



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

**Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias**

**TITULO**

**Efecto del Consumo de Tortillas de  
Maíz Azul, Sobre las Conductas de  
Ansiedad y Memoria Espacial en  
Ratas Sometidas a Estrés**

**Tesis**

**que para obtener el grado de**

**Maestro en Ciencias en Biosistemática  
y Manejo de Recursos Naturales y  
Agrícolas**

**Presenta**

**Luis Octavio Aguirre López**

**Zapopan, Jalisco**

**Diciembre de 2017**





**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

**Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias**

**TITULO**

**Efecto del Consumo de Tortillas de Maíz Azul,  
Sobre las Conductas de Ansiedad y Memoria  
Espacial en Ratas Sometidas a Estrés**

**Tesis**

**que para obtener el grado de**

**Maestro en Ciencias en Biosistemática y Manejo de  
Recursos Naturales y Agrícolas**

**Presenta**

**NOMBRE ALUMNO**

**Luis Octavio Aguirre López**

**DIRECTOR**

**Dr. Juan Francisco Zamora Natera**

**CODIRECTOR**

**Dr. Jacinto Bañuelos Pineda**

**Zapopan, Jalisco**

**Diciembre de 2017**



# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

## Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias


**Efecto del Consumo de Tortilla de Maíz Azul, Sobre las Conductas de Ansiedad y Memoria Espacial en Ratas Sometidas a Estrés.**

Por


**LUIS OCTAVIO AGUIRRE LÓPEZ**

**Maestría en Ciencias en Biosistemática y Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas**

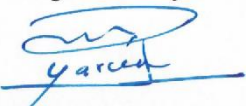
Aprobado por:

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Juan Francisco Zamora Natera**  
Director de Tesis e integrante del jurado


25-Oct-2017  
Fecha

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Jacinto Bañuelos Pineda**  
Coodirector e integrante del jurado


31 OCT 2017  
Fecha

  
\_\_\_\_\_  
**M. en C. Pedro Macedonio García López**  
Asesor del Comité Particular e integrante del jurado

26/10/2017  
Fecha

  
\_\_\_\_\_  
**M. en C. Jesús Angel Andrade Ortega**  
Asesor del Comité Particular e integrante del jurado

25/oct-2017.  
Fecha

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Ramón Rodríguez Macías**  
Sinodal e integrante del jurado

25-oct-2017  
Fecha

## **AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo de tesis fue realizado gracias al apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) al otorgarme el apoyo como becario del programa de Maestría en Ciencias en Biosistemática y Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas (BIMANERA) del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara.

Agradecimientos también, a todas las personas que brindaron el apoyo material, instrumental, tecnológico e intelectual para la realización del proceso experimental y de escritura del presente trabajo. Así mismo, debo agradecer a las compañeras y compañeros voluntarios y/o prestadores de servicio social del laboratorio de Neuromorfología del Departamento de Medicina Veterinaria por el apoyo y ayuda incondicional e invaluable que brindaron durante el proceso de realización del presente documento.

# ÍNDICE

Índice.....	2
RESUMEN .....	1
INTRODUCCIÓN .....	2
ANTECEDENTES .....	4
Antocianinas .....	4
Antocianinas para el mejoramiento de la salud.....	7
Maíces pigmentados como parte de la alimentación.....	9
Antocianinas como parte de los maíces pigmentados .....	11
Maíz y salud.....	13
Estrés en los animales .....	13
Modelo de aislamiento social .....	17
Modelo de restricción.....	20
Laberinto elevado en cruz .....	22
Laberinto abierto de Barnes.....	24
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	27
JUSTIFICACIÓN .....	28
HIPÓTESIS .....	29
OBJETIVO GENERAL.....	30
OBJETIVOS PARTICULARES .....	30
MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
Nixtamalización y elaboración de tortilla.....	31
Extracción y cuantificación de antocianinas.....	32
Preparación de la muestra y extracción .....	32
Cuantificación de antocianinas monoméricas totales.....	32

Modelo experimental y manipulación.....	33
Aislamiento social.....	34
Estrés por restricción.....	34
Evaluación de conductas de ansiedad, capacidad de memoria y aprendizaje.....	35
Laberinto elevado en cruz.....	35
Laberinto abierto de Barnes.....	35
Diseño experimental y Análisis estadístico.....	36
RESULTADOS.....	38
Contenido de antocianinas.....	38
Análisis del peso corporal.....	38
Laberinto elevado en cruz.....	40
Laberinto abierto de Barnes.....	46
DISCUSIÓN.....	53
Contenido de antocianinas.....	53
Pesos corporales.....	53
Laberinto elevado en cruz.....	56
Laberinto abierto de Barnes.....	58
CONCLUSIONES.....	61
BIBLIOGRAFÍA.....	62

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 .....	5
Figura 2 .....	6
Figura 3 .....	7
Figura 4 .....	39
Figura 5 .....	42
Figura 6 .....	43
Figura 7 .....	44
Figura 8 .....	44
Figura 9 .....	45
Figura 10 .....	45
Figura 11 .....	47
Figura 12 .....	48
Figura 13 .....	49
Figura 14 .....	50
Figura 15 .....	51

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1 .....	11
Cuadro 2 .....	38
Cuadro 3 .....	38



## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del consumo de tortilla elaborada con maíz pigmentado sobre los procesos cognitivos de ansiedad, aprendizaje y memoria en un modelo de estrés mixto (crónico-agudo). Para la elaboración de la tortilla se utilizó maíz azul de la raza Mixteco preparado mediante el proceso de nixtamalización. Las antocianinas monoméricas totales se cuantificaron tanto en grano crudo como en la tortilla mediante la técnica de pH diferencial. En el estudio conductual, se utilizaron 48 ratas macho de la cepa Wistar de 22 días de edad distribuidas en tres grupos de 16 animales cada uno; a dos de estos grupos se les generó estrés crónico por aislamiento social al finalizar la semana 10. Al final de la semana 10 del periodo de aislamiento social, los animales fueron expuesto a un segundo periodo de estrés agudo mediante el protocolo de restricción de movimientos. A uno de estos grupos, se le proporcionó una cantidad calculada de tortilla de maíz azul equivalente al consumo diario de 100 mg de antocianinas (TAe) sin restricción del consumo de alimento comercial a libre acceso; al segundo grupo (CTRe) solo se le proporcionó alimento comercial a libre demanda. Al grupo restante de ratas se le mantuvo en condiciones estándar de bioterio y no se le sometió a estrés, conformando el grupo control intacto (CTR). Para valorar las conductas de ansiedad relacionadas al estrés generado, se aplicó la prueba de laberinto elevado en cruz. Así mismo para determinar la capacidad de aprendizaje y memoria espacial se aplicó la prueba de exploración libre en el laberinto de Barnes. Los resultados mostraron que el contenido de antocianina del maíz azul de la raza mixteco fue de 126.94 mE de cianidin-3-glucosida, así mismo se observó que el proceso de nixtamalización reduce este contenido en un 53%. El consumo promedio diario de tortilla de maíz azul fue de 12.9 g, que representó 8.59 mg de antocianinas. Por otro lado, las ratas alimentadas con tortilla de maíz azul mostraron un mayor número de conductas exploratorias y entradas a los brazos abiertos en el laberinto elevado en cruz, lo que evidencia un efecto ansiolítico por el consumo de tortillas pigmentadas. Respecto a la evaluación de la memoria espacial, las ratas del grupo TAe tuvieron un desempeño similar al grupo CTR, mientras que el grupo CTRe registró un mayor tiempo de latencia y tiempo para el encuentro de la caja de escape. Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que el consumo de tortilla azul tuvo un efecto ansiolítico y pudo contribuir a la disminución del deterioro cognitivo generado por el estrés mixto (crónico-agudo) en ratas.

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of the consumption of tortilla made with pigmented maize on the cognitive processes of anxiety, learning and memory in a mixed stress model (chronic-acute). For the elaboration of the tortilla was used purple corn (race mixteco), prepared using the process of nixtamalization. The total monomeric anthocyanins were quantified both in raw grain and in the tortilla by the pH differential method. For the behavioral study 48 male Wistar rats (22 days) was use. Animals were randomly assigned on three groups (16 animals per group). Two grupos were submitted to social isolation model for ten weeks to generate chronic stress, at the end of the last week of isolation to these groups were applied the restraint stress model like acute stres. One of these two groups was provided with blue tortilla equivalent to a consumption daily of 100mg of anthocianyns (TAe), while the other group only was fed with comercial food (CTRe); rats bred in standard condition represented the control group (CTR). To evaluate the anxiety behavior related to stress, the elevated plus maze test was applied; to determine the learning and memory spatial was implemented the Barnes maze. The results showed that the anthocyanins content in Mixteco maize was de 126.94mE of cyanidin-3-glucysid. In addition we observed a loss of 53% in consequence to nixtamalization prosses. The mean daily consumption of blue tortilla was 12.9gr which represented a consumption of 8.59mg of antocyanin. On the other hand the rats fed with blue tortilla showed a higher number of exploratory behavior and entries in the open arms, this support an ansiolitic effect for the consumption of blue tortillas. Regard the evaluation of spatial memory, the rats in the grupo TAe had a similar performance to the CTR group, while the CTRe group show the higher latency time and time for the encounter with the escape box. The results obtained in this study show that the consumption of blue tortillas had an ansiolytic effect and the decrease of cognitive deterioration generated by the mixed stress in rats.

## INTRODUCCIÓN

Numerosos trabajos han caracterizado los efectos adversos del estrés sobre la citoarquitectura y funcionalidad del sistema nervioso, siendo el hipocampo una de las regiones más susceptibles al deterioro, lo que en consecuencia genera la pérdida de procesos cognitivos como el aprendizaje y la memoria. Así mismo, puede generar la pérdida del control de reacción ante situaciones novedosas de exigencia o nuevos estresores (Kim y Diamond, 2002; Conrad, 2008; Groeneweg et al., 2011).

Por otro lado, existen reportes que relacionan la ingesta de sustancias contenidas en alimentos vegetales con la prevención de enfermedades crónico-degenerativas, tal es el caso de los flavonoides particularmente las antocianinas, esto debido a su capacidad antioxidante (Wang y Jiao, 2000; Ramos-Escudero et al., 2012). Así mismo, se ha propuesto que estos efectos pueden prevenir o reducir los síntomas asociados al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Strathearn et al., 2014; Rehman et al., 2017; Shah et al., 2013) así como su posible efecto ansiolítico (Gutierrez et al., 2014).

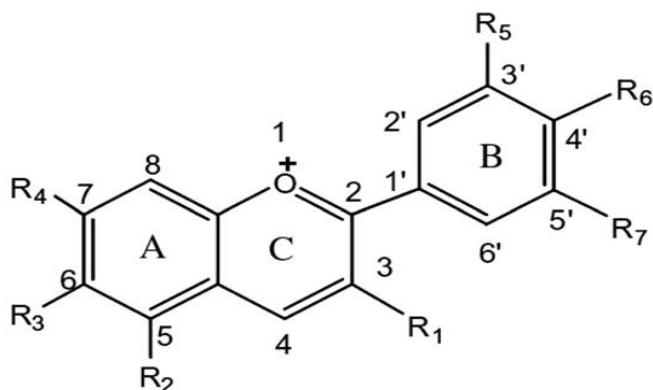
Los granos de maíz pigmentado, además de poseer un alto valor nutricional, contienen una gran cantidad de antocianinas (Salinas et al., 2003; Rochin et al., 2010; Wang y Stoner, 2008; Luciola, 2012; Aburto et al., 2013). Por lo que su consumo regular puede prevenir las complicaciones asociadas a enfermedades degenerativas como diabetes, cáncer y obesidad (Long et al., 2012; Kang et al. 2013; Chaiittianan et al., 2017). Sin embargo, no se cuenta con información que permita sustentar un efecto benéfico de las antocianinas a nivel de sistema nervioso. Por ello, el presente trabajo fue desarrollado con el objetivo de determinar si el consumo de estas sustancias contenidas en la tortilla azul, un subproducto de maíz pigmentado, puede disminuir los efectos adversos relacionados con el desarrollo de conductas de ansiedad y el deterioro de la capacidad de aprendizaje y memoria en ratas jóvenes sometidas a un modelo de estrés mixto (crónico-agudo).

## ANTECEDENTES

### Antocianinas

El término antocianinas (ANTs) se deriva de los vocablos griegos *anthos* (flor) y *kyanos* (que hace alusión al color azul). Las ANTs representan un grupo de pigmentos naturales solubles en agua, ampliamente distribuidos entre las plantas. Son responsables de conferir tonalidades rojas, azules y púrpuras a estructuras como flores, frutas, granos y raíces; funcionalmente participan en la protección contra el daño generado por la radiación, en defensa contra patógenos y/o depredadores, en funciones reproductivas como atrayentes de polinizadores (Strack y Wray, 1993; Vargas et al., 2000; Teresa et al., 2013) y regulando la síntesis de factores de crecimiento como la auxina (Agatia et al., 2012). El almacenamiento de estas moléculas dentro de la planta se da en la solución vacuolar de las células epidermales, mientras que en algunas especies vegetales como en la col morada (o repollo morado) se pueden almacenar en vacuolas celulares denominadas antocianoplastos. Para el caso de algunas ANTs contenidas en flores existen cuerpos coloreados intravasculares llamados vacuolas de inclusión antociánico (AVIs) (Markham et al., 2000). La distribución de las ANTs puede estar determinada por agentes externos, por ejemplo, en el maíz, la luz altera la manera en la que las antocianinas se distribuyen en los compartimientos vacuolares (Small y Peckel, 1982; Irani y Grotewold, 2005; Teresa et al., 2013).

Las ANTs pertenecen a la familia de los flavonoides y, como tal, son compuestos polifenólicos que se caracterizan químicamente por ser glucósidos de antocianidina, es decir están constituidas por una molécula de antocianidina (generalmente conocida como aglicona o chalcona) a la que se le une un azúcar por medio de un enlace  $\beta$ -glucosídico. La estructura química básica de estas agliconas es un derivado polimetoxi y polihidroxi del 2-fenilbenzopirilio o sal flavilio, que consta de dos grupos aromáticos (fig. 1): un anillo benzopirilio (anillo A) y un anillo fenólico (B), separados por un anillo heterocíclico (C); las ANTs son los flavonoides con mayor grado de oxidación al presentar el anillo C completamente insaturado con un hidroxilo (OH) en la posición 3 (Mazza y Miniati 1993; Luciola, 2012).

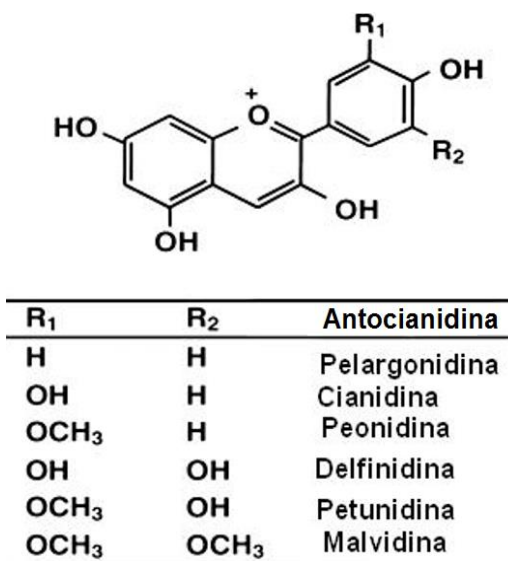


**Figura 1. Estructura química de las antocianinas. Tomado de Pojer (2013).**

En la naturaleza se han reportado 17 tipos de ANTs de las cuales 6 son las más ampliamente distribuidas en las plantas comestibles (fig. 2). La cianidina (cy), delphinidina (dp), petunidina (pt), feonidina (peo), pelargoniina (pl) y malvidina (mv), son los nombres asignados a las ANTs de acuerdo con su procedencia vegetal, de donde se extrajeron por vez primera. Las ANTs no solo pueden presentarse de manera glicosilada, sino que también pueden hallarse aciladas, por la conjugación de algunos ácidos. De hecho, el número y posición de los grupos OH, el nivel de metilación de estos, la naturaleza, número y localización de los fragmentos glicosídicos, así como la naturaleza y número de ácidos alifáticos ó aromáticos unidos al azúcar, determinan las diferencias individuales entre las ANTs (Mazza y Miniati 1993; Strack y Wray, 1993; Pojer et al., 2013).

Los ácidos que se encuentran con mayor frecuencia conjugados con las ANTs son el coumárico, cafeico, ferúlico, p-hidroxi benzonico, malónico, acético, succínico, oxálico y málico. Las fracciones glicosiladas que comúnmente se encuentran en las ANTs son la glucosa y la ramnosa, seguidos de la galactosa, xilosa y la arabinosa, ocasionalmente, la gentobiosa, la rutinosa y la soforosa. Aunque, la combinación de monosacáridos para conformar di o trisacáridos también es frecuente. Entre las formas de antocianidinas glicosiladas, la disposición de azúcares y los sitios de unión más usuales son el 3-OH monóxidos, la más frecuentemente encontrada en plantas comestibles (Fernandesa et al., 2013), 3-HO glucósidos, 3,5-HO diglucósido y 3,7-HO diglucósidos. Sin embargo, la glicosilación en las posiciones 3'-4'- y 5'-(OH) han sido demostradas (Mazza y Miniati 1993; Heim et al., 2002; Teresa et al., 2013). La acetilación puede ocurrir en las posiciones 3'y 5'y menos frecuente en las

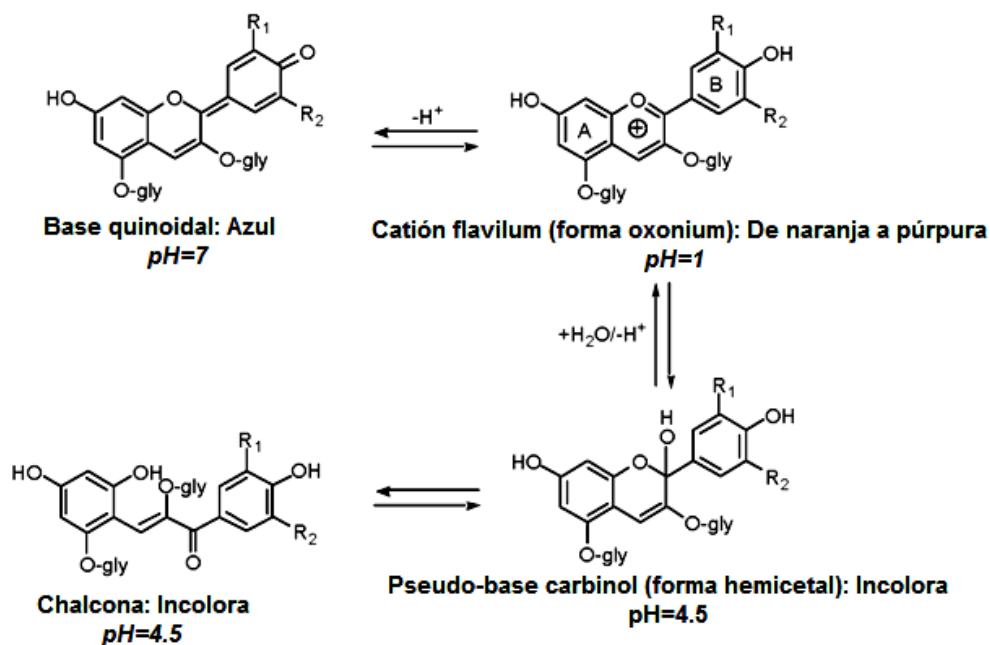
posiciones 5 y 7. Considerando todos estos factores, el número de compuestos antociánicos que se han caracterizado en la naturaleza es de aproximadamente 600 (Lucoli, 2012).



**Figura 2. Clasificación estructural de las seis antocianinas más comunes. Tomado y modificado de Pojer (2013).**

Las ANTs son moléculas altamente reactivas, pero sensibles a la degradación; el oxígeno, temperatura, luz, pH y actividad enzimática, son factores que pueden afectar su conformación química y consecuentemente la estabilidad y su color. La degradación de las ANTs puede ocurrir durante los procesos de extracción, preparación y almacenamiento de los alimentos. En fase acuosa el equilibrio y estabilidad de las ANTs depende mayormente del pH de la solución, lo que puede dar lugar a la formación de cuatro especies moleculares diferentes: catión flavilio, pseudobase carbinol, chalcona y base quinoidal (fig. 3); las cuales están relacionadas directamente con la coloración que presentan las ANTs. Por ejemplo, a pH por debajo de 2 las antocianinas existen predominantemente como catión flavilio, lo cual les confiere coloraciones rojas, mientras que en medios con un pH de 3 a 6, ocurre una competición termodinámica y cinética entre la reacción de hidratación del catión flavilio y la reacción de transferencia del protón liberado del grupo OH de la aglicona. A partir de la reacción de hidratación del catión flavilio, se obtiene una pseudo-base carbinol incolora la cual puede experimentar la apertura del anillo de chalcona; mientras que a partir de la reacción de transferencia se da lugar a la formación de una base quinoidal. Mientras que a pH entre los rangos 6-7 puede ocurrir la desprotonación de la base quinoidal lo que origina coloraciones

que van del azul al violeta incluso, se pueden generar colores marrones si se someten a condiciones de alcalinidad (Brouillard y Dubois, 1977; Brouillard, 1982; Brouillard y Lang, 1990; Fossen et al., 1998; Duen et al., 2006; He et al., 2010).



**Figura 3. Mecanismo general de transformación en las antocianinas en un medio ácido acuoso. Tomado y modificado de Lee, 2005.**

### Antocianinas para el mejoramiento de la salud

Si bien, las antocianinas son de una importancia fundamental para las plantas, estudios epidemiológicos señalan que estas moléculas pueden promover el mantenimiento y mejoramiento de la salud en los consumidores. Diversas investigaciones han atribuido propiedades antiinflamatorias y anticarcinogénicas, así como la capacidad de reducir la incidencia y efectos de enfermedades cardíacas, diabetes y desordenes en las funciones cognitivas.

La capacidad antioxidante de las ANT es dependiente de su estructura química, el número de grupos hidroxilos en la fracción de la chalcona del anillo B, de los patrones de metilación e hidroxilación, de acetilación y glicosilación (Yang et al., 2011). Al respecto, la glicosilación

de las ANTs puede disminuir la capacidad antioxidante en comparación con la aglicona (Wang y Stoner, 2008). Existen dos posibles mecanismos por los cuales las antocianinas ejercen un efecto antioxidante. El primero efecto directo se da a través de la capacidad que tienen estas moléculas para donar electrones de hidrógeno (Wang y Jiao, 2000). El segundo involucra vías indirectas, dependientes del mejoramiento de numerosos mecanismos endógenos, restaurando o incrementando la actividad antioxidante de la enzima superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa (Toufektsian et al., 2008; Ramos-Escudero et al., 2012), así como la activación de genes que codifican de estas enzimas (Shih et al., 2005; Shin et al., 2007).

Una vez ingeridas las ANTs pueden ser absorbidas directamente en el tracto gastro-intestinal (McGhie y Walton, 2007) o pueden ser metabolizadas y transformadas a antocianidinas y ácidos fenólicos por la flora intestinal (Felgines et al., 2005; Jaganath et al., 2006). En este sentido se ha reportado un bajo porcentaje en la absorción de antocianinas en el orden de 0.004% a 0.1% de la ingesta total. Por otra parte, presentan una rápida absorción y excreción alcanzando su nivel máximo en plasma en un tiempo promedio de 1.5 h, mientras que en la orina se pueden encontrar en un tiempo de 2.5 h. Las antocianinas pueden persistir en el organismo pudiéndose encontrar en la orina hasta 24 h después de la ingesta. En la circulación y orina se han aislado de forma intacta antocianinas metiladas, glucoronizadas y/o sulfoconjugadas (Mazza et al., 2002; Manach et al 2005).

Tras su ingesta se ha detectado la acumulación de ANTs en el tracto gastro-intestinal, hígado, riñones, ojos y cerebro (Talavéra et al., 2005; Kalt et al 2008): Al respecto, Milbury y Kalt (2010) han demostrado la capacidad de las ANTs para atravesar la barrera hematoencefálica posiblemente por la modulación de señales de transducción y/o la expresión de genes; aunque también se ha sugerido la afinidad por transportadores celulares en el cerebro (Dreiseitel et al., 2009). Se han identificado ANTs de regiones específicas para el control de funciones cognitivas como el hipocampo, corteza frontal y amígdala (Andres-Lacueva et al., 2005). Frutas con un alto contenido en flavonoides principalmente ANTs han demostrado disminuir el deterioro cognitivo y psicomotor en modelos de envejecimiento (Andres-Lacueva et al., 2005; Shukitt-Hale et al., 2006; Shukitt-Hale et al., 2009; Rehman et al., 2017). En modelos de isquemia cerebral, las ANTs poseen un papel tanto preventivo como de tratamiento, al reducir



la zona de infarto y la pérdida de las capacidades cognitivas (Mina et al., 2011; Di Giacomo et al., 2012). Resultados similares se han obtenido en modelos crónico neurodegenerativos; con extractos ricos en ANTs y pro-antocianinas.

En modelos de la enfermedad de Parkinson las ANTs exhibieron capacidades neuroprotectoras, incluso mayores a otros tipos de polifenoles (Gao et al., 2012; Strathearn et al., 2014); una dieta rica en ANTs puede evitar la amnesia inducida por escopolamina en modelos de Alzheimer (Gutierrez et al., 2014). Más allá de la capacidad antioxidante, se ha propuesto que las ANTs son capaces de regular la neurotransmisión colinérgica y la restauración de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa y  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa (Gutierrez et al., 2014), por otro lado se ha propuesto la inhibición de señales apoptóticas como ASK1-JNK/p38, estimulando la hemoxygenasa, el reclutamiento intracelular de ácido siálico a través de la expresión del gen Neu1 sialidasa (Kim et al., 2012), la inactivación de las proteínas pro-apoptóticas Bax, caspasa-3 y PARP-1; y mediante la activación de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2, a través de la activación de receptores  $\text{GABA}_{\text{B}1}$  (Shah et al., 2013).

### **Maíces pigmentados como parte de la alimentación**

El maíz representa uno de los cereales más importantes en el mundo y junto al arroz y el trigo son la base de la alimentación para la mayoría de los países en desarrollo (Escalante-Aburto et al., 2013). México es el centro de origen, domesticación y diversificación del maíz, existen 59 razas de acuerdo con la clasificación basada en características morfológicas e isoenzimáticas, también se ha reportado una variedad importante de sub-razas y variedades locales, las cuales se pueden clasificar de acuerdo a sus características morfológicas, bioquímicas, citogenéticas y moleculares (Sánchez et al., 2000). Desde el punto de vista alimentario, político, económico y social el maíz representa el producto agronómico más importante en México siendo el cultivo de mayor superficie sembrada. Así mismo, resulta ser un insumo importante para la ganadería y la obtención de subproductos industriales cubriendo poco más de la mitad de la superficie total sembrada, con aproximadamente 7'426,412.19 millones de hectáreas y una producción de 23'273, 256.24 toneladas de grano de maíz (SIAP, 2014).

Por su parte, el consumo per cápita de maíz en México es 10 veces mayor que el de Estados Unidos de América (Serna-Saldívar y Amaya-Guerra, 2008) según cálculos del consejo nacional de evaluación de la política de desarrollo social, el consumo diario de tortilla per cápita es de 155.4 g en las zonas urbanas y 217.9 g en las zonas rurales lo cual representa el 17% y 22% respectivamente, del aporte calórico convirtiéndolo en el insumo con mayor aporte a la nutrición de la población mexicana (CONEVAL 2014).

En este sentido, el maíz forma parte básica de la dieta de los mexicanos, esto en parte por la gran versatilidad de alimentos que es posible elaborar, sin embargo, el consumo del maíz se da principalmente a través de productos nixtamalizados y en forma de tortilla. Para la producción de tortilla usualmente se prefieren los maíces de color blanco o amarillo, no obstante, existen regiones del país donde se utilizan los maíces pigmentados, por otro lado la demanda de este tipo de maíces para elaborar tortilla, se ha venido incrementando, entre otras razones por la palatabilidad encontrada, ya que las cualidades de sabor, textura y consistencia son superiores desde el punto de vista organoléptico (Victores, 2001). En cuanto a la composición química existe algunas diferencias entre las tortillas elaboradas con maíz azul y las elaboradas con maíz blanco (cuadro 1). Entre estas diferencias es de resaltar un mayor contenido proteico en la tortilla elaborada con maíz azul, esta característica más allá de las propiedades nutricionales, también aporta beneficios a las cualidades organolépticas, debido a las interacciones proteína-almidón las cuales pueden reducir la retrogradación del almidón (Hernández, 2008). Relacionándose con la textura suave en las tortillas azules y aún más evitando la pérdida de esta cualidad con el envejecimiento del producto (Hernández, 2008). Estos valores coinciden con los reportados por Salinas et al. (2013) para 10 razas de maíces pigmentados del estado de Oaxaca, México; en donde se registraron valores de entre 10.1 a 10.9% de proteína en base seca. (Mazhar y Chandrashekar, 1995).

Por otro lado, los maíces de coloración azul con endoespermo harinoso poseen mayor valor nutricional con respecto a los granos de coloración amarilla, por el contenido de lisina, el cual es un aminoácido esencial para los humanos, y ha sido registrado en granos pigmentados en cantidades de 2.3 mg/g, en contraste el valor para este aminoácido en granos amarillos es de 1.4 mg/g. Así mismo el proceso de nixtamalización en el maíz para la elaboración de las

tortillas, tiene un efecto benéfico sobre la disponibilidad de lisina, triptófano y algunas vitaminas como la niacina (Miguel et al., 2004).

**Cuadro 1. Composición química de la tortilla blanca (maíz comercial blanco) y la tortilla azul (raza chalqueño cónico). Tomado de Hernández 2008.**

Componente %	Muestra	
	Tortilla azul	Tortilla blanca
Almidón total 2	68.47 ± 0.10	74.90 ± 0.32
Humedad 1	34.74 ± 0.10	38.3 ± 0.34
Proteína 2	9.56 ± 0.13	8.03 ± 0.10
Lípidos 2	4.47 ± 0.07	2.60 ± 0.05
Cenizas 2	1.60 ± 0.02	1.36 ± 0.03

1 = Media de tres réplicas ± error estándar

2 = Media de tres réplicas ± error estándar, base seca

### Antocianinas como parte de los maíces pigmentados

Otro aspecto importante es la coloración en las variedades pigmentadas, siendo los colores más comunes el rojo, azul y negro. Pigmentación conferida por las ANTs que en los granos se almacenan principalmente en la capa de la aleurona (Betrán, 2001), aunque también es posible encontrarlas en el pericarpio o en ambas estructuras (Salinas et al., 1999; Salinas et al. 2003). Aunque, la mayoría de las variedades de maíces pigmentados son capaces de acumular ANTs en diferentes tejidos, esto es regulado por los factores transcripcionales *red1/booster1* y *colorless1/purple plant1*. De hecho, la mayoría de los maíces nativos, líneas puras e híbridos poseen algún tejido pigmentado, por ejemplo, en las raíces de la plántula o las anteras (Sharma et al., 2011; Petroni et al., 2014). En los maíces pigmentados el contenido de ANTs puede evaluarse como bajo, medio y alto, encontrando valores que oscilan entre los 5.9 a 3045 mg equivalentes de cianidina-3-glucosida/100g de muestra. En comparación con los valores reportados en maíces blancos o amarillos (0.9 a 1.2 mg equivalentes de cianidina-3-glucosida/100 g) (Aburto et al., 2013).

Previo a la elaboración de tortillas, el maíz es sometido a un proceso de nixtamalización, el cual consiste en la cocción del grano en agua adicionada con un álcali, generalmente hidróxido

de calcio (cal) y sometido a temperatura ligeramente menor a la ebullición, durante 30-45 minutos, el grado de cocción y la temperatura en este proceso dependerá de la dureza del grano. Este proceso produce cambios que mejoran la calidad de las cualidades del maíz, las temperaturas relativamente altas durante la cocción y el valor del pH ( $\approx 12$ ) facilita la transformación de componentes en el grano como proteínas, lípidos, la degradación del pericarpio y la parcial gelatinización del almidón (Montealvo et al., 2008). Tras la cocción el producto final (nixtamal) es lavado repetidamente con agua corriente para eliminar el exceso de  $\text{Ca(OH)}_2$  contenido en la solución de cocción (najayote) y el pericarpio del grano (Reguera et al., 2000). Posteriormente, el nixtamal es molido para formar una masa, de la cual se forman porciones que son sometidas a presión con una presa manual (tortilladora), para posteriormente cocerlas en una plancha caliente (comal).

Se ha reportado que el proceso de nixtamalización reduce el contenido de ANTs, en parte por las temperaturas utilizadas para este proceso y en mayor medida por el hecho que las ANTs poseen mayor estabilidad en medios ácidos. Sin embargo, las ANTs de tipos acilado son más estables y conservan su color característico a pH alcalino (Fossen et al., 1998). La localización de los pigmentos en el grano determinan su uso potencial, por ejemplo, cuando se presenta una cantidad elevada de antocianinas en el pericarpio y en la región de la aleurona, los maíces resultan ser potenciales fuentes de pigmentos (maíz color rojo intenso); cuando los pigmento se localizan únicamente en la aleurona son adecuados para elaborar productos nixtamalizados (maíz de color morado, azul o negro), estos reportan una pérdida de entre un 19.2% y el 50.2% mientras que, los granos con pigmento en el pericarpio no son adecuados para la nixtamalización ya que, con las condiciones de pH alcalino y temperatura elevada durante el proceso, las ANTs son degradadas entre un 73 y 100% (Salinas 2003; de la Parra et al., 2007; Aburto et al., 2013).

Al parecer los maíces de color morado producen un mayor rendimiento de ANTs al momento de su extracción y tras el proceso de nixtamalización. Se han identificado tres tipos principales de ANTs no aciladas en los maíces pigmentados: Cy-3-glucósido, pl-3-glucósido y peo-3-glucósido (Yang et al., 2009); aunque también se ha identificado cy-3-(6''-malonilglucósido), pl-3-(6''-malonilglucósido), peo-3-(6''-malonilglucósido), cy-3-(6''-etilmalonilglucósido), pl-3-(6''-etilmalonilglucósido) y peo-3-(6''-etilmalonilglucósido) (De pascual et al., 2002). Aoki

et al. (2002) reportaron a la cy-3-O-β-D-glucósido como la principal antocianina en extractos etanólicos obtenidos de maíz morado peruano, también confirmaron la presencia de otras cinco ANTs más: Pl-3-O-β-D-glucósido, peo-3-O-β-D-glucósido, cy-3-O-β-D-(6-malonil-glucósido), pl-3-O-β-D-(6-malonil-glucósido) y peo-3-O-β-D-(6-malonilglucósido). Con lo que concluyeron que los derivados de cianidina constituyen aproximadamente el 70% de las ANTs del grano.

### **Maíz y salud**

La tortilla no solo representa una importante fuente calórica, ya que actualmente ha surgido evidencia que sugiere que este alimento puede disminuir los niveles de triglicéridos y lípidos de baja densidad, así como una disminución del efecto hepatotóxico generado por soluciones con alta concentración en sucrosa (Nabae et al., 2008; Muñoz et al., 2013; Chaiittianan et al 2017). Así mismo, el consumo de maíz disminuye el tamaño y número de tumores intestinales en ratones, estabilizando el pH digestivo (Clarke et al., 2008). También, se ha encontrado que el consumo de maíces pigmentados puede evitar las complicaciones fisiológicas en personas con diabetes. Kang et al. (2013) reportaron que extractos de maíces pigmentados pueden regular la angiogénesis anormal, disminuyendo la incidencia de nefropatía diabética y con ello las complicaciones en el funcionamiento renal. Por otro lado, los extractos de maíces pigmentados también pueden ejercer protección sobre las células β pancreáticas, incrementar la secreción de insulina y activación de proteínas cinasa en el hígado de ratones (Huang et al., 2015). Las ANTs del maíz también pueden ejercer efectos cardio-protectores y actuar como reguladores de la presión arterial (Shindo et al., 2006; Toufektsian et al., 2008). Existen evidencias que relacionan el consumo de maíces pigmentados con la inducción de apoptosis tanto en tumores mamarios como prostáticos. (Fukamachi et al., 2008; Long et al., 2012).

### **Estrés en los animales**

El estrés es una respuesta fisiológica la cual, promueve la supervivencia, ayudando al organismo a responder ante una gran variedad de desafíos, los cuales pudiesen representar o no una amenaza para el individuo. Existen varios mediadores biológicos para esta respuesta, incluyendo neurotransmisores (por ejemplo, noradrenalina y serotonina), péptidos (por

ejemplo, hormona liberadora de corticotropina –CRH- u otros miembros de la familia CRH y vasopresina), hormonas esteroideas (por ejemplo, glucocorticoides, cortisol en humanos, corticoesterona en roedores) y citocinas; los cuales permiten mantener la homeóstasis en el organismo pese a los cambios externos. La liberación de los moderadores de la respuesta al estrés bajo condiciones controladas o por factores de un estilo de vida saludable como la dieta, el sueño y la actividad física permiten promover la adaptación, lo que resulta generalmente benéfico para el individuo (McEwen, 2004; Radley et al., 2015). De hecho se ha relacionado al estrés agudo (situaciones de exigencia que no sobrepasan algunas horas) con un mejoramiento tanto de la respuesta inmune (Dhabhar, 2014) y de las funciones cognitivas, por ejemplo la liberación de CRH en el núcleo central de la amígdala durante estrés agudo, puede mejorar la consolidación de la memoria (Roosendaal et al., 2002; Merali et al., 2004), mientras que la liberación de CRH de las interneuronas hipocampales mejora la potenciación a largo plazo (Blank et al., 2002) y mejora la memoria (Wang et al., 1998). Sin embargo la exposición crónica al estrés (situaciones que pueden durar desde días hasta semanas) se ha asociado con alteraciones en el estado de salud y patologías, una probable causa para esto es la “carga alostática”, que hace referencia al efecto acumulativo o el “costo” generado por la exposición repetida al estrés, perjudicando a múltiples sistemas fisiológico, condición conocida como “diestres” (McEwen y Stellar, 1993; Logan y Barksdale, 2008). La percepción de una situación estresante y la respuesta diferencial de los sistemas reguladores del estrés, están influenciados por experiencias tempranas, factores hereditarios y la ocurrencia previa de la experiencia estresante, así como el desarrollo y aprendizaje de conductas durante las primeras etapas en la vida del individuo (Logan y Barksdale, 2008).

La respuesta al estrés conlleva una serie de eventos tanto fisiológicos como conductuales, regulados por el sistema nervioso central, periférico y endócrino. La activación del eje simpático-adrenal-medular (SAM) y el eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) son cruciales en la regulación de la respuesta neuroendocrina al estrés. La activación del eje HPA culmina con la secreción de glucocorticoides los cuales actúan en múltiples niveles, al ser reconocidos por sus receptores en una gran cantidad de órganos. En el cerebro de mamíferos estos actúan primeramente a través de receptores a glucocorticoides y mineralocorticoides (Joëls y Baram, 2009). La respuesta al estrés inicia con la secreción de la hormona CRH del núcleo paraventricular en el hipotálamo (PVN); la CRH a su vez promueve la secreción en la

pituitaria de la hormona adrenocorticotripón (ACTH), esta es liberada a la circulación general, estimulando la secreción de glucocorticoides en la corteza adrenal. Neuronas liberadoras de CRH, neuronas liberadoras de arginina vasopresina (AVP) del hipotálamo y neuronas del locus coeruleus, principalmente, son los centros de coordinación de la respuesta al estrés. La CRH es el mayor regulador en la respuesta de estrés, pero la AVP, la cual es co-expresada en una tasa del 50% con respecto a la CRH, potencializa la liberación tanto de la CRH como de la ACTH (Brett et al., 1983; Aguilera, 1998; Tsigos y Chrousos, 2002; Tuvnes et al., 2003; Gulati et al., 2015).

Ante un estímulo estresante agudo se produce la liberación de glucocorticoides lo que permite re-direccionar el metabolismo. Por otro lado incrementa la generación de energía vía glucólisis y la actividad del sistema simpático, lo que a su vez aumenta la vasoconstricción, lipólisis y proteólisis, los cuales están mediados por acción de catecolaminas; así mismo se ha descrito que incrementa la expresión de ARNm del factor neurotrófico neuronal (BDNF). Lo que se relaciona con una mejora en las capacidades cognitivas (Herman et al., 2003; McEwen 2004). Hay una interacción mutua entre los principales centros reguladores del estrés y tres grandes áreas de control en el cerebro: La interacción de los sistemas reguladores del estrés con estas zonas de control permite los fenómenos anticipatorios (sistema mesocortical/mesolímbico), iniciación, propagación y finalización de la actividad en los sistemas reguladores del estrés (amígdala/complejo hipocámpal) y ajuste de la sensación al dolor (núcleo arcuato) (Tsigos y Chrousos, 2002). lo que resulta esencial en la plasticidad y el normal funcionamiento neuronal.

La formación hipocámpal tiene la capacidad de inhibir el eje HPA bajo condiciones basales y de estrés agudo. El de daños en esta región incrementa significativamente la expresión de ARNm de CRH en el NPV de ratas, mientras que en monos se genera una hipersecreción de glucocorticoides (Herman et al., 1989; Sapolsky et al., 1991). Sin embargo se especula que este proceso involucra la activación de múltiples vías ya que otros reportes han encontrado una escasa actividad de la formación hipocámpal en la regulación de la secreción de glucocorticoides (Tuvnes et al., 2003). Otras estructuras del sistema límbico están relacionadas con la inhibición de la actividad en la región PVN; daños en la corteza prefrontal o en el septum lateral incrementan los niveles de ACTH y corticoesterona en ratas, mientras que la

inoculación de corticosterona en estas zonas reduce significativamente los niveles de corticoesteroides y ACTH en plasma (Diorio et al., 1993). Por otro lado, no solo el proceso de retroalimentación negativa influye en la regulación de la respuesta al estrés; ya que se ha observado un efecto inhibitorio indirecto de los glucocorticoides, induciendo la secreción de norepinefrina y disminuyendo la síntesis y liberación de catecolaminas en la PVN (Pacak et al., 1995). Al respecto se ha considerado que el circuito inhibitorio límbico actúa de manera específica según el tipo de estrés al cual se ha sometido el organismo, lo que resultaría en una especificidad de las vías límbicas inhibitorias (Herman y Cullinan, 1997).

### **Efecto del estrés crónico sobre el sistema nervioso central**

Los efectos del estrés crónico observados en el sistema nervioso se han asociado con numerosos desordenes tanto conductuales como fisiológicos. Entre estos, se ha sugerido una relación entre el estrés crónico y la incidencia de depresión fisiopatológica, al encontrarse niveles elevados de glucocorticoides y citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-6 en pacientes con depresión, así como en roedores sometidos a estrés crónico (Miller et al., 2009; Sahina et al., 2015). Por otro lado, también se ha sugerido una estrecha relación entre la exposición a condiciones de estrés crónico y el padecimiento de trastornos como esquizofrenia (Walker et al., 2008), enfermedad de Cushings (Whitworth et al., 2000) y la aceleración del deterioro cognitivo observado en la enfermedad de Alzheimer (Tran et al., 2010; Alkadhi y Tran, 2015). Se considera también, que la hipersecreción de glucocorticoides es uno de los mayores factores en la degeneración de los procesos cognitivos durante el envejecimiento (Landfield et al., 1978; Landfield y Eldridge, 1991). En modelos con roedores, el estrés crónico origina déficit de las habilidades cognitivas de aprendizaje y memoria en diferentes pruebas como el laberinto acuático de Morris (Vasconcellos et al, 2003), el laberinto radial (Srikumar et al., 2007) y en el laberinto abierto de Barnes (McLay et al., 1998).

El hipocampo forma parte del sistema límbico y ha recibido una gran atención en las neurociencias por el papel que tiene en las funciones de aprendizaje y memoria, así como las implicaciones con los sistemas de respuesta emocional. Como resultado de diferentes investigaciones se ha considerado que el estrés crónico altera la conformación y estructura hipocampal, los resultados obtenidos en estos estudios han demostrado que el estrés crónico y



niveles elevados de glucocorticoides durante periodos de tiempos prolongados generan una marcada disminución en la neurogénesis y plasticidad neuronal en las regiones del cuerno de amonís 1 (CA1) y el giro dentado (GD) del hipocampo (Joe et al., 2005, Pham et al., 2003), también se ha observado alteraciones en la densidad de espinas dendríticas y la retracción dendrítica, mayormente en la región del cuerno de amonís 3 (CA3) y en menor medida en la neuronas piramidales de CA1 (Sunanda, 1995; Sandi et al., 2003). Estos cambios resultan ser más duraderos (varios días) tras situaciones estresantes, en comparación con los cambios observados tras la aplicación de glucocorticoides de manera exógena, los cuales regresan a sus niveles basales de forma rápida (algunas horas) (Conrad, 2008).

Se han reportado atrofas estructurales en pacientes con desordenes relacionados a depresión o síndrome de estrés post-traumático (McEwen et al., 1997) lo cual se ha evidenciado a través de estudios en modelos experimentales, y se ha reportado la muerte de neuronas piramidales en el hipocampo tras someter a los animales a estrés por inmovilización o por la aplicación directa y prolongada de CRH exógena (Mizoguchi et al., 1992; Arbel et al., 1994). En modelos de neurosis experimental en ratas, inducido por estrés crónico, se ha demostrado la disminución en el número de células de la región CA1, estimando una pérdida del 7.2% con respecto al grupo control. Esto resulta de interés si se toma en cuenta el porcentaje de perdida neuronal reportado en modelos de enfermedad de Alzheimer, el cual oscila entre el 4-9%, observando también la activación de células microgliales. (Tishkina et al., 2009; 2013; Yang et al., 2003).

### **Modelo de aislamiento social**

La crianza en aislamiento es uno de los modelos más utilizados para generar estrés crónico y estudiar el efecto de situaciones estresantes en etapas tempranas del desarrollo (Whitaker-Azmitia et al., 2000). El modelo consiste en mantener en alojamiento individual a ratas o ratones tras el destete (entre los 21 a 28 días de edad) en el caso de ratas. La única manipulación a la que son sometidos éstos animales se limita solo al recambio de cama y limpieza de la caja de alojamiento. Las ratas en aislamiento pueden tener contacto visual, auditivo y olfatorio con otros animales mantenidos bajo las mismas condiciones de alojamiento, pero se evita la interacción social y/o física con sus pares (Fone y Porkess, 2008).

La privación de contacto social en ratas y ratones como experiencia temprana, puede provocar la disfunción del desarrollo en el sistema nervioso, y a largo plazo en alteraciones del comportamiento durante la etapa adulta (Einon y Morgan, 1977). La crianza por aislamiento a partir del día 22 postnatal y durante cuatro semanas disminuye el proceso de neurogénesis en el giro dentado del hipocampo y reduce la potenciación a largo plazo (Lu et al 2003). También se han encontrado modificaciones en las terminales serotoninérgicas de las inervaciones hipocampales (Whitaker-Azmitia et al., 2000). Por otro lado se han podido observar modificaciones en los sistemas dopaminérgicos en diversas regiones encefálicas, al incrementarse los niveles basales de dopamina en la amígdala y disminuir en la corteza infralímbica, así como la reducción en los niveles de serotonina en el núcleo acumbens (Heidbreder et al., 2000). Muchimapura et al. (2002) encontraron en la formación hipocampal dorsal una reducción en la función del sistema serotoninérgico, así como un aumento en la expresión de genes c-fos (los cuales pertenecen a la familia de genes conocida como genes de expresión inmediata en respuesta a estímulos aversivos), durante un evento de estrés en ratas criadas en aislamiento, también se ha documentado la disminución de las conexiones sinápticas en la capa molecular del giro dentado (Varty et al., 1999; Smith et al., 1997).

En las ratas, algunas estructuras como el hipocampo no se encuentran completamente desarrolladas, sino hasta los días 35-40 post natal (Lanier y Issacson, 1977); cerca de un 85% de la células granulares del giro dentado son generadas durante la proliferación neuronal entre los días 20 a 30 post natal (Altman y Das, 1995) e incluso durante la edad adulta (Kaplan y Bell, 1984). Similarmente los niveles de neurotransmisores como noradrenalina, dopamina y serotonina se estabilizan entre los días 30 a 50 post natal (Coyle y Henry, 1973). El retraso con el cual estos factores se desarrollan hace del cerebro vulnerable al efecto de manipulación ambiental o a situaciones de estrés, durante periodos tempranos de desarrollo. Lo anterior podría indicar que las modificaciones en la formación hipocampal seguida a la crianza por aislamiento, pudieran ser cambios compensatorios dependientes de las conexiones glutamatérgicas hipocampales, lo que podría generar una reorganización funcional en las conexiones del sistema límbico en los neonatos (Muchimapura et al., 2002).

La modificación en la conducta de roedores criados en aislamiento, también refleja la disfunción en el desarrollo y consolidación de circuitos neuronales. En este sentido el llamado

síndrome de aislamiento ha sido bien caracterizado por una hiperactividad motora condicionada (Einon y Morgan, 1977; Gentsch et al., 1983; Domeney y Feldon, 1998, Varty et al., 1999) y la respuesta exacerbada ante ambientes novedosos o estímulos estresantes (Heidbreder et al., 2000; Muchimapura et al., 2003). Durante la prueba de laberinto elevado en cruz aplicada en ratones criados en aislamiento se ha observado una mayor preferencia por los brazos abiertos (Gentsch et al., 1982; Hilakivi et al., 1989), sin embargo el aislamiento social puede afectar en mayor forma a las ratas en comparación a los efectos reportados en ratones, ya que estos resultan ser más territoriales (Syme, 1978). En ratas aisladas se ha reportado una mayor preferencia por los ambientes novedosos, en comparación con el grupo control (Einon y Morgan, 1977); aunque otros trabajos solo han reportado este comportamiento bajo condiciones de luz roja (Hall et al., 1997). Entre otras de las conductas observadas en animales aislados; está una mayor agresividad al ser transferidos a un ambiente social (Wongwitdecha y Marsden, 1996), sin embargo la edad a la cual son aislados los animales juega un papel importante ya que la re-socialización en animales aislados después del día 36 postnatal facilita la interacción social, más no así en animales aislados más tempranamente (Wright et al., 1991; Lapis et al., 2003). La disminución de las facultades cognitivas como el aprendizaje y la memoria también ha sido demostrada en ratas bajo restricción social (Lu et al 2003).

La crianza bajo restricción social disminuye la regulación del eje HPA, sin embargo los resultados entre estudios no son concluyentes al respecto, ya que se ha reportado sobreactivación (Gamallo et al., 1986), cambios nulos (Holson et al., 1991) o incluso disminución (Mar-Sánchez et al., 1998) en la vía reguladora del estrés. Al respecto Serra et al. (2005) encontraron que la concentración en los niveles basales de ACTH en plasma disminuyó en animales socialmente restringidos; sin embargo en el grupo aislado la inyección intraventricular de CRF incrementa la concentración plasmática de esta hormona, en comparación al grupo control. Lo que sugiere una sensibilización en la glándula pituitaria a CFR. Por otro lado el incremento de las sub-unidades  $\alpha 4$  y  $\delta$  de los receptores GABA<sub>A</sub>, en el estrato oriens y radiatum de CA1 y CA3, así como en la capa molecular del giro dentado e hilus en el hipocampo de ratas aisladas, se ha asociado con la sensibilidad del eje HPA; también se ha registrado el incremento en los niveles de esteroides neuroactivos como alopregnanona y 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -tetrahydrodeoxycorticosterona (Serra et al., 2007). Weisset et al., (2004) reportaron el incremento en conductas de ansiedad en machos evaluados con la prueba de

laberinto elevado en cruz más no así en hembras; así mismo se observó en los machos la hiperactividad en HPA detectando niveles elevados de la hormona ACTH y corticoesterona, resultados no encontrados en hembras (Peters, et al., 1991).

Por lo anterior es posible considerar que el modelo de aislamiento social puede ser un estresante para los animales de hábitos gregarios, y la reactividad anormal ante estímulos ambientales generados por la crianza en estas condiciones puede ser producto del efecto del estrés prolongado y crónico.

### **Modelo de restricción**

La restricción de los movimientos ha sido ampliamente utilizada como un modelo generador de estrés en los animales, esto debido principalmente a la sencillez de manejo, a la falta de estímulos dolorosos y poca exigencia física para los animales. La limitación de los movimientos en cualquier animal, puede ser un verdadero factor de estrés psicológico desencadenando miedo y ansiedad (Conrad et al., 1999; Gameiro et al., 2006). En comparación con otras metodologías para la inducción de estrés como la administración de drogas, intervenciones quirúrgicas, temperaturas extremas o estimulaciones acústicas, la restricción permite evaluar eficientemente cambios en los niveles de hormonas adrenocorticotróficas, inhibición en la respuesta del eje HPA y expresión de citocinas (Buynitsky y Mostofsky, 2009). Se ha relacionado los cambios tanto psicológicos como fisiológicos durante la restricción debido al diestrés provocado por la aversión natural que provoca la inmovilización, esto más allá de la posible activación de mecanismos de dolor o un irreversible incomodidad (Grandin y Deesing, 2002). El estrés crónico por restricción afecta la morfología y funciones neuronales lo que puede desarrollar un déficit en las capacidades de aprendizaje y memoria relacionadas con la función hipocámpal, entre estas afectaciones se ha reportado la retracción de las dendritas en neuronas piramidales, de la región CA3 del hipocampo tras 21 días de restricción (Watanabe et al., 1992; Kuroda y McEwen, 1998; Conrad et al., 1999), más no así durante 7 o 13 días (Luine et al., 1996). Entre los mecanismos descritos en el proceso de degeneración neuronal debido a la restricción de los movimientos, se encuentran una marcada disminución en la expresión de ARNm para la proteína asociada al crecimiento (GAP-43) (Kuroda y McEwen, 1998). En ratas macho se ha podido detectar una

disminución en la expresión de receptores a glucocorticoides tanto en la región CA1 como en el giro dentado del hipocampo tras la aplicación de estrés por restricción durante 21 días; (Kitraki et al., 2004), así como del control en la secreción de glucocorticoides por retroalimentación negativa (Mizoguchi et al., 2003). Por otro lado también se ha encontrado una menor expresión de BDNF en CA3, y la disminución en la memoria espacial, más no así en la memoria de trabajo (Ortiz et al., 2014). No obstante, al parecer existen mecanismo que permiten normalizar las funciones neuronales tras la exposición a este tipo de estrés; así la aplicación de restricción durante 21 días puede generar la retracción dendrítica en neuronas hipocampales, sin embargo este cambio se ve revertido 21 días tras la aplicación del estímulo (Hoffman et al., 2011), otra observación al respecto es la disminución de BDNF ARNm en ratas sometidas a estrés por restricción crónico y la recuperación de los niveles basales 24 horas tras el evento estresante (Murakami et al., 2005).

Los métodos más comúnmente implementados para la restricción e inmovilización incluyen: A) introducir al sujeto de prueba en un cono rígido de plexiglás. B) La restricción de las extremidades sujetándolas a una tabla mediante almohadillas o bien a una malla de alambre. C) La colocación de un panel de plexiglás en una de las esquenas de la jaula de alojamiento, limitando el espacio en la jaula. D) Colocando a los animales en una caja de restricción. E) Envolviendo al animal en una gaza o toalla permitiendo solo que la cabeza quede libre (Buynitsky y Mostofsky, 2009).

De manera aguda, la restricción de los movimientos puede inducir la expresión de la enzima ciclooxigenasa-2 en corteza e hipocampo, la cual se relaciona con procesos inflamatorios patológicos, lo que podría aumentar el daño oxidativo en el encéfalo (Madrigal et al., 2003; Kumari et al., 2007), la restricción aguda también puede incrementar los niveles del péptido  $\beta$ -amiloide en el fluido intersticial cerebral, lo que se ha relacionado con un incremento en el riesgo de padecer la enfermedad de Alzheimer (Kang et al., 2007), los valores de ACTH encontrados en plasma en modelos agudos de restricción, han resultado ser mayores con respecto a protocolos de estrés sub-crónico y crónico bajo el mismo modelo; lo que también se expreso en un incremento en las conductas de ansiedad (Gameiro et al., 2006). La expresión de BDNF tras la aplicación de restricción por un periodo de 6 horas, resulta en una marcada reducción en la expresión de ARNm con respecto al grupo de ratas sometidas durante 21 días

a este mismo modelo (Murakami et al., 2005). Estas evidencias sugieren que la implementación de restricción en forma aguda, puede modificar los sistemas neuroendocrinos relacionados con el funcionamiento de sistema HPA, si bien este sistema es activado como un mecanismo compensatorio, bajo situaciones que pudiesen comprometer la homeóstasis en el organismo; una constante activación del mismo puede llevar a un colapso en dichos sistemas (McEwen, 2008). Por lo que el estrés agudo por restricción resultaría en un modelo excelente para evaluar la respuesta del sistema HPA en organismos sometidos a un estrés crónico previo.

### **Laberinto elevado en cruz**

El laberinto elevado en cruz (LEC), es quizá, el modelo para evaluar conductas de ansiedad más empleado en la actualidad. La prueba consiste en colocar a la rata ó ratón en un aparato que se eleva por sobre el nivel del suelo; este se compone de dos brazos cerrados perpendiculares a dos brazos abiertos. El LEC se fundamenta en la evaluación de conductas de ansiedad, ante una situación de conflicto generada por estados emocionales opuestos (situación de aproximación-evitación). Por ejemplo, en ambientes novedosos se puede observar el reflejo incondicionado exploratorio; mientras que ante lugares abiertos, luminosos y/o elevados se generan conductas de evitación; condiciones representadas por los brazos abiertos. Inicialmente Montgomery (1955) utilizó una plataforma con forma de “Y” con uno de sus brazos cerrado mientras que los otros dos se mantenían abiertos; observando que las ratas consistentemente permanecían y exploraban en mayor medida el brazo cerrado, la conclusión en este trabajo estableció que tanto el brazo cerrado como los brazos abiertos pueden evocar el mismo impulso exploratorio, la evitación mostrada a los brazos abiertos es debido el miedo natural por los espacios abiertos. La prueba como tal es considerada como una evaluación etológica, al considerar respuestas incondicionadas (Cole y Rodgers, 1994).

El confinamiento en los brazos abiertos puede ocasionar signos fisiológicos asociados al estrés (aumento en la defecación e incremento en la concentración de glucocorticoides en plasma), mientras que la administración de drogas ansiolíticas como las benzodiazepinas incrementa la exploración de estos (Pellow y File, 1986). Sin embargo también se han propuesto otros parámetros como la evaluación de riesgo (postura de estiramiento), conductas de rearing (los roedores asumen una postura vertical, al pararse en sus patas traseras), grooming

(acicalamiento) y dipping (los roedores miran hacia abajo al estar en los brazos abiertos; realizando un movimiento de cabeza estereotipado) categorizando los tipos de comportamientos mostrados durante la prueba en: Ansiedad, locomoción, evaluación de riesgo, toma de decisiones, actividad vertical y exploración (Rodgers et al., 1997; Rogers y Dalvi, 1997; Setem et al., 1999).

La utilización de variables como el número de entradas en los brazos abiertos, en brazos cerrados, el tiempo invertido en cada uno de estos y conductas etológicas como vocalizaciones, micciones, estados de “freezing” y defecación, son tomados como indicadores de ansiedad en los animales de prueba. Es posible categorizar las variables que afectan los valores de base en los factores a analizar en tres componentes: A) Variación del organismo, en este se incluyen la especie, raza, edad y género; en general se ha observado que en ratas, las hembras tienden a mantener mayor tiempo en los brazos abiertos que los machos (Rodgers y Cole, 1994; Huynh et al., 2011; Crawford et al., 2013). B) Variables de procedimiento en las que el tipo de alojamiento, niveles de luz, horario de prueba y tiempo de duración así como evaluaciones previas, manipulación, inducción de estrés previo o experiencias anteriores en el laberinto pueden influir de manera radical en los niveles basales de ansiedad en el LEC; por ejemplo el número de entradas y el tiempo de exploración en los brazos abiertos puede incrementar significativamente cuando la prueba es realizada de las 8 a las 12 horas con respecto a los valores registrados entre 14 y las 17 horas (Griebel et al., 1993); también se ha observado que el número de entradas en los brazos abiertos disminuye con la inducción de estrés de manera crónica, este mismo resultado se observa con la evaluación en el LEC durante la fase oscura del ciclo circadiano (Huynh et al., 2011). C) El tipo de parámetros a evaluar en sí mismo; mientras que el porcentaje de entradas y el tiempo de permanencia en los brazos abiertos constituyen el mayor índice de ansiedad; el número total de ingresos en los brazos puede ser un indicativo directo de la actividad motora (Rodgers et al., 1997; Escarabajala et al., 2003); sin embargo se ha debatido sobre la validación de este parámetro (Harro, 1993; Cruz et al., 1994); aunque también se ha utilizado la distancia total recorrida y el porcentaje de la distancia en los brazos abiertos como indicador de la actividad locomotora (Schmitt et al., 2000; Raynauda et al., 2015). Todos estos parámetros evaluados en el LEC muestran una marcada relación con la actividad de los receptores GABA<sub>A</sub> (Schmitt et al., 2000).

La utilización del LEC presenta múltiples ventajas ya que resulta económico rápido y fácil de diseñar, así mismo goza de validez en tres aspectos: Validez de constructor, lo que hace referencia a la posibilidad de utilizar una variable dependiente observable, como el tiempo de permanencia en los brazos abiertos, para medir un constructo como la ansiedad. Esto ha sido demostrado por la reducción del tiempo permanencia en los brazos abiertos al administrar drogas ansiogénicas, mientras que las drogas ansiolíticas incrementan el tiempo que permanecen los animales en los brazos abiertos (Pellow et al., 1985). Validez predictiva, que se describe como el grado en el cual la variable dependiente predice un comportamiento relacionándose proporcionalmente a la medida del primero. Por ejemplo, los niveles plasmáticos de glucocorticoides se incrementan con la exposición a los brazos abiertos y esto se relaciona de forma positiva con el incremento en la conducta de evaluación de riesgo (posturas de estiramiento) (File et al., 1994; Rodgers et al., 1999). También presenta una validez aparente la cual es la habilidad de la prueba para evaluar lo que en supuesto deberá evaluar; esto es la medición de la ansiedad y el miedo hacia los espacios abiertos en los roedores (Pellow et al., 1985; Walf y Frye, 2007).

### **Laberinto abierto de Barnes**

El laberinto de Barnes (LAB) es una prueba que permite evaluarla adquisición, retención, evocación de la percepción y cognición espacial, así como la acción dirigida para la navegación espacial aloctrica; consiste en una plataforma circular con agujeros dispuesto en la periferia (Barnes, 1979; Wincewicz y Braszko, 2015), en su mayoría los orificios conducen a una caída libre al piso, en tanto que solo, bajo uno de ellos se halla un caja oscura de pequeñas dimensiones denominada “caja de escape”, en la cual el animal puede esconderse (Carter y Shieh, 2010); generalmente se colocan marcadores visuales en la habitación de prueba. En esta prueba los roedores son motivados a localizar la caja de escape debido a la aversión natural por los espacios abiertos y luminosos (condiciones de la plataforma), con la repetición los animales aprenden a utilizar los marcadores espaciales para determinar la ubicación espacial de la caja de escape, la cual se mantiene en la misma posición. Para determinar la capacidad cognitiva, se evalúa el tiempo total de prueba (tiempo de latencia), que corresponde a tiempo que le toma a la rata en encontrar la caja de escape e ingresar en esta, el número de errores ó exploraciones realizadas en orificios que no contienen la caja de



escape y la distancia total recorrida (Barnes, 1979; Popović et al., 2010; O'Leary y Brown, 2013); por otra parte se ha propuesto la categorización de las estrategias de búsqueda, en función de la forma en la que el animales exploran los orificios (Locklear y Kritzer, 2014). Trabajos han demostrado que el análisis de las habilidades cognitivas mediante el LAB ha resultado óptimo en la evaluación de los efectos del envejecimiento (Barnes, 1979; Barrett, et al., 2009), de las hormonas sexuales (Raber et al., 2004; Popović et al., 2010; Locklear y Kritzer, 2014), en la comprobación de los efectos de anestésicos (Zhang et al., 2014; Tan et al., 2014) y del estrés crónico (Mclay et al., 1998; Wielgat et al., 2011; Trofimiuk y Braszko, 2015), resultando particularmente sensible en la detección de deficiencias cognitivas generadas por la exposición a radiación (Raber et al., 2004). Además se ha demostrado una correlación entre el daño en la región hipocampal y la ejecución de la prueba, lo que soporta la naturaleza espacial del LAB (Fox et al., 1998; Paylor et al., 2001; Raber et al., 2004), tanto en memoria a corto como a largo plazo (Pompl et al., 1999).

En su mayoría las pruebas para evaluar la memoria espacial utilizan reforzadores negativos, por ejemplo en el laberinto multi-radial, los animales son privados de alimento y/o agua por un periodo prolongado de tiempo, en el caso del laberinto acuático de Morris (LAM), la prueba representa en sí mismo un potente estresor, y demanda una exigencia física, debido a la exposición al agua, en cambio la utilización de laberintos terrestres, como el LAB en ratas, los niveles de corticoesterona en plasma sanguíneo han sido menores, con respecto a los valores encontrados en ratas sometidos al LAM (Harrison et al., 2009). Esto hace de la prueba de LAB un excelente alternativa para la evaluación de la memoria espacial y de referencia, ya que provoca un menor estrés a los animales, exige una menor demanda física y requiere de un menor número de ensayos, durante menos días, para la obtención de un entrenamiento satisfactorio (Fox et al., 1998; Maegele et al., 2005; Harrison et al., 2009).

Por otro lado una de las posibles desventajas encontradas en el LAB es la libertad con la cual los animales pueden resolver la prueba (Locklear y Kritzer, 2014), en este sentido la falta de un estímulo de mayor aversión y exigencia, como en lo es el caso del LAM o el laberinto radial, puede dar lugar al desarrollo de múltiples estrategias para el afrontamiento de las condiciones dispuestas en el LAB. Sin embargo tanto en el LAM, el laberinto radial o el LAB puede existir la influencia de un gran número de factores no cognitivos como la actividad

exploratoria o conductas de freeze o inmovilidad por ansiedad (Reiserer et al. 2006), por lo que es importante considerar estos factores no cognitivos durante la interpretación de los resultados obtenidos en pruebas de memoria espacial. Sin embargo se ha podido comprobar que en el LAB la ejecución esta mayormente asociada a las habilidades espaciales (Harrison et al., 2006); otra evidencia que sugieren la naturaleza espacial de la prueba se obtiene al remover los marcadores visuales utilizados, lo conduce a un peor desempeño en la prueba (Barnes et al., 1979; Pompl et al.1999). Por último, es posible que ocurra una habituación a las condiciones dispuestas del LAB, por lo que se ha sugerido la adquisición de los respectivos parámetros, solo hasta el primer encuentro con la caja de escape; ya que como lo mencionan Harrison et al., (2006) los valores adquiridos hasta que el roedor entra en la caja de escape, no es la mejor fuente de información sobre el aprendizaje. Estas aseveraciones vienen de las observaciones de Reiserer et al. (2006), donde los ratones se dirigían desde el inicio de la prueba, de manera directa al orificio donde se encontraba la caja de escape, sin ingresar a esta, para posteriormente seguir explorando el aparato.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Recientemente en las sociedades urbanas, los problemas de salud mental asociados con el estrés crónico se han incrementado considerablemente, al punto de convertirse en un problema de salud pública. El estrés crónico está relacionado con la disminución de procesos cognitivos como el aprendizaje y la memoria, así como la disfunción de respuesta ante situaciones novedosas o nuevos estresores (Kim y Diamond, 2002; Conrad, 2008; Groeneweg et al., 2011).

Entre las estrategias para combatir esta problemática esta la utilización de fármacos, sin embargo muchas de estos presentan efectos secundarios nocivos para el consumidor. Por ello se han probado alternativas que eviten el impacto negativo de los medicamentos; tal es el caso de sustancias provenientes de fuentes naturales entre las que se encuentran las antocianinas. Las evidencias actuales han corroborado el efecto benéfico de estas moléculas en neuropatologías, al prevenir o disminuir los efectos fisiológicos de enfermedades crónico-degenerativas (Strathearn et al., 2014; Rehman et al., 2015). Sin embargo el efecto de estas moléculas en modelos de estrés crónico sobre las funciones de aprendizaje y memoria o como posibles agentes ansiolíticos no ha sido corroborado. La presencia de antocianinas contenidas en los granos de maíces pigmentados y en los subproductos elaborados con estos, los hace en una fuente potencial de antocianinas. Por lo que es necesario evaluar el efecto que tiene el consumo de tortillas elaboradas con maíces pigmentados a nivel de sistema nervioso, mediante la valoración de conductas de ansiedad y las funciones cognitivas de memoria y aprendizaje.

## **JUSTIFICACIÓN**

Actualmente existen investigaciones que muestran la presencia de antocianinas en los granos de maíces pigmentados. Al ser el maíz uno de los principales insumos dentro de la dieta en México, representa una fuente importante de ANTs en la alimentación de la población. Por otro lado los beneficios asociados al consumo de estos antioxidantes pudiera contribuir en la prevención y disminución de problemas de salud pública relacionados al estrés crónico, particularmente la pérdida de las capacidades cognitivas como el aprendizaje y memoria, así como la capacidad de afrontamiento ante nuevas situaciones de estrés. Es por ello por lo que en este trabajo se caracterizo el efecto del consumo de tortilla elaborada con maíz azul en un modelo de estrés mixto (crónico-agudo), con la finalidad de determinar un posible efecto ansiolítico y la reducción en la pérdida de capacidades cognitivas como la memoria y el aprendizaje.

## **HIPÓTESIS**

La exposición crónica a una situación estresante sensibilizará la reacción ante un estresor agudo novedoso, en conjunto ambos estresores disminuirán la capacidad de aprendizaje y memoria espacial en ratas jóvenes e incrementará las conductas de ansiedad. Por lo tanto el consumo de tortillas pigmentadas (con alto contenido de ANTs) disminuirá los efectos de estos estresores evidenciado en las conductas de ansiedad, aprendizaje y memoria espacial de los animales.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto del consumo de tortilla elaborada con maíz pigmentado sobre procesos cognitivos como ansiedad, aprendizaje y memoria espacial en un modelo de estrés mixto (crónico-agudo).

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Determinar la cantidad de antocianinas contenidas en los granos de maíz, en el nixtamal y en la tortilla.
- Valorar el efecto del consumo de una dieta con alto contenido de tortillas azul sobre conductas de ansiedad en ratas jóvenes sometidas a estrés crónico y agudo
- Evaluar el efecto de una dieta con alto contenido de tortillas azul sobre el aprendizaje y memoria espacial de ratas jóvenes sometidas a estrés crónico y agudo.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Este estudio se llevó a cabo en los laboratorios de Neuromorfología (Departamento de Medicina Veterinaria) y laboratorio de Biotecnología (Departamento de Botánica y Zoología) del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias.

El maíz azul (raza mixteco, variedad CIIDIR 125) se obtuvo de Chalcatongo, región Mixteca del estado de Oaxaca (proporcionado por el Dr. José Luis Chávez Servia, con sede en el Centro Interdisciplinario de Integración para el Desarrollo Integral Regional. Unidad Oaxaca).

Para el estudio se utilizaron un total de 48 ratas macho de la cepa Wistar de 22 días de edad (100-150gr); distribuidos aleatoriamente en tres grupos de 16 animales cada uno: Grupo control sin estrés (CTR); ratas a las cuales no se les aplicó tratamiento alguno ni se expusieron a ningún tipo de estresor. Grupo control más estrés (CTRe); animales a los que no se le proporcionó ningún tratamiento, pero fueron sometidos a estrés crónico por aislamiento social durante diez semanas más un periodo de siete horas a estrés por restricción al concluir la decima semana de aislamiento. Grupo tortilla azul (TAe); ratas sometidas a estrés, a las cuales se les proporcionó tortilla elaborada de maíz pigmentado y alimento comercial durante nueve semanas consecutivos. Las ratas se mantuvieron en condiciones estándar de bioterio a temperatura controlada de  $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , con ciclos luz oscuridad de 12 horas; permitiéndoles el acceso *ad libitum* de agua y alimento comercial para roedores (pellets Purina Rodent Chow®) durante todo el periodo experimental. Los pesos corporales fueron registrados semanalmente.

### **Nixtamalización y elaboración de tortilla.**

Se estandarizó el proceso de nixtamalización según el protocolo propuesto por Rochin, et al. (2015). Se pesaron 1000gr de granos de maíz pigmentado y posteriormente fueron cocidos durante 31 minutos en una solución alcalina (5.4gr de  $\text{Ca}(\text{OH})_2/\text{L}$  de agua) con una relación 1:3 (w/v) a una temperatura controlada de  $85^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ , seguido de un periodo de 12 horas de reposo. Enseguida el líquido de cocción (najayote) fue drenado y el maíz (nixtamal) lavado con agua corriente. El nixtamal se mantuvo durante 30 minutos a temperatura ambiente y se molió en un molino manual hasta formar una masa cohesiva con la que se formaron porciones

de 20gr a las cuales se les dio una forma esférica de manera manual, y con ayuda de una tortilladora manual se formaron discos de 8cm de diámetro y 2mm de espesor. Estos se cocinaron en una plancha eléctrica a 90°C durante 2 minutos por cada lado (tortillas). Una vez preparadas se deshidrataron a una temperatura de 50°C durante 16 horas.

## **Extracción y cuantificación de antocianinas**

### **Preparación de la muestra y extracción**

La extracción de antocianinas se realizó de acuerdo las recomendaciones propuestas por Yang et al. (2009) con algunas modificaciones. La cuantificación se efectuó en el grano crudo y la tortilla. El proceso de extracción se realizó de la siguiente manera: A un gramo de muestra se le adicionaron 30 ml de etanol ácido pH  $1.0 \pm 0.5$  (etanol 95% - HCl 1.5N; 85:15); la mezcla se homogenizó por sonicación (ultrasonificador Branson 2510 -42KHZ  $\pm 6\%$ -) durante 15 minutos. Una vez concluido este proceso, la mezcla fue incubada durante 80 minutos a una temperatura de 70°C; al terminar la muestra se mantuvo en reposo 40 minutos a temperatura ambiente, evitando la incidencia de luz sobre la misma. Inmediatamente después la mezcla fue filtrada, recuperando el sobrenadante y el precipitado. El proceso de filtración se realizó en condiciones de vacío, utilizando papel filtro Whatman #1 (90nm). El precipitado colectado se sometió a una segunda extracción según las condiciones anteriormente descritas.

### **Cuantificación de antocianinas monoméricas totales**

La determinación de antocianinas se realizó siguiendo el método diferencial de pH (Lee, 2005). Una vez obtenida los dos sobrenadantes (solución madre) de las extracciones previas, se prepararon dos diluciones de cada una de ellas. La primera se realizó utilizando una solución amortiguadora de cloruro de potasio pH  $1 \pm 0.5$ , la segunda fue preparada mediante una solución amortiguadora de acetato de sodio pH  $4.5 \pm 0.5$ . El factor de dilución para la primera extracción de la muestra fue 1:20, mientras que para la segunda extracción 1:10. Ambas diluciones una vez preparadas fueron centrifugadas a 9500rpm durante 18 minutos a una temperatura de 4 °C. Las absorbancias de ambas soluciones se midieron a 520 y 700nm en



un espectrofotómetro Jenway. La concentración de antocianinas monoméricas totales fue calculada con la siguiente ecuación:

$$TAC \left( \frac{mg}{100g} \right) = \frac{Ab}{eL} \times MW \times D \frac{V}{G} \times 100 \quad [1]$$

Donde:

TAC= antocianinas monoméricas totales (miliequivalentes de cy-3-glu/100gr de muestra).

Ab= pH1 (absorbancia 520nm – absorbancia 700nm) – pH4.5 (absorbancia 520–absorbancia 700).

e= absortividad molar de cy-3-glu (26,900).

MW= Peso molecular de cy-3-glu (449.2 g/mol).

L= 1 (longitud de trayectoria en cm).

D= factor de dilución.

V= volumen final de la solución.

G= peso de la muestra.

100= factor de conversión.

### **Modelo experimental y manipulación**

La ración de tortilla en el grupo TAe, se calculó en base a un consumo diario de 100mg de antocianinas/kg de peso. Esta se proporcionó por un periodo de 9 semanas, que cubrió desde la segunda semana de aislamiento, hasta un día previo a la aplicación de la prueba de LAC. La manera en la que se proporcionó la tortilla se describe a continuación: En un horario de 9am a cada rata del grupo TAe se le proporcionó la porción calculada de tortilla, esto sin retirar el alimento comercial. Pasadas 24h se colectó el sobrante. El consumo de tortilla se calculó por diferencia, la ración calculada de tortilla ofrecida (gr) menos la ración recolectada 24h después (gr).

## **Aislamiento social**

Todo el proceso experimental se llevó a cabo según las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio (Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999). Los animales seleccionados de manera aleatoria en los grupos CTRe y TAe fueron separados de la madre el día 22 post-nacimiento y mantenidos en aislamiento (1 rata/caja), mientras que las ratas seleccionadas aleatoriamente en el grupo CTR se mantuvieron en grupos (3-4 ratas/caja). Todos los animales permanecieron en cajas de acrílico de base sólida con cama de aserrín. Las ratas alojadas de manera aislada solo fueron manipuladas una vez por semana, con el propósito de limpieza y recambio de la caja de alojamiento, mientras que los animales mantenidos en grupo CTR se manipularon dos veces por semana para este mismo propósito. Tanto las ratas en los grupos TAe y CTRe permanecieron en la misma habitación junto al grupo CTR; lo que les permitió tener contacto auditivo y olfativo, más no así visual y físico. El aislamiento comprendió un periodo de 10 semanas.

## **Estrés por restricción**

La exposición repetida al mismo estresor puede resultar en la reducción de algunas respuestas fisiológicas para ese estímulo particular (Campmany et al., 1996). Por ejemplo la ingesta de alimento, así como la ganancia de peso pueden retornar gradualmente a la normalidad (Armario et al., 1988) y tanto los sistemas medulo-adrenal y HPA pueden reducir parcialmente su activación ante el mismo estímulo de estrés (Kawahara et al., 1993; Armario et al., 1988; Armario et al., 1984). Es por ello que en este trabajo se sometió a los animales, incluidos en los grupos MAe y CTRe, a un estrés agudo e intenso. Para lo cual los animales fueron inmovilizados en una cámara cilíndrica acrílica (6cm de diámetro x 25cm de largo). La inmovilización se llevó a cabo al finalizar la semana diez de aislamiento por un periodo de 7 horas (10:00h-17:00h). Una vez finalizado este periodo de tiempo, las ratas fueron devueltas a su caja de alojamiento (manteniendo la individualidad). Veinticuatro horas después de haber iniciado la restricción, iniciaron las diferentes pruebas conductuales.

## **Evaluación de conductas de ansiedad, capacidad de memoria y aprendizaje**

### **Laberinto elevado en cruz**

Veinticuatro horas después de haber sido sometidas al estrés por restricción, todas las ratas fueron evaluadas mediante una prueba única en el LEC. El aparato fabricado en metal recubierto con pintura blanca, consiste en dos brazos abiertos (100cm X 15cm), perpendiculares a dos brazos cerrados (100cm X 15cm X 50cm), elevados 100cm del suelo. Las ratas se evaluaron de manera individual como se describe a continuación: la rata era posicionada al centro del LEC, a partir de este punto se le permitió la exploración sin restricciones de todo el aparato durante 5 minutos, al finalizar las ratas se regresaron a su caja de alojamiento. Entre cada prueba, el LEC se limpió cuidadosamente con etanol al 70%, para remover todas las posibles señales químicas. Todas las pruebas se realizaron entre las 9 y las 16h en una habitación distinta y contigua a la del alojamiento. Todas las pruebas fueron video-grabadas para su posterior análisis. Para poder determinar el grado de ansiedad en los individuos se registraron y compararon los siguientes parámetros: número de entradas (entrada= la rata coloca sus cuatro patas dentro de cualquier sector del LEC), número de entradas en los brazos abiertos y cerrados, tiempo de permanencia en brazos abiertos, cerrados y el centro de LEC, tiempo de inmovilidad. Así mismo, se cuantificaron medidas etológicas como: número de conductas de dipping (movimiento estereotipado de cabeza dentro del brazo abierto, en el cual el animal explora el piso por debajo del laberinto), número de conductas de rearing (exploración vertical, en la cual el animal se levanta sobre sus patas traseras para olfatear la periferia) y posturas de estiramiento (medida de exploración y evaluación de riesgo).

### **Laberinto abierto de Barnes**

Setenta y dos horas después de haber realizado la prueba en el LEC, los animales fueron sometidos al LAB, para evaluar las capacidades de aprendizaje y memoria espacial. Nuestro LAB es una plataforma metálica circular de color negro con 120cm de diámetro, en su periferia se distribuyen 20 orificios de 5cm de diámetro y espaciados entre sí por 8.5cm; la plataforma se eleva del suelo 91cm. Debajo de una de los orificios se colocó la “caja de

escape” elaborada con material acrílico negro (11cm x 11cm x 40cm). Durante el primer día de pruebas las ratas fueron habituadas, para ello previo a el primer ensayo se colocaron de manera individual en el centro del laberinto durante 10 segundos, dentro de un cilindro plástico denominado tubo de inicio (15cm de diámetros por 30cm de alto); una vez transcurrido este periodo de tiempo se condujo a la rata cuidadosamente hacia la caja de escape, donde era mantenida por 1 minuto. Ya concluido se transportaban nuevamente a su caja de alojamiento. Una vez habituados todos los individuos, se realizó el primer ensayo. En el centro de laberinto se posicionó a la rata dentro del cilindro de inicio con el fin de aleatorizar la posición inicial, una vez transcurridos 10 segundos este fue retirado. Durante 3 minutos se le permitió la libre exploraron de la plataforma, si al concluir este lapso de tiempo no encontraba la caja de escape, se les guiaba cuidadosamente hasta ella, una vez que la rata localizaba la caja de escape o se les guiaba a ella, se mantenían dentro durante 1 minuto. Las ratas eran regresadas a su caja de alojamiento al concluir la prueba. El paradigma del LAB consistió en dos pruebas por día durante 4 días; el periodo entre pruebas para cada rata fue de 45 minutos. Con la finalidad de evaluar la capacidad para retener la información espacial a largo plazo, se realizó una prueba 72 horas después del día 4 de pruebas. Entre cada prueba el laberinto, la caja de inicio y la caja de escape fueron limpiados cuidadosamente con etanol al 70%, para evitar la posible influencia de señales aromáticas. Todas las pruebas se video-grabaron con una cámara digital para su posterior análisis. Para analizar los diferentes parámetros se utilizó el software Kinovea. Setup.0.8.15. En cada prueba se evaluaron: número de errores (se consideracomo error cuando la rata introdujo su nariz dentro de un orificio que no contenía a la caja de escape); tiempo de latencia, distancia total recorrida, tiempo de latencia para la primera exploración y tiempo de latencia al primer encuentro con la caja de escape.

### **Diseño experimental y Análisis estadístico**

El diseño experimental fue un modelo completamente aleatorio. Para determinar diferencias entre los grupos en el LEC, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía. Para el análisis de los valores obtenidos en el LAB se utilizó el ANOVA de un vía con medidas repetidas. La comparación de los pesos corporales se realizó utilizando un ANOVA de dos

vías. De encontrar diferencias significativas, se utilizó la prueba de Scheffe como análisis post hoc.

## RESULTADOS

### Contenido de antocianinas.

El contenido de antocianinas en el grano y la tortilla son reportados en el cuadro 2, el análisis de la concentración ANTs tanto en grano crudo como la tortilla deshidratada, nos permitió calcular una pérdida del 53.4% debido al proceso de nixtamalización.

**Cuadro 2. Concentración de antocianinas en grano y tortilla de maíz azul de la raza mixteco (CIDIIR 125), registrado mediante el método de pH diferencial**

Muestra	Grano	Tortilla base húmeda	Tortilla base seca
Concentración de antocianinas mg/100gr de muestra*	126.94 ± 0.92	35.23 ± 1.76	67.80 ± 0.92

Las concentraciones se presentan como el promedio ± E.E (n=5)

\*Se reporta como miliequivalentes de cy-3-glu

Por otra parte la ingesta promedio diaria de antocianinas durante el periodo experimental fue de 8.54mg (cuadro 3)

**Cuadro 3. Relación entre consumo promedio diario de tortilla y antocianinas durante el periodo de prueba**

Tortilla consumida	12.97 ± 0.44g*
Consumo de antocianinas calculado	8.59 mg

\*Se reporta el consumo promedio de tortilla deshidratada ± E.E durante 10 semanas

### Análisis del peso corporal

El análisis corporal (ANOVA de dos vías) mostró diferencia entre grupos (F[2]=42.089, p<0.001) y entre las semanas de prueba (F[8]=98.202, p<0.001), sin embargo, no se reportó interacción entre ambas variables (F[16]=0.936, p>0.05).

El grupo TAe registró el menor peso durante las semanas 3, 5 y 6 ( $p < 0.001$ ) con respecto a los grupos CTR y CTRe. Es de resaltar que para la semana 9 la diferencia entre pesos solo se registró entre los grupos CTRe y TAe ( $p < 0.05$ ). No se registraron diferencias entre los grupos CTRe y CTR durante las semanas de tratamiento (fig. 4a).

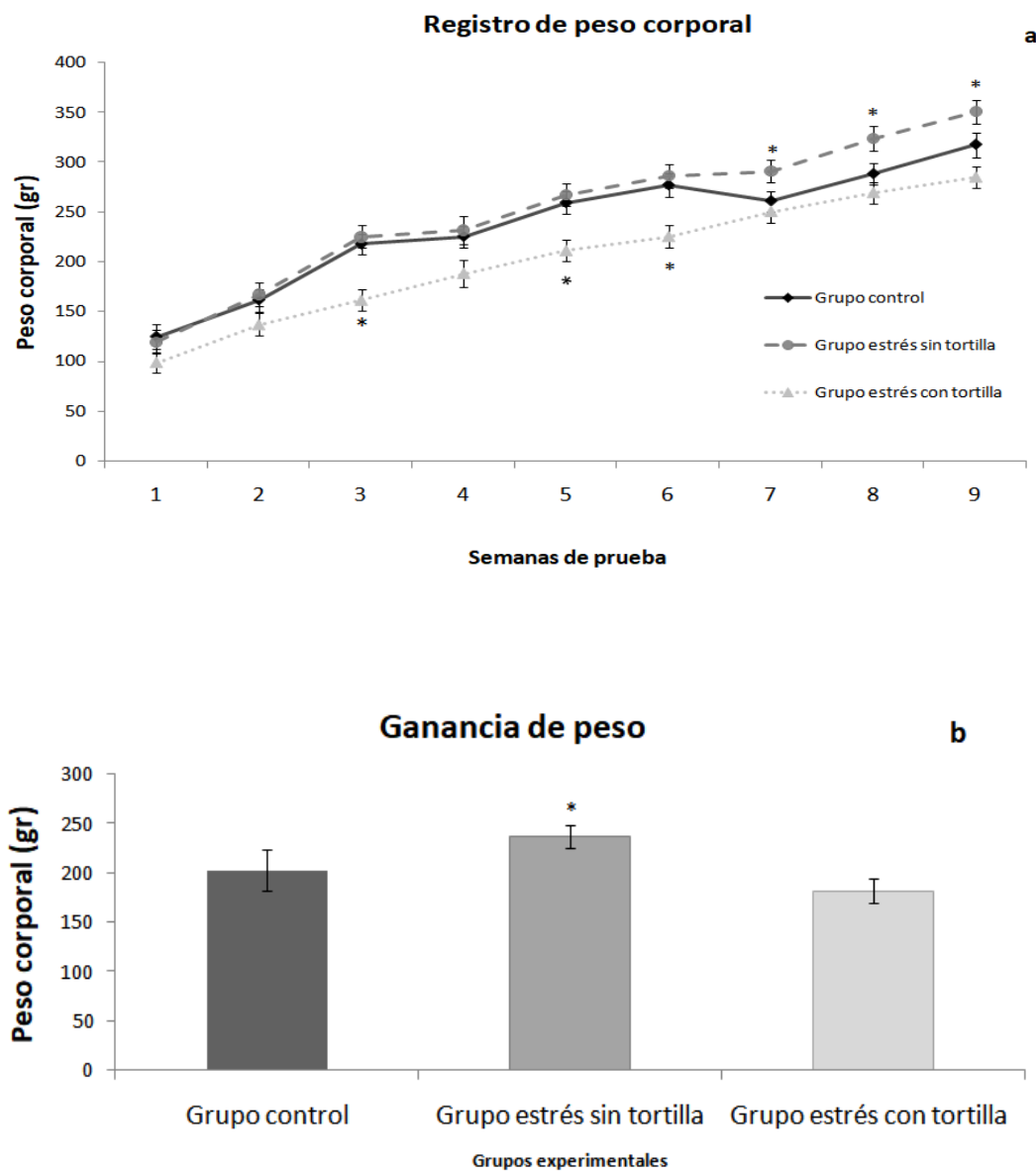


Figura 4. Se muestran el registro de peso corporal durante las semanas de tratamiento (a) y la comparación entre la ganancia de peso promedio en los grupos experimentales (b). Los datos se reportan como la media  $\pm$  E.E.  $*=p < 0.05$ .

El registro de peso corporal expresado como ganancia de peso neto durante el experimento mostró diferencias entre los grupos ( $F[2]=3.514$ ,  $p<0.05$ ). El grupo CTRe registró mayor ganancia de peso corporal, sin embargo al compararlo con el grupo CTR no se registraron diferencias significativas, más no así al compararla con el grupo TAe ( $p<0.05$ ) (fig. 4b).

### **Laberinto elevado en cruz**

El análisis del número total de entradas a los brazos abiertos mostró diferencias entre grupos ( $F[2]=5.486$ ,  $p<0.05$ ). Mediante la prueba de Scheffé se observó que el grupo TAe realizó un mayor número de ingresos a los brazos abiertos con respecto al grupo CTR ( $p<0.05$ ) y CTRe ( $p<0.05$ ) (fig. 5a); mientras que el grupo CTRe mostró menor número de entradas a los brazos abiertos, aunque este resultado no fue significativo respecto al grupo CTR ( $p>0.05$ ). De lo anterior fue posible detectar diferencia significativa en el tiempo de permanencia en los brazos abiertos ( $F[2]=4.222$ ,  $p<0.05$ ); donde el grupo TAe mantuvo mayor tiempo permanencia con respecto al grupo CTR, aunque no se registro diferencias significativas ( $p>0.05$ ); por otro lado el grupo CTRe registro una disminución del tiempo en brazos abiertos al compararlo con el CTR, más no se encontraron diferencias significativas ( $p>0.05$ ). Al comparar los grupos TAe y CTRe sí fue posible detectar significancia ( $p<0.05$ ) (fig. 6a). Con respecto al número de entradas en los brazos cerrados, no se detectaron diferencias entre los grupos ( $F[2]=1.683$ ,  $p>0.05$ ) (fig. 5b). Sin embargo, al evaluar el tiempo en estos brazos, fue posible observar diferencias significativas entre grupos ( $F[2]=4.153$ ,  $p<0.05$ ), el menor tiempo de permanencia registrado fue en el grupo TAe, solo con diferencia significativa respecto al grupo CTRe ( $p>0.05$ ) (fig. 6b). Como consecuencia de lo anterior, el conteo de entradas totales resulto en una diferencia entre grupos ( $F[2]=5.504$ ,  $p<0.05$ ), donde el grupo TAe realizó un mayor número de entradas con respecto al grupo CTR. El grupo CTRe presento una disminución en este paramento al compararlo al grupo CTR, pero sin registrar diferencia ( $p>0.05$ ); al comparar los grupos TAe y CTRe fue posible detectar diferencia significativa ( $p<0.05$ ) (fig. 5c).

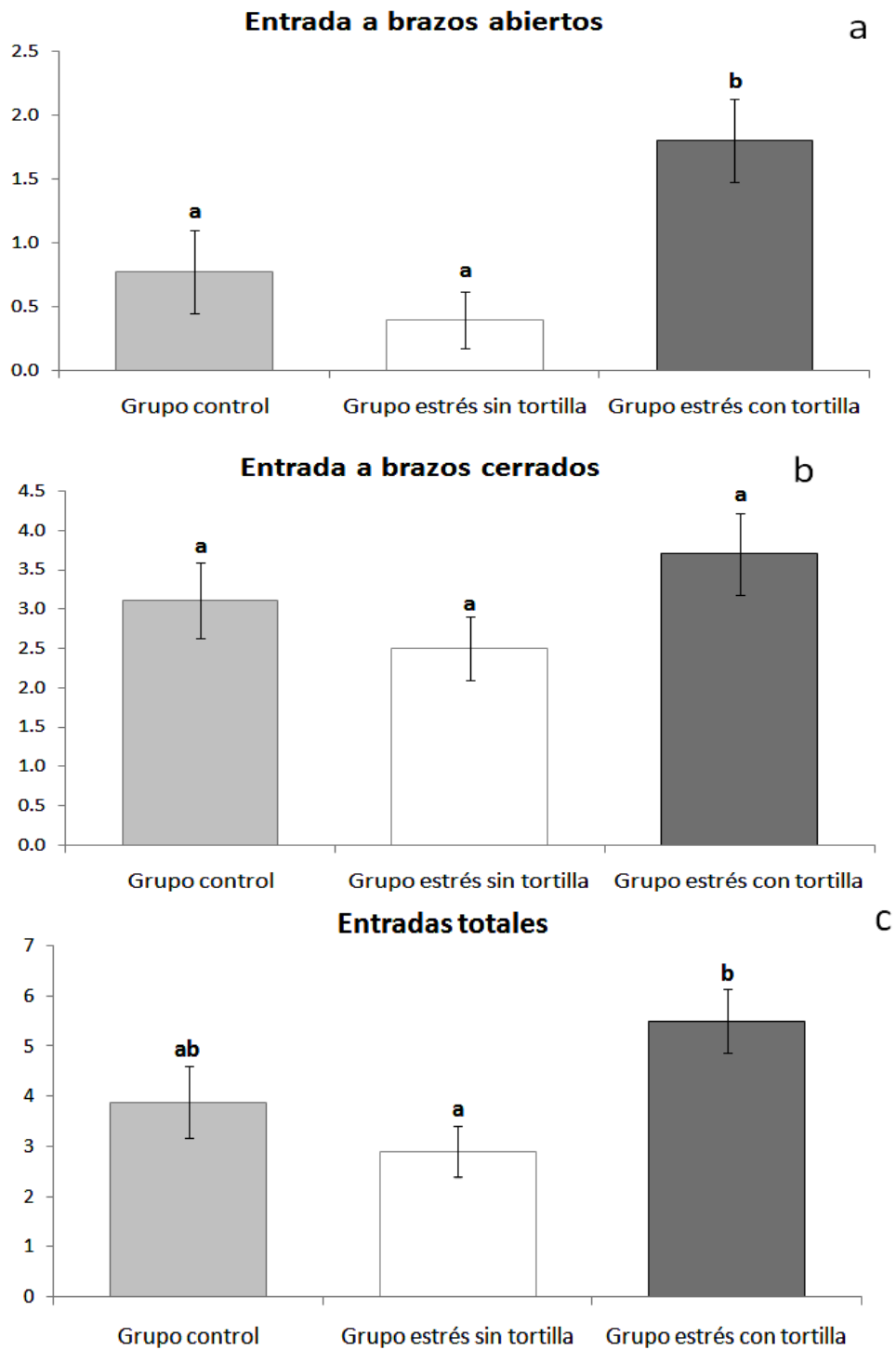
Al analizar el tiempo que las ratas invierten en la exploración del centro del laberinto, se encontraron diferencias significativas entre grupos ( $F[2]=5.164$ ,  $p<0.05$ ). La comparación



entre grupos mostró un mayor tiempo de permanencia del grupo TAe ( $p < 0.05$ ) con respecto al grupo CTR y CTRe (fig. 6c).

El análisis de medidas etológicas permitió evaluar la actividad exploratoria durante la prueba en el LAC. Se observaron diferencias significativas en las conductas de exploración vertical (conductas de rearing) ( $F[2]=3.393$ ,  $p < 0.05$ ), parámetro en el cual el grupo TAe presentó una mayor actividad, únicamente respecto al grupo CTR ( $p < 0.05$ ), el grupo CTRe presentó la misma tendencia, aunque no fue significativa su diferencia ( $p > 0.05$ ) (fig. 7).

Por su parte la exploración en los brazos abiertos, mediante la inclinación estereotipada de la cabeza en dirección al piso por debajo del laberinto (conductas de dipping) también evidenció diferencias significativas ( $F[2]=15.671$ ,  $p < 0.001$ ). Este tipo de exploración fue significativamente mayor en el grupo TAe en comparación a los grupos CTR y CTRe ( $p < 0.05$ ) (fig. 8). Estos grupos presentaron una escasa exploración en los brazos abiertos. Así mismo el análisis de las conductas de estiramiento también evidenciaron diferencia entre grupos ( $F[2]=4.010$ ,  $p < 0.05$ ), el grupo CTRe mostró diferencias significativas respecto a los grupos CTR y TAe (fig. 9). Por último, al evaluar el tiempo de inmovilidad, asociado a conductas de freezing fue posible observar diferencias entre grupos ( $F[2]=5.680$ ,  $p < 0.05$ ), sobre esto las ratas del grupo TAe permanecieron por un menor tiempo inmóviles durante los ensayos en el LAC, esto al compararlo con el grupo CTR ( $p < 0.05$ ) (fig. 10).



**Figura 5.** (a) Actividad exploratoria en el laberinto elevado en cruz. Entradas a los brazos abiertos, en la cual el grupo TA registro un incremento. (b) Registro del número de ingresos los brazos cerrados, no se registra diferencia significativa. (c) Al centro del laberinto. Los datos se reportan como la media  $\pm$  E.E. Letras diferentes indican  $p < 0.05$ .

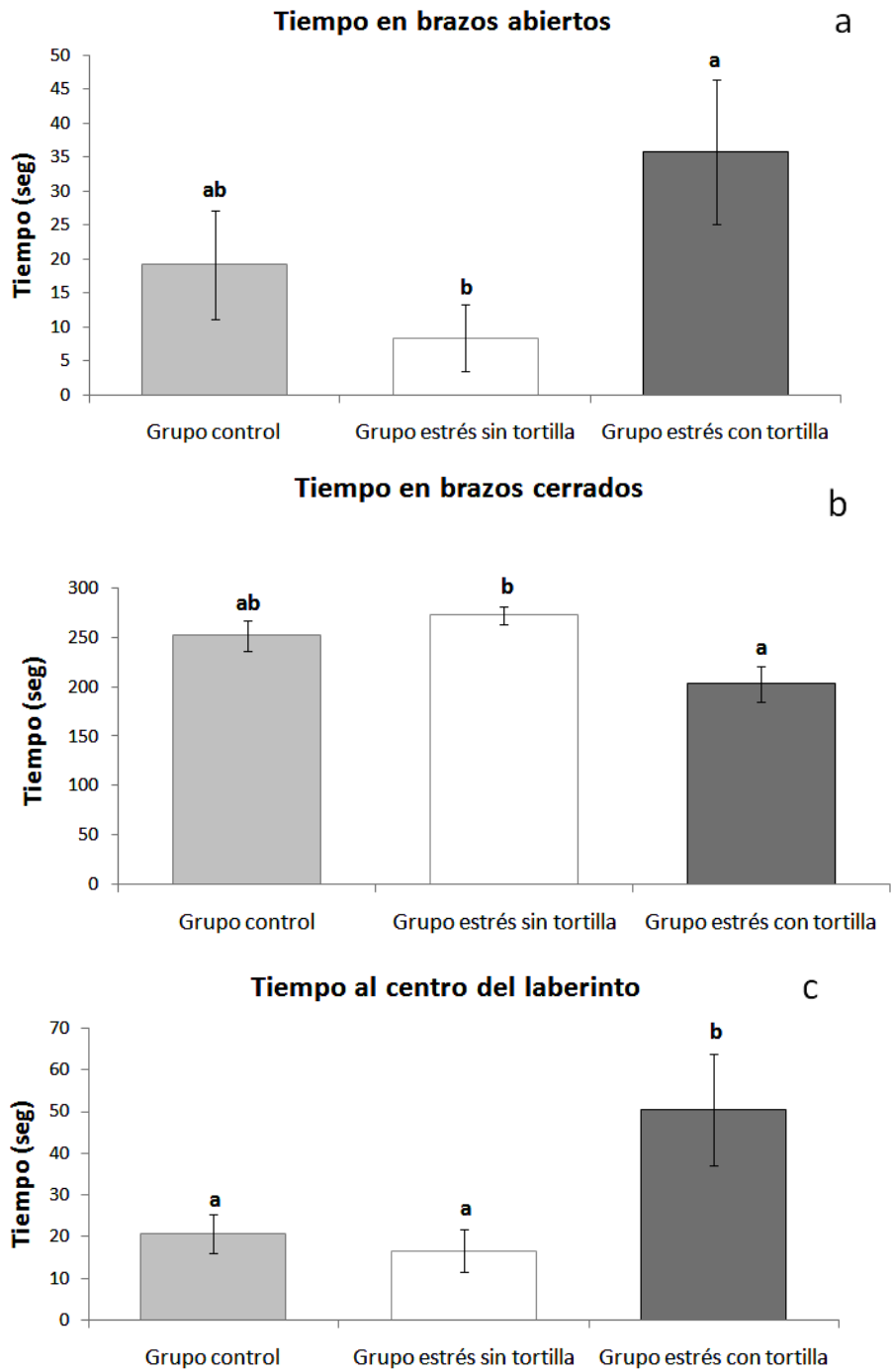


Figura 6. (a) Tiempo de permanencia en las diferentes secciones que comprende el laberinto elevado en cruz. Brazos abiertos, donde el grupo TAE mostró un incremento. (b) Brazos cerrados en donde el grupo TAE mostró el menor promedio. (c) Centro del laberinto. Los datos se reportan como la media  $\pm$  E.E. Letras diferentes indican  $p < 0.05$ .

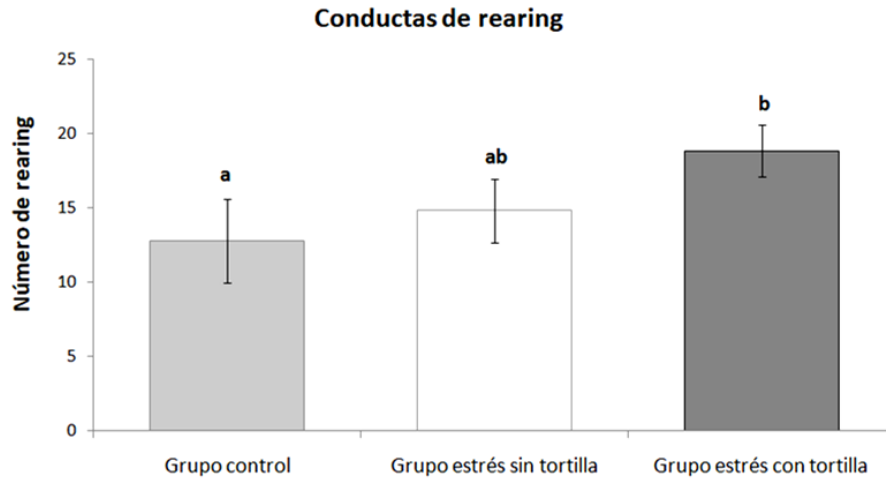


Figura 7. Efecto de las diferentes condiciones experimentales sobre la conducta exploratoria vertical durante la prueba de laberinto elevado en cruz, es posible observar un incremento en el grupo TAe. Los datos se reportan como la media  $\pm$  E.E. Letras diferentes indican  $p < 0.05$ .

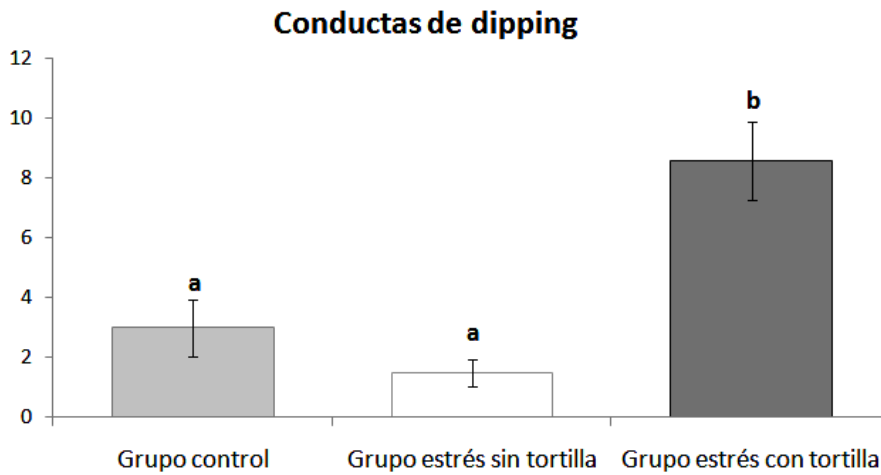
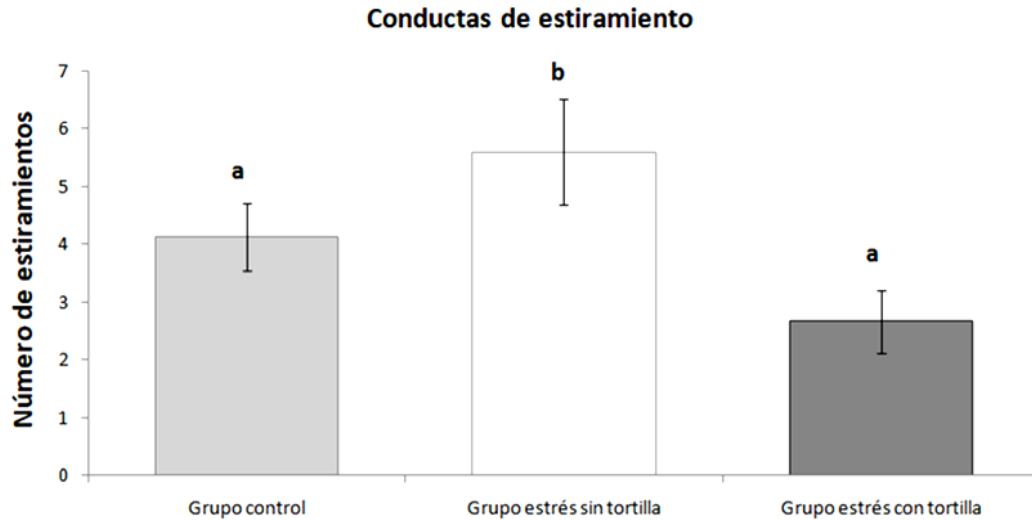
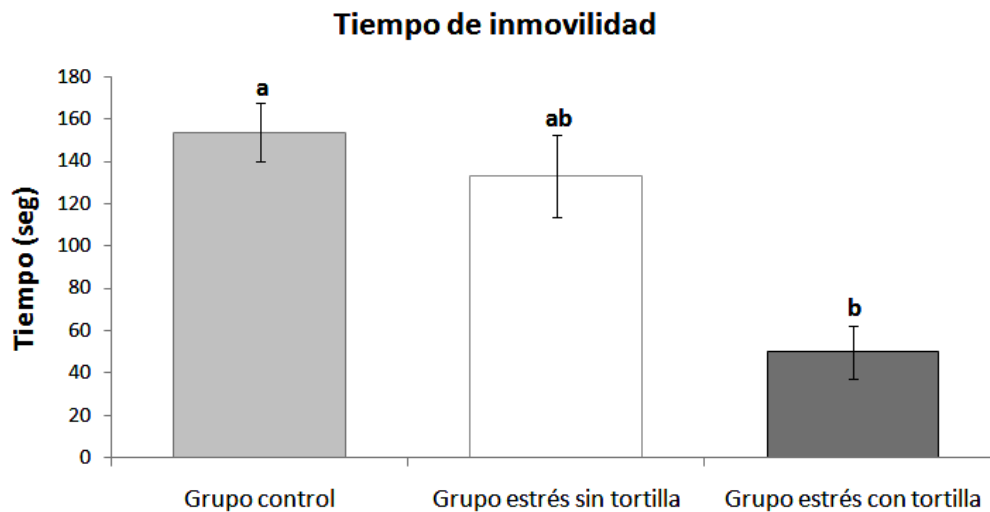


Figura 8. Muestra la conducta de exploración en los brazos abiertos, dentro de los grupos experimentales durante la prueba de laberinto elevado encruz. Los datos se reportan como la media  $\pm$  E.E. Letras diferentes indican  $p < 0.05$ .



**Figura 9.** Muestra la conducta de estiramientos realizados durante la prueba de LAC, se da un incremento en de estas conductas en el grupo estrés sin tratamiento. Los datos se reportan como la media  $\pm$  E.E. Letras diferentes indican  $p < 0.05$

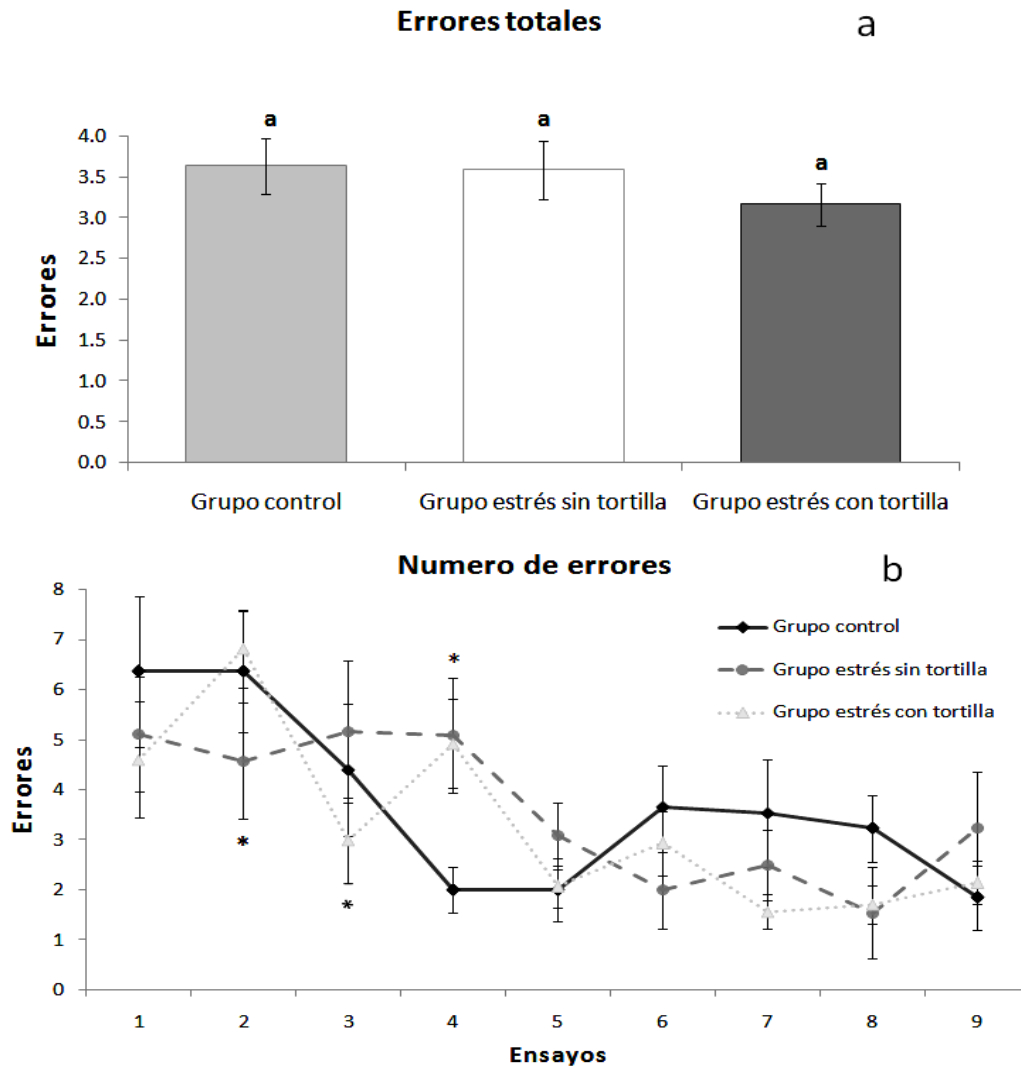


**Figura 10.** Muestra el tiempo promedio durante el cual las ratas en los diferentes grupos experimentales permanecieron inmóviles, se observa una marcada disminución en el grupo estrés con tortilla. Los datos se reportan como la media  $\pm$  E.E. Letras diferentes indican  $p < 0.05$ .

## **Laberinto abierto de Barnes**

La utilización de la prueba ANOVA de medidas repetidas no detectó diferencias en el número de errores totales entre grupos ( $F[2]=3.049, p=0.05$ ) (fig. 11a). Sin embargo al analizar los datos del tercer ensayo, el grupo TAe mostró menor número de errores con respecto al grupo CTRe ( $p<0.05$ ) y similar al grupo CTR. Esta conducta igualmente se observó durante el ensayo 4 donde no se observó diferencia al comparar los grupos CTR y TAe, sin embargo el grupo CTRe cometió un mayor número de errores en comparación al grupo CTR ( $p<0.05$ ). Al comparar los ensayos 8 y 9 (con una diferencia de 72 horas entre ambos) fue posible evaluar la capacidad de retención observando solo una tendencia en el grupo CTR ( $p>0.05$ ) (fig. 11b).

En lo que respecta a la distancia recorrida por los animales, resultó significativo entre grupos ( $F[2]=8.892, p<0.001$ ). Este análisis mostró que las ratas del grupo TAe recorrieron menor distancia, en comparación al grupo CTRe ( $p<0.05$ ) (fig. 12a). En el ensayo 3 el grupo TAe mostro la menor distancia recorrida, aunque solo fue posible encontrar diferencias significativas al compararlo con el grupo CTRe ( $p<0.05$ ). A partir del ensayo 5 los grupos TAe y CTRe recorrieron menos distancia respecto al grupo CTR; se detectó diferencia entre los grupo CTR y TAe (ensayo 5 y 6) y entre los grupos TAe y CTRe (ensayo 8). En el ensayo 9 o de retención no se observaron diferencias significativas (fig. 12b).



**Figura 11. (a) Muestra el promedio acumulado de errores cometidos durante la evaluación de memoria en el laberinto abierto de Barnes. (b) Se describen el número de errores cometidos durante los diferentes ensayos realizados para la evaluación de la memoria. Los datos se reportan como la media  $\pm$  E.E. Letras diferentes indican  $p < 0.05$ . \*=  $p < 0.05$ .**

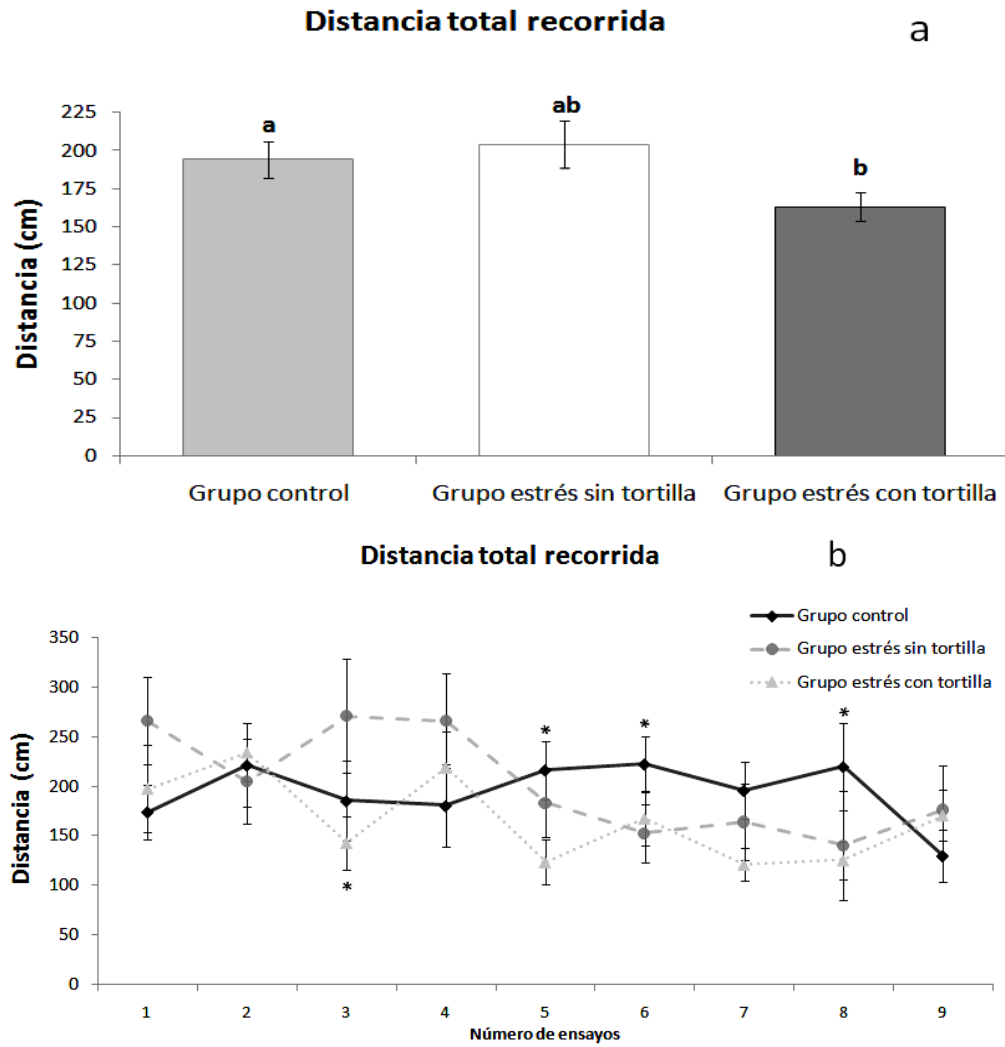
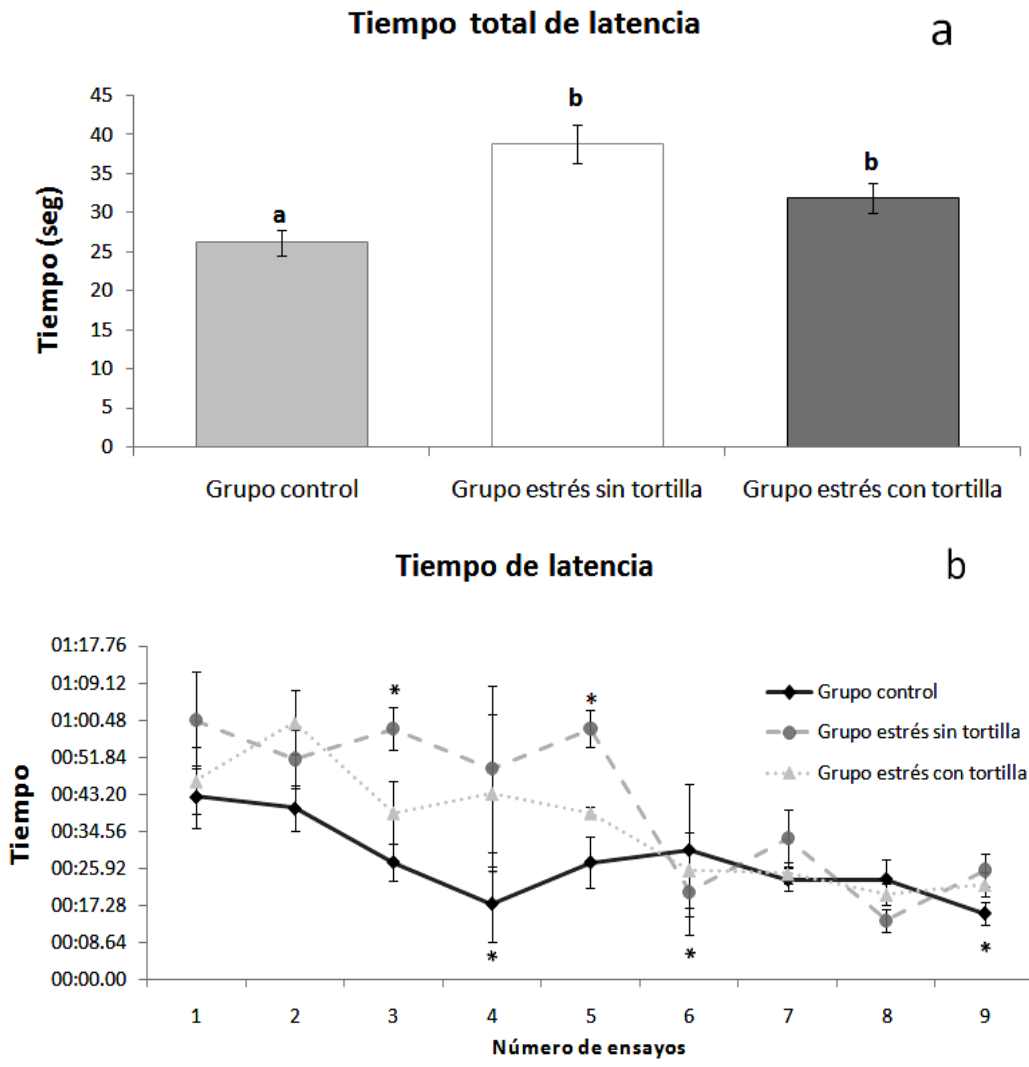


Figura 12. (a) Muestra la distancia total recorrida promedio registrada durante la evaluación conductual, en el cual se observa la disminución en el grupo TAc respecto al control. (b) Se describe la distancia recorrida durante los diferentes ensayos. Los datos se reportan como la media  $\pm$  E.E. Letras diferentes indican  $p < 0.05$ . \* =  $p < 0.05$



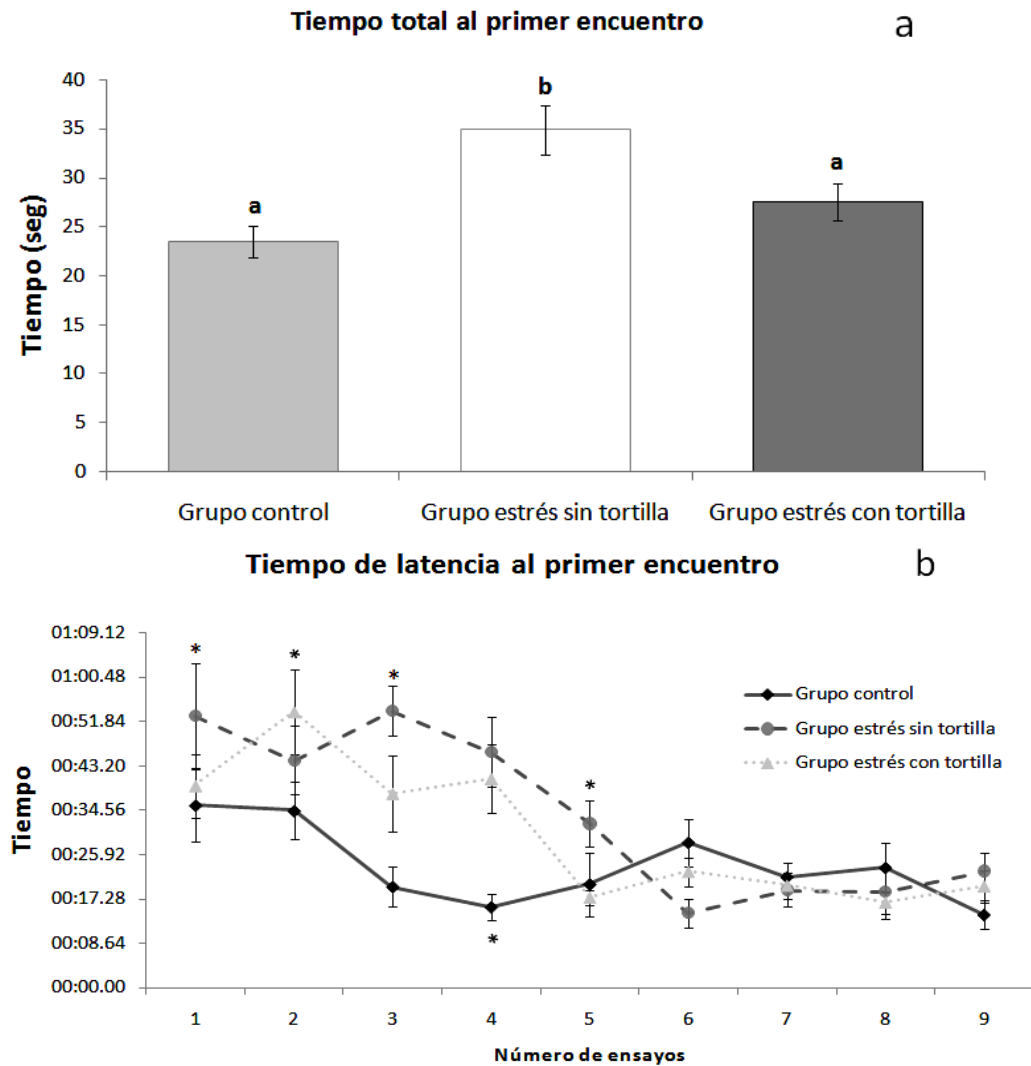


**Figura 13. (a) Se muestra el tiempo promedio necesario para la finalización de la prueba de Barnes, en los grupos TAe y CTRe se observa un mayor tiempo de latencia respecto al grupo CTR. (b) Se describe el tiempo total de prueba promedio durante los ensayos realizados y la disminución de los promedios en los tres grupos a realizar los ensayos. Los datos se reportan como la media  $\pm$  E.E. Letras diferentes indican  $p < 0.05$ . \*=  $p < 0.05$**

El análisis del tiempo de latencia mostro la existencia de diferencia significativa ( $F[2]=8.892$ ,  $p<0.001$ ). La comparación pos hoc mostro que los grupos CTRe y TAe tuvieron mas alto promedio que el grupo CTR (fig. 13a). No fue posible encontrar diferencia entre este grupo y el alimentado con tortilla. Durante los ensayos 3 y 5 el grupoCTRe necesito un mayor tiempo para ingresar a la caja de escape en comparación al grupo control ( $p<0.05$ ). Durante el ensayo

4 fue posible observar diferencias entre los grupos TAe y CTRe respecto al control ( $p < 0.05$ ) (fig. 13b).

Por otro lado, durante la prueba de retención tanto los grupos TAe y CTRe registraron un mayor tiempo de latencia respecto al CTR, sin embargo, solo se registró diferencias en el grupo CTRe ( $p < 0.05$ ) (fig. 13b).



**Figura 14. (a) Muestra el tiempo promedio requerido para localizar la caja de escape, en el cual solo fue posible observar incremento en el grupo CTRe. (b) Describe los promedios de tiempo del tiempo requerido para localizar la caja de escape durante los diferentes ensayos, es posible notar una disminución entre las diferentes pruebas. Los datos se reportan como la media  $\pm$  E.E. Letras diferentes indican  $p < 0.05$ . \*=  $p < 0.05$**

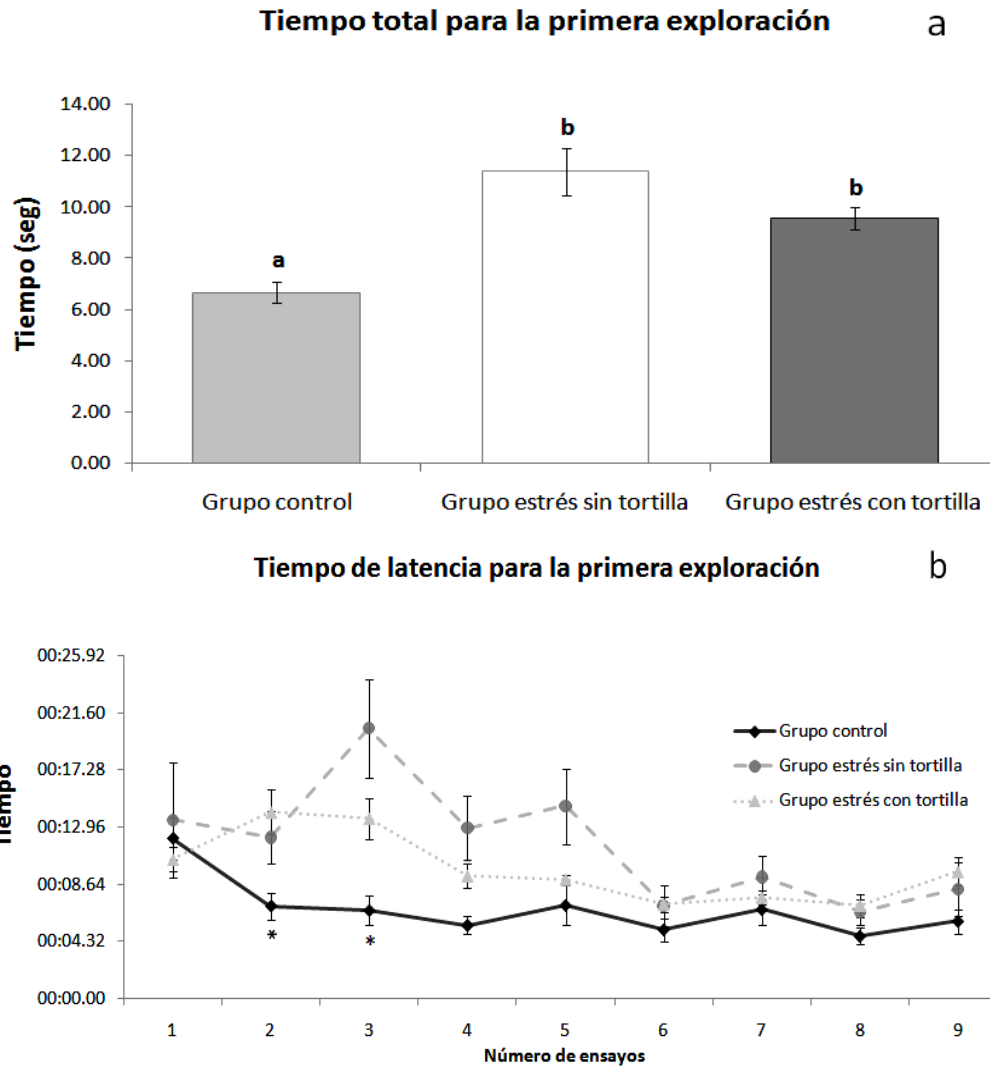


Figura 15. (a) Muestra el tiempo promedio global para la realización de la primera exploración, tanto los grupos TAE y CTRe registraron un incremento de este parámetro respecto al grupo CTR. (b) Describe el tiempo de latencia durante los diferentes ensayos realizados, se observa un menor tiempo para la primera exploración en el grupo CTR. Los datos se reportan como la media  $\pm$  E.E. Letras diferentes indican  $p < 0.05$ . \*=  $p < 0.05$ .

Otro parámetro que resulto de interés evaluar fue el tiempo de latencia para el primer encuentro con la caja de escape, en el cual se encontraron diferencias significativas ( $F[2]=9.585$ ,  $p<0.001$ ). Esta variable mostro que el grupo CTRe invirtió más tiempo para poder localizar la caja de escape. Cabe mencionar que para este parámetro el grupo TAE no mostro diferencia significativa al compararlo con nuestro control, mientras que el grupo CTRe

registró un mayor tiempo en la localización de la caja de escape, en comparación al control ( $p < 0.05$ ) (fig. 14a).

Durante el desarrollo de las pruebas solo se detectaron diferencias en las pruebas de adquisición más no así durante la retención; particularmente durante los primeros ensayos. Mientras que durante la adquisición, el grupo CTRe resulto ser el que más tiempo registro para encontrar la caja de escape, esto solo en comparación al grupo CTR; durante el segundo ensayo resulto ser el grupo TAe, aunque de igual manera solo con respecto al control ( $p < 0.05$ ). Es sin embargo en el ensayo 4 donde los grupos CTRe y TAe mostraron un incremento del tiempo para la localización de la caja escape respecto al grupo CTR ( $p < 0.05$ ). Apartir del ensayo cinco el grupo TAe mostro una disminución en este parámetro, aunque solo al compararlo con el grupo CTRe ( $p < 0.05$ ) (fig. 14b).

La evaluación del tiempo de latencia para la primera exploración, arrojó diferencias entre los grupos de trabajo ( $F[2]=13.482$ ,  $p < 0.001$ ), y con las pruebas pos hoc se comprobó el incremento del tiempo que tomaban las ratas para realizar la primera exploración en los grupos CTRe y TAe, esto con respecto al grupo CTR; particularmente el grupo CTRe presento el mayor incremento ( $p < 0.05$ ), aun así no se encontró diferencia significativa al compáralo contra el grupo TAe ( $p > 0.05$ ) (fig. 15a). Respecto a lo anterior se registró diferencia en el segundo ensayos, donde el grupo TAe aumento la latencia para realizar la primera exploración pero unicamente con respecto al grupo CTR ( $p < 0.05$ ); durante el tercer ensayolos grupos TAe y CTRe mostraron diferencia significativa por sobre el grupo CTR ( $p < 0.05$ ). A partir del ensayo cinco esta tendencia fue rediciendo hasta encontrar tiempos de latencia para la primera exploración similares en los tres grupos (fig. 15b).

## **DISCUSIÓN**

### **Contenido de antocianinas**

Las concentraciones de ANTs en el grano de maíz utilizado en este trabajo, registradas mediante el proceso de pH diferencial coinciden con lo ya reportados en otros trabajos (Aburto et al., 2013). Por otro lado la pérdida de ANTs calculada en la variedad utilizada, por efecto del proceso de nixtamalización concuerda con los porcentajes de pérdida para granos cuyo reservorio de ANT's se encuentra en la capa de la aleurona (Salinas 2003; de la Parra et al., 2007; Aburto et al., 2013); en este sentido la raza de maíz pigmentado con la cual fueron elaboradas las tortillas para este estudio, contiene una concentración media de ANTs, sin embargo debido a que la pérdida de estas moléculas por efecto de la nixtamalización es moderada ya que se cuentan con reportes que señalan una pérdida de hasta el 100% (Salinas 2003). Por consiguiente el maíz azul utilizado en para este trabajo (la raza mixtco variedad CIDIR125) resulta ser una excelente opción para la integración de estos flavonoides a la dieta. No obstante es necesario mencionar la existencia de maíces con mayor contenido antociánico, por lo que es necesario probar el efecto fisiológico de estos maíces; por esto surge la necesidad de probar diferentes variedades de maíces pigmentados como una potencial fuente de flavonoides para el mejoramiento a la salud.

### **Pesos corporales**

Se detectó un incremento progresivo del peso corporal en los animales a través de las semanas de estudio. Sin embargo a partir de la tercera semana fue posible observar una disminución en la ganancia de peso en los animales del grupo TAe, a comparación con los grupos CTR y CTRe, tendencia que se mantuvo hasta la semana nueve. Durante este periodo los animales sometidos a estrés sin tratamiento, registraron el promedio de peso más alto. Relacionado con esto, los resultados señalan un efecto asociado al consumo de tortilla azul sobre el peso corporal, lo que se confirma al tomar en cuenta la diferencia entre los grupos CTRe y TAe. Por otro lado el peso de los animales en el grupo CTR mostro un comportamiento similar a al grupo CTRe lo que probablemente se deba al tipo de alimento proporcionado, ya que en

ambos grupos se aplicó una fórmula comercial. Esta inferencia surge de las observaciones que evidencian un efecto diferencial en la respuesta metabólica asociado con el nivel de estrés (crónico) aplicado en modelos animales, principalmente sobre las conductas de ingesta (Levine y Morley, 1981; Morley et al., 1983). Así, estímulos altamente estresantes o traumáticos, pueden desencadenar conductas de hipofagia, mientras que un estrés moderado como el generado durante el aislamiento social, genera hiperfagia (Torres et al., 2007; Robbins y Fray, 1980), lo que produjo una mayor ganancia de peso corporal en el grupo CTRe, al incrementar el consumo de alimento; sin embargo debido a las características nutricionales del alimento proporcionado, esta ganancia de peso no resultó ser significativo con respecto a las ratas control. Lo anterior queda evidenciado en trabajos donde animales sometidos a un estrés moderado y alimentados con una dieta hipercalórica reportan una ganancia de peso significativa respecto al control (Torres et al. 2007;), en este sentido el incremento en las conductas de ingesta más una dieta hipercalórica producen un sobrepeso en los animales, sin embargo por las cualidades nutricionales de la fórmula comercial proporcionada en este trabajo esta ganancia no fue tan marcada en los animales bajo estrés crónico.

Como se mencionó anteriormente, el estrés crónico está estrechamente relacionado con la ganancia de peso, debido a la modificación en las conductas de ingesta alimenticia (Yau et al. 2013), en este sentido algunos estudios han demostrado que la exposición prolongada a situaciones de estrés pueden interferir en los mecanismos de regulación implicados tanto en la activación como inhibición del eje HPA; así la activación crónica del eje HPA puede alterar el metabolismo de glucosa, generar resistencia a insulina y alterar la liberación de múltiples hormonas relacionadas con el apetito (Bose et al., 2013). Por otro parte estructuras encefálicas implicadas en las conductas de recompensa (amígdala, hipocampo y corteza prefrontal) pueden verse afectadas de forma negativa por el estrés crónico, lo que se traduce en conductas de ingesta-dependientes y compulsivas (Sinha y Jastreboff, 2008), por lo que al tomar en cuenta lo anterior, el estrés crónico generaría la ganancia de peso anormal en los animales del grupo CTRe.

Se ha establecido que la producción de radicales libres es uno de los principales mecanismos de daño a nivel de sistema nervioso durante el estrés crónico (Aguilera, 2011), la reducción de estos radicales tras la administración de extractos de ANTs ha sido comprobado en modelos

tanto *in vivo* como *in vitro* (Wang y Jiao, 2000; Ramos-Escudero et al., 2012); por lo que es posible que el efecto observado en los pesos corporales de los animales tratados con tortilla azul este directamente relacionado con el contenido de flavonoides, especialmente las antocianinas. Esto puede explicarse debido a que existe una disminución en la pérdida del control sobre los mecanismos neuro-endocrinos asociados al metabolismo y el daño en las estructuras nerviosas que controlan las conductas de recompensa y ansiedad. Por otro lado, existe evidencia que demuestra un efecto preventivo en la ganancia de peso por el consumo de maíces pigmentados debido a un incremento en la metabolización de lípidos, lo que evitaría la acumulación de grasa corporal (Muñoz et al., 2013, Chaiittianan et al 2017), esto explicaría en parte que el grupo TAe haya registrado una menor ganancia de peso con respecto al grupo CTR.

Lo anterior contradice de manera directa los argumentos respecto al consumo de tortilla en México, teniendo este producto como un factor detonante de la obesidad. Respecto a la cantidad con la cual fueron administrados las ratas en el grupo TAe la ingesta de tortilla represento de entre un 43.13% a un 86.46% de ingesta total diaria. Lo anterior, tomando en cuenta que el consumo de alimento en las cepas utilizadas en laboratorio, oscila entre 15 a 30gr diarios (<http://www.researchdiets.com/resource-center-page/typical-food-intake>). Para la población en México la tortilla representa un alto porcentaje del aporte calórico, por lo que de acuerdo a las cantidades proporcionadas en este trabajo, resulta erróneo adjudicar un incremento desproporcionado del peso corporal debido al consumo de tortilla.

El aporte de ANTs que representa el consumo de tortillas pigmentadas resulta importante ya que; se ha calculado un consumo de tortilla anual per cápita de 56.7kg para la zona urbana y 79.5kg para el medio rural (CONEVAL 2014), teniendo en cuenta la cantidad de ANTs calculado en el maíz utilizado para este trabajo, el aporte diario de ANTs sería de 147.67mg para los habitantes de las zonas rurales y 105.32mg para los de ciudad. Por lo que, con el consumo de este tipo de productos, mejoraría de manera considerable la calidad de la dieta en el país.

## **Laberinto elevado en cruz**

El LEC tiene como paradigma la confrontación de conductas opuestas al presentar una situación de evitación-exploración por novedad (Montgomery, 1955), por lo que la adaptación a las condiciones de la prueba, esto es, la capacidad de afrontar correctamente una situación novedosa incrementaría la exploración de todo el laberinto. De forma conjunta los diferentes parámetros evaluados durante la ejecución del LEC indican una disminución de las conductas de ansiedad en el grupo TAe. Mientras que los grupos CTR y CTRe exhibieron un desempeño similar al presentar mayor tiempo de inmovilidad, tiempo en los brazos cerrados y conductas de estiramiento, así como una menor actividad exploratoria. Se ha demostrado que la administración de ansiolíticos como benzodiazepinas incrementa el número de entradas a los brazos abiertos (Pellow y File, 1986; Escarabajal et al., 2003), mientras que el estrés crónico puede reducirlas (Spasojevic et al., 2016; Martin et al. 2017). Sin embargo, también es importante tomar en cuenta que la interpretación, únicamente del número de entradas resulta inadecuado, debido a que, en ocasiones el ingreso a los brazos abiertos resulta de una situación esporádica. Así pues, el tiempo de permanencia y las exploraciones realizadas en los brazos abiertos (conductas de dipping), permiten identificar una verdadera actividad exploratoria. Al respecto nuestros resultados muestran en el grupo TAe no solo un incremento en las entradas a los brazos abiertos, sino que además un mayor número en las conductas exploratorias. El tiempo de permanencia fue menor en el grupo CTRe, en el caso del grupo CTR los resultados reflejan periodos de inmovilidad prolongados una vez que las ratas ingresaban al brazo abierto, lo que se comprueba con la escasa cuantificación de las conductas de dipping.

Referente a las entradas totales el grupo TAe registró el mayor número; esto, más la disminución del tiempo de inmovilidad, señalan un incremento en la actividad motora. El tiempo de inmovilidad puede estar asociado a conductas de freezing, estas son desencadenadas como un reflejo de pánico. En este sentido es probable que la disminución en los periodos de inmovilidad observados en el grupo CTRe se deban a la habituación de los sistemas neuro-endocrinos reguladores del estrés como consecuencia del manejo previo, ya que se ha demostrado la habituación de estos sistemas por la repetición crónica de estímulos estresantes (Campmany et al., 1996); esto también explicaría que el grupo CTR presentara un mayor tiempo de inmovilidad. Aun así, aunque los grupos CTRe y TAe mostraron menor tiempo de



inmovilidad que el grupo CTR, el número de entradas totales fue menor en el grupo CTRe respecto al control pese a no encontrar diferencias significativas; lo anterior permitió evidenciar en el grupo CTR una mayor actividad locomotriz (al cruzar de un brazo a otro) pero poca actividad exploratoria (una vez que entro al brazo la rata permanecía inmóvil). Lo anterior se confirma al analizar tanto el tiempo en los brazos cerrados como la exploración vertical (conductas de rearing), si bien no se registraron diferencias entre los grupo CTRe y CTR, el grupo TAe disminuyó significativamente el tiempo de inmovilidad teniendo diferencias significativa solo con el grupo CTRe, no obstante pese a presentar menor tiempo en los brazos cerrados el grupo TAe presento un mayor número de conductas de “rearing” pero únicamente respecto al grupo CTR. Por otra parte en este trabajo se pudo observar como una respuesta estereotipada de ansiedad en los animales la conducta de estiramiento, si bien este parámetro en la gran mayoría de estudios pasa desapercibido, nosotros pudimos comprobar una relación entre el incremento de este comportamiento y el nivel de ansiedad, al observar en el grupo CTRe un marcado aumento y una disminución en el grupo TAe. Otra observación importante se obtuvo al evaluar el tiempo al centro del laberinto, al respecto las ratas en grupo TAe incrementaron el tiempo de permeancia dentro de este sector, de hecho es posible que la ocurrencia de un mayor tiempo de actividad en esta parte del LEC esté relacionada con la toma de decisiones.

Con todo lo anterior fue posible evidenciar un efecto ansiolítico debido al consumo de tortilla azul. Lo anterior coincide con lo reportado por Gutierrez et al., (2014) quienes indirectamente observaron este efecto. Es por ello que nosotros proponemos que los resultados obtenidos durante la prueba de laberinto elevado en cruz están relacionados con las ANTs contenidas en la tortilla y su capacidad de prevenir el deterioro de las estructuras asociadas con la regulación del eje HPA. Sobre esto se ha demostrado que el estrés crónico puede afectar de manera importante tanto la morfología como el funcionamiento de estructuras como el hipocampo, que está directamente relacionada con la inhibición y control de eje HPA. Por otro lado, el consumo de antocianinas no solo ha evitado la perdida en la integridad celular de esta región, sino que también puede activar funciones tróficas (Shah et al., 2013). Lo que no solo evitaría el daño causado por el estrés crónico, además facilitara la recuperación del tejido nervioso al ocurrir una perdida debido al estrés crónico.

## **Laberinto abierto de Barnes**

Los resultados obtenidos comprueban un mejor desempeño en los grupos CTR y TAe durante la ejecución de esta prueba respecto al grupo CTRe, esto corrobora una mejor capacidad de aprendizaje y memoria espacial. El grupo TAe mostro una tendencias a disminuir el número total de errores aunque no se registró diferencia significativa, no obstante el análisis individual de los ensayos arrojó diferencia para los días 3 y 4, donde el grupo CTRe realizó un mayor número de errores. Al respecto esta tendencia fue observada durante el ensayo de retención. Actualmente en los protocolos se utilizan el numero de errores y el tiempo de latencia para determinar el estado cognitivo en los animales (O'Leary y Brown, 2013; Gomez-Smith et al., 2016; Ahmed et al., 2016). Con respecto a esto el grupo CTR terminó las pruebas en un menor tiempo por sobre los otros grupos; caso contrario el grupo CTRe tardó más en concluir las pruebas, particularmente durante los ensayos 3 y 5, esto hace mención de una escasa capacidad de retención, ya que ambas pruebas corresponden a los primeros ensayos en los días 2 y 3, por lo que existe un periodo de 24 horas entre la última prueba, periodo de tiempo que influyó de manera importante en su desempeño. Sin embargo decidimos analizar el tiempo que le tomó a la rata encontrar la caja de escape, sin que necesariamente entrarán en ella; así pues este parámetro nos permitió advertir de forma interesante una nula diferencia entre el grupo TAe y el grupo control, las ratas en el grupo CTRe fueron las que más tiempo registraron. Al respecto ya se había mencionado que debido a la naturaleza de los estímulos durante la prueba es posible la ocurrencia de habituación en los animales, lo cual generó que una vez la rata encontró la caja de escape esta no ingresaba, esto influiría de manera significativa en los resultados (Harrison et al., 2006; Reiserer et al. 2006). Derivado de lo anterior es posible afirmar que la diferencia en el tiempo de latencia, entre los grupos CTR y TAe se debe a que las ratas en el grupo TAe encontraban la caja de escape en los primeros segundo de prueba pero no ingresaban. Por otro lado, la distancia total recorrida resultó menor en el grupo TAe, esta variable se ha propuesto para valorar la actividad motora de los animales durante la prueba (Popović et al., 2010; O'Leary y Brown, 2013), no obstante es posible relacionar la distancia recorrida con el tipo de estrategia utilizada por la rata para encontrar la caja de escape, ya que una menor distancia no necesariamente implicaría poca actividad motora, sino que estaría reflejando que el animal se traslado directamente a la caja de escape. Respecto al

grupo CTR se observó que pese a tener los menores promedios de tiempo tanto para el encuentro con la caja de escape como para la finalización de la prueba, la distancia recorrida fue mayor, lo que indica que las ratas en su mayoría realizaron una búsqueda azarosa, recorriendo una mayor superficie del laberinto. Por otro lado, al analizar el grupo TAe se observaron pruebas más directas, lo que indica que en la mayoría de los ensayos las ratas del grupo TAe se desplazaban directamente a la caja de inicio aunque no necesariamente estas entrarán en ella. Con lo anterior también es posible evidenciar un peor desempeño en las ratas del grupo CTRe al presentar no solo un mayor tiempo para encontrar la caja de escape sino que además demuestra una búsqueda azarosa al incrementar la distancia recorrida.

La ejecución del LAB está directamente relacionada con la función cognitiva de estructuras como el hipocampo, de hecho lesiones en esta región del cerebro generan la incapacidad de recordar la ubicación de la caja, lo que tiene como resultados tiempos de latencia más prolongados y un mayor número de errores (Raber et al., 2004; Locklear y Kritzer, 2014; Betancourt et al., 2016). Al respecto el estrés crónico puede inducir la pérdida en la capacidad de ejecutar esta prueba (Wielgat et al., 2011; Trofimiuk y Braszko, 2015), se han propuesto varios mecanismo de daño, que pudiesen afectar al hipocampo a consecuencia de una liberación crónica de corticoesteroides, como la pérdida de funciones enzimáticas debido a la liberación crónica de corticoesterona (Wielgat et al., 2011), así mismo un posible proceso de citotoxicidad relacionada con la activación de receptores glutamatérgico principalmente  $GABA_{A1}$  (Afroz et al., 2017). Esto último resulta de interés ya que también se ha comprobado que estos mismos receptores pudieran funcionar en la recepción de las ANTs para la activación de algunas funciones tróficas en hipocampo (Carvalho et al., 2015; Yang et al., 2015, Rehman et al., 2017). Con lo anterior es posible concluir que la capacidad de prevenirlos efectos adversos del estrés es debido al consumo de maíces pigmentados y principalmente a las ANTs contenidas en estos, sin embargo es necesario la realización de más trabajo al respecto que permitan confirmar este efecto. Es importante mencionar que un factor a tomar en cuenta es la edad a la cual el estrés crónico se comenzó a implementar, ya que existe evidencias que señalan que el desarrollo neurológico es llevado a cabo hasta el día 37 pos natal donde se siguen generando procesos de remodelación neuronal (Altman y Das, 1965; Lanier y Issacson, 1977; Folha, et al., 2017), por lo que estímulos aversivo externos pueden tener como consecuencia un inadecuado desarrollo de los circuitos neuronales, por ello es

posible advertir que el consumo de moléculas con actividad biológica, como las ANTs, puede ayudar en el correcto desarrollo neurológico durante el crecimiento, evitando la pérdida funcional del sistema nervioso.

## CONCLUSIONES

- El contenido de antocianinas en el maíz azul fue de 126.092mg/100g de muestra, mientras que en la tortilla deshidrata fue de 67.80mg/100g de muestra.
- El estudio mostró que las variables de estrés se relacionan con el aumento significativo de la ganancia de peso corporal en los animales. No obstante el grupo de ratas sometidas a estrés y alimentadas con tortilla presentaron una ganancia de peso similar a los animales del grupo control.
- El modelo de estrés utilizado en el presente estudio fue capaz de inducir aumento en las conductas de ansiedad en las ratas. Sin embargo el consumo de tortilla de maíz se relaciono con la disminución de estas conductas.
- El consumo de tortillas elaboradas de maíces pigmentados evito la perdida de las capacidades cognitivas de memoria y el aprendizaje asociadas al modelo de estrés por aislamiento y restricción.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aburto, E.A., Wong, R.B., Chávez, T.I.P., Hoyos, B.M.J., Cárdenas, F., Cervantes, L.J. (2013) La nixtamalización y su efecto en el contenido de antocianinas de maíces pigmentados, una revisión. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 36 (4): 429-437.
- Afroz, S., Shena, A.H., Smith, S. (2017)  $\alpha 4\beta\delta$  GABA<sub>A</sub> receptors reduce dendritic spine density in cal hippocampus and impair relearning ability of adolescent female mice: effects of a gaba agonist and a stress steroid. *Neuroscience*. 347: 22–35.
- Agatia, G., Azzarella, G., Pollastri, S., Tattini, M. (2012) Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Science*. 196: 67–76.
- Aguilera, G. (1998) Corticotropin releasing hormone, receptor regulation and the stress response. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 9: 329–336.
- Aguilera, G. (2011) HPA axis responsiveness to stress: Implications for healthy aging. *Experimental Gerontology*. 46: 90–95.
- Ahmed, M.E., Dong, Y., Lu, Y., Tucker, D., Wang, R., Zhang, Q. (2016) Beneficial effects of a CAMKII $\alpha$  inhibitor TATCn21 peptide in global cerebral ischemia. *Journal Molecular Neurosciens*
- Alkadhi, K.A., Tran, T.T. (2015) Chronic stress decreases basal levels of memory-related signaling molecules in area ca1 of at-risk (subclinical) model of Alzheimer's disease. *Molecuar Neurobiology*. 52:93–100.
- Altman, J., Das, G.D. (1995) Autoradio graphic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in the rat. *Journal of Comparative Neurology*. 124: 319–336.
- Andres-Lacueva, C., Shukitt-Hale, B., Galli, I.R., Jauregui, O., Lamuela-Laventos, M.R., Joseph, A.J. (2005) Anthocyanins in aged blueberry-fed rats are found centrally and may enhance memory. *Nutritional Neuroscience*. 8(2): 111–120.
- Aoki H, N Kuze, Y Kato (2002) Anthocyanin isolated from purple corn (*Zea mays* L.) Disponible en: [http://www.ffcr.or.jp/zaidan/ffcrhome.nsf/7bd44c20b0dc562649256502001b65e9/c6698773361b42b249256ba60018e581/\\$FILE/anthocyanin - FFIJ199.pdf](http://www.ffcr.or.jp/zaidan/ffcrhome.nsf/7bd44c20b0dc562649256502001b65e9/c6698773361b42b249256ba60018e581/$FILE/anthocyanin - FFIJ199.pdf) (Agosto 2013).
- Arbel, I., Kadar, T., Silbermann, M., Levy, A. (1994). The effects of long-term corticosterone administration on hippocampal morphology and cognitive performance of middle-aged rats. *Brain Research*. 657(1–2): 227–235.
- Armario, A.; Castellanos, J.M.; Balasch, J. (1984) Effect of chronic stress on corticotropin function and on emotional reactivity in adult rats. *Neuroendocrinology Letters*. 6: 121-127.

- Armario, A., Hidalgo, J., Giralt, M. (1988) Evidence that the pituitary-adrenal axis does not cross-adapt to stressors. Comparison to other physiological variables. *Neuroendocrinology Letters*. 47: 263-267.
- Barnes, C.A, Nadel, L., Honig, W.K. (1979) Spatial memory deficit in senescent rats. *Canadian Journal of Psychology*. 34(1):29–39.
- Barrett, G.L., Bennie, A., Trieu, J., Ping, S., Tsafoulis, C. (2009) The chronology of age-related spatial learning impairment in two rat strains, as tested by the Barnes maze. *Behavior Neurosciens*. 123, 533–538.
- Betancourt, E., Wachtel, J., Michaelos A., Haggerty, M., Conforti, J., Kritzer M.F. (2016) The impact of biological sex and sex hormones on cognition in a rat model of early, premotor parkinson's disease. *Neuroscience*. 345: 297-314
- Betrán, F.J., Bockholt, A.J., Rooney, L. (2001) Blue corn. En: specialty corns. Hallauer, A.R. Edition speciality Conrs. CRC. Press: Boca Raton, Florida. 1:393–301.
- Blank, T., Nijholt, I., Eckart, K., Spiess, J. (2002) Priming of long-term potentiation in mouse hippocampus by corticotropin-releasing factor and acute stress: implications for hippocampus-dependent learning. *Journal of Neuroscience*: 22: 3788–3794.
- Bose, M., Oliván, B., Laferrère, B. (2013) Stress and obesity: the role of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in metabolic disease. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*. 16(5): 340–346.
- Brett L.P., Chong G.S., Coyle S., Levine S. (1983) The pituitary–adrenal response to novel stimulation and ether stress in young adult and aged rats. *Neurobiology of Aging*. 4:133–138.
- Brouillard, R., Dubois, J.E. (1977). Mechanism of structural transformations of anthocyanins in acidic media. *Journal of the American Chemical Society*. 99: 1359–1364.
- Brouillard, R. (1982) Chemical structure of anthocyanins. En:Markakis P (ed) *Anthocyanins as Food Colors*. Academic, NewYork, 1–38.
- Brouillard, R., Lang, J. (1990). The hemiacetal-cis-chalcone equilibrium of malvidin, a natural anthocyanin. *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimi*. 68: 755–761.
- Buynitsky, T., Mostofsky, D.I. (2009) Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 33: 1089–1098.
- Campmany, L., Pol, O., Armario, A. (1996) The Effects of Two Chronic Intermittent Stressors on Brain Monoamines. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 53(3): 517-523.

- Carter, M., Shieh J. (2010) Animal Behavior en Guide to Research Techniques. En: Neuroscience (Second Edition). Academic press. 39–71.
- Carvalho, F.B., Gutierrez, J.M., Bohnert, C., Zago A.M., Abdalla, F.H., Vieira, J.M., Palma, H.E., Oliveira, S.M., Spanevello, R.M., Duarte, M.M., Lopes, S.T.A., Aiello, G., Amarale, M.G., Pippia, N.L., Andrade, C.M. (2015) Anthocyanins suppress the secretion of proinflammatory mediators and oxidative stress, and restore ion pump activities in demyelination. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 26: 378–390.
- Chaiittianan, R., Sutthanutb, K., Rattanathongkom, A. (2017) Purple corn silk: A potential anti-obesity agent with inhibition on adipogenesis and induction on lipolysis and apoptosis in adipocytes. *Journal of Ethnopharmacology* 201: 9–16
- Clarke, M.J., Topping, L.D., Bird, R.A., Young, P.G., Cobiac, L. (2008) Effects of high-amylose maize starch and butyrylated high-amylose maize starch on azoxymethane-induced intestinal cancer in rats. *Carcinogenesis*. 29(11): 2190–2194.
- CONEVAL, Consejo Nacional de Evaluación de la Política de Desarrollo Social (2014) Construcción de las Líneas de Bienestar. Documento metodológico. Disponible en: [http://www.coneval.gob.mx/Informes/Coordinacion/INFORMES\\_Y\\_PUBLICACIONES\\_PDF/Construccion\\_lineas\\_bienestar.pdf](http://www.coneval.gob.mx/Informes/Coordinacion/INFORMES_Y_PUBLICACIONES_PDF/Construccion_lineas_bienestar.pdf). (Noviembre 2015)
- Coyle, J.C., Rodgers, R.J. (1994) Ethological evaluation of the effects of acute and chronic buspirone treatment in the murine elevated plus-maze test: Comparison with haloperidol. *Psychopharmacology*. 114: 288-96.
- Conrad, C.D., Magarinos, A.M., LeDoux, J.E., McEwen, B.S. (1999) Repeated restraint stress facilitates fear conditioning independently of causing hippocampal CA3 dendritic atrophy. *Behavioral Neuroscience*. 113(5): 902–913.
- Conrad, C.D., (2008). Chronic Stress-Induced Hippocampal Vulnerability: The Glucocorticoid Vulnerability Hypothesis. *Reviews Neuroscience*. 19(6): 395–411.
- Coyle, J.T., Henry, D. (1973) Catecholamines in foetal and newborn rat brain. *Journal of Neurochemistry*. 21: 61–67.
- Crawford, A.C., Der-Ghazarian, T., Britt, E.C., Varela, A.F., Kozanian O.O. (2013) Novelty-induced conditioned place preference, sucrose preference, and elevated plus maze behavior in adult rats after repeated exposure to methylphenidate during the preweaning period. *Behavioural Brain Research*. 246: 29–35.
- Cruz, A.P.M., Frei, F., Graeff, F.G. (1994) Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 49:171–176.
- De Pascual, T.S., Buelga, S.B., Gonzalo, R.C.J. (2002) LCMS analysis of anthocyanins from purple corn cob. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 82: 1003-1006.



- Dhabhar, S.F. (2014) Effects of stress on immune function: the good, the bad, and the beautiful. *Immunologic Research*. 58:193–210.
- Di Giacomo, C., Acquaviva, R., Santangelo, R., Sorrenti, V., Vanella, L., Li Volti, G., D’Orazio, N., Vanella, A., Galvano, F. (2012) Effect of treatment with cyanidin-3-*o*- $\beta$ -*d*-glucoside on rat ischemic/reperfusion brain damage. *Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
- Diorio, D., Viau, V., Meaney, M.J. (1993) The role of the medial prefrontal cortex (Cingulate Gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *The journal of neuroscience*. 13: 3839-3847.
- Domeney, A., Feldon J. (1998) The disruption of prepulse inhibition by social isolation in the Wistar rat: how robust is the effect?. *Pharmacology. Biochemistry and. Behavior*. 59: 883–890.
- Dreiseitel, A, Oosterhuis, B., Vukman, K.V., Schreier, P., Oehme, A., Locher, S., Hajak G., Sand P.G. (2009) Berry anthocyanins and anthocyanidins exhibit distinct affinities for the efflux transporters BCRP and MDR1. *British Journal of Pharmacology*. 158: 1942–1950.
- Duen, M., Salas, E., Cheynier, V., Dangles, O., Fulcrand, H.L. (2006). UV-visible spectroscopic investigation of the 8,8-methylmethine catechin-malvidin 3-glucoside pigments in aqueous solution: structural transformations and molecular complexation with chlorogenic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54: 89-196.
- Einon, D.F., Morgan, M.J. (1977) A critical period for social isolation in the rat. *Developmental Psychobiology*. 10: 123–132.
- Escalante, A.A., Ramírez W.B., Chávez, T.I., Hoyos, B.M., Cárdenas, F.J., Cervantes, L.J. (2013) La nixtamalización y su efecto en el contenido de antocianinas de maíces pigmentados, una revisión. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 36(4): 429.437.
- Escarabajala, M.D., Torresa, C., Flaherty, C.F. (2003) The phenomenon of one-trial tolerance to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze test is abolished by previous administration of chlordiazepoxide or buspirone. *Life Sciences*. 73: 1063–1074.
- Farías, F.R., Bustos, M.F., Moreno, S.Y., Chang, Y.K., Hernández J.G., Ríos, E. (2000) Physicochemical and rheological characteristics of commercial nixtamalised Mexican maize flours for tortillas Antocianinas. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80:657-664.
- Felgines, C., Talavera, S., Texier, O., Gil-Izquierdo, A., Lamaison, J.L., Remesy, C. (2005) Blackberry anthocyanins are mainly recovered from urine as methylated and glucuronidated conjugates in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 7721–7727.

- Fernandesa, I., Faria, A., Calhau C., de Freitas, V., Mateusa, N. (2013) Bioavailability of anthocyanins and derivatives. *Journal of Functional Foods*. 7: 54-66.
- File, S.E., Zangrossi, H.J., Sanders, F.L., Mabbutt, P.S. (1994). Raised corticosterone in the rat after exposure to the elevated plus-maze. *Psychopharmacology*. 113:543–546.
- Folha, A.A.C., Bahia, C.P., de Aguiara G.P.S., Herculano, A.M., Coelho, N.L.G., de Sousa M.B.C., Shiramizu, V.K.M., Galvão, A.C.M. (2017) Effect of chronic stress during adolescence in prefrontal cortex structure and function. *Behavioral Brain Research*. 326 44–51
- Fone, K.C.F., Porkess, M.V. (2008) Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents—Relevance to developmental neuropsychiatric disorders. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 32: 1087–1102.
- Fossen, T., Cabrita, L., Andersen, M. (1998) Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region. *Food Chemistry*. 63(4): 435-440.
- Fox, G.B., Fan, L., LeVasseur, R.A., Faden, A.(1998) Effect of traumatic brain injury on mouse spatial and nonspatial learning in the Barnes circular maze. *Journal of Neurotrauma*. 12: 1037-46.
- Fukamachi, K., Imada, T., Ohshima, Y., Xu, P., Tsuda, H. (2008) Purple corn color suppresses Ras protein level and inhibits 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary carcinogenesis in the rat. *Cancer Science*. 99(9): 1841–1846.
- Gamallo, A., Villanua, A., Trancho, G., Fraile, A., (1986) Stress adaptation and adrenal activity in isolated and crowded rats. *Physiology and Behavior*. 36: 217–221.
- Gameiro, G.H., Gameiro, P.H., Andrade, A.S., Pereira, L.F., Arthuri, M.T., Marcondes F.K., Veiga M.C.F.A. (2006) Nociception- and anxiety-like behavior in rats submitted to different periods of restraint stress. *Physiology and Behavior*. 87: 643–649.
- Gao, X., Cassidy, A., Schwarzschild, M.A., Rimm, E.B., Ascherio, A. (2012) Habitual intake of dietary flavonoids and risk of Parkinson disease. *Neurology*. 78: 1138–1145.
- Gentsch, C., Lichtsteiner, M., Kraeuchi, K., Feer, H. (1982). Different reaction patterns in individually and socially reared rats during exposures to novel environments. *Behavioural Brain Research*. 4: 45–54.
- Gentsch C., Lichtsteiner M., Feer, H. (1983) Individually housed rats exceed group-housed animals in rotational movements when exposed to a novel environment. *Experientia* 39:1412–1414.
- Gomez-Smith, M., Karthikeyan, S., Jeffers, M.S., Janik, R., Thomason, L.A., Stefanovic B., Corbett, D. (2016) A physiological characterization of the Cafeteria diet model of metabolic syndrome in the rat. *Physiology & Behavior* 167: 382–391.

- Grandin, T., Deesing, M. (2002) Distress in animals: is it fear, pain or physical stress? American Board of Veterinary Practitioners.
- Griebel, G., Moreau, J.L., Jenck, F., Martin, J.R., Misslin, R. (1993) Some critical determinants of the behavior of rats in the elevated plus maze. *Behavioral Processes*. 29:37–48.
- Groeneweg, F.L., Karst, H., de Kloet, E.R., Joels, M. (2011) Rapid non-genomic effects of corticosteroids and their role in the central stress response. *Journal of Endocrinology*. 209: 153–167.
- Gulati, K., Joshi, J.C., Ray, A. (2015) Recent advances in stress research: Focus on nitric oxide *European Journal of Pharmacology*. 765: 406–414.
- Gutierrez, J.M., Carvalho, F.B., Schetinger, M.R.C., Agostinho, P., Marisco, P.C., Vieira, J.M., Rosa, M.M., Bohnert, A., Rubina, M.A., Morscha, V.M., Spanevello, R., Mazzanti, C.M. (2014) Neuroprotective effect of anthocyanins on acetylcholinesterase activity and attenuation of scopolamine-induced amnesia in rats. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 33: 88–97.
- Hall, F.S., Humby, T., Wilkinson, L.S., Robbins, T.W. (1997) The effects of isolation rearing on preference by rats for a novel environment. *Physiology and Behavior*. 62: 299–303.
- Harm J.K., Douma, B.R., Andringa, G., Bohus, B., Korf, J., Luiten, G.M. (1997) Exposure to chronic psychosocial stress and corticosterone in the rat: effects on spatial discrimination learning and hippocampal protein kinase C $\gamma$  Immunoreactivity. *Hippocampus*. 7(4): 427-36.
- Harrison, F.E., Reiserer, R.S., Tomarken, A.J., McDonald, M.P. (2006) Spatial and nonspatial escape strategies in the Barnes maze. *Learning and Memory*. 13: 809-819.
- Harrison, F.E., Hosseini, A.H., McDonald, M.P. (2009). Endogenous anxiety and stress responses in water maze and Barnes maze spatial memory tasks. *Behavioural Brain Research*. 198: 247–251
- Harro, J. (1993) Measurement of exploratory behavior in rodents. En: Conn, P. M., ed. *Methods in neurosciences*, Vol. 14. New York: Academic Press. 359–377.
- He, F., Mu, L., Yan, G.L., Liang, N.N., Pan, Q.H., Wang, J., Reeves, M.J., Duan, C.Q. (2010) Biosynthesis of anthocyanins and their regulation in colored grapes. *Molecules*. 15(12): 9057-91.
- Heidbreder, C.A., Weiss, I.C., Domeney, A.M., Pryce, C., Homberg, J., Hedou G., Feldon J., Moran, M.C., Nelson, P. (2000) Behavioral, neurochemical and endocrinological characterization of the early social isolation syndrome. *Neuroscience*. 100(4): 749–768.

- Heim, K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya, J.D. (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 13: 572–584.
- Hernández U. J. P. (2008). Tortilla de maíz pigmentado: digestibilidad del almidón, aspectos fisicoquímicos y moleculares. Tesis. IPN.
- Herman, J.P., Schafer, M.K.H., Young, E.A., Thompson, R., Douglass, J., Akil, H., Watson, S.J. (1989) Evidence for hippocampal regulation of neuro-endocrine neurons of the hypothalamo pituitary adrenocortical axis. *The Journal of Neuroscience*. 9: 3072–3082.
- Herman J.P., Cullinan E.W., (1997). Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo–pituitary–adrenocortical axis. *Trends in Neuroscience*. 20(2): 78-84.
- Herman, J.P.; Figueiredo, H.; Mueller, N.K.; Ulrich-Lai, Y.; Ostrander, M.M., Choi, a Cullinan, W.E. (2003) Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo–pituitary–adrenocortical responsiveness., *Frontiers in Neuroendocrinology*. 24: 151–180.
- Hilakivi, L.A., Ota, M., Lister, R.G. (1989) Effect of isolation on brain monoamines and the behavior of mice in tests of exploration, locomotion, anxiety and behavioral ‘despair’. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 3: 371–374.
- Hoffman, A.N., Krigbaum, A., Ortiz, J.B., Mika, A., Hutchinson, K.M., Bimonte-Nelson, H.A., Conrad, C.D. (2011) Recovery after chronic stress within spatial reference working memory domains: correspondence with hippocampal morphology. *European Journal of Neuroscience*. 34(6): 1023–1030.
- Holson, R.R., Scallet, A.C., Ali, S.F., Turner, B.B. (1991) “Isolation stress” revisited: isolation-rearing effects depend on animal care methods. *Physiology and Behavior*. 49: 1107–1118.
- Huang, B., Wang, Z., Park H., Ryu, H., Choi, M.K., Lee, J.Y., Kang, Y.H., Lim, S.S. (2015) Anti-diabetic effect of purple corn extract on C57BL/KsJ db/db mice. *Nutrition Research and Practice*. 9(1): 22-29.
- Huynh, N.T., Krigbaum, A.M., Hanna, J.J., Conrad, C.D. (2011) Sex differences and phase of light cycle modify chronic stress effects on anxiety and depressive-like behavior. *Behavioural Brain Research*. 222(1): 212–222.
- Irani, N.G., Grotewold, E. (2005) Light-induced morphological alteration in anthocyanin-accumulating vacuoles of maize cells. *BMC Plant Biology*. 5:1-15.
- Jaganath, I., Mullen, W., Edwards, C.A., Crozier, A. (2006) The relative contribution of the small and large intestine to the absorption and metabolism of rutin in man. *Free Radical Research*. 40: 1035–1046.

- Joe, M., Karst, H., Arez, D., Heine, V.V., Qin, Y., Riel, E.V., Verkuyl, M., Lucassen, P.J., Krugers, H.J. (2005) Effects of chronic stress on structure and cell function in rat hippocampus and hypothalamus. *Stress*. 7(4): 221–231.
- Joëls, M., Baram, T.Z. (2009) The neuro-symphony of stress. *Nature Reviews Neuroscience*. 10(6): 459–466.
- Kalt, W., Blumberg, J.B., McDonald, J.E., Vinqvist-Tymchuk, V., Fillmore, S.A., Graf, B.A., O’Leary, J.M., Milbury, P.E. (2008) Identification of anthocyanins in the liver, eye, and brain of blueberry-fed pigs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56: 705–712.
- Kang, J.E., Cirrito, J.R., Dong, H., Csernansky, J.G., Holtzman, D.M. (2007) Acute stress increases interstitial fluid amyloid- $\beta$  via corticotropin-releasing factor and neuronal activity. *Proceedings of the National Academy of the Science of the United States of America*. 104 (25): 10673-10678.
- Kang, M.K., Lim, M.M., Lee, J.Y., Yeo, K.M., Kang, Y.H. (2013) Anthocyanin-Rich Purple Corn Extract Inhibit Diabetes-Associated Glomerular Angiogenesis. 8(11): e79823.
- Kaplan, M.S., Bell, D.H. (1984). Mitotic neuroblasts in the 9-day-old and 11-month-old rodent hippocampus. *The journal of neuroscience*. 4: 1429–1441.
- Kawahara, H., Yoshida, M., Yokoo, H., Nishi, M., Tanaka, M. (1993) Psychological stress increases serotonin release in the rat amigdala and prefrontal cortex assessed by in vivo microdialysis. *Neuroscience Letters*. 162: 81-84.
- Kim, J.J., Diamond, D.M. (2002) The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nature Reviews Neuroscience*. 3: 453–462
- Kim, S.M., Chung, M.J., Ha, T.J., Choi, H.N., Jang, S.J., Kim, S.O., Chun, M.C., Do, S.I., Choo, Y.K., Park, Y.I. (2012) Neuroprotective effects of black soybean anthocyanins via inactivation of ASK1–JNK/p38 pathways and mobilization of cellular sialic acids. *Life Sciences*. 90: 874–882.
- Kitraki, E., Kremmyda, O., Youlatos, D., Alexis, M., Kittas, C. (2004). Spatial performance and corticosteroid receptor status in the 21-day restraint stress paradigm. *Annals of the New York Academy of Science*. 1018: 323–327.
- Kumari, B., Kumar, A., Dhir, A. (2007) Protective effect of non-selective and selective COX-2-inhibitors in acute immobilization stress induced behavioral and biochemical alterations. *Pharmacological reports*. 59: 699-707.
- Kuroda, Y., McEwen, B.C. (1998) Effect of chronic restraint stress and tianeptine on growth factors, growth-associated protein-43 and microtubule-associated protein 2 mRNA expression in the rat hippocampus. *Molecular Brain Research*. 59: 35–39.

- Landfield, P.W., Waymire, J.C., Lynch, G. (1978) Hippocampal aging and adrenocorticoids: quantitative correlations. *Science*. 202: 1098–1102.
- Landfield, P.W., Eldridge, J.C. (1991) The glucocorticoid hypothesis of brain aging and neurodegeneration: recent modifications. *Acta Endocrinology*. 125: 54–64.
- Lanier, L.P., Issacson, L.R. (1977) Early developmental changes in the locomotor response to amphetamine and their relation to hippocampal function. *Brain Research*. 126: 567–575.
- Lapiz, M.D.S., Fulford, A., Muchimapura, S., Mason, R., Parker, T., Marsden, C.A. (2003) Influence of postweaning social isolation in the rat on brain development, conditioned behavior and neurotransmission. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 33(1): 13-29.
- Lee J. (2005) Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the ph differential method: collaborative study. *Journal of AOAC International*. 5(88): 1259-1278.
- Levine, A.S., Morley, J.E (1981) Stress-induced eating in rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 241(1): 72–6.
- Locklear, M.N., Kritzer, M.F. (2014) Assessment of the effects of sex and sex hormones on spatial cognition in adult rats using the Barnes maze. *Hormones and Behavior*. 66: 298–308.
- Logan, J.G., Barksdale D.J. (2008) Allostasis and allostatic load: expanding the discourse on stress and cardiovascular disease. *Journal of Clinical Nursing*. 17:201-208.
- Long, N., Suzuki, S., Sato, S., Naiki-Ito, A., Sakatani, K., Shirai, T., Takahashi, S. (2012) Purple corn color inhibition of prostate carcinogenesis by targeting cell growth pathways. *Cancer Science*. 104(3): 298-303.
- Lucioli, S. (2012) Anthocyanins: Mechanism of action and therapeutic efficacy. En: Capasso, A. (ed). *Medicinal Plants as Antioxidant Agents: Understanding Their Mechanism of Action and Therapeutic Efficacy*. Research Signpost Kerala, India. 27-57.
- Luine, V., Martinez, C., Villegas, M., Magarinos, A., McEwen, B.S. (1996) Restraint stress reversibly enhances spatial memory performance. *Physiology and Behavior*. 59(1): 27-32.
- Lu, L., Bao, G., Chen, H., Xia, P., Fan, X., Zhang, J., Pei, G., Maa, L. (2003) Modification of hippocampal neurogenesis and neuroplasticity by social environments. *Experimental Neurology*. 183: 600–609.
- Madrigal, J.L., Moro, M.A., Lizasoain, I., Lorenzo, P., Fernandez, A.P., Rodrigo, J., Bosca, L., Leza, J.C. (2003) Induction of cyclooxygenase-2 accounts for restraint

- stress-induced oxidative status in rat brain. *Neuropsychopharmacology*. 28: 1579–1588.
- Madrigal, S.A., Ramos Q.A., Bustos, M.F., Pizarro, O.M.P., Gutiérrez, R.G.M., Dávila, C.A., Chávez, C.P.I., Wong, R.B. (2015) Effect of different calcium sources on the bioactive compounds stability of extruded and nixtamalized blue maize flours. *Journal of Food Science and Technology*. 52(5): 2701–2710.
- Maegele, M., Lippert-gruener, M., Ester-Bode, T., Sauerland, S., Schäfer, U., Molcany, M., Lefering, R., Bouillon, B., Neiss, W.F., Angelov, D.N., Klug, N., McIntosh, T.K., Neugebauer, E.A.M. (2005) Reversal of neuromotor and cognitive dysfunction in an enriched environment combined with multimodal early onset stimulation after traumatic brain injury in rat. *Journal of Neurotrauma*. 22(7): 772-782.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., Rémésy, C. (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in human. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1: 230- 242.
- Markham, K.R., Gould, K.S., Winefield, C.S., Mitchell, K.A., Bloor, S.J., Boase, M.R. (2000) Anthocyanic vacuolar inclusions-their nature and significance in flower colouration. *Phytochemistry*. 55(4): 327-36.
- Mar-Sánchez, M., Aguado, F., Sánchez-Toscano, F., Saphier, D. (1998) Neuroendocrine and immunocytochemical demonstrations of decreased hypothalamo–pituitary–adrenal axis responsiveness to restraint stress after long-term social isolation. *Endocrinology*. 139: 579–587.
- Martirosyan, D.A., Singh, J. (2015) A new definition of functional food by FFC: what makes a new definition unique? *Functional Foods in Health and Disease*. 5(6): 209-223.
- Martin, V., Riffaud, A., Marday, T., Brouillard, C., Franc B., Tassin, J.P., Sevoz-Couche, C., Mongeau, R. Lanfumey, L. (2017) Response of Htr3a KO mice to antidepressant treatment and chronic stress. 174(15): 2471-2483
- Mazhar, H., Chandrashekar, A. (1995) Quantification and distribution of kafirins in the kernels of sorghum cultivars varying in endosperm hardness. *Journal of Cereal Science*. 21: 155-162.
- Mazza G, Miniati, E. (1993). *Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains*. Boca Raton: CRC Press.
- Mazza, D.K., Tony, C., Bruce, J.H. (2002) Absorption of Anthocyanins from Blueberries and Serum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 7731-7737.
- McEwen, B.S., Stellar, E. (1993) Stress and the individual. Mechanisms leading to disease. *Archives of Internal Medicine*. 153: 2093–2101.

- McEwen, B.S., Conrad, C.D., Kuroda, Y., M. Frankfurt, A., Magarinos, M., McKittrick C. (1997) Prevention of stress-induced morphological and cognitive consequences. *European Neuropsychopharmacology*. 7(3): 323–328.
- McEwen, B.S.,(2004). Protection and damage from acute and chronic stress. *Annals New York Academy of Sciences*. 1032: 1–7.
- McEwen, B.S. (2007) Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. *European Journal of Pharmacology*. 583: 174–185.
- McEwen, B.S. (2008) Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. *European Journal of Pharmacology*. 583: 174–185
- McGhie, T.K., Walton, M.C. (2007) The bioavailability and absorption of anthocyanins: towards a better understanding. *Molecular Nutrition and Food Research*.51: 702–713.
- McLay R.N., Freeman S.M., Zadina J.E. (1998) Chronic corticosterone impairs memory performance in the Barnes Maze. *Physiology Behavior*. 63:933–937
- Merali, Z., Khan, S., Michaud, D.S., Shippy, S.A., Anisman, H. (2004) Does amygdaloid corticotropin-releasing hormone (CRH) mediate anxiety-like behaviors? Dissociation of anxiogenic effects and CRH release. *European Journal of Neuroscience*. 20: 229–239.
- Miguel, M.A., Vázquez, A.J., de los Santos, G.G., Colín, S.M., Contreras, M.A., Cossío, V.G. (2004) Variedades criollas de maíz azul raza chalqueño. Características agronómicas y calidad de semilla. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 27(1): 9–15.
- Milbury, P.E., Kalt, W. (2010) Xenobiotic Metabolism and Berry Flavonoid Transport across the Blood-Brain Barrier. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58: 3950–3956.
- Miller, A.H., Maletic, V., Raison, C.L. (2009) Inflammation and its discontents: The role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biological psychiatry*. 65: 732–741.
- Mina, J., Yub, S.W., Baek, S.H., Naird, K.M., Bae, O.N., Bhatt, A., Kassab, M., Naird, M.G., Majida, A. (2011) Neuroprotective effect of cyanidin-3-O-glucoside anthocyanin in mice with focal cerebral ischemia. *Neuroscience Letters*. 500: 157–161.
- Mizoguchi, K., Kunishita, T., Chui, D.H., Tabira, T. (1992) Stress induces neuronal death in the hippocampus of castrated rats. *Neuroscience Letters*. 138: 157–160.



- Mizoguchi, K., Ishige, A., Aburada A.M., Tabira, T. (2003) Chronic stress attenuates glucocorticoid negative feedback: Involvement of the prefrontal cortex and hippocampus. *Neuroscience*. 119: 887–897.
- Montgomery, K.C. (1955) The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. 48: 254-60.
- Montealvo, M.G., Suárez G.J.F., López P.O., Pérez B.A. (2008) Effect of nixtamalization on morphological and rheological characteristics of maize starch. *Journal of Cereal Science*. 48: 420-425.
- Muchimapura, S., Fulford, A. J., Mason, R., Marsden. C. A. (2002) Isolation rearing in the rat disrupts the hippocampal response to stress *Neuroscience*. 112(3): 697-705.
- Murakami, S., Imbe, H., Morikawa, Y., Kubo, C., Senba, E. (2005). Chronic stress, as well as acute stress, reduces BDNF mRNA expression in the rat hippocampus but less robustly. *Neuroscience Research*. 53: 129–139.
- Morley, J.E., Levine, A.S., Rowland, N.E. (1983) Stress induced eating. *Life Sciences*. 32(19): 2169–82.
- Muñoz, C.J.M., Aguilar, C.A., Hernández, C.J. (2013). Lipid-lowering effect of maize-based traditional Mexican food on a metabolic syndrome model in rats. *Lipids in Health and Disease*. 12 (35): 1-6.
- Nabae, K., Hayashi, S., Kawabe, M., Ichihara T., Hagiwara, A., Tamano, S., Tsushima, Y., Uchida, K., Koda, T., Nakamura, M., Ogawa, K., Shirai, T. (2008) A 90-day oral toxicity study of purple corn color, a natural food colorant, in F344 rats. *Food and Chemical Toxicology*. 46: 774–780.
- Ortiz, J.B., Mathewson, C.M., Hoffman, A.N., Hanavan, P.D., Terwilliger, E.F., Conrad, C.D. (2014) Hippocampal brain-derived neurotrophic factor mediates recovery from chronic stress-induced spatial reference memory deficits. *European Journal of Neuroscience*. 40: 3351–3362.
- O’Leary T.P., Brown, R.E. (2013) Optimization of apparatus design and behavioral measures for the assessment of visuo-spatial learning and memory of mice on the Barnes maze. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 20: 85–96.
- Pacak, K., Palkovits, M., Kvetnansky, R., Matern, P., Hart, C., Kopin, I., Goldstein, D.S. (1995) Catecholaminergic inhibition by hypercortisolemia in the paraventricular nucleus of conscious rats. *Endocrinology*. 136: 4814–4819.
- Parra, C., Saldivar, S.O., Liu, H.R. (2007). Effect of processing on the phytochemical profiles and antioxidant activity of corn for production of masa, tortillas, and tortilla chips. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 4177-4183.

- Paylor, R., Zhao, Y., Libbey, M., Westphal, H., and Crawley, J.N. (2001) Learning impairments and motor dysfunctions in adult Lhx5-deficient mice displaying hippocampal disorganization. *Physiology and Behavior*. 73:781–792.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S.E., Briley, M. (1985) Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*. 14: 149–167.
- Pellow, S., File, S.E. (1986) Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacological Biochemistry and Behavior*. 24: 525-9.
- Peters, S.L., Gray, J.A., Joseph, M.H. (1991) Pre-weaning non-handling of rats disrupts latent inhibition in males, and results in persisting sex- and area-dependent increases in dopamine and serotonin turnover. *Behavioural Pharmacology*. 2: 215–23.
- Petroni, K., Pilu, R., Tonell, C. (2014) Anthocyanins in corn: a wealth of genes for human health. *Planta*. 240: 901–911.
- Pham, K., Nacher, J., Hof, P.R., McEwen, B.S. (2003) Repeated restraint stress suppresses neurogenesis and induces biphasic PSA-NCAM expression in the adult rat dentate gyrus. *European Journal of Neuroscience*. 17: 879–886.
- Pojer, E., Mattivi, F., Johnson, D., Stockley, S.C. (2013) The case for anthocyanin consumption to promote human health: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 12: 483-508.
- Pompl, P.N., Mullan M.J., Bjugstad, K., Arendash, G.W. (1999) Adaptation of the circular platform spatial memory task for mice: use in detecting cognitive impairment in the APP<sub>sw</sub> transgenic mouse model for Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience Methods*. 87: 87–95.
- Popović, N., Madrida, J.A., Rola, Maria A., Caballero-Bleda, M., Popović, M. (2010) Barnes maze performance of *Octodon degus* is gender dependent. *Behavioural Brain Research*. 212: 159–167.
- Raber, J., Rola, R., LeFevour, A., Morhardt, D., Curley, J., Mizumatsu, S., VandenBerg, S.R., Fike, J.R. (2004) Radiation-induced cognitive impairments are associated with changes in indicators of hippocampal neurogenesis. *Radiation Research*. 162: 39–47.
- Radley, J., Morilak, D., Viau, V., Campeau, S. (2015) Chronic stress and brain plasticity: Mechanisms underlying adaptive and maladaptive changes and implications for stress-related CNS disorders. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 58: 79–91
- Ramos-Escudero, F., Muñoz, A.M., Alvarado-Ortíz, C., Alvarado, A., Yañes, J.A. (2012) Purple corn (*Zea mays L.*) phenolic compounds profile and its assessment as an agent against oxidative stress in isolated mouse organs. *Journal of Medicinal Food*. 15(2): 206–215.

- Raynauda, A., Meuniera, N., Acquistapacea, A., Bombail, V. (2015) Chronic variable stress exposure in male Wistar rats affects the first step of olfactory detection. *Behavioural Brain Research*. 291: 36–45.
- Reguera, E., Madeira, Y.H., Bertrán, F.J., Sinencio, S.F. (2000) On the state of calcium in nixtamalized corn grains. *Topics in Contemporary Physics*. En: *Topics in Contemporary Physics*. Instituto Politecnico Nacional, Mexico, D.F. 219-238
- Rehman, S.U., Shah, S.A., Ali, T., Chung, J.I., Kim, M.O. (2017) Anthocyanins reversed d-galactose-induced oxidative stress and neuroinflammation mediated cognitive impairment in adult rats. *Molecular Neurobiology*. En publicación.
- Reiserer, R.S., Harrison, F.E., Syverud, D.C., McDonald, M.P. (2006) Impaired spatial learning in the APPSwe + PSEN1-E9 bigenic mouse model of Alzheimer's disease. *Genes Brain Behavior*. 6(1): 54-65.
- Robbins, T.W., Fray, P.J. (1980) Stress-induced eating: fact, fiction or misunderstanding? *Appetite*. 1(2):103–33.
- Rochin, M.S., Uribe, G.A.B., Saldivar, S.O.S., Peña, S.P., Moreno R.C., Carrillo, J.M. (2010) Phenolic content and antioxidant activity of tortillas produced from pigmented maize processed by conventional nixtamalization or extrusion cooking. *Journal of Cereal Science*. 52(3): 502–508.
- Rodgers, R.J., Cole, J.C. (1994) The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. En: Cooper, S. J.; Hendrie, C. A. eds. *Ethology and psychopharmacology*. Chichester: Wiley:9–44.
- Rodgers, R.J., Cao, B.J., Dalvi, A., Holmes, A. (1997) Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 30: 289-304.
- Rodgers, R.J., Dalvi, A. (1997) Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 21(6): 801–810.
- Rodgers, R.J., Haller, J., Holmes, A., Halasz, J., Walton, T.J., Brain, P.F. (1999) Corticosterone response to the plus-maze: high correlation with risk assessment in rats and mice. *Physiology and Behavior*. 68:47–53.
- Roosendaal, B., Brunson, K.L., Holloway, B.L., McGaugh, J.L., Baram, T.Z. (2002). Involvement of stress-released corticotropin-releasing hormone in the basolateral amygdala in regulating memory consolidation. *Proceeding of the National Academy of Science*. 99: 13908–13913.
- Sahina, T.D., Karsonb, A., Balcı, F., Yazır, Y., Bayramgürler, D., Utkana, T. (2015) TNF-alpha inhibition prevents cognitive decline and maintains hippocampal BDNF levels in the unpredictable chronic mild stress rat model of depression. *Behavioural Brain Research*. 292: 233–240.

- Salinas M.Y., Soto M.H, Martínez, F., González, H., Ortega, P. (1999) Análisis de antocianinas en maíces de grano azul y rojo provenientes de cuatro razas. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 22: 161-174.
- Salinas, Y., Bustos, F., Hernández, M., Pakza, R., Vázquez, J.L. (2003) Efecto de la nixtamalización sobre las antocianinas del grano de maíces pigmentados. *Agrociencias*. 37(6): 617-628.
- Salinas, M.Y., Cuevas, A.F., Moncada, Y.C., Villarreal, A.J., López, A.B., Montes, S.E. (2013) Caracterización física y composición química de razas de maíz de grano azul/morado de las regiones tropicales y subtropicales de Oaxaca. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 36(1): 23–31.
- Sanchez, J.J., Goodma, G.M.M., Stuber, C.W. (2000) Isozymatic and morphological diversity in the of maize of mexico. *Economic Botany*. 54(1): 43-59.
- Sandi, C., Davies, H.A., Cordero, M.I., Rodriguez, J.J., Popov, V.I., Stewart, M.G. (2003) Rapid reversal of stress induced loss of synapses in CA3 of rat hippocampus following water maze training. *European Journal of Neuroscience*. 17: 2447–2456.
- Sapolsky, R.M., Zolamorgan, S., Squire, L.R. (1991) Inhibition of glucocorticoid secretion by the hippocampal formation in the primate. *Journal of Neuroscience*. 11: 3695–3704.
- Schmitt, U., Lüddens, H., Hiemke, C. (2000) Behavioral effects of GABA<sub>A</sub> receptor stimulation and GABA-transporter inhibition. *Pharmacology biochemistry and behavior*. 65(2): 351–356.
- Serra, M., Pisu, M.G., Floris, I., Biggio, G. (2005) Social isolation-induced changes in the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in the rat. *Stress*. 8: 259–264.
- Serra, M., Sanna, E., Mostallino, M.C., Biggio, G. (2007) Social isolation stress and neuroactive steroids. *European Neuropsychopharmacology*. 17: 1-11.
- Serra, M., Pisub, G., Mostallino, M.C., Sanna, E., Biggio, G. (2008) Changes in neuroactive steroid content during social isolation stress modulate GABA<sub>A</sub> receptor plasticity and function. *Brain Research Reviews*. 57: 520–530.
- Serna-Saldívar, S.O, Amaya-Guerra, C.A. (2008) El papel de la tortilla nixtamalizada en la nutrición y la alimentación. In: *Nixtamalización del Maíz a la Tortilla. Aspectos Nutrimientales y Toxicológicos*. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México. 105-151.
- Setem, J., Pinheiro, A.P., Motta, A.V., Morato, S., Cruz, A.P.M. (1999) Ethopharmacological analysis of 5-HT ligands on the rat elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 62(3):515–521.

- Shah S.A., Ullah, I., Lee, H.Y., Kim, M.O. (2013) Anthocyanins protect against ethanol-induced neuronal apoptosis via GABA<sub>B1</sub> receptors intracellular signaling in prenatal rat hippocampal neurons. *Molecular Neurobiology*. 48: 257–269.
- Sharma, M., Cortes-Cruz, M., Ahern, K.R., McMullen, M., Brutnel, T.P., Chopra, S. (2011) Identification of the Pr1 gene product completes the anthocyanin biosynthesis pathway of maize. *Genetics*. 188: 69–79.
- Shih, P.H., Yeh, C.T, Yen, G.C. (2005) Effects of anthocyanidin on the inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human gastric adenocarcinoma cells. *Food and Chemical Toxicology*. 43(10): 1557–1566.
- Shih, P.H., Yeh, C.T., Yen, G.C. (2007) Anthocyanins induce the activation of phase II enzymes through the antioxidant response element pathway against oxidative stress induced apoptosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 9427–9435.
- Shindo, M., Kasai, T., Abe, A., Kondo, Y. (2006). Effects of dietary administration of plant-derived anthocyanins rich colors to spontaneously hypertensive rats. *Journals of Nutrition Science Vitaminol*. 53: 90-93.
- Shukitt-Hale B, Carey, A., Simon, L., Mark, D.A., Joseph, J.A. (2006) The effects of Concord grape juice on cognitive and motor deficits in aging. *Nutrition*. 22: 295–302.
- Shukitt-Hale, B., Kalt, W., Carey, A.N., Vinqvist-Tymchuk, M., McDonald, J., Joseph, J.A. (2009) Plum juice, but not dried plum powder, is effective in mitigating cognitive deficits in aged rats. *Nutrition*. 25(5): 567–73.
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2014) Cierre de la producción agrícola por cultivo. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>. (Noviembre 2014).
- Sinha, R., Jastreboff, A.M. (2013) Stress as a common risk factor for obesity and addiction. *Biological Psychiatry*. 73(9): 827–835.
- Small, C.J., Pecket, P.R. (1982) The ultrastructure of anthocyanoplasts in red-cabbage. *Planta*. 154: 97-99.
- Smith, M.A., Makino, S., Kvetnansky, R., Post, R.M. (1995) Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. *The Journal of Neuroscience*. 15(3): 1766-1777.
- Smith, J.K., Neill, J.C., Costall, B. (1997) Post-weaning housing conditions influence the behavioral effects of cocaine and d-amphetamine. *Psychopharmacology*. 131: 23–33.
- Spasojevic, N., Stefanovic, B., Jovanovic, P., Dronjak, S. (2016) Anxiety and hyperlocomotion induced by chronic unpredictable mild stress can be moderated with melatonin treatment. *Folia Biologica (praha)*. 62: 250-257.

- Srikumar, B.N., Raju, T.R., Shankaranarayana, B.S. (2007) Contrasting effects of bromocriptine on learning of a partially baited radial arm maze task in the presence and absence of restraint stress. *Psychopharmacology*. 193: 363–374.
- Strack, D., Wray, V. (1993) The anthocyanins. en: Harborne JB (ed) *The flavonoids: advances in research since 1986*. Chapman & Hall, London.
- Strathearn, E.K., Yousef, G.G., Grace, H.M., Roya, L.S., Tambe, A.M., Ferruzzi, G.M., Wud, L.Q., Simond, E.G., Lilab, A.M., Roche, J.C. (2014) Neuroprotective effects of anthocyanin- and proanthocyanidin-rich extracts in cellular models of Parkinson's disease. *Brain Research*. 1555: 60–77.
- Sunanda, R. (1995) Effect of chronic restraint stress on dendritic spines and excrescences of hippocampal CA3 pyramidal neurons. A quantitative study. *Brain Research*. 694: 312–317.
- Syme, L.A. (1973) Social isolation at weaning, some effects on two measures of activity. *Animal Learning and Behavior*. 1: 161–163.
- Tan, H., Cao, J., Zhang, J., Zuo, Z. (2014) Critical role of inflammatory cytokines in impairing. *Neuroinflammation*. 11(93): 1-10.
- Talavéra, S., Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Gil-Izquierdo, A., Lamaison, J.L., Rémésy, C. (2005). Anthocyanin metabolism in rats and their distribution to digestive area, kidney, and brain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(10): 3902–3908.
- Teresa, P.S., Ballesta, S.M.T., Viguera, G.S (2013) Anthocyanins. En: K.G. Ramawat, J.M. Mérillon (eds.). *Natural Products*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 1804-1816.
- Tishkina, A.O., Levshina, I.P., Lazareva N.A., Passikova, N.V., Stepanichev, Y.M., Ajrapetyanz, M.G., Gulyaeva, N.V. (2009) Chronic stress induces nonapoptotic neuronal death in the rat hippocampus. *Doklady Biological Sciences*. 428: 403–406.
- Tishkina, A.O., Novikovaa, M.R., Stepanicheva, M.Y., Levshina, I.P., Pasikova, N.V., Lazareva, N.A., Moiseenok, A.G., Gulyaeva, N.V. (2013) Changes in the expression of astroglial and microglial markers in the hippocampus of rats adapted to chronic stress and the effects of panthenol. *Neurochemical Journal*. 7(2): 150-158.
- Tran, T.T., Srivareerat, M., Alkadh, K.A. (2010) Chronic psychosocial stress triggers cognitive impairment in a novel at-risk model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*. 37: 756–763.
- Trofimiuk, E., Braszko, J.J. (2015) Ciproxifan differentially modifies cognitive impairment evoked by chronic stress and chronic corticosterone administration in rats. *Behavioural Brain Research*. 283: 145–153.

- Toufektsian, C.M., Lorgeril, M., Nagy, N., Salen, P., Donati, B.M., Giordano, L., Mock, H.P., Peterek, S., Matros, A., Petroni, K., Pilu, R., Rotilio, D., Tonelli, C., Leiris, J., Boucher, F., Martin, M. (2008) Chronic dietary intake of plant-derived anthocyanins protects the rat heart against ischemia-reperfusion injury. *Journal of Nutrition*. 138: 747-756.
- Torres, S.J., Nowson, C.A. (2007) Relationship between stress, eating behavior, and obesity. *Nutrition*. 23(11-12): 887-94.
- Tsigosa, C., Chrousos, G.P (2002) Hypothalamic pituitary adrenal axis neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research*. 53: 865-871
- Tuvnes, A.F., Steffenach, H.A., Murison, R., Moser, M.B., Moser, E.I. (2003) Selective hippocampal lesions do not increase adrenocortical activity. *The Journal of Neuroscience*. 23(10): 4345-4354.
- Vargas, D.F., Jiménez, A.R., López, P.Q. (2000) Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 40:173-289.
- Varty, G.B., Marsden, C.A., Higgins, G.A. (1999) Reduced synaptophysin immunoreactivity in the dentate gyrus of prepulse inhibition-impaired isolation-reared rats. *Brain Research*. 824: 197-203.
- Vasconcellos, A.P., Tabajara, A.S., Ferrari, C., Rocha, E., Dalmaz, C. (2003) Effect of chronic stress on spatial memory in rats is attenuated by lithium treatment. *Physiology and Behavior*. 79: 143-149.
- Victores, E.M.N. (2001) La producción, transformación, y comercialización de maíz azul (*zea mays* L.) en la zona Nor-oriental del Estado de México y sus perspectivas. Departamento de ingeniería agroindustrial UACH Chapingo. México. 92p.
- Walf, A.A., Frye, A.C. (2007) The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protocol*. 2(2): 322-328.
- Walker, E., Mittal, V., Tessner K. (2008) Stress and the hypothalamic pituitary adrenal axis in the developmental course of schizophrenia. *Annual Review of Clinical Psychology*. 4: 189-216.
- Wang, S.Y., Jiao, H. (2000) Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and singlet oxygen. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*. 48: 5677-5684.
- Wang, H.L., Wayner, M.J., Chai, C.Y., Lee, E.H. (1998) Corticotrophin-releasing factor produces a long-lasting enhancement of synaptic efficacy in the hippocampus. *European Journal of Neuroscience*. 10: 3428-3437.

- Wang, S.L., Stoner, G.D. (2008) Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Letters*. 269(2): 281–290.
- Watanabe, Y., Gould E., McEwen, B.S. (1992) Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Research*. 588: 341-345.
- Weisst, I.C., Pryce, C.R, Jongen-Relo, A.L., Nanz-Bahr, N.I., Feldon, J. (2004) Effect of social isolation on stress-related behavioural and neuroendocrine state in the rat. *Behavioural Brain Research*. 152: 279–295.
- Whitaker-Azmitia, P., Zhou, F., Hobin, J., Borella, A., 2000. Isolation rearing of rats produces deficits as adults in the serotonergic innervation of hippocampus. *Peptides*, 21: 1755–1759.
- Whitnal. H.M. (1993) Regulation of the hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurosecretory system. *Progress in Neurobiology*. 40(5): 573–629.
- Whitworth, J.A., Mangos, G.J., Kelly, J.J. (2000) Cushing, cortisol, and cardiovascular disease. *Hypertension*. 36(5): 912-6.
- Wielgat, P., Walesiuk, A., Braszko, J.J. (2011) Effects of chronic stress and corticosterone on sialidase activity in the rat hippocampus. *Behavioural Brain Research*. 222: 363–367.
- Wincewicz, D., Braszko, J.J. (2015) Angiotensin II AT1 receptor blockade by telmisartan reduces impairment of spatial maze performance induced by both acute and chronic stress. *Journal of the Renin Angiotensin Aldosterone System*. 16(3): 495–505.
- Wongwitdecha, N., Marsden, C.A. (1996) Social isolation increases aggressive behaviour and alters the effects of diazepam in the rat social interaction test. *Behavioural Brain Research*. 75: 27–32.
- Wright, I.K., Ismail, H., Upton, N., Marsden, C.A. (1991) Resocialization of isolation-reared rats do not alter their anxiogenic profile in the elevated X-maze model of anxiety. *Physiology and Behavior*. 50(6): 1129-1132.
- Wrolstad, R.E. (2004) Anthocyanin pigments bioactivity and coloring properties. *Journal of Food science*. 69(5): 419-424.
- Yang, Y., Mufson, E.J., Herrup, K. (2003) Neuronal cell death is preceded by cell cycle events at all stages of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*. 23(7): 2557–2563.
- Yang, Z., Chen, Z., Yuan, S., Zhai, W., Piao, X., Piao,X. (2009) Extraction and identification of anthocyanins from purple corn (*Zea mays* L.). *International Journal of Food Science and Technology*. 44: 2485-2492.



- Yang, M., Koo, S.I., Song, W.O., Chun, O.K. (2011) Food matrix affecting anthocyanin bioavailability: Review. *Current Medical Chemistry*. 18(2): 291-300.
- Yang, J.S., Perveen, S., Ha, T.J., Kim, S.Y., Yoon, S.H. (2015) Cyanidin-3-glucoside inhibits glutamate-induced  $Zn^{2+}$  signaling and neuronal cell death in cultured rat hippocampal neurons by inhibiting  $Ca^{2+}$ -induced mitochondrial depolarization and formation of reactive oxygen species. *Brain Research*. 160: 69–20.
- Yau, Y.H.C., Potenza M.N. (2013) Stress and eating behaviors. *Minerva Endocrinol*. 38(3): 255–267.
- Zhang, J., Tan, H., Jiang, W., Zuo, Z. (2014) The choice of general anesthetics may not affect neuroinflammation and impairment of learning and memory after surgery in elderly rats. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 10(1):179-89.