



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFECTO DE LA MORINA SOBRE LA
PROLIFERACIÓN CELULAR RELACIONADA CON
NEUROGÉNESIS EN HIPOCAMPO DE RATONES
ADULTOS SANOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

JOSÉ RIVERA ALVAREZ



**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MÓNICA ADRIANA TORRES RAMOS
2015**

CIUDAD UNIVERSITARIA, D. F.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

Rivera
Alvarez
José
55-40-81-95-01
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
307031219

2.- DATOS DEL TUTOR

Dra.
Mónica Adriana
Torres
Ramos

3.- DATOS DEL SINODAL 1

Dra.
Pilar
Durán
Hernández

4.- DATOS DEL SINODAL 2

Dr.
Alonso
Martínez
Canabal

5.-DATOS DEL SINODAL 3

Dra.
Hilda
Martínez
Coria

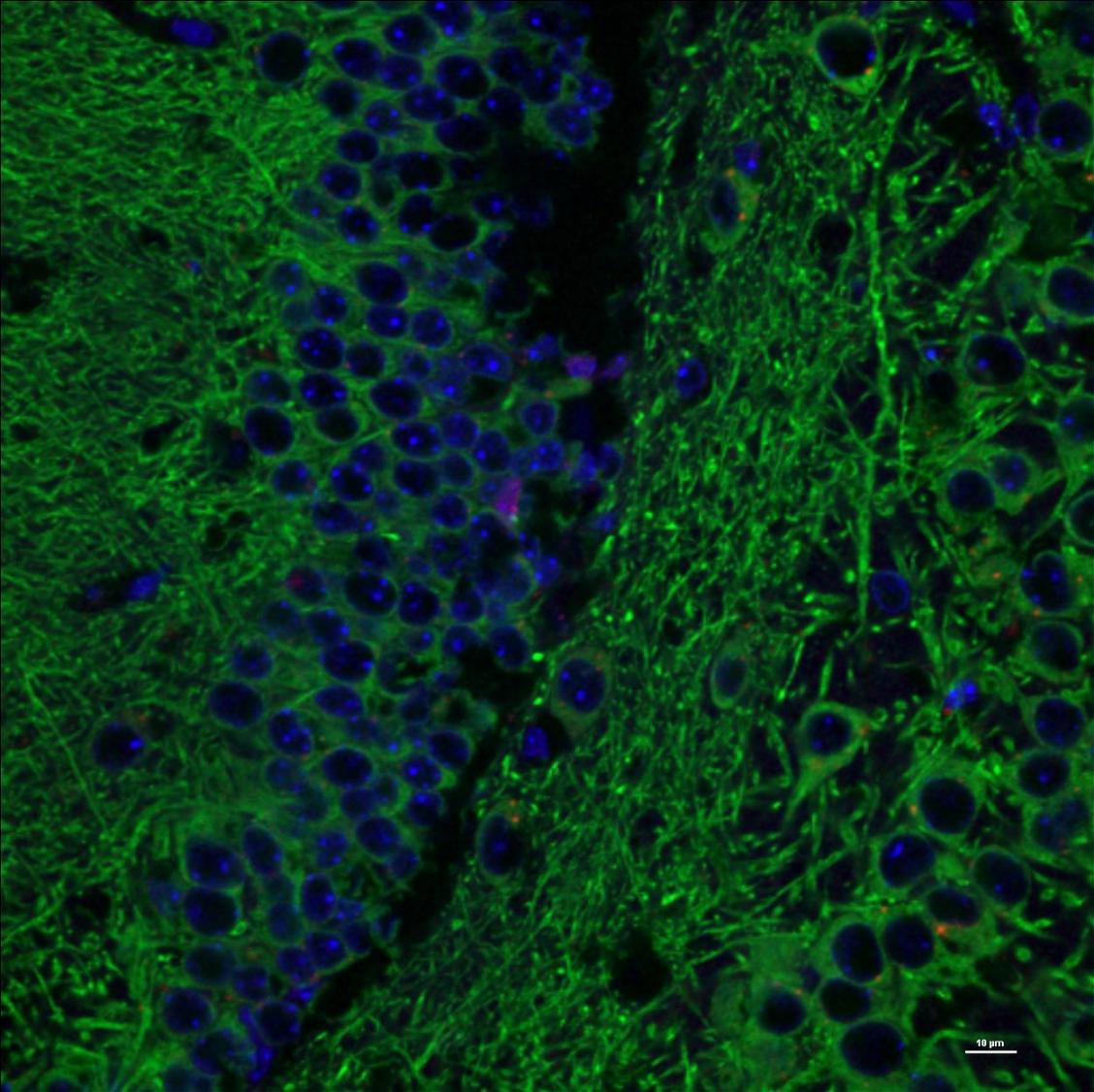
6.-DATOS DEL SINODAL 4

Dr.
Paul
Carrillo
Mora

7.-DATOS DE LA TESIS

Efecto de la morina sobre la proliferación celular relacionada con neurogénesis en hipocampo de ratones adultos sanos.

65 p.
2015



Dedicatoria

A Ma. Guadalupe Alvarez Lazarín

Agradecimientos

A todas las personas que me apoyaron en la elaboración de esta tesis:

A la Dra. Mónica Torres por aceptarme en su grupo de trabajo, por su paciencia y por transmitirme el gusto por la ciencia y por el proceso creativo que conlleva.

Al Dr. Aurelio Campos por proporcionarme un espacio para hacer este trabajo, por involucrarse en la elaboración de este proyecto y sus enseñanzas. A la Dra. Marisol Orozco, que me ayudó con material y reactivos que necesité para hacer el trabajo experimental, además de sus comentarios muy acertados.

A la M. en C. Daniela Silva por su apoyo en la parte experimental y la motivación que me inspiró para seguir adelante. Al M. en C. César Rodríguez y el departamento del bioterio por prestarme un espacio para hacer el laberinto de Morris y los ratones que me proporcionaron. Al Dr. Miguel Tapia, técnico del microscopio DSU en el IIB por el apoyo técnico en la toma de fotos en el microscopio.

A los sinodales de esta tesis por sus valiosos comentarios que ayudaron a terminar de construir este escrito: Dra. Pilar Durán, Dr. Alonso Martínez, Dra. Hilda Martínez y Dr. Paul Carrillo.

Al programa de becas PROBEI por el apoyo económico proporcionado mientras se realizó este proyecto.

A mis hermanos, que contribuyeron a mi formación como persona con su ejemplo.

A mis amigos del laboratorio que con su compañía hicieron el trabajo más sencillo. Yos, eres una persona en la que siempre puedo confiar y también una excelente amiga. Eli, gracias por tus enseñanzas y el entusiasmo que transmites. Chabelita, gracias por tu valiosa compañía, que aumenta el ánimo y también por alegrarme el día con tus ocurrencias. Victor, se te agradecen tus amplios conocimientos y siempre es un gusto ver Champions contigo. Paco, gracias por abastecernos de golosinas y juegos de estrategia.

A mis amigos del laboratorio de NBMyC, que me hicieron sentir bienvenido desde el primer día que los conocí y por los buenos momentos que pasamos: Jazmín, Paco Nancy, Janet, Ana, Norma.

A mis amigos de la facultad, con los cuales compartí algunos años de aprendizaje: Sebas, Gaby, Bere, Marco, Hugo, Antonio, Fátima, Alejandra, Monse, Sandra, Dulce, Leonón, Vicente, Román, etc.

Índice

1.- Índice de figuras.....	9
2.- Abreviaturas.....	10
3.- Resumen.....	11
4.- Marco teórico	
4.1.- El estudio de la neurogénesis en el adulto.....	12
4.2.- Maduración neuronal en el nicho neurogénico del hipocampo	
4.2.1.- El nicho neurogénico.....	13
4.2.2.- Diferenciación neuronal.....	16
4.3.- Plasticidad neuronal.....	18
4.3.1- Implicación de la neurogénesis en la plasticidad neuronal.....	18
4.3.2.- El circuito trisináptico.....	19
4.4.- Modulación de la señalización en la proliferación y diferenciación neuronal (factores intracelulares).....	21
4.4.1.- Notch y Shh.....	22
4.4.2.- Wnt/ β -catenina	22
4.4.3.- Factores de crecimiento.....	23
4.5.- Potenciadores externos de la neurogénesis adulta.....	24
4.5.1.- Influencia de los polifenoles en la neurogénesis.....	25
4.6.- Flavonoides y su beneficio en aspectos de neuroplasticidad.....	27
4.7.- La morina en el SNC.....	28
5.- Hipótesis.....	29
6.- Objetivos	
6.1.- Objetivo general.....	29

6.2.- Objetivos particulares.....	29
7.- Material y método	
7.1.- Animales y tratamiento con morina.....	30
7.2.- Evaluación de memoria espacial.- Laberinto de Morris.....	31
7.3.- Pruebas de biología molecular.....	33
7.3.1- Administración de BrdU e inmunohistoquímica.....	34
7.3.2- Cuantificación de proteínas mediante método de Lowry	36
7.3.3.- Western blot.....	36
8.- Resultados	
8.1.- Aprendizaje y memoria en ratones tratados con morina.....	39
8.1.1.- Trayecto recorrido durante las diferentes fases de la prueba.....	39
8.1.2.- Fase de aprendizaje.....	40
8.1.3.- Prueba de memoria.....	42
8.2.- Proliferación celular en hipocampo de ratones sanos tratados con morina....	42
8.2.1- Estandarización de NeuN.....	44
8.3.- Posibles Mecanismos moleculares involucrados en el efecto de la morina en hipocampo de ratones	
8.3.1.- Expresión de p-Gsk 3 β	46
8.3.2.- Expresión de p-Erk 1/2.....	47
9.- Discusión.....	48
10.- Conclusión.....	54
11.- Bibliografía.....	56

1.- Índice de figuras

Figura 1.-Giro dentado del hipocampo y su estructura.....	14
Figura 2.-Localización y estructura del hipocampo.....	20
Figura 3.-Vías de señalización relacionadas con la proliferación y la diferenciación.....	23
Figura 4.-Estructura básica de un flavonoide.....	26
Figura 5.-Estructura química de la morina (3, 5, 7, 2', 4' pentahidroxi flavona).....	27
Figura 6.-Diseño experimental de la administración de morina.....	30
Figura 7.- Laberinto de Morris en el cual se realizaron las pruebas conductuales.....	32
Figura 8.-Esquema del modelo de experimentación para las pruebas moleculares.....	34
Figura 9.- Trayecto de los ratones en el laberinto de Morris.....	39
Figura 10.-Fase de aprendizaje.....	40
Figura 11.-La morina disminuye el tiempo de llegada a la plataforma durante el aprendizaje.....	41
Figura 12.-Prueba de memoria.....	42
Figura 13.- Promedio de células positivas a BrdU en los cortes.....	43
Figura 14.- Imágenes del giro dentado de hipocampo de ratones tratados con vehículo o morina.....	43
Figura 15.- Marca de NeuN en el giro dentado del hipocampo.....	45
Figura 16.-Expresión de p- Gsk 3β ante la administración de diferentes dosis de morina.....	46
Figura 17.-Expresión de p-Erk ante la administración de diferentes dosis de morina.....	47
Figura 18.- Número de espinas dendríticas por cada 10 μm en CA3.....	49

2.-Abreviaturas

<u>Siglas</u>	<u>Significado</u>
BrdU	5-bromo, 2-deoxiuridina
CA1	Cuerno de Amón 1
CA3	Cuerno de Amón 3
Dex	Doblecortina
DNA	Ácido desoxirribonucleico (Desoxirribonucleic acid)
Erk ½	Cinasa regulada por señal extracelular (Extracellular regulated kinase)
GABA	Ácido γ -aminobutírico (Gamma aminobutiric acid)
Gsk3-β	Cinasa de glucógeno sintasa 3- β (Glycogen synthase kinase 3- β)
GD	Giro dentado
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida (Glial fibrilar acidic protein)
LPS	Lipopolisacárido
Map2	Proteína asociada a microtúbulos 2 (Microtubule associated protein 2)
MAPK	Proteína cinasa asociada a mitógeno (Mitogen associated protein kinase)
NeuN	Núcleo neuronal (Neuronal nuclei)
NHA	Neurogénesis hipocámpica adulta
PBS	Amortiguador de fosfatos salino (Phosphate buffered saline)
PB	Amortiguador de fosfatos (Phosphate buffer)
SNC	Sistema nervioso central
TBS	Amortiguador salino de tris (Tris buffered saline)
ZSV	Zona sub-ventricular
ZSG	Zona sub-granular

3.- RESUMEN

Introducción: La neurogénesis hipocámpica en el cerebro adulto es un proceso implicado en la plasticidad neuronal y particularmente influye en la memoria espacio-temporal. La morina es un flavonoide presente en plantas de la familia Moraceae y posee varias actividades sobre sistema nervioso, siendo uno de sus blancos moleculares la cinasa Gsk-3 β , implicada en la neurogénesis y formación de procesos neuronales. Los flavonoides tienen además otros efectos sobre sistema nervioso que influyen en neuroplasticidad.

Objetivo: Caracterizar el efecto de la morina sobre la proliferación celular en hipocampo de ratones adultos y sobre la memoria de estos.

Material y método: Se realizó un tratamiento con morina vía intraperitoneal a ratones adultos (25-30g) de la cepa C57BL/6 en diferentes dosis (2.5, 5, 10 y 20 mg/kg) durante diez días. Se estandarizó el protocolo de aprendizaje y memoria en el laberinto de Morris, en donde fueron cuantificadas la latencia de llegada a la plataforma durante los entrenamientos (4 sesiones) y la permanencia en el cuadrante objetivo en una prueba final de memoria. Con la técnica de inmunofluorescencia se determinó la presencia de BrdU y la expresión de Map2, proteína característica de neuronas maduras, contándose las células positivas a BrdU. Se hizo western blot para evaluar la cantidad de p-Gsk-3 β y p-Erk.

Resultados: En la segunda y tercer sesión de la fase de aprendizaje el grupo con el tratamiento de 2.5 mg/kg de morina localizó más rápido a la plataforma de escape, llegando a esta en la mitad del tiempo del que utilizó el grupo vehículo. En este mismo tratamiento se observa una tendencia a un mayor número de células BrdU+, sin embargo p-Gsk-3 β y p-Erk no muestran cambios en esta dosis.

Discusión y conclusiones: La disminución del tiempo de llegada a la plataforma en los diferentes días indica una mejoría en el aprendizaje, esto puede deberse a diversos cambios que ocurran en el hipocampo. En la dosis de 2.5 mg/kg de morina se obtuvo una tendencia a una mayor cantidad de células BrdU+, esto fue una dosis parecida a otros polifenoles en donde se obtuvo un aumento en neurogénesis. Siendo que la cantidad de p-Erk y p-Gsk-3 β no cambiaron, habrá que buscar otros mecanismos.

Palabras clave: Neurogénesis, hipocampo, morina, aprendizaje, memoria.

4.-Marco teórico

4.1.- El estudio de la neurogénesis en el adulto

Los órganos de los individuos adultos mantienen un reservorio de células denominadas troncales que provee manutención y reparación, estas células tienen la capacidad de autorenovarse y de tener multipotencialidad (Riquelme, Drapeau y Doetsch 2008). Algunos ejemplos son: las células troncales de la piel, hematopoyéticas o intestinales, por mencionar algunos ejemplos (Walker 2009).

Sin embargo, en el estudio de las neurociencias se consideraba que el cerebro de los mamíferos adultos incluido el de los humanos, no podía regenerar sus neuronas y que todas estas células las mantenía un individuo desde el final de su desarrollo embrionario hasta la muerte. Fue hasta finales del siglo XX que existieron las herramientas experimentales que permitieron el estudio y la obtención de evidencias sobre el proceso de neurogénesis en el cerebro adulto de mamíferos.

Uno de los primeros en realizar experimentos para demostrar la neurogénesis adulta fue Joseph Altman a principios de la década de 1960, quien a través de autoradiografías de cerebros de rata administrada con timidina tritiada (que se incorpora en el DNA), observó que existían células mitóticas en regiones como cerebelo e hipocampo (Altman 1962). Debido a la poca información que proporcionaban estos hallazgos, no se tomó como una evidencia convincente.

En la década de los 1990 hubo avances técnicos en el área de la biología celular que permitieron determinar el fenotipo de células específicas a través del marcaje con anticuerpos. Para visualizar la división celular se administró a las células el compuesto 5-bromo, 2-deoxiuridina (BrdU), un análogo de la timidina que puede incorporarse al DNA en la fase S del ciclo celular. Actualmente, por la facilidad de su uso y la marca duradera

que proporciona es el método más utilizado para determinar la proliferación de células. Existen otros métodos para observar células que proliferan, principalmente proteínas del ciclo celular. Además de la marca del ciclo celular se conoce su identidad neuronal debido a la co-localización con proteínas específicas, como PSA-NCAM, Tuj y NeuN, entre otras. Para demostrar que la neurogénesis era un fenómeno que sucede *in vivo* se diseñaron experimentos en los cuales se observaron células en ciclo celular que se diferenciaban a neuronas tanto en zona sub-granular (ZSG) del giro dentado (GD) del hipocampo como en zona sub-ventricular (ZSV) de roedores (Cameron et al. 1993; revisado en Gerd Kempermann 2012) y primates (Gould et al. 1999). Se observó también que los tipos celulares generados son del tipo granular en GD y las que surgen en ZSV terminan diferenciándose en neuronas granulares y glomerulares en bulbo olfatorio (Lledo, Alonso, and Grubb 2006).

Se ha caracterizado que en la región del GD del hipocampo de humanos también ocurre neurogénesis (Eriksson et al. 1998) y actualmente existen diferentes grupos de investigación dedicados a determinar el proceso de neurogénesis en otras regiones cerebrales (Migaud et al. 2010), así como a explicar mejor los procesos conductuales en los que participa la integración de nuevas neuronas en el cerebro maduro.

4.2.- Maduración neuronal en el nicho neurogénico del hipocampo

4.2.1.- El nicho neurogénico

Para que el cerebro incorpore nuevas neuronas requiere que estas se produzcan en sitios con características especiales. Por esto, un concepto básico para entender el establecimiento de la neurogénesis adulta es el de los nichos neurogénicos. Un nicho neurogénico es una zona en la que existe un microambiente adecuado para el desarrollo de las células

progenitoras hacia un linaje neuronal (Varela-Nallar et al. 2010); en mamíferos se han comprobado dos, la ZSG en el GD del hipocampo (Fig. 1 y 2) y la ZSV (Arturo Alvarez-Buylla, Seri y Doetsch 2002).

En estos microambientes están los factores moduladores del desarrollo de las células precursoras, establecidos en parte por las células circundantes, principalmente astrocitos, neuronas, células endoteliales y otros precursores (S. W. Lee, Clemenson y Gage 2012). Este entorno provee características moleculares que se asemejan al ambiente embrionario para la formación de neuronas y que permiten su desarrollo, crecimiento y migración (Alvarez-Buylla y Lim 2004).

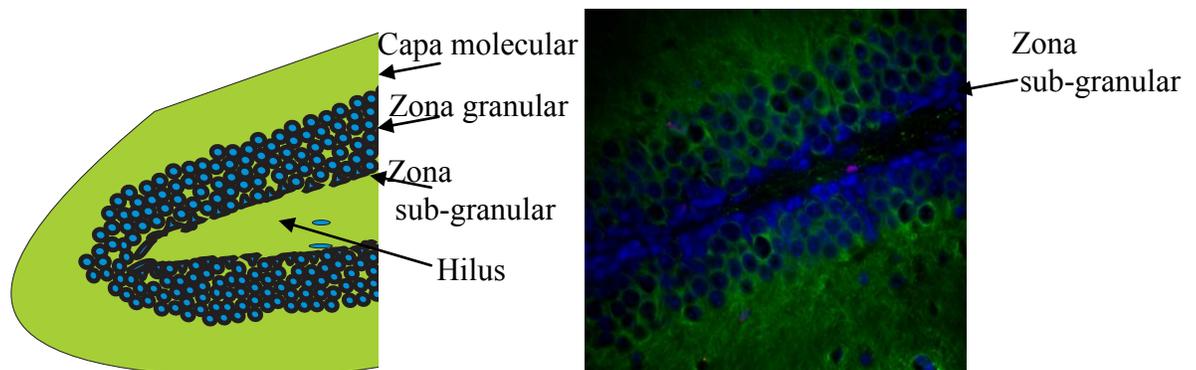


Figura 1. Giro dentado del hipocampo y su estructura. A) Representación esquemática del giro dentado del hipocampo y sus diferentes partes. B) Localización del GD en una foto de microscopía confocal. Los núcleos están en azul (DAPI), el citoesqueleto neuronal en verde (Map2) y en morado está una célula en división, indicada por la marca de BrdU (foto tomada por J. Rivera).

La irrigación abundante de los vasos sanguíneos es importante por la secreción de factores de crecimiento de las células endoteliales, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o el factor de crecimiento parecido a insulina (IGF-1) (Cao et al. 2004). Se ha visto que en el hipocampo y en especial en la ZSG, las células progenitoras que se diferencian

en neuronas se encuentran cerca de zonas ampliamente abastecidas de capilares llamados redes vasculares (clusters) (Palmer, Willhoite y Gage 2000).

El contacto con la matriz extracelular es un factor crucial en procesos de desarrollo y migración. Son importantes moléculas como integrinas y la molécula neuronal de adhesión celular con ácido polisiálico (PSA-NCAM). El contenido de ácido polisiálico (PSA) es el que determinará la adhesividad de la célula con la matriz, puesto que su alta carga negativa hace que absorba gran cantidad de agua y se evite la interacción con las células en proximidad, con lo cual se consigue la migración hasta el sitio donde se requiere (Rutishauser 2008), (Rutishauser, Acheson y Hall 1988).

Los astrocitos y las neuronas tienen también un papel importante en la conformación de estos nichos. Los primeros proporcionan un sitio especial para la maduración neuronal (Song, Stevens y Gage 2002) dependiente tanto de factores solubles que secretan al espacio extracelular (Wnt3 (Lie et al. 2005), bFGF y EGF (Doetsch 2003)) como de factores unidos a membrana con los que interactúan (efrina B2 y Eph-B4(Ashton, Conway y Pangarkar 2012)).

Las neuronas ejercen una neurotransmisión GABAérgica excitatoria en los progenitores, una respuesta diferente a la de neuronas maduras (Ge et al. 2006). La neurotransmisión de este tipo se asocia a la fosforilación del factor de transcripción CREB y con el desarrollo del árbol dendrítico (Jagasia et al. 2009; Ming and Song 2011). A medida que maduran las neuronas adquieren aferencias glutamatérgicas excitatorias y las GABAérgicas se vuelven inhibitorias (Ge et al. 2006).

Los progenitores de estas zonas dan origen a los tipos celulares característicos del sistema nervioso tales como oligodendrocitos, astrocitos o neuronas (Gage 2002). A pesar de que

existen células progenitoras en varias partes del cerebro, las condiciones del microambiente no son las idóneas para la neurogénesis en todos estos sitios (Shihabuddin y Horner 2000).

4.2.2.- Diferenciación neuronal

Es posible identificar las etapas de maduración neuronal gracias a las proteínas que las células expresan al diferenciarse y que utilizamos en la investigación científica como marcadores moleculares (Tabla 1). En el nicho neurogénico existe un grupo de células que se encuentra quiescente (con divisiones lentas) con características de glía radial (también llamadas células tipo I) y que es posible identificar por la presencia de las proteínas GFAP (Seri et al. 2001), nestina (Fukuda et al. 2003), Pax 6 (Heins et al. 2002) y Sox2 (Suh et al. 2007). Las dos primeras, son proteínas de citoesqueleto y las dos últimas son factores de transcripción que permiten que las células mantengan su multipotencialidad.

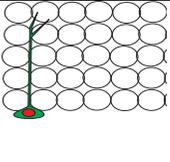
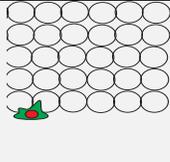
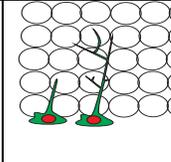
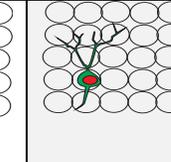
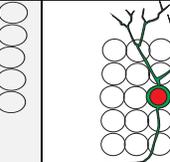
Al salir de la quiescencia se dividen en células que proliferan más rápidamente, y que expresan además de las proteínas mencionadas, el factor de transcripción Trb2 (Hodge et al. 2008) (Células tipo II o “transit amplifying cells”).

Estos precursores pueden tener divisiones que den lugar a neuronas inmaduras (células tipo III) que expresan proteínas como la doblecortina (Dcx), que estabiliza los microtúbulos en las fases iniciales de desarrollo neuronal (Rao y Shetty 2004). Si sobreviven, dan lugar a células con proteínas neuronales características de estadios maduros (NeuroD1, NeuN, Prox)(Kuwabara, Hsieh y Muotri 2009) y dejan de expresar Dcx. Las células en etapa de diferenciación cuentan con receptores para EGF y bFGF (Tanigaki, Nogaki y Takahashi 2001).

Conforme ocurre la diferenciación sucede la migración hasta giro dentado, el lugar donde ha de cumplir su función, integrándose como una unidad funcional del circuito neuronal.

En el caso del GD ocurre un movimiento que traslada el soma de la neurona de la zona subgranular hacia la zona granular, un trayecto de apenas unas pocas micras. Posteriormente las dendritas se incorporan a la capa molecular y el axón se proyecta hacia CA3 (Zhao et al. 2006) (Fig. 1B). El proceso completo en roedores desde la división hasta el término de la diferenciación se tiene estimado entre 4 y 6 semanas (Zhao et al. 2006).

Tabla 1. Características fenotípicas en la maduración de los precursores neuronales del GDH (Con información de (Ming y Song 2011), (Varela-Nallar et al. 2010), (Wu y Hen 2013), (Lledo, Alonso y Grubb 2006) y (Breunig et al. 2007)).

Nominación del tipo celular	Progenitores tipo I (tipo glia radial)	Progenitores tipo II (células en amplificación)	Progenitores tipo III	Neuronas inmaduras	Neuronas maduras
Marcadores moleculares	GFAP, Nestina, Sox2, Pax6	Tbr2, GFAP, Nestina, Sox2	Dcx, PSA-NCAM, NeuroD1,	Tbr1, DCX, NeuroD1	NeuN, Prox1, Calbidina .
Morfología y localización (Breunig et al. 2007), (Gerd Kempermann 2012)					
Aferencias sinápticas	GABAérgicas excitatorias (Ge et al. 2006)			Glutamatérgicas excitatorias y GABAérgicas del tipo inhibitorio	

En cada etapa existe muerte de las células debido a procesos apoptóticos dependientes de moléculas como Bax (Sun et al. 2004), por lo tanto no todas las células que proliferan se desarrollan hasta etapas maduras.

De manera constitutiva cerca de 9,000 células son producidas diariamente en el cerebro juvenil de ratas (de 9 a 10 semanas) y de estas células se diferencian a neuronas el 75% (Cameron y McKay 2001).

4.3.- Plasticidad neuronal

El cerebro es un componente del sistema nervioso central que a través de la comunicación entre las redes neuronales permite el desarrollo del comportamiento, desde el desarrollo del movimiento hasta la realización de cualquier tarea cognitiva (Kandel, Schwartz, and Jessel 2000). A lo largo de la vida de un individuo estas redes pueden tener ciertos cambios que permiten una mayor eficiencia en la comunicación.

A este fenómeno por el cual el cerebro adulto puede tener cambios en el aspecto morfológico o funcional en respuesta a ciertos estímulos se le conoce como plasticidad neuronal (Lledo, Alonso y Grubb 2006), y permite tener flexibilidad para adaptarse a las diversas situaciones a las que pueda estar expuesto. Parte de esta plasticidad se ha investigado en fenómenos como la potenciación a largo plazo, la remodelación dendrítica o la regeneración axonal, además se puede observar por la modulación de la neurogénesis en los individuos adultos (Ho et al. 2013).

4.3.1- Implicación de la neurogénesis en la plasticidad neuronal en hipocampo

Desde el descubrimiento de la neurogénesis en el hipocampo se han realizado estudios conductuales que la relacionan con funciones propias de esta estructura. Dado que el hipocampo conecta con diversas regiones en el cerebro se ha descrito una regionalización de funciones. La parte anterior (dorsal) del hipocampo está involucrada principalmente en la memoria declarativa y la región posterior (ventral) además de la función de memoria, está relacionada con aspectos emocionales (Green y Nolan 2014).

En las funciones de la memoria se observa que posteriormente al estímulo neurogénico ocurre una mejoría en la discriminación de patrones (Sahay et al. 2011) y aprendizaje espacial de tipo aloentríco, como es observado en el en laberinto de Morris (Van Praag et

al. 1999). Por otro lado, se ha demostrado también que el aumento de neuronas en GDH promueve el olvido de eventos que ocurren simultáneamente al estímulo neurogénico (Akers et al. 2014).

En relación con los estados de ánimo, se han hecho estudios vinculados con la depresión y la ansiedad, donde se ha observado que medicamentos antidepresivos o ansiolíticos generan mayor cantidad de neuronas de las que se producen de manera normal (Samuels y Hen 2011; Schloesser et al. 2010), situación contraria ante eventos estresantes (Mirescu et al. 2006).

Para dar una mejor correlación a las funciones mencionadas, se han realizado experimentos en los cuales el efecto conductual no se produzca ante la inhibición de la neurogénesis, lo cual se consigue a través de aproximaciones de tipo farmacológico (Mustafa et al. 2008), genético (Jessberger et al. 2009) o por aplicación de radiación (Saxe et al. 2006).

4.3.2.- El circuito trisináptico

El hipocampo es una estructura cerebral cuyas regiones anatómicas así como las conexiones entre estas han sido ampliamente descritas. El GD es parte de un circuito caracterizado como una vía trisináptica. Este circuito frecuentemente se utiliza para explicar la conexión entre las estructuras: corteza entorrinal, GD, CA3 y CA1 (Oomen et al. 2014) (Fig. 1B y C). Existe una gran cantidad de conexiones entre estas y otras regiones del hipocampo, pero el circuito descrito en su forma básica es el siguiente:

- 1.- La corteza entorrinal envía sus proyecciones hacia GD a través de un trayecto conocido como vía perforante.
- 2.- Una vez recibidos estos axones en GD, las células de esta zona transmiten los impulsos a través de las fibras musgosas hasta la región CA3.
- 3.- De CA3 se

mandan axones a CA1 por las fibras colaterales de Schaffer. Después ocurre un regreso por la vía temporoamónica hacia corteza entorrinal (Fig. 1D).

La información que viaja a través de este circuito finalmente se transmite desde corteza entorrinal hasta la neocorteza, lugar donde se ha de almacenar (Van Strien, Cappaert y Witter 2009).

De esta manera, las neuronas recién integradas contribuyen con dendritas que reciben la información de la corteza entorrinal, proyectando axones a través de las fibras musgosas hacia la región CA3. Esto es importante tomando en cuenta que como un centro donde se integra una información en constante cambio, el hipocampo requiere que se realicen modificaciones que permitan una mayor eficiencia en la comunicación (Rudy 2014).

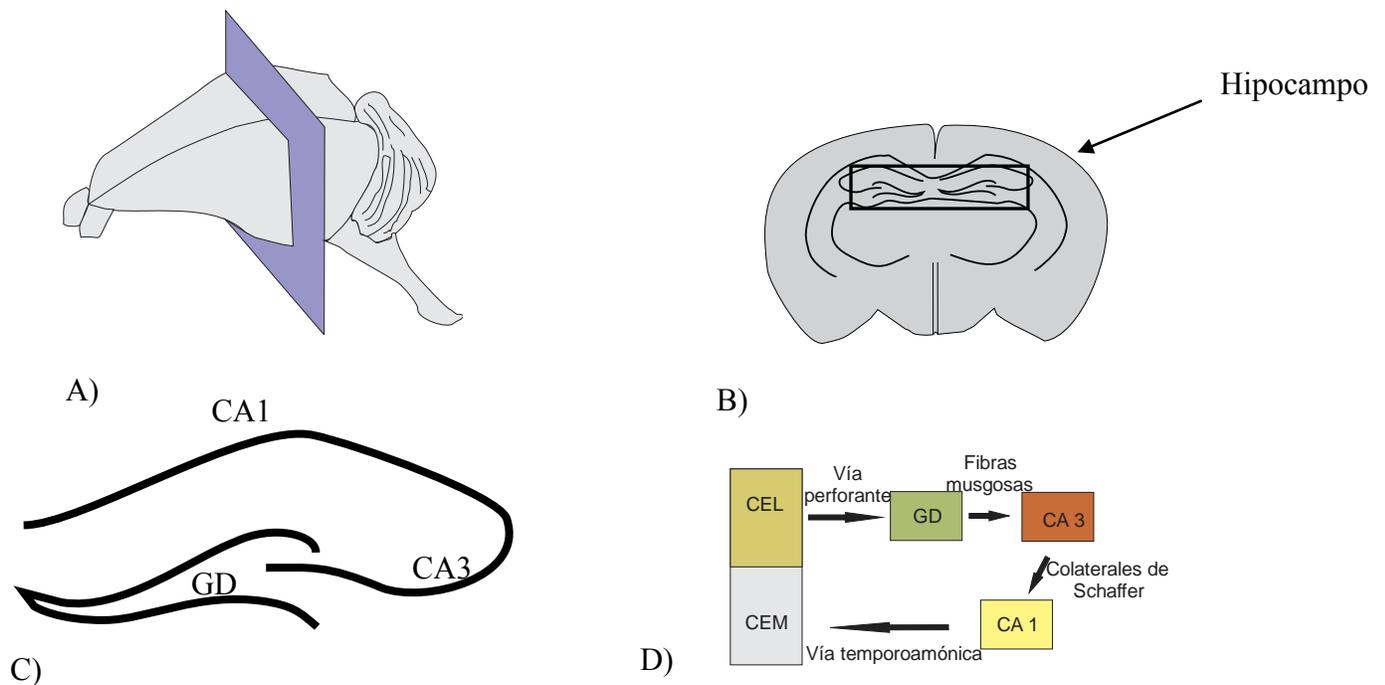


Figura 2. Localización y estructura del hipocampo. A) Esquema de un cerebro de ratón con un corte coronal donde se ubica el hipocampo. B) Corte coronal del cerebro donde se muestra la localización del hipocampo. C) Regiones anatómicas del hipocampo. D) Esquema del circuito trisináptico (CEL: Corteza entorrinal lateral, GD: Giro dentado, CA: Cornu ammonis CEM: corteza entorrinal medial) (con información de Van Strien, et al. 2009).

4.4.- Modulación de la señalización en la proliferación y diferenciación neuronal (factores intracelulares)

El conocimiento de la comunicación intracelular permite la intervención farmacológica o genética sobre los tipos celulares formados a partir de las células progenitoras. Se conocen diferentes vías de señalización relacionadas con la proliferación y diferenciación neuronal, entre las más importantes que se han estudiado están las asociadas a factores de crecimiento así como la señalización de Wnt, Notch y Sonic Hedgehog (Shh) (Fig.3).

4.4.1.- Shh y Notch

En células progenitoras la vía de Shh es necesaria para mantener el grupo de células precursoras en un número estable, puesto que si se inhibe esta señalización ocurre una producción de neuronas sin una autorenovación de los progenitores (Lai et al. 2003).

Los ligandos Notch 1 y 3 promueven una mayor diferenciación hacia un linaje astrogial, inclusive en la presencia de factores pro-neurogénicos (Tanigaki, Nogaki y Takahashi 2001). Conforme avanza el estado de diferenciación neuronal disminuyen los marcadores que indican la activación de esta vía, sin embargo en las etapas finales de diferenciación las proteínas de esta señalización vuelven a tener actividad (Breunig et al. 2007).

4.4.2.- Wnt/ β -catenina

La estimulación de esta vía promueve la proliferación y diferenciación neuronal *in vitro* e *in vivo* (Kuwabara, Hsieh y Muotri 2009; Mira et al. 2005),. Esto se consigue a través del ligando Wnt3 (Mira et al. 2005), que al unirse al receptor Fz3 y co-receptor Lrp 5/6 provoca una señalización que inhibe la cinasa Gsk-3 β por medio de las interacciones que ocurren

con un complejo multiproteico conformado por axina, CKI y APC. Puesto que Gsk-3 β en condiciones sin estímulo fosforila β -catenina para mandarla a degradación, su inhibición representa un aumento en la acumulación intracelular de β -catenina que se trasloca a núcleo y se acopla a LEF/ TCL para activar genes pro-neuronales como NeuroD1 (Inestrosa y Arenas 2010; Kuwabara, Hsieh, y Muotri 2009) (Fig. 3).

La activación de las proteínas de esta cascada de señalización produce además en neuronas maduras la prolongación de los procesos neuronales, aumentando la arborización dendrítica (Rui et al. 2013; Dill et al. 2008).

4.4.3.- Factores de crecimiento

El VEGF producido por células endoteliales, neuronas y astrocitos, estimula receptores diméricos tirosina cinasa VEGFR2 en células tipo III y produce *in vivo* un aumento en la población neuronal (Jin et al. 2002). Se ha observado que el aumento en la neurogénesis producida por este factor de crecimiento es independiente de su capacidad angiogénica (Cao et al. 2004). Existe también una regulación positiva de la proliferación a través de factores de crecimiento como EGF, bFGF e IGF-1 (Mudò et al. 2009; Trejo, Carro, y Torres-Aleman 2001), mismos que tienen río abajo de su señalización a proteínas como p-Erk 1/ 2, PI3K y p-Akt (Yan et al. 2007; Won et al. 2011; Fournier, Lee y Banasr 2012) (Fig. 3).

La incorporación de las neuronas a sus circuitos requiere que estas sobrevivan y en este proceso participa la fosforilación de la proteína Akt (p-Akt). Esta proteína inhibe proteínas pro-apoptóticas como Bax, e inhibe a la ya mencionada Gsk-3 β mediante fosforilación en la serina 9 (Dill et al. 2008).

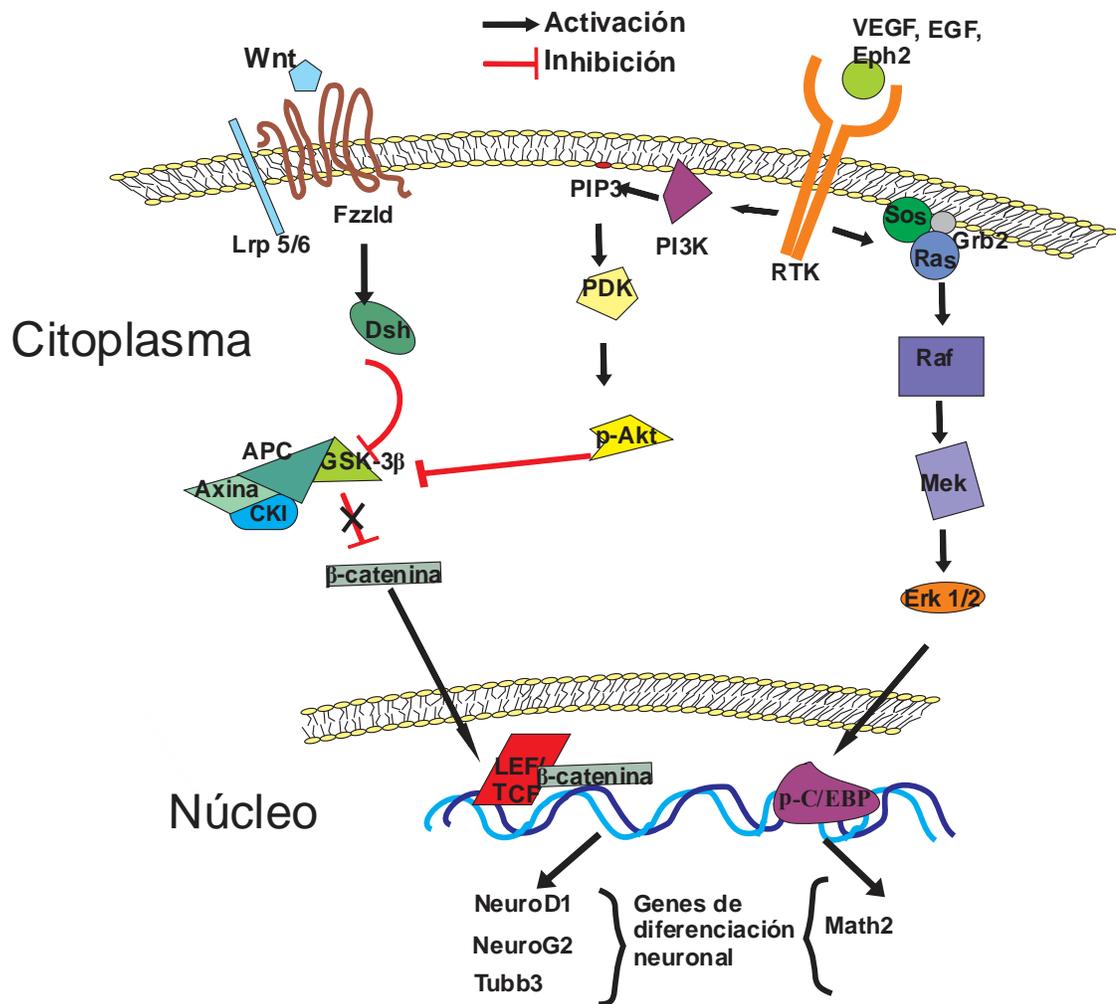


Figura 3. Vías de señalización relacionadas con la proliferación y la diferenciación. Se muestra la vía Wnt-β catenina y dos vías asociadas a factores de crecimiento, tales como la vía que implica a Akt y otra que implica a Erk 1/2 (con información de Inestrosa y Arenas 2010; Ménard et al. 2002).

4.5.- Potenciadores externos de la neurogénesis adulta

La neurogénesis ocurre de manera constitutiva en los mamíferos, pero como proceso implicado en la plasticidad puede verse modificada ante los estímulos ambientales, o como respuesta a cambios fisiológicos que se produzcan ante procesos naturales, como lo es el envejecimiento.

Los estímulos sobre la neurogénesis pueden repercutir sobre diferentes etapas del proceso, ya sea en la proliferación de los progenitores iniciales (células tipo I y II), en el aumento de diferenciación hacia el linaje neuronal (células tipo III), o bien en la sobrevivencia de las células que se diferencian a neuronas, puesto que normalmente de las células surgidas en el GD mueren entre el 60% y 80% después de un mes (Sun et al. 2004).

El incremento de la neurogénesis adulta es producido por varios factores ambientales o del comportamiento. Entre los más importantes están la realización de actividad física voluntaria (Van Praag et al. 1999), la administración crónica de antidepresivos (Malberg et al. 2000), la exposición a ambientes enriquecidos (G Kempermann, Kuhn y Gage 1997), la interacción con otros individuos (McCormick et al. 2010), la estimulación electromagnética de baja frecuencia (Cuccurazzu et al. 2010), y la alimentación con base a ciertos componentes de la dieta (Stangl y Thuret 2009) por mencionar algunos.

4.5.1.- Influencia de los polifenoles en la neurogénesis

Un factor que debe tomarse en cuenta de manera importante en su aspecto sobre la neurogénesis es la dieta, debido a los compuestos presentes en los alimentos que se consumen de manera cotidiana (Stangl y Thuret 2009). Entre estos compuestos están los polifenoles, abundantes en productos de origen vegetal y característicos por la presencia de dos o más grupos fenoles (consisten en un grupo fenil con un hidroxilo añadido)(Hooper y Frazier 2012).

Se ha visto que hay algunos que aumentan la cantidad de neuronas producidas en el hipocampo de roedores. Ejemplos de tales polifenoles son la curcumina (Kim et al. 2008), el resveratrol (Madhyastha, Sekhar y Rao 2013), la oroxilina A (S. Lee et al. 2010) y la epigallocatequina de galato (EGCG) (Márquez 2013) (Tabla 2), que se encuentran en el

rizoma de la cúrcuma, el vino tinto, la raíz de escutelaria y el té verde, respectivamente. Dada su estructura química estos compuestos son lipofílicos en su mayoría, por lo que pueden atravesar membranas y por lo tanto barrera hematoencefálica, es por esto que sus propiedades bioactivas se mantienen al llegar al tejido cerebral (Vauzour, Kerr y Czank 2014).

Tabla 2. Polifenoles de origen vegetal con efecto positivo sobre la neurogénesis hipocámpica adulta

Polifenol	Dosis	Tiempo de administración	Tipo celular aumentado	Moléculas implicados	Animal utilizado	Referencia
Curcumina	0.16 mg/kg	4 días	BrdU+	p-Erk y p-38	Ratón	(Kim et al. 2008)
Resveratrol	0.2 mg/kg	21 días	BrdU+ y calbindina+	CGRP e IGF-1	Ratón	(Harada et al. 2011)
EGCG	20 mg/kg	60 días	BrdU+	Shh	Ratón	(Wang et al. 2012)
EGCG	2.5 mg/kg	14 días	BrdU+ y Dcx+	p-Akt	Rata	(Márquez 2013)
Oroxylina A	5 mg/kg y 10 mg/kg	14 días	BrdU+ y NeuN+	-	Ratón	(S. Lee et al. 2010)

Debido a su diversa estructura molecular estos compuestos provocan el aumento en la neurogénesis a través de diferentes mecanismos. Relacionado con factores de crecimiento se observa que la curcumina promueve el aumento en la fosforilación de Erk 1/2 y p38 (Kim et al. 2008), el EGCG hace lo mismo con Akt (Márquez 2013) y el resveratrol promueve un incremento en el ligando IGF-1 (Harada et al. 2011). En el caso de la administración con EGCG a 60 días, se reportó un aumento en la proteína Shh (Wang et al. 2012).

Los periodos de tiempo en que los polifenoles ejercen un efecto sobre la proliferación de progenitores neuronales *in vivo* se ha observado desde los 4 días (con la curcumina), hasta los 60 días (con el EGCG), con periodos de 14 (EGCG y oroxilina A) o 21 días (resveratrol).

4.6.- Flavonoides y su beneficio en aspectos de neuroplasticidad

Un grupo muy abundante de polifenoles son los flavonoides, moléculas constituidas por dos componentes: un benzopirano (anillos A y B) y un benceno (anillo C), con el benceno insertado en la posición 2 del benzopirano (Fig. 4). Se subdividen en varias categorías tomando en cuenta el grado de oxidación presente en el anillo C, el patrón de hidroxilación y la sustitución del grupo 3 (Nones et al. 2010). Están en varias partes de las plantas, principalmente en hojas, flores, frutos, semillas, cortezas y raíces (Miranda, Maier y Stevens 2012).

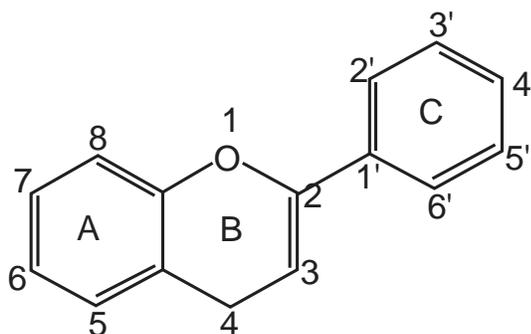


Figura 4. Estructura básica de un flavonoide (Modificado de Spencer, Vauzour y Rendeiro 2009)

Los flavonoides ingresan al SNC principalmente debido a su lipofilidad, característica que facilita el acceso a las membranas celulares. También pueden usar otros mecanismos de

entrada a la célula, por ejemplo proteínas transportadoras como la glicoproteína P, estudiada en relación con la naringenina y quercetina (Williams y Spencer 2012).

La administración de flavonoides produce una mejoría en la memoria de trabajo en ratas de 8 semanas de edad (Rendeiro et al. 2013) y en memoria espacial en ratones seniles (Li et al. 2009). Se ha observado que una alimentación enriquecida en flavonoides se relaciona con una mejor memoria verbal en humanos (Kesse-Guyot et al. 2012). Estos efectos se fundamentan por la modulación sobre blancos moleculares relacionados con la plasticidad sináptica, como por ejemplo, el aumento en la subunidad NR2B del canal NMDA, en PSA-NCAM (Rendeiro et al. 2013) o en BDNF (Williams y Spencer 2012).

El aumento de neurogénesis producido por flavonoides se ha observado únicamente con la administración de oroxilina A, que provocó un mayor número de células en proliferación, así como también de neuronas maduras en la ZSG del hipocampo de ratones (S. Lee et al. 2010).

4.7.- La morina en el SNC

La morina (2,3,4,5,7- pentahidroxi flavona) (Fig. 5) es un flavonoide perteneciente a la categoría de los flavonoles, se distribuye en varias plantas entre las que se encuentran *Morus alba* (mora), *Ficus carica* (higo), o *Maclura tinctoria*. En los estudios llevados a cabo con esta molécula en el sistema nervioso se ha observado que disminuye el daño producido en modelos de inflamación, de isquemia (Gottlieb et al. 2006), (Campos-esparza, Sánchez-gómez y Matute 2009), de enfermedad de Alzheimer (Zhang et al. 2010), de enfermedad de Parkinson (Ji et al. 2011), y que tiene potencial anti-cancerígeno (Cheng 1997).

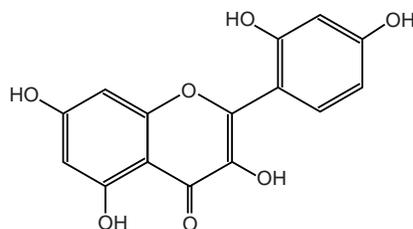


Figura 5. Estructura química de la morina (3, 5, 7, 2', 4' pentahidroxiflavona)

En el modelo de isquemia mencionado, interviene disminuyendo las especies reactivas de oxígeno (EROs) y aumentando sobrevivencia celular a través del incremento de p-Akt (Campos-esparza, Sánchez-gómez y Matute 2009; Paoli et al. 2013), previniendo así el déficit mnémico, esto último fue observado en una prueba de laberinto de Y (Campos-esparza, Sánchez-gómez y Matute 2009).

Otro de los blancos moleculares con los que se le relaciona es Gsk-3 β , generando una inhibición en su actividad de cinasa sobre la proteína β -catenina *in vitro* y disminuyendo la fosforilación de tau en un modelo transgénico de Alzheimer en ratón (Ji et al. 2011). La proteína p-Akt, implicada en la sobrevivencia y proliferación además de verse modulada por la morina en el modelo *in vivo* de isquemia antes mencionado (Campos-esparza, Sánchez-gómez y Matute 2009), aumenta su expresión en un modelo *in vitro* de diabetes en células hepáticas (Paoli et al. 2013).

Estas acciones sobre las proteínas que se involucran en proliferación y sobrevivencia pueden estar además estar teniendo una acción conjunta con la disminución del estrés oxidativo, de manera que pueda ocurrir una protección del ambiente neuronal.

Con base en el marco teórico revisado, en este estudio indagamos el efecto de la morina sobre la proliferación de los progenitores presentes en el hipocampo de ratones adultos y sus beneficios en la cognición.

5.- Hipótesis

La morina aumenta la proliferación de células progenitoras en el giro dentado del hipocampo de ratones adultos y provoca mejoría en la memoria.

6.- Objetivos

6.1.- Objetivo general

Caracterizar el efecto de la morina sobre la proliferación celular en hipocampo de ratones adultos y observar la repercusión sobre la memoria.

6.2.- Objetivos particulares

- Determinar la concentración de morina que aumenta la proliferación celular en la zona subgranular del giro dentado en el hipocampo de ratón.
- Elucidar los cambios en p-Erk y p-Gsk-3 β inducidos por morina.
- Determinar el efecto de la morina sobre el aprendizaje y la memoria.

7.- Material y método

7.1.- Animales y tratamiento con morina

En este proyecto se trabajó con 90 ratones (*Mus musculus*) machos de la cepa C57BL/6, de 25-30 g (2 meses de edad), en el bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” con condiciones de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, temperatura constante (22-23°C), además de comida y agua *ad libitum*. Los protocolos de este estudio se hicieron de acuerdo a la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999.

Fueron utilizados 6 grupos diferentes: control (Solución salina), vehículo (DMSO), y 4 grupos con tratamiento de morina en dosis de 2.5, 5, 10 y 20 mg/kg durante 10 días, tomando en cuenta las referencias de la tabla 2. Se utilizaron 15 animales por tratamiento.

Se realizaron las pruebas de conducta de aprendizaje y memoria en laberinto acuático de Morris. Terminado el tratamiento los ratones se sacrificaron por perfusión para pruebas de inmunofluorescencia o por dislocación cervical para western blot (Fig. 6).

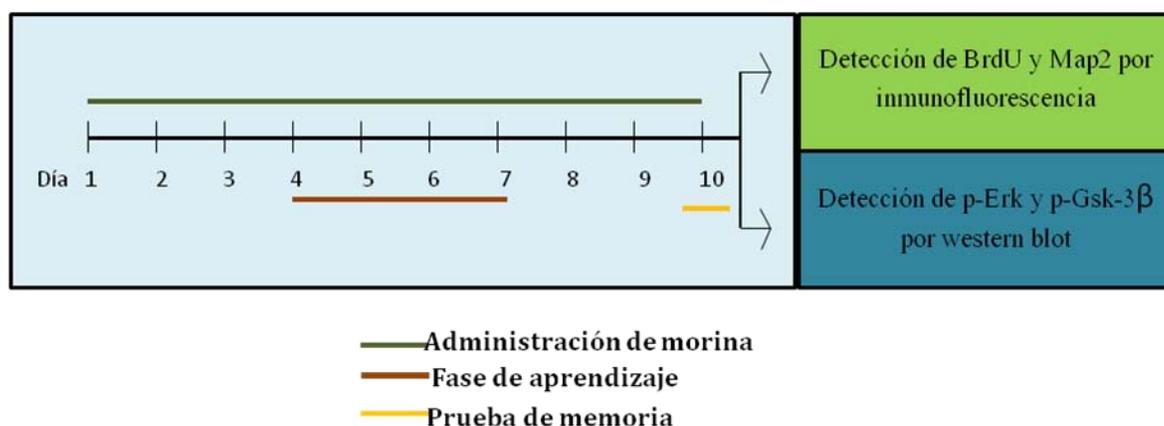


Figura 6. Diseño experimental de administración de morina, en donde se realizaron pruebas de conducta, para finalizar con las pruebas moleculares.

7.2.- Evaluación de memoria espacial.- Laberinto de Morris

La realización de esta prueba está justificada en los diversos blancos moleculares que tienen los flavonoides sobre el SNC y que pueden tener efecto sobre la memoria independientemente de la neurogénesis (Spencer, Vauzour, y Rendeiro 2009). El laberinto acuático de Morris es una prueba comúnmente utilizada para cuantificar memoria espacial, que es un proceso en donde interviene el hipocampo (Vorhees 2010). Este laberinto consiste en una tina llena con agua opacada, con una plataforma no visible a simple vista que constituye la vía de escape. Durante los entrenamientos los ratones se colocan en diferentes puntos de inicio (previamente establecidos) y se les deja nadar durante un minuto o hasta que encuentren la plataforma. Los animales aprenden la ubicación de la plataforma creando un mapa mental, utilizando como referencia señales externas colocadas alrededor de la tina, las cuales permanecen en el mismo sitio a lo largo de todo el experimento. Cada vez que el ratón no encuentre la plataforma se le lleva cuidadosamente hasta la misma y se le deja en esta ubicación de 5 a 10 segundos. Este procedimiento se repite varias veces a lo largo de varios días (sesiones de entrenamiento) y en una prueba final se remueve la plataforma del laberinto para cuantificar ciertos parámetros como tiempo de llegada al cuadrante donde estaba la plataforma o el tiempo que permanecen en este sitio.

Las condiciones para la realización de estas prueba se estandarizaron a partir de las referencias encontradas en la literatura(Clark et al. 2008; Li et al. 2009; Van Praag et al. 1999; Cao et al. 2004; Morris 1981) con las características descritas a continuación (resumidas en la tabla 3).

Características de la prueba realizada.- Se utilizó una tina de plástico de 65 cm de diámetro (Fig. 7) dividida en cuadrantes imaginarios, en uno de los cuales se colocó una

plataforma de 8 cm de diámetro. El recipiente se llenó de agua 0.5 cm por encima de la plataforma y para opacar el agua dentro de la tina se utilizó leche en polvo. La colocación de los objetos alrededor de la tina permaneció constante a lo largo de todo el experimento (cortina al norte, escritorio al sur y percheros en dirección este y oeste).

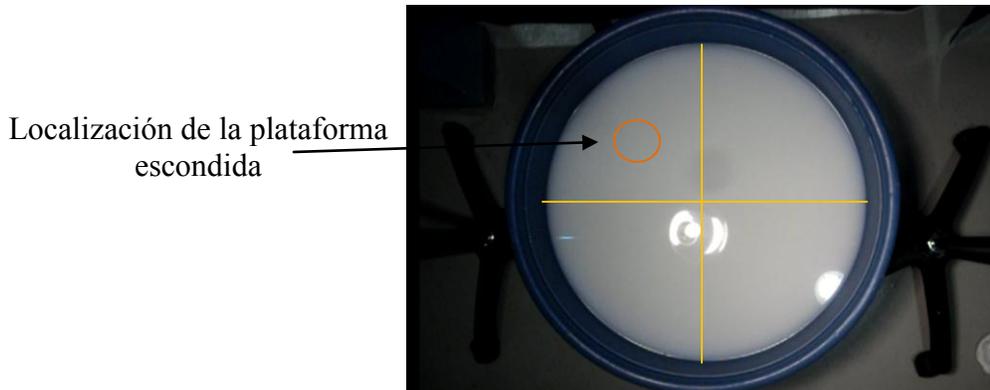


Figura 7.- Laberinto de Morris en el cual se realizaron las pruebas conductuales.

Se administró la morina durante 10 días (1 hora previa a la evaluación) y se realizaron las pruebas de aprendizaje del día 4 al día 7 (duración de 4 días), con dos entrenamientos por día, se registró el tiempo desde que el ratón se colocó en la tina hasta que llegó a la plataforma teniendo un límite de 60 s. En el décimo día se efectuó la prueba de memoria, en donde se removió la plataforma y se colocó a cada ratón en la tina para observar el tiempo que permanecían en el cuadrante objetivo, así como las veces que entraban a este en un tiempo de 60 s (fig. 8). El horario de las pruebas fue entre 9:00 AM y 11:00 AM.

Se promedió el tiempo de llegada a la plataforma por día en cada grupo. Para observar diferencias en la fase de aprendizaje se realizó una prueba ANOVA de dos vías, utilizando como factores el día de aprendizaje y tratamiento. La prueba de memoria fue analizada con

ANOVA de una vía. Se utilizó una prueba post hoc de Fisher, considerando el dato significativo con una $p < 0.05$.

Tabla 3.- Aspectos tomados en cuenta para la realización del laberinto de Morris

Característica	Medida
Diámetro de la tina	65 cm
Diámetro de la plataforma	8 cm
Colorante del agua	100 g de leche en polvo
Referencia espacial	El cuarto de entrenamiento (cortina, mesa, percheros, experimentador)
Días de entrenamiento	4
Entrenamientos por día	2
Duración de máxima por entrenamiento	60 s
Días posteriores para la prueba final	3
Duración de la prueba final	60 s

7.3.- Pruebas de biología molecular

Para determinar la proliferación celular y mecanismos moleculares relacionados con este fenómeno se realizaron pruebas de inmunofluorescencia en tejido de hipocampo, así como western blot para la detección de las formas fosforiladas de Erk (p-Erk) y de Gsk-3 β (p-Gsk-3 β). El diseño experimental de muestra en la fig. 8.

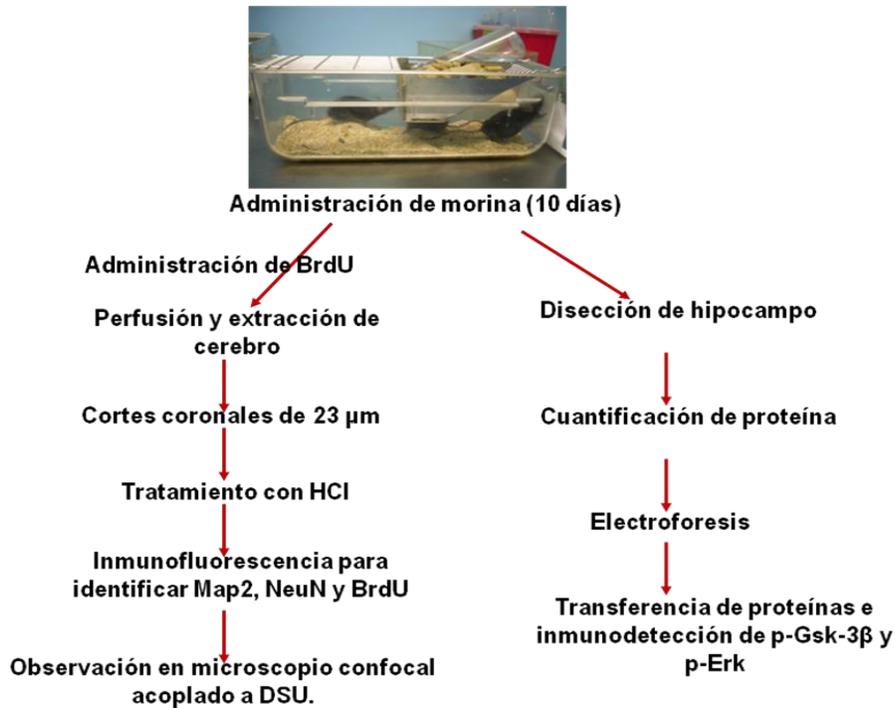


Figura 8. Esquema del diseño experimental para las pruebas moleculares.

7.3.1.- Administración de BrdU e inmunohistoquímica

Para determinar la proliferación celular, se inyectó en los ratones BrdU (Roche) vía intraperitoneal en dosis de 50 mg/kg durante los últimos tres días de tratamiento, dos veces cada día. Para el marcaje de las células en proliferación del giro dentado en hipocampo, se empleó el método descrito por Wojtowicks y Kee (Wojtowicz y Kee 2006) añadiendo algunas modificaciones.

Un día posterior al término de los tratamientos, se realizó una perfusión transcardíaca con solución salina (0.9% NaCl), seguida de paraformaldehído (PFA) al 4% disuelto en buffer de fosfatos salino (PBS) 0.1 M (137 mM de NaCl, 2.7 mM de KCl y 10 mM de Na₂HPO₄, a pH 7.4). Posteriormente se extrajo el cerebro y permaneció en post-fijación en la solución

de PFA 4% – PBS. Para la crioprotección del tejido, se colocó el cerebro en una solución de sacarosa al 30% en PBS.

Se realizaron cortes coronales de 23 μm de grosor, tomando en cuenta aquellos en los que estuviera presente el giro dentado del hipocampo. Los cortes se sometieron primero a tres lavados de 10 minutos con PBST (PBS 0.1 M con tritón al 0.03%) para permeabilizar el tejido. Después se desnaturalizó el DNA con una incubación de 30 minutos en HCl 2N a 37°C, para normalizar el pH se hizo una incubación durante 10 minutos en buffer de borato 0.1 M ajustado a un pH de 8.8.

Se bloqueó durante 90 minutos con albúmina al 5% y suero de cabra al 5%, para posteriormente dejar incubando con anticuerpo primario para BrdU (1:50, Santa Cruz sc-56258) y Map2 (1:800, Abcam ab5392) a 4°C durante toda la noche.

Se realizaron 3 lavados de diez minutos con buffer de fosfatos (PB, a 76 mM de Na_2HPO_4 y 26 mM de NaH_2PO_4), incubando después durante dos horas los anticuerpos secundarios. Para detectar el BrdU se utilizó el anticuerpo Alexa 647 (anti-rata hecho en burro, 1:200, Invitrogen) y para Map2 se añadió Alexa 488 (anti-pollo hecho en cabra, 1:400, Invitrogen). Se lavó 3 veces durante 10 minutos con PB y posteriormente se incubó con DAPI (1:200, sigma) por 10 minutos y nuevamente se lavó con PB en tres repeticiones de 10 minutos.

Se realizó la observación de las imágenes en un microscopio Olympus BX51 W1 acoplado a una unidad de disco giratorio (DSU), se tomaron fotos a 20X y se contabilizó el número de células positivas a BrdU en cada corte para finalmente promediar el número de células positivas en el total de los cortes de cada tratamiento. El criterio tomado en cuenta para el conteo de las células fue que estuvieran en la zona sub-granular, ubicada entre la capa granular y la polimórfica.

Se utilizó el marcador NeuN (millipore, MAB377, concentración 1:200), con anticuerpo secundario anti-ratón hecho en burro Alexa 488 (1:200, Invitrogen) en algunos cortes para tener otro marcador de neuronas maduras.

7.3.2.- Cuantificación de proteínas mediante método de Lowry

Para la obtención de las muestras para cuantificar proteína se sacrificaron los ratones mediante dislocación cervical, disecando posteriormente el hipocampo. Se obtuvieron homogenados de las muestras mediante lisis del tejido con buffer RIPA (pH de 7.4), el cual contenía inhibidores de fosfatasa (1 mM de ortovanadato de sodio, 8 mM de pirofosfato de sodio, 1 mM de glicerol 2- fosfato) e inhibidores de proteasas (en tableta) para mantener la integridad de las proteínas y las fosforilaciones de estas.

Se agregaron 2 µl de homogenado a 198 µl de agua bidestilada, a esta mezcla se le añadió 1 ml de solución de Lowry ($\text{Cu}_2(\text{SO}_4)_3$ al 0.5% + Na_2CO_3 al 2%, NaOH al 0.4% y tartrato de sodio al 0.002%), transcurridos 10 minutos se adicionaron 100 µl del reactivo de Folin al 50%. Después de incubar durante una hora a temperatura ambiente, se determinó la absorbancia de la muestra en un espectrofotómetro, utilizando una longitud de onda de 550 nm. La cantidad de proteína en cada muestra fue determinada con respecto a una curva patrón de albúmina.

7.3.3.- Western blot

Para la electroforesis de las proteínas, se añadió amortiguador de carga 3X (30% de glicerol, 15% de tris pH 6.8 1 M, 15% de agua bidestilada, 30% de SDS a 20%, 0.3% de azul de bromofenol a 1% y 10% de β -mercaptoetanol) a los homogenados de las muestras

en relación 1:1, se hirvió esta mezcla para desnaturalizar las proteínas y cargarlas en geles de poliacrilamida al 12%.

Las proteínas fueron separadas por peso molecular con un voltaje constante de 110 V durante 90 minutos en amortiguador de corrida (25 mM de Tris base, 250mM de glicina y 6 mM de SDS).

Una vez separadas las proteínas en el gel se transfirieron a membranas de nitrocelulosa utilizando un amortiguador que contenía 38 mM de glicina, 47 mM de tris base y 1.2 mM de SDS; aplicando una intensidad constante de 200 mA durante dos horas.

Para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos las membranas se bloquearon con leche al 5% en buffer salino de tris (TBS, con 136 mM de NaCl, 2 mM de KCl y 24 mM de tris base). Para la inmunodetección de las proteínas deseadas se realizó la incubación a 4°C en los siguientes anticuerpos durante toda la noche: p-Gsk-3 β (1:700, Santa Cruz), p- Erk 1/2 (1:2,000, Cell Signaling) y actina (1:5,000 Cell Signalling) como control de carga. Se realizaron lavados con TBS y se incubó durante 1 hora en anticuerpo secundario (anti-ratón hecho en conejo, 1:10,000 conjugado con hrp y anti-conejo hecho en ratón, 1:3,000 conjugado con hrp).

El revelado se realizó mediante la adición de reactivo de quimioluminiscencia (Santa Cruz) sobre las membranas y la observación de las bandas en películas de revelado. El análisis de la expresión de las proteínas de interés con respecto a su control de carga se realizó con el software ImageJ.

LISTA DE REACTIVOS UTILIZADOS

Nombre del reactivo	Marca
Acrilamida	Biorad
Albúmina	MP Biomedicals
Azul de bromofenol	Meyer
β -mercaptoetanol	Sigma
Bisacrilamida	Sigma
Borato de sodio	Sigma
Buffer RIPA	Thermoscientific
Carbonato de sodio (Na_2CO_3)	Golden Bell
Cloruro de sodio (NaCl)	Golden Bell
Cloruro de potasio (KCl)	Golden Bell
Duodecil sulfato sódico (SDS)	Golden Bell
Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4)	Golden Bell
Fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4)	Golden Bell
Glicerol 2-fosfato	Sigma
Glicerol	Meyer
Ortovanadato de sodio	Sigma
Paraformaldehído (PFA)	Electron Microscopy Sciences
Pirofosfato de sodio	Sigma
Reactivo de Folin	Sigma
Sacarosa	Golden Bell
Sulfato cúprico ($\text{Cu}_2(\text{SO}_4)_3$)	Fermont
Tableta de inhibidores de proteasas	Roche
Tártrato de sodio	Fermont
Tritón	Golden Bell
Tris base	Golden Bell

8.- Resultados

8.1.- Aprendizaje y memoria en ratones tratados con morina

8.1.1.- Trayecto recorrido durante las diferentes fases de la prueba.- Los trayectos de los ratones para llegar a la plataforma en el último entrenamiento se indican en las figuras 9 A y B, donde se observa que independientemente del lugar donde inicie el recorrido los ratones, controles y experimentales, realizan una ruta dirigida al sitio de escape. Después la plataforma fue removida, indicándose en la figura 9C el recorrido de un ratón en el laberinto.

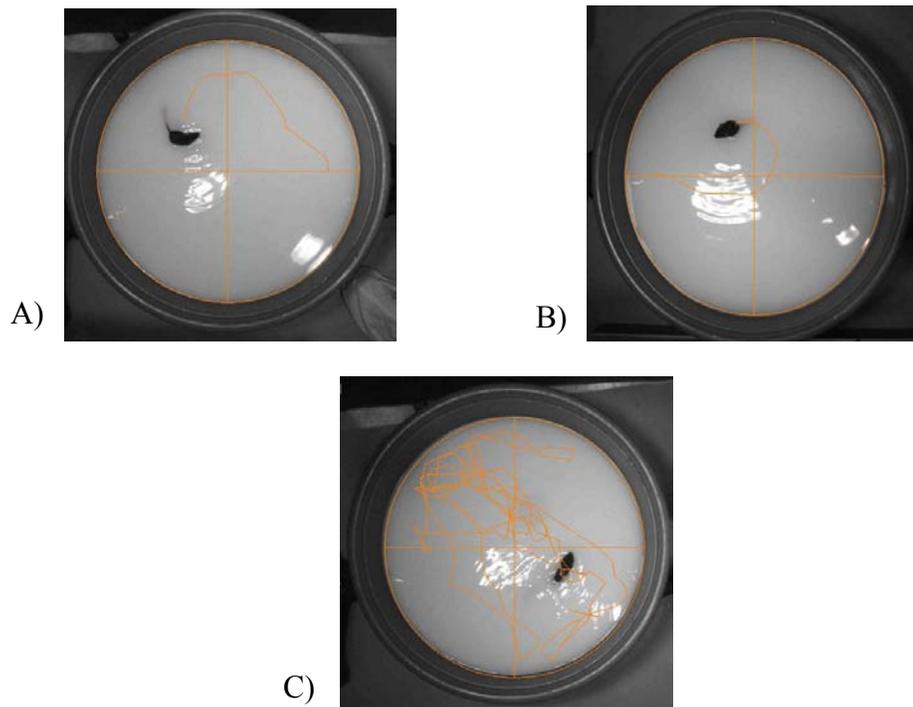


Figura 9.- Trayecto de los ratones en el laberinto de Morris. A) y B) trayecto del ratón desde su colocación en el laberinto hasta su llegada a la plataforma. C) Recorrido en la prueba final de memoria donde se remueve la plataforma.

8.1.2.- Fase de aprendizaje.- En esta prueba se observa una disminución progresiva del tiempo que los ratones necesitaban para llegar a la plataforma en todos los grupos, tanto controles como experimentales (Fig. 10 y tabla 4). En el primer día, la latencia es mayor en todos los grupos, con una media general $39s \pm 2.2$; en el segundo día, disminuye hasta $27s \pm 2.2$; en el tercer día llegan en $22s \pm 2.1$; y finalmente en el cuarto día la latencia es menor respecto a la sesión anterior, llegando en $18s \pm 1.6$.

Figura 10.- Fase de aprendizaje. Latencia de llegada de los ratones a la plataforma (medida en segundos) a lo largo de 4 días de entrenamiento, se muestran los grupos: control, vehículo y los tratamientos de morina (ANOVA de dos factores: Día $F_{3,36}=35.3$, $p<0.05$. Tratamiento $F_{5,60}=2.5$, $p<0.05$. Tratamiento \times día $F_{15,180}=1.61$, $p=0.07$. $n=15$, se muestran medias \pm E.E.M.)

Realizando las comparaciones entre los grupos, el tratamiento con morina a dosis de 2.5 mg/kg provocó disminución significativa en la latencia del segundo y tercer día respecto al vehículo (Fig. 11 y tabla 4). En el segundo día, el promedio de latencia del vehículo fue de 36 ± 5.8 , mientras el del tratamiento de morina, de 18 ± 3.6 ; en el tercer día, el vehículo tuvo

un promedio de 26 ± 5.4 , con 13 ± 3.9 que se observaron con el grupo al que se le administró el flavonoide. En el cuarto día, siguen existiendo diferencias, a pesar de que no resultan significativas, con un promedio de 23 por parte del vehículo, y 14.9 ± 3.0 de los ratones administrados con la morina.

Tabla 4.- Latencia de llegada a la plataforma a lo largo de 4 días (n=15, se muestran promedios \pm E.E.M)

Día	Control	Vehículo	2.5 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg
1	39.6 ± 5.5	41.9 ± 5.3	35.7 ± 5.7	39.1 ± 5.9	43.9 ± 4.8	36.1 ± 5.2
2	20.5 ± 4.5	36.0 ± 5.8	18.3 ± 3.6	28.8 ± 5.4	31.4 ± 5.7	31.8 ± 5.7
3	28.0 ± 5.4	26.6 ± 5.4	13.8 ± 3.9	22.3 ± 4.8	24.3 ± 4.6	20.9 ± 5.4
4	24.9 ± 5.2	23.0 ± 4.7	14.9 ± 3.0	15.3 ± 3.4	16.9 ± 3.4	16.7 ± 3.3

Figura 11. La morina disminuye el tiempo de llegada a la plataforma durante el aprendizaje. Tiempo de llegada a la plataforma a lo largo de 4 días de entrenamiento en los grupos vehículo y morina a 2.5 mg/kg (ANOVA de dos factores: Día $F_{3,36}=35$, tratamiento $F_{5,60}=2.5$ $p<0.05$. Tratamiento x día $F_{15,180}=1.61$ $p=0.07$. n=15. El post hoc de Fisher mostró diferencias en día 2 y 3) Se muestran promedios \pm E.E.M. * $P<0.05$).

8.1.3.- Prueba de memoria.- En esta fase del experimento se midieron dos parámetros: la permanencia en el cuadrante objetivo y el número de cruces de plataforma en 60 s (fig. 12).

Los porcentajes de estancia en el cuadrante objetivo en cada grupo fue del rango de 20 a 25% y no hubo diferencias significativas entre los animales controles y los experimentales (fig. 12A). Asimismo, tampoco hubo diferencias en el tiempo que los ratones tardaron en realizar su primer entrada al cuadrante objetivo (Fig. 12B).

A) Tratamiento (mg/kg) **B)** Tratamiento (mg/kg)

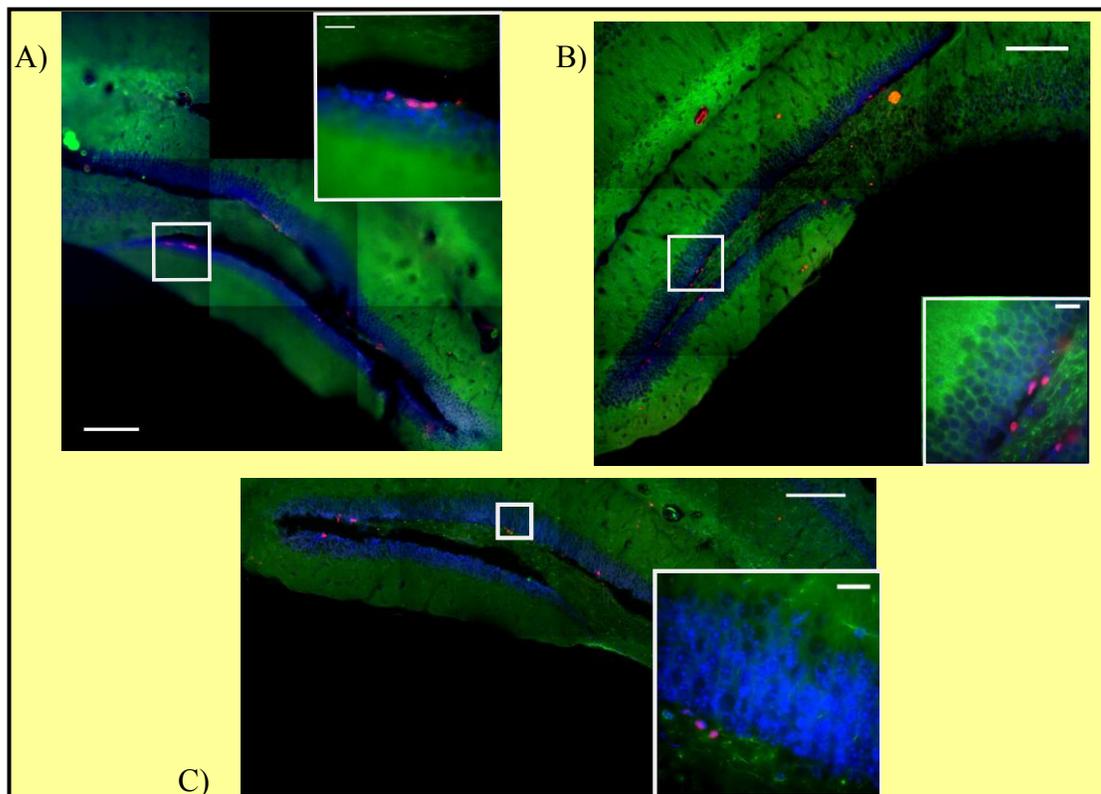
Figura 12.- Prueba de memoria. A) Porcentaje de permanencia en el cuadrante objetivo en los grupos control, vehículo y tratamientos con morina ($F_{5,84}=1.42$, $p=0.22$, $n=15$). B) Tiempo que los ratones tardaron en entrar al cuadrante objetivo ($F_{5,84}=0.77$, $p=0.61$, $n=15$)

8.2.- Proliferación celular en hipocampo de ratones sanos tratados con morina.

Se hizo el conteo del número de células positivas a BrdU por corte (Tabla 5). En este estudio preliminar, se observó que en los animales tratados con la dosis más baja (2.5 mg/kg), hay un mayor promedio de células en proliferación en la ZSG del GD del

hipocampo (Fig. 13). En la fig. 14 se muestran los cortes de las imágenes representativas de cada tratamiento, donde la marca para BrdU está en color rojo y en verde está Map2, que marca citoesqueleto de neuronas maduras.

Figura 13.- Promedio de células positivas a BrdU en GDH (n=1, excepto en 2.5 y 5 mg/kg, con n=2 y 3 respectivamente. Se muestran promedios con E.E.M.)



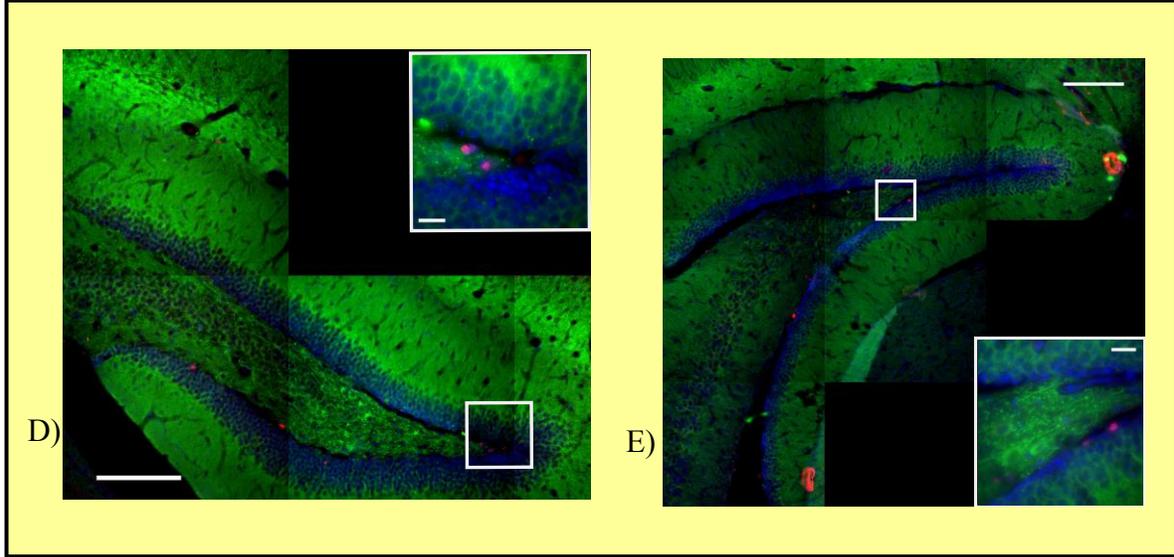


Figura 14.- Imágenes del giro dentado de hipocampo de ratones tratados con vehículo o morina. A: Vehículo, B: 2.5 mg/kg, C:5 mg/kg, D: 10 mg/kg y E: 20 mg/kg. Marca nuclear con DAPI (azul), BrdU (rojo), Map2 (Verde). El giro dentado del hipocampo se muestra a un aumento de 20x, su barra de escala es de 150µm; las imágenes amplificadas están a 60x, su barra de escala es de 20µm.

El experimento para observar la proliferación celular con inmunodetección por fluorescencia con BrdU se realizó en un total de tres veces, sin embargo, en los últimos dos experimentos la marca de BrdU no se detectó en ninguno de los animales controles, ni experimentales. Después de realizarse diferentes variaciones metodológicas, tales como el cambio en el tiempo de incubación en HCl y de las pruebas con diferentes anticuerpos primarios y secundarios, concluimos que el reactivo BrdU, el cual fue comprado en otra casa comercial (Sigma), era el responsable de la falla en la marca, quizá por algún percance durante su almacenamiento o por fabricación. Sin embargo, para la continuación de este protocolo se tienen los cerebros almacenados y serán evaluados con Dcx, un anticuerpo que

nos permitirá determinar si existe un mayor número de neuronas en estadios primarios de desarrollo.

8.2.1.- Estandarización de NeuN

Se realizó la prueba del marcador neuronal NeuN para identificar estas células en estado maduro ubicadas en zona granular del giro dentado del hipocampo y considerar la utilización de este marcador en un futuro (Fig. 15).

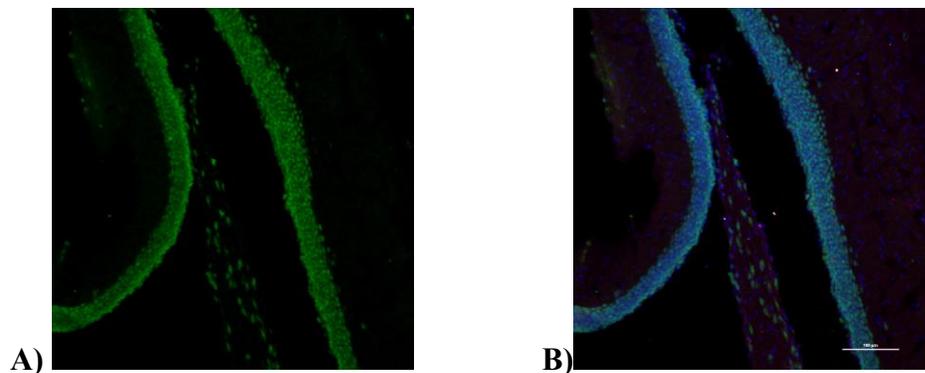


Figura 15.- Marca de NeuN en el giro dentado del hipocampo A) en verde se muestra la proteína nuclear neuronal NeuN. B) Co-localización de DAPI (azul) con NeuN (Aumento a 20x).

8.3.- Posibles Mecanismos moleculares involucrados en el efecto de la morina en hipocampo de ratones.

8.3.1.- Expresión de p-Gsk 3 β

La expresión de la proteína fosforilada Gsk-3 β en la serina 9 (p-Gsk-3 β) se analizó a través de western blot, donde no se observan cambios por la administración de morina hasta las dosis de 10 y 20 mg/kg, en las que ocurre una disminución de 34 y 46% respectivamente (Fig. 16 B).

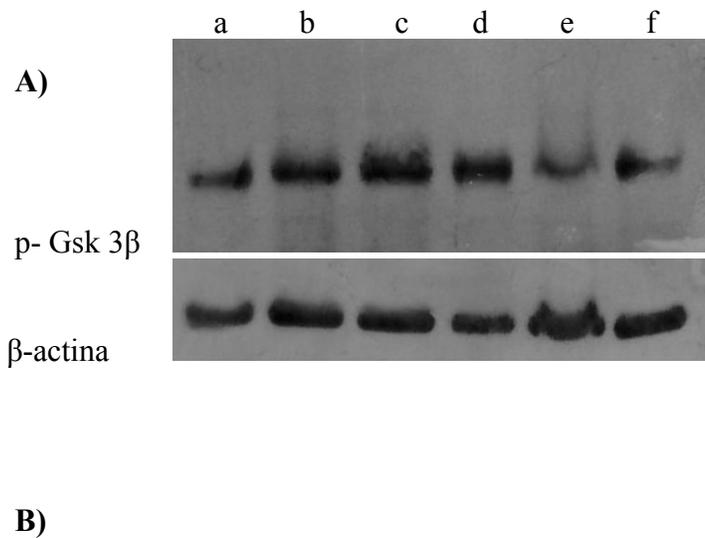


Figura 16.-Expresión de p- Gsk 3 β por la administración de diferentes dosis de morina. A) a.- Control, b.- Vehículo, c.- 2.5 mg/kg, d.- 5 mg/kg, e.- 10 mg/kg, f.- 20 mg/kg. B) Gráfica de la densitometría ($F_{5,12}=1.49$, $p=0.23$, $n=3$, Se muestra promedio y E.E.M.)

8.3.2.- Expresión de p-Erk 1/2

Se investigó el papel que podría estar llevando a cabo uno de los efectores de las MAP cinasas involucrado en proliferación celular. Se observó que no hay cambios la expresión de Erk 1/2 fosforilado (p-Erk 1/2) en los diferentes grupos, tanto controles, como experimentales (Fig. 17).

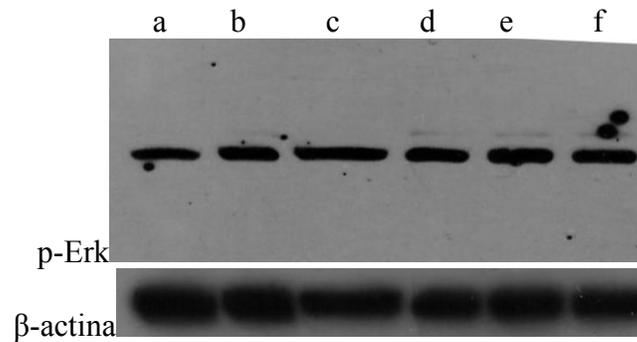


Figura 17.- Expresión de p-Erk ante la administración de diferentes dosis de morina.
a.- Control, b.- Vehículo, c.- 2.5 mg/kg, d.- 5 mg/kg, e.- 10 mg/kg, f.- 20 mg/kg

9.- Discusión

Pruebas de aprendizaje y memoria

Se realizó la administración de morina durante 10 días para observar proliferación celular, pero considerando los diversos blancos moleculares que tiene la morina y el efecto de los flavonoides sobre la plasticidad cerebral, es posible que ocurran cambios en las neuronas maduras y esto influya en el comportamiento (Spencer, Vauzour y Rendeiro 2009). Para observar este posible efecto se estandarizó el protocolo de laberinto acuático de Morris.

Los ratones que recibieron la dosis de 2.5 mg/kg de morina obtuvieron los tiempos más cortos de latencia de llegada a la plataforma en los días 2 y 3 de aprendizaje (días 5 y 6 de administración) respecto al vehículo, lo que indica una adquisición más rápida de la información aprendida.

El efecto sobre el aprendizaje se ha reportado con otros polifenoles. Con el resveratrol mejora el desempeño en la fase de aprendizaje del laberinto de Morris en ratones administrados con 0.2 mg/kg del polifenol durante 22 días (Harada et al. 2011).

Wang y cols. en 2012 efectuaron un estudio a 60 días con dosis diarias de 20 mg/kg (Wang et al. 2012) de EGCG en ratones, y reportaron menor tiempo de latencia en la fase de aprendizaje a partir del segundo entrenamiento. El efecto que reportan los autores lo relacionan con la neurogénesis, sin embargo, los trabajos revisados carecen de experimentos que refuercen la correlación entre la mejora de la memoria con el aumento en el número de neuronas.

Tomando en cuenta los diferentes mecanismos de plasticidad involucrados en aprendizaje, una diferencia funcional puede ocurrir como resultado de modificaciones morfológicas en neuronas ya existentes (Rochefort y Konnerth 2012). Reportamos en estudios preliminares que una administración diaria de morina en una concentración de 2.5 mg/kg durante 10 días

tiene una tendencia de aumentar las espinas dendríticas en el área CA1 del hipocampo de ratones de 8 semanas de edad (Fig. 18) (Rivera et al. 2014).

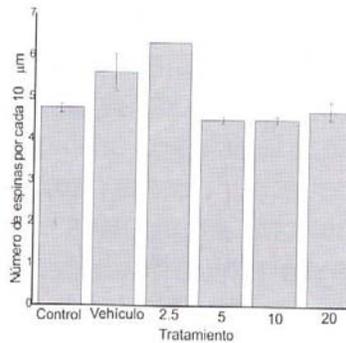


Figura 18.- Número de espinas dendríticas por cada 10 μm en el área CA1 de hipocampo con los diferentes tratamientos.

En la prueba de memoria no se observan cambios en los tratamientos respecto a los grupos controles. Para explicar este aspecto es de importancia conocer las bases neuroanatómicas del aprendizaje, donde el hipocampo es una estructura importante para almacenar la información que se está adquiriendo del medio, posteriormente la corteza tiene un papel fundamental en el almacenamiento a largo plazo de estos recuerdos para su evocación (Van Strien, Cappaert, and Witter 2009). Siendo así, se puede proponer que la morina estaría ejerciendo un efecto sobre el hipocampo, para permitir una adquisición más rápida de la información que se está obteniendo, pero no en la posterior evocación de la misma.

En cuanto a los porcentajes adquiridos en la prueba de memoria, se han observado resultados similares en otros reportes donde la permanencia en el cuadrante objetivo está cerca del 25%, siendo los tratamientos los que provocan el incremento respecto a los grupos control (Cao et al. 2004; Van Praag et al. 1999).

En este tipo de protocolos se realizan pocas sesiones de entrenamiento debido a que una sesión de entrenamientos más intensiva enmascararía el efecto de una posible mejoría en la memoria, a lo cual se le ha llamado “efecto techo” (Rudy 2014). Tomando en cuenta que los efectos de la morina podrían verse de mejor manera con un protocolo de baja intensidad, se decidió utilizar 72 horas posteriores para evaluar la memoria.

Otro aspecto metodológico a observar es el diámetro de la tina donde se realizó la prueba, que siendo de 65 cm de diámetro es corto en comparación con la mayoría de laberintos que se utilizan. Estas dimensiones se tomaron en cuenta por el trabajo de Clark et al. 2008, donde mencionan que su laberinto con 70 cm de diámetro funcionó para las pruebas de adquisición y retención. Además de este aspecto se tiene que mencionar que se ha reportado un rendimiento similar en laberintos de diámetros cortos en comparación con los de dimensiones grandes (Van Der Staay 2000; Van Dam, Lenders y De Deyn 2006).

Resulta interesante también corroborar los resultados obtenidos en nuestro estudio con otro tipo de pruebas conductuales que permitan conocer de manera precisa el funcionamiento de la morina. Estas pruebas estarían encausadas principalmente a comprobar que exista un efecto sobre la memoria propiamente, sobre la motricidad, o que haya una repercusión en la ansiedad, factores que también influyen en pruebas de laberintos (Carrillo, Giordano y Santamaría 2009).

Proliferación celular en GDH

Actualmente se sabe que los polifenoles y en especial los flavonoides tienen acciones benéficas sobre el SNC, (Spencer, Vauzour y Rendeiro 2009; Williams y Spencer 2012) y para que se tome en cuenta su uso como terapia en diferentes padecimientos es importante profundizar en la investigación de sus efectos. Los experimentos realizados en este

proyecto se dirigieron hacia la exploración del efecto de la morina sobre la proliferación celular relacionada con neurogénesis y los mecanismos moleculares que pudieran estar implicados.

Dentro de las etapas de la neurogénesis se ha observado el efecto positivo *in vivo* que algunos polifenoles tienen sobre la fase proliferativa de las células progenitoras del hipocampo en roedores (Kim et al. 2008; S. Lee et al. 2010). En nuestros resultados se observa que hay una tendencia hacia una mayor proliferación celular con la dosis más baja de morina (2.5 mg/kg) aplicada en este estudio, esto tendrá que ser corroborado posteriormente aumentando el tamaño muestral. En comparación con otros estudios realizados hay similitud en la dosis efectiva para aumentar la neurogénesis.

En el caso del EGCG y de la oroxilina A se observa que aumentan neurogénesis en dosis de 2.5 mg/kg y 5 mg/kg respectivamente. La curcumina y el resveratrol inclusive tienen efecto en dosis más bajas, la primera con 0.16 mg/kg y el segundo a 0.20 mg/kg, por lo que resulta interesante continuar con estas dosis.

Se dará un seguimiento a largo plazo con la administración de la morina usando marcadores de neuronas en desarrollo. Para la continuación de este protocolo se tienen los cerebros almacenados y serán evaluados con Ki67 y Dcx, con los cuales se marcarán neuronas en estadios primarios de desarrollo.

La biodisponibilidad de estos compuestos es un tema poco estudiado y se sabe poco acerca de la cantidad de fármaco que puede estar llegando al cerebro en determinado tiempo y por lo tanto ejercer un efecto. No obstante se ha observado que los polifenoles ejercen un efecto sobre la neurogénesis desde los 4 días en el caso de la curcumina (Kim et al. 2008), tiempo menor al usado en este trabajo.

Entre los compuestos en los que se ha observado su efecto sobre sistema nervioso, se ha visto que después de 13 días de administración del flavanol (-) epicatequina, el compuesto está presente en el tejido cerebral, provocando aumento en angiogénesis y en la cantidad de proyecciones dendríticas (van Praag et al. 2007).

En cuanto a la repercusión funcional que un aumento en la neurogénesis pueda provocar, es importante tomar en cuenta que además de que las nuevas neuronas forman un sustrato para la formación de memoria, también representan una remodelación de los circuitos neuronales, lo cual trae consigo la pérdida de información adquirida en el momento del aumento en la proliferación (Akers et al. 2014). Por lo tanto es importante ser cuidadoso en el protocolo de conducta que se realice para dar una relación funcional con la neurogénesis.

Mecanismos moleculares

Se conoce que la morina tiene efecto sobre Gsk-3 β (Ji et al. 2011), proteína que participa en el desarrollo neuronal a través de la vía Wnt/ β -catenina (Morales-Garcia et al. 2012) y otras proteínas reguladoras (Valvezan y Klein 2012). Gsk-3 β funciona señalizando para la degradación del factor de transcripción pro-neuronal β -catenina, pero en estado fosforilado (p-Gsk-3 β) se inactiva (Jope y Johnson 2004). Esta fosforilación normalmente se asocia con la actividad de factores de crecimiento (Valvezan y Klein 2012).

En nuestros experimentos se observa que la expresión de p-Gsk-3 β permanece constante en las dosis más bajas administradas (2.5 y 5 mg/kg), de manera que la proteína fosforilada no estaría interviniendo en un aumento de neurogénesis dependiente de una administración de morina. Sin embargo, es importante tomar en cuenta que la regulación de la proteína puede ocurrir por la intervención de la morina directamente con Gsk-3 β sin afectarla en su fosforilación, y también por otra interacción proteica.

Las vías de señalización de los factores de crecimiento tienen como elementos importantes a las MAP cinasas, donde p-Erk es un efector de estas cascadas (Cao et al. 2004). Se ha observado que su expresión es aumentada por la administración de curcumina (Kim et al. 2008). En nuestros resultados se ve que el tratamiento con morina no provocó cambios en la fosforilación de Erk respecto a los controles, por lo tanto estos resultados sugieren que en las condiciones del tratamiento con morina, la vía en la que participa esta proteína permanece intacta. Tomando en cuenta que no se observaron cambios asociados a p-Erk ni a p-Gsk-3 β (a 2.5 y 5 mg/kg), las vías asociadas a factores de crecimiento parecen no tener intervención con la administración de morina.

Otro aspecto que se observó en la expresión de p-Gsk-3 β , fue una tendencia a disminuir con las dosis de 10 y 20 mg/kg. Esta característica sería indicativa de que Gsk-3 β se activa respecto a los controles. En cultivo de neuronas de hipocampo de rata se observa una disminución de la longitud dendrítica y del número de ramificaciones neuronales cuando disminuye la fosforilación de Gsk-3 β (Rui et al. 2013). Algo similar sucede en cultivo celular de la línea SH-SY5Y, donde ocurre una correlación entre la disminución de p-Gsk-3 β y de las proyecciones de tipo neuronal en células diferenciadas (Sanchez et al. 2001). La disminución de p-Gsk-3 β también ocurre en plaquetas de pacientes con déficit cognoscitivo leve y con enfermedad de Alzheimer (Forlenza et al. 2011).

En el caso de la glía, la principal relación de p-Gsk-3 β es con inflamación. En un modelo de Alzheimer en ratones transgénicos la actividad de Gsk-3 β está implicada en la reactividad astrocítica y en la producción de interleucina 1 β (IL-1 β), aumentando además la migración de la microglía de manera dependiente de Gsk-3 β (Ko et al. 2014). Huang y colaboradores (Huang et al. 2009) observaron que la administración de la toxina LPS en cultivo de microglía aumenta la expresión de RANTES e iNOS por mediación de Gsk-3 β .

Si se provoca entonces la activación de Gsk-3 β se producirán efectos que pueden ser adversos tanto en neuronas como en glía, generando inflamación que se ha demostrado desfavorable sobre la neurogénesis (Ekdahl et al. 2003).

Estos datos tienen sentido por el efecto bifásico que los polifenoles muestran en dosis altas y bajas, por ejemplo la curcumina dosis altas provoca muerte celular en cultivos de células progenitoras neuronales, mientras que a dosis bajas estimula su proliferación (Kim et al. 2008); este efecto también ocurre con el EGCG, donde en dosis altas disminuye la proliferación celular en hipocampo de ratas adultas (Márquez 2013).

10.- Conclusión

Los ratones administrados con la dosis de 2.5 mg/kg de morina aprenden más rápido la ubicación de la plataforma de escape.

Existe una tendencia hacia una mayor proliferación celular en la dosis de 2.5 mg/kg administrada durante 10 días. No existen cambios en la expresión de p-Erk y p-Gsk-3 β .

Con este estudio se abre la posibilidad de explorar a la morina como una molécula con potenciales beneficios en la cognición.

11.- Bibliografía

- Akers, Katherine G, Alonso Martinez-Canabal, Leonardo Restivo, Adelaide P Yiu, Antonietta De Cristofaro, Hwa-Lin Liz Hsiang, Anne L Wheeler, et al. 2014. "Hippocampal Neurogenesis Regulates Forgetting during Adulthood and Infancy." *Science* 344: 598–602. doi:10.1126/science.1248903.
- Altman, J. 1962. "Are New Neurons Formed in the Brains of Adult Mammals." *American Association for the Advancement of Science* 135 (3509): 1127–28.
- Alvarez-Buylla, A, and DA Lim. 2004. "For the Long Run: Maintaining Germinal Niches in the Adult Brain." *Neuron* 41: 683–86.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627304001114>.
- Alvarez-Buylla, Arturo, Bettina Seri, and Fiona Doetsch. 2002. "Identification of Neural Stem Cells in the Adult Vertebrate Brain." *Brain Research Bulletin* 57 (6): 751–58.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12031271>.
- Ashton, RS, A Conway, and C Pangarkar. 2012. "Astrocytes Regulate Adult Hippocampal Neurogenesis through Ephrin-B Signaling." *Nature ...* 15 (10): 1399–1408.
<http://www.nature.com/neuro/journal/v15/n10/abs/nn.3212.html>.
- Breunig, Joshua J, John Silbereis, Flora M Vaccarino, Nenad Sestan, and Pasko Rakic. 2007. "Notch Regulates Cell Fate and Dendrite Morphology of Newborn Neurons in the Postnatal Dentate Gyrus." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (51): 20558–63. doi:10.1073/pnas.0710156104.
- C Vorhees, M Williams. 2010. "Morris Water Maze: Procedures for Assessing Spatial and Related Forms of Learning and Memory." *National Institutes of Health* 1 (2): 848–58. doi:10.1038/nprot.2006.116.Morris.
- Cameron, H a, and R D McKay. 2001. "Adult Neurogenesis Produces a Large Pool of New Granule Cells in the Dentate Gyrus." *The Journal of Comparative Neurology* 435 (4): 406–17. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11406822>.
- Cameron, H, C Woolley, B McEwen, and E Gould. 1993. "Differentiation of Newly Born Neurons and Glia in the Dentate Gyrus of the Adult Rat." *Neuroscience* 56 (2): 337–44. doi:10.1016/0306-4522(93)90335-D.
- Campos-esparza, María Rosario, María Victoria Sánchez-gómez, and Carlos Matute. 2009. "Cell Calcium Molecular Mechanisms of Neuroprotection by Two Natural Antioxidant Polyphenols." *Cell Calcium* 45: 358–68. doi:10.1016/j.ceca.2008.12.007.

- Cao, Lei, Xiangyang Jiao, David S Zuzga, Yuhong Liu, Dahna M Fong, Deborah Young, and Matthew J Doring. 2004. "VEGF Links Hippocampal Activity with Neurogenesis, Learning and Memory." *Nature Genetics* 36 (8): 827–35. doi:10.1038/ng1395.
- Carrillo, Paul, Magda Giordano, and Abel Santamaría. 2009. "Spatial Memory: Theoretical Basis and Comparative Review on Experimental Methods in Rodents." *Behavioural Brain Research* 203 (2): 151–64. doi:10.1016/j.bbr.2009.05.022.
- Cheng, Christopher H K. 1997. "In Vitro and in Vivo Inhibitory Actions of Morin on Rat Brain Phosphatidylinositol Kinase Activity." *Life Sciences* 61 (20): 2035–47.
- Clark, P J, W J Brzezinska, M W Thomas, N a Ryzhenko, S a Toshkov, and J S Rhodes. 2008. "Intact Neurogenesis Is Required for Benefits of Exercise on Spatial Memory but Not Motor Performance or Contextual Fear Conditioning in C57BL/6J Mice." *Neuroscience* 155 (4): 1048–58. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.06.051.
- Cuccurazzu, Bruna, Lucia Leone, Maria Vittoria Podda, Roberto Piacentini, Elisa Riccardi, Cristian Ripoli, Gian Battista Azzena, and Claudio Grassi. 2010. "Exposure to Extremely Low-Frequency (50 Hz) Electromagnetic Fields Enhances Adult Hippocampal Neurogenesis in C57BL / 6 Mice." *Experimental Neurology* 226 (1). Elsevier Inc.: 173–82. doi:10.1016/j.expneurol.2010.08.022.
- Dill, John, Hongyu Wang, Fengquan Zhou, and Shuxin Li. 2008. "Inactivation of Glycogen Synthase Kinase 3 Promotes Axonal Growth and Recovery in the CNS." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 28 (36): 8914–28. doi:10.1523/JNEUROSCI.1178-08.2008.
- Doetsch, Fiona. 2003. "The Glial Identity of Neural Stem Cells." *Nature Neuroscience* 6 (11): 1127–34.
- Ekdahl, Christine T, Jan-hendrik Claasen, Sara Bonde, Zaal Kokaia, and Olle Lindvall. 2003. "Inflammation Is Detrimental for Neurogenesis in Adult Brain." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (23).
- Eriksson, Peter, Ekaterina Perfilieva, Thomas Bjork-Eriksson, Ann Alborn, Claes Nordborg, Daniel Peterson, and Fred Gage. 1998. "Neurogenesis in the Adult Human Hippocampus." *Nature Medicine* 4 (11): 1313–17.
- Forlenza, Orestes V, Carolina a Torres, Leda L Talib, Vanessa J de Paula, Helena P G Joaquim, Breno S Diniz, and Wagner F Gattaz. 2011. "Increased Platelet GSK3B Activity in Patients with Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease." *Journal of Psychiatric Research* 45 (2). Elsevier Ltd: 220–24. doi:10.1016/j.jpsychires.2010.06.002.
- Fournier, NM, B Lee, and M Banasr. 2012. "Vascular Endothelial Growth Factor Regulates Adult Hippocampal Cell Proliferation through MEK/ERK-and PI3K/Akt-Dependent

Signaling.” *Neuropharmacology* 63: 642–52.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0028390812001694>.

Fukuda, Satoshi, Fusao Kato, Yusuke Tozuka, Masahiro Yamaguchi, Yusei Miyamoto, and Tatsuhiro Hisatsune. 2003. “Two Distinct Subpopulations of Nestin-Positive Cells in Adult Mouse Dentate Gyrus.” *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 23 (28): 9357–66. doi:23/28/9357 [pii].

Gage, Fred H. 2002. “Neurogenesis in the Adult Brain.” *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 22 (3): 612–13.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3324277&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Ge, Shaoyu, Eyleen L K Goh, Kurt a Sailor, Yasuji Kitabatake, Guo-li Ming, and Hongjun Song. 2006. “GABA Regulates Synaptic Integration of Newly Generated Neurons in the Adult Brain.” *Nature* 439 (7076): 589–93. doi:10.1038/nature04404.

Gottlieb, Miroslav, Victoria Sa, Elena Alberdi, and Amaia Arranz. 2006. “Neuroprotection by Two Polyphenols Following Excitotoxicity and Experimental Ischemia.” *Neurobiology of Disease* 23: 374–86. doi:10.1016/j.nbd.2006.03.017.

Gould, Elizabeth, Alison J. Reeves, Mazyar Fallah, Patima Tanapat, Charles G. Gross, and Eberhard Fuchs. 1999. “Hippocampal Neurogenesis in Adult Old World Primates.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (9): 5263–67. doi:10.1073/pnas.96.9.5263.

Green, Holly, and Yvonne Nolan. 2014. “Inflammation and the Developing Brain: Consequences for Hippocampal Neurogenesis and Behavior.” *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 40: 20–34.

Harada, Naoaki, Juan Zhao, Hiroki Kurihara, Naomi Nakagata, and Kenji Okajima. 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. doi:10.1016/j.jnutbio.2010.09.016.

Heins, Nico, Paolo Malatesta, Francesco Cecconi, Masato Nakafuku, Kerry Lee Tucker, Michael a Hack, Prisca Chapouton, Yves-Alain Barde, and Magdalena Götz. 2002. “Glial Cells Generate Neurons: The Role of the Transcription Factor Pax6.” *Nature Neuroscience* 5 (4): 308–15. doi:10.1038/nn828.

Ho, N F, J M Hooker, a Sahay, D J Holt, and J L Roffman. 2013. “In Vivo Imaging of Adult Human Hippocampal Neurogenesis: Progress, Pitfalls and Promise.” *Molecular Psychiatry* 18 (4): 404–16. doi:10.1038/mp.2013.8.

Hodge, Rebecca D, Thomas D Kowalczyk, Susanne a Wolf, Juan M Encinas, Caitlin Rippey, Grigori Enikolopov, Gerd Kempermann, and Robert F Hevner. 2008.

- “Intermediate Progenitors in Adult Hippocampal Neurogenesis: Tbr2 Expression and Coordinate Regulation of Neuronal Output.” *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 28 (14): 3707–17. doi:10.1523/JNEUROSCI.4280-07.2008.
- Hooper, B., and R. Frazier. 2012. “Polyphenols in the Diet: Friend or Foe?” *Nutrition Bulletin* 37 (4): 297–308. doi:10.1111/j.1467-3010.2012.02001.x.
- Huang, Wei-Ching, Yee-Shin Lin, Chi-Yun Wang, Cheng-Chieh Tsai, Hsiang-Chi Tseng, Chia-Ling Chen, Pei-Jung Lu, et al. 2009. “Glycogen Synthase Kinase-3 Negatively Regulates Anti-Inflammatory Interleukin-10 for Lipopolysaccharide-Induced iNOS/NO Biosynthesis and RANTES Production in Microglial Cells.” *Immunology* 128 (1 Suppl): e275–86. doi:10.1111/j.1365-2567.2008.02959.x.
- Inestrosa, Nivaldo C, and Ernest Arenas. 2010. “Emerging Roles of Wnts in the Adult Nervous System.” *Nature Reviews. Neuroscience* 11 (2). Nature Publishing Group: 77–86. doi:10.1038/nrn2755.
- Jagasia, Ravi, Kathrin Steib, Elisabeth Englberger, Sabine Herold, Theresa Faus-Kessler, Michael Saxe, Fred H Gage, Hongjun Song, and D Chichung Lie. 2009. “GABA-cAMP Response Element-Binding Protein Signaling Regulates Maturation and Survival of Newly Generated Neurons in the Adult Hippocampus.” *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29 (25): 7966–77. doi:10.1523/JNEUROSCI.1054-09.2009.
- Jessberger, Sebastian, Robert E Clark, Nicola J Broadbent, Gregory D Clemenson, Antonella Consiglio, D Chichung Lie, Larry R Squire, and Fred H Gage. 2009. “Dentate Gyrus-Specific Knockdown of Adult Neurogenesis Impairs Spatial and Object Recognition Memory in Adult Rats.” *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 16: 147–54. doi:10.1101/lm.1172609.
- Ji, Eun, Hee Ra, Mi Eun, Shunfu Piao, Eunjin Lee, Dong-gyu Jo, Hae Young, Nam-chul Ha, Mark P Mattson, and Jaewon Lee. 2011. “Morin Attenuates Tau Hyperphosphorylation by Inhibiting GSK3 B.” *Neurobiology of Disease* 44: 223–30. doi:10.1016/j.nbd.2011.07.005.
- Jin, K, Y Zhu, Y Sun, and XO Mao. 2002. “Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Stimulates Neurogenesis in Vitro and in Vivo.” *Proceedings of the ...* 99 (18): 11946–50. <http://www.pnas.org/content/99/18/11946.short>.
- Jope, Richard S, and Gail V W Johnson. 2004. “The Glamour and Gloom of Glycogen Synthase Kinase-3.” *Trends in Biochemical Sciences* 29 (2). doi:10.1016/j.tibs.2003.12.004.
- Kandel, Eric, James Schwartz, and Thomas Jessel. 2000. *Principles of Neural Science*.

- Kempermann, G, HG Kuhn, and FH Gage. 1997. "More Hippocampal Neurons in Adult Mice Living in an Enriched Environment." *Nature* 386 (3): 493–95.
http://classes.biology.ucsd.edu/bgggn231.WI09/Feb25_Kempermann.pdf.
- Kempermann, Gerd. 2012. "New Neurons for 'Survival of the Fittest.'" *Nature Reviews. Neuroscience* 13: 727–36.
- Kesse-Guyot, E., L. Fezeu, V. Andreeva, M. Touvier, A. Scalbert, S. Hercberg, and P. Galan. 2012. "Total and Specific Polyphenol Intakes in Midlife Are Associated with Cognitive Function Measured 13 Years Later." *Journal of Nutrition* 142: 76–83.
 doi:10.3945/jn.111.144428.
- Kim, So Jung, Tae Gen Son, Hee Ra Park, Mikyung Park, Min-Sun Kim, Hyung Sik Kim, Hae Young Chung, Mark P Mattson, and Jaewon Lee. 2008. "Curcumin Stimulates Proliferation of Embryonic Neural Progenitor Cells and Neurogenesis in the Adult Hippocampus." *The Journal of Biological Chemistry* 283 (21): 14497–505.
 doi:10.1074/jbc.M708373200.
- Ko, Chiung-Yuan, Wen-Ling Wang, Shao-Ming Wang, Yu-Yi Chu, Wen-Chang Chang, and Ju-Ming Wang. 2014. "Glycogen Synthase Kinase-3 β -Mediated CCAAT/enhancer-Binding Protein Delta Phosphorylation in Astrocytes Promotes Migration and Activation of Microglia/macrophages." *Neurobiology of Aging* 35 (1). Elsevier Ltd: 24–34. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.07.021.
- Kuwabara, T, J Hsieh, and A Muotri. 2009. "Wnt-Mediated Activation of NeuroD1 and Retro-Elements during Adult Neurogenesis." *Nature ...* 12 (9): 1097–1105.
<http://www.nature.com/neuro/journal/v12/n9/abs/nn.2360.html>.
- Lai, Karen, Brian K Kaspar, Fred H Gage, and David V Schaffer. 2003. "Sonic Hedgehog Regulates Adult Neural Progenitor Proliferation in Vitro and in Vivo." *Nature Neuroscience* 6 (1): 21–27. doi:10.1038/nn983.
- Lee, S, DH Kim, DH Lee, and SJ Jeon. 2010. "Oroxylin A, a Flavonoid, Stimulates Adult Neurogenesis in the Hippocampal Dentate Gyrus Region of Mice." *Neurochemical ...* 35: 1725–32. doi:10.1007/s11064-010-0235-y.
- Lee, Star W, Gregory D Clemenson, and Fred H Gage. 2012. "New Neurons in an Aged Brain." *Behavioural Brain Research* 227 (2). Elsevier B.V.: 497–507.
 doi:10.1016/j.bbr.2011.10.009.
- Li, Q, H F Zhao, Z F Zhang, Z G Liu, X R Pei, J B Wang, M Y Cai, and Y Li. 2009. "Long-Term Administration of Green Tea Catechins Prevents Age-Related Spatial Learning and Memory Decline in C57BL/6 J Mice by Regulating Hippocampal Cyclic Amp-Response Element Binding Protein Signaling Cascade." *Neuroscience* 159 (4). IBRO: 1208–15. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.02.008.

- Lie, DC, SA Colamarino, HJ Song, and L Désiré. 2005. "Wnt Signalling Regulates Adult Hippocampal Neurogenesis." *Nature* 437 (27): 1370–75.
<http://www.nature.com/nature/journal/v437/n7063/abs/nature04108.html>.
- Lledo, Pierre-Marie, Mariana Alonso, and Matthew S Grubb. 2006. "Adult Neurogenesis and Functional Plasticity in Neuronal Circuits." *Nature Reviews. Neuroscience* 7 (3): 179–93. doi:10.1038/nrn1867.
- Madhyastha, Sampath, Sudhanshu Sekhar, and Gayathri Rao. 2013. "Resveratrol Improves Postnatal Hippocampal Neurogenesis and Brain Derived Neurotrophic Factor in Prenatally Stressed Rats." *International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 31 (7). International Society for Developmental Neuroscience: 580–85.
 doi:10.1016/j.ijdevneu.2013.06.010.
- Malberg, J E, a J Eisch, E J Nestler, and R S Duman. 2000. "Chronic Antidepressant Treatment Increases Neurogenesis in Adult Rat Hippocampus." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 20 (24): 9104–10.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11124987>.
- Márquez, Berenice. 2013. "Efecto de La Epigallocatequina 3-Galato Sobre La Neurogénesis Hipocámpica."
- Mccormick, Cheryl M, Feather Nixon, Catherine Thomas, Bobbi Lowie, and Joshua Dyck. 2010. "Hippocampal Cell Proliferation and Spatial Memory Performance after Social Instability Stress in Adolescence in Female Rats." *Behavioural Brain Research* 208 (1). Elsevier B.V.: 23–29. doi:10.1016/j.bbr.2009.11.003.
- Ménard, Catherine, Paul Hein, Annie Paquin, Aviva Savelson, Xiu Ming Yang, Doron Lederfein, Fanie Barnabé-Heider, et al. 2002. "An Essential Role for a MEK-C/EBP Pathway during Growth Factor-Regulated Cortical Neurogenesis." *Neuron* 36: 597–610. doi:10.1016/S0896-6273(02)01026-7.
- Migaud, Martine, Martine Batailler, Stéphanie Segura, Anne Duittoz, Isabelle Franceschini, and Delphine Pillon. 2010. "Emerging New Sites for Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: A Comparative Study between the Hypothalamus and the Classical Neurogenic Zones." *The European Journal of Neuroscience* 32 (12): 2042–52.
 doi:10.1111/j.1460-9568.2010.07521.x.
- Ming, Guo, and Hongjun Song. 2011. "Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions." *Neuron* 70 (4). Elsevier Inc.: 687–702. doi:10.1016/j.neuron.2011.05.001.
- Mira, Helena, Dieter-chichung Lie, Sophia A Colamarino, Hong-jun Song, Laurent De, Antonella Consiglio, Edward S Lein, et al. 2005. "Wnt Signalling Regulates Adult Hippocampal Neurogenesis." *Nature Letters* 437 (October). doi:10.1038/nature04108.

- Miranda, Cristobal L, Claudia Maier, and Jan Stevens. 2012. "Flavonoids." *eLS*, 1–13.
- Mirescu, Christian, Jennifer Peters, Liron Noiman, and Elizabeth Gould. 2006. "Sleep Deprivation Inhibits Adult Neurogenesis in the Hippocampus by Elevating Glucocorticoids." *PNAS* 103 (50): 1–6.
- Morales-Garcia, Jose a, Rosario Luna-Medina, Sandra Alonso-Gil, Marina Sanz-Sancristobal, Valle Palomo, Carmen Gil, Angel Santos, Ana Martinez, and Ana Perez-Castillo. 2012. "Glycogen Synthase Kinase 3 Inhibition Promotes Adult Hippocampal Neurogenesis in Vitro and in Vivo." *ACS Chemical Neuroscience* 3 (11): 963–71. doi:10.1021/cn300110c.
- Morris, G M. 1981. "Spatial Localization Does Not Require the Presence of Local Cues." *Learning and Motivation* 260: 239–60.
- Mudò, G, A Bonomo, V Di Liberto, M Frinchi, K Fuxe, and Natale Belluardo. 2009. "The FGF-2/FGFRs Neurotrophic System Promotes Neurogenesis in the Adult Brain." *Journal of Neural Transmission* 116 (8): 995–1005. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19291360>.
- Mustafa, Sarah, Alex Walker, Geoffrey Bennett, and Peter M. Wigmore. 2008. "5-Fluorouracil Chemotherapy Affects Spatial Working Memory and Newborn Neurons in the Adult Rat Hippocampus." *European Journal of Neuroscience* 28 (May): 323–30. doi:10.1111/j.1460-9568.2008.06325.x.
- Nones, Jader, Joice Stipursky, Sílvia Lima Costa, and Flávia Carvalho Alcantara Gomes. 2010. "Flavonoids and Astrocytes Crosstalking: Implications for Brain Development and Pathology." *Neurochemical Research* 35 (7): 955–66. doi:10.1007/s11064-010-0144-0.
- Oomen, Charlotte, Pedro Bekinhtein, Brianne Kent, Lisa Saksida, and Timothy Bussey. 2014. "Adult Hippocampal Neurogenesis and Its Role in Cognition." *Molecular Neurodegeneration* 5 (October): 573–87. doi:10.1186/1750-1326-6-85.
- Palmer, Theo D, Andrew R Willhoite, and Fred H Gage. 2000. "Vascular Niche for Adult Hippocampal." *The Journal of Comparative Neurology* 494 (July): 479–94.
- Paoli, Paolo, Paolo Cirri, Anna Caselli, Francesco Ranaldi, Giulia Bruschi, Alice Santi, and Guido Camici. 2013. "The Insulin-Mimetic Effect of Morin: A Promising Molecule in Diabetes Treatment." *Biochimica et Biophysica Acta* 1830 (4). Elsevier B.V.: 3102–11. doi:10.1016/j.bbagen.2013.01.017.
- Rao, Muddanna S., and Ashok K. Shetty. 2004. "Efficacy of Doublecortin as a Marker to Analyse the Absolute Number and Dendritic Growth of Newly Generated Neurons in the Adult Dentate Gyrus." *European Journal of Neuroscience* 19 (Dcx): 234–46. doi:10.1111/j.0953-816X.2003.03123.x.

- Rendeiro, Catarina, Andrew Foley, Vera C Lau, Rebecca Ring, Ana Rodriguez-Mateos, David Vauzour, Claire M Williams, Ciaran Regan, and Jeremy P E Spencer. 2013. "A Role for Hippocampal PSA-NCAM and NMDA-NR2B Receptor Function in Flavonoid-Induced Spatial Memory Improvements in Young Rats." *Neuropharmacology* 79C (December). Elsevier Ltd: 335–44. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.12.003.
- Riquelme, PA, E Drapeau, and F Doetsch. 2008. "Brain Micro-Ecologies: Neural Stem Cell Niches in the Adult Mammalian Brain." *Philosophical Transactions: Biological Sciences* 363 (1489): 123–37. <http://rstb.royalsocietypublishing.org/content/363/1489/123.short>.
- Rivera, José, Daniela Silva, César Rodríguez, Elena Bringas, Gonzálo Flores, Aurelio Campos, and Mónica Torres. 2014. "Evaluación de La Memoria Espacial Y de La Morfología Neuronal En El Hipocampo de Ratones Adultos Sanos Tratados Con Morina." *Archivos de Neurociencias*.
- Rocheffort, Nathalie, and Arthur Konnerth. 2012. "Dendritic Spines: From Structure to in Vivo Function." *EMBO Reports* 13 (8). Nature Publishing Group: 699–708. doi:10.1038/embor.2012.102.
- Rudy, Jerry. 2014. *Neurobiology of Learning and Memory*. Edited by Jerry Rudy. Second edi. Sinauer.
- Rui, Yanfang, Kenneth R Myers, Kuai Yu, Ariel Wise, Angel L De Blas, H Criss Hartzell, and James Q Zheng. 2013. "Activity-Dependent Regulation of Dendritic Growth and Maintenance by Glycogen Synthase Kinase 3 β ." *Nature Communications* 4 (January). Nature Publishing Group: 2628. doi:10.1038/ncomms3628.
- Rutishauer, Urs. 2008. "Polysialic Acid in the Plasticity of the Developing and Adult Vertebrate Nervous System." *Nature Reviews Neuroscience* 9: 26–35.
- Rutishauser, U, A Acheson, and AK Hall. 1988. "The Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM) as a Regulator of Cell-Cell Interactions." *Science* 249 (4848): 53–57. <http://www.sciencemag.org/content/240/4848/53.short>.
- Sahay, Amar, Kimberly N Scobie, Alexis S Hill, Colin M O'Carroll, Mazen a Kheirbek, Nisha S Burghardt, André a Fenton, Alex Dranovsky, and René Hen. 2011. "Increasing Adult Hippocampal Neurogenesis Is Sufficient to Improve Pattern Separation." *Nature* 472 (7344): 466–70. doi:10.1038/nature09817.
- Samuels, Benjamin, and René Hen. 2011. "Neurogenesis and Affective Disorders." *The European Journal of Neuroscience* 33 (6): 1152–59. doi:10.1111/j.1460-9568.2011.07614.x.

- Sanchez, S, C L Sayas, F Lim, J Avila, and F Wandosell. 2001. "The Inhibition of Phosphatidylinositol-3-Kinase Induces Neurite Retraction and Activates GSK3." *Journal of Neurochemistr* 78: 468–81.
- Saxe, Michael D, Fortunato Battaglia, Jing-Wen Wang, Gael Malleret, Denis J David, James E Monckton, a Denise R Garcia, et al. 2006. "Ablation of Hippocampal Neurogenesis Impairs Contextual Fear Conditioning and Synaptic Plasticity in the Dentate Gyrus." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (46): 17501–6. doi:10.1073/pnas.0607207103.
- Schloesser, R, M Lehmann, K Martinowich, H Manji, and H Herkenham. 2010. "Enviromental Enrichment Requires Adult Neurogenesis to Facilitate the Recovery from Psychosocial Stress." *Molecular Psychiatry* 15: 1152–63.
- Seri, B, J M García-Verdugo, B S McEwen, and a Alvarez-Buylla. 2001. "Astrocytes Give Rise to New Neurons in the Adult Mammalian Hippocampus." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 21 (18): 7153–60. doi:10.1210/jc.80.10.2954.
- Shihabuddin, LS, and PJ Horner. 2000. "Adult Spinal Cord Stem Cells Generate Neurons after Transplantation in the Adult Dentate Gyrus." *The Journal of ...* 20 (23): 8727–35. <http://www.jneurosci.org/content/20/23/8727.short>.
- Song, Honhjun, Charles Stevens, and Fred Gage. 2002. "Astroglia Induce Neurogenesis from Adult Neural Stem Cells." *Nature* 417: 39–44.
- Spencer, Jeremy P E, David Vauzour, and Catarina Rendeiro. 2009. "Flavonoids and Cognition: The Molecular Mechanisms Underlying Their Behavioural Effects." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 492 (1-2). Elsevier Inc.: 1–9. doi:10.1016/j.abb.2009.10.003.
- Stangl, Doris, and Sandrine Thuret. 2009. "Impact of Diet on Adult Hippocampal Neurogenesis." *Genes & Nutrition* 4 (4): 271–82. doi:10.1007/s12263-009-0134-5.
- Suh, Hoonkyo, Antonella Consiglio, Jasodhara Ray, Toru Sawai, Kevin a. D'Amour, and Fred H Gage. 2007. "In Vivo Fate Analysis Reveals the Multipotent and Self-Renewal Capacities of Sox2+ Neural Stem Cells in the Adult Hippocampus." *Cell Stem Cell* 1 (November): 515–28. doi:10.1016/j.stem.2007.09.002.
- Sun, Woong, Adam Winseck, Sharon Vinsant, Ok-hee Park, Hyun Kim, and Ronald W Oppenheim. 2004. "Programmed Cell Death of Adult-Generated Hippocampal Neurons Is Mediated by the Proapoptotic Gene Bax." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 24 (49): 11205–13. doi:10.1523/JNEUROSCI.1436-04.2004.

- Tanigaki, K, F Nogaki, and J Takahashi. 2001. "Notch1 and Notch3 Instructively Restrict bFGF-Responsive Multipotent Neural Progenitor Cells to an Astroglial Fate." *Neuron* 29: 45–55. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627301001799>.
- Trejo, J L, Eva Carro, and I Torres-Aleman. 2001. "Circulating Insulin-like Growth Factor I Mediates Exercise-Induced Increases in the Number of New Neurons in the Adult Hippocampus." *The Journal of Neuroscience* 21 (5): 1628–34. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11222653>.
- Valvezan, Alexander J, and Peter S Klein. 2012. "GSK-3 and Wnt Signaling in Neurogenesis and Bipolar Disorder." *Frontiers in Molecular Neuroscience* 5: 1–13. doi:10.3389/fnmol.2012.00001.
- Van Dam, Debby, Guy Lenders, and Peter Paul De Deyn. 2006. "Effect of Morris Water Maze Diameter on Visual-Spatial Learning in Different Mouse Strains." *Neurobiology of Learning and Memory* 85: 164–72. doi:10.1016/j.nlm.2005.09.006.
- Van Der Staay, F. 2000. "Effects of the Size of the Morris Water Tank on Spatial Discrimination Learning in the CFW1 Mouse." *Physiology and Behavior* 68: 599–602. doi:10.1016/S0031-9384(99)00236-X.
- Van Praag, Henriette, Brian Christie, Terrence Sejnowski, Fred Gage, and Brian Christieff. 1999. "Running Enhances Neurogenesis, Learning, and Long Term Potentiation in Mice." *National Academy of Sciences* 96 (23): 13427–31.
- Van Praag, Henriette, Melanie J Lucero, Gene W Yeo, Kimberly Stecker, Neema Heivand, Chunmei Zhao, Ed Yip, et al. 2007. "Plant-Derived Flavanol (-)epicatechin Enhances Angiogenesis and Retention of Spatial Memory in Mice." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 27 (22): 5869–78. doi:10.1523/JNEUROSCI.0914-07.2007.
- Van Strien, N M, N L M Cappaert, and M P Witter. 2009. "The Anatomy of Memory: An Interactive Overview of the Parahippocampal-Hippocampal Network." *Nature Reviews. Neuroscience* 10 (April): 272–82. doi:10.1038/nrn2614.
- Varela-Nallar, Lorena, Florencia C Aranguiz, Ana C Abbott, Paula G Slater, and Nibaldo C Inestrosa. 2010. "Adult Hippocampal Neurogenesis in Aging and Alzheimer's Disease." *Birth Defects Research. Part C, Embryo Today : Reviews* 90 (4): 284–96. doi:10.1002/bdrc.20193.
- Vauzour, David, Jason Kerr, and Charles Czank. 2014. "Plant Polyphenols as Dietary Modulators of Brain Functions." In *Polyphenols in Human Health and Disease*, 357–70. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-398456-2.00027-X.
- Walker, MR. 2009. "The Stem Cell Niche." *The Journal of Pathology* 217: 169–80. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/path.2474/full>.

- Wang, Yanyan, Maoquan Li, Xueqing Xu, Min Song, Huansheng Tao, and Yun Bai. 2012. "Green Tea Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) Promotes Neural Progenitor Cell Proliferation and Sonic Hedgehog Pathway Activation during Adult Hippocampal Neurogenesis." *Molecular Nutrition & Food Research* 56 (8): 1292–1303. doi:10.1002/mnfr.201200035.
- Williams, Robert J, and Jeremy P E Spencer. 2012. "Flavonoids , Cognition , and Dementia : Actions , Mechanisms , and Potential Therapeutic Utility for Alzheimer Disease." *Free Radical Biology and Medicine* 52 (1). Elsevier Inc.: 35–45. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.010.
- Wojtowicz, Martin, and Nohjin Kee. 2006. "BrdU Assay for Neurogenesis in Rodents." *Nature Protocols* 1 (3): 1399–1405.
- Won, Ho, Bokara Kiran, Sa Hyun, Yong Heui, Yoon Azalea, Won Teak, Kyung Ah, and Jong Eun. 2011. "Agmatine Enhances Neurogenesis by Increasing ERK1 / 2 Expression , and Suppresses Astrogenesis by Decreasing BMP 2 , 4 and SMAD 1 , 5 , 8 Expression in Subventricular Zone Neural Stem Cells." *Life Sciences* 89 (13-14). Elsevier Inc.: 439–49. doi:10.1016/j.lfs.2011.07.003.
- Wu, Melody, and René Hen. 2013. "The Young and the Restless: Regulation of Adult Neurogenesis by Wnt Signaling Melody." *Cell Stem Cell* 12: 139–40.
- Yan, Xue, Hai Hou, Lin Wu, Ji Liu, and Jiang Zhou. 2007. "Lithium Regulates Hippocampal Neurogenesis by ERK Pathway and Facilitates Recovery of Spatial Learning and Memory in Rats after Transient Global Cerebral Ischemia." *Neuropharmacology* 53: 487–95. doi:10.1016/j.neuropharm.2007.06.020.
- Yu, Xiang, and Robert C Malenka. 2003. "Beta-Catenin Is Critical for Dendritic Morphogenesis." *Nature Neuroscience* 6 (11): 1169–77. doi:10.1038/nn1132.
- Zhang, Zhen-tao, Xue-bing Cao, Nian Xiong, Hong-cai Wang, Jin-sha Huang, Sheng-gang Sun, and Tao Wang. 2010. "Morin Exerts Neuroprotective Actions in Parkinson Disease Models in Vitro and in Vivo." *Nature Publishing Group* 31 (8). Nature Publishing Group: 900–906. doi:10.1038/aps.2010.77.
- Zhao, Chunmei, E Matthew Teng, Robert G Summers, Guo-Li Ming, and Fred H Gage. 2006. "Distinct Morphological Stages of Dentate Granule Neuron Maturation in the Adult Mouse Hippocampus." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 26 (1): 3–11. doi:10.1523/JNEUROSCI.3648-05.2006.