transformación de alrededor de 1×10^7 moléculas de sustrato por segundo. La CAT cataliza la descomposición del H_2O_2 en oxígeno y agua:



Se conocen tres tipos de CAT: la CAT típica (CAT mono funcional), CAT-per oxidasa y Manganeso- CAT [91].

La CAT típica tiene una masa de 50 a 65 kDa, se encuentran compuestas por cuatro subunidades idénticas de alrededor de 480 aminoácidos por subunidad. El extremo amino terminal comprende los primeros 70 aminoácidos, y a partir del él se extiende una región globular constituida de los otros tres dominios: un barril- β , un dominio de conexión y el dominio α -helicoidal [92].

La CAT-peroxidasa son homodímeros con subunidades de 65 a 85 kDa. Cada subunidad de la enzima contiene un grupo hemo el cual suele ser el protohemo -IX; sin embargo, también se han reportado grupos hemo distintos. Las CAT-peroxidasas están ampliamente distribuidas en bacterias, pero solo se han descrito en cuatro géneros arqueobacterias, y en los microorganismos eucariotas solo se han encontrado en los hongos [93].

La Manganeso-CAT, pueden ser homohexámeros u homotetrámeros, cuyas subunidades de 30kDa muestran un arreglo de cuatro hélices- α anti paralelas entre las que se encuentran inmersos los dos átomos de Mn. El sitio activo de dimanganeso se encuentra coordinado por los residuos de histidinas, glutamatos y/o aspartatos provenientes de las cuatro hélices antiparalelas. Los dos átomos de Mn, a su vez, se encuentran unidos entre sí por un oxígeno [93].

La expresión de la CAT en los mamíferos es muy variable por ejemplo: en eritrocitos y en el hígado es muy elevada, alta en tejido adiposo y riñón, moderada en el páncreas y pulmones, y baja en corazón y en el cerebro [93]. La mayor parte de la CAT se encuentra localizada en los peroxisomas, sin embargo en los eritrocitos es citosólica [92].

Además de los sistemas de defensa endógenos, el cuerpo humano también utiliza antioxidantes exógenos provenientes de la dieta para limitar la sobreacumulación de ERO y RL. Estos incluyen, pero no se limitan a, ácido ascórbico también nombrado comúnmente como vitamina C, α - tocoferol conocido como vitamina E y los flavonoides [46].

La vitamina C (VIT-C)

La VIT-C, es el enantiómero S del ácido ascórbico y es clasificada como un nutrimento indispensable en la dieta, debido a que el ser humano, no tiene la capacidad de sintetizarla. Las mayores fuentes de VIT-C presente en los alimentos son: la toronja, guayaba, mango, chile, nopal y perejil entre otros [94]. En el organismo la VIT-C a pH fisiológico se puede encontrar en forma de anión ascorbato (ASC) (Figura 14). La VIT-C se encuentra implicada en funciones fisiológicas como en la biosíntesis de colágeno, la carnitina y de algunos neurotransmisores, particularmente de las catecolaminas [95].

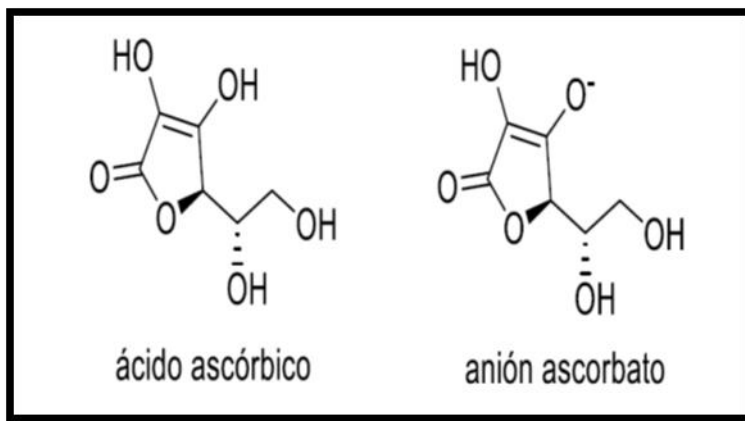


Figura 14. El ácido ascórbico en los organismos.

La absorción de la VIT-C depende principalmente de dos tipos de transportadores el transportador de vitamina C de sodio tipo 1 (TVCS1) y tipo 2 (TVCS2). Sin embargo, el TVCS2 es el que se encuentra asociado para su transporte hacia el citosol de la neurona desde el plasma. Por otro lado, los astrocitos pueden absorber la VIT-C a través de transportadores de glucosa (GLUT) [96].

El cerebro es uno de los órganos que presentan una gran cantidad de VIT-C y las neuronas pueden alcanzar concentraciones de 10 mmol / L [96]. En las neuronas una de sus principales funciones es la de un potente agente antioxidante, puede neutralizar radicales libres, como el $O_2^{\bullet-}$, $\bullet OH$ y $LOO\bullet$. Sin embargo, una de las características peculiares de la VIT-C es tener la capacidad de regenerar antioxidantes como el α -tocoferol [94]. Por ejemplo, el radical α -tocoferilo generado en la membrana celular como consecuencia de la acción del α -tocoferol como antioxidante, reacciona con la VIT-C

regenerándolo a su estado reducido, a su vez la VIT-C puede ser regenerada por la acción del GSH [94,96].

Por otro lado, se han evaluado los efectos protectores de la VIT-C en el SNC y se ha reportado que la administración intraperitoneal de 125 mg/kg de la VIT-C, en el modelo animal de la enfermedad de Alzheimer (EA), basado en el metabolismo de la proteína precursora del amiloide del ser humano y la presenilina 1 (APP/PS1), impidió el daño cognitivo en pruebas de memoria espacial y disminuyó la formación de agregados del péptido Beta amiloide (β a) [97]. En otro estudio utilizando el mismo modelo animal, se observó que la administración de 1335 mg/kg de VIT-C vía oral mejoró los procesos de memoria y aprendizaje, disminuyó la oxidación de proteínas y aumentó la concentración del antioxidante GSH [98]. A su vez se ha reportado un papel antioxidante y antiinflamatorio de la VIT-C en un modelo de EA provocado por la administración de colchicina. En este modelo de EA se ha reportado que la colchicina incrementa los niveles de ERO y de marcadores inflamatorios como el TNF- α y la IL-1 β en el hipocampo. En el mismo modelo, se observó que la administración de 200 y 400 mg/kg de VIT-C, previno alteraciones en la memoria de trabajo y de referencia. Además se reportó una disminución en las concentraciones de ERO y de los marcadores inflamatorios [99].

El α -tocoferol

Los tocoferoles y tocotrienoles (colectivamente conocidos como tocoles) son compuestos monofenólicos, y comprenden un grupo de ocho homólogos de cromanol que poseen actividad de vitamina E. Sin embargo, de entre ellos, el α -tocoferol (Figura 15), posee la mayor capacidad antioxidante [100].

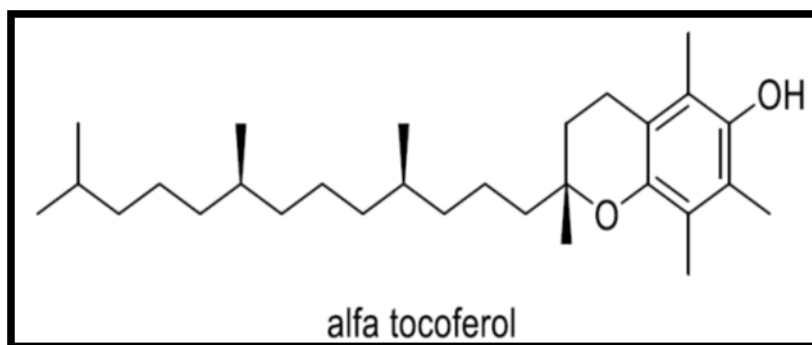


Figura 15. Molécula del α -tocoferol.

En la dieta el α -tocoferol se encuentra principalmente en el aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de palma y el grano de trigo [101]. Es el principal antioxidante liposoluble dentro de la célula inhibiendo formas reactivas de los radicales libres de oxígeno, principalmente es la encargada de proteger a los ácidos grasos insaturados de la oxidación, previendo la LP ya que puede reaccionar con $LOO\bullet$, formando el radical α -tocoferilo, el electrón desapareado resultante se deslocaliza sobre el anillo aromático, lo que hace que sea insuficientemente reactivo para abstraer un protón de un LH contiguo impidiendo la LP en cadena [100]. En el cerebro existen mecanismos para una mayor captación y retención del α -tocoferol en comparación con otros tejidos esto se da por medio, de la proteína de transferencia del tocoferol (PTT). La PTT es también esencial para mantener los niveles altos del α -tocoferol en el cerebro [102].

Por otro lado, en un ensayo controlado con placebo, pacientes con EA tratados con 2000 IU de α -tocoferol mostraron retraso en el desarrollo de demencia en comparación con el grupo control [103]. En otro estudio semejante en pacientes con EA leve y moderada la administración de 2200 unidades de α -tocoferol, durante 5 años resultó en un declive funcional más lento en comparación con el grupo placebo [104]. Por otro lado, la administración de 241 unidades/ kg de α -tocoferol, en el modelo del animal de EP inducido por la 6-hidroxidopamina (6-OHDA), mostró una reducción de muerte neuronal del 20 por ciento al ser comparado con el grupo tratado solo con la 6-OHDA [105].

Los flavonoides

Los flavonoides constituyen uno de los grupos más comunes de polifenoles presentes en la dieta del ser humano [106,107] y su ingesta diaria varía de 20 mg -500 mg [108]. Se encuentran presentes en las frutas, vegetales y en gran variedad de plantas utilizadas para preparar diferentes infusiones [106].

Los flavonoides se caracterizan por compartir un esqueleto en común, compuesto de dos anillos de fenilo (anillos A y B), unidos por una cadena de tres átomos de carbono formando un anillo heterocíclico (anillo C) cerrado con el anillo bencénico A (Figura 16) [109].

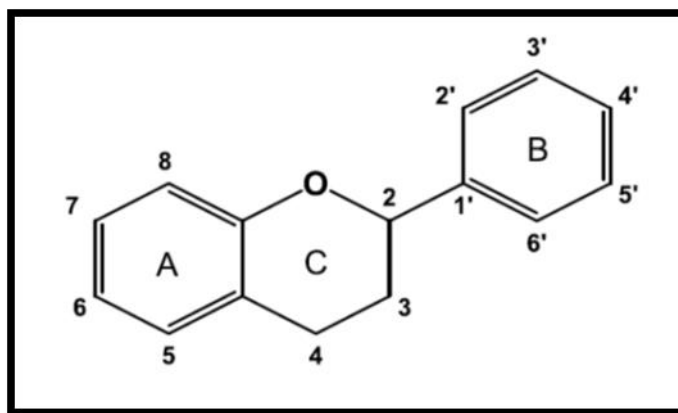
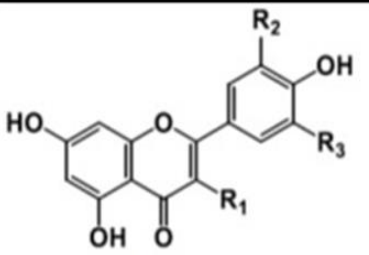
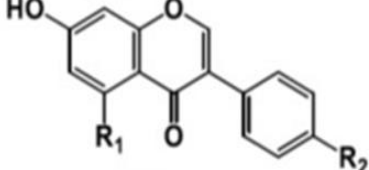
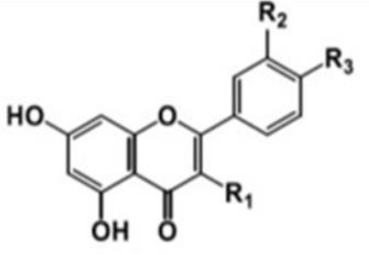
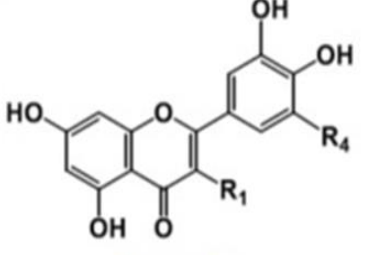
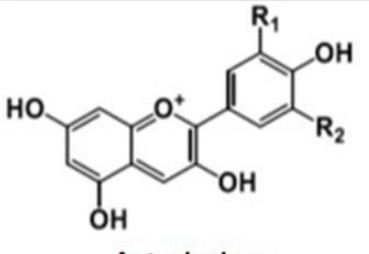


Figura 16. Estructura básica de los flavonoides.

Los flavonoides pueden ser clasificados en varios subgrupos según el grado de oxidación del anillo C, el patrón de hidroxilación de la estructura del anillo y la sustitución en la posición 3 [107]. Los principales flavonoides que se encuentran en los alimentos son: 1) flavonoles (kaempferol, quercetina), que se encuentran en cebollas, puerros y brócoli; 2) flavonas (apigenina, luteolina), que se encuentran en perejil y apio; 3) isoflavonas (daidzeína, genisteína), que se encuentran principalmente en productos elaborados a partir de soya; 4) flavanones (hesperetina, naringenina), que se encuentran en frutos cítricos y tomates; 5) flavanoles (por ejemplo, catequina, epicatequina, epigallocatequina y galato de epigallocatequina), que son abundantes en el té verde, vino tinto y chocolate; y 6) antocianidinas (delfinidina, pelargonidina, cianidina, malvidina), cuyas fuentes incluyen el vino tinto y principalmente las bayas (Tabla 3) [106,109,110].

Por otro lado, se ha descrito a los flavonoides como potentes antioxidantes que atrapan a los radicales libres como los $\bullet\text{OH}$ y $\text{LOO}\bullet$ bloqueando su acción tóxica y esta acción antioxidante se basa en su capacidad de donar protones, a su vez los flavonoides son capaces de quelar iones metálicos de transición impidiendo que se generen otras especies más tóxicas como el $\bullet\text{OH}$ a través de la reacción del Fenton [108].

Tabla 3. Se observan los esqueletos de las diferentes clases de flavonoides, algunos ejemplos, actividades antioxidantes y los alimentos que los contienen.

Estructura	Ejemplos	Efectos antioxidantes y sus concentraciones	Alimentos que los contienen
 <p style="text-align: center;">Flavonoles</p>	<p>Quercetina</p>	<p>Administración de 75mg/kg de Quercetina, disminuye la concentración de ERO y la muerte neuronal en un modelo de Parkinson [117]</p>	<p>Cebollas, puerros y brócoli</p>
 <p style="text-align: center;">Isoflavonas</p>	<p>Daidzeína Genisteína</p>	<p>Administración de 10mg/kg de Genisteína, disminuye la concentración de MDA e impide el déficit cognitivo en un modelo animal de Alzheimer [118]</p>	<p>Soya</p>
 <p style="text-align: center;">Flavanonas</p>	<p>Naringenina Hesperetina</p>	<p>Estudios in vitro han demostrado que las concentraciones de 100nM de hesperidina posee una potente actividad antioxidante en células de neuroblastoma [119]</p>	<p>Frutos cítricos y tomates</p>
 <p style="text-align: center;">Flavonoles</p>	<p>Catequina Epicatequina Epigallocatequina</p>	<p>Administración de 50mg/kg de Epigallocatequina, disminuye la lipoperoxidación y la muerte neuronal en un modelo de Isquemia [120]</p>	<p>Té verde, chocolate</p>
 <p style="text-align: center;">Antocianinas</p>	<p>Cianidina Petunidina Delfinidina Malvidina</p>	<p>Administración de dosis de 50 mg/kg de MQ disminuyó de forma significativa los niveles de marcadores de estrés oxidativo en un modelo de accidente cerebro vascular [121]</p>	<p>Bayas y vino tinto</p>

Los flavonoides se encuentran presentes en los alimentos en forma de flavonoides glucósidos es decir contienen un glúcido en su estructura (generalmente sacáridos) [110]. Una vez ingeridos, los flavonoides glucósidos son sometidos a diferentes procesos metabólicos [106]. Por ejemplo en el intestino delgado, la Lactasa-Florizina Hidrolasa (LFH), que se encuentra en la membrana del borde en cepillo de las células intestinales [111], puede hidrolizar a los flavonoides glucósidos, debido a que exhibe una amplia especificidad de sustrato para ellos, y los flavonoides agliconas resultantes (la forma del flavonoide sin el sacárido unido), pueden entonces ingresar por difusión a la vena porta, donde posteriormente pasarán por un metabolismo adicional en el hígado, ya sean procesos de glucuronidación, sulfatación u O-metilación. Sin embargo, estos procesos también pueden presentarse en el intestino delgado [112]. Otro paso hidrolítico alternativo, es mediado por la enzima β -Glucosidasa Citosolica (BGC), para que ocurra este hidrolisis, los flavonoides glucósidos polares deben ser transportados a las células epiteliales, por medio del transportador de glucosa dependiente de sodio activo. Por lo tanto, hay dos rutas posibles por las cuales los conjugados de glucósidos se hidrolizan: "LFH / difusión" y "transporte / BGC" [111].

A su vez, los flavonoides que no son absorbidos en el intestino delgado pueden ser metabolizados por el colon con ayuda de la microbiota que induce su descomposición en diferentes ácidos fenólicos [106,112]. Después de los procesos metabólicos efectuados en el intestino delgado, en el colon y en hígado, los metabolitos resultantes de los flavonoides, pueden llegar a la circulación sistémica, cruzar la barrera hematoencefálica (BHE) y entrar en el cerebro (Figura 17) [106,113]. En este sentido, la biodisponibilidad de los flavonoides y / o sus metabolitos en el cerebro dependerá de su capacidad para atravesar la BHE, una capacidad que a menudo ha sido asociada con la lipofilicidad [114]. Con base en lo anterior, los flavonoides o metabolitos menos polares (es decir, derivados O-metilados), tendrán una mayor capacidad de absorción en el cerebro que los flavonoides más polares y / o metabolitos (sulfatados y glucuronidados) [106,109,114]. Sin embargo, actualmente existe evidencia que sugiere que algunos transportadores de la BHE están implicados en el flujo de los flavonoides hacia el cerebro, entre ellos se encuentran: las proteínas relacionadas con resistencia a múltiples fármacos, los transportadores de aniones orgánicos, las proteínas transportadoras de aniones orgánicos, y la glicoproteína-P [115,116].

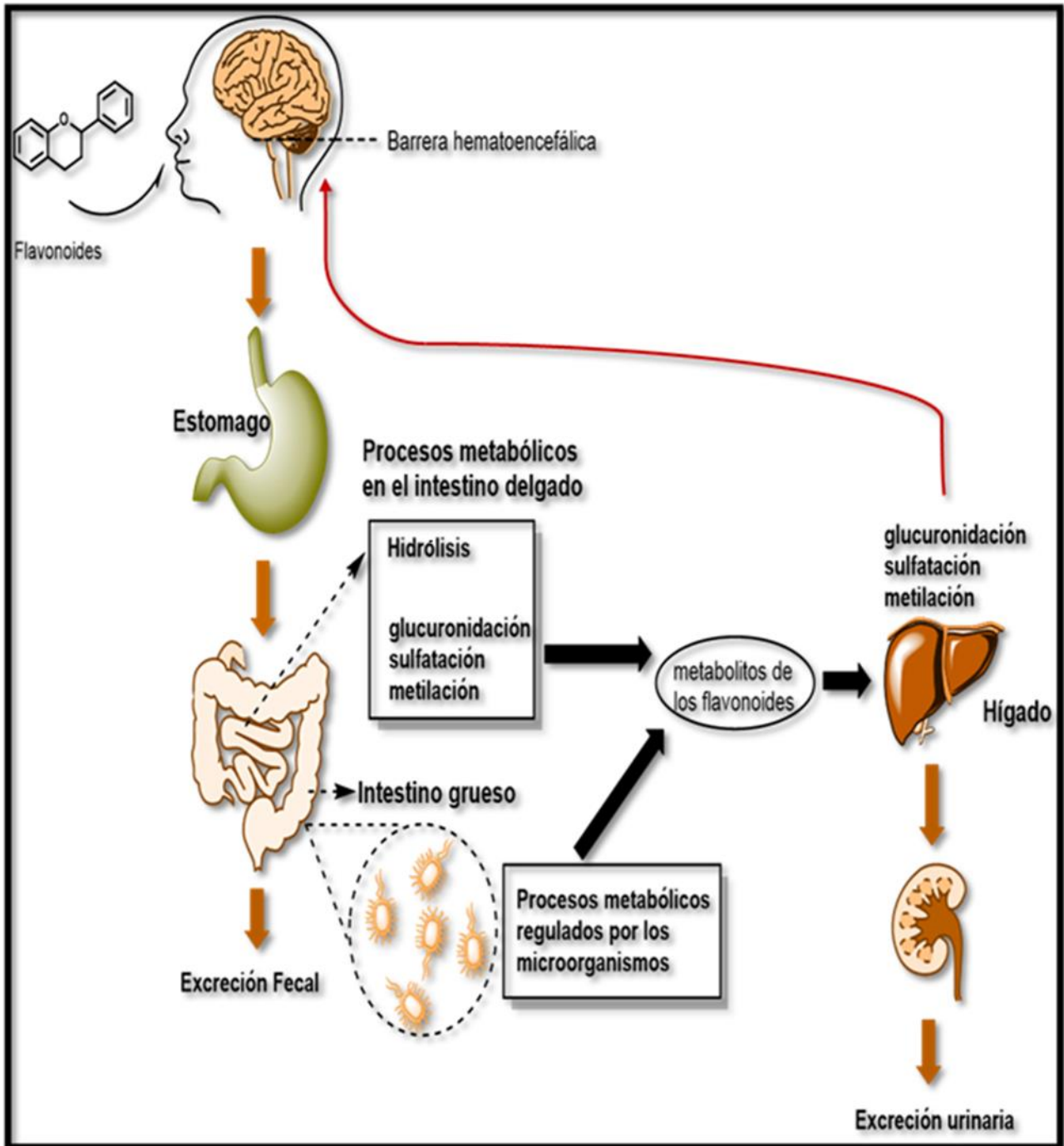


Figura 17. Resumen del metabolismo de los flavonoides. La hidrólisis de los flavonoides glucósidos, libera formas de flavonoides aglicona, que pueden ser absorbidos sin modificaciones o sujetos a glucuronidación, sulfatación u O-metilación en el intestino delgado y el hígado. La transformación de flavonoides no absorbidos ocurre a través de la microbiota intestinal. Los metabolitos resultantes pueden llegar a la circulación sistémica, cruzar la BHE y entrar en el cerebro.

Por lo que se refiere a los efectos protectores de los flavonoides en el cerebro, en modelos animales de EA, que presentan déficit cognitivo, se ha observado mejorías en su capacidad cognitiva al ser tratados con flavonoides purificados, por ejemplo, la administración de 25 mg/kg de fisetina (flavonol) y de 40 mg/kg de apigenina (flavona) en ratones transgénicos (APP/PS1), presentaron mejoras cognitivas en el aprendizaje y la memoria espacial, además previnieron la disminución de la actividad enzimática de SOD Y GPx presentes en estos ratones transgénicos. Además, se observó que estos flavonoides pueden activar la expresión de la proteína de unión a elementos de respuesta de cAMP (CREB) un factor de transcripción, e incrementar la expresión de genes asociados con el re-modelado de la sinapsis, como el del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) [122-123]. Tanto CREB como BDNF se han asociado con el aumento en la plasticidad sináptica, ya que se ha demostrado que existe una mayor conexión y comunicación neuronal cuando se incrementa la expresión de estos genes. En condiciones más severas de deterioro cognitivo, inducido por inyecciones de β a, la administración de apigenina, quercetina o 5-hidroxi-6,7,40-trimetoxiflavona, lograron aminorar los daños a partir de una semana de tratamiento [113].

Por otro lado, en un modelo de EA se ha observado que la administración de epicatequina previene la formación de ERO y disminuye la LP provocados por la inyección de β a, en el hipocampo de ratas macho [124].

Así mismo en modelos de EP inducidos por la 6-hidroxidopamina (6-OHDA) o por la inyección del 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), se ha visto que la epigallocatequina atenúa la toxicidad y el daño en la estructura de la sustancia nigra [124,125] además de disminuir marcadores de LP como el 4HNE y depurar radicales libres en estudios similares [126].

Así mismo, se han evaluado los efectos de la ingesta de flavonoides sobre la demencia en adultos mayores. Para ejemplo de lo anterior, adultos mayores con discapacidad cognitiva leve, quienes consumieron diariamente dosis de entre 444mL a 621mL de jugo de uva durante 12 a 16 semanas, mostraron mejoría en la memoria episódica y de aprendizaje verbal [127,128], estos efectos benéficos se presentan también con el consumo de jugo de mora azul, durante 12 semanas [129]. Mientras que en adultos mayores con discapacidad cognitiva leve la administración de 120mg del extracto de Ginkgo biloba, resultó en una mejora del rendimiento cognitivo, mientras que, en pacientes con EA, el

extracto de Ginkgo biloba logró ralentizar significativamente el deterioro cognitivo progresivo, comparado con pacientes a los cuales se les dio un placebo [130].

Sin embargo, actualmente existen varios trabajos que han tratado de dilucidar otras posibles vías, por las cuales los flavonoides ejercen sus efectos neuroprotectores, entre ellas destacan, la capacidad de modular las vías de señalización mediadas por quinasas y la posible capacidad de regular rutas de supervivencia celular [107]. Con base en lo anterior, se ha observado en modelos in vivo, que productos como el té verde, la mora azul, o el Ginkgo biloba, pueden activar vías de señalización relacionadas con la memoria y aprendizaje entre ellas, Activación de proteincinasas como Ca²⁺/Calmodulina proteína cinasa II (CaMKII), proteína cinasa A (PKA), proteína cinasa (B), proteína cinasa C (PKC) y la cinasa regulada por señal extracelular (ERK), aumento en la expresión de genes como CREB y aumento en la cantidad de proteína BDNF [110]. A su vez, en estudios in vitro se han reportado que flavonoides puros como el flavanol, la epicatequina y la hesperetina, activan ERK e incrementa la fosforilación del factor de transcripción CREB [113]. Además de la activación de las rutas anteriormente mencionadas, los flavonoides pueden aumentar la traducción de ARNm específicos, como Arc el cual ha sido implicado en los cambios de fuerza sináptica e inducción de cambios morfológicos en las espinas dendríticas [110].

El Maqui Berry (MQ)

Aristotelia chilensis, (Molina) Stuntz, también conocido como “maqui”, “maki” (Mapuche), o “queldron”, es un árbol pequeño perteneciente a la familia Eleocarpaceae [131, 132]. Es una especie nativa chilena que produce pequeñas bayas comúnmente conocidas como “maqui Berry” (MQ) que son recolectadas en forma silvestre. Las flores y las distintas etapas de maduración del MQ se aprecian en la (Figura 18) [133].

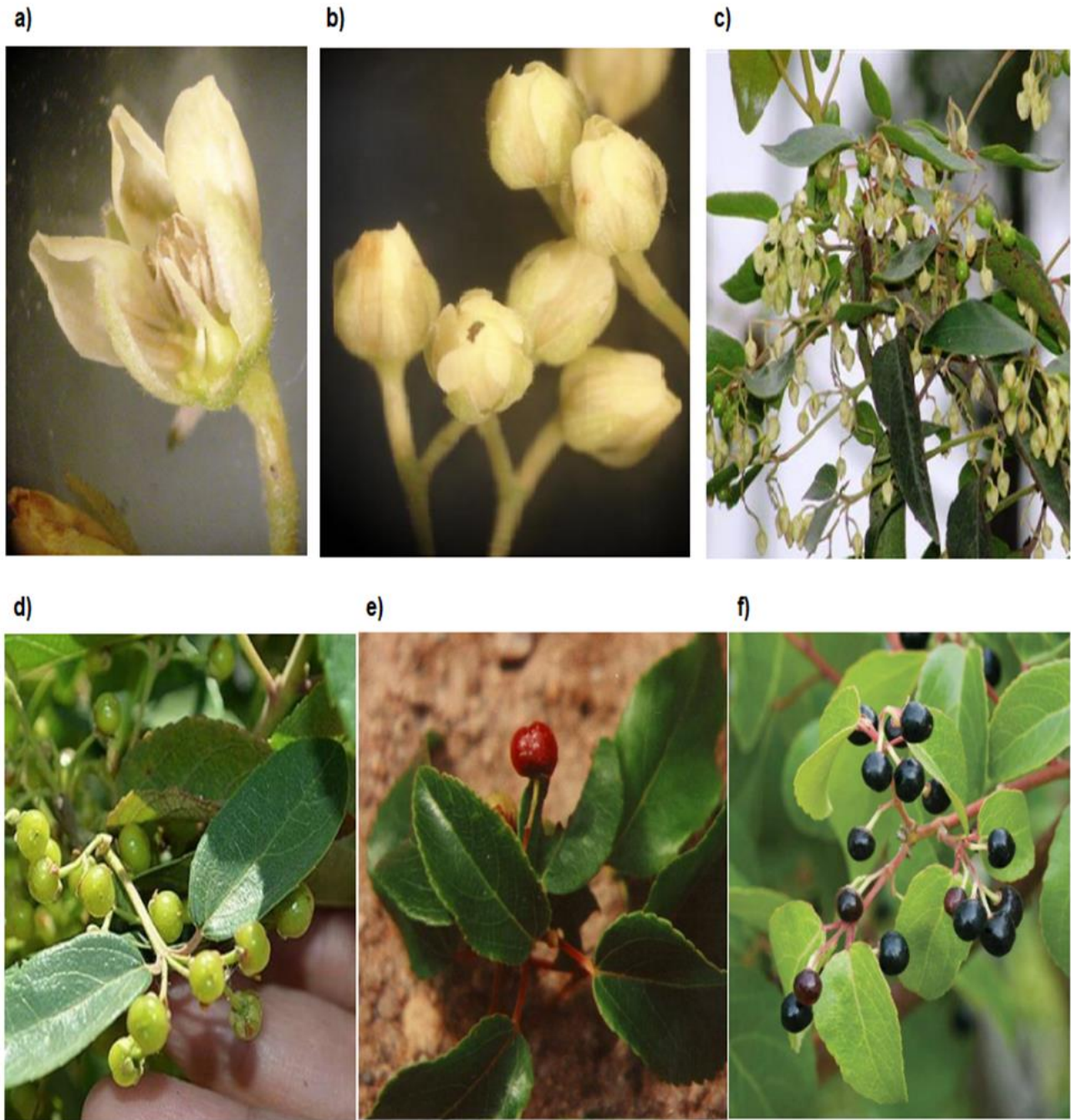


Figura 18. En las imágenes de la parte superior (a, b y c), se pueden apreciar las flores de color amarillo, de 5-6mm de diámetro, las cuales se encuentran en inflorescencia y agrupadas en corimbo de 2 a 3. Mientras que en las imágenes de la parte inferior (d, e y f) se pueden observar los distintos estados de maduración del MQ, pasando de verde a rojo y finalmente a un color púrpura-negro en su etapa madura [134].

Aristotelia chilensis (Molina) Stuntz, es una especie endémica de los bosques subantárticos de Chile, crece en varias regiones que van desde Coquimbo hasta Aysén (Figura 19). Se desarrolla muy bien en quebradas, faldeos de cerros o márgenes de bosques, principalmente crece en lugares húmedos, coloniza terrenos que han perdido su cubierta vegetal, transformándose en una especie pionera de suelos recién quemados o explotados [134].



Figura 19. Se observan las regiones de Chile donde el MQ se distribuye. Empezando desde la región de Coquimbo en la zona más al norte, hasta la región de Aysén en el sur.

El MQ es una baya redonda comestible de color púrpura-negro brillante, de unos 5 mm de diámetro, debido a lo dulce de su pulpa es muy apreciada para su consumo fresco. En la cultura mapuche el MQ es utilizado para curar diarreas crónicas y aliviar los síntomas asociados a la disentería [135]. Se ha descrito que el MQ contiene cantidades significativamente altas de flavonoides, en especial de las antocianinas; correspondientes a 3-glucósidos, 3,5-diglucósidos, 3-sambubiósidos y 3-sambubiósido-5-glucósidos de delphinidina y cianidina, siendo la principal antocianina delphinidina 3-sambubiósido-5-glucósido (34% de antocianinas totales) [131,132]. A su vez, se ha descrito una alta capacidad antioxidante ORAC en comparación con otras bayas, como es el açai de Brasil o el arándano nativo chileno Tabla 4 [131,132].

Bayas	Contenido total de antocianinas (mg/100g p.s.)	Capacidad antioxidante ¹ (ORAC, μ mol ET/g p.s.)	Flavonoides totales ² (mg EAG/100g p.s.)
MQ (<i>Aristotelia chilensis</i>)	614,12\pm7,32 (136)	299\pm0,98 (136)	1420\pm10,00 (133)
Açai (<i>Euterpe oleracea</i>)	347,81\pm35,86 (136)	283\pm3,88 (136)	312\pm2,60 (137)
Árândano (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.)	101,88\pm2,36 (138)	55,7\pm2,94 (139)	274,48\pm15,83 (140)

Tabla 4. Comparación del contenido total de antocianinas, capacidad antioxidante (ORAC) y contenido de flavonoides totales en MQ, açai y arándano.

Capacidad antioxidante¹: Datos expresados como μ mol de equivalentes Trolox en un gramo de peso seco (p.s.).

Flavonoides totales²: Datos expresados como mg de equivalentes de ácido gálico en cien gramos de peso seco (p.s.).

Por otro lado, se ha reportado que el jugo de MQ inhibe la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y protege a las células endoteliales de del estrés oxidativo intracelular [131]. A su vez, extractos de MQ, han mostrado un efecto protector preventivo en estudios in vivo de Isquemia / repercusión en corazón de ratas, que se atribuye a la reducción de la oxidación lipídica y del estrés

oxidativo [141]. Además de su alto poder antioxidante, se han descrito otras actividades farmacológicas del extracto de MQ como: antiinflamatorias y analgésicas [142].

En el cerebro se ha descrito un efecto neuroprotector del extracto de MQ sobre las neuronas del hipocampo incubadas con el péptido β -amiloide (β a), MQ favorece la recuperación en la frecuencia transitoria del canal de calcio, una mejoría en la actividad sináptica espontánea, la preservación de la arborización dendrítica y la disminución de muerte neuronal. MQ puede inducir cambios en la cinética de agregación del β a, produciendo variaciones en la fase de nucleación, lo que genera menos especies tóxicas y protegerá la red neuronal. Los efectos benéficos mencionados anteriormente han sido atribuidos a la gran actividad antioxidante de MQ [143].

En un estudio reciente, el extracto de MQ disminuyó el número de ataques epilépticos y la muerte neuronal en animales tratados con ácido kaínico a los 17 y 32 días después del nacimiento; reduciendo así el riesgo de crisis epilépticas durante desarrollo [144].

Con base en lo descrito anteriormente, el MQ resulta ser un excelente candidato para evaluar sus efectos antioxidantes y posiblemente neuroprotectores, en un modelo de estrés oxidativo provocado por la exposición crónica a O_3 . El modelo del animal expuesto a O_3 , es ampliamente aceptado para poder analizar los efectos del estrés oxidativo en el SNC, resultando en la lipoperoxidación de la membrana celular, oxidación de proteínas, inactivación enzimática, fragmentación del DNA y apoptosis celular. En este mismo modelo, se han hallado alteraciones en las funciones cerebrales relacionadas con los eventos de memoria y aprendizaje. Por ejemplo, se ha reportado déficit en los procesos de la memoria y aprendizaje y cambios bioquímicos en áreas relacionadas con estos procesos en ratas expuestas a O_3 por largo plazo.

Por lo tanto, en el presente trabajo, evaluamos los posibles efectos antioxidantes y protectores del extracto de MQ, en algunas regiones del cerebro asociadas con el rendimiento cognitivo, en un modelo de estrés oxidativo por exposición a O_3 .

6. HIPÓTESIS

Si, el extracto de Maqui berry presenta actividad antioxidante en el cerebro, entonces su administración en animales expuestos a O₃, disminuirá el daño oxidativo, reflejándose en la disminución de algunos marcadores de estrés oxidativo y la prevención del déficit cognitivo.

7. METODOLOGÍA

Animales

Se utilizaron ratas macho adultas de la cepa Sprague Dawley (250–300 g de peso) los cuales se colocaron en cajas de acrílico (cinco animales por caja) con acceso ad libitum, al agua y a los alimentos (dieta Formulab 5008, Labdiet, St. Louis, MO, EE. UU.). Los animales se mantuvieron en una habitación con 12 h ciclo de luz / oscuridad (inicio del ciclo de luz a las 8:00 h). Los animales fueron tratados de acuerdo con las pautas y requisitos de la Declaración de Helsinki por la Asamblea Médica Mundial y por el Comité de Ética de la Coordinación de Investigación en Salud del Instituto Mexicano de Seguridad Social (CIS / R-2017-785-060 IMSS).

Exposición a ozono (O₃)

Durante 30 días consecutivos, los animales fueron expuestos a una dosis constante de 0.25 ppm de O₃ por 4 h al día. Para realizar la exposición a O₃, los animales fueron colocados dentro de una cámara con un difusor conectado a un generador de flujo variable O₃ (5 l / s), como se ha descrito anteriormente [77]. El convertidor de O₃ se alimentó con aire purificado filtrado. Los niveles de producción de O₃ fueron proporcionales a la intensidad y al flujo de aire. Para monitorear que los niveles de O₃ fueran constantes a 0.25ppm dentro de la cámara durante los experimentos, se monitorearon las concentraciones de O₃, por medio de un sensor (PCI Ozone y Control Systems, West Caldwell, NJ, EE. UU.). Aunque los animales de control estuvieron expuestos a una corriente de aire libre de O₃, los mismos protocolos de exposición fueron utilizados para estos grupos. Después de la exposición, los animales fueron inmediatamente regresados a sus jaulas.

Tratamientos

El polvo de bayas de Maqui Berry CHI2 (Selva ecuatoriana, LLC, EE.UU.) fue utilizado en este estudio y consiste en fruto de Maqui Berry molido en agua y después liofilizado (MQ). El polvo resultante es rico en antocianinas (600 mg / 100 g de peso seco), por análisis HPLC, principalmente delfinidinas y

cianidinas), y otros compuestos de interés, tales como derivados del ácido eláxico (14 mg / 100 g de peso seco), flavonoles (24 mg / 100 g de peso seco) y ácido clorogénico (9 mg / 100 g de peso seco) [136]. En el presente estudio se administraron las dosis de 50 y 100 mg/kg de MQ ya que en estudios previos, la administración de estas dosis tuvo efectos protectores en el cerebro [144, 121].

Las ratas se dividieron al azar en siete grupos experimentales, los cuales se agruparon de la siguiente manera (Figura 20):

Grupo 1 (NT): Ratas sin exponer al aire o al O₃, sin ningún tratamiento con vehículo (agua) o MQ

Grupo 2 (VEH): Ratas expuestas a una corriente de aire y tratadas con 1ml de agua (VEH) por medio de una sonda oral.

Grupos 3 (50 MQ) y 4 (100 MQ): Ratas expuestas a una corriente de aire y tratadas con 50 o 100 mg / kg del extracto de MQ, respectivamente. El polvo de MQ (Selva ecuatoriana, LLC, EE. UU.), se disolvió en 1 ml de agua a temperatura ambiente y se administró por medio de una sonda oral una hora después de la exposición a O₃ o aire libre de O₃.

Grupo 5 (O₃): Ratas expuestas a O₃ y tratadas con VEH.

Grupos 6 (O₃ 50 MQ) y 7 (O₃ 100 MQ): Ratas expuestas a O₃ y tratadas con 50 o 100 mg / kg de polvo MQ liofilizado, respectivamente.

Prueba de evitación pasiva (PEP)

Veinticuatro horas después del último tratamiento, se realizó la prueba de evitación pasiva (PEP) para cada grupo. La PEP, se utiliza como una manera de evaluar la memoria de corto y de largo plazo. El animal se condiciona con un estímulo aversivo y posteriormente se valora si recuerda esa experiencia. Para llevar a cabo esta prueba se utiliza una caja con dos compartimentos, uno claro y otro oscuro, separados entre sí por una puerta en forma de guillotina. En el compartimento claro hay una luz enfocando directamente a la rata, mientras que en el oscuro hay un circuito cerrado que producirá pequeñas descargas eléctricas. Esta prueba requiere que las ratas aprendan a inhibir su tendencia natural a pasar de una cámara iluminada a un compartimento no iluminado donde se le aplica la descarga. Todos los animales fueron entrenados una vez para realizar la PEP [145].

La memoria de corto y de largo plazo (10 min y 24 h después del entrenamiento, respectivamente) fueron evaluadas. En resumen, las ratas fueron colocados en un aparato (OMNIALVA®, México) que consiste principalmente en dos cámaras: un compartimento de seguridad (blanco) y un compartimento de shock (negro) divididos entre ellos por una puerta en forma de guillotina. La duración del estímulo fue controlada automáticamente y las latencias (adquisición y escape) fueron medidas manualmente con cronómetros.

Durante el entrenamiento (fase de adquisición), cada animal fue colocado en el compartimento de seguridad durante 10 seg. Luego, se levantó la puerta de tipo guillotina y se registró el tiempo requerido para la que el animal cruzara al compartimento de castigo (latencia de adquisición). Una vez que el animal se desplazó y colocó sus cuatro extremidades en el compartimento de castigo, la puerta se cerró y se disparó una sola descarga eléctrica (3mA durante 5seg). Inmediatamente después, la puerta se abrió y el tiempo requerido para que el animal regresara al compartimento de seguridad (latencia de escape) fue medido. El animal permaneció en el compartimento de seguridad durante 30 s antes de volver a su alojamiento.

Diez minutos (memoria a corto plazo) y 24 h (memoria a largo plazo) después del entrenamiento, se realizó la fase de retención, en la cual el animal fue colocado nuevamente en el compartimento de seguridad durante 10 seg, después de este tiempo la puerta de tipo guillotina fue abierta. Se registró el tiempo en que el animal permaneció en el compartimento de seguridad antes de entrar al compartimento de castigo (latencia de retención). Se dio por concluida la prueba cuando el animal entró en el compartimento de castigo o permaneció en el compartimento de seguridad durante 600 s. Los experimentos se realizaron a la misma hora del día y en condiciones idénticas.

Una vez concluidas las PEP, se seleccionó al azar una muestra de cada grupo experimental (n = 8). Finalmente, los animales fueron sacrificados por decapitación, y se disecaron el hipocampo, la corteza prefrontal y la amígdala. El tejido se colocó en tubos de microcentrifuga de 2.0 ml, con nitrógeno líquido y se almacenaron para su conservación en un ultracongelador a -70°C para su posterior análisis (Figura 20).

Western Blot

Los tejidos se homogeneizaron en un tampón de lisis (150 mM NaCl, 20 mM de Tris-HCl, 10% de glicerol, 5 mM de EDTA y 1% de NP-40; Roche, Mannheim, Alemania), adicionado con un cóctel de inhibidores de proteasas Complete TM (Sigma-Aldrich Saint Louis MO, EE. UU.), en una proporción de 1 ml de tampón / 1 g de tejido a 4 ° C. Las muestras homogeneizadas se centrifugaron a 15,000 rpm por 15 min a 4 ° C para obtener en el sobrenadante las proteínas totales. La concentración de proteína se determinó a una absorbancia de 280nm, con un espectrofotómetro Nanodrop® (ThermoFisher Scientific, Waltham CA, EE. UU.).

Las proteínas (30 µg) se separaron mediante electroforesis por gel de poliacrilamida (10% SDS- PAGE), con un sistema Mini-Protean (BioRad, Hercules CA, EE. UU.) Y transferido a membranas de nitrocelulosa (Merck Millipore, Burlington MA, EE. UU.). Las membranas fueron bloqueadas con 5% de leche en polvo descremada diluida en un buffer de solución salina TBS-Tween-20 (0.05%) a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se incubaron a 5°C, durante la noche con los anticuerpos primarios. Marcadores preestablecidos (BioRad, Hercules CA, EE. UU.), se incluyeron para la determinación del peso molecular proteico.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos diluidos en buffer TBS-Tween 20: anticuerpo policlonal de cabra contra 4-hidroxinenal (4- HNE) (Millipore AB5605; Merck Millipore, Burlington MA, Estados Unidos; diluido 1:3,000); anticuerpo monoclonal de ratón contra nitrotirosina (Nt3) (Santa Cruz sc-101358; Santa Cruz CA, Estados Unidos; diluido 1:1,500) y monoclonal de ratón anticuerpo contra α -tubulina (Santa Cruz sc- 398103; Santa Cruz CA, Estados Unidos; diluido 1:1,000). Después de la incubación con el anticuerpo primario, las membranas fueron lavadas con TBS-Tween-20, e incubadas durante una hora, con anticuerpos secundarios acoplados peroxidasa de rábano picante (Santa Cruz, diluidos 1:10,000). Las bandas inmunorreactivas se detectaron usando un sistema de quimioluminiscencia mejorado (Merck Millipore, Burlington MA, EE. UU.). Cuando sea necesario, las membranas fueron despojadas utilizando una solución reblot (Merck Millipore, Burlington MA, EE. UU.). La señal de la quimioluminiscencia se analizó con C-DiGit® Blot Scanner, (Li-Cor Biosciences, Lincoln NE, EE. UU.), con un período de adquisición de 12 minutos y la imagen se analizó con el Software de cuantificación Studio™ Lite (Li-Cor Biosciences, Lincoln NE, EE. UU.).

Determinación de malondialdehído (MDA)

El MDA es uno de los productos finales de peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados y un marcador de la actividad de radicales libres. A un pH ácido y altas temperaturas, una molécula de MDA reacciona con dos moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) formando aductos rosados los cuales son detectados a 532 nm [146].

Antes de la determinación de MDA, se realizó un paso que consistió en desproteinizar la muestra para evitar la interferencia de los sedimentos formados por las proteínas desnaturalizadas.

La muestra (200 μ l) se colocó en tubos eppendorf y se le añadió 200 μ l de ácido tricloroacético (TCA) al 20%, se agitó por medio de un vortex y se incubó a 4 ° C durante 10 min, se centrifugó a 11,000 rpm durante 3 min. El sobrenadante fue recuperado.

La curva de calibración con ocho puntos (0–100 μ M), así como las muestras se prepararon de la siguiente manera: 25 μ l de cualquiera de los sobrenadantes o de solución estándar se mezclaron con 200 μ l de TBA al 0,8%, se agitaron por medio de un vórtex y se incubaron a 95 °C/60 min, y finalmente a 22 °C/10 min. Al terminar, se determinó la absorbancia en un espectrofotómetro para microplacas (EPOCH) a 532 nm para la curva de calibración y las muestras.

Determinación de los productos finales de glicación avanzada (AGEs)

La determinación de los AGEs se basó en la detección espectrofluorométrica de algunos productos fluorescentes [147]. Los homogeneizados provenientes del hipocampo, de la corteza prefrontal y de la amígdala se diluyeron 1:50 con PBS pH 7.4 y la intensidad de fluorescencia se registró a la máxima emisión (~450 nm) tras la excitación a 370 nm. Se utilizó un espectrofluorómetro (espectrofluorómetro Fluoromax-3, Horiba, Kioto, Japón), en el cual las longitudes de onda (λ) de excitación y emisión se calibraron utilizando bisulfato de quinina 5 μ M en 0,2 M de ácido sulfúrico. Se establecieron las condiciones de operación para la evaluación de los AGEs utilizando una solución de BSA (50 μ m) incubada con glucosa (0.5 M). La intensidad de la máxima fluorescencia de esta solución se obtuvo a λ =450 nm por excitación con una fuente de luz λ = 370 nm. La intensidad de

fluorescencia se expresó como unidades arbitrarias de fluorescencia (AUF), relativas a la solución de control. Cada medida se normalizó a una concentración de proteína de 1 mg / ml. La intensidad de fluorescencia fue expresado en unidades arbitrarias por mililitro de homogeneizado cerebral (AUF / ml).

Actividad de la superóxido dismutasa (SOD)

La actividad de la SOD total, fue medida por la reducción de un colorante (formazan) soluble en agua. Se siguió el protocolo de determinación de la actividad de SOD utilizando el kit 19160 (Sigma- Aldrich, Saint Louis, MO, EE. UU.). La tasa de reducción del colorante de formazán soluble en agua está relacionada linealmente con la actividad de xantina oxidasa e inhibida por SOD. Por lo tanto, la actividad de SOD se puede cuantificar midiendo la disminución de la absorbancia a 440 nm.

Las regiones del cerebro se homogenizaron en un tampón frío que contenía KH₂PO₄ (100 mM), EDTA (1 mM) y tritón X al 0,1%, pH 7,5. Se incluyeron tres espacios en blanco para el ensayo: sin muestra (blanco 1), muestra específica sin enzima (blanco 2) y sin muestra y sin enzima (blanco 3). El espacio en blanco 2 actúa como un control para la reducción de formazán inespecífica ya que no contiene la enzima xantina oxidasa, por lo que toda la reducción del formazán se tendrá en cuenta para los donantes de electrones no específicos. La actividad enzimática se determinó en un micro placa de 96 pozos, la cual se incubó a 37 °C durante 20 minutos. Todas las mediciones se realizaron a 440 nm en EPOCH. La tasa de actividad de SOD se calculó con la siguiente ecuación y se expresó como porcentaje de tasa de inhibición.

$$= \frac{(\text{Abs blanco 1} - \text{Abs blanco 3}) - (\text{Abs muestra} - \text{Abs blanco 2})}{(\text{Abs blanco 1} - \text{Abs blanco 3})} \times 100$$

Determinación de los grupos Tiol (-SH)

La determinación de los tioles se realizó mediante el reactivo de Ellman (5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) o DTNB), siguiendo el procedimiento descrito previamente [148]. El cuál, se basa en la reacción estequiometria entre el DTNB y los -SH de acuerdo con la reacción de Habeeb [149].

Para realizar esta reacción se preparó una curva de calibración de 8 puntos de 0-100 μM de L-Cisteína, las muestras y la curva de calibración se trataron de la misma manera, en donde se colocaron 12.5 μL de DTNB, 25 μL de buffer Tris-EDTA pH 8.2 y 210 μL de agua destilada. Se determinó la primera lectura a 412 nm. Tras la lectura se incorporaron 2.5 μL del estándar o del homogenizado se agitaron e inmediatamente se realizó la segunda lectura a la misma longitud de onda en EPOCH.

Determinación de la vitamina C (VIT-C)

Para evaluar la cantidad de vitamina C en las áreas del cerebro, se utilizó el método descrito por Prieto. Este método se basa en la reducción del molibdato (VI) a molibdato (V) por la muestra, seguido de la formación de un complejo entre el fosfato y el molibdato (V), el cual tiene una absorción a 695 nm. [150]. Para su determinación se preparó una curva de calibración de ácido ascórbico con 8 puntos de calibración de 0-10 nM, se utilizaron 10 μL de la muestra o del estándar, se le agregaron 10 μL de agua destilada los cuales se colocaron en un tubo eppendorf, el cual contenía 200 μL de una solución reactiva (0.6 M de ácido sulfúrico, 28 mM de fosfato de sodio mobásico y 4 mM de molibdato de amonio). Después se incubó a 95 $^{\circ}\text{C}$ durante 90 minutos. Tras esta primera incubación, se dejó enfriar durante 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se determinó la densidad óptica a 695 nm en EPOCH. Con los datos de la curva se calculó la concentración de VIT-C en cada muestra expresados en mmol/mL.

Análisis estadístico

Los datos fueron primeramente analizados por medio de la prueba D'Agostino y Pearson para seleccionar las pruebas estadísticas apropiadas para el análisis de cada grupo de resultados.

Para una distribución normal, se realizó el análisis unidireccional de varianza ANOVA (prueba paramétrica) seguido de una prueba post hoc de Tukey. El análisis de varianza de Kruskal-Wallis (pruebas no paramétricas) y la prueba de Mann-Whitney se utilizaron para una distribución no normal. The Prism versión 6.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EE. UU.) Se utilizó para calcular valores de probabilidad. Los datos se expresaron como media \pm ESM (Error estándar de la media). Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

Esquema metodológico

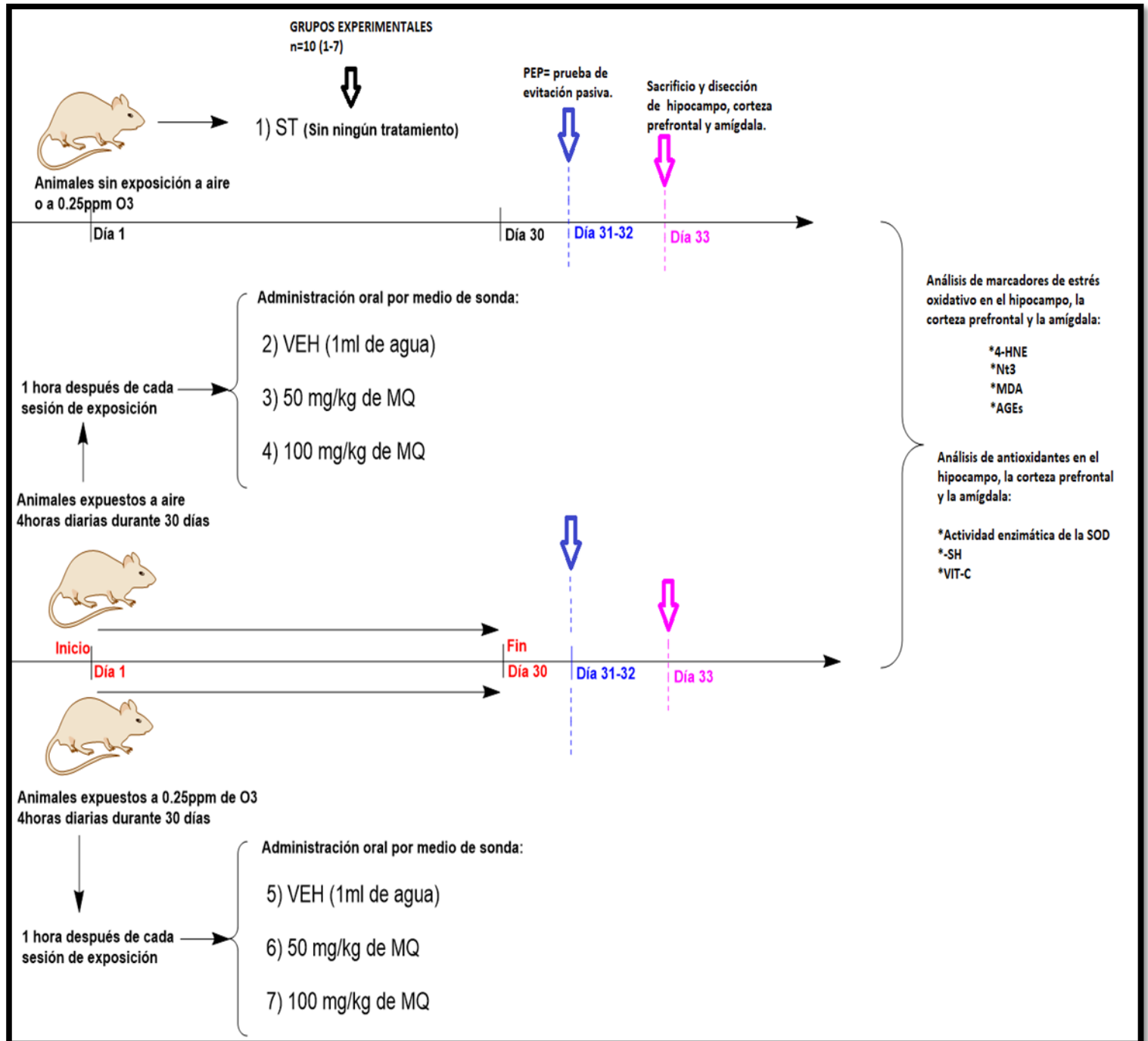


Figura 20. Se observa el diagrama de la metodología empleada para el presente trabajo: se utilizaron 7 grupos de animales: Grupo (1) ST animales sin ninguna manipulación o tratamiento. Grupos (2-4) animales expuestos a aire y tratados con VEH o con 50 o 100mg/kg de MQ. Grupos (5-7) animales expuestos a 0.25 ppm de O₃ y tratados con VEH o con 50 o 100mg/kg de MQ. El día 30 terminan sus tratamientos. Los días 31-32 se les realizó la PEP. El día 33 se les sacrifico y diseccionaron el hipocampo, la corteza prefrontal y la amígdala para los análisis posteriores.

8. RESULTADOS

Efectos de la administración de MQ sobre la memoria de corto y largo plazo.

La exposición crónica a O₃ disminuyó la latencia de retención tanto en las pruebas de memoria a corto plazo (Figura 21a) como a largo plazo (Figura 21b). Esta disminución fue estadísticamente significativa en comparación con los animales expuestos solo al aire. Por el contrario, la latencia de retención en la memoria a corto y largo plazo aumentó en animales expuestos a O₃ y tratados con 50 y 100 mg / kg de MQ. Este aumento también fue significativo al ser comparados con los animales expuestos a O₃ y tratados con VEH.

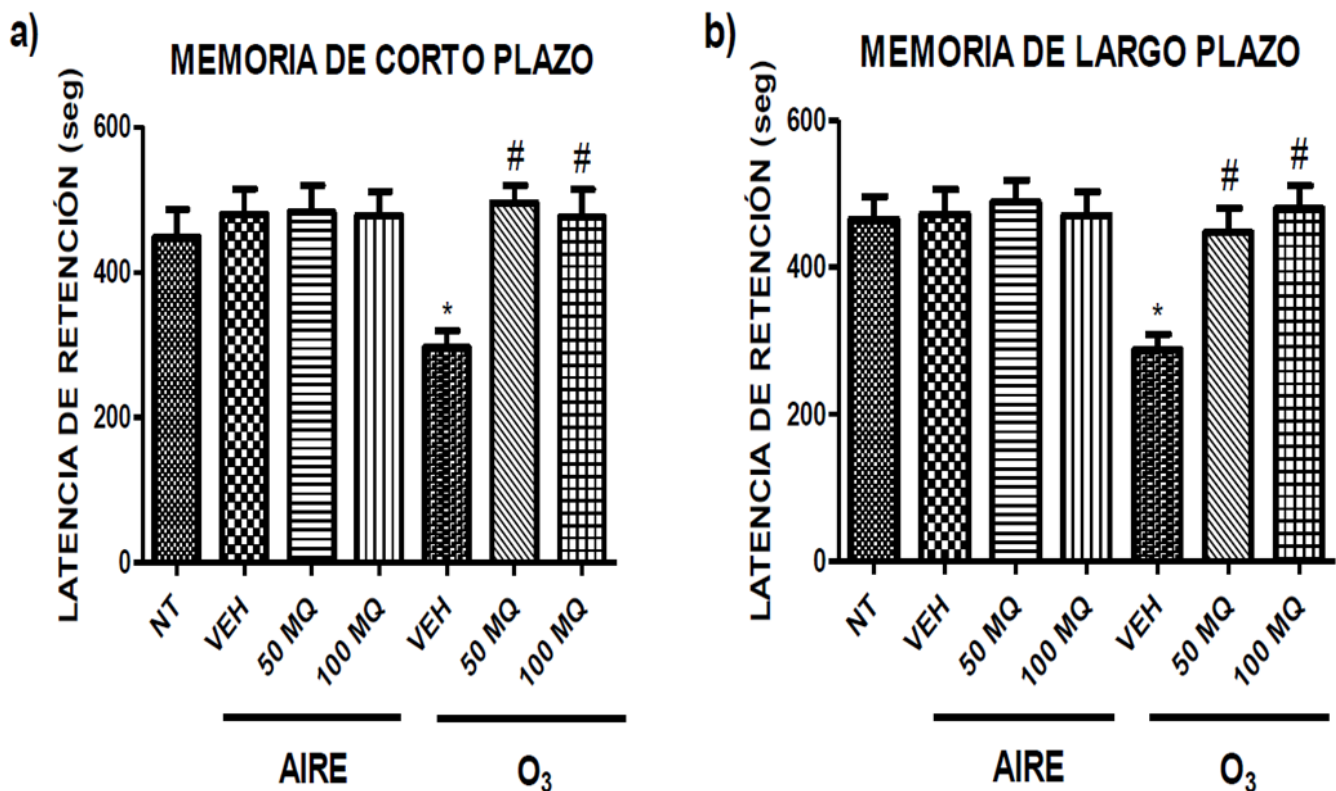


Figura 21. Efecto de la administración de 50 y 100 mg / kg del extracto de MQ en la memoria. Latencia (seg) de retención de la memoria de corto (a) y largo plazo (b) en animales expuestos a una corriente de aire o a 0.25 ppm de O₃. NT: animales sin exponer al aire ni a O₃ ni tratados con VEH (agua) o MQ (n = 10 animales por grupo). * P <0.05 en comparación con NT y VEH; #P <0.05 en comparación con O₃.

Efecto del tratamiento con MQ sobre el 4HNE y Nt3 en el hipocampo.

La administración de ambas dosis de MQ (50 y 100 mg / kg) disminuyeron de forma significativa los niveles del marcador de peroxidación lipídica 4HNE en el hipocampo de animales expuestos a una corriente de aire, en comparación con los animales tratados con VEH (Figura 22a). Por el contrario, no se observaron cambios en la expresión de Nt3 en estos grupos (Figura 22 b).

Por otro lado, el estrés oxidativo inducido por la exposición a O₃ aumentó significativamente los niveles de productos de descomposición de peróxidos derivados de ácidos grasos poliinsaturados (4HNE) y los niveles de nitración proteica (Nt3), en comparación con los grupos VEH (Figura 14 a y b), mientras que la administración de 50 y 100 mg / kg de MQ en animales expuestos a O₃ disminuyó significativamente los niveles de 4HNE y Nt3 (Figuras 22a y b).

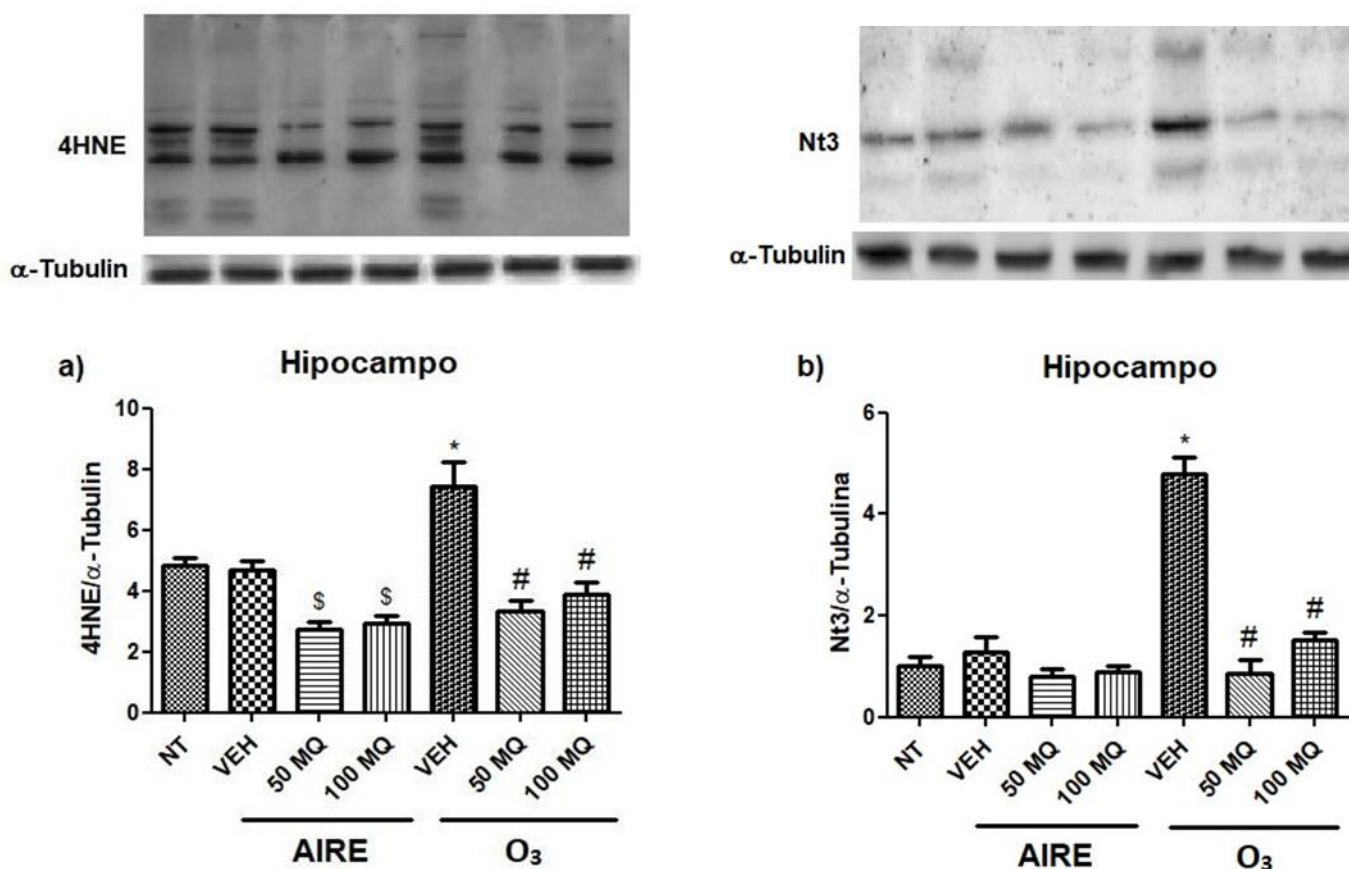


Figura 22. La inmunodetección de bandas y el análisis densitométrico de (a) 4HNE y (b) Nt3 en el hipocampo de la rata. Los resultados se expresan como la $\bar{X} \pm$ S. E. (n = 6). \$ P < 0.05 50MQ y 100MQ-AIRE vs VEH-AIRE; * P < 0.05 VEH-O₃ vs VEH-AIRE; # P < 0.05 50MQ y 100MQ-O₃ vs VEH-O₃.

Efecto del tratamiento con MQ sobre el 4HNE y Nt3 en la corteza prefrontal.

En la corteza prefrontal de animales expuestos a una corriente de aire, la administración de 100 mg / kg de MQ disminuyó significativamente los niveles de 4HNE y de Nt3 en comparación con sus respectivos grupos control (Figura 23 a y b).

Por el contrario, se observó un aumento significativo en los niveles de 4HNE y Nt3, en animales expuestos a O₃, en comparación con los animales expuestos al aire. A su vez, la administración de 50 y 100 mg / kg de MQ en los animales expuestos a O₃ disminuyó de forma significativa la concentración de 4HNE y Nt3 en comparación con los animales expuestos a O₃ y tratados con vehículo (Figura 23 a y b).

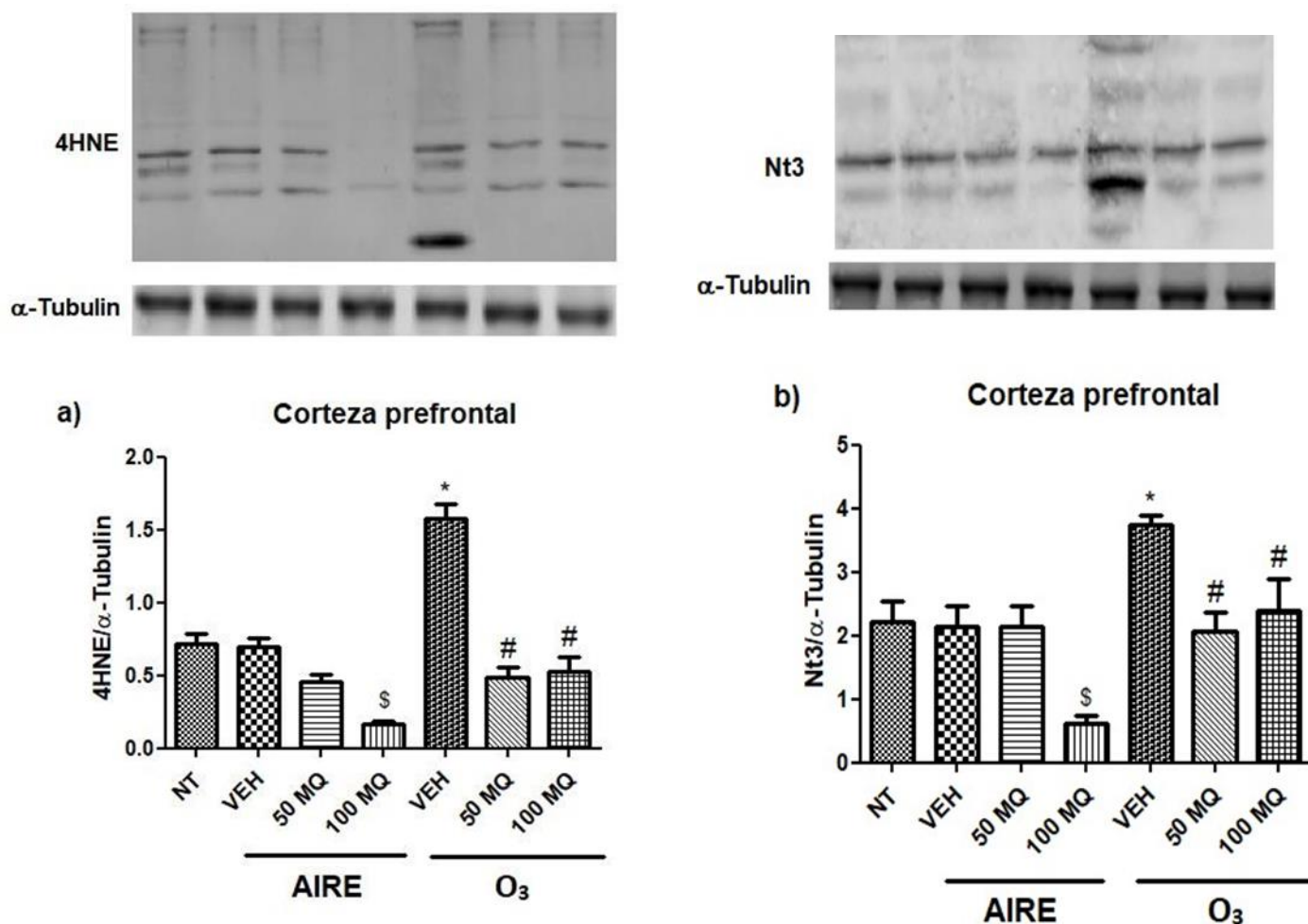


Figura 23. La inmunodetección de bandas y el análisis densitométrico de (a) 4HNE y (b) Nt3 en la corteza prefrontal de la rata. Los resultados se expresan como la $\bar{x} \pm S. E.$ (n = 6). \$ P < 0.05 100MQ-AIRE vs VEH-AIRE; * P < 0.05 VEH-O₃ vs VEH-AIRE; # P < 0.05 50MQ y 100MQ-O₃ vs VEH-O₃.

Efecto del tratamiento con MQ sobre el 4HNE y Nt3 en amígdala.

En la amígdala de animales expuestos a una corriente de aire, la administración de 100 mg / kg de MQ disminuyó significativamente la concentración de 4HNE en comparación con el grupo VEH (Figura 24 a). Además, la administración de 50 y 100 mg / kg de MQ disminuyeron de forma significativa los niveles de Nt3 en comparación con su grupo control (Figura 24 b). Además, se observó un aumento significativo en el contenido de 4HNE y Nt3, en la amígdala de animales expuestos a O₃ en comparación con animales expuesto a una corriente de aire. Por el contrario, la administración de 50 y 100 mg / kg de MQ en animales expuestos a O₃ disminuyó significativamente el contenido de 4HNE y Nt3 (Figura 24 a y b).

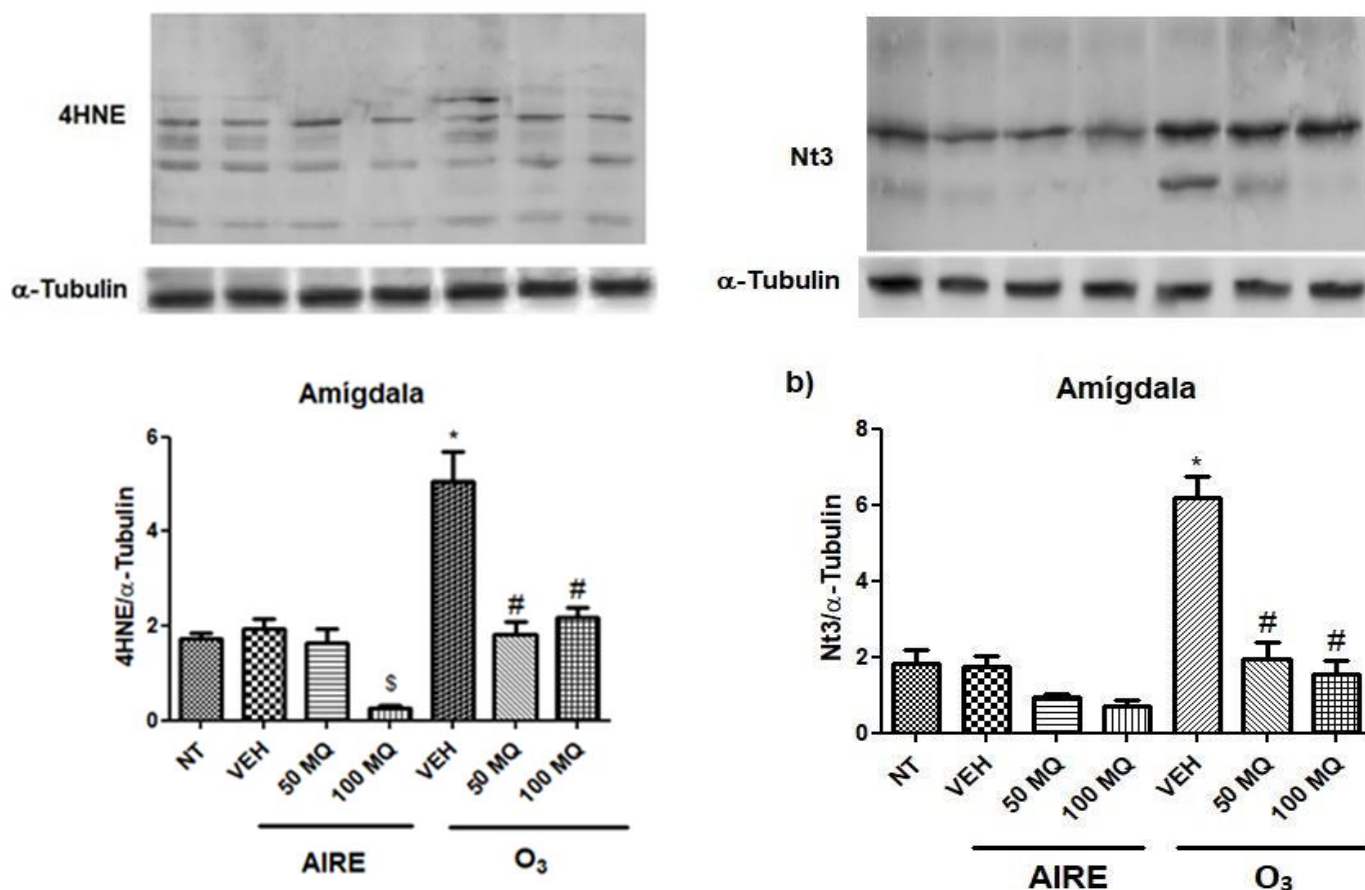


Figura 24. La inmunodetección de bandas y el análisis densitométrico de (a) 4HNE y (b) Nt3 en la amígdala de la rata. Los resultados son expresados como la $\bar{X} \pm S. E.$ (n = 6). \$ P < 0.05 100MQ-AIRE vs VEH-AIRE; * P < 0.05 VEH-O₃ vs VEH-AIRE; #P < 0.05 50MQ y 100MQ-O₃ vs VEH-O₃.

Efecto del tratamiento con MQ sobre la concentración de MDA.

En los animales expuestos a O₃, la concentración de MDA aumentó significativamente en el hipocampo, corteza prefrontal y amígdala (Figura 25 a, b y c) cuando se compara con animales expuestos a una corriente de aire. Además, el tratamiento con MQ (dosis de 50 y 100 mg / kg) en animales expuestos a O₃ disminuyó significativamente la concentración de MDA en comparación con los animales tratados solo con VEH. Interesantemente, los niveles de MDA en animales expuestos a O₃ y tratados con MQ alcanzan niveles semejantes a los controles (NT y VEH-AIRE).

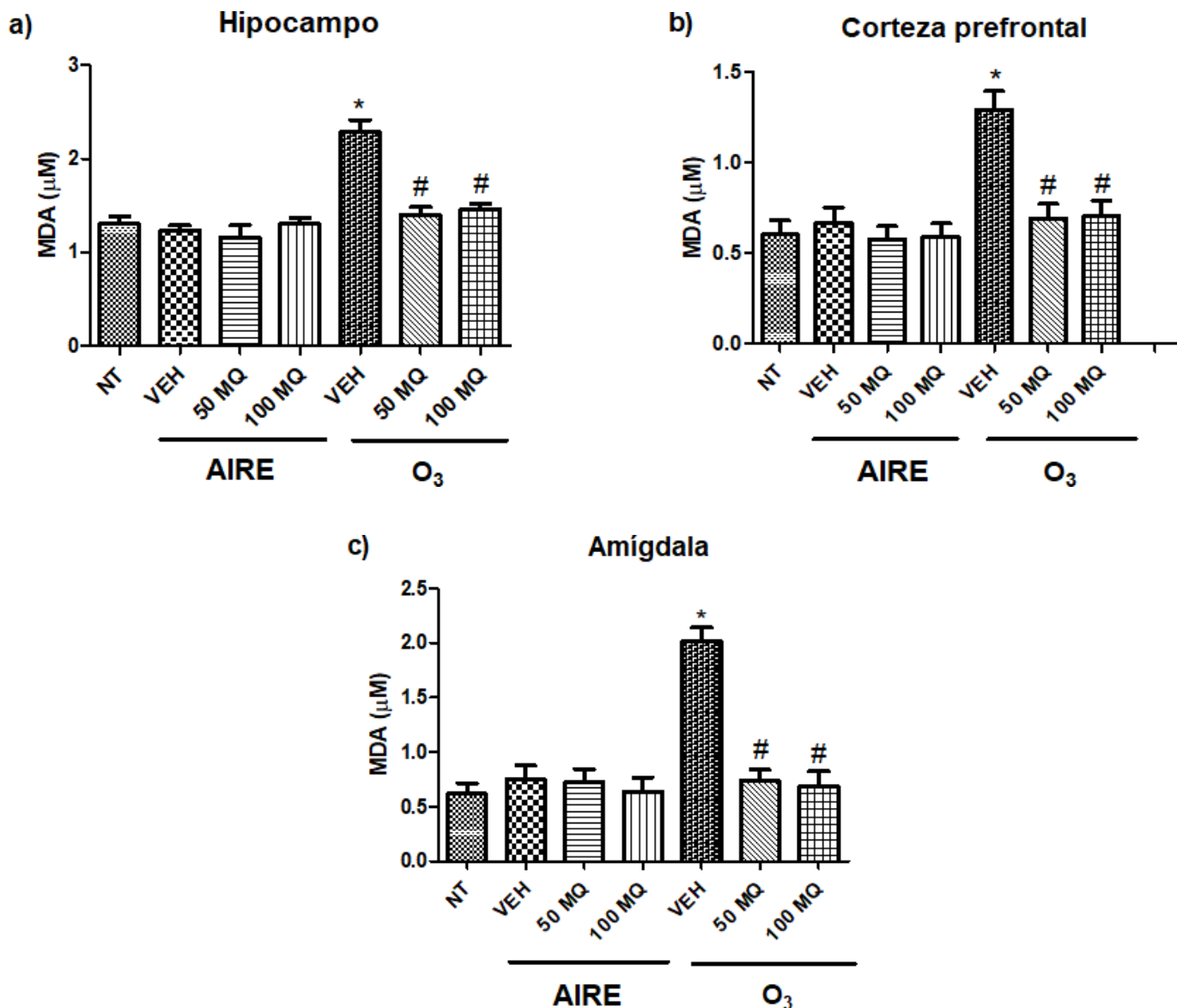


Figura 25. Efecto del extracto de MQ sobre la concentración de MDA en el hipocampo (a), la corteza prefrontal (b) y la amígdala (c) de ratas expuestas a una corriente de aire u O₃ (0.25 ppm). Los resultados se expresan como la $\bar{X} \pm S. E.$ (n = 8). * P < 0.05 VEH-O₃ vs VEH-AIRE; # P < 0.05 50MQ y 100MQ-O₃ vs VEH-O₃.

Efecto del tratamiento de MQ sobre la concentración de AGEs.

En los animales expuestos a O₃, la concentración de AGEs aumentó significativamente en el hipocampo, corteza prefrontal y amígdala en comparación con los animales expuestos a una corriente de aire (Figura 26). En contraste, la administración de MQ en los animales expuestos a O₃ disminuyeron significativamente la concentración de AGEs en el hipocampo con 50 mg / kg y 100 mg / kg de MQ.

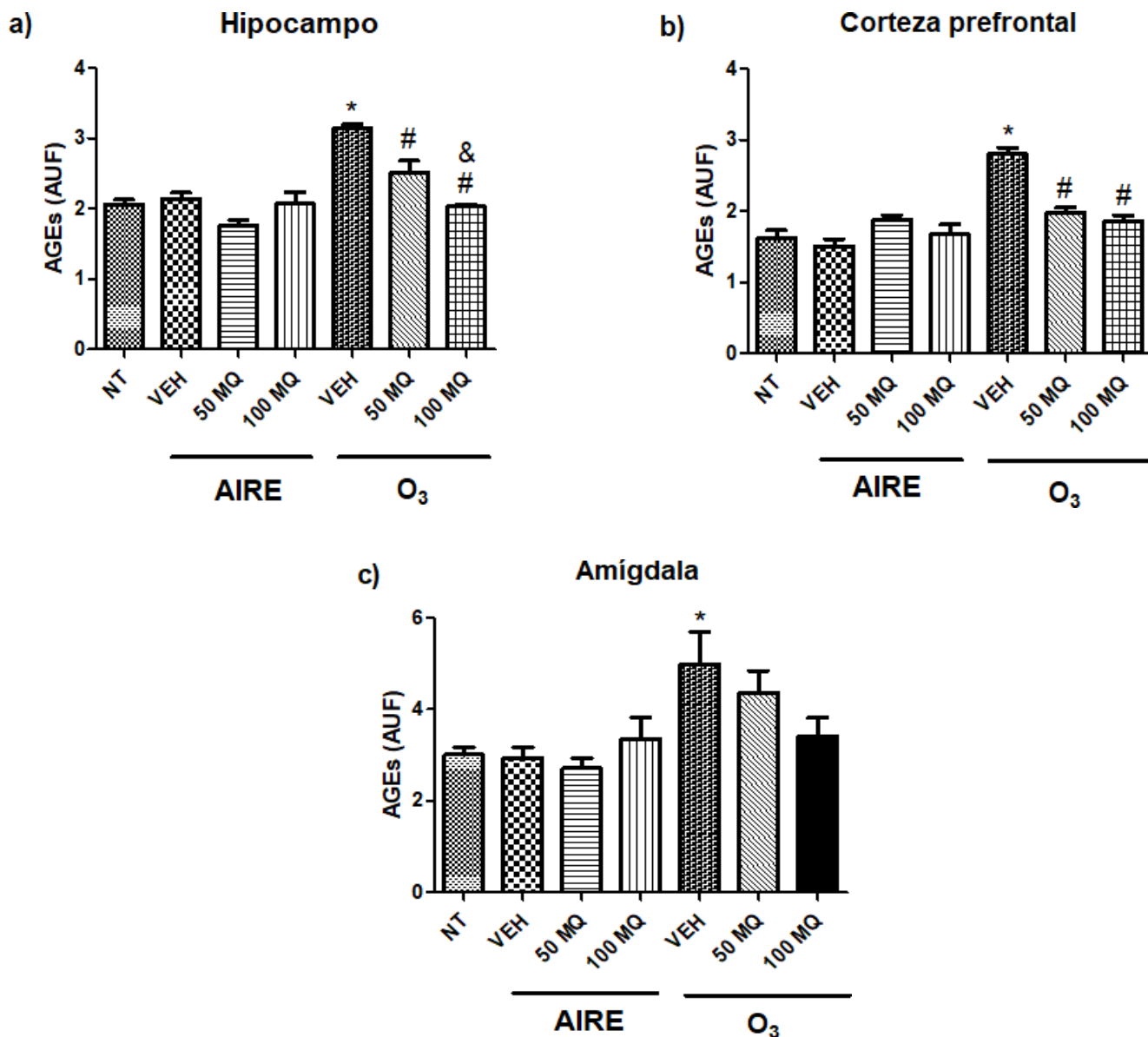


Figura 26. Efecto del extracto de MQ sobre la concentración de AGEs en el hipocampo (a), la corteza prefrontal (b) y la amígdala (c) de ratas expuestas a una corriente de aire u O₃ (0.25 ppm). Los resultados se expresan como la $\bar{X} \pm S. E.$ (n = 8). * P < 0.05 VEH-O₃ vs VEH-AIRE; #P < 0.05 50MQ y 100MQ-O₃ vs VEH-O₃; & P < 0.05 100MQ-O₃ vs 50 MQ-O₃.

Efecto del tratamiento MQ sobre la actividad total de SOD.

En animales expuestos a O₃ y tratados con VEH, la actividad enzimática de SOD aumentó significativamente en el hipocampo, corteza prefrontal y amígdala (Figura 27) en comparación con los animales expuestos al aire, mientras que la administración de las dosis de 50 y 100 mg / kg de MQ previnieron el aumento en la actividad de SOD en el hipocampo, corteza prefrontal y amígdala.

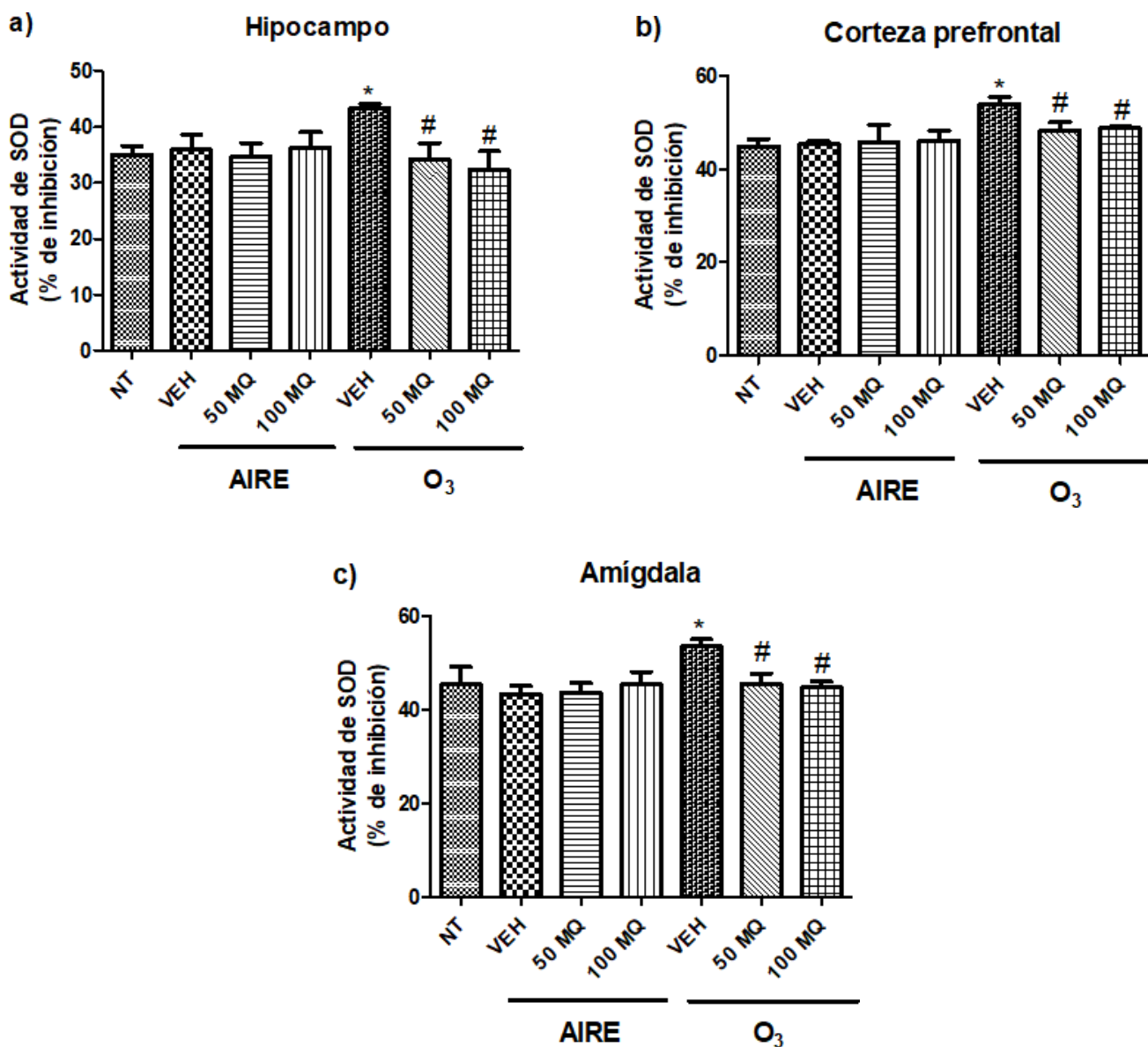


Figura 27. Efecto del extracto de MQ sobre la actividad de SOD en el hipocampo (a), la corteza prefrontal (b) y la amígdala (c) de ratas expuestas a una corriente de aire u O₃ (0.25 ppm). Los resultados se expresan como la $\bar{X} \pm S. E.$ (n = 8). * P < 0.05 VEH-O₃ vs VEH-AIRE; #P < 0.05 50MQ y 100MQ-O₃ vs VEH-O₃.

Efecto del tratamiento MQ sobre la concentración de grupos Tiol (-SH).

En los animales expuestos a O₃, la concentración de -SH disminuyó significativamente en el hipocampo, corteza prefrontal y amígdala en comparación con los animales expuestos a una corriente de aire (Figura 28). En contraste, la administración de 50 mg / kg y 100 mg / kg de MQ aumento la concentración de -SH a concentraciones semejantes a sus controles en los animales expuestos a O₃.

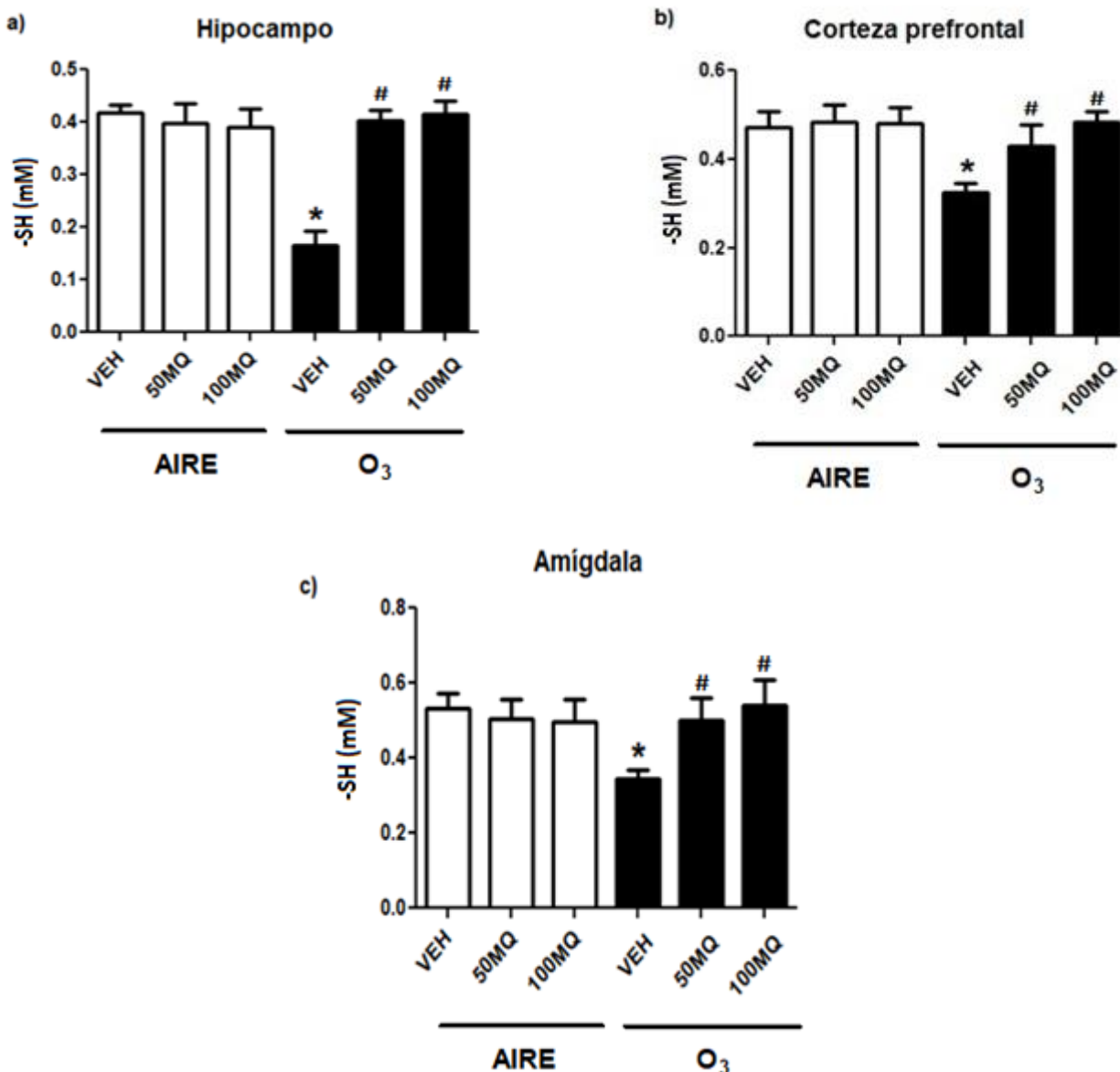


Figura 28. Efecto del extracto de MQ sobre la concentración de -SH en el hipocampo (a), la corteza prefrontal (b) y la amígdala (c) de ratas expuestas a una corriente de aire u O₃ (0.25 ppm). Los resultados se expresan como la $\bar{X} \pm S. E.$ (n = 8). * P < 0.05 VEH-O₃ vs VEH-AIRE; #P < 0.05 50MQ y 100MQ-O₃ vs VEH-O₃.

Efecto del tratamiento MQ sobre la concentración de vitamina C (VIT-C).

En los animales expuestos a O₃, la administración de MQ no modificó la concentración de VIT-C, en las áreas del cerebro evaluadas previamente (Figura 29 a – c).

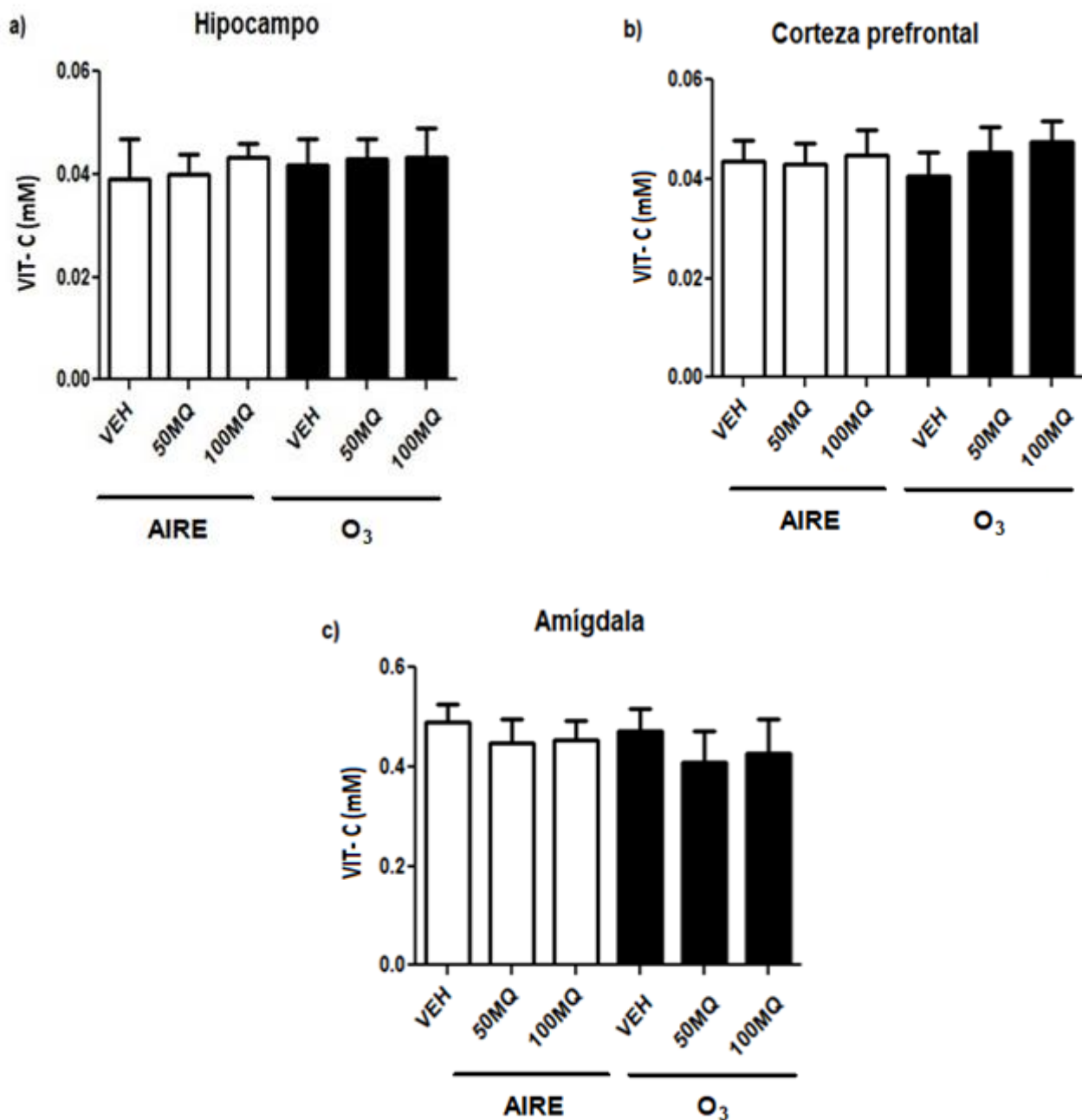


Figura 29. Efecto del extracto de MQ sobre la concentración de VIT-C en el hipocampo (a), la corteza prefrontal (b) y la amígdala (c) de ratas expuestas a una corriente de aire u O₃ (0.25 ppm). Los resultados se expresan como la $\bar{X} \pm S. E.$ (n = 8).

9. DISCUSIÓN

Efecto de la administración de MQ sobre la memoria de corto y de largo plazo

En el presente trabajo, se observó que la exposición de las ratas a 0.25 ppm de O₃ durante 30 días redujo la latencia de retención en las pruebas de memoria de corto (10 min) y de largo plazo (24 h). Estos resultados son consistentes con estudios previos, en los cuales la exposición tanto de rata macho como de hembra, a 0.25ppm de O₃ durante 30 o 60 días disminuyó la latencia de retención en la PEP, sugiriendo un deterioro sobre la memoria de corto y de largo plazo [151-153]. En contraste, los animales expuestos a O₃ y tratados con 50 y 100 mg / kg de MQ mantuvieron los niveles de latencia de retención a valores similares a los de sus respectivos grupos control, sugiriendo una prevención del daño cognitivo ocasionado por la exposición a O₃.

Hasta donde sabemos, no existen evidencias de los efectos benéficos de MQ sobre la memoria de corto y de largo plazo, en animales expuestos a O₃. Sin embargo, se ha descrito que la administración del extracto liofilizado de mora azul en ratas durante 10 semanas mejoró el rendimiento de la memoria espacial en la prueba del laberinto acuático de Morris. A su vez, la mejora en el aprendizaje de dicha prueba, fue asociada con la identificación de flavonoides en áreas del cerebro relacionadas con los procesos cognitivos [154]. Por otra parte, en varios estudios se han reportado los efectos benéficos de la suplementación de la dieta con bayas, sobre los procesos de aprendizaje y memoria. Por ejemplo, en el modelo de envejecimiento con déficit cognitivo de ratas, la suplementación con un extracto de mora azul (2g/kg) durante 8 semanas evitó el deterioro del aprendizaje y la memoria espacial, además en este mismo modelo el consumo de 500 mg diarios de mora azul, durante 12 semanas mejoró la memoria de corto plazo [155,156]. Del mismo modo, se han evaluado los efectos de las bayas ricas en flavonoides en adultos mayores con deterioro cognitivo leve. Aquellos individuos que consumieron dosis diarias que van desde 444 ml - 621 ml de jugo de uva durante un período de 16 semanas mostraron una mejora en la memoria episódica y del aprendizaje verbal [128]. Estos efectos benéficos fueron también observados con el consumo de jugo de arándano durante 12 semanas [129].

Efecto de la administración de MQ sobre los biomarcadores de estrés oxidativo

Uno de los posibles mecanismos por los cuales se alteran los procesos cognitivos es el daño oxidativo sobre la plasticidad cerebral generada por la exposición a O₃, a través de la oxidación de diferentes macromoléculas, como lípidos y proteínas [151,38].

En este trabajo, el daño oxidativo generado por la exposición a 0.25 ppm de O₃, fue evaluado a través de cuatro marcadores de estrés oxidativo: el 4HNE, el MDA, la Nt3 y los AGEs en áreas del cerebro involucradas en el aprendizaje y la memoria. En el presente estudio, se observó un aumento en el contenido de estos marcadores, en todas las regiones de los animales expuestos a O₃. Estos resultados son consistentes con investigaciones previas, en las cuales la exposición crónica a O₃ en ratas, aumentó el contenido de 4HNE, de MDA y de Nt3 en el hipocampo [151,35].

Tanto el MDA como el 4HNE son considerados citotóxicos ya que puede formar aductos con diferentes proteínas, promoviendo cambios funcionales o la desactivación de enzimas, transportadores y receptores [157]. Estas modificaciones, podrían alterar la dinámica del cerebro, explicando en parte el bajo rendimiento en las pruebas de memoria de los animales expuestos a O₃ [151]. En apoyo a esta idea, en el presente estudio se observó una relación entre el aumento de los marcadores de lipoperoxidación (4HNE y MDA) y de nitración de proteínas (Nt3) con una disminución en el rendimiento de la PEP.

En el presente trabajo, el contenido de 4HNE, MDA y Nt3 se evaluó en la amígdala de animales expuesto a O₃. Esta estructura, no ha sido evaluada previamente en el modelo de exposición a O₃. La amígdala, es una estructura límbica funcionalmente vinculada a las emociones y a la motivación, además, de estar fuertemente relacionada con los comportamientos discriminatorios de evitación por estímulos aversivos [42]. El aumento de los marcadores de estrés oxidativo en la amígdala explicaría en parte, el bajo rendimiento en la PEP. Como se ha descrito en apartados anteriores la PEP, evalúa la memoria de corto y de largo plazo. Sin embargo, también se encuentra fuertemente influenciada por la memoria emocional dependiente de la amígdala [1].

Otro de los marcadores de estrés oxidativo evaluados en el presente trabajo fue el contenido de AGEs. En estudios previos, el incremento en la concentración de AGEs en el cerebro, ha sido asociado a diferentes alteraciones en los procesos cognitivos. En modelos de roedores de EA, el bloqueo de su receptor específico (RAGE) evita los déficits cognitivos causados por la administración de AGEs a nivel del hipocampo [158,159].

Por otro lado, se ha reportado que la administración de antioxidantes exógenos como la vitamina E y la taurina, en animales expuestos a O₃, disminuyen los niveles de los marcadores de peroxidación lipídica [160,36].

En el presente trabajo, se observó que la administración de las dosis de 50 y 100 mg/kg de MQ, disminuyeron de forma importante el contenido de 4HNE, MDA y Nt3 en el hipocampo, la corteza prefrontal y la amígdala, mientras que, en relación con los AGEs, esta disminución solo se observó en el hipocampo y la corteza prefrontal de animales expuestos a O₃. Según nuestros hallazgos, la administración de dosis de 50 mg/kg de MQ fue suficiente para disminuir de forma significativa el contenido de marcadores de estrés oxidativo en las áreas del cerebro evaluadas. Anteriormente, ha sido reportado que la administración de dosis de 50 mg/kg de MQ disminuyó de forma significativa los niveles de marcadores de estrés oxidativo en un modelo de accidente cerebro vascular [121]. En nuestro modelo de estrés oxidativo, nuestros datos coincidieron con estas observaciones. Además, la disminución de los marcadores del estrés oxidativo se mantuvo hasta la dosis de 100 mg/kg de MQ.

En otros estudios realizados in vitro se ha reportado que tanto el extracto metanólico como el acuoso de MQ mostraron una actividad antioxidante significativa en pruebas como DPPH (di (fenil) - (2,4,6-trinitrofenil) iminoazano), FRAP (poder antioxidante de la reducción férrica) y ORAC (capacidad de absorción del radical oxígeno) [161,162]. Debido a lo anterior, la actividad antioxidante de MQ se ha relacionado con su alto contenido de flavonoides en comparación con otros tipos de bayas [136].

En el presente estudio no evaluamos la ubicación de los principales flavonoides de MQ en las áreas del cerebro evaluadas. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que el extracto de MQ ejerce sus efectos antioxidantes en el cerebro.

Efecto del extracto MQ sobre la actividad de la superóxido dismutasa (SOD)

En el presente trabajo, se observó en las diferentes áreas del cerebro evaluadas, un aumento significativo en la actividad de SOD en los animales expuestos a O₃ y tratados con VEH en comparación con los grupos control. Estos resultados son consistentes con reportes previos, en los cuales la exposición crónica a 0.25 ppm de O₃ en ratas durante 30 y 60 días, aumentó la concentración de SOD en el hipocampo [87]. Los resultados sugieren que el aumento en la actividad de SOD no es suficiente para contrarrestar los efectos oxidantes de la exposición a O₃.

Por otro lado, los efectos de la administración de MQ en el modelo del animal expuesto a O₃ y la actividad de SOD no han sido estudiados. En el presente trabajo la administración de 50 y 100 mg/kg de MQ en animales expuestos a O₃, disminuyó la actividad de la SOD en los animales expuestos a O₃, manteniéndola a niveles semejantes a los grupos control. Por otro lado, en diferentes modelos de estrés oxidativo, han sido reportados los efectos de los flavonoides, sobre la actividad de SOD. Para ejemplo de ello, se observó en un modelo de la EA, que la administración de un extracto de granada durante 4 meses, disminuyó la actividad de SOD en el hipocampo y la corteza frontal a niveles semejantes a sus controles [122]. Mientras que en el modelo de la rata anciana, la administración de 30 mg/kg de antocianinas disminuyó los niveles de SOD, en el hipocampo y la corteza prefrontal [123].

Efecto del extracto de MQ sobre el contenido de los grupos tiol (-SH) y la vitamina C (VIT-C).

En el presente estudio decidimos evaluar el efecto de la administración de MQ sobre la concentración de los -SH y la VIT-C, ambos descritos como importantes antioxidantes endógenos (90, 97, 98,99).

Cuando un -SH, como la cisteína contenida en el glutatión (GSH) se enfrentan a procesos oxidativos, pueden oscilar entre un estado reducido y adquirir diferentes grados de oxidación: ácido sulfénico (-SOH), ácido sulfinico (-SO₂H), ácido sulfónico (-SO₃H) y el puente disulfuro (-S-S-) no todos ellos son estados reversibles, tanto el -SOH y el -S-S-, puede generar una reversión a un estado reducido, mediante diferentes moléculas reductoras, mientras que el -SO₂H y el -SO₃H no pueden ser reducidos [163].

En el presente trabajo, se utilizó el reactivo Ellman para cuantificar la concentración de los -SH [149], este reactivo interacciona con los -SH en estado reducido [148]. Con base en lo anterior, nuestros resultados muestran una disminución de las en las concentraciones de los -SH, en el hipocampo, la corteza prefrontal y la amígdala de animales expuestos a O₃. Lo que nos permite sugerir que a los 30 días de exposición, los bajos niveles de -SH se deben a que probablemente la mayoría de ellos se encuentran en un estado de oxidación irreversible debido a los efectos oxidantes del O₃. Por otro lado, observamos que la administración de las dosis de 50 mg/kg y 100 mg/kg previno la oxidación de los -SH, debido a los efectos antioxidantes que hemos observado en los diferentes resultados presentados.

Finalmente decidimos evaluar cómo podría afectar la administración de MQ a las concentraciones de la VIT-C en el cerebro de nuestro modelo de estrés oxidativo.

El ser humano a diferencia de otros mamíferos, como las ratas y ratones, es incapaz de sintetizar la VIT-C y esto hace que los niveles de esta dependan de la ingesta diaria, cuyos valores de consumo recomendados son de 90 mg diarios en adultos [95].

Por otro lado, en diferentes modelos animales de neurodegeneración, se ha evaluado la importancia de la VIT-C en el cerebro. Para ejemplo de lo anterior, se ha reportado que la deficiencia de VIT-C en el modelo de EA, esta relacionado con un incremento en los marcadores de estrés oxidativo y un aumento en la mortalidad de estos animales [96]. A su vez, en un modelo de EA (APP/PS1), el cual presenta déficit de memoria y aumento en los marcadores de estrés oxidativos, una disminución en la concentración de VIT-C en el hipocampo, provocado por alteraciones en su transportador de tipo 2 TVCS2, sugiriendo que el daño oxidativo esta relacionado en parte a la disminución en las concentraciones de VIT-C en el hipocampo [164].

A pesar de la importancia descrita anteriormente respecto a la VIT-C, en modelos de estrés oxidativo. No existe información en el animal expuesto a O₃ ni sobre los efectos de la administración de MQ respecto a la concentración de VIT-C en el cerebro. En el presente estudio, no observamos ningún cambio significativo respecto a la concentración de VIT-C en las áreas del cerebro evaluadas de los

animales expuestos a O₃, ni en los expuestos a O₃ y tratados con dosis de 50 y 100 mg/kg de MQ. Sugiriendo que en nuestro modelo la VIT-C no esta participando en la regulación de los marcadores de estrés oxidativo.

En general nuestros resultados indican que MQ tiene una gran capacidad antioxidante, debido a la gran cantidad de flavonoides que contiene, los cuales han sido descritos como potentes antioxidantes, debido a su capacidad para donar protones y quelar iones metálicos [108].

Sin embargo, no se puede descartar la participación de los flavonoides en otras vías de regulación del estrés oxidativo. Por ejemplo, sobre el sistema antioxidante del factor nuclear relacionado con el eritroide 2 el factor 2 (Nrf2). En este sentido, se ha reportado que la administración de 12 mg / kg de antocianinas durante 30 días, aumenta la expresión de Nrf2 y de la hemo oxigenasa- 1 (HO-1) acompañada de una reducción significativa en los niveles de MDA en el hipocampo de ratones transgénicos (APP/PS1). Estos hallazgos sugieren, que la reducción en los marcadores de lipoperoxidación, está siendo regulada parcialmente por la vía Nrf2 / HO-1 [165].

A su vez, ha sido reportado que la quercetina, uno de los componentes de bayas como MQ, contrarresta el daño celular inducido por estrés oxidativo, mediante la activación de la vía Nrf2/ERA [165]. Varios estudios sugieren diferentes mecanismos por los cuales los alimentos ricos en flavonoides pueden tener efectos modulando las vías de señalización, activando procesos de transcripción y regulando la expresión génica. Sin embargo, los receptores a través de los cuáles los antioxidantes regulan las vías de señalización relacionadas a los procesos antioxidantes aún no han sido dilucidados del todo.

10. CONCLUSIONES

1. El estrés oxidativo provocado por la exposición a O₃, genera alteraciones en la memoria de corto y de largo plazo, las cuales son prevenidas por la administración de MQ.
2. La administración de las dosis de 50 mg/kg y 100 mg/kg de MQ disminuye las concentraciones de los marcadores de estrés oxidativo: lipoperoxidación (4-HNE, MDA), de nitración de proteínas (Nt3) y de AGEs en el hipocampo, la corteza prefrontal y la amígdala de los animales expuestos a O₃.
3. Los resultados del presente trabajo, indican que la administración de las dosis de 50 y 100 mg de Maqui Berry disminuye la actividad de la SOD, en el cerebro de los animales expuestos a O₃.
4. La administración de MQ previene la disminución de los -SH en el hipocampo, la corteza prefrontal y la amígdala de los animales expuestos a O₃.
5. Con base en los resultados anteriores, podemos sugerir que el extracto de MQ es una buena alternativa para prevenir los daños cognitivos y oxidantes provocados por la exposición a O₃.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Fernandez-Ruiz, J. y Bermúdez-Rattoni, F. (2008) Clasificación de la memoria. En Memoria Dónde Reside y Cómo se Forma (1ra Edn) (Bermúdez-Rattoni, F y Prado-Alcalá, A., eds), pp. 11- 25, Trillas
- [2] Tsien, Z. (2012) Learning and Memory. In Basic Neurochemistry (8th Edn) (Brady, T. and Siegel, J., eds), pp. 963-981, Academic Press
- [3] Correa M. (2007) Functional neuroanatomy of implicit learning: associative, motor and habit. *Rev Neurol.* 44, 234-24
- [4] Almaguer, W. y Bergado-Rosado J.A. (2002) Interacciones entre el hipocampo y la amígdala en procesos de plasticidad sináptica. Una clave para entender las relaciones entre motivación y memoria. *Revi Neurol.* 35, 586-593
- [5] Squire, L. and Zola, M. (1996) Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 13515–13522
- [6] Navarrete, F. et al. (2008) Methods to evaluate cognitive disorders in animal models. *Rev Neurol.* 47, 137-45
- [7] Milner, B. et al. (1998) Cognitive Neuroscience Review and the Study of Memory. *Neuron.* 20, 445–468
- [8] Wang, H. et al. (2006) Molecular and systems mechanisms of memory consolidation and storage. *Progress in Neurobiology.* 79, 123–135
- [9] Squire, L. (2004) Memory systems of the brain: A brief history and current perspective memory systems. *Neurobiology of Learning and Memory.* 82, 171–177
- [10] Brem, K. et al. (2013) Learning and memory. In *Handbook of Clinical Neurology* (3rd edn) (Lozano, M. and Hallert, M., eds), pp. 693-737, Elsevier
- [11] Dharani, K. (2015) Memory. In *The Biology of Thought* (1ra Edn) (Dharani, K. ed), pp. 53-74, Academic Press
- [12] Puzzo, D. et al. (2016) Molecular Mechanisms of Learning and Memory, In *Genes, Environment and Alzheimer's disease* (1ra edn) (Lazarov, O. and Tescoed, G. eds), pp. 1-27, Academic Press
- [13] Eichenbaum, H. (2017) Memory: Organization and Control. *Annu Rev Psychol.* 68, 19–45

- [14] Sandrini, M. and Cohen, G. (2014) Effects of Brain Stimulation on Declarative and Procedural Memories. In *The Stimulated Brain* (1st edn) (Cohen, K., ed), pp. 237-263, Academic Press
- [15] Fernández-Ruiz, J. y López-García, F. (2008) Sustratos neuronales de la memoria. En *Memoria Dónde Reside y Cómo se Forma* (1ra edn) (Bermúdez-Rattoni, F y Prado-Alcalá, A., eds), pp. 27- 36, Trillas
- [16] Amaral, D. and Witter M. (1989) The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31, 571-91
- [17] Amaral, D. and Witter M. (1995) Hippocampal formation. *The rat nervous system*. G. Paxinos. New York, Academic Press: 443-493
- [18] Burges, N, et al. (1999) *The hippocampal and parietal foundations of spatial cognition*. England, Oxford University Press.
- [19] Paxinos, G. and Watson, C. (2007) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. London: Academic Press
- [20] Deng, W. et al. (2010) New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nature Reviews. Neuroscience* 11, 339-350
- [21] Murray, E. and Mishkin M. (1986) Visual recognition in monkeys following rhinal cortical ablations combined with either amygdectomy or hippocampectomy. *J Neurosci* 6, 1991-2003
- [22] Murray, E. and Mishkin M. (1998) Object recognition and location memory in monkeys with excitotoxic lesions of the amygdala and hippocampus. *J Neurosci* 18:6568-6582.
- [23] Brown, M. and Aggleton, JP. (2001) Recognition memory: what are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus? *Nat Rev Neurosci.* 2, 51-61
- [24] Martin S.J., Clark R.E. (2007) The rodent hippocampus and spatial memory: from synapses to systems. *Cellular and Molecular Life Sciences* 1-31
- [25] Grüter, T. (2015) Altered neuronal excitability underlies impaired hippocampal function in animal model psychosis. *Front. Behav. Neurosci.* 9, 117
- [26] Bizon, J. et al. (2012) Characterizing cognitive aging of working memory and executive function in animal models. *Front. Ag. Neurosci.* 4, 19
- [27] Spalding, N. (2018) The role of the medial prefrontal cortex in the generalization of conditioned fear. *Neuropsychology.* 32, 1-17

- [28] Zhang, Y. et al. (2011) Induction and requirement of gene expression in the anterior cingulate cortex and medial prefrontal cortex for the consolidation of inhibitory avoidance memory. *Mol Brain*. 19, 4-4
- [29] McGaugh, L. (2015) Consolidating memories. *Annu Rev Psychol*. 3, 1-24
- [30] Sah, P. et al. (2003) The amygdaloid complex: Anatomy and physiology. *Physiological Reviews*. 83, 803-834
- [31] LeDoux, J. (2007). The amygdala. *Current Biology : CB*, 17(20), R868–74
- [32] Johansen, J. et al. (2011) Molecular mechanisms of fear learning and memory. *Cell*, 147, 509–24
- [33] Roozendaal, B. et al. (2009) Stress, memory and the amygdala. *Nature Reviews Neuroscience*, 10, 423-433
- [34] Orsini, C. and Maren, S. (2012) Neuroscience and Biobehavioral Reviews Neural and Cellular mechanisms of fear and extinction memory formation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 36, 1773–1802
- [35] Rivas-Arancibia, S. et al. (1998) Effects of O₃ exposure in rats on memory and levels of brain and pulmonary superoxide dismutase. *Environ Res*. 76, 33–9
- [36] Rivas-Arancibia S, et al. (2000) et al. Effects of taurine on ozone-induced memory deficits and lipid peroxidation levels in brains of young, mature, and old rats. *Environ Res*. 82, 7–17
- [37] Rivas-Arancibia S. et al. (2003) Effect of acute O₃ exposure on locomotor behavior and striatal function. *Pharmacol Biochem Behav*. 74, 891–900
- [38] Dorado-Martínez C. et al. (2001) Effects of different ozone doses on memory, motor activity and lipid peroxidation levels in rats. *Int J Neurosci*. 108, 149–61
- [39] Gandhi, S. and Abramov, AY. (2012) Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxid Med Cell Longev*. 12, 1-12
- [40] Konisberg, F. (2008) Cadena respiratoria mitocondrial. En radicales libres y estrés oxidativo Aplicaciones médicas (Martinez-Moreno, M. ed.), pp. 49-58, El Manual moderno
- [41] Turrens, JF. (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*. 15, 335- 344
- [42] Cobb CA. and Cole MP. (2015) Oxidative and nitrate stress in neurodegeneration. *Neurobiol Dis*. 84, 4–21

- [43] Rivas-Arancibia, S. et al. (2011) Oxidative Stress and Neurodegenerative Disease. In Neurodegenerative Diseases - Processes, Prevention, Protection and Monitoring (Chuen-Chung, C. ed.), pp. 53-88, Intech
- [44] Bringold, U. et al. (2000) Peroxynitrite formed by mitochondrial NO synthase promotes mitochondrial Ca²⁺ release. *Free Radic Biol Med.* 29, 343-348
- [45] Dorado-Martínez, C. et al. (2003) Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Rev Fac Med UNAM.* 46, 229-235
- [46] Guerra-Araiza, C. et al. (2013) Effect of natural exogenous antioxidants on aging and on neurodegenerative diseases. *Free Radical Research.* 1–12
- [47] Mark, R.J. et al. (1997) A role for 4-hydroxynonenal, and aldehydic product of lipid peroxidation, in disruption of ion homeostasis and neuronal death induced by amyloid beta- peptide. *J Neurochem.* 68, 255-64
- [48] W. and Lovell, M. (1998) Four-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, is increased in the brain in Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging.* 19, 33-36
- [49] Arlt, S. et al. (2002) Lipid peroxidation in neurodegeneration: new insights into Alzheimer's disease. *Current opinion in lipidology.* 13, 289-29
- [50] Selley, ML et al. (2002) The effect of increased concentrations of homocysteine on the concentration of (E)-4-hydroxy-2-nonenal in the plasma and cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 23, 383-388
- [51] Uchida K. (2003) 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Progress in Lipid Research.* 42, 318-343
- [52] Perluigi, M., et al. (2012) 4-Hydroxy-2-nonenal, a reactive product of lipid peroxidation, and neurodegenerative diseases: a toxic combination illuminated by redox proteomics studies. *Antioxidants & redox signaling.* 11, 1590-609
- [53] Abe, K. (1995) Induction of nitrotyrosine-like immunoreactivity in the lower motor neuron of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett.* 199, 152-4
- [54] Peluffo, H. et al. (2004) Induction of motor neuron apoptosis by free 3-nitro-L-tyrosine. *J Neurochem.* 89, 602-12
- [55] Singh, R. et al. (2001) Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 44, 129-146
- [56] Byun, K. et al. (2012) Induction of neuronal death by microglial AGE-albumin: implications for Alzheimer's disease. *PLoS One* 7, 37917

- [57] Byun, K. (2012) Activated microglial cells synthesize and secrete AGE-albumin. *Anat Cell Biol* 45, 47-52.
- [58] Ott, C. et al. (2014) Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biol* 2, 411-429
- [59] Aliev, G. et al. (2010) Oxidative stress induced mitochondrial failure and vascular hypoperfusion as a key initiator for the development of Alzheimer Disease. *Pharmaceuticals* 3, 158-187
- [60] Perrson, T. et al. (2014) Oxidative stress in Alzheimer's disease: why did antioxidant therapy fail? *Oxid Med Cell Longev*. 1-11
- [61] Anzai, K. et al. (1999) Oxidation- dependent changes in the stability and permeability of lipid bilayers. *Antioxid Redox Signal*. 3, 339-347
- [62] Ávila-Costa MR. et al. (1999) Memory deterioration in an oxidative stress model and its correlation with cytological changes on rat hippocampus CA1. *Neurosci Lett*. 270, 107-9
- [63] Martínez-Lazcano, J. et al. (2013) The effects of ozone exposure and associated injury mechanisms on the central nervous system. *Reviews in the neurosciences*. 24, 337-352
- [64] La Secretaría de Salud actualiza la NOM 020 en materia de ozono. (2020) Recuperado 21 de noviembre de 2020, de www.gob.mx website: [//www.gob.mx/cofepris/prensa/la-secretaria-de-salud-actualiza-la-nom-020-en-materia-de-ozono-56372](http://www.gob.mx/cofepris/prensa/la-secretaria-de-salud-actualiza-la-nom-020-en-materia-de-ozono-56372)
- [65] Hernández-Cadena, L. et al. (2007) Infant morbidity caused by respiratory diseases and its relation with the air pollution in Juarez City, Chihuahua, Mexico. *Salud Pública Mex*. 49, 27-36
- [66] Calderón-Garcidueñas, L. et al. (2006) Lung radiology and pulmonary function of children chronically exposed to air pollution. *Environ Health Perspect*. 114, 1432-1427
- [67] Romero-Calderón, A. (2017) Oxidative stress, lung function and exposure to air pollutants in Mexican schoolchildren with and without asthma. *Salud publica de Mexico*. 59, 630-638.
- [68] Hackney, J. et al. (1975) Experimental studies on human health effects of air pollutants II. Four-hour exposure to ozone alone in combination with other pollutant gases. *An International Journal*. 30, 379-384
- [69] Calderón-Garcidueñas, L. et al. (2008). Air pollution, cognitive deficits and brain abnormalities: a pilot study with children and dogs. *Brain and cognition*. 68, 117-127
- [70] Chen JC, and Schwartz J. (2009) Neurobehavioral effects of ambient air pollution on cognitive performance in US adults. *Neurotoxicology*. 30, 231-239

- [71] Goodman P. et al. (2004) Cause-specific mortality and the extended effects of particulate pollution and temperature exposure. *Environ Health*. 112, 179–185
- [72] Postlethwait E. et al. (2000) Three-dimensional mapping of ozone-induced acute cytotoxicity in tracheobronchial airways of isolated perfused rat lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 22, 191–9
- [73] Pryor WA and Church DF. (1991) Aldehydes, hydrogen peroxide, and organic radicals as mediators of ozone toxicity. *Free Radic Biol Med*. 11, 41–6
- [74] Sunil V. et al. (2013) Ozone-induced injury and oxidative stress in bronchiolar epithelium are associated with altered pulmonary mechanics. *Toxicol Sci*. 133, 309–19
- [75] Ávila-Costa, MR. (1999) Memory deterioration in an oxidative stress model and its correlation with cytological changes on rat hippocampus CA1. *Neurosci Lett*. 270, 107–9
- [76] Gackière F. et al. (2011) Ozone inhalation activates stress-responsive regions of the CNS. *J Neurochem*. 117, 961–72
- [77] Pinto-Almazán R. et al. (2018) Effect of tibolone pretreatment on kinases and phosphatases that regulate the expression and phosphorylation of Tau in the hippocampus of rats exposed to ozone. *Neural regeneration research*
- [78] Paz C. and Huitron-Resendiz S. (1996) The effects of ozone exposure on the sleep-wake cycle and serotonin contents in the pons of the rat; *Neurosci Lett*. 204, 49-52
- [79] Alfaro-Rodríguez A. and González-Piña R. (2005) O₃-induced paradoxical sleep decrease is related to diminished acetylcholine levels in the medial preoptic area in rats. *Chem Biol Interact* 151, 151–158
- [80] Velazquez, P. et al. (2004) El envejecimiento y los radicales libres. *Ciencias*. 75
- [81] Moreira, P. et al. (2010) Detection and localization of markers of oxidative stress by in situ methods: application in the study of Alzheimer's disease. In *Free Radicals and Antioxidant Protocols* (Uppu, M. et al. eds.), pp. 419-434, Human Press
- [82] Jardim F. et al. (2017). Resveratrol and Brain Mitochondria: a Review *Mol Neurobiol*. 017- 0448
- [83] Green, S. et al. (2002). Structure, chromosomal locations, and analysis of the canine Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) gene. *J. Hered*. 93, 119-124
- [84] Wulfsberg, E. et al. (1983). Normal superoxide dismutase-1 (SOD-1) activity with deletion of chromosome band 21q21 supports localization of SOD-1 locus to 21q22. *Hum. Genet*. 64, 271- 272
- [85] Beckman, G. et al. (1973). Superoxide dismutase isozymes in different human tissues, their genetic control and intracellular localization. *Hum. Hered*. 23, 338-345

- [86] Wan, X. et al. (1994). Molecular structure and organization of the human manganese superoxide dismutase gene. *DNA Cell Biol.* 13, 1127-1136
- [87] Rodríguez-Martínez, E. (2013) Mitochondrial dysfunction in the hippocampus of rats caused by chronic oxidative stress. *Neuroscience.* 12, 384–395
- [88] Gómez-Quiroz L. and Cuevas-Bahena (2008) Superóxido dismutasas. En radicales libres y estrés oxidativo Aplicaciones médicas (Martinez-Moreno, M. ed.), pp. 49-58, El Manual moderno
- [89] Somogyi, A. et al. (2007). Antioxidant measurements. *Physiol Meas.* 28, 41-55
- [90] Cárdenas-Rodríguez, N. (2008). Glutathión peroxidasas: una familia de enzimas. En radicales libres y estrés oxidativo Aplicaciones médicas (Martinez-Moreno, M. ed.), pp. 183-200, El Manual moderno
- [91] Ogata, M. et al. (2008). Mammalian acatalasemia: the perspectives of bioinformatics and genetic toxicology. *Acta Med. Okayama* 62: 345-361, 2008
- [92] Zamocky M. et al. (2008). Evolution of catalases from bacteria to humans. *Antioxid Redox Signal.* 1527-48
- [93] Peraza-Reyes, L. (2008). Catalasa. En Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. Ciudad de México: Manual Moderno, pp. 169-182
- [94] Almeida, M. y Fernandes, S. (2008) Potencial antioxidante del ácido ascorbico. En radicales libres y estrés oxidativo Aplicaciones médicas (Martinez-Moreno, M. ed.), pp. 279-288, El Manual moderno
- [95] Bourges, H. (2008) Aspectos nutriólogicos de la vitamina C. En radicales libres y estrés oxidativo Aplicaciones médicas (Martinez-Moreno, M. ed.), pp. 579-592, El Manual moderno
- [96] Kocot, J. et al. (2017) Does Vitamin C Influence Neurodegenerative Diseases and Psychiatric Disorders? *Nutrients.* 9, 1-29
- [97] Kennard, J. et al. (2014) Intravenous ascorbate improves spatial memory in middle-aged APP/PSEN1 and wild type mice. 1, 34-42
- [98] Kazuma, M. et al. (2011) Vitamin C Restores Behavioral Deficits and Amyloid-Oligomerization without Affecting Plaque Formation in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. 26, 7-18
- [99] Sil, s. et al. (2016) Dual Role of Vitamin C on the Neuroinflammation Mediated Neurodegeneration and Memory Impairments in Colchicine Induced Rat Model of Alzheimer Disease. *J Mol Neurosci.* 4, 421-435

- [100] Metcalfe, T. et al. (1989) Vitamin E concentrations in human brain of patients with Alzheimer's disease, fetuses with Down's syndrome, centenarians, and controls, *Neurochem.* 14 1209–1212
- [101] Jimenez, F. et al. (1997) Cerebrospinal fluid levels of alpha-tocopherol (vitamin E) in Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.* 104, 703–710
- [102] Fernandez-Calle, J et al. (1992) Serum levels of alpha-tocopherol (vitamin E) in Parkinson's disease. *Neurology.* 42, 1064–1066
- [103] Sano, M. et al. (1997) A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. The Alzheimer's Disease Cooperative Study. 17, 1216-1222
- [104] Dysken, M. (2014) Effect of vitamin E and memantine on functional decline in Alzheimer disease: the TEAM-AD VA cooperative randomized trial. 311, 33–44
- [105] Cadet, J. et al. (1989) Vitamin E attenuates the toxic effects of intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in rats: behavioral and biochemical evidence. *Brain Res* 476, 10–5
- [106] Rendeiro, C. et al. (2012) Flavonoids as modulators of memory and learning: molecular interactions resulting in behavioural effects. *Nutrition Society.* 71, 246–262
- [107] Spencer, P. et al. (2009) Flavonoids and cognition: The molecular mechanisms underlying their behavioural effects. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 492, 1–9
- [108] Wang, T. et al. (2018) Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological. *Asian journal of pharmaceutical sciences.* 13, 12–23
- [109] Williams, R. and Spencer, P. (2012) Flavonoids, cognition, and dementia: Actions, mechanisms, and potential therapeutic utility for Alzheimer disease. *Free Radical Biology & Medicine.* 52, 35–45
- [110] Bakhtiaria, M. (2017) Protective effects of flavonoids against Alzheimer's disease-related neural dysfunctions. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 93, 218–229
- [111] Walle, T. (2004) Serial Review: Flavonoids and Isoflavones (Phytoestrogens): Absorption, Metabolism, and Bioactivity. *Free Radical Biology & Medicine.* 36, 829 – 837
- [112] Crozier, A. et al. (2010) Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine.* 31, 446–467
- [113] Jaeger, N. B. et al. (2017) Mechanisms of dietary flavonoid action in neuronal function and neuroinflammation. *Molecular Aspects of Medicine.* 30, 1-13
- [114] Spencer, P. et al. (2004) Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 423, 148–161

- [115] Youdim, K. et al. (2004) Flavonoids and the brain: interactions at the blood–brain barrier and their physiological effects on the central nervous system. *Free Radical Biology & Medicine*. 37, 1683–1693
- [116] Ziberna, L. (2014) Bioavailability of Flavonoids: The Role of Cell Membrane Transporters. In *Polyphenols in Human Health and Disease*. (1st edn) (Watson, R. Preedy, R. and Zibadi, S., eds), pp. 489–511, Academic Press
- [117] Karuppagounder, S. et al. (2013) Madathil, M. Pandey, R. Haobam, U. Rajamma, K. Mohanakumar, Quercetin up-regulates mitochondrial complex-I activity to protect against programmed cell death in rotenone model of Parkinson’s disease in rats, *Neuroscience* 236, 136-148
- [118] Bagheri, M. et al. (2011) Genistein ameliorates learning and memory deficits in amyloid b (1–40) rat model of Alzheimer’s disease, *Neurobiol. Learn. Mem.* 95, 270–276
- [119] Rainey-Smith, S. et al. (2008) Neuroprotective effects of hesperetin in mouse primary neurones are independent of CREB activation, *Neurosci. Lett.* 438, 29–33
- [120] Lee, S. (2000) Protective effects of the Green tea polyphenol epigallocatechin gallate against hippocampal neuronal damage after transient global ischemia in gerbils. *Neurosci. Lett.* 287, 191-194
- [121] Di Lorenzo A. et al. (2019) Post-stroke depression: antidepressive effects of a chemically characterized maqui berry extract in a mouse model (*Aristotelia chilensis* (molina) stuntz). *Food Chem Toxicol.* 129, 434–443
- [122] Subash, S. et al. (2014) Pomegranate from Oman Alleviates the Brain Oxidative Damage in Transgenic Mouse Model of Alzheimer's disease. *Journal of Traditional and Complementary Medicin.* 4, 232-237
- [123] Jie, W. et al. (2017) Anthocyanins from Black Chokeberry (*Aroniamelanocarpa* Elliot) Delayed Aging-Related Degenerative Changes of Brain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65, 5973-5984
- [124] Cuevas, E. (2009) Antioxidant effects of epicatechin on the hippocampal toxicity caused by amyloid-beta 25-35 in rats. *European Journal of Pharmacology.* 616, 122-127
- [125] Mandel, S. and Youdim M. (2004) Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. 37, 304-317
- [126] Levites, Y. et al. (2002) Attenuation of 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) activation and cell death by tea extracts in neuronal cultures. 63, 21-9

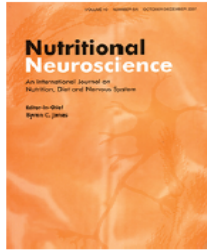
- [127] Krikorian, R. et al. (2010) Concord grape juice supplementation improves memory function in older adults with mild cognitive impairment. *Br J Nutr.* 103, 730–734
- [128] Krikorian, R. et al. (2012) Concord grape juice supplementation and neurocognitive function in human aging. *J Agric Food Chem.* 60, 5736–5742
- [129] Krikorian, R. et al. (2010) Blueberry supplementation improves memory in older adults. *J Agric Food Chem.* 58, 3996–4000
- [130] Le Bars, P.L. et al. (2002) Influence of the severity of cognitive impairment on the effect of the Ginkgo biloba extract EGb 761 in Alzheimer’s disease. *Neuropsychobiology.* 45, 19–26
- [131] Miranda-Rottmann, S. et al. (2002) Juice and phenolic fractions of the berry *Aristotelia chilensis* inhibit LDL oxidation in vitro and protect human endothelial cells against oxidative stress. *J Agric Food Chem.* 50, 7542–7
- [132] Escribano-Bailon, MT. et al. (2006). Anthocyanins in berries of Maqui (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz). *Phytochem Anal.* 17, 8–14
- [133] Fredes, C. et al. (2012) Polyphenol content and antioxidant activity of maqui (*Aristotelia chilensis* [Molina] Stuntz) during fruit development and maturation in central Chile. *Chilean Journal of Agricultural Research.* 72, 582 - 589
- [134] Bennedetti, S. (2012) Información tecnológica de productos forestales no madereros del bosque nativo en Chile: Monografía de maqui (*Aristotelia chilensis*). En Instituto Forestal. Pp. 5-18
- [135] Muñoz, O. et al. (2004) Plantas medicinales de uso en Chile: Química y Farmacología. Santiago, Chile. En Universidad de Chile, Vicerrectoría de Asuntos Académicos, Comité de Publicaciones Científicas: Editorial Universitaria. Pp. 200-240
- [136] Gironés-Vilaplana A. et al. (2014) American fruits rich in phytochemicals with biological effects. *J Functional Foods.* 7, 599–608
- [137] Kang, J, K. et al. (2012) Bioactive of açai (*Euterpe precatoria* Mart.) fruit pulp, superior antioxidant and anti-inflammatory properties to *Euterpe oleracea* Mart. *Food Chemistry.* 133, 671 - 677
- [138] Bunea, A. et al. (2013) Anthocyanin determination in blueberry extracts from various cultivars and their antiproliferative and apoptotic properties in B16-F10 metastatic murine melanoma cells. *Phytochemistry.* 95, 436-444
- [139] You, Q. et al. (2011) Comparison of anthocyanins and phenolics in organically and conventionally grown blueberries in selected cultivars. *Food Chemistry.* 125, 201-208

- [140] Rodrigues, E. et al. (2011) Phenolic compounds and antioxidant activity of blueberry cultivars grown in Brazil. *Food Science and Technology*. 31, 911-917
- [141] Céspedes, CL. et al. (2008). Antioxidant and cardioprotective activities of phenolic extracts from fruits of Chilean blackberry *Aristotelia chilensis* (Elaeocarpaceae), Maqui. *Food Chem*. 107, 820–9
- [142] Araos, JP. (2015) *Aristotelia chilensis*: a possible nutraceutical or functional food. *Med Chem*. 5, 378–82
- [143] Fuentealba, J. et al. (2012) Synaptic silencing and plasma membrane dyshomeostasis induced by amyloid- β peptide are prevented by *Aristotelia chilensis* enriched extract. *J Alzheimers Dis*. 31, 879–89
- [144] Bautista-Orozco, L. et al. (2016) Neuroprotective effect of *Aristotelia Chilensis* (maqui berry) extract and dapsone in a status epilepticus model. Conference: III International Congress food Technology, Quality and safety; Novi Sad, Serbia
- [145] Cimadevilla, J.M. et al. (2007) Unilateral hippocampal blockade reveals that one hippocampus is sufficient for learning a passive avoidance task. *Journal Neuroscience Research*. 85, 1138-42
- [146] Mihara H and Uchiyama M. (1978) Determination of malondialdehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem*. 1, 271–8
- [147] Münch G. et al. Influence of advanced glycation end-products and AGE-inhibitors on nucleation-dependent polymerization of beta-amyloid peptide (1997) *Biochim Biophys Acta*. 1360, 17–29
- [148] Gallardo JM. (2007) Evaluación del sistema antioxidante en el semen normal. *Revista de investigación clínica*. 1, 42-47
- [149] Habeeb et al. (1972) Reaction of protein sulfhydryl groups with Ellman's reagent. *Methods in Enzymology*. 25, 457-464
- [150] Prieto et al. (1999) Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity Through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E *Anal Biochem*. 269, 337-41
- [151] Farfán-García ED. et al. (2014) Tibolone prevents oxidation and ameliorates cholinergic deficit induced by ozone exposure in the male rat hippocampus. *Neurochem Res*. 39, 1776–86
- [152] Rivas-Arancibia S. et al. (2010) Oxidative stress caused by ozone exposure induces loss of brain repair in the hippocampus of adult rats. *Toxicol Sci*. 113, 187–97

- [153] Pinto-Almazán R. et al. (2014) Neuroprotective effects of tibolone against oxidative stress induced by ozone exposure. *Rev Neurol.* 58, 441–8
- [154] Andres-Lacueva C. et al. (2005) Anthocyanins in aged blueberry-fed rats are found centrally and may enhance memory. *Nutr Neurosci.* 8, 111–20
- [155] Casadesus G. et al. (2004) Modulation of hippocampal plasticity and cognitive behavior by short-term blue-berry supplementation in aged rats. *Nutr Neurosci.* 7, 309–16
- [156] Williams CM. et al. (2008) Blueberry-induced changes in spatial working memory correlate with changes in hippocampal CREB phosphorylation and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels. *Free Radic Biol Med.* 45, 295–305
- [157] Lorigados-Pedre L. et al. (2018) Oxidative stress in patients with drug resistant partial complex seizure. *Behav Sci (Basel).* 8, 59-75
- [158] Deane R. et al. (2012) A multimodal RAGE-specific inhibitor reduces amyloid β -mediated brain disorder in a mouse model of Alzheimer disease. *J Clin Invest.* 122, 1377–92
- [159] Hong Y. et al. (2016) Effects of RAGE-specific inhibitor FPS-ZM1 on amyloid- β metabolism and AGEs-induced inflammation and oxidative stress in rat hippocampus. *Neurochem Res.* 41, 1192–9.
- [160] Guerrero AL. et al. (1999) Effects of vitamin E on ozone-induced memory deficits and lipid peroxidation in rats. *Neuroreport.* 10, 1689–92
- [161] Rodríguez, K. et al. (2016) Changes in bioactive components and antioxidant capacity of maqui, *Aristotelia chilensis* [Mol] Stuntz, berries during drying. *LWT—Food Science and Technology.* 65, 537–42
- [162] Romanucci, V. et al. (2016) Bioactive compounds of *Aristotelia chilensis* Stuntz and their pharmacological effects. *Curr Pharm Biotechnol.* 17, 513–23
- [163] Denu, J. and Taner, K. (1998) Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry.* 21, 5633-42
- [164] Shilpy, D. et al. (2015) Vitamin C Deficiency in the Brain Impairs Cognition, Increases Amyloid Accumulation and Deposition, and Oxidative Stress in APP/PSEN1 and Normally Aging Mice. *ACS Chemical Neuroscience* 6, 570-581
- [165] Saw, CL. et al. (2014) The berry constituents quercetin, kaempferol, and pterostilbene synergistically attenuate reactive oxygen species: involvement of the Nrf2-ARE signaling pathway. *Food Chem Toxicol.* 72, 303–11

12. APÉNDICE

Artículo requisito para la obtencion de grado



Nutritional Neuroscience

An International Journal on Nutrition, Diet and Nervous System



ISSN: 1028-415X (Print) 1476-8305 (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/ynns20>

Maqui berry (*Aristotelia chilensis*) extract improves memory and decreases oxidative stress in male rat brain exposed to ozone

Iván Bribiesca-Cruz, Diego A. Moreno, Cristina García-Viguera, Juan Manuel Gallardo, Julia J. Segura-Urbe, Rodolfo Pinto-Almazán & Christian Guerra-Araiza

To cite this article: Iván Bribiesca-Cruz, Diego A. Moreno, Cristina García-Viguera, Juan Manuel Gallardo, Julia J. Segura-Urbe, Rodolfo Pinto-Almazán & Christian Guerra-Araiza (2019): Maqui berry (*Aristotelia chilensis*) extract improves memory and decreases oxidative stress in male rat brain exposed to ozone, *Nutritional Neuroscience*, DOI: [10.1080/1028415X.2019.1645438](https://doi.org/10.1080/1028415X.2019.1645438)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/1028415X.2019.1645438>



Published online: 28 Jul 2019.



Submit your article to this journal [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=ynns20>



Maqui berry (*Aristotelia chilensis*) extract improves memory and decreases oxidative stress in male rat brain exposed to ozone

Iván Bribiesca-Cruz ^{1a}, Diego A. Moreno ^{2b}, Cristina García-Viguera ^{3b}, Juan Manuel Gallardo ^{4c}, Julia J. Segura-Uribe ^{5d}, Rodolfo Pinto-Almazán ^{6e} and Christian Guerra-Araiza ^{1a}

^{1a}Unidad de Investigación Médica en Farmacología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City, Mexico; ^{2b}CEBAS-CSIC, Food Science and Technology Department, Phytochemistry and Healthy Foods Lab, Campus Universitario de Espinardo, Murcia, Spain; ^{3c}Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Nefrológicas, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City, Mexico; ^{4d}Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City, Mexico; ^{5e}Unidad de Investigación del Hospital Regional de Alta Especialidad de Ixtapaluca, Municipio de Ixtapaluca, Mexico

ABSTRACT

Introduction: Prolonged ozone exposure can produce a state of oxidative stress, which in turn causes alterations in the dynamics of the brain and affects memory and learning. Moreover, different investigations have shown that high flavonoid content berries show a great antioxidant activity. The relationship between the protective effect of the maqui berry extract and its antioxidant properties in the brain has not been studied in depth. **Objectives:** The present study evaluated whether the protection exerted by the aqueous extract of maqui berry in brain regions associated with cognitive performance is due to its antioxidant capacity. **Methods:** Sprague Dawley rats were exposed to 0.25 ppm ozone and administered with maqui berry extracts. At the end of the treatments, spatial learning and short- and long-term memory were evaluated, as well as oxidative stress markers. **Results:** The administration of 50 and 100 mg/kg of the aqueous extract of maqui berry was effective in preventing the cognitive deficit caused by chronic exposure to ozone. The antioxidant effect of the administration of maqui berry was analyzed in the prefrontal cortex, hippocampus, and amygdala. Oxidative stress markers levels decreased and the enzymatic activity of superoxide dismutase diminished in animals exposed to ozone treated with the 50 mg/kg dose of maqui berry. **Discussion:** These results show a relationship between protection at the cognitive level and a decrease in oxidative stress markers, which suggests that the prevention of cognitive damage is due to the antioxidant activity of the maqui berry.

KEYWORDS

Oxidative stress; memory and learning; maqui berry; malondialdehyde; superoxide dismutase; ozone; antioxidants; neuroprotection; hippocampus



Introduction

Oxidative stress (OS) is widely accepted to be involved in the development of chronic degenerative diseases [1]. OS can be induced by chronic ozone exposure [2]. Ozone (O_3), which is one of the main components of photochemical pollution, is a highly irritating and oxidant gas [3]. O_3 is formed from photochemical reactions (UV rays) between nitrogen oxides and hydrocarbons from vehicle emissions and factories [4]. In different epidemiological studies conducted in both children and adults, O_3 has been associated with adverse effects on health, with the respiratory and cardiovascular systems being the most affected [5–7]. Moreover, the central nervous system (CNS) is not exempt from the adverse effects of this gas. Some studies have reported headaches, fatigue and cognitive alterations as a consequence of O_3 exposure [8,9].

In animal models, the effects of O_3 inhalation have been evaluated. This gas causes severe damage to the

alveolar pulmonary epithelium, which increases its permeability and activates inflammatory processes [10]. In addition, it has been proposed that during the acute phase of O_3 exposure, cell necrosis predominates due to the direct cytotoxicity of the generation of free radicals (FR). FR generate reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species, which in turn exacerbate damage [11]. When the production of ROS and RNS exceeds the antioxidant defense systems of the lungs [12], these species can reach different parts of the body through the bloodstream, including the CNS, and cause a state of generalized OS [13,14]. The brain is particularly vulnerable to OS due to its high-energy metabolism, large amount of unsaturated lipids sensitive to oxidation and low concentrations of antioxidant enzymes [15].

In this context, it has been reported that O_3 exposure OS causes lipoperoxidation of the cell membrane, increases protein oxidation markers, alterations in

CONTACT Christian Guerra-Araiza  cristianguerra2001@gmail.com  Unidad de Investigación Médica en Farmacología, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Av. Cuauhtémoc 330, Colonia Doctores, Alcaldía Cuauhtémoc, Mexico City C.P. 06720, Mexico
© 2019 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

enzymatic antioxidant activity, and neuronal death in the rat brain [16–18]. The olfactory bulb, as well as the hippocampus, striatum, cerebellum, and prefrontal cortex are the most vulnerable areas [19,20]. In turn, it has been suggested that the biochemical and structural changes observed in the animal model exposed to O₃ can converge in brain plasticity problems, which lead to deficits in memory and learning [13,19].

Furthermore, the research on their composition and biological activity has shown that the intake of fruits and vegetables has a great impact on human health, well-being, and the prevention of various diseases [21]. Many of the biological properties of fruits are generally attributed to a high content of polyphenols, which are constituted by flavonoids (anthocyanins, flavonols), condensed tannins (proanthocyanidins), hydrolysable tannins (ellagitannins and gallotannins), and phenolic acids [22]. Among polyphenols, anthocyanins have shown a powerful antioxidant and anti-inflammatory effect [23,24].

Aristotelia chilensis, commonly known as maqui (MQ) berry, is considered as a powerful natural antioxidant [25]. MQ has significant amounts of flavonoid antioxidants and bioactive properties compared to other berries [26]. MQ juice inhibits the oxidation of low density lipoproteins (LDL) and protects endothelial cells against intracellular oxidative stress, for which it is considered useful as an anti-atherogenic [25]. In ischemia/reperfusion studies *in vivo* in rat heart, the methanolic extract of MQ showed preventive/protective effects attributed to the reduction of lipid oxidation and oxidative stress [27].

In addition to its high antioxidant power, other pharmacological activities of MQ extract such as anti-inflammatory and analgesic effects have been described [28]. A neuroprotective effect of MQ extract has been also described in hippocampal neurons incubated with the amyloid- β peptide (A β), in which a recovery in the transient frequency of the calcium channel has been observed, as well as a spontaneous synaptic activity, the preservation of dendritic arborization and a decrease in neuronal death. These results suggest that MQ can induce changes in the aggregation kinetics of A β , producing variations in the nucleation phase generating less toxic species and protecting this neural network. These effects have been attributed to the great antioxidant activity of *Aristotelia chilensis* [29].

Recently, it has been reported that the aqueous extract of MQ decreased the number of epileptic seizures and neuronal death in animals treated with kainic acid at 17 and 32 days after birth; thus, reducing the risk of developing epilepsy [30].

It is important to find solutions to the health problems caused by exposure to O₃. One of these

alternatives may be the use of the aqueous extract of MQ due to its large number of compounds with antioxidant capacity. Therefore, in the present research, the neuroprotection effects exerted by the aqueous extract of MQ were evaluated in some brain regions associated with cognitive performance in a rat model of OS by O₃ exposure.

Methods

Animals

Male Sprague Dawley rats (250–300 g of weight) were placed in acrylic boxes (five animals per box) with free access to water and food (Formulab diet 5008, Labdiet, St. Louis, MO, USA) and kept in a room with a 12 h light/dark cycle (start of the light cycle at 8:00 h). The animals were treated according to the guidelines and requirements of the Declaration of Helsinki by the World Medical Assembly and by the Ethics Committee of the Coordination of Health Research of the Mexican Institute of Social Security (CIS/IMSS).

Ozone exposure

For 30 consecutive days, the animals were exposed to O₃ at a constant dose of 0.25 ppm for 4 h per day. The dose was chosen to mimic the moderate levels of ozone found in the industrialized zones of Mexico City, which concentrations range from 0.1 ppm to 0.74 ppm [18,31]. In a previous study, it was shown that this dose provokes OS-related damage to the brain on rats [16–18]. Briefly, animals were placed inside a chamber with a diffuser connected to a variable flux O₃ generator (5 l/s), as previously described [17]. The O₃ converter was fed with filtered purified air. O₃ production levels were proportional to the current intensity and the airflow. A PCI Ozone and Control System Monitor (PCI Ozone and Control Systems, West Caldwell, NJ, USA) was used to measure O₃ concentration inside the chamber during the experiments and to keep a constant O₃ concentration. Although control animals were exposed to an airstream free of O₃, the same exposure protocols were used for these groups. Animals were immediately returned to their home cages after the exposure.

Treatments

The maqui berry powder CHI2 (Ecuadorian Rainforest, LLC, USA) was used in these experiments. This powder consists of a whole fruit ground rich in anthocyanins (600 mg/100 g d.w. by HPLC analysis, mainly delphinidins and cyanidins), and other compounds of interest,

such as ellagic acid derivatives (14 mg/100 g d.w.), flavonols (24 mg/100 g d.w.) and chlorogenic acid (9 mg/100 g d.w.) [32].

Rats were randomly divided into seven experimental groups as follows:

Group 1 (NT): Rats neither exposed to air or O₃ nor given any treatment with vehicle or MQ

Group 2 (VEH): Rats exposed to a current of air and administered with 200 µl of water by oral gavage

Groups 3 (50 MQ) and 4 (100 MQ): Rats exposed to an air current and administered either with 50 or 100 mg/kg of MQ extract, respectively. The lyophilized MQ berry powder (Ecuadorian Rainforest, LLC, USA) was dissolved in 1 ml of water and administered by oral gavage one hour after the exposure to O₃ or air

Group 5 (O₃): Rats exposed to O₃ and administered VEH

Groups 6 (O₃ 50 MQ) and 7 (O₃ 100 MQ): Rats exposed to O₃ and administered either with 50 or 100 mg/kg of lyophilized MQ powder, respectively

Passive avoidance test

Twenty-four hours after the last treatment, the passive avoidance test (PAT) was performed for every group. All animals were trained once to perform the PAT. Short- and long-term memory (10 min and 24 h after training, respectively) were evaluated. In brief, rats were placed in a PAT-apparatus (OMNIALVA®, Mexico) with two chambers: the safe (white) and the shock (black) compartments. The duration of the stimulus was automatically controlled and the latencies were measured manually with chronometers.

During the training (acquisition), each animal was placed in the safety compartment for 10 s. Then, the guillotine-type door was raised and the time required for the animal to cross the threshold to the punishment compartment was recorded (acquisition latency). Once the animal was standing with its four limbs in the punishment compartment, the door was closed and a single electric shock was triggered (3 mA for 5 s). Immediately after, the door was opened and the time required for the animal to return to the safety compartment (escape latency) was measured. The animal remained in the safety compartment for 30 s before returning to its individual housing.

Ten minutes (short-term memory) and 24 h (long-term memory) after training, the retention phase was performed, in which the animal was placed again in the security compartment for 10 s and the guillotine-type door was opened. The time that the animal remained in the security compartment before entering

the punishment compartment was recorded (latency of retention). The test ended when the animal either entered the punishment compartment or remained in the security compartment for 600 s. The experiments were performed at the same time of day and under identical conditions.

Once the behavioral tests were concluded, a sample from each experimental group ($n = 8$) was picked randomly. The animals were sacrificed by decapitation. Immediately after, the brains were removed, and the hippocampus, prefrontal cortex, and the amygdala were dissected.

Western blot

Tissues were homogenized in lysis buffer with a cocktail of protease inhibitors Complete™ (Sigma-Aldrich Saint Louis MO, USA) in a ratio of 1 ml of buffer/1 g of tissue at 4°C. The homogenized samples were centrifuged at 15,000 rpm for 15 min at 4°C to obtain total proteins in the supernatant. Protein concentration was determined with a Nanodrop® spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, Waltham CA, USA).

Proteins (30 µg) were resolved using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (10% SDS-PAGE) with a Mini-Protean system (BioRad, Hercules CA, USA) and transferred to nitrocellulose membranes (Merck Millipore, Burlington MA, USA). Membranes were blocked with 5% nonfat dry milk diluted in 0.05% Tween-20 Tris-buffered saline and incubated overnight with the primary antibodies. Pre-stained markers (BioRad, Hercules CA, USA) were included for determination of protein molecular weight.

The following antibodies were used: goat polyclonal antibody against 4-hydroxynonenal (4-HNE) (Millipore AB5605; Merck Millipore, Burlington MA, USA; diluted 1:3,000); mouse monoclonal antibody against nitrotyrosine (Nt3) (Santa Cruz sc-101358; Santa Cruz CA, USA; diluted 1:1,500), and mouse monoclonal antibody against α-tubulin (Santa Cruz sc-398103; Santa Cruz CA, USA; diluted 1:1,000). After incubation with the primary antibody, membranes were washed and incubated with horseradish peroxidase-coupled secondary antibodies (Santa Cruz, diluted 1:10,000). Immunoreactive bands were detected using an enhanced chemiluminescence system (Merck Millipore, Burlington MA, USA). When necessary, membranes were stripped using a reblot solution (Merck Millipore, Burlington MA, USA). The chemiluminescence signal was analyzed with C-DiGit® Blot Scanner (Li-Cor Biosciences, Lincoln NE, USA) and the Image Studio™ Lite Quantification Software (Li-Cor Biosciences, Lincoln NE, USA).

Determination of malondialdehyde

Before the determination of malondialdehyde (MDA), a step consisting of deproteinizing the sample was performed in order to avoid interference by the sediments formed by denatured proteins to avoid pipetting errors. The sample (200 μ l) was placed in eppendorf tubes and 200 μ l of 20% trichloroacetic acid (TCA) were added, vortexed and incubated at 4°C for 10 min, and centrifuged at 11,000 rpm for 3 min. The supernatant was recovered.

MDA is one of the final products of polyunsaturated fatty acid peroxidation and a marker of free radical activity. At an acid pH and high temperatures, one molecule of MDA reacts with two molecules of TCA forming pink adducts detected at 532 nm [33]. A calibration curve with eight points (0–100 μ M), as well as the samples were prepared as follows: 25 μ l of either the supernatant or standard solution were mixed with 200 μ l of 0.8% TCA, vortexed and incubated at 95°C/60 min, and lastly at 22°C/10 min. Finally, the absorbance at 532 nm was determined for the calibration curve and the samples.

Advanced glycation end-products assay

The determination of advanced glycation end-products (AGEs) was based on the spectrofluorometric detection of some fluorescent products [34]. Briefly, the brain homogenates were diluted 1:50 with PBS pH 7.4 and fluorescence intensity was recorded at the maximum emission (\sim 450 nm) upon excitation at 370 nm (Fluoromax-3 spectrofluorometer, Horiba, Kyoto, Japan). A spectrofluorometer, which excitation and emission wavelengths (λ) were calibrated using 5 μ M quinine bisulfate in 0.2 M sulfuric acid, was used. The operating conditions for the evaluation of AGEs were established using a BSA solution (50 μ M) incubated with glucose (0.5 M) for 90 days. The maximum fluorescence intensity of this solution was obtained at λ = 450 nm by excitation with a λ = 370 nm light source. The fluorescence intensity was expressed as arbitrary units (AUF) relative to the control solution. Each measurement was normalized to a protein concentration of 1 mg/ml. The fluorescence intensity was expressed in arbitrary units per milliliter of brain homogenate (AUF/ml).

Activity of superoxide dismutase

Superoxide dismutase (SOD) activity was measured by reduction of water-soluble formazan dye. SOD activity protocol was followed from 19160 SOD determination Kit (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). The rate

of reduction of water-soluble formazan dye is linearly related to xanthine oxidase activity and inhibited by SOD. Therefore, SOD activity can be quantified by measuring the decrease in the color development of the dye at 440 nm. Brain regions were homogenized in ice cold buffer containing 100 mM KH₂PO₄, 1 mM EDTA and 0.1% triton X, pH 7.5. Three blanks were included for the assay: no sample (blank 1), specific sample with no enzyme (blank 2) and no sample and no enzyme (blank 3). Blank 2 acts as a control for non-specific formazan reduction as it does not contain the xanthine oxidase enzyme, for which all formazan reduction will be accounted for the non-specific electron donors. Activity was performed in 96-well microplate. All measurements were performed at 23°C. The SOD activity rate was calculated with the following equation and expressed as inhibition rate percentage.

SOD activity

$$= \frac{(Abs_{blank1} - Abs_{blank3}) - (Abs_{sample} - Abs_{blank2})}{(Abs_{blank1} - Abs_{blank3})} \times 100$$

Statistical analysis

Data were first analyzed by the D'Agostino and Pearson test to select the appropriate statistical tests for the analysis of each group of results. For a normal distribution, one-way analysis of variance ANOVA (parametric test) followed by a *post hoc* Tukey's test was performed. A Kruskal-Wallis analysis (non-parametric tests) of variance and the Mann-Whitney test were used for a non-normal distribution. The Prism version 6.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) was used to calculate probability values. Data were expressed as mean \pm SEM. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Effects of the administration of MQ on memory

Chronic exposure to O₃ decreased the retention latency in both short- (Figure 1a) and long-term memory (Figure 1b) tests. This decrease was statistically significant [$P < 0.0001$] when compared to animals exposed only to air. In contrast, the retention latency in the short- and long-term memory increased in animals exposed to O₃ and treated with 50 and 100 mg/kg of MQ. This increase was also significant [$P < 0.0001$] when compared to animals exposed to O₃ without MQ treatment.

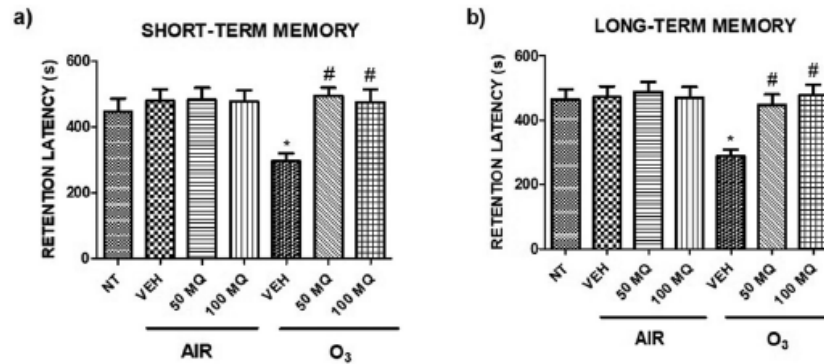


Figure 1. Effect of the administration of 50 and 100 mg/kg of the aqueous extract of MQ on memory. Retention latency (s) of short-(a) and long-term (b) memory in animals exposed to either an air current or 0.25 ppm of O₃. NT: animals neither exposed to air or O₃ nor treated with VEH (water) or MQ ($n = 10$ animals per group). * $P < 0.0001$ compared with NT and VEH; # $P < 0.0001$ compared to O₃.

Effect of the treatment with MQ on 4HNE and Nt3

The administration of both doses (50 and 100 mg/kg) of MQ decreased the lipid peroxidation marker 4HNE levels in the hippocampus of animals exposed to an air current at a significant level [$F(6,35) = 16.14$; $P < 0.01$] when compared with the animals treated with VEH (Figure 2a). In contrast, no changes were observed in the expression of Nt3 in these groups (Figure 2b). Conversely, oxidative stress induced by O₃ exposure significantly increased the levels of decomposition products of peroxides derived from polyunsaturated fatty acids (4HNE) [$F(6,35) = 16.14$; $P < 0.0001$] and levels of protein nitration (Nt3) [$F(6,21) = 39.93$; $P < 0.0001$] when compared to VEH groups (Figure 2a and b), whereas the administration of 50 and 100 mg/kg of MQ in animals exposed to O₃ significantly decreased the levels of 4HNE [$F(6,35) = 16.14$; $P < 0.0001$] and Nt3 [$F(6,21) = 39.33$; $P < 0.0001$] (Figures 2a and b).

In the prefrontal cortex of animals exposed to an air current, the administration of 100 mg/kg of MQ significantly decreased the levels of 4HNE [$F(6,35) = 39.14$; $P < 0.0001$] and of Nt3 [$F(6,18) = 15.61$; $P < 0.01$] when compared with their respective control groups (Figure 3a and b). In contrast, a significant increase in the levels of 4HNE [$F(6,35) = 39.14$; $P < 0.0001$] and Nt3 [$F(6,18) = 15.61$; $P < 0.05$] was observed in animals exposed to O₃ when compared to animals exposed to air. Meanwhile, the administration of 50 and 100 mg/kg of MQ in animals exposed to O₃ significantly decreased the concentration of 4HNE [$F(6,35) = 39.14$; $P < 0.0001$] and Nt3 [$F(6,18) = 15.61$; $P < 0.05$] when compared with animals exposed to O₃ administered with vehicle (Figure 3a and b).

In the amygdala of animals exposed to an air current, the administration of 100 mg/kg of MQ significantly decreased the concentration of 4HNE [$F(6,35) = 23.02$; $P < 0.001$] when compared to the VEH group (Figure

4a). Also, the administration of 50 and 100 mg/kg of MQ significantly decreased Nt3 levels [$F(6,21) = 26.86$; $P < 0.001$] in comparison with its control group (Figure 4b). Furthermore, a significant increase in the content of 4HNE [$F(6,35) = 23.02$; $P < 0.001$] and Nt3 [$F(6,21) = 26.86$; $P < 0.001$] was observed in the amygdala of animals exposed to O₃ when compared with animals exposed to an air current. Conversely, the administration of 50 and 100 mg/kg of MQ in animals exposed to O₃ significantly decreased the content of 4HNE [$F(6,35) = 23.02$; $P < 0.0001$] and Nt3 [$F(6,21) = 26.86$; $P < 0.0001$] (Figure 4a and b).

Effect of the treatment with MQ on the concentration of MDA

In animals exposed to O₃, the concentration of MDA increased significantly in the hippocampus [$F(6,49) = 16.48$; $P < 0.0001$] (Figure 5a), prefrontal cortex [$F(6,49) = 9.45$; $P < 0.0001$] (Figure 5b) and amygdala [$F(6,49) = 17.08$; $P < 0.0001$] (Figure 5c) when compared with animals exposed to an air current. In addition, the treatment with MQ (doses of 50 and 100 mg/kg) in animals exposed to O₃ significantly decreased the concentration of MDA [$P < 0.001$].

Effect of MQ treatment on the activity of SOD

In animals exposed to O₃ and treated with VEH, the enzymatic activity of SOD increased significantly in the hippocampus [$F(6,28) = 9.814$; $P < 0.001$] (Figure 6a), prefrontal cortex [$F(6,28) = 13.07$; $P < 0.0001$] (Figure 6b), and amygdala [$F(6,28) = 10.91$; $P < 0.0001$] (Figure 6c) when compared with animals exposed to air, while the administration of 50 and 100 mg/kg diminished significantly this increase in the hippocampus [$P < 0.0001$],

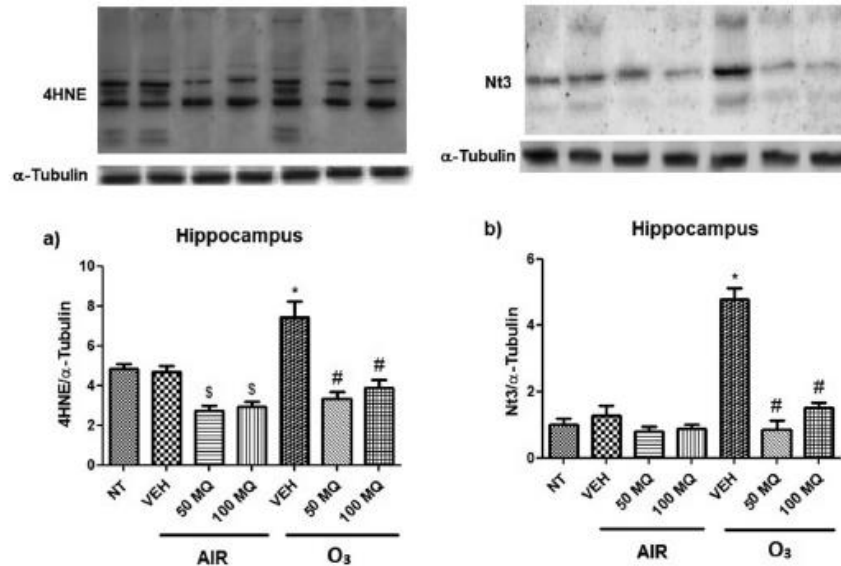


Figure 2. The immunodetection of bands and the densitometric analysis of (a) 4HNE and (b) Nt3 in the hippocampus of the rat. The results are expressed as the mean \pm standard error ($n = 6$). $S P < 0.01$ compared to VEH; $* P < 0.0001$ compared to VEH; $\# P < 0.0001$ compared to O₃.

prefrontal cortex [$P < 0.001$] and amygdala [$P < 0.0001$] when compared with animals exposed to O₃.

Effect of MQ treatment on the AGEs

In the animals exposed to O₃, the concentration of AGEs increased significantly in the hippocampus [$F(6,28) =$

18.15; $P < 0.0001$], prefrontal cortex [$F(6,28) = 18.9$; $P < 0.0001$] and amygdala [$F(6,28) = 3.82$; $P < 0.05$] when compared with animals exposed to an air current (Figure 7a-c). In contrast, the administration of MQ in animals exposed to O₃ significantly decreased the concentration of AGEs in the hippocampus with 50 mg/kg [$P < 0.01$] and 100 mg/kg of MQ [$P < 0.0001$]

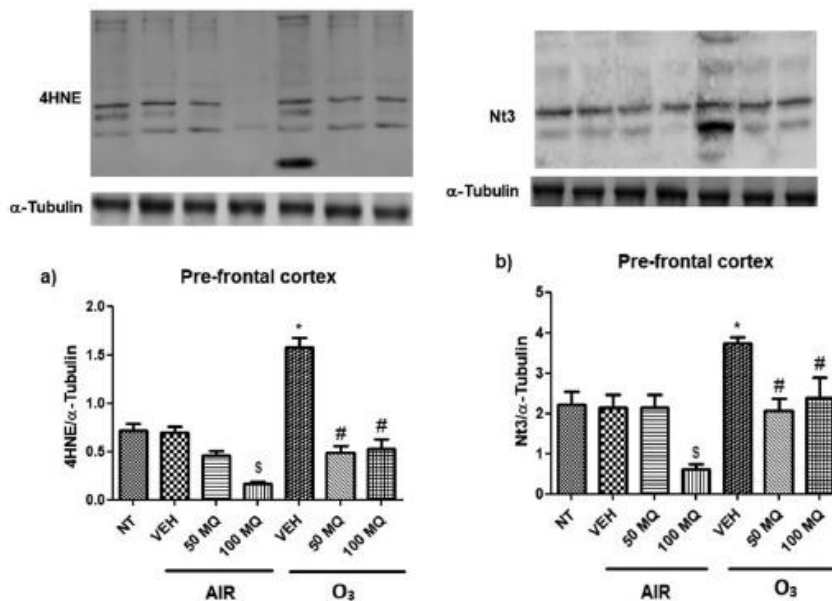


Figure 3. The immunodetection of bands and densitometric analysis of (a) 4HNE and (b) Nt3 in the prefrontal cortex of the rat. The results are expressed as the mean \pm standard error ($n = 6$). $S P < 0.01$ compared to VEH; $* P < 0.05$ compared to VEH; $\# P < 0.05$ compared to O₃.

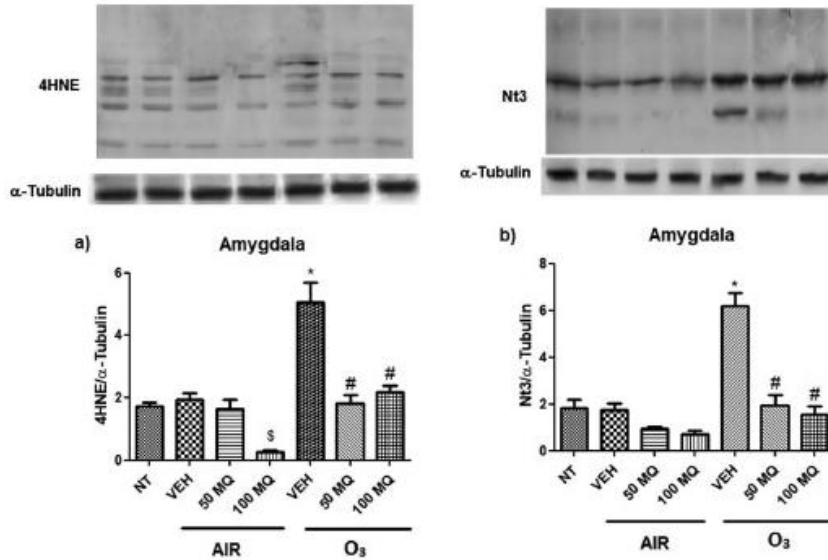


Figure 4. The immunodetection of bands and densitometric analysis of (a) 4HNE and (b) Nt3 in the amygdala of the rat. The results are expressed as the mean ± standard error ($n = 6$). \$ $P < 0.001$ compared to VEH; * $P < 0.001$ compared to VEH; # $P < 0.0001$ compared to O₃.

(Figure 7a), while this effect was similar in the prefrontal cortex with both doses [$P < 0.0001$] (Figure 7b) when compared with animals exposed to O₃. In addition, the decrease in AGEs concentration was significantly higher

in the hippocampus of the O₃ exposed group treated with 100 mg/kg of MQ [$P < 0.05$] (Figure 7a) when compared with animals exposed to O₃ and treated with 50 mg/kg of MQ.

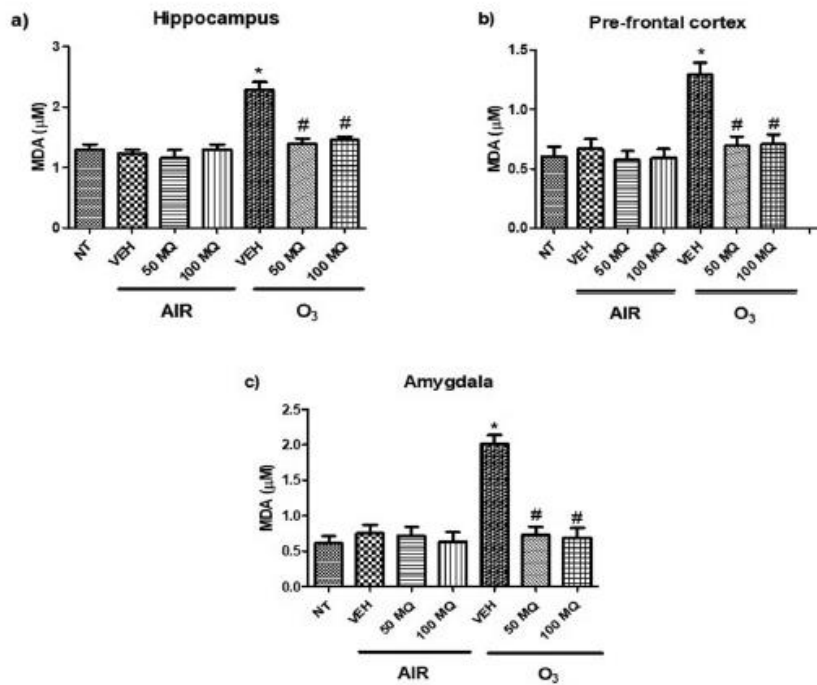


Figure 5. Effect of the aqueous extract of MQ on the concentration of MDA in the hippocampus (a), the prefrontal cortex (b), and the amygdala (c) of rats exposed to an air current or O₃ (0.25 ppm). The results are expressed as the mean ± standard error ($n = 8$). * $P < 0.0001$ compared to VEH; # $P < 0.001$ compared to O₃.

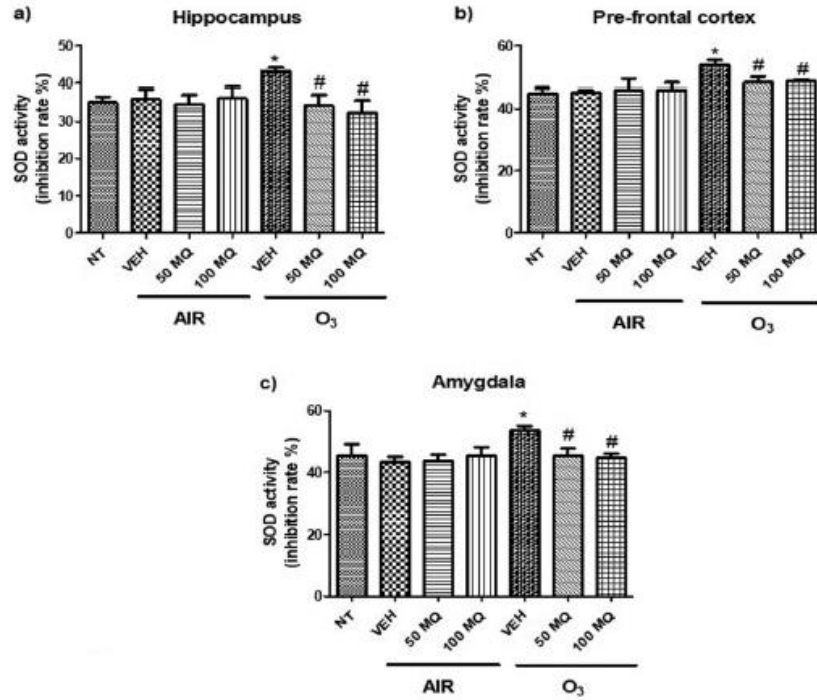


Figure 6. Effect of the aqueous extract of MQ on the concentration of SOD activity in the hippocampus (a), the prefrontal cortex (b), and the amygdala (c) of rats exposed to an air current or O₃ (0.25 ppm). The results are expressed as the mean ± standard error (n = 8). *P < 0.001 compared to VEH; #P < 0.001 compared to O₃.

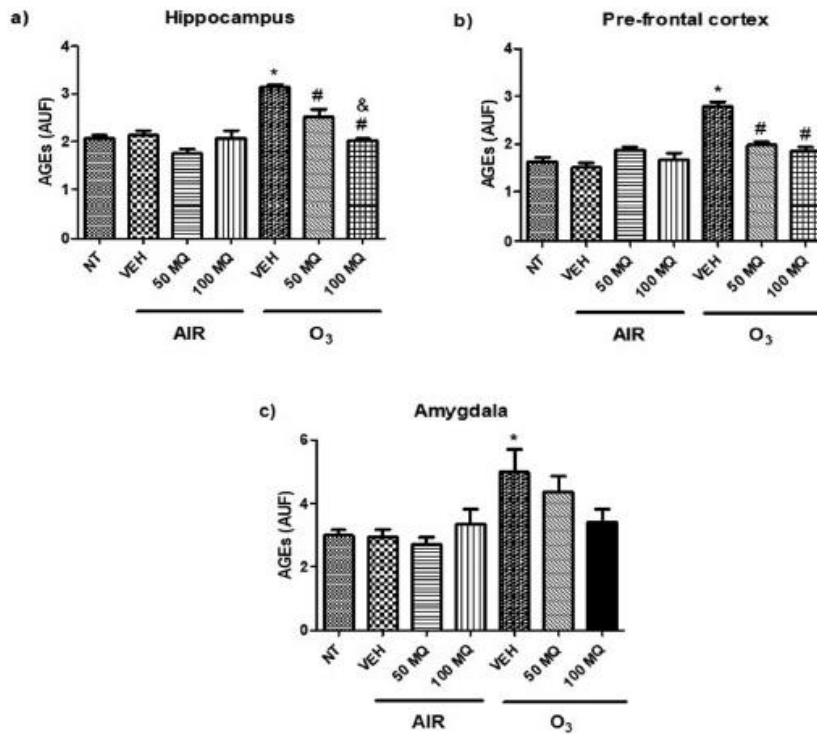


Figure 7. Effect of the aqueous extract of MQ on the concentration of advanced glycation end products (AGEs) in the hippocampus (a), the prefrontal cortex (b), and the amygdala (c) of rats exposed to air or current or O₃ (0.25 ppm). The results are expressed as the mean ± standard error (n = 8). *P < 0.05 compared to VEH; #P < 0.01 compared to O₃; &P < 0.05 compared to O₃ 50 MQ.

Discussion

Memory and learning

In this work, it was observed that the exposure of rats to O₃ (0.25 ppm) for 30 days reduced the retention latency in the short- (10 min) and long-term (24 h) memory tests. These results are consistent with those reported previously in animals exposed to O₃ [2,18,35]. In contrast, animals exposed to O₃ and treated with 50 and 100 mg/kg of the aqueous extract of MQ kept retention latency levels similar to those of their respective control groups.

To the extent of our knowledge, no reports exist on the effects of the MQ in animals exposed to O₃ as a model of oxidative stress. However, it was described that the administration of MQ (lyophilized extract) for 8 weeks in rats improved the spatial memory performance in the Morris water maze. This improvement was correlated with the identification of flavonoids in brain areas related to cognitive processes [1]. In turn, some studies on the beneficial effects of other berries on animal models with cognitive impairment have been reported, in which the deterioration of learning and spatial memory has been prevented [36,37]. Similarly, the effects of berries rich in flavonoids have been assessed on dementia in older adults with mild cognitive impairment. Those individuals who consumed daily doses ranging from 444 ml to 621 ml of grape juice during a period of 16 weeks showed an improvement in episodic memory and verbal learning [38]. These beneficial effects were also observed when blueberry juice was consumed for 12 weeks [39].

Oxidative stress biomarkers

One of the possible mechanisms by which cognitive processes are altered is the oxidative damage on brain plasticity generated by O₃ through the oxidation of different macromolecules, such as lipids and proteins [2,13].

In this paper, oxidative damage generated by O₃ was evaluated through four oxidative stress markers: 4HNE, MDA, Nt3 and AGEs in brain areas involved in learning and memory processes.

An increase in the content of the oxidative stress markers previously mentioned was observed in the hippocampus, prefrontal cortex, and amygdala of animals exposed to O₃ and treated with vehicle. These results are consistent with previous research, in which the chronic exposure to O₃ increased the content of 4HNE, MDA and Nt3 in the hippocampus of rats [2,40].

MDA and 4HNE are considered cytotoxic since they can form adducts with different proteins, promoting

functional changes or the deactivation of enzymes, transporters, and receptors [41]. These modifications could alter the dynamics of the brain, which are indicated by a poor performance in behavioral tests. In support of this idea, a correlation between the increase of lipoperoxidation and protein nitration markers with a decrease in the performance of PAT was observed in the present study.

In the present work, the content of 4HNE, MDA, and Nt3 was assessed in the amygdala of animals exposed to O₃. To the best of our knowledge, this brain structure has not been studied previously in a O₃ exposure model. The amygdala is a limbic structure functionally linked to emotions and motivation, and strongly related to discriminatory behaviors of avoidance by aversive stimuli as well [42]. The increase of oxidative stress markers in this area would explain in part the low performance in the PAT, which depends on emotional memory.

Moreover, this study assessed the content of AGEs in the brain of rats exposed to O₃. In previous studies, AGEs have been associated with alterations in cognitive processes. In rodent models of Alzheimer's disease, the blockade of their specific receptor (RAGE) prevented the cognitive deficits caused by the administration of AGEs at the hippocampal level [43,44]. Furthermore, different exogenous treatments, such as vitamin E and taurine, have been evaluated in animals exposed to O₃, and its antioxidant effects shown by the decrease of lipid peroxidation markers were reported [45,46].

An important decrease in the content of 4HNE, MDA and Nt3 was observed in the hippocampus, prefrontal cortex, and the amygdala, whereas, in relation to AGEs, this decrease was only observed in the hippocampus and prefrontal cortex of animals exposed to O₃ and treated with doses of 50 and 100 mg/kg of MQ. According to our findings, the 50 mg/kg dose of MQ was enough to observe a significant decrease in the content of oxidative stress markers in these areas of the brain. Previously, it was reported that oxidative stress markers levels decreased with 50 mg/kg of MQ. Consistently, our data agreed with these observations as expected. Furthermore, the decrease of oxidative stress markers was maintained up to the 100 mg/kg dose of MQ [47].

Both methanolic and aqueous extracts of MQ showed a significant antioxidant activity in vitro assays such as DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate), FRAP (ferric reducing antioxidant power), and ORAC (oxygen radical absorbance capacity) [31,48]. Consequently, the antioxidant activity of MQ has been related to its high content of flavonoids in comparison with other types of berries [32].

Although the location of flavonoids in the studied areas of the brain was not evaluated in the present study, the findings suggest that the MQ aqueous extract compounds can cross the BBB and exert their antioxidant effects in the brain of rats exposed to O₃.

Effect of the MQ aqueous extract on the activity of SOD

In the present work, a significant increase in SOD activity was observed in animals exposed to O₃ and treated with VEH in comparison to the control groups in different areas of the brain. Previous studies on SOD activity in the O₃ exposure animal model found an increase in the activity of this enzyme in the hippocampus [2,16]. These results suggest that the increased SOD activity is not enough to counteract the oxidizing effects of O₃, which are observed as increased levels of oxidative stress markers and cognitive deficits in this model. However, in this same model, the activity of the glutathione peroxidase enzyme is decreased [16], which could indicate that other enzymes could be more sensitive to oxidative stress generated by O₃.

Moreover, the effects of berries on the model of animals exposed to O₃ and the activity of SOD have not been studied. Conversely, the effects purified flavonoids have been evaluated in animal models of Alzheimer's disease with cognitive impairment [49,50]. For example, in transgenic mice (APP/PS1), the administration of 25 mg/kg of fisetin (flavonol) and 40 mg/kg of apigenin (flavone) showed cognitive improvements in learning and spatial memory, and prevented the decrease in SOD and GPx activity.

Overall, these results indicate that the aqueous extract of maqui berry diminishes the oxidative stress induced by ozone exposure. The greatest effect of the MQ is considered to be due to its flavonoids, which have been described as powerful scavengers of free radicals because of their ability to donate protons and chelate metal ions [51]. However, other key roles in the regulation of oxidative stress such as stimulating the master endogenous antioxidant system of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) cannot be ruled out. It has been reported that some flavonoids such as anthocyanins are able to modulate the Nrf2 pathway. In Ali et al. [52] observed a significant increase in the expression of Nrf2 and heme oxygenase-1 (HO-1) and significantly reduced MDA levels in the hippocampus of transgenic mice (APP/PS1) treated with 12 mg/kg of anthocyanins for 30 days, in comparison with APP/PS1 mice treated with vehicle. These findings suggested that the reduction of lipoperoxidation in the hippocampus is partially regulated by the Nrf2/HO-1 pathway. Moreover, it has been

reported that quercetin, one of the constituents of berries, counteracts the cellular damage induced by oxidative stress by means of the activation of the Nrf2/ARE pathway [53].

Several studies suggest different mechanisms by which foods rich in flavonoids may have beneficial effects: the modulation of signaling pathways, activation of transcription, regulation of gene expression, and protein factors. However, the receptors through which antioxidants are regulating signaling pathways related to antioxidant processes are still unknown, which means further research on this topic should be considered.

The exposure to O₃ increased oxidative stress markers in the studied brain regions, which in turn caused cognitive alterations on short- and long-term memory tests. The present study indicated that these alterations can be prevented by the administration of the aqueous extract of MQ.

Acknowledgments

Christian Guerra-Araiza received Beca de Excelencia en Investigación by Fundación IMSS, A. C. This paper was presented in partial compliance with the requirements for the PhD degree of Iván Bribiesca Cruz at the Doctorate in Biological Sciences Program (Universidad Nacional Autónoma de México). The sponsors had no participation in the design of the study, the obtaining and analysis of results, the decision to publish or the preparation of the manuscript.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

This work was partially funded by the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (MEIC) through the Research Project 'Bebesano' (Grant number AGL2016-75332-C2-1-R) and the Fondo de Investigación en Salud (Project FIS/IMSS/PROT/G17/1664) from the Instituto Mexicano del Seguro Social.

Notes on contributors

Iván Bribiesca-Cruz is a PhD candidate in Biological Sciences (Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico) and completed a B.Sc. in Biology (Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico) and an M.Sc. in Biological Sciences (Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico). Bribiesca-Cruz's research include sex hormones, oxidative stress in neurodegenerative diseases, and natural antioxidants in ozone exposure models.

Diego A. Moreno holds a PhD in Biological Sciences, University of Granada, Spain. He is a scientific researcher in the Phytochemistry and Healthy Foods lab of the Food Science and Technology Department at CEBAS-CSIC – The Spanish National Research Council (2018–present), being a member of the Research Group on Quality, Safety and Bioactivity of Plant Foods (CSIC #641446) since 2005, staff scientist (2008–2018) and postdoctoral associate ('Ramón y Cajal' 2006–2008, and I3P-CSIC 2005–2006). Diego A. Moreno has a previous experience abroad as a postdoctoral associate in the Ilya Raskin's Lab at Rutgers – The State University of New Jersey (New Brunswick, NJ, US) from 2001 to 2004, and background of PhD in Plant Physiology (2000), MSc (1996), and BSc (1994), obtained in the University of Granada (Spain). Current active projects of R&D and innovation on the development of new functional foods and beverages enriched in bioactive phytochemicals to modulate the energy metabolism (inflammation, glucose and lipid metabolism).

Cristina García-Viguera completed a BSc in Pharmacy (Complutense Univ. Madrid), and PhD in Chemistry (Murcia Univ.). Worked in several Institutions: Oxford Univ., Reading Univ, Kew Gardens and IFR, in UK, as well as ATO-DLO (The Netherlands). Currently is a CSIC- Research Professor, at CEBAS-CSIC (Murcia- Spain). Has 164 publications (h = 52), and 4 patents. Research: development of new plant origin foods (fresh and processed), organoleptic and nutritionally improved, through life-enhancing bioactive phytochemicals. Founding Partner of the Spin-off Aquaporins & Ingredients SL. Head of the "Phytochemistry and Healthy Food Lab" and CSIC-UPCT "Quality and Risk Assessment in Food" (Assoc Unit).

Juan Manuel Gallardo is an MD (Universidad Autónoma de Aguascalientes), MSc in Physiology Sciences (Centro de Investigación y Estudios Avanzados –IPN). He currently works at the Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Nefrológicas, Instituto Mexicano del Seguro Social in Mexico. He does research on oxidative stress and inflammation in nephrological and metabolic diseases.


Julia J. Segura-Urbe obtained a BSc in Chemistry (Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico), MSc in Biochemistry (Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico), and is a PhD candidate in Medical Research (Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Mexico City, Mexico). Has 17 publications. Research: Sex hormones and neuroprotection, Alzheimer's disease.


Rodolfo Pinto-Almazán obtained a BSc in Pharmaceutical and Biological Chemistry (Universidad La Salle, Mexico City), an MSc in Pharmacology (Instituto Politécnico Nacional [IPN], Mexico City), a PhD in Biomedical Sciences (Universidad Nacional Autónoma de México [UNAM], Mexico City), and a Postdoctoral Fellow at USC-CONACYT program (Keck University of Medicine, USC/Children's Hospital Los Angeles, CA). Currently, he works as an Associate Professor in Medical Sciences "C" (Hospital Regional de Alta Especialidad de Ixtapaluca, Secretaría de Salud, Ixtapaluca, Mexico). Has 13 publications (143 cites, h = 6), among others. Research: Sex differences on neurological effects of metabolic syndrome. Cognitive effects in children nutrition.


Christian Guerra-Araiza obtained a BSc in Biology (Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City), and a PhD

in Biochemistry (Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City). He continued his research as a postdoc at DGAPA-UNAM program (Instituto Cajal, Madrid, Spain). Currently, he works as Titular Researcher B at the Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Mexico City, Mexico. Has 50 publications. Research: Sex hormones and neuroprotection, Alzheimer disease, neurological effects of pollution and metabolic syndrome.

ORCID

Iván Bribiesca-Cruz  <http://orcid.org/0000-0002-1930-3373>

Juan Manuel Gallardo  <http://orcid.org/0000-0001-8833-4651>

Diego A. Moreno  <http://orcid.org/0000-0002-6547-8764>

Cristina García-Viguera  <http://orcid.org/0000-0002-4751-3917>

Julia J. Segura-Urbe  <http://orcid.org/0000-0002-0676-5667>

Rodolfo Pinto-Almazán  <http://orcid.org/0000-0002-5210-5395>

Christian Guerra-Araiza  <http://orcid.org/0000-0002-7164-4116>

References

- [1] Andres-Lacueva C, Shukitt-Hale B, Galli RL, Jauregui O, Lamuela-Raventos RM, Joseph JA. Anthocyanins in aged blueberry-fed rats are found centrally and may enhance memory. *Nutr Neurosci.* 2005;8:111–20.
- [2] Farfán-García ED, Castillo-Hernández MC, Pinto-Almazán R, Rivas-Arancibia S, Gallardo JM, Guerra-Araiza C. Tibolone prevents oxidation and ameliorates cholinergic deficit induced by ozone exposure in the male rat hippocampus. *Neurochem Res.* 2014;39:1776–86.
- [3] De Vizcaya Ruiz AMG, Del Razo LM. Daño Oxidativo y Enfermedades Crónico-Degenerativas Asociadas a la Contaminación Ambiental. In: Konigsberg Fainstein M, Martínez Moreno M, editors. Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. México, DF: El Manual Moderno; 2008; p. 459–74.
- [4] Loomis DP, Borja-Aburto VH, Bangdiwala SI, Shy CM. Ozone exposure and daily mortality in Mexico City: a time-series analysis. *Res Rep Health Eff Inst.* 1996; (75):1–37.
- [5] Brauer M, Brook JR. Ozone personal exposures and health effects for selected groups residing in the Fraser Valley. *Atmos Environ.* 1997;31:2113–21.
- [6] Brook RD, Brook JR, Urch B, Vincent R, Rajagopalan S, Silverman F. Inhalation of fine particulate air pollution and ozone causes acute arterial vasoconstriction in healthy adults. *Circulation.* 2002;105:1534–6.
- [7] Barraza-Villarreal A, Sunyer J, Hernandez-Cadena L, Escamilla-Núñez MC, Sienna-Monge JJ, Ramírez-Aguilar M, et al. Air pollution, airway inflammation, and lung function in a cohort study of Mexico City schoolchildren. *Environ Health Perspect.* 2008;116:832–8.
- [8] Genc S, Zadeoglulari Z, Fuss S, Genc K. The adverse effects of air pollution on the nervous system. *J Toxicol.* 2012;2012:1–23. Article ID 782462.

- [9] Chen JC, Schwartz J. Neurobehavioral effects of ambient air pollution on cognitive performance in US adults. *Neurotoxicology*. 2009;30:231–9.
- [10] Postlethwait EM, Joad JP, Hyde DM, Schelegle ES, Bric JM, Weir AJ, et al. Three-dimensional mapping of ozone-induced acute cytotoxicity in tracheobronchial airways of isolated perfused rat lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000;22:191–9.
- [11] Pryor WA, Church DF. Aldehydes, hydrogen peroxide, and organic radicals as mediators of ozone toxicity. *Free Radic Biol Med*. 1991;11:41–6.
- [12] Sunil V, Vayas K, Massa C, Gow A, Laskin J, Laskin D. Ozone-induced injury and oxidative stress in bronchiolar epithelium are associated with altered pulmonary mechanics. *Toxicol Sci*. 2013;133:309–19.
- [13] Dorado-Martínez C, Paredes-Carbajal C, Mascher D, Borgonio-Pérez G, Rivas-Arancibia S. Effects of different ozone doses on memory, motor activity and lipid peroxidation levels in rats. *Int J Neurosci*. 2001;108:149–61.
- [14] Gackière F, Saliba L, Baude A, Bosler O, Strube C. Ozone inhalation activates stress-responsive regions of the CNS. *J Neurochem*. 2011;117:961–72.
- [15] Guerra-Araiza C, Álvarez-Mejía AL, Sánchez-Torres S, Farfan-García E, Mondragón-Lozano R, Pinto-Almazán R, et al. Effect of natural exogenous antioxidants on aging and on neurodegenerative diseases. *Free Radic Res*. 2013;47(6-7):451–62.
- [16] Rodríguez-Martínez E, Martínez F, Espinosa-García M, Maldonado P, Rivas-Arancibia S. Mitochondrial dysfunction in the hippocampus of rats caused by chronic oxidative stress. *Neuroscience*. 2013;252:384–95.
- [17] Pereyra-Muñoz N, Rugerío-Vargas C, Angoa-Pérez M, Borgonio-Pérez G, Rivas-Arancibia S. Oxidative damage in substantia nigra and striatum of rats chronically exposed to ozone. *J Chem Neuroanat*. 2006;31:114–23.
- [18] Rivas-Arancibia S, Guevara-Guzmán R, López-Vidal Y, Rodríguez-Martínez E, Zanardo-Gomes M, Angoa-Pérez M, et al. Oxidative stress caused by ozone exposure induces loss of brain repair in the hippocampus of adult rats. *Toxicol Sci*. 2010;113:187–97.
- [19] Ávila-Costa MR, Colín-Barenque L, Fortoul TI, Machado-Salas P, Espinosa-Villanueva J, Rugerío-Vargas C. Memory deterioration in an oxidative stress model and its correlation with cytological changes on rat hippocampus CA1. *Neurosci Lett*. 1999;270:107–9.
- [20] Ávila-Costa MR, Colín-Barenque L, Fortoul TI, Machado-Salas JP, Espinosa-Villanueva J, Rugerío-Vargas C, et al. Motor impairments in an oxidative stress model and its correlation with cytological changes on rat striatum and prefrontal cortex. *Int J Neurosci*. 2001;108(3–4):193–200.
- [21] Zafra-Stone S, Yasmin T, Bagchi M, Chatterjee A, Vinson JA, Bagchi D. Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Mol Nutr Food Res*. 2007;51:675–83.
- [22] Seeram NP. Bioactive polyphenols from foods and dietary supplements: challenges and opportunities. In: Ho CT, Wang M, Sang S, editors. *Herbs: challenges in chemistry and biology*; ACS Symposium Series 925 (Herbs). New York: Oxford University Press; 2006; p. 25–38.
- [23] Seeram NP, Momin RA, Bourquin LD, Nair MG. Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant cyanidin glycosides from cherries and berries. *Phytomedicine*. 2001;8:362–9.
- [24] Seeram NP, Nair MG. Inhibition of lipid peroxidation and structure-activity-related studies of the dietary constituents, anthocyanins, anthocyanidins and catechins. *J Agric Food Chem*. 2002;50:5308–12.
- [25] Miranda-Rottmann S, Aspillaga AA, Perez DD, Vasquez L, Martinez ALF, Leighton F. Juice and phenolic fractions of the berry *Aristotelia chilensis* inhibit LDL oxidation in vitro and protect human endothelial cells against oxidative stress. *J Agric Food Chem*. 2002;50:7542–7.
- [26] Escribano-Bailon MT, Alcalde-Eon C, Munoz O, Rivas-Gonzalo JC, Santos-Buelga C. Anthocyanins in berries of Maqui (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz). *Phytochem Anal*. 2006;17:8–14.
- [27] Céspedes CL, El-Hafidi M, Pavon N, Alarcon J. Antioxidant and cardioprotective activities of phenolic extracts from fruits of Chilean blackberry *Aristotelia chilensis* (Elaeocarpaceae), Maqui. *Food Chem*. 2008;107:820–9.
- [28] Araos JP. *Aristotelia chilensis*: a possible nutraceutical or functional food. *Med Chem*. 2015;5:378–82.
- [29] Fuentealba J, Dibarrart A, Saez-Orellana F, Fuentes-Fuentes MC, Oyanedel CN, Guzmán J, et al. Synaptic silencing and plasma membrane dyshomeostasis induced by amyloid- β peptide are prevented by *Aristotelia chilensis* enriched extract. *J Alzheimers Dis*. 2012;31:879–89.
- [30] Bautista-Orozco L, Girones-Vilaplana A, Gonzalez Trujano E, García-Viguera C, Moreno AD, Diaz Ruiz A, et al. Neuroprotective effect of *Aristotelia Chilensis* (maqui berry) extract and dapsone in a status epilepticus model. Conference: III International Congress food Technology, Quality and safety; 2016; Novi Sad, Serbia.
- [31] Rodríguez K, Ah-Hen KS, Vega-Gálvez A, Vásquez V, Quispe-Fuentes I, Rojas P, et al. Changes in bioactive components and antioxidant capacity of maqui, *Aristotelia chilensis* [Mol] Stuntz, berries during drying. *LWT-Food Science and Technology*. 2016;65:537–42.
- [32] Gironés-Vilaplana A, Baenas N, Villaño D, Speisky H, García-Viguera C, Moreno DA. Evaluation of Latin-American fruits rich in phytochemicals with biological effects. *J Functional Foods*. 2014;7:599–608.
- [33] Mihara H, Uchiyama M. Determination of malondialdehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem*. 1978;1:271–8.
- [34] Münch G, Mayer S, Michaelis J, Hipkiss AR, Riederer P, Müller R, et al. Influence of advanced glycation end-products and AGE-inhibitors on nucleation-dependent polymerization of beta-amyloid peptide. *Biochim Biophys Acta*. 1997;1360:17–29.
- [35] Pinto-Almazán R, Rivas-Arancibia S, Farfán-García ED, Rodríguez-Martínez E, Guerra-Araiza C. Neuroprotective effects of tibolone against oxidative stress induced by ozone exposure. *Rev Neurol*. 2014;58:441–8.
- [36] Casadesus G, Shukitt-Hale B, Stellwagen HM, Zhu X, Lee HG, Smith MA, et al. Modulation of hippocampal plasticity and cognitive behavior by short-term blueberry supplementation in aged rats. *Nutr Neurosci*. 2004;7(5–6):309–16.
- [37] Williams CM, El Mohsen MA, Vauzour D, Rendeiro C, Butler LT, Ellis JA, et al. Blueberry-induced changes in

- spatial working memory correlate with changes in hippocampal CREB phosphorylation and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels. *Free Radic Biol Med.* 2008;45:295–305.
- [38] Krikorian R, Boespflug EL, Fleck DE, Stein AL, Wightman JD, Shidler MD, et al. Concord grape juice supplementation and neurocognitive function in human aging. *J Agric Food Chem.* 2012;60:5736–42.
- [39] Krikorian R, Shidler MD, Nash TA, Kalt W, Vinqvist-Tymchuk MR, Shukitt-Hale B, et al. Blueberry supplementation improves memory in older adults. *J Agric Food Chem.* 2010;58:3996–4000.
- [40] Rivas-Arancibia S, Vazquez-Sandoval R, Gonzalez-Kladiano D, Schneider-Rivas S, Lechuga-Guerrero A. Effects of O₃ exposure in rats on memory and levels of brain and pulmonary superoxide dismutase. *Environ Res.* 1998;76:33–9.
- [41] Lorigados-Pedre L, Gallardo JM, Morales Chacón LM, Vega García A, Flores-Mendoza M, Neri-Gómez T, et al. Oxidative stress in patients with drug resistant partial complex seizure. *Behav Sci (Basel).* 2018;8(6):59 (16 pages). doi: 10.3390/bs8060059.
- [42] Almaguer-Melián W, Bergado-Rosado JA. Interacciones entre el hipocampo y la amígdala en procesos de plasticidad sináptica. Una clave para entender las relaciones entre motivación y memoria. *Rev Neurol.* 2002;35:586–93.
- [43] Deane R, Singh I, Sagare AP, Bell RD, Ross NT, LaRue B, et al. A multimodal RAGE-specific inhibitor reduces amyloid β -mediated brain disorder in a mouse model of Alzheimer disease. *J Clin Invest.* 2012;122:1377–92.
- [44] Hong Y, Shen C, Yin Q, Sun M, Ma Y, Liu X. Effects of RAGE-specific inhibitor FPS-ZM1 on amyloid- β metabolism and AGEs-induced inflammation and oxidative stress in rat hippocampus. *Neurochem Res.* 2016;41:1192–9.
- [45] Guerrero AL, Dorado-Martínez C, Rodríguez A, Pedroza Ríos K, Borgonio-Pérez G, Rivas-Arancibia S. Effects of vitamin E on ozone-induced memory deficits and lipid peroxidation in rats. *Neuroreport.* 1999;10:1689–92.
- [46] Rivas-Arancibia S, Dorado-Martínez C, Borgonio-Pérez G, Hiriart-Urdanivia M, Verdugo-Diaz L, Durán-Vázquez A, et al. Effects of taurine on ozone-induced memory deficits and lipid peroxidation levels in brains of young, mature, and old rats. *Environ Res.* 2000;82:7–17.
- [47] Di Lorenzo A, Sobolev AP, Nabavi SF, Sureda A, Moghaddam AH, Khanjani S, et al. Post-stroke depression: antidepressive effects of a chemically characterized maqui berry extract in a mouse model (*Aristotelia chilensis* (molina) stuntz). *Food Chem Toxicol.* 2019;129:434–43. doi:10.1016/j.fct.2019.04.023.
- [48] Romanucci V, D'Alonzo D, Guaragna A, Di Marino C, Davinelli S, Scapagnini G, et al. Bioactive compounds of *Aristotelia chilensis* Stuntz and their pharmacological effects. *Curr Pharm Biotechnol.* 2016;17:513–23.
- [49] Zhao L, Wang JL, Liu R, Li XX, Li JF, Zhang L. Neuroprotective, anti-amyloidogenic and neurotrophic effects of apigenin in an Alzheimer's disease mouse model. *Molecules.* 2013;18:9949–65.
- [50] Currais A, Prior M, Dargusch R, Armando A, Ehren J, Schubert D, et al. Modulation of p25 and inflammatory pathways by fisetin maintains cognitive function in Alzheimer's disease transgenic mice. *Aging Cell.* 2014;13:379–90.
- [51] Wang TY, Li Q, Bi KS. Bioactive flavonoids in medicinal plants: structure, activity and biological fate. *Asian J Pharm Sci.* 2018;13:12–23.
- [52] Ali T, Kim T, Rehman SU, Khan MS, Amin FU, Khan M, et al. Natural dietary supplementation of anthocyanins via PI3 K/Akt/Nrf2/HO-1 pathways mitigate oxidative stress, neurodegeneration, and memory impairment in a mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol.* 2018;55:6076–93.
- [53] Saw CL, Guo Y, Yang AY, Paredes-Gonzalez X, Ramirez C, Pung D, et al. The berry constituents quercetin, kaempferol, and pterostilbene synergistically attenuate reactive oxygen species: involvement of the Nrf2-ARE signaling pathway. *Food Chem Toxicol.* 2014;72:303–11.