



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Medicina**

**Escuela Profesional de Nutrición**

**Efecto neuroprotector del cocimiento de hojuelas de  
Chenopodium quinoa (quinua) variedad negra en  
ratones sometidos a daño por etanol**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Licenciada en Nutrición

**AUTOR**

Lizeth Alicia PALOMINO SIERRA

**ASESOR**

Oscar Gustavo HUAMÁN GUTIÉRREZ

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Palomino, L. Efecto neuroprotector del cocimiento de hojuelas de *Chenopodium quinoa* (quinua) variedad negra en ratones sometidos a daño por etanol [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina, Escuela Profesional de Nutrición; 2019.

---



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**  
Universidad del Perú. Decana de América

Vicerrectorado de Investigación y Posgrado  
Dirección General de Biblioteca y Publicaciones

Dirección del Sistema de Bibliotecas y Biblioteca Central



### **Hoja de metadatos complementarios**

- **Código ORCID del autor: (Dato opcional)**

- **Código ORCID del asesor: (Dato obligatorio):**

0000 – 0002 – 6224 – 9165

- **DNI del autor:**

72522675

- **Grupo de Investigación:**

Salutaris Cibus e Plantae

- **Institución que financia parcial o totalmente la investigación:**

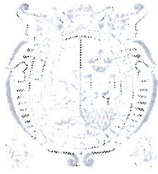
Vicerrectorado de Investigación y Posgrado

- **Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación Debe incluir localidades y/o coordenadas geográficas:**

Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición

- **Año o rango de años que la investigación abarcó:**

2017 – 2019



Universidad Nacional Mayor de San Marcos  
Universidad del Perú. Decana de América  
Facultad de Medicina



Escuela Profesional de Nutrición

"Año de la Lucha contra la Corrupción y la Impunidad"

**ACTA N° 017 DE EXAMEN DE TITULACIÓN  
MODALIDAD DE SUSTENTACIÓN DE TESIS**

Conforme a lo estipulado en el artículo 45° de la Ley Universitaria 30220, el Jurado de Sustentación nombrado por el Comité de Gestión y la Dirección de la Escuela Profesional de Nutrición, conformado por las siguientes Docentes:

Presidente: Mg. Henry Guija Guerra  
Miembros: Lic. Olga Patricia Palomo Luck  
Mg. Martha Pilar Pastrana Poma  
Asesor: Mg. Oscar Gustavo Huamán Gutiérrez

Se reunió en la ciudad de Lima, el día miércoles 24 de julio del 2019, para proceder a evaluar la Sustentación de Tesis para Optar el Título Profesional de Licenciada en Nutrición de la bachiller:

**LIZETH ALICIA PALOMINO SIERRA**

Código de Matricula N° 11010551

Tesis: "Efecto neuroprotector del cocimiento de hojuelas de *chenopodium quinoa* (quinua) variedad negra en ratones sometidos a daño por etanol"  
(Aprobado con RD N° 02730-D-FM-2016)

La mencionada bachiller aprueba el examen de titulación, mediante la modalidad de sustentación de tesis, obteniendo la calificación de:

..... *DIECISIETE* ..... (En letras)

Estando de acuerdo con la presente acta, el Jurado de Sustentación firma en señal de conformidad.

.....  
Mg. Henry Guija Guerra  
Presidente

.....  
Lic. Olga Patricia Palomo Luck  
Miembro

.....  
Mg. Martha Pilar Pastrana Poma  
Miembro

.....  
Mg. Oscar Gustavo Huamán Gutiérrez  
Asesor



DH02/desa

## **DEDICATORIA**

A Dios por ser mi fortaleza en todo momento, por guiar mis pasos y permitirme lograr metas preciadas.

A mis padres, Rosa y Tino, por sus consejos, su apoyo incondicional y su gran esfuerzo por verme crecer profesionalmente, todo es gracias a ellos.

A mis abuelitas que desde el cielo he sentido su gran cariño y apoyo.

A mi familia que me mostraron apoyo y aliento en esta etapa.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi asesor el Mg. Oscar Huamán Gutiérrez por su gran apoyo, tiempo y confianza brindada para la elaboración de esta tesis.

A mi alma máter, a la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, la Escuela Profesional de Nutrición, por haberme aceptado ser parte de ella, por las enseñanzas y conocimientos brindados.

Al Dr. Hugo Castro por el asesoramiento y cordialidad en las lecturas histológicas.

Al Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición de la UNMSM, por el espacio brindado para el desarrollo de esta tesis.

## ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	10
2.1 Hipótesis .....	10
2.2. Objetivos .....	10
III. MÉTODO.....	11
3.1. Tipo de estudio.....	11
3.2. Materiales.....	11
3.3. Muestra de estudio y unidad de análisis .....	11
3.4. Variables .....	11
3.5. Prueba piloto .....	12
3.6. Método experimental .....	13
3.7 Determinación del marcador histológico .....	15
3.8 Determinación de los marcadores bioquímicos .....	15
3.8.1. Determinación de la lipoperoxidación .....	15
3.8.2 Determinación de Glutación (GSH) .....	17
3.9 Análisis de datos .....	18
3.10. Ética del estudio .....	18
IV. RESULTADOS .....	19
4.1 Niveles de lipoperoxidación en tejido cerebral.....	19
4.2 Niveles de glutación en tejido cerebral .....	20
4.3 Cambios histológicos del tejido nervioso .....	21
V. DISCUSIÓN .....	27
VI. CONCLUSIONES.....	36
VII. RECOMENDACIONES.....	37
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	38
ANEXOS.....	48



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Nivel de Lipoperoxidación en homogenizado de cerebro según grupo de tratamiento.....	19
Tabla 2: Nivel de Glutación (GSH) en homogenizado de cerebro de ratones según grupo de tratamiento.....	20

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Células piramidales de la corteza cerebral del grupo I (sin tratamiento) Tinción H-E 40 x'.....	21
Figura 2: Células gigantes de la corteza cerebral del grupo I (sin tratamiento) Tinción H-E 40 x'.....	21
Figura 3: Cerebelo del grupo I (sin tratamiento). Tinción H-E 40 x'.....	22
Figura 4: Células gigantes de la corteza cerebral del grupo II (daño inducido por etanol) Tinción H-E 40 x'.....	22
Figura 5: Células piramidales de la corteza cerebral del grupo II (daño inducido por etanol) Tinción H-E 40 x'.....	22
Figura 6: Cerebelo del grupo II (daño inducido por etanol). Tinción H-E 40 x'.....	23
Figura 7: Células gigantes del grupo III (vitamina E /etanol). Tinción H-E 40 x'.....	23
Figura 8: Células piramidales del grupo III (vitamina E /etanol). Tinción H-E 40 x'.....	23
Figura 9: Cerebelo del grupo III (vitamina E /etanol), Tinción H-E 40 x'.....	24
Figura 10 Células piramidales del grupo IV (cocimiento de quinua 5mg/kg /etanol) . Tinción H-E 40 x'.....	24
Figura 11: Células gigantes del grupo IV (cocimiento de quinua 5mg/kg /etanol). Tinción H-E 40 x'.....	24
Figura 12: Cerebelo del grupo IV (cocimiento de quinua 5mg/kg /etanol), Tinción H-E 40 x'.....	25
Figura 13: Células gigantes de la corteza cerebral del grupo V (cocimiento de quinua 15mg/kg /etanol). Tinción H-E 40 x'.....	25
Figura 14: Células piramidales de la corteza cerebral del grupo V (cocimiento de quinua 15mg/kg /etanol). Tinción H-E 40 x'.....	25
Figura 15: Cerebelo del grupo V (cocimiento de quinua 15mg/kg /etanol). Tinción H-E 40 x'.....	26
Figura 16: Cerebelo del grupo V (cocimiento de quinua 15mg/kg /etanol). Tinción H-E 40 x'.....	26

## INDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Flujograma de la preparación del cocimiento de hojuelas de <i>Chenopodium quinoa</i> (quinua) variedad negra .....	48
Anexo 2: Flujograma del diseño experimental.....	49

## RESUMEN

**Introducción:** Las enfermedades neurodegenerativas es un problema de salud mundial que establece un daño oxidativo donde se incrementa la cantidad de especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN), las cuales pueden ser el resultado u origen de las mismas. El consumo de muchos granos se ha asociado a un menor riesgo de enfermedades neurodegenerativas, teniendo la *Chenopodium quinoa* (quinua) poseedor de un buen nivel de compuestos fenólicos totales, sustancias de capacidad antioxidante. **Objetivos:** Determinar el efecto neuroprotector del cocimiento de hojuelas de *Chenopodium quinoa* (quinua) variedad negra en ratones sometidos a daño por etanol. **Materiales y métodos:** Estudio experimental, analítico, longitudinal y prospectivo. Se utilizaron 30 ratones machos *Mus Musculus* de 3 meses de edad y hojuelas de *Chenopodium quinoa* (quinua) variedad negra. Los grupos en tratamiento recibieron una dieta balanceada y agua *ad libitum*. Recibieron por vía peroral: grupo I y II: medio coloidal 10mL/kg, grupo III: vitamina E 15 UI/kg, grupo IV: cocimiento de hojuelas de quinua negra a dosis de 5ml/kg y grupo V: cocimiento de hojuelas de quinua negra a dosis de 15ml/kg; administrando después de 30 minutos etanol 1,8 g/kg (40% v / v) vía Intraperitoneal. Concluido el tratamiento después de 14 días fueron llevados a ayuno de 12 horas y anestesiados con Pentobarbital a dosis letal, extrayéndose los cerebros y masa encefálica, los cuales se lavaron con suero fisiológico, usando el hemisferio izquierdo para el análisis bioquímico y el hemisferio derecho para estudio histológico. **Resultados:** La administración del cocimiento de hojuelas de *Chenopodium quinoa* (quinua) variedad negra presentaron menores niveles de lipoperoxidación comparado con el grupo II siendo significativo solo con el grupo IV; los niveles de glutatión mostraron niveles similares al grupo II, y en relación a los cambios histológicos se observa una mejora leve en los grupos IV y V en comparación con el grupo II. **Conclusiones:** La administración del cocimiento de hojuelas de *Chenopodium quinoa* (quinua) variedad negra promueve efecto neuroprotector en el indicador bioquímico (lipoperoxidación) e histológico en ratones inducidos a daño por etanol.

**Palabras clave:** *Chenopodium quinoa*. (quinua), Neuroprotección, estrés oxidativo, lipoperoxidación, glutatión, etanol.

## ABSTRACT

**Introduction:** Neurodegenerative diseases is a global health problem that establishes an oxidative damage where the number of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (ERN) increases, which can be the result or origin of them. The consumption of many grains has been associated with a lower risk of neurodegenerative diseases, with *Chenopodium quinoa* (quinoa) having a good level of total phenolic compounds, substances of antioxidant capacity. **Objectives:** To determine the neuroprotective effect of leaflet *Chenopodium quinoa* (quinoa) black breeding in mice subjected to ethanol damage. **Materials and methods:** Experimental, analytical, longitudinal and prospective study. We used 30 3-month-old Mus Musculus male mice and *Chenopodium quinoa* (quinoa) black variety flakes. The groups under treatment received a balanced diet and water *ad libitum*. They received perorally: group I and II: colloidal medium 10mL / kg, group III: vitamin E 15 IU / kg, group IV: cooking of black quinoa flakes at a dose of 5ml / kg and group V: cooking of quinoa flakes black at a dose of 15ml / kg; administering after 30 minutes ethanol 1.8 g / kg (40% v / v) via Intraperitoneal. Concluded the treatment after 14 days were taken to fasting for 12 hours and anesthetized with Pentobarbital at a lethal dose, extracting the brains and brain mass, which were washed with saline, using the left hemisphere for biochemical analysis and the right hemisphere for histological study. **Results:** The administration of the *Chenopodium quinoa* flakes (quinoa) black variety showed lower levels of lipoperoxidation compared with group II, being significant only with group IV; glutathione levels showed levels similar to group II, and in relation to histological changes a slight improvement was observed in groups IV and V compared to group II. **Conclusions:** *Chenopodium quinoa* (black quinoa) leaflet administration promotes neuroprotective effect in the biochemical (lipoperoxidation) and histological indicator in mice induced to damage by ethanol.

**Keywords:** *Chenopodium quinoa*. (quinoa), Neuroprotection, oxidative stress, lipoperoxidation, glutathione, ethanol.

## I. INTRODUCCIÓN

La prevalencia de enfermedades neurodegenerativas se ha incrementado de forma progresiva con la edad de la población. En el presente siglo se está observando un cambio demográfico importante “el envejecimiento de la población”. (1) El Perú no está ajeno a este fenómeno, en Lima la proporción de personas mayores de 60 años ha aumentado, siendo uno por cada diez habitantes y que en la próxima década esta población se duplicará, teniendo que enfrentar el cuidado y atención al adulto mayor, en especial al que padece alguna enfermedad neurodegenerativa. (2)

Las enfermedades neurodegenerativas es un problema de salud mundial, (3) tienen como particularidad el curso progresivo de sus síntomas, reflejo del deterioro paulatino de una parte o partes del sistema nervioso; generando un terrible padecimiento físico y psíquico entre el paciente y sus familiares (4), constituyendo como la principal contribuidora de discapacidad en la población. (1) Sus intervenciones se concentran, en aliviar el dolor, la incapacidad y las posibles complicaciones que aminoran la calidad de vida. Estas enfermedades requieren una atención que sume a la ofrecida a nivel hospitalario (4) y que sea abordado sin demora. (3)

La población de “ancianos” experimenta el curso irreversible del envejecimiento en donde las células se ven expuestas a un deterioro morfofuncional que puede acarrearlas hacia a la muerte. (5) El tejido cerebral acumula más estrés oxidativo con la edad, el cual se considera como un factor trascendente en el desarrollo y la patogénesis de la distinta variedad de enfermedades neurodegenerativas. (6) Dentro de estas encontramos al Parkinson, Alzheimer y la esclerosis múltiple, entre otras, que se diferencian por su evolución crónica, degenerativa y progresiva. (7)

La elevada incidencia de disfunción neurológica relacionada a diversos eventos clínicos y la comprobación de productos naturales que coadyuvan en las estrategias terapéuticas, han motivado distintos estudios para una identificación y demostración del efecto neuroprotector de la diversa riqueza de recursos naturales que tenemos.(8)

El consumo de muchos granos se ha asociado con un menor riesgo de enfermedades degenerativas (9) siendo la *Chenopodium quinoa* (quinua) poseedor de un buen nivel de compuestos fenólicos totales, presentando estas sustancias bioactivas capacidad antioxidante.(10) La quinua variedad negra presenta el contenido más elevado de vitamina E, compuestos fenólicos y actividad antioxidante comparada con la quinua variedad blanca. (11) Distintas investigaciones han surgido sobre los componentes químicos de la quinua y propiedades terapéuticas, haciendo que desempeñe un papel importante en el tratamiento y prevención de enfermedades como “alimento funcional”. (12)

En estudios demográficos reportan el aumento significativo de la población mayor de 60 años, siendo del 12 al 15% en países desarrollados, y en países en vías de desarrollo como el Perú representa el 7,4%, del cual se espera que llegué a un 12% para el año 2025. (13) La enfermedad de Alzheimer, perjudica a uno de cada diez adultos mayores de 65 años y a la mitad de adultos mayores de 80 años. En el Perú existen unas 250 000 personas damnificadas por esta enfermedad y solo en Lima existen alrededor de 75 000 enfermos. Se piensa que por cada paciente de Alzheimer, cinco personas se ven dolientes, correspondiendo al núcleo familiar. (2)

El sistema nervioso está organizado por el sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP). El SNC consiste en el encéfalo y la médula espinal y el SNP está conformado por nervios craneales, espinales y periféricos que canalizan impulsos desde el SNC y hacia el mismo. (14) El encéfalo está conformado por los hemisferios cerebrales, cerebelo, diencéfalo, mesencéfalo, bulbo raquídeo y protuberancia. (15)

El tejido nervioso está conformado por las neuronas y las células de sostén. La unidad funcional del tejido nervioso es la neurona y se compone de un cuerpo celular y otras prolongaciones de longitudes variables. (14) Las neuronas no se dividen; empero, en el encéfalo están presentes células madre nerviosas que son calificadas para diferenciarse y reemplazar neuronas dañadas. (14) (16)

Las células de sostén están en contacto estrecho con las neuronas, en el SNC se les llama células neuróglícas, neuroglía o sólo glía. Estos pueden ser de cuatro tipos: oligodendrocitos, astrocitos, microglíocitos y células endoteliales. (14) Se estima que por cada neurona hay 10 glías que brindan un microambiente ideal hacia las neuronas. (16)

La corteza cerebral está conformado por seis capas: capa plexiforme, capa de neuronas piramidales pequeñas, capa de neuronas piramidales medianas, capa de células granulosas, capa de neuronas piramidales grandes y la capa de neuronas polimorfas. (14) (17) El cerebelo se localiza la capa molecular y la capa celular granulosa; en límites de ambas se encuentran las células de Purkinje. (14)

Las enfermedades neurodegenerativas tienen características clínicas muy distintas pero comparten la misma vía de muerte celular, la apoptosis. (7) La etiología de las enfermedades neurodegenerativas no se debe a un solo mecanismo, estas vías ejercerían de forma sinérgica, mediante múltiples interacciones que desencadenan la neurodegeneración. (18)

Siendo diversos factores que desencadenan y aceleran los trastornos neurodegenerativos, teniendo como resultado una patología multifactorial (18) siendo en común el daño por oxidación, (7) el cual está asociado al incremento de generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, (19) disfunción mitocondrial, inestabilidad de algunos cationes metálicos, agregación peptídica y proteica, inflamación, excitotoxicidad, factores genéticos o pérdida de soporte trófico, (18) que cooperan al incremento del estrés oxidativo dirigiendo a un deterioro cerebral progresivo. (19)



La condición de estrés oxidativo evidencia un papel crítico en la fisiopatología de enfermedades neurodegenerativas (19) o situaciones traumáticas. El Alzheimer, Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica e isquemia-reperfusión, entre otras, van acompañadas por un notable aumento de formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN), pudiendo ser la consecuencia o la causa de las mismas. (18)

El tejido nervioso es vulnerable al daño oxidativo debido a factores causales entre ellos por la incrementada actividad metabólica oxidativa, la existencia de un alto contenido de lípidos poliinsaturados oxidables, la numerosa concentración de cationes metálicos ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ), la limitada capacidad antioxidante, la baja regeneración celular y formación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , teniendo en consecuencia la injuria celular. (18) (20)

En la condición patológica de la neurodegeneración se establece la participación de estrés oxidativo en el aumento de la producción de ROS. (19) (21) Este evento induce a las neuronas presinápticas que liberen glutamato, neurotransmisor excitatorio, que es captado por el receptor glutamatérgico ionotrópico en la neurona posináptica; la sobreactivación exagerada de glutamato unida a las especies reactivas, elevaría los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ , activando a las fosfolipasas, proteasas, endonucleasas, y la sintasa de óxido nítrico (NOS) promoviendo la lipoperoxidación. (22) (23)

Los astrocitos usualmente perciben glutamato y lo transfieren a las neuronas en la manera de su precursor, glutamina, sin embargo en presencia de estrés oxidativo los astrocitos dispersan glutamato y óxido nítrico, aumentando y ampliando el daño a las neuronas cercanas. (22) En la neurodegeneración la inflamación sucede como una respuesta en los astrocitos y microglia activada, donde pierden su regulación y se transforma en un poderoso componente de destrucción neuronal. (19) Las células microgliales son inmunoefectoras que se estimulan por destrucción o por alteración en el microambiente liberando una serie de productos

citotóxicos (ROS, NO y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), factores proinflamatorios que provocan lesión y muerte neuronal. (22) (24)

La apoptosis es un fenómeno natural en el SNC, pero en una situación fisiopatológica como son las enfermedades neurodegenerativas los mecanismos de apoptosis son los causantes de la disfunción y muerte neuronal y/o glial. (7) Las ROS consiguen estimular la apoptosis por la activación de caspasas, de genes apoptóticos y de enzimas líticas, mientras que la necrosis es un proceso pasivo frente a la agresión que involucra un incremento de los niveles de calcio, deficiencia en la regulación de ATP desencadenando ingreso masivo de agua y Na<sup>+</sup> que desencadena en la formación de edemas a nivel celular. (22)

La excitotoxicidad es provocada por el incremento de la activación de receptores glutamatérgicos ionotrópicos (NMDA, kainato, o AMPA) causando la muerte neuronal. El glutamato es un neurotóxico mediado principalmente por el receptor NMDA, su potente activación lleva una retroalimentación negativa por la formación de ROS y nitrosilación proteica. (22) (25)

El etanol es metabolizado principalmente por oxidación, convirtiéndose en acetaldehído, por medio del sistema enzimático: alcohol deshidrogenasa (ADH), el citocromo P-4502E1 (CYP2E1) y la catalasa (CAT). (26) En el organismo, el etanol se metaboliza en dos procesos: la primera donde se genera acetaldehído, y la segunda donde se modifica el acetaldehído en ácido acético, por acción del acetaldehído deshidrogenasa (ALDH). (27)

En el hígado actúa principalmente la isozima ADH de la clase I que interviene en la oxidación del etanol, pero en el cerebro presenta una acción limitada. (28) En el ser humano y ratones la isoforma predominante en el cerebro es la clase III, (27) el cual tiene una distribución amplia en el cerebro localizándose en la capa subependimal y las áreas perivasculares de la corteza cerebral, el subcórtez, el tallo cerebral y el cerebelo. (28)

Los citocromos que pertenecen al sistema microsomal de oxidación del etanol (MEOS), específicamente el citocromo P-450 (CYP-450) están situados en la glía y neuronas. (28) Son responsables de un 20% del metabolismo cerebral del etanol, teniendo consecuencias funcionales relevantes por su vinculación a toxicidad de etanol y modificación de membranas neuronales. (27) (26) Sin embargo, la principal responsable es la catalasa participando un 60% en la oxidación de etanol a acetaldehído. (26)

La quinua, una planta de hoja ancha que sus semillas se han utilizado como los cereales, son comúnmente de color amarillo pálido, pero puede variar a colores rosa o negro. (29) Dentro de las antiguas culturas de los Andes es considerada como uno de los primordiales alimentos (30) llamada “el grano madre” por los incas. (29) (31)

Según el Instituto de Innovación Agraria la quinua tiene la siguiente clasificación taxonómica (32)

Reino: Vegetal

División: Fanerógamas

Clase: Dicotiledóneas

Sub clase: Angiospermas

Orden: Centrospermales

Familia: Chenopodiáceae

Género: *Chenopodium*

Sección: Chenopodia

Subsección: Cellulata

Especie: *Chenopodium quinoa* Willdenow

La calidad nutricional del grano es importante contienen entre el 16 al 20% de proteínas (30) y posee todos los aminoácidos (31) sumando la característica que el grano, las hojas y las inflorescencias de la quinua presenta proteínas de muy buena calidad. (30)

La quinua presenta dentro de su composición a la fenilalanina, considerado un estimulante cerebral y principal neurotransmisor, a la treonina que participa en la desintoxicación hepática, el triptófano que es precursor directo del neurotransmisor serotonina utilizado con notoriedad en situación de depresión, estrés y ansiedad. (30)

Con respecto a los ácidos grasos el 11% son saturados y alrededor del 82,71% son ácidos grasos insaturados, contiene omega 6 (ácido linoleico) un 50,24%, omega 9 (ácido oleico) un 26,04% y omega 3 (ácido linolénico) un 4,77% lo cual puede reducir el colesterol LDL del organismo y elevar el colesterol HDL. (30) La quinua muestra ventaja con los cereales en minerales como fósforo, magnesio, potasio, hierro, zinc y en algunas variedades en calcio y manganeso, (31) también es una buena fuente de riboflavina, tiamina, ácido fólico, (33) niacina, vitaminas A, C, D y E. (31)

Las semillas de quinua contienen cantidades significativas de fitoquímicos incluyendo flavonoides, ácidos fenólicos, esqualeno, fitoesteroles, (34) ecdisteroides, fagopiritoles, carotenoides, vitamina C, polifenoles, betalaínas, antocianinas, indicados por ser beneficiosos para la salud. (33) (35) Sin embargo, un autor refiere que la presencia de betalaínas es excluyente de las antocianinas. (36)

Los ácidos fenólicos presentes en la quinua son: los ácidos cafeico, ferúlico, p-cumárico, p-OH-benzoico, vanilínico, gálico y cinámico; la presencia de flavonoides está conformado por quercetina y kempferol; sin embargo, otras variedades de quinua presentan orientina, vitexina y rutina. La *Chenopodium quinoa* variedad negra contiene una mayor presencia de isoflavonas, compuestos bioactivos, consideradas protectoras de la salud. (33) (37)

En el 2007 Yawadio y colaboradores evaluaron la potencia antioxidante del extracto etanólico de dos ecotipos de semillas de quinua: el tipo Japón, nivel del mar y el tipo Bolivia, Altiplano; teniendo como resultado que el ecotipo Japón tiene

mayor contenido de fenoles y capacidad antioxidante en el ensayo de poder de reducción antioxidante del hierro (FRAP) y en el método de  $\beta$ -caroteno, mientras el ecotipo Bolivia presenta mayor actividad antioxidante en el ensayo de DPPH; dando la posibilidad que ambas semillas podrían ser ricos en fitonutrientes que actúan como poderoso antioxidantes en la dieta. (9)

En un estudio realizado en el 2010 por Carrasco sobre los flavonoides y compuestos fenólicos en granos indígenas como la quinua, tuvo como resultado el alto contenido de los flavonoides como la quercetina y kaempferol superiores a los de bayas como el arándano rojo, se resalta el beneficio de los flavonoides en la reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares, cánceres, enfermedades neurodegenerativas, diabetes y osteoporosis. (37)

En otro estudio mencionan sobre las evidencias que tienen los flavonoides al proteger la integridad y funcionalidad neuronal, la prevención del incremento de ROS y de peroxidación lipídica en el hipocampo de ratas. Se menciona también que la quercetina (flavonoide) presenta elevada acción antioxidante resultando 5 veces mayor comparado con la vitamina E y C. (38)

En el 2011 mediante una revisión sobre las propiedades antioxidantes y neuroprotectoras de los polifenoles de arándanos se menciona el efecto favorable en modelo de animales y que la suplementación con jugo de arándano durante 12 semanas a nueve sujetos ancianos mejoró significativamente los resultados en pruebas de memoria, aunque no significativa, resaltando que dentro de la familia de los polifenoles hay varios compuestos tales como los flavonoides, que incluyen antocianinas que podrían inducir estos cambios. (39)

Diversas investigaciones han comparado las semillas dulces y amargas de quinua (provenientes de Ecuador y Perú respectivamente) y se demostró que las semillas de quinua amarga tiene mayor actividad antioxidante comparadas con las semillas de quinua dulce. En ambos casos se redujo después de la cocción; mientras que la capacidad antioxidante para la quinua dulce dependía de los

compuestos carotenoides, fenólicos y flavonoides; mientras para la quinua amarga se debía solo a estos dos últimos, afirmando que el consumo de estos granos andinos son útiles para la salud y que ambas variedades son fuente de antioxidantes. (40)

Investigaciones por Brend en el 2012 evaluaron el contenido fenólico total y la actividad antioxidante de la quinua roja y amarilla afectadas por horneado y cocción donde se mostró que las semillas de quinua cocida y horneados conservan la mayor parte de esos indicadores; siendo las semillas de quinua roja quienes conservan en mayor nivel y podría ser considerada un alimento funcional, a parte de su uso en la dieta; sugiriendo investigaciones para verificar que las semillas de quinua de color se pueden utilizar para la gestión y la prevención de enfermedades degenerativas. (41)

En un estudio se evaluó las propiedades antioxidantes de semillas de quinua procedente de Puno antes y después de la cocción en el agua; las semillas eran de diferentes colores (rojo, blanco, negro y gris) teniendo como resultado que en la cocción aumenta la cantidad de compuesto fenólico, especialmente en el caso de las semillas grises.(42)

En el 2015 Hernández menciona que la quinua es una alternativa en la nutrición de la persona diabética debido a que contiene carbohidratos con índice glucémico bajo siendo beneficioso al organismo por los antioxidantes que contiene y el papel en mejora de las enfermedades degenerativas como el Alzheimer, enfermedades cardiovasculares, el cáncer, la artritis, la Diabetes Mellitus y la osteoporosis. (31)

## II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1 Hipótesis

La ingesta del cocimiento de hojuelas de *Chenopodium quinoa* (quinua) variedad negra posee efecto neuroprotector en ratones sometidos a daño por etanol.

### 2.2. Objetivos

#### a) Objetivo general

Determinar el efecto neuroprotector del cocimiento de hojuelas de *Chenopodium quinoa* (quinua) variedad negra en ratones sometidos a daño por etanol.

#### b) Objetivos específicos

- Determinar el efecto del cocimiento de hojuelas de *Chenopodium quinoa* (quinua) variedad negra sobre marcadores bioquímicos del estrés oxidativo en el tejido nervioso en ratones sometidos a daño por etanol.
- Describir el efecto del cocimiento de hojuelas de *Chenopodium quinoa* (quinua) variedad negra sobre la morfología del cerebro y cerebelo en ratones sometidos a daño por etanol.

### III. MÉTODO

#### 3.1. Tipo de estudio

Según Argimon, el estudio es experimental, analítico, longitudinal y prospectivo (43)

#### 3.2. Materiales

##### 3.2.1 Material biológico

- Hojuelas de *Chenopodium quinoa* (variedad negra).
- Ratones machos *Mus musculus* de tres meses de edad.

##### 3.2.2 Reactivos

- 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) Sigma®
- Ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) Sigma®
- Ácido tricloroacético (TCA) Sigma®
- Ácido Etildiaminotetraacético (EDTA) Sigma®
- Buffer fosfato 0,01 M pH 7,4
- Etanol, metanol absoluto SPECTRUM®
- Vitesol E® 400, D-alfatocoferol acetato (equivalente a vitamina E 400 UI)

#### 3.3. Muestra de estudio y unidad de análisis

Se utilizaron 30 ratones machos *Mus musculus* de  $29,0 \pm 3,1$  g de peso y de tres meses de edad.

#### 3.4. Variables

- **Variable independiente:**

**Cocimiento de hojuelas de *Chenopodium quinoa* (quinua) variedad negra:** de cocción de hojuelas de quinua negra el cual se agregó maicena y azúcar. (44)



- **Variable dependiente:**

**Efecto neuroprotector:** “Efecto que tiene por objeto prevenir, retrasar o mitigar los procesos neurodegenerativos y evita la pérdida de neuronas, interfiriendo en la cascada de eventos celulares que producen la muerte celular, tales como el aumento del estrés oxidativo, liberación de neurotransmisores excitatorios, aumento de calcio, producción de productos tóxicos que incluyen óxido nítrico y activación de fosfolipasas”. (45) (46)

### 3.4.1 Definición operacional de variables

Variables	Dimensión	Indicadores	Puntos de corte	Escala de medición
Variable independiente: Cocimiento de hojuelas de <i>Chenopodium quinoa</i> (quinua) variedad negra	---	Ingesta del cocimiento de hojuelas de <i>Chenopodium quinoa</i> (quinua) variedad negra	Dosis: 5 mL/kg 15 mL/kg  Concentración: 5,3% w/v aprox.	Numérica
Variable dependiente: Efecto neuroprotector	Marcadores bioquímicos del estrés oxidativo	% del incremento del glutatión	Comparado con el grupo control (Grupo II)	Numérica (µg/g)
		% de inhibición de lipoperoxidación		Numérica (nmol/g)
	Modificación de los cambios morfológicos del tejido cerebral	Cambios histológicos		Nominal-Cualitativo

### 3.5. Prueba piloto

Se realizó una prueba piloto con motivo de detectar y descartar probables dificultades en la administración, la concentración y dosis del cocimiento de hojuelas de *Chenopodium quinoa* (quinua) variedad negra.

### **3.6. Método experimental**

#### **3.6.1. Obtención y preparación del cocimiento de hojuelas**

Las hojuelas de *Chenopodium quinoa* (quinua) variedad negra fueron adquiridas en el mes de enero en la “Feria de los deseos” ubicada en el distrito de Jesús María, el cual procede de la región Puno.

La preparación del cocimiento de hojuelas de *Chenopodium quinoa* (quinua) variedad negra se realizó diariamente, la cual empleó 50 g de las hojuelas de quinua variedad negra con 1 000 mL de agua por 15 minutos a 80°C, posteriormente se agregó 60 g de azúcar por 4 minutos con movimiento constante luego se añadió 10 g de maicena previamente suspendida en agua fría, formando una suspensión de gel, siendo el volumen final de 1 000 mL y una concentración final de hojuelas del 5 % w/v aproximadamente. (Ver anexo 1).

Para los controles se preparó un medio coloidal con los ingredientes empleados en la preparación anterior excepto por la hojuelas de quinua negra, teniendo un volumen final de 1 000 mL.

#### **3.6.2. Condicionamiento y aclimatación de los animales**

Se emplearon ratones machos *Mus musculus* obtenidos del bioterio de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM). Fueron aclimatados en las instalaciones del bioterio de la Facultad de medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, aislados en jaulas de rejillas metálicas, a temperatura de 22 °C aproximadamente, con ciclos alternados de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, con libre acceso de agua *ad libitum* y alimento balanceado del Centro de Producción de la UNALM.

Los pesos fueron registrados de forma interdiaria durante el acondicionamiento y tratamiento.

### 3.6.3. Ensayo experimental

Para inducir a la neurodegeneración, los ratones recibieron etanol a una dosis de 1,8 g/kg por vía intraperitoneal de una solución al 40%, método empleado por Witte y Bada.<sup>38</sup> (47)

Los ratones fueron distribuidos aleatoriamente en cinco grupos (n=6), recibiendo por 14 días los siguientes tratamientos: (Ver anexo 2)

**Grupo I:** 10 mL/kg del medio coloidal vía peroral y 30 minutos después se administró suero fisiológico 1,8 g/kg vía intraperitoneal.

**Grupo II:** 10 mL/kg de medio coloidal vía peroral y 30 minutos después se administró etanol 1,8 g/kg (40% v/v) vía intraperitoneal.

**Grupo III:** 15 UI/kg de Vitamina E vía peroral y 30 minutos después se administró etanol 1,8 g/kg (40% v/v) vía intraperitoneal.

**Grupo IV:** 5 mL/kg del cocimiento de hojuelas de *Chenopodium quinoa* (quinua) variedad negra, vía peroral, y 30 minutos después se administró etanol 1,8 g/kg (40% v/v) vía intraperitoneal.

**Grupo V:** 15 mL/kg del cocimiento de hojuelas de *Chenopodium quinoa* (quinua) variedad negra, vía peroral, y 30 minutos después se administró etanol 1,8 g/kg (40% v/v) vía intraperitoneal.

Durante este período los animales fueron monitoreados permanentemente con evaluaciones diarias de apariencia, comportamiento, apetito y actividad.

Concluido los 14 días de tratamiento todos los ratones fueron expuestos a ayuno de 12 horas y se les administró Pentobarbital 26 mg/kg (Halatal®) a dosis letal; luego se les extrajo el cerebro y cerebelo, los cuales se lavaron con suero fisiológico y fueron pesados en balanza analítica para determinar su masa.

El hemisferio derecho de la corteza cerebral y el cerebelo fueron conservados en formol al 10 % en NaCl 0,9% para estudio histológico, mientras el hemisferio cerebral izquierdo se empleó para la evaluación de lipoperoxidación y glutatión.

### **3.7 Determinación del marcador histológico**

Para efectuar el estudio histopatológico del cerebro y cerebelo, los tejidos fueron fijados y procesados en el Instituto de Patología de la UNMSM - sede Hospital Nacional Arzobispo Loayza donde se utilizó la tinción Hematoxilina eosina. Los resultados de las lecturas de las láminas fueron con el apoyo del Dr Hugo Castro del Ministerio Publico Morgue central de Lima, el cual evaluó la corteza, células de la glía, células gigantes y piramidales del hemisferio derecho del cerebro, en caso del cerebelo evaluó la corteza y células Purkinje.

### **3.8 Determinación de los marcadores bioquímicos**

Se realizó los siguientes homogenizados:

#### **Homogenizado para lipoperoxidación**

Se pesó aproximadamente 150 mg de tejido cerebral y se homogenizó (Ultra Turrax IKA T10 Basic) con buffer fosfato 0,01 M pH 7,4 a un volumen final de 2 mL.

#### **Homogenizado para GSH**

Se pesó aproximadamente 150 mg de tejido cerebral y se homogenizó (Ultra Turrax IKA T10 Basic) con EDTA 0,02 mol/L. frío 4°C a un volumen final de 2 mL

#### **3.8.1. Determinación de la lipoperoxidación**

**Fundamento:** El malondialdehído (MDA) es resultado de lipoperoxidación de ácidos grasos de las membranas celulares, el cual reacciona con dos moles de ácido 2-tiobarbitúrico para formar un complejo de color rosado, muestra una absorción máxima a los 535 nm, la intensidad de esta coloración es proporcionada al grado de oxidación de los ácidos grasos, se utilizó la técnica

modificada por Suárez en el 2014, la cual considera un precalentamiento del reactivo. (48)

**Protocolo:** En un tubo con tapa se colocó 500  $\mu\text{L}$  del homogenizado y se añadió 1 mL de TCA al 20%, el cual fue llevado a baño María hirviendo por 10 minutos. Luego se retiró y dejó enfriar con agua de caño.

Posteriormente se le añadió 1,5 mL de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) al 0,67% en HCl 0,25 N, y se llevó nuevamente a baño María hirviendo por 20 minutos, se retiró y centrifugó a 15 minutos por 3500 RPM, se leyó en el espectrofotómetro a 535 nm.

Los cálculos de la concentración se determinó usando el coeficiente de extinción molar  $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  del complejo coloreado comprendido por el malondialdehído-tiobarbitúrico; expresando sus resultados como nmol/g de peso de tejido húmedo y porcentaje de inhibición, a través de la siguiente formula:

$$TBARS \frac{nmol}{g} = \frac{(ABS_{(MP-BI)}) \times VH \times Vrx \times 10}{1,56 \times Wc \times VHRx}$$

ABS MP-BI: absorbancia de la muestra restado del blanco reactivo

VH: Volumen del homogenizado (2 mL)

Vrx: Volumen de la reacción (3 mL)

Wc: peso del tejido a homogenizar

VHRx: volumen del homogenizado empleado para la reacción (500  $\mu\text{L}$ )

$$\% \text{ inhibición} = \frac{G \text{ II} - G \text{ Tto}}{G \text{ II}} \times 100$$

GTto: Media del grupo tratamiento

G II: media del grupo II.

### 3.8.2 Determinación de Glutación (GSH)

**Fundamento:** La oxidación del GSH por el ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzoico) (DTNB), produce la formación de un mol de ácido 2-nitro-5-tiobenzoico (TNB), el cual presenta una absorbancia máxima a la longitud de onda de 412 nm. (49)

**Protocolo:** Se tomó 1 mL del homogenizado con 2 mL de TCA al 50% y 0,8 mL de agua, se agitó y se dejó luego en reposo por 15 minutos, posteriormente se centrifugó por 5 minutos a 5000 rpm. Del sobrenadante se tomó 500 µL y se añadió 2 mL de buffer TRIS 0,4 mol/L, pH 8,9 luego se agregó 25 µL de DTNB 0,01 mol/L y mezcló.

La reacción final fue leída a 412 nm antes de los 5 minutos, y se procedió a registrar las absorbancias. Los resultados se expresó como µg GSH/mL/g de tejido y porcentaje de incremento, el cual fue determinado por la siguiente fórmula:

$$GSH \frac{\mu g}{g} = \frac{FC \times ABS_{(MP-BI)} \times VH \times Vrxp \times VRf}{Wc \times Vsn}$$

FC: 65,676 µmol%

ABS (MP-BI): absorbancia de la muestra problema restado del blanco reactivo.

VH: Volumen del homogenizado (2mL)

Vrxp: volumen de la reacción precipitante (2,2 mL)

VRf: volumen de la reacción final (2,525 mL) Wc: peso del tejido cerebral

Vsn: volumen del sobrenadante (0,5 mL)

$$\% \text{ incremento} = \frac{G Tto - G II}{G II} \times 100$$

GTto: Media del grupo tratamiento

G II: media del grupo II.

### **3.9 Análisis de datos**

Culminado el diseño experimental, los datos obtenidos se ordenaron y analizaron siendo ingresados a una hoja de cálculo en Microsoft Excel 2016. Fueron procesados mediante el programa estadístico SPSS versión 24.0.

Se aplicó la prueba de Shapiro Wilk para la normalidad, y la prueba de Kruskal-Wallis para la distribución no normal obteniendo diferencia significativa. Se utilizó el valor  $p < 0,05$  para la consideración de diferencia estadísticamente significativa.

### **3.10. Ética del estudio**

Según la Ley Peruana N° 30407 de la protección y bienestar animal de Enero del año 2016, en el artículo 19 de “Centros que utilizan animales en actos de experimentación, investigación y docencia” se permite la experimentación para el estudio y el avance de la ciencia, cuando el mismo cuente con bioética, bioseguridad y con buenas prácticas en animales y se establezcan procedimientos para mitigar el sufrimiento del animal. (50)

Se consideró los principios de Reducir y Refinar en la experimentación humanizada para con los animales, propuesta por William Russell (zoólogo y psicólogo) y Rex Burch (microbiólogo) en 1959. (51)

#### IV. RESULTADOS:

Los animales de los diferentes grupos no mostraron diferencia significativa en la variación de peso durante el periodo de tratamiento.

##### 4.1 Niveles de lipoperoxidación en tejido cerebral

Se evidenció que tras la inducción al daño por etanol, las especies reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) muestran valores de lipoperoxidación similares (grupo II) en comparación al grupo I.

El grupo III que tuvo el tratamiento con vitamina E 15 UI/kg y etanol, presentó niveles de lipoperoxidación menor al grupo I y II ( $p < 0,05$ ).

En los grupos tratados con cocimiento de hojuelas de quinua negra se observaron menores niveles de lipoperoxidación comparado con el grupo II siendo significativo solo con el grupo IV.

El grupo que recibió la mayor dosis del cocimiento de hojuelas de quinua negra (grupo V) expresó un leve aumento de lipoperoxidación en comparación al de menor dosis (grupo IV), sin presentar diferencias significativas entre ellos. (Tabla 1).

**Tabla 1: Nivel de Lipoperoxidación en homogenizado de cerebro según grupo de tratamiento**

Grupo de Tratamiento	Lipoperoxidación* (nm/g de tejido)	% Inhibición
Grupo I	39,04 ± 8,23	---
Grupo II	38,62 ± 10,23	---
Grupo III	24,94 ± 6,67 <sup>a</sup>	35,42
Grupo IV	22,38 ± 3,54 <sup>a</sup>	42,05
Grupo V	28,52 ± 3,86	26,15

Kruskal Wallis

\* Mediana ± DE (n=6)

a  $p < 0.05$  comparado con el grupo II



## 4.2 Niveles de glutatión en tejido cerebral

Después de la inducción sometida a daño por etanol (grupo II) se observó que los niveles de glutatión disminuyeron en el tejido cerebral en comparación al grupo I, siendo significativo ( $p < 0,05$ ).

El grupo III que estuvo con el tratamiento de vitamina E 15 UI/kg y con daño sometido a etanol, presentó un mayor nivel de glutatión comparado al grupo II siendo significativa ( $p < 0,05$ ). Los grupos con dosis de cocimiento de hojuela de quinua negra (grupo IV y V) mostraron niveles muy similares al grupo II.

**Tabla 2: Nivel de Glutatión (GSH) en homogenizado de cerebro de ratones según grupo de tratamiento**

Grupo de Tratamiento	GSH* (mg/mL/g de tejido)	% de incremento
Grupo I	2,18 ± 0,17 <sup>a</sup>	---
Grupo II	1,13 ± 0,08	---
Grupo III	1,41 ± 0,08 <sup>a</sup>	24,77
Grupo IV	1,15 ± 0,06	1,76
Grupo V	1,16 ± 0,04	2,65

Kruskal-Wallis

\*Mediana ± DE (n=6)

<sup>a</sup>  $p < 0.05$  comparado con el grupo II

### 4.3 Cambios histológicos del tejido nervioso

La descripción a nivel histológico del cerebro y cerebelo de los ratones sometidos a daño por etanol identificó la presencia de:

**Grupo I:** Se observó la corteza intacta y en relación similar en la capa granulosa, la zona límbica no evidenció modificaciones en su estructura, en cuanto a las células de la glía, células piramidales y células gigantes se observaron de apariencia normal y sin edema (Figura 1 y Figura 2).

En las muestras de cerebelo se mostró la capa granular normal, las células de Purkinje con un número mayor a 6 por campo, las cuales están en distribución homogénea y sin edemas con una leve eosinofilia citoplasmática (Figura 3) mientras la capa molecular externa en condiciones normales y sin edemas.

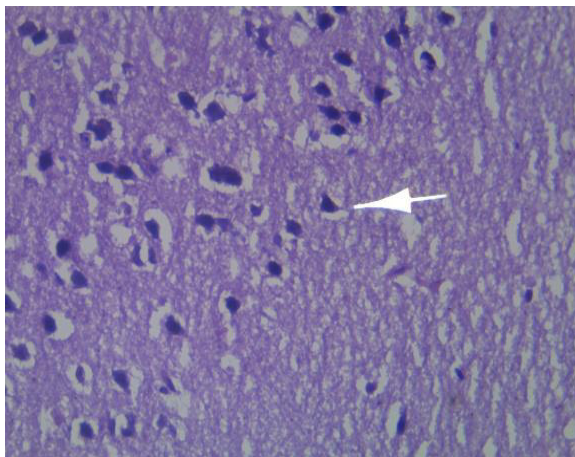


Figura 1: Células piramidales de la corteza cerebral del grupo I (sin tratamiento) Tinción H-E 40 x'.

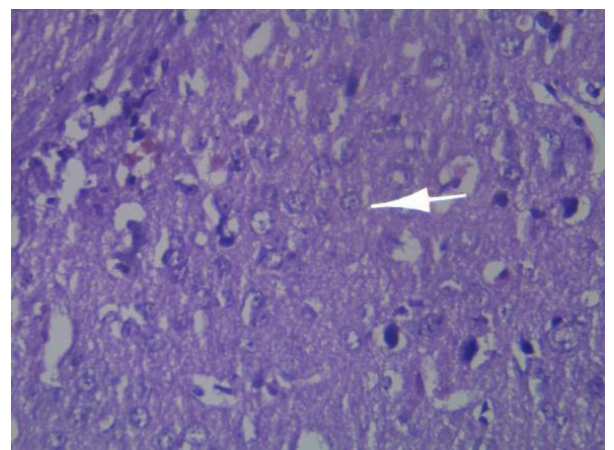


Figura 2: Células gigantes de la corteza cerebral del grupo I (sin tratamiento) Tinción H-E 40 x'.

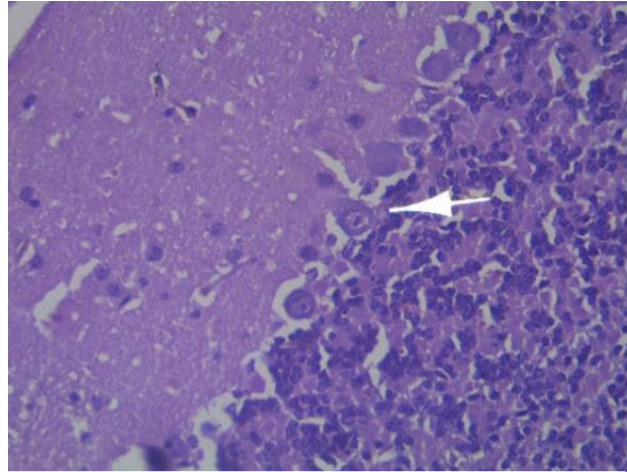


Figura 3: Cerebelo del grupo I (sin tratamiento). Tinción H-E 40 x'.

**Grupo II:** Las muestras presentan en su totalidad edema leve en las células gliales y en la zona perivascular, observándose células gigantes en presencia de edema (Figura 4), en cuanto las células piramidales con cambios en su forma y con edema pericitoplasmático moderado (Figura 5)

En cuanto al cerebelo se observó a las células de Purkinje deformes y ralas, con citoplasma retraído y ligero cambio de posición (asimétrica) y de tamaño más pequeño y con edema severo. Presentando daño en el núcleo y con una marcada picnosis. (Figura 6), la capa molecular y granulosa presentan edema moderado.

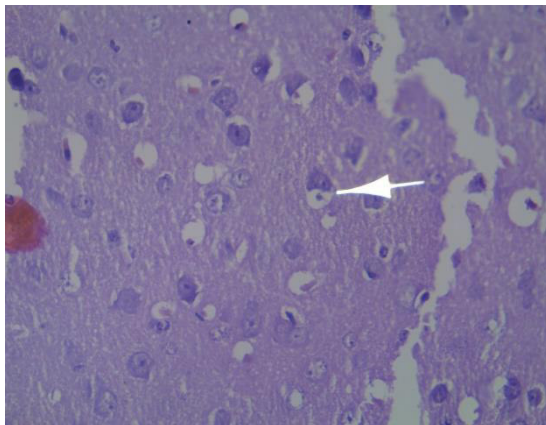


Figura 4: Células gigantes de la corteza cerebral del grupo II (daño inducido por etanol) Tinción H-E 40 x'.

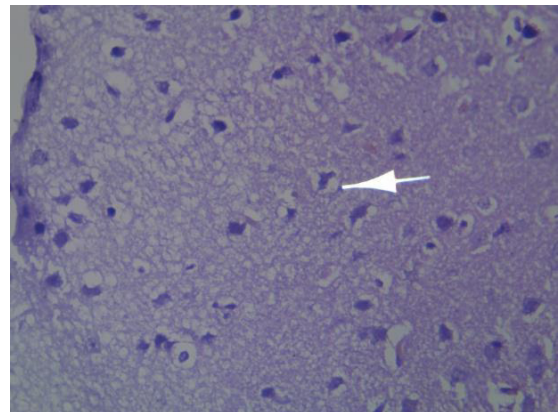


Figura 5: Células piramidales de la corteza cerebral del grupo II (daño inducido por etanol) Tinción H-E 40 x'.

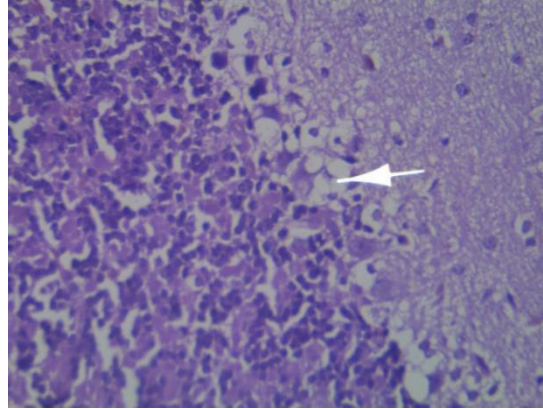


Figura 6: Cerebelo del grupo II (daño inducido por etanol). Tinción H-E 40 x'.

**Grupo III:** En la mayoría de los cortes cerebrales se evidenciaron que en el hipocampo (zona límbica) presentaban las células gigantes normales (Figura 7) y edema leve con células piramidales retraídas y con halo citoplasmático (Figura 8).

En referencia a los cortes de cerebelo se observa un edema en la mitad de la capa granular con células de Purkinje hiperocrómicas y con alteración de la membrana, retraída en el citoplasma, algunas sin axón, en presencia de arrugamiento y picnosis en la mayoría de sus núcleos. (Figura 9)

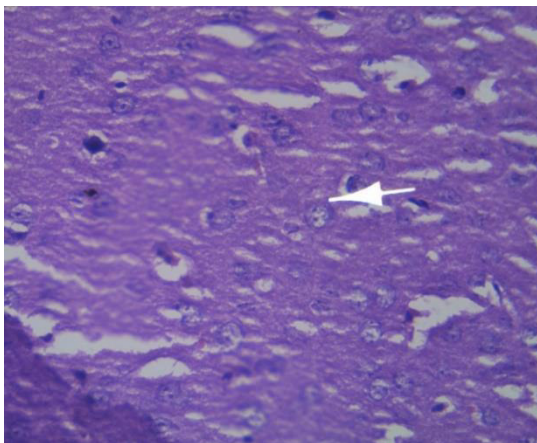


Figura 7: Células gigantes del grupo III (vitamina E /etanol) Tinción H-E 40 x'

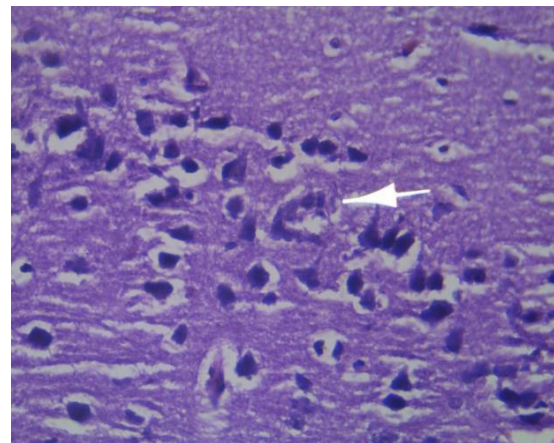


Figura 8: Células piramidales del grupo III (vitamina E /etanol) Tinción H-E 40 x'.



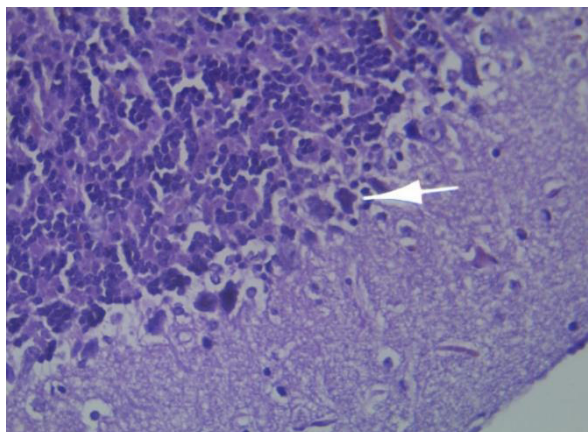


Figura 9: Cerebelo del grupo III (vitamina E /etanol)  
Tinción H-E 40 x'

**Grupo IV:** En los cortes cerebrales se evidenció edema leve en las células piramidales (Figura 10) en el espacio subaracnoides y zona medular y con la mitad de eosinofilia citoplasmática neuronal, las células gigantes y gliales dañadas y con edema menor del 30% (Figura 11)

En el cerebelo, las capas molecular y granular presenta edema moderado, mientras que las células de Purkinje con edematización severa, algunas arrugadas y disminuidas en su forma normal y otras espiculadas y con ligero edema, con presencia de proliferación celular y ligeramente hiper Cromáticas y con eosinofilia moderada. (Figura 12)

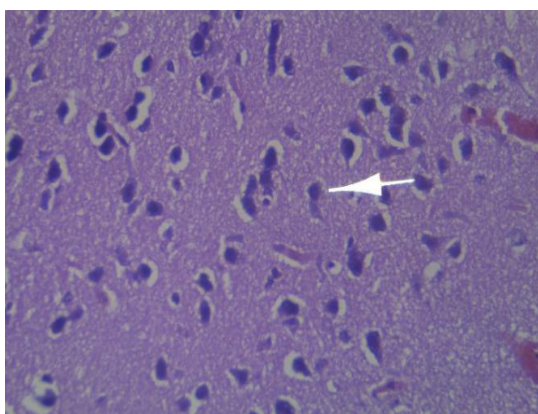


Figura 10: Células piramidales del grupo IV  
(cocimiento de quinua 5mg/kg /etanol) Tinción H-E 40 x'.

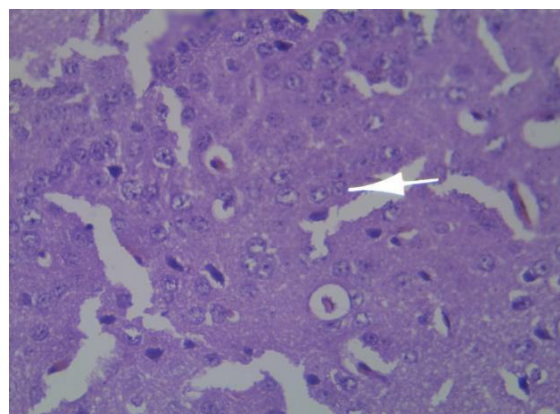


Figura 11: Células gigantes del grupo IV,  
(cocimiento de quinua 5mg/kg /etanol) Tinción H-E 40 x'.

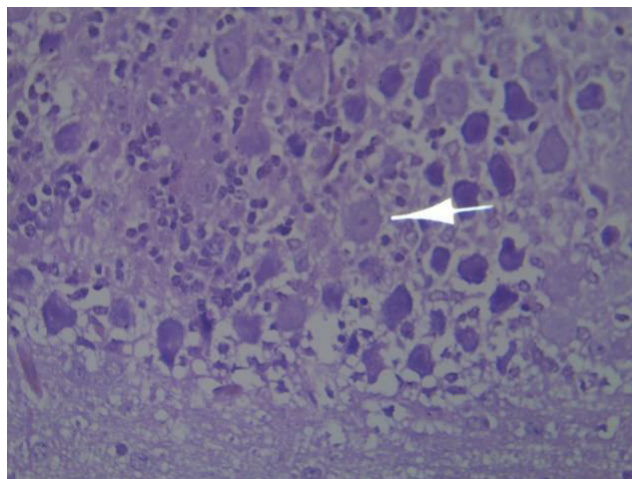


Figura 12: Cerebelo del grupo IV (cocimiento de quinua 5mg/kg /etanol) Tinción H-E 40 x'

**Grupo V:** En los cortes cerebrales, se muestra edema leve solo en la zona perivascular, las células piramidales normales y células gigantes normales (Figura 13 y 14).

En el cerebelo las células de Purkinje se encontraban con edema moderado, recuperando su axón y forma, sin presencia de eosinofilia citoplasmática. (Figura 15), las que se encontraban cercanas a la capa granulosa (CG) algunas picnóticas (Figura 16), La capa molecular y granular presentan edema leve.

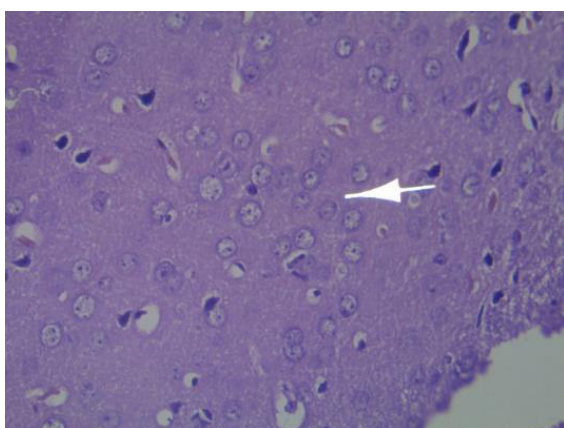


Figura 13: Células gigantes de la corteza cerebral del grupo V (cocimiento de quinua 15mg/kg /etanol) Tinción H-E 40 x'.

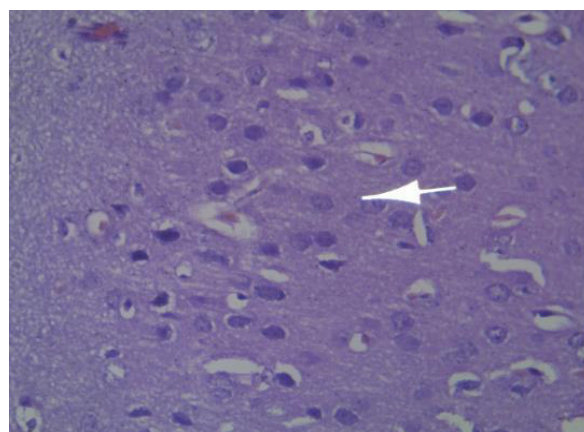


Figura 14: Células piramidales de la corteza cerebral del grupo V (cocimiento de quinua 15mg/kg /etanol) Tinción H-E 40 x'.

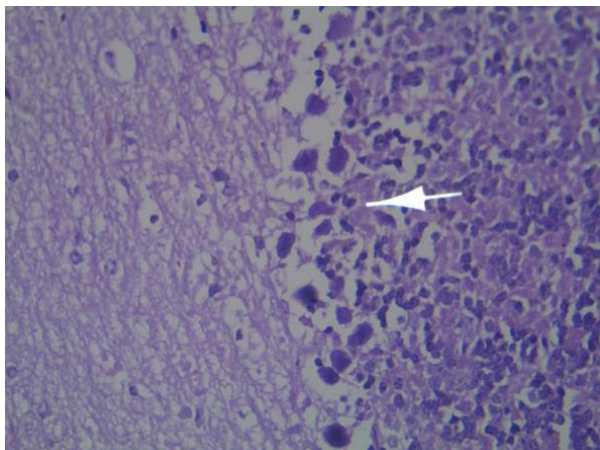


Figura 15: Cerebelo del grupo V (cocimiento de quinua 15mg/kg /etanol).Tinción H-E 40 x'.

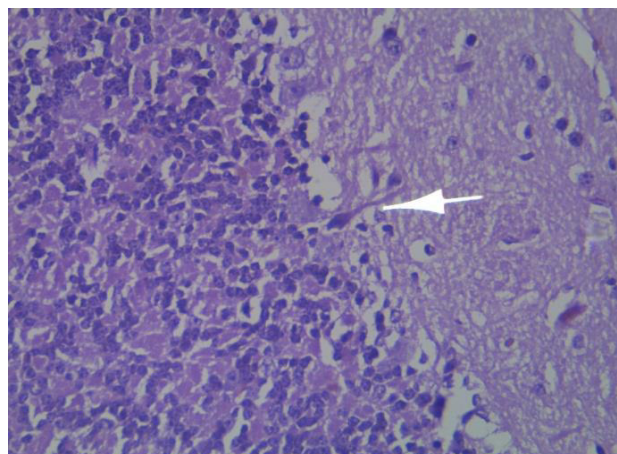


Figura 16: Cerebelo del grupo V (cocimiento de quinua 15mg/kg /etanol). Tinción H-E 40 x'.

## V. DISCUSIÓN

El envejecimiento es un proceso universal e inevitable (13) que está en aumento a nivel mundial y esto se debe a las transformaciones económicas y sociales, trayendo consigo una mayor incidencia de enfermedades neurodegenerativas.(52) En este proceso normal, relacionado con la edad, hay una pérdida neuronal acelerada en el sistema nervioso central (SNC), siendo esta la principal causa relacionada a la discapacidad. (1)

Se sabe que para reducir o prevenir enfermedades, el consumo de determinados nutrientes podría intervenir en ciertas funciones cerebrales; uno de los retos es aprovechar los beneficios naturales de los alimentos.(52)(53) La existencia de estrés oxidativo en enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento, requieren de la acción de antioxidantes para contrarrestar dicho evento, (54) estos pueden anular los efectos adversos de los radicales libres y prevenir la neurodegeneración. (52)

En el presente estudio, se mostró en el grupo II un menor nivel de GSH, sin embargo, la lipoperoxidación mostró valores cercanos al grupo I. El tejido cerebral presentó edema en las células piramidales, gigantes y gliales. En el cerebelo presentó edema severo en las células de Purkinje con edemas moderados en la capa molecular y granular.

El etanol es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica (BHE), en un 90%, ocasionando un efecto directo en el tejido nervioso. (55) Se ha observado que por cada exposición el etanol causa cuadro de deshidratación y precipitación de proteínas citoplasmáticas causando lesión y muerte de cierto número de neuronas. (56) Además, un compuesto neurotóxico es el etanol y su consumo continuo puede tener consecuencias a nivel cerebral, puesto que se oxida generando acetaldehído. (57)



La biotransformación del etanol se realiza a nivel hepático en un 85 a 90% usando tres vías metabólicas: siendo la principal el sistema alcohol deshidrogenasa (ADH) y aldehído deshidrogenasa (ALDH). (58) (59) La segunda vía, en menor proporción, es por el sistema microsomal oxidativo del etanol (MEOS) involucrando al citocromo P450 y la tercera vía que representa el 2% de la oxidación del etanol es la catalasa (CAT) que utiliza peróxido de hidrógeno. (26) (55) (60)

A nivel cerebral abunda la isoforma ADH III que tiene baja afinidad por el etanol. Los citocromos del sistema MEOS, isoenzima CYP2E1, permitiría la oxidación del etanol a acetaldehído en pequeñas cantidades vinculadas a efectos tóxicos y alteraciones en la membranas neuronales; y la catalasa que es la principal vía activa en el SNC metaboliza el 60% de la oxidación del etanol. (56) (60) (61) (26) Estos sistemas enzimáticos localizados en el endotelio microvascular del cerebro, generan productos oxidativos y nitrosativos, (61) esto puede estar relacionado con la peroxidación lipídica y disminución de factores antioxidantes como el glutatión, tal como lo cita Almanza M. 2011. (60)

El efecto del etanol en el cerebro explicaría el aumento de peroxidación lipídica como se ha mencionado anteriormente, (61) puesto que la membrana neuronal presenta grandes cantidades de ácidos grasos poliinsaturados que es sensible a la lipoperoxidación, (62) esto se debe a su elevado consumo de oxígeno y cuando existe un desbalance de radicales libres en los cuales también se encuentra involucrado la excitotoxicidad, niveles de  $Ca^{+2}$  y disfunción mitocondrial. (63) La incrementación de  $Ca^{+2}$  de forma prolongada activa la hidrolisis de fosfolípidos, causando una mayor cantidad de ácidos grasos libres de tipo polinsaturados generando la mayor lipoperoxidacion. (63) (64)

Es conocido que la peroxidación de los lípidos incrementa la permeabilidad de la membrana celular y disminuye su potencial, manifestándose en la apertura de los canales de  $Ca^{+2}$ , incrementando su concentración citoplasmática y activando a la sintasa constitutiva del óxido nítrico (nNOS), (65) (66) presentes en las neuronas,

(67) formando radicales superóxidos ( $O_2^-$ ) y óxido nítrico ( $NO^-$ ) (66) causando la muerte celular por necrosis. (65)

Según Ozel y col 2010 en su investigación con administración vía intraperitoneal de etanol a dosis de 2 g/kg/día por 14 días en ratas, observó el aumento de malondialdehído (MDA) comparado con el grupo control; el MDA es el producto final de la peroxidación lipídica y refleja la lesión en la membrana celular mediado por los ROS.(68) En otro estudio se evaluó el efecto de la administración aguda del etanol sobre marcadores de estrés oxidativo en el cerebro de ratón, con pretratamiento de suero fisiológico y transcurrida media hora se administró 2,5 g/kg intraperitoneal de etanol, observándose una disminución de la lipoperoxidación sin tener diferencia significativa, (69) resultados similares a lo encontrado en el grupo II del presente estudio.

Se ha reportado que la administración crónica del etanol conduce al aumento de los receptores de N-metil D-aspartato (NMDA) en el hipocampo del cerebro y cerebelo, teniendo un drástico incremento del glutamato a las 10 horas de cese de etanol, contribuyendo a la muerte celular; lo cual explicaría su mecanismo en alteraciones neuropatológicas tanto en animales de experimentación como en humanos, (57) lo mencionado estaría relacionado a los resultados histológicos encontrados en el grupo II.

El incremento del glutamato extracelular provocaría el colapso de gradientes iónicos produciendo un déficit en la captura de este aminoácido en las neuronas y células gliales, y la presencia del NO influiría en el incremento de la concentración de glutamato, estimulando los receptores glutamatérgicos de las neuronas vecinas y produciendo la muerte excitotóxica. (55) Complementariamente, el NO afecta en la disminución de los niveles de ATP o por la formación de peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (55) siendo esta última, una especie reactiva de nitrógeno implicada en enfermedades como el Alzheimer. (70) Por esta vía también podría explicar el mayor nivel de lipoperoxidación en el grupo II.

En cuanto a la disminución del GSH observado en el grupo II se asocia con la muerte neuronal y con las enfermedades neurodegenerativas, (71) (72) el

agotamiento del GSH también se relaciona con la desintoxicación del etanol y el envejecimiento evaluado en tejido como el hígado y riñón. (73) El GSH interviene en la detoxificación de xenobióticos, manteniendo de esta forma la permeabilidad de la membrana y evitando mecanismos de apoptosis. (74) (75)

Resultados similares encontró Almansa en el 2011 que evaluó el consumo crónico de etanol y su efecto sobre el cerebro de rata administrando una dieta líquida de alcohol (5% v/v) por seis semanas y se reportó una disminución ligera de GSH en el homogenizado de cerebro de ratas. (60) Según el autor esto podría atribuirse al incremento de colesterol en las mitocondrias del cerebro de ratas, provocando una disminución de GSH, al igual que en hígado de ratas que han sido tratadas con etanol. (60)

En el estudio de Arteaga y col 2017, midió el daño cerebral por estrés oxidativo después de una abstinencia alcohólica de 2 semanas en ratas que consumían gradualmente el etanol por 56 días, se observó una disminución del GSH comparado con el grupo control y esto se debería a la acumulación de sustancias tóxicas que promueven el daño cerebral y al aumento de las concentraciones de nitrato/nitrito así como la generación de per-oxinitrito que resulta en la oxidación sustancial y destrucción potencial que induce a la muerte celular por apoptosis y necrosis. (76)

La neuroinflamación está asociada a la actividad de la microglía, se ha descrito que el etanol promueve la inflamación por la vía de los receptores tipo Toll (TLR) que cumple un rol dentro de la regulación de la inflamación, respuesta inmune y apoptosis. (58)

A nivel morfológico, la ingesta de etanol puede estar relacionado a pérdida de axones, sinapsis e incluso muerte celular. El etanol al estimular los TLR4 y el NF- $\kappa$ B de la neuroglia induce a la producción de citoquinas proinflamatorias como interleucina 6 (IL-6), interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), (58) (77) estos al actuar sobre la microglía, esta se activa produciendo cambios morfológicos, a una actividad fagocitaria. (58)

En pacientes alcohólicos se reportan un daño selectivo de 15 al 23% de disminución y contracción de neuronas piramidales del hipocampo y células Purkinje del cerebelo, (55) siendo este último el que mayor efecto recibe frente al alcohol. (55) (78) El cerebelo es una de las estructuras nerviosas que mayor recibe el efecto del consumo del alcohol, (79) las células de Purkinje son altamente vulnerables a sustancias químicas como el etanol. (55) (78) Del mismo modo, Rodríguez y col. en el 2002 demostró mediante la administración oral y crónica de etanol y agua a concentraciones de 4,12 y 24%, cambios morfológicos en las células de Purkinje en ratas adultas a partir de 4 semanas. (80) Lo mencionado guarda relación con nuestros resultados observados en el grupo II a nivel histológico tanto en el cerebro y cerebelo de ratones.

El estudio de Pachonpai y col en 2012 evaluó la neurodegeneración por etanol en cerebro de ratas por administración vía intraperitoneal a 1,8 g/kg por 14 días en cortes histológicos de tinción cresil violeta donde se evidencia el daño neuronal en el hipocampo. (47) Mientras Guadagnoli en 2014 demostró que neuronas corticales en cultivo son susceptibles por daño con etanol, se analizó a los 7 y 14 días de crecimiento in vitro evidenciando mayor daño en las neuronas maduras al aumentar el número de células que mueren por apoptosis y necrosis. (81)

El grupo III, que recibió el tratamiento de vitamina E y etanol, se observó un menor nivel de lipoperoxidación y un mayor nivel de GSH en comparación con el grupo II. En relación al estudio histológico se evidenció edema en el cerebro en la zona límbica del hipocampo y en las células piramidales. En el cerebelo, las células de Purkinje con edema e hiperromáticas en la capa granular, algunas sin axón y picnóticas.

Estos resultados guardan relación con las propiedades de la vitamina E, el  $\alpha$ -tocoferol es el octámero más abundante y biodisponible en el órgano humano. Este antioxidante protege a las células y disminuye los efectos adversos de las especies reactivas, inhibiendo la lipoperoxidación a nivel de membrana celular. (82) (83) (84)

El mayor grupo de antioxidantes lipídicos solubles que protegen la membrana celular de la lipoperoxidación es a vitamina E. (62) Su papel protector se da interrumpiendo las reacciones en cadena de los radicales mediante la transferencia de un átomo de hidrogeno fenólico a un radical peróxido, (64) (85) <sup>90,93</sup> generando hidroperóxidos lipídicos estables que limitan la reacción radicálica en cadena, siendo capaz de reducir la peroxidación lipídica, (63) esto guarda relación con un menor nivel de lipoperoxidación en el grupo III.

El sistema de defensa antioxidante incluye al glutatión. (86) La actividad antioxidante de la vitamina E (tocoferoles) se basa en el sistema redox tocoferol-tocoferilquinona, secuestrando radicales libres y de peróxidos, evitando de esta forma el daño oxidativo. (87) Esta vitamina se encuentra ampliamente distribuida en el cerebro y corteza cerebelar, (88) en un estudio del 2014 se reportó que los tocoferoles y tocotrienoles (vitamina E) actuó en defensa de los astrocitos frente al daño causado por el glutamato, pudiendo estar asociadas al efecto neuroprotector a nivel de las mitocondrias dañadas. (89)

La capacidad neuroprotectora de la vitamina E también fue evaluada por una técnica de desorientación motora en ratones (corte de bigotes) en donde se expresó un menor nivel de lipoperoxidación. (83) Además, en un estudio del 2014 se revela la importancia de la vitamina E en el SNC teniendo un efecto preventivo para los síntomas de la enfermedad de Alzheimer (EA), dando asociación a las isoformas de la vitamina E (tocoferol y tocotrieno). (83) (90)

En relación a los grupos que recibieron tratamiento con el cocimiento de hojuelas de *Chenopodium quinoa* (quinua) variedad negra, (grupo IV y V) se observó un menor nivel de lipoperoxidación, mientras que los niveles de GSH presentó valores similares comparados con el grupo II. En el grupo IV, a nivel del tejido cerebral, se evidenció edema leve en las células piramidales y con eosinofilia citoplasmática neuronal, y en el cerebelo, las células Purkinje presentaron edema severo con alteración en su forma y organización. Mientras que en el grupo V presentó edema leve solo en la zona perivascular del cerebro y edema moderado en las células de Purkinje con recuperación de axón y forma.

Los resultados obtenidos podrían relacionarse con los componentes de la quinua, la cual contiene importantes cantidades de fitoquímicos abarcando a los flavonoides (quercetina y kempferol), ácidos fenólicos (ácidos cafeico, ferúlico, p-cumárico, p-OH-benzoico, vanilínico, gálico y cinámico), escualeno, fitoesteroles, betainas, ecdisteroides, fagopiritoles, carotenoides, antocianinas y vitamina C, (33) (34) (35) destacando a la *Chenopodium quinoa* variedad negra por el mayor contenido de isoflavonas, siendo una fuente potencial de compuestos bioactivos alentadores para la salud. (33)

En un estudio donde analizó las variedades roja y negra de la quinua evidenció que después del proceso de cocción se retienen la mayor cantidad de compuestos fenólicos totales (CFT) en la variedad negra. Existe un aumento de la actividad antioxidante en ambas variedades después del proceso de secado y cocción. Los flavonoides después del proceso del lavado no evidencian pérdida significativa, debido a que estos antioxidantes se acumulan en las vacuolas siendo protegidas por la célula. Sin embargo, después del secado y cocción se evidenció pérdidas significativas, lo cual difiere con lo reportado por Dini en el 2010. (91)

Los flavonoides ejercen una neuroprotección sobre los mecanismos de estrés oxidativo y neuroinflamación, ya que son capaces de cooperar con la funcionalidad e integridad de las neuronas, prevenir el incremento de los ROS y de la lipoperoxidación. (38) Sus efectos antioxidantes pueden intervenir en la recuperación de la homeostasis de óxido-reducción en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, (92) disminuyendo los procesos de la peroxidación lipídica en homogeneizados de cerebro, neutralizando el oxígeno reactivo, particularmente el anión superóxido, radical hidroxilo o hidroperóxidos. Además, los flavonoides son aptos en el bloqueo de la respuesta inflamatoria a través de inhibición de la microglía y moléculas proinflamatorias como la interleucina 1 $\beta$ , factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) y la sintasa del óxido nítrico inducible (iNOS), por ello tendrían un papel importante para la protección del cerebro. (38)

Po otra parte, la quercitina y el kaempferol contribuyen en la prevención de enfermedades, ya que activa sobre el gen de regulación del GSH en un 50%, de esta forma favorece a la defensa intracelular. Limón en el 2010 menciona a la quercetina presenta una actividad antioxidante cinco veces mayor que la vitamina E. (38) Es conveniente señalar que la quinua contiene niveles de vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), según refiere Fuentes y col.2013, (33) siendo la quinua negra la variedad que presenta mayor contenido de esta vitamina.

La quercetina ha demostrado ser efectiva en la neuroprotección, en modelos de lesión neuronal o daños neurotóxicos en *in vitro* e *in vivo*. (93) Según Wagner y col. en el 2006 evaluó la protección de quercitrina (glicósido de quercetina) donde previno la formación de TBARs inducida por agentes prooxidantes. (94) Hay que considerar que tras la administración de quercetina en ratas y cerdos, se encontraron que en niveles muy bajos (nanomolar) benefician su ingreso al cerebro por la gradiente de concentración, (93) lo que reflejaría la existencia de un papel protector significativo como antioxidante y por la biodisponibilidad hacia el tejido cerebral.

Hernández en el 2013 indica que la quercetina aporta una protección en el hipocampo de ratas sometidas a irradiación que tenían neuronas picnóticas disminuyendo significativamente el daño genético inducido y la mejoría del estado oxidativo gracias a su potencial antioxidante. (95) A los cuales se suma los hallazgos de Mehdizadeth 2009 donde menciona que este flavonoide antioxidante y posee un efecto neuroprotector en un modelo de la enfermedad de Parkinson en ratas mediante la evaluación histoquímica. (96)

Así mismo Priprem en el 2010 mediante el encapsulado de quercetina en liposomas vía nasal en ratas se observó que aminora la degeneración de las neuronas y las neuronas colinérgicas en el hipocampo, reduciendo así el estrés oxidativo, los cuales están relacionados a la enfermedad de Alzheimer. (97)

Se ha reportado en quinua roja y negra la presencia de betanina e isobetanina (betalaínas) siendo ligeramente de mayor contenido en la variedad negra. La

cantidad de flavonoides es de diferencia significativa y de mayor cantidad para la variedad negra. (91)

Reportes como el de Aguirre en el 2015 evidencian que en frutos de color rojo o moradas que contengan antocianinas ejercerían una acción neuroprotectora brindando beneficios para la salud mental. Su administración frente a un evento isquémico limita el aumento del óxido nítrico intracelular. Así mismo la suplementación con antocianinas y/o proantocianinas presenta eventos beneficiosos en modelo de Parkinson ya que ejerce una modulación en la actividad glial, disminuyendo el efecto antiinflamatorio. (98)

Jáuregui en el 2016 evaluó el efecto neuroprotector del maíz morado haciendo referencia a sus compuestos fenólicos principalmente flavonoides y antocianinas donde se demostró la actividad antiinflamatoria y actividad antioxidante evidenciándose en la disminución de la hemólisis de glóbulos rojos así como la menor cantidad de MDA, ya que la neurodegeneración involucra a la inflamación y la presencia de lipoperoxidación está presente enfermedades de Parkinson se encuentra incrementado. (99)



## VI. CONCLUSIONES

### 6.1 Conclusiones:

- La administración del cocimiento de hojuelas de *Chenopodium quinoa* “quinua” variedad negra a dosis administradas causó un menor nivel de lipoperoxidación en el tejido cerebral.
- La administración del cocimiento de hojuelas de *Chenopodium quinoa* “quinua” variedad negra aminoró el daño en cerebro y cerebelo a nivel histológico.
- De la presente investigación se infiere que el cocimiento de hojuelas de *Chenopodium quinoa* “quinua” variedad negra promueve efecto neuroprotector, en los indicadores bioquímicos (lipoperoxidación) e histológico en ratones sometidos a daño por etanol.

## VII. RECOMENDACIONES

### 7.1 Recomendaciones:

- Realizar la prueba FRAP para la capacidad antioxidante in vitro de las hojuelas de *Chenopodium quinoa* “quinua” variedad negra.
- Realizar la cuantificación enzimática de antioxidantes: Superóxido dismutasa, catalasa, y otras sustancias como: glutatión total, glutatión reducido y glutatión oxidado.
- Realizar la determinación bioquímica de TBARs y GS-NP a nivel de hipocampo y cerebelo.
- Realizar las pruebas histológicas con la técnica de impregnación con plata u oro.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Durán Ogalla R. Aminopeptidas y estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas [Tesis doctoral]. España: Universidad de Granada; 2008.
2. Izaguirre Calderón MH. Centro de referencia para personas con Alzheimer en Comas [Tesis] Perú: Universidad peruana de Ciencias Aplicadas; 2016.
3. Garcés M. Estudio sobre las enfermedades neurodegenerativas en España y su impacto económico y social. España; 2016.
4. Federación Española. Estudio sobre las enfermedades neurodegenerativas en España y su impacto económico y social [informe en internet] España, 2010.
5. Samper Noa J, Llibre Rodríguez J, Sosa Pérez S, Solórzano Romero J. Del envejecimiento a la enfermedad de alzheimer. Revista Habanera de Ciencias Médicas. 2011; 10(3).
6. Sarubbo MF. Estrategias neuroprotectoras ene el envejecimiento cerebral. Mecanismos neuroquímicos y moleculares y su correlación con los efectos sobre las capacidades cognitivas [Tesis doctoral] España: Universitat de les Illes Balears; 2016.
7. Réaulx Rojas E, Dorazco Barragán G. Estabilización clínica en enfermedades neurodegenerativas: estudio clínico en fase II. Revista de neurologia. 2010; 50(9).
8. Arias Rodríguez R, Toma Zárate J, Aguilar Felices E, Ramírez Roca E, Shimabuku Azato R, Suárez Cunza S. Neuroprotección del extracto hidroalcohólico de las hojas de Satureja brevicalyx 'wayra muña' en un modelo animal de hiperoxia e hipoxia-isquemia. An Fac med. 2012; 73(3).
9. Yawadio Nsimba R, Kikuzaki H, Konishi Y. Antioxidant activity of varios extracts and fractions of *Chenopodium quinoa* and *Amaranthus* spp. seeds. Food Chemistry. 2008; 106.
10. Repo de Carrasco R, Encina Zelada R. Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos fenólicos de cereales andinos: quinua (*Chenopodium quinoa*), kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*) y kiwicha (*Amaranthus caudatus*).

- Rev Soc Quim Perú. 2008; 74(2).
11. Padrón Pereira CA, Oropeza González RA, Montes Hernández AI. Semillas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willdenow): composición química y procesamiento. Aspectos relacionados con otras áreas. Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 2014; 5(2).
  12. Graf B, Rojas Silva P, Rojo L, Delatorre Herrera J, Baldeón M, Raskin L. Innovations in Health Value and Functional Food Development of Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). Comprehensive REVIEWS in food science and food safety. 2015; 14.
  13. Varela L, Chávez H, Gálvez M, Méndez F. Características del deterioro cognitivo en el adulto mayor hospitalizado a nivel nacional. Rev Soc Per Med Inter. 2004; 17(2).
  14. Ross M, Pawlina W. Ross Histología texto y atlas correlación con biología molecular y celular. 7th ed.: Wolters Kluwer; 2016.
  15. Hib J. Histología de Di Fiori Texto y Atlas. 1st ed.: El Ateneo; 2001.
  16. Junquera L, Carneiro J. Histología básica Texto y Atlas. 12th ed.: Editorial Médica Panamericana S.A.; 2015.
  17. Valverde F. Estructura de la corteza cerebral. Organización intrínseca y análisis comparativo del neocórtex. Rev Neurol. 2002; 34(8).
  18. López Gonzáles G, Porcal Quinta W. Estrés oxidativo/nitro-oxidativo como blanco terapéutico en enfermedades neurodegenerativas. En García Rodríguez J. Neuroprotección en enfermedades Neuro y Heredo degenerativas. España: OmniaScience; 2014.
  19. Angoa Pérez M, Rivas Arancibia S. Estrés oxidativo y neurodegeneración: ¿causa o consecuencia? Arch Neurocién (Mex). 2007; 12(1).
  20. Santamaria del Ángel A. Daño oxidativo y enfermedades neurodegenerativas. En Konigsberg Fainstein M. Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas.: El manual moderno S.A. de CV; 2008.
  21. Martínez Lazcano JC, Boll Woehrlen C, Hernández Melesio A, Rubio Osornio M, Sánchez Mendoza A, Ríos C, et al. Radicales libres y estrés oxidativo en las

- enfermedades neurodegenerativas. Mensaje bioquímico. 2010; XXXIV.
22. Dorado Martínez C, Rugerio Vargas C, Rivas Arancibia S. Estrés oxidativo y neurodegeneración. Rev Fac Med UNAM. 2003; 46.
  23. Flores Soto M, Chaparro Huerta V, Escoto Delgadillo M, Vazquez Valls E, González Castañeda R, Beas Zarate C. Estructura y función de las subunidades del receptor a glutamato tipo NMDA. Neurología. 2012; 27(5).
  24. Morales I, Arata L, Maccioni R. La teoría de la neuroinmunomodulación en enfermedades neurodegenerativas: nuevas evidencias científicas. Rev Chil Neuro-Psiquiat. 2015; 53(1).
  25. Odeon MM. Consecuencias del estrés postnatal repetido y la exposición a etanol sobre la actividad del transportador de glutamato y la conducta en ratas. [Tesis doctoral] Universidad de Buenos Aires; 2015.
  26. Martí Prats L. Efecto dual del etanol administrado en pVTA sobre la actividad motora de la rata: implicaciones en el desarrollo de una nueva estrategia terapéutica para el tratamiento de las recaídas en el alcoholismo. [Tesis doctoral]. España. Universidad de Valencia. F.
  27. Sánchez Vera I.. Papel del sistema endocannabinoide en el alcoholismo: estudio en modelos animales.[Tesis] Universidad de Málaga; 2007.
  28. Escarbajal M. Enzimas cerebrales y psicofarmacología del alcohol. ADICCIONES. 2002; 14(4).
  29. Abugoch James L. Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd): Composition, chemistry, nutritional, and functional properties. Advances in food and Nutrition Research. 2009; 58.
  30. FAO. La quinua: cultivo milenario para contribuir a la seguridad alimentaria mundial.; 2011.
  31. Hernández Rodríguez J. La quinua, una opción para la nutrición del paciente con diabetes mellitus. Revista Cubana de Endocrinología. 2015; 26(3).
  32. Apaza V, Cáceres G, Estrada R, Pinedo R. Catálogo de variedades comerciales de quinua en el Perú. Primera ed.; 2013.
  33. Fuentes F, Paredes Gonzales X. Perspectivas nutraceuticas de la quinua:

- propiedades biológicas y aplicaciones funcionales. En FAO. Estado de arte de la quinua en el mundo en 2013.; 2014.
34. Pasko P, Zagrodzki P, Barton H, Chlopicka J, Gorinstein S. Effect of Quinoa Seeds (*Chenopodium quinoa*) in Diet on some Biochemical Parameters and Essential Elements in Blood of High Fructose-Fed Rats. *Plant Foods Hum Nutr.* 2010; 65.
  35. Bermúdez Naranjo D. Evaluación tecnológica de la harina de quinua (*Chenopodium quinoa*) variedad piartal como espesante alimentario obtenida bajo diferentes condiciones de proceso. [Tesis] Universidad de la Salle;2017.
  36. Huaman Congora LA. Evaluación del tipo de solvente en el rendimiento durante la extracción de colorante natural de la cascara de Tuna morada (*Opuntia ficus*) [Tesis] Universidad del Centro del Perú; 2014.
  37. Carrasco Valencia RR, Hellstrom J, Matti Pihlava J, Mattila P. Flavonoids and other phenolic compounds in Andean indigenous grains: Quinoa (*Chenopodium quinoa*), kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*) and kiwicha (*Amaranthus caudatus*). *Food Chemistry.* 2010; 120.
  38. Limón D, Díaz A, Mendieta L, Luna F, Zenteno E, Guevara J. Los flavonoides: mecanismo de acción, neuroprotección y efectos farmacológicos. *Mensaje bioquímico.* 2010; XXXIV.
  39. Giacalone M, Di Sacco F, Traupe I, Topini R, Forfori F, Giunta F. Antioxidant and neuroprotective properties of blueberry polyphenols: a critical review. *Nutritional Neuroscience.* 2011; 14(3).
  40. Dini I, Tenore GC, Dini A. Antioxidant compound contents and antioxidant activity before and after cooking in sweet and bitter *Chenopodium quinoa* seeds. *LWT-Food Science and Technology.* 2010; 43.
  41. Brend Y, Galili L, Badani H, Hovav R, Galili S. Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Red and Yellow Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) Seeds as Affected by Baking and Cooking Conditions. *Food and Nutrition Science.* 2012; 3.
  42. Vainio T, Jarvenpaa E, Repo Carrasco V. The efecto of cooking antioxidant

- activity of quinoa seeds. Congreso científico Internacional de Quinoa y Granos Andinos. 2014.
43. Argimon Pallás J, Jiménez Villa J. Métodos de investigación clínica y epidemiológica. 3rd ed. Madrid, España: EdiDe SL; 2004.
44. Lechuga Gilt H, Salas Ramírez HL. Estudio para la instalación de una planta productora de mazamorra de tocosh con maca, quinua y leche. Ingeniería Industrial. 2013;(31).
45. Estrada Rojo F, Morales Gómez J, Tabla Ramón E, Solis Luna B, Navarro Arguelles H, Martínez Vargas M, et al. Neuroprotección y traumatismo craneoencefálico. Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM. 2012; 55(4).
46. Agudo Barriuso M, Avilés Trigueros M, Villegas Pérez P, Vidal Sanz M. Neuroprotección en glaucoma. En García S´snchez J, Honrubia López F, García Feijóo J, Pablo Júlvez L. Diagnóstico y tratamiento del galucoma de ángulo abierto.; 2013.
47. Wathita P, Jinanaporn W, Panakaporn W, Chonlatip T, Bungorn S, Supaporn M. *Coscinium fenestratum* protects against ethanolinduced neurodegeneration in adult rat brain. American Journal of Pharmacology and Toxicology. 2012; 7(3).
48. Suárez Cunza S, Castro Luna A, Ale Borja N. Actividad antioxidante in vitro de un extracto acuoso de *Allim sativum* variedad huaralino. Rev Soc Quím Perú. 2014; 80(4).
49. Sedlak J, Lindsay R. Estimation of total, protein- Bound, and Nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman'n reagent. Analytical Biochemistry. 1968; 25.
50. Congreso de La República. Ley Peruana Nro. 30407 Ley de protección y bienestar animal. [Online].Acceso 1 de Julio de 2019. Disponible en: <http://www.leyes.congreso.gob.pe/Documentos/Leyes/30407.pdf>.
51. Mrad de Osorio A. Ética en la investigación con modelos animales experimentales. Alternativas y las 3 RS de Russel. Una responsabilidad y un compromiso ético que nos compete a todos. Revista Colombiana de Bioética. 2006; 1(1).

52. Abarca J, Chino B, Llacho M, Gonzales K, Mucho K, Vásquez R, et al. Relación entre Educación, Envejecimiento y Deterioro Cognitivo en una Muestra de Adultos Mayores de Arequipa. *Revista Neuropsicología, Neuropsiquiatría y Neurociencias*. 2008; 8(2).
53. Cortés Castell E, Veciana Galindo C, Torro Montell L, Sirvent Segura E, Rizo Baeza M, Gil Guillén V. Efecto sobre el neurodesarrollo y neuroprotección en pez cebra de un extracto polifenólico de huesos de aceituna. *Nutr Hosp*. 2014; 30(2).
54. Sabogal Guáqueta A, Muñoz Manco J, Cortes Rendón N, Ramirez Pineda J, Lamprea Rodriguez M, Osori Durango E, et al. Flavonoides como estrategia terapéutica en neurodegeneración: hallazgos y retos. *VITAE, REVISTA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA*. 2014; 21(1).
55. García O, Massieu L. Interacción entre las células gliales y neuronales y su papel en la muerte y sobrevivencia neuronal. *Arch Neurocienc. (Mex DF)*. 2004; 9(1).
56. Medina G. Efecto del alcohol etílico sobre la actividad específica de aminopetidases reguladoras de neuropeptidos en neuronas y astrogliia en cultivo. [Trabajo de investigación tutelado]. Universidad de Jaén. Facultad de ciencias experimentales y de la salud. 2006.
57. Pla Rodríguez A. Importancia de los mecanismos de degradación de proteínas en la neurodegeneración causada por el abuso de alcohol: papel de los receptores TLR4. [Tesis para obtener el grado doctoral] Universidad politécnica de Valencia. 2014.
58. Schlesinger Piedrahita A, Pescador Vargas B, Roa Culma LA. Neurotoxicidad alcohólica. *Revista Med*. 2017; 25(1).
59. Téllez Mosquera J, Cote Menéndez M. ALCOHOL ETÍLICO: Un tóxico de alto riesgo para la salud humana socialmente aceptado. *ALCOHOL ETÍLICO: Un tóxico de alto riesgo para la salud humana socialmente aceptado. Rev. Fac. Med*. 2006; 54(1).
60. Almansa Frías I. "Efecto del consumo crónico de etanol sobre el cerebro de rata. Tratamiento con naltrexona". [Tesis Doctoral]. Universidad CEU Cardenal Herrera. Valencia. 2011.



61. Porcu F. Efecto del consumo intensivo y repetido de etanol sobre la integridad de la barrera hematoencefálica. Implicación de los receptores toll-like 4 (TLR4). [Tesis Doctoral]. Universidad Complutense de Madrid. 2014.
62. Rodríguez A, Solano M. Daño cerebral por estrés oxidativo y alteraciones en el comportamiento después de la abstinencia alcohólica en ratas Lewis. Revista del Postgrado de Psiquiatría. 2008; 1(3).
63. López A, Fernando C, Lazarova Z, Bañuelos R, Sánchez S. Antioxidantes, un paradigma en el tratamiento de enfermedades. REVISTA ANACEM,. 2012; 6(1).
64. Pajuelo M, Yamada L, Florentini E, Carranza E. Enzimas antioxidantes en cerebro de cobayos nativos de las grandes alturas. Ciencia e Investigación. 2004; VII(2).
65. Tapia R. Enfermedades neurodegenerativas: ¿Mecanismos comunes de muerte celular? Gac Méd Méx. 1998; 134(6).
66. Almeguer Gotay D, Almaguer Mederos L. Estrés oxidativo y muerte neuronal. Una visión biomolecular. Rev Mex Neuroci. 2006; 7(4).
67. Peinado M, del Moral M, Esteban F, Martínez E, Siles E, Jiménez A, et al. Envejecimiento y neurodegeneración: bases moleculares y celulares. REV NEUROL. 2000; 31(11).
68. Ozel Turkcu U, Bilgihan A, Biberoglu G, Mertoglu O. Carnosine supplementation protects rat brain tissue against ethanol-induced oxidative stress. Mol Cell Biochem. 2010; 339.
69. Guillem García L. Efecto de la administración aguda de etanol sobre marcadores de estrés oxidativo en el cerebro de ratón. Trabajo fin de grado de biotecnología. Universidad politécnica de Valencia. 2016.
70. Chirina Y, Orozco M, Pedraza J. Participación del peroxinitrito en diversas enfermedades. Rev Invest Clin. 2006; 58(4).
71. Díaz M, González M, Blanco L. El sistema antioxidante del glutatión en la etiopatología de la disfunción nigro-estriatal. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas. 2015; 34(2).
72. Díaz M, González M, Fernández I, Harruitiner I, Piedra S. El daño oxidativo

- afecta la consolidación de la memoria en ratas. *Biotecnología Aplicada*. 2011; 28.
73. Vogt B, Richie J. Glutathione Depletion and Recovery After Acute Ethanol Administration in the Aging Mouse. *Biochem Pharmacol.* 2007; 73(10).
74. Martínez Sámano J, Torres Durán P, Juárez Oropeza M. El glutatión y su asociación con las Enfermedades neurodegenerativas, la Esquizofrenia, el envejecimiento y la Isquemia cerebral. *REB*. 2011; 30(2).
75. Bonola Gallardo I, Irigoyen Camacho M, Vera Robles L, Campero Celis A, Hamdan Partida A. Estrés oxidante: el sistema enzimático glutatión y la salud bucal. *Ciencias Clínicas*. 2014; 15(1).
76. Arteaga M, Díaz M, Ross Y, Gavilondo P. Daño cerebral por estrés oxidativo y alteraciones en el comportamiento después de la abstinencia alcohólica en ratas Lewis. *Revista Archivo del Hospital Universitario "General Calixto García"*. 2017.
77. Quesada Yamasaki D, Arce Soto E, Ramírez K, Formaguera Trías J, Mora Gallegos A. El papel de la microglía en la señalización neuroinflamatoria y la respuesta neuroinmune. *Revista eNeurobiología*. 2016; 7(16).
78. Imosemi I. The Role of Antioxidants in Cerebellar Development. A Review of Literature. *Int. J. Morphol.* 2013; 31(1).
79. Cristóvão J, Broche Y, Rodríguez L. Efectos nocivos del consumo prolongado de alcohol sobre el sistema nervioso central. *Arch Neurocién (Mex)*. 2015; 20(1).
80. Rodrigues Apfel M, Ésberard C, Pereira F, Bahamad F, Oliveira R. Estudo estereológico das células de purkinje cerebelares submetidas à intoxicação alcoólica em ratos wistar. *Arq Neuropsiquiatr*. 2002; 60(2A).
81. Guadagnoli T. ¿La neurotoxicidad del etanol depende del estadio de diferenciación neuronal? Estudio en cultivos primarios de neuronas corticales. [Tesis doctoral]. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Universidad de Buenos Aires. 2014.
82. La Fata G, Weber P, Mohajeri H. Effects of Vitamin E on Cognitive Performance during Ageing and in Alzheimer's Disease. *Nutrients*. 2014; 6.
83. Dávila J. Efecto neuroprotector de la semilla de prunus dulcis "almendra" sobre el tejido nervioso en ratones inducidos a estrés por desorientación motora". [Tesis].

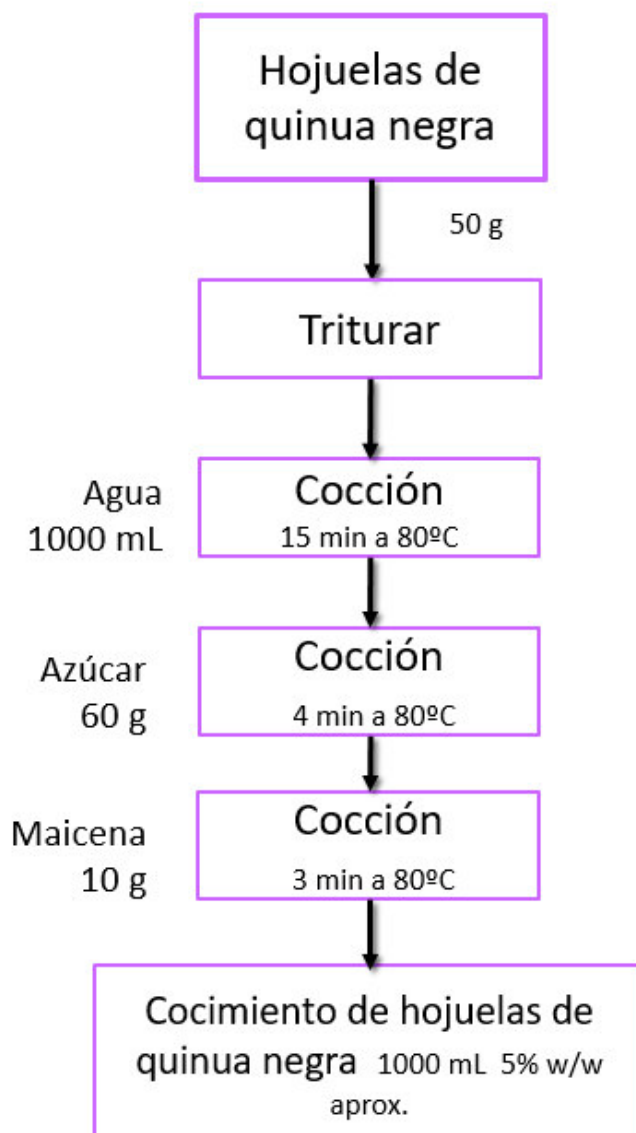
Universidad Mayor de San Marcos.. 2015.

84. de la Peña A, Redondo P. Radicales libres y mecanismos antioxidantes. Generalidades y aplicaciones en la práctica clínica. Departamento de Medicina Interna. Clínica Universitaria de Navarra. 1997.
85. Berg G. Departamento de Medicina Interna. Clínica Universitaria de Navarra. Revista Argentina de Cardiología. 2010; 78(5).
86. Soto M, Raventós H. Papel del estrés oxidativo en la esquizofrenia. AMC. 2008; 50(4).
87. Maestro Durán R, Borja Padilla R. Actividad antioxidante de las vitaminas C y E y de la provitamina A. Fasc. 1993; 44.
88. Esmer C, Salazar A, Rentería E, Bravo A. Hallazgos clínicos y moleculares en una paciente con ataxia por deficiencia de vitamina E, homocigota para la mutación c.205-1G>C en el gen TTPA. Bol Med Hosp Infant Mex. 2013; 70(4).
89. Selvaraju T, Khazaai H, Abd M, Vasudevan R. The neuroprotective effects of tocotrienol rich fraction and alpha tocopherol against glutamate injury in astrocytes. Bosn J Basic Med Sci. 2014; 14(4).
90. Dolores M, Ramírez M, Cobo M, Camacho B, García M, Carrera P, et al. Modificaciones calcio dependiente de radicales libres en sinaptosomas de corteza frontal de ratón por la ingesta crónica de alcohol. Arch Neurocién (Mex). 2006; 11(4).
91. Vidaurre Ruiz J, Dias Rojas G, Mendoza Llamo E, Solano Cornejo Miguel. Variación del contenido de betalaínas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante durante el procesamiento de la quinua. Rev Soc Quím Perú. 2017; 83(3).
92. Estrada Reyes R, Ubaldo Suárez D, Araujo Escalona A. Los flavonoides y el sistema nervioso central. Salud mental. 2012; 35(5).
93. Costa L, Garrick J, Roqué P, Pellacani C. Mechanisms of Neuroprotection by Quercetin: Counteracting Oxidative Stress and More. Hindawi Publishing Corporation Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2016.
94. Wagner C, Fachinetto R, Dalla C, Bidinotto V, Severo D, de Oliveira G, et al.

- Quercitrin, a glycoside form of quercetin, prevents lip peroxidation in vitro. Science Direct. 2006.
95. Hernández R. Efectos de la quercetina sobre las alteraciones en el comportamiento y estrés oxidativo inducidas por rayos X en ratas. [Tesis Doctoral]. Universidad de León. 2013.
96. Mehdizadeh M, Taghi M, Nobakht M, Aryanpour R. Neuroprotective Effect of Quercetin in a Model of Parkinson's Disease in Rat: A histochemical Analysis. Basic and Clinical neuroscience. 2009; 1(1).
97. Pripem A, Watanotorn J, Sutthiparinyanont S, Phachonpai W, Muchimapura S. Anxiety and cognitive effects of quercetin liposomes in rats. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine. 2008; 4.
98. Aguirre L.. Efectos del consumo de tortilla de maíz azul de la raza mixteco sobre la capacidad de memoria visoespacial en ratas adultas. [Tesis] Universidad de Guadalajara, México. 2015.
99. Jáuregui L. Efecto neuroprotector del extracto del zea mays l. sobre la bradicinesia y rigidez inducidas por haloperidol en ratas. [Tesis]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú. 2016.

## ANEXOS

### Anexo 1: Flujograma de la preparación del cocimiento de hojuelas de *Chenopodium quinoa* (quinua) variedad negra



## Anexo 2: Flujoograma del diseño experimental

