



Efecto del liofilizado de hojas de *Mangifera indica* L. “mango kent”, sobre memoria espacial y la lipoperoxidación en membranas neuronales de *Rattus norvegicus* Sprague Dawley ovariectomizadas

Daniel Asunción-Alvarez¹, Roberto Ybañez-Julca²

Información del artículo

Historia del artículo

Recibido: 12/02/2018

Aprobado: 15/03/2018

Autor correspondal

Roberto Ybañez-Julca
rybanez@untru.edu.pe

Financiamiento

Autofinanciado

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener
ningún conflicto de interés.

Citar como

Asunción-Alvarez D, Ybañez-Julca R. Efecto del liofilizado de hojas de *Mangifera indica* L. “mango kent”, sobre memoria espacial y la lipoperoxidación en membranas neuronales de *Rattus norvegicus* Sprague Dawley ovariectomizadas. Rev Peru Med Integrativa.2018;3(1):18-25.

Resumen

Objetivos. Evaluar el efecto del liofilizado de hojas de *Mangifera indica* L. mango Kent, sobre memoria espacial y la lipoperoxidación en membranas neuronales de *Rattus norvegicus* Sprague Dawley ovariectomizadas. **Materiales y métodos.** Estudio experimental. Se usaron 24 especímenes hembras de 2 meses de edad, con un peso entre 150-200 g, dieciocho de ellas fueron previamente ovariectomizadas (OVX); luego fueron distribuidas (n = 6) en grupos blanco, control, problema 1 y problema 2. Al grupo control se le administró vía oral (VO) NaCl 9‰/oo, a los grupos problema 1 y 2 se les administró VO el liofilizado a una concentración de 0,05 g/mL en dosis de 0,25 y 0,50 g/kg, respectivamente, la administración fue durante un periodo de 8 semanas. La memoria espacial se evaluó mediante el laberinto acuático de Morris y para determinar la lipoperoxidación en membranas neuronales según niveles de malondialdehído (MDA), se utilizó el ensayo de las especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) a 532 nm. **Resultados.** Los niveles de MDA (nmol/mL) en medianas (rango intercuartilar) fueron en el grupo control: 5,0 (2,8); blanco: 2,2 (1,7); problema 1: 3,6 (0,3); y problema 2: 4,6 (1,1). La memoria espacial evaluada a través del laberinto acuático de Morris presentó una mejora significativa (p = 0,04) en el parámetro tiempo de latencia de escape para el grupo problema 1 (32,4 ± 17,6 s) en comparación con el control (75,8 ± 18,6 s). **Conclusiones.** El liofilizado de hojas de *Mangifera indica* L. mango Kent, a dosis de 0,25 g/kg mejora la memoria espacial y presenta efecto antioxidante expresado en la disminución de los niveles de MDA; aunque no se encontraron diferencias significativas en comparación con el control.

Palabras clave: *Mangifera indica* L.; Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico; Memoria Espacial; Peroxidación de Lipido; Experimentación Animal; Antioxidante/farmacología (Fuente: DeCS)

Effect of lyophilized of leaves of *Mangifera indica* L. “mango kent”, on spatial memory and lipoperoxidation in neuronal membranes of *Rattus norvegicus* Sprague Dawley ovariectomized

Abstract

Objectives. To evaluate the effect of the lyophilized of leaves of *Mangifera indica* L. mango Kent, on spatial memory and lipid peroxidation in neuronal membranes of *Rattus norvegicus* Sprague Dawley ovariectomized. **Material and methods.** Experimental research. Twenty-four female specimens of 2 months of age, with a weight between 150-200 g, were used; eighteen of them were previously ovariectomized (OVX); then they were distributed (n = 6) in groups non-intervened, control, problem 1 and problem 2. The control group was administered orally (VO) NaCl 9‰/oo, the problem groups 1 and 2 were administered VO lyophilized at a concentration of 0.05 g/mL in doses of 0.25 g/kg and 0.50 g/kg respectively, administration was for a period of 8 weeks. Spatial memory was evaluated by the Morris Water Maze and to determine the lipoperoxidation in neuronal membranes according to malondialdehyde levels (MDA), the assay of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) at 532 nm was used. **Results.** The median (interquartile range) MDA (nmol/mL) values were on control group: 5.0 (2.8), non-intervened group: 2.2 (1.7), problem 1 group: 3.6 (0.3) and problem 2 group: 4.6 (1.1). The spatial memory evaluated through the Morris Water Maze showed a significant improvement (p = 0.04) in the Escape Latency Time parameter for the problem group 1 (32.4 ± 17.6 s) in comparison with the control (75.8 ± 18.6 s). **Conclusions.** The lyophilized of leaves of *Mangifera indica* L. mango Kent, at a dose of 0.25 g/kg improves spatial memory and presents antioxidant effect expressed in the decrease of MDA levels; instead of that, there were no significant differences between experimental groups and control.

Keywords: *Mangifera indica* L.; Thiobarbituric Acid Reactive Substances; Spatial Memory; Lipid Peroxidation; Animal Experimentation; Antioxidants/pharmacology (Source: MeSH)

¹ Escuela de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de Trujillo.

² Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo.

Introducción

El proceso fisiológico de envejecimiento suele ser un periodo en el que los seres humanos son más vulnerables de sufrir más enfermedades y discapacidades; sin embargo, este tiene un efecto diferente en las personas de sexo femenino, en quienes el proceso de envejecimiento se asocia con un desbalance hormonal ⁽¹⁾. El hito más importante de esta transición natural se da con la aparición de la menopausia, definida como el último periodo menstrual que una mujer tiene, y es diagnosticado después de un periodo de un año sin aparición de menstruación ⁽²⁾. Este proceso fisiológico complejo es causado por la disminución de la producción de 17 β -estradiol por los ovarios y trae como consecuencia una serie de cambios fisiológicos que pueden interferir con la capacidad para hacer frente a un nuevo estado psicológico y social, además de afectar la calidad de vida ^(3,4).

Adicionalmente a su efecto hormonal, los estrógenos son capaces de eliminar radicales libres gracias al anillo fenólico que tienen en posición A; por lo tanto, pueden inhibir la generación de especies de oxígeno reactivo (ROS) o neutralizar su exceso ^(5,6). Su depleción en la menopausia puede ocasionar un desequilibrio redox, condición en la que ROS y los prooxidantes superan la capacidad antioxidante y producen un daño celular grave ⁽⁷⁾. Uno de los tejidos más sensibles al estrés oxidativo y a las ROS es el neuronal, debido a que posee una cantidad considerable de lípidos insaturados susceptibles a la peroxidación lipídica ^(8,9). La lipoperoxidación de las membranas celulares trae productos químicos como el malondialdehído (MDA), el cual altera muchas funciones, entre ellas las relacionadas con la memoria ^(10,11). En la menopausia se pierde el efecto regulador de los estrógenos sobre la peroxidación lipídica en las neuronas, lo que explica, en parte, los efectos sobre la memoria y cognición que aparecen comúnmente en este periodo ^(12,13).

La terapia hormonal sustitutiva (THS) es el tratamiento de elección para el manejo de los síntomas vasomotores relacionados con la menopausia ⁽¹⁴⁾; sin embargo, su uso en la prevención de enfermedades crónicas no transmisibles ⁽¹⁵⁾; o en la afectación de la memoria y envejecimiento cognitivo es aún controversial ⁽¹⁶⁻¹⁸⁾. Adicionalmente, sus numerosos efectos adversos, así como contraindicaciones y riesgos, han hecho que se busquen alternativas terapéuticas que tengan una mejor seguridad y tolerancia que la THS ⁽¹⁹⁾. Una de estas alternativas son los fitoestrógenos, componentes bioactivos provenientes de una especie vegetal en particular, con efectos similares a los estrógenos sintetizados de forma fisiológica ^(20,21).

Mangifera indica L. (mango) es una de las plantas de uso común de las que más evidencias se tienen sobre sus propiedades antioxidantes y contenido de fitoestrógenos *in vitro* ^(22,23); a pesar de ello no se han encontrado estudios que corroboren este efecto en modelos experimentales *in vivo*. Por ello, el presente trabajo de investigación tiene por objetivo determinar si el liofilizado de hojas de *Mangifera indica* L., mango Kent, mejora los parámetros de memoria espacial en el laberinto acuático de Morris y previene la lipoperoxidación en membranas neuronales de *Rattus norvegicus* Sprague Dawley ovariectomizadas.

Materiales y métodos

Material vegetal

Hojas de *Mangifera indica* L., mango Kent, recolectadas en el distrito de Bagua Grande, provincia de Utcubamba, región Amazonas; con coordenadas de latitud sur 5° 45' 26.0"; longitud oeste 78° 26' 43.0"y altitud de 450 m s.n.m. La recolección fue en el mes de noviembre de 2017.

Preparación del extracto liofilizado de hojas de *Mangifera indica* L., mango Kent

Se adquirieron 5 kg de hojas de *Mangifera indica* L., mango Kent, las cuales fueron llevadas al laboratorio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo para seleccionar las que se encontraban en mejor estado. Las hojas fueron lavadas, disecadas y trituras, para luego preparar un extracto hidroalcohólico al 50%. En primer lugar, se agregó etanol 50° GL a la muestra, luego esta mezcla se transfirió a un balón de 500 mL. Posteriormente, se adicionó cantidad suficiente de etanol al 50% para homogeneizar la muestra y los solventes. El balón se llevó a un sistema de reflujo y dos horas después se filtró en caliente con ayuda del vacío. Se elaboró un segundo y tercer extracto con el procesamiento antes mencionado para, finalmente, juntar todos los extractos y concentrarlos por evaporación en baño María. Este extracto concentrado se guardó, fue llevado a un rotacool y se congeló a -80 °C para, posteriormente, ser liofilizado. Los liofilizados se conservaron en refrigeración a 4 °C en tubos Falcon herméticamente cerrados con parafil.

Animales de experimentación

Se utilizaron 24 ejemplares *Rattus norvegicus* Sprague Dawley hembras, de 60 días de nacidas, con un peso entre 150-200 g, procedentes del Bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia – Lima: su posterior adaptación

se realizó en el Bioterio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo, a una temperatura de 22-27 °C, con ciclos de luz/oscuridad de 12 h, alimentación con maíz y agua *ad libitum*.

Los animales de experimentación fueron divididos en cuatro grupos: blanco (n = 6), conformado por especímenes no ovariectomizados; control (n = 6), especímenes ovariectomizados a los que se le administró vía oral (VO) NaCl 9‰/oo; y los grupos problema I (n = 6) y problema II (n = 6), que fueron ovariectomizados y a los cuales se les administró VO el liofilizado a una concentración de 0,05 g/mL en dosis de 0,25 y 0,50 g/kg, respectivamente, la administración fue durante ocho semanas.

Ovariectomía en animales de experimentación

Los especímenes fueron anestesiados con ketamina 110 mg/kg vía intraperitoneal; posteriormente, fueron intervenidos quirúrgicamente (previa limpieza y asepsia) de acuerdo a la técnica descrita en estudios previos^(24,25): se realizó un corte en la piel de la parte inferior del abdomen con un bisturí 15; seguidamente, se procedió a cortar el peritoneo, por debajo de la primera incisión, para luego ubicar el cuerpo uterino, las trompas de Falopio y los ovarios. Una vez identificadas las trompas y los ovarios, se procedió a seccionar y extirpar cada ovario. Se colocaron los cuernos uterinos en su posición inicial y se procedió al cierre de la cavidad abdominal en dos planos: peritoneo y piel, mediante sutura discontinua (puntos independientes) con catgut crómico 4-0; una vez realizado el cierre de la herida, se lavó con solución de yodopovidona y se colocó sobre ella violeta de genciana. La herida se observó diariamente para confirmar la ausencia de complicaciones hasta su cicatrización en forma similar a estudios anteriores^(26,27).

Determinación de la lipoperoxidación de membranas neuronales según niveles de malondialdehído en cerebro de *Rattus norvegicus* Sprague Dawley ovariectomizadas

Se sacrificó a los especímenes mediante traumatismo en las vértebras cervicales para la extracción del cerebro⁽²⁸⁾. El tejido obtenido se mantuvo a 4 °C y se homogeneizó con ayuda de un mortero y pilón en tampón fosfato de potasio helado 20 mM de pH 7,4. Posteriormente, se centrifugó a 1700 g durante 10 min a 4 °C, se recogió el sobrenadante y se incubó en baño María a 37 °C y en oscuridad por 60 min; finalmente, se adicionó 0,02 mL de ácido tricloroacético (ATC) al 10% (p/v) y se centrifugó a 960 g durante 10 min a 4 °C⁽²⁶⁾.

Se tomó para cada tubo de ensayo 1 mL del homogenizado anterior, más 2,0 mL de ácido tiobarbitúrico (ATB) al 0,67%,

luego se colocó en baño María entre 95 a 100 °C durante 60 min y posteriormente fueron enfriados en hielo por 15 min. Luego, se realizó una extracción en frío de los aductos con una mezcla de 2,5 mL de n-butanol-piridina (15:1 v/v), con el fin de separar la fase orgánica, y 0,5 mL de agua destilada. Los sobrenadantes de cada uno de los tubos de ensayo fueron centrifugados a 960 g durante 10 min a 4 °C, se extrajo el sobrenadante y se llevó a leer a 532 nm; Para la preparación de los blancos se usó un volumen a partes iguales de ATC + ATB⁽²⁶⁾.

Determinación de la capacidad de memoria según el laberinto acuático de Morris⁽²⁹⁻³¹⁾

El sistema de trabajo se realizó en cinco días, cuatro para la fase de adquisición y uno para la prueba de retención. En la fase de adquisición se usó una piscina con dos claves visuales (sol y luna) y una plataforma, en donde se introdujo a un sujeto de experimentación y se le dejó nadar libremente por 120 s. Si durante ese tiempo, el sujeto de estudio no encontró la plataforma, se le colocó en la plataforma por 15 s, se le retiró y secó con una toalla, finalmente se le dejó descansar por cinco minutos. Después de ello, se repetía la prueba hasta por dos veces. Se registró el tiempo que el espécimen tardó en encontrar la plataforma sumergida (tiempo de latencia de escape), considerándose como cero segundos los ensayos restantes si el espécimen lograba alcanzar la plataforma antes de 120 s en alguno de los ensayos.

El último día (fase de retención), se tuvo la misma piscina, pero sin la plataforma sumergida. Se dejó nadar al espécimen durante 60 s en un único ensayo, y se registró el tiempo que permaneció en el cuadrante noreste donde estuvo la plataforma en las pruebas anteriores (tiempo de permanencia) y el número de veces que cruzó por el mencionado lugar (número de cruzamientos).

Análisis estadístico

Se usó el paquete estadístico SPSS ver. 23.0 (Statistical Package for the Social Sciences) para procesar los datos. Se realizó la prueba de Kruskal-Wallis (con pruebas *post hoc*) para determinar si existía diferencia significativa en las concentraciones de malondialdehído (MDA) encontradas en las membranas neuronales, así como el tiempo de latencia de escape, tiempo de permanencia y número de cruzamientos evaluados en el test del laberinto acuático de Morris; se utilizó la prueba de ANOVA de medidas repetidas con comparaciones intragrupos e intergrupos. Se analizaron los datos considerándose diferencias significativas con un $p < 0,05$.

Consideraciones éticas

Todos los procesos se hicieron para evitar el menor daño posible del animal siguiendo los datos de la American Veterinary Medical Association (AVMA) donde se especifica que los animales de laboratorio deben de ser tratados adecuadamente dado que gracias a ellos se realiza una investigación con propósito científico ⁽²⁸⁾.

Resultados

Con respecto a la evaluación de la memoria espacial, durante la fase de adquisición los tiempos de latencia de escape (TLE), oscilaron entre 32,4 y 75,8 s, en promedio. Se encontraron diferencias significativas entre los valores de tiempo de latencia de escape al día 1, 2, 3 y 4 ($p < 0,001$); asimismo, se encontró relación entre estas diferencias y el grupo de estudio ($p = 0,04$) (Figura 1).

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos de estudio y los parámetros tiempo de permanencia ($p = 0,250$) y número de cruzamientos ($p = 0,131$) (Figura 2).

Las evaluaciones en las concentraciones de MDA por cada grupo de investigación mostraron que el grupo control que recibió ovariectomía sin tratamiento fitoterapéutico tuvo una mediana de 5,0 (2,7) nmol/mL, seguida por un valor de 4,6 (1,1) nmol/mL del grupo que recibió el liofilizado de *Mangifera indica* L. 0,50 g/kg y por una mediana de 3,7 (0,3) nmol/mL por parte del grupo que recibió el extracto de *Mangifera indica* L. 0,25 g/kg. Se encontró una diferencia significativa entre los rangos de valores de MDA por grupo de estudio ($p = 0,004$). Adicionalmente, se encontraron diferencias ante la comparación entre el grupo blanco y problema 2 ($p = 0,017$); y el grupo control ($p = 0,006$) (Figura 3).

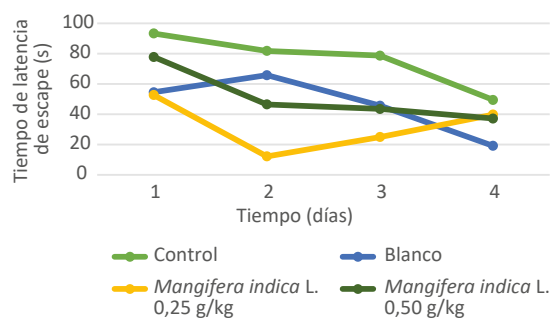


Figura 1. Efecto del liofilizado de hojas de *Mangifera indica* L., mango Kent, sobre el tiempo de latencia de escape promedio de *Rattus norvegicus* Sprague Dawley en los días 1-4 de la prueba del laberinto acuático de Morris.

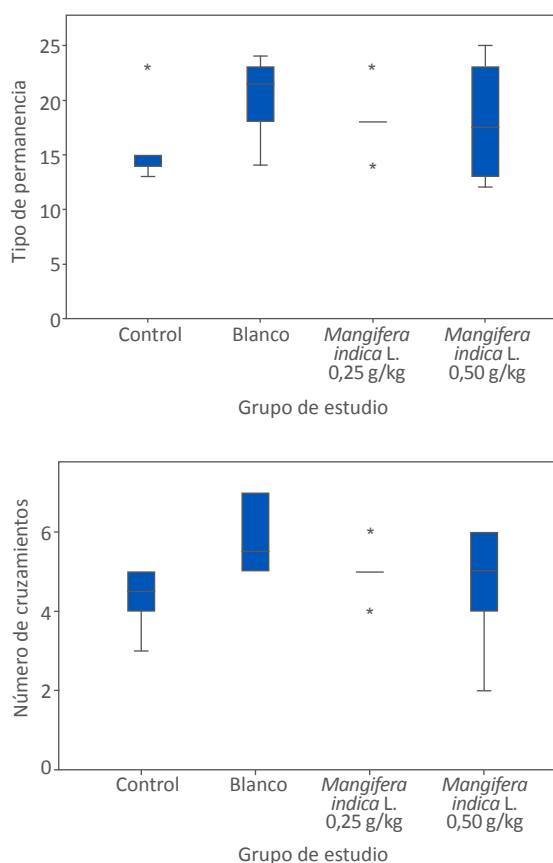


Figura 2. Efecto del liofilizado de hojas de *Mangifera indica* L., mango Kent, sobre el tiempo de permanencia (TP) y el número de cruzamientos (NC) en *Rattus norvegicus* Sprague Dawley en el día 5 de la prueba de laberinto acuático de Morris.

Discusión

Este estudio encontró diferencias significativas en los niveles de MDA (nmol/mL) en homogeneizado de membranas neuronales en la comparación entre el grupo blanco y el grupo control o el grupo que recibió extracto liofilizado de *Mangifera indica* L. a una dosis de 0,50 g/kg. Se tiene evidencia que la ovariectomía es capaz de disminuir los niveles de las enzimas antioxidantes, superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx), las cuales forman parte de la defensa mitocondrial, así como también de la catalasa (CAT) que es parte de la defensa microsomal ⁽³²⁾. Por otro lado, es bien sabido que en ratas OVX la expresión de NOX4 (subtipo de NADPH oxidasa) aumenta, enzima que está involucrada predominantemente en la regeneración ROS entre la familia de NOX en el cerebro ⁽³³⁾.

La ovariectomía, además, induce la descompensación del equilibrio Bcl-2/Bax disminuyendo la expresión de la primera

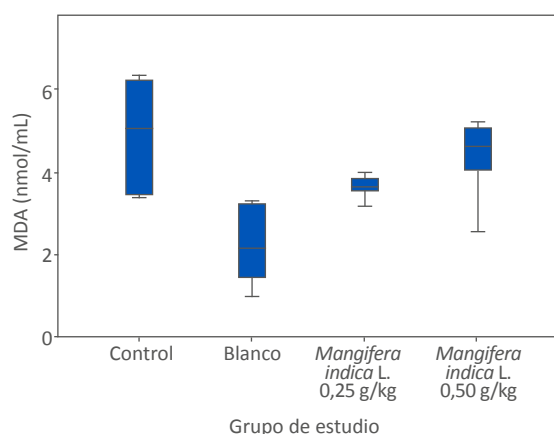


Figura 3. Efecto del liofilizado de hojas de *Mangifera indica* L., en los niveles de malondialdehído (MDA) promedio en membranas neuronales de *Rattus norvegicus Sprague Dawley*.

de las proteínas, e incrementando la segunda, de tal manera que se produce una pérdida de viabilidad celular. Además, que reduce la expresión de moléculas del hipocampo que están implicadas en plasticidad sináptica como son la sinaptofisina y la forma fosforilada de CREB⁽³⁴⁻³⁶⁾.

El extracto liofilizado de hojas *Mangifera indica* L. puede deber su efecto antioxidante a la presencia de componentes reportados en otros estudios^(37,38) como catequinas, ácido gálico, ácido mangiferónico y mangiferina, esta última con estructura polifenólica es una C-glucósido xantona [2-C-β-D-glucopiranosil-1,3,6,7-tetrahidroxixantona; C₁₉H₁₈O₁₁] a la cual se le atribuye diversas propiedades biológicas, dentro de ellas la capacidad de inhibir la peroxidación de fosfolípidos. Estudios confirman que el liofilizado de hojas de *Mangifera indica* L. posee una poderosa actividad de barrido de radicales HO• y actúa como un quelante del hierro, además que muestra un efecto inhibidor sobre la peroxidación de fosfolípidos cerebrales de rata^(39,40).

Por otro lado, también se sabe que la mangiferina es capaz de inhibir la activación del inflammasoma tipo 3, que contiene dominio de pirina (NLRP3) el cual genera ROS y participa en la neurotoxicidad/neurodegeneración mediante la vía de señalización que involucra a la proteína que interactúa con la tioredoxina (TXNIP)⁽⁴¹⁾. Adicionalmente, se tiene registro que, en células corticales, la mangiferina además de influir en las proteínas mitocondriales y apoptóticas, ya que regula negativamente (*down-regulation*) la activación del inflammasoma NLRP3 y NF-κB, así como la producción de citocinas inflamatorias, es capaz de regular positivamente (*up-regulation*) la expresión de Nrf2 y HO-1⁽⁴²⁾. El primero es un factor citoprotector que regula la expresión de genes que codifican proteínas antioxidantes, antiinflamatorias y desintoxicantes, y la segunda está involucrada en la

protección contra la lesión oxidativa, la regulación de la apoptosis, la modulación de la inflamación y la contribución a la angiogénesis⁽⁴³⁾.

El tiempo de latencia de escape (TLE) en los cuatro primeros días del Laberinto acuático de Morris, presentó diferencias estadísticamente significativas tanto a través del tiempo de observación como en la comparación entre el grupo control y el grupo problema 1. Si bien todos los grupos tuvieron una tendencia inicial decreciente en el TLE en los cuatro días de estudio, el grupo que recibió el liofilizado de *Mangifera indica* L. en la dosis de 0,25 g/kg, no sostuvo esta tendencia desde la mitad de la intervención. Dos estudios previos en modelos experimentales, que usaron extractos etanólicos del fruto de *Mangifera indica* L., encontraron mejora en los TLE y tiempos de permanencia (TP) después de tratamientos de 7 días⁽⁴⁴⁾ y 3 semanas⁽⁴⁵⁾, a diferencia de nuestro estudio que solo encontró mejorías en el TLE, más no en el TP o NC.

Asimismo, un estudio previo⁽⁴⁶⁾ con técnicas de extracción especializadas de mangiferina, en una intervención de 22 semanas, presentó resultados acordes a los estudios previos, con mejorías en todos los parámetros de la prueba de Morris en modelos experimentales de Alzheimer. Queda claro que los componentes de los extractos derivados de *Mangifera indica* L. tienen propiedades antioxidantes y que mejoran la cognición en modelos experimentales, incluso ya se ha estudiado la posibilidad de que la mangiferina aumente los niveles del factor neurotrófico derivado del cerebro del hipocampo (BDNF)⁽⁴⁷⁻⁴⁹⁾, el cual es uno de los factores citoesqueléticos implicados en la regeneración axonal, sinaptogénesis, y la regulación de la potenciación a largo plazo del hipocampo, sobre todo si se une a un receptor de quinasa relacionado con tropomiosina (Trk) lo que promueve la eficacia sináptica^(50,51).

Si bien el diseño de este estudio no permite establecer una relación entre la acción antioxidante contra la peroxidación lipídica de membranas neuronales y mejora de la cognición en este modelo experimental, el conocimiento obtenido por experiencias previas hace pensar que esta asociación es, por lo menos, razonable. Sin embargo, al no encontrarse estudios previos en hojas de *Mangifera indica* L., futuras investigaciones deberán ahondar si esta relación es aplicable a los productos derivados de esta parte de la planta estudiada.

En conclusión, el extracto liofilizado de hojas de *Mangifera indica* L., mango Kent, mostró actividad antioxidante, en los niveles de MDA, aunque no estadísticamente significativa en comparación al grupo control. En contraste, los grupos que recibieron el liofilizado mostraron mejoría en la memoria espacial (tiempo de latencia de escape) en comparación al control.

Referencias bibliográficas

1. Ward K, Deneris A. An Update on Menopause Management. *J Midwifery Womens Health*. 2018;63(2):168-177. doi:10.1111/jmwh.12737
2. Fritz MA, Speroff L. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. 8th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2011.
3. Li R-X, Ma M, Xiao X-R, Xu Y, Chen X-Y, Li B. Perimenopausal syndrome and mood disorders in perimenopause: prevalence, severity, relationships, and risk factors. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(32):e4466. doi:10.1097/MD.0000000000004466
4. Sánchez-Rodríguez MA, Castrejón-Delgado L, Zacarías-Flores M, Arronte-Rosales A, Mendoza-Núñez VM. Quality of life among post-menopausal women due to oxidative stress boosted by dysthymia and anxiety. *BMC Womens Health*. 2017;17. doi:10.1186/s12905-016-0358-7
5. Prokai L, Rivera-Portalatin NM, Prokai-Tatrai K. Quantitative structure-activity relationships predicting the antioxidant potency of 17 β -estradiol-related polycyclic phenols to inhibit lipid peroxidation. *Int J Mol Sci*. 2013;14(1):1443-1454. doi:10.3390/ijms14011443
6. Abbas AM, Elsamanoudy AZ. Effects of 17 β -estradiol and antioxidant administration on oxidative stress and insulin resistance in ovariectomized rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 2011;89(7):497-504. doi:10.1139/y11-053
7. Can S, Cigsar G, Gur Ozabacigil F, et al. Hepatoprotective effect of 17 β -estradiol as antioxidant modulators against stress damage. *Hepat Mon*. 2015;15(2):e22633. doi:10.5812/hepatmon.22633
8. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:360438. doi:10.1155/2014/360438
9. Pansini F, Mollica G, Bergamini CM. Management of the Menopausal Disturbances and Oxidative Stress. *Curr Pharm Des*. 2005;11(16):2063-2073. doi:10.2174/1381612054065819
10. Cakir T, Goktas B, Mutlu MF, et al. Advanced oxidation protein products and malondialdehyde - the new biological markers of oxidative stress - are elevated in postmenopausal women. *Ginek Pol*. 2016;87(5):321-325.
11. Prokai L, Simpkins JW. Structure-nongenomic neuroprotection relationship of estrogens and estrogen-derived compounds. *Pharmacol Ther*. 2007;114(1):1-12. doi:10.1016/j.pharmthera.2007.01.006
12. Vedder H, Anthes N, Stumm G, Würz C, Behl C, Krieg J-C. Estrogen Hormones Reduce Lipid Peroxidation in Cells and Tissues of the Central Nervous System. *J Neurochem*. 1999;72(6):2531-2538. doi:10.1046/j.1471-4159.1999.0722531.x
13. Sánchez-Rodríguez MA, Zacarías-Flores M, Arronte-Rosales A, Correa-Muñoz E, Mendoza-Núñez VM. Menopause as risk factor for oxidative stress. *Menopause*. 2012;19(3):361. doi:10.1097/gme.0b013e318229977d
14. ACOG Practice Bulletin No. 141: management of menopausal symptoms. *Obstet Gynecol*. 2014;123(1):202-216. doi:10.1097/01.AOG.0000441353.20693.78
15. US Preventive Services Task Force, Grossman DC, Curry SJ, et al. Hormone Therapy for the Primary Prevention of Chronic Conditions in Postmenopausal Women: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *JAMA*. 2017;318(22):2224-2233. doi:10.1001/jama.2017.18261
16. Rapp SR, Espeland MA, Shumaker SA, et al. Effect of estrogen plus progestin on global cognitive function in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Memory Study: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2003;289(20):2663-2672. doi:10.1001/jama.289.20.2663
17. Resnick SM, Espeland MA, An Y, et al. Effects of conjugated equine estrogens on cognition and affect in postmenopausal women with prior hysterectomy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(11):4152-4161. doi:10.1210/jc.2009-1340
18. Lethaby A, Hogervorst E, Richards M, Yesufu A, Yaffe K. Hormone replacement therapy for cognitive function in postmenopausal women. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008;(1):CD003122. doi:10.1002/14651858.CD003122.pub2
19. Hickey M, Elliott J, Davison SL. Hormone replacement therapy. *BMJ*. 2012;344:e763.
20. Branca F, Lorenzetti S. Health effects of phytoestrogens. *Forum Nutr*. 2005;(57):100-111.
21. Patisaul HB, Jefferson W. The pros and cons of phytoestrogens. *Front Neuroendocrinol*. 2010;31(4):400-419. doi:10.1016/j.yfrne.2010.03.003
22. Khoo HE, Ismail A. Determination of Daidzein and Genistein Contents in *Mangifera* Fruit. *Mal J Nutr*. 2008;14(2):189-198.
23. Awobajo FO, Olatunji-Bello II, Ogbewey LI. Reproductive impact of aqueous leaf extract of *Mangifera indica* (Mango) on some reproductive functions in female Sprague-Dawley rats. *Biol Med*. 2013;5:58-64.
24. Yin C, Kang L, Lai C, et al. Effects of 17 β -estradiol on leptin signaling in anterior pituitary of ovariectomized

- rats. *Exp Anim*. 2017;66(2):159-166. doi:10.1538/expanim.16-0087
25. Muñoz-Castañeda JR, Muntané J, Herencia C, et al. Ovariectomy exacerbates oxidative stress and cardiopathy induced by adriamycin. *Gynecol Endocrinol Off J Int Soc Gynecol Endocrinol*. 2006;22(2):74-79. doi:10.1080/09513590500490249
 26. Cieza M, Muñoz L. Efecto del extracto acuoso de *Lepidium meyenii* walp "maca" ecotipo amarilla en la lipoperoxidación de membranas neuronales en cerebro de *Rattus Rattus* var albinus ovariectomizados. 2012. <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/1761>. Accessed May 15, 2018.
 27. Julca RY, Diaz IQ, Viteri SC. Efecto de *Calophyllum brasiliense* sobre niveles de malondialdehído en mucosa gástrica de *Rattus norvegicus* var. albinus ovariectomizadas. *Perspectiva*. 2015;16(18):239-248.
 28. American Veterinary Medical Foundation. *AVMA Guidelines for the Humane Slaughter of Animals*. Schaumburg: American Veterinary Medical Association; 2016.
 29. Sharma S, Rakoczy S, Brown-Borg H. Assessment of spatial memory in mice. *Life Sci*. 2010;87(17-18):521-536. doi:10.1016/j.lfs.2010.09.004
 30. Ruiz Medina J. Facilitación del aprendizaje y la memoria de una tarea de referencia espacial en el Laberinto Acuático de Morris por autoestimulación eléctrica intracraneal, en ratas Wistar. Universitat Autònoma de Barcelona; 2008. <https://ddd.uab.cat/record/37593>. Accessed May 15, 2018.
 31. Rubio J, Qiong W, Liu X, et al. Aqueous Extract of Black Maca (*Lepidium meyenii*) on Memory Impairment Induced by Ovariectomy in Mice. *Evid-Based Complement Altern Med ECAM*. 2011;2011:253958. doi:10.1093/ecam/nen063
 32. Ha BJ. Oxidative stress in ovariectomy menopause and role of chondroitin sulfate. *Arch Pharm Res*. 2004;27(8):867-872.
 33. Hao F, Gu Y, Tan X, et al. Estrogen Replacement Reduces Oxidative Stress in the Rostral Ventrolateral Medulla of Ovariectomized Rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:2158971. doi:10.1155/2016/2158971
 34. Sharma K, Mehra RD. Long-term administration of estrogen or tamoxifen to ovariectomized rats affords neuroprotection to hippocampal neurons by modulating the expression of Bcl-2 and Bax. *Brain Res*. 2008;1204:1-15. doi:10.1016/j.brainres.2008.01.080
 35. Sales S, Ureshino RP, Pereira RT dos S, et al. Effects of 17beta-estradiol replacement on the apoptotic effects caused by ovariectomy in the rat hippocampus. *Life Sci*. 2010;86(21-22):832-838. doi:10.1016/j.lfs.2010.04.002
 36. Sharma K, Mehra RD, Dhar P, Vij U. Chronic exposure to estrogen and tamoxifen regulates synaptophysin and phosphorylated cAMP response element-binding (CREB) protein expression in CA1 of ovariectomized rat hippocampus. *Brain Res*. 2007;1132(1):10-19. doi:10.1016/j.brainres.2006.11.027
 37. Shah KA, Patel MB, Patel RJ, Parmar PK. *Mangifera indica* (mango). *Pharmacogn Rev*. 2010;4(7):42-48.
 38. Benites Vilchez J, López Vivar J, Kusch Fuschlocher F, et al. Actividad antioxidante, antibacteriana y analgésica de extractos de *Mangifera indica* L. *BIOFARBO*. /:10.
 39. Saha S, Sadhukhan P, Sil PC. Mangiferin: A xanthonoid with multipotent anti-inflammatory potential. *Biofactors*. 2016;42(5):459-474.
 40. Martínez G, Delgado R, Pérez G, Garrido G, Núñez Sellés AJ, León OS. Evaluation of the in vitro antioxidant activity of *Mangifera indica* L. extract (Vimang). *Phytother Res PTR*. et al 2000;14(6):424-427.
 41. Fan K, Ma J, Xiao WJ. Mangiferin attenuates blast-induced traumatic brain injury via inhibiting NLRP3 inflammasome. *Chem Biol Interact*. 2017;271:15-23. doi:10.1016/j.cbi.2017.04.021
 42. Wang Z, Guo S, Wang J, Shen Y, Zhang J, Wu Q. Nrf2/HO-1 mediates the neuroprotective effect of mangiferin on early brain injury after subarachnoid hemorrhage by attenuating mitochondria-related apoptosis and neuroinflammation. *Sci Rep*. 2017;7(1):11883. doi:10.1038/s41598-017-12160-6
 43. Loboda A, Damulewicz M, Pyza E, Jozkowicz A, Dulak J. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2016;73(17):3221-3247. doi:10.1007/s00018-016-2223-0
 44. Kumar B, Vijayakumar M, Govindarajan R, Pushpangadan P. Ethnopharmacological approaches to wound healing-Exploring medicinal plants of India. *J Ethnopharmacol*. 2007;114(2):103-113. doi:10.1016/j.jep.2007.08.010
 45. Wattanathorn J, Muchimapura S, Thukham-Mee W, Ingkaninan K, Wittaya-Areekul S. *Mangifera indica* Fruit Extract Improves Memory Impairment, Cholinergic Dysfunction, and Oxidative Stress Damage in Animal Model of Mild Cognitive Impairment. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:1-7. doi:10.1155/2014/132097
 46. Infante-García C, Ramos-Rodríguez JJ, Delgado-Olmos I, et al. Long-Term Mangiferin Extract Treatment Improves Central Pathology and Cognitive Deficits in APP/PS1 Mice. *Mol Neurobiol*. 2017;54(6):4696-4704. doi:10.1007/s12035-016-0015-z
 47. Feng X, Xue JH, Xie KX, et al. Beneficial effect of Mangiferin against sleep deprivation-induced neurodegeneration and memory impairment in mice. *Biomed Res*. 2017;28(2):769-777.

48. Kasbe P, Jangra A, Lahkar M. Mangiferin ameliorates aluminium chloride-induced cognitive dysfunction via alleviation of hippocampal oxido-nitrosative stress, proinflammatory cytokines and acetylcholinesterase level. *J Trace Elem Med Biol Organ Soc Miner Trace Elem GMS*. 2015;31:107-112. doi:10.1016/j.jtemb.2015.04.002
49. Luo G-Q, Liu L, Gao Q-W, Wu X-N, Xiang W, Deng W-T. Mangiferin prevents corticosterone-induced behavioural deficits via alleviation of oxido-nitrosative stress and down-regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity. *Neurol Res*. 2017;39(8):709-718. doi:10.1080/01616412.2017.1310705
50. Sasi M, Vignoli B, Canossa M, Blum R. Neurobiology of local and intercellular BDNF signaling. *Pflugers Arch*. 2017;469(5-6):593-610. doi:10.1007/s00424-017-1964-4
51. Leal G, Afonso PM, Salazar IL, Duarte CB. Regulation of hippocampal synaptic plasticity by BDNF. *Brain Res*. 2015;1621:82-101. doi:10.1016/j.brainres.2014.10.019