



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Estrategias antienviejecimiento y neurogénesis adulta

Antònia Crespí Roig

Grau de Biologia

Any acadèmic 2013-14

DNI de l'alumne: 43209226T

Treball tutelat per Antoni Miralles Socias
Departament de Biologia

S'autoritza la Universitat a incloure el meu treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Paraules clau del treball:

Neurogènesi adulta, envelliment cerebral, melatonina, vitamina E, resveratrol.

Índice

1.-Resumen.....	4
2.-Introducción.....	4
3.-Metodología.....	5
4.-Neurogénesis en el cerebro adulto.....	7
4.1.-Etapas de la neurogénesis.....	8
4.2.-Zonas implicadas en la neurogénesis.....	8
4.2.1.-Neurogénesis en la zona subventricular del ventrículo lateral.....	9
4.2.2.-Neurogénesis en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo.....	9
4.3.-Componentes celulares que intervienen en la neurogénesis.....	10
4.4.-Relación de la neurogénesis con el aprendizaje y el envejecimiento.....	10
5.-Técnicas utilizadas para el estudio de la neurogénesis.....	11
6.-Estrategias anti envejecimiento cerebral y neurogénesis.....	13
6.1.-Melatonina.....	13
6.1.1.-Niveles de melatonina.....	14
6.1.2.-Propiedades neuroprotectoras de la melatonina.....	14
6.1.3.-Efectos de la melatonina sobre la neurogénesis.....	14
6.1.3.1.-Modelos de estudio.....	14
6.1.3.2.-Vías de administración de melatonina.....	15
6.1.3.3.-Efecto de la melatonina sobre la densidad de neuronas granules en el hipocampo.....	15
6.1.3.4.-Efecto de la melatonina sobre la proliferación en el giro dentado del hipocampo.....	16
6.1.3.5.-Efectos de la melatonina sobre la neurodiferenciación.....	17
6.1.3.6.-Efecto de la melatonina sobre diferentes pautas comportamentales.....	19
6.2.-Vitamina E.....	21
6.2.1.-Propiedades neuroprotectoras de la vitamina E.....	21
6.2.2.-Efectos de la vitamina E sobre la neurogénesis.....	21
6.2.2.1.-Modelos de estudio.....	21
6.2.2.2.-Vías de administración de vitamina E.....	22
6.2.2.3.-Efecto de la vitamina E sobre la densidad de neuronas granulares del hipocampo.....	22
6.2.2.4.-Efecto de la vitamina E sobre la proliferación en el giro dentado del hipocampo.....	22
6.2.2.5.-Efectos de la vitamina E sobre la neurodegeneración.....	24
6.2.2.6.-Efectos de la vitamina E sobre diferentes pautas comportamentales.....	24
6.3.-Resveratrol.....	26
6.3.1.-Propiedades neuroprotectoras del resveratrol.....	26
6.3.2.-Efectos del resveratrol sobre la neurogénesis.....	26
6.3.2.1.-Modelos de estudio.....	26
6.3.2.2.-Vías de administración de resveratrol.....	26
6.3.2.3.-Efectos del resveratrol sobre la proliferación en el giro dentado del hipocampo.....	27
6.3.2.4.-Efectos del resveratrol sobre la neurodiferenciación.....	28
6.3.2.5.-Efectos del resveratrol sobre la neurodegeneración.....	28
6.3.2.6.-Efectos del resveratrol sobre diferentes pautas comportamentales.....	29
7.-Conclusiones.....	29
8.-Bibliografía.....	30

1.-Resumen

El envejecimiento es un proceso natural que lleva asociado el declive de numerosas funciones fisiológicas. El envejecimiento cerebral se observa por una disminución en las capacidades cognitivas y motoras. Para corregir los efectos del envejecimiento cerebral se han desarrollado toda una serie de estrategias que pretenden retrasar o revertir los déficits neuronales relacionados con la edad. Este trabajo se ha centrado en tres estrategias que han demostrado sus efectos beneficiosos sobre las capacidades cognitivas en animales viejos: tratamientos con melatonina, vitamina E y resveratrol. Por otra parte, la neurogénesis es un proceso que se mantiene activo en el hipocampo (región cerebral relacionada con la memoria y el aprendizaje) en los adultos, pero que también decae con la edad. El objetivo de este trabajo es averiguar si los efectos beneficiosos de estos tratamientos sobre el envejecimiento se deben, en parte, a la modificación de los procesos de neurogénesis. Para ello, se ha realizado una revisión, en la que se han examinado todos los artículos publicados en la base de datos MEDLINE relacionados con estos conceptos y el de neurogénesis adulta. Los resultados considerados en este trabajo proporcionan fundamentos para concluir que las tres estrategias anti-envejecimiento estudiadas pueden modificar ciertos parámetros relacionados con la neurogénesis. La administración de melatonina tiene importantes efectos positivos ya que favorece la proliferación, maduración y diferenciación neuronal, además de mejorar las capacidades cognitivas de animales de edad avanzada o que padecen determinadas neuropatologías, sin afectar a individuos jóvenes. La vitamina E y el resveratrol tienen importantes efectos anti-envejecimiento, debido a sus capacidades neuroprotectoras y a que favorecen las capacidades cognitivas de los animales envejecidos tratados.

2.-Introducción

El presente trabajo, de estrategias anti-envejecimiento y neurogénesis adulta, se ha realizado con el fin de averiguar la posible implicación de la neurogénesis como uno de los mecanismos subyacentes en las diversas estrategias que han demostrado poseer cierta capacidad para actuar retrasando el envejecimiento cerebral. Para ello, será necesario conocer los mecanismos fisiológicos implicados en la neurogénesis adulta, así como las zonas que participan en el proceso, las etapas en que se divide, los componentes celulares que intervienen y los mecanismos de regulación comprometidos.

Muchas de las estrategias dirigidas a la prevención y retraso del envejecimiento cerebral han demostrado su eficacia en los tests cognitivos realizados a animales envejecidos. Por esta razón surge el interés del estudio de la posible relación de la neurogénesis con este proceso en el cual se incrementan las capacidades de aprendizaje y memoria.

En el cerebro el proceso de envejecimiento se produce de forma paralela a los tejidos periféricos. Los déficits neuronales relacionados con la edad se manifiestan a través de una disminución de las capacidades cognitivas, como el aprendizaje y la memoria, dependientes de la actividad hipocámpal, y que además predisponen para el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas.

En animales de experimentación se ha demostrado que la disminución cognitiva y motora observada durante el envejecimiento puede prevenirse mediante tratamientos de restitución hormonal con hormona del crecimiento y melatonina (Esteban *et al.*, 2010,a,b) o con tratamientos con antioxidantes como el resveratrol y la vitamina E (Esteban *et al.*, 2013; Ramis *et al.*, 2012).

El hipocampo, y especialmente su giro dentado, son regiones cerebrales en las cuales se conserva la capacidad neurogénica durante la vida adulta. Esta capacidad disminuye con la edad al igual que lo hacen las capacidades cognitivas. En consecuencia, el interés de este trabajo consiste en averiguar, en base a lo publicado hasta ahora, si los efectos beneficiosos de los tratamientos que retrasan el envejecimiento cerebral son debidos en parte a la modificación de las condiciones de neurogénesis.

3.-Metodología.

El trabajo consiste en una búsqueda bibliográfica de artículos científicos relacionados con la neurogénesis adulta. Para la realización de la búsqueda se ha utilizado el motor de búsqueda PubMed que proporciona libre acceso a la base de datos MEDLINE, una base de datos bibliográficos que recopila las citaciones y resúmenes de más de 20 millones de artículos de investigación biomédica y ciencias de la vida de más de 5.400 títulos de revistas científicas de todo el mundo indexadas desde 1947. Este motor de búsqueda lo ofrece de forma gratuita la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos (United States National Library of Medicine) que forma parte del Instituto Nacional de la Salud (NIH, National Institutes of Health).

Los conceptos clave utilizados para la búsqueda han sido “melatonin”, “vitamin E” y “resveratrol”, juntamente con la idea principal del trabajo, la neurogénesis.

De los artículos resultantes, se han seleccionado exclusivamente aquellos que explican la neurogénesis adulta, prescindiendo de todos aquellos que hablan de la neurogénesis embrionaria. Esto se debe a que, como vemos en la figura 1, la mayor parte de los artículos de neurogénesis publicados no se corresponden con neurogénesis adulta, sino que solamente hacen referencia a la neurogénesis embrionaria. Así, desde el año 1947 se han publicado 16.543 artículos de neurogénesis en esta base de datos, de los que solamente 6.417 hablan de neurogénesis adulta. Este hecho es comprensible si tenemos en cuenta que la neurogénesis adulta es un tema mucho más reciente, que como se puede observar en la figura, empezó a desarrollarse en la década de los 80.

Artículos de neurogénesis y neurogénesis adulta publicados

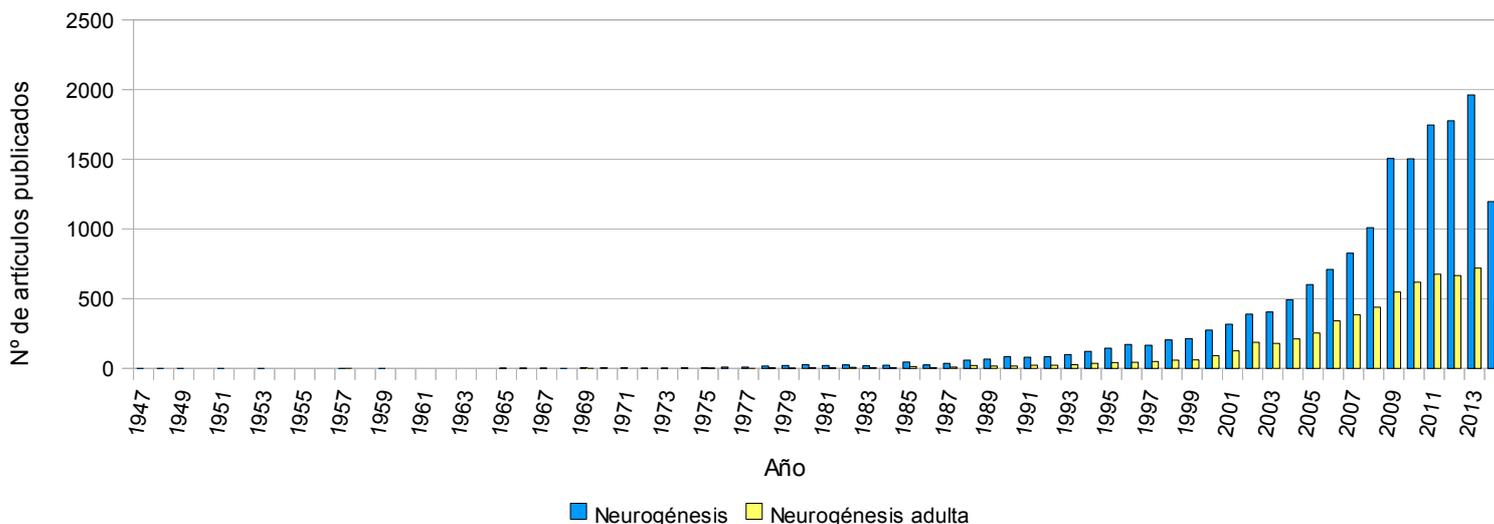


Figura 1.-Número de artículos de neurogénesis y neurogénesis adulta publicados en diversidad de revistas científicas a lo largo de los años, recogidas en la base de datos Pubmed.

Este hecho sucede igual con todas las palabras clave consultadas. Así, por ejemplo, se han encontrado 59 artículos de neurogénesis relacionados con la melatonina, de los que solamente 26 hablan de la neurogénesis en adultos (figura 2A). Por tanto, los 33 artículos restantes explican la neurogénesis que se da durante las etapas del desarrollo embrionario. Esto se debe a que el estudio de la relación entre la melatonina y la neurogénesis adulta es algo más reciente que el de la relación existente entre la melatonina y la neurogénesis embrionaria y, por tanto, hay menos trabajos al respecto.

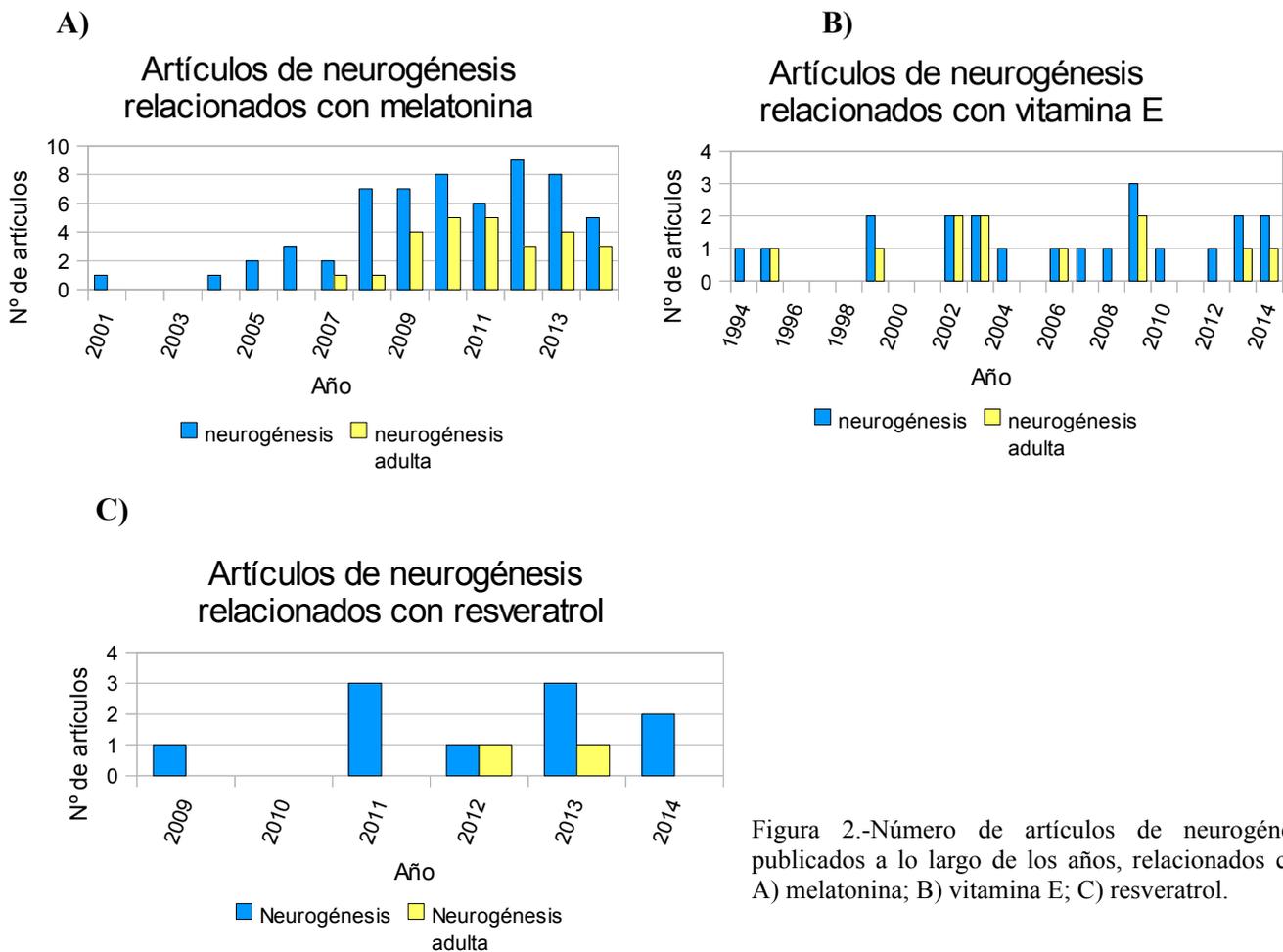


Figura 2.-Número de artículos de neurogénesis publicados a lo largo de los años, relacionados con: A) melatonina; B) vitamina E; C) resveratrol.

En el caso de artículos de neurogénesis relacionados con vitamina E (figura 2B), se han encontrado un total de 21 artículos, de los que solo 11 explican la neurogénesis adulta, a pesar de que ambos temas (neurogénesis embrionaria y neurogénesis adulta) relacionados con vitamina E, empezaron a estudiarse en la misma época, en el año 1994 y 1995 respectivamente.

Al realizar la búsqueda de artículos de neurogénesis relacionados con resveratrol, ocurre algo bastante similar a lo que sucede cuando realizamos la búsqueda usando la palabra melatonina como concepto clave. También hay más artículos de neurogénesis en general, que de neurogénesis adulta, debido a que la relación de la neurogénesis adulta y de este concepto clave empezó a estudiarse hace muy pocos años atrás. Así, al usar como palabras clave los conceptos resveratrol y neurogénesis, se han encontrado un total de 10 artículos, de los que solamente 2 explican la neurogénesis adulta (Figura 2C).

Por otra parte, además de no tener en cuenta los artículos que explican la neurogénesis embrionaria, se han descartado aquellos artículos que combinan dos estrategias para incrementar la neurogénesis, alguna de las nombradas y otra, como pudiera ser el ejercicio. De esta manera nos hemos asegurado de que los efectos observados en el estudio se deben única y exclusivamente a la estrategia en cuestión (por ejemplo a la administración de melatonina) y no a la interacción de ésta con otros factores ambientales, como el ejercicio.

Así, se ha prescindido de gran parte de los artículos encontrados y únicamente se han estudiado en detalle los que cumplen las condiciones anteriores: explicar el efecto de alguno de los

conceptos estudiados (melatonina, vitamina E y resveratrol) sobre la neurogénesis adulta sin combinarse con ninguna otra estrategia.

Tabla 1.- Artículos obtenidos y artículos consultados para la realización del trabajo.

Palabras clave	Artículos obtenidos	Artículos utilizados
Melatonina /neurogénesis	59	7
Vitamina E/neurogénesis	21	5
Resveratrol/neurogénesis	10	5

Como se observa en la tabla 1 el número resultante de artículos obtenidos y artículos utilizados para cada uno de los conceptos clave estudiados (melatonina, vitamina E y resveratrol) es muy distinto. Por ejemplo, al realizar la búsqueda utilizando melatonina y neurogénesis como palabras clave, de los 59 artículos obtenidos solamente se han estudiado en detalle 7, debido a que 33 de los 52 artículos restantes explican la neurogénesis en general (no solamente la neurogénesis adulta) y a que el resto explican el efecto de la melatonina combinado con otras estrategias.

En el caso de la vitamina E, se han obtenido 21 artículos de los que solamente se han utilizado 5, por los mismos motivos que en el caso anterior. Por último, del resveratrol se han obtenido 10 artículos, de los que solo se han consultado la mitad.

Además, se ha realizado una búsqueda bibliográfica utilizando como palabra clave solamente el concepto de neurogénesis adulta, con la finalidad de aprender los mecanismos fisiológicos implicados en la neurogénesis adulta, además de las zonas involucradas en el proceso, las etapas en que se divide, los componentes celulares implicados y los mecanismos de regulación que intervienen en el proceso.

Paralelamente, se han buscado artículos de otras fuentes, como google scholar, para comparar y contrastar la información obtenida. También se han consultado varios artículos relevantes citados en los artículos previamente seleccionados.

4.-Neurogénesis en el cerebro adulto

La neurogénesis es un proceso complejo de formación de células funcionales del sistema nervioso central (SNC). Es decir consiste en la producción de neuronas y células gliales a partir de precursores.

Tradicionalmente se pensaba que este fenómeno solamente ocurría en los estados embrionarios y perinatales y que, por tanto, el cerebro era una estructura estática en la que sólo se producían neuronas durante la etapa del desarrollo. Sin embargo, en la década de los 60 el científico y biólogo estadounidense Joseph Altman, con el uso de timidina tritiada (timidina-3H) para marcar células en división, demostró la existencia de neurogénesis en algunas regiones del cerebro postnatal y adulto de la rata (Altman *et al.*, 1965). No obstante, estas observaciones fueron negadas por la comunidad científica hasta la década de los noventa, en la que varias investigaciones reforzaron estos estudios. Propulsado por un interés general y con la ayuda de los avances metodológicos, en la última década se ha avanzado mucho en el estudio de casi todos los aspectos relacionados con la neurogénesis adulta en el SNC (revisado recientemente en los trabajos de Ming y Song, 2011).

Por una parte, se ha demostrado la presencia de neurogénesis en casi todos los mamíferos examinados, incluyendo los seres humanos. Por otra parte, se ha estimado que se forman miles de neuronas cada día, aunque el número es variable en función de diversos factores que pueden influir positiva o negativamente en el proceso. Así, hoy en día se sabe que el cerebro de los mamíferos es un órgano plástico y dinámico, donde se están formando continuamente nuevas neuronas.

4.1.-Etapas de la neurogénesis

Las revisiones actuales (Ramírez *et al.*, 2007; Duan *et al.*, 2008) afirman que la neurogénesis adulta se divide en varias etapas secuenciales: la proliferación de los precursores neuronales para formar células funcionales del sistema nervioso central, la migración de las nuevas células formadas a través de la glía radial hasta su ubicación definitiva, la diferenciación celular (donde se da la adquisición de las características fisiológicas y morfológicas de las neuronas maduras) y la integración sináptica, donde las nuevas neuronas extienden sus conexiones axonales y se convierten en funcionales, integrándose en el circuito neuronal existente.

En general, las etapas de migración, diferenciación y integración sináptica son bastante conocidas. Sin embargo, el proceso de proliferación neuronal aún no se tiene del todo claro debido a las limitaciones técnicas. Por tanto, hay mucha controversia acerca de si los precursores neuronales producen un número significativo de neuronas en condiciones fisiológicas normales (Breunig *et al.*, 2007).

Por una parte, se sabe que el cerebro adulto posee células madre neuronales multipotentes que tienen la capacidad de autorrenovarse y de generar otros tipos celulares especializados a través de la diferenciación. No obstante, estas células madre neuronales no se han estudiado en detalle debido a que los métodos clásicos utilizados, como BrdU, requieren división celular y, por tanto, no son eficaces para el estudio de este tipo de células que se encuentran principalmente en reposo (Doetsch *et al.*, 1999; Seri *et al.*, 2001).

Por otra parte se desconoce la variedad de precursores neuronales. Algunos estudios muestran heterogeneidad entre los precursores neuronales presentes incluso en el mismo nicho neurogénico. Además, todavía no se conoce si los precursores neuronales de los tejidos involucrados en la neurogénesis adulta (zona subgranular del giro dentado del hipocampo y zona subventricular próxima a los ventrículos laterales) son iguales, a pesar del hecho de que producen neuronas distintas.

Por último también se discute sobre si los precursores neuronales adultos tienen el mismo origen que los responsables de la neurogénesis en los estados embrionarios.

4.2.-Zonas implicadas en la neurogénesis

Como se muestra en la figura 3, se ha visto que la neurogénesis adulta activa está restringida a dos áreas específicas del cerebro, la zona subgranular y la zona subventricular. En la zona subgranular, presente en el giro dentado (DG) del hipocampo (HP) se generan nuevas células granulares dentadas; mientras que en la zona subventricular propia de los ventrículos laterales (LV), se sintetizan nuevas neuronas que migran a través de la corriente migratoria rostral (RMS) hasta el bulbo olfatorio (OB) para convertirse en interneuronas (Ming y Song, 2011).

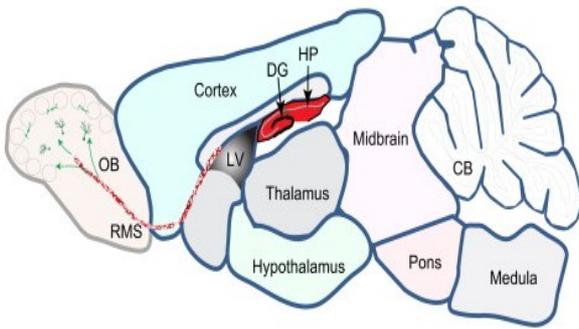


Figura 3.-Vista de la sección sagital de un cerebro de roedor adulto destacando las dos regiones restringidas que exhiben neurogénesis adulta activa: el giro dentado (DG) en la formación del hipocampo (HP) y el ventrículo lateral (LV), comunicado a través de la corriente migratoria rostral (RMS) con el bulbo olfatorio (OB). Tomado de: Ming, G.L. y Song, H., 2011. Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. Neuron 70, 687-702.

4.2.1.-Neurogénesis en la zona subventricular del ventrículo lateral

Como se observa en la figura 4, en la zona subventricular adulta las células gliales radiales proliferan y dan lugar a células de amplificación transitoria, que a su vez generan neuroblastos. En la corriente migratoria rostral (RMS), los neuroblastos forman una cadena y migran hacia el bulbo olfatorio a través de un tubo formado por astrocitos (Lois *et al.*, 1996). Una vez que alcanzan el núcleo del bulbo olfatorio, las neuronas inmaduras se desprenden de la corriente migratoria rostral y migran radialmente hacia glomérulos donde se diferencian en distintos subtipos de interneuronas (Lledo *et al.*, 2006). La mayoría de las neuronas resultantes son neuronas granulares (GC), aunque también hay una pequeña minoría de neuronas periglomerulares (PG).

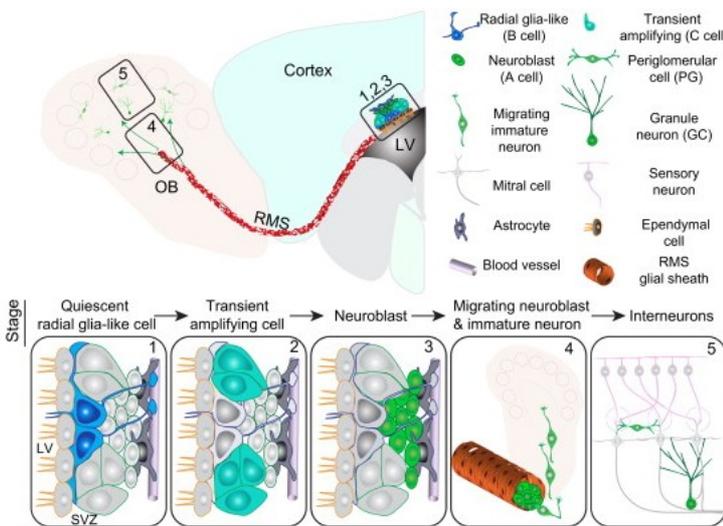


Figura 4.-Neurogénesis adulta en la zona subventricular del ventrículo lateral y el bulbo olfatorio. Resumen de las cinco etapas de desarrollo que tienen lugar durante la neurogénesis adulta en la zona subventricular (SVZ): (1) activación de las células de la glía radial en la zona subventricular de los ventrículos laterales (LV); (2) proliferación de las células de amplificación transitorias; (3) generación de neuroblastos; (4) migración de neuroblastos a través de la corriente migratoria rostral (RMS) y migración radial de neuronas inmaduras en el bulbo olfatorio (OB); y (5) integración sináptica y maduración de células granulares (GC) y neuronas periglomerulares (PG) en el bulbo olfatorio. Tomado de: Ming, G.L. y Song, H., 2011. Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. Neuron 70, 687-702.

4.2.2.-Neurogénesis en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo

Como muestra la figura 5, en la zona subgranular adulta del giro dentado del hipocampo la proliferación de precursores radiales y no radiales da lugar a progenitores intermedios, que a su vez generan neuroblastos. Las neuronas inmaduras migran a la capa de células granulares interior y se diferencian en células granulares dentadas en el hipocampo. Poco tiempo después, las neuronas recién nacidas extienden sus dendritas hacia la capa molecular y los axones se proyectan a través del hilio hacia la CA3 (Zhao *et al.*, 2006).

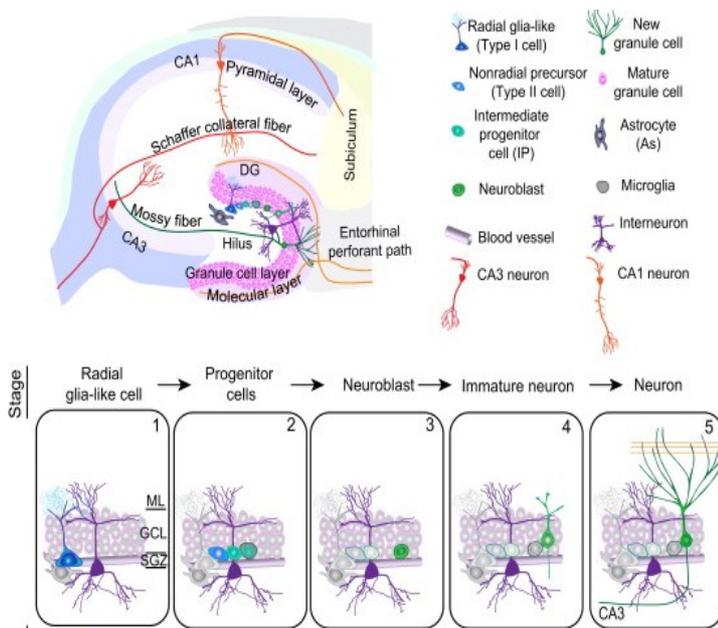


Figura 5.-Neurogénesis adulta en el giro dentado del hipocampo. Resumen de las cinco etapas de desarrollo que tienen lugar durante la neurogénesis en el hipocampo adulto: (1) activación de la células de la glía radial como en la zona subgranular (SGZ); (2) proliferación de precursor no radiales y progenitores intermedios; (3) generación de neuroblastos; (4) integración de las neuronas inmaduras; y (5) maduración de las células granulares dentadas adultas recién nacidas. Tomado de: Ming, G.L. y Song, H., 2011. Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. *Neuron* 70, 687-702.

4.3.-Componentes celulares que intervienen en la neurogénesis

Según Ming y Song (2011) los principales componentes celulares presentes en los dos nichos donde se realiza la neurogénesis adulta (zona subventricular y zona subgranular) son: células endoteliales, astrócitos, células vasculares, microglía, neuronas maduras y precursores neuronales.

Las células endoteliales, los astrócitos y las células vasculares realizan funciones importantes para algunas de las etapas de la neurogénesis como son la proliferación de precursores neuronales y la migración de las nuevas células formadas.

Las células endoteliales, que solamente se encuentran en la zona subventricular adulta, recubriendo la pared ventricular, también ejercen un efecto protector sobre el nicho neurogénico. Además regulan activamente la especificación del destino neuronal de los precursores neuronales adultos mediante la liberación de Noggin. Asimismo, sus cilios establecen gradientes de concentración para la migración directa de los neuroblastos.

Los astrócitos además de promover la proliferación y el destino neuronal de las células madre neurales multipotentes, favorecen la supervivencia, la maduración y la formación de sinapsis entre neuronas.

Por último, las células vasculares proporcionan el sustrato necesario para que se de la migración de las neuronas, además de regular la disponibilidad de citoquinas y de factores de crecimiento que intervienen en el proceso de neurogénesis.

4.4.-Relación de la neurogénesis con el aprendizaje y el envejecimiento

Numerosos estudios han demostrado que la neurogénesis del hipocampo adulto es importante para el normal aprendizaje y para el desarrollo de la memoria espacial, por lo que animales que muestran deterioros en las neuronas recién nacidas presentan una capacidad de memoria y aprendizaje reducida (Imayoshi *et al.*, 2008).

Se considera que las nuevas neuronas formadas en el hipocampo adulto (por neurogénesis) contribuyen a la formación de los nuevos recuerdos y a mantener la estabilidad de los viejos, mediante su conexión con la de neuronas ya existentes. Del mismo modo, la mayoría de los tratamientos que perjudican la neurogénesis del hipocampo adulto también alteran la cognición espacial (Deng *et al.*, 2009). De hecho, existe una correlación significativa entre el rendimiento en el laberinto de agua de Morris (MWM) y el número de células recién generadas derivadas de la neurogénesis adulta (Velazquez *et al.*, 2013).

Respecto al envejecimiento, hay una relación entre éste y las tasa de neurogénesis y neurodegeneración. Por una parte, con el envejecimiento se da la pérdida progresiva de la función del sistema nervioso, de neuronas y de células madre neuronales, lo que conlleva a una reducción de la neurogénesis. Esto se cree que puede ser debido a varios factores, tales como el aumento del estado de reposo, la disfunción de la telomerasa, fallos de sistemas de reparación del ADN, aumento de la apoptosis, etc.

Por otra parte, con el envejecimiento se incrementa la tasa de neurodegeneración, lo que se debe principalmente al mayor número de radicales libres presentes y al aumento del estrés oxidativo. La reducción del número de enzimas antioxidantes, la alteración de mTOR, la disfunción mitocondrial, el mal plegamiento y la agregación de proteínas favorecen la neurodegeneración.

Así, el descenso de neurogénesis y el incremento de neurodegeneración pueden considerarse las principales causas del deterioro cognitivo y de memoria que se da en ancianos, y que suele ir acompañados de deterioro de la agudeza visual, déficits motores, deficiencias de equilibrio y caídas.

5.-Técnicas utilizadas para el estudio de la neurogénesis

En todos los artículos estudiados en detalle se han utilizado roedores como animales de experimentación. No obstante, en algunos artículos consultados que aparecen citados en los artículos seleccionados se han utilizado otro tipo de organismos, como determinados ejemplares de *Drosophila*, de monos e incluso de la especie humana.

Las técnicas utilizadas para el análisis de la neurogénesis dependen del tipo de estrategia que se quiere examinar (melatonina, vitamina E y resveratrol) y del tipo de estudio en particular.

Las vías de administración, por ejemplo, varían en función de la sustancia. Así, la vitamina E y el resveratrol se administran oralmente, a través de la dieta; mientras que la melatonina, a pesar de poder ser subministrada oralmente, se suele inyectar. No obstante, el método de administración de la sustancia depende del artículo concreto que consideremos.

En la mayoría de los casos se estudian ejemplares sanos y ejemplares que poseen alguna anomalía neurológica y que, por tanto, poseen déficits neuronales. Esto permite comparar en que caso los efectos de las estrategias que queremos estudiar son más relevantes. Ambos se estudian en condiciones normales (control) y con la aplicación de la estrategia a estudiar (melatonina, vitamina E y resveratrol).

A pesar de que existen numerosas técnicas que permiten estudiar la existencia de neurogénesis, el **ensayo con BrdU** es el método más usado. Esta técnica se basa en el marcaje de células proliferantes, es decir, en el marcaje de células que se encuentran en la fase S de la división celular, también conocida como la fase de síntesis de la replicación.

Para ello se utiliza la bromodesoxiuridina (BrdU o 5-bromo-2-desoxiuridina), que es un nucleótido sintético análogo a la timidina, que al tener una estructura muy similar a ésta permite una sustitución casi total (entre el 99.8 y el 100%) de los nucleótidos de timidina en las células en fase de síntesis.

El proceso de determinación del número de células de una muestra que se hallan en la fase de síntesis del ciclo celular se divide en dos etapas: la incorporación de BrdU y la detección de células marcadas con BrdU.

El primer paso es la incorporación de BrdU, que en el caso de ratones se recomienda que se de a través de inyecciones intraperitoneales. La BrdU se incorpora al ADN de nueva síntesis de las células presentes en la fase S del ciclo celular, lo que puede ser útil para estimar la cantidad de células que se encuentran en esta fase y, por tanto, para identificar las células que están en división.

Al inyectar BrdU al torrente sanguíneo de los animales de experimentación, éste se convierte en disponible para todas las células y las células van sintetizando su nueva cadena de ADN usando el BrdU presente en el entorno. Así, dado que la timidina y el BrdU son análogos, en algunos puntos del ADN que requieren timidina se incorpora BrdU.

El segundo paso consiste en la detección de moléculas que han sido marcadas con BrdU. Para ello se pueden utilizar anticuerpos anti-BrdU etiquetados fluorescentemente o ligados a enzimas, aunque existen otras posibilidades. Así, se puede deducir que las células BrdU positivas han sufrido proliferación después del momento de la inyección de la sustancia y que, por tanto, se ha dado neurogénesis.

Otras técnicas utilizadas en los artículos consultados y que son necesarias para su comprensión se presentan en la tabla 2.

Tabla 2.-Técnicas utilizadas en los artículos consultados.

TÉCNICA	OBJETIVO
Ensayo con BrdU (bromodesoxiuridina)	El BrdU es un nucleótido sintético análogo a la timidina que permite determinar el número de células de una muestra que se encuentran en la fase de síntesis y, por tanto, ver si hay neurogénesis.
Tinción de Nissl	Método que utiliza colorantes acidófilos (azul de metileno, violeta de cresilo, tionina, hematoxilina, azul de toluidina, etc) que se unen al ARN contenido en los ribosomas, tiñiendo el núcleo, el nucléolo y los ribosomas del retículo endoplasmático. Permite teñir neuronas y células gliales y se utiliza para calcular la densidad total de neuronas.
Cuantificación de células marcadas con 4'6-diamino-2-fenilindol (DAPI)	DAPI es un marcador fluorescente nuclear que se une a determinadas regiones del ADN y permite cuantificar células.
Cuantificación de la proteína ki67	Ki67 es una proteína nuclear cuya producción aumenta cuando las células se preparan para dividirse y formar nuevas células. La presencia de esta proteína (células ki67 +) es útil para evaluar la división activa de las células. Ausente en las células Go, se usa como marcador de proliferación celular.
Cuantificación de Neurotrofina 3 (NT-3)	NT-3 es una proteína que actúa favoreciendo la supervivencia y la diferenciación de las neuronas existentes, y potenciando el crecimiento, la diferenciación y la sinapsis de nuevas neuronas. Se utiliza para identificar la presencia de neurogénesis, ya que existe una relación directa entre NT-3 y neurogénesis.
Marcaje con doblecortina (DCX)	La doblecortina es una proteína asociada a microtúbulos que se expresa específicamente en la migración y diferenciación de las neuronas y que es útil para estudiar la

	neurodiferenciación.
Marcaje con calretinina	La calretinina es una proteína de unión al calcio que se expresa durante el contacto dendrítico y axonal de las neuronas, una vez que ya han migrado hacia sus localizaciones definitivas. Permite evaluar las neuronas que se han diferenciado. Se trata de un marcador específico de neuronas no piramidales gabaérgicas.
Cuantificación de Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF)	El BDNF se trata de una proteína asociada con la neuroplasticidad. Fomenta el crecimiento, la migración y la sinapsis de las nuevas neuronas generadas. Se utiliza para identificar la presencia de neurogénesis, ya que existe una relación directa entre BDNF y neurogénesis.
Cuantificación del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF)	El VEGF es una proteína implicada en la angiogénesis que estimula la migración de neuronas. Existe una relación directa entre la cantidad de VEGF y la cantidad de neuronas recién generadas que migran hacia sus localizaciones definitivas. Por lo tanto, la cantidad de VEGF se correlaciona con la neurogénesis.
Ensayo TUNEL	Se utiliza para evaluar apoptosis o muerte celular programada y, por tanto, se correlaciona de manera directa con la neurodegeneración.
Evaluación de sirtuina-1 desacetilasa dependiente de NAD (SIRT1)	La SIRT 1 es una enzima desacetilasa que contribuye a la desacetilación celular, pudiendo activar o desactivar otras enzimas. En este caso, se ha evaluado su expresión para ver como afecta a otras proteínas, como la p53, que participan en la regulación de la supervivencia de las neuronas recién generadas.
Evaluación de p53	P53 es una proteína que regula la apoptosis celular. Puede encontrarse en su configuración normal o desacetilada, donde pierde su función. Así, la presencia de p53 con su configuración normal (sin desacetilar) se relaciona con una mayor neurodegeneración.

Además de estas técnicas que estudian determinados parámetros bioquímicos, en los artículos consultados se describen varios tests comportamentales para examinar los reflejos motores y sensoriales, la capacidades locomotoras, de exploración y de aprendizaje y la actividad física de los individuos estudiados. Entre los exámenes realizados están: la prueba de la sonda, el test del reflejo de enderezamiento, el test de geotaxis negativa, el test de suspensión de la cuerda, el test de campo abierto, el laberindo de Morris, el laberinto radial de ocho brazos y la rueda giratoria.

6.-Estrategias antienvjecimiento cerebral y neurogénesis

El resultado de la búsqueda ha revelado que algunas de las estrategias que previenen el envejecimiento cerebral afectan la neurogénesis en los animales viejos e incrementan la supervivencia de las nuevas neuronas, lo que probablemente contribuye a la mejora de los procesos de aprendizaje y memoria. Sin embargo, los mecanismos moleculares y fisiológicos implicados en esta mejora cognitiva todavía no se han comprendido por completo.

Este trabajo se ha centrado únicamente en las siguientes estrategias antienvjecimiento cerebral: tratamientos con melatonina, vitamina E o resveratrol en animales viejos. Hasta ahora, los artículos que abordan la neurogénesis como uno de los mecanismos responsables de la eficacia de estas estrategias son escasos. Además se observa una gran diferencia en el número de artículos dependiendo de la estrategia. Así, son mucho más abundantes los artículos sobre melatonina y neurogénesis que resveratrol y neurogénesis.

6.1.-Melatonina

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) es una neurohormona que producen tanto

vertebrados como invertebrados principalmente en la glándula pineal y que está implicada en una gran variedad de funciones biológicas, como funciones del sueño, visuales, cerebrovasculares, reproductivas, neuroendocrinas y neuroinmunológicas.

6.1.1.-Niveles de melatonina

Los niveles de melatonina sufren cambios diarios y a lo largo de la vida. Por una parte, la producción de melatonina sigue un ritmo circadiano, por lo que varía a lo largo del día en sincronía con el período de oscuridad o de noche subjetiva; habiendo un alto nivel de producción durante la noche (Sarlak *et al.*, 2013; Zawilska *et al.*, 2009).

Por otra parte, los niveles de melatonina se modifican a lo largo de la vida de los individuos. En el período fetal, el feto utiliza la melatonina materna que cruza la placenta (Sarlak *et al.*, 2013). A partir del nacimiento los niveles de melatonina aumentan, hasta llegar a un pico en la pubertad, (Payne *et al.*, 2006) luego disminuye en los individuos de mediana edad y de edad avanzada.

Así, el nivel de melatonina eficaz se ve alterado con la edad. Esto es debido a la degradación de determinados enzimas (como el enzima arilalquilamina N-acetiltransferasa) y/o de determinados receptores diana (MT1 y MT2) que participan en la síntesis de melatonina, tanto en la glándula pineal como en la mayoría de tejidos extrapineales (hígado, bazo, riñones, etc). Como resultado, es muy común que las personas mayores presenten alteraciones del sueño, cambios hormonales y una menor capacidad cognitiva (Sarlak *et al.*, 2013).

6.1.2.-Propiedades neuroprotectoras de la melatonina

La melatonina tiene capacidades neuroprotectoras que se asocian, por una parte, a sus propiedades antioxidantes y de barrido de radicales libres. Se sabe que la melatonina y dos de sus metabolitos principales (AFMK y AMK) ejercen un papel antioxidante muy importante, ya que reaccionan con HO• y actúan como captadores de radicales libre. Además la melatonina se puede oxidar a AFMK y reciclar NADH, que tiene un papel clave en el metabolismo y el sistema de defensa antioxidante (Tan *et al.*, 2005). Por lo tanto, la melatonina es un eliminador de radicales libres y, por tanto, protege contra la neurodegeneración.

Por otra parte, la melatonina regula determinados procesos de autofagia y mitofagia, que se sabe que son muy importantes para el mantenimiento de la homeostasis celular, es decir para el mantenimiento de un número estable de neuronas (Sarlak *et al.*, 2013).

Por último, se sabe que la melatonina tiene efectos antiinflamatorios. De este modo, al disminuir la expresión de una variedad de genes proinflamatorios (tales como la COX-2, iNOS, y diversas citoquinas), puede reducir la neurodegeneración debida a inflamación (Sarlak *et al.*, 2013).

6.1.3.- Efectos que ejerce la melatonina sobre la neurogénesis

6.1.2.1- Modelos de estudio

En los artículos revisados el efecto de la melatonina sobre el desarrollo neuronal se ha estudiado en ratones de edad avanzada, debido a que con el envejecimiento aumenta el estrés

oxidativo, lo que contribuye al deterioro cognitivo y neuronal de los ratones adultos. También se ha estudiado en modelos de ratones que presentan distintos tipos de neuropatologías (Síndrome de Down y isquemia)

6.1.2.2- Vías de administración de melatonina

En los artículos consultados el estudio de los efectos de la melatonina se ha realizado tras la administración de melatonina exógena a los animales objeto de estudio, en la mayoría de los casos ratones. Se ha administrado oralmente o mediante inyecciones intraperitoneales y ambos procesos han resultado efectivos.

El hecho de que la melatonina exógena atraviese la barrera hematoencefálica y se introduzca de manera relativamente fácil en el SNC, permite observar rápidamente los efectos que ejerce sobre la neurogénesis.

6.1.2.4-Efecto de la melatonina sobre la densidad de neuronas granulares del hipocampo

El estudio de Ramirez-Rodriguez *et al.*, (2010) ha evaluado el volumen (en mm^3) de la capa de células granulares (GCL) del giro dentado del hipocampo de ratones adultos, ya que se sabe que hay una relación directa entre éste y la tasa de neurogénesis. Para ello, se ha utilizado la tinción de Nissl, que es un método que usa colorantes acidófilos que permiten teñir neuronas y células gliales.

Los resultados (figura 6) muestran que los ratones que han sido tratados con melatonina (MLT) presentan un volumen de GCL aproximadamente 33% veces superior al de los ratones vehículo (VHL) (vehículo: 0.1122 ± 0.002 ; melatonina: 0.1492 ± 0.010 ; $P = 0,013$). Así, la administración de melatonina a individuos adultos favorece el proceso de neurogénesis.

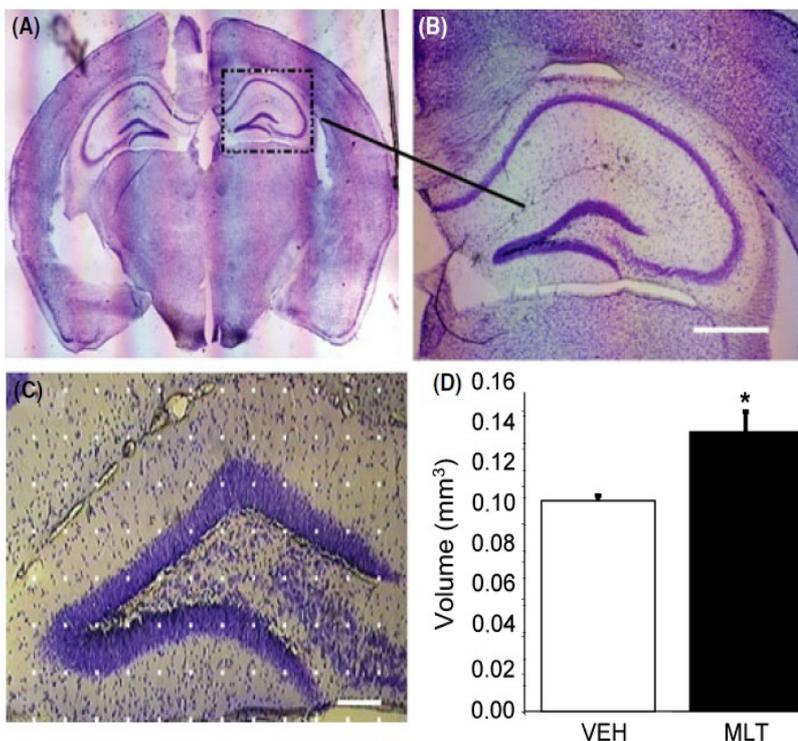


Figura 6.-La melatonina modifica el volumen de la capa de células granulares (GCL). El volumen de GCL de ratones vehículo y ratones tratados con melatonin (8 mg / kg) durante 14 días se determinó a partir de secciones coronales teñidas con Nissl como se indica en Materiales y métodos. A) Imagen panorámica de una sección coronal. B) Amplificación de la imagen A. Escala de 50 μm . C) Imagen representativa que muestra la GCL manchada con el procedimiento de Nissl y con la red de conteo de puntos (puntos blancos). Escala de 50 μm . D) La administración de melatonina aumenta el volumen de la GCL después de 14 días de tratamiento. $n = 5-6$ ratones por grupo. Las barras de error representan S.E.M. * $P < 0,013$. Test de Student. Tomado de: Ramirez-Rodriguez, G., Ortiz-López, LI, Domínguez-Alonso, A., Benítez-King, G.A., Kempermann, G., 2010. Chronic treatment with melatonin stimulates dendrite maturation and complexity in adult hippocampal neurogenesis of mice. *J Pineal Res* 50, 29-37.

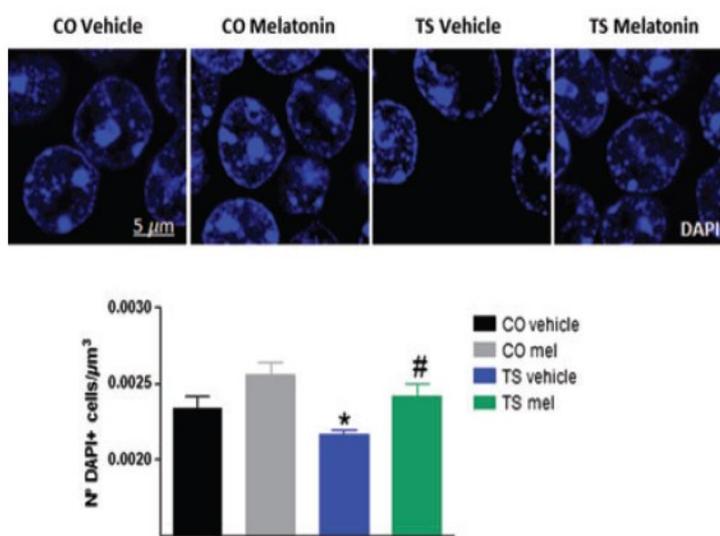
La densidad celular también es un indicador de que se está dando la neurogénesis. Así en los trabajos de Corrales *et al.*, (2014) se ha evaluado este parámetro en ratones jóvenes sanos (CO) y en ratones de la misma edad que presentan síndrome de Down (TS).

Se ha utilizado 4'6-diamino-2-fenilindol (DAPI) para cuantificar células granulares, con la ayuda de un microscopio confocal. El DAPI es un marcador fluorescente que se une a regiones concretas del ADN y tiñe selectivamente los núcleos, lo que permite cuantificar la densidad celular.

Como se observa en la figura 7, los resultados muestran un incremento de células marcadas con DAPI en aquellos ratones que presentan Síndrome Down y han sido tratados con melatonina (0,5 mg/día), respecto al de los ratones vehículo, a los que no se les ha suministrado melatonina. Esto indica que la administración de melatonina aumenta la densidad celular y, por tanto, la tasa de neurogénesis en ratones con Síndrome de Down.

Los ratones sanos que han sido tratados con melatonina también presentan un mayor número de células marcas con DAPI que los ratones sanos vehículo, a los que no se les ha administrado melatonina. No obstante, estas diferencias no son significativas, por lo que no se puede afirmar que la administración de melatonina a ratones jóvenes sanos favorezca la neurogénesis.

Figura 7.-Imágenes representativas de células DAPI+ presentes en el giro dentado del hipocampo de ratones control vehículo (CO Vehicle), ratones control a los que se les ha administrado melatonina (CO Melatonin), ratones con Síndrome de Down vehículo (TS Vehicle) y ratones con Síndrome de Down a los que se les ha administrado melatonina (TS Melatonin). Media de la densidad de neuronas granulares maduras presentes en la capa de células granulares del hipocampo de ratones CO y ratones TS. *P <0,05 TS en comparación con CO; #P <0,05 melatonina frente a vehículo; Pruebas post-hoc de Bonferroni. Tomado de: Corrales, A., Vidal, R., García, S., Vidal, V., Martínez, P., García, E., Flórez, J., Sanchez-Barceló, E.J., Martínez-Cué, C., Rueda, N., 2014. Chronic melatonin treatment rescues electrophysiological and neuromorphological deficits in a mouse model of Down syndrome. *J. Pineal Res* 56, 51–61.



6.1.2.3-Efecto de la melatonina sobre la proliferación en el giro dentado del hipocampo

La expresión de la proteína nuclear Ki67 se utiliza como marcador de proliferación celular y, por tanto, su expresión en el hipocampo es un indicador de neurogénesis.

El estudio de Corrales *et al.*, (2014) ha cuantificado la densidad de células de la zona subgranular que expresan esta proteína (células ki67+) en ratones sanos y ratones con Síndrome de Down, sin tratar o tratados con melatonina.

Los resultados (figura 8) muestran que el número de células ki67+ aumenta en los ratones con Síndrome de Down tratados con melatonina en relación a los ratones vehículo, que no han seguido ningún tratamiento. Sin embargo, en los ratones control (sanos), que no presentan ninguna

enfermedad, no se observan diferencias entre los tratados con melatonina y los vehículo.

Así, se puede deducir que el número de células ki67 positivas y, por tanto, la división activa de neuronas aumenta tras el tratamiento con melatonina, siempre que los individuos tratados presenten Síndrome de Down. Por el contrario, en ratones sanos (control), el número de células ki67 positivas se mantiene más o menos constante.

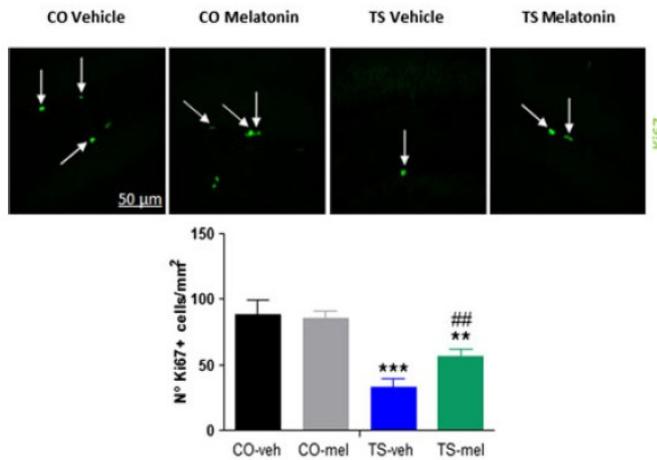


Figura 8.- Media de la densidad de células ki67+ encontradas en la zona subgranular de ratones control vehículo (CO Vehicle), ratones control tratados con melatonina (CO Melatonin), ratones con Síndrome de Down vehículo (TS Vehicle) y ratones con Síndrome de Down tratados con melatonina (TS Melatonin). *** P <0,001 TS contra CO; ## P <0,01 melatonina en comparación con vehículo; Pruebas post-hoc de Bonferroni. Tomado de: Corrales, A., Vidal, R., García, S., Vidal, V., Martínez, P., García, E., Flórez, J., Sanchez-Barceló, E.J., Martínez-Cué, C., Rueda, N., 2014. Chronic melatonin treatment rescues electrophysiological and neuromorphological deficits in a mouse model of Down syndrome. *J. Pineal Res* 56, 51–61.

6.1.2.5.- Efectos de la melatonina sobre la neurodiferenciación

Por otra parte, para identificar la existencia de neurogénesis es muy frecuente que se estudie la expresión de determinados productos relacionados con la neurodiferenciación. Los marcadores más utilizados son doblecortina y calretinina. La doblecortina es una proteína asociada a microtúbulos que se expresa de manera específica durante la migración y la diferenciación neuronal, mientras que la calretinina es una proteína de unión al calcio que se produce cuando se da el contacto dendrítico y axonal entre neuronas. Ambos son indicadores de que está teniendo lugar la neurogénesis.

El estudio de Ramirez-Rodriguez *et al.*, (2010) ha evaluado el número de células marcadas con doblecortina (células DCX+) del giro dentado del hipocampo de ratones adultos sanos. Los resultados (figura 9) muestran que el número de células del giro dentado del hipocampo marcadas con DCX de ratones adultos tratados con melatonina se incrementó en un 22% en comparación con los ratones vehículo (vehículo: 4224 ± 102 ; melatonina: 5139 ± 229 ; P = 0,007). Así, se puede concluir que el tratamiento con melatonina mejora la neurodiferenciación y la formación de nuevas neuronas en individuos adultos sanos, puesto que favorece el aumento del número de neuronas marcadas con DCX.

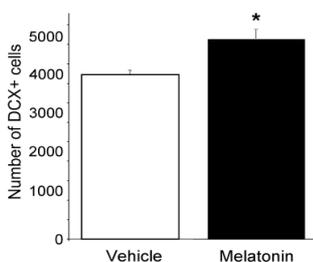


Figura 9.-Número de células marcadas con doblecortina (DCX) en ratones vehículo y ratones que han sido tratados con melatonina. La administración de melatonina induce un aumento significativo del número de neuronas inmaduras identificadas por tinción con doblecortina en comparación con ratones vehículo. n = 5-6 ratones por grupo. Las barras de error representan S.E.M. * P <0,007 por la prueba t. Tomado de: Ramirez-Rodriguez, G., Ortíz-López, Ll, Domínguez-Alonso, A., Benítez-King, G.A., Kempermann, G., 2010. Chronic treatment with melatonin stimulates dendrite maturation and complexity in adult hippocampal neurogenesis of mice. *J Pineal Res* 50, 29-37.

Además en este mismo estudio (Ramirez-Rodriguez *et al.*, 2010) se han establecido seis categorías de células marcadas con DCX en función de la morfología dendrítica: (a) células sin dendritas; (b) células que muestran dendritas más cortas que el tamaño soma; (c) células con dendritas un poco más grandes que el tamaño del soma; (d) células con dendritas más largas que las de la categoría c; (e) células con apariencia más madura que muestran una dendrita primaria con un solo punto de ramificación (nodo); (f) células con apariencia madura que muestran más de tres nodos y alcanzan la capa molecular (ML).

Con ello se ha examinado como afecta el tratamiento con melatonina a la morfología dendrítica de las nuevas neuronas generadas. Los resultados (figura 10) muestran que el porcentaje de células con una morfología dendrítica simple (células a y b) disminuye tras el tratamiento con melatonina. Sin embargo, el porcentaje de células que presentan una morfología dendrítica más compleja (células c,d,e y f) aumenta con la administración de melatonina. De esta manera, se confirman que el tratamiento con melatonina mejora la neurodiferenciación y la formación de nuevas neuronas en individuos adultos sanos.

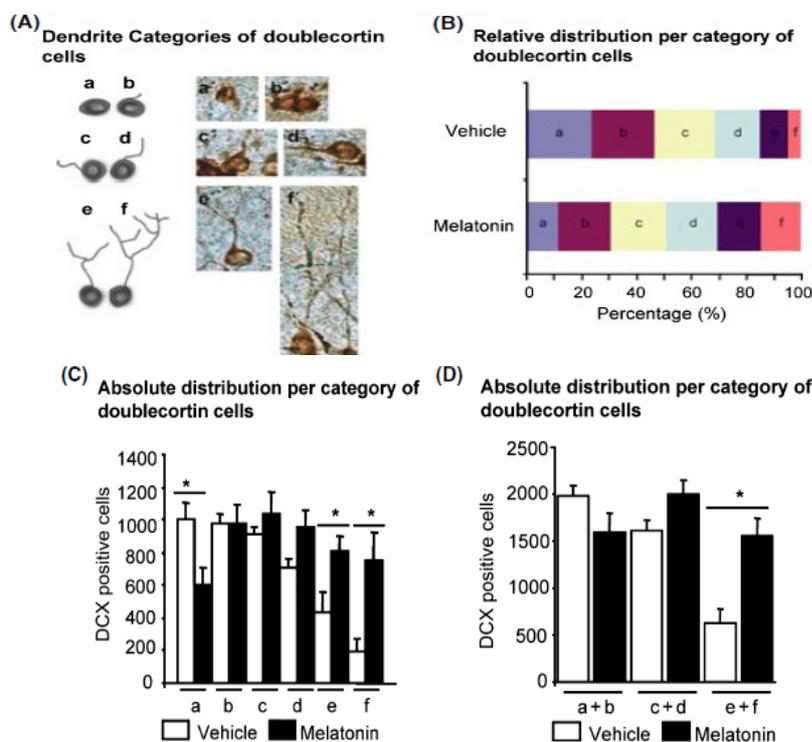
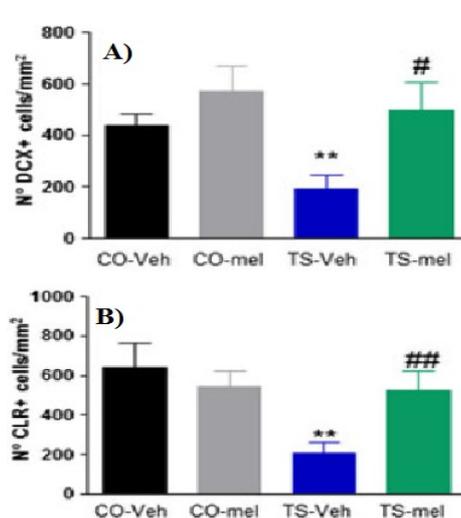


Figura 10.-El tratamiento con melatonina crónica cambia la morfología dendrítica de las nuevas neuronas. En la imagen A se muestra la representación de las diferentes morfologías de células marcadas con doblecortina (DCX). Escala de 5 μ m. En la imagen B se observa la distribución relativa por categorías de células marcadas con DCX. Los ratones tratados con melatonina muestran una disminución relativa de células sin dendritas. Además, la administración de melatonina aumenta la proporción de células con dendritas más maduras. Las imágenes C y D muestran la cuantificación absoluta basándose en el porcentaje por categoría y número total de células marcadas con DCX. n = 5-6 ratones por grupo. Las barras de error representan S.E.M. * P < 0,001. Prueba de Fisher post hoc y ANOVA de una vía.

A pesar de que los trabajos de Ramirez-Rodriguez *et al.*, (2010) muestren que la administración de melatonina favorece la neurodiferenciación, los resultados no siempre coinciden. El estudio de Corrales *et al.*, (2014) ha cuantificado los niveles de células marcadas con DCX (figura 11A) y CLR (figura 11B) en ratones jóvenes sanos y ratones jóvenes con Síndrome de Down.

Los resultados (figura 11) muestran que los niveles de células marcadas con DCX y CLR de ratones con Síndrome de Down (TS) aumentan tras el tratamiento con melatonina (sobre todo las células DCX+), aproximándose mucho a los valores de los ratones control. El número de células DCX+ de los ratones control también se incrementa tras el tratamiento con melatonina. Sin embargo, estas diferencias no son significativas.



Con estos resultados se puede deducir que la administración de melatonina favorece la diferenciación de precursores neuronales y la maduración dendrítica de ratones que poseen Síndrome de Down, pero no de ratones sanos.

Figura 11.-Media de la densidad de neuronas DCX (A)+ y de neuronas CLR+ (B) encontradas en la zona subgranular de ratones control vehículo (CO Vehicle), ratones control tratados con melatonina (CO Melatonin), ratones con Síndrome de Down vehículo (TS Vehicle) y ratones con Síndrome de Down tratados con melatonina (TS Melatonin). ** P <0,01; TS contra CO; # P <0,05, melatonina en comparación con vehículo; ### P <0,01 melatonina en comparación con vehículo. Pruebas post-hoc de Bonferroni. Tomado de: Corrales, A., Vidal, R., García, S., Vidal, V., Martínez, P., García, E., Flórez, J., Sanchez-Barceló, E.J., Martínez-Cué, C., Rueda, N., 2014. Chronic melatonin treatment rescues electrophysiological and neuromorphological deficits in a mouse model of Down syndrome. *J. Pineal Res* 56, 51–61.

6.1.2.6-Efecto de la melatonina sobre diferentes pautas comportamentales

Se sabe que el comportamiento de los animales está altamente influenciado por la cantidad de neuronas presentes en el cerebro. Así, los reflejos motores y sensoriales, la capacidades locomotoras, de exploración y de aprendizaje de los animales dependen del fenómeno de la neurogénesis, que puede ser evaluado con distintos tests.

Esteban *et al.*, (2010) ha evaluado estos parámetros en ratones jóvenes y ratones adultos mediante la realización de la prueba del laberinto de ocho brazos y la prueba del rota-rot.

Como muestra la tabla 3 el tiempo necesario para completar el laberinto de ocho brazos se reduce a casi la mitad en aquellos ratones adultos que han sido tratados con melatonina, al tiempo que también se reduce el número de errores cometidos por éstos. Esto nos indica que la administración de melatonina mejora las capacidades de exploración y de aprendizaje de los individuos adultos.

Tabla 3.-Efectos del tratamiento con melatonina en ratas de edad avanzada en la prueba del laberinto radial de ocho brazos, en comparación con el grupo control de la misma edad y con el grupo de ratas jóvenes. Los brazos no visitados o visitados más de una vez se consideran como un error.

Group and treatment	Performance time (s)	Errors (number)
Young-saline (n = 6)	597 ± 57	9.4 ± 1.3
Old-saline (n = 6)	1155 ± 16**	15 ± 0.37*
Old-chronic melatonin (n = 7)	698 ± 24†	9.57 ± 0.68††

* P <0,01, ** P <0,001 en comparación con el grupo control joven; † P <0,05, †† P <0,001 en comparación con el grupo control antiguo por ANOVA. Tomado de: Esteban, S., Garau, C., Aparicio, S., Moranta, D., Barceló, P., Fiol, M.A., Rial, R., 2010a. Chronic melatonin treatment and its precursor L-tryptophan improve the monoaminergic neurotransmission and related behavior in the aged rat brain. *J Pineal Res* 48, 170-177.

También se ha demostrado (Esteban *et al.*, 2010) que los reflejos motores y sensoriales y la capacidades locomotoras de los ratones adultos son mayores después de que hayan sido tratados con melatonina. Esto puede observarse en la tabla 4, que muestra que las ratas adultas tratadas con melatonina son capaces de permanecer mucho más tiempo en la rueda giratoria que las ratas control de la misma edad, a las que no se les ha administrado melatonina.

Tabla 4.-Efectos de la melatonina en ratas de edad avanzada en la prueba del rota-rod, en comparación con el grupo control de la misma edad y el grupo de ratas jóvenes. La aceleración de Rotación fue de 4-40 cm/s en 30s.

Group and treatment	Time on rota-rod (s)
Young-control (n = 6)	26.55 ± 1.06
Old-control (n = 6)	15.03 ± 1.50*
Old-chronic melatonin (n = 7)	25.97 ± 1.6†

* P <0,01 en comparación con el grupo de ratones jóvenes control; † P <0,05 en comparación al antiguo grupo de control por ANOVA. Tomado de: Esteban, S., Garau, C., Aparicio, S., Moranta, D., Barceló, P., Fiol, M.A., Rial, R., 2010a. Chronic melatonin treatment and its precursor L-tryptophan improve the monoaminergic neurotransmission and related behavior in the aged rat brain. *J Pineal Res* 48, 170-177.

De modo semejante, Wang *et al.*,(2013), ha utilizado distintos tests conductuales (test del reflejo de enderezamiento, test de geotaxis negativa, test de la suspensión de la cuerda, test de campo abierto y laberindo de Morris) en ratones sanos y en ratones que presentan isquemia y los resultados muestran que la melatonina mejora ciertos déficits neuroconductuales en los ratones isquémicos, pero no en los sanos.

La administración de melatonina reduce la geotaxis negativa y aumenta la velocidad con que se dan los reflejos de enderezamiento en ratones con isquemia, pero no provoca ningún efecto significativo en ratones sanos.

Además, como muestra la figura 12, con el test de campo abierto se ha demostrado que los ratones isquémicos (Hy), que generalmente deambulan más que los ratones sanos (Sham), al ser tratados con melatonina (Hy+MT) reducen significativamente su actividad y se vuelven más pasivos. No obstante, las variaciones entre ratones sanos tratados (Sham+MT) y sin tratar (Sham) son muy poco importantes.

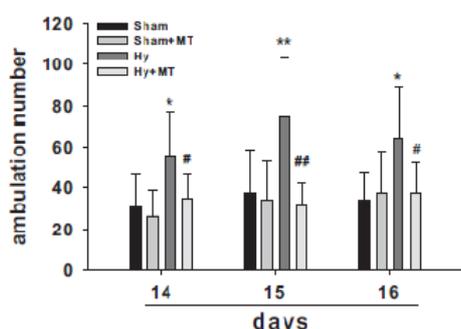


Figura 12.- Número de ambulaciones realizadas en el test de campo abierto. Se han realizado observaciones de ratones sanos (Sham), ratones sanos tratados con melatonina (Sham+MT), ratones con hipoxia (Hy) y ratones con hipoxia tratados con melatonina (Hy+MT) que ha realizado la prueba durante 5 minutos tras 14, 15 y 16 días. Los resultados se expresan como media ± SD, n = 10, * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 hipoxia (Hy) vs sham; #p <0,05, ## p <0,01 hipoxia + melatonina (Hy + MT) vs Hy. Tomado de: Wang, Z., Liu, D., Zhan, J., Xie, K., Wang, X., Xian, X., Gu, J., Chen, W., Hao, A., 2013. Melatonin improves short and long-term neurobehavioral deficits and attenuates hippocampal impairments after hypoxia in neonatal mice. *Pharmacol Res* 76, 84-97.

Por último, con el laberinto de Morris (figura 13) se ha demostrado que la melatonina mejora la memoria y el aprendizaje de animales que han sufrido hipoxia (Wang *et al.*, 2013), ya que al ser tratados con melatonina tardan menos a llegar a la plataforma y permanecen más tiempo en el cuadrante correcto que los ratones isquémicos que no han sido tratados.

Así, la melatonina mejora ciertos parámetros relacionados con la neurogénesis o bien de individuos adultos o de individuos que padecen alguna neuropatología, como Síndrome de Down o isquemia. Sin embargo, a pesar de que tiene efectos sobre los individuos jóvenes sanos éstos son

muy reducidos y no pueden considerarse significativos.

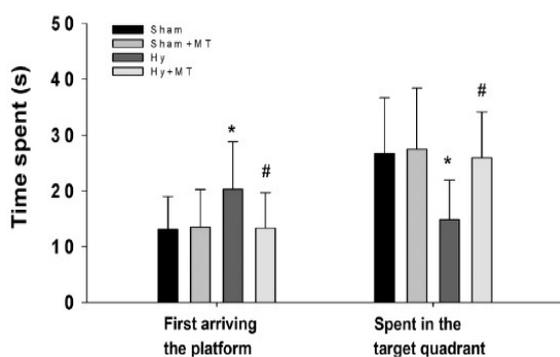


Figura 13.-Efecto de la melatonina sobre los déficit de aprendizaje y memoria después de hipoxia. Latencia de escape y porcentaje de tiempo empleado (en segundos) en el cuadrante objetivo en la prueba de exploración espacial realizada en ratones sanos (Sham), ratones sanos tratados (Sham+MT), ratones con hipoxia (Hy) y ratones con hipoxia tratados con melatonina (Hy+MT). Los valores representan la media \pm SD, n = 10, * p < 0,05, ** p < 0,01 Hy vs sham; #p < 0,05 Hy + MT vs Hy. Tomado de: Wang, Z., Liu, D., Zhan, J., Xie, K., Wang, X., Xian, X., Gu, J., Chen, W., Hao, A., 2013. Melatonin improves short and long-term neurobehavioral deficits and attenuates hippocampal impairments after hypoxia in neonatal mice. *Pharmacol Res* 76, 84-97.

6.2.-Vitamina E

La vitamina E es una sustancia de origen natural que influye en una amplia gama de mecanismos relacionados con la salud humana (Pereira *et al.*, 2013). Existe en ocho formas diferentes: cuatro tocoferoles (o TCP) y cuatro tocotrienoles. Cada forma tiene un anillo de cromanol, con un grupo hidroxilo que puede donar un átomo de hidrógeno para reducir los radicales libres y una cadena lateral hidrófoba que permite la penetración en las membranas biológicas. Tanto los tocoferoles como los tocotrienoles se producen en las formas alfa, beta, gamma y delta, designados por el número de grupos metilo que presentan en el anillo cromanol. El alfa está más altamente metilado y tiene como máximo tres grupos metilo en el anillo cromanol en comparación con las formas beta, gamma y delta, que tienen dos, uno y ningún grupo metilo en el anillo de cromanol, respectivamente. Entre ellos el alfa-tocoferol es el más importante cuantitativamente y fisiológicamente. De éste existen ocho estereoisómeros, que difieren en la disposición de los grupos alrededor de sus estereocentros (Ciaroni *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 2013).

6.2.1.-Propiedades neuroprotectoras de la vitamina E

La vitamina E realiza un papel importante en el mantenimiento de la morfología de las estructuras neurológicas y de su funcionamiento (Pereira *et al.*, 2013). Esto se debe a sus propiedades antioxidantes, ya que es un agente de barrido importante de radicales dentro del medio ambiente lipofílico de la bicapa lipídica.

Además, tiene un efecto protector contra la neurotoxicidad inducida por altas concentraciones de glutamato u otros aminoácidos, que actúan como neuroreguladores y moduladores de la neurogénesis.

6.2.2.- Efectos de la vitamina E sobre la neurogénesis

6.2.2.1- Modelos de estudio

El efecto que ejerce la vitamina E sobre las funciones cognitivas se ha estudiado en ratones adultos, debido a que con el paso del tiempo el estrés oxidativo aumenta, incrementando así el deterioro cognitivo y neuronal de los ratones.

6.2.2.2- Vías de administración de vitamina E

En la mayoría de los casos el efecto de la vitamina E sobre la neurogénesis se ha estudiado mediante la administración de esta sustancia de manera oral a través de la dieta, aunque también puede suministrarse a través de inyecciones intraperitoneales, a distinta dosis en función del estudio en particular del que se trate.

En otros estudios, sin embargo, los efectos de esta sustancia se han estudiado mediante la reducción de la ingesta de ésta, en este caso para ver que consecuencias tiene la deficiencia de vitamina E sobre la neurogénesis.

6.2.2.3-Efecto de la vitamina E sobre la densidad de neuronas granulares del hipocampo

Ciaroni *et al.*, (1999) ha realizado el recuento de células totales presentes en la capa de células granulares de ratas control de 1 mes de edad (C1), ratas control de 5 meses de edad (C5) y ratas de 5 meses de edad con una dieta deficiente en vitamina E (D5).

Los resultados (figura 14) muestran que los ratas de 5 meses de edad con una dieta deficiente en vitamina E tienen un mayor número de células que el resto, seguido de las ratas control de 5 meses de edad. Por último, las ratas control de 1 mes de edad son los que presentan un número más reducido de células. Así, al relacionar la tasa de neurogénesis con el número de células presentes en la capa de células granulares, se puede deducir que las ratas con dietas deficientes en vitamina E presentan una tasa de neurogénesis superior al resto y que, por tanto, las deficiencias en vitamina E mejoran ciertos aspectos de la neurogénesis en ratas adultas.

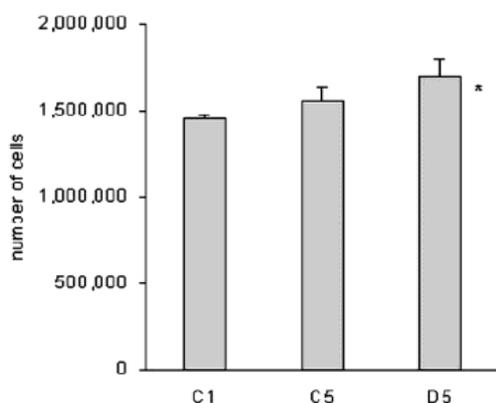


Figura 14.-Número de células totales presentes en la capa de células granulares de C1 (ratas control de 1 mes de edad), C5 (ratas control de 5 meses de edad) y D5 (ratas de 5 meses de edad con una dieta deficiente en vitamina E). La densidad de células granulares y el volumen se ha determinado en secciones teñidas con violeta-cresilo y se utiliza para obtener el número total de células. Tomado de: Ciaroni, S., Cuppini, R., Cecchini, T., Ferri, P., Ambrogini, P., Cuppini, C., Del Grande, P., 1999. Neurogenesis in the Adult Rat Dentate Gyrus Is Enhanced by Vitamin E Deficiency. *The journal of comparative neurology* 411, 495-502.

6.2.2.4-Efecto de la vitamina E sobre la proliferación en el giro dentado del hipocampo

El estudio de Ciaroni *et al.*, (2002) ha evaluado la división activa de las células de ratones jóvenes (Y), ratones adultos (C) y ratones adultos con deficiencias de vitamina E (Y) mediante el ensayo de BrdU, una técnica inmunohistoquímica que permite identificar células proliferativas y, por tanto, el proceso de formación de nuevas neuronas a partir de precursores neuronales ya existentes. Además se ha realizado el recuento de células marcadas con BrdU 1 día y 30 días después de la última inyección de la sustancia, con el fin de deducir en que caso la supervivencia de las neuronas recién generadas es mayor.

Como puede verse en los resultados (figura 15) las ratas adultas con una dieta deficiente en vitamina E (D₁) presentan un mayor número de células proliferantes que las ratas adultas control (C₁), que tienen una dieta estándar que cumple con todos los requerimientos de vitamina E. Esto indica que las deficiencias de vitamina E ejercen efectos beneficiosos sobre el proceso de neurogénesis.

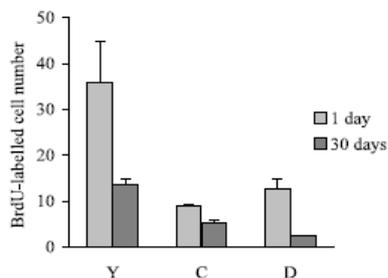
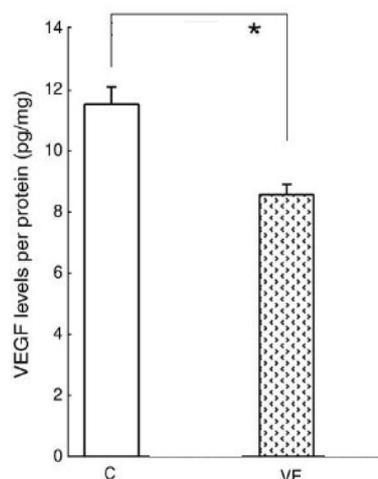


Figura 15.-Análisis cuantitativo de células marcadas con BrdU en ratas jóvenes (Y), ratas adultas control (C) y ratas adultas con una dieta deficiente en vitamina E (D) 1 y 30 días después de la última inyección de BrdU. Tomado de: Ciaroni, S., Cecchini, T., Ferri, P., Cuppini, R., Ambrogini, P., Santi, S., Benedetti, S., Del Grande, P., Papa, S., 2002. Neural precursor proliferation and newborn cell survival in the adult rat dentate gyrus are affected by vitamin E deficiency. *Neurosci Res* 44, 369-77.

A pesar de que viendo estos resultados parece que se puede concluir que las deficiencias de vitamina E mejoran la neurogénesis, los resultados no siempre son tan evidentes. En algunos estudios (Muto *et al.*, 2010) hay diferencias entre los niveles de células marcadas con BrdU de ratas jóvenes control y ratas jóvenes a las que se les ha suplementado la dieta con vitamina E. Sin embargo, estas diferencias no son significativas, por lo que no se puede descartar que estas desigualdades se deban al azar. Así, no se puede concluir que las deficiencias en vitamina E afecten a la neurogénesis de ratas jóvenes.

Por otra parte, la cuantificación de los niveles de determinadas proteínas que se expresan durante el proceso de neurogénesis también resulta útil para deducir si se está dando el proceso. Así, los factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF) han sido examinados en varios estudios (Muto *et al.*, 2010) con técnicas de inmunoensayo como el ELISA con el fin de determinar la existencia de neurogénesis. Los factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF) son proteínas que promueven la angiogénesis, que consiste en la formación de vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes y que está muy relacionada con la neurogénesis del hipocampo.



Como se observa en los resultados (figura 16) los niveles de VEGF son mayores en los ratones control que en ratones a los que se les ha inyectado vitamina E. Así, se puede concluir que la administración de Vitamina E dificulta la expresión de VEGF y, por tanto, reduce la tasa de neurogénesis.

Figura 16.-Niveles de VEGF en el hipotálamo de ratones control (C) y ratones a los que se les ha inyectado vitamina E (VE). Los niveles de VEGF en ratones C fueron significativamente mayores que los de los otros ratones VE. Los datos son medias \pm SEM. (C: n = 11, RS y Noni: n = 10, VE: n = 9). Tomado de: Muto, J., Hosung, L., Uwaya, A., Isami, F., Ohno, M., Mikami, T., 2010. Morinda citrifolia fruit reduces stress-induced impairment of cognitive function accompanied by vasculature improvement in mice. *Physiol Behav.* 101, 211-7.

6.2.2.5.- Efectos de la vitamina E sobre la neurodegeneración

La cuantificación de células muertas mediante el ensayo TUNEL es útil para evaluar la tasa de neurodegeneración, ya que existe una correlación directa entre estos parámetros.

El estudio de Ciaroni *et al.*, (2002) ha realizado este ensayo, comparando ratones adultos control (C_T) con ratones que han tenido una dieta deficiente en vitamina E de la misma edad (D_T). Los resultados (figura 17) muestran que las ratas con una dieta deficiente en vitamina E presentan una mayor muerte celular que las ratas control de su misma edad. Estas diferencias se han encontrado por igual tanto en la zona subgranular como en la zona subventricular. Así, se puede concluir que la vitamina E tiene la capacidad de reducir la apoptosis y, por tanto, la muerte de neuronas recién nacidas.

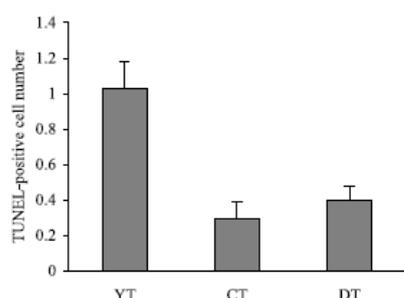


Figura 17.-Diferencias cuantitativas en el número de células TUNEL-positivas por sección en ratas jóvenes control (Y_T), ratas adultas control (C_T) y ratas adultas con una dieta deficiente en vitamina E deficientes (D_T). Tomado de: Ciaroni, S., Cecchini, T., Ferri, P., Cuppini, R., Ambrogini, P., Santi, S., Benedetti, S., Del Grande, P., Papa, S., 2002. Neural precursor proliferation and newborn cell survival in the adult rat dentate gyrus are affected by vitamin E deficiency. *Neurosci Res* 44, 369-77.

6.2.2.6.-Efectos de la vitamina E sobre diferentes pautas comportamentales

Los trabajos de Esteban *et al.*, (2013) han evaluado el impacto del α -tocoferol, uno de los tipos de vitamina E, sobre el rendimiento cognitivo y las capacidades de memoria y aprendizaje de ratas adultas (17-19 meses) mediante la realización de varios tests comportamentales (laberinto radial de ocho brazos, laberinto de Barnes y test de reconocimiento de objetos).

Como puede observarse (figura 18 A) la administración de α -tocoferol ha reducido de manera significativa el tiempo que las ratas adultas tardan en completar el laberinto, en relación a las ratas control, que no han sido tratadas con α -tocoferol. Además el número de errores cometidos por éstas también reduce mucho (figura 18 B). Así, se puede considerar que las capacidades de memoria y aprendizaje de ratas adultas se ve mejorada tras la administración de α -tocoferol.

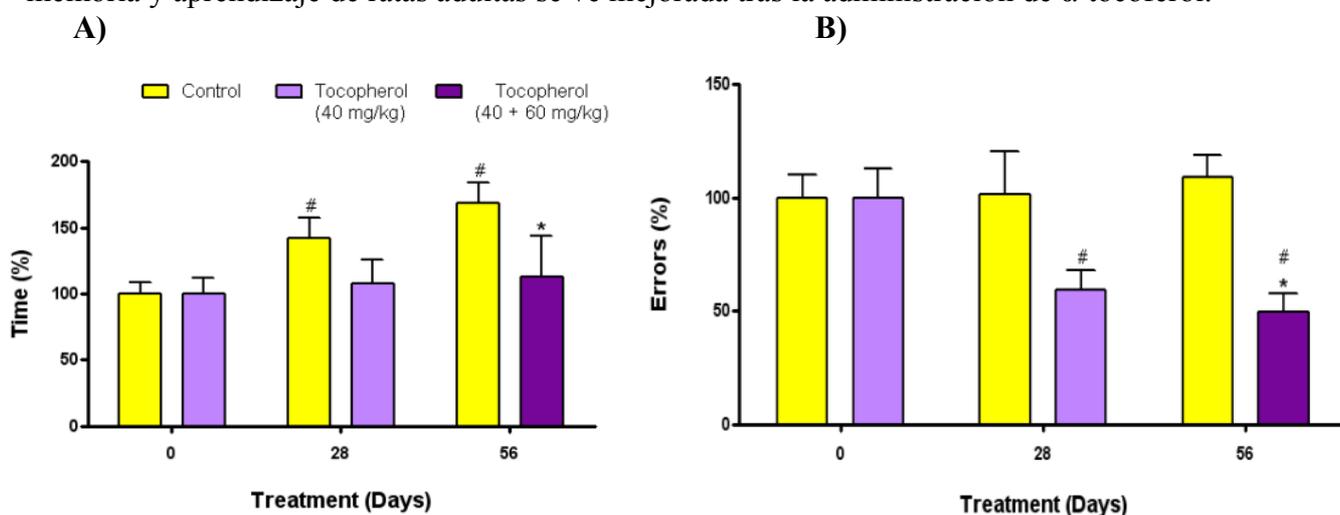
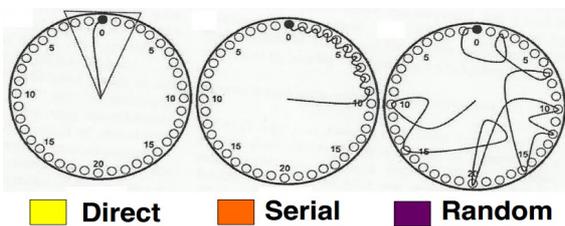


Figura 18.- Efectos del α -tocoferol en ratas en el laberinto radial, * $p < 0,05$ en comparación con

grupo de control; #p <0,05 en comparación con el primer día (prueba t de Student). Tomado de: Esteban, S., Terrasa, J.L., Ramis, M., Sarubbo, F., Miralles, A., Aparicio, S., 2013. Effects of chronic treatment with α -tocopherol on cognitive abilities in old rats. 45th European Brain and Behavior Society Meeting.

De modo semejante, se ha evaluado la estrategia que utilizan las ratas para completar el laberinto de Barnes. En los resultados (figura 19B) se puede observar que ambas ratas (control y tratada con tocoferol) el primer día solamente han realizado las estrategias seriada y al azar (figura 17A), que son algo más complejas puesto que las ratas deambulan más hasta llegar al sitio correcto. Sin embargo, el día del test las ratas control realizan dos tipos de estrategias (directa y seriada); mientras que las ratas a las que se les ha administrado tocoferol llevan a cabo los tres tipos de estrategias (directa, seriada y al azar). Además las ratas tratadas completan más ensayos con la estrategia directa que las controles, que usan preferiblemente el tipo de estrategia de serie. Así, los resultados de esta prueba permiten deducir que la administración de tocoferol mejora la memoria y el aprendizaje de ratas adultas.

A)



B)

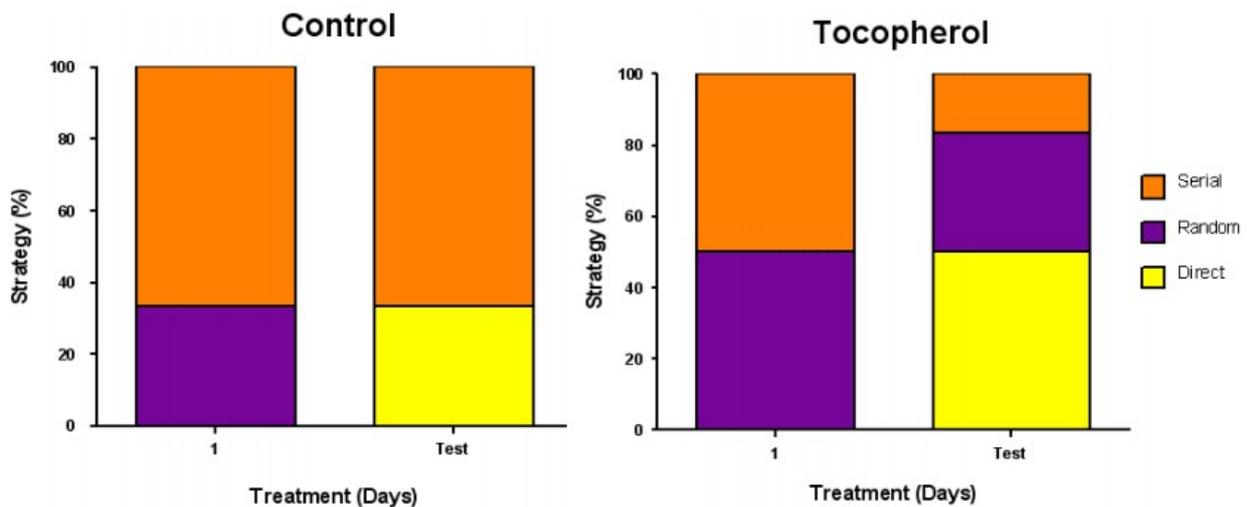


Figura 19.- Efectos del α -tocopherol en ratas en relación al tipo de estrategia utilizada para la realización del laberinto de Barnes, #p <0,05 en comparación con la primera repetición (prueba t de Student). Tomado de: Esteban, S., Terrasa, J.L., Ramis, M., Sarubbo, F., Miralles, A., Aparicio, S., 2013. Effects of chronic treatment with α -tocopherol on cognitive abilities in old rats. 45th European Brain and Behavior Society Meeting.

Por último, este mismo estudio (Esteban *et al.*, 2013) también ha realizado el test de reconocimiento de objetos a estos animales y los resultados (figura 20) muestran que los animales que han sido tratados con tocoferol reconocen los objetos con más facilidad que el resto y, por tanto, aprenden con mayor rapidez. Por lo que se confirma la hipótesis de que la administración de tocoferol mejora la memoria y el aprendizaje de ratas adultas.

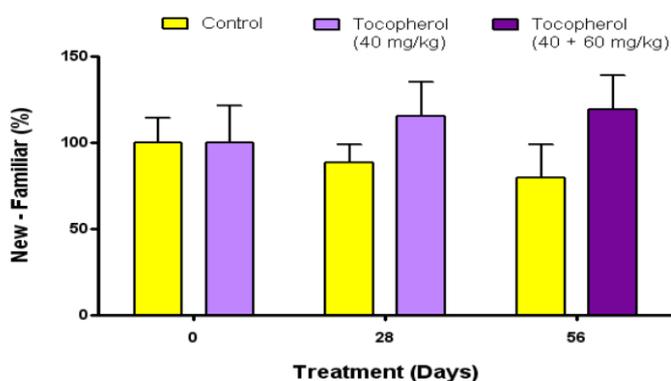


Figura 20.-Efectos del α -tocoferol en ratas en la que se ha realizado la prueba de reconocimiento de objetos, * $p < 0,05$ en comparación con el grupo control; # $p < 0,05$ en comparación con el primer día (Prueba t de Student).

A pesar de que con los estudio de Esteban *et al.*, (2013) parece claro que la administración de tocoferol tiene efectos beneficiosos sobre la memoria y el aprendizaje de los animales tratados; contrariamente a lo que se esperaba, en algunos estudios realizados con vitamina E (Muto *et al.*, 2010) no se ha visto ningún efecto beneficioso.

6.3.-Resveratrol

El resveratrol (3, 4, 5 trihidroxiestilbeno) es una fitoalexina presente en la semilla y la piel de las uvas y en productos derivados como vino, mosto, etc , aunque también se puede encontrar en otros alimentos como cacahuets y nueces (Harada *et al.*, 2011; Madhyastha *et al.*, 2013). Además, puede ser producido por las plantas como defensa ante ataques fúngicos.

6.3.1.-Propiedades neuroprotectoras del resveratrol

El resveratrol es conocido por ejercer un efecto neuroprotector que se asocia a sus importantes propiedades antioxidantes y a su enorme capacidad de barrido de radicales libres. Así, protege al hipocampo de las alteraciones producidas por varias neuropatologías (Madhyastha *et al.*, 2013).

6.3.2.-Efectos del resveratrol sobre la neurogénesis

6.3.2.1.-Modelos de estudio

El efecto del resveratrol sobre la neurogénesis se ha estudiado principalmente en roedores que padecen neuropatologías, como fátiga crónica. También se ha estudiado en ratones jóvenes sanos. Sin embargo, en ningún caso se ha estudiado el efecto que produce en ratones de edad avanzada sanos.

6.3.2.2.-Vías de administración de resveratrol

Generalmente el resveratrol se administra de manera oral, a través de la dieta. Según Madhyastha *et al.*, (2013) es capaz de cruzar la barrera de sangre del cerebro, por lo que se dirige con rapidez al cerebro del individuo tratado y sus efectos sobre la neurogénesis se pueden observar con relativa facilidad.

6.3.2.3.-Efectos del resveratrol sobre la proliferación

El estudio concreto de Moriya *et al.*, (2011) ha utilizado la técnica de marcaje con BrdU en ratones normales (sanos), modelo (con fatiga crónica) y RSV (con fátiga crónica y tratados con resveratrol), con el fin de cuantificar el número de células proliferantes y, por tanto, identificar la existencia de neurogénesis.

Los resultados (figura 21) muestran que los ratones a los que se les ha administrado resveratrol presentan un número de células marcadas con BrdU superior al resto. Así, la proliferación celular y, por tanto, la tasa de neurogénesis es mayor cuando se administra resveratrol.

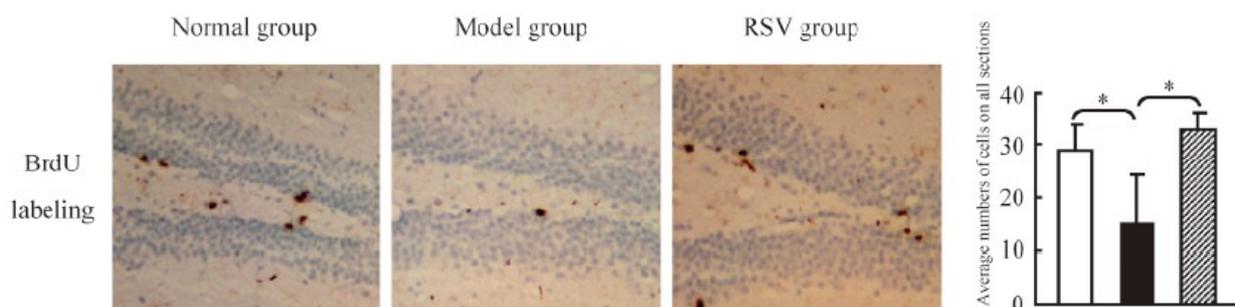


Figura 21.-Morfología de las células marcadas con BrdU. El tratamiento con resveratrol aumentó el recuento de células BrdU-positivas en giro dentado del hipocampo, especialmente en la zona subgranular. Escala = 100 μ m. Las barras blanca, oscura y rallada hacen referencia al grupo normal, modelo y tratado con resveratrol, respectivamente. * $p < 0.05$. Tomado de: Moriya, J., Chen, R., Yamakawa, J., Sasaki, K., Ishigaki, Y., Takahashi, T., 2011. Resveratrol improves hippocampal atrophy in chronic fatigue mice by enhancing neurogenesis and inhibiting apoptosis of granular cells. *Biol Pharm Bull* 34, 354-9.

No obstante, a pesar de que este resultado muestra que el resveratrol aumenta la proliferación neuronal, Park *et al.*, (2012) demuestra lo contrario en un estudio realizado con ratones jóvenes sanos. Es decir, muestra que el número de células marcadas con BrdU decrece de manera dosis dependiente en aquellos ratones jóvenes sanos a los que se les ha administrado resveratrol (figura 22).

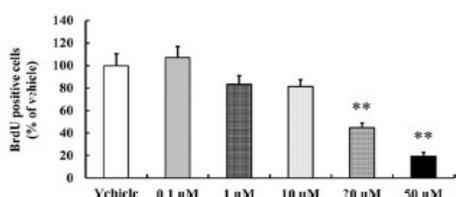


Figura 22.-Porcentaje de células marcadas con BrdU en relación al número de células BrdU positivas de los individuos control (vehículo). Tomado de: Park, H.R., Kong, K.H., Yu, B.P., Mattson, M.P., Lee, J., 2012. Resveratrol inhibits the proliferation of neural progenitor cells and hippocampal neurogenesis. *J Biol Chem* 287, 42588-600.

El BDNF es uno de los factores principales asociados con la neuroplasticidad, que tiene como función la construcción de redes y la reorganización, además de desempeñar un papel importante en la proliferación, la diferenciación y la supervivencia de las células progenitoras neuronales. Así, la presencia de este factor, puede considerarse un indicador de neurogénesis.

Los estudios de Madhyastha *et al.*, (2013) muestran que el resveratrol incrementa los niveles de BDNF y la expresión de mRNA de éste en ratones estresados, pero no en ratones sanos. Así, se puede deducir que el efecto que ejerce el resveratrol sobre la neurogénesis depende de la dosis y del estado de salud del individuo objeto de estudio, ya que cuando los individuos están sanos los efectos son nulos o escasos.

6.3.2.4.- Efectos del resveratrol sobre la neurodiferenciación

En este mismo estudio, Madhyastha *et al.*, (2013) ha cuantificado el número de células marcadas con doblecortina para estimar que está dándose la neurodiferenciación celular. Los resultados (figura 23) muestran que los ratones con estrés a los que se les ha administrado resveratrol muestran un mayor número de células DCX positivas, en comparación con los ratones a los que no se les ha suplementado la dieta con resveratrol. Sin embargo, el número de células DCX positivas de ratones sanos no aumentan aunque se les administre resveratrol.

Además los resultados de los trabajos de Park *et al.*, (2012) demuestran que el número de células DCX positivas de ratones sanos no solo no aumentan al administrar resveratrol, sino que se reduce y esta reducción es dosis dependiente (aumenta a medida que se incrementa la dosis de resveratrol administrada).

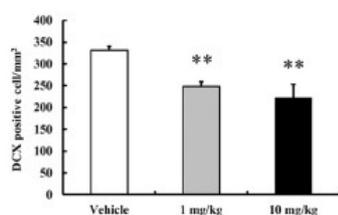


Figura 23.- Análisis del número de células DCX-positivas en el giro dentado. **, $P < 0,01$ frente al vehículo (ANOVA con el procedimiento de PLSD de Fisher). Tomado de: Park, H.R., Kong, K.H., Yu, B.P., Mattson, M.P., Lee, J., 2012. Resveratrol inhibits the proliferation of neural progenitor cells and hippocampal neurogenesis. *J Biol Chem* 287, 42588-600.

6.3.2.5.- Efectos del resveratrol sobre la neurodegeneración

Moriya *et al.*, (2011) ha realizado el ensayo TUNEL en ratones normales (sanos), modelo (con fatiga crónica) y RSV (con fatiga crónica y tratados con resveratrol) para evaluar los niveles de células muertas presentes, que están directamente relacionados con la tasa de neurodegeneración.

Los resultados (figura 24) muestran que los ratones con fatiga crónica que han sido tratados con resveratrol muestran un menor número de células muertas respecto a los ratones control. Esto indica, que la administración de resveratrol reduce la neurodegeneración en aquellos ratones que presentan problemas neuronales.

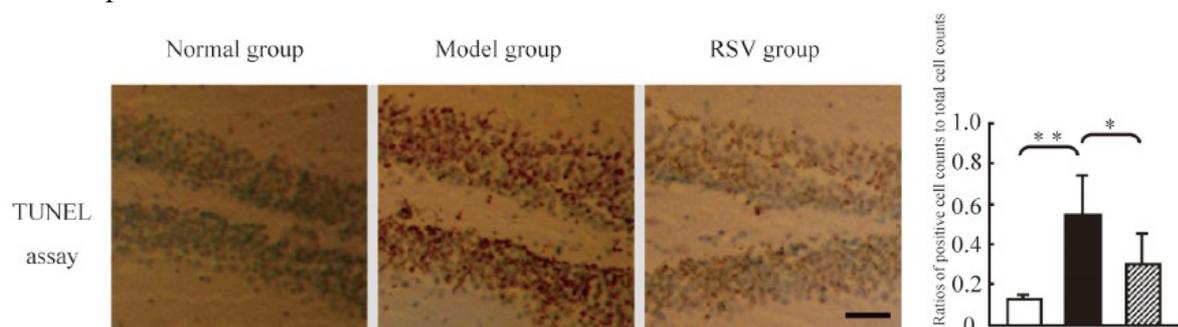


Figura 22.-Morfología de las células apoptóticas obtenidas en el ensayo TUNEL. El tratamiento con resveratrol inhibió la apoptosis de las células granulares. Escala = 100µm. Las barras blanca, oscura y rallada hacen referencia al grupo normal, modelo y tratado con resveratrol, respectivamente. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Tomado de: Moriya, J., Chen, R., Yamakawa, J., Sasaki, K., Ishigaki, Y., Takahashi, T., 2011. Resveratrol improves hippocampal atrophy in chronic fatigue mice by enhancing neurogenesis and inhibiting apoptosis of granular cells. *Biol Pharm Bull* 34, 354-9.

Por otra parte, el resveratrol es reconocido como un activador polifenólico de sirtuina 1 (SIRT1); SIRT1 es una histona desacetilasa que inhibe los niveles de acetilación de muchas proteínas reguladoras implicadas en la supervivencia celular, la homeostasis de la energía, la

reparación del ADN y la extensión de la vida útil (Marcia y Leonard, 2006). SIRT1 puede proteger a las células contra los daños del estrés a través de la desacetilación de sus objetivos (Saharan *et al.*, 2013). Puede desacetilar p53 y proteger diversas células de la apoptosis inducida por daños del ADN (Luo *et al.*, 2001).

Al cuantificar los niveles de estas moléculas (Moriya *et al.*, 2011), se ha detectado una disminución notable de la proteína p53 acetilada en los ratones tratados con resveratrol, respecto a los ratones control. Sin embargo, no se han visto diferencias significativas en el nivel total de proteína p53. Así, la administración de resveratrol protege diversas células de la apoptosis y dificulta la neurodegeneración.

6.3.2.6.-Efectos del resveratrol sobre diferentes pautas comportamentales

Para determinar el efecto de la administración de resveratrol Ramis *et al.*, (2012) ha realizado el test del laberinto espacial a ratas adultas sanas. Como consecuencia, se ha observado una mejora significativa en la prueba del laberinto radial después del tratamiento con resveratrol (20mg/kg) en relación a los individuos control (31% de reducción en el tiempo de prueba y 38% de reducción de errores).

Por otra parte, para evaluar la actividad física Moriya *et al.*, (2011) ha realizado la prueba de la rueda giratoria. Los resultados obtenidos muestran que la actividad física diaria aumenta notablemente en los ratones a los que se les ha subministrado resveratrol, ya que tras cuatro semanas de tratamiento realizan un mayor número de vueltas que los ratones control, a los que no se les ha inyectado ninguna sustancia. Esta mejora se da en aquellos ratones que presentan fatiga crónica, mientras que los ratones sanos no muestran diferencias importantes en su actividad.

Por último, con la prueba del laberinto acuático de Morris ha analizado el efecto de la administración de resveratrol sobre las capacidades de aprendizaje de los ratones y ha observado un mayor aprendizaje espacial en los animales tratados con resveratrol en comparación con el de los animales control. También ha realizado la prueba de la sonda, obteniendo los mismos resultados.

7.-Conclusiones.

1.-Del análisis de los resultados del conjunto de artículos consultados podemos concluir que las tres estrategias antienvjecimiento estudiadas (tratamiento con melatonina, vitamina E y resveratrol) son capaces de afectar los procesos de neurogénesis en el hipocampo de los animales de experimentación.

2.-La administración de melatonina a ratones jóvenes sanos no afecta significativamente ninguno de los parámetros relacionados con la neurogénesis. Sin embargo la administración de melatonina a animales de edad avanzada o que padecen algún tipo de neuropatología (animales modelo del Síndrome de Down o a los que se ha provocado hipoxia), no sólo mejora sus capacidades cognitivas (memoria, aprendizaje y reflejos motores y sensoriales), si no que favorece la proliferación, maduración y diferenciación neuronal en el hipocampo.

3.-La vitamina E y el resveratrol son capaces, en función de la dosis, de modificar las capacidades cognitivas de los animales envejecidos. Sin embargo, los efectos positivos parecen ser debidos mayoritariamente a su efecto neuroprotector (disminución de la tasa de

neurodegeneración). La deficiencia de vitamina E favorece la neurogénesis. El tratamiento con resveratrol en ratones jóvenes inhibe la neurogénesis en el hipocampo a la vez que disminuye las capacidades cognitivas. Mientras que en animales envejecidos favorece la proliferación neuronal en el hipocampo y mejora las capacidades cognitivas.

8.-Bibliografía

Altman, J., Das, G.D., 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J. Comp. Neurol* 124, 319-335.

Breunig, J.J., Arellano, J.I., Macklis, J.D., Rakic, P., 2007. Everything that glitters isn't gold: A critical review of postnatal neural precursor analyses. *Cell Stem Cell* 1, 612-627.

Ciaroni, S., Cecchini, T., Ferri, P., Cuppini, R., Ambrogini, P., Santi, S., Benedetti, S., Del Grande, P., Papa, S., 2002. Neural precursor proliferation and newborn cell survival in the adult rat dentate gyrus are affected by vitamin E deficiency. *Neurosci Res* 44, 369-77.

Ciaroni, S., Cuppini, R., Cecchini, T., Ferri, P., Ambrogini, P., Cuppini, C., Del Grande, P., 1999. Neurogenesis in the Adult Rat Dentate Gyrus Is Enhanced by Vitamin E Deficiency. *The journal of comparative neurology* 411, 495-502.

Corrales, A., Vidal, R., García, S., Vidal, V., Martínez, P., García, E., Flórez, J., Sanchez-Barceló, E.J., Martínez-Cué, C., Rueda, N., 2014. Chronic melatonin treatment rescues electrophysiological and neuromorphological deficits in a mouse model of Down syndrome. *J. Pineal Res* 56, 51-61.

Deng, W., Saxe, M.D., Gallina, I.S., 2009. Adult-born hippocampal dentate granule cells undergoing maturation modulate learning and memory in the brain. *J Neurosci* 29, 13532-13542.

Doetsch, F., Caillé, I., Lim, D.A., García-Verdugo, J.M., Alvarez-Buylla, A., 1999. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97, 703-716.

Duan, X., Kang, E., Liu, C.Y., Ming, G.L., Song, H., 2008. Development of neural stem cell in the adult brain. *Curr. Opin. Neurobiol* 18, 108-115.

Esteban, S., Garau, C., Aparicio, S., Moranta, D., Barceló, P., Fiol, M.A., Rial, R., 2010a. Chronic melatonin treatment and its precursor L-tryptophan improve the monoaminergic neurotransmission and related behavior in the aged rat brain. *J Pineal Res* 48, 170-177.

Esteban, S., Garau, C., Aparicio, S., Moranta, D., Barceló, P., Ramis, M., Tresguerres, J.A.F., Rial, R., 2010b. Improving Effects of Long-Term Growth Hormone Treatment on Monoaminergic Neurotransmission and Related Behavioral Tests in Aged Rats. *Rejuven Res* 13, 707-716.

Esteban, S., Terrasa, J.L., Ramis, M., Sarubbo, F., Miralles, A., Aparicio, S., 2013. Effects of chronic treatment with α -tocopherol on cognitive abilities in old rats. 45th European Brain and Behavior Society Meeting.

Harada, N., 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. *Journal of Nutritional Biochemistry* 22, 1150-1159.

- Imayoshi, I., Sakamoto, M., Ohtsuka, T., 2008. Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nat Neurosci* 11, 1153–1161.
- Lledo, P.M., Alonso, M., Grubb, M.S., 2006. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat. Rev. Neurosci* 7, 179–193.
- Lois, C., García-Verdugo, J.M., Alvarez, A., 1996. Chain migration of neuronal precursors. *Science* 271, 978–981.
- Luo, J., Nikolaev, A.Y., Imai, S., Chen, D., Su, F., Shiloh, A., Guarente, L., Gu, W., 2001. Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell* 107, 137–148.
- Madhyastha, S., Sekhar, S., Rao, G., 2013. Resveratrol improves postnatal hippocampal neurogenesis and brain-derived neurotrophic factor in prenatally stressed rats. *Int. J. Devl Neuroscience* 31, 580–585.
- Ming, G.L. y Song, H., 2011. Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. *Neuron*, 70, 687-702.
- Moriya, J., Chen, R., Yamakawa, J., Sasaki, K., Ishigaki, Y., Takahashi, T., 2011. Resveratrol improves hippocampal atrophy in chronic fatigue mice by enhancing neurogenesis and inhibiting apoptosis of granular cells. *Biol Pharm Bull.* 34, 354-9.
- Moriya, T., Horie, N., Mitome, M., Shinohara, K., 2007 Melatonin influences the proliferative and differentiative activity of neural stem cells. *J Pineal Res* 42, 411-8.
- Muto, J., Hosung, L., Uwaya, A., Isami, F., Ohno, M., Mikami, T., 2010. Morinda citrifolia fruit reduces stress-induced impairment of cognitive function accompanied by vasculature improvement in mice. *Physiol Behav* 101, 211-7.
- Park, H.R., Kong, K.H., Yu, B.P., Mattson, M.P., Lee, J., 2012. Resveratrol inhibits the proliferation of neural progenitor cells and hippocampal neurogenesis. *J Biol Chem* 287, 42588-600.
- Payne, J.K., 2006. The trajectory of biomarkers in symptom management for older adults with cancer. *Semin Oncol Nurs* 22, 31–35.
- Pereira, I., Dessai, S.N., Pinto, A., 2013. Vitamin E-Induced Changes in Glutamate and GABA Metabolizing Enzymes of Chick Embryo Cerebrum. *ISRN Neurol*.
- Ramírez, G., Benítez, G., Kempermann, G., 2007. Formación de neuronas nuevas en el hipocampo adulto: neurogénesis. *Salud Mental* 30, 12-19.
- Ramirez-Rodriguez, G., Ortiz-López, Ll, Domínguez-Alonso, A., Benítez-King, G.A., Kempermann, G., 2010. Chronic treatment with melatonin stimulates dendrite maturation and complexity in adult hippocampal neurogenesis of mice. *J Pineal Res* 50, 29-37.
- Ramis, M., Miralles, A., Terrasa, J.L., Sarubbo, F., Garau, C., Aparicio, S., Esteban, S., 2012. Comparative effects of chronic treatment with Resveratrol and α -tocopherol on cognitive ability in aged rats. *Federación Europea de Sociedades Fisiológicas*.
- Saharan, S., Jhaveri, D.J., Bartlett, P.F., 2013. SIRT1 regulates the neurogenic potential of neural precursors in the adult subventricular zone and hippocampus. *J Neurosci Res* 91, 642-59.

- Sarлак, G., Jenwitheesuk, A., Chetsawang, B., Govitrapong, P., 2013. Effects of melatonin on nervous system aging: neurogenesis and neurodegeneration. *J Pharmacol Sci* 20, 9-24.
- Seri, B., García-Verdugo, J.M., McEwen, B.S., Alvarez-Buylla, A., 2001. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J. Neurosci* 21, 7153–7160.
- Tan, D.X., Manchester, L.C., Sainz, R.M., Mayo, J.C., Leon, J., Hardeland, R., 2005. Interactions between melatonin and nicotinamide nucleotide: NADH preservation in cells and in cell-free systems by melatonin. *J Pineal Res* 39, 185–194.
- Velazquez, R., Ash, J.A., Powers, B.E., 2013. Maternal choline supplementation improves spatial learning and adult neurogenesis in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Neurobiol Dis* 58, 92–101.
- Wang, Z., Liu, D., Zhan, J., Xie, K., Wang, X., Xian, X., Gu, J., Chen, W., Hao, A., 2013. Melatonin improves short and long-term neurobehavioral deficits and attenuates hippocampal impairments after hypoxia in neonatal mice. *Pharmacol Res* 76, 84-97.
- Zawilska, J.B., Skene, D.J., Arendt, J., 2009. Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms. *Pharmacol Rep* 61, 383-410.
- Zhao, C., Teng, E.M., Summers, R.G., Ming, G.L., Gage, F.H., 2006. Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J. Neurosci* 26, 3–11.