



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

**Efecto de la Epigallocatequina 3-Galato sobre la neurogénesis
hipocámpica**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Biól. Berenice Márquez Valadez

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Gerardo Bernabe Ramírez Rodríguez
Facultad de Medicina

COMITÉ TUTOR: Dra. Selva Lucía Rivas Arancibia
Facultad de Medicina

Dra. Laura Colín Barenque
FEZ, Iztacala

MÉXICO, D.F. Mayo, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted, que el Subcomité de (Biología Experimental y Biomedicina), en su sesión ordinaria del día 11 de febrero de 2013, aprobó el jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **MÁRQUEZ VALADEZ BERENICE** con número de cuenta **302262489**, con la tesis titulada **"EFECTO DE LA EPIGALOCATEQUINA 3-GALATO SOBRE LA NEUROGÉNESIS HIPOCÁMPICA"**, bajo la dirección del **DR. GERARDO BERNABE RAMIREZ RODRÍGUEZ**:

Presidente: **DRA. SELVA LUCÍA RIVAS ARANCIBIA**
Vocal: **DRA. ANA ERIKA RODRÍGUEZ MARTÍNEZ**
Secretario: **DR. JULIO EDUARDO ROQUE MORÁN ANDRADE**
Suplente: **DR. MIGUEL ÁNGEL MORALES MENDOZA**
Suplente: **DR. PAUL CARRILLO MORA**

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 24 de abril de 2013

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por permitirme continuar con mi formación académica, por todo su apoyo durante este difícil trayecto.

Agradezco la beca recibida por el Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT), durante mis estudios de maestría, con el número de becario 255136.

A los miembros de mi comité tutor:

- A la Dra. Selva Lucía Rivas Arancibia por sus valiosas correcciones, por su invaluable apoyo desde el inicio y hasta el final de este proyecto; pero sobre todo por siempre escuchar y resolver todas mis dudas.
- A la Dra. Laura Colín Barenque por sus valiosos comentarios y observaciones realizadas a lo largo de este proyecto de investigación, los cuales fueron de gran importancia para que este trabajo de tesis culminara de forma exitosa.
- Al Dr. Gerardo B. Ramírez Rodríguez por la dirección y revisión de éste trabajo.

Agradecimientos

A mis padres, hermanos y mi sobrino quienes siempre me han motivado para que alcance mis metas. A mi madre que siempre se preocupa por mí y procura que no me equivoque, gracias por todo tu amor!

Al Dr. Jorge Humberto Arce Rincón por ser mi gran apoyo, por ser mi mejor amigo, por siempre escucharme y ayudarme en los momentos más difíciles; pero sobretodo porque siempre haz creído en mí, incluso cuando ni yo misma lo hacía, te quiero muchísimo!!!

A todos mis amigos que siempre me han escuchado, aconsejado y apoyado. Por los momentos de alegría incomparables que he vivido a su lado, gracias!

A mis amigos del Laboratorio de Neurogénesis con quienes compartí alegrías, tristezas y muchísimo estrés crónico e impredecible, los quiero!

A los integrantes del Posgrado en Ciencias Biológicas por todo su apoyo durante este largo trayecto.

A Erika Rodríguez Reyes por su invaluable apoyo y amistad. Gracias por siempre escuchar y ayudarme a resolver todas mis dudas!

A los integrantes de mi jurado quienes aportaron valiosas correcciones a la tesis.

Dedicatoria

Este trabajo de tesis representa una pequeña parte del enorme e increíble trabajo no reconocido que mis compañeros del Laboratorio de Neurogénesis llevaron a cabo en este lugar. Por tal motivo quiero dedicar esta tesis en reconocimiento a su trabajo y esfuerzo. Gracias por su apoyo y amistad durante los momentos más difíciles, los quiero mucho!

A José Fidel Laguna Chimal

A María del Ángel Ocaña Fernández

A Patricia Chimal Cortés

A Federico Acosta Blanco

Porque sólo ellos comprenden lo difícil que se puede llegar a convertir el camino.

Con dedicatoria especial

A Luis Alejandro Méndez Cuesta por su inteligencia, lealtad y nobleza. Por tener el coraje y la fuerza para no dejarse vencer por las tiranías y mantener siempre en alto sus ideales. Gracias por compartir conmigo los momentos más difíciles de este proyecto, por su apoyo incondicional y por compartir una pequeña parte de su vida conmigo. De todo corazón, gracias!

“La ciencia sin ética forma tiranos, la ética sola hace fanáticos y que por lo tanto, como universitario, es su deber y su derecho combatir la ignorancia, la propia y la ajena con dignidad y grandeza, fomentando la unidad entre los individuos y la libre expresión de las ideas, sin que por esto dimita de su responsabilidad moral ni abdique de su humanidad”.

Toma de Protesta, UNAM

ÍNDICE

I. ABREVIATURAS.....	10
II. RESUMEN/ABSTRACT.....	11
III. INTRODUCCIÓN.....	13
1. Neurogénesis en el cerebro adulto.....	13
1.1 Reseña histórica.....	14
2. Regiones neurogénicas en el cerebro adulto de mamíferos.....	16
2.1 Neurogénesis en el giro dentado del hipocampo.....	17
3. Regulación del proceso neurogénico.....	21
3.1 Reguladores positivos.....	22
3.2 Reguladores negativos.....	30
4. Flavonoides.....	36
5. Epigallocatequina 3-galato (EGCG).....	40
5.1 Extracción y purificación de la EGCG.....	41
5.2 Estructura química de la EGCG.....	41
5.3 Metabolismo de la EGCG.....	42
5.4 Actividades biológicas de la EGCG.....	44
5.4.1 Actividad antioxidante.....	45
5.4.2 Actividad anti-tumoral.....	46
5.4.3 Modulador de vías de señalización.....	47
5.5 EGCG y neurogénesis.....	50
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	51
V. HIPÓTESIS.....	52
VI. OBJETIVOS.....	53
1. Objetivo general.....	53

2. Objetivos particulares.....	53
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	54
1. Animales y reactivos.....	54
2. Diseño experimental.....	55
3. Técnica de inmunohistoquímica.....	56
4. Cuantificación de las células positivas para cada marcador.....	58
5. Determinación de las categorías morfológicas de las células positivas a DCX en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo.....	59
6. Técnica de Western blott.....	60
7. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....	60
8. Determinación de los niveles de expresión proteica.....	61
9. Inmunodetección de proteínas.....	62
10. Análisis estadístico.....	63
VIII. RESULTADOS.....	64
1. Efecto de la administración de EGCG sobre la proliferación celular en el giro dentado del hipocampo de ratones macho adulto.....	64
2. Efecto de la administración de EGCG sobre la supervivencia celular en el giro dentado del hipocampo de ratones macho adulto.....	66
3. Efecto de la administración de EGCG sobre la activación de la proteína caspasa-3 en el giro dentado del hipocampo de ratones macho adulto.....	68
4. Efecto de la administración de EGCG sobre la diferenciación neuronal en el giro dentado del hipocampo de ratones macho adulto.....	70
5. Efecto de la administración de EGCG sobre la maduración dendrítica de células positivas a DCX.....	72
5.1 Distribución relativa de las categorías de acuerdo a la morfología dendrítica de las células positivas a DCX.....	72

5.2 Distribución absoluta de las categorías de acuerdo a la morfología dendrítica de las células positivas a DCX.....	73
6. Evaluación de la activación de la proteína Akt/PKB por la EGCG....	75
IX. DISCUSIÓN.....	77
X. CONCLUSIONES.....	84
XI. PERSPECTIVAS.....	85
XII. REFERENCIAS.....	87

I. ABREVIATURAS

ADN.....	Ácido desoxirribonucleico
Akt/PKB.....	Proteína cinasa B
BDNF.....	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BLBP.....	Proteína de unión a lípidos del cerebro
BrdU.....	Bromodesoxiuridina
CRM.....	Cadena rostral migratoria
DCX.....	Proteína doblecortina
E.E.M.....	Error estándar de la media
EGCG.....	Epigallocatequina 3-galato
EGF.....	Factor de crecimiento epidérmico
FGF 2.....	Factor de crecimiento de fibroblastos 2
GABA.....	Ácido gamma-amino butírico
GFAP.....	Proteína acídica fibrilar glial
IGF 2.....	Factor de crecimiento insulínico tipo 2
Ki67.....	Proteína Ki67
LTP.....	Potenciación a largo plazo
MAPK.....	Proteínas cinasas activadas por mitógeno
NeuN.....	Proteína nuclear neuronal específica
PH3.....	Fosfohistona-3
PSA-NCAM.....	Proteína polisiálica de adhesión neural
Shh.....	Sonic hedgehog
SNC.....	Sistema nervioso central
Tuj1.....	Beta-tubulina III
VEGF.....	Factor de crecimiento del endotelio vascular
ZSG.....	Zona subgranular
ZSV.....	Zona subventricular

II. RESUMEN/ABSTRACT

Introducción: La neurogénesis en el hipocampo adulto es una forma de plasticidad cerebral, que se lleva a cabo a partir de la proliferación de las células multipotenciales, seguido por la diferenciación neuronal, la maduración morfológica y fisiológica para la integración de las nuevas neuronas a la circuitería neuronal. El proceso neurogénico es regulado de manera positiva o negativa por factores endógenos y exógenos. La Epigallocatequina 3-Galato (EGCG), es el principal flavonoide contenido en el té verde. Estudios recientes sugieren que la EGCG modula diversas vías de señalización que son relevantes para el proceso neurogénico. Considerando lo anterior, la hipótesis de este trabajo fue que la administración de la EGCG durante 14 días a ratones adultos favorecerá la formación de nuevas neuronas a través de su capacidad para modular la activación de la proteína cinasa B, también conocida como Akt. **Objetivo:** Estudiar el efecto del compuesto EGCG sobre la neurogénesis hipocámpica en roedores adultos. **Metodología:** Se utilizaron ratones macho de la cepa BalbC. El compuesto EGCG se administró por vía intraperitoneal siguiendo una curva dosis respuesta (0, 2.5, 5.0, 10 mg/Kg de peso) durante 14 días. Una hora previa al inicio del tratamiento con las diferentes dosis de EGCG se administró bromodesoxiuridina (BrdU, 50 mg/Kg). Al final del tratamiento, los roedores se sacrificaron para evaluar la expresión de marcadores endógenos del proceso neurogénico. Además, en homogenados de hipocampo se estudió la activación de la proteína cinasa B (PKB/Akt) que forma parte de la señalización encargada de la supervivencia celular. **Resultados:** La administración de EGCG a una dosis de 2.5 mg/Kg incrementó significativamente el número de células inmunoreactivas a BrdU y a la proteína doblecortina (DCX). En cambio, la dosis de 10 mg/Kg causó un efecto tóxico al aumentar el número de células positivas al marcador de apoptosis, la proteína caspasa-3 y disminuir significativamente tanto la proliferación, como la sobrevivencia celular. Además, el compuesto EGCG favorece la maduración dendrítica de las neuronas de nueva generación, efecto que es acompañado por un aumento en la forma activa de la proteína Akt. **Conclusiones:** Los resultados de este trabajo indican que el compuesto EGCG a la dosis de 2.5 mg/Kg modula el proceso neurogénico en el hipocampo de roedores adultos. Además, sugieren que la EGCG actúa a través de la activación de la proteína Akt para modular la neurogénesis hipocámpica en el cerebro adulto.

ABSTRACT

Introduction: Adult hippocampal neurogenesis is a form of brain plasticity, which occurred from the multi-potent stem cells, followed by, both, neuronal differentiation and, morphological and physiological maturation of new neurons to be integrated in the neuronal circuitry. The neurogenic process is positively or negatively regulated by several endogenous or exogenous factors. Epigallocatechin 3-gallate (EGCG), is the main flavonoid content in green tea, recent studies suggest that EGCG modulates several signaling pathways that are relevant to the neurogenic process. The hypothesis of the present work was that the administration of EGCG to adult mice during 14 days modulates the new neuron formation through the activation of protein kinase B, also known as Akt. **Aim:** Study the effect of the compound EGCG on hippocampal neurogenesis in adult rodents. **Methodology:** Male BalbC mice were used. The EGCG compound was intraperitoneally injected following a dose-response curve (0, 2.5, 5.0, 10 mg /Kg of body weight) for 14 days. One hour before the start of treatment with EGCG or vehicle, mice were administered with a single injection of bromodeoxyuridine (BrdU). After treatment, mice were sacrificed to evaluate the expression of endogenous markers for the neurogenic process. Furthermore, hippocampal homogenates were used to study the activation of protein kinase B (PKB/ Akt), protein that is relevant for the modulation of cell proliferation and survival of new neurons. **Results:** The administration of 2.5 mg/Kg EGCG significantly increased the number of BrdU and DCX immunoreactive cells. In contrast, 10 mg/Kg of EGCG caused a toxic effect by increasing the number of caspase-3 positive cells and significantly decreased both proliferation and cell survival. Furthermore, the EGCG compound promotes dendritic maturation of new neurons and this effect was accompanied by an increase in the active form of Akt protein. **Conclusions:** The results of this study indicate that the EGCG compound, 2,5 mg/Kg, modulates the neurogenic process in the hippocampus of adult mice. They also suggest that EGCG, acts through the activation of the Akt protein to modulate adult hippocampal neurogenesis.

III. INTRODUCCIÓN

1. Neurogénesis en el cerebro adulto

La neurogénesis es el proceso de formación de neuronas funcionales a partir de precursores neuronales; dicho proceso incluye las etapas de proliferación, sobrevivencia y diferenciación neuronal, además de la maduración e integración funcional de la progenie dentro de los circuitos neuronales (Ming & Song, 2005). Anteriormente se creía que la neurogénesis ocurría únicamente durante el desarrollo embrionario y en los estados postnatales tempranos de los mamíferos (Ramon y Cajal, 1913). Actualmente se sabe que la neurogénesis es un proceso que se lleva a cabo en los mamíferos adultos, tales como roedores, primates no humanos e incluso se han encontrado evidencias de este proceso en cerebros humanos post-mortem (Eriksson et al 1998; Sanai et al 2004, Curtis et al 2007).

La neurogénesis en el adulto está conservada evolutivamente desde organismos invertebrados hasta vertebrados, dentro de los vertebrados se encuentran peces, aves, roedores y primates (Barker et al., 2011). El grado de neurogénesis post-natal disminuye conforme incrementa la complejidad cerebral, por ejemplo en anfibios y reptiles se ha estudiado la capacidad regenerativa de regiones completas del cerebro; mientras que en el cerebro de mamíferos adultos la formación de neuronas nuevas está restringida a pocas regiones del cerebro con capacidad neurogénica (Lledo et al., 2006).

La producción de nuevas neuronas en el cerebro adulto de mamíferos ocurre de manera constitutiva en regiones específicas: las primeras en describirse fueron la zona subventricular (ZSV) de los ventrículos laterales, y la zona subgranular (ZSG) del giro dentado del hipocampo (García-Verdugo et al., 1998; Kempermann et al 2004). Diversos estudios han demostrado la producción de nuevas neuronas en regiones no neurogénicas del cerebro adulto, incluidas la neocorteza (Dayer et al., 2005), estriado (Luzzati et al., 2006), amígdala e hipotálamo (Fowler et al., 2002). Sin embargo se ha observado que la exposición a estímulos nocivos, como son sustancias tóxicas ó condiciones de isquemia cerebral favorecen la formación de nuevas neuronas en estas regiones que no se consideraban neurógenicas (Tattersfield et al., 2004).

1.1 Reseña Histórica

Los estudios de Ramon y Cajal (1913) concluyeron que la neurogénesis ocurría únicamente en etapas tempranas del desarrollo; a partir de estos trabajos se acepto como dogma central en las neurociencias que no hay formación de neuronas nuevas posteriores al nacimiento, por tal motivo trabajos como el de Ezra Allen (1912) donde se sugiere la existencia de células en división en el sistema nervioso central (SNC) no fueron tomados en cuenta por la comunidad científica.

Fue hasta la década de los 60's en que los trabajos de Joseph Altman utilizando la timidina tritiada, un análogo de la timina que se incorpora al ácido desoxirribonucleico (ADN) en la fase S del ciclo celular, evidenciaron la

proliferación de células en diferentes regiones del cerebro adulto de rata, incluyendo el giro dentado del hipocampo (Altman & Das, 1965; Altman, 1966) y el bulbo olfatorio (Altman, 1969).

Michael S. Kaplan y James W. Hinds (1977) inyectando timidina tritiada a ratas adultas y realizando un análisis de microscopía electrónica en el giro dentado del hipocampo y en el bulbo olfatorio, determinó que las células que incorporaron el análogo lograron sobrevivir al menos por 30 días y además presentan características morfológicas de neuronas maduras.

Posteriormente, se continuaron realizando diversos estudios acerca la capacidad proliferativa de algunas regiones del SNC. Sin embargo fue hasta los trabajos de Fernando Nottebohm y colaboradores en que a la neurogénesis adulta se le asocio funcionalmente con el canto estacional en diferentes especies de aves, como una forma de plasticidad cerebral (Alvarez-Buylla et al., 1990; Nottebohm, 2004).

Carlos Lois y Alvarez-Buylla reportaron que las células aisladas de la ZSV de ratones adultos mantenían su capacidad proliferativa en condiciones *in vitro* y además logran diferenciarse a neuronas y astrocitos (Lois & Alvarez-Buylla, 1993). De igual manera, Cameron y colaboradores (1993) encontraron en el hipocampo de ratas adultas que la mayoría de las células de nueva generación se diferenciaron a neuronas y migraban hacia la capa granular del giro dentado; además de evidenciar la existencia de una población celular en proliferación con características de glía radial.

El uso del reactivo bromodesoxiuridina (BrdU) facilitó la identificación de las nuevas células; dado que emplea el mismo mecanismo que la timidina tritiada al ser también un marcador de síntesis del ADN, se incorpora a las células que se encuentran durante la fase S del ciclo celular, con la ventaja de que puede ser inmunodetectado con anticuerpos específicos; por tal motivo la BrdU se adoptó como una nueva herramienta útil y eficaz para la investigación de la neurogénesis (Gratzner, 1982; Ming & Song, 2005).

Diversas investigaciones reportaron la proliferación y diferenciación de estas nuevas neuronas en el cerebro adulto de mamíferos, tales como los roedores y primates no humanos (Gould et al., 1998). Sin embargo fue hasta 1998 que Peter Eriksson y colaboradores evidenciaron la formación de nuevas neuronas en cerebros humanos post-mortem, a través de la co-localización del BrdU con la proteína nuclear neuronal específica "NeuN", la cual es un marcador del linaje neuronal (Eriksson et al., 1998).

2. Regiones neurogénicas en el cerebro adulto de mamíferos

Actualmente se sabe que el proceso neurogénico en el cerebro adulto ocurre en regiones discretas del SNC, la ZSV de los ventrículos laterales y la ZSG del hipocampo, es por demás sabido que dichas regiones constituyen un microambiente ó nicho que mantiene su capacidad neurogénica (Kempermann et al., 2004; Ramírez-Rodríguez et al., 2007). Para el presente trabajo sólo nos enfocamos en la neurogénesis hipocámpica.

2.1 Neurogénesis en el giro dentado del hipocampo

En el giro dentado, la principal vía excitatoria, las células granulares, continúan generándose en la vida adulta de los mamíferos. Dicho proceso ocurre a partir de la división de las células multipotenciales y progenitoras que se encuentran en la ZSG del giro dentado y migrarán a la capa granular para establecer contactos sinápticos con las neuronas existentes y poder incorporarse funcionalmente a los circuitos neuronales (Kempermann et al., 2004; Lledo et al., 2006; Ming & Song, 2011).

La formación de neuronas nuevas en la ZSG inicia con la división asimétrica de una célula multipotencial con características morfológicas de glia radial, soma de forma triangular y con un proceso apical principal dirigido a la capa molecular (Kempermann et al., 2004; Ming & Song, 2005). Estas células, denominadas del tipo 1, expresan marcadores específicos como son la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), el filamento intermedio nestina, la proteína de unión a lípidos del cerebro (BLBP) y el factor de transcripción, Sox2 (Von bohlen, 2011).

Aunque la tasa de división de las células multipotenciales es baja, el hecho de que se dividan asimétricamente permite mantener la población de células multipotenciales constante; así como dar origen a las células del tipo 2, las cuales presentan un potencial de desarrollo diferente a las células del tipo 1 (Kempermann et al., 2004).

Las células tipo 2 presentan una alta tasa de proliferación, expresan receptores para el neurotransmisor ácido gamma-aminobutírico (GABA) y su estimulación resulta en una depolarización de la membrana celular, además de mantener una activación tónica mediada por el mismo neurotransmisor (Ge et al., 2006; Lledo et al., 2006).

Las células tipo 2 se pueden subdividir en células tipo 2a y 2b; ambas sub-poblaciones celulares presentan soma pequeño con un núcleo denso e irregular y con procesos dendríticos cortos orientados paralelamente a la capa granular; sin embargo carecen de procesos apicales, las células 2a son positivas para nestina y Sox2, y se diferencian en las células 2b que son positivas para la proteína doblecortina (DCX), la proteína polisialica de adhesión neural, el factor de transcripción NeuroD y el gen Prox1 (Von bohlen, 2011; Kempermann et al., 2004).

La maduración de las células tipo 2 origina a las células tipo 3 también llamadas neuroblastos, las cuales expresan las proteínas DCX y PSA-NCAM, así como NeuroD y Prox1. Las células 3 tiene baja actividad proliferativa, incluso se ha evidenciado la salida del ciclo celular durante esta población celular (Ehninger et al., 2008). Morfológicamente, estas células presentan procesos dendríticos con una gran variedad de longitud y forma, orientados perpendicularmente a la capa granular. La migración celular inicia con las células tipo 3, las cuales migrarán de la ZSG hacia el tercio superior interno de la capa granular (Kempermann et al., 2003).

DCX es una proteína asociada a citoesqueleto, la cual se ha vinculado funcionalmente con procesos de diferenciación neuronal, migración y maduración celular; incluyendo sinaptogénesis (Plumpe et al 2006). La PSA-NCAM es una proteína de adhesión neural, que se ha implicado en la formación, unión y consolidación de contactos sinápticos, crecimiento axonal y dendrítico, e incluso se le ha relacionado con sobrevivencia celular y plasticidad cerebral (Gascon et al., 2007). Ambas proteínas se expresan temporalmente de manera casi coordinada en el desarrollo neurogénico y abarcan el período de sobrevivencia, migración y maduración neuronal (Ehninger et al., 2008).

Una vez que las células nuevas salen del ciclo celular mantienen una morfología vertical (similar a las células tipo 3), con núcleo redondeado ligeramente triangular y con una dendrita apical que puede alcanzar la capa molecular. Diversos estudios han evidenciado la expresión de marcadores como son la proteína de unión a calcio, calretinina, PSA-NCAM, DCX y Prox1 en las células post-mitóticas tempranas y se ha observado que la mayoría de dichas células llegan a esta etapa, 3 días posteriores de su proliferación (Kempermann et al., 2003; Brandt et al., 2003, Kempermann, 2004).

Las células post-mitóticas expresan la proteína nuclear específica de neuronas (NeuN), incluso un día posterior a la inyección del BrdU se pueden encontrar un número considerable de células positivas para BrdU/NeuN. La mayoría de estas células son sujetas a procesos de selección durante los cuales pueden ser reclutadas a la circuitería neuronal ó ser eliminadas por apoptosis (Kempermann et al., 2004; Ehninger et al., 2008).

El período de expresión de calretinina puede representar la fase durante la cual las neuronas inmaduras son susceptibles a las conexiones sinápticas, además de favorecer la maduración axónica y presentar un incremento en la sinaptogénesis, lo cual favorecerá su reclutamiento en los circuitos neuronales que participan en la función hipocámpica (Brandt et al., 2003; Tony & Sultan, 2011).

A partir de la segunda a la tercera semana de maduración neuronal, las neuronas nuevas cambian la expresión de calretinina por la proteína de unión a calcio, calbidinina y además en esta etapa extienden sus procesos dendríticos a la capa molecular y comienzan a expresar el exportador de cloro, KCC2, lo cual permite el cambio de la estimulación depolarizante mediado por GABA a una estimulación hiperpolarizante (Von bohlen, 2011; Ge et al., 2006).

Entre la tercera y sexta semana de edad, las nuevas neuronas muestran un incremento en la plasticidad sináptica y en la potenciación a largo plazo (LTP) (Ge et al., 2007; Tony & Sultan, 2011). Estudios previos han demostrado que la estimulación de alta frecuencia de las fibras de la vía perforante inducen un incremento en el LTP de las células de nueva generación en el giro dentado, lo cual favorece la supervivencia de las células (Kitamura et al., 2010).

Al término de este período y cuatro a siete semanas posteriores, las nuevas neuronas en el hipocampo son morfológica y funcionalmente similares a las neuronas que nacieron durante la embriogénesis (Figura 2) (Kempermann et al., 2004; Ehninger et al., 2008).

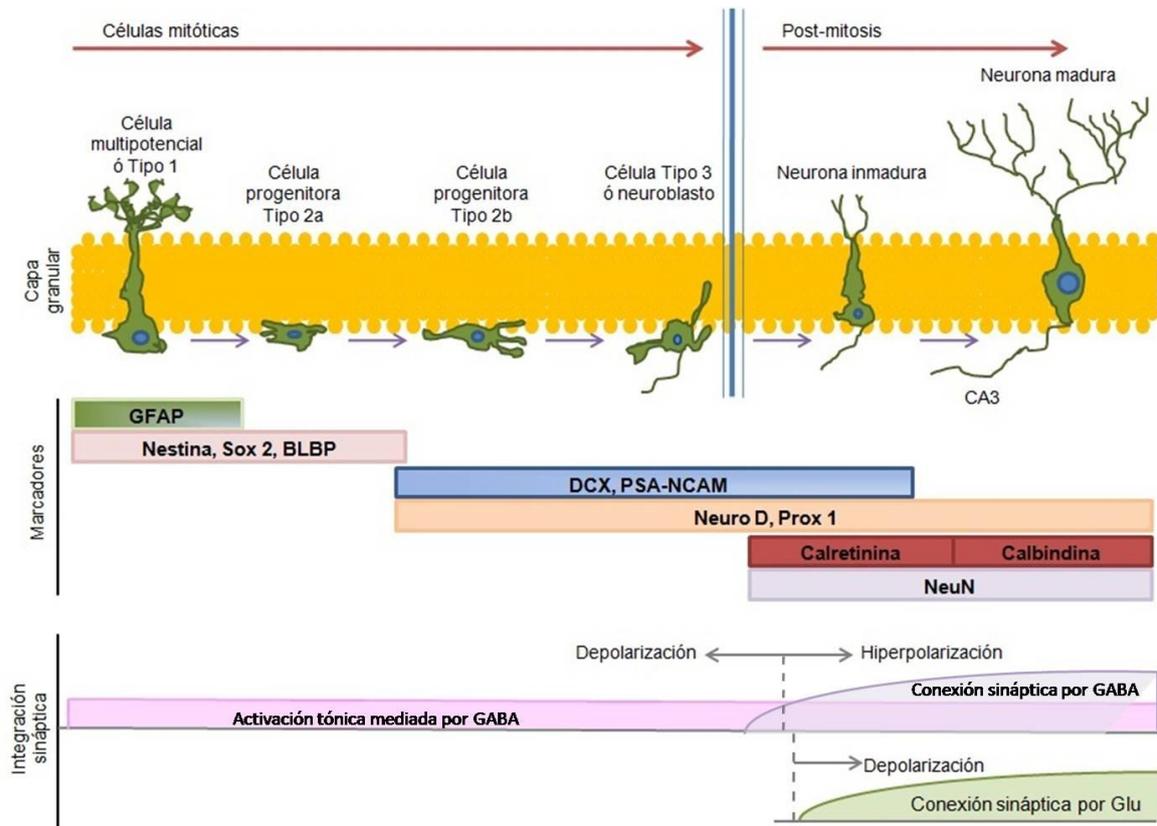


Figura 2. Neurogénesis en el giro dentado del hipocampo.

3. Regulación del proceso neurogénico

Las diferentes etapas, así como los eventos que involucran a la formación de nuevas neuronas, son reguladas por una gran cantidad de factores tanto intrínsecos como extrínsecos, lo cual hace que la neurogénesis sea un proceso dinámico (Ramírez-Rodríguez et al., 2007).

El estudio de la neurogénesis a partir de la progresión del ciclo celular, así como la expresión temporal de diversos marcadores celulares han permitido la identificación de numerosos factores que modulan, tanto positiva como negativamente las diferentes etapas de la neurogénesis (Zhao et al.,

2008). A continuación se presenta una breve síntesis de algunos de los reguladores que favorecen al proceso neurogénico (reguladores positivos); así como reguladores que afectan al mismo (reguladores negativos):

3.1 Reguladores Positivos:

- **Nicho:** Es el lugar anatómico donde residen la células multipotenciales que darán origen a las neuronas nuevas. Diversos reportes han revelado que el microambiente o nicho puede tener factores específicos que permiten la diferenciación e integración de las nuevas células (Seki, 2003; Zhao et al., 2008). Las células endoteliales, los astrocitos, las neuronas maduras, la microglia y el sistema vascular son los principales componentes del microambiente que regulan la proliferación, diferenciación y maduración de las nuevas células (Ming & Song, 2011).

Se ha observado que al aislar a los astrocitos maduros de ambas regiones neurogénicas, estos promueven en condiciones *in vitro* la proliferación y diferenciación de las células multipotenciales (Lim & Alvarez-Buylla, 1999; Song et al., 2002). Por otra parte, Barkho y colaboradores (2006) determinaron que los astrocitos maduros de la ZSG expresan factores de crecimiento e interleucinas que modulan y favorecen la diferenciación neuronal de las células multipotenciales.

De igual manera se ha observado que las células endoteliales secretan factores que favorecen la replicación de las células multipotenciales; así

como su diferenciación hacia neuronas en condiciones *in vitro* (Shen et al., 2004; Wurmser et al., 2004).

Las células multipotenciales en condiciones *in vivo* son influenciadas por un gran número de señales intracelulares, así como de factores externos que regulan cada etapa del proceso neurogénico.

- **Mecanismos moleculares:** La progresión de las células madre a neuronas maduras está sujeta al control coordinado de una gran cantidad de factores intrínsecos y extrínsecos. Entre los factores intrínsecos más importantes, se encuentran las vías de señalización celular, los factores de transcripción y los factores epigenéticos (Mu et al., 2010).

Algunas de las vías de señalización más importantes implicadas en la regulación neurogénica son la vía de señalización Wnt/ β -catenina, la vía de la proteína cinasa B (también llamada Akt/PKB), el sistema de señalización de las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK) y la vía de señalización "Sonic hedgehog" (Shh) (Ming & Song et al., 2011; Lledo et al., 2006, Mu et al., 2010).

La vía de señalización Wnt/ β -catenina mantiene la proliferación y multipotencialidad de las células progenitoras a través de un incremento en la expresión del factor de transcripción NeuroD1 (Mu et al., 2010). Por otra parte, la vía de Shh, se le ha vinculado como regulador de la

proliferación celular al actuar como un mitógeno, tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo* (Lai et al., 2003).

Las cascadas de señalización que modulan los factores de transcripción son de gran importancia para el control de la proliferación de las células progenitoras, así como para la toma del destino neural de las células nuevas (Hodge et al., 2011). Algunos de los factores de transcripción relacionados al mantenimiento de las células multipotenciales, así como de la proliferación celular son Sox2 y Pax6; por otra parte los factores de transcripción vinculados a la supervivencia celular, al compromiso del destino neuronal y plasticidad cerebral; se encuentran NeuroD1, Prox1 y CREB, respectivamente (Mu et al., 2010; Hodge et al., 2011).

Recientemente se ha observado que los factores epigenéticos, los cuales funcionan como claves para la coordinación de la expresión génica durante el proceso neurogénico, actúan a través de la metilación del ADN, las modificaciones de histonas y de acetilación, así como de los micro-RNA no codificantes pueden estar modulando la proliferación celular de las células madre, al controlar proteínas reguladoras del ciclo celular, así como la diferenciación neuronal al reprimir la expresión de genes, como Sox2 mediante la actividad catalítica de la histona deacetilasa (HDAC2) (Ma et al., 2010).

- **Factores de Crecimiento:** Son factores potentes para el mantenimiento de las células madre *in vitro* (Babu et al., 2007). Particularmente, factores como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de

crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2), el factor de crecimiento insulínico tipo 2 (IGF2) promueven la proliferación en la ZSV y en la ZSG; y se ha reportado que el FGF2 puede favorecer la diferenciación neuronal *in vitro* (Babu et al., 2011; Bracko et al., 2012; Zhao et al., 2008).

De igual manera al factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) se le ha propuesto como un factor importante en la neurogénesis, al ser también una proteína angiogénica y participar en los dos procesos de formación de vasos sanguíneos y neuronas nuevas (Jin et al., 2002).

- **Hormonas:** Diversas hormonas como son la melatonina, prolactina y los estrógenos se han relacionado como moduladores positivos del proceso neurogénico tanto en la ZSV como en la ZSG (Lledo et al., 2006), de igual manera se ha observado el efecto negativo de las hormonas vinculadas con la respuesta al estrés (Snyder et al., 2011).

La melatonina es secretada por la glándula pineal y se le ha relacionado con la regulación del ciclo circadiano (Reiter, 1991). Ramírez-Rodríguez y colaboradores (2009) determinaron que la administración de melatonina no afecta la proliferación de las células progenitoras aisladas del giro dentado de ratones adulto; sin embargo favorece la sobrevivencia celular en condiciones *in vitro* e *in vivo*, así como la diferenciación neuronal al encontrar un incremento en el número de células positivas para BrdU/Tuj1 *in vitro*.

De manera similar, el mismo grupo demostró que la administración crónica de melatonina por 14 días a ratones C57BL/6 incrementa la diferenciación neuronal medido a través de expresión de la proteína DCX y además favorece la maduración dendrítica de las células de nueva generación (Ramírez-Rodríguez et al., 2011).

Por otra parte, la prolactina una hormona asociada con funciones metabólicas y reproductivas, se ha vinculado funcionalmente como modulador de la neurogénesis adulta al incrementar la proliferación celular en cultivos primarios de células progenitoras del hipocampo (Walker et al., 2012).

- **Neurotrofinas:** Las neurotrofinas tienen un amplio rango de efectos en la sobrevivencia y maduración neuronal. Babu y colaboradores (2007) demostraron que tanto la neurotrofina 3 como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) causan un incremento significativo en el número de células positivas para TuJ1.

De manera interesante, el mismo grupo de colaboración utilizando un co-cultivo de neuronas granulares maduras y células progenitoras del hipocampo de roedores adulto demostraron que la actividad sináptica de las neuronas maduras favorece la diferenciación neuronal de las células progenitoras al incrementar el número de células inmunoreactivas a Tuj1 (Babu et al., 2009).

La proliferación de las células multipotenciales se incrementa considerablemente al incrementar los niveles de BDNF tanto en la ZSV como en la ZSG; de igual manera se ha evidenciado el papel del BDNF en la sobrevivencia celular al disminuir significativamente la sobrevivencia de las nuevas células en ratones heterocigotos para BDNF^(+/-) (Zigova et al., 1998; Rossi et al., 2006).

- **Neurotransmisores:** Las diferentes etapas de producción de nuevas neuronas son sujetas a modulación por cambios en el microambiente. La actividad eléctrica por sí misma puede actuar directamente en la proliferación y diferenciación de las células progenitoras; así como su incorporación en los circuitos neuronales (Lledo et al., 2006). Entre los neurotransmisores implicados se encuentran el GABA, al cual se ha relacionado con la integración sináptica de las nuevas neuronas, al mantener inicialmente una activación tónica y posteriormente inervar las nuevas células para luego recibir las sinápsis glutamatérgicas en el giro dentado de ratones adultos (Ge et al., 2006). Similarmente en la ZSV, la activación de los receptores GABA_A modula la movilidad de los neuroblastos en la cadena rostral migratoria, una vez que arriban al bulbo olfatorio reciben entradas sinápticas GABAérgicas y posteriormente glutamatérgicas (Bolteus & Bordey, 2004).

El glutamato es el neurotransmisor excitatorio más abundante del sistema nervioso central. Se ha evidenciado que las nuevas células de la ZSG se diferencian hacia neuronas glutamatérgicas (Lledo et al., 2006);

aunado a lo anterior se ha estudiado que el glutamato puede alterar la proliferación, sobrevivencia, migración y diferenciación neuronal actuando de manera dual dependiendo del receptor que se esté activando, por ejemplo la activación de receptores tipo AMPA incrementan la proliferación celular, pero esta se inhibe cuando se activan receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (Cameron et al., 1995; Bai et al., 2003). Adicionalmente, la serotonina actuando a través de los receptores 5-HT_{2a} y 5HT_{2c} sobre regulan la proliferación celular, mientras que la transmisión colinérgica y noradrenérgica en la ZSG favorecen la neurogénesis (Banar et al., 2004; Kotani et al., 2006; Kulkarni et al., 2002).

- **Actividad física y Ambiente enriquecido:** La neurogénesis adulta puede ser modulada por una gran cantidad de reguladores (Kempermann, 2011); la actividad física es el factor ambiental más potente para incrementar la proliferación celular, así como incrementar la neurotransmisión y el LTP en el giro dentado (Van praag et al., 1999). Lafenetre y colaboradores (2011), sugieren la implicación de diversas moléculas que incrementan su expresión al someter roedores a actividad física voluntaria, tales como BDNF y factores de crecimiento, los cuales podría estar mediando las acciones benéficas de la actividad física.

El ambiente enriquecido es una combinación compleja de diversos estímulos inanimados y sociales, así como de aprendizaje y actividad física (Vivar et al., 2012). La sobrevivencia celular en el hipocampo se

favorece en ratones expuestos a un ambiente enriquecido (Kempermann et al., 1997).

Dado que la actividad física es un elemento importante en el ambiente enriquecido, es difícil disociar los efectos de cada condición; sin embargo Kobilko et al. (2011), evidenciaron que la actividad física es un potente estímulo neurogénico y neurotrófico; la proliferación y sobrevivencia de las nuevas células se incrementó únicamente en aquellas condiciones que se encontraban bajo actividad física voluntaria, y estos resultados se correlacionaban positivamente con un incremento en los niveles de BDNF.

- **Compuestos naturales:** En los últimos años los compuestos naturales han tomado una gran importancia por las diferentes propiedades biológicas y neuroprotectoras (Spencer, 2010). Existen evidencias que relacionan el consumo de polifenoles, los cuales son constituyentes importantes de algunos alimentos y bebidas, con un incremento en la neurogénesis adulta. Algunos de los polifenoles más estudiados son el resveratrol, la curcumina, la quercetina, la epicatequina y la epigallocatequina 3-galato (Pereira-Dias et al., 2012).

Se ha demostrado que compuestos como el resveratrol, la curcumina y la epigallocatequina 3-galato favorecen la proliferación celular en el giro dentado de roedores adultos evidenciado por un incremento en el número de células positivas para BrdU; particularmente el incremento en la proliferación celular favorecida por los compuestos resveratrol y la

curcumina, se correlaciona positivamente con un incremento en los niveles del factor neurotrófico BDNF; así como un mejor desempeño de los roedores en pruebas de memoria espacial (Moriya et al., 2011; Dong et al., 2011; Yoo et al., 2010).

3.2 Reguladores Negativos:

- **Estrés:** El estrés definido como cualquier estímulo capaz de alterar la homeostasis, desencadenará mecanismos para permitir la adaptación del organismo. Los glucocorticoides son las hormonas que se liberan en respuesta a experiencias estresantes y ayudan a restaurar la homeostasis en el organismo (Armario et al., 2006). Diversas investigaciones han postulado a los glucocorticoides como un regulador negativo de la neurogénesis, Yu *et al.* demostraron que la exposición de las células precursoras del hipocampo en condiciones *in vitro*, a concentraciones crecientes de dexametasona, un glucocorticoide sintético, disminuye el número de células positivas para BrdU, DCX y TuJ; además incrementa de manera concentración dependiente las células en apoptosis (Yu et al., 2010). También se ha observado que la administración de antagonistas de receptores de glucocorticoides, como la mifepristona mantiene la neurogénesis en niveles basales en ratas sometidas a un modelo de estrés crónico impredecible (Oomen et al., 2007).

Snyder y colaboradores (2011) encontraron que al utilizar roedores transgénicos con la neurogénesis adulta inhibida se incrementan los niveles de corticosterona en plasma, al someter a los ratones a restricción de inmovilidad, comparado con aquellos roedores que mantenían el proceso neurogénico intacto; lo cual sugiere que la neurogénesis puede estar amortiguando la respuesta generada por el estrés.

- **Envejecimiento:** El envejecimiento es un proceso fisiológico normal, el cual se ha relacionado con una disminución en la neurogénesis adulta, tanto en la ZSG como en la ZSV (Couillard et al., 2011; Lou et al., 2006). El grupo de Rao y colaboradores (2005) determinaron que ratas envejecidas (12 y 24 meses de edad) presentan una disminución en la proliferación celular y en el número de células NeuN positivas; además de presentar arborizaciones dendríticas menos complejas y largas con respecto a aquellas presentes en ratas jóvenes (4 meses de edad).

Durante el envejecimiento hay muchos factores que se alteran, como son los factores de crecimiento, factores neurotróficos, hormonas, neurotransmisores, etc.; por lo tanto es factible una disminución en la producción de nuevas neuronas en ambos nichos neurogénicos debido a una consecuencia de cambios en múltiples factores relacionados con la edad (Rao et al., 2005; Couillard et al., 2011).

A partir de una serie de experimentos, Villeda y colaboradores (2011) demostraron que la administración de plasma sanguíneo proveniente de

roedores envejecidos a ratones jóvenes reduce significativamente la neurogénesis hipocámpica, la plasticidad sináptica y la memoria y el aprendizaje espacial en los roedores; sugiriendo que la disminución observada en la neurogénesis durante el envejecimiento puede deberse a un cambio en diversos factores que regulan al proceso.

- **Especies reactivas y estrés oxidativo:** Aunque se sabe que las especies reactivas juegan un papel importante en la regulación de la señalización intracelular implicada en la proliferación celular y diferenciación neuronal o glial (Huang et al., 2012); se ha estudiado que estados crónicos de estrés oxidativo alteran negativamente la neurogénesis adulta. Rivas-Arancibia y colaboradores (2010) determinaron que la exposición crónica de ratas a bajas dosis de ozono disminuye significativamente el número de células DCX y NeuN positivas en el hipocampo.

Por otra parte, se ha reportado que la sobreexpresión de la enzima superóxido dismutasa 1, la cual se encarga de catalizar la reacción del radical anión superóxido a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), en el giro dentado de ratones adultos C57BL6/J disminuye la proliferación celular y la diferenciación neuronal, así como el número de neuronas con dendritas terciarias; dicho efecto puede deberse a un incremento drástico en las concentraciones de H_2O_2 en el medio, lo cual puede estar alterando el balance de oxidación-reducción y en consecuencia al proceso neurogénico (Yoo et al., 2012). Estos resultados se corroboran con la

investigación de Valente et al. (2009), donde determinaron que la exposición de células progenitoras a H₂O₂ en condiciones *in vitro* disminuye significativamente la viabilidad celular y este efecto es prevenido por la adición de antioxidantes en el medio (Valente et al., 2009).

- **Enfermedades neurodegenerativas y psiquiátricas:** Las enfermedades neurodegenerativas cursan con procesos de disfunción y muerte neuronal, los cuales se caracterizan por ser procesos lentos, crónicos y progresivos (Dietrich & Kempermann, 2006). Las enfermedades neurodegenerativas alteran el mantenimiento de las células madre, la proliferación y sobrevivencia celular; así como la integración funcional de las nuevas neuronas (Winner et al., 2011).

En un modelo transgénico de la enfermedad de Alzheimer, donde se realizó una mutación triple (presenilina-1, proteína precursora amiloidea y proteína tau), se observó una disminución en la proliferación celular, evaluado a través de la expresión de la fosfohistona-3, en los ratones transgénicos comparado con los roedores silvestres; lo cual se asoció directamente con la presencia de placas amiloideas en el hipocampo (Rodríguez et al., 2008). Sin embargo, diversas investigaciones han reportado un incremento en la proliferación y sobrevivencia de las nuevas células en ambas regiones neurogénicas en diferentes modelos de la patología de Alzheimer (Mirochnic et al., 2009; Haughey et al., 2002), sugiriendo que el incremento en la proliferación celular puede

deberse a un mecanismo de compensatorio en el proceso neurogénico (Winner et al., 2011).

Al utilizar un modelo de la enfermedad de Alzheimer, Wolf y colaboradores (2006) determinaron en roedores transgénicos para la proteína precursora de amiloide (APP-23); que la exposición de los roedores a un ambiente enriquecido modula negativamente la progresión de la patología, al reflejarse en un incremento en los niveles de factores neurotróficos (NT3 y BDNF) y en la neurogénesis en el hipocampo (Wolf et al., 2006).

Por otra parte, la sobreexpresión de la proteína mutada α -sinucleína, la cual es una característica presente en los pacientes con la enfermedad de Parkinson; incrementa la muerte celular y se correlaciona con una disminución en la población de neuroblastos, sin alterar la proliferación celular en ambos nichos neurogénicos, sugiriendo una alteración en la sobrevivencia y diferenciación neuronal (Winner et al., 2004).

Aunado a lo anterior, los modelos con roedores transgénicos para la patología de Huntington reportan una reducción en la proliferación de las células progenitoras sin modificar la diferenciación neuronal en el giro dentado (Lazic et al., 2004; Von Horsten et al., 2003).

De manera similar, las enfermedades psiquiátricas como la depresión cursan con una alteración en la neurogénesis en hipocampo; particularmente la etiología de la depresión se ha relacionado de manera

importante con el proceso neurogénico (Lee et al., 2010). Esta idea ha sido sustentada por diversas investigaciones, en las cuales se demuestra que la neurogénesis se disminuye en modelos animales de depresión, y que además la administración de fármacos antidepresivos la incrementan (Snyder et al 2011; Syahrul et al., 2012).

Surget y colaboradores (2008) demostraron en ratones con la neurogénesis abatida en el hipocampo y que fueron sometidos al modelo de estrés crónico impredecible, que la neurogénesis adulta es requerida para la acción eficaz de los antidepresivos como la fluoxetina e imipramina, los cuales actúan a través de un mecanismo monoaminérgico (Surget et al., 2008).

4. Flavonoides

La dieta es uno de los estilos de vida más importantes, la cual puede influir de manera importante en la prevención ó desarrollo de diversas enfermedades neurológicas. Particularmente los flavonoides, un grupo de metabolitos secundarios encontrados en diferentes plantas han ganado gran interés por los diversos efectos neuroprotectores que ejercen en el SNC (Spencer, 2009).

Los flavonoides son moléculas que comprenden al grupo más común de compuestos polifénolicos, y son sintetizados por las plantas a partir de tres moléculas de malonil-Coenzima A y una molécula de fenilpropanoide para formar la estructura básica de los flavonoides (Manach et al., 2004).

La estructura química básica de los flavonoides comprende dos anillos aromáticos, benzopirano (A y C), los cuales están unidos por tres átomos de carbono a un anillo oxigenado heterocíclico, benzeno (B) (Figura 3); éstos a su vez pueden ser divididos en 6 sub-clases diferentes dependiendo del patrón de hidroxilación de los anillos, así como del grado de saturación y la sustitución en la posición 3 del anillo C (Williams et al., 2012; Spencer et al., 2012).

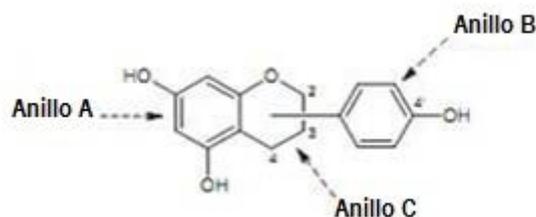


Figura 3. Estructura general de los flavonoides.

Entre las principales sub-clases de flavonoides se encuentran (1) los flavonoles (por ejemplo la quercetina y Kaemferol), los cuales se encuentran en las cebollas y el brócoli; (2) las flavonas (como la luteolina y la apigenina) que sintetizan en el perejil y el apio; (3) las isoflavonas (la genisteína y daidzeína son ejemplos de estas) que se encuentran en la soya; (4) las flavanonas (por ejemplo la naringerina y hesperetina) que se pueden encontrar en diversos frutos cítricos; (5) los flavanoles (como son las catequinas, epicatequina, epigallocatequina y epigallocatequina 3-galato) los cuales son abundantes en el té verde, chocolate y en el vino tinto; (6) y las antocianidinas (por ejemplo la malvidina y la pelargonidina) que se sintetizan en las zarzamoras y las uvas moradas (Figura 4) (Williams et al., 2012; Spencer, 2008; Manach et al., 2004).

A grandes rasgos, los flavonoides son absorbidos y metabolizados resultando en una disminución significativa de su potencial antioxidante. Los flavonoides pueden ser sometidos al menos a tres tipos de metabolismo intracelular: el metabolismo oxidativo, metabolismo relacionado con la actividad del citocromo P450 ó ser conjugados con grupos tioles, particularmente con el tiol no proteico, el glutatión reducido (GSH) (Spencer, 2008).

Los metabolitos de los flavonoides, como son las formas glucorinadas, sulfatadas y las formas O-metiladas conjugadas; así como los aductos formados entre flavonoides-GSH presentan un potencial antioxidante reducido comparado con las moléculas originales (Manach et al., 2004; Spencer, 2008).

Los flavonoides han tomado gran importancia debido a los efectos benéficos que producen al organismo, tanto en condiciones fisiológicas como patofisiológicas (Haque et al., 2006; Surh et al., 2008; Kim et al., 2010).

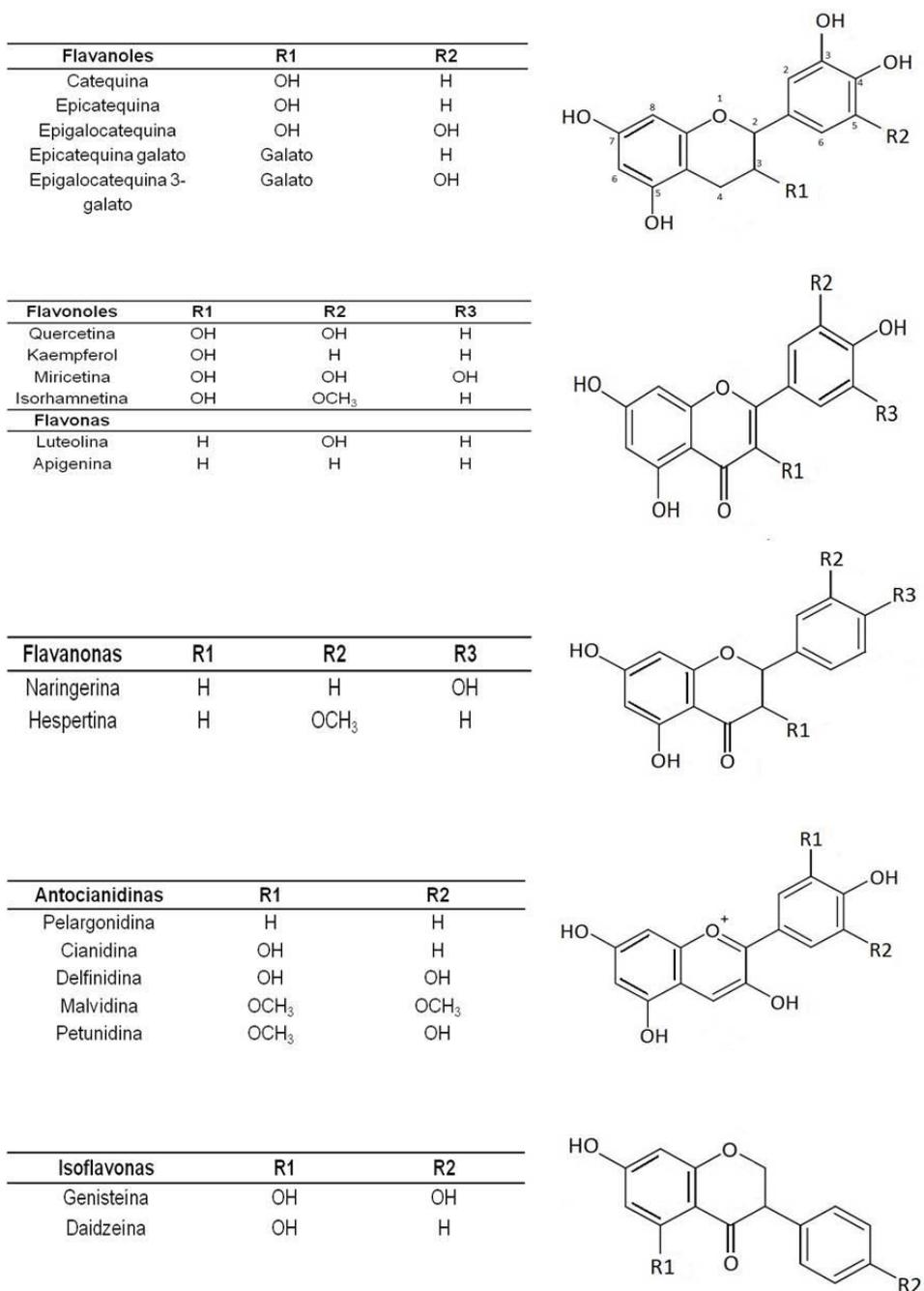


Figura 4. Estructura de las principales clases de flavonoides.

Particularmente en el SNC, los flavonoides han mostrado tener un efecto neuroprotector en diferentes modelos animales de daño neuronal y modelos de envejecimiento, así como en condiciones fisiológicas basales (Li et al., 2006; He et al., 2009; Sarkar et al., 2009). Inicialmente, las acciones biológicas de los flavonoides se atribuían a sus capacidades antioxidantes a través de su capacidad reductora e influir de esta manera en estado redox intracelular; sin embargo estudios recientes han elucidado diversas acciones biológicas de los flavonoides (Spencer, 2008).

Actualmente se sabe que además de su capacidad como antioxidante, los flavonoides son moléculas capaces de incrementar el desempeño cognitivo a través de la habilidad de interactuar con vías de señalización neuronales y gliales que inducen la plasticidad sináptica (Sarkar et al., 2009). Asimismo disminuyen la apoptosis y promueven la diferenciación y supervivencia neuronal (An et al., 2008); además de favorecer el flujo sanguíneo al inducir el proceso de angiogénesis (Van Praag et al., 2007).

Aunque existe una gran cantidad de evidencias sobre los efectos de los flavonoides, así como de la distribución de los mismos y sus metabolitos en el cerebro, a la fecha no se ha elucidado el ó los mecanismos concretos por los cuales estas moléculas entran al parénquima cerebral (Spencer, 2010).

Existen reportes que sugieren que el potencial para que los flavonoides penetren al cerebro depende de su grado de lipofilicidad y polaridad (Spencer, 2010); algunas investigaciones han demostrado que algunos flavonoides interactúan con transportadores específicos para poder ingresar al cerebro; por

ejemplo la quercetina y naringerina interactúan con la glicoproteína P, la cual se expresa en la barrera hematoencefálica y es un transportador específico que regula la entrada de nutrientes esenciales, fármacos y otros xenobióticos (Youdium et al., 2004; Lin & Yamazaki, 2003).

5. Epigallocatequina 3-Galato

La (-)-cis-2-(3,4,5-Trihidroxifenil)- 3,4-dihidro-1(2H)- benzopirano -3,5,7, triol 3-galato, también llamada epigallocatequina 3-galato (EGCG, $C_{22}H_{18}O_{11}$) es un compuesto polifénolico con un peso molecular de 458.37 g/mol que se encuentra en el vino tinto y en algunas frutas, sin embargo el chocolate y la planta del té verde (*Camellia sinensis*) son las principales fuentes donde se puede encontrar a la EGCG (Manach et al., 2004).

El té verde se compone de una gran cantidad de compuestos, entre los que destacan las catequinas, algunas de las catequinas de mayor abundancia son la epicatequina (EC), epicatequina 3-galato (EGC), epigallocatequina (EGC) y epigallocatequina 3-galato (EGCG) (Mandel et al., 2004). Diversos estudios sugieren que las catequinas son responsables por la mayoría de los efectos benéficos a la salud atribuidos al consumo del té verde (Nagle et al., 2006; Mandel et al., 2004).

5.1 Extracción y purificación de la EGCG

La extracción de la EGCG se lleva a cabo a partir de las hojas del té verde (*Camellia sinensis*) con agua caliente. Posteriormente, el agua caliente extraída se utiliza para la separación de la fracción orgánica con etil-acetato. La fracción orgánica se sometió a cromatografía de fase líquida para separar a la EGCG de la fracción de catequinas con etanol/agua seguido de la cristalización y secado. Este método de purificación, a partir de las hojas del té verde asegura un $\geq 95\%$ de pureza del compuesto (Isbruker et al., 2006; Product information, Sigma).

5.2 Estructura química de la EGCG

Los flavanoles son una sub-clase de flavonoides que se diferencian los grupos encontrados en la posición 3 del grupo benzopirano y en la posición 4 del benzeno (Williams et al., 2012). Las catequinas encontradas en el té verde son flavanoles que se caracterizan por el patrón de hidroxilación así como de la presencia ó no del grupo galato (Spencer, 2010).

Particularmente, la estructura química de la EGCG comprende dos anillos aromáticos, benzopirano (A y C), los cuales están unidos a un anillo oxigenado heterocíclico, benzeno (B). En la posición C-3 del anillo C se encuentra el grupo galato y en la posición C-5 del anillo B se encuentra un grupo -OH, formando un grupo tri-hidroxilo (estructura pirogalo) en el anillo B (Figura 5) (Spencer, 2010; Weinreb et al., 2009).

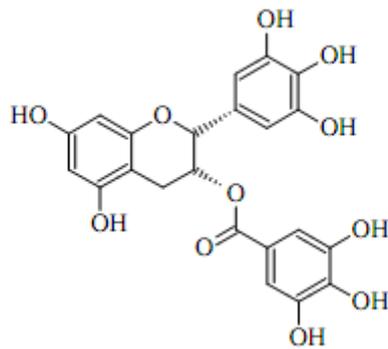


Figura 5. Estructura química de la epigalocatequina 3-galato (EGCG, $C_{22}H_{18}O_{11}$).

5.3 Metabolismo de la EGCG

A las catequinas, especialmente la EGCG, se les ha atribuido varias actividades biológicas. Sin embargo, la biodisponibilidad y biotransformación de las catequinas es uno de los factores limitantes para entender los efectos biológicos de las mismas. Recientemente, diversos estudios han analizado los parámetros farmacocinéticos del té verde, de la EGCG y sus metabolitos (Suganuma et al., 1998; Meng et al., 2002; Lambert et al., 2003).

El metabolismo de la EGCG (administrada por vía oral), ocurre a partir de la absorción de la misma en el intestino delgado y su paso por el hígado, la catequina es conjugada mediante procesos de metilación, sulfatación y glucoronidación (Lambert et al., 2003; Lee et al., 2002).

Los metabolitos formados se pueden encontrar en sangre y en órganos blancos resultando en una alteración de la actividad biológica. El principal metabolito formado en humanos y roedores, a partir de la administración de EGCG es el 4',4''-di-O-metil-EGCG (Meng et al., 2002). El proceso de conjugación del EGCG facilita su eliminación al incrementar su grado de

hidrofilicidad; algunos metabolitos pueden ser reabsorbidos por el sistema enterohepático o ser eliminados vía orina y/o heces (Lambert et al., 2003; Lee et al., 2002).

A partir de una administración gástrica a ratones de EGCG marcada radioactivamente con tritio (^3H -EGCG), se determinó la amplia distribución de la EGCG en órganos como son el tracto digestivo (estomago, intestino delgado y colon), hígado, pulmones, cerebro, corazón, riñones, páncreas, hueso y piel, entre otros (Suganuma et al., 1998). Además se demostró que la administración continua de ^3H -EGCG incrementa significativamente los niveles en sangre, así como en el cerebro y otros órganos; manteniendo las concentraciones altas de ^3H -EGCG y sus metabolitos en los diferentes órganos blanco (Suganuma et al., 1998).

Lin y colaboradores (2007) reportaron que la administración intravenosa de EGCG (50 mg/Kg) a ratas macho, alcanza la distribución regional de EGCG en diferentes áreas del cerebro como son la corteza (6.23 ng/g), tallo cerebral (3.76 ng/g), hipocampo (4.18 ng/g), estriado (4.72 ng/g) y cerebelo (7.13 ng/g); demostrando que la EGCG es capaz de distribuirse en el parénquima cerebral y de penetrar la barrera hematoencefálica (Lin et al., 2007).

Aunque la vida media ($t_{1/2}$) de la EGCG dependerá de diversos factores como son la vía de administración, dosis administrada y especie en cuestión; Lambert y colaboradores (2003) determinaron que la $t_{1/2}$ en ratones macho administrados con EGCG pura (163.8 $\mu\text{mol/Kg}$) a través de la vía oral es de

1.28±0.23 horas. En humanos se ha determinado que la $t_{1/2}$ de la EGCG pura administrada por vía oral es de 3.4±0.3 horas (Lee et al., 2002).

5.4 Actividades biológicas de la EGCG

Estudios epidemiológicos han mostrado que el consumo de frutas, vegetales y derivados de plantas; están asociados con una reducción en el riesgo de padecer diversas patologías (Spencer, 2010). El consumo del té verde es considerado una fuente de compuestos con actividades biológicas y farmacológicas con potenciales beneficios a la salud (Mandel et al., 2004). Se estima que una taza de té verde (2.5 gr. de hojas de té verde/200 mL. de agua) pueden contener 90 mg. de EGCG y de esta manera contribuir a los efectos benéficos atribuidos al té verde, como son las propiedades neuroprotectoras (Weinreb et al., 2009).

Es importante señalar que la actividad biológica de la EGCG actúa de un modo bifásico, el cual es una ventana de acción farmacológica dependiente de la concentración. A altas concentraciones del compuesto exhibe actividad pro-oxidante y pro-apoptótica, las cuales son responsables por sus propiedades anti-tumorales; mientras que a dosis bajas ejerce su efecto de neuroprotección contra una amplia variedad de compuestos neurotóxicos (Weinreb et al., 2009; Mandel et al., 2004; Mandel et al., 2005).

Las actividades biológicas de la EGCG han tomado gran atención por los diversos efectos que producen en el organismo; algunas de las propiedades

que se le han atribuido a la EGCG son anti-tumoral (Sadiq et al., 2009; Sarkar et al., 2009), antioxidante y agente quelante (Weinreb et al., 2009), anti-inflamatorio (Spencer et al., 2012), favorece la función cardiovascular (Van Praag et al., 2007), modula diferentes vías de señalización (Mandel et al., 2005; Spencer, 2008), así como modulador de la expresión de genes relacionados con sobrevivencia y muerte celular (Weinreb et al., 2003; Levites et al., 2002). A continuación se presenta algunas una breve síntesis de las actividades biológicas más estudiadas de la EGCG:

5.4.1 Actividad antioxidante

Tradicionalmente, un antioxidante se define como una molécula capaz de estabilizar a un radical libre a través de la donación de un electrón, generando moléculas menos reactivas que no dañan la integridad celular (Valko et al., 2007). Nanjo y colaboradores (1996) evidenciaron que la EGCG presenta la capacidad de captar radicales como son el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroxilo ($^{\bullet}OH$), oxígeno singulete (1O_2) y el radical hidroperoxilo (ROO^{\bullet}) en condiciones *in vitro*.

El mismo grupo de investigación determinó que la actividad captadora de radicales libres de la EGCG está atribuida por la presencia del grupo trihidroxilo en el anillo B y a la unión del grupo galato en la posición 3 del anillo C (Figura 5). (Nanjo et al., 1999 y 1996). Adicionalmente, a la EGCG se le ha atribuido la propiedad quelante de metales, tales como son el cobre (II) y el hierro (III), formando complejos inactivos y prevenir la generación de radicales libres (Weinreb et al., 2009).

Las características estructurales más importantes que definen el potencial quelante de la EGCG son la presencia del grupo 3´4´-dihidroxilo en el anillo B, así como el grupo galato los cuales pueden neutralizar los iones hierro y cobre para formar complejos, y por lo tanto proteger a la célula del daño oxidativo (Mandel et al., 2005; Thompson et al., 1976).

Recientemente, se ha estudiado que la EGCG puede estar efectuando su actividad antioxidante a través de la modulación de las defensas antioxidantes endógenas al activar al factor nuclear relacionado a eritroide-2 (Nrf2), el cual regula la inducción de genes en respuesta al estrés, como son enzimas de la fase II, por ejemplo la superóxido dismutasa (SOD), glutatión S-transferasa (GST), glutatión peroxidasa (GPx), hemo-oxigenasa-1 (HO-1), catalasa, entre otros (Surh et al., 2008).

Al analizar el perfil de expresión génica en ratones silvestres C57BL6J y ratones knockout para Nrf2 (^{-/-}) administrados con EGCG, se observó un incremento en el número de genes expresados dependientes de Nrf2, que fueron favorecidos por la administración de EGCG, comparado con el perfil génico de los roedores transgénicos y que también fueron administrados con EGCG; demostrando la habilidad de la catequina para activar al factor de transcripción Nrf2 (Shen et al., 2005).

5.4.2 Actividad Anti-tumoral

Diversas investigaciones experimentales con animales y líneas celulares humanas; así como estudios epidemiológicos en diferentes poblaciones han revelado que el consumo del té verde y de la EGCG reducen el riesgo y

previenen de padecer diferentes tipos de cáncer (Sadiq et al., 2009; Sarkar et al., 2009).

El cáncer de colon, pulmón, próstata, hígado, piel y leucemia son algunos de los tipos de cáncer en los que se ha observado un efecto quimioterapéutico inducido por la administración del té verde o de la EGCG pura (Berger et al., 2001; Gupta et al., 2003; Sartippour et al., 2002; Sadiq et al., 2009; Li et al., 2010).

Las propiedades quimioterapéuticas del té verde están mediadas en gran medida por la EGCG; se ha estudiado que la catequina induce apoptosis al modular la expresión de genes proapoptóticos; tales como *bax*, *bad* y el ligando *fas* (Levites et al., 2002), además promueve el arresto del ciclo celular al alterar la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular (Sadiq et al., 2009) y regular vías de señalización relacionadas con proliferación celular, apoptosis y metástasis (Sarkar et al., 2009).

Recientemente se ha propuesto que la EGCG puede estar regulando la expresión génica a través de un mecanismo de remodelaje de la cromatina, sugiriendo que la catequina puede estar llevando a cabo su propiedad anti-tumoral a través de un mecanismo epigenético (Li & Tollefsbol, 2010).

5.4.3 Modulador de vías de señalización

Una gran cantidad de evidencia sugiere que las propiedades quelantes y antioxidantes de la EGCG no son los únicos mecanismos responsables de la acción neuroprotectora de la catequina; la capacidad de modular diversas vías

de señalización que pueden contribuir significativamente a sobrevivencia celular (Weinreb et al., 2009).

Algunas de las vías de transducción implicadas en la función neuroprotectora promovida por la EGCG se encuentran la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK's), la vía de la proteína cinasa B (también llamada Akt), la vía de la proteína cinasa C (PKC) y la vía del factor nuclear kappa B (NfκB) (Chung et al., 2003; Mandel et al., 2003, 2004 y 2008; Levites et al., 2002; Spencer et al., 2009).

Las MAPK's son proteínas cinasas que transducen señales extracelulares a través de una serie de fosforilaciones intracelulares que modulan positivamente la proliferación y crecimiento celular (Weinreb et al., 2007). La cinasa regulada por señales extracelulares 1/2 (ERK 1/2), integrante de la familia de las MAPK's se activa principalmente en respuesta a mitógenos y factores de crecimiento (Xia et al., 1995).

Se ha reportado que el daño producido por la adición de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) es atenuado por la administración de EGCG en el medio, al incrementar la fosforilación de la proteína ERK1/2 en las células de neuroblastoma (Levites et al., 2002).

La activación de la proteína Akt/PKB se ha implicado en procesos de sobrevivencia celular, control del ciclo celular, regulación del flujo del calcio intracelular (Mandel et al., 2008; Spencer et al., 2003; Koh et al., 2004).

Un estudio realizado en un línea celular de queratinocitos humanos demostró que la EGCG promueve la sobrevivencia celular al incrementar el índice de las proteínas Bcl-2/Bax, e inducir un incremento en la fosforilación de Bad a través de la vía de Akt (Chung et al., 2003). Schroeter y colaboradores (2007) demostraron que a bajas dosis de la catequina estimula la fosforilación en la proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc, la cual regula la viabilidad neuronal y plasticidad sináptica a través de la vía de Akt y ERK 1/2.

La vía de la PKC se ha relacionado con sobrevivencia y diferenciación celular, procesos de dentritogénesis, así como formación y consolidación de diferentes tipos de memoria (Weinreb et al., 2009; Mandel et al., 2004; Caputi et al., 1996). Se ha observado que la inducción de la actividad de la PKC es un requisito para la neuroprotección contra diferentes condiciones tóxicas como son el β -amilode (A β) y la 6-OHDA (Levites et al., 2003).

La neuroprotección inducida por la EGCG es dependiente de la activación de la PKC, dado que al utilizar un inhibidor específico de la vía (GF109203X), se disminuye significativamente la sobrevivencia celular en cultivo celular de neuroblastoma humano expuesto a la toxina 6-OHDA (Levites et al., 2002). Por otra parte, se ha estudiado que la administración de EGCG (2 mg/Kg) favorece un incremento en la expresión de la isoforma α de la PKC en el estriado de ratones; así como la expresión de las isoformas α y ϵ en el hipocampo de los roedores (Mandel et al., 2004; Levites et al., 2003).

5.5 EGCG y neurogénesis

Recientemente se ha reportado el efecto de la EGCG sobre algunas etapas del proceso neurogénico. La EGCG administrada por vía oral a una dosis de 5mg/10 ml durante 4 semanas favorece la proliferación y diferenciación neuronal demostrado por el incremento en el número de células positivas a las proteínas Ki67 y DCX, respectivamente (Yoo et al., 2010). Estos datos son interesantes, sin embargo en este trabajo no se estudió a detalle el proceso neurogénico, de tal modo que sólo se reportó el efecto de la EGCG sobre la proliferación y la formación de neuroblastos, así mismo tampoco se exploró el mecanismo de acción a través del cual la EGCG ejerce sus efectos sobre la neurogénesis hipocámpica.

De manera similar, Wang y colaboradores (2012) estudiaron el efecto de la EGCG sobre el proceso neurogénico encontrando un incremento en la proliferación celular en condiciones *in vitro* en *in vivo*; sin alterar la diferenciación neuronal en los roedores adultos. Además determinaron que el incremento en la proliferación celular inducido por la EGCG está regulado por la activación de la vía Sonic hedgehog (Shh). Aunque estos datos son muy interesantes, también son controversiales.

Por lo cual en el presente proyecto se planteó evaluar el efecto del EGCG sobre la proliferación, la sobrevivencia y la diferenciación neuronal en ratones adultos; así como la implicación de la proteína Akt en los efectos de la EGCG.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El proceso neurogénico en el adulto es complejo e involucra varios eventos celulares que pueden ser modulados positivamente por hormonas, factores de crecimiento, neurotransmisores, la actividad física, y el aprendizaje. Sin embargo, también se ha observado una alteración en la neurogénesis en el cerebro adulto en modelos animales de diversas enfermedades tanto neurodegenerativas como son: la enfermedad de Alzheimer, el Parkinson y el Huntington; como enfermedades psiquiátricas tales como la esquizofrenia y la depresión (Dietrich & Kempermann, 2006; Kuhn et al., 2007; Reif et al., 2006).

Diversos compuestos naturales con efectos biológicos diferentes han ganado gran interés por los beneficios que causan en el organismo tanto en condiciones fisiológicas, como en modelos de enfermedades neurodegenerativas y psiquiátricas (Syahrul et al., 2012; Vauzour et al., 2010). En este sentido, la búsqueda de sustancias naturales que favorezcan o prevengan el deterioro del proceso neurogénico y cognoscitivo es relevante para la modulación de la neurogénesis. Además, es importante conocer las vías de señalización celular a través de las cuales estos compuestos pueden modular el proceso neurogénico.

Dado que la EGCG presenta diversos efectos biológicos benéficos (Weinreb et al., 2009; Mandel et al., 2004, 2005; 2008), en este proyecto estudiaremos los efectos de la EGCG sobre el proceso neurogénico y las vías de señalización celular implicadas en los efectos de la EGCG.

V. HIPÓTESIS

Si la EGCG se administra durante 14 días a ratones adultos, entonces se favorecerá la formación de nuevas neuronas en el giro dentado del hipocampo; a través de su capacidad para incrementar la vía de señalización celular de la proteína Akt/PKB.

VI. OBJETIVOS

1. *Objetivo General*

- Estudiar el efecto del compuesto EGCG sobre la neurogénesis hipocámpica en roedores adultos.

2. *Objetivos Particulares*

- Determinar los efectos de la EGCG sobre la proliferación y supervivencia celular en el giro dentado del hipocampo de roedores adultos tratados durante 14 días.
- Determinar el efecto de la EGCG sobre la activación de la caspasa-3 en el giro dentado del hipocampo de roedores adultos tratados durante 14 días.
- Evaluar el efecto de la EGCG sobre la diferenciación neuronal en el giro dentado del hipocampo de roedores adultos tratados durante 14 días.
- Evaluar el posible mecanismo de acción de la EGCG que favorece el proceso neurogénico, a través de su capacidad para modular la activación de la proteína Akt/PKB.

VII.MATERIALES y METÓDOS

1. Animales y reactivos

Se utilizaron en total 32 ratones macho adultos de la cepa BalbC de entre 8 a 10 semanas de edad, los cuales se obtuvieron del bioterio del Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz” y se alojaron en cajas de acrílico (6 animales por caja). Todos los animales tuvieron libre acceso a agua y comida; y se mantuvieron en condiciones constantes de temperatura ($25 \pm 3^{\circ}\text{C}$), humedad ($50 \pm 10\%$) y luz (12:12 ciclo luz:obscuridad). Los animales fueron distribuidos al azar en 6 grupos experimentales; los grupos 1 - 4 (n=6) se utilizaron para determinar los efectos de la EGCG sobre los parámetros de proliferación, sobrevivencia y diferenciación neuronal, así como la activación de la caspasa-3. Una vez determinada la dosis del compuesto que favoreció al proceso neurogénico, los grupos 5 y 6 (n=4) se utilizaron para el análisis de la expresión proteica. El manejo y los procedimientos seguidos con los animales se realizaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999).

La EGCG ($\geq 95\%$) y el BrdU ($\geq 99\%$) fueron obtenidos de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EUA). El agua desionizada utilizada en todos los experimentos se obtuvo de un sistema purificador Direct-Q system (Millipore, MA, USA). Para la preparación de todas las soluciones se utilizó agua desionizada, excepto para la EGCG y el BrdU, los cuales se disolvieron en solución salina estéril (0.9% NaCl).

2. Diseño experimental

La dosis de la EGCG que favoreció al proceso neurogénico se determinó realizando una curva dosis-respuesta del compuesto. Se formaron 4 grupos experimentales con 6 animales cada uno de la siguiente manera: **1) Grupo control:** recibió 100 μ L de vehículo (solución salina) por vía intraperitoneal (i.p.); **2) Grupo EGCG 2.5:** recibió 100 μ L de EGCG 2.5 mg/Kg/día por 14 días vía i.p.; **3) Grupo EGCG 5.0:** recibió 100 μ L de EGCG 5.0 mg/Kg/día por 14 días vía i.p.; **4) Grupo EGCG 10.0:** recibió 100 μ L de EGCG 10.0 mg/Kg/día por 14 días vía i.p. La EGCG se administró por vía intraperitoneal (i.p.) debido a que está reportado que este compuesto cruza eficazmente la barrera hematoencefálica (Nakagawa et al., 1997; Suganuma et al., 1998).

Los grupos 1 al 4 fueron utilizados para los experimentos de inmunohistoquímica, a los 4 grupos se les inyectó una hora previa al inicio de los tratamientos, un marcador de síntesis del ADN (Bromodesoxiuridina, BrdU; 50 mg/Kg por vía i.p.) para marcar a las células que se encontraban en estado de proliferación al inicio del tratamiento. Una vez finalizado los tratamientos por 14 días, los animales fueron sacrificados 2 horas posteriores a la administración de la última dosis del compuesto ó vehículo mediante una sobredosis de anestesia, y se perfundieron transcárdialmente con paraformaldehído al 4% en solución salina.

Una vez que se determinó la dosis efectiva del compuesto EGCG, el análisis de la expresión proteica se realizó en 2 grupos. Los grupos experimentales con 4 animales cada uno se formaron de la siguiente manera: **5) Grupo control:**

recibió 100 µL de vehículo (solución salina; vía i.p.) y **6) Grupo EGCG 2.5:** recibió 100 µL de EGCG 2.5 mg/Kg/día por 14 días vía i.p.; dos horas después de la última administración del vehículo ó fármaco, los roedores se sacrificaron por una sobredosis de anestesia y rápidamente se obtuvo el cerebro en frío y se obtuvo la región del hipocampo para procesarlo por técnicas de Western blot.

3. Técnica de inmunohistoquímica

Los cerebros de los ratones perfundidos se mantuvieron en para-formaldehído por 48h; y posteriormente fueron transferidos a una solución de sacarosa al 30% para su crioprotección hasta que se seccionaron. Se realizaron cortes coronales de 40 µm de grosor a lo largo del eje rostro-caudal con ayuda de un microtómo Leica y se mantuvieron en solución crioprotectora (25% glicerol; 25% etilenglicol en solución amortiguadora de fosfatos, pH 7.4) a -20°C, de acuerdo a reportes previos (Kempermann et al., 2003).

Para identificar las células positivas a cada marcador, se utilizó el método de flotación libre acoplado a la peroxidasa. El número de células inmunoreactivas a los diferentes marcadores se determinó en cada sexta sección de cada cerebro de todos los animales.

Los cortes se lavaron en TBS 1x (0.5 M Tris-base y 9.0% NaCl pH 7.4) para retirar el exceso de solución crioprotectora y posteriormente se

mantuvieron por 30 min. en solución de peróxido de hidrógeno al 0.6% en TBS 1x para bloquear a las peroxidases endógenas.

Para la detección del BrdU y la caspasa-3 se realizó un pre-tratamiento del tejido con HCL 2N durante 30 min. a 37°C y después se mantuvieron 10 min. en solución amortiguadora de boratos pH 8.5 (0.1 M ácido bórico); para la proteína DCX el pre-tratamiento se realizó con solución amortiguadora de citratos pH 6.0 (10 mM Citrato de sodio y 0.05% Tween 20), durante 2h a 50°C. Los cortes utilizados para la detección de la proteína Ki67, no se sometieron a ningún pre-tratamiento.

Una vez finalizado los diferentes pre-tratamientos, los cortes se bloquearon por 30 min. en TBS-Plus (triton X-100 al 10% y suero de burro al 3% en TBS 1x) y se incubaron toda la noche a 4°C con anticuerpos monoclonales específicos diluidos en TBS-Plus; anti-Ki67 (anticuerpo monoclonal purificado de conejo, diluido 1:2000, Abcam), anti-BrdU (anticuerpo monoclonal purificado de rata, diluido 1:500, Accurate), anti-DCX (anticuerpo monoclonal purificado de cabra, diluido 1:125, Santa Cruz) y anti-caspasa-3 forma activa (anticuerpo monoclonal purificado de ratón, diluido 1:250).

Al termino de la incubación con el anticuerpo primario, los cortes se lavaron con TBS 1x, y se incubaron con anticuerpos biotinilados secundarios específicos diluidos en TBS-Plus (anti-rabbit biotin, anti- rat biotin, anti-goat biotin y anti-mouse biotin, Jackson Immunoresearch) por 2h a temperatura ambiente.

Al término de la incubación se realizó la amplificación de la señal con el complejo de avidina-biotina (9 µl/ml; ABC, Vectastain Elite, Vector Laboratories) durante 1 hora y posteriormente se utilizó como cromógeno a la diaminobencidina (DAB, Sigma) por 5 minutos a una concentración de 0.25 mg/ml en TBS con 0.01% de peróxido de hidrogeno y 0.04% de cloruro de níquel. Los cortes se lavaron en TBS 1x y posteriormente se clarificaron y montaron en portaobjetos previamente gelatinizados en medio Neomount (Merck).

4. Cuantificación de las células positivas para cada marcador

La cuantificación de las células inmunoreactivas a Ki67, BrdU, DCX y caspasa-3 se realizó a lo largo del eje rostro-caudal de la zona granular y subgranular del giro dentado del hipocampo con ayuda de un microscopio de luz de Leica (DM500), el cual tiene acoplada una cámara digital y se obtuvieron las fotografías con los objetivos 10x y 40x. Los datos resultantes se multiplicaron por 6 para obtener el estimado del número total de células positivas para cada marcador (Plumpe et al., 2006. Ramírez-Rodríguez et al., 2009 y 2011).

5. Determinación de las categorías morfológicas de las células positivas a DCX en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo.

La determinación de las diferentes categorías morfológicas de las células positivas a DCX en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo se realizó de acuerdo a estudios previos (Plumpe et al., 2006; Ramírez-Rodríguez et al., 2011). Se establecieron seis categorías de acuerdo a la presencia y forma o madurez de las dendritas. La categoría **A** son células que no presentan dendritas, mientras que en la categoría **B** las dendritas son menores al tamaño del núcleo (<10 μm). En la categoría **C**, las dendritas presentan un tamaño igual o ligeramente mayor al del núcleo y en la categoría **D**, las dendritas presentan un tamaño mayor que el observado en la categoría C. Finalmente, en la categoría **E** se observa una dendrita primaria con un único punto de ramificación, mientras que en la categoría **F** se observa un árbol dendrítico más complejo con al menos tres puntos de ramificación que alcanzan la capa molecular.

Las diferentes categorías de células positivas a DCX se analizaron en el grupo control y en el grupo tratado con la dosis efectiva de EGCG (2.5 mg/Kg). Para llevar a cabo lo anterior, se tomaron microfotografías de cada corte hipocámpico con los objetivos 10x y 40x en un microscopio de luz Leica que tiene acoplada una cámara digital. Se tomaron en total 100 células por individuo (6 roedores por grupo), se escogieron 10 células en promedio escogidas al azar de cada corte hipocámpico (10 cortes hipocámpicos por

roedor en promedio), y se determinó la categoría correspondiente a cada célula. Se realizó el análisis de la distribución relativa y absoluta de las categorías, de acuerdo a lo que previamente se ha reportado (Ramírez-Rodríguez et al., 2011).

6. Técnica de Western blot

Los hipocampos obtenidos de los ratones tratados se homogenizaron en amortiguador RIPA 1x (150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1% Triton X-100, 2.5mM pirofosfato de sodio; 1mM ortodovanato de sodio; 1mM PMSF e inhibidores de proteasas en 20mM Tris-HCL pH 7.6) y centrifugaron a 14 000 rpm por 15 minutos para remover los restos celulares. El contenido total de proteína se cuantificó por el método de Bradford (Bio-Rad) (Bradford, 1976).

7. Cuantificación de proteína por el método de Bradford

La cuantificación de proteínas se determinó a través del método de Bradford (1976). Este método se basa en la unión del colorante azul de Coomassie a las proteínas principalmente a aminoácidos básicos (especialmente arginina) y residuos de aminoácidos aromáticos. El colorante existe en 3 formas: la catiónica (rojo), neutral (verde) y aniónica (azul). Bajo condiciones ácidas, el colorante se encuentra predominantemente en la forma protonada catiónica roja. Sin embargo, cuando el colorante se une a las proteínas, pasa a la forma estable no protonada azul; esta forma azulada es detectada a una densidad óptica de 595 nm.

Se realizó una curva estándar de albúmina de suero de bovino (ASB, 1mg/mL) empleando concentraciones de 0 a 80 µg de proteína. A las muestras obtenidas se les hizo una dilución 1:1000; y se tomaron 100 µL de la dilución y de la curva estándar y se les agregó 100 µL del reactivo de Bradford (Bio-Rad), se dejó incubando por 5 min a temperatura ambiente y en movimiento constante. Por último la densidad óptica de las muestras y la curva se cuantificó a una longitud de onda de 595 nm en un lector de ELISA. Los resultados se expresaron como µg/µL de muestra.

8. Determinación de los niveles de expresión proteica

Las muestras obtenidas de los roedores tratados con EGCG 2.5 mg/Kg ó vehículo se utilizaron para medir la expresión proteica de pAkt, Akt total y GAPDH. Se cargaron 30 µg de proteína de todas las muestras y se les adicionó amortiguador de carga (Laemmli, Bio-rad) en una relación 1:1 volumen/volumen y se hirvieron durante 5 min. Se realizaron geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 10% (Bis-acrilamida 0.8% y Acrilamida 30%; Tris – HCL pH 8.8) y 1 mm. de grosor, de acuerdo a reportes previos (Babu et al., 2009; Ramírez-Rodríguez et al., 2009).

La electroforesis se llevó a cabo por 1h a 120 volts en amortiguador de corrida (Tris-Base 25mM, glicina 192mM y SDS al 10%). Al término de la electroforesis los geles se colocaron 20 min. en amortiguador de transferencia (Tris-Base 25mM, glicina 192 mM, Metanol al 20%) para estabilizarlos y posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa a 350 miliamperios durante 2 h. a en una cámara de transferencia fría.

9. Inmunodetección de proteínas

Las membranas se bloquearon en una solución de leche al 5% con Tween 20 al 0.05% en amortiguador de fosfatos (TBS 1x; pH 7.4) por 1 h. a temperatura ambiente y se incubaron toda la noche a 4°C con anticuerpos específicos; anti-Akt fosforilado (anticuerpo monoclonal purificado de conejo, Cell Signaling), anti-Akt total (anticuerpo monoclonal purificado de conejo, Cell Signaling) y anti-GAPDH (anticuerpo monoclonal purificado de ratón, Cell Signaling); diluidos 1:1000 en solución de leche al 1% con Tween 20 al 0.05% en TBS 1x.

Al término de la incubación se realizaron 3 lavados de 10 min. cada uno con solución TBS-T (Tween 20 al 0.05% en TBS 1x); enseguida se incubaron por 2 h. a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios específicos acoplados a la peroxidasa; anti-mouse HRP y anti-rabbit HRP (Invitrogen) a una dilución de 1:1000 en solución de bloqueo; al término se realizaron 3 lavados de 10 min. cada uno con solución TBS-T.

La unión de los anticuerpos a las proteínas reconocidas se evidenció mediante quimioluminiscencia de alta afinidad (Inmmobilon para HRP, Millipore) donde el peróxido de luminol y un activador son sustratos de la peroxidasa del anticuerpo secundario que al reaccionar produce una luminiscencia que se cuantifica utilizando placas radiográficas de alta sensibilidad. Se utilizó a la proteína GAPDH como control de carga y se realizó el análisis densitométrico con el programa Image J, haciendo una relación entre la expresión de las proteínas fosforiladas entre la proteína total y posteriormente entre el control de carga GAPDH.

10. Análisis estadístico

El análisis de los resultados se realizó con el programa SigmaStat versión 3.1. El análisis estadístico se realizó aplicando una ANOVA de una vía seguida por la prueba *post-hoc* de Fisher. La prueba t de “Student” no pareada se utilizó para comparar diferencias entre dos grupos. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a un valor de $p < 0.05$.

VIII. RESULTADOS

1. Efecto de la administración de EGCG sobre la proliferación celular en el giro dentado del hipocampo de ratones macho adulto.

Para determinar el efecto de las diferentes dosis de EGCG (0, 2.5, 5 y 10 mg/kg de peso) sobre la proliferación celular, se utilizó como marcador de proliferación a la proteína Ki67, la cual es una proteína que se expresa en células que se encuentran en las fases activas del ciclo celular (Scholzen et al., 2000). La administración crónica de la dosis de 2.5 mg/kg de la EGCG aumentó en un 25% el número de células que se encuentran en etapa de proliferación con respecto al grupo control, esta diferencia en el número total de células positivas no fue significativamente diferente (Vehículo: 574 ± 51.46 ; EGCG 2.5 mg/Kg: 718 ± 75.11 $p= 0.16$). Por otro lado la dosis de 5.0 mg/Kg no afectó la proliferación celular con respecto al grupo control (Vehículo: 574 ± 51.46 ; EGCG 5.0 mg/Kg: 528 ± 104.98 $p= 0.70$). Sin embargo, la dosis más alta del compuesto EGCG (10 mg/kg) causó una disminución del 56% en las células en proliferación en comparación con el grupo control (Vehículo: 574 ± 51.46 ; EGCG 10.0 mg/Kg: 252 ± 38.18 $p=0.008$) (**Figura 6**).

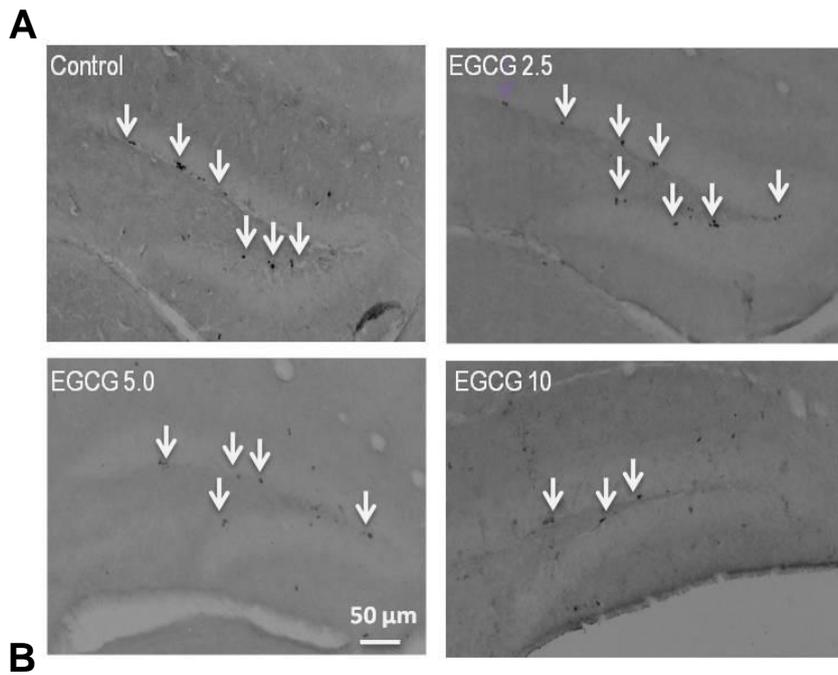
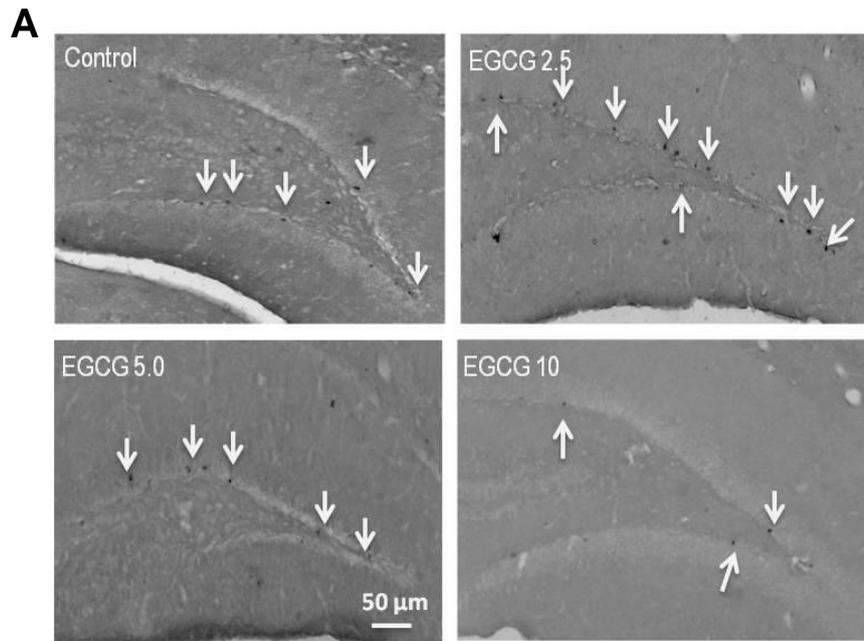


Figura 6. Efecto de la administración de EGCG durante 14 días sobre la proliferación celular en ratones macho BalbC. (A) Imágenes representativas de los grupos marcados con Ki67. (B) Análisis cuantitativo de las células positivas a Ki67. Las barras representan valores promedio de células positivas a Ki67 presentes en ambos hipocampos a lo largo del eje rostro caudal de los individuos de cada grupo. Los datos se expresan como promedio \pm E.E.M. ANOVA de una vía seguido por una prueba de Fisher. * $P=0.008$ versus Control ($n=6$).

2. Efecto de la administración de EGCG sobre la supervivencia celular en el giro dentado del hipocampo de ratones macho adulto.

El efecto de las diferentes dosis de EGCG (0, 2.5, 5 y 10 mg/kg de peso) sobre la supervivencia de las células de nueva generación se determinó a través de la administración del BrdU (50 mg/Kg) una hora previa al inicio del tratamiento con la EGCG. Las células que hayan incorporado el BrdU, las cuales sobrevivieron y fueron favorecidas por la administración de la catequina se detectaron al término del tratamiento (**Figura 7**). La dosis de 2.5 mg/Kg favoreció de manera significativa la supervivencia celular al causar un incremento del 40% comparado con el grupo control (Vehículo: 756 ± 58.32 ; EGCG 2.5 mg/Kg: 1062 ± 89.49 $p=0.005$). Sin embargo, la administración de la dosis de 5.0 mg/kg mostró una disminución del 19% con respecto al control, esta disminución en el número de células positivas a BrdU no fue significativo (Vehículo: 756 ± 58.32 ; EGCG 5.0 mg/Kg: 619 ± 39.67 $p=0.08$). Finalmente, la dosis de 10.0 mg/Kg de la EGCG afectó de manera importante (53%) la supervivencia de las células de nueva generación (Vehículo: 756 ± 58.32 ; EGCG 10.0 mg/Kg: 357 ± 52.22 ; $p= 0.002$) (**Figura 7**).



B

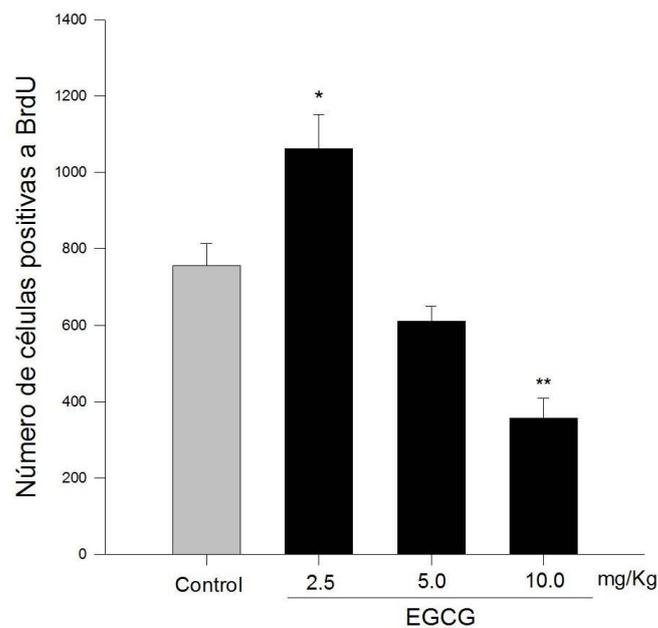


Figura 7. Efecto de la administración de EGCG durante 14 días sobre la supervivencia celular en ratones macho BalbC. (A) Imágenes representativas de los grupos marcados con BrdU. (B) Análisis cuantitativo de las células positivas a BrdU. Las barras representan valores promedio de células positivas a BrdU presentes en ambos hipocampos a lo largo del eje rostro caudal de los individuos de cada grupo. Los datos se expresan como promedio \pm E.E.M. ANOVA de una vía seguido por una prueba de Fisher. * $P=0.005$, ** $P=0.002$ versus Control ($n=6$).

3. Efecto de la administración de EGCG sobre la activación de la proteína caspasa-3 en el giro dentado del hipocampo de ratones macho adulto.

Para determinar un posible efecto tóxico por parte de la EGCG se realizó una inmunohistoquímica contra la forma activa de la caspasa-3 a los cuatro puntos de la curva de EGCG (0, 2.5, 5.0 y 10.0 mg/Kg). La administración de la catequina a la dosis efectiva que favorece el proceso neurogénico induce una discreta disminución no significativa en el número de células positivas a caspasa-3 con respecto al grupo control (Vehículo: 366 ± 58.0 ; EGCG 2.5 mg/Kg: 276 ± 16.2 $p=0.48$); la dosis intermedia de la EGCG no induce ningún cambio significativo en la activación de la caspasa-3 (Vehículo: 366 ± 58.0 ; EGCG 5.0 mg/Kg: 330 ± 56.8 $p=1$); sin embargo la dosis de 10 mg/Kg, la cual disminuyó la proliferación y sobrevivencia celular incrementó de manera significativa la activación de la caspasa-3 en un 52% con respecto al grupo control (Vehículo: 366 ± 58.0 ; EGCG 10.0 mg/Kg: 558 ± 52.8 $p=0.017$) (**Figura 8**).

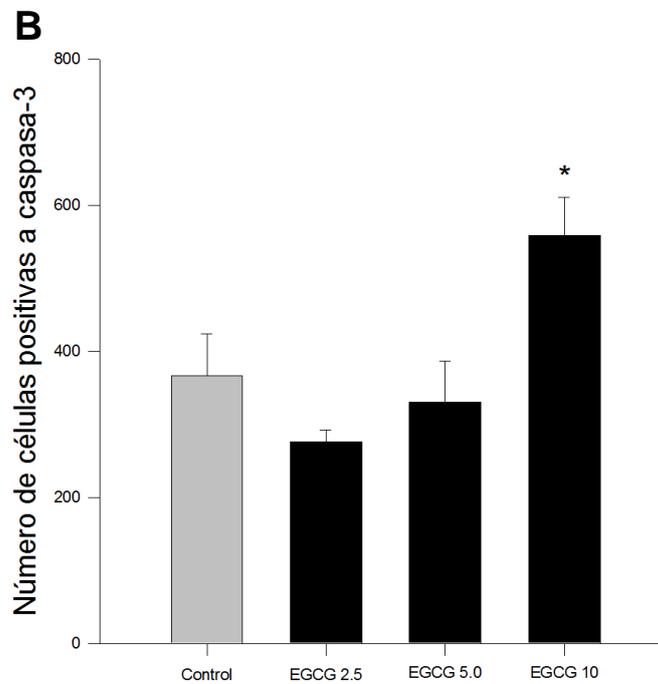
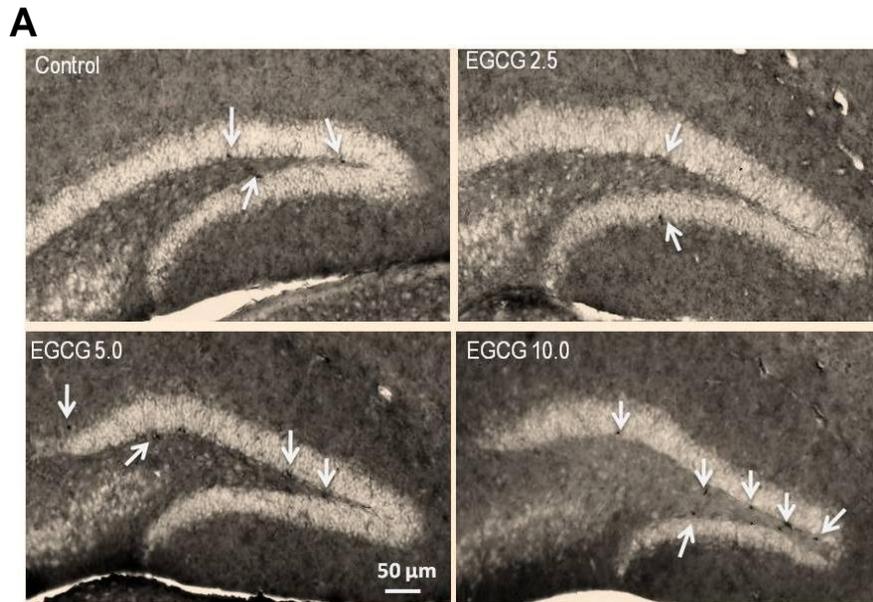


Figura 8. Efecto de la administración de EGCG durante 14 días sobre la activación de la caspasa-3 en ratones macho BalbC. (A) Imágenes representativas de los grupos marcados para la caspasa-3. (B) Análisis cuantitativo de las células positivas a caspasa-3. Las barras representan valores promedio de células positivas a caspasa-3 presentes en ambos hipocampos a lo largo del eje rostro caudal de los individuos de cada grupo. Los datos se expresan como promedio \pm E.E.M. ANOVA de una vía seguido por una prueba de Fisher. * $P=0.017$ versus Control ($n=6$).

4. Efecto de la administración de EGCG sobre la diferenciación celular en el giro dentado del hipocampo de ratones macho adulto.

Con base en los resultados obtenidos en los experimentos de proliferación y supervivencia celular para la determinación del efecto de la EGCG sobre la diferenciación neuronal se utilizaron únicamente cortes coronales del grupo 1: Control (vehículo) y del grupo 2: EGCG 2.5 mg/kg de peso. Esta dosis es la que favorece tanto la proliferación como la supervivencia de las células de nueva generación.

La diferenciación neuronal se determinó utilizando el marcaje con la proteína DCX. La administración de dicha dosis durante 14 días a los roedores incrementó de manera significativa (88%) a las células positivas a DCX en comparación con el grupo control (Vehículo: 5397 ± 980.30 ; EGCG 2.5 mg/Kg: 10143 ± 609.00 ; $p=0.006$) (**Figura 9**).

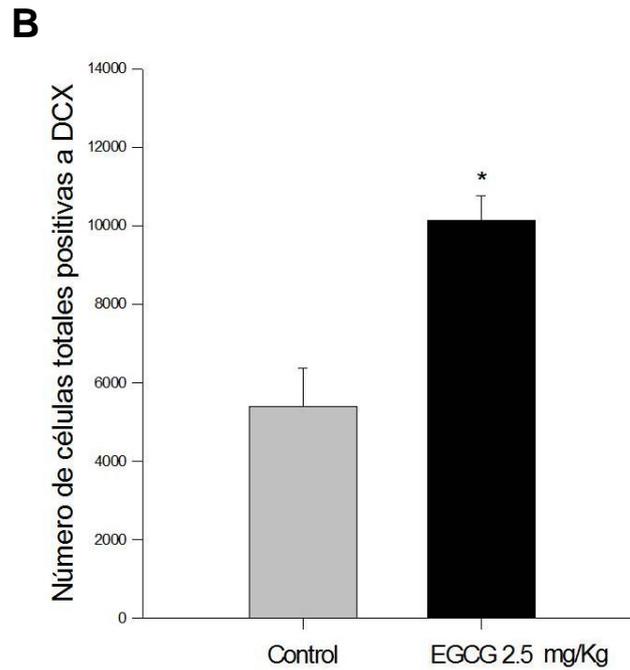
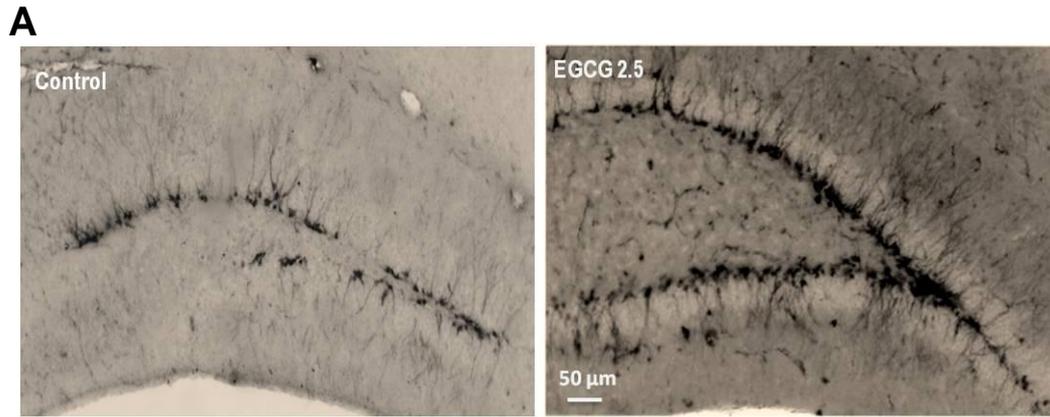


Figura 9. Efecto de la administración de EGCG durante 14 días sobre la diferenciación neuronal en ratones macho BalbC. (A) Imágenes representativas de los grupos marcados con DCX. (B) Análisis cuantitativo de las células positivas a DCX. Las barras representan valores promedio de células positivas a DCX presentes en ambos hipocampos a lo largo del eje rostro caudal de los individuos de cada grupo. Los datos se expresan como promedio \pm E.E.M. Prueba de t-Student * $P= 0.006$ versus Control ($n=6$).

5. Efecto de la administración de EGCG sobre la maduración dendrítica de células positivas a DCX

5.1 Distribución relativa de las categorías de acuerdo a morfología dendrítica de las células positivas a DCX

Para determinar las diferentes poblaciones positivas a DCX se realizó una clasificación considerando la morfología de la organización dendrítica, de acuerdo a estudios previos (Plumpe et al., 2006; Ramírez-Rodríguez et al., 2011).

El análisis de la distribución relativa por categoría mostró una disminución en las células positivas a DCX sin dendritas ó con dendritas muy cortas en el grupo tratado con EGCG 2.5 mg/Kg comparado con el grupo control (Categoría "A": Vehículo: 18.75%, EGCG: 15.0%; Categoría "B": Vehículo: 16.5%, EGCG: 12.0%). En las categorías con procesos dendríticos más largos pero sin ramificaciones se observó un ligero incremento en los ratones tratados con EGCG 2.5 mg/Kg (Categoría "C": Vehículo: 13.5%, EGCG: 15.0%; Categoría "D": Vehículo: 14.25%, EGCG: 15.0%). Las categorías relacionadas con una mayor maduración y complejidad dendrítica se mostró un incremento relativo particularmente en la categoría "F" (Categoría "E": Vehículo: 17.5%, EGCG: 17.8%; Categoría "F": Vehículo: 19.5%, EGCG: 25.3%) (**Figura 10**).

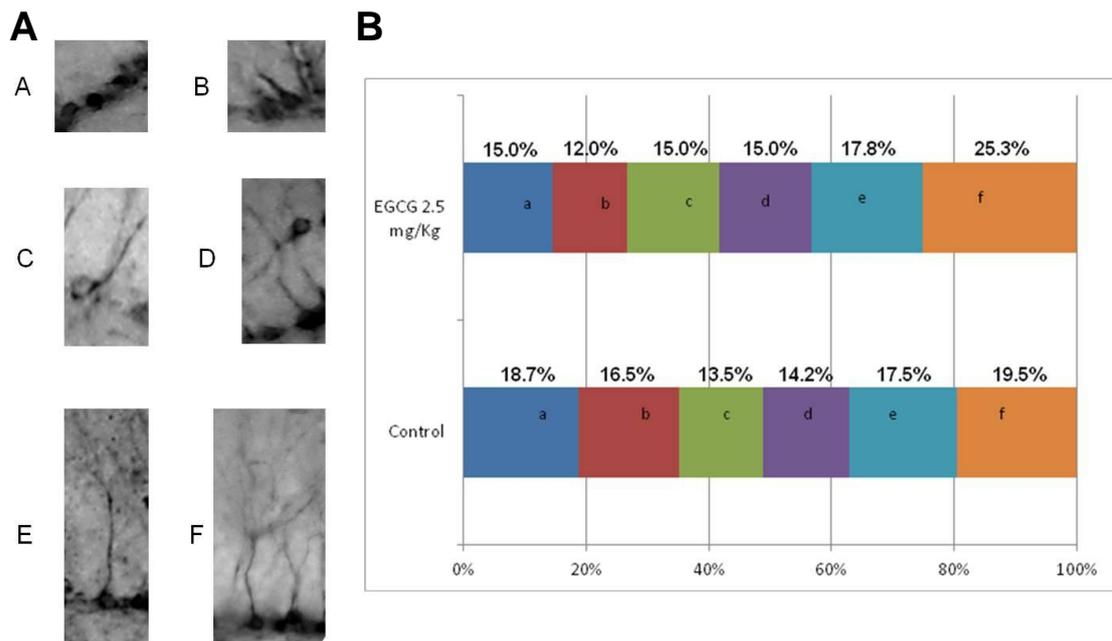


Figura 10. Efecto de la administración de EGCG durante 14 días sobre a la morfología dendrítica en ratones macho BalbC. (A) Microfotografías (40x) representativas de las diferentes categorías de la población de células positivas a DCX. (B) Distribución relativa de las células positivas a DCX. El 100% representa 100 células de cada individuo de cada grupo (n=6).

5.2 Distribución absoluta de las categorías de acuerdo a morfología dendrítica de las células positivas a DCX

Con base en los resultados obtenidos en el análisis de la distribución relativa, se realizó el análisis de la distribución absoluta de las células positivas a DCX, basándonos en el porcentaje de células correspondiente a cada categoría por el número total de células positivas a DCX entre 100, de acuerdo a reportes previos (Ramírez-Rodríguez et al., 2011).

El análisis de la distribución absoluta de las categorías analizadas de las células DCX positivas muestra un incremento significativo en todas las

categorías del grupo tratado con EGCG a una dosis de 2.5 mg/Kg de peso. En el grupo tratado con EGCG se observó un incremento en las células sin dendritas ó con procesos dendríticos muy cortos (Categoría "A": Vehículo: 1012 \pm 80.47, EGCG 2.5 mg/Kg: 1521 \pm 71.65, $p=0.003$; Categoría "B": Vehículo: 891 \pm 46.47, EGCG 2.5 mg/Kg: 1217 \pm 41.43, $p=0.002$). Las células con procesos dendríticos de igual tamaño al núcleo ó un poco más largo se incrementaron de manera significativa con la administración de la catequina con respecto al grupo control (Categoría "C": Vehículo: 729 \pm 99.61, EGCG 2.5 mg/Kg: 1521 \pm 215.19, $p=0.016$; Categoría "D": 769 \pm 33.97, EGCG 2.5 mg/Kg: 1521 \pm 41.43, $p=<0.001$). Las células con al menos una bifurcación en sus dendritas ó con un árbol dendrítico más complejo, de igual manera aumento la cantidad de células en esta categoría en el grupo tratado con EGCG 2.5 mg/Kg con respecto al grupo control (Categoría "E": Vehículo: 944 \pm 64.02, EGCG 2.5 mg/Kg: 1800 \pm 253.10, $p=<0.001$; Categoría "F": Vehículo: 1052 \pm 108.97, EGCG 2.5 mg/Kg: 2561 \pm 86.63, $p=<0.001$) (**Figura 11**).

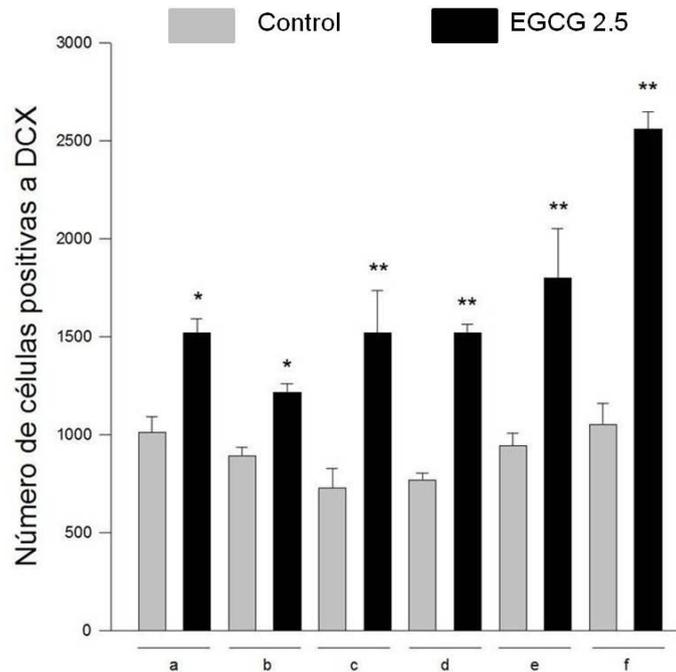


Figura 11. Efecto de la administración de EGCG durante 14 días sobre la distribución absoluta por categoría de acuerdo a la morfología dendrítica de las células positivas a DCX en ratones macho BalbC. Los datos se expresan como promedio \pm E.E.M. ANOVA de una vía seguido por una prueba de Fisher. * $P < 0.004$; ** $P < 0.001$ versus Control (n=6).

6. Evaluación de la activación de la proteína Akt por la EGCG.

Para determinar la posible participación de la proteína Akt en los efectos causados por la EGCG se realizó la inmunodetección de esta proteína que pertenece a la vía de la PI3K/Akt (Spencer et al., 2009; Zhuang et al., 2012).

El análisis de la expresión de la proteína Akt en el hipocampo de los roedores tratados durante 14 días con la EGCG a la dosis de 2.5 mg/Kg mostró un incremento del 97% en los niveles de expresión de la proteína Akt fosforilada con respecto al grupo control ($P=0.025$) (Figura 12). Por otra parte,

los niveles de expresión de la proteína Akt total no fueron modificados debido al efecto de la catequina, con respecto al control ($P=0.573$). Estos resultados en conjunto sugieren que la EGCG está modulando positivamente la vía de la proteína Akt al inducir un incremento en la activación de la vía, lo cual no se debe a cambios en los niveles de expresión de la proteína total (Figura 12).

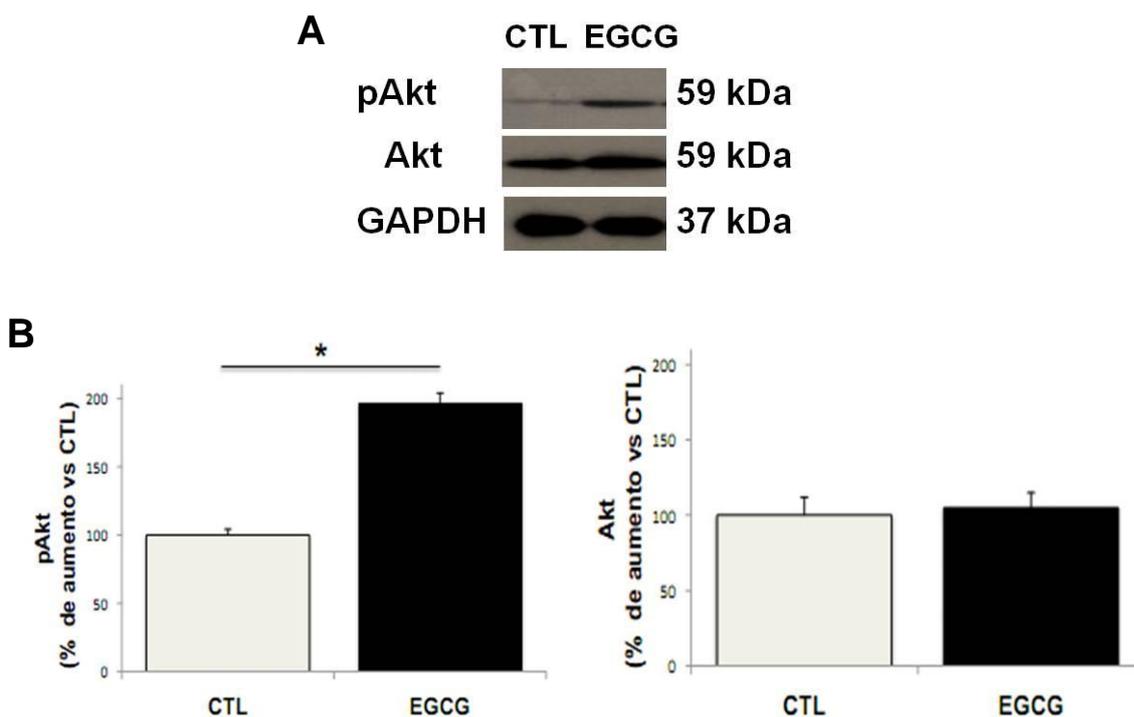


Figura 12. Efecto de la administración de EGCG durante 14 días sobre la activación y expresión de la proteína Akt en ratones macho BalbC. (A) Imágenes representativas de las radiografías del grupo control y grupo EGCG 2.5 mg/Kg. (B) Análisis densitométrico de las bandas de los grupos experimentales. Los datos se expresan como % de aumento versus Control. * $P=0.025$ ($n=4$).

IX. DISCUSIÓN

Estudios epidemiológicos relacionados con la nutrición en humanos y animales han sugerido que una dieta con compuestos polifenólicos, en particular flavonoides, pueden jugar un rol benéfico en la prevención de la degeneración neuronal, decline motor y cognitivo relacionado con la edad; así como un mejor rendimiento en pruebas de memoria y aprendizaje (Spencer et al., 2009, 2010; Gu et al., 2011).

En este estudio demostramos que la administración de EGCG durante 14 días a ratones adultos de la cepa BalbC promueve la supervivencia celular, la diferenciación neuronal y la maduración dendrítica de las células de nueva generación en el giro dentado del hipocampo; indicando que la EGCG incrementa la neurogénesis post-natal, y que este efecto requiere de la activación de la vía de la proteína Akt/PKB.

La EGCG es el principal componente polifenólico encontrado en la planta del té verde (*Camellia sinensis*). Algunos de sus componentes y derivados del té verde han demostrado ejercer una actividad anti-tumoral, anti-inflamatoria, antioxidante y quelante de metales; además de favorecer la función cardiovascular (Mandel et al., 2005; Nagle et al., 2006; Weinreb et al., 2009; Spencer et al., 2012)

La neurogénesis en el cerebro adulto es una forma de plasticidad cerebral que se caracteriza por ser un proceso complejo que involucra diversas etapas, las cuales pueden ser reguladas tanto positiva como negativamente

(Kempermann, 2011); recientemente se ha propuesto que la nutrición es un factor importante que modula la formación de nuevas neuronas (Pereira-Dias et al., 2012; Syahrul et al., 2012). Diversos estudios epidemiológicos han sugerido una relación inversa entre calidad de nutrición y enfermedades mentales (Nanri et al., 2010; Jacka et al., 2011). De manera similar, hay una gran cantidad de investigaciones vinculando la dieta con habilidades cognitivas, especialmente en la población envejecida (Kim et al., 2010; Song et al., 2012).

El efecto de la EGCG sobre la neurogénesis hipocámpica ha sido evaluado anteriormente en los trabajos de Yoo y colaboradores (2010) y Wang y colaboradores (2012); los resultados encontrados en ambas publicaciones son interesantes. Sin embargo, la falta de datos sobre la acción de la EGCG a diferentes dosis, así como sobre las diferentes etapas del proceso neurogénico no ha sido totalmente esclarecida.

Considerando lo anterior, en este trabajo se realizó una curva dosis respuesta de la EGCG, debido a que está reportado que este compuesto puede ejercer diferentes efectos biológicos dependiendo de la concentración utilizada (Levites et al., 2002; Weinreb et al., 2003; Mandel et al., 2004). La realización de la curva dosis respuesta permitió observar un efecto dependiente de la dosis administrada sobre los eventos de proliferación y supervivencia celular, así como en la inducción de la muerte por apoptosis.

Aunque previamente se reportó que la EGCG incrementa la proliferación de las células progenitoras del hipocampo tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo* (Yoo et al., 2010; Wang et al., 2012), los resultados obtenidos con el

marcaje de la proteína Ki67 muestran que a dosis bajas del compuesto (2.5 y 5.0 mg/Kg) no hay cambios significativos con respecto al control; sin embargo a dosis altas (10 mg/Kg) hay una disminución significativa de la proliferación y supervivencia celular, esto efecto puede deberse al daño celular inducido por la catequina a esa dosis; en este sentido observamos un incremento significativo en la activación de la proteína caspasa-3, la cual es el paso final de la vía de muerte por apoptosis.

Anteriormente se reportaron cambios en la expresión génica de células NB SH-SY5Y tratadas con diferentes concentraciones de la EGCG (Levites et al., 2002). Esta expresión es diferencial y dependiente de la dosis; a dosis altas (50 μ M) la catequina ejerce un efecto sobre la expresión de genes pro-apoptóticos como son Bax, Bad, caspasa-6, caspasa-1, ligando fas y Gadd45, así como la disminución en gene anti-apoptóticos como Bcl-2, Bcl-w y Bcl-XI (Levites et al., 2002). Los resultados obtenidos con la curva dosis respuesta de la EGCG muestran que ejerce un efecto dependiente de la dosis sobre las etapas de proliferación y supervivencia celular del proceso neurogénico probablemente debido a la modulación diferencial de la expresión de genes de sobrevivencia y muerte celular.

A diferencia de lo previamente reportado (Yoo et al., 2010; Wang et al., 2012), nuestros resultados no muestran un incremento estadísticamente significativo en la proliferación celular, este hecho puede deberse a la diferencia en las condiciones utilizadas; como son las dosis de EGCG evaluadas; y los diferentes tiempos de administración de la catequina.

La supervivencia celular medida a través de la incorporación del BrdU al inicio del tratamiento mostró un incremento significativo con la dosis de 2.5 mg/Kg de EGCG. De manera similar, el grupo de Yoo y colaboradores (2010) encontró que la administración de la EGCG durante 4 semanas a la dosis de 5mg/10mL favorece la supervivencia celular y diferenciación neuronal, evidenciado a través de la incorporación del BrdU y la expresión de la proteína DCX en el hipocampo de roedores adultos.

La supervivencia de las nuevas neuronas es una etapa crítica durante el proceso neurogénico; esta etapa está asociada con varios eventos celulares como es la maduración dendrítica, la cual puede ser regulada por diversos factores. Se ha demostrado que el establecimiento de contactos sinápticos, así como la maduración axónica son eventos celulares importantes para la integración final de las nuevas neuronas a los circuitos neuronales del hipocampo (Ge et al., 2007; Tony & Sultan, 2011).

Considerando que la EGCG favorece la supervivencia de las nuevas células, se realizó el marcaje para la proteína DCX. La administración crónica de EGCG (2.5 mg/Kg) causa un incremento estadísticamente significativo en el número de células positivas a DCX, lo cual sugiere que la EGCG modula positivamente la sobrevivencia y diferenciación neuronal de las células de nueva generación.

Aunque estudios previos han reportado el incremento en diferentes etapas del proceso neurogénico adulto debido a la administración de la EGCG, no existe ningún reporte del efecto de la EGCG sobre la maduración dendrítica.

Nuestros resultados revelan que la administración de EGCG durante 14 días induce un incremento en el número de células DCX que muestran una mayor complejidad dendrítica, correspondiente a las categorías E y F y disminuye las categorías A y B. Considerando lo anterior, se sugiere que la EGCG también promueva la maduración dendrítica de las células de nueva generación.

Aunque el mecanismo celular preciso por el cual la EGCG ejerce sus acciones sobre el proceso neurogénico no ha sido totalmente esclarecido; Wang y colaboradores (2012) sugieren que una de las vías de señalización que juega un papel importante en la acción de la EGCG es la vía activada por la proteína sonic hedgehog (Shh)

En nuestro trabajo, encontramos la activación de la proteína Akt/PKB, la cual es uno de los principales efectores de la vía de la fosfatidil inositol 3-cinasa (PI3K). La Akt es relevante para la modulación de la sobrevivencia celular y diferenciación neuronal al regular la actividad de moléculas efectoras como son las proteína Bad, ASK1 y GSK3 β (Spencer et al., 2003; Mandel et al., 2004; Vauzour et al., 2007).

Nuestros datos indican que la EGCG modula positivamente la sobrevivencia y diferenciación neuronal, así como la maduración dendrítica posiblemente involucrando la activación de la proteína Akt, sin descartar algunas otras vías que pueden estar implicadas en los efectos de la EGCG sobre la neurogénesis hipocámpica (Figura 13). Entre estas proteínas se encuentran la proteína cinasa C (PKC), proteína que participa en el mecanismo neuroprotector de la catequina contra la toxicidad de moléculas como es la 6-

hidroxi-dopamina (6-OHDA) y el péptido β -amiloide (Levites et al., 2002; Levites et al., 2003).

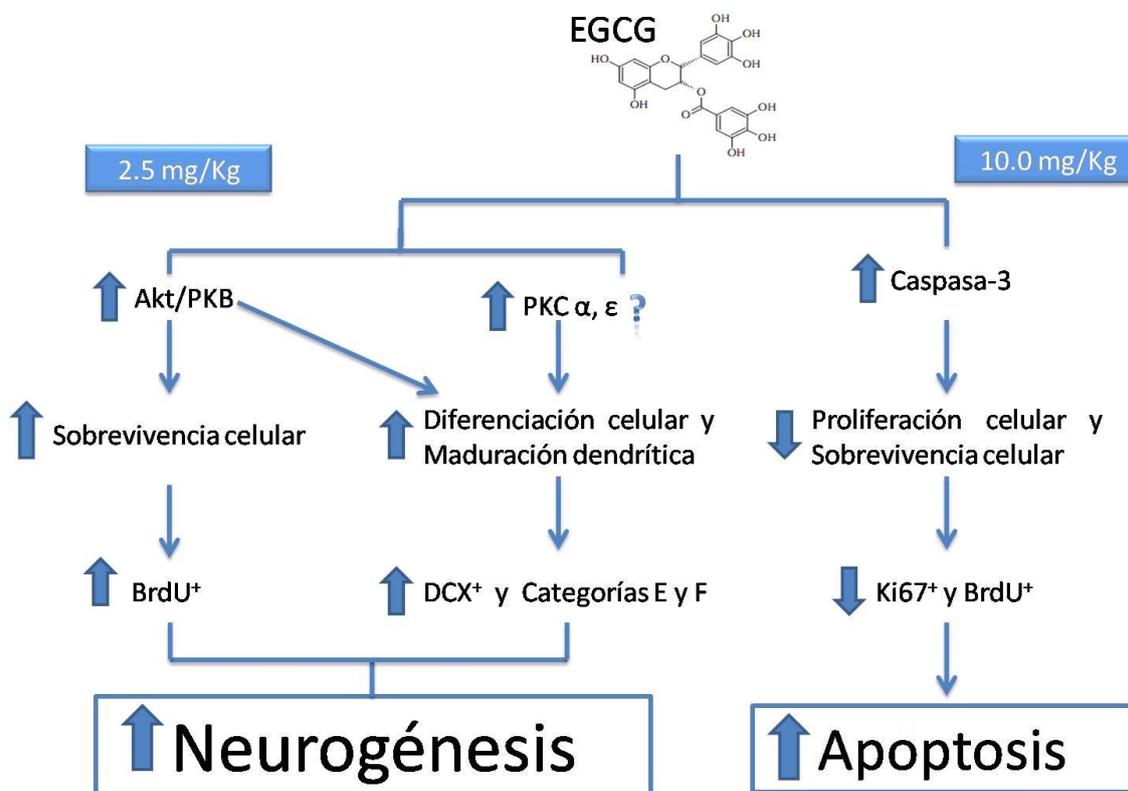


Figura 13. Mecanismo propuesto de la acción de la EGCG sobre el proceso neurogénico. La administración de la EGCG a roedores adultos ejerce un efecto dependiente de la dosis. Por un lado, la activación de la vía de la proteína Akt favorece los procesos de supervivencia, diferenciación neuronal y maduración dendrítica; mientras que un incremento en la activación de la proteína caspasa-3 conlleva a una disminución en la proliferación y supervivencia de las células de nueva generación.

Finalmente, los datos integrados en este trabajo indican que la EGCG modula diversos eventos del proceso neurogénico en una forma dependiente de la dosis administrada, siendo la dosis de 2.5 mg/Kg de EGCG suficiente para favorecer la formación de neuronas en el hipocampo del roedor adulto. En

relación a la cantidad administrada de EGCG a los roedores (2.5 mg/Kg), en el humano se requerirían entre 187.5 a 200 mg de EGCG al día para alcanzar una dosis similar a la administrada a los roedores en nuestro estudio (Chow et al., 2003; Wang et al., 2012). En este sentido se ha reportado que 2.5 gramos de hojas de té verde puede contener alrededor de 90 mg de EGCG en 200 mililitros (Weinreb et al., 2009).

A pesar de esta información, es necesario considerar las vías de administración y el metabolismo del flavonoide, ya que dependiendo de éstas, diferentes cantidades del compuesto o de sus metabolitos puede alcanzar los órganos blanco, como es el cerebro, para ejercer sus acciones biológicas y farmacológicas (Levites et al., 2002; Mandel et al., 2004; Weinreb et al., 2009).

Con base en lo anterior este estudio indica que el compuesto EGCG actúa como un regulador exógeno del proceso neurogénico en el hipocampo del cerebro adulto.

X. CONCLUSIONES

- La neurogénesis hipocámpica es regulada positivamente en ratones macho adultos por la administración durante 14 días de EGCG a una dosis de 2.5 mg/Kg.
- El efecto de la EGCG sobre la neurogénesis es dependiente de la dosis administrada; a dosis bajas favorece la formación de nuevas neuronas, mientras que a dosis altas la neurogénesis en el hipocampo se disminuye significativamente.
- La administración de EGCG (10 mg/Kg) disminuye significativamente la proliferación y supervivencia celular, e incrementa la expresión de la proteína caspasa-3 en el giro dentado del hipocampo de roedores adultos.
- La supervivencia celular, así como la diferenciación neuronal se incrementan significativamente debido al efecto de la EGCG a la dosis de 2.5 mg/Kg sobre ambas etapas del proceso neurogénico.
- De manera similar, la maduración dendrítica es favorecida positivamente debido a la acción de la catequina, reflejándose en un incremento en la distribución absoluta en todas las categorías de las células doblecortina positivas.
- La activación de la proteína Akt está implicada en el efecto biológico de la EGCG para favorecer al proceso neurogénico.

XI. PERSPECTIVAS

La investigación realizada es una primera etapa del estudio del efecto de la epigallocatequina 3-galato sobre la neurogénesis hipocámpica en ratones macho adulto de la cepa BalbC. Este trabajo reveló que la EGCG actúa como un modulador positivo de la neurogénesis post-natal. Sin embargo, diversas consideraciones deben realizarse para llevar a cabo un análisis posterior. Entre éstas se encuentran las siguientes:

- Determinar las concentraciones totales de la EGCG y sus metabolitos en el hipocampo de los roedores tratados.
- Determinar los fenotipos celulares (células maduras) finales que favorece la EGCG a una dosis de 2.5 mg/Kg.
- Elucidar de manera adicional a la Akt, los mecanismos de señalización celular a través de los cuales la EGCG actúa y favorece al proceso neurogénico utilizando herramientas como son las moléculas inhibidoras de vías de señalización específicas.
- Estudiar el impacto de la EGCG a una dosis de 2.5 mg/Kg sobre la formación de espinas dendríticas en las células granulares del giro dentado del hipocampo.
- Estudiar el efecto del aumento de las nuevas neuronas causado por la EGCG a una dosis de 2.5 mg/Kg sobre el proceso de memoria y aprendizaje.

- Estudiar el efecto de la EGCG sobre el proceso neurogénico en diversos modelos animales de enfermedades neurodegenerativas y psiquiátricas, y evaluar si esta molécula es capaz de prevenir ó atenuar las alteraciones encontradas en estos modelos.

XII. REFERENCIAS

- Allen E. 1912. The cessation of mitosis in the central nervous system of albino rat. *J. Comp. Neurol.* 19:547–68.
- Altman J. & Das GD. 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J. Comp. Neurol.* 124:319–35.
- Altman J. 1966. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. II. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in infant rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. *J. Comp. Neurol.* 1966:431–74.
- Altman J. 1969. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* 137:433–57.
- Alvarez-Buylla A, Kirn JR, Nottebohm F. 1990. Birth of projection neurons in adult avian brain may be related to perceptual or motor learning. *Science*, 21;249(4975):1444-6.
- An L, Zhang YZ, Yu NJ, Liu XM, Zhao N, Yuan L, Chen HX, Li YF. 2008. The total flavonoids extracted from Xiaobuxin-Tang up-regulate the decreased hippocampal neurogenesis and neurotrophic molecules expression in chronically stressed rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 32(6):1484-90.
- Armario A. 2006. The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis: What can I tell us about stressors? *CNS & Neurological Disorders – Drug Targets.*, 5(5): 485-501.
- Babu H, Cheung G, Kettenmann H, Palmer TD, Kempermann G. 2007. Enriched monolayer precursor cell cultures from micro-dissected adult mouse dentate gyrus yield functional granule cell-like neurons. *PLoS One*, 25;2(4):388.
- Babu H, Ramírez-Rodríguez G, Fabel K., Bischofberger J, Kempermann G. 2009. Synaptic network activity induces neuronal differentiation of adult hippocampal precursor cells through BDNF signaling. *Frontiers in Neuroscience*, 3(49): 1-11.
- Babu H., Claasen J-H, Kannan S., Rünker A., Palmer T., Kempermann G. 2011. A protocol for isolation and enriched monolayer cultivation of neural precursor cells from mouse dentate gyrus. *Front Neurosci*, 5:89.

- Bai F, Bergeron M, Nelson DL. 2003. Chronic AMPA receptor potentiator (LY451646) treatment increases cell proliferation in adult rat hippocampus. *Neuropharmacology*, 44(8):1013-21.
- Banasr M, Hery M, Printemps R, Daszuta A. 2004. Serotonin-induced increases in adult cell proliferation and neurogenesis are mediated through different and common 5-HT receptor subtypes in the dentate gyrus and the subventricular zone. *Neuropsychopharmacology*, 29(3):450-60.
- Barker JM, Boonstra R, Wojtowicz JM. 2011. From pattern to purpose: how comparative studies contribute to understanding the function of adult neurogenesis. *Eur J Neurosci*, 34(6):963-77.
- Barkho BZ, Song H, Aimone JB, Smrt RD, Kuwabara T, Nakashima K, Gage FH, Zhao X. 2006. Identification of astrocyte-expressed factors that modulate neural stem/progenitor cell differentiation. *Stem Cells Dev*, 15(3):407-21.
- Berger SJ, Gupta S, Belfi CA, Gosky DM, Mukhtar H. 2001. Green tea constituent (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits topoisomerase I activity in human colon carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288:101–05.
- Bolteus AJ & Bordey A. 2004. GABA release and uptake regulate neuronal precursor migration in the postnatal subventricular zone. *J Neurosci.* 2004 1;24(35):7623-31.
- Bracko O, Singer T, Aigner S, Knobloch M, Winner B, Ray J, Clemenson GD Jr, Suh H, Couillard-Despres S, Aigner L, Gage FH, Jessberger S. 2012. Gene expression profiling of neural stem cells and their neuronal progeny reveals IGF2 as a regulator of adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci*, 7;32(10):3376-87.
- Bradford MM. 1976. A rapid sensitive and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*; 72: 248-254.
- Brandt MD, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G, Reuter K, Bick-Sander A, von der Behrens W, Kempermann G. 2003. Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Mol Cell Neurosci*, 24(3):603-13.
- Cameron HA, McEwen BS, Gould E. 1995. Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus. *J Neurosci*, Jun;15(6):4687-92.
- Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS, Gould E. 1993. Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience*, 56(2):337-44.

- Caputi A, Rurale S, Pastorino L, Cimino M, Cattabeni FN, Di Luca M. 1996. Differential translocation of protein kinase C isozymes in rats characterized by a chronic lack of LTP induction and cognitive impairment. *FEBS Lett*, 393(1):121-3.
- Couillard DS, Iglseider B, Aigner L. 2011. Neurogenesis, cellular plasticity and cognition: The impact of stem cells in the adult and aging brain – a mini-review. *Gerontology*; 57(6):559-64.
- Curtis MA, Kam M, Nannmark U, Anderson MF, Axell MZ, Wikkelso C, Holtås S, van Roon-Mom WM, Björk-Eriksson T, Nordborg C, Frisén J, Dragunow M, Faull RL, Eriksson P. 2007. Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension. *Science*, 2;315(5816):1243-9.
- Chow HH, Cai Y, Hakim IA, Crowell JA. 2003. Pharmacokinetics and safety of green tea polyphenols after multiple dose administration of epigallocatechin gallate and polyphenon E in healthy individuals. *Clin. Cancer Res.* 9:3312-19.
- Chung JH, Han JH, Hwang EJ, Seo JY, Cho KH, Kim KH, Youn JI, Eun HC. 2003. Dual mechanisms of green tea extract (EGCG)-induced cell survival in human epidermal keratinocytes. *FASEB J*, 17(13):1913-5.
- Dayer AG, Cleaver KM, Abouantoun T, Cameron HA. 2005. New GABAergic interneurons in the adult neocortex and striatum are generated from different precursors. *J Cell Biol*, 31;168(3):415-27.
- Dietrich J. & Kempermann G. 2006. Role of Endogenous Neural Stem Cells in Neurological Disease and Brain Repair. *Adv Exp Med Biol*; 557:191-220.
- Dong S, Zeng Q, Mitchell ES, Xiu J, Duan Y, Li C, Tiwari JK, Hu Y, Cao X, Zhao Z. 2012. Curcumin enhances neurogenesis and cognition in aged rats: implications for transcriptional interactions related to growth and synaptic plasticity. *PLoS One*, 7(2):e31211.
- Ehninger D, Kempermann G. 2008. Neurogenesis in the adult hippocampus. *Cell Tissue Res*, 331(1):243-50.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Marie Alborn A, Nordborg C, Peterson D, Gage F. 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med.* 4: 1313-1317.
- Fowler CD, Liu Y, Ouimet C, Wang Z. 2002. The effects of social environment on adult neurogenesis in the female prairie vole. *J Neurobiol*, 51(2):115-28.
- Gascon E, Vutskits L, Kiss JZ. 2007. Polysialic acid-neural cell adhesion molecule in brain plasticity: from synapses to integration of new neurons. *Brain Res Rev*, 56(1):101-18.

- García-Verdugo JM, Doetsch F, Wichterle H, Lim DA, Alvarez-Buylla A. 1998. Architecture and Cell Types of the Adult Subventricular Zone: In Search of the Stem Cells. *J Neurobiol*, 36(2):234-48.
- Ge S, Goh EL, Sailor KA, Kitabatake Y, Ming GL, Song H. 2006. GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature*, 2;439(7076):589-93.
- Ge S, Pradhan DA, Ming GL, Song H. 2007. GABA sets the tempo for activity-dependent adult neurogenesis. *Trends Neurosci*, 30(1):1-8.
- Gould E., Tanapat P., McEwen B.S., FLUGGES G., Fuchs E. 1998. Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 3168–71.
- Gratzner HG. 1982. Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. *Science* 218:474–75.
- Gu Y, Janoschka S, Ge S. 2011. Neurogenesis and Hippocampal Plasticity in Adult Brain. *Curr Top Behav Neurosci*, 10: 1-18.
- Gupta S, Hussain T, Mukhtar H. 2003. Molecular pathway for (-)-epigallocatechin-3-gallate-induced cell cycle arrest and apoptosis of human prostate carcinoma cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 410(1):177–185.
- Haque AM, Hashimoto M, Katakura M, Tanabe Y, Hara Y, Shido O. 2006. Long-term administration of green tea catechins improves spatial cognition learning ability in rats. *J Nutr*; 136(4):1043-7.
- Haughey NJ, Nath A, Chan SL, Borchard AC, Rao MS & Mattson MP. 2002. Disruption of neurogenesis by amyloid beta-peptide, and perturbed neural progenitor cell homeostasis, in models of Alzheimer's disease. *J Neurochem*; 83(6):1509-24.
- He M, Zhao L, Wei MJ, Yao WF, Zhao HS, Chen FJ. 2009. Neuroprotective effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on aging mice induced by D-galactose. *Biol Pharm Bull*; 32(1):55-60.
- Hodge RD & Hevner RF. 2011. Expression and actions of transcription factors in adult hippocampal neurogenesis. *Dev Neurobiol*; 71(8):680-9.
- Huang T.T., Zoub Y., Corniolab R. 2012. Oxidative stress and adult neurogenesis: Effects of radiation and superoxide dismutase deficiency. *Semin Cell Dev Biol*; 23(7):738-44.
- Isbrucker RA, Bausch J, Edwards JA, Wolz E. 2006. Safety studies on epigallocatechin gallate (EGCG) preparations. Part 1: genotoxicity. *Food Chem Toxicol*; 44(5):626-35.

- Jacka FN, Kremer PJ, Berk M, de Silva-Sanigorski AM, Moodie M, Leslie ER, Pasco JA, Swinburn BA. 2011. A prospective study of diet quality and mental health in adolescents. *PLoS One*, 6(9):e24805.
- Jin, K. 2002. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc. Natl Acad. Sci.* 99: 11946-50.
- Kaplan MS, Hinds JW. 1977. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science*; 197:1092-4.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. 1997. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*, 386:493-5.
- Kempermann G, Gast D, Kronenberg G, Yamaguchi M, Gage FH. 2003. Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development*, 130(2):391-9.
- Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G. 2004. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci*, 27(8):447-52.
- Kempermann G. 2011. Seven principles in the regulation of adult neurogenesis. *Eur J Neurosci.*, 33(6):1018-24.
- Kim J, Lee HJ, Lee KW. 2010. Naturally occurring phytochemicals for the prevention of Alzheimer's disease. *J Neurochem*; 112(6):1415-30.
- Kitamura T., Saitoh Y, Murayama A, Sugiyama H, Inokuchi K. 2010. LTP induction within a narrow critical period of immature stages enhances the survival of newly generated neurons in the adult rat dentate gyrus. *Mol Brain*, 3:13.
- Kobil T, Liu QR, Gandhi K, Mughal M, Shaham Y, van Praag H. 2011. Running is the neurogenic and neurotrophic stimulus in environmental enrichment. *Learn Mem.*, 30;18(9):605-9.
- Koh SH, Kim SH, Kwon H, Kim JG, Kim JH, Yang KH, Kim J, Kim SU, Yu HJ, Do BR, Kim KS, Jung HK. 2004. Phosphatidylinositol-3 kinase/Akt and GSK-3 mediated cytoprotective effect of epigallocatechin gallate on oxidative stress-injured neuronal-differentiated N18D3 cells. *Neurotoxicology*, 25(5):793-802.
- Kotani S, Yamauchi T, Teramoto T, Ogura H. 2006. Pharmacological evidence of cholinergic involvement in adult hippocampal neurogenesis in rats. *Neuroscience*, 13;142(2):505-14.
- Kuhn HG, Cooper-Kuhn CM, Boekhoorn K, Lucassen PJ. 2007. Changes in neurogenesis in dementia and Alzheimer mouse models: are they functionally relevant? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 257(5):281-9.

- Kulkarni VA, Jha S, Vaidya VA. 2002. Depletion of norepinephrine decreases the proliferation, but does not influence the survival and differentiation, of granule cell progenitors in the adult rat hippocampus. *Eur J Neurosci*, 16(10):2008-12.
- Lafenetre P, Leske O, Wahle P, Heumann R. 2011. The beneficial effects of physical activity on impaired adult neurogenesis and cognitive performance. *Front Neurosci.*, 12;5:51.
- Lai K, Kaspar BK, Gage FH, Schaffer DV. 2003. Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nat Neurosci.* 2003 Jan;6(1):21-7.
- Lambert JD, Lee MJ, Lu H, Meng X, Hong JJ, Seril DN, Sturgill MG, Yang CS. 2003. Epigallocatechin-3-Gallate is absorbed but extensively glucuronidated following oral administration to mice. *J Nutr*, 133:4172–7.
- Lazic SE, Grote H, Armstrong R, Blakemore C, Hannan A, Van Dellen A & Barker R. 2004. Decreased hippocampal cell proliferation in R6 / 1 Huntington's mice. *Neuroreport*; 15(5):811-3.
- Lee MJ, Maliakal P, Chen L, Meng X, Bondoc FY, Prabhu S, Lambert G, Mohr S, Yang CS. 2002. Pharmacokinetics of Tea Catechins after Ingestion of Green Tea and (-)-Epigallocatechin-3-gallate by Humans: Formation of Different Metabolites and Individual Variability. *Cancer Epidemiol Biomarkers & Prev.*; 11: 1025–1032.
- Lee S, Jeong J, Kwak Y, Park S. 2010. Depression research: where are we now?. *Mol Brain*; 3: 1-8.
- Levites Y, Amit T, Youdim MBH, Mandel S. 2002. Involvement of protein kinase C activation and cell survival/cell cycle genes in green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate neuroprotective action. *J Biol Chem*; 277:30574–80.
- Levites Y, Amit T, Mandel S, Youdim MBH. 2003. Neuroprotection and neurorescue against amyloid beta toxicity and PKC-dependent release of non-amyloidogenic soluble precursor protein by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *FASEB J*; 17:952–4.
- Li GX, Chen YK, Hou Z, Xiao H, Jin H, Lu G, Lee MJ, Liu B, Guan F, Yang Z, Yu A, Yang CS. 2010. Pro-oxidative activities and dose–response relationship of (2)-epigallocatechin-3-gallate in the inhibition of lung cancer cell growth: a comparative study in vivo and in vitro. *Carcinogenesis*. 31(5):902-10.
- Li R, Peng N, Du F, Li XP, Le WD. 2006. Epigallocatechin gallate protects dopaminergic neurons against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-

induced neurotoxicity by inhibiting microglial cell activation. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*; 26(4):376-80.

- Li Y. & Tollefsbol TO. 2010. Impact on DNA methylation in cancer prevention and therapy by bioactive dietary components. *Curr Med Chem*. 17(20):2141-51.
- Lim DA & Alvarez-Buylla A. 1999. Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 22;96(13):7526-31.
- Lin JH & Yamazaki M. 2003. Clinical relevance of P-glycoprotein in drug therapy. *Drug Metab Rev*, 35(4):417-54.
- Lin LC, Wang MN, Tseng TY, Sung JS, Tsai TH. 2007. Pharmacokinetics of (-)-Epigallocatechin-3-gallate in Conscious and Freely Moving Rats and Its Brain Regional Distribution. *J Agric Food Chem.*; 55: 1517-24.
- Lledo PM, Alonso M, Grubb MS. 2006. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci*. 2006 Mar;7(3):179-93.
- Lois C. & Alvarez-Buylla A. 1993. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci*. 90(5):2074-7.
- Lois C, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. 1996. Chain migration of neuronal precursor. *Science*. 271(5251):978-81.
- Luo J, Daniels SB, Lenington JB, Notti RQ, Conover JC. 2006. The aging neurogenic subventricular zone. *Aging Cell*; 5(2):139-52.
- Luzzati F, De Marchis S, Fasolo A, Peretto P. 2006. Neurogenesis in the caudate nucleus of the adult rabbit. *J Neurosci*, 11;26(2):609-21.
- Ma DK, Marchetto MC, Guo JU, Ming GL, Gage FH, Song H. 2010. Epigenetic choreographers of neurogenesis in the adult mammalian brain. *Nat Neurosci*. 2010 Nov;13(11):1338-44.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*; 79(5):727-47.
- Mandel S, Reznichenko L, Amit T, Youdim MB. 2003. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate protects rat PC12 cells from apoptosis induced by serum withdrawal independent of P13-Akt pathway. *Neurotox Res* 5:419–24.
- Mandel S, Weinreb O, Amit T, Youdim MB. 2004. Cell signaling pathways in the neuroprotective actions of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate: implications for neurodegenerative diseases. *J Neurochem*; 88(6):1555-69.

- Mandel SA, Avramovich-Tirosh Y, Reznichenko L, Zheng H, Weinreb O, Amit T, Youdim MB. 2005. Multifunctional activities of green tea catechins in neuroprotection: Modulation of cell survival genes, iron-dependent oxidative stress and PKC signaling pathway. *Neurosignals*; 14:46–60.
- Mandel SA, Amit T, Kalfon L, Reznichenko L, Youdim MB. 2008. Targeting Multiple Neurodegenerative Diseases Etiologies with Multimodal-Acting Green Tea Catechins. *J Nutr.* 138(8):1578S-1583S.
- Mirochnic S, Wolf S, Staufenie, M & Kempermann G. 2009. Age effects on the regulation of adult hippocampal neurogenesis by physical activity and environmental enrichment in the APP23 mouse model of Alzheimer disease. *Hippocampus*, 19(10):1008-18.
- Ming G. & Song H. 2005. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 28:223–50.
- Ming G. & Song H. 2011. Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. *Neuron*, 26;70(4):687-702.
- Meng X, Sang S, Zhu N, Lu H, Sheng S, Lee MJ, Ho CT, Yang CS. 2002. Identification and Characterization of Methylated and Ring-Fission Metabolites of Tea Catechins Formed in Humans, Mice, and Rats. *Chem. Res. Toxicol.*, 15: 1042-1050.
- Moriya J, Chen R, Yamakawa J, Sasaki K, Ishigaki Y, Takahashi T. 2011. Resveratrol improves hippocampal atrophy in chronic fatigue mice by enhancing neurogenesis and inhibiting apoptosis of granular cells. *Biol Pharm Bull.*, 34(3):354-9.
- Mu Y, Lee SW, Gage FH. 2010. Signaling in adult neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol.* 2010 Aug;20(4):416-23.
- Nagle DG, Ferreira D, Zhou YD. 2006. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG): chemical and biomedical perspectives. *Phytochemistry*; 67(17):1849-55.
- Nakagawa K. and Miyazawa T. 1997. Absorption and distribution of tea catechin, (-)-epigallocatechin-3-gallate, in the rat. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 43: 679–684.
- Nanjo F, Goto K, Seto R, Suzuki M, Sakai M, Hara Y. 1996. Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radic Biol Med.* 21(6):895-902.
- Nanjo F, Mori M, Goto K, Hara Y. 1999. Radical scavenging activity of tea catechins and their related compounds. *Biosci Biotechnol Biochem.* 63(9):1621-3.

- Nanri A, Mizoue T, Matsushita Y, Sasaki S, Ohta M, Sato M, Mishima N. 2010. Serum folate and homocysteine and depressive symptoms among Japanese men and women. *Eur J Clin Nutr*, 64(3):289-96.
- Nottebohm F. 2004. The road we travelled: discovery, choreography, and significance of brain replaceable neurons. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*1016:628–58.
- Oomen CA, Mayer J., Lucassen P. 2007. Brief treatment with the glucocorticoid receptor antagonist mifepristone normalizes the reduction in neurogenesis after chronic stress. *Eur J Neurosci*; 26(12):3395-401.
- Pereira-Dias G, Cavegn N, Nix A, do Nascimento Bevilaqua MC, Stangl D, Zainuddin MS, Nardi AE, Gardino PF, Thuret S. 2012. The role of dietary polyphenols on adult hippocampal neurogenesis: molecular mechanisms and behavioural effects on depression and anxiety. *Oxid Med Cell Longev*;2012:541971.
- Plumpe T., Ehninger D., Steiner B., Klempin F., Jessberger S., Brandt M., Romer B., Ramírez-Rodríguez G., Kronenberg G., Kempermann G. 2006. Variability of doublecortin-associated dendrite maturation in adult hippocampal neurogenesis is independent of the regulation of precursor cell proliferation. *BMC Neurosci*, 15;7:77.
- Product Information, Sigma
www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/e4143?lang=es®ion.
- Ramírez-Rodríguez G., Benitez-King G., Kempermann G. 2007. Formación de neuronas nuevas en el hipocampo adulto: Neurogénesis. *Salud mental*, 30(3): 12-9.
- Ramírez-Rodríguez G, Klempin F, Babu H, Benítez-King G, Kempermann G. 2009. Melatonin modulates cell survival of new neurons in the hippocampus of adult mice. *Neuropsychopharmacology*, 34(9):2180-91.
- Ramírez-Rodríguez G., Ortíz-López L., Domínguez-Alonso A., Benítez-King G., Kempermann G. 2011. Chronic treatment with melatonin stimulates dendrite maturation and complexity in adult hippocampal neurogenesis of mice. *J. Pineal Res.*; 50: 29-37.
- Ramon y Cajal S. 1913. Degeneration and regeneration of the nervous system. London: Oxford Univ. Press.
- Rao M.S., Hattiangady B., Abdel-Rahman A., Stanley D.P., Shetty A.K. 2005. Newly born cells in the ageing dentate gyrus display normal migration, survival and neuronal fate choice but endure retarded early maturation. *Eur J Neurosci*; 21(2):464-76.

- Reif A, Fritzen S, Finger M, Strobel A, Lauer M, Schmitt A, Lesch KP. 2006. Neural stem cell proliferation is decreased in schizophrenia, but not in depression. *Mol Psychiatry*, 11(5):514-22.
- Reiter RJ. 1991. Melatonin: the chemical expression of darkness. *Mol Cell Endocrinol*, 79: C153–C158.
- Rivas-Arancibia S, Guevara-Guzmán R, López-Vidal Y, Rodríguez-Martínez E, Zanardo-Gomes M, Angoa-Pérez M, Raisman-Vozari R. 2010. Oxidative stress caused by ozone exposure induces loss of brain repair in the hippocampus of adult rats. *Toxicol Sci*; 113(1):187-97.
- Rodriguez JJ, Jones VC, Tabuchi M, Allan SM, Knight EM, LaFerla FM, Oddo S & Verkhratsky A. 2008. Impaired adult neurogenesis in the dentate gyrus of a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One*; 3(8):e2935.
- Rossi C, Angelucci A, Costantin L, Braschi C, Mazzantini M, Babbini F, Fabbri ME, Tessarollo L, Maffei L, Berardi N, 2006. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. *Eur J Neurosci*, 24(7):1850-6.
- Sadiq MS. & Sultan MT. 2009. Green Tea: Nature's Defense against Malignancies. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 49(5):463-73.
- Sanai N., Tramontin A., Quiñones-Hinojosa A., Barabaro NM., Gupta N., Kunwar S., Lawton MT., McDermott MW., Parsa AT., García-Verdugo JM., Berger MS., Alvarez-Buylla A. 2004. Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature*,19;427(6976):740-4.
- Sarkar FH, Li Y, Wang Z, Kong D. 2009. Cellular signaling perturbation by natural products. *Cell Signal*; 21(11):1541-7.
- Sartippour MR, Shao ZM, Heber D, Beatty P, Zhang L, Liu C, Ellis L, Liu W, Go VL, Brooks MN. 2002. Green tea inhibits vascular endothelial growth factor (VEGF) induction in human breast cancer cells. *J. Nutr*. 132:2307–11.
- Scholzen T & Gerdes J. 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*, 182(3):311-22.
- Schroeter H, Bahia P, Spencer JPE, Sheppard O, Rattray M, Cadenas E, Rice-Evans C, Williams RJ. 2007. (-)Epicatechin stimulates ERK-dependent cyclic AMP response element activity and up-regulates GluR2 in cortical neurons. *J. Neurochem*. 101: 1596–606.
- Seki T. 2003. Microenvironmental elements supporting adult hippocampal neurogenesis. *Anat Sci Int*, 78(2):69-78.

- Shen G, Xu C, Hu R, Jain MR, Nair S, Lin W, Yang CS, Chan JY, Kong AN. 2005 Comparison of (-)-epigallocatechin 3-gallate elicited liver and small intestine gene expression profiles between C57BL/6 J mice and C57BL/6J/Nrf2 (-/-) mice. *Pharm Res.* 22: 1805–20.
- Shen Q, Goderie SK, Jin L, Karanth N, Sun Y, Abramova N, Vincent P, Pumiglia K, Temple S. 2004. Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science*, 28;304(5675):1338-40.
- Snyder JS., Soumier A., Brewer M., Pickel J., Cameron HA. 2011. Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behavior. *Nature*, 3;476(7361):458-61.
- Song H, Stevens CF, Gage FH. 2002. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature*, 2;417(6884):39-44.
- Song J, Xu H, Liu F, Feng L. 2012. Tea and cognitive health in late life: current evidence and future directions. *J Nutr Health Aging.* 16(1):31-4.
- Spencer JP, Rice-Evans C, Williams RJ. 2003. Modulation of Pro-survival Akt/Protein Kinase B and ERK1/2 Signaling Cascades by Quercetin and Its in Vivo Metabolites Underlie Their Action on Neuronal Viability. *J Biol Chem.* 278(37):34783-93.
- Spencer JP. 2008. Flavonoids: modulators of brain function?. *Br J Nutr*; 99 E Suppl 1:ES60-77.
- Spencer JP. 2009. Nutrients and brain health: an overview. *Genes Nutr.*; 4: 225-6.
- Spencer JP. 2010. Beyond antioxidants: the cellular and molecular interactions of flavonoids and how these underpin their actions on the brain. *Proc Nutr Soc.*, 69(2):244-60.
- Spencer JP. 2010. The impact of fruit flavonoids on memory and cognition. *Br J Nutr*;104 Suppl 3:S40-7.
- Spencer JP, Vafeiadou K, Williams RJ, Vauzour D. 2012. Neuroinflammation: modulation by flavonoids and mechanisms of action. *Mol Aspects Med*; 33(1):83-97.
- Suganuma M, Okabe S, Oniyama M, Tada Y, Ito H, Fujiki H. 1998. Wide distribution of [3H](-)-epigallocatechin gallate, a cancer preventive tea polyphenol, in mouse tissue. *Carcinogenesis*; 19(10):1771-6.
- Surget A., Saxe M., Leman S., Ibarguen-Vargas Y., Chalon S., Griebel G., Hen R., Belzung C. 2008. Drug-dependent requirement of hippocampal

- neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal. *Biol Psychiatry*, 64: 293:301.
- Surh YJ, Kundu JK, Na HK. 2008. Nrf2 as a Master Redox Switch in Turning on the Cellular Signaling Involved in the Induction of Cytoprotective Genes by Some Chemopreventive Phytochemicals. *Planta Med*, 74: 1526–39.
 - Syahrul M., Zainuddin A., Thuret S. 2012. Nutrition, adult hippocampal neurogenesis and mental health. *British Medical Bulletin*, 103: 89–114.
 - Tattersfield AS, Croon RJ, Liu YW, Kells AP, Faull RL, Connor B. 2004. Neurogenesis in the striatum of the quinolinic acid lesion model of Huntington's disease. *Neuroscience*, 127(2):319-32.
 - Thompson M, Williams CR, Elliot GE. 1976. Stability of flavonoid complexes of copper(II) and flavonoid antioxidant activity. *Anal Chim Acta* 85:375–81.
 - Toni N. & Sultan S. 2011. Synapse formation on adult-born hippocampal neurons. *Eur J Neurosci*, 33(6):1062-8.
 - Valente T, Hidalgo J, Bolea I, Ramírez B, Angles N, Reguant J, Ramón J, Gutiérrez C, Boada M, Unzeta M. 2009. A Diet Enriched in Polyphenols and Polyunsaturated Fatty Acids, LMN Diet, Induces Neurogenesis in the Subventricular Zone and Hippocampus of Adult Mouse Brain. *J Alzheimers Dis*; 18(4):849-65.
 - Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*; 39: 44-84.
 - Van Praag H, Kempermann G, Gage FH. 1999. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci.*, 2(3):266-70.
 - Van Praag H, Lucero MJ, Yeo GW, Stecker K, Heivand N, Zhao C, Yip E, Afanador M, Schroeter H, Hammerstone J, Gage FH. 2007. Plant-derived flavanol (-)epicatechin enhances angiogenesis and retention of spatial memory in mice. *J Neurosci*. 2007; 27(22):5869-78.
 - Vauzour D, Vafeiadou K, Rice-Evans C, Williams RJ, Spencer JP. 2007. Activation of pro-survival Akt and ERK1/2 signalling pathways underlie the anti-apoptotic effects of flavanones in cortical neurons. *J Neurochem*. 103(4):1355-67.
 - Vauzour D, Rodriguez-Mateos A, Corona G, Oruna-Concha MJ, Spencer JP. 2010. Polyphenols and human health: prevention of disease and mechanisms of action. *Nutrients*, 2(11):1106-31.

- Villeda SA, Luo J, Mosher KI, Zou B, Britschgi M, Bieri G, Stan TM, Fainberg N, Ding Z, Eggel A, Lucin KM, Czirr E, Park JS, Couillard-Després S, Aigner L. 2011. The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature*; 477(7362):90-4.
- Vivar C, Potter MC, van Praag H. 2012. All About Running: Synaptic Plasticity, Growth Factors and Adult Hippocampal Neurogenesis. *Curr Top Behav Neurosci.*, 31: 1-22.
- Von Bohlen & Halbach O. 2011. Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus. *Cell Tissue Res*, 345(1):1-19.
- Von Hörsten S, Schmitt I, Nguyen HP, Holzmann C, Schmidt T, Walther T., Lindenberg KS, Landwehrmeyer B, Bauer A, Li XJ, Riess O. 2003. Transgenic rat model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet*; 12(6):617-24.
- Walker TL, Vukovic J, Koudijs MM, Blackmore DG, Mackay EW, Sykes AM, Overall RW, Hamlin AS, Bartlett PF. 2012. Prolactin stimulates precursor cells in the adult mouse hippocampus. *PLoS One*. 7(9):e44371.
- Wang Y, Li M, Xu X, Song M, Tao H, Bai Y. 2012. Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) promotes neural progenitor cell proliferation and sonic hedgehog pathway activation during adult hippocampal neurogenesis. *Mol Nutr Food Res*. 56(8):1292-303.
- Weinreb O, Mandel S, Youdim MB. 2003. CDNA gene expression profile homology of antioxidants and their anti-apoptotic and pro-apoptotic activities in human neuroblastoma cells. *FASEB J*. 17:935–937.
- Weinreb O, Amit T, Mandel S, Youdim MB. 2009. Neuroprotective molecular mechanisms of (-)-epigallocatechin-3-gallate: a reflective outcome of its antioxidant, iron chelating and neurotogenic properties. *Genes Nutr*; 4(4):283-96.
- Weinreb O, Amit T, Youdim MB. 2007. A novel approach of proteomics and transcriptomics to study the mechanism of action of the antioxidant-iron chelator green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Free Radic Biol Med* 43:546–56.
- Williams RJ, Spencer JP. 2012. Flavonoids, cognition, and dementia: actions, mechanisms, and potential therapeutic utility for Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med*; 52(1):35-45.
- Winner B, Lie DC, Rockenstein E, Aigner R, Aigner L, Masliah E, Kuhn HG & Winkler J. 2004. Human wild-type alpha-synuclein impairs neurogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol*; 63(11):1155-66.

- Winner B, Kohl Z, Gage FH. 2011. Neurodegenerative disease and adult neurogenesis. *Eur J Neurosci*; 33(6):1139-51.
- Wolf SA, Kronenberg G, Lehmann K, Blankenship A, Overall R, Staufenbiel M, Kempermann G. 2006. Cognitive and physical activity differently modulate disease progression in the amyloid precursor protein (APP)-23 model of Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry*, 60(12):1314-23.
- Wurmser AE, Palmer TD, Gage FH. 2004. Cellular interactions in the stem cell niche. *Science*, 304(5675):1253-5.
- Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. 1995. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*, 270(5240):1326-31.
- Yoo DY, Shin BN, Kim IH, Kim W, Kim DW, Yoo KY, Choi JH, Lee CH, Yoon YS, Choi SY, Won MH, Hwang IK. 2012. Effects of Cu,Zn-Superoxide Dismutase on Cell Proliferation and Neuroblast Differentiation in the Mouse Dentate Gyrus. *Neurochem Res.*, 37(2):261–267.
- Yoo KY, Choi JH, Hwang IK, Lee CH, Lee SO, Han SM, Shin HC, Kang IJ, Won MH. 2010. (-)-Epigallocatechin-3-gallate increases cell proliferation and neuroblasts in the subgranular zone of the dentate gyrus in adult mice. *Phytother Res*; 24(7):1065-70.
- Youdim KA, Shukitt-Hale B, Joseph JA. 2004. Flavonoids and the brain: interactions at the blood-brain barrier and their physiological effects on the central nervous system. *Free Radic Biol Med*, 37(11):1683-93.
- Yu S, Patchev A.V., Wu Y., Lu J., Holsboer F., Zhang J.Z., Sousa N., Almeida O.F. 2010. Depletion of the Neural Precursor Cell Pool by Glucocorticoids. *Annals of neurology*, 67(19): 21:30.
- Zhao C, Deng W, Gage FH. 2008. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell*, 22;132(4):645-60.
- Zhuang P, Zhang Y, Cui G, Bian Y, Zhang M, Zhang J, Liu Y, Yang X, Isaiah AO, Lin Y, Jiang Y. 2012. Direct Stimulation of Adult Neural Stem/Progenitor Cells In Vitro and Neurogenesis In Vivo by Salvianolic Acid B. *PLoS One*. 7(4):35636.
- Zigova T, Pencea V, Wiegand SJ, Luskin MB. 1998. Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb. *Mol Cell Neurosci*, 11(4):234-45.