



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Efecto de la morina sobre la neurogénesis en  
ratones adultos sanos.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I Ó L O G A**

**P R E S E N T A:**

**ALEIDA IGNACIO JUÁREZ**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. MÓNICA ADRIANA TORRES RAMOS**

**Ciudad Universitaria, CD. MX., 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **HOJA DE DATOS DEL JURADO**

### **1.- DATOS DEL ALUMNO**

Ignacio  
Juárez  
Aleida  
55 47 66 44 69  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
312168601

### **2.- DATOS DEL TUTOR**

Dra.  
Mónica Adriana  
Torres  
Ramos

### **3.- DATOS DEL SINODAL 1**

Dra.  
Hilda  
Martínez  
Coria

### **4.- DATOS DEL SINODAL 2**

Dra.  
María Luisa  
Escobar  
Sánchez

### **5.- DATOS DEL SINODAL 3**

M. en C.  
Irma Daniela  
Silva  
Adaya

### **6.- DATOS DEL SINODAL 4**

Dr.  
José Eduardo  
Rodríguez  
Bustamante

### **7.- DATOS DE LA TESIS**

Efecto de la morina sobre la neurogénesis en ratones adultos sanos.  
66 p.  
2019

Este trabajo fue realizado en la Unidad Periférica de Neurociencias del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” y financiado con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y el Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social (CONACYT-FOSISS 262295).

*A mis padres y mi hermano.*

## **Agradecimientos**

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

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

A la M. en C. Daniela Silva por el apoyo constante no solo en la realización de la parte experimental de esta tesis sino también en los demás aspectos del proyecto, por transmitirme el gusto por el trabajo en el laboratorio y alentarme a seguir adelante.

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

Al M. en C. César Rodríguez y al departamento del bioterio por los ratones que me proporcionaron, así como el espacio para realizar la administración de tratamientos.

A los sinodales de esta tesis: Dr. José Eduardo Rodríguez Bustamante, Dra. Hilda Martínez Coria, M. en C. Irma Daniela Silva Adaya y Dra. María Luisa Escobar Sánchez, por los comentarios para la elaboración de este trabajo escrito.

A mis padres, por el esfuerzo invertido para traerme hasta este punto, por todo lo que han aportado a mi formación como persona, y sobre todo por sus palabras y amor incondicional.

A mi hermano, que me muestra siempre un lado más complejo de la vida con su existencia, por inspirarme a siempre avanzar, por su amor y compañía en cada paso. A Cenobio Ignacio S., gracias por siempre tener las palabras adecuadas e inspirarme a hacer tanto.

A mis compañeros de laboratorio por hacer el trabajo más agradable con su compañía, por el aprendizaje y los buenos momentos que compartimos.

A mis amigos, los que se quedaron desde la infancia y a los que llegaron después a mi vida, por las pláticas, consejos, por todo lo compartido; qué fortuna habernos encontrado.

## Índice

<b>Índice de figuras</b> .....	7
<b>Abreviaturas</b> .....	8
<b>Resumen</b> .....	9
<b>Marco teórico</b>	
Neurogénesis en adultos.....	10
Factores que modulan la neurogénesis.....	12
Polifenoles.....	16
Polifenoles implicados en neurogénesis.....	19
Morina.....	22
Mecanismos moleculares relacionados con proliferación neuronal activados por flavonoides.....	24
<b>Antecedentes</b> .....	29
<b>Justificación</b> .....	31
<b>Hipótesis</b> .....	32
<b>Objetivos</b>	
Objetivo general.....	32
Objetivos particulares.....	32
<b>Material y método</b>	
Animales.....	33
Tratamiento con morina y administración de BrdU.....	34
Tratamiento de tejidos e inmunofluorescencia.....	34
<b>Resultados</b>	
Estandarización de la técnica de inmunofluorescencia.....	37
La morina induce proliferación celular en hipocampo de ratón.....	38
Proliferación neuronal después del tratamiento con morina.....	43
La morina en tratamientos de 30 días produce un aumento de la expresión de BDNF en el hipocampo de ratones adultos sanos.....	47
<b>Discusión</b> .....	51
<b>Conclusión</b> .....	57
<b>Bibliografía</b> .....	58

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Sitios y proceso neurogénico en el cerebro adulto.....	10
<b>Figura 2.</b> Factores que modulan la neurogénesis.....	13
<b>Figura 3.</b> Estructura química básica de los flavonoides.....	17
<b>Figura 4.</b> Estructura química de la morina.....	23
<b>Figura 5.</b> Vías de señalización relacionadas con proliferación y diferenciación neuronal....	27
<b>Figura 6.</b> Diseño experimental.....	33
<b>Figura 7.</b> Diseño temporal de administración de morina y BrdU.....	34
<b>Figura 8.</b> Estandarización de los anticuerpos de inmunofluorescencia.....	37
<b>Figura 9.</b> Expresión de BrdU después de 10 días de tratamiento con morina.....	39
<b>Figura 10.</b> Imágenes representativas del giro dentado del hipocampo de todos los tratamientos (Ki67).....	40
<b>Figura 11.</b> Células positivas a Ki-67 uno y veinte días después de aplicar el tratamiento....	41
<b>Figura 12.</b> Células positivas a Ki-67 (verde) en el giro dentado del hipocampo de ratones tratados con solución salina y 0.5 mg/kg de morina.....	42
<b>Figura 13.</b> Proliferación veinte días después de finalizar el tratamiento y con una concentración de 0.5 mg/kg de morina.....	42
<b>Figura 14.</b> Imágenes representativas del giro dentado del hipocampo de todos los tratamientos (Ki67+DcX).....	43
<b>Figura 15.</b> Células positivas a Ki-67 y DcX un día y veinte días después del tratamiento....	45
<b>Figura 16.</b> Proliferación neuronal en el giro dentado de ratones tratados con solución salina y morina en una concentración de 0.5 mg/kg.....	46
<b>Figura 17.</b> Proliferación neuronal veinte días después de finalizar el tratamiento y con una concentración de 0.5 mg/kg de morina.....	47
<b>Figura 18.</b> Expresión de BDNF en el giro dentado del hipocampo de ratones tratados con morina (inmunofluorescencia).....	48
<b>Figura 19.</b> Expresión de BDNF en el giro dentado del hipocampo de ratones tratados con morina (cuantificación).....	49
<b>Figura 20.</b> Expresión de BDNF en la concentración de 1 mg/kg.....	50

## Abreviaturas

<b><u>Siglas</u></b>	<b><u>Significado</u></b>
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BrdU	5-bromo, 2-deoxiuridina
CREB	<i>cAMP response element-binding</i> / Elemento de respuesta cAMP
DcX	Doblecortina
DG	Giro dentado
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Desoxirribonucleic acid</i> / Ácido desoxirribonucleico
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i> / cinasa reguada por señales extracelulares
NPC	Células progenitoras neurales
PB	Amortiguador de fosfatos ( <i>Phosphate buffer</i> )
PBS	Amortiguador de fosfatos salino ( <i>Phosphate buffered Saline</i> )
PLC	Fosfolipasa C
EROS	Especies reactivas de oxígeno
SNC	Sistema nervioso central
TrkB	Receptor de tirosin quinasa B ( <i>Tropomyosin receptor kinase B</i> )
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
ZSV	Zona subventricular
ZSG	Zona subgranular

## **RESUMEN**

La neurogénesis es el proceso de generación de nuevas neuronas, en adultos de roedores se lleva a cabo en dos regiones cerebrales: la zona subgranular del giro dentado del hipocampo y los ventrículos laterales. La morina es un polifenol de tipo flavonoide, los polifenoles son metabolitos secundarios de plantas con propiedades benéficas para la salud humana. Algunos polifenoles estimulan la proliferación neuronal como respuesta a la activación de distintas vías de señalización, entre las que se encuentra la activación del receptor TrkB por el factor de crecimiento BDNF. En este trabajo, 20 ratones de la cepa C57BL/6 fueron divididos en cinco grupos: control (solución salina), vehículo (DMSO) y tratamiento en dosis de 0.5, 1 y 2.5 mg/kg (los tratamientos de morina, DMSO y solución salina se administraron durante diez días), con el objetivo de observar su efecto sobre la proliferación neuronal en el hipocampo en 10 y 30 días.

Con la técnica de inmunofluorescencia se observó un mayor número de células positivas a BrdU, Ki-67, DcX y BDNF, en el giro dentado del hipocampo de ratones tratados con morina comparados con el control y el vehículo. Se observaron diferencias significativas en el número de células positivas a BrdU, Ki-67, DcX y BDNF en 10 y 30 días de tratamiento en la dosis de 0.5 mg/kg, con mayor expresión a los 30 días. Sin embargo, se observó mayor expresión de BDNF en el tratamiento de 1 mg/kg de morina con respecto al control.

La importancia de la neurogénesis en cerebros adultos no se restringe sólo a su participación en la plasticidad neuronal, sino que también se ve implicada en la remodelación del tejido cerebral, homeostasis y mantenimiento del cerebro. El efecto de la morina sobre la neurogénesis coloca a este polifenol en la lista de sustancias que deben ser estudiadas cuidadosa y extensivamente, ya que pudiera ser usada en el control o tratamiento de enfermedades neurológicas y neurodegenerativas.

**Palabras clave:** Polifenoles, neurogénesis, hipocampo, ki67, DcX, BrdU, plasticidad neuronal.

## Marco teórico

### *Neurogénesis en adultos*

El fenómeno de producción de nuevas neuronas es conocido con el término de neurogénesis, este término, generalmente, se refiere al proceso que involucra proliferación, migración, supervivencia y diferenciación de nuevas células, además de la integración de éstas en los circuitos neuronales existentes (Dias *et al.* 2012; Olivares *et al.* 2015). Durante la etapa adulta, se tiene registro de neurogénesis en dos sitios del cerebro de roedores (figura 1): la zona subgranular (ZSG) del giro dentado del hipocampo y la zona subventricular (ZSV) de los ventrículos laterales (Dias *et al.* 2012; Lee *et al.* 2010; Olivares *et al.* 2015).

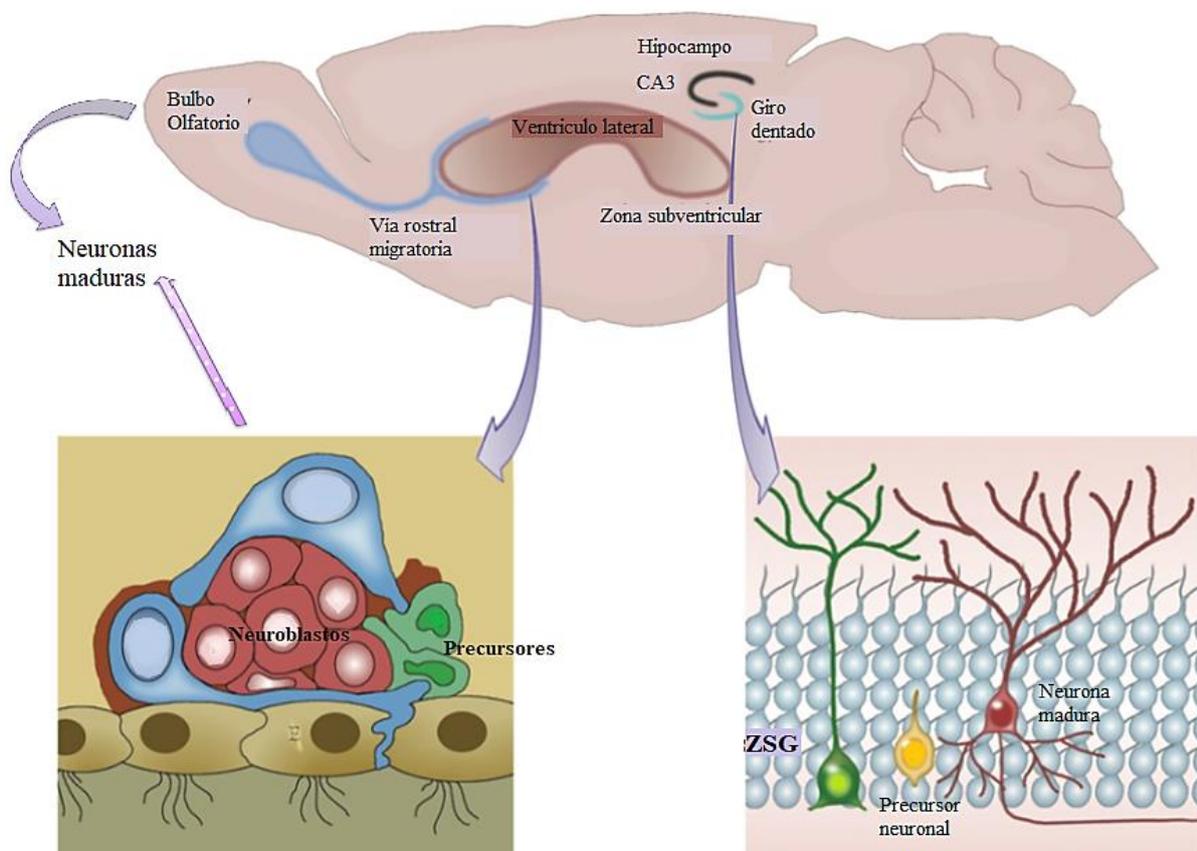


Figura 1. Sitios y proceso neurogénico en el cerebro adulto de roedores. Modificado de Días *et al.* 2012

En la zona subventricular de los ventrículos laterales, las células progenitoras se originan a partir de las células pluripotenciales, estas progenitoras migran a través de la vía rostral migratoria hasta llegar al bulbo olfatorio en donde se diferenciarán para formar interneuronas (Santos-Marcial, 2008). Las interneuronas formadas pueden ser de dos tipos: células granulares y periglomerulares, las cuales modulan el proceso de la información sensorial (Santos-Marcial, 2008).

En el giro del hipocampo existen células pluripotenciales que residen en la zona subgranular; estas dan origen a células progenitoras, las células progenitoras que dan origen a neuronas en la zona subgranular se pueden dividir en dos tipos: progenitores hipocampales de tipo 1 y 2, los primeros con un proceso largo y los segundos con procesos cortos (Dias *et al.* 2012). Las células progenitoras maduran localmente en la zona granular del giro dentado, una vez que maduran envían sus proyecciones axonales al cuerno de Amón (CA3) y sus arborizaciones dendríticas a la capa granular (Santos-Marcial, 2008).

Durante muchos años se desconocía la neurogénesis en organismos adultos, y se pensaba que era un proceso restringido a las primeras etapas de desarrollo. En 1960, Joseph Altman y colaboradores realizaron experimentos inyectando timidina radiactiva (3H-timidina) a ratas y gatos, la cual tiene la capacidad de incorporarse al DNA de células en división permitiendo su posterior visualización por métodos de autorradiografía, los investigadores observaron células con morfología similar a las neuronas marcadas en el bulbo olfatorio y el hipocampo de estos animales (Arias-Carrión *et al.* 2007). Sin embargo, fue hasta que Michael Kaplan replicó los experimentos de Altman y cols., en el año 1984, que se pudo confirmar que las nuevas células eran neuronas, identificadas con técnicas de microscopía electrónica (Arias-Carrión *et al.* 2007). A finales del siglo XX, se observó la neurogénesis con la incorporación de BrdU en el hipocampo y el bulbo olfatorio de algunos mamíferos adultos como ratones y ratas (Acevedo, 2014; Baptista & Andrade, 2018; Dias *et al.* 2012).

Los cambios morfológicos de las células que participan en el proceso de neurogénesis han permitido identificar diversas características dependiendo de los marcadores proteicos expresados temporalmente (Ramírez *et al.* 2007).

La importancia de la neurogénesis en el cerebro adulto se remite al posible tratamiento de trastornos neurológicos relacionados con pérdida neuronal o que afectan a la neurogénesis (Sirerol & García, 2010). Aunque el rol de la neurogénesis hipocampal adulta aún requiera más estudios se ha observado que está implicada en el aprendizaje dependiente del hipocampo, en la memoria espacial y asociativa (Dias *et al.* 2012), además de que las neuronas jóvenes son más activas en procesar nueva información (Baptista & Andrade, 2018), y pueden estar relacionadas con reparación cerebral.

### ***Factores que modulan la neurogénesis***

Para evitar una alteración en los circuitos neuronales, la formación de nuevas neuronas se encuentra modulada finamente (Ramírez *et al.* 2007), los factores que modulan la neurogénesis se pueden dividir en internos y externos. Entre los factores internos se encuentra la expresión de genes, factores de crecimiento, hormonas y neurotransmisores, así como la edad, mientras que entre los factores externos pueden mencionarse los estímulos ambientales y los farmacológicos (Arias-Carrión *et al.* 2007). Los factores externos pueden actuar positiva o negativamente sobre factores de crecimiento que regulan diferentes etapas de la neurogénesis o a neurotransmisores y receptores que pueden estar ligados al aprendizaje y memoria espacial a través de la potenciación a largo plazo (Olivares *et al.* 2015, Ming & Song, 2011) (figura 2).

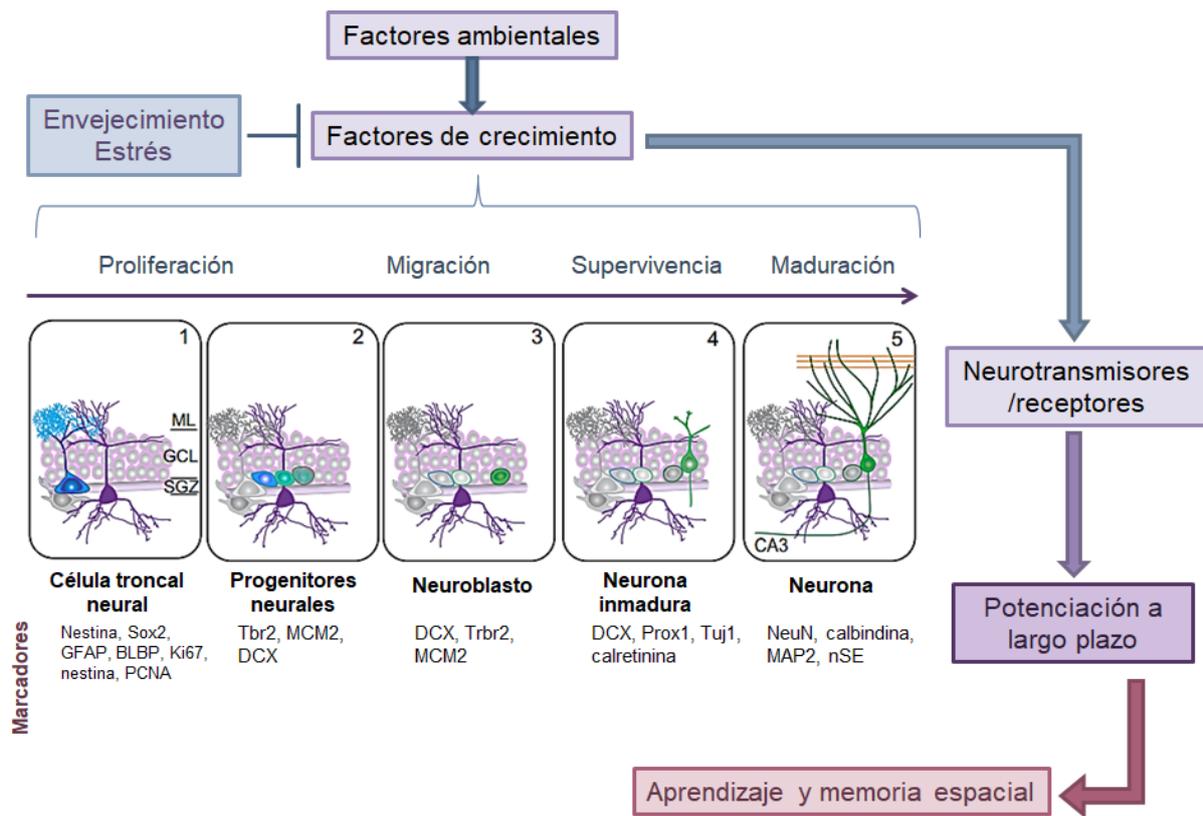


Figura 2. Factores que modulan la neurogénesis. Con información de Olivares *et al.* 2015 y Ming & Song, 2011

El nicho celular neurogénico es uno de los factores que intervienen en la regulación de la neurogénesis, está constituido por las células pluripotenciales, los astrocitos y las células endoteliales. Las células que componen el nicho se complementan para mantener la población de células pluripotenciales, su migración a través de la acción de diversos factores secretados por los astrocitos, además de mantener la población de astrocitos y de células endoteliales (Ramírez *et al.* 2007).

### Factores genéticos y moleculares

Entre los factores genéticos que inducen neurogénesis y morfogénesis embrionaria puede mencionarse la expresión de los genes *Notch*, *BMP* (Proteína morfogénica ósea), *Eph/ephrins*, *Noggin* y *Sonic-hedgehog (Shh)* (Suárez, 2015). Estos genes participan en la

regulación de la diferenciación y proliferación celular en zonas neurogénicas del cerebro adulto. *Sonic-hedgehog* es una proteína que controla la transcripción y tiene gran importancia durante el desarrollo, durante la neurogénesis está involucrada en el mantenimiento de las células progenitoras en los adultos, así como en el sistema de señalización Wnt (Suárez, 2015).

### *Factores de crecimiento*

Hay diversos genes y factores de crecimiento implicados en la neurogénesis (Suárez, 2015). Entre los que se encuentran el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el factor de crecimiento epidérmico endotelial vascular (VEGF) que está involucrado en la regulación del destino celular y determina el tamaño de la población neuronal o glial, el factor de crecimiento tipo insulina (IGF-I) que incrementa la neurogénesis del hipocampo en ratas adultas, el factor de crecimiento epidérmico (EGF) que reduce el número de neuronas que llegan al bulbo olfatorio incrementando el número de astrocitos, el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF- 2) que incrementa el número de nuevas neuronas en el bulbo olfatorio, entre otros (Suárez, 2015).

### *Neurotransmisores*

Actualmente se sabe que diversos neurotransmisores participan como factores que regulan la neurogénesis en el cerebro adulto, estos son liberados en áreas sinápticas y no sinápticas y se encuentran también en el fluido cerebroespinal (Berg *et al.* 2013). Entre los más estudiados se encuentran el glutamato y monoaminas como la serotonina (5-HT), la noradrenalina y la dopamina (Arias-Carrión *et al.* 2007, Berg *et al.* 2013). Se ha observado un aumento de neurotransmisores como glutamato, acetilcolina, dopamina y serotonina durante la proliferación neuronal en la zona subventricular del giro dentado del hipocampo y una

disminución de GABA, que también es esencial para integración neuronal (Vaidya *et al.* 2007). En la fase de supervivencia hay disminución de acetilcolina y norepinefrina, y en la fase de diferenciación disminuye la dopamina, que modula la diferenciación interneuronal (Vaidya *et al.* 2007). A su vez, los neurotransmisores regulan factores neurotróficos que se ven implicados en la neurogénesis como el BDNF (Hagg, 2009).

### *Hormonas*

Los estrógenos endógenos y los esteroides ováricos, estimulan la proliferación celular de los precursores granulares (Dias *et al.* 2012), las hormonas participan en la regulación de la neurogénesis y cambian según diversos factores como la edad, sexo y estímulos externos. Por ejemplo, un estudio en ratas demuestra que la tasa de neurogénesis se incrementa un 65% durante el embarazo y alcanza su pico máximo justo antes del parto, el cual coincide con los niveles de prolactina (Arias-Carrión *et al.* 2007).

### *Edad*

La edad es un factor importante, pues la tasa de neurogénesis en el cerebro adulto disminuye conforme se incrementa la edad (Arias-Carrión *et al.* 2007), por diversas causas como la disminución en la producción de factores de crecimiento (Baptista & Andrade, 2018) o el decaimiento de las condiciones del nicho. Se ha demostrado que el proceso de neurogénesis se lleva a cabo en roedores adultos (Lee *et al.* 2010; Arias-Carrión *et al.* 2007), sin embargo, en humanos adultos continúa en controversia dado que algunos autores sí encuentran neurogénesis en cerebros humanos adultos, mientras que otros reportan no haberla encontrado (Baptista & Andrade, 2018).

### *Externos*

Factores externos como ambientes enriquecidos, restricción energética, actividad física, entre otros, actúan regulando positivamente la neurogénesis, mientras que otros como el estrés, ansiedad y depresión actúan de forma contraria (Arias-Carrión *et al.* 2007; Baptista & andrade, 2018; Dias *et al.* 2012). Los antidepressivos tienen un efecto proneurogénico en el hipocampo (Dias *et al.* 2012). La alimentación es otro factor importante: algunas restricciones dietéticas o ingestión de ciertos alimentos pueden modular la neurogénesis (Park & Lee, 2011); la ingesta de ácidos grasos previene el decaimiento de funciones cognitivas, además, el consumo de flavonoides mejora habilidades cognitivas (Stangl & Thuret, 2009).

Sirerol y García (2010) mencionan que “La formación de neuronas nuevas en el cerebro adulto es un proceso interesante para la implementación de tratamientos de reemplazo neuronal en las enfermedades neurodegenerativas y también para aquellas asociadas con la pérdida neuronal selectiva, como los trastornos neurológicos y psiquiátricos”. En adultos mayores la capacidad neurogénica del cerebro se ve disminuida por la edad, posiblemente debido a las condiciones de las células precursoras neurales y el nicho en que se encuentran, además de que hay cambios en la circulación de células del sistema inmune, incremento en especies reactivas de oxígeno, disminución en la vía de señalización Wnt, entre otros (Sarubbo *et al.* 2018); por tanto, los adultos mayores son más propensos a trastornos neurológicos y neurodegenerativos y los tratamientos de reemplazo neuronal mejorarían su calidad de vida.

### *Polifenoles*

Los polifenoles son un grupo muy extenso de sustancias que se encuentran en la mayoría de

frutas y verduras, es decir en plantas; son metabolitos secundarios de éstas y sirven para su protección contra patógenos, radiación y otros factores externos (Manach *et al.* 2004). También, son responsables de atraer dispersores y polinizadores, así como para la señalización en la formación de nódulos para la fijación de nitrógeno (Del Río *et al.* 2013); los polifenoles más comunes en la dieta humana son los flavonoides y ácidos fenólicos (Ávalos & Pérez, 2009; Tsao, 2010). Estas sustancias se presentan en su mayoría en su forma glicosilada con uno o más residuos de azúcar conjugados a un grupo hidroxilo o anillo aromático. A causa de este grupo hidroxilo o anillo aromático son lentamente absorbidos en el estómago (Porras & López, 2009). Existen varias clases y subclases de polifenoles; éstos se dividen y definen según el número de anillos fenólicos que poseen y de los elementos estructurales que presentan estos anillos (Quiñones *et al.* 2012), aunque también se han clasificado dependiendo de su fuente de origen y función biológica (Tsao, 2010). La estructura básica de los flavonoides se compone de tres anillos, dos anillos de benceno (A y B) unidos mediante un anillo C de pirano que contiene un oxígeno (Kühnau, 1976) (figura 3).

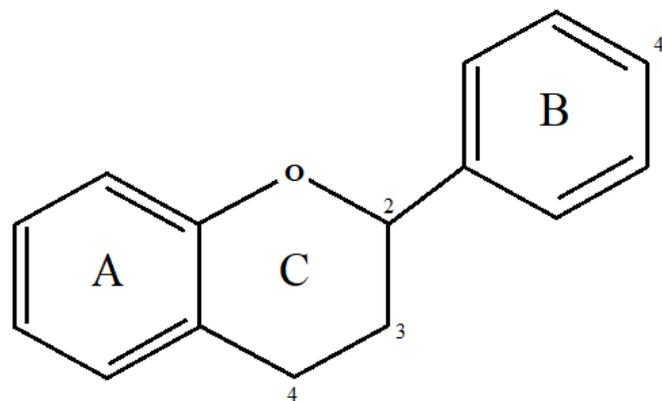


Figura 3. Estructura química básica de los flavonoides. Con información de Spencer *et al.* 2009 y Martínez *et al.* 2002.

Entre los grupos en que se dividen los polifenoles se encuentran: ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), estilbenos, lignanos, alcoholes

fenólicos y flavonoides (Quiñones *et al.* 2012). Los flavonoides tienen la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica debido a su naturaleza lipofílica (Sarubbo *et al.* 2018). Los complejos polifenólicos son conocidos por sus propiedades antioxidantes, neuroprotectoras, y por su participación en el mejoramiento cognitivo (Arriagada *et al.* 2016; Dias *et al.* 2012; Quiñones *et al.* 2012). Al ser antioxidantes ejercen su efecto neuroprotector ante estímulos pro-oxidantes ambientales o los relacionados con la edad (Shahidi, 1995). Además, exhiben una gran variedad de otras propiedades dependiendo de sus estructuras particulares (Gharras, 2009; Yao *et al.* 2004) y de la interacción entre polifenoles de distintas familias, entre las que se encuentran efectos antidepresivos tanto en roedores como en humanos (Dias *et al.* 2012). Algunos polifenoles como los flavonoides tienen efectos neuroprotectores al controlar la supervivencia neuronal, diferenciación, potenciación a largo plazo y memoria (Spencer *et al.* 2009), debido a que modulan la actividad de diversos receptores celulares y enzimas (Middleton *et al.* 2000). Se ha reportado que los polifenoles se encuentran ampliamente distribuidos con más de 8000 estructuras fenólicas conocidas hasta ahora (Tsao, 2010).

Los polifenoles proveen de diferentes beneficios en la salud por diferentes mecanismos, incluyendo la eliminación o inhibición de radicales libres, la protección y regeneración de otros antioxidantes, así como la quelación de metales pro-oxidantes (Pereira *et al.* 2014), la modulación de hormonas esteroides, entre otros (Yao *et al.* 2004). Los efectos de los polifenoles dependen de diversos factores como su absorción, biodisponibilidad, que se define como la parte del nutriente o compuesto que puede desencadenar su acción biológica dentro del organismo, y concentración, ya que todos tienen efectos diversos e incluso pueden cambiar por sus interacciones con otras moléculas (Quiñones *et al.* 2012). Además, su grado de polimerización y otras propiedades como la polaridad molecular pueden determinar la potencia de sus efectos (Dias *et al.* 2012). Días y cols. (2010) mencionan la importancia de

tomar en cuenta el efecto sinérgico de los polifenoles con otros polifenoles y/o distintos compuestos químicos, dado que sus efectos cambian al conjugarse varios de éstos. Es importante considerar que los polifenoles tienen acciones protectoras en bajas dosis, ya que en concentraciones altas pueden actuar como mutágenos y pro-oxidantes que generan radicales libres e inhibidores de enzimas involucradas por ejemplo, en el metabolismo hormonal (Pereira *et al.* 2014). En bajas concentraciones son agonistas de receptores de alta afinidad y en altas concentraciones suelen inhibir enzimas (Spencer *et al.* 2009).

La principal fuente de polifenoles en la dieta son frutas y bebidas como el té, vino tinto y café; en general, vegetales, plantas leguminosas y cereales son también buenas fuentes de estos (Gharras, 2009). Se encuentran diversos polifenoles en conjunto en cada alimento, y su biodisponibilidad depende de diversos factores como su exposición al sol, su almacenamiento, tipo de cultivo, entre otros (Visioli *et al.* 2011).

Los flavonoides son los polifenoles más abundantes, generalmente participan en la coloración de las flores, pero también intervienen en la prevención de la oxidación y protección de vitaminas y enzimas (Yao *et al.* 2004), se difunden lentamente a través de membranas lipídicas y algunos no lo hacen (Schramm *et al.* 1999), dependiendo principalmente del pH pero también de su composición química, por ejemplo, las catequinas sin grupos galato son muy poco o nada difundidas comparada con catequinas que poseen grupos galato (Tarahovsky *et al.* 2014). Se encuentran en concentraciones relativamente bajas, de aproximadamente 15-30 mg/kg en los alimentos (Manach *et al.* 2004).

### ***Polifenoles implicados en neurogénesis***

Los polifenoles han demostrado ser efectivos en el tratamiento de patologías neurodegenerativas y al contrarrestar la disminución de la cognición relacionada con la edad.

Sus efectos podrían no solo limitarse a la memoria y el aprendizaje, sino que podrían también propiciar cambios positivos en la actividad psicomotora en animales viejos (Del Río *et al.* 2013). Diferentes estudios *in vitro* e *in vivo* muestran el papel de los polifenoles en el proceso de neurogénesis en dosis bajas.

Las células progenitoras neurales (NPC) son el origen de las neuronas y las células gliales que forman todas las regiones del cerebro durante el desarrollo embrionario. El cerebro adulto retiene poblaciones de NPC en el hipocampo y la región subventricular de la corteza cerebral que son capaces de dividirse, migrar y diferenciarse en neuronas. Las células progenitoras neurales responden a varios tipos de estímulos ambientales, entre los que se encuentra el ejercicio físico y la alimentación, estos estímulos aumentan la proliferación y/o supervivencia de las neuronas recién generadas (Kim *et al.* 2008). Se ha observado que diferentes polifenoles pueden aumentar la plasticidad sináptica y promover la potenciación a largo plazo (Dias *et al.* 2012), así como aumentar la proliferación celular.

La curcumina (diferuloilmetano) es un químico fenólico de origen natural aislado de los rizomas de la planta *Curcuma longa* Linn (cúrcuma), presenta un color amarillo y es uno de los componentes principales de la especia cúrcuma. Kim y cols. (2008) identificaron que la curcumina promueve la proliferación de neuronas con la administración de dosis pequeñas (500 nmol/kg de peso del animal), ya que al administrarla aumentó significativamente el número de células madre neurales en el hipocampo adulto. Por lo tanto, dosis relativamente bajas de curcumina pueden estimular la neuroplasticidad del hipocampo. Estas observaciones implican un hallazgo importante con aplicaciones en trastornos neurológicos que impliquen neurogénesis alterada (Kim *et al.* 2008).

La oroxilina A (5,7-dihidroxi-6-metoxi-2-fenilcromen-4-ona) es uno de los principales ingredientes flavonoides de la raíz de *Scutellaria baicalensis* Georgi, que es ampliamente utilizada en la medicina herbolaria tradicional, Lee y cols. (2010) demostraron que el

tratamiento con Oroxilina A durante 7 o 14 días produce proliferación celular en la ZSG del giro dentado del hipocampo de una manera dependiente de la dosis y del tiempo. Esto puede convertirla en un buen candidato para agentes terapéuticos dados sus efectos positivos sobre la función cognitiva, que se ve comprometida en muchas enfermedades psiquiátricas (Lee *et al.* 2010).

El té verde es una bebida popular en todo el mundo, se le han observado propiedades en el tratamiento del cáncer, las enfermedades cardiovasculares, las enfermedades inflamatorias y la diabetes. Un polifenol que forma parte de los componentes del té verde llamado epigallocatequina-3-galato (EGCG), actúa directamente en NPC de adultos para favorecer la proliferación tanto *in vitro* como *in vivo*, al activar la vía de señalización Shh (Wang *et al.* 2012).

El resveratrol (3, 5, 4-trihidroxiestilbeno) es un polifenol de la familia de la fitoalexina que se encuentra en las semillas de algunas especies de plantas, incluidas las uvas, los cacahuates y además constituye uno de los componentes del vino tinto. Harada y cols. (2011), demostraron que la administración oral de vino tinto conteniendo 20 mg / L de resveratrol durante 3 semanas mejoró la función cognitiva de ratones.

An L. y cols. (2008) administraron por vía oral flavonoides extraídos de Xiaobuxin-Tang (XBXT-2) a ratas y observaron que este polifenol incrementa significativamente la neurogénesis hipocampal en éstas, además, invierte la disminución de la producción de BDNF inducida por estrés.

Shukitt-Hale y cols. (2015) sometieron a ratones a una dieta de 2% de fresas o 2% de moras azules y observaron que con ella mejoraba la cognición además de que incrementaba la neurogénesis hipocampal.

Muchos estudios se enfocan en las propiedades neuroprotectoras en modelos de daño cerebral, sin embargo, también existen estudios para identificar el efecto de polifenoles sobre

la neurogénesis hipocampal (Dias *et al.* 2012). Es recomendable que estos estudios se realicen tanto *in vitro* como *in vivo* para observar los efectos reales de los polifenoles, ya que algunas sustancias químicas como los antioxidantes tienen efectos excelentes *in vitro* que no son trasladados a organismos *in vivo*. Esto puede deberse a la heterogeneidad de los sistemas vivos y la interacción entre los distintos componentes de los organismos (Shen *et al.* 2007). Los polifenoles, destacados por sus múltiples propiedades, tienen efectos positivos en dosis pequeñas en neurogénesis, que está involucrada en la mejoría de la memoria y el aprendizaje. No obstante, en muchos de estos casos aún no se determinan los mecanismos moleculares que activan o en los que participan estas sustancias para producir dichos efectos neurogénicos.

### ***Morina***

La morina (2', 3, 4', 5, 7-pentahidroxi-flavona) (figura 4) es un polifenol del tipo flavonoide (Green *et al.* 2012), con un peso molecular de 302.24 g/mol, que presenta baja solubilidad en agua y es sensible a algunos factores ambientales como la luz y el oxígeno (Arriagada *et al.* 2016). Los flavonoides tienen una estructura básica compuesta por dos anillos aromáticos y un anillo pirónico, formando un esqueleto C6-C3-C6 unido a distintos grupos, que en el caso de la morina son hidroxilos (Xie *et al.* 2006), se dividen a su vez en seis subclases que incluyen a los flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianidinas y flavanoles (Manach *et al.* 2004).

Se extrae como un pigmento amarillo de plantas de la familia *Moraceae* (Caselli *et al.* 2016), la mayoría de las plantas en las que se encuentra son utilizadas como hierbas medicinales en distintas culturas (Subash & Subramanian, 2009). La morina tiene una baja permeabilidad intestinal comparada con otros polifenoles, por tanto, su biodisponibilidad puede ser baja

dependiendo de la cantidad consumida (Caselli *et al.* 2016). Se ha observado que en células epiteliales de la aorta hay un sistema dependiente de energía que sirve para transportar a la morina (Schramm *et al.* 1999), sin embargo, en este estudio no mencionan si este transporte se activa debido a la interacción de la morina con receptores intracelulares o extracelulares.

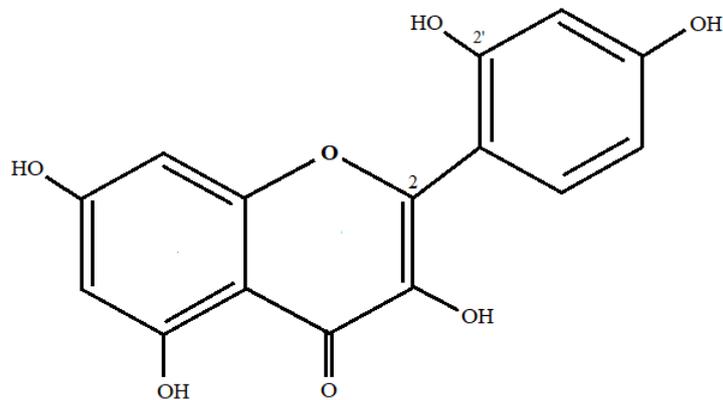


Figura 4. Estructura química de la morina (2', 3, 4', 5, 7-pentahidroxiflavona).

Se han descrito diversos efectos producidos por la morina tales como sus propiedades antibacterianas (Green *et al.* 2012), antiinflamatorias, anticancerígenas, antioxidantes y de protección cardiovascular (Arriagada *et al.* 2016). Es un inhibidor no competitivo de la enzima PTP1B, implicada en la diabetes; tiene una gran capacidad como quelante de iones metálicos (Subash & Subramanian, 2009). Además, tiene una muy baja citotoxicidad, algunos autores calculan la dosis tóxica de morina en 300 mg/kg de peso por día (Caselli *et al.* 2016).

La morina contribuye además a neutralizar algunos efectos negativos de las especies reactivas de oxígeno (EROS), también estimula la expresión de algunas enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa, con ello se disminuyen, entonces, los niveles de especies reactivas de oxígeno intracelular y la actividad transcripcional de Nf-κB. Inhibe

también la actividad de glicoproteínas P, lo que mejora la actividad de la quimioterapia (Caselli *et al.* 2016).

La interacción directa de morina con proteínas o enzimas contribuye a la modulación de vías de señalización involucradas en el metabolismo y fisiología celular (Caselli *et al.* 2016). En cuanto a sus propiedades neuroprotectoras, la morina atenúa síntomas de la enfermedad de Parkinson y prevé muerte neuronal. Inhibe enzimas implicadas en tautopatías y la actividad de Nf- $\kappa$ B actuando como antiinflamatorio, además de inhibir el ensamblaje de fibras amiloides y la actividad de la acetilcolinesterasa, ambos implicados en la enfermedad de Alzheimer (Caselli *et al.* 2016). Estas características hacen de la morina un potencial tratamiento contra algunas enfermedades neurodegenerativas, principalmente las enfermedades de Alzheimer y Parkinson. Diversos antioxidantes exógenos han mostrado tener un efecto neuroprotector en modelos de daño cerebral; en el caso de la morina se reduce el estrés oxidativo y la muerte neuronal ligada a la excitotoxicidad en cultivos celulares (Gottlieb *et al.* 2006). Estos autores observaron que la morina reduce la pérdida neuronal en el hipocampo después de daño cerebral, este efecto se ve asociado con la reducción de efectos negativos sobre funciones cognitivas luego del daño.

### ***Mecanismos moleculares relacionados con proliferación neuronal activados por flavonoides***

Como ya se mencionó, la neurogénesis está regulada por la interacción de diversos factores que incluyen la activación de diferentes vías de señalización. Los factores de crecimiento son factores que promueven o inhiben ciertas vías de señalización; un ejemplo de esto se observa en la activación de la vía de señalización MEK-C/EBP que promueve la neurogénesis e inhibe la gliogénesis (Ménard *et al.*, 2002). Esta vía se activa con factores de crecimiento

como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), los cuales se unen a receptores y activan vías de señalización de cinasas. Los posibles mecanismos moleculares involucrados en la proliferación pueden ser CREB, BDNF, VEGF y señalización de calcio; en el caso de la supervivencia, los mecanismos moleculares involucran PLC, pERK, CREB y BDNF (Vaidya *et al.* 2007).

Por otro lado, la vía de señalización Wnt también se ve implicada en la neurogénesis. Los ligandos Wnt son factores externos que regulan este proceso mediante la vía canónica, también llamada Wnt -  $\beta$ catenina (Inestrosa & Arenas, 2010). Esta vía también induce potenciación a largo plazo y arborización dendrítica; la participación de la vía de señalización Wnt se ha visto implicada tanto en el giro dentado del hipocampo como en la zona subgranular (Inestrosa & Arenas, 2010).

Los flavonoides interactúan con diferentes receptores, cinasas y factores de transcripción (Spencer *et al.* 2009), y participan en vías de señalización que incluyen PI3K/Akt, PLC- $\gamma$  (Park & Lee, 2011) y MAPK. Mediante estas cinasas tienen efectos sobre la potenciación a largo plazo, lo que afecta a la memoria y al aprendizaje (Jang *et al.* 2010). Spencer y colaboradores (2009) indican que los flavonoides actúan de diferentes formas, uniéndose a sitios ATP en enzimas y receptores, preservando la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$ , modulando directamente la actividad de cinasas, o al afectar la función de fosfatasas importantes en las vías de señalización (Spencer *et al.* 2009). Activan distintas vías de señalización como la vía Wnt, en esta, el ligando Wnt interactúa con receptores Frizzled y receptores de lipoproteínas de baja densidad, así, se bloquea la Gsk-3 $\beta$  y se acumula  $\beta$ -catenina en el citoplasma antes de pasar al núcleo en dónde se transcriben genes relacionados con diferenciación neuronal (Inestrosa & Arenas, 2010). También pueden activar vías relacionadas con el receptor TRK asociado a factores de crecimiento que desencadena cascadas de señalización para finalmente

fosforilar a C/EBPs y activar la transcripción de genes de diferenciación neuronal (Ménard *et al.* 2002)(figura 5).

Algunos polifenoles activan SIRT1, una enzima que responde a estrés celular y está involucrada en supervivencia celular, *in vitro* mediante mecanismos alostéricos o al reducir la formación de especies reactivas de oxígeno (EROS), lo que a su vez inhibe a la actividad de NF- $\kappa$ B (Sarubbo *et al.* 2018).

El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), cuya expresión está regulada por mecanismos mediados por calmodulina (Tabuchi, 2008), ejerce sus funciones biológicas uniéndose a dos receptores, el receptor p75NTR y el TrkB. Al unirse al TrkB el BDNF desencadena cascadas de señalización para mediar la supervivencia neuronal, plasticidad sináptica, diferenciación y neurogénesis (Jang *et al.* 2010; Stagini *et al.* 2017). Además de estar relacionado con la memoria y aprendizaje espacial (Park & Lee, 2011), la unión del BDNF al receptor TrkB lleva a la internalización del complejo ligando-receptor que es transportado del nervio terminal al cuerpo celular en forma de endosomas para mediar esos eventos de señalización (Liu *et al.* 2014).

Liu y colaboradores (2014) probaron que la deoxiedunida es un agonista del BDNF y puede unirse al receptor TrkB para desencadenar efectos de supervivencia y proliferación mediante PI3K/Akt y MAPK. Por otra parte Jang y cols. (2010) demostraron que la 7,8-dihidroxi flavona, un polifenol de la familia de los flavonoides, se asocia e induce la dimerización y autofosforilación (Stagini *et al.* 2017) del receptor TrkB (figura 5).

A diferencia del BDNF, la 7.8-dihidroxyflavona puede atravesar la barrera hematoencefálica, mantiene su estabilidad al ser administrada al organismo, y se asocia al extremo N-terminal en la región LRM-CC2 del receptor (Du & Hill, 2015; Liu *et al.* 2014). El efecto de la 7,8-dihidroxi flavona también fue probado en ratones modelo de síndrome de Down, obteniendo resultados positivos: este flavonoide restaura la memoria hipocampal, y la madurez neuronal

en ratones neonatos de la cepa Ts65Dn (Stagini *et al.* 2017). Se ha demostrado que la activación por 7,8-dihidroxi-flavona es más sensible a maduración neuronal *in vitro* comparada con el BDNF, sin embargo BDNF tiene más sitios de unión que su agonista por lo que sus efectos son mayores (Liu *et al.* 2014), es decir, la 7,8-dihidroxi-flavona no podría tener los mismos efectos que el BDNF, pero ambos provocan la internalización del receptor y la transcripción de genes pro-supervivencia y proliferativos. Por otro lado, bajas concentraciones de resveratrol incrementan la fosforilación de cinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs) y cinasas p38, mientras que concentraciones altas tenían efectos inhibitorios, reduciendo el número de NPCs (Kumar & Pandey, 2016).

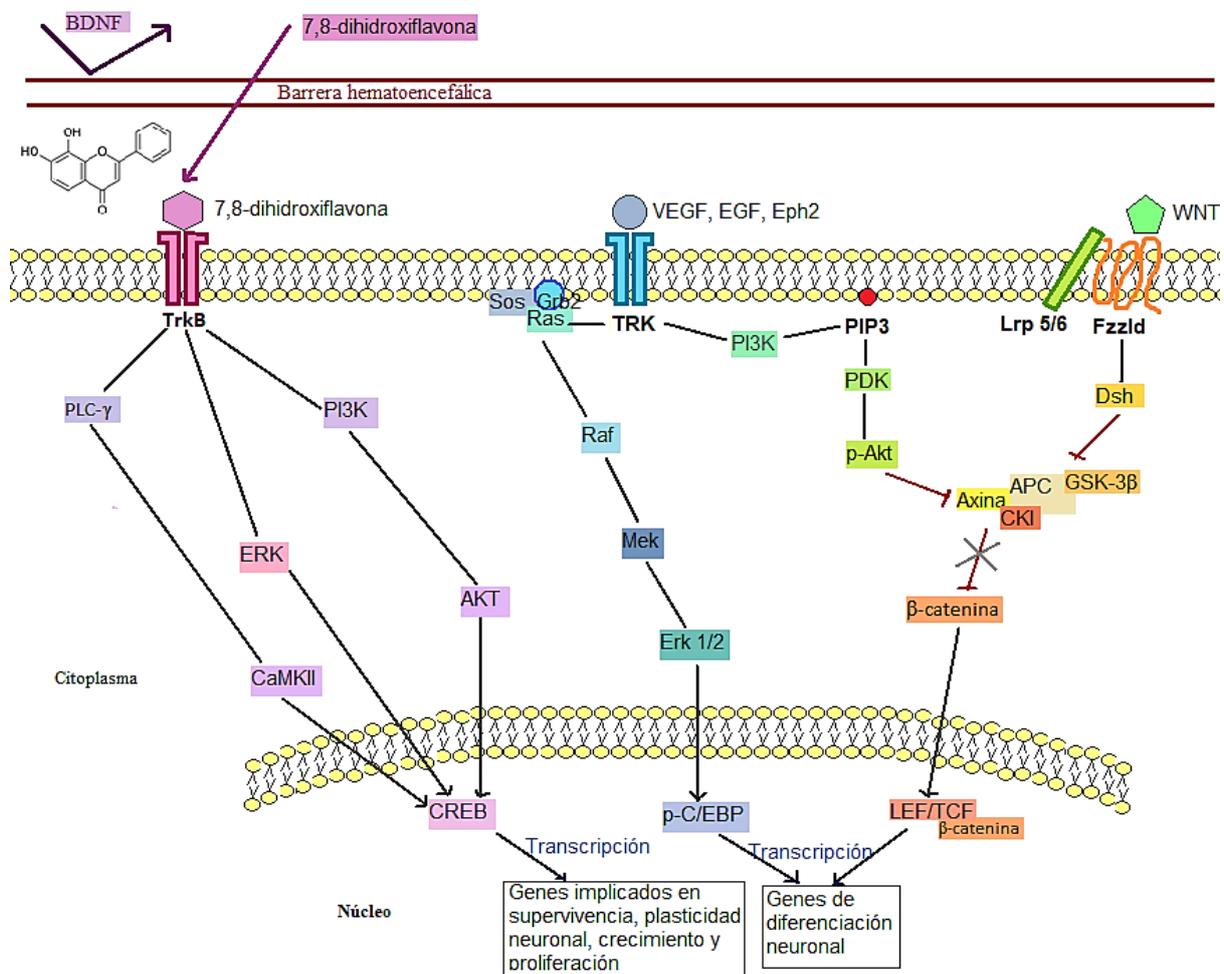


Figura 5. Vías de señalización relacionadas con proliferación y diferenciación neuronal. Extremo izquierdo: Activación del receptor TrkB por un flavonoide (7,8-dihidroxi-flavona), Centro: Dos vías desencadenadas al activarse

el receptor RTK asociado a factores de crecimiento, Derecha: vía Wnt- $\beta$  catenina. Con información de Du & Hill, 2015, Inestrosa y Arenas 2010, Ménard *et al.* 2002 y Rivera, 2015.

Kim y colaboradores (2008) también demostraron que dosis bajas de curcumina tenían un efecto proliferativo sobre células precursoras neurales mediante ERK y MAP cinasas, debido a que el tratamiento con curcumina incrementó la fosforilación de ERKs y p38 MAPK (Kim *et al.* 2008). Se ha observado que las flavanonas y flavanoles tienen efectos sobre la vía ERK, mediada por interacciones entre receptores de membrana, MEK1 y MEK2 (Spencer *et al.* 2009). Esta vía de señalización está relacionada con la potenciación a largo plazo, esto depende mucho de CREB, ya que sin este no hay formación de memoria a largo plazo, este factor de transcripción está estrechamente relacionado con neurotrofinas como BDNF para realizar funciones de supervivencia neuronal, diferenciación y sinapsis (Spencer *et al.* 2009). La activación de CREB y la expresión de BDNF también pueden llevar a la activación de la vía de señalización PI3K/Akt (Williams *et al.* 2008).

La forma en que los flavonoides como la 7,8-dihydroxiflavona y la morina entran al cerebro es muy importante debido a que primero deben atravesar la barrera hematoencefálica, que regula el tráfico molecular y amortigua los cambios en el sistema (Youdim *et al.* 2003), Youdim y colaboradores (2003) realizaron estudios en donde se observa que la mayoría de los flavonoides son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, como las agliconas que pasan por difusión transcelular pasiva. Por otra parte, algunos no lo logran, por lo que los efectos de éstos sobre el sistema nervioso central pueden deberse a efectos sobre otros sitios del organismo como el sistema inmune.

## **Antecedentes**

Se ha observado que algunos polifenoles tienen efecto sobre la proliferación neuronal, como la curcumina y el resveratrol. La morina es un polifenol de tipo flavonoide que posee propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y se ve involucrada en la regulación de algunas vías de señalización. Su efecto sobre la proliferación celular, memoria y cognición ha sido estudiado sobre el hipocampo de roedores, y recientemente nuestro grupo de trabajo describió que la morina tiene efecto sobre el aprendizaje y memoria. Rivera y cols. (2014) realizaron estudios en ratones jóvenes sanos, proporcionando datos preliminares en concentración de 2.5 miligramos de morina por kilogramo de peso, los ratones de estos estudios fueron tratados con morina en dosis de 2.5, 5 y 10 miligramos de este flavonoide por kilogramo de peso del animal; sus resultados muestran en el giro dentado del hipocampo una tendencia hacia una mayor proliferación con las dosis más bajas utilizadas en el experimento, sin diferencias significativas, por este motivo se utilizarán dosis más pequeñas en este estudio. En el mismo trabajo se reportó que la morina no tiene efecto sobre las proteínas Gsk-3 $\beta$  y Erk fosforiladas, sin embargo, podría afectar directamente a la Gsk-3 $\beta$  o producir su efecto por otras vías no asociadas a factores de crecimiento (Rivera, 2015).

Torres y cols. (2018) realizaron estudios administrando 1mg/kg de morina durante diez días para evaluar su efecto sobre la memoria utilizando tres pruebas diferentes: laberinto de Morris, y prueba de reconocimiento de objetos con y sin contexto. Los ratones de la cepa C57BL/6 tratados con morina mostraron una mejor adquisición en el laberinto de Morris comparados con el control, sin embargo, no mostraron diferencias significativas en retención de la memoria. Por otro lado, presentaron mejoría de la memoria en la prueba de reconocimiento de objetos con y sin contexto. Los investigadores proponen que este efecto de mejora en la memoria espacial y de reconocimiento se debe a algún mecanismo que involucra

factores de crecimiento cómo BDNF probablemente producido en astrocitos activados por IL-4. La morina además, protege a las neuronas evitando la hiperfosforilación de tau inducida por  $\beta$  amiloide ( $A\beta$ ), teniendo un rol importante en este efecto la inhibición de Gsk-3 $\beta$  tanto *in vivo* como *in vitro* (Ji *et al.* 2011). No obstante, el mecanismo por el cual interactúa con la Gsk-3 $\beta$  aún es desconocido.

Este trabajo busca explorar los efectos de la morina en concentraciones más bajas de las que se han utilizado, esperando encontrar mejores resultados sobre la neurogénesis, es decir, encontrar una dosis que produzca un aumento en la neurogénesis de los organismos tratados con este polifenol. También, se realizaron experimentos para elucidar un posible mecanismo por el cual este flavonoide induce proliferación celular en cerebros de ratones adultos sanos.

## **Justificación**

Los polifenoles son metabolitos secundarios de plantas que sirven para su protección contra factores externos y presentan efectos diversos al ser administrados en el organismo de animales. Estudios previos muestran que los polifenoles estimulan la neuroplasticidad, neurogénesis y actúan como antiinflamatorios, por lo tanto, pueden ser usados en terapias de diferentes enfermedades. Se ha observado que en dosis bajas desde 0.16 mg/kg como la curcumina (Kim *et al.* 2008) y 0.2 mg/kg del resveratrol (Harada *et al.* 2011) favorecen la proliferación, actúan como neuroprotectores, antioxidantes, entre otros efectos positivos para la salud (Arriagada *et al.* 2016; Dias *et al.* 2012; Quiñones *et al.* 2012), mientras que en dosis altas pueden actuar como mutágenos o pro-oxidantes (Pereira *et al.* 2014).

El estudio del efecto de la morina sobre la neurogénesis es importante debido al potencial que tiene la administración de este polifenol en concentraciones bajas (desde 2.5 mg/kg) y específicas como tratamiento para algunas enfermedades neurodegenerativas. Estas enfermedades afectan principalmente a personas de la tercera edad, quienes componen un gran porcentaje de la población mundial (aproximadamente 600 millones de personas mayores de 60 años, OMS). El estudio de los mecanismos implicados en el efecto de este polifenol sobre la proliferación aportaría nuevos conocimientos al campo de estudio de la neurogénesis y su relación con la memoria y el aprendizaje.

## **Hipótesis**

La morina en dosis menores a 2.5 mg/kg producirá neurogénesis en cerebros de ratones adultos sanos.

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Describir el efecto de la morina sobre la neurogénesis en el hipocampo de ratones adultos jóvenes.

### **Objetivos particulares**

- Estandarizar la técnica de inmunofluorescencia para la identificación de proteínas involucradas en proliferación celular y diferenciación neuronal (GFAP, NeuN, Ki67, BDNF, DCX y BrdU).
- Evaluar la neurogénesis en ratones adultos jóvenes sanos en tratamientos con dosis menores a 2.5 mg/kg de morina y en dos tratamientos temporales (10 y 30 días).
- Dilucidar un posible mecanismo molecular involucrado en la neurogénesis inducida por morina.

## Material y Método

- Animales

Para la elaboración de este proyecto se trabajó con cuarenta ratones (*Mus musculus*) machos de la cepa C57BL/6 de tres meses de edad, de 25 a 30 g en condiciones de 12 horas de luz y 12 de oscuridad, comida y agua *ad libitum* y temperatura constante (22-23°C), en el bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”. Los experimentos y protocolos utilizados en este proyecto se realizaron en acuerdo a la NOM-062-ZOO-199.

Los animales fueron divididos en dos grupos de veinte ratones cada uno para realizar un experimento de diez días y uno de treinta días, cada uno de estos grupos fue sub-dividido en cinco tratamientos distintos: control (solución salina), vehículo (DMSO) y tratamiento con morina en dosis de 0.5, 1 y 2.5 mg/kg (figura 6).

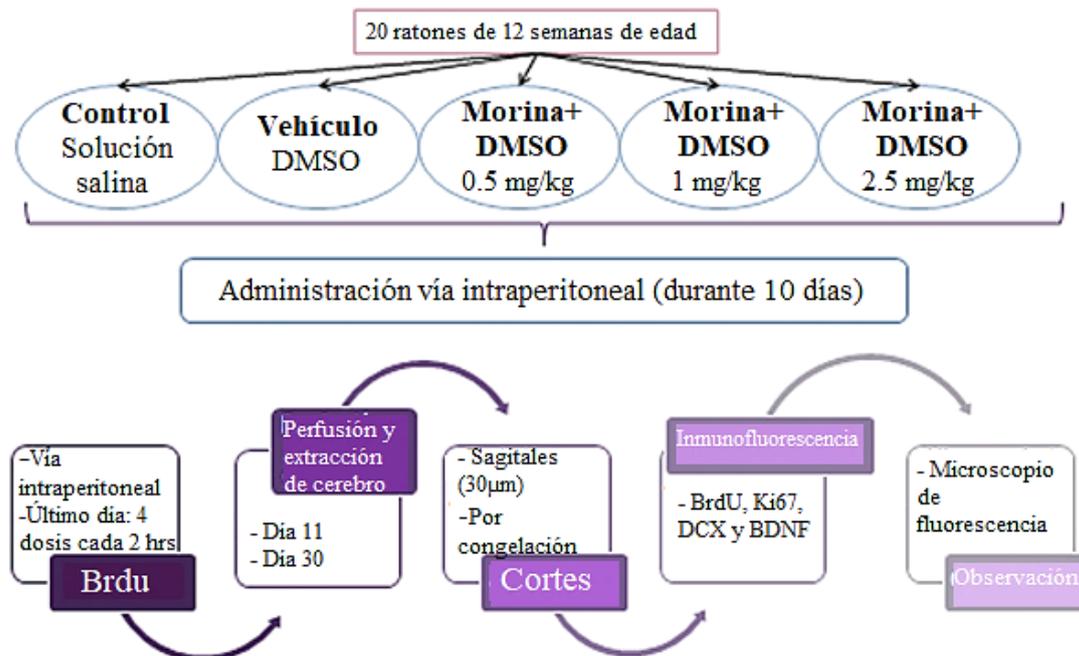


Figura 6. Diseño experimental

- Tratamiento con morina y administración de BrdU

Se administró durante diez días el tratamiento correspondiente a cada uno de los cinco grupos: control (solución salina), vehículo (DMSO diluido en solución salina) y tratamiento con morina en dosis de 0.5, 1 y 2.5 miligramos por kilogramo de peso (mg/kg); cada grupo compuesto por cuatro ratones. El tratamiento fue inyectado vía intraperitoneal cada día en un horario de las diez a once horas.

El último día del tratamiento con morina (día 10) se inyectó vía intraperitoneal a todos los ratones BrdU (Santa Cruz, sc-290815) en dosis de 50 mg/kg, cada dos horas, un total de cuatro dosis, siguiendo el protocolo de Latchney y colaboradores (2013) para el marcaje de células en proliferación en el giro dentado del hipocampo.

Un día después de la administración de BrdU y al término de los tratamientos se realizó una perfusión intracardiaca con solución salina (0.9% NaCl), seguida de paraformaldehído (PFA) al 4% disuelto en buffer de fosfatos (PB) a pH 7.4 a cuatro ratones de cada grupo. Por otro lado, cuatro ratones de cada grupo fueron conservados con vida durante veinte días posteriores al término de los tratamientos y la administración de BrdU para realizarles una perfusión intracardiaca en el día 30 (figura 7).

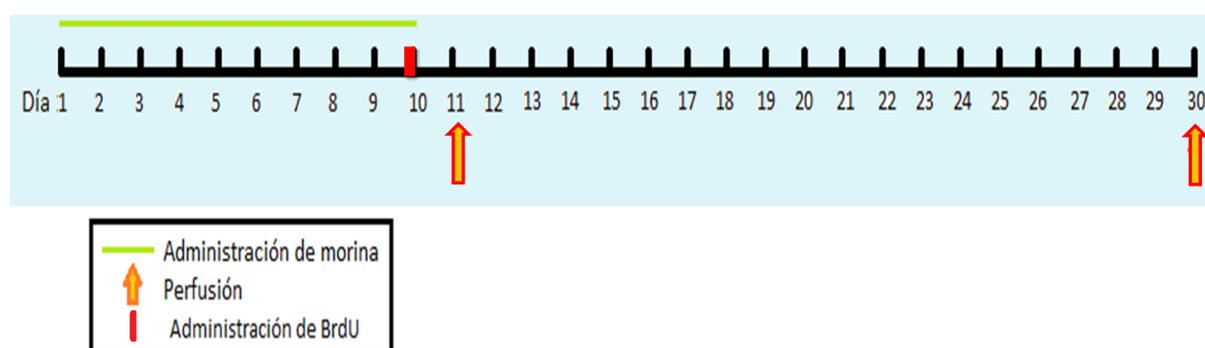


Figura 7. Diseño temporal de administración de morina y BrdU, para realizar al término pruebas moleculares.

- Tratamiento de tejidos e inmunofluorescencia

Se realizó una perfusión intracardiaca con solución salina (0.9% NaCl), seguida de paraformaldehído (PFA) al 4% disuelto en buffer de fosfatos (PB) a pH 7.4 a los dos grupos

de veinte ratones cada uno (10 y 30 días de experimento). Después de la perfusión se realizó la extracción de los cerebros, los cerebros se mantuvieron en post-fijación en una solución de PFA 4%-PB. Posterior a esto se colocaron los cerebros en una solución de sacarosa al 20% durante tres días y después en una solución de sacarosa al 30% por otros tres días para la crioprotección del tejido. Se realizaron cortes sagitales en criostato de 30  $\mu\text{m}$  de grosor, conservando aquellos en los que se observe el giro dentado del hipocampo en solución PFA 4%-PB.

Con los tejidos se realizaron inmunofluorescencias para la observación de células positivas a Ki-67, DcX, BDNF y BrdU; para esto se hicieron tres lavados con PBST (PBS 0.1 M con tritón al 0.3%), esto con el fin de permeabilizar el tejido. Posterior a esto se realizó una incubación de cuarenta minutos en amortiguador de citratos a 70°C calentado por diez minutos previos a este paso. Se dejaron enfriar los tejidos para posteriormente realizar un lavado con agua destilada. Se realizaron tres lavados más con PBST 0.3%, agitando diez minutos a intensidad baja. Posteriormente se bloqueó durante 60 minutos con albúmina y suero de cabra, ambos al 5%, para posteriormente dejar incubando con anticuerpo primario para Ki-67 (1:50, Santa Cruz sc-7846), BDNF (1:500, abcam ab72439) y Ki-67 (1:50, Santa Cruz sc-7846) más DcX (1:50, Santa Cruz sc-271390) durante toda la noche.

Se hicieron tres lavados con PBT 0.3% durante diez minutos con agitación a baja. Posterior a esto se agregaron los anticuerpos secundarios a los tejidos y se incubaron durante dos horas en oscuridad. Para la detección de BDNF se utilizó anticuerpo Alexa 488 (anti-conejo, 1:400, Invitrogen), para Ki-67 se utilizó el anticuerpo Alexa 488 (anti-cabra, 1:300, Invitrogen) y para DcX se agregó Alexa 594 (anti-ratón, 1:300, Invitrogen). Se lavaron los tejidos tres veces con PBT 0.3% durante diez minutos y después se incubó con DAPI (1:200, DAKO) de diez a quince minutos. Posterior a esto se realizaron tres lavados con PB pH 7.4; finalmente

se realizó el montaje de los tejidos y su observación en un microscopio Leica DM/LS 020-518-500.

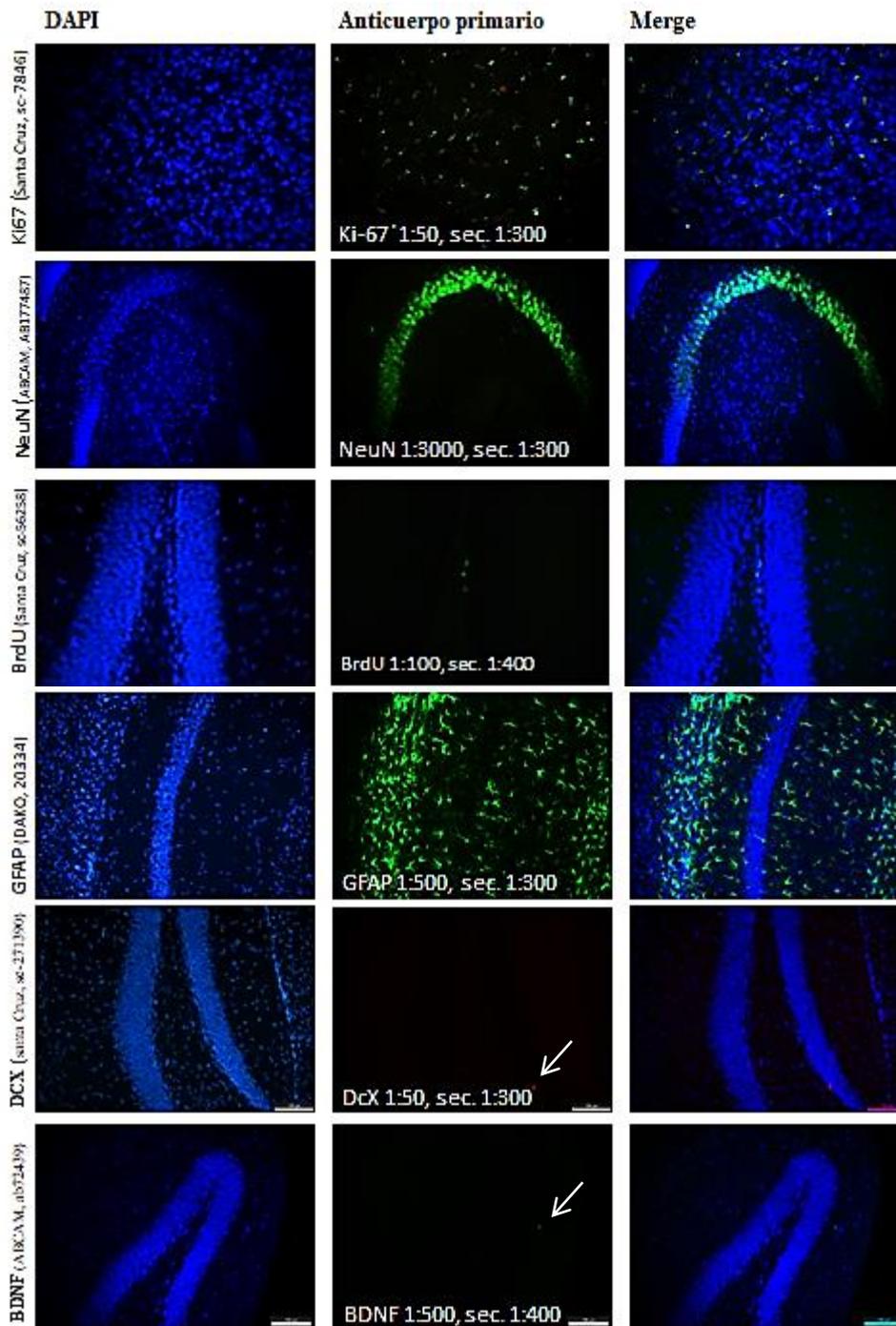
En las inmunofluorescencias para identificar BrdU se siguió un procedimiento similar pero con algunos cambios. El DNA se desnaturalizó con una incubación de 30 minutos en HCl 1N a 37°C, a continuación se hizo una incubación en buffer de boratos 0.1M pH 8.8 durante diez minutos y el tiempo de bloqueo fue de dos horas. Se utilizó anticuerpo primario para BrdU (1:100, Santa Cruz sc-56258) para detectar el BrdU se utilizó el anticuerpo secundario Alexa 594 (anti-rata 1:400, Invitrogen).

Posteriormente se tomaron fotos a 20x en el microscopio (Leica DM/LS 020-518-500) y se contabilizó el número de células positivas a Ki-67, Ki67+DcX, BDNF y BrdU en cada corte, para realizar posteriormente análisis estadísticos con el programa GraphPad Prism 8® (GraphPad Software, Inc. 2018), ANOVA de una y dos vías dependiendo del experimento, seguidos de pruebas de Tukey para comparaciones múltiples.

## Resultados

- Estandarización de la técnica de inmunofluorescencia

Se realizó la estandarización de anticuerpos para la observación de proteínas involucradas en proliferación celular y diferenciación neuronal (figura 8), mediante la técnica de inmunofluorescencia utilizada después para la evaluación del tratamiento con morina.



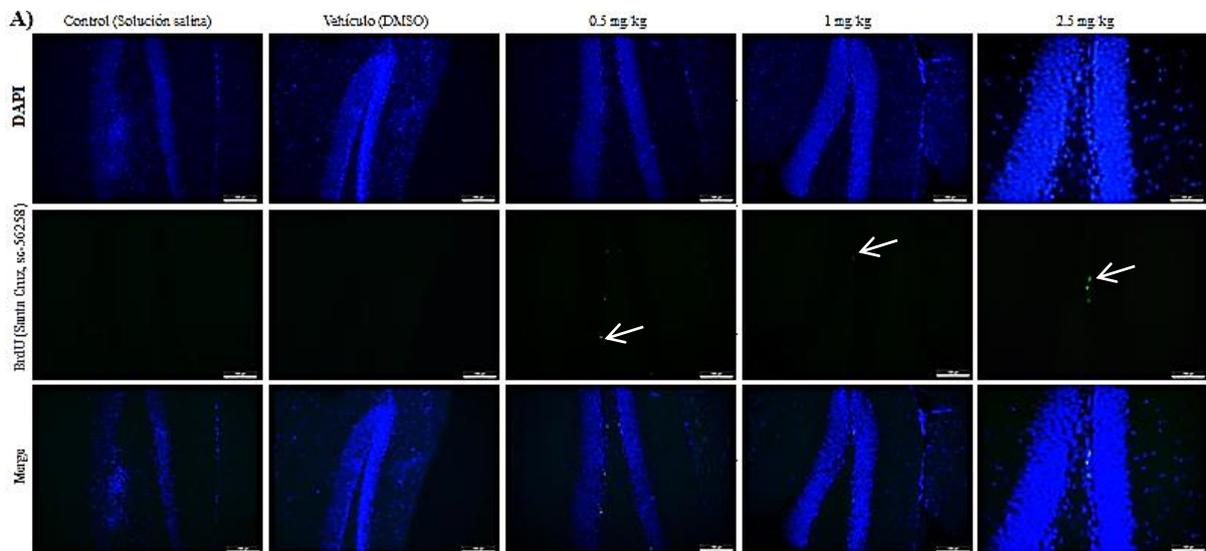
**Figura 8. Estandarización de anticuerpos de inmunofluorescencia.** Se observa el giro dentado de cortes de cerebros de ratones de la cepa C57BL/6. Marca nuclear con DAPI (azul), Ki-67, NeuN, BrdU, GFAP y BDNF (verde), DcX (rojo). Las flechas señalan células positivas a CDX y BDNF. Fotos tomadas en un aumento de 20x. Barra de escala: 100µm.

La estandarización de estos anticuerpos de inmunofluorescencia es importante para posteriores experimentos. En el caso de Ki-67 se realizó la estandarización con cortes de cerebro de ratón neonato, esto debido a que las pruebas con tejidos de ratones adultos no mostraban células en proliferación.

Se utilizarán las siguientes concentraciones de anticuerpo: Ki67 1:50, NeuN 1:3000, BrdU 1:100, GFAP 1:500, DcX 1:50, y BDNF 1:500.

- **La morina induce proliferación celular en hipocampo de ratón**

Se realizó la observación de BrdU mediante la técnica de inmunofluorescencia en los tejidos de ratones tratados durante diez días con morina y posteriormente perfundidos (figura 9). Se observa una mayor proliferación celular en los cortes cerebrales de ratones tratados con morina, esto indica que el tratamiento con morina durante diez días sí propicia una proliferación celular mayor a la normal.



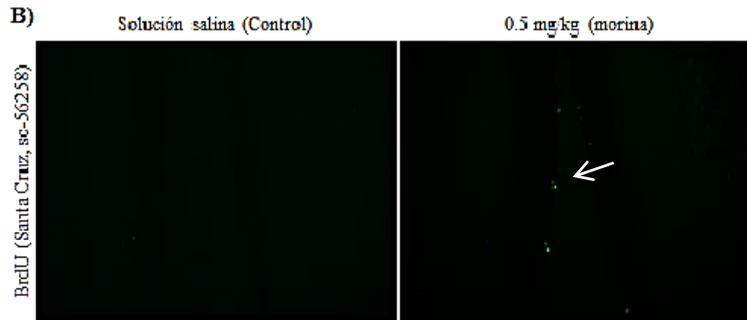
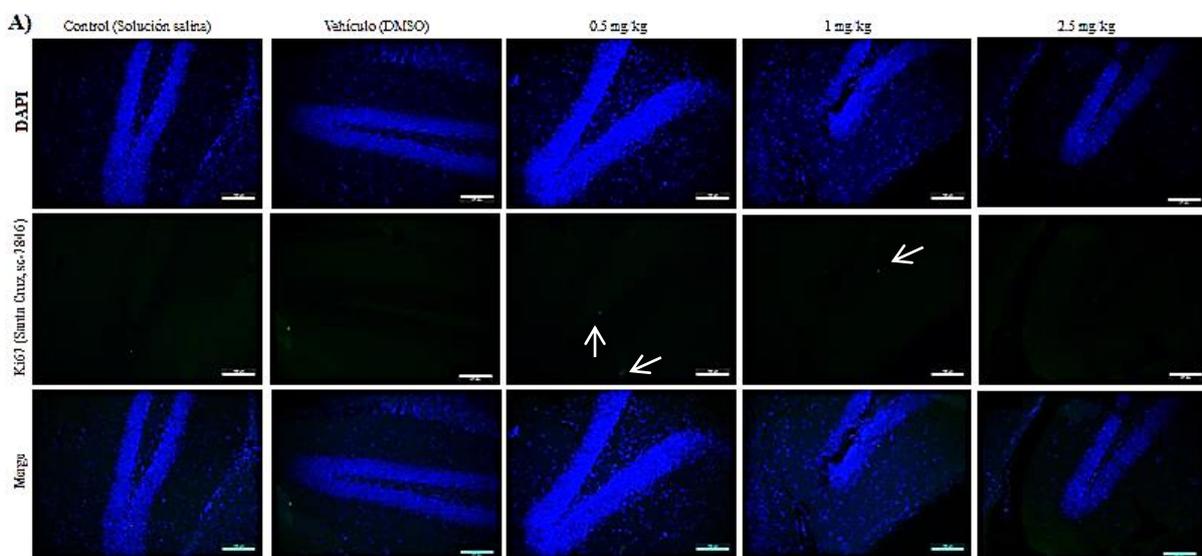
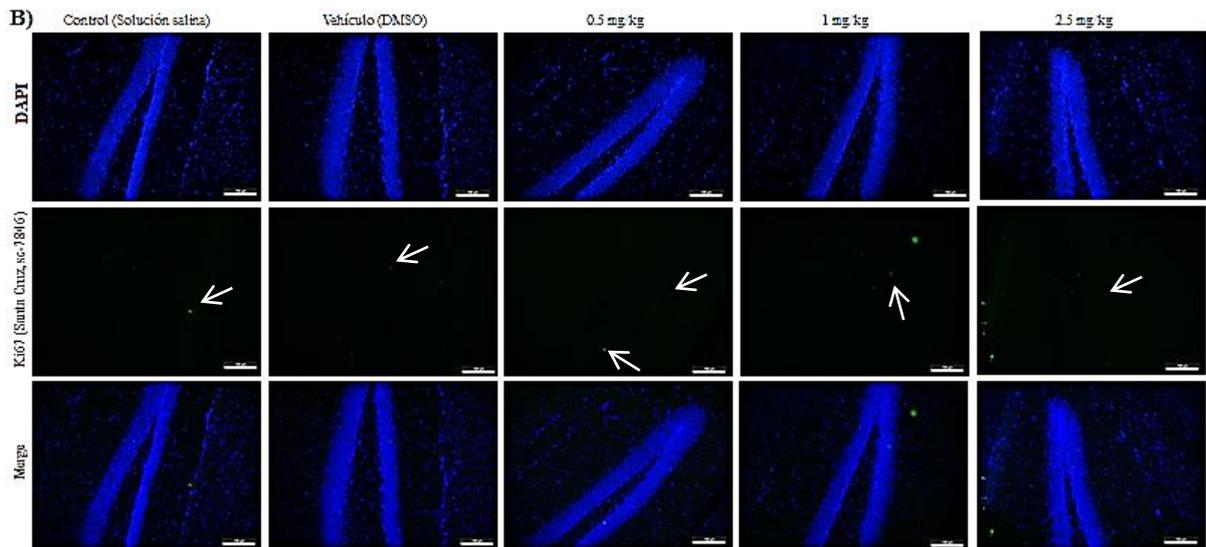


Figura 9. Expresión de BrdU después de 10 días de tratamiento con morina. Giro dentado de cerebros de ratones de la cepa C57BL/6, cortes de 30µm. A: Proliferación celular un día después del tratamiento con morina por diez días, células marcadas con BrdU (verde, administrado el último día del tratamiento), marca nuclear con DAPI (azul), B: Comparación de la expresión de BrdU (verde) entre el control y la concentración de 0.5 mg/kg, en la que se observa mayor proliferación que en el resto de los tratamientos. Las flechas señalan células positivas a BrdU en los cortes. Fotos tomadas en un aumento de 20x, Barra de escala: 100µm. 2.5 mg/kg que fue tomada en un aumento de 40x.

Posterior a esto se realizó una inmunofluorescencia para identificar Ki-67, marcador de células nuevas, en el giro dentado del hipocampo de cortes cerebrales de ratones sometidos al experimento durante diez y treinta días (figura 10). Se observa una tendencia a mayor proliferación en menores concentraciones del tratamiento.





**Figura 10. Imágenes representativas del giro dentado del hipocampo de todos los tratamientos (Ki67). A:** Proliferación celular un día después del tratamiento con morina por diez días en el giro dentado de cerebros de ratones de la cepa C57BL/6, cortes de 30 $\mu$ m, **B:** proliferación celular veinte días después del tratamiento con morina por diez días en el giro dentado de cerebros de ratones de la cepa C57BL/6, cortes de 30 $\mu$ m. Las flechas indican células positiva a Ki67. Marca nuclear con DAPI (azul), Ki-67 (verde). Fotos tomadas en un aumento de 20x. Barra de escala: 100 $\mu$ m.

Se realizó el conteo del número de células positivas a Ki-67 por corte y se realizó la comparación entre los diferentes tratamientos (Figura 11). Se observan diferencias significativas en los experimentos de diez (Figura 11 A) y treinta días (Figura 11 B) entre el tratamiento de 0.5 mg/kg y el control. En el caso del experimento de 10 días hay diferencias significativas entre el tratamiento de 0.5 mg/kg y el resto de los tratamientos. Estos resultados indican que el tratamiento con morina durante diez días es una concentración de 0.5 mg/kg resulta en una mayor proliferación celular en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo (Figura 12).

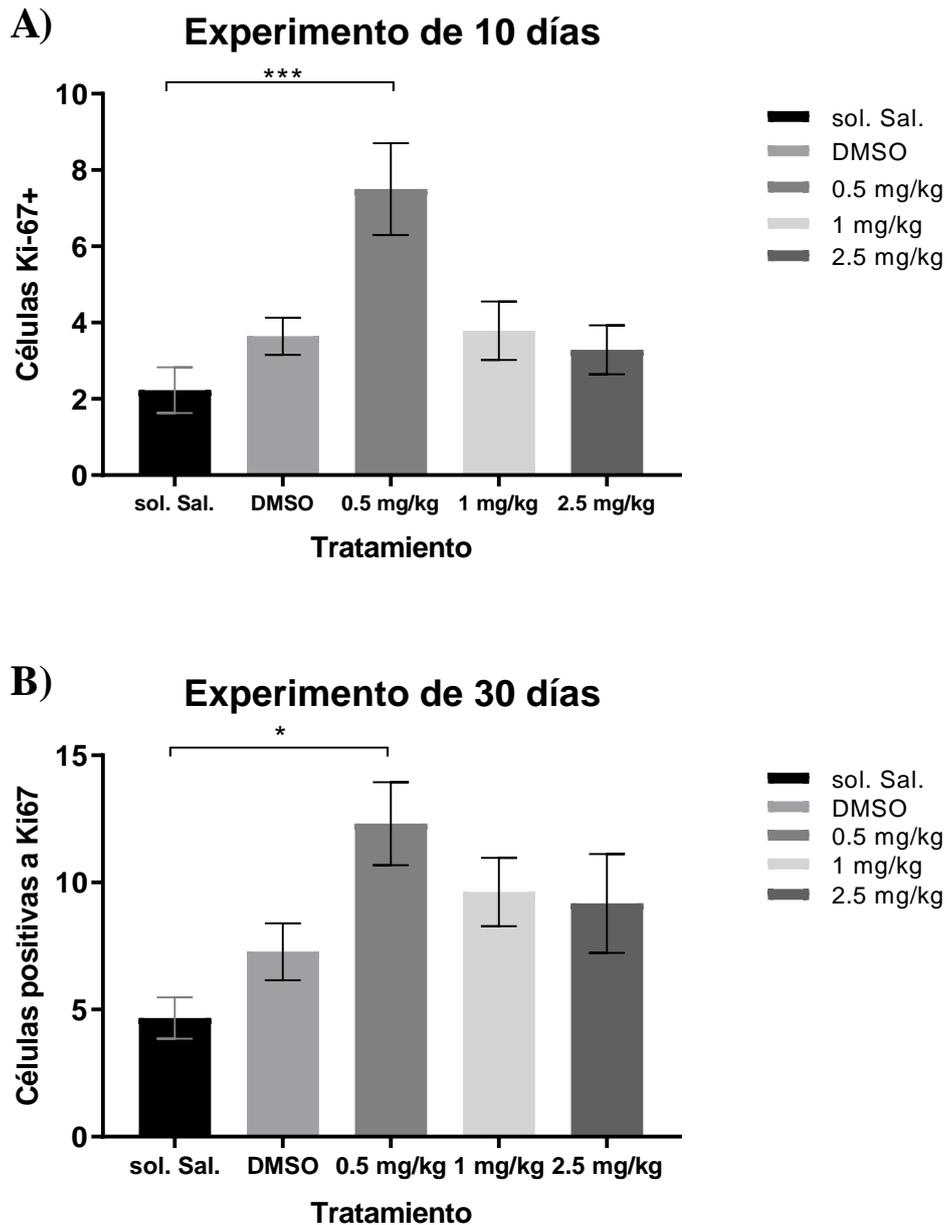


Figura 11. . Células positivas a Ki-67 uno y veinte días después de aplicar el tratamiento. Células positivas a Ki-67 (marcador de proliferación celular) un día después de aplicar el tratamiento de morina por diez días (A: ANOVA de una vía:  $F=6.469$ ,  $P=0.0002$ ,  $n=13$ ) y veinte días después del tratamiento (B: ANOVA de una vía:  $F=4.117$ ,  $P=0.0044$ ,  $n=16$ ). El tratamiento con morina estimula la proliferación celular. Se muestran promedios  $\pm$  E.E.M. \* $P<0.05$ , \*\*\* $P=0.0001$ .

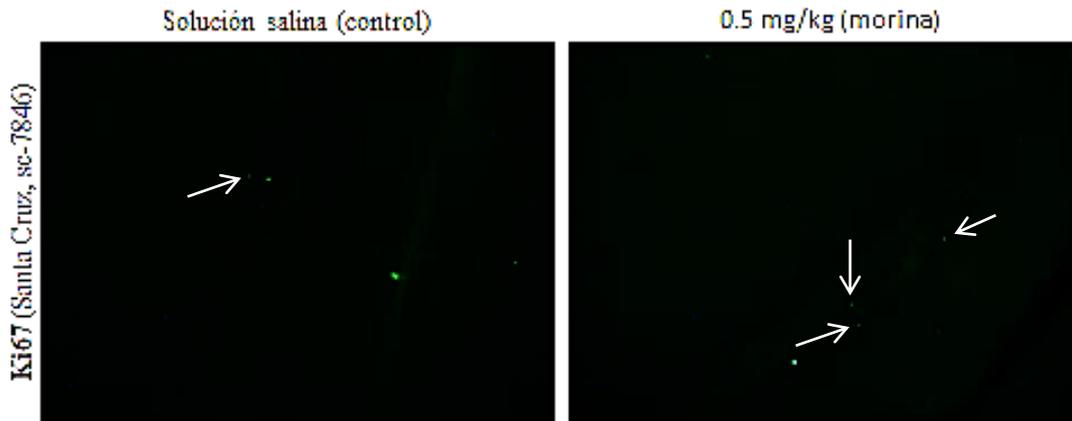


Figura 12. Células positivas a Ki-67 (verde) en el giro dentado del hipocampo de ratones tratados con solución salina y 0.5 mg/kg de morina. Cortes de cerebros de ratones tratados con solución salina y 0.5 mg/kg de morina respectivamente, cortes de 30µm de ancho. La concentración de 0.5 mg/kg propicia la proliferación. Las flechas indican células positivas a Ki67. Imágenes tomadas en un aumento de 20x.

Al realizar la comparación entre los experimentos de diez y treinta días se puede observar que hay una mayor proliferación a los treinta días de tratamiento en todas las concentraciones de morina y el vehículo (figura 13, negro). Además se observan diferencias significativas entre el tratamiento con 0.5 mg/kg de morina, el control y el vehículo, en conjunto, el tratamiento de 0.5 mg/kg propicia una mayor proliferación celular (figura 13, rojo) tanto en el experimento de diez días como el de treinta días.

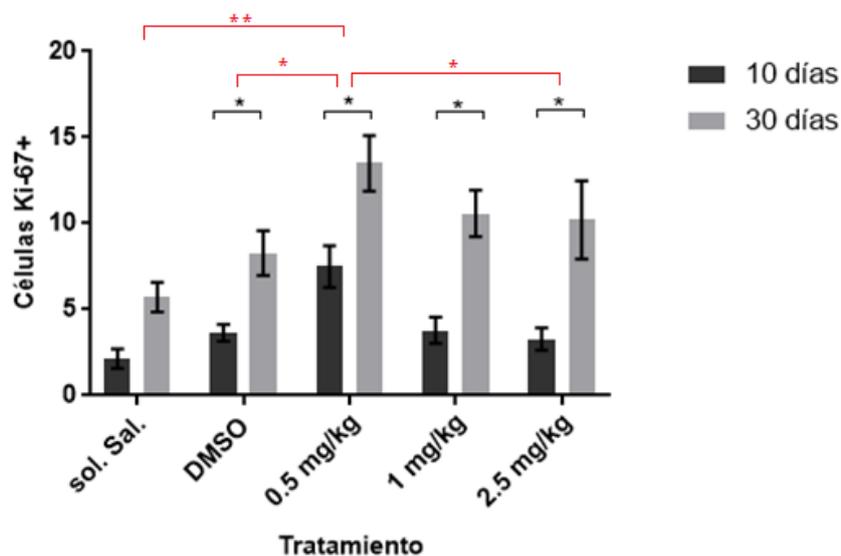
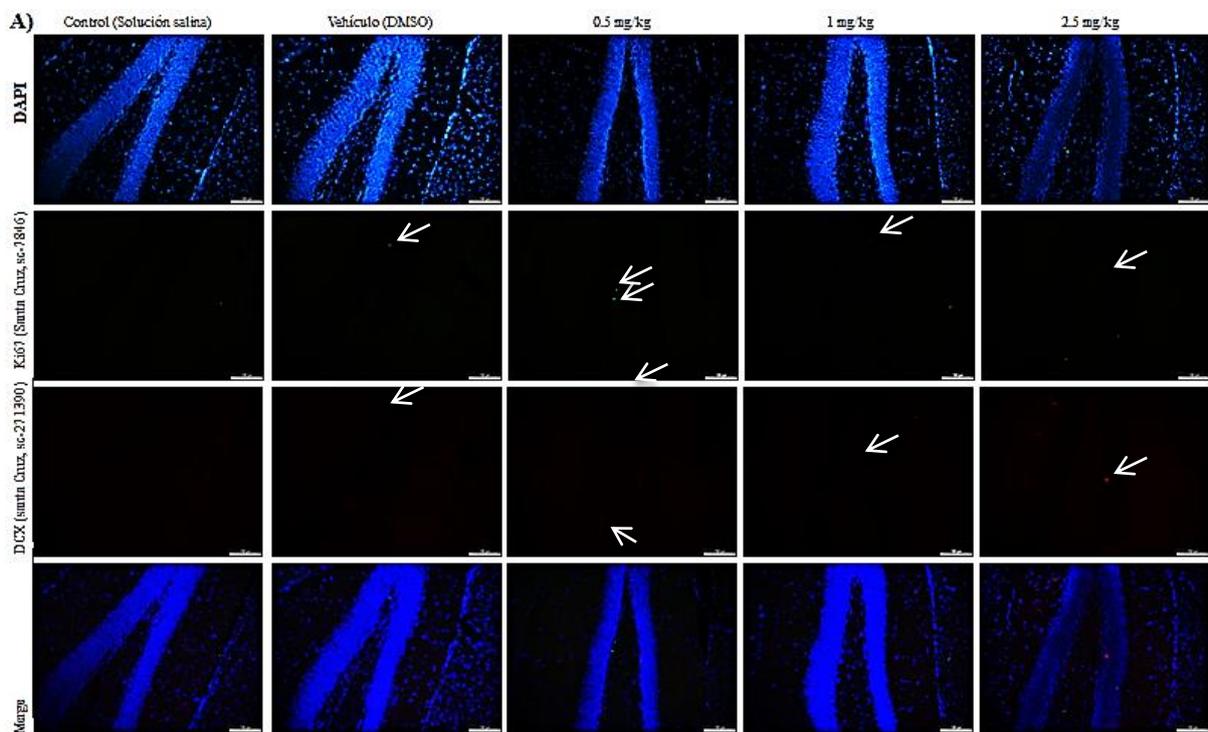


Figura 13. Proliferación veinte días después de finalizar el tratamiento y con una concentración de 0.5 mg/kg de morina. Células positivas a Ki-67 en los diferentes tratamientos, comparación entre los tratamientos de 10 y 30 días.

Se observan diferencias significativas entre los tratamientos de 10 y 30 días en todos los casos excepto el control. Se muestran promedios  $\pm$  E.E.M. \* $P < 0.05$  (negro). Rojo: Células positivas a Ki-67, comparación entre tratamientos, la concentración de 0.5 mg/kg presenta diferencias significativas con el control, el vehículo y el tratamiento con 2.5 mg/kg (ANOVA de dos vías: Tratamiento  $F_{4,130} = 7.568$ , día  $F_{1,130} = 51.87$ . Tratamiento x día  $F_{4,130} = 0.6951$ ,  $P = 0.5967$ ,  $n = 12$ ). Se muestran promedios  $\pm$  E.E.M. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$ .

- **Proliferación neuronal después del tratamiento con morina**

Con el objetivo de identificar si las células que proliferaron eran neuronas inmaduras se realizaron inmufluorescencias para identificar DcX (marcador de neuronas inmaduras) y Ki-67 (marcador de proliferación), se muestran imágenes representativas de los cortes de cada tratamiento (figura 14).



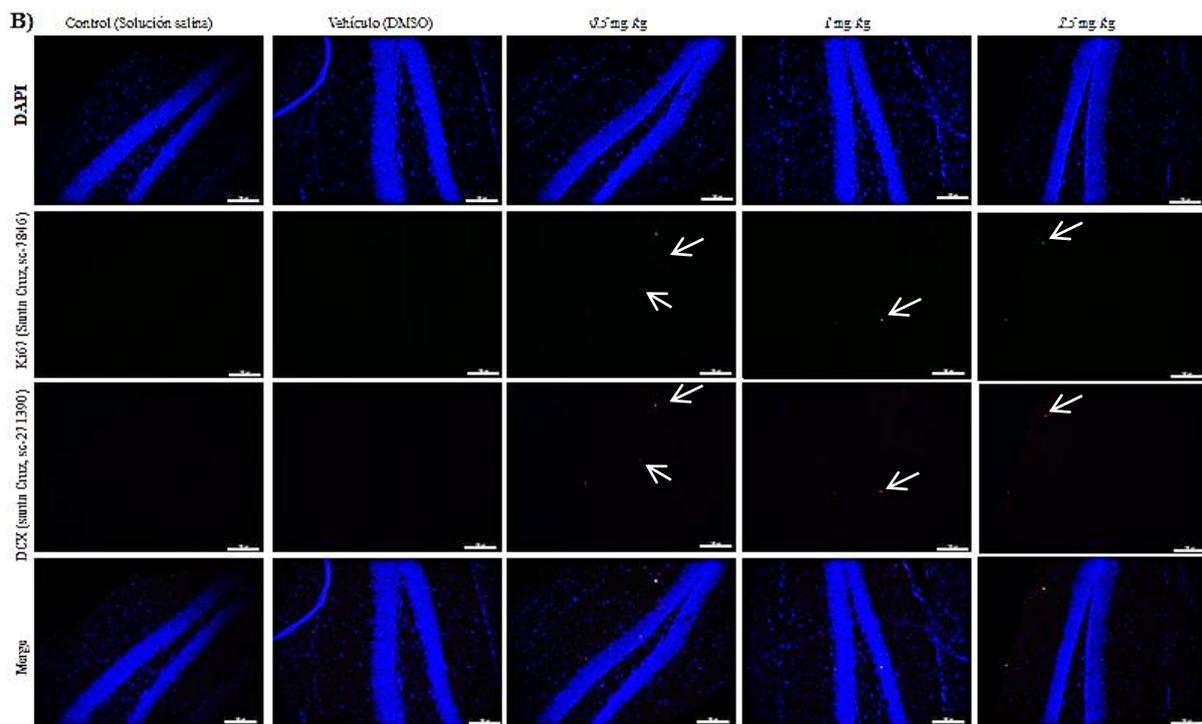
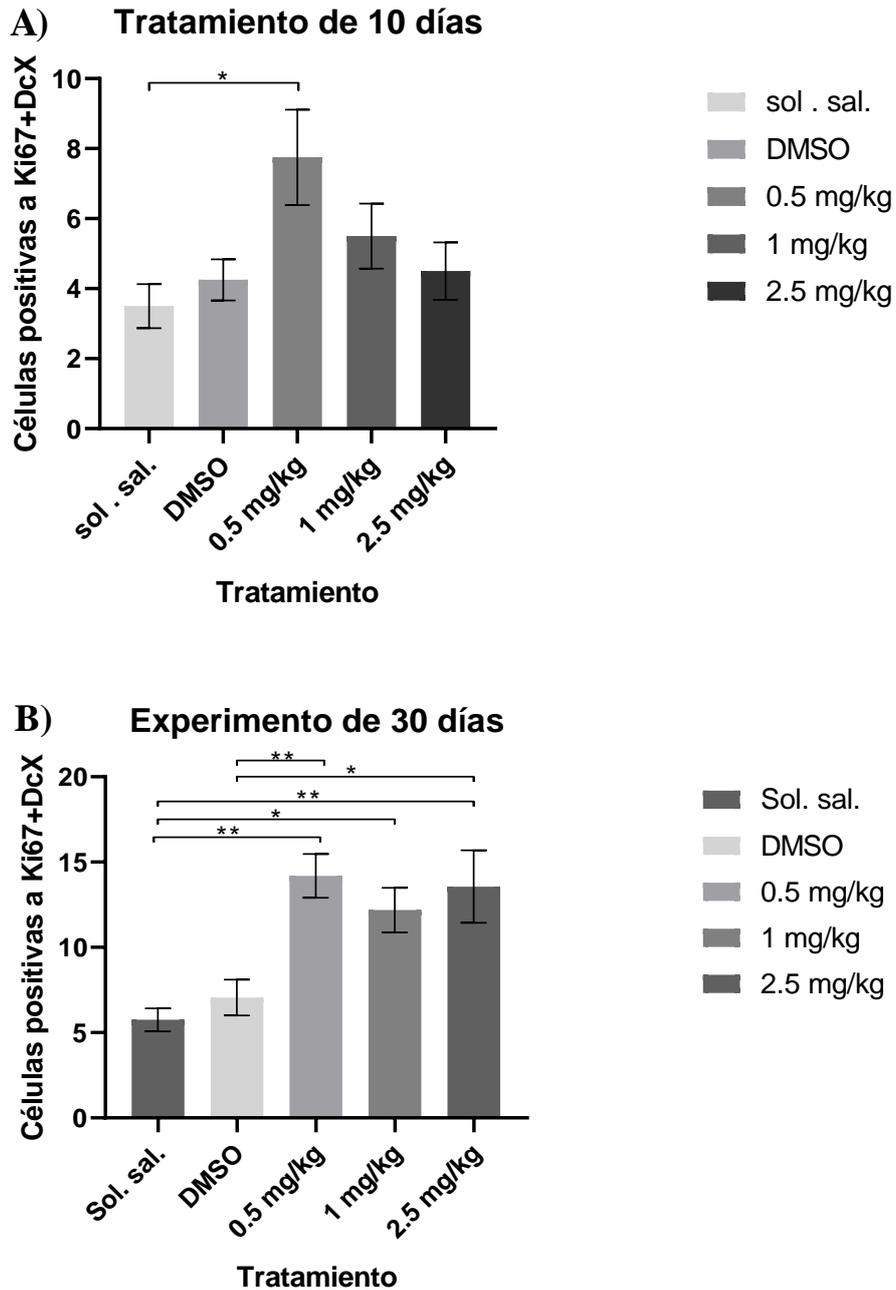
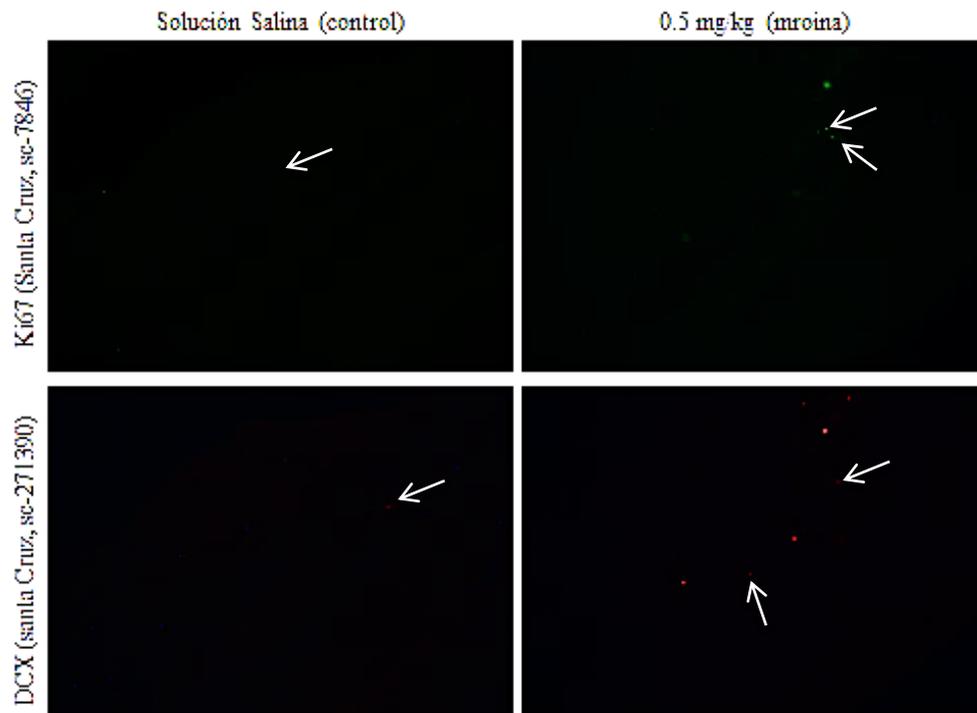


Figura 14. Imágenes representativas del giro dentado del hipocampo de todos los tratamientos (Ki67+DcX). A: Proliferación neuronal un día después del tratamiento con morina por diez días en el giro dentado de cerebros de ratones de la cepa C57BL/6, cortes de 30 $\mu$ m, B: proliferación neuronal veinte días después del tratamiento con morina por diez días en el giro dentado de cerebros de ratones de la cepa C57BL/6, cortes de 30 $\mu$ m. Marca nuclear con DAPI (azul), Ki-67 (verde), DcX (rojo). Las flechas indican células positivas a Ki67 y DcX. Fotos tomadas en un aumento de 20x. Barra de escala: 100 $\mu$ m.

Se realizó la cuantificación de las células positivas a Ki-67 y DcX en los cortes, se observa una mayor proliferación neuronal con la concentración de 0.5 mg/kg en el experimento de diez días mostrando diferencias significativas con el control, mientras que en el de treinta días se observan diferencias significativas en todos los tratamientos de morina comparados con el control y en en los tratamientos con 0.5 mg/kg y 2.5 mg/kg de morina comparados con el vehículo (DMSO) (figura 15 y 16).



**Figura 15. Células positivas a Ki-67 y DcX un día y veinte días después del tratamiento.** Células positivas a Ki-67 (marcador de proliferación celular) y DcX (marcador de neuronas inmaduras) un día después de aplicar el tratamiento de morina por diez días (A: ANOVA de una vía:  $F=3.280$ ,  $P=0.0220$ ,  $n=8$ ) y veinte días después del tratamiento (B: ANOVA de una vía:  $F=7.987$ ,  $P<0.0001$ ,  $n=16$ ). El tratamiento con morina estimula la proliferación neuronal. Se muestran promedios  $\pm$  E.E.M. \* $P<0.05$ . \*\* $P<0.001$ .



**Figura 16. Proliferación neuronal en el giro dentado de ratones tratados con solución salina y morina en una concentración de 0.5 mg/kg.** La concentración de 0.5 mg/kg propicia la proliferación neuronal. Células positivas a Ki-67 (verde) y DcX (rojo) en el giro dentado del hipocampo de cortes de cerebros de ratones tratados con solución salina y 0.5 mg/kg de morina respectivamente. Las flechas indican células positivas a Ki67 y DCX. Imágenes tomadas en un aumento de 20x.

Al realizar la comparación entre experimentos se pueden observar diferencias significativas en el número de células positivas a Ki-67 y DcX entre los experimentos de diez y treinta días en los ratones tratados con morina, hay más proliferación neuronal en los experimentos de treinta días (Figura 17, negro). En conjunto, el tratamiento con 0.5 mg/kg tiene mayores diferencias con el control, pero se observa una mayor proliferación con todos los tratamientos de morina (Figura 17, rojo), esto indica que el tiempo es un componente importante para observar los efectos del tratamiento con morina, y que estos no se restringen a los primeros días de tratamiento, sino que es un efecto a largo plazo.

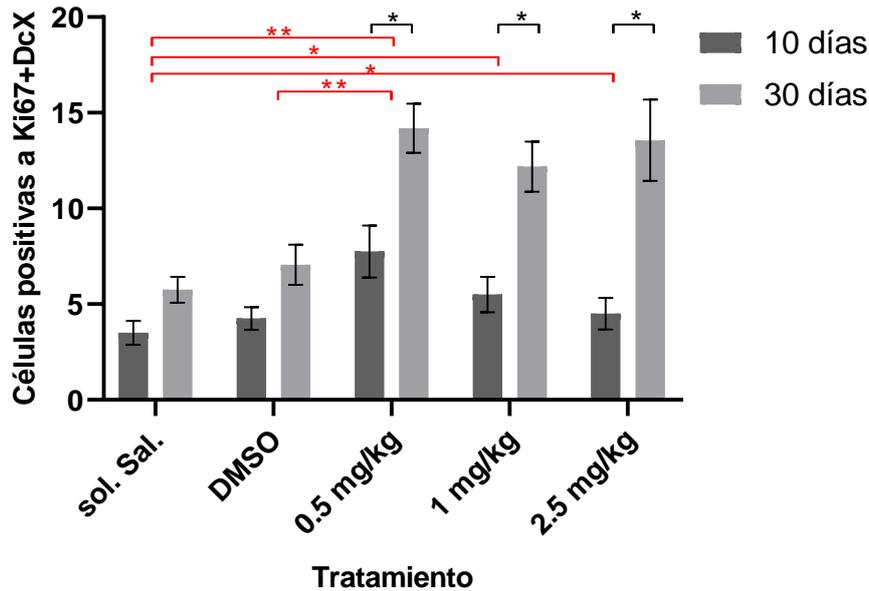
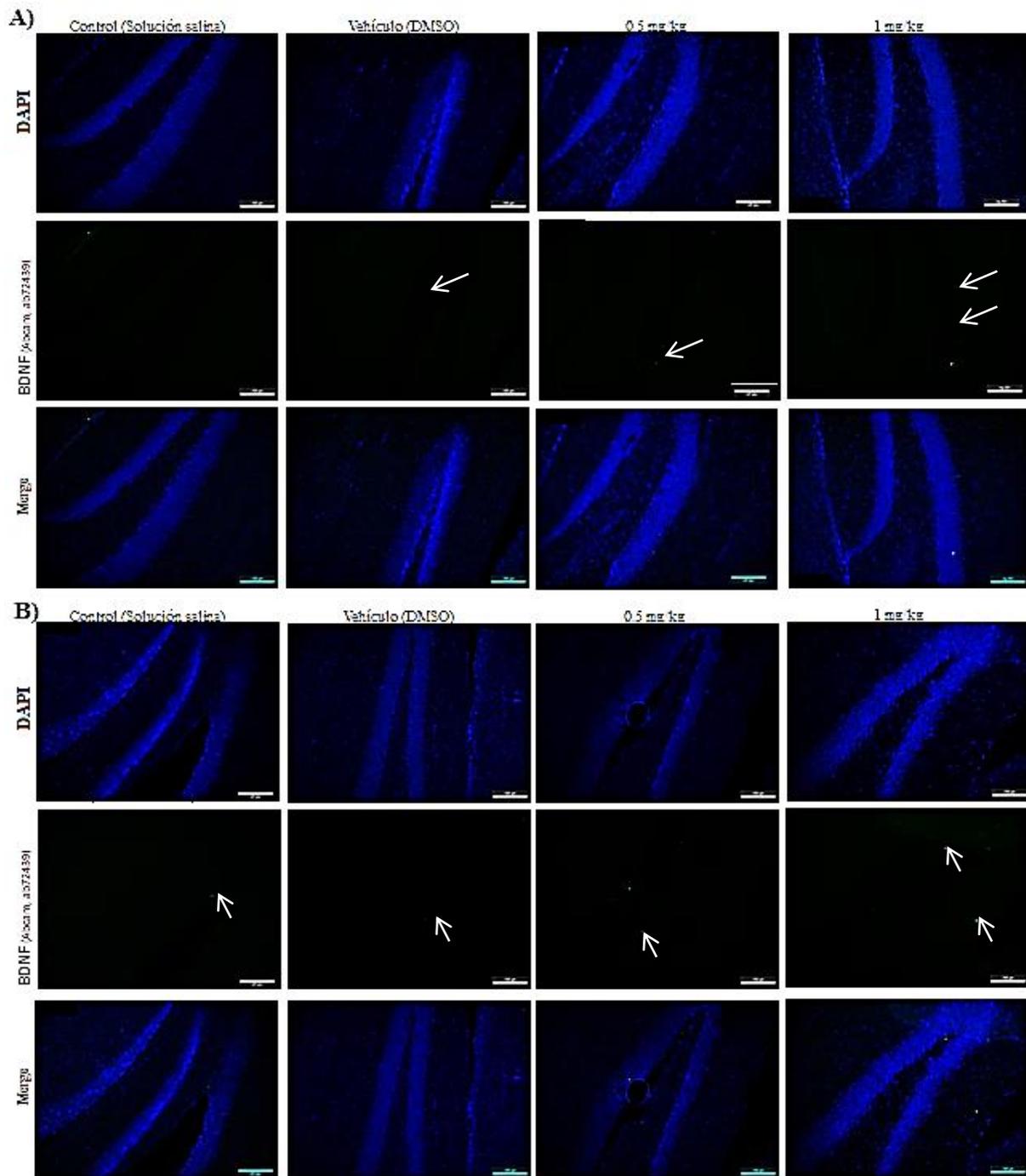


Figura 17. Proliferación neuronal veinte días después de finalizar el tratamiento y con una concentración de 0.5 mg/kg de morina. Células positivas a Ki-67 y DcX en los diferentes tratamientos, comparación entre los tratamientos de 10 y 30 días (ANOVA de dos vías: Tratamiento  $F_{4,110} = 6.432$ , día  $F_{1,110} = 34.97$ . Tratamiento x día  $F_{4,110} = 1.928$ ,  $P = 0.1107$ ,  $n = 16$ ). Se observan diferencias significativas entre los tratamientos de 10 y 30 días en los tratamientos con morina. Se muestran promedios  $\pm$  E.E.M. \* $P < 0.05$  (negro). Rojo: Células positivas a Ki-67 y DcX, comparación entre tratamientos, la concentración de 0.5 mg/kg presenta diferencias significativas con el control (ANOVA de dos vías: Tratamiento  $F_{4,110} = 6.432$ , día  $F_{1,110} = 34.97$ . Tratamiento x día  $F_{4,110} = 1.928$ ,  $P = 0.1108$ ,  $n = 16$ ). Se muestran promedios  $\pm$  E.E.M. \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.001$ .

- **La morina en tratamientos de 30 días produce un aumento de la expresión de BDNF en el hipocampo de ratones adultos sanos.**

Se realizó una inmunofluorescencia para identificar la expresión de BDNF como el posible mecanismo molecular causante del efecto de la morina sobre la proliferación celular; la evaluación en 10 días no fue consistente debido al escaso número de células positivas al BDNF (figura 18A). Sin embargo, en 30 días de tratamiento se observa una mayor expresión de BDNF, especialmente en la concentración 1 mg/kg de morina (figura 18B).



**Figura 18. Expresión de BDNF en el giro dentado de ratones tratados con morina.** A: Un día después del tratamiento con morina por diez días, B: Veinte días después del tratamiento con morina por diez días. Marca nuclear con DAPI (azul), BDNF (verde). Las flechas indican células positivas a BDNF. Fotos tomadas en un aumento de 20x. Barra de escala: 100 $\mu$ m.

Posterior a esto se realizó la cuantificación de células positivas a BDNF (Figura 19). Hay una tendencia a una mayor expresión con los tratamientos de morina y el DMSO en el

experimento de diez días; sin embargo, sólo se encuentran diferencias significativas entre el control y el vehículo. Por otro lado, en el experimento de treinta días hay diferencias significativas entre el tratamiento con morina en una concentración de 1 mg/kg y el resto de los tratamientos, en esta concentración hay una mayor expresión de BDNF.

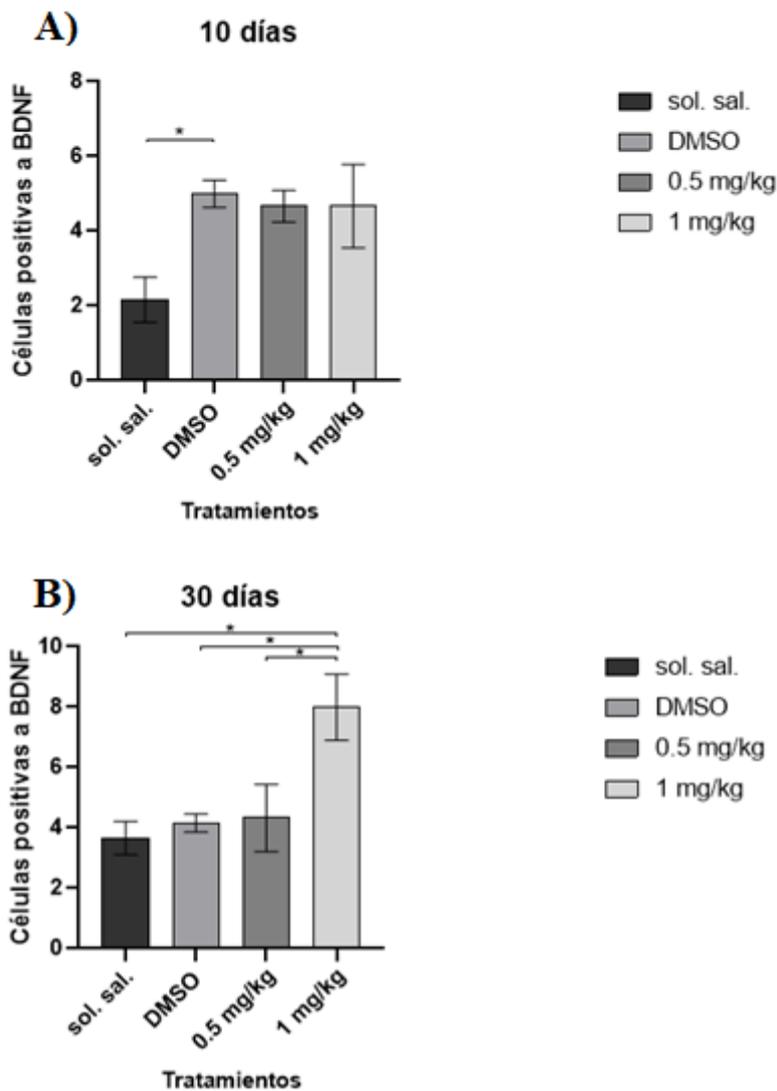


Figura 19. Expresión de BDNF en el giro dentado de ratones tratados con morina. Células positivas a BDNF un día después de aplicar el tratamiento de morina por diez días (A: ANOVA de una vía:  $F=3.609$ ,  $P=0.0313$ ,  $n=6$ ) y veinte días después del tratamiento (B: ANOVA de una vía:  $F=5.572$ ,  $P=0.0060$ ,  $n=6$ ). Se muestran promedios  $\pm$  E.E.M. \* $P<0.05$

Se observa una mayor expresión de BDNF en el tratamiento de 1 mg/kg de morina comparado con el control (solución salina) en ambos experimentos, de diez y treinta días (figura 20), sin embargo, hay diferencias significativas solo en el experimento por treinta días.



Figura 20. Expresión de BDNF en la concentración de 1 mg/kg. Células positivas a BDNF (verde) en el giro dentado de cortes de cerebros de ratones tratados con solución salina y 1 mg/kg de morina respectivamente. Las flechas indican células positivas a BDNF en 10 y 30 días. Imágenes tomadas en un aumento de 20x. Barra de escala: 100µm.

## Discusión

En este estudio se evaluó el efecto de la morina (2', 3, 4', 5, 7-pentahidroxi-flavona) sobre la neurogénesis en ratones adultos sanos. En estudios previos, Rivera (2015) observó una tendencia en el aumento de la proliferación celular causada por morina conforme disminuía la dosis en ratones jóvenes. Sin embargo, Rivera (2015) no observó diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos. En el presente estudio se utilizaron dosis menores obteniendo diferencias significativas entre el tratamiento con morina, sobre todo en una concentración de 0.5 mg/kg comparado con el resto de los tratamientos, esto indica que el efecto de la morina es mejor en dosis pequeñas; los datos muestran un aumento en la proliferación celular conforme la dosis de morina disminuye. En el caso de la proliferación neuronal (Ki-67 y DcX), se observa un aumento más significativo con el tratamiento de 0.5 mg/kg de morina, un día después de finalizar la administración del polifenol durante diez días y a los treinta días. En el experimento de treinta días se observan diferencias significativas en todos los tratamientos comparados con el control, lo que indica que el tiempo es un factor importante para poder observar el efecto de la morina sobre la neurogénesis.

El fenómeno observado concuerda con la literatura, los polifenoles en bajas concentraciones tienen efectos biológicos importantes (Kim *et al.* 2008, Harada *et al.* 2011). Activan algunas proteínas anti-envejecimiento (Davis *et al.* 2009), un ejemplo de esto es la quercentina que en dosis de 10 a 30 mg/kg inhibe enzimas relacionadas con la depresión (Bandaruk *et al.* 2012). También se ha observado que diversos polifenoles como la curcumina, el EGCG y la oroxilina entre otros, aumentan la proliferación celular. Por otro lado, concentraciones altas de polifenoles causan diversos daños a nivel celular, tales como el efecto mutagénico de la quercentina (Bjeldanes & Chang, 1977), e incluso degradación de DNA (Sahu & Gray, 1997); Skibola y Smith (2000) proponen que estos efectos negativos estén relacionados con daño al DNA debido a actividad pro-oxidante de estas sustancias.

Los polifenoles pueden actuar como antimutágenos o pro-mutágenos y como antioxidantes o pro-oxidantes dependiendo de las concentraciones consumidas y absorbidas, así como del estado del organismo que los ingiere. Las dosis de flavonoides que inducen citotoxicidad y mutaciones no se podrían adquirir mediante una dieta normal (Skibola & Smith, 2000), sin embargo, la incorporación de suplementos a nuestra dieta puede llevar al consumo de concentraciones que tengan estos efectos. Lo anterior representa un dato preocupante debido a que se ha promocionado mucho el consumo de polifenoles comerciales debido principalmente a su efecto como antioxidantes.

Se ha observado neurogénesis hipocampal en cerebros de varios mamíferos, las nuevas células generadas pueden tener funciones en cognición o reparación del cerebro después de algún daño (Van Praag *et al.* 2002). Las neuronas generadas en el giro dentado del hipocampo participan en funciones como memoria y aprendizaje, mientras que en la zona subventricular los precursores maduran para ser interneuronas (Gage, 2000), por estos motivos es importante identificar sustancias que puedan ser utilizadas en tratamientos para enfermedades neurológicas causadas o relacionadas con la pérdida neuronal o neurogénesis anormal que requieran de sustitución de neuronas. Van Praag y colaboradores (2002) observaron que las neuronas generadas se incorporan a los circuitos existentes, y podrían reemplazar a las que están en proceso de muerte y/o dañadas, o simplemente mejorar la plasticidad, futuros estudios pueden enfocarse a realizar pruebas conductuales (tales como laberinto de morris y reconocimiento de objetos) y/o moleculares que permitan identificar el destino de las nuevas neuronas generadas, con el fin de conocer el alcance de este proceso en cerebros adultos.

Eriksson y colaboradores (1998) realizaron experimentos con pacientes humanos, administrando BrdU (un marcador que se une al DNA en la fase S del ciclo celular y permite identificar células en proliferación) a pacientes con cáncer. Observaron que existía

proliferación neuronal en el giro dentado del hipocampo, es decir, el cerebro conserva su capacidad de generar nuevas neuronas a partir de los precursores que se conservan en cerebros humanos adultos, sin embargo, desconocían aún si estas neuronas eran funcionales y si se integraban a circuitos neuronales. Los experimentos de Eriksson y colaboradores (1998) muestran que existe neurogénesis en cerebros humanos adultos. Estos son estudios relativamente antiguos y en la actualidad muchos autores mencionan que este proceso está restringido a roedores y monos, sin embargo, otros mencionan que sí hay neurogénesis adulta en humanos aunque con diferencias al compararla con la neurogénesis adulta en roedores. En roedores sólo el 10% (aproximadamente) de neuronas se cambia por nuevas mientras que en humanos parece ser que la mayoría de las neuronas del giro dentado se intercambian (Sarubbo *et al.* 2018). Deben llevarse a cabo más estudios para poder extrapolar estos experimentos a cerebros humanos con nuevas técnicas que permitan observar si este fenómeno ocurre también en dichos cerebros.

En este trabajo se observa una mayor cantidad de células en proliferación veinte días después de concluido el tratamiento con morina, comparado con los tejidos de un día después de terminado el tratamiento. Esto sugiere que el tiempo es importante para desencadenar los mecanismos moleculares implicados en proliferación y diferenciación, además es un indicador de que el efecto del tratamiento con morina no se restringe a los primeros días después de la administración, sino que su efecto se conserva a largo plazo. Este estudio permite observar el efecto de la morina sobre la proliferación celular, particularmente neuronal, sin embargo los flavonoides son solo un tipo de polifenoles de un grupo de sustancias químicas muy variado. Los polifenoles se encuentran en conjunto en los alimentos que consumimos (Manach *et al.* 2004), esto puede implicar diferentes efectos cuando la morina se conjuga con otros polifenoles (Días *et al.* 2010). Podría estudiarse entonces en el futuro el efecto sinérgico de distintos polifenoles o polifenoles con otras sustancias de

naturaleza química distinta, como ácidos grasos. Por ejemplo, Valente y cols. (2009) sometieron a roedores a una dieta de polifenoles y ácidos grasos, observaron que esta propiciaba una mayor proliferación celular en el bulbo olfatorio y el giro dentado del hipocampo. Parte de la importancia del presente estudio radica en que se observa el efecto de la morina en un organismo vivo, ya que muchos estudios de polifenoles se realizan *in vitro* (Visioli *et al.* 2011) y es necesario conocer su efecto luego de la interacción con los diferentes tipos celulares y tejidos dentro de organismos vivos.

Por otro lado, el DMSO (dimetilsulfóxido) usado como solvente, tiene la capacidad de penetrar tejidos sin causar daño significativo. Puede aceptar puentes de hidrógeno, tiene una naturaleza polar y una estructura compacta, lo que en conjunto, le proporciona la habilidad de asociarse con proteínas, sustancias iónicas y otros constituyentes de sistemas vivos (Szmant, 2001). Es muy utilizado en investigación clínica, debido a que mejora o permite la entrada al sistema nervioso central de sustancias insolubles en agua (Penazzi, 2017). Por estas características y principalmente debido a que la morina no es soluble en agua, aunque puede atravesar la barrera hematoencefálica, que el DMSO fue utilizado como solvente en la administración del tratamiento con morina a los ratones.

Un vehículo debe ser biocompatible pero sin efectos biológicos *per se*, en el caso del DMSO hay un conflicto debido a que tiene efectos en el organismo dependientes de la dosis y la duración de los tratamientos, generalmente benéficos como como aumentar la densidad dendrítica (1% v/v) (Penazzi, 2017) y algunos autores mencionan que el dimetilsulfóxido aumenta el efecto de las sustancias disueltas en él (Kahler, 2000). Así, se pueden usar concentraciones menores de algunos medicamentos manteniendo sus efectos. Los efectos positivos del DMSO dependen de la dosis, aunque se requeriría de una dosis muy alta para generar algún daño; según los resultados obtenidos en este proyecto, no hay diferencias significativas entre los tejidos de ratones control (tratados solo con solución salina) y los

tratados con el vehículo (dimetilsulfóxido). Por lo tanto, ya que el DMSO no tiene efecto en la proliferación celular bajo las condiciones de este estudio no interfiere en el efecto del tratamiento con morina que se observó y es un buen vehículo.

Se ha encontrado que el DMSO puede producir apoptosis *in vivo* e *in vitro* en concentraciones altas (Galvao, 2013) aunque durante algún tiempo se mantuvo en controversia debido a que los autores que reportaban este efecto generalmente no reportaban la concentración de DMSO. Recientemente, se reportó que también produce apoptosis en el sistema nervioso central de ratones en desarrollo dependiendo de la dosis y la edad de los roedores, pero es relativamente seguro en dosis de hasta 50 mg por día (Hanslick *et al.* 2009), los efectos negativos del DMSO aún se encuentran en controversia (Kahler, 2000). En estudios posteriores sería importante investigar y probar otros vehículos para la morina u otras vías de administración para el tratamiento. La otra opción es buscar otras formas de administración del tratamiento, por ejemplo, la vía oral. Sin embargo, en este caso es importante tener en cuenta la interacción de la morina con otros componentes y absorción en el sistema digestivo, así como el solvente utilizado para lograr que una dosis efectiva llegue a su destino y sea realmente aprovechada por el organismo estimulando la proliferación.

La actividad de la morina sobre la neurogénesis está probada en este trabajo, existe un aumento en la proliferación, sin embargo, el mecanismo por el cual la morina produce este efecto positivo en la proliferación celular es aún desconocido. La 7, 8-dihydroxiflavona es un flavonoide con estructura química muy similar a la morina, presente en plantas como la *Godmania aesculifolia*, es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, a diferencia del BDNF, y activar los receptores TrkB hasta desencadenar la transcripción de genes pro-supervivencia, de crecimiento, que aumentan la plasticidad neuronal y la proliferación celular (Stagini *et al.* 2017). Con base en la similitud de la estructura química de la 7, 8-dihydroxiflavona y la morina (2', 3, 4', 5, 7-pentahydroxiflavona) además de su naturaleza

polifenólica podría estudiarse la capacidad de la morina para activar los receptores TrkB como la causa de su efecto proliferativo sobre las neuronas del giro dentado de cerebros de ratones adultos. En este estudio se observa una mayor expresión de BDNF en el hipocampo de los cerebros de ratones tratados con morina con la técnica de inmunofluorescencia. Al realizar la cuantificación de células positivas a BDNF hay diferencias significativas entre el tratamiento con morina a una concentración de 1 mg/kg y el resto de los tratamientos en el experimento de treinta días. En el experimento de diez días solo hay diferencias significativas entre en vehículo (DMSO) y el control (solución salina), lo cual indica que el vehículo tiene un efecto en la producción de BDNF, esto podría indicar que el aumento en BDNF en el tratamiento con morina no se debe solamente a la morina, podría ser un efecto del DMSO. Se requiere de una técnica más sensible (como western blot, que permite la identificación de proteínas) para evaluar con mayor precisión los cambios de BDNF producidos por la morina e identificar el mecanismo molecular por el cual se produce la neurogénesis.

La importancia de la neurogénesis en cerebros adultos no se restringe sólo a su participación en la plasticidad neuronal, sino que también se ve implicada en la remodelación del tejido cerebral, homeostasis y mantenimiento del cerebro (Poulose *et al.* 2017). En este estudio se observa una proliferación neuronal significativamente mayor inducida por la administración de morina durante diez días, un tratamiento con potencial para utilizarse en el control o tratamiento de enfermedades neurológicas y neurodegenerativas.

## **Conclusión**

En conclusión, la morina propicia una mayor proliferación neuronal en ratones jóvenes adultos sanos en el tratamiento de 0.5 mg/kg en el experimento de 10 y en el de 30 días, se observa una mayor proliferación en el tiempo más largo. Bajo las condiciones de este proyecto, el tratamiento más efectivo para aumentar la neurogénesis es de 0.5 mg/kg de morina administrada durante diez y observada en 30 días. Probablemente el BDNF participe en los mecanismos moleculares involucrados en la neurogénesis inducida por morina.

## **Bibliografía**

- Acevedo, C. (2014) Efectos de la estimulación de la neurogénesis hipocampal sobre el desempeño en una tarea de memoria de trabajo en ratas Wistar. *Universidad Nacional de Colombia*.
- An, L., Zhang, Y. & Yu, N. (2008) The total flavonoids extracted from Xiaobuxin-Tang up-regulate the decreased hippocampal neurogenesis and neurotrophic molecules expression in chronically stressed rats. *Progress in neuro.Psychopharmacology and biological psychiatry* 32(6): 1484-1490.
- Arias-Carrión, O., Olivares-Bañuelos, T. & Drucker-Colin, R. (2007). Neurogénesis en el cerebro adulto. *Revista de Neurología*, 44(9), 541-550.
- Arriagada, F., Correa, O., Günthe, G., Nonell, S., Mura, F., Olea, C. & Morales, J (2016) Morin flavonoid adsorbed on mesoporous silica, a novel antioxidant nanomaterial.
- Ávalos, A. & Pérez, E. (2009) Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*. 2 (3): 119-145.
- Bandaruk, Y., Mukai, R., Kawamura, T., Nemoto, H. & Terao, J. (2012) Evaluation of the inhibitory effects of quercetin-related flavonoids and tea catechins on the monoamine oxidase-A reaction in mouse brain mitochondria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60:10270-10277.
- Baptista, P. & Andrade, J. (2018) Adult hippocampal neurogenesis: Regulation and possible functional and clinical correlates. *Frontiers in Neuroanatomy*. 12(44):23 pp.
- Berg, D., Belnoue, L., Song, H. & Simon, A. (2013) Neurotransmitter-mediated control of neurogenesis in the adult vertebrate brain. *Development* 140(12): 2548-2561.
- Bjeldanes, L. & Chang, G. (1997) Mutagenic activity of quercetin and related compounds. *Science* 197(4303):223-240.

- Caselli, A., Cirri, P., Santi, A. & Paoli, P. (2016) Morin: a promising natural drug. *Current medicinal chemistry*, 23: 18.
- Davis, J., Murphy, E. & Carmichael, M. (2009) Effects of dietary flavonoid quercetin upon performance and health. *Current Sports Medicine Reports* 8:206-213.
- Dias, G., Cavegn, N., Nix, A., Stangl, D., Suarhul, M., Egidio, A., Franca, P. & Thiret, S. (2012) The Role of Dietary Polyphenols on Adult Hippocampal Neurogenesis: Molecular Mechanisms and Behavioural Effects on Depression and Anxiety. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 18pp.
- Del Río, D., Rodríguez, A., Spencer, J., Tognolini, M., Borges, G. & Crozier, A. (2013) Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. *Antioxidant and redox signaling* 18(14): 1818-1892.
- Du, X. & Hill, R. (2015) 7,8-Dihydroxyflavone as a pro-neurotrophic treatment for neurodevelopmental disorders. *Neurochemistry international* 30: 1-11.
- Eriksson, P., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A., Nordborg, C., Peterson, D. & Gage, F. (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature*. 4(11): 1313-1317.
- Gage, F. (2000) Mammalian neural stem cells. *Science* 287(80): 1433-1438.
- Galvao, J., Davis, B., Tilley, M., Normando, E., Duchon, M. & Cordeiro, M. (2013) Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *The FASEB journal* 28: 14.
- Gharras, H (2009) Polyphenols: food sources, properties and applications- a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 44: 2512-2518.

- Gottlieb, M., Leal, R., Campos, M., Sánchez, M., Alberdi, E., Arranz, A., Delgado, J., Gruart, A. & Matute, C. (2006) Neuroprotection by two polyphenols following excitotoxicity and experimental ischemia. *Neurobiology of disease* 23(2): 374-386.
- Green, A., Rowlands, R., Cooper, R. & Maddocks, S. (2012) The effect of the flavonol morin on adhesion and aggregation of *Streptococcus pyogenes*. *Microbiology letters* 333(1).
- Hagg, T. (2009) From neurotransmitters to neurotrophic factors to neurogenesis. *Neuroscientist* 15(1): 20-27.
- Hanslick, J., Lau, K., Noguchi, K., Olney, J., Zorumski, C., Mannerick, S. & Farber, N. (2009) Dimethyl sulfoxide (DMSO) produces widespread apoptosis in the developing central nervous system. *Neurobiology disease* 34(1): 1-12.
- Harada, N., Naoaki., Zhao, J., Kurihara, H., Nakagata, N. & Okajima, K. (2011). Resveratrol improves cognitive function in mice by increasing production of insulin-like growth factor-I in the hippocampus. *The journal of nutritional biochemistry* 22(12). Elsevier Inc.: 1150-59.
- Inestrosa, N. & Arenas, E. (2010) Emerging roles of Wnts in the adult nervous system. *Nature reviews, Neuroscience* 11(2):77-86.
- Jang, S., Liu, X., Yepes, M., Shepperd, K., Miller, G., Liu, Y., Wilson, W., Shiao, G., Bianchi, B., Sun, Y. & Ye, K. (2010) A selective TrkB agonist with potent neurotrophic activities by 7,8-dihydroxyflavone. *PINAS*, 107(6): 2687-2692.
- Ji, E., Ra, H., Eun, M., Piao, S., Lee, E., Jo, D., Young, H., Ha, N., Mattson, M. & Lee, J. (2011) Morin attenuates tau hyperphosphorylation by inhibiting Gsk-3 $\beta$ . *Neurobiology of disease* 44(2): 223-230.
- Kahler, C. (2000) Evaluation of the use of the dimethyl sulfoxide in chemiluminescent studies. *Blood cells, molecules and diseases* (26(6): 626-633.

- Kim, S.,Tae, G., Hee, R., Mikyung, P., Min-Sun, K., Hyung, S., Hae, Y., Mark, P. & Jaewon, L. (2008). Curcumin stimulates proliferation of embryonic neural progenitor cells and neurogenesis in the adult hippocampus. *The journal of biological chemistry* 283 (21): 14497-505.
- Kühnau, J. (1976). The flavonoids. A class of semi-essential food components: Their role in human nutrition. *World Review of Nutrition and Dietetics* 24: 117-191.
- Kumar, V. & Pandey, A. (2016) Differential responses of trans-resveratrol on proliferation of neural progenitor cells and aged rat hippocampal neurogenesis. *Scientific Reports*: 20 pp.
- Latchney, S., Hein, A., O'Banion, M., DiCicco, E. & Opanashuk, L. (2013) Deletion or activation of the aryl hydrocarbon receptor alters adult hippocampal neurogenesis and contextual fear memory. *Journal of Neurochemistry* 125 (3): 430-45.
- Lee, S., Kim, D., Lee, D. & Jeon, S. (2010) Oroxylin A, a flavonoid, stimulates adult neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus region of mice. *Neurochemical* 35: 1725-32.
- Liu, X., Obiany, O., Chan, C., Huang, J., Xue, S., Yang, J., Zeng, F., Goodman, M. & Ye, K. (2014) Biochemical and Biophysical Investigation of the Brain-derived Neurotrophic Factor Mimetic 7,8-Dihydroxyflavone in the Binding and Activation of the TrkB Receptor. *Journal of biological chemistry* 289(40):27571-27584.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C. & Jiménez, L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* 79:727– 47.
- Martínez-Flórez, S., González, J., Culebras, J. & Tuñón, M. (2002) Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición hospitalaria*. 17(6):271-278.

- Sirerol, M. & García J. (2010) Células madre y neurogenesis en el cerebro adulto. En: Matezans, R., y colaboradores. Medicina regenerativa y células madre. *Editorial CSIC - CSIC Press*. 240 pps.
- Ménard, c., Hein, P., Paquin, A, Savelson, A., Ming, X., Lederfein D. & Bernabé-Heider, F. (2002) An essential role for a MEK-C/EBP pathway during growth factor.regulated cortical neurogenesis. *Neuron* 36:597-610.
- Middleton, E., Kandaswami, C. & Theoharides, T. (2000) The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews* 52:673-751.
- Ming, G. & Song, H. (2011) Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron*. 70(4): 687-702.
- Olivares, J., Juárez, E. & García, F. (2015) El hipocampo: neurogénesis y aprendizaje. *Revista Medica de la Universidad Veracruzana*, enero-junio: 20-29 pp.
- Park, H. & Lee, J. (2011) Neurogenic contributions made by dietary regulation to hippocampal neurogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1229:23-28.
- Penazzi, L., Lorengel, J., Sündermann, F., Golovyashkina, N., Marre, S., Mathis, C., LEwejjohann, L., Brant, R. & Bakota, L. (2017) DMSO modulates CNS function in a preclinical Alzheimer's disease model. *Neuropharmacology* 113: 434-444.
- Pereira, G., Vianello, F., Corres, C., Da Silva, S. & Galhardo, M. (2014) Polyphenols in Fruits and Vegetables and Its Effect on Human Health. *Food and nutritions sciences* (5): 1065-1082.
- Porrás, A. & López, A (2009) Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos* 3-1.
- Poulose, S., Miller, M., Scott, T. & Shukitt-Hale, B. (2017) Nutritional factors affecting adult neurogenesis and cognitive function. *Advances in Nutrition* 8:804-811.

- Quiñones, M., Miguel, M. & Aliexandre, A. (2012) Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria* 27(1):76-89 ISSN 0212-1611
- Ramírez, G., Benítez, G. & Kempermann, G. (2007). Formación de neuronas nuevas en el hipocampo adulto: neurogénesis. *Salud mental* 30 (3): 12-19.
- Rivera, J., Silva, D., Rodríguez, C., Bringas, M., Flores, G., Campos, A. & Torres, M. (2014) Evaluación de la memoria espacial y de la morfología neuronal en el hipocampo de ratones sanos tratados con morina. *Archivos de Neurociencias (México)* 19(1): 16-19.
- Rivera, J. (2015) Efecto de la morina sobre la proliferación celular relacionada con neurogénesis en hipocampo de ratones adultos sanos. *TESIUNAM*. 65.
- Sahu, S. & Gray, G. (1997) Lipid peroxidation and DNA damage induced by morin and naringenin in isolated rat liver nuclei. *Food and Chemical Toxicology* 35(5): 443-447.
- Santos-Marcial, E (2008) Neurogénesis de células progenitoras de la zona subventricular. *Revista Mexicana de Neurociencia*. Mayo-Junio; 9(3): 202-205
- Sarubbo, F., Moranta, D. & Pani, G. (2018) Dietary polyphenols and neurogenesis: Molecular interactions and implication for brain ageing and cognition. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 90:456-470.
- Schramm, D., Collins, H. & German, B. (1999) Flavonoid transport by mammalian endothelial cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 10:193-197.
- Shahidi, F. & Naczk, M. (1995) Food phenolics, sources, chemistry, effects, applications. *Technomic publishing Co Inc*. 414 pp.
- Shen, L., Ji, H. & Zhang, H. (2007) How to understand the dichotomy of antioxidants. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 362:543-545.

- Shukitt-Hale, B., Bielinski, D., Lau, F., Willis, L., Carey, A. & Joseph, J. (2015) The beneficial effects of berries on cognition, motor behaviour and neuronal function un ageing. *British Journal of Nutrition* 114(10):1542-1549.
- Skibola, C. & Smith, M. (2000) Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radical Biology & medicine* 29(3):375-383.
- Spencer, J., Vazour, D. & Rendeiro, C. (2009) Flavonoids and cognition: The molecular mechanisms underlying their behavioural effects. *Archives of biochemistry and biophysics*. 492(2): 1-9.
- Stagini, F., Glacomini, A., Guidi, S., Emili, M., Uguagliati, B., Salvalai, M., Bortolotto, V., Grilli, M., Rimondibi, R. & Bartesaghi, R. (2017) A flavonoid agonist of the TrkB receptor for BDNF improves hippocampal neurogenesis and hippocampus-dependent memory in the Ts65Dn mouse model of DS. *Experimental neurology*, 298:78-96.
- Stangl, D. & Thuret, E. (2009) Impact of diet on adult hippocampal neurogenesis. *Genes and nutrition* 4: 271-282.
- Suárez, I. (2015) Papel de la neurogénesis hipocampal adulta en los procesos cognitivos que dependen del hipocampo. *Departamento de fisiología, anatomía y biología celular facultad de ciencias experimentales universidad pablo de olavide* 220 pp.
- Subash, S. & Subramanian, P. (2009) Morin a flavonoid exerts antioxidant potential in chronich hyperammonemic rats: a biochemical and histopathological study. *Molecular and celular biochemistry* 327: 153.
- Szmant, H. (2001). Physical properties of simethyl sulfoxide and its function in biological system. (En línea) Consultado el 12 de diciembre de 2018, disponible en: <https://www.dmsso.org/articles/information/szmant.html>

- Tabuchi, A. (2008) Synaptic plasticity-regulated gene expression: a key event in the long-lasting changes of neuronal function. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 31(3):327-335.
- Tarahovsky, S., Kim, Y., Yagolnik, E. & Muzafarov, E. (2014) Flavonoid-membrane interactions: Involvement of flavonoid-metal complexes in raft signaling. *Biochimica et Biophysica Acta* 1838: 1235-1246.
- Torres, M., Martínez, H., Serrano, N., López, G., Orozco, M., González, A. & López, H. (2018) Astrocytes activation induced by morin improves recognition memory in healthy mouse. Póster presentado en, CDMX, México.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *nutrients* (2): 1237-1246
- Vaidya, V., Vadodaria, K. & Jha, S. (2007) Neurotransmitter regulation of adult neurogenesis: Putative therapeutic targets. *CNS & Neurological disorders-Drug targets* 6(5): 11 pp.
- Valente, T., Hidalgo, J., Bolea, I., Ramírez, B., Angles, N., Reguant, J., Morell, J., Gutierrez, C., Boada, M. & Unzeta, M. (2009) A diet enriched in polyphenols and polyunsaturated fatty acids, LMN diet, induces neurogenesis in the subventricular zone and hippocampus of adult mouse brain. *Journal of Alzheimers Disease* 18:849-865.
- Van Praag, H., Schinder, A., Christie, B., Toni, N., Palmer, T. & Gage F. (2002) Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*. 415: 1030-1034.
- Visioli, F., Alarcón, C., Andrés-Lacueva, C., Aviram, M., Calhau, C., Cassano, A., D'Archivio, M., Faria, A., Fav, G., Fogliano, V., Llorach, R., Vitaglione, P., Zoratti, M. & Edeas, M. (2011) Polyphenols and Human Health: A Prospectus. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(6):524-546.

- Wang, Yanyan, Li, M., Xu, X., Song, M., Tao, H. & Bai, Y. (2012) . Green tea Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) promotes neural progenitor cell proliferation and sonic hedgehog pathway activation during adult hippocampal neurogenesis. *Molecular nutrition & food research* 56 (8): 1292-1303.
- Williams, C., El Mohsen, M., Vauzour, D., Rendeiro, C., Butler, L., Ellis, J., Whiteman, M. & Spencer, J. (2008) Blueberry-induced changes in spatial working memory correlate with changes in hippocampal CREB phosphorylation and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels. *Free Radical Biology & Medicine* 45(3):295-305.
- Xie, M., Long, M., Liu, Y., Qin, C. & Wang, Y. (2006) Characterization of the interaction between human serum albumin and morin. *Biochimica et biophysica acta* 1760: 1184-1191.
- Yao, L., Jiang, Y., Shi, J., Tomás, J., Datta, N., Singanusong, R. & Chen, S. (2004) Flavonoids in Food and Their Health Benefits. *Plant Foods for Human Nutrition* 59: 113–122.
- Youdim, K., Dobbie, M., Kuhnle, G., Prottogente, A., Abbott, N. & rice-Evans, C. (2003) Interaction between flavonoids and the blood-brain barrier: in vitro studies. *Journal of Neurochemistry* 85:180-192.