



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**  
**FACULTAD DE PSICOLOGÍA**

**“EFECTO DE LA MORINA SOBRE LA MEMORIA EN EL ENVEJECIMIENTO DE RATÓN Y ESTUDIO DE LOS MECANISMOS MOLECULARES INVOLUCRADOS”**

**TESIS**  
**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**  
**MAESTRA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**  
**ALEIDA IGNACIO JUÁREZ**

**TUTOR PRINCIPAL**  
**DRA. MÓNICA ADRIANA TORRES RAMOS**  
Instituto Nacional De Neurología y Neurobiología Manuel Velasco Suárez

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**  
**DRA. SOFÍA YOLANDA DÍAZ MIRANDA**  
Instituto de Neurobiología  
**DR. OCTAVIO CÉSAR GARCÍA GONZÁLEZ**  
Facultad de Psicología

Ciudad Universitaria, CD. MX. Agosto 2021



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.

## HOJA DE DATOS DEL JURADO

### 1.- DATOS DEL ALUMNO

Ignacio  
Juárez  
Aleida  
55 47 66 44 69  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Psicología  
Maestría en ciencias (Neurobiología)  
312168601

### 2.- DATOS DEL TUTOR

Dra.  
Mónica Adriana  
Torres  
Ramos

### 3.- DATOS DEL SINODAL 1

Dr.  
Mauricio  
Díaz  
Muñoz

### 4.- DATOS DEL SINODAL 2

Dr.  
Julio  
Morán  
Andrade

### 5.- DATOS DEL SINODAL 3

Dra.  
Sofía  
Yolanda  
Díaz  
Miranda

### 6.- DATOS DEL SINODAL 4

Dra.  
Susana  
Castro  
Obregón

### 7.- DATOS DE LA TESIS

“Efecto de la morina sobre la memoria en el envejecimiento de ratón y estudio de los mecanismos moleculares involucrados”.

78 p.  
2021

***Dedicatoria***

*A mis padres y mi hermano.*

## **Agradecimientos**

A todos aquellos que me apoyaron directa o indirectamente en la elaboración de esta tesis:

A la Dra. Mónica Torres por su tutoría y acompañamiento en la realización del proyecto, admitirme en su grupo de trabajo e impulsar mi gusto por la ciencia.

A mi comité tutorial: Dr. Octavio César García González y Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda, por los comentarios para la elaboración de este trabajo escrito, por su acompañamiento a lo largo de la realización de la tesis y por el conocimiento compartido.

A la Dra. Hilda Martínez Coria, quien me instruyó en la realización de las pruebas conductuales y me permitió utilizar sus espacios para la realización de éstas, por su apoyo con material y reactivos, así como por los conocimientos compartidos, sus comentarios y consejos para la realización de este proyecto.

A la Dra. Marisol Orozco quien me apoyó con material y reactivos que necesité para hacer el trabajo experimental, por sus consejos y comentarios para la realización del proyecto.

Al M. en C. César Rodríguez y al departamento del bioterio por los ratones que me proporcionaron, así como el espacio para su hospedaje.

A la técnico académico Biól. Isabel Pérez Hernández, por su acompañamiento y apoyo en la realización de este proyecto.

A los sinodales de esta tesis: Dra. Susana Castro Obregón, Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda, Dr. Julio Morán Andrade, Dr. Mauricio Díaz Muñoz y Dra. Mónica Torres Ramos, por los comentarios para la elaboración de este trabajo escrito.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, instituciones que me proporcionaron los recursos necesarios para la realización de esta tesis.

## **ÍNDICE**

<b>Índice de figuras</b>	7
<b>Abreviaturas</b>	8
<b>Resumen en español</b>	9
<b>Resumen en inglés</b>	10
<b>Marco teórico</b>	11
Aprendizaje y memoria	11
Envejecimiento	14
Flavonoides	19
Vías de señalización involucradas en cognición activadas por flavonoides	21
Morina	24
<b>Antecedentes</b>	27
Flavonoides y su efecto sobre la cognición	28
Efecto de la morina sobre la cognición en modelos murinos	30
<b>Justificación</b>	33
<b>Hipótesis</b>	34
<b>Objetivos</b>	35
<b>Diseño experimental</b>	36
<b>Material y métodos</b>	37
Ratones C57BL/6	37
Administración de tratamientos	38
Memoria de reconocimiento de objetos en un contexto novedoso	39
Evaluación de los cambios en los niveles de proteínas por Western Blot	39
Análisis estadístico	41
<b>Resultados</b>	42
Identificación de las modificaciones en los niveles de las proteínas p-GSK3 $\beta$ , p-38, p-38 fosforilado y ERK 1/2, involucradas en vías de señalización relacionadas con memoria que son activadas por	42

flavonoides en ratones de catorce semanas	
La morina aumenta la forma inactiva de GSK3 $\beta$ en corteza e hipocampo	42
Efecto de la morina sobre los niveles de p38 y su forma fosforilada en corteza e hipocampo	45
Efecto de la morina en los niveles de ERK 1/2 en corteza e hipocampo	49
Estandarización del vehículo para la morina	51
Prueba de reconocimiento de objetos con contexto en ratones de cuarenta y seis semanas de edad	52
Identificación de BDNF en ratones envejecidos	54
<b>Discusión</b>	56
<b>Conclusiones</b>	68
<b>Referencias bibliográficas</b>	70
<b>Anexo: Evidencias experimentales de Western blot</b>	81

## Índice de figuras

<i>Figura 1.</i>	Estructura química básica de los flavonoides.	20
<i>Figura 2.</i>	Principales vías de señalización involucradas en los efectos de los flavonoides sobre cognición	22
<i>Figura 3.</i>	Estructura química de la morina (2', 3, 4', 5, 7-pentahidroxiflavona)	25
<i>Figura 4.</i>	La morina en dosis de 1 y 2.5 mg/kg mejora la memoria de reconocimiento de objetos con y sin contexto en ratones de la cepa C57BL/6 jóvenes sanos	31
<i>Figura 5.</i>	Diseño experimental	37
<i>Figura 6.</i>	La morina aumenta la inhibición de GSK3 $\beta$ en la corteza	43
<i>Figura 7.</i>	Efecto de la morina en los niveles de p38 y su forma fosforilada	46
<i>Figura 8.</i>	La morina tiende a aumentar los niveles de ERK 1/2 en corteza	50
<i>Figura 9.</i>	Medición de pH en preparaciones de morina disuelta en solución salina con NaOH	52
<i>Figura 10.</i>	Arenas utilizadas en la prueba de reconocimiento de objetos con contexto	52
<i>Figura 11.</i>	Índice de reconocimiento para la prueba de reconocimiento de objetos con contexto en ratones	54
<i>Figura 12.</i>	Identificación de BDNF en cerebro de ratones jóvenes y viejos tratados con solución salina y morina en dosis de 1 mg/kg.	55
<i>Figura 13.</i>	Cambio en los niveles de proteínas después del tratamiento con morina utilizando como vehículo DMSO	61

<b><u>Siglas</u></b>	<b><u>Significado</u></b>
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
CREB	<i>cAMP response element-binding</i> / Elemento de respuesta cAMP
DMSO	Dimetilsulfóxido
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i> / cinasa regulada por señales extracelulares
TrkB	<i>Tropomyosin receptor kinase B</i> / Receptor de tirosin quinasa B
GSK-3 $\beta$	<i>Glycogen synthase kinase 3 beta</i> / cinasa glucógeno sintasa 3 beta
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i> / proteínas cinasas activadas por mitógenos
DNA	Ácido desoxiribonucleico
NMDA	Ácido N-metil-D-aspartico

## Resumen

El envejecimiento trae consigo un decaimiento en los sistemas neuromoduladores relacionados con la función de la memoria y el aprendizaje. Sin embargo, se ha demostrado que el consumo de polifenoles puede disminuir el riesgo a padecimientos neurodegenerativos y mejorar el rendimiento cognitivo en ancianos. Se han descrito diversas vías de señalización activadas por flavonoides relacionadas con la memoria y el aprendizaje, entre las que se incluye la activación de los receptores de Tropomiosina relacionados a cinasas y sus receptores TrK. Nuestras investigaciones muestran que la morina, un flavonoide presente en plantas de la familia *Moraceae* mejora la adquisición del aprendizaje, la memoria y promueve neurogénesis al ser aplicada en diferentes dosis.

En este proyecto se evaluó el efecto de la morina sobre el desempeño de ratones envejecidos de la cepa C57BL/6 sometidos a pruebas cognitivas de memoria y su posible relación a cambios moleculares cerebrales producidos por la morina.

Se administró la morina vía intraperitoneal (i.p.) en dosis de 1 mg/kg durante diez días a ratones de 14 y 46 semanas de edad, estandarizando un nuevo vehículo para su administración. Al finalizar el tratamiento se realizaron pruebas de memoria, e inmunodetección por western blot para la identificación de proteínas relacionadas con la vía de señalización desencadenada por la activación de los receptores TrKB y se conservaron cerebros para posteriores análisis.

Se analizó la proteína pGSK3 $\beta$  (glycogen synthase kinase 3), y las cinasas activadas por mitógenos (MAPK) p38, p-p38 y ERK 1/2 en animales jóvenes de 14 semanas, sin pruebas conductuales previas como experimentación preliminar. Nuestros resultados muestran que la morina tiende a modificar los niveles de pGSK3 $\beta$ , p38 y p-p38; además, promueve el aumento de ERK 1/2; esto sugiere que el efecto de la morina se relaciona con estas proteínas. Se realizaron, además, en ratones de 46 semanas de edad de la misma cepa C57BL/6, pruebas de reconocimiento de objetos con contexto, encontrándose que el índice de reconocimiento se mejoró con la administración de morina en dosis de 1 mg/kg, lo que sugiere que la morina tiene un efecto en la mejora

de la memoria contextual en ratones envejecidos. Finalmente se evaluó BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) en estos ratones, sin obtenerse diferencias significativas.

## **Summary**

Aging brings with it a decline in neuromodulatory systems related to loss of memory and learning. However, it has been shown that the consumption of polyphenols can decrease the risk of neurodegenerative diseases and improve cognitive performance in the elderly. Various flavonoid-activated signaling pathways related to memory and learning have been described, including activation of Tropomyosin receptors related to kinases and their receptors (TrK).

Our research shows that morin, a flavonoid present in plants of the Moraceae family, improves the acquisition of learning, memory and promotes neurogenesis applied in different doses. In this project, the effect of morin on the performance of aged C57BL / 6 strain subjected to cognitive memory tests and its relationship to molecular brain changes produced by morine were evaluated. Morine was administered intraperitoneally (i.p.) in doses of 1 mg / kg for ten days to mice of 14 and 46 weeks of age, standardizing a new vehicle for its administration. At the end of the treatment, memory tests and immunodetection by western blot were performed to identify proteins related to the signalling pathway triggered by the activation of TrK receptors, and their brains were preserved for subsequent analysis.

pGSK3 $\beta$  (glycogen synthase kinase 3) protein, and mitogen-activated kinases (MAPK) p38, p-p38, and ERK 1/2 were analyzed in young animals of 14 weeks without previous behavioral tests. Our results show that morin could modify the levels pGSK3 $\beta$ , in addition, it promotes the increase of ERK 1/2, these results suggest that the effect of morin is related to this proteins. Object recognition tests with context were also carried out on 46-week-old mice of the same strain C57BL / 6, finding that the recognition index was improved with the administration of morin in a dose of 1 mg / kg, which suggests that morin has an effect on improving contextual memory in aged mice, finally we evaluated BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) in these mice.

## **MARCO TEÓRICO**

En la actualidad, una de cada diez personas es mayor de sesenta años. El envejecimiento trae consigo una disminución de las funciones biológicas y de la capacidad para adaptarse al estrés metabólico; esto hace a las personas seniles propensas a diferentes padecimientos, entre los que se encuentra el deterioro cognitivo (Alvarado y Salazar, 2014). Estudiar el proceso de envejecimiento, así como posibles tratamientos que contrarresten sus efectos es un punto clave para mejorar la calidad de vida de la población, dada la expectativa ampliada de vida, así como para garantizar un envejecimiento exitoso.

### **Aprendizaje y memoria**

Un proceso cognitivo puede ser definido como un fenómeno mental o conductual correspondiente a un evento identificable de manera introspectiva, implica siempre alguna operación cognitiva o neuronal, o bien, se refiere a procesos mentales relacionados con obtener y utilizar información para guiar el comportamiento (Cowell *et al.* 2019; Bakoyiannis *et al.* 2019). La memoria y el aprendizaje son dos de los procesos cognitivos más estudiados. Los procesos cognitivos involucran a la capacidad de percibir información, codificarla, almacenarla y posteriormente trabajar con ella (Lu *et al.* 2008).

Las capacidades cognitivas de orden superior dependen necesariamente de interacciones complejas a través de sistemas cerebrales a gran escala que dependen de la actividad regional, conexiones funcionales y vínculos estructurales (Murphy *et al.* 2020); entre estos se encuentran procesos como el aprendizaje y la memoria. El aprendizaje consiste en la modificación de las conexiones sinápticas existentes en el cerebro a través de experiencias que potencian la plasticidad, y la memoria es la consolidación de estos cambios en las redes sinápticas (Gallistel & Matzel, 2013). La memoria es un proceso que permite codificar, almacenar y luego recuperar la información (Suárez, 2015). Este proceso cognitivo, no reside en una sola estructura cerebral, es un proceso que involucra diversas estructuras y su interacción, además, se puede dividir en distintos tipos, para cada cual hay estructuras cerebrales especializadas.

Así, el hipocampo es fundamental para procesar y recordar información tanto espacial como contextual, es decir, en la memoria declarativa, mientras que la amígdala se requiere para memorias emocionales (Olivares *et al.* 2015; Adams y Sweatt, 2002). La capacidad de formar recuerdos declarativos a largo plazo depende de los lóbulos temporales mediales (Cowell *et al.* 2019). Por otro lado, la corteza prefrontal está implicada en el procesamiento de la memoria de trabajo, especialmente el espacial (Funahashi y Kubota, 1994), además, las propiedades de disparo de las neuronas prefrontales las predisponen a integrar información durante intervalos de tiempo más largos que las regiones corticales sensoriomotoras (Wallis, 2018). La memoria de trabajo depende de varios sistemas, la corteza frontoparietal está involucrada en el control cognitivo, es vital para dirigir la atención a estímulos externos (Murphy *et al.*

2020). Además, la corteza perirrinal, está involucrada en el reconocimiento de objetos novedosos o la re-ocurrencia de estímulos (Brown y Aggleton, 2001). Según evidencia electroencefalográfica, las redes de memoria cortical están distribuidos en la corteza posterior, que es sensorial o perceptual, y la corteza frontal que es la ejecutiva; sin embargo, experimentos de imagen, muestran que la memoria de trabajo activa simultáneamente la corteza prefrontal y al menos una región de la corteza posterior (Fuster, 2009).

Se considera que la plasticidad sináptica es el principal mecanismo celular involucrado en el aprendizaje y la memoria. La potenciación a largo plazo es la forma más estudiada de plasticidad sináptica y se refiere al aumento en la fuerza sináptica (Bakoyiannis *et al.* 2019), esta requiere muchos componentes moleculares iguales a los que requiere la memoria (Lu *et al.* 2008; Adams y Sweatt, 2002); las principales vías de señalización involucradas en la producción de potenciación a largo plazo y así en la plasticidad sináptica son la vía ERK y la vía PI3K (Bakoyiannis *et al.* 2019). Se ha propuesto también, que existe un repertorio de modificaciones reversibles del DNA, que podrían contribuir a los procesos de aprendizaje y memoria (Marshall & Bredy, 2016). Además del DNA, se han identificado clases de RNA no codificante que están involucrados en varias formas de memoria y aprendizaje relacionados con el miedo (Marshall & Bredy, 2016). Los genes de las subunidades del receptor NMDA contribuyen al aprendizaje y la flexibilidad del comportamiento, ambos en modelos de roedores (Burmeister & Liu, 2020).

Además de la potenciación a largo plazo, la formación de la memoria también consta de dos componentes, primero la síntesis de proteínas y la mejora de la eficacia sináptica a

partir de la transcripción de genes y síntesis de otras proteínas para la consolidación (Marshall y Bredy, 2016).

El deterioro cognitivo significa la pérdida de habilidades cognitivas, principalmente la memoria en sus diferentes tipos. Estos déficits están acompañados por la disfunción de diversas áreas cerebrales del sistema límbico, como la corteza cerebral, el hipocampo y la amígdala, que tienen un papel muy importante en procesos como la memoria (Bakoyiannis *et al.* 2019).

### **Envejecimiento**

La esperanza de vida ha aumentado de manera significativa, en los últimos doscientos años (dos y medio años por década aproximadamente), debido a los cambios ambientales, a la disponibilidad de alimento, de agua y de higiene, así como las condiciones de vida, la reducción del impacto de enfermedades con medicamentos y cuidados médicos en todas las edades (Flatt y Partridge, 2018). Sin embargo, este aumento en la esperanza de vida trae consigo un incremento en el número de personas envejecidas. El envejecimiento puede definirse de forma simple, como la pérdida continua de la integridad fisiológica y el deterioro de las funciones que conducen a la muerte (Kanasi *et al.* 2016).

El envejecimiento es la pérdida progresiva de tejidos y funciones biológicas a través del tiempo, además de ser, debido al deterioro en diversos sistemas, el principal factor de riesgo de enfermedades cardiovasculares, metabólicas y desórdenes neurodegenerativos (Liguori *et al.* 2018; McHugh y Gil, 2018). Los cambios que ocurren

durante el envejecimiento en las funciones biológicas incluyen la falla en la homeostasis intracelular de calcio, disminución en la sensibilidad de sistemas como el adrenérgico, el dopaminérgico y el colinérgico, así como decremento en las funciones motoras y cognitivas y en la habilidad de mitigar los efectos a largo plazo del estrés oxidativo (Joseph *et al.* 1999).

Los sellos distintivos del envejecimiento se pueden dividir en tres categorías: el número uno son las causas primarias o del daño asociado a la edad, el segundo sello son los antagonistas o respuestas al daño, y finalmente, el tercer sello distintivo del envejecimiento, las integrativas o consecuencias de las respuestas y culpables del fenotipo de envejecimiento (McHugh y Gil, 2018). Como ejemplo de las causas primarias o daño asociado a la edad tenemos el agotamiento de células troncales, cambios en la expresión de genes, entre otros. Esto provoca respuestas como la disminución de la funcionabilidad celular, la proliferación y renovación, y todas estas respuestas en conjunto, llevan al deterioro de tejidos, comunicación celular y de otros procesos, característicos del envejecimiento. Con mayor detalle, a las antagonistas o respuestas al daño, pertenece la senescencia, que es una respuesta que limita la proliferación de células dañadas o envejecidas, y es precedida por marcas primarias como inestabilidad genómica y desgaste de telómeros. Otra marca primaria es una disminución en la mitofagia, o degradación y reciclaje de mitocondrias, que da como resultado o marca secundaria una red mitocondrial defectuosa y trae como consecuencia la disfunción metabólica, que es parte de los terceros sellos, los culpables del fenotipo de envejecimiento (McHugh y Gil, 2018).

El envejecimiento se manifiesta desde lo molecular y celular, en este nivel las principales características del envejecimiento son disfunción mitocondrial, metabolismo energético desregulado, acumulación intracelular de proteínas, ácidos nucleicos y lípidos dañados, desregulación en la actividad de las redes neuronales y en el manejo del  $\text{Ca}^{2+}$  neuronal, alteración en la funcionalidad de lisosomas y proteasoma, mala señalización de la respuesta adaptativa al estrés, inflamación y agotamiento de las células troncales, así como acortamiento de telómeros, metilación del DNA e integridad del citoesqueleto comprometida (Mattson y Arumugam, 2018; DiLoreto y Murphy, 2015; Xia *et al.* 2017). Además, es importante mencionar que las células y en general el organismo depende de la comunicación entre diversas células y sistemas, lo que resulta en una interacción que en conjunto controla el envejecimiento (DiLoreto y Murphy, 2015). Algunos procesos que contribuyen a enfermedades asociadas con el envejecimiento incluyen daño al DNA, genotoxicidad, estrés oxidativo, acortamiento de telómeros y alteraciones en genes y expresión de RNA no codificante (Wagner *et al.* 2016).

Los procesos mentales también cambian a través de las diferentes etapas de la vida del ser humano, entre los 20 y 30 años de edad hay un pico en la memoria de trabajo y ejecutiva, sin embargo, a partir de este pico, la memoria y otros procesos cognitivos van en declive conforme se incrementa la edad del individuo (Barrera-reyes *et al.* 2020; Suárez, 2015). Los déficits cognitivos relacionados con la edad son más pronunciados en ciertos dominios como la memoria episódica, la memoria de trabajo, funciones ejecutivas y razonamiento conceptual (Singh *et al.* 2021). Además, hay cambios en la morfología dendrítica en algunas regiones, así como afectaciones en la conectividad

celular, desregulación de calcio, de expresión génica u otros factores que afectan a la plasticidad, y finalmente alteran la dinámica de redes neuronales que dan soporte a la cognición, se ven afectadas sobre todo la corteza prefrontal y el hipocampo (Burke y Barnes, 2006).

Hay diversos cambios en el cerebro envejecido, que incluyen la reducción de materia gris y blanca, reducción de mielina, pérdida axonal y dendrítica, incremento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, y la disminución del número y tamaño de las espinas dendríticas, así como cambios en los neurotransmisores, enzimas y metabolitos (Singh *et al.* 2021); esto en conjunto lleva a la pérdida de habilidades cognitivas y ocasiona una mayor propensión a padecer enfermedades neurológicas.

Una causa de enfermedades con más prevalencia durante el envejecimiento como la enfermedad de Alzheimer y de Huntington es la neurodegeneración, que es a su vez, causada por el estrés oxidativo, agregados de proteínas, neuroinflamación, disfunción mitocondrial, inducción de muerte celular y alteración de la autofagia (Spagnuolo *et al.* 2017). Además, durante el envejecimiento hay una disminución en la densidad y la ramificación de las espinas dendríticas, así como una disminución en el número de neuronas de ciertas regiones, sobre todo corticales y en el hipocampo, además de una reducción en actividad sináptica (Burke y Barnes, 2006).

Por lo tanto, el envejecimiento se asocia con la pérdida progresiva de habilidades motoras y cognitivas como la memoria y el aprendizaje relacionada con un decaimiento de sistemas neuromoduladores cerebrales, alteraciones en la conectividad hipocampal y la plasticidad sináptica (Mahncke *et al.* 2006; Lau *et al.* 2005; Pitozzi *et al.* 2012). El

decaimiento cognitivo que afecta a las poblaciones envejecidas reduce su calidad de vida. Hay diversas condiciones relacionadas con la edad que incrementan la vulnerabilidad a enfermedades neurodegenerativas como la Enfermedad de Alzheimer (Krikorian et al. 2010); una reserva de células progenitoras inactivas, así como una menor vascularización del nicho neurogénico, y una menor neuroplasticidad, pueden explicar algunos cambios cognitivo-emocionales relacionados con la edad (Boldrini et al. 2018).

La neuropatología del envejecimiento relacionada con enfermedades neurodegenerativas se caracteriza por desregulación redox, mal plegamiento de proteínas y su agregación debido al mal funcionamiento del sistema ubiquitina-proteasoma y autofagia, eliminación de antioxidantes endógenos, reducción de la expresión de factores tróficos, inflamación y excitotoxicidad (Mandel et al. 2015). El ejercicio físico mejora el flujo sanguíneo cerebral, así como la cognición en modelos murinos y en humanos, pero este efecto se reduce en personas envejecidas (Boldrini et al. 2018).

La prevención de la morbilidad en el envejecimiento en humanos debería idealmente involucrar intervenciones que comiencen en la mediana edad, a pesar de que en esta etapa de vida no hay señales tan pronunciadas de deterioro cognitivo. El propiciar un envejecimiento exitoso puede proteger a los individuos de la pérdida de funciones cognitivas y motoras (Flatt y Partridge, 2018), asegurando que tengan una mejor calidad de vida al llegar a edades avanzadas.

## Flavonoides

Existen estudios que indican que el consumo de polifenoles, presentes en frutas y verduras se encuentra asociado con un menor riesgo de trastornos neurodegenerativos y un mejor rendimiento cognitivo en ancianos (Letenneur *et al.* 2007). Los polifenoles se caracterizan por estar compuestos de varios grupos hidroxilo en anillos aromáticos, que en total son tres, dos anillos benceno unidos a uno pireno (Vauzour, 2008). Estas sustancias son producto del metabolismo secundario de plantas (Manach *et al.* 2004), en estos organismos se encargan de la protección contra agentes externos, estos metabolitos secundarios se pueden acumular en órganos específicos como hojas, frutos, raíces y tallo (Karak, 2019). Además, se encuentran en la dieta humana, principalmente los ácidos fenólicos y flavonoides (Ávalos y Pérez, 2009).

Los polifenoles actúan eliminando o inhibiendo especies químicas reactivas, protegiendo y regenerando otros antioxidantes, promueven la quelación de metales prooxidantes, entre otros (Pereira *et al.* 2014). De manera farmacológica, presentan diversas propiedades de neuroprotección y participación en el mejoramiento cognitivo, así como manteniendo la homeostasis intracelular (Gottlieb *et al.*, 2006; Dias *et al.* 2012; Casamenti y Stefani, 2017). Al ser antioxidantes, el efecto neuroprotector de los polifenoles se ejerce ante estímulos pro-oxidantes o relacionados con la edad (Shahidi y Naczk, 1995).

Existe una familia de polifenoles denominados flavonoides, que está compuesta por más de cuatro mil integrantes (Fang *et al.* 2007). Son los compuestos bioactivos de este grupo de sustancias con el menor peso molecular (Karak, 2019), en su mayoría

formados por quince carbonos, con dos anillos aromáticos (Vauzour, 2012). Su estructura química básica consta de un esqueleto de difenil-propano, con quince átomos de carbono en su núcleo primario, tienen dos anillos de benceno que están unidos entre sí por un tercer anillo de pireno heterocíclico que contiene oxígeno (Karak, 2019) (figura 1).

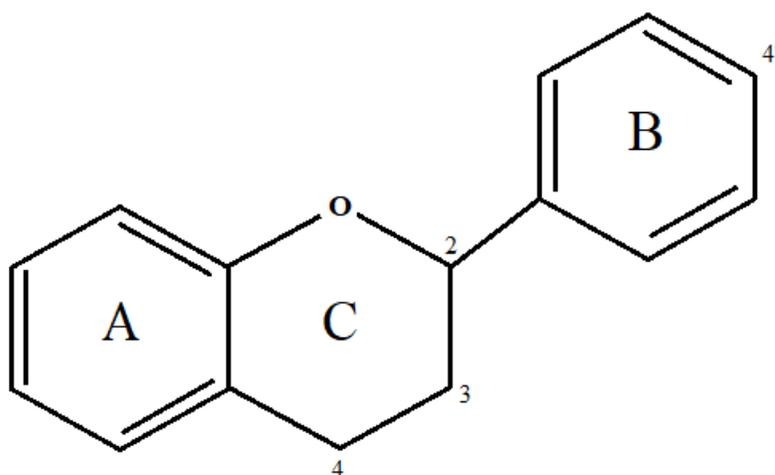


Figura 1. Estructura química básica de los flavonoides. Con información de Spencer *et al.* 2009 y Karar *et al.* 2019.

Los flavonoides poseen diversas actividades biológicas en organismos animales, tales como su capacidad antioxidante, antiinflamatoria, antiviral, anticancerígena, antidiabética y anti-citotóxica (Karak, 2019). Tienen la capacidad de modular el flujo sanguíneo cerebral e inhibir el avance de procesos neuropatológicos en diferentes regiones del cerebro (Ayaz *et al.* 2019). Así mismo, pueden controlar la supervivencia neuronal, diferenciación, promoción de la memoria, aprendizaje y otras funciones cognitivas (Spencer *et al.* 2009; Vauzour *et al.* 2008). Tienen la capacidad de modular a la memoria en distintos aspectos, desde la adquisición de la memoria, la de trabajo a

corto plazo, o la memoria de referencia de largo plazo, así como su retención y recuperación (Spencer, 2010).

Se ha postulado que los efectos de los flavonoides en el cerebro se deben a su habilidad de proteger neuronas vulnerables, mejorar la funcionalidad de las neuronas, estimular el flujo sanguíneo cerebral e inducir neurogénesis (Spencer, 2010). Además, interactúan con diferentes receptores, cinasas y factores de transcripción, participando en vías de señalización que incluyen PI3K/Akt, PLC- $\gamma$  (Park y Lee, 2011) y MAPK, mediante las cuales, tienen efectos sobre la potenciación a largo plazo, modificando así la memoria y aprendizaje (Jang *et al.* 2010).

### **Vías de señalización involucradas en cognición activadas por flavonoides**

Los flavonoides pueden ejercer sus efectos a través de la actividad mitocondrial, modulando la expresión de genes específicos o modulando cascadas de señalización que controlan la apoptosis y la supervivencia neuronal (Flanagan *et al.* 2018; Rendeiro *et al.* 2013). Regulan la expresión de proteínas relacionadas con la reparación neuronal y la plasticidad sináptica; interactúan con diversas vías de señalización, tanto gliales como neuronales que están involucradas en funciones neuronales y en la supervivencia de estas células, así como en la comunicación cerebral (Ayaz *et al.* 2019). Además, participan en la regulación de la expresión de genes, comunicación celular, y señalización hormonal (Singh *et al.* 2021).

Los flavonoides interactúan con diferentes cascadas de señalización a través de diversas formas, son capaces de unirse a sitios de unión a ATP en enzimas y

receptores, pueden modular directamente la actividad de las cinasas, afectar la función de fosfatasas y modular la activación de factores de transcripción y su unión a las secuencias promotoras (Spencer, 2010). Las cascadas de señalización relacionadas con el estrés oxidativo como Keap1/Nrf-2/ARE son activadas por flavonoides. Por otro lado, el efecto neuroprotector de estas sustancias se lleva a cabo por la activación de cascadas de señalización como PI3K/Akt, PKC-ERK1/2, Akt-ERK1/2 y MAPK (Carrillo *et al.* 2019; Di Meo *et al.* 2020; Bakhtiari *et al.* 2017; Crozier *et al.* 2009) (figura 3). El resveratrol, por ejemplo, ejerce su propiedad neuroprotectora a través de la vía PI3K/Akt (Bhullar y Rupasinghe, 2013).

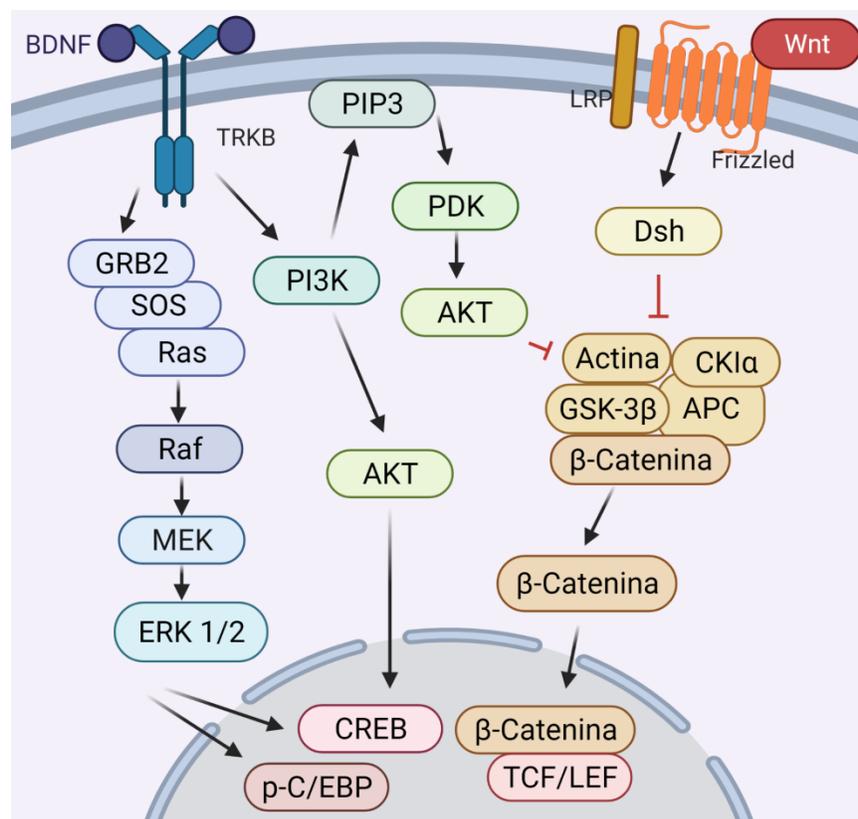


Figura 2. Principales vías de señalización involucradas en los efectos de los flavonoides sobre cognición

Algunos flavonoides activan también la vía de señalización de Wnt, en ésta, el ligando Wnt interactúa con receptores Frizzled y de lipoproteínas de baja densidad, así, se bloquea la Gsk-3 $\beta$  y se acumula  $\beta$ -catenina en el citoplasma antes de pasar al núcleo en donde se transcriben genes relacionados con diferenciación neuronal (Inestrosa y Arenas, 2010, figura 3). También pueden activar vías relacionadas con los receptores TRK asociados a factores de crecimiento que desencadena cascadas de señalización para finalmente fosforilar a C/EBPs o CREB y activar la transcripción de genes de diferenciación neuronal, esto se ha visto con flavonoides como la 7,8-dihidroxiavone (Ménard *et al.* 2002).

Los flavonoides tienen también la capacidad de estimular factores neurotróficos como BDNF que están involucrados en el aprendizaje y la memoria, GDNF que regula la supervivencia neuronal y la plasticidad sináptica y NGF que es necesario para la supervivencia neuronal; además, pueden interactuar con diversos receptores a estrógenos, testosterona, GABA, adenosina, opioides, nicotínicos y TrkB (Kennedy, 2014; Ayaz *et al.* 2019). Así mismo, son potentes inhibidores de diversas enzimas como la xantina oxidasa, ciclo-oxigenasa, lipogenasa, aldosa reductasa, fosfodiesterasa y fosfoinositida-3-cinasa previniendo así enfermedades neurodegenerativas (Panche *et al.* 2016). Algunos flavonoides como las isoflavonas mejoran el aprendizaje al imitar la actividad de los estrógenos en el cerebro (Ayaz *et al.* 2019). Otros tienen actividad anti-colinesterasa, lo que aumenta los niveles de acetilcolina, o actividad similar a la insulina, (Panche *et al.* 2016). En conjunto, su capacidad de interactuar con diversos factores moleculares, les hace posible afectar diversos procesos, entre los que se encuentran procesos cognitivos como la memoria.

Se ha propuesto también que los flavonoides reducen la neuroinflamación actuando a través de la regulación de células de la microglía, y que algunos de sus efectos podrían deberse a la regulación de otras células gliales (Spagnuolo *et al.* 2017). Los flavonoides interactúan con astrocitos y microglía, y regulan así la inflamación y el sistema inmunológico cerebral, esto porque inhiben la actividad de macrófagos, células gliales y osteoblastos, que se ha demostrado, son reguladores del sistema inmunológico cerebral (Rossnagl *et al.* 2016), provocando una menor expresión de factores proinflamatorios como IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF (González *et al.* 2011). Además, protegen a las células gliales mediante la reducción del estrés oxidativo, o atenuando la excitotoxicidad inducida por glutamato y la neuroinflamación (Vidak *et al.* 2015).

Además, estas sustancias tienen otros efectos sobre el sistema nervioso central. Ppor ejemplo, participan en el incremento del flujo sanguíneo cerebral, en la neurogénesis del hipocampo y en la regulación de la expresión alterada de genes relacionados con el desarrollo neuronal, la neurotransmisión y las funciones sinápticas en la corteza y el hipocampo e inducen el crecimiento dendrítico (Vauzour *et al.* 2008; Spencer, 2010; Rendeiro *et al.* 2013). Los compuestos como los flavonoides son candidatos potenciales como agentes bioactivos en el sector farmacéutico para prevenir e incluso curar diversas enfermedades.

## **Morina**

La morina (3,5,7,2', 4'-pentahidroxiflavona, figura 2) es un compuesto polifenólico cristalino que se encuentra en las ramas de *Morus alba* L (morera blanca), pero también

puede estar presente en varias frutas y verduras como los higos y la guayaba, en bebidas como el té y el vino tinto, así como en almendras y algunas hierbas chinas (Caselli *et al.* 2016). La morina es un flavonoide liposoluble (Taguchi *et al.* 2015). Diferentes evidencias indican que la morina tiene propiedades antiinflamatorias, antiapoptóticas, antiautofágicas, cardioprotectoras, antioxidantes y de protección para células cerebrales, así como antiproliferativas en modelos de cáncer y prevención de astrogliosis (Kim y Park, 2019; Zhang *et al.* 2008; Lee *et al.* 2016). Una de las propiedades principales de la morina es su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica debido a que es una molécula no-polar (Campos-Esparza *et al.* 2009).

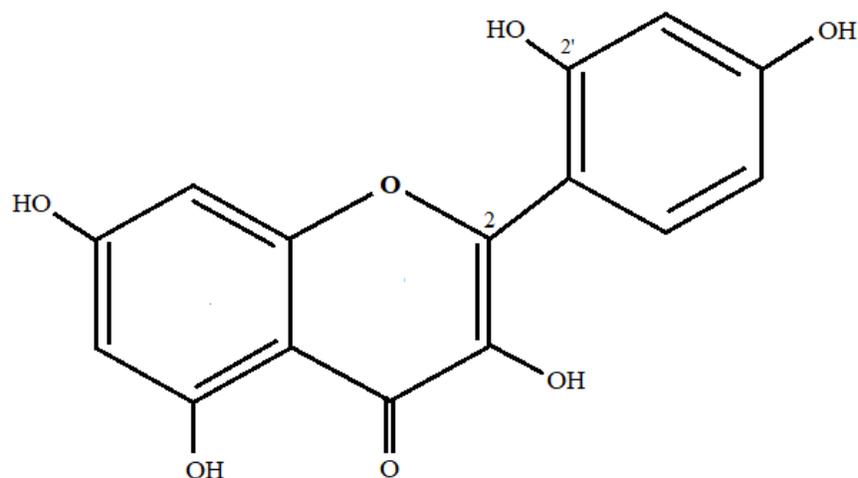


Figura 3. Estructura química de la morina (2', 3, 4', 5, 7-pentahidroxiflavona). Con información de Caselli *et al.* 2016.

La morina tiene un efecto benéfico sobre el endotelio vascular mediante la activación de la vía de señalización de la proteína cinasa B y de la sintetasa del óxido nítrico endotelial Akt/eNOS (Taguchi *et al.* 2015). Además, la morina inhibe la actividad de la

glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3) y la acetilcolinesterasa, evitando la pérdida de la acetilcolina; también, reduce los déficits neurológicos y mejora las discapacidades cognitivas, causadas por el daño isquémico transversal del cerebro anterior en modelos de roedores (Gottlieb *et al.* 2006). Existe evidencia de que la morina posee efectos protectores en enfermedades neurodegenerativas como la isquemia, esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer (Frandsen *et al.* 2020).

La morina, inhibe la vía de procesamiento de la proteína precursora de amiloide (APP, por sus siglas en inglés) amiloidogénica y así facilita la degradación de la  $\beta$  amiloide ( $\beta$ A), protegiendo así contra la muerte neuronal excitotóxica (Caselli *et al.* 2016), además, inhibe a la enzima que fosforila a tau, la GSK3 $\beta$ , evitando de esta forma la hiperfosforilación de la proteína tau (Yu *et al.* 2018). Recientemente se describió que la morina tiene una actividad de tipo antipsicótico en ratones, posiblemente mediada por mecanismos relacionados con la mejora de la neurotransmisión del ácido gamma amino butírico (GABAérgica) y de factores neurotróficos, así como la supresión del daño oxidativo inducido por la enzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH-oxidasa) (Ben-Azu *et al.* 2018).

Los estudios de la morina sugieren sus efectos potenciales sobre factores relacionados con la plasticidad neural y la reserva cognitiva, retrasando el desarrollo de enfermedades neurológicas. Además, los estudios sistemáticos de flavonoides incluyendo la morina, apuntan que ésta pudiera tener un efecto importante en retrasar el desarrollo del envejecimiento, sin embargo, en animales sanos los estudios son limitados. Por lo tanto, conocer con detalle el efecto benéfico que la morina puede producir sobre la memoria y cuáles son los mecanismos moleculares implicados,

ayudará a conocer cómo es que funcionan los componentes profilácticos de la dieta en la capacidad cognitiva para alcanzar un envejecimiento exitoso. Esto permitiría de manera eventual retrasar y/o prevenir las enfermedades neurológicas y neurodegenerativas asociadas con el avance de la edad.

## **ANTECEDENTES**

Los procesos cognitivos como la memoria y el aprendizaje se ven afectados por factores externos e internos. Diversas evidencias epidemiológicas y clínicas sugieren que el nivel educativo, un estilo de vida activo físico y socialmente, así como la dieta, pueden mejorar las funciones cognitivas en personas sanas y protegen contra la pérdida de la memoria. Diferentes investigaciones han establecido que el aprendizaje y la memoria, así como el estado de ánimo pueden estar influenciados por la alimentación durante el desarrollo, en la edad adulta y el envejecimiento (Stangl y Thuret, 2009). Los flavonoides, son factores externos capaces de afectar estos procesos cognitivos, debido a sus diversas actividades farmacológicas.

Sin embargo, existen aún muchas incógnitas por aclarar en el estudio de los mecanismos moleculares implicados en el efecto neuroprotector y en la investigación de los mecanismos activados por una dieta específica capaz de inducir una mejora en los procesos cognitivos. Esto es relevante tanto en personas mayores, como en el retraso o la recuperación de enfermedades neurodegenerativas como lo son la Enfermedad de Parkinson y la Enfermedad de Alzheimer (Stangl y Thuret, 2009;

Campos-Esparza y Torres-Ramos, 2010; Winner *et al.* 2011). Es importante también estudiar los mecanismos moleculares que están involucrados con otras vías de administración de sustancias como los flavonoides, y su introducción en la dieta.

### **Flavonoides y su efecto sobre la cognición**

Las plantas utilizan a los flavonoides como parte de las estrategias de interacción con el medio ambiente y con otros organismos; aunque su popularidad e importancia se deben a los múltiples beneficios para la salud que su consumo ofrece al ser humano. Debido a su naturaleza se pueden encontrar fácilmente en nuestra dieta.

Se ha observado que flavonoides presentes en moras son capaces de mejorar los déficits motores y de memoria espacial ocasionados por la edad (Vauzour *et al.* 2008). Los flavonoides del té verde como la catequina y la epicatequina mejoran la memoria espacial de las ratas viejas al aumentar la actividad del factor de transcripción CREB a través de la señalización de BDNF que lo activa (Assunção *et al.* 2010; Williams y Spencer, 2012).

El resveratrol se encuentra en uvas, moras y cacahuates, este flavonoide tiene efectos en la protección contra la neurodegeneración hipocampal, déficits de aprendizaje y cognitivos en modelos de roedores, además, mejora la adquisición de la memoria espacial y no espacial (Marx *et al.* 2018). Se ha demostrado que en dosis de 20 mg/L administradas durante tres semanas mejora la función cognitiva en ratones (Harada *et al.* 2011).

La quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavona) es un flavonoide que se encuentra en manzanas, cerezas, cebolla, entre otros (Babaei *et al.* 2018); bloquea la producción de especies reactivas de oxígeno y previene la peroxidación lipídica, además de reducir las tautopatías, la sobreproducción de  $\beta$ A y astrogliosis características de la enfermedad de Alzheimer (Bakhtiari *et al.* 2017); tiene la capacidad de restaurar la memoria a corto plazo en modelos con amnesia, así como el desempeño en la prueba de laberinto de Morris y de laberinto elevado (Dhivya *et al.* 2016).

La 7,8-dihidroxi-flavona se une e induce la dimerización y autofosforilación del receptor TrkB (Stagini *et al.* 2017); tiene la capacidad de restaurar el deterioro de la memoria explícita a través de la inhibición del estrés nitroxidativo, induce la activación de la vía TrkB/BDNF que contribuye al aumento en la densidad de espinas dendríticas, así como mediante el aumento en la actividad de la acetilcolina (Narayan *et al.* 2020)

La oroxylina-A también mejora las funciones cognitivas y disminuye el deterioro en la memoria inducido por  $\beta$ amiloides en ratones. Además, este polifenol induce la fosforilación de CREB por un aumento de la expresión de BDNF en el hipocampo (Lee *et al.* 2010). Es importante notar que la activación de CREB es inducida por muchos polifenoles, y este factor de transcripción es crítico en la inducción de cambios de larga duración en la plasticidad sináptica y la memoria y juega un papel muy importante en la potenciación a largo plazo y la formación de la memoria (Vauzour, 2012; Mandel *et al.* 2015)

Se ha reportado que flavonoides como la 7,8-dihidroxi-flavona pueden unirse y activar directamente los receptores TrkB, estos también son activados por factores

neurotróficos que promueven diferenciación, supervivencia y mantenimiento de células nerviosas, pero estos no atraviesan la barrera hematoencefálica, a diferencia de moléculas pequeñas como la 7,8-dihidroxi-flavona y la 3,7,3',4'-tetrahidroxi-flavona que sí lo hacen (Maher *et al.* 2006); al activar los receptores TrkB se desencadenan cascadas de señalización para mediar la supervivencia neuronal, plasticidad sináptica, diferenciación y neurogénesis (Jang *et al.* 2010), mecanismos moleculares que pudieran estar relacionadas con la memoria espacial y aprendizaje (Park y Lee, 2011).

Los efectos de los polifenoles podrían no solo afectar a la memoria y el aprendizaje, sino que podrían propiciar cambios positivos en la actividad psicomotora de animales viejos (Del Río *et al.* 2013).

Las fresas y moras, que contienen diversos polifenoles, también mejoran la cognición y la neurogénesis hipocampal en ratones (Shukitt-Hale *et al.* 2015). Se ha observado que la mejora en memoria espacial ocurre en tres semanas en modelos de roedores, lo que equivale a aproximadamente tres años en humanos (Vauzour, 2012). Debido a estas características, el estudio de la morina, que es un flavonoide con la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica, es sumamente importante para elucidar su efecto sobre procesos cognitivos como la memoria.

### **Efecto de la morina en la cognición de modelos murinos**

Nuestro grupo de trabajo ha reportado que ratones jóvenes de la cepa C57BL/6 sanos de tres meses de edad, sin estímulo previo y tratados con morina en dosis de 2.5 mg/kg durante diez días, tienen una mejor adquisición del aprendizaje (Rivera *et al.* 2014) y

mejoran la memoria de reconocimiento de objetos con y sin contexto cuando los ratones fueron tratados con dosis de 1 y 2.5 mg/kg, sin embargo, con la dosis de 5 mg/kg el índice de reconocimiento parece disminuir (figura 4). Se ha observado que la morina no tiene efecto sobre el BDNF en ratones jóvenes, solo parece restablecer los niveles de este factor después de que son disminuidos por el DMSO (Torres *et al.* 2018). Además, tenemos datos que muestran que también en animales jóvenes sanos, la morina en dosis de 0.5 mg/kg promueve un aumento de neuronas inmaduras en el giro dentado del hipocampo (Ignacio-Juárez, 2019). Estas nuevas neuronas y los resultados que muestran un aumento en la densidad de espinas dendríticas (Rivera *et al.* 2014) podrían significar un aumento en la plasticidad neuronal responsable de la mejora de los niveles cognitivos observados.

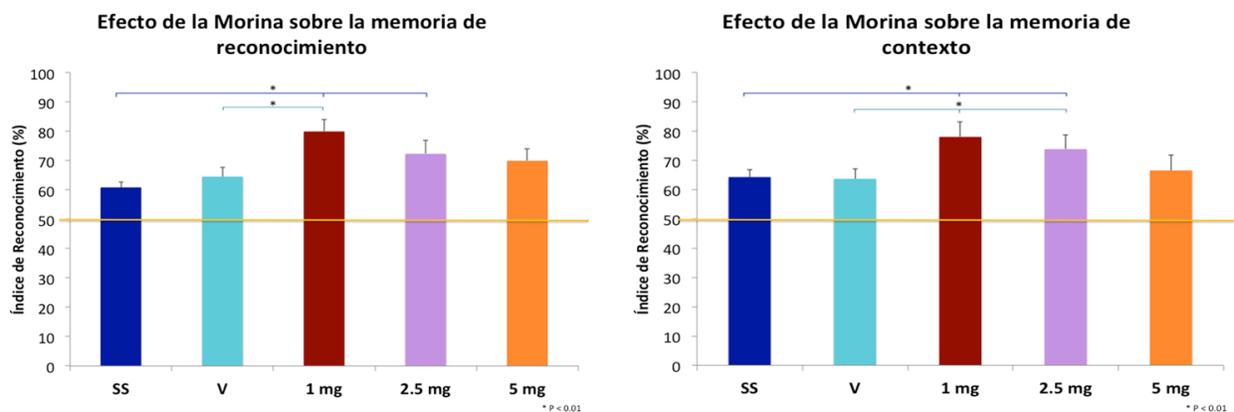


Figura 4. La morina en dosis de 1 y 2.5 mg/kg mejora la memoria de reconocimiento de objetos con y sin contexto en ratones de la cepa C57BL/6 jóvenes sanos. Torres *et al.* 2018.

La morina previene el daño celular producido por el peróxido de hidrógeno, además de inhibir la peroxidación lipídica membranal a través del incremento de la actividad de la catalasa e inhibe así, la producción de especies reactivas de oxígeno, que están relacionadas con el daño a redes neuronales involucradas con la memoria y el

aprendizaje (Zhang *et al.* 2009). En modelos *in vivo* e *in vitro* de isquemia cerebral, la morina reduce la generación de radicales libres y la pérdida neuronal en regiones hipocampales. Además, mejora el desempeño en pruebas de memoria dependientes de hipocampo post-isquemia (Gottlieb *et al.* 2006).

Dhingra y Soni (2016) observaron que la morina en dosis de 20 mg/kg, en ratones de la cepa Swiss albinos, reduce la latencia en el periodo de entrenamiento y aumenta el tiempo que los ratones exploran el cuadrante objetivo en la prueba de laberinto de Morris, lo que indicaría una mejora del aprendizaje y la memoria en ratones jóvenes (2-3 meses) y adultos (7-9 meses).

Además, la morina mejora la memoria, reduce los niveles de malondialdehído y de nitrito, y mejora los niveles de glutatión reducido en ratones con estrés crónico; así mismo, disminuye los niveles cerebrales de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , y disminuye la expresión de iNOS y NF- $\kappa$ B, finalmente, rescata las neuronas de la región CA3 hipocampal de estos ratones (Akinluyi *et al.* 2020), lo que indica que la mejora de la memoria producida por la morina se puede relacionar con su habilidad antioxidante y de supresión de la inflamación.

Ben-Azu y colaboradores (2018), mostraron que la morina promueve el aumento de los niveles del BDNF y corrige el comportamiento, disminuyendo el deterioro en un modelo de esquizofrenia en ratón. Este mismo grupo de trabajo menciona también, que el efecto antipsicótico de la morina podría llevar a cabo a través de la modulación de acciones oxidativas y colinérgicas, así como por la neuroprotección (Ben-Azu *et al.* 2018). Frandsen y colaboradores (2020) demostraron que derivados de la morina y la

morina misma mejora la vía neural de la glioxalasa y previene el estrés oxidativo mediado por metilglioxal en un modelo de la enfermedad de Alzheimer (Frandsen *et al.* 2020). Además, la morina reduce la muerte celular provocada por oligómeros de  $\beta$ Amiloide en cultivos neuronales y atenúa el estrés oxidativo, así mismo, previene la disfunción mitocondrial (Alberdi *et al.* 2018)

Debido a la especial sensibilidad del sistema nervioso central al proceso de envejecimiento y a las propiedades farmacológicas que presenta la morina, en este trabajo se pretende evaluar el efecto de este flavonoide sobre la memoria en ratones seniles, así como alguno de los posibles mecanismos moleculares involucrados.

## **Justificación**

Con el aumento de la población de edad avanzada, es primordial buscar alternativas de tratamientos que ayuden a garantizar un envejecimiento exitoso, evitando el factor de riesgo para padecer enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la pérdida de habilidades cognitivas, como la memoria y el aprendizaje, que son características del progreso de la edad que trae consigo la disminución de procesos fisiológicos importantes como la neuromodulación y plasticidad sináptica. Actualmente, existen pocas terapias o acciones efectivas para prevenir estos padecimientos neurodegenerativos, evitando que la creciente población en envejecimiento tenga una buena calidad de vida durante etapas seniles de su vida.

Estudiar el efecto de sustancias como la morina, que además de ser metabolitos secundarios de plantas y por lo tanto son de fácil acceso, tienen alto y sustantivo potencial en el mejoramiento de la memoria y otras habilidades cognitivas, es importante incluso para establecer estrategias que permitan mejorar la calidad de vida de las personas afectadas por enfermedades neurológicas.

Se espera que al confrontar los resultados de este estudio se observe que la morina en dosis menores a 2.5 mg/kg mejore la memoria de organismos seniles y, además, poder dilucidar la participación de algunos factores moleculares en los efectos de la morina sobre los ratones. Esto pondría a la morina, un flavonoide presente en plantas de consumo regular, como una sustancia con potencial fármaco-profiláctico para un mejor envejecimiento e incluso para el tratamiento de enfermedades relacionadas con pérdida de habilidades cognitivas como la memoria.

## **Hipótesis**

La morina mejorará la memoria en ratones envejecidos asociado a la activación de los receptores TRKB en hipocampo y corteza.

## Objetivos

### Objetivos generales

- Evaluar el efecto de la morina sobre la memoria contextual en ratones envejecidos.
- Describir si la vía de señalización de TRKB se activa en respuesta a la exposición a la morina, analizando los factores moleculares: p-GSK3 $\beta$ , p-38, p-38 fosforilado, ERK 1/2 y BDNF.

### Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto de la morina sobre el desempeño de ratones envejecidos en pruebas de reconocimiento de objetos con contexto.
- Elucidar si la vía de señalización de los receptores TRKB está involucrada en el efecto de la morina.
- Describir la modificación de los factores moleculares: p-GSK3 $\beta$ , p-38, p-38 fosforilado, ERK 1/2 y BDNF con el tratamiento con morina en dosis de 1 mg/kg.

## **Diseño experimental**

Se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6 machos, separados en dos grupos, uno de 14 y otro de 46 semanas de edad.

Se administró morina en distintas dosis a los ratones jóvenes en la semana catorce de edad y a los adultos en la cuarenta y seis, con los datos preliminares con que contamos se realizó un protocolo de tamizaje para buscar el mejor tratamiento de acuerdo con los resultados de las pruebas conductuales y realizando pruebas moleculares.

Se administraron cinco tratamientos distintos durante diez días, de acuerdo a los protocolos en ratones jóvenes: control, vehículo y morina en dosis de 0.5, 1 y 2.5 mg/kg. Los tratamientos fueron administrados vía intraperitoneal a los ratones jóvenes en la semana catorce de edad. Finalmente, los animales se sacrificaron y se realizó la criopreservación de sus cerebros para las pruebas moleculares, que fueron Western blots para la identificación de distintas proteínas involucradas en vías de señalización activadas por flavonoides (figura 5A).

Con los datos preliminares obtenidos determinamos seguir con el estudio para la comparación de animales jóvenes y viejos con el tratamiento de morina en dosis de 1mg/kg durante diez días y su respectivo control con solución salina. Al finalizar la administración del tratamiento se realizaron las pruebas conductuales. Para las determinaciones moleculares se realizó la eutanasia a los animales de todos los grupos experimentales. Se llevaron a cabo muestras de Western blot en cerebros congelados, como se propone en el esquema experimental de la figura 5B.

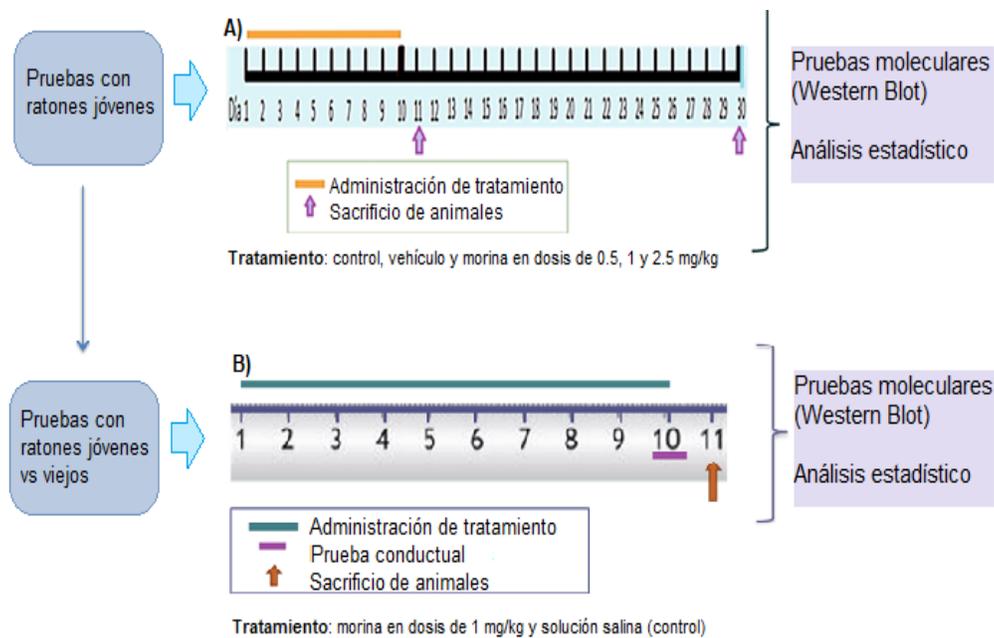


Figura 5. Diseño experimental. **A:** diseño experimental con ratones jóvenes para la obtención de datos que dirijan el estudio con ratones envejecidos. **B:** diseño experimental con ratones envejecidos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Ratones C57BL/6

Los animales utilizados en el presente trabajo experimental se manejaron de acuerdo con la guía del National Institutes of Health (NIH) para el cuidado y uso de animales de laboratorio y se cumplió con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999: especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio; se hicieron todos los esfuerzos necesarios para minimizar el sufrimiento animal. En el caso del protocolo realizado únicamente con ratones jóvenes se utilizaron cuatro ratones (*mus musculus*) de veinte semanas de edad por tratamiento, obteniendo

un total de cuarenta ratones de la cepa C57BL/6. Para el protocolo de comparación de edades se utilizaron ocho animales por tratamiento para las pruebas conductuales, dos tratamientos por grupo de edad (control, y morina en dosis de 1 mg/kg) y dos grupos de edad (14 y 46 semanas), y se consideraron un extra de diez animales por grupo en la edad joven y cinco en la edad de cuarenta y seis semanas para la realización de otras pruebas, es decir, sesenta y dos ratones de la cepa C57BL/6. Esto hace un total de ciento doce ratones machos de la cepa C57BL/6. Los ratones se mantuvieron en condiciones de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, temperatura constante (22-23°C), y con comida y agua *ad libitum*.

## **2. Administración de tratamientos**

*Grupo jóvenes:* Se administró durante diez días el tratamiento correspondiente a cada uno de los cinco grupos: morina en dosis de 0.5, 1 y 2.5 miligramos por kilogramo de peso (mg/kg) utilizando como vehículo el DMSO diluido en solución salina en concentración de 0.25 ml/L, vehículo (DMSO diluido en solución salina) y control (solución salina). La administración se realizó vía intraperitoneal, en un horario entre las diez y once horas. *Grupo de ratones envejecidos vs jóvenes:* Se administraron dos tratamientos durante diez días, el tratamiento control y morina en dosis de 1 mg/kg de peso, utilizando como vehículo la solución alcalina compuesta por solución salina alcalinizada con NaOH en proporción 1:10. Los tratamientos se administraron vía intraperitoneal en un horario entre las diez y once horas.

### **3. Memoria de reconocimiento de objetos en un contexto novedoso**

Los ratones controles y tratados con morina se probaron en nuevas tareas de reconocimiento de objetos con contexto, tareas dependientes del hipocampo. La habituación de los animales para estas tareas se realizó del día siete al nueve de tratamiento colocando a los ratones en una arena vacía durante cinco minutos y luego de noventa minutos en otra arena vacía por otros cinco minutos, esto se realizó cada día. Los ratones de cada grupo fueron entrenados en la tarea de reconocimiento de objetos con contexto de la siguiente manera: a los animales se les dejó explorar, como parte del entrenamiento, un par de objetos idénticos en una primera arena (contexto A) durante cinco minutos. Después de noventa minutos, los ratones se colocaron en una segunda arena (contexto B) con otro par de objetos idénticos y se les permitió explorar durante cinco minutos. Veinticuatro horas después, los ratones se probaron durante tres minutos con una copia del objeto familiar en el contexto A y un objeto fuera de contexto de la segunda arena (B). El índice de reconocimiento (RI) representa el porcentaje de tiempo que los ratones pasaron explorando el objeto fuera de contexto (Martínez-Coria et al. 2010).

### **4. Evaluación de los cambios en los niveles de proteínas por Western Blot.**

Las células y los tejidos (hipocampos y cortezas de ratones de la cepa C57BL/6) se lisaron con la solución de lisis RIPA (Sigma Aldrich MFCD02100484 10x) añadiendo fluoruro de sodio, pirofosfato de sodio, glicerol-2-fosfato y coctel de proteasas cOmplete™ (Sigma Aldrich, 11697498001) para proteger a las proteínas nativas, posteriormente se realizó la medición de proteína por el método de Bradford (Bradford,

1976) (Bio-Rad, 5000006). Las muestras homogenadas se mezclaron con amortiguador de carga 3X (30% de glicerol, 15% de tris pH 6.8 1M, 15% de agua bidestilada, 30% de SDS a 20%, 0.3% de azul bromofenol a 1% y 10% de  $\beta$ -mercaptoetanol) y se hirvieron durante seis minutos. Las proteínas fueron separadas por electroforesis convencional en geles de poliacrilamida al 12%, utilizando un voltaje constante de 150V por 30 minutos y posteriormente 100V durante 90 minutos utilizando amortiguador de corrida (25 mM de Tris base, 250 mM de glicina y 6 mM de SDS); posteriormente fueron transferidas por electrotransferencias a membranas de nitrocelulosa aplicando una intensidad constante de 200 mA durante dos horas en amortiguador de transferencia (38 mM de glicina 47 mM de Tris base y 1.2 mM de SDS); finalmente se bloquearon las membranas con leche al 5% en buffer salino de tris (TBS, 136 mM de NaCl, 2mM de KCl y 24 mM de tris base). Las inmunodetecciones se llevaron a cabo usando los anticuerpos seleccionados con el procedimiento acorde a los lineamientos de la casa comercial, y como secundarios los necesarios según estos mismos lineamientos. El revelado se realizó mediante la adición de reactivo de quimioluminiscencia (Santa Cruz sc-2048 y ThermoScientific 34094) sobre las membranas y la observación de las bandas en películas de revelado. Se utilizó actina (Cell signalling, 1:1000) como control de carga. El análisis de los niveles de las proteínas estudiadas, se realizó con respecto al control de carga utilizando el software ImageJ (Java).

En los experimentos con ratones jóvenes, debido al tamaño de la muestra, las proteínas que se evaluaron fueron realizadas en la misma membrana (Novus Biologicals, Biotechne) teniendo de esta forma el mismo control de carga para las proteínas estudiadas en este grupo experimental; los datos obtenidos están considerados como

preliminares hasta que puedan ser repetidos para confirmar los resultados, se realizaron dos o tres réplicas biológicas por tratamiento.

<b>Anticuerpo primario</b>	<b>Anticuerpo secundario</b>
<b>BDNF</b> (Santa Cruz, sc-65514) 1:500	Anti mouse (Santa Cruz, sc-2005), 1:15000
<b>P38</b> (Santa Cruz, sc-7149) 1:500	Anti rabbit (Santa Cruz, sc-2004), 1:15000
<b>p-p38</b> (Santa Cruz, sc-7973) 1:500	Anti mouse ((Santa Cruz, sc-2005), 1:15000
<b>pGSK3<math>\beta</math></b> (Santa Cruz, sc-81495) 1:500	Anti mouse (Santa Cruz, sc-2005), 1:15000
<b>ERK 1/2</b> (Santa Cruz, sc-153) 1:500	Anti rabbit (Santa Cruz, sc-2004), 1:15000

### 5. Análisis estadísticos.

Los datos se expresan como promedio  $\pm$  error estándar de la media (EEM). Se analizaron con el programa Prism 8 (Graph Pad, San Diego, CA, USA) usando las pruebas estadísticas adecuadas según los datos. Las diferencias se consideraron significativas a valores de  $p < 0.05$ . La n fue de tres individuos por tratamiento para identificar los cambios en los niveles de proteínas involucradas en vías de señalización relacionadas con memoria que son activadas por flavonoides en hipocampo y de dos en corteza. Se utilizó la prueba de ANOVA de dos vías para comparar entre tratamientos y días de experimentación, dado que se comportaban de forma normal. Para analizar el índice de reconocimiento en la prueba de reconocimiento de objetos con contexto se utilizó la prueba de t de student, dado que los datos fueron normales. Finalmente, para el análisis de los niveles de BDNF se utilizó una prueba de t de student y una ANOVA de dos vías para comparar entre edades y tratamientos, la n fue de cuatro individuos por tratamiento.

## RESULTADOS

### ***Identificación de las modificaciones en los niveles de las proteínas p-GSK3 $\beta$ , p-38, p-38 fosforilado y ERK 1/2, involucradas en vías de señalización relacionadas con memoria que son activadas por flavonoides en ratones de catorce semanas***

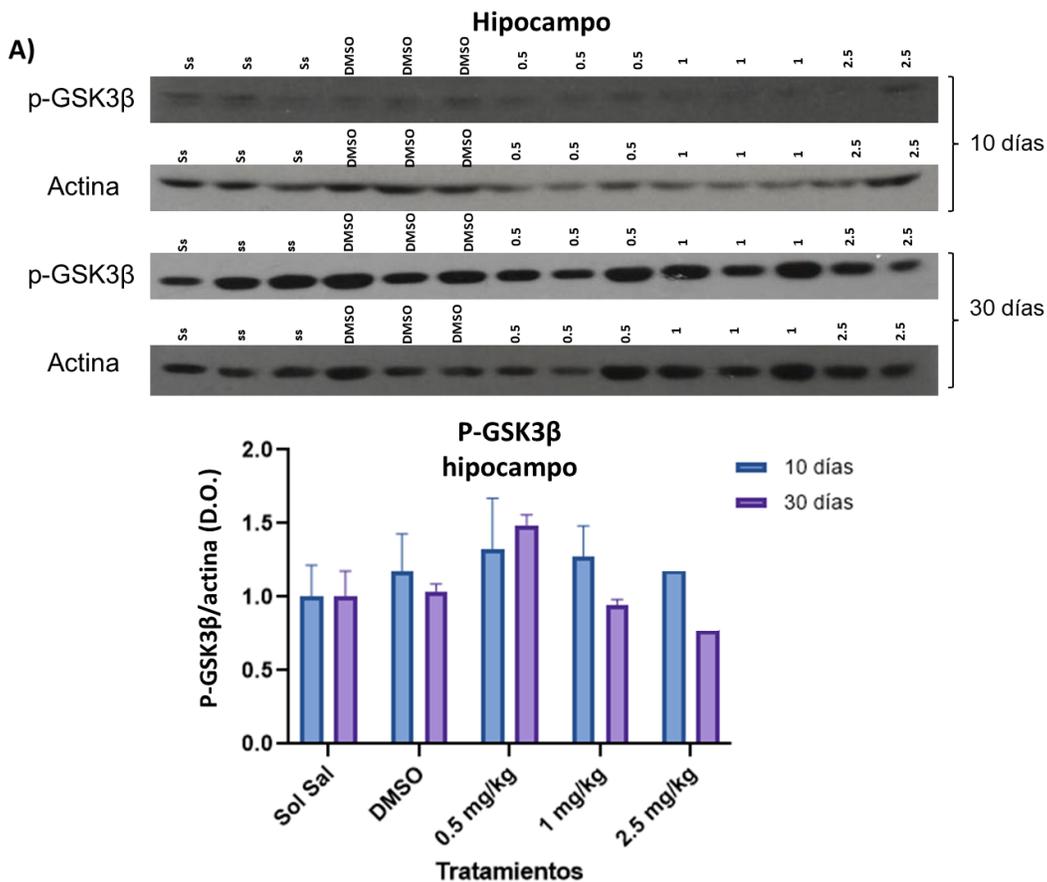
Como tamizaje del efecto de la morina en ratones para posteriormente realizar un estudio dirigido a los animales viejos (cuarenta y seis semanas), se realizaron Western blots para identificar a las proteínas posiblemente implicadas en los mecanismos moleculares involucrados en la mejoría de la memoria de ratones tratados con la morina en distintas dosis (control (hipocampo: n=3, corteza: n=2), DMSO (Hipocampo: n=3, corteza: n=2), 0.5 (Hipocampo: n=3, corteza: n=2), 1 (Hipocampo: n=3, corteza: n=2) y 2.5 (n=2) mg/kg); se evaluaron muestras de cerebros de ratones de catorce semanas de edad, edad en la que nuestro grupo de trabajo ha demostrado que la morina mejora la memoria y el aprendizaje (figura 4, datos por publicar). Los Western blots se realizaron con los datos de dos o tres animales y fueron corridos en una misma membrana por tejido; por lo que las diferentes proteínas analizadas comparten el mismo control de carga, sin embargo, para facilitar su análisis, los resultados se presentan desglosados.

### **La morina aumenta la forma inactiva de GSK3 $\beta$ en corteza e hipocampo**

Se evaluó el estado de inhibición por fosforilación de la proteína GSK3 $\beta$  que es parte de la vía Wnt/ $\beta$ catenina, con el objetivo de estudiar una vía de señalización que está

implicada también en efectos sobre la cognición producidos por flavonoides y que además se ve indirectamente afectada por los receptores TrKB.

Al evaluar los niveles de la forma fosforilada de GSK3 $\beta$  en el caso del hipocampo no hay diferencias significativas en la inhibición de esta proteína, solo se observa un ligero aumento con la dosis de 0.5 mg/kg en los experimentos de diez y treinta días; sin embargo, en corteza, aunque no de forma estadísticamente significativa, se observa un aumento de los niveles de pGSK3 $\beta$  con la dosis de 1 mg/kg de morina en el experimento de diez días, comparado con el control, DMSO, y los tratamientos con morina de 0.5 y 2.5 mg/kg; por otro lado en el experimento de treinta días no hay modificaciones en los niveles de pGSK3 $\beta$  (figura 6).



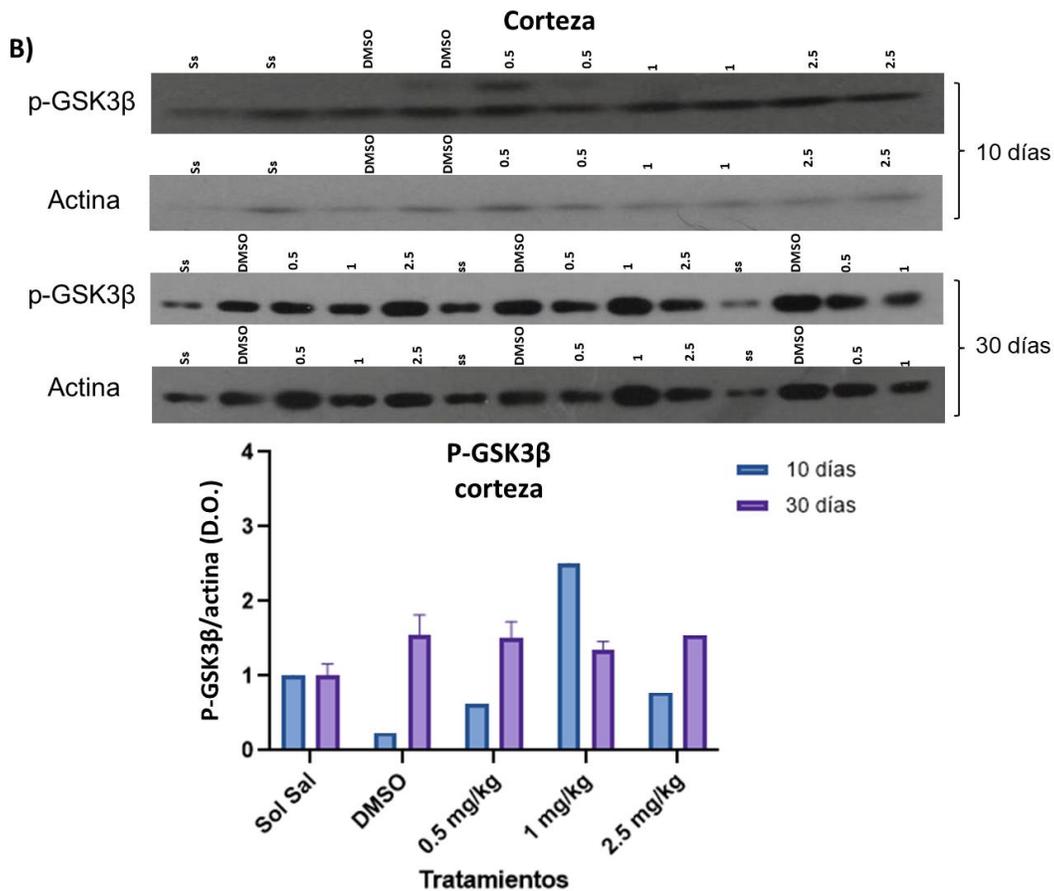


Figura 6. La morina aumenta la inhibición de GSK3 $\beta$  en la corteza. Western blot para la identificación de pGSK3 $\beta$  en hipocampo (A) y corteza (B) de ratones bajo cinco tratamientos: Solución salina (Hipocampo n=3, corteza n=2), DMSO (Hipocampo n=3, corteza n=2), 0.5 (Hipocampo n=3, corteza n=2), 1 (Hipocampo n=3, corteza n=2) y 2.5 mg/kg (Hipocampo n=2, corteza n=2) de morina. En la parte superior se muestran las bandas de pGSK3 $\beta$  y del control de carga en diez y treinta días. D.O.= densidad óptica, los niveles de la proteína fueron normalizados con los niveles de actina correspondientes. HIPOCAMPO: ANOVA de dos vías: Tratamiento F<sub>4,18</sub>=1.558 P=0.2282, Días F<sub>1,18</sub>=1.241 P=0.2799, Interacción F<sub>4,18</sub>=0.7528 P=0.5691. CORTEZA: ANOVA de dos vías: Tratamiento F<sub>4,19</sub>=6.237 P=0.0022, Días F<sub>1,19</sub>=5.725 P=0.0272, Interacción F<sub>4,19</sub>=8.451 P=0.0004. Se muestran medias  $\pm$ E.E.M. ss: solución salina (control), DMSO, 0.5: 0.5 mg/kg morina, 1: 1 mg/kg de morina, 2.5: 2.5 mg/kg de morina.

Como se mencionó, la literatura señala que la morina inhibe GSK3 $\beta$ , su forma inactiva es la fosforilada, por lo que nuestros al aumentar el número de animales estudiados, nuestros resultados probablemente serían concordantes con la literatura. Es importante notar que los niveles de pGSK3 $\beta$  parecen afectados por el DMSO en corteza.

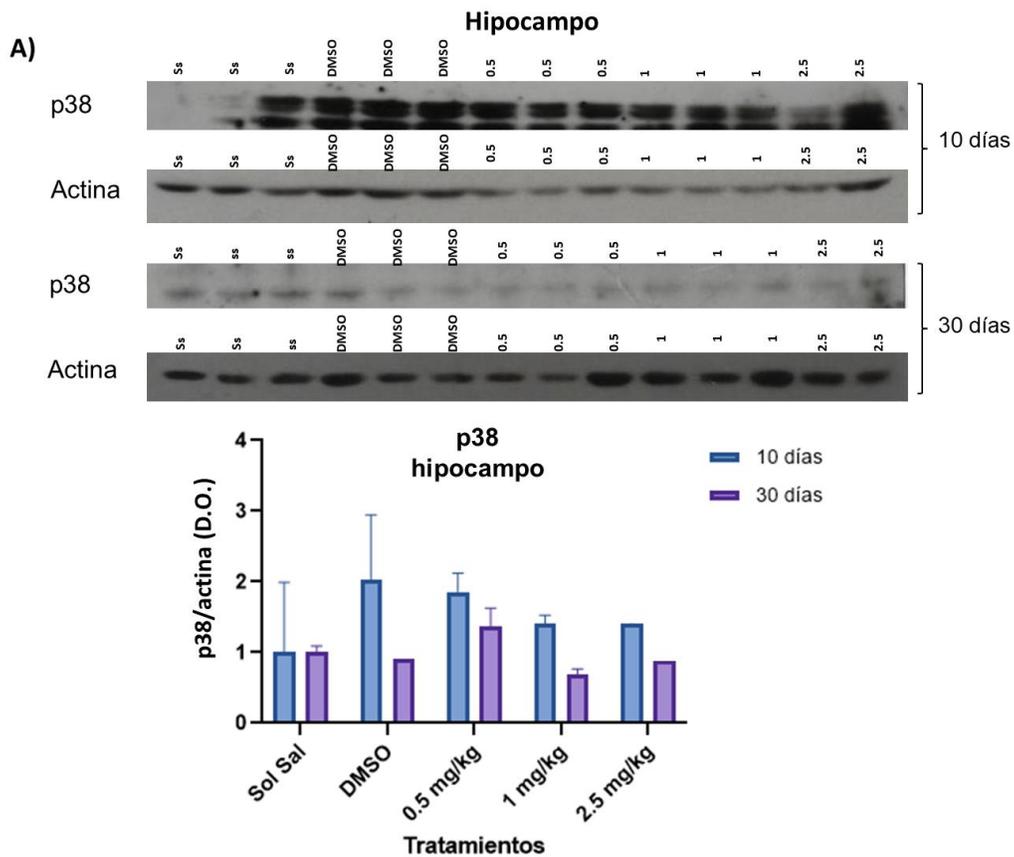
## Efecto de la morina sobre los niveles de p38 y su forma fosforilada en corteza e hipocampo

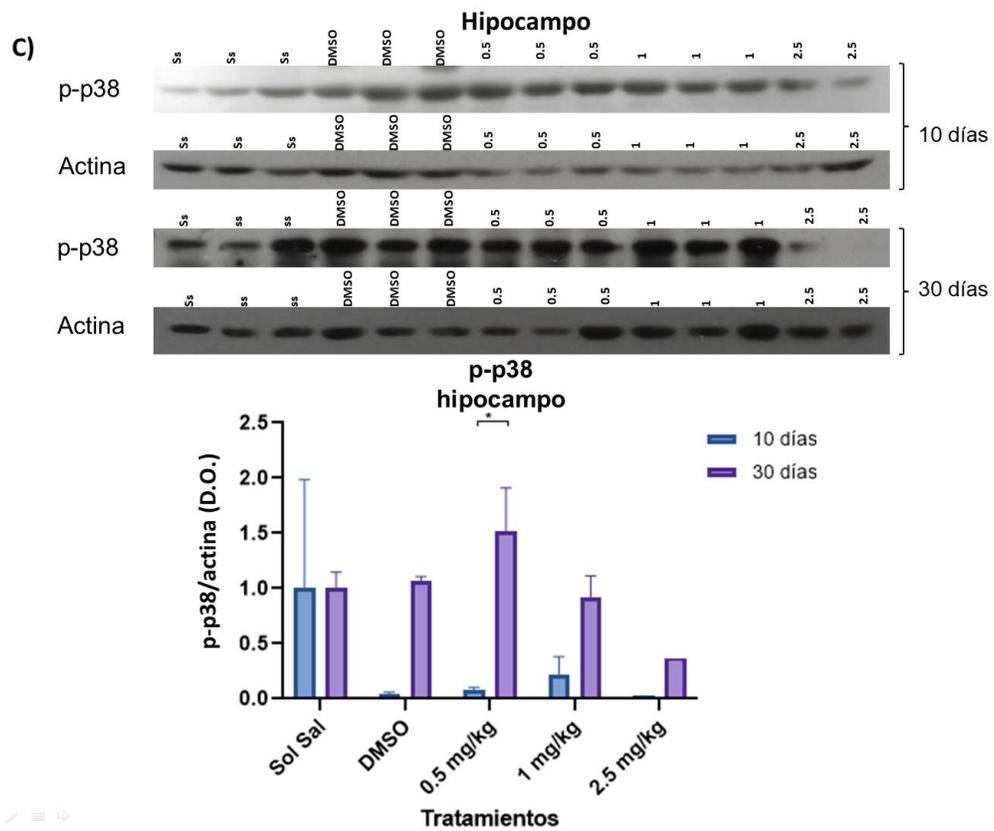
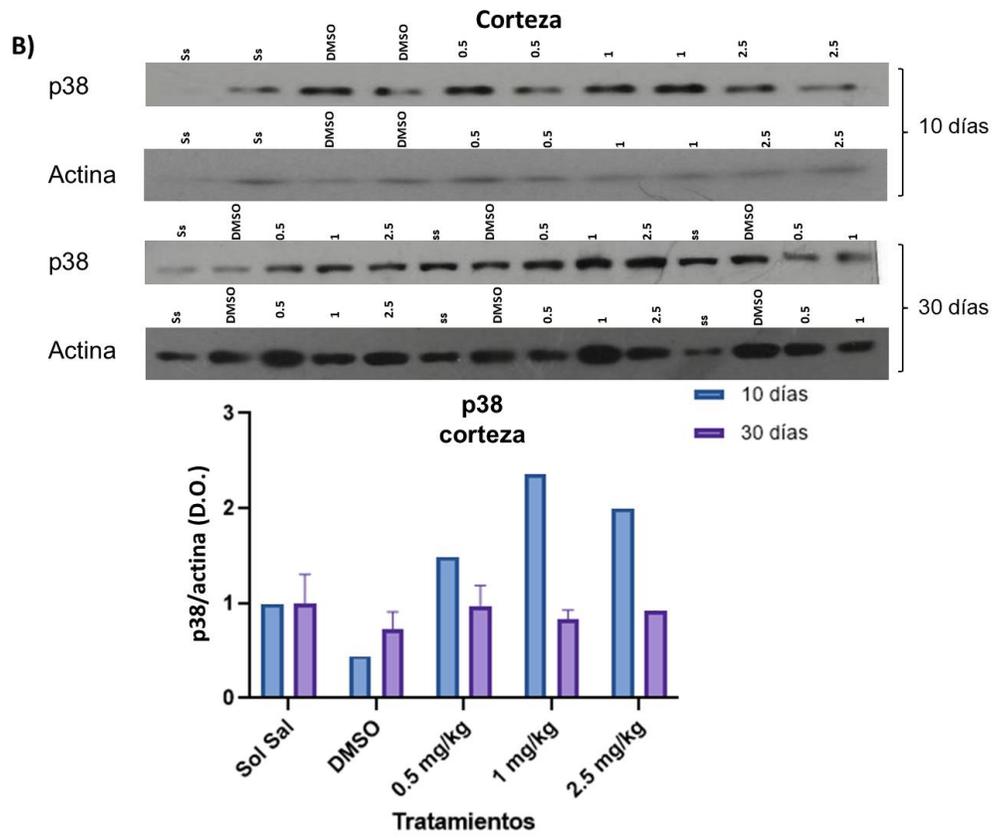
p38 es una proteína relacionada con muerte celular, diferenciación y proliferación celular, puede ser inhibida por proteínas de las vías de señalización Wnt- $\beta$ catenina y TRK-ERK; se investigó la modificación de los niveles de p38 y de su forma fosforilada bajo el tratamiento con morina.

En las evaluaciones realizadas se encontró que en el hipocampo no hay diferencias en p38 en ninguno de los casos (figura 7); por otro lado, en la corteza se observa la tendencia al aumento de p38 en el experimento de diez días para los ratones tratados con dosis de morina de 1 mg/kg en comparación con los tratados con DMSO, sin embargo, no son datos estadísticamente significativos, por lo que es necesario aumentar el número de animales experimentales (figura 7).

En el hipocampo, no hay cambios en los niveles de p-p38 con los distintos tratamientos, lo que indica que no se está activando, ya que la fosforilación activa a p38. Solo se observa un aumento significativo con la dosis de morina de 1 mg/kg al comparar entre los días de experimentación ( $p=0.0295$ ) (figura 7), lo que podría indicar que con el paso de los días hay un aumento en la activación de p38. También se observa un ligero aumento de los niveles de p-p38 con la dosis de 0.5 mg/kg en el día 30 de experimentación y después la tendencia a disminuir.

En la corteza se puede observar una tendencia al aumento en los niveles de p-p38 en cerebros de ratones tratados con morina conforme aumenta la dosis comparados con los tratados con DMSO en el día diez del experimento. Es importante señalar que los niveles de p38 y p-p38 parecen verse afectados por el DMSO; además, solo se observan aumentos en la corteza. El efecto del DMSO no se observa en pruebas conductuales. Es necesario aumentar el número de animales analizados para confirmar estos resultados preliminares.





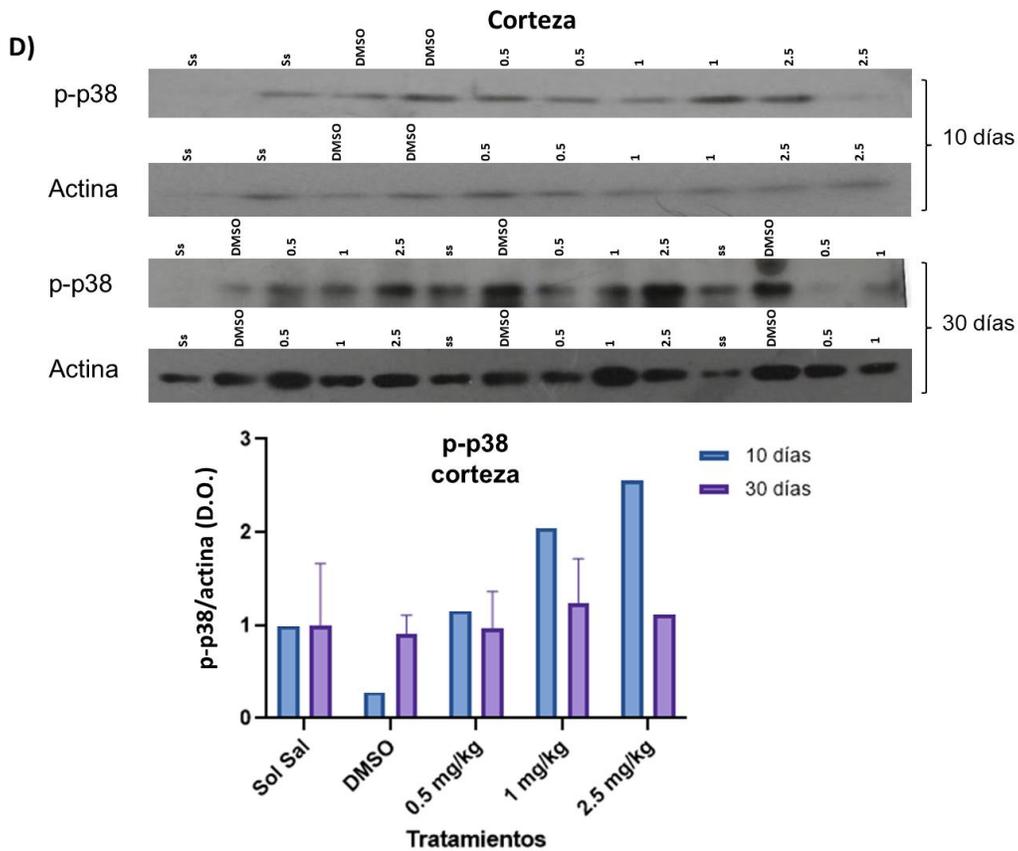


Figura 7. Efecto de la morina en los niveles de p38 y su forma fosforilada. Western blot para la identificación de p38 en hipocampo (A) y corteza (B), así como de p-p38 en hipocampo (C) y corteza (D) de ratones bajo cinco tratamientos: Solución salina (Hipocampo n=3, corteza n=2), DMSO (Hipocampo n=3, corteza n=2), 0.5 (Hipocampo n=3, corteza n=2), 1 (Hipocampo n=3, corteza n=2) y 2.5 (Hipocampo n=2, corteza n=2) mg/kg de morina. En la parte superior se muestran las bandas de p38, p-p38 y del control de carga en diez y treinta días. D.O.= densidad óptica, los niveles de la proteína fueron normalizados con los niveles de actina correspondiente. P38: HIPOCAMPO: ANOVA de dos vías: Tratamiento  $F_{4,18}=0.8812$   $P=0.4947$ , Días  $F_{1,18}=4.730$   $P=0.4947$ , Interacción  $F_{4,18}=0.4242$   $P=0.7892$ . CORTEZA: ANOVA de dos vías: Tratamiento  $F_{4,19}=2.431$   $P=0.0831$ , Días  $F_{1,19}=6.762$   $P=0.0176$ , Interacción  $F_{4,19}=2.228$   $P=0.1045$ . p-p38: HIPOCAMPO: ANOVA de dos vías: Tratamiento  $F_{4,18}=2.334$   $P=0.0948$ , Días  $F_{1,18}=16.07$   $P=0.0008$ , Interacción  $F_{4,18}=2.049$   $P=0.1302$ . CORTEZA: ANOVA de dos vías: Tratamiento  $F_{4,19}=2.978$   $P=0.0458$ , Días  $F_{1,19}=2.091$   $P=0.1645$ , Interacción  $F_{4,19}=1.835$   $P=0.1638$ . Se muestran medias  $\pm$ E.E.M. ss: solución salina (control), DMSO, 0.5: 0.5 mg/kg morina, 1: 1 mg/kg de morina, 2.5: 2.5 mg/kg de morina.

## Efecto de la morina en los niveles de ERK 1/2 en corteza e hipocampo

Los efectos de los polifenoles sobre procesos cognitivos como el aprendizaje y la memoria se han visto relacionados con la activación de ERK 1/2, que a su vez se relaciona con la activación de la vía de receptores TRKB.

Al evaluar los niveles de ERK1, obtuvimos que en el hipocampo no se observan cambios significativos en sus niveles, solo se observa una ligera disminución con la dosis de 1 mg/kg en 30 y 10 días de experimentación (figura 8), sin embargo es necesario estudiar la forma activa, es decir fosforilada, de estas cinasas.

En la corteza, se observa una tendencia a la disminución de los niveles de ERK 1 con los tratamientos de morina en treinta días, mientras que en diez días se observa una disminución con respecto al control del resto de los tratamientos (figura 8).

ERK 2 en el hipocampo no presenta diferencias significativas con el tratamiento con morina (figura 8). En la corteza, no se encontraron diferencias significativas de ERK2 en ningún caso, pero se observa un ligero aumento en el experimento de diez días con las dosis de 1 y 2.5 mg/kg (figura 8).

Es necesario estudiar la activación de estas cinasas para poder elucidar su modificación bajo los tratamientos con morina, así como aumentar el número de animales analizados para confirmar estos resultados.

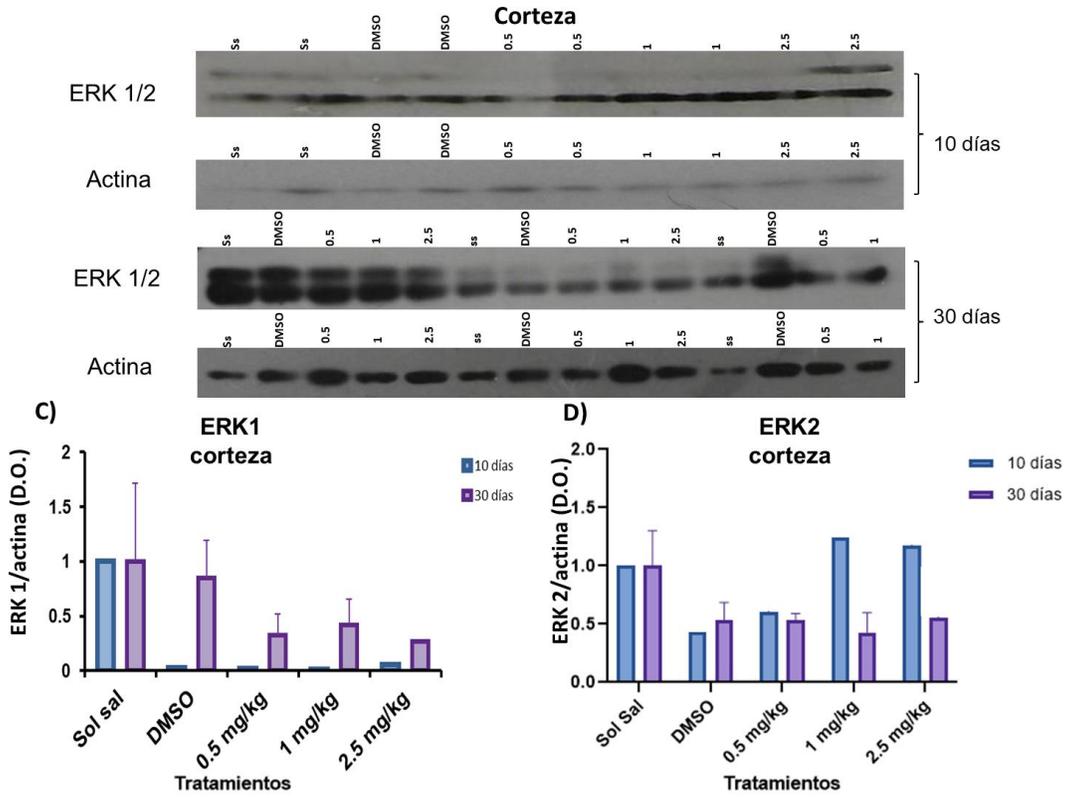
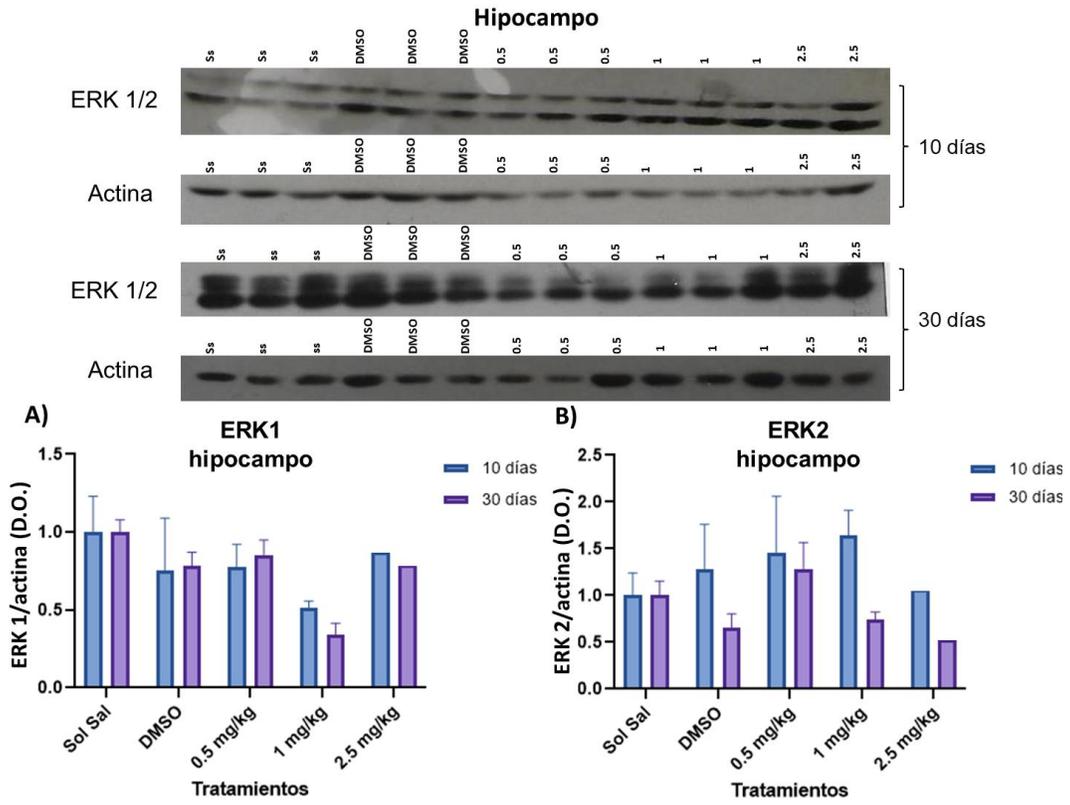


Figura 8. La morina tiende a aumentar los niveles de ERK 1/2 en corteza. Western blot para la identificación de ERK1/2 en hipocampo (ERK1:A, ERK2:B) y corteza (ERK1:C, ERK2:D) de ratones bajo cinco tratamientos: Solución salina (Hipocampo n=3, corteza n=2), DMSO (Hipocampo n=3, corteza n=2), 0.5 (Hipocampo n=3, corteza n=2), 1 (Hipocampo n=3, corteza n=2) y 2.5 (Hipocampo n=2, corteza n=2) mg/kg de morina. En la parte superior se muestran las bandas de ERK 1/2 y del control de carga en diez y treinta días. D.O.= densidad óptica, los niveles de la proteína fueron normalizados con los niveles de actina correspondientes. ERK1: HIPOCAMPO: ANOVA de dos vías: Tratamiento  $F_{4,18}=2.597$   $P=0.0711$ , Días  $F_{1,18}=0.06699$   $P=0.7987$ , Interacción  $F_{4,18}=0.1576$   $P=0.9570$ . CORTEZA: ANOVA de dos vías: Tratamiento  $F_{4,19}=9.434$   $P=0.0002$ , Días  $F_{1,19}=9.462$   $P=0.0062$ , Interacción  $F_{4,19}=6.921$   $P=0.0013$ . ERK 2: HIPOCAMPO: ANOVA de dos vías: Tratamiento  $F_{4,18}=0.9508$   $P=0.4578$ , Días  $F_{1,18}=4.609$   $P=0.4578$ , Interacción  $F_{4,18}=0.5858$   $P=0.6770$ . CORTEZA: ANOVA de dos vías: Tratamiento  $F_{4,19}=1.348$   $P=0.2890$ , Días  $F_{1,19}=3.025$   $P=0.0982$ , Interacción  $F_{4,19}=1.266$   $P=0.3179$ . Se muestran medias  $\pm$ E.E.M. ss: solución salina (control), DMSO, 0.5: 0.5 mg/kg morina, 1: 1 mg/kg de morina, 2.5: 2.5 mg/kg de morina.

### ***Estandarización del vehículo para la morina***

Debido a que los resultados sugieren cambios en los niveles de algunas proteínas en ratones bajo tratamiento con DMSO, se buscó una alternativa de vehículo para la morina.

Se realizaron pruebas de solubilidad para la morina en solución salina alcalina sin DMSO, para ello fue necesario agregar NaOH en proporción 1:10 a la solución salina y posteriormente la morina, posterior a esto, se hicieron mediciones de pH para conocer si esta solución era adecuada para administrar el tratamiento a los ratones (figura 9), el pH de las soluciones es muy cercano a siete, por lo que se consideró adecuado; para corroborar esto, se administró la solución a una población de ratones de veinte ratones de cinco meses y esta no afectó a los animales, no hubo irritación, no hubo dolor y los ratones responden a la prueba de conducta.

Es importante señalar que mayores concentraciones de morina no pudieron ser disueltas en la solución alcalina.



Figura 9. Medición de pH en preparaciones de morina disuelta en solución salina con NaOH en proporción 1:10. El pH que presenta la dosis de morina de 1 mg/kg se encuentra entre siete y ocho.

### ***Prueba de reconocimiento de objetos con contexto en ratones de cuarenta y seis semanas de edad***

Se prepararon las pruebas de reconocimiento de objetos con contexto en una población de veinte individuos machos de la cepa C57BL/6. Para ello se utilizaron dos arenas distintas y dos pares de objetos diferentes (figura 10), la prueba se realizó intercambiando la posición de un objeto de la caja roja con uno de la caja azul en contraposición. Los ratones respondieron adecuadamente a la prueba, mostrando interés en los objetos novedosos, sin mostrar preferencia por alguno en específico.



Figura 10. Arenas utilizadas en la prueba de reconocimiento de objetos con contexto. Para la prueba se intercambié un objeto de la caja roja por uno de la caja azul en contraposición y viceversa.

Se realizó la prueba de reconocimiento de objetos con contexto a dieciséis ratones envejecidos de la cepa C57BL/6, de once meses de edad, divididos en dos grupos, el grupo control tratado con solución salina y el grupo tratado con morina en dosis de 1 mg/kg (figura 11), esta dosis fue seleccionada porque en los experimentos previos realizados por nuestro grupo de trabajo, se observa un aumento de la memoria en las pruebas conductuales, y además, los resultados de esta tesis muestran posibles cambios importantes en las determinaciones moleculares.

Los resultados obtenidos indican que el índice de reconocimiento para los ratones envejecidos tratados con morina fue mayor comparado con el grupo control ( $p=0.0532$ ), lo que indica que la morina mejora la memoria de reconocimiento en estos ratones, además, al comparar estos resultados con la información preliminar, estos datos confirman el resultado previo con animales jóvenes, en donde se observó que el DMSO no tiene efecto sobre la conducta.

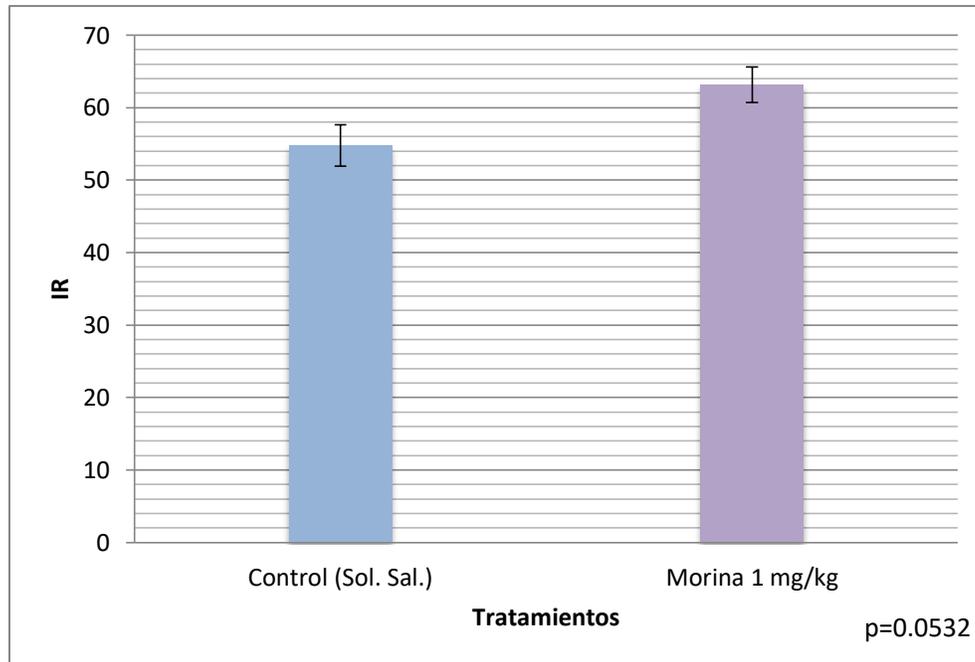


Figura 11. Índice de reconocimiento para la prueba de reconocimiento de objetos con contexto en ratones de la cepa C57BL/6 de 11 meses de edad tratados con solución salina (control) y morina en dosis de 1 mg/kg. T de student:  $p=0.053$ ,  $t=2.1439$ ,  $df=12$ ,  $n=8$ .

### ***Identificación de BDNF en ratones envejecidos***

Se realizaron pruebas de Western blot para la identificación de BDNF en ratones viejos (cuarenta y seis semanas de edad) y jóvenes (catorce semanas de edad) tratados con solución salina como control o con morina en dosis de 1 mg/kg, con el objetivo de elucidar si los niveles de este factor se modificaba al administrar la morina con el vehículo de solución alcalina.

Bajo nuestras condiciones experimentales, no se obtuvieron diferencias significativas entre el tratamiento con morina y el tratamiento control en ningún grupo de edad, jóvenes y viejos (figura 12B).

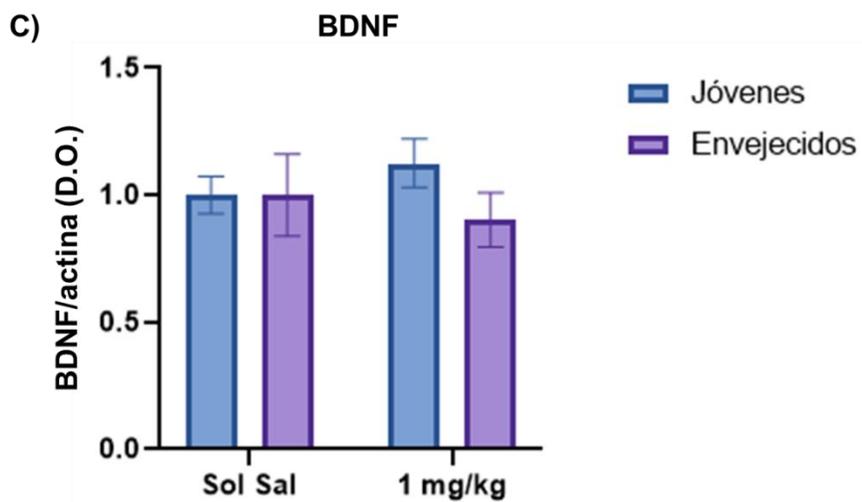
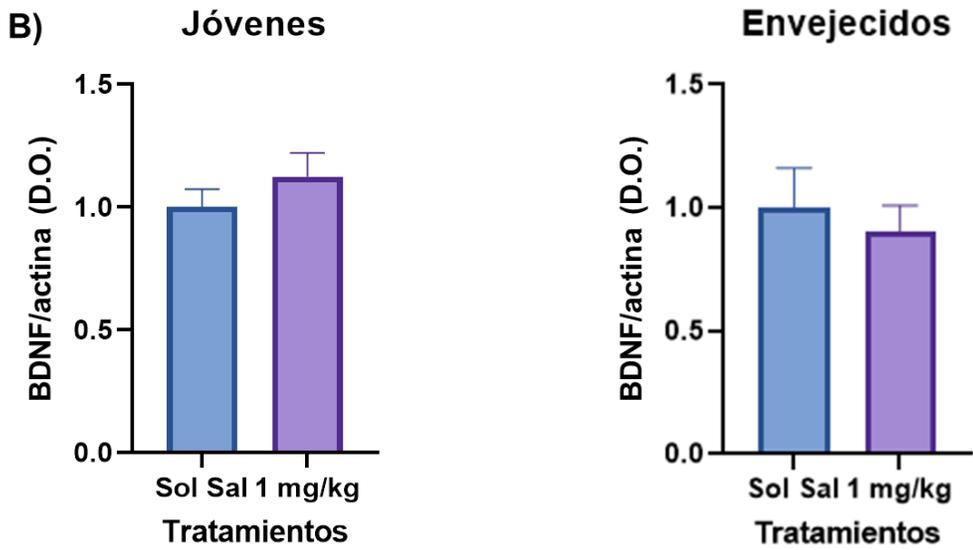
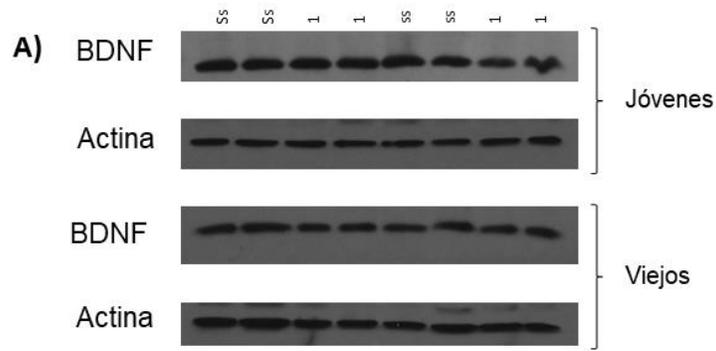


Figura 12. Identificación de BDNF en cerebro de ratones jóvenes y viejos tratados con solución salina y morina en dosis de 1 mg/kg. A) Western blot, ss: solución salina (control), 1: 1 mg/kg de morina, B) Comparación entre tratamientos, Ratones machos de la cepa C57BL/6 de cinco meses de edad. D.O.= densidad óptica, los niveles de la proteína fueron normalizados con los niveles de actina correspondientes. Jóvenes: T de student:  $p=0.3419$ ,  $t=1.032$ ,  $df=6$ ,  $n=4$ . Viejos (de cuarenta y seis semanas de edad): T de student:  $p=0.6323$ ,  $t=0.5039$ ,  $df=6$ ,  $n=4$ . C) Comparación entre edades. ANOVA de dos vías: Edades  $F_{1,12}=0.9462$   $P=0.3499$ , Tratamientos  $F_{1,12}=0.01368$   $P=0.9088$ , Interacción  $F_{1,12}=0.9462$   $P=0.3499$ .  $n=4$ .

Por otro lado, al comparar el efecto del tratamiento con morina en dosis de 1 mg/kg sobre BDNF en ambos grupos de edad (catorce y cuarenta y seis semanas) no se observan diferencias significativas en los niveles del factor neurotrófico derivado del cerebro en ratones viejos comparados con los ratones jóvenes (figura 12C).

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en los experimentos con jóvenes, lo que indica que la morina no tiene efecto sobre el factor neurotrófico derivado del cerebro, así que su efecto puede deberse a la inhibición de GSK3 $\beta$ .

## Discusión

Se ha propuesto que los efectos de comidas ricas en flavonoides sobre funciones neuro-cognitivas se debe a la habilidad de estos para interactuar con la arquitectura celular y molecular encargada de la memoria y el aprendizaje, sobre todo los relacionados con potenciación a largo plazo y plasticidad sináptica (Vauzour *et al.* 2008). En este trabajo investigamos el efecto de la morina, un flavonoide presente en principalmente en plantas de la familia *moraceae*, sobre la memoria de ratones

envejecidos, así como su efecto sobre los niveles de diversos factores involucrados en vías de señalización Wnt/ $\beta$ catenina y de los receptores TrkB/CREB que subyacen a la memoria y son activados por flavonoides como la morina, estos fueron: pGSK3 $\beta$ , p38, p-p38, ERK 1/2 y BDNF. Es importante mencionar que los resultados de estos western blots son preliminares, y debemos aumentar el número de experimentos para confirmar los resultados; sin embargo, se tienen dos o tres réplicas biológicas, lo cual es más informativo que las réplicas técnicas. Discutiré entonces, el posible alcance de este trabajo.

Realizamos pruebas para determinar los niveles de la forma inactiva de GSK3 $\beta$ , que es parte de la vía Wnt- $\beta$ catenina, aunque no únicamente de esta vía. Evidencias recientes sugieren que la GSK3 $\beta$  tiene múltiples funciones celulares, entre las que se encuentra un rol importante en la formación de la memoria, pero también está relacionada con excitotoxicidad (Aceto *et al.* 2020; El-gazar *et al.* 2019), además, influye en ciertos tipos de plasticidad sináptica, sobre todo en depresión a largo plazo. Así mismo, es considerada un regulador de la plasticidad estructural y metabólica (Bradley *et al.* 2012; Gong *et al.* 2011). La sobreactivación de GSK3 $\beta$  produce déficits en pruebas de reconocimiento de objetos y memoria espacial, sin embargo, se ha demostrado que la activación de GSK3 $\beta$  sinaptosomal está asociada a la consolidación de la memoria (Bradley *et al.* 2012).

En las pruebas realizadas se observa un aumento la inhibición de GSK3 $\beta$  con el tratamiento de morina en dosis de 1 mg/kg comparado con el resto de los tratamientos en el experimento de diez días, aunque no de forma estadísticamente significativa. La

morina ha demostrado ser un inhibidor de GSK3 $\beta$ , produciendo así, neuroprotección (Gong *et al.* 2011; Du *et al.* 2016; El-gazar *et al.* 2019; Ayaz *et al.* 2019); nuestros resultados preliminares sugieren un aumento en la forma fosforilada de GSK3 $\beta$ , que es la forma inactiva, lo que sugiere que, de acuerdo a la literatura, esta inactivación podría favorecer la plasticidad y estar involucrada en el efecto sobre la memoria que tiene la morina (El-gazar *et al.* 2019); sin embargo, es necesario, como se menciona, que se realicen pruebas con un mayor número de animales.

p38 puede ser inhibida por GSK3 $\beta$ . Se observaron niveles más altos de p-p38 en dosis de 2.5 mg/kg de morina en la corteza en el experimento de diez días comparado con el tratamiento con DMSO, resultado que requiere ser corroborado debido al número de animales experimentales; por otro lado, p38 parece aumentar en la corteza con el tratamiento en dosis de 1 mg/kg comparado con DMSO, lo notable de esto es que, para ambos, p-p38 y p38, la activación parece aumentar en el día diez del experimento. Además, sus niveles en corteza tiende a disminuir con el DMSO. La vía p38 MAPK es activada por estímulos estresantes (Rossato *et al.* 2006), en casos de isquemia, p38 se activa y activa a su vez apoptosis en el hipocampo, lo que puede dañar el aprendizaje espacial, sin embargo, también activa la expresión de genes que pueden inducir proliferación, diferenciación, entre otras que pueden llevar a mejorar la memoria de forma indirecta (Yang *et al.* 2013)

Además, la inhibición de p38 atenúa déficits cognitivos en ratas, esto debido a que su forma activa induce la apoptosis en el hipocampo, lo que puede afectar la cognición, así mismo, si su concentración es elevada, disminuye la potenciación a largo plazo, así

como la densidad de espinas dendríticas (Ashabi *et al.* 2012; Yang *et al.* 2013; Dai *et al.* 2016). En este caso, podemos observar que la morina parece aumentar los niveles de p38 y su forma fosforilada, que indica su activación, sin embargo, para observar este cambio se requieren dosis de morina a partir de 2.5 mg/kg, lo que podría indicar que a partir de esta dosis comienza a activar otros mecanismos. Podría verse involucrado el efecto de hormesis que tienen los flavonoides, que implica que en dosis pequeñas tienen efecto en procesos como la proliferación, pero en dosis altas tienen efectos contrarios, como en muerte celular, efecto que ha sido observado en neurogénesis y en pruebas conductuales en ratones jóvenes (Torres *et al.* 2018, Ignacio-Juárez, 2019).

Dos proteínas que participan en la vía de los receptores TRK son ERK 1/2. ERK 1/2 hipocampal es crucial para la potenciación a largo plazo (Rossato *et al.* 2006), además activan diversas vías de señalización implicadas en el aprendizaje y la memoria, como aquellas desencadenadas por los receptores NMDA y los receptores para el factor neurotrófico derivado del cerebro (Maher *et al.* 2006). En las pruebas realizadas se observan ligeros aumentos y disminuciones de los niveles de ERK 1/2 pero no se observan cambios significativos en la corteza ni en el hipocampo, sin embargo, es necesario aumentar el número de experimentos para lograr establecer diferencias estadísticamente significativas.

Muchos flavonoides influyen en la vía ERK, como el EGCG que restaura la actividad de la proteína cinasa C y ERK 1/2 en neuronas sin suero, o la hesperetina que activa la señalización de ERK 1/2 en neuronas corticales (Vauzour *et al.* 2008). La fisteína aumenta la potenciación a largo plazo y mejora el reconocimiento de objetos en ratones

mediante un mecanismo dependiente de la activación de ERK y CREB, ambos se ven activados también por la epicatequina en neuronas corticales (Vauzour *et al.* 2008; Maher *et al.* 2006).

La vía ERK 1/2 activada por el BDNF mediante su receptor TrkB está muy relacionada en la consolidación de la memoria a largo plazo (Bekinschtein *et al.* 2014). La activación de ERK 1/2 regula la actividad sináptica y tiene un rol importante en la inducción y el mantenimiento de la potenciación a largo plazo, así como en la formación de la memoria, y la memoria espacial; en su mayoría, estos efectos se deben a la activación de CREB vía ERK en el hipocampo (Peng *et al.* 2010; Adams y Sweatt, 2002). Por esto, es importante que estudios posteriores evalúen el estado de activación de ERK 1/2 para descartarlo como posible factor involucrado en los efectos de la morina, sin embargo, el aumento en la forma inactiva de GSK3 $\beta$  indica que este factor podría estar involucrado en el efecto que tiene la morina sobre los ratones.

Seguimos tres cascadas de señalización (figura 15), estas vías son activadas por compuestos muy similares en conformación a la morina (Jang *et al.* 2010), y favorecen la memoria al activar esta vía de señalización; por lo tanto proponemos que los efectos de la morina podrían deberse a la activación de la vía Wnt. En el caso de ERK 1/2, puede ser que se activen cascadas de señalización que lleven a su aumento o disminución o que la morina interactúe de forma directa con ERK 1/2 (Bekinschtein *et al.* 2014), sin embargo, debe realizarse el estudio de su forma fosforilada para elucidar su activación.

Basándonos en su estructura química similar a la 7,8-dihydroxiflavona (Jang *et al.* 2010) propusimos que la vía involucrada en el efecto de la morina sea la de los receptores TRK, sin embargo, los resultados no sindicaron que la morina puede ser un activador de la vía wnt/ $\beta$ catenina, pues se observa la inhibición de GSK3 $\beta$ . Se ha demostrado que la actividad de ERK está estrechamente relacionada en aprendizaje espacial (Joseph *et al.* 2003); flavonoides como la epicatequina, la hesperetina y el EGCG activan a ERK 1/2 y generalmente esto lleva a la activación del factor de transcripción CREB que es crítico en la plasticidad sináptica (Flanagan *et al.* 2018), por lo que es importante en investigaciones futuras evaluar este factor de transcripción, la forma activa de las cinasas y otros factores de esta vía y de la vía wnt/ $\beta$ catenina.

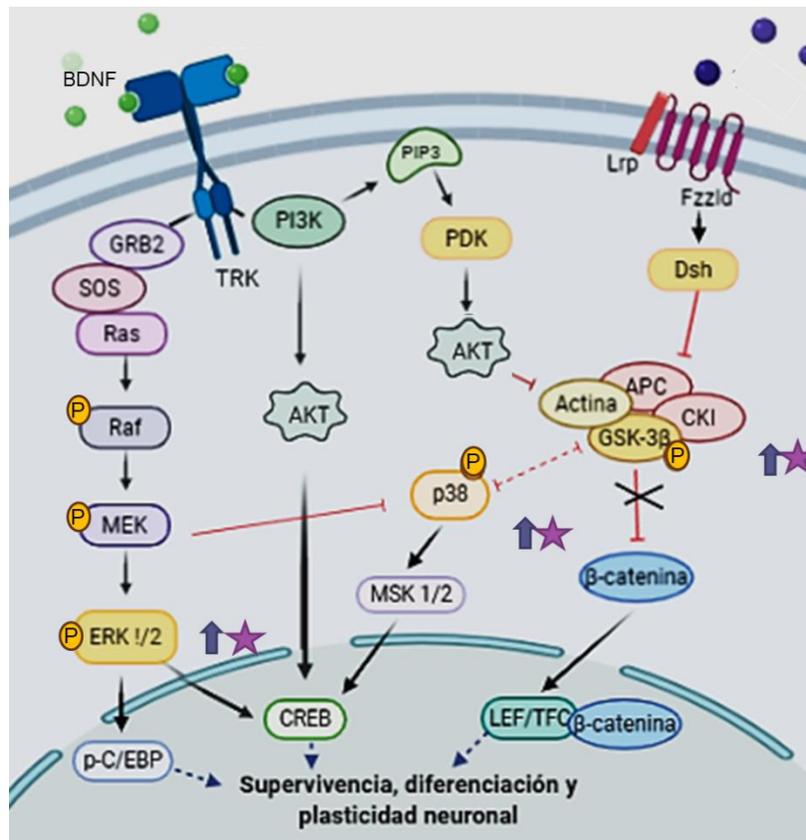


Figura 13. Cambio en los niveles de proteínas después del tratamiento con morina utilizando como vehículo DMSO. Diagrama realizado con información de Pai *et al.* 2017; Bahrami y Drablos, 2016; Alam

et al. 2016 y Rodríguez et al. 2016. †: indica aumento en las proteínas, la estrella significa que el aumento es con morina en dosis de 1 mg/kg en corteza.

El dimetilsulfóxido (DMSO) es un solvente usado comúnmente debido a su capacidad de penetrar tejidos sin causar daño significativo, además, permite o mejora la entrada de sustancias insolubles en agua al sistema nervioso central (Penazzi, 2017), sin embargo, el DMSO puede tener efectos dependientes de la dosis y el tiempo en el organismo. A pesar de que estos efectos son generalmente benéficos, como potenciar el efecto de las sustancias disueltas en él y el aumento en la densidad dendrítica (Kahler, 2000; Penazzi, 2017), es necesario buscar otros vehículos que no tengan interferencias en la observación de los efectos que tiene la sustancia de nuestro interés, la morina, por sí misma sobre la memoria y los mecanismos moleculares involucrados en esta.

Debido a que los ratones tratados con DMSO parecen tener diferencias en los niveles de algunas proteínas en comparación con el resto de los tratamientos, incluyendo BDNF en ratones jóvenes (Martínez-Coria *et al.* 2018), y para prevenir interferencias que pudiera tener este vehículo en las pruebas conductuales y moleculares, se realizó la administración del tratamiento con morina usando como vehículo solución salina alcalinizada con NaOH en proporción 1:10, así mismo, se siguió el tratamiento de 1 mg/kg durante diez días con la prueba conductual en el último día de administración debido a que los resultados indican que con este tratamiento se modifican los niveles de ciertas proteínas, además de que los resultados obtenidos previamente por nuestro grupo de trabajo en pruebas conductuales muestran que esta dosis mejora el rendimiento de los ratones en estas pruebas.

El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) está involucrado en la formación de diferentes tipos de memoria, además de mantener información a largo plazo en el hipocampo, amígdala y la corteza insular después del aprendizaje (Bekinschtein et al. 2014). Además de su papel en la plasticidad sináptica, el BDNF es requerido para el mantenimiento de las espinas dendríticas en el sistema nervioso central adulto, así como en la potenciación a largo plazo y la retención y recuperación de recuerdos (Yamada y Nabeshima, 2003); se ha demostrado que la señalización BDNF-TrkB influye en la densidad sináptica y dendrítica en neuronas hipocampales corticales (Luine y Frankfurt, 2013). Nuestros resultados con el tratamiento de solución salina y morina en dosis de 1 mg/kg administrada con el vehículo de solución salina en ratones envejecidos, muestran que los niveles de BDNF en ratones tratados con morina no es significativamente distinta a los niveles en ratones tratados con solución salina, tanto en ratones jóvenes, como envejecidos; estos resultados concuerdan con la información obtenida previamente por nuestro grupo de trabajo (Martínez-Coria *et al.* 2018).

En estudios con roedores y monos se ha encontrado que los niveles de BDNF en el hipocampo disminuyen en edades avanzadas, lo que se relaciona con el deterioro en la memoria; además, sus niveles disminuyen también en respuesta al estrés (Erickson et al. 2012; Garza et al. 2004). Autores como Garza y colaboradores (2004) sugieren que hay un cambio significativo en la capacidad de respuesta del BDNF regional del hipocampo a lo largo de la vida, y que expresión de BDNF no significa una mayor eficiencia de los efectos que este tiene en el sistema nervioso central (Adlard et al. 2005); es posible que con la edad, los receptores y sistemas que se encargan de producir los efectos del BDNF, requieran este factor en mayor medida para su eficacia.

Nuestros resultados no indican una disminución de BDNF con la edad como lo mencionan otros autores, esto podría ser un indicador de que la edad de cuarenta y seis semanas a nivel molecular no es una edad que pueda considerarse de envejecimiento, sin embargo, faltan más pruebas para confirmar esto.

Es importante notar que los cambios en los niveles de las proteínas bajo el tratamiento con morina, parecen ocurrir en la corteza, por lo que el efecto que la morina tiene sobre la memoria debe estar relacionado con esta estructura cerebral, debido a que se observa un efecto en la memoria contextual con el tratamiento con morina.

Se ha propuesto que los polifenoles como el resveratrol tienen efectos específicamente en el hipocampo, mejorando el desempeño en las tareas de reconocimiento de objetos, las observaciones indican que las dietas que contienen flavonoides propician mejores tiempos de reacción en la memoria de reconocimiento de patrones (Huhn et al. 2018). En la prueba de reconocimiento de objetos con contexto realizada a ratones de la cepa C57BL/6 de once cuarenta y seis semanas de edad, se observa un índice de reconocimiento mayor en los ratones tratados con morina en dosis de 1 mg/kg comparados con el control, lo que indica que la morina tiene un efecto mejorando la memoria contextual en los ratones envejecidos.

Estudios previos indican que el envejecimiento trae consigo una disminución en la memoria y en otros procesos cognitivos (Mahncke et al. 2006; Lau et al. 2005; Pitozzi et al. 2012), que se ve reflejado en un desempeño deficiente en pruebas como la que realizamos; sin embargo, polifenoles presentes en la espinaca, fresas o moras son efectivos revirtiendo los déficits de señalización neuronal relacionados con la edad, así

como el rendimiento cognitivo (Joseph et al. 2003). Nuestros resultados concuerdan con información previa que dice que la morina produce una mejora en procesos cognitivos como la adquisición de aprendizaje y memoria (Dhingra y Soni, 2016; Rivera, 2014), y es importante mencionar que este efecto se observó en ratones de cuarenta y seis semanas, lo que indica que el efecto en la mejora de la memoria se conserva aún en edades avanzadas.

La corteza prefrontal es sumamente importante en la capacidad de aprendizaje, la memoria remota, la memoria de orden temporal y la metamemoria (Shimamura, 1995), así como en la memoria de trabajo, incluida la espacial (Funahashi y Kubota, 1994), sin embargo, nuestra prueba conductual evalúa la memoria contextual que comúnmente se relaciona con el hipocampo; recientemente, se ha mostrado que la memoria de reconocimiento se subdivide en dos componentes neuroanatómicos y funcionales: uno reside en el hipocampo, es lento y se encarga del procesamiento sobre la ocurrencia previa de estímulos, el segundo es el que se encuentra en la corteza, esta es un sistema de discriminación de familiaridad, es decir, procesa la información sobre la novedad o la reaparición de elementos de estímulos individuales (Brown y Aggleton, 2001). Esta información podría relacionarse con los resultados en la prueba de reconocimiento de objetos que se realizó, ya que la morina en dosis de 1 mg/kg, que parece inducir cambios en los niveles de proteínas en la corteza, también mejora la memoria de reconocimiento de objetos en ratones envejecidos. Es importante tener en cuenta que el hipocampo permite la formación y consolidación de la memoria en la neocorteza (Fuster, 2009), por lo que la morina podría estar interviniendo en la consolidación de la memoria, o directamente sobre el hipocampo, por lo que es

importante continuar con la investigación en ratones jóvenes y envejecidos bajo las nuevas condiciones (solución alcalina como vehículo).

Algo resaltable es que los experimentos previos para evaluar el efecto de la morina sobre pruebas conductuales habían sido realizados con ratones adultos, de máximo nueve meses de edad, así como en ratones jóvenes y en algunos modelos de enfermedades neurológicas como la enfermedad de Parkinson y la esquizofrenia; sin embargo, no se habían realizado estudios en modelos de solo envejecimiento como lo es el utilizado en este trabajo experimental.

Realizamos una descripción de factores involucrados en el efecto que tiene la morina sobre la corteza e hipocampo envejecidos, que puede verse reflejado en el desempeño de los ratones en pruebas conductuales de reconocimiento de objetos con contexto, sin embargo, es necesario profundizar en los mecanismos activados por este flavonoide, esto podría realizarse a través de cultivos celulares o en modelos en los que se inhiban los factores de interés para observar si el efecto de la morina es diferente al observado en este trabajo.

Además de profundizar la investigación de los factores moleculares estudiados, es importante observar los cambios celulares que pueden ser inducidos por el tratamiento con morina con el fin de elucidar si están relacionados también en el efecto que tiene este flavonoide sobre procesos cognitivos como la memoria. Para esto, se propone en futuras investigaciones, estudiar la morfometría neuronal bajo el efecto de la morina, centrándonos en áreas como el hipocampo y la corteza que están involucradas en la adquisición y consolidación de la memoria, y comparar el efecto que tienen distintas

dosis de morina en distintas edades (jóvenes y viejos) sobre la densidad de espinas dendríticas y la morfología neuronal, en distintos tipos neuronales.

Se ha demostrado que hay cambios dependientes de tiempo en la densidad de espinas dendríticas en el hipocampo durante la formación de memoria reciente y remota, principalmente un aumento de espinas en el área CA1, de hasta el 20% (Restivo et al. 2009; Leuner et al. 2003), además, debido a que la mayoría de las espinas involucran sinapsis excitadoras en el hipocampo, un aumento en el número de espinas dendríticas generalmente se relaciona con un aumento en la neurotransmisión, que se considera un paso sumamente importante en la formación de la memoria (Leuner et al. 2003).

Así mismo, se han realizado estudios que indican que la suplementación con moras ricas en flavonoides facilita cambios en la fuerza sináptica, a través de la estimulación del crecimiento de espinas dendríticas pequeñas en espinas largas con forma de hongo, sin embargo, no es algo que se restringe a las moras, existe evidencia de que los flavonoides en general son capaces de inducir el crecimiento dendrítico (Spencer, 2010). El BDNF ha mostrado ser un regulador importante de la plasticidad sináptica, además de ser requerido para el mantenimiento de las espinas dendríticas en el sistema nervioso central adulto, al parecer, a través de sistemas rápidos de segundos mensajeros mediados por membrana y a través de mecanismos genómicos, principalmente por la activación del factor de transcripción CREB (Luine y Frankfurt, 2013), se ha postulado que las espinas dendríticas son el sustrato anatómico en la formación y almacenamiento de la memoria (Leuner et al. 2003).

Se propone también, que futuros experimentos se centren en el efecto que tiene la morina sobre otros tipos celulares presentes en el cerebro, principalmente los astrocitos y la microglía, que están estrechamente relacionados con la remodelación sináptica y la protección del sistema nervioso, debido a que estas propiedades en conjunto puede afectar el estado de las redes neuronales, la plasticidad sináptica y la conectividad celular, y finalmente, tener repercusiones en procesos cognitivos como la memoria y el aprendizaje.

Es sumamente importante realizar estudios con sustancias como la morina, que se encuentran en plantas, y que además tienen un enorme potencial en el tratamiento de enfermedades que conlleven el deterioro cognitivo; los flavonoides se caracterizan por su rol neuroprotector en diferentes enfermedades a través de la modulación de la función neural de enfermedades genéticas multifactoriales y esporádicas como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington, la esclerosis múltiple y otras (Tahir et al. 2021), además el efecto que tiene este flavonoide sobre la memoria no es útil únicamente en enfermedades, sino también en el envejecimiento por sí mismo, que involucra el deterioro de redes neuronales y otros problemas fisiológicos.

## **Conclusiones**

- La morina mejora la memoria contextual en ratones envejecidos (cuarenta y seis semanas de edad) de la cepa C57BL/6 en dosis de 1 mg/kg. Este efecto se había observado previamente en ratones jóvenes, lo que indica que el efecto de la morina sobre la memoria se mantiene a través de la edad.

- Los cambios moleculares involucrados con los tratamientos de morina observados en ratones jóvenes son principalmente la inhibición de GSK3 $\beta$ , datos que deben ser corroborados. Involucrando de esta forma, entre otras posibles, la vía Wnt/ $\beta$ catenina y con menor probabilidad la vía del receptor TRKB, como dianas moleculares de la morina.

Reitero que los datos de los primeros western blots de esta tesis son datos preliminares y deben ser confirmados.

Finalmente, las perspectivas que deja esta investigación son: realizar un estudio *in vitro* para elucidar los mecanismos involucrados en el efecto de la morina, primero para averiguar si la morina es un ligando de los receptores TRKB y otro dirigido a las vías de señalización wnt/ $\beta$ catenina y que involucren a ERK 1/2. Así como un estudio histológico para evaluar la morfometría neuronal en corteza e hipocampo y elucidar de esta forma la participación de la morina en plasticidad sináptica.

### **Artículo de revisión**

Paralelo al trabajo experimental redacté un artículo de revisión que lleva por título: El efecto de las hidroxiflavonas en procesos cognitivos y su relación con la enfermedad de Alzheimer. El texto es el anexo 2 y las figuras el anexo 3.

## Referencias bibliográficas

- Aceto, G., Colussi, C., Leone, L., Fusco, S., Rinaudo, M., Scala, F., Green, TA., Laezza, F., D'Ascenzo, M. & Grassi, C. (2020) Chronic mild stress alters synaptic plasticity in the nucleus accumbens through GSK3 beta-dependent modulation of Kv4.2 channels. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america* 117(14): 8143-8153.
- Adams, J. & Sweatt, D. (2002) Molecular psychology: Roles for the ERK MAP Kinase cascade in memory. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42:135-163.
- Adlard, P., Perreau, -v. & Cotman, C. (2005) The exercise-induced expression of BDNF within the hippocampus varies across life-span. *Neurobiology of aging*, 26: 511-520.
- Akinluyi, E., Aderibigbe, A., Adeoluwa, O., Ben-Azu, B., Eduviere, A., Ajayi, A. & umukoro, S. (2020) Morin hydrate attenuates chronic stress-induced memory impairment and degeneration of hippocampal subfields in mice: The role of oxidative, nitrenergic and neuroinflammatory pathways. *Metabolic Brain disease*, 12pp.
- Alam, A., Rallabandi, V. & Roy, P. (2016) Systems biology of immunomodulation for post-stroke neuroplasticity: multimodal implications of pharmacotherapy and neurorehabilitation. *Frontiers in neurology* 7(94):1-16.
- Alberdi, e., Sánchez, M., Ruiz, A., Cavaliere, F., Ortiz, C., Quintela, T., Capetillo, E., Solé, s. & Matute, C. (2018) Mangiferin and morin attenuate oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and neurocytotoxicity, induced by amyloid beta oligomers. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 13 pp.
- Alvarado A, & Salazar A. (2014) Análisis del concepto de envejecimiento. *Gerokomos* 25(2), 57-62.
- Ashabi, G., Ramin, M., Azizi, P., Taslimi, Z., Zeighamy, S., Haghparast, A., Ansari, N., Motamedi, F. & Khodaghali, F. (2012) ERK and p38 inhibitors attenuate memory deficits and increase CREB phosphorylation and PGC-1 $\alpha$  levels in AB-injected rats. *Behavioural brain research* 232:165-173.
- Assunção, M., Santos, M., Carvalho, F. & Andrade, J. (2010) Green tea averts age-dependent decline of hippocampal signaling systems related to antioxidant defenses and survival. *Free radical biology and medicine*. 48(6), 831-838.
- Ávalos, A. & Pérez, E. (2009) Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*. Serie Fisiología Vegetal. 2 (3), 119-145.
- Ayaz, M., Sadiq, A., Junaid, M., Ullah, f., Ovais, M., Ullah, I., Ahmed, J. & Shahid, M. (2019) Flavonoids as prospective neuroprotectants and their therapeutic

propensity in aging associated neurological disorders. *Frontiers aging neuroscience*, 11(155): 20pp.

- Babaei, F., Mirzababaei, M. & Nassiri, M. (2018) Quercetin in food: possible mechanisms of its effects on memory. *Journal of food science*, 83(9):2280-2286.
- Bahrami, S. & Drablos, F. (2016) Gene regulation in the immediate-early response process. *Advances in biological regulation*, 62.
- Bakhtiari, M., Panahi, Y., Ameli, J. & Darvishi, B. (2017) Protective effects of flavonoids against Alzheimer's disease-related neural dysfunctions. *Biomedicine & pharmacotherapy* 93: 218-229.
- Bakoyiannis, I., Daskalopoulou, A., Pergialiotis, V. & Perrea, D. (2019) Phytochemicals and cognitive health: are flavonoids doing the trick? *Biomedicine & pharmacotherapy*, 109: 11pp.
- Barrera-Reyes, P., Cortés-Fernández, J., González-Soto, M & Tejero, E. (2020) Effects of cocoa-derived polyphenols on cognitive function in human. Systematic review and analysis of methodological aspects. *Plant foods for human nutrition*, Enero. 11 pp.
- Bekinschtein, P., Cammarota, M. & Medina, G. (2014) BDNF and memory processing. *Neuropharmacology* 76: 677-683.
- Ben-Azu B, Oldele A, Mayowa A, Okubo A., Umokoro S. & Iwalewa E. (2018) Involvement of GABAergic, BDNF and Nox-2 mechanisms in the prevention and reversal of ketamine-induced schizophrenia-like behavior by morin in mice. *Brain research bulletin*, 43 pp.
- Ben-Azu, B., Oladele, A., Omogbiya, I., Mayowa, A., Owoeye, O., Olonode, E. & Iwalwea, E. (2018) Probable mechanisms involved in the antipsychotic-like activity of morin in mice. *Biomedicine and pharmacotherapy*, 105: 1079-1090.
- Bhullar, K. & Rupasinghe, V. (2013) Polyphenols: multipotent therapeutic agents in neurodegenerative diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity*: 18 pp.
- Biotechne. Western Blot Handbook, novus biologicals, 041316. Disponible en línea: [https://images.novusbio.com/design/BR\\_westernblotguide\\_042816b.pdf](https://images.novusbio.com/design/BR_westernblotguide_042816b.pdf)
- Boldrini, M., Fulmore, C., Tartt, A., Simeon, L., Pavlova, I., Poposka, V., Rosoklija, G., Stankov, A., Arango, V., Dwork, A., Hen, R. & Mann, J. (2018) Human hippocampal neurogenesis persists throughout aging. *Cell Stem Cell*, 22: 589-599.
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-Dye Binding. *Analytical biochemistry*, 72: 248-254.

- Brown, M., & Aggleton, J. (2002) Recognition memory: what is the roles of the perirhinal cortex and hippocampus? *Nature reviews neuroscience*, 2: 51-61.
- Burke, S. & Barnes, C. (2006) Neural plasticity in the ageing brain. *Nature reviews*, 7: 30-41.
- Burmeister, S. & Liu, Y. (2020) Integrative comparative cognition: can neurobiology and neurogenomics inform comparative analyses of cognitive phenotype?. Oxford University press on behalf of the society for integrative and comparative biology: 11pp.
- Buscà, R., Pouysségur, J. & Lenormand, P. (2016) ERK1 and ERK2 Map kinases: specific roles or functional redundancy?. *Frontiers in cell and developmental biology*, 4(53): 23 pp.
- Campos-Esparza, M., Sánchez-Gómez, M. & Matute, C. (2009) Molecular mechanisms of neuroprotection by two natural antioxidant polyphenols. *Cell Calcium*, 45(4): 358-368.
- Campos-Esparza, M. & Torres-Ramos, M. (2010) Neuroprotection by natural polyphenols: molecular mechanisms. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*. 10(4), 269-277.
- Carrillo, J., Zafrilla, M. & Marhuenda, J. (2019) Cognitive function and consumption of fruit and vegetable polyphenols in a young population: Is there a relationship? *Foods* 8 (507):17 pp.
- Casamenti, F. & Stefani, M. (2017) Olive polyphenols: new promising agents to combat aging-associated neurodegeneration. *Expert Review of neurotherapeutics*, 17(4): 345-358.
- Caselli A, Cirri P, Santi A. & Paoli P. (2016) Morin: a promising natural drug. *Current medicinal chemistry*, 23: 18.
- Cowell, R., Barense, M. & Sadil, P. (2019) a roadmap for understanding memory: decomposing cognitive processes into operations and representations. *ENEURO*, 122 (19): 1-19.
- Crozier, A., Jaganath, I. & Clifford, M. (2009) dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural products reports*, 26: 1001-1043.
- Dai, H., Hu, W., Jiang, L., Li, L., Gaung, X. & Xiao, Z. (2016) P38 MAPK inhibition improves synaptic plasticity and memory in angiotensin II-dependent hypertensive mice. *Scientific reports*, 6:27600.
- Del Río, D., Rodríguez, A., Spencer, J., Tognolini, M., Borges, G. & Crozier, A. (2013) Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. *Antioxidant and redox signaling*. 18(14), 1818-1892.

- Dhingra, D. & Soni, K. (2016) Improvement of learning and memory by morin, a flavonoid in young and aged mice. *Pharmacologia*, 7:75-82.
- Dhivya, S., Latha, S. & Selvamani, P. (2016) Enhancement of cognitive performance in mice and in vitro acetyl-cholinesterase inhibitory activity of 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone isolated from *Cadaba indica*. *Bangladesh J Pharmacol* (11): 886-893.
- Dias G, Cavegn N, Nix A, Stangl D, Suarhul M, Egidio A, Franca P. & Thiret S. (2012) The Role of Dietary Polyphenols on Adult Hippocampal Neurogenesis: Molecular Mechanisms and Behavioural Effects on Depression and Anxiety. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 18pp.
- Di Meo, f., Valentino, A., Petillo, O., Peluso, G., Filosa, S. & Crispi, S. (2020) Bioactive polyphenols and neuromodulation: Molecular mechanisms in neurodegeneration. *International Journal of Molecular Sciences* 21 (2564): 21 pp.
- Du, Y., Qu, J., Zhang, W., Bai, M., Zhou, Q., Zhang, Z., Li. Z. & Miao, J. (2016) Morin reverses neuropathological and cognitive impairments in APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mice by targeting multiple pathogenic mechanisms. *Neuropharmacology*, 108: 1-13.
- El-Gazar, A., Soubh, A., Mohamed, E., Awas, A. & El-Abhar, H. (2019) Morin post-treatment confers neuroprotection in a novel rat model of mild repetitive traumatic brain injury by targeting dementia markers. *Brain research*.
- Erickson, K., Miller, D. & Roecklein, K. (2012) The aging hippocampus: interactions between exercise, depression, and BDNF. *The neuroscientist*, 18(1): 82-97.
- Fang, F., Li, J., Pan, Q. & Huang, W. (2007) Determination of red wine flavonoids by HPLC and effect of aging. *Food chemistry*, 101: 428-433.
- Flanagan, E., Müller, M., Hornberger, M. & Vauzour, D. (2018) Impact of flavonoids on cellular and molecular mechanisms underlying age-related cognitive decline and neurodegeneration. *Current nutrition reports*, 7: 49-57.
- Flatt, T. & Partridge, L. (2018) Horizons in the evolution of aging. *BMC biology*, 16(93): 13 pp.
- Frandsen, J., Choi, S. & Narayanasamy, P. (2020) Neural glyoxalase pathway enhancement by morin derivatives in an Alzheimer's disease model. *ACS chemical neuroscience*: 25 pp.
- Funahashi, S. & Kubota, K. (1994) Working memory and prefrontal cortex. *Neuroscience research*, 21(1): 1-11.
- Fuster, J (2009) Cortex and memory: emergence of a new paradigm. *Journal of cognitive neuroscience*, 21(11): 2047-2072.

- Gabbott, P. & Somogyi, J. (1984) The “single” section Golgi-impregnation procedure: methodological description. *Journal of Neuroscience Methods*. 11(4), 221–230.
- Gallistel, C. & Matzel, L. (2013) The neuroscience of learning: Beyond the hebbian synapse. *Annual review of psychology*, 64: 169-200.
- Garza, A., Ha, T., Garcia, C., Chen, M. & Russo-Neustadt, A. (2004) Exercise, antidepressant treatment, and BDNF mRNA expression in the aging brain. *Pharmacology, biochemistry and behavior*, 77: 209-220.
- Gong, E., Park, H., Kim, M., Piao, S., Lee, E., Jo, D., Chung, H., Ha, N., Mattson, M. & Lee, J. (2011) Morin attenuates tau hyperphosphorylation by inhibiting GSK3B. *Neurobiology of disease*, 44: 223-230.
- González, R., Ballester, I., López, R., Suárez, M., Zarzuelo, A., Martínez, O. & Sánchez, F. (2011) Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation. *Critical reviews in food science and nutrition*, 51(4): 331-362.
- Gottlieb, M., Leal, R., Campos, M., Sánchez, M., Alberdi, E., Arranz, A., Delgado, J., Gruart, A. & Matute, C. (2006) Neuroprotection by two polyphenols following excitotoxicity and experimental ischemia. *Neurobiology of disease*. 23(2), 374-386.
- Hanslick, J., Lau, K., Noguchi, K., Olney, J., Zorumski, C., Mannerick, S. & Farber, N. (2009) Dimethyl sulfoxide (DMSO) produces widespread apoptosis in the developing central nervous system. *Neurobiology disease* 34(1): 1-12.
- Harada, N., Naoaki., Zhao, J., Kurihara, H., Nakagata, N. & Okajima, K. (2011) Resveratrol improves cognitive function in mice by increasing production of insulin-like growth factor-I in the hippocampus. *The journal of nutritional biochemistry*, 22(12). Elsevier Inc.: 1150-59.
- Huhn, S., Beyer, F., Zhang, R., Lampe, L., Grothe, J., Kratzsch, J., Wilenberg, A., Breitfeld, J., Kovacs, P., Strumvoll, -m., Trampel, R., Bazin, P., Villringer, A. & Witte, V. (2018) Effects of resveratrol on memory performance, hippocampus connectivity and microstructure in older adults- a randomized controlled trial. *Neuroimage*, 174: 177-190.
- Ignacio-Juárez A. (2019) Efecto de la morina sobre la neurogénesis en ratones adultos sanos. Universidad Nacional Autónoma de México, 65 pp.
- Inestrosa, N. & Arenas, E. (2010) Emerging roles of Wnts in the adult nervous system. *Nature reviews, Neuroscience* 11(2):77-86.
- Jang S, Liu X, Yepes M, Shepperd K, Miller G, Liu Y, Wilson W, Shiao G, Bianchi B, Sun Y. & Ye K. (2010) A selective TrkB agonist with potent neurotrophic activities by 7,8-dihydroxyflavone. *PINAS*, 107(6), 2687-2692.

- Joseph, J., Shukitt-Hale, B., Denisova, N., Bielinski, D., Martin, A., McEwen, J. & Bickford, P. (1999) Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction in cognitive, and motor behavioral deficits with blueberry, spinach, or strawberry dietary supplementation. *The journal of neuroscience*, 19(18): 8114-8121.
- Joseph, J., Denisova, N., Arendash, G., Gordon, M., diamond, D., Shukitt-Hale, B. & Morgan, D. (2003) Blueberry supplementation enhances signaling and prevents behavioral deficits in an Alzheimer disease model. *Nutritional neuroscience*, 6(3): 153-162.
- Kahler, C. (2000) Evaluation of the use of the dimethyl sulfoxide in chemiluminescent studies. *Blood cells, molecules and diseases* (26(6): 626-633.
- Kanasi, E., Ayilavarapu, S. & Jones, J. (2016) The aging population: demographics and the biology of aging. *Periodontology 2000*, 72: 13-18.
- Karar, P. (2019) Biological activities of flavonoids: an overview. *International Journal of Pharmaceutical sciences and research*, 10(4): 1567-1574.
- Kennedy, D. (2014) Polyphenols and the human brain: plant secondary metabolite ecologic roles and endogenous functions drive benefits. *American Society for nutrition. Adv. Nutr*, 5: 515-533.
- Krikorian R, Shidler M, Nash T, Kalt W, Vinqvist M, Shukitt B. & Joseph J. (2010) Blueberry supplementation improves memory in older adults. *J. Agric. Food. Chem*, 58: 3996-4000.
- Kim, S & Park, J. (2019) Morin hydrate attenuates CSE-induced lipid accumulation, ER stress, and oxidative stress in RPE cells: implications for age-related macular degeneration, *Free Radical Research*.
- Lau, F., Shukitt-Hale, B. & Joseph, J. (2005) The beneficial effects of fruit polyphenols on brain aging. *Neurobiology of aging*, 26: 128-132.
- Lee, K., Lee, Y., Chun, H., Kim, A., Kim, J., Lee, J., Ishigami, a. & Lee, J. (2016) Neuroprotective and anti-inflammatory effects of morin in a murine model of Parkinson's disease. *Journal of neuroscience research*. 14 pp.
- Lee S, Kim D, Lee D, Jean S, Lee C, Son K, Jung J, Shin C, Ryu K. (2010) Oroxylin A, a Flavonoid, Stimulates adult neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus region of mice. *Neurochemistry research*, 35: 1725-1732.
- Letenneur L, Proust S, Gouge A, Dartigues J. & Barberger G. (2007) Flavonoid intake and cognitive decline over a 10-year period. *Am. J. Epidemiol*, 165: 1364-1371.

- Leuner, B., Falduto, J. & Shors, T. (2003) Associative memory formation increases the observation of dendritic spines in the hippocampus. *The Journal of neuroscience*, 23(2): 659-665.
- Liguori, I., Rosso, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D. & Abete, P. (2018) Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical interventions in aging*, 13: 757-772.
- Lu, Y., Christian, K. & Lu, B. (2008) BDNF: a key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory. *Neurobiology of learning and memory*, 89: 312-323.
- Luine, V. & Frankfurt, M. (2013) Interactions between estradiol, BDNF and dendritic spines in promoting memory. *Neuroscience*, 34-35.
- Lund, J. S. (1973) Organization of neurons in the visual cortex, area 17, of the monkey (*Macaca mulatta*). *The Journal of Comparative Neurology*, 147(4): 455-495.
- Maher, P., Akaishi, T. & Abe, K. (2006) Flavonoid fistein promotes ERK-dependent long-term potentiation and enhances memory. *PNAS* 103(44): 16568-16573.
- Mahncke H, Connor B, Appleman J, Ahsanuddin O, Hardy J, Wood R, Joyce N, Boniske T, Atkins S. & Merzenich M. (2006) Memory enhancement in healthy older adults using a brain plasticity-based training program: A randomized, controlled study. *PNAS*, 103(33): 12523-12528.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C. & Jiménez L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 79:727- 47.
- Mandel, S., amit, T., Weinreb, O. & Youdim, M. (2011) Understanding the broad-spectrum neuroprotective action profile of green tea polyphenols in aging and neurodegenerative diseases. *Journal of Alzheimer's disease*, 25: 187-208.
- Marshall, P. & Bredy, T. (2016) Cognitive neuroepigenetics: the next evolution in our understanding of the molecular mechanisms underlying learning and memory. *Science of learning*, 1 (16014): 8 pp.
- Martínez-Coria, H., Green, K., Billings, L., Kitazawa, M., Albrecht, M., Rammes, G., Parsons, C., Gupta, S., Banerjee, P. & LaFeria, F. (2010) Memantine improves cognition and reduces Alzheimer's-like neuropathology in transgenic mice. *The American Journal of Pathology*, 176(2): 870-880.
- Martínez-Coria, H., Serrano-García, N., López-Chávez, G., González-Muñiz, Y., López-Valdéz, H., Orozco-Ibarra, M., Torres-Ramos, M. (2018) Subchronic treatment with Morin improves memory in healthy mice, Society for neuroscience meeting, noviembre, 3-7, San Diego, California.

- Marx, W., Kelly, J., Marshall, S., Cutajar, J., Annois, B., Pipingas, A., Tierney, A. & Iltiopoulos, C. (2018) Effect of resveratrol supplementation on cognitive performance and mood in adults: a systematic literature review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrition reviews* 76(6): 432-443.
- Mattson, M. & Arumugam, T. (2018) Hallmarks of brain aging: adaptive and pathological modifications by metabolic states. *Cell metabolism, Perspective*, 27: 1176-1199.
- McHugh, D. & Gil, J. (2018) Senescence and aging: causes, consequences and therapeutic avenues. *J Cell Biol*, 217(1): 65-77.
- Ménard, C., Hein, P., Paquin, A., Savelson, A., Ming, X., Lederfein, D. & Bernabé-Heider, F. (2002) An essential role for a MEK-C/EBP pathway during growth factor-regulated cortical neurogenesis. *Neuron* 36:597-610.
- Murphy, A., Bertolero, M., Papadopoulos, L., Lydon, D. & Bassett, D. (2020) Multimodal network dynamics underpinning working memory. *Nature communications*, 11: 3035.
- Narayan, S., Kwatra, M., Kumar, D., Choubey, P., Lahkar, M. & Jangra, A. (2020) 7,8-dihydroxyflavone alleviated the high-fat diet and alcohol-induced memory impairment: behavioral, biochemical and molecular evidence. *Psychopharmacology*: 14pp.
- Olivares J, Juárez A & García F. (2015) El hipocampo: neurogénesis y aprendizaje *Revista médica de la Universidad de Veracruz*, 20-29.
- Pai, S., Carneiro, B., Mota, J., Costa, R., Leite, C., Barroso, R., Kapla, J., Chae, Y. & Giles, F. (2017) Wnt/beta-catenin pathway: a potential anticancer immune response. *Journal of hematology and oncology*, 10(1).
- Park H. & Lee J. (2011) Neurogenic contributions made by dietary regulation to hippocampal neurogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1229:23-28.
- Panche, A.M. Diwan, A. & Chandra, S. (2016) Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, 5(e47): 15pp.
- Penazzi, L., Lorengel, J., Sündermann, F., Golovyashkina, N., Marre, S., Mathis, C., Lewejohann, L., Brant, R. & Bakota, L. (2017) DMSO modulates CNS function in a preclinical Alzheimer's disease model. *Neuropharmacology* 113: 434-444.
- Peng, S., Zhang, Y., Zhang, J., Wang, H. & Ren, B. (2010) ERK in learning and memory: A review of recent research. *Int. J. Mol. Sci.* 11(1): 222-232.
- Pereira, G., Vianello, F., Corres, C., Da Silva, S. & Galhardo, M. (2014) Polyphenols in Fruits and Vegetables and Its Effect on Human Health. *Food and nutrition sciences*. (5): 1065-1082.

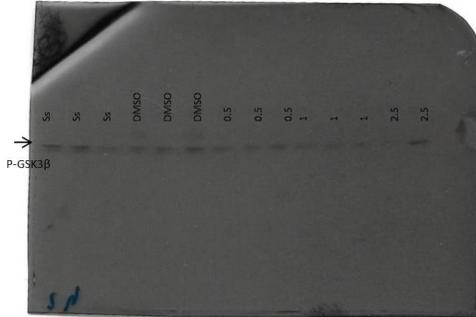
- Pitozzi, V., Jacomelli, M., Catelan, D., Servili, M., Taticchi, A., Biggeri, A., Dolara, P. & Giovannelli, L. (2012) Long-term dietary extra-virgin olive oil rich in polyphenols reverses age-related dysfunctions in motor coordination and contextual memory in mice: Role of oxidative stress. *Rejuvenation research*, 15(6): 601-612.
- Rendeiro, C., Vauzour, D., Rattray, M., Waffo-Téguo, P., Mérillon, M., Butlres, L., Williams, C. & Spencer, J. (2013) Dietary levels of pure flavonoids improve spatial memory performance and increase hippocampal brain-derive neurotrophic factor. *PLoS One*, 8(5): e63535.
- Restivo, L., Vetere, G., Bontempi, B. & Ammassari, M. (2009) The formation of recent and remote memory is associated with time-dependent formation of dendritic spines in the hippocampus and anterior cingulate cortex. *The journal of neuroscience*, 29(25): 8206-8214.
- Rivera J, Silva D, Rodríguez C, Bringas M, Flores G, Campos A. & Torres M. (2014) Evaluación de la memoria espacial y de la morfología neuronal en el hipocampo de ratones sanos tratados con morina. *Arch Neurocién (Mex)*, 19(1): 16-19.
- Rodríguez, E., Gámez, B. & Ventura, F. (2016) P38 MAPK signalling in osteoblast differentiation. *Front. Cell Dev. Biol.* 4(40): 2o pp.
- Rossato, J., Bevilaqua, L., Lima J., Medina, J., Izquierdo, I. & Cammarota, M. (2006) On the participation of hippocampal p38 mitogen-activated protein kinase in extinction and reacquisition of inhibitory avoidance memory. *Neuroscience* 143: 15-23.
- Rosnagl, S., Algrock, E., Sens, C., Kraft, S., Rau, K., Milsom, M., Giese, T., Samstag, Y. & Nakchbandi, I. (2016) EDA-Fibronectin Originating from Osteoblasts inhibits the immune response against cancer. *PLOS Biology*: 32 pp.
- Seibenhener, M. & Wooten, M. Isolation and Culture of hippocampal neurons from prenatal mice. Auburn University.
- Shahidi, F. & Naczki, M. (1995) Food phenolics, sources, chemistry, effects, applications. Technomic publishing Co Inc. 414 pp.
- Shimamura, A. (1995) Memory and the prefrontal cortex. En Grafman, K. & Boller, F. *Annals of the new york academy of sciences*, New York academy of sciences, 769: 151-159.
- Shukitt-Hale, B., Bielinski, D., Lau, F., Willis, L., Carey, A. & Joseph, J. (2015) The beneficial effects of berries on cognition, motor behaviour and neuronal function in ageing. *British Journal of Nutrition*, 114(10):1542-1549.

- Singh, P., Sivanandam, T., Konar, A. & Thakur, M. (2021) Role of nutraceuticals in cognition during aging and related disorders. *Neurochemistry international*, 143: 11 pp.
- Spagnuolo, C., Moccia, S. & Russo, G. (2017) Anti-inflammatory effects of flavonoids in neurodegenerative disorders. *European journal of medicinal chemistry*: 11 pp.
- Spencer, J., Vazour, D. & Rendeiro, C. (2009) Flavonoids and cognition: The molecular mechanisms underlying their behavioural effects. *Archives of biochemistry and biophysics*. 492(2): 1-9.
- Spencer, J. (2010) The impact of fruit flavonoids on memory and cognition. *British journal of nutrition*, 104: s40-s47.
- Stagini, F., Glacomini, A., Guidi, S., Emili, M., Uguagliati, B., Salvalai, M., Bortolotto, V., Grilli, M., Rimondibi, R. & Bartesaghi, R. (2017) A flavonoid agonist of the TrkB receptor for BDNF improves hippocampal neurogenesis and hippocampus-dependent memory in the Ts65Dn mouse model of DS. *Experimental neurology*, 298:78-96.
- Stangl, D. & Thuret, S. (2009) Impact of diet on adult hippocampal neurogenesis. *Genes Nutr*, 4(4): 271-282.
- Suárez I. (2015) Papel de la neurogenesis hippocampal adulta en los procesos cognitivos que dependen del hipocampo. Tesis doctoral, Universidad Pablo de Olavide, 202pp.
- Taguchi, K., Hida, M., Hasegawa, M., Matsumoto, T. & Kobayashi, T. (2016) Dietary polyphenol morin rescues endotelial dysfunction in a diabetic mouse model by activating the Akt/eNOS pathway. *Mol Nutr Food Res*, 60: 580-588.
- Tahir, M., Almezgagi, M., Zhang, Y., Bashir, A., Mazhar, H., Gamah, M., Xiaozhou, W., Qinfang, Z., Xiangqun, S., Qianqian, M., alei, M., Ahmed, Z., Malik, W. & Zhang, W. (2021) Mechanistic new insights of flavonols on neurodegenerative diseases. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 137: 111253.
- Torres, M., Martínez, H., Serrano, N., López, G., Orozco, M., González, A. & López, H. (2018) Astrocytes activation induced by morin improves recognition memory in healthy mouse. Póster presentado en: CDMX, México.
- Vauzour, D., Vafeiadou, K., Rodríguez-Mateos, A., Rendeiro, C. & Spencer, J. (2008) The neuroprotective potential of flavonoids: a multiplicity of effects. *Genes Nutr*, 3(4): 115-126.
- Vazour, D. (2012) Dietary polyphenols as modulators of brain functions: Biological actions and molecular mechanisms underpinning their beneficial effects. *Oxidative and cellular longevity*: 16 pp.

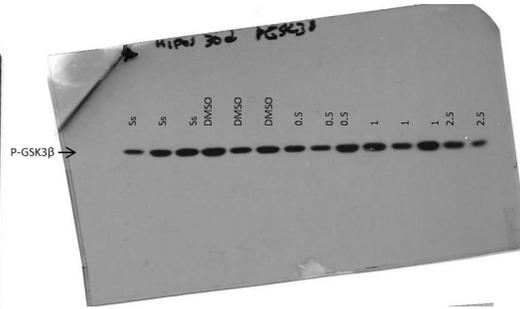
- Vidak, M., Rozman, D. & Komel, R. (2015) Effects of flavonoids from food and dietary supplements on glial and glioblastoma multiforme cells. *Molecules*, 20: 19406-19432.
- Wallis, J. (2018) Decoding cognitive processes from neural ensembles. *Trends Cogn Sci*, 22(12): 1091-1102.
- Wagner, K., Cameron-Smith, D., Wessner, B. & Franzke, B. (2016) Biomarkers of aging: from function to molecular biology. *Nutrients*, 8 (338): 12 pp.
- Williams, R. & Spencer, J. (2012) Flavonoids, cognition, and dementia: actions, mechanisms, and potential therapeutic utility for Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med*, 52(1): 35-45.
- Winner, B., Kohl, Z. & Gage, F. (2011) Neurodegenerative disease and adult neurogenesis. *European Journal of Neuroscience*, 33(6): 1139-1151.
- Xia, S., Chen, W., McDermott, J. & Han, J. (2017) Molecular and phenotypic biomarkers of aging. *F1000 Research*, 6(860): 10 pp.
- Yamada, K. & Nabeshima, T. (2003) Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. *J Pharmacol Sci*, 91: 267-270.
- Yang, S., Zhou, G., Liu, H., Zhang, B., Li, J., Cui, R. & Du, Y. (2013) Protective effects of p38 MAPK inhibitor SB202190 against hippocampal apoptosis and spatial learning and memory deficits in rat model of vascular dementia. *BioMed research international*: 9pp.
- Yu, X., Oh, M. & Disterhoft, J. (2017) CREB, cellular excitability, and cognition: implications for aging. *Behav brain res*, 30(322): 206-211.
- Yu, K., Kwan, P., Cheunf, S., Ho, A. & Baum, L. (2018) Effects of resveratrol and morin on insoluble tau in tau transgenic mice. *Translational neuroscience*, 9: 54-60.
- Zaqout, S. & Kaindl, A. (2016) Golgi-Cox Staining Step by Step. *Frontiers in neuroanatomy*, 10-38.
- Zhang, R., Kang, K., Piao, M., Maeng, Y., Lee, K., Chang, W., You, H., Kim, J., Kang, S. & Hyun, J. (2008) Cellular protection of morin against oxidative stress induced by hydrogen peroxide. *Chemico-biological interactions*, 177: 21-27.

# Anexo.Evidencias experimentales de Western blot: Películas originales y gráficas de la cuantificación de proteínas.

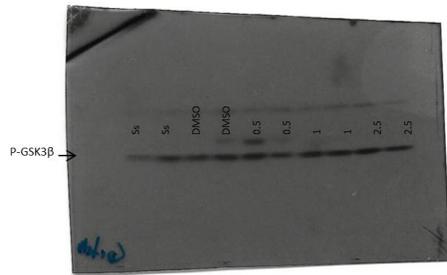
**1. p-GSK3 $\beta$**  42,44 kD  
a) Hipocampo 10 días



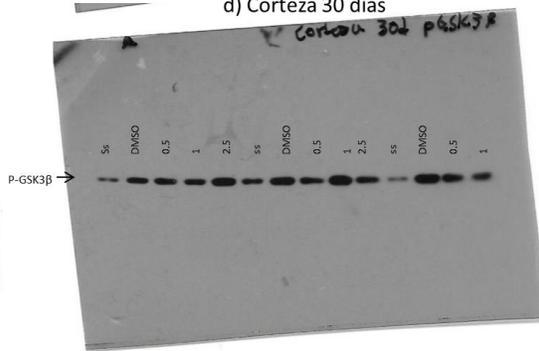
b) Hipocampo 30 días



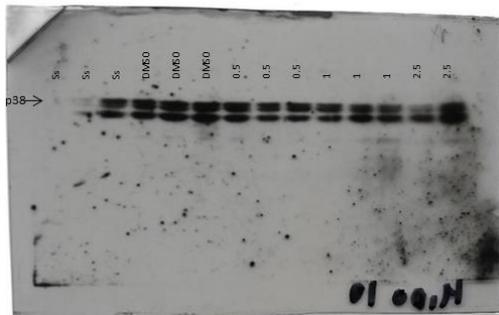
c) Corteza 10 días



d) Corteza 30 días



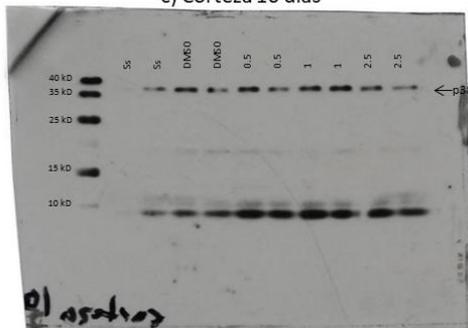
**2. p38** 38 kD  
a) Hipocampo 10 días



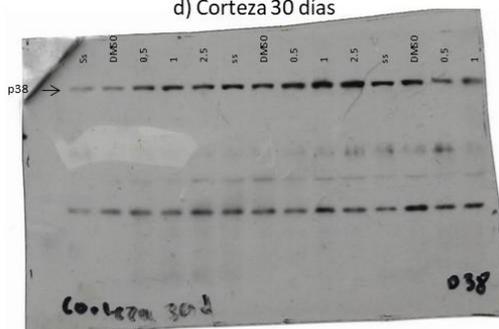
b) Hipocampo 30 días



c) Corteza 10 días

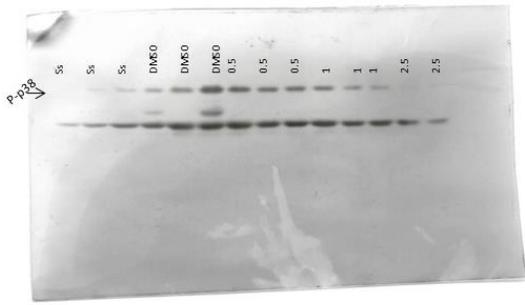


d) Corteza 30 días

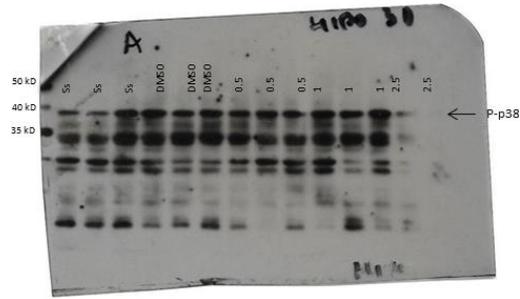


**3. p-p38**  
38 kD

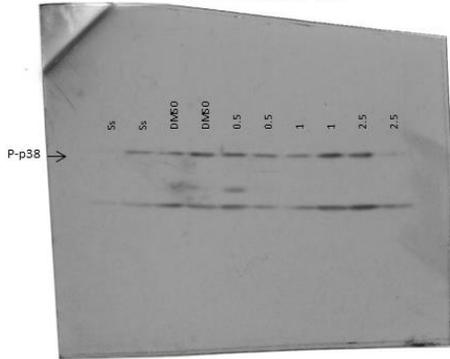
a) Hipocampo 10 días



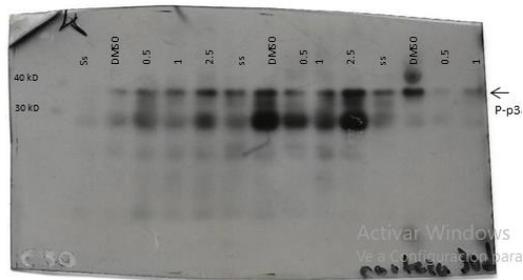
b) Hipocampo 30 días



c) Corteza 10 días



d) Corteza 30 días

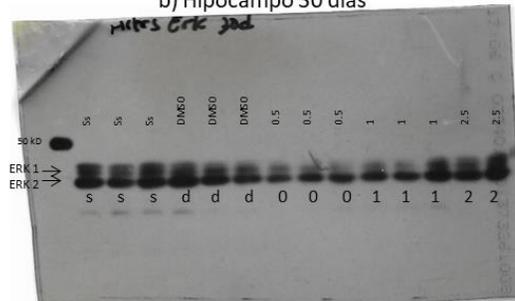


**4. ERK 1/2**  
44,42 kD

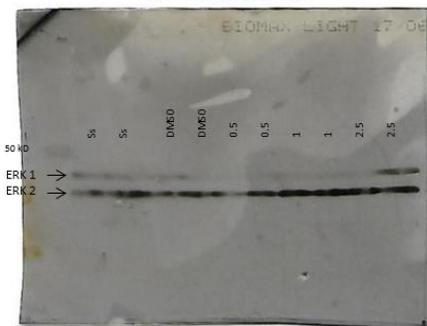
a) Hipocampo 10 días



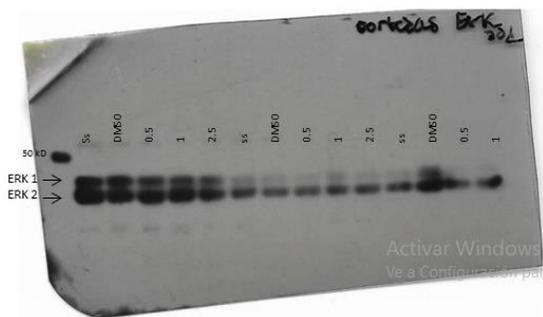
b) Hipocampo 30 días



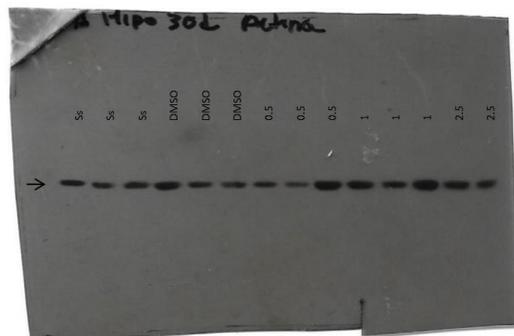
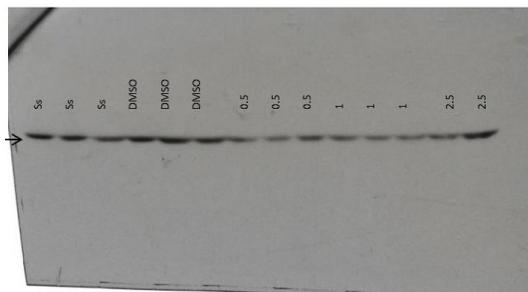
c) Corteza 10 días



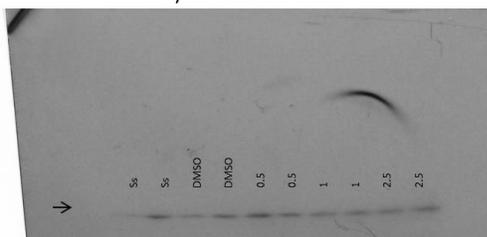
d) Corteza 30 días



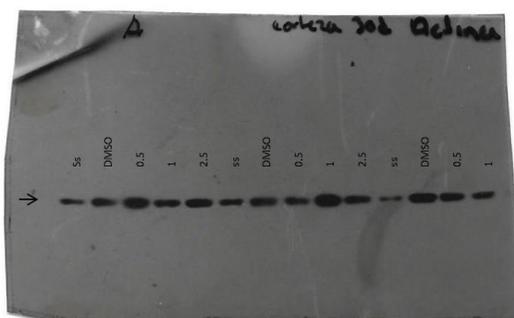
**5. Actina** a) Hipocampo 10 días



c) Corteza 10 días

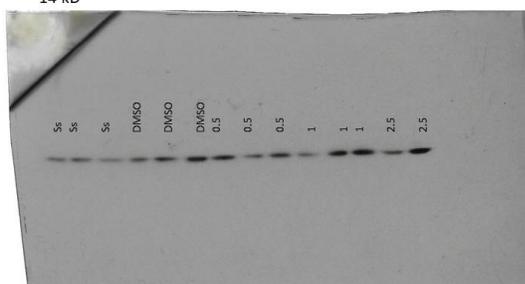


d) Corteza 30 días

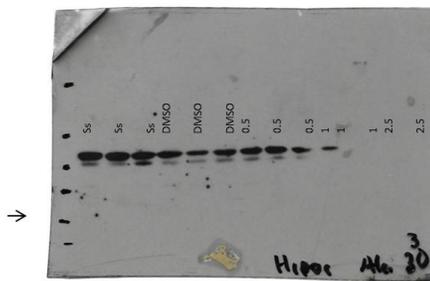


**6. BDNF**  
14 kD

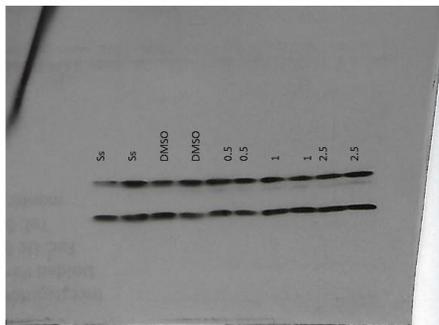
a) Hipocampo 10 días



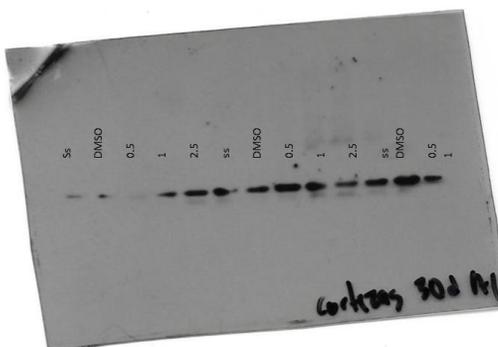
b) Hipocampo 30 días



c) Corteza 10 días

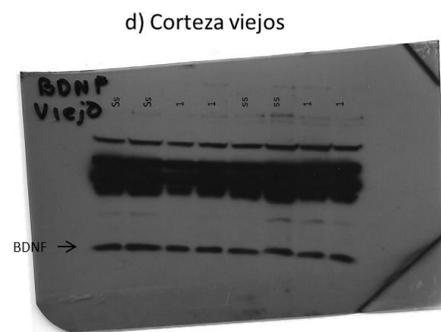
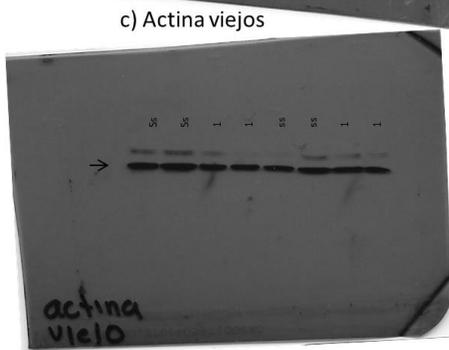
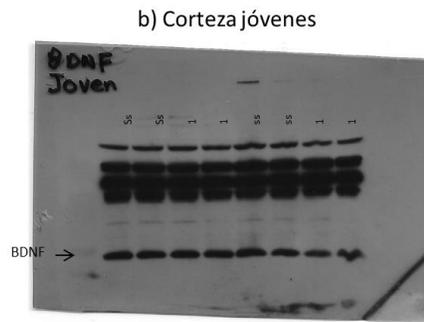
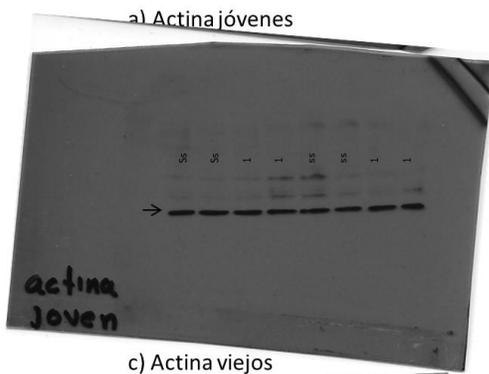


d) Corteza 30 días



Nota: en la tesis quitamos BDNF porque no aparecen en el peso molecular esperado.

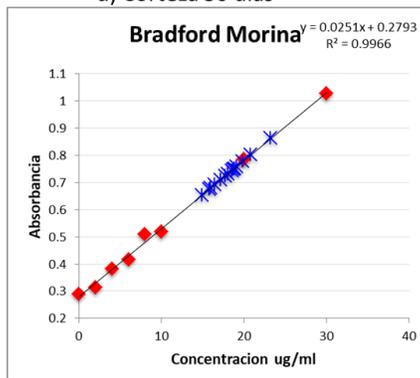
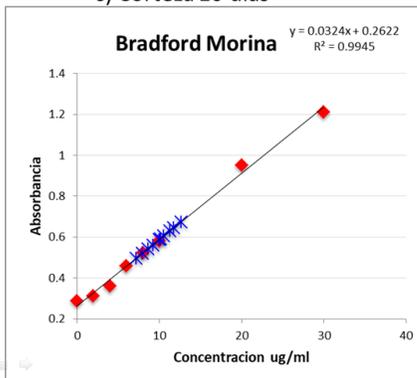
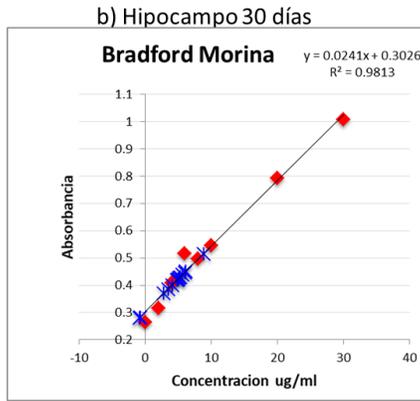
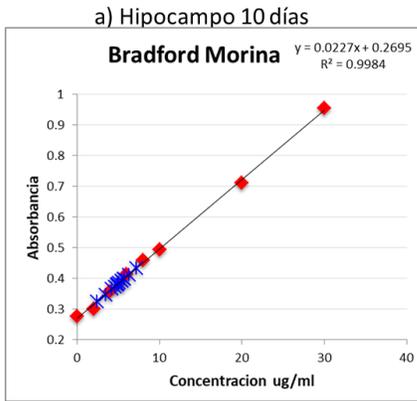
7. BDNF viejos vs jóvenes  
14 kD



Se presentan las gráficas correspondientes a la cuantificación de proteínas por el método de Bradford de todas las muestras. Las cruces azules representan las muestras y los cuadros rojos son las concentraciones conocidas de la curva estándar (siguiente página).

## 8. Cuantificación de proteínas 10 vs 30 días

Rojo: curva patrón, azul: muestras



## 9. Cuantificación de proteínas Jóvenes vs viejos

Rojo: curva patrón, azul: muestras

