



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**Efectos de la ausencia de la proteína STAT-1 sobre el proceso
neurogénico en el hipocampo adulto en el modelo murino
C57BL/6**

T E S I S

Que para obtener el título de Bióloga

P R E S E N T A

Rosa Carolina Casillas Silva

Director de tesis:

Dr. Gerardo Bernabé Ramírez Rodríguez

Asesora interna:

Dra. Leticia Morales Ledesma

México, D.F.

Febrero del 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
 "ZARAGOZA"
 DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
 PRESENTE.

Comunico a usted que la alumna **CASILLAS SILVA ROSA CAROLINA**, con número de cuenta **305082473**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **10 de febrero de 2016** a las **15:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE Dra. MARÍA ESTHER CRUZ BELTRÁN

Maria Esther Cruz Beltran

VOCAL Dr. GERARDO BERNABÉ RAMÍREZ RODRÍGUEZ*

Gerardo Bernabé Ramírez Rodríguez

SECRETARIO Dra. LETICIA MORALES LEDESMA

Leticia Morales Ledesma

SUPLENTE M. en IBSH. ANGÉLICA FLORES RAMÍREZ

Angélica Flores Ramírez

SUPLENTE Dra. LUCILA ÁLVAREZ BARRERA

Lucila Álvarez Barrera

El título de la tesis que presenta es: **Efectos de la ausencia de la proteína STAT-1 sobre el proceso neurogénico en el hipocampo adulto en el modelo murino C57BL/6.**

Opción de titulación: Tesis

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
 "POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
 México, D. F., a 03 de diciembre de 2015

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
 DIRECTOR



[Handwritten signature of Víctor Manuel Mendoza Núñez]

RECIBÍ
 OFICINA DE EXÁMENES
 PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.
 M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
 JEFE DE CARRERA

Dedicatoria

A mi Coco, cuyo significado en mi vida fue y siempre será más que un amor verdadero. Por enseñarme el amor a la naturaleza, a la vida. Siempre estás presente. Gracias por tus bendiciones y por tu amor.

A mi madre Rosario Silva, cuyo amor, valor, comprensión y apoyo han sido y seguirán siendo únicos e invaluable, por ser la mejor estudiante y la mejor maestra, por mostrarme que la vocación se da donde le permitimos florecer, por ayudarme a vencer mis miedos, porque siempre has creído en mí...

¡Gracias mamá!

A mi Lopita, tía consentidora, cuyo carácter me enseñó que la imprudencia y la disciplina a veces son dos armas que se pueden usar cuando los tiempos lo ameritan, que aún en tiempos de guerra podemos ser compasivos y amorosos, y que la abogacía no sólo es para los mártires. Gracias por amarme y apoyarme tanto, por brindarme durante tantos años el trabajo que me ayudó a crecer.

A mi abuelita Rosita, quién con su disciplina y trabajo, me ha enseñado el amor a la vida. Gracias por tu cariño.

A mi abuelo Carlos, el hombre que me enseñó a sonreír en los mejores y peores momentos, por quererme tanto y alentarme a seguir adelante

A mi abuelita Margarita, quien me ha hecho sentir como una verdadera nieta y cuyo amor, cariño y aliento, me han dado fuerza en todo momento.

A Mela, por ser la mejor compañía y la mejor consejera, por abrirme su corazón y enseñarme los valores y las verdades de la vida. Por siempre tu sonrisa...

A mis tíos Javier y Carmelita, por el apoyo y amor incondicionales que siempre han tenido conmigo, por ser para mí un ejemplo a seguir.

A mis tíos Carlos y a Margarita, por ser tan cálidos y amorosos, por compartir conmigo tanto durante tantos años, por creer en mí.

A mis tío Javier, tías Lourdes, Yuyis y Marce porque siempre han dibujado una sonrisa en mi vida y me han brindado su cariño.

A mi sobrino Sebastián, el regalo más bonito que recibido, el alma de nuestras vidas.

A mi hermana Rosario, con quién he compartido, librado y sostenido las batallas más duras de mi vida.

A mi padre José Ramón por el cariño que me ha dado.

A mis primos Ale, Carlos, Harim, Gaby, Chio, Eli, Dani, David, Laura, Christi, Karla, porque sin excepción me han mostrado su cariño y amor, y porque se han convertido en los mejores ejemplos de la superación.

A mi tía Hilda, quién me ha enseñado que la pasión más bonita es el amor a la vida, donde el amor propio también se emana a los demás.

A mi tío Cristóbal, el alma de la fiesta, el tío favorito. Gracias por sacarme siempre una sonrisa y por quererme.

A mis tíos Lilia, Carmelo, Alma y Gerardo por su cariño y apoyo.

A Evenlyn Demián porque me mostraste tu amistad en mis peores momentos. Gracias por brindarme un hogar en tiempos difíciles.

Al Dr. Gerardo Ramírez, quien confió en mí en este proceso de formación y con quién he podido compartir la ciencia con un sentido humano. Por ser un verdadero amigo en este trayecto y por dirigir esta orquesta científica.

A la Dra. Leticia Morales quién me ha apoyado incondicionalmente desde mi formación académica hasta mi formación profesional. Gracias por su amistad, cariño y paciencia por ser parte de esta obra.

A la Dra. Nelly Vega, quién me ha mostrado que la honestidad, paciencia y disposición son indispensables en la vida de cualquiera. Gracias por los consejos y apoyo brindados durante este trayecto.

A Leonardo Ortiz, el mejor maestro, cuya paciencia y tolerancia son invaluable. Gracias por hacerme sentir en casa, por tu amistad y sinceridad.

A Ariadna Gómez, la mujer más dulce del mundo con quién pude tener un apoyo incondicional durante este trayecto. Gracias por tu amistad, por motivarme.

A Rogelio Pérez, por estar conmigo y brindarme tu apoyo durante este trayecto, por enseñarme a ser paciente y a creer en mí.

A mis amistades Galy, Ross, Vane, Luis, Dani, Sara, Dalia, Isela, Fer, Anita, Viri, Lulú, Juanito, Pablo y Manuel por animarme para seguir adelante. Y a todas aquellas amistades que a lo largo de mi vida han estado presentes con honestidad y cariño.

A mis profesoras y profesores de la carrera quienes me abrieron camino en la biología.

A mi nación, porque el pequeño aporte de este trabajo de pie a nuevas siembras y cosechas del pensamiento científico y con ello el desarrollo de una mejor humanidad.

Agradecimientos

A la máxima casa de estudios, la UNAM. Por brindarme la mejor educación y las mejores etapas de mi vida.

Al cuerpo académico de la FES-Z, quienes me han ayudado a crecer en el ámbito formativo y profesional de mi carrera.

Al equipo del Laboratorio de Neurogénesis, encabezado por el Dr. Gerardo Ramírez-Rodríguez, del Instituto Nacional de Psiquiatría Dr. Ramón de la Fuente Muñiz (INPRFM). Por brindarme el espacio para mi formación profesional así como el apoyo para llevar a cabo este proyecto.

Al Dr. Marco Antonio Meraz Ríos del Centro de Investigación y estudios avanzados (CINVESTAV Zacatenco), por la donación de los animales utilizados en este proyecto.

Al equipo del Laboratorio de Biología de la Reproducción de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ) de la Dra. Leticia Morales Ledesma.

Al jurado de este proyecto:

Dra. María Esther Cruz Beltrán,

Dr. Gerardo Bernabé Ramírez Rodríguez,

Dra. Leticia Morales Ledesma,

M. en IBSH. Angélica Flores Ramírez y

Dra. Lucila Álvarez Barrera.

Por el tiempo que dedicaron a la revisión de este trabajo.

A Luis Meza y al equipo de anfitriones de la sala de Ciencia Recreativa del Museo Universum, así como al programa de becas, que me facilitó el dar continuidad a mi tesis como proyecto paralelo.

| | |
|---|-----------|
| RESUMEN ----- | 1 |
| INTRODUCCIÓN ----- | 3 |
| NEUROGÉNESIS EN EL GIRO DENTADO DEL CEREBRO ADULTO----- | 5 |
| PROPIEDADES DE LAS CÉLULAS MADRE ----- | 6 |
| ETAPAS DE LA NEUROGÉNESIS----- | 8 |
| PARTICIPACIÓN DE PROTEÍNAS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR PARA LA GENERACIÓN DE NUEVAS NEURONAS EN EL HIPOCAMPO ----- | 12 |
| EL PROCESO NEUROGÉNICO Y SU POSIBLE RELACIÓN CON LA VÍA JAK-STAT----- | 18 |
| <i>Vía de señalización JAK-STAT</i> ----- | 19 |
| <i>STAT1</i> ----- | 23 |
| STAT1 Y NEUROGÉNESIS----- | 25 |
| JUSTIFICACIÓN ----- | 28 |
| HIPÓTESIS ----- | 30 |
| OBJETIVO GENERAL ----- | 31 |
| OBJETIVOS PARTICULARES ----- | 31 |
| MATERIAL Y MÉTODOS ----- | 32 |
| ANIMALES ----- | 32 |
| TRATAMIENTO----- | 32 |
| SACRIFICIO ----- | 33 |
| CORTES CORONALES ----- | 33 |
| INMUNOHISTOQUÍMICAS ----- | 34 |
| <i>Proliferación</i> ----- | 35 |
| <i>Sobrevivencia</i> ----- | 36 |
| <i>Neuroblastos y neuronas inmaduras.</i> ----- | 37 |
| <i>Neuronas granulares inmaduras</i> ----- | 38 |
| <i>Células madre tipo glía radial</i> ----- | 38 |
| <i>Células madre de la glía radial, células del tipo 2a y 2b</i> ----- | 39 |
| MONTAJE EN PORTAOBJETOS ----- | 39 |
| CUANTIFICACIÓN CELULAR ----- | 40 |
| ANÁLISIS ESTADÍSTICO----- | 44 |
| RESULTADOS ----- | 45 |

| | |
|--|-----------|
| EFFECTOS DE LA AUSENCIA DE LA PROTEÍNA STAT1 SOBRE EL PROCESO NEUROGÉNICO EN EL HIPOCAMPO ADULTO EN EL MODELO MURINO C57BL/6.----- | 45 |
| PROLIFERACIÓN CELULAR ----- | 45 |
| SOBREVIVENCIA CELULAR----- | 47 |
| ESTADIOS INTERMEDIOS DEL PROCESO NEUROGÉNICO ----- | 49 |
| NEURONAS GRANULARES INMADURAS ----- | 53 |
| CÉLULAS MADRE TIPO GLÍA RADIAL ----- | 56 |
| CÉLULAS MADRE DE LA GLÍA RADIAL, CÉLULAS DEL TIPO 2A Y CÉLULAS TIPO 2B ----- | 58 |
| CONCLUSIÓN ----- | 75 |
| PERSPECTIVAS ----- | 76 |
| <i>Glosario de términos y abreviaturas</i> ----- | 78 |
| <i>BIBLIOGRAFÍA</i> ----- | 82 |

RESUMEN

La regeneración de nuevas neuronas en el cerebro postnatal y adulto de mamíferos se lleva a cabo en el giro dentado del hipocampo, una región del cerebro donde se han encontrado procesos cognitivos importantes los cuales son la memoria y aprendizaje.

Se sabe que la participación de determinadas proteínas y diversos factores propician una adecuada regeneración de nuevas neuronas. De ahí la importancia de estudiar los mecanismos moleculares que operan en el proceso neurogénico.

En el presente trabajo se realizó una comparación de dos muestras de roedores de la cepa C57BL/6, donde una muestra no expresa la proteína STAT1 (debido a que los roedores fueron modificados genéticamente) mientras que la otra muestra permaneció intacta de manera que no se afectó la producción natural de la proteína STAT1 (grupo control).

Los resultados mostraron que los animales que no produjeron la proteína (*knock-out* STAT1), disminuyeron sus poblaciones celulares en las etapas de proliferación, sobrevivencia, diferenciación e integración sináptica, en comparación al grupo control, a excepción de las etapas iniciales del proceso neurogénico, donde se observa que las células madre tipo glía radial y tipo 2a y 2b se encontraron en mayor proporción en los animales *knock-out* STAT1.

Lo anterior indica que la proteína STAT1 es de gran importancia para que se lleve a cabo un adecuado proceso neurogénico. La falta de la proteína STAT1 propicia un desequilibrio en la señalización molecular para la regeneración de nuevas neuronas en el giro dentado del hipocampo adulto.

Introducción

El cerebro adulto del ratón, así como el de otros mamíferos, es un órgano dinámico que posee células de distinta naturaleza, las cuales se pueden agrupar en dos linajes principales: las células gliales y neuronas (Kriegstein y Alvarez-Buylla, 2009). Cada tipo celular posee propiedades que permiten al organismo desarrollar una adecuada homeostasis.

Se ha mostrado que en los mamíferos adultos algunas células gliales, tales como las glía radiales (GR) en desarrollo y subpoblaciones específicas de astrocitos funcionan como progenitores primarios o células troncales neurales (NSCs, por sus siglas en inglés) (Kriegstein y Alvarez-Buylla, 2009) cuya localización se halla en dos zonas principales: en la zona subventricular (ZSV) de los ventrículos laterales y el bulbo olfatorio (BO), así como en la zona subgranular (ZSG) del giro dentado (GD). Ver Figura 1.

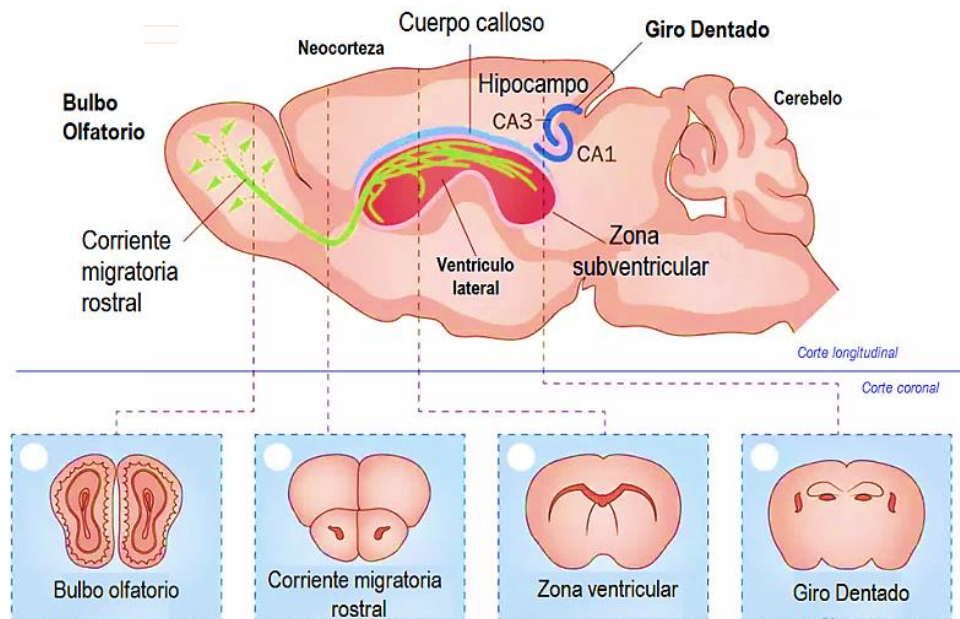


Figura 1 Principales regiones neurogénicas del cerebro postnatal y adulto. Vista de corte longitudinal y corte coronal. Tomado y modificado de Ziegler y colaboradores 2015.

Debido a la capacidad neurogénica del cerebro adulto, existe un gran interés por conocer cuáles son los procesos y factores que regulan el origen y división de los precursores celulares que dan inicio a las etapas sucesivas que involucran la proliferación (las células presentan un ciclo celular en el cual las células replican todos sus componentes y se dividen en dos células hijas), sobrevivencia (señalización molecular activa y continua que inhibe la apoptosis, un mecanismo de autodestrucción de la célula), diferenciación (una o ambas células hijas logran adquirir un tipo celular diferente al de la célula madre) e integración de las neuronas en los circuitos neuronales existentes (Ramírez-Rodríguez y *cols.*, 2007, und Halbach, 2007, Dale y Rang, 2008).

Neurogénesis en el Giro Dentado del Cerebro Adulto

La neurogénesis en el giro dentado del cerebro adulto es el resultado de la persistencia de la neurogénesis postnatal temprana (el estado de transición que hay entre la neurogénesis embrionaria y adulta), pues en el periodo postnatal existen dos tipos de progenitores derivados de la matriz dentada secundaria: un tipo de progenitores migran debajo de la superficie pial y forman la capa celular granular (CCG) por el día postnatal 5 (P5) en ratas, y el otro tipo migra del hilus prospectivo o de la matriz dentada terciaria (Seki y cols., 2011).

Las células recién nacidas en el hilus son adheridas hacia la parte interior de la CCG y forman su cubierta interna (Altman y Bayer, 1990). Conforme el desarrollo postnatal procede, la zona proliferante hilar es confinada a la ZSG en la etapa adulta, ya que en esta se desarrolla un microambiente especial llamado nicho, el cual posee la habilidad para mantener las propiedades de las células madre y regular su diferenciación (Seki y cols., 2011). Ver Figura 2.

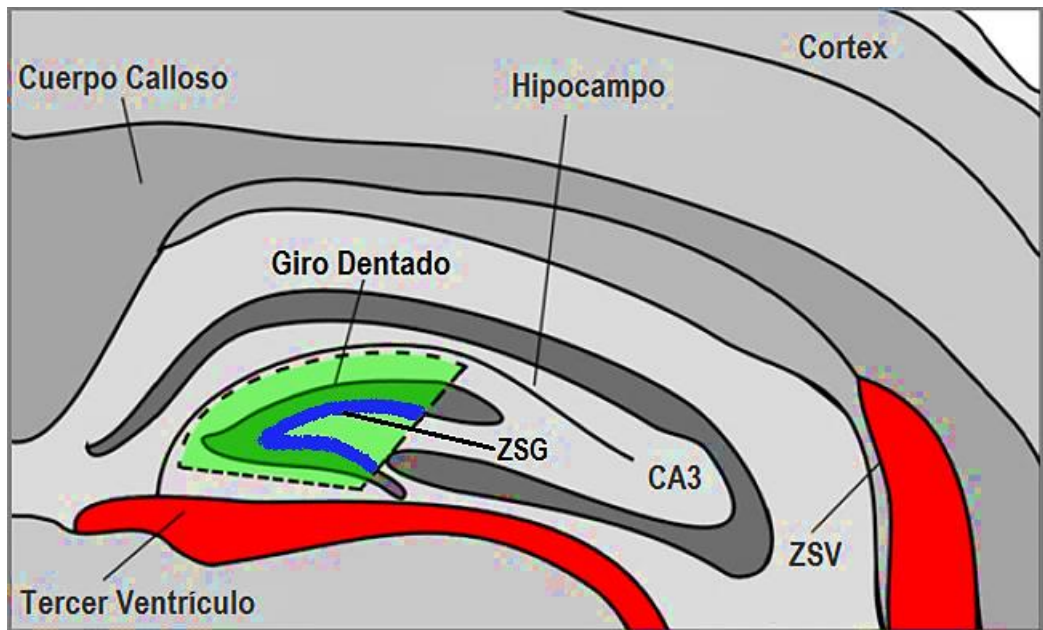


Figura 2. Giro dentado del hipocampo, visión coronal. Abreviaturas: ZSG (zona subgranular), ZSV (zona subventricular), CA3 (*Cornu Ammonis*, asta de Amón 3). Tomado y modificado de Babu y colaboradores 2007.

Propiedades de las células madre

A lo largo de su desarrollo, las células progenitoras adquieren capacidad para dar origen a distintos tipos celulares y presentan propiedades que logran su identificación. Dentro de sus propiedades existe la expresión de moléculas que regulan su actividad a lo largo del proceso neurogénico, y que en ocasiones se encuentran presentes tanto en las etapas embrionaria, postnatal temprana y en la etapa adulta. Ver Tabla 1, (Seki y cols., 2011).

Tabla 1. Moléculas reguladoras de la neurogénesis en las etapas embrionaria/postnatal y adulta. Tomada y modificada de Seki y colaboradores 2011.

| Molécula | Etapas embrionaria/postnatal | Etapas adulta |
|-----------------------|---|--|
| Shh/Gli | Han y cols., (2008) | Lai y cols., (2003) |
| Wnt | Breunig y cols., (2008) Lee y cols., (2000) Zhou y cols., (2004) Machon y cols., (2007) Galceran y cols., (2000) Solberg y cols., (2008) Roelink (2000) | Machold y cols., (2003) Lie y cols., (2005) |
| Lhx EMX2 | Mangale y cols., (2008) Pellegrini y cols., (2006) Yoshida y cols., (1997) Oldekamp y cols., (2004) Zhao y cols., (2006) | Hong y cols., (2007) |
| SDF-1 (CXC112)/CXCR4 | Lu y cols., (2002) Bagri y cols., (2002) Li y cols., (2009) | Kolodziej y cols., (2008) |
| Notch Reelina | Breunig y cols., (2007) Foster y cols., (2002) Foster y cols., (2006) Sibbe y cols., (2009) Li y cols., (2009) | Salama-Cohen y cols., (2006) Gong y cols., (2007) Muller y cols., (2009) |
| Mash1 (Asc1) | | Kim y cols., (2007) Jessberger y cols., (2008) |
| Neurogenina NeuroD | Galichet y cols., (2008) Miyata y cols., (1999) Schwab y cols., (2000) Liu y cols., (2000) | Ozen y cols., (2009) Gao y cols., (2009) |
| DISC1 | Enomoto y cols., (2009) Meyer y Morris (2009) | Kim y cols., (2009) Duan y cols., (2007) |

Las células progenitoras dan origen a los glioblastos, que en la etapa de proliferación son positivos a la proteína acídica fibrilar glial (GFAP por sus siglas en inglés). Los glioblastos que se encuentran en la región hiliar postnatal son integrados en la ZSG y posteriormente vienen a ser células gliales radiales, donde una pequeña población de las células proliferativas astrocíticas se diferencia en células gliales radiales.

Sin embargo, la mayoría de las células proliferativas similares a los glioblastos, dan origen a las neuronas (Namba y cols., 2005) y pueden distinguirse por la expresión de SOX2 también conocida como SRY-box 2 (Sex determining Region Y-box 2 por sus siglas en inglés) y GFAP (Seki y cols., 2011).

Etapas de la neurogénesis

En el año 2004 Kemperman y colaboradores, describieron que las diferentes etapas del proceso neurogénico en el hipocampo adulto se pueden agrupar en seis tipos celulares principales:

En el primer estadio se hayan las células del tipo 1: aquellas células madre del tipo glía radial de carácter multipotente, cuya morfología se caracteriza por un soma semi-triangular que presenta largos y fuertes procesos apicales que se desplazan dentro de la CCG y alcanzan la capa molecular (CM) (Figura 3), donde se dispersan los procesos más pequeños que los suceden.

Estas células expresan la proteína GFAP que es un marcador astrocítico, y la proteína nestina que es un marcador de células no diferenciadas, estas proteínas son expresadas por las dos terceras partes de las células en la ZSG.

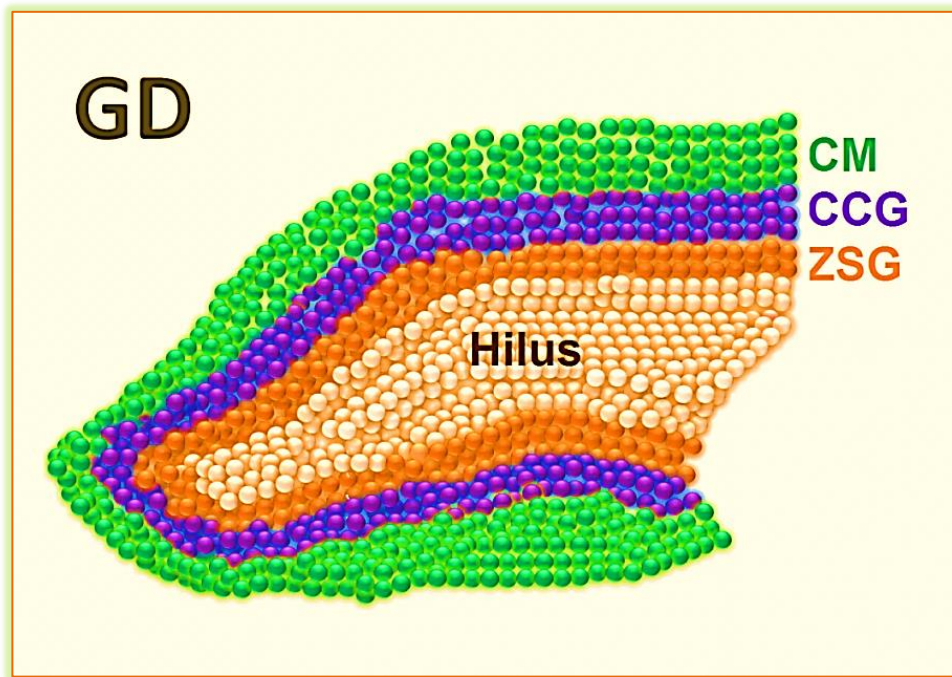


Figura 3. Capas celulares presentes en el giro dentado (GD) del hipocampo adulto: capa molecular (CM), capa celular granular (CCG), zona subgranular (ZSG).

Las células positivas a GFAP se denominan como células del tipo 1, logran dividirse de manera asimétrica y dan origen a dos células hijas, llamadas células del tipo 2 que pasan a ser parte del segundo y tercer estadios donde presentan una corta prolongación de procesos muy pequeños que están orientados tangencialmente; su núcleo es denso y de forma irregular, estas características apuntan que pueden realizar una migración tangencial. Las células del tipo 2 no expresan GFAP, sin embargo son altamente proliferantes.

En el segundo estadio, las células del tipo 2 que son exclusivamente positivas a nestina, [una proteína del tipo filamentoso, la cual es codificada por el gen NES (Dahlstrand y cols., 1992)] y reciben la denominación de células tipo 2a.

En el tercer estadio las células se denominan 2b ya que son positivas tanto a nestina como a doblecortina [DCX, por sus siglas en inglés, es una proteína asociada a los microtúbulos de las células, expresada en precursores neuronales y en neuronas inmaduras (Brown y cols., 2003)].

En el cuarto estadio se presentan las células del tipo 3, las cuales son positivas a DCX, sin embargo son negativas a nestina. Poseen de igual manera una gran capacidad proliferante. En su morfología, el núcleo mantiene una forma ovalada.

La molécula de adhesión celular neural de forma polisilada (PSA-NCAM, por sus siglas en inglés) también puede encontrarse (en menor proporción) en las células del tipo 2.

En el quinto estadio se presentan las células postmitóticas inmaduras, que persisten al tercer día de haber transcurrido la división celular, las cuales aún expresan DCX, pero también expresan la proteína de unión a calcio (Ca^{2+}) denominada calretinina.

En su morfología las células mantienen una posición vertical con un núcleo semi-triangular u ovalado, y cuya dendrita apical es claramente visible.

Posteriormente estas células inmaduras neuronales atraviesan un proceso estricto de selección ya sea para ser reclutadas y llevar a cabo su función o en su defecto para eliminadas.

En el sexto estadio, se integran las células granulares maduras, que también expresan calbindina (una proteína de unión a Ca^{2+}), sin embargo toma de cuatro a siete semanas que las células presenten

características similares a las de las células postmitóticas maduras. En este tiempo las nuevas neuronas se encontrarán integradas a los circuitos neuronales existentes. Ver Figura 4.

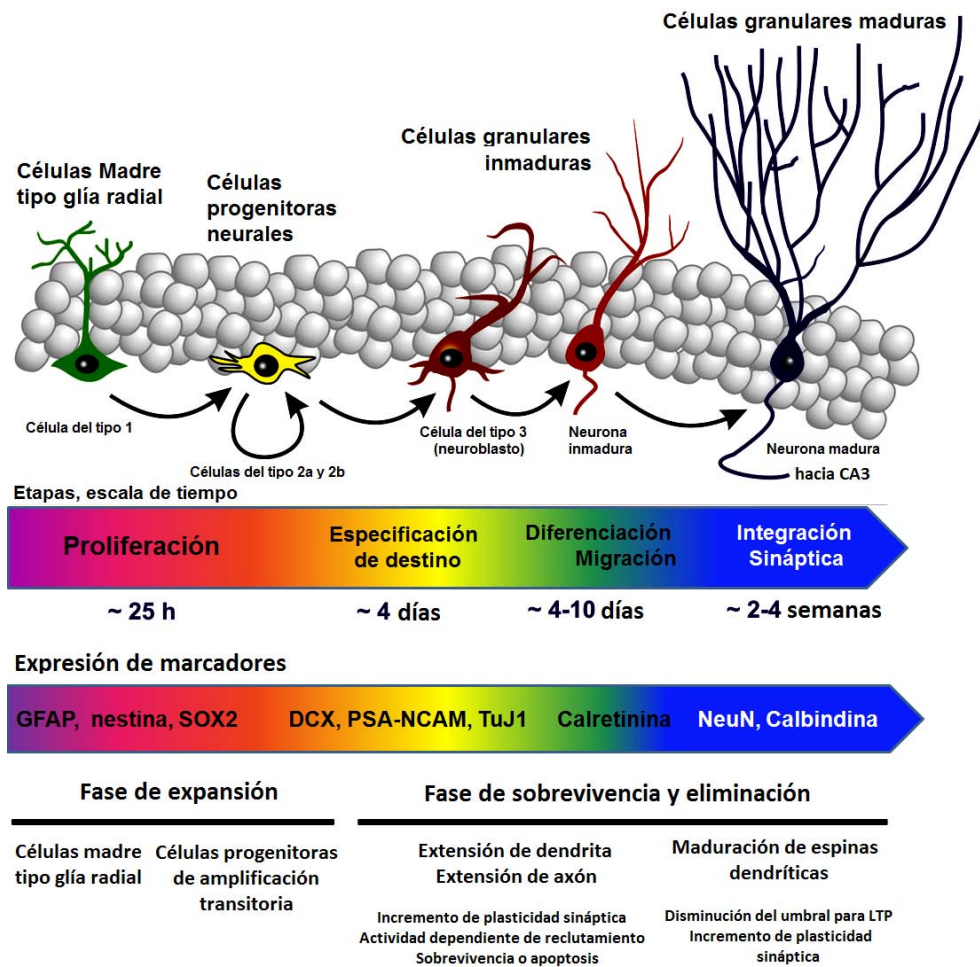


Figura 4. Esquema que ilustra las etapas de la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo adulto. Tomado y modificado de Lucassen y colaboradores 2010. Abreviaciones usadas: Calbindina, Calretinina; DCX: doblecortina; GFAP: proteína ácida fibrilar glial; NeuN: antígeno nuclear neuronal; Nestina: proteína codificada por el gen NES; PSA-NCAM: forma poliasilada de la molécula de adhesión celular neural; TuJ1: β -tubulina tipo III; SOX2: SRY-box 2.

Participación de proteínas de señalización celular para la generación de nuevas neuronas en el hipocampo

Los diversos factores reguladores del proceso neurogénico postnatal y adulto, pueden ser extrínsecos e intrínsecos, están involucrados con las propiedades integrativas de las células nerviosas y las moléculas de la matriz extracelular, que en conjunto con otros tipos celulares conforman el nicho neurogénico (Bordey, 2006).

Las proteínas participantes en la regulación del proceso neurogénico y constructoras de este nicho pueden ser moléculas inhibitorias o moléculas proneurogénicas que activan diversas vías de señalización.

Uno de los aspectos importantes a tomar en cuenta sobre el proceso neurogénico postnatal y adulto es que en muchos de los casos las vías de señalización también han estado involucradas en el proceso neurogénico en la etapa del desarrollo (Seki y cols., 2011).

Dentro de los más importantes tipos de proteínas que regulan el proceso neurogénico tenemos a la proteína Shh (del inglés sonic hedgehog, o proteína sónica del erizo), que pertenece a la familia de proteínas de señalización Hedgehog, las cuales se encargan de diversas funciones durante el desarrollo de los vertebrados.

La proteína Shh se encuentra implicada tanto en el proceso neurogénico embrionario, especialmente en el desarrollo de la formación del tubo neural dorsoventral, así como en el proceso neurogénico postnatal, para dar continuidad a la proliferación de células troncales neurales y la sobrevivencia de células gliales y neuronales.

La ausencia o disfunción de esta proteína causa holoprosencefalia o ciclopía (malformación cerebral del lóbulo frontal del cerebro y anomalías faciales severas tales como la fusión de los ojos), debido a la fallida separación de los lóbulos temporales del prosencéfalo tanto en humanos como en roedores (Ho y Scott, 2002).

La proteína Shh está involucrada en la determinación del destino celular en la etapa de desarrollo. Confiere competencia proliferante a las NSCs tanto de manera temporal como espacial, por la regulación de la expresión del protooncogen viral homólogo de mielocitomatosis presente en el neuroblastoma, (N-Myc por sus siglas en inglés), y las proteínas reguladoras del ciclo celular Ciclina D1, E2f1 y E2f2 (cuyos nombres de estas últimas dos se atribuyen a los genes que las codifican) (Wen y cols., 2009).

Por otra parte la proteína Wnt (el nombre es una contracción del inglés *Wingless Int*), de manera general se sabe que está implicada en el control del crecimiento celular y durante la diferenciación en el desarrollo del sistema nervioso central (SNC), así como también en la inducción de la diferenciación neuronal y astrogliar, aunque suprime la diferenciación oligodendroglial.

Wnt promueve la proliferación de células precursoras neurales (NPCs por sus siglas en inglés) tempranas así como también desempeña un papel positivo en la fase neurogénica, en las condiciones epigenéticas tanto en las NPCs de estados tempranos y tardíos (Wen y cols., 2009).

Otra de las proteínas de señalización que resulta importante es Notch (llamada así porque provoca la aparición de surcos- del inglés notches- en los bordes de las alas de *Drosophila melanogaster*), la cual resulta clave en el desarrollo del SNC así como también se encuentra implicada en la determinación del destino celular.

Notch al igual que muchas otras moléculas también es multifuncional, regula el mantenimiento de la renovación de progenitores neuronales, la apoptosis, la determinación del destino celular debido a que inhibe el compromiso neuronal, así como también orienta el destino glial y astrocítico, el compromiso oligodendrocítico, y la diferenciación celular en la morfogénesis y migración neural.

En el SNC, la señal de Notch activa la expresión HES, (sus siglas en inglés de *hairy and enhancer of Split*) la cual es una familia de genes, cuyos miembros se encuentran involucrados en el proceso neurogénico, tales como es el Hes6, el cual está implicado en el desarrollo del neuroblasto y está expresado en NSCs y en células progenitoras (Nam y cols., 2016).

Por otra parte Hes1 y Hes5 pertenecen a los represores transcripcionales del motivo estructural de proteínas base hélice-bucle-hélice (bHLH por sus siglas en inglés) (Wen y cols., 2009), donde a su vez este último grupo de factores de transcripción resulta relevante para el proceso neurogénico.

Estudios han mostrado que la proliferación, especificación y la diferenciación de las NSCs se ve influenciada por los factores de transcripción bHLH, que median la unión del ácido desoxidorribonucleico (ADN) así como funciones de dimerización.

bHLH se encuentra presente en las NSCs que están destinadas a ser neuronas, desde la etapa de proliferación hasta completar la transición de la neurogénesis (Seki y cols., 2011).

La neurogénesis es mediada por dos grandes categorías de los factores bHLH:

1) los factores proneurales bHLH, tales como neurogenina1 y 2 así como el factor de determinación neural de *Drosophila* homólogo en mamíferos (MASH por sus siglas en inglés), involucrados en el inicio de la neurogénesis y el factor de diferenciación neurogénica (NEUROD por sus siglas en inglés) que interviene en la diferenciación neuronal.

2) El dominio 2 de bHLH mediante la interacción con las secuencias de ADN, y la transactivación por los heterodímeros de bHLH con coactivadores, tales como la proteína de unión p300 y la proteína de unión a CREB (CBP por sus siglas en inglés) y el factor asociado a los coactivadores p300/CBP (PCAF por sus siglas en inglés), el cual recluta un largo complejo que conforma una maquinaria basal transcriptor (Seki y cols., 2011).

Las proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs, por sus siglas en inglés) son una subclase de la superfamilia de factores de crecimiento y transformación beta (TGF β por sus siglas en inglés).

Las BMPs están involucradas en muchos procesos de desarrollo, que incluyen la proliferación celular, la diferenciación, apoptosis y las interacciones intercelulares durante la morfogénesis en una determinada dotación de genes de manera dependiente.

Estas son reclutadas para los promotores de genes responsivos mediante una alta afinidad de cofactores, los cuales se unen al promotor STAT3 que transactiva el gen de GFAP.

La señal de BMP también inhibe la transformación desde el ectodermo primitivo, y establece al tejido neural; la señal de BMP tiene una influencia positiva en la regulación de la formación de tipos celulares neurales dorsales, inducen la correcta especificación de astrocitos así como la proliferación de precursores de astrocitos preexistentes y la inhibición de la especificación de oligodendrocitos (Wen y cols., 2009).

Otra de las cosas que resultan relevantes en la señal de BMP, es que esta cruza e interacciona con otras vías claves del desarrollo tales como Wnt y Shh para coordinar la proliferación y el patrón celular, seguida de la formación de un número apropiado de tipos de neuronas diferenciadas (Wen y cols., 2009).

Otra proteína importante en la regulación del proceso neurogénico es la proteína STAT3 que pertenece a la familia de proteínas STAT (transductores de la señal y activadores de transcripción).

La proteína STAT3 es un miembro importante de proteínas citoplasmáticas que junto con el dominio homólogo 2 del protooncogen de sarcoma (Src) (SH2 por sus siglas en inglés) actúa en la señal de mensajeros y factores de transcripción.

La señal mediada por STAT3 es uno de los principales mecanismos que promueven la diferenciación de astrocitos por la inhibición de la diferenciación neuronal en el cortex embrionario.

STAT3 puede promover la proliferación de las NSCs al tiempo en que la señal de BMP y Notch son activadas para la inducción de la astrogénesis.

Cualquier alteración en la vía durante la etapa de desarrollo del SNC embrionario, puede dejar graves defectos o el desarrollo de tumores neuroectodérmicos primitivos como el meduloblastoma debido a una mala diferenciación (Wen y cols., 2009).

Por otra parte las cinasas de tirosina: el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF por sus siglas en inglés) junto con el factor de crecimiento epidérmico (EGF por sus siglas en inglés), son consideradas dentro de un grupo importante de factores para el proceso neurogénico.

En precursores neurales la señal de PDGF/EGF activa la vía JAK-STAT por medio de las cinasas de tirosina JAK-1 y Tyk2, y se da una translocación nuclear de dos factores de transcripción citoplasmáticos latentes: STAT1 y STAT2.

Tanto PDGF y EGF promueven la diferenciación neuronal, así como la oligodendrogénesis en NSCs comprometidas, en el tiempo de la promoción de la proliferación durante la fase temprana del desarrollo del SNC (Wen y cols., 2009).

El proceso neurogénico y su posible relación con la vía JAK-STAT

El proceso neurogénico es regulado por programas genéticos y moleculares específicos. Una de las vías que recientemente ha atraído la atención es la vía de señalización JAK-STAT, cuyos estudios recientes muestran su implicación tanto en la gliogénesis, astrogénesis y recientemente en la neurogénesis.

La vía de señalización JAK-STAT es importante debido a que se ha conservado en el linaje evolutivo de los eucariotas y se encuentra implícita en diversos procesos tales como el crecimiento, sobrevivencia, desarrollo y diferenciación celular. Su desregulación puede estar asociada con patologías tales como el cáncer, desórdenes del sistema inmune y enfermedades cardiovasculares (Nicolas y *col.s.*, 2013).

En el SNC se encuentra la vía JAK-STAT, asociada con la regulación de genes durante el desarrollo, la liberación de hormonas, la inflamación o la tumorigénesis. Las proteínas involucradas en la vía JAK-STAT, se hallan expresadas en diversas áreas del cerebro, tales como la corteza cerebral, el hipocampo, el hipotálamo y el cerebelo (Nicolas y *col.s.*, 2013).

La expresión de estas proteínas varía durante el desarrollo, ya que son expresadas en altas cantidades durante los estadios embrionarios (particularmente JAK2, JAK1, STAT3, STAT6 y STAT1) y su expresión disminuye durante el crecimiento y la etapa adulta (Nicolas y *col.s.*, 2013).

Se ha descrito la participación de JAK2 y STAT3 en la plasticidad sináptica del hipocampo (proceso que implica la adquisición del aprendizaje y la memoria) (Mahmoud y Grover, 2006).

También se ha visto que la disfunción de la vía JAK-STAT está íntimamente relacionada con los procesos de inflamación y la sobrevida de neuronas y la glía (Planas y *cols.*, 2006, Regis y *cols.*, 2008, Tsai y *cols.*, 2011).

Esto por consecuencia involucra a la vía en la mayoría de los desórdenes del cerebro tales como la epilepsia, el cáncer del cerebro, lesiones, isquemia cerebral y desórdenes degenerativos tales como la enfermedad de Alzheimer (Nicolas y *cols.*, 2013, Buckingham y *cols.*, 2009, Chiba y *cols.*, 2009).

Vía de señalización JAK-STAT

La vía JAK-STAT es la abreviación que se le da a la vía de señalización en las que se encuentran involucradas dos familias de proteínas: la familia Janus cinasa (JAK) que comprende cuatro tipos de cinasas de tirosinas (JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2), y la familia STAT que contiene siete factores de transcripción (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B y STAT6), (Nicolas y *cols.*, 2013). Esta vía está involucrada principalmente en la regulación de la expresión de genes.

La vía JAK-STAT involucra la activación de receptores por polipéptidos tales como las hormonas, factores de crecimiento o citocinas las cuales dan lugar a la activación de JAK, la cual fosforila a las STAT que entonces son dimerizadas, es decir forman una especie química compuesta por dos moléculas STAT.

La STAT dimerizada es translocada al núcleo donde se une al ADN y regula su transcripción (Figura 5, Nicolas y *cols.*, 2013). El control de la actividad de esta vía involucra diferentes mecanismos que incluyen la regulación del estado de fosforilación de JAK y STAT por las fosfatasa respectivas.

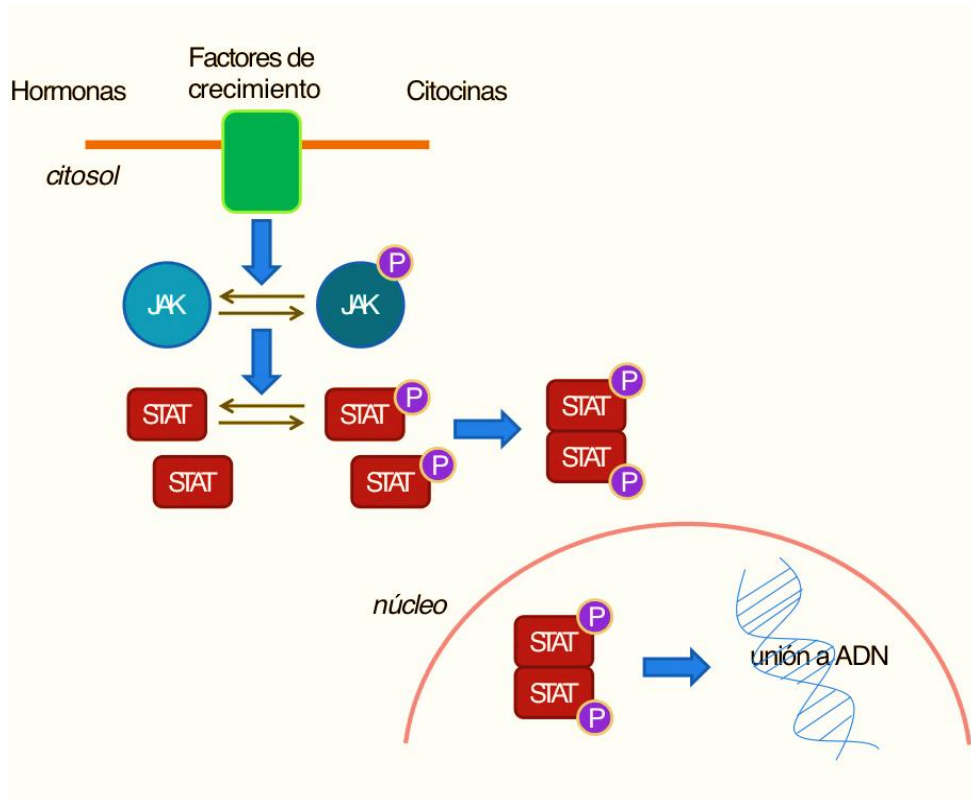


Figura 5. Vía de señalización canónica JAK-STAT en el SNC. Hormonas, factores de crecimiento y citocinas pueden inducir la fosforilación de JAK y la activación de STAT las cuales se homo o heterodimerizan. Los dímeros (moléculas formadas por dos subunidades estructuralmente similares) son translocados al núcleo donde se unen al ADN. Tomado y modificado de Nicolas y colaboradores 2013.

Dentro de algunos estudios en los que se destaca la participación de los miembros de la familia STAT en el proceso neurogénico se encuentran los siguientes:

Las citocina interleucina-15 (IL-15), es expresada por las NSCs en la ZSV, e induce la activación de STAT1, STAT3 y STAT5 para favorecer la proliferación celular, que es bloqueada por los inhibidores JAK (Bauer, 2009, Gómez-Nicola y cols., 2011).

La lectina recombinante de rata puede regular la proliferación celular en el GD del ratón adulto por la vía de activación de STAT3 y la cinasa treonina/serina (Akt por sus siglas en inglés), tanto *in vitro* como *in vivo* (Garza y cols., 2008).

La acción del interferón beta (IFN- β) (el tratamiento por elección para la esclerosis múltiple) tienen una acción controversial en la proliferación y diferenciación de las células progenitoras neurales (NPCs, por sus siglas en inglés) murinas, ya que logra inhibir, estimular o incluso no repercutir en la proliferación de las NPCs. En ambos casos, logra la activación de las STAT (Arscott y cols., 2011, Hirsch y cols., 2009, Lum y cols., 2009, Nicolasy cols., 2013).

Por otra parte en 2009 Müller y colaboradores muestran que el factor neurotrófico ciliar (CNTF por sus siglas en inglés) induce la señal de STAT3, que es esencial para la formación y para el mantenimiento de la ZSG del GD adulto.

En el mismo sentido, el factor estimulador de la colonia de granulocitos (G-CSF, por sus siglas en inglés), induce la proliferación mediada por su receptor y la diferenciación de los precursores neurales en los cultivos de NSCs humanas y en el cerebro adulto de la rata *in vivo*, a través de una interacción recíproca con el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés) y la activación de STAT3 y STAT5 (Jung y cols., 2006).

Sin embargo, se ha reportado también el papel controversial de la vía JAK-STAT: el IFN- β que sirve para el tratamiento de células de neuroblastoma SH-SY5Y humano, activa STAT1 y STAT3, e incrementa la apoptosis y muerte celular, acompañados por la liberación del citocromo C y la posterior activación de caspasa 9 y procaspasas 3 y 7 (Dedoni y cols., 2010).

De manera similar el interferón gama (IFN- γ), el cual también activa STAT1, reduce la proliferación e induce apoptosis por la sobre-regulación de la señal de p21 y caspasa 3 en las NSCs (Mäkelä y cols., 2010).

Por otra parte la interleucina nueve (IL-9) protege a las neuronas neonatales de la apoptosis. STAT1 y STAT3 son activadas después del tratamiento *in vitro* e *in vivo* de IL-9 y el AG490 (un inhibidor de la vía JAK-STAT previene este efecto anti-apoptótico) (Fontaine y cols., 2008).

Por lo anterior es importante resaltar que también los estudios deben tomar en cuenta el efecto temporal, ya que una rápida función no-transcriptora de las STAT puede distinguirse desde su efecto más prolongado en la transcripción (Nicolas y cols., 2013).

Tal es el caso en que la activación rápida de STAT puede dar lugar a la activación de caspasas, pero que también da lugar a la transcripción de proteínas no apoptóticas (Schindler y cols., 2007).

STAT1

Fue uno de los primeros genes identificados en las vías de traducción de señales del interferón (IFN, por sus siglas en inglés) en las células de los mamíferos (Meraz y cols., 1996) y se localiza junto con STAT4 en el cromosoma 2 del genoma humano (Lim y Cao, 2006) o propiamente en la región denominada 2q12-33 y en el ratón en el cromosoma 1 (Ihle, 2001).

STAT1 es inducida por los interferones alfa (α), beta (β) o gama (γ), y se encuentra involucrada en la apoptosis, la respuesta anti-viral y anti-bacteriana, en la inhibición del crecimiento y en la supresión de tumores, entre otras funciones (Lim y Cao, 2006).

Su activación es rápida, con un máximo acumulado en el núcleo durante 30 minutos, que abarca de un 20 a un 25% del total de STAT1, de manera que es rápidamente inactivada por la defosforilación, lo que resulta en que la vida media de STAT1 fosforilada sea menor a los 15 minutos (Lim y Cao, 2006).

La proteína STAT1 es de gran interés ya que su mensajero se encuentra expresado en el giro dentado del hipocampo (región neurogénica del cerebro adulto) (Figura 6) [Allen Brain Atlas <http://mouse.brain-map.org/gene/show/20608>].

En 1996 Méraz y colaboradores desarrollaron una cepa de ratón *knock out* (KO, por sus siglas en inglés, cuyo significado en el deporte significa fuera de lugar, y que en ciencia se utiliza para referirse a un organismo que ha sido modificado genéticamente, donde uno o varios genes son eliminados totalmente, lo que en consecuencia elimina la función propia de estos mismos; por ejemplo: la producción de determinadas

moléculas) para la proteína STAT1, cuyo gen se encuentra deletado.

Los roedores KO-STAT1 en apariencia y medidas, no difiere de su control (animal del tipo silvestre o intacto). En un principio el animal KO-STAT1 fue diseñado para evaluar la función de STAT1 en el sistema inmune. Ahora el animal KO-STAT1, es una excelente opción para poder evaluar la función de STAT1 en el proceso neurogénico.

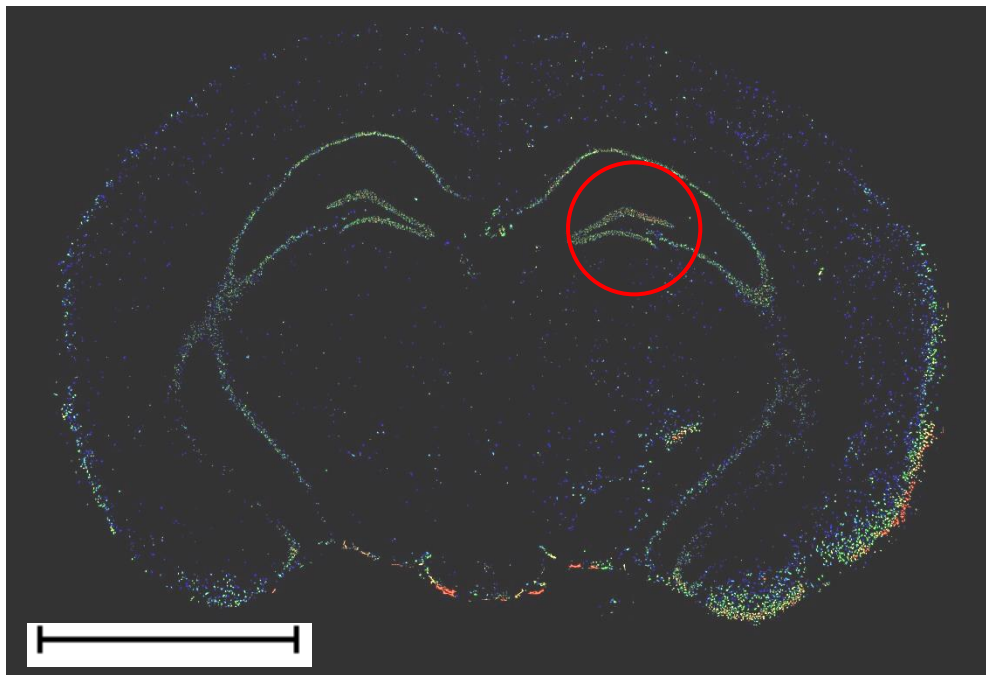


Figura 6. Fotografía de corte coronal que muestra la expresión del mensajero de la proteína STAT1 en el giro dentado del cerebro adulto del ratón C57BL/6; técnica por hibridación in situ. Observe la ZSG y la CCG del GD rodeado por el círculo rojo. Barra de calibración 2608 μ Tomado del Allen Brain Atlas. Referencia en catálogo: GeneStat1Probe Type RNA Probe Orientation Antisense, Plane of Section coronal Treatments ISH Specimen 2402, Organism Mus musculus, Strain: C57BL/6J, Age56, Sex: M, Stat1 - RP_040507_01_E06 - coronal, <http://mouse.brain-map.org/gene/show/20608>, Experiment 2635.

STAT1 Y NEUROGÉNESIS

Debido a su papel en diferentes procesos de regulación celular, STAT1 comienza a ser un punto de atención sobre el proceso neurogénico.

Recientes estudios muestran que existen vías de señalización en las que la proteína STAT1 participa a través de la regulación de otras moléculas que influyen en el desarrollo de células precursoras.

En el año de 2010 el grupo de estudio de Sun y colaboradores mostró que existe una conexión entre las vías de señalización del IFN- γ y la señalización de Shh.

Al realizar cultivos de células precursoras neuronales granulares primarias (GNP por sus siglas en inglés) observaron que el IFN- γ induce una rápida transcripción de Shh y que a su vez esta resulta ser resistente a la inhibición de síntesis de proteínas.

Por otra parte en un análisis de inmunoprecipitación, mostraron que existe una unión directa de STAT1 al promotor Shh. Observaron que el tratamiento de células GNP con IFN- γ incrementó la proliferación celular de manera significativa.

También lograron observar que el efecto mitogénico es bloqueado por la inhibición de la señalización de Shh. Finalmente proponen que Shh es un gen blanco del IFN- γ y es responsable de que el IFN- γ propicie la proliferación de las GNP.

Otro estudio que revela la participación de STAT1 en interacción con el IFN- γ y Shh, sobre la diferenciación neuronal es de Walter y colaboradores 2012.

Observaron que el IFN- γ induce un fenotipo desregulado de células precursoras troncales neurales (NSPCs por sus siglas en inglés) y que bajo esa condición expresan simultáneamente marcadores neurales y gliales, con propiedades electrofisiológicas determinadas.

Así también, mediante un ensayo de inmunoprecipitación de cromatina confirmaron que el dímero fosforilado de STAT1 es capaz de entrar al núcleo en orden de la unión de la secuencia de los elementos del sitio de activación del IFN- γ (GAS por sus siglas en inglés) en la región promotora de Shh; lo cual hace evidente que la liberación del IFN- γ y la sobrerregulación de STAT1 está ligada directamente en la inducción de la vía Shh por los dímeros fosforilados de STAT1 que entran al núcleo y funcionan como factores de transcripción.

A su vez ellos descartan que la vía Shh fuese por sí sola responsable de la inducción del fenotipo desregulado de las NSPCs, ya que la inducción del fenotipo desregulado requiere la señal del IFN- γ que es dependiente de la activación de la vía Shh.

Al tomar en cuenta que los genes reguladores (IRGs por sus siglas en inglés) o estimulantes (ISGs por sus siglas en inglés) del IFN- γ son regulados por la vía de citocinas JAK/STAT, ellos sugieren que GAS en la región del promotor Shh, regula la activación de Shh o de manera simultánea mediante una co-activación directa del fenotipo desregulado.

Por otra parte el estudio de Pereira y colaboradores 2015 , muestra que el IFN- γ , a través de la activación de STAT1 en su vía de señalización canónica, actúa en progenitores positivos a Nestina y provoca una disminución en la etapa de proliferación mientras que a su vez el IFN- γ incrementa el número de neuroblastos generados.

Como resultado final observan un deficiente reclutamiento de nuevas neuronas en el BO, muestra que el IFN- γ induce una estimulación de la diferenciación neuronal, pero no compensa el efecto antiproliferativo.

Ellos concluyen que la señal del IFN- γ vía STAT1, en la ZSV actúa de forma dual como un factor antiproliferativo y proneurogénico

Justificación

Existen diversos estudios que muestran el papel de la familia STAT en el cerebro, tanto en los procesos inflamatorios como en los procesos de muerte celular. Sin embargo, recientes estudios comienzan a aportar información sobre la importancia de la familia STAT en el proceso neurogénico.

En este sentido, existen diversos integrantes de esta familia de proteínas, que están involucrados en las vías de señalización en la proliferación de precursores neuronales, tales como STAT3 y STAT5.

Los grupos de estudio de Sun y colaboradores 2010, y Walter y colaboradores 2012, muestran que STAT1 participa en la activación de Shh mediante la señal del IFN- γ , lo que estimula el desarrollo de GNPs, y de un fenotipo específico para NSPCs para el proceso neurogénico, respectivamente.

Por otra parte Pereira y colaboradores 2015, observan que el proceso neurogénico de la ZSV del BO está regulado por medio del IFN- γ y la activación de STAT1.

Esto muestra que diversos integrantes de la familia STAT se hayan involucrados en diferentes vías de la neurogénesis.

Esto es importante ya que STAT1, cuyo mensajero se encuentra expresado en el giro dentado del hipocampo, resulta ser un blanco para el estudio del proceso neurogénico en el hipocampo del cerebro adulto. Para conocer el papel que uno o varios genes desempeñan, existen modelos animales que pueden ser de utilidad.

Tal es el caso de los modelos KO, donde un gen está suprimido o delecionado y se pueden observar los efectos implicados.

El modelo KO para STAT1 fue utilizado en este trabajo para estudiar a las poblaciones celulares que participan en la neurogénesis del hipocampo adulto en ausencia de la proteína STAT1.

Hipótesis

La proteína Stat1 se encuentra presente en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo de los ratones silvestres de la cepa C57BL/6 lo que sugiere su participación en el proceso neurogénico, de tal modo que la ausencia del gen que codifica la proteína STAT1 disminuirá la generación de neuronas en el hipocampo adulto.

Objetivo General

Estudiar el papel de Stat1 en el proceso neurogénico del hipocampo en ratones adultos KO para el gen STAT1.

Objetivos particulares

- Analizar la proliferación celular en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo a través de la identificación de la proteína Ki67 (marcador de proliferación celular).
- Analizar la sobrevivencia celular en la capa celular granular del giro dentado del hipocampo a través de la identificación de la 5-bromo-desoxiuridina (BrdU)
- Analizar las poblaciones de neuroblastos y neuronas inmaduras a través de la identificación de la proteína doblecortina (DCX) en la zona subgranular y en la capa celular granular del giro dentado del hipocampo.
- Analizar las neuronas granulares inmaduras a través de la identificación de la proteína calretinina en la capa celular granular del giro dentado del hipocampo.
- Analizar estadios de células madre tipo glía radial a través de la identificación de GFAP en la zona subgranular y en la capa celular granular del giro dentado del hipocampo.
- Analizar las poblaciones de células madre de la glía radial, células del tipo 2a y 2b a través de la identificación de SOX2 en la zona subgranular y capa celular granular del giro dentado del hipocampo.

Material y Métodos

Animales

Se utilizaron cinco ratones machos de la cepa C57BL/6 (tipo silvestre) como grupo control y cinco ratones machos KO para el gen STAT1 de 10 semanas de edad, con un peso de entre 26-30 gramos.

Ambos grupos de roedores se mantuvieron bajo condiciones controladas en un ambiente denominado “*supermouse*” (de acuerdo con su denominación en inglés), en el cual la asepsia en general es de alto rango, el aire es constantemente purificado a través de filtros, así como el acceso al alimento y al agua son altamente asépticos, aún bajo condiciones de *ad libitum*, a temperatura ambiente, y ciclos de luz-oscuridad de 12/12 horas.

Los ratones KO-STAT1 fueron generados y donados por el doctor Marco Antonio Meraz Ríos del Centro de Investigación y estudios avanzados (CINVESTAV Zacatenco) de acuerdo a lo reportado previamente (Meraz y cols., 1996).

Tratamiento

Todos los animales, tanto el grupo control como el grupo KO para STAT1, a las 10 semanas de edad fueron inyectados con una solución de BrdU (50 mg/Kg de peso) por vía intraperitoneal, a las 3:00 PM. Al pasar un transcurso de dos horas se administró una segunda inyección en la misma región y con la misma concentración. Basado en Kempermann y colaboradores 1997 y Ramírez y colaboradores 2009.

Sacrificio

Posterior a la inyección intraperitoneal con BrdU, al término de 28 días los animales fueron anestesiados por medio de una sobre dosis con Ketamina (20 mL/cc o unidades por cada animal) por inyección intraperitoneal con una jeringa para insulina; se dejó transcurrir un tiempo entre uno y dos minutos para dar lugar al efecto del anestésico. Ya anestesiados los animales fueron decapitados.

La cabeza se depositó en una hielera pequeña con hielo en trozos finos y se cubrió con los mismos durante un minuto, posteriormente, se extrajo el cerebro completo, al cual se le realizó un enjuague con tampón fosfato salino (PBS 1X, por sus siglas en inglés), con una concentración de 10 mM PO_4^{3-} , 138 mM NaCl, 3 mM KCl, 8.1 mM Na_2HPO_4 , 1.5 mM KH_2PO_4 ; e inmediatamente se depositó en una solución fría de paraformaldehído (PFD) al 4% en la que permaneció durante 6 días. Al término de este tiempo, se transfirió el cerebro a una solución de sacarosa al 30% durante otros 6 días (Kempermann y cols., 1997, Torres y cols. 2015).

Cortes coronales

Transcurridos los 6 días en la solución de sacarosa, el cerebro de cada uno de los animales se seccionó en cortes coronales de 40 μm de grosor, por medio de congelación con hielo seco en un micrótopo de deslizamiento Leica SM2010R.

Cada uno de los cortes fue tomado con un pincel fino y depositado en 140µL de solución crioprotectora contenida en cada uno de los pozos de una placa de 96 pozos, de manera que al completarse el llenado de todos los pozos de la placa, al seguir habiendo cortes coronales se reinició de uno a dos depósitos de cortes en la misma placa para obtener una distribución uniforme de los cortes en cada una de las líneas de los pozos (Kempermann y cols., 1997).

Inmunohistoquímicas

De manera general, en el proceso de cada una de las inmunohistoquímicas para cada marcador celular, se tomó una muestra de tejido de cada individuo. Es decir una línea de ocho pozos de la placa de 96 pozos de cada uno de los individuos, de ambos grupos de comparación. La muestra de tejido de cada individuo se colocó en un inserto (contenedor cilíndrico con rejilla para, aislar y escurrir tejido) previamente marcado para su identificación.

Cada uno de los insertos se colocó en un pozo de una placa de 12 pozos y en ella se realizaron 3 lavados continuos con solución salina tamponada con Tris 50 mM, 150 mM NaCl y pH de 7.5 (TBS 1X por sus siglas en inglés), durante 5 minutos cada uno, para retirar la solución crioprotectora del tejido.

Posteriormente el tejido se transfirió a una solución de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y TBS al 6% a una placa de 24 pozos, durante un periodo aproximado de 30 minutos, para inactivar las peroxidasas del tejido.

Inmediatamente el tejido se transfirió de nuevo a los insertos de la placa de 12 pozos para ser nuevamente lavado y posteriormente ser

bloqueado en sitios inespecíficos por medio de una solución de TBS plus (Tris 1M pH 7.4, 100 µL de Tritón X-100, y suero de burro al 3%) durante un periodo de una hora nuevamente en una placa de 24 pozos.

Al termino del bloqueo con TBS plus, se diluyó el anticuerpo primario de cada marcador (Ki67, BrdU, Doblecortina, Calretinina, GFAP y SOX2) en una solución de TBS plus e inmediatamente se incubó el tejido en una placa de 24 pozos durante un periodo de 24 horas a 4°C.

Transcurrido el periodo de incubación, de nuevo el tejido fue transferido a los insertos de placas de 12 pozos para realizar lavados y retirar así el exceso de anticuerpo primario. Posteriormente se incubó el anticuerpo secundario durante dos horas a temperatura ambiente.

Posterior al tiempo requerido, se procedió a realizar el revelado del anticuerpo por medio de la técnica de diaminobenzidina. La técnica de inmunohistoquímica está basada en Kempermann y colaboradores 1997 y Ramírez y colaboradores 2009.

A continuación se detalla lo realizado para cada parámetro:

Proliferación

La identificación de la proliferación celular se hizo por medio del marcador Ki67, cuyo anticuerpo hecho en conejo reconoce a la proteína de Ki67 endógena, la cual se integra en las células cuando estas se encuentran en la fase de S del ciclo celular.

La concentración utilizada para la dilución del anticuerpo primario en TBS-plus fue de 1:2000 µL y la concentración del anticuerpo secundario biotiniliado anti-conejo fue de 1:250µL.

Sobrevivencia

Se realizó la identificación de la sobrevivencia celular por medio del marcador celular BrdU, el cual es un marcador exógeno (análogo a la timidina) que se incorpora en las células cuando estas se encuentran en la fase de S (fase de síntesis) del ciclo celular, donde propiamente se abren las cadenas de ADN para dar lugar al proceso de replicación del ADN; de esta manera el BrdU persiste en la nueva generación de células hijas.

* Antes de la incubación del anticuerpo primario:

Al finalizar la inactivación de las peroxidases y sus respectivos lavados, el tejido fue tratado con una solución de ácido clorhídrico (HCl) a una concentración 2N a 37° C, durante 30 minutos. Al terminar este periodo, se transfirió el tejido a una solución amortiguadora de boratos durante 10 minutos con la finalidad de neutralizar el ácido en el tejido.

La concentración utilizada para la dilución del anticuerpo primario hecho en rata que reconoce a la proteína de BrdU fue de 1:500 μ L y la concentración del anticuerpo secundario biotinilado anti-rata fue de 1:250 μ L.

Neuroblastos y neuronas inmaduras.

Estadios intermedios del proceso neurogénico

Para la identificación de células en etapa de diferenciación, donde se presentan los estadios intermedios de la neurogénesis, se utilizó el marcador de doblecortina (DCX), un marcador que reconoce a la proteína endógena presente en células con destino o con fenotipo neuronal.

* Antes de la incubación del anticuerpo primario, al finalizar la inactivación de las peroxidasas y sus respectivos lavados, el tejido se transfirió a una placa de 12 pozos con buffer de citratos con pH 6 a 50°C durante dos horas. Transcurrido el tiempo, se transfirió el tejido mediante los mismos insertos a otra placa con buffer de citratos a una temperatura de -4°C.

Luego el tejido se transfirió a otra placa de 12 pozos con TBS1X para ser nuevamente lavado y posteriormente ser bloqueado en sitios inespecíficos por medio de una solución de TBS plus durante un periodo de una hora nuevamente en placa de 24 pozos.

Posteriormente se realizó la dilución del anticuerpo primario hecho en cabra que reconoce la señal de DCX en una solución de TBS plus en una concentración de 1:250 μ L. El anticuerpo secundario biotiniliado anti-cabra tuvo una concentración de 1:250 μ L.

Neuronas granulares inmaduras

Transición a la maduración neuronal

Para evaluar las neuronas granulares inmaduras se utilizó el marcador de calretinina, el cual identifica a la proteína endógena, y revela a células neuronales en etapas iniciales a la maduración de los procesos dendríticos.

La concentración del anticuerpo primario hecho en ratón que reconoce a la proteína de calretinina fue de 1:2000 μL y la concentración para el anticuerpo secundario biotinilado anti-ratón fue de 1:250 μL .

Células madre tipo glía radial

Para observar si la ausencia de la proteína STAT1 había afectado los primeros estadios de las etapas del desarrollo neurogénico, se utilizó el marcador de GFAP, el cual identifica a la proteína endógena, y revela a células madre gliales antes de que estas adquieran el compromiso para células del tipo neural

Se utilizó el procedimiento genérico al igual que en las inmunohistoquímicas anteriores.

La dilución del anticuerpo primario hecho en conejo que reconoce a la proteína de GFAP en la solución de TBS plus fue de 1:1000 μL y la concentración del anticuerpo secundario biotinilado anti-conejo fue de 1:250 μL .

Células madre de la glía radial, células del tipo 2a y 2b

Para observar si la ausencia de la proteína STAT1 había afectado los estadios de las células madre glía radial y células del tipo 2a y 2b que pertenecen a las primeras etapas del desarrollo neurogénico.

Se utilizó el marcador de SOX2, el cual identifica la proteína endógena que está presente en las células que en la etapa de proliferación comienzan a adquirir el compromiso para convertirse en células del tipo 3.

Se realizó el procedimiento genérico al igual que en las inmunohistoquímicas anteriores.

El anticuerpo primario hecho en cabra que reconoce a la proteína de SOX2 se diluyó a una concentración de 1:2000 μ L y el anticuerpo secundario biotinilado anti-cabra tuvo una concentración de 1:250 μ L.

Montaje en portaobjetos

Una vez obtenidas cada una de las inmunohistoquímicas, los cortes coronales fueron montados y fijados con Neumont en portaobjetos para su posterior observación y cuantificación por medio de microscopía de luz.

Cuantificación celular

La cuantificación de cada uno de los grupos y marcadores utilizados fue obtenida, por medio de un microscopio óptico Leica, con base a la cualificación del marcador celular, respectivamente referenciado en bibliografía:

- Ki67: se tomaron como parámetros de células positivas a Ki67 todas aquellas que presentaron una tinción circular uniforme y cuya localización fuera cerca de las tres primeras capas celulares de la CCG de la ZSG, es decir a partir del área colindante con el hilus, hacia la capa molecular (Kim y cols., 2009).
- BrdU: las células que se tomaron como positivas a BrdU, fueron todas aquellas células que presentaron una tinción circular uniforme, siempre y cuando estuviese cerca de las tres primeras capas celulares de la CCG de la ZSG, es decir a partir del área colindante con el hilus, hacia la capa molecular (Kee y cols., 2002).
- Doblecortina: en este marcador se tomaron como parámetros de células positivas todas aquellas que estuviesen teñidas y presentaran las morfologías que caracteriza DCX, pues puede teñir tanto el soma de las neuroblastos en proceso de desarrollo como neuronas inmaduras, lo que permitió que se pudieran observar seis categorías de desarrollo neuronal con base a Plümpe y colaboradores 2006. Ver Figura 7.

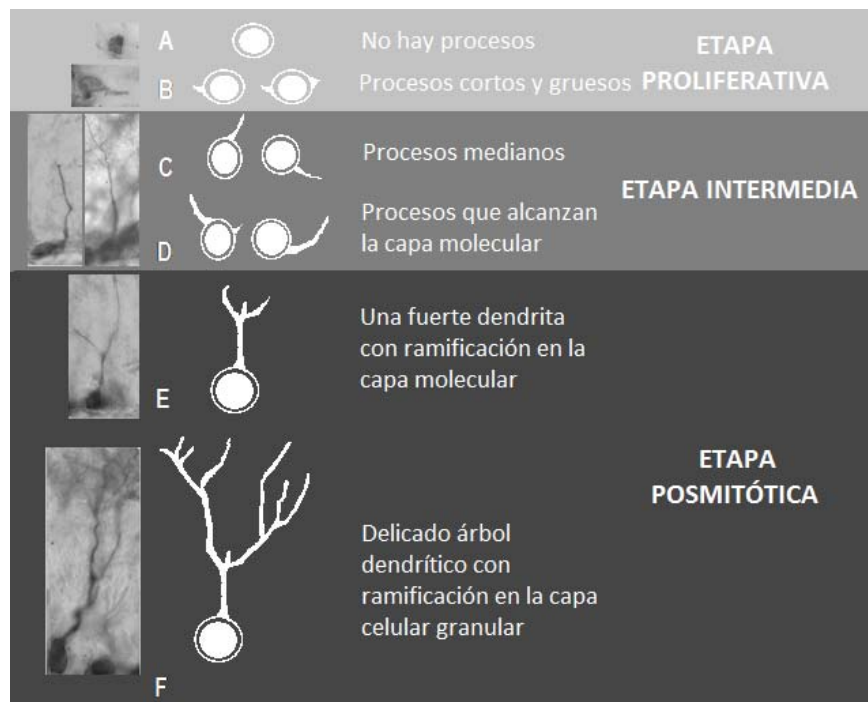


Figura 7. Esquema que muestra el proceso de diferenciación y desarrollo dendrítico de células positivas a DCX, las cuales son agrupadas en seis categorías cuya nominación es de la letra A a la letra F, donde A representa la categoría más simple y F la categoría más compleja. Tomado y modificado de Plümpe y colaboradores 2006.

Considerando lo anterior se realizó un análisis de las proporciones celulares correspondientes a las seis categorías que se establecieron con base en la morfología de acuerdo a lo descrito por Plümpe y colaboradores 2006 en los siguientes métodos:

- Se obtuvo el porcentaje de los seis niveles de desarrollo que se observan en esta etapa, donde cada nivel se ve representado por el grado de desarrollo que se da en las células que son positivas a DCX, de modo que en el primer nivel de desarrollo se incluyó en la

categoría A, donde se encuentran las células menos desarrolladas sin procesos dendríticos, hasta llegar al nivel más desarrollado representado por la categoría F, con procesos dendríticos largos y complejos.

Para esto se contaron al azar cien células positivas a DCX de cada uno de los animales de cada grupo de comparación. Se agrupó el número de células correspondiente a cada categoría; posteriormente se hizo la sumatoria para obtener los porcentajes de cada categoría respecto al total.

- Se realizó una evaluación estadística sobre las diferencias entre el número total de células positivas a DCX entre ambos grupo de comparación, así como los porcentajes de las categorías tanto en el grupo de estudio como con su referente (KO-STAT1, control, KO-STAT1 versus su control).

Se tomaron en cuenta los valores absolutos de cada grupo para observar posibles niveles de diferenciación significativa.

- *Calretinina*: con este marcador se tomaron como células positivas todas aquellas que estuviesen teñidas y cuyo soma fuera perfectamente redondo u oval con un tamaño relativamente grande (aprox 10-15 μ m) así como su respectiva proyección dendrítica hacia la capa molecular (Ramírez y cols., 2009).
- *GFAP*: se tomaron como células positivas a este marcador, aquellas que se encontraran en la CCG y que tuvieran diversos procesos elongados (Garcia y cols., 2004).
- *SOX2*: este marcador no tiñe procesos, sin embargo se tomaron como positivas aquellas células que estuvieran teñidas en su soma, el cual debe tener una morfología muy redonda y grande. La región en la que se cuantificó de igual forma que el marcador anterior fue la CCG y la ZSG del GD (Ferri y cols., 2004).

Análisis Estadístico

Se cuantificaron las células que dieron positivo a cada marcador (Ki67, BrdU, DCX, Calretinina, GFAP y SOX2), los cuales correspondieron a cada una de las etapas anteriormente mencionadas.

Las variables fueron consideradas no continuas (discretas), por lo que se realizaron las siguientes pruebas paramétricas: para cada caso se realizó una prueba “t” de Student, para determinar si el grupo KO-STAT1 tenía diferencias significativas con respecto al grupo control.

En el caso de Ki67 y Calretinina los datos obtenidos fueron evaluados mediante la prueba no paramétrica de U Mann-Whitney, debido a que el tamaño de la muestra fue pequeño.

Para el caso del marcador DCX el cual dio resultados para longitudes variables de dendritas que se cotejaron cualitativamente en cinco categorías (A, B, C, D, E, F) se realizó un análisis de varianza de dos vías para determinar diferencias entre estas categorías comparadas de un mismo grupo, y finalmente entre grupos KO-STAT1 con su grupo control correspondiente.

Cada análisis estadístico se acompaña por sus correspondientes representaciones gráficas (ver en el apartado de Resultados), que muestran el comportamiento de los datos, así como sus respectivas significancias, que en su conjunto fueron analizados para su interpretación, redacción y conclusión.

Resultados

Efectos de la ausencia de la proteína STAT1 sobre el proceso neurogénico en el hipocampo adulto en el modelo murino C57BL/6.

De manera general se observó que los animales KO-STAT1, en la etapa de proliferación, sobrevivencia, diferenciación, maduración e integración sináptica mostraron un menor número de células en comparación con su grupo control, con diferencias significativas.

En el caso de las etapas de las células madre tipo glía y células madre de la glía radial, se observó un mayor número de células en los animales KO-STAT1, en comparación con su grupo control, con diferencias significativas.

Proliferación celular

En primer lugar se evaluó la etapa de proliferación por medio de las células positivas a la proteína Ki67, el cual es un marcador endógeno y se expresa en células que se encuentran en la fase S del ciclo celular, una etapa importante del proceso mitótico. Al cuantificar el número de células positivas a este marcador se observó una disminución estadísticamente significativa en el grupo del animal KO en comparación con su grupo control (Figura 8 y Figura 9).

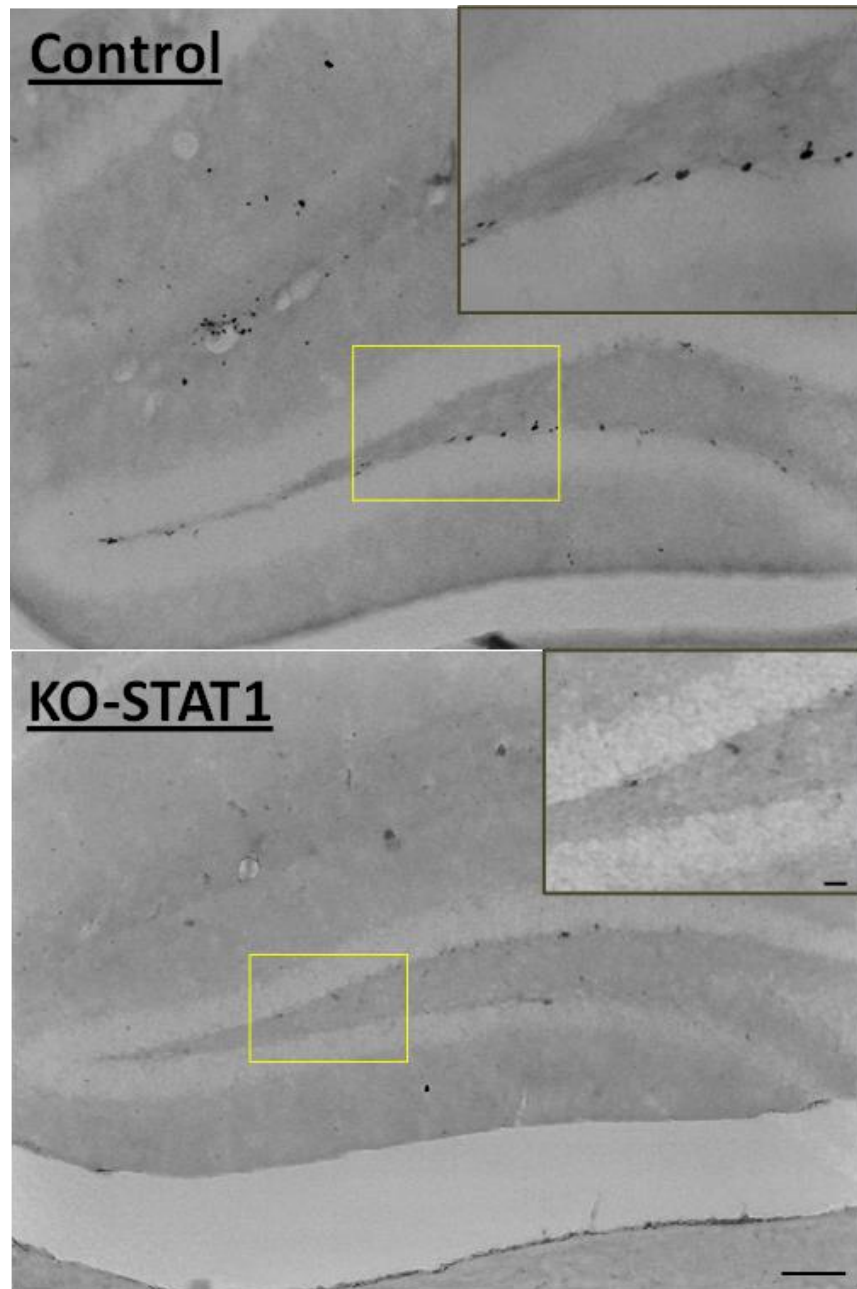


Figura 8. Fotografía que muestra las células positivas a Ki67, por técnica de inmunohistoquímica en el GD del hipocampo del ratón KO-STAT1 *versus* su grupo control. Barras de calibración = 100μm, 20μm (amplificación).

PROLIFERACIÓN CELULAR

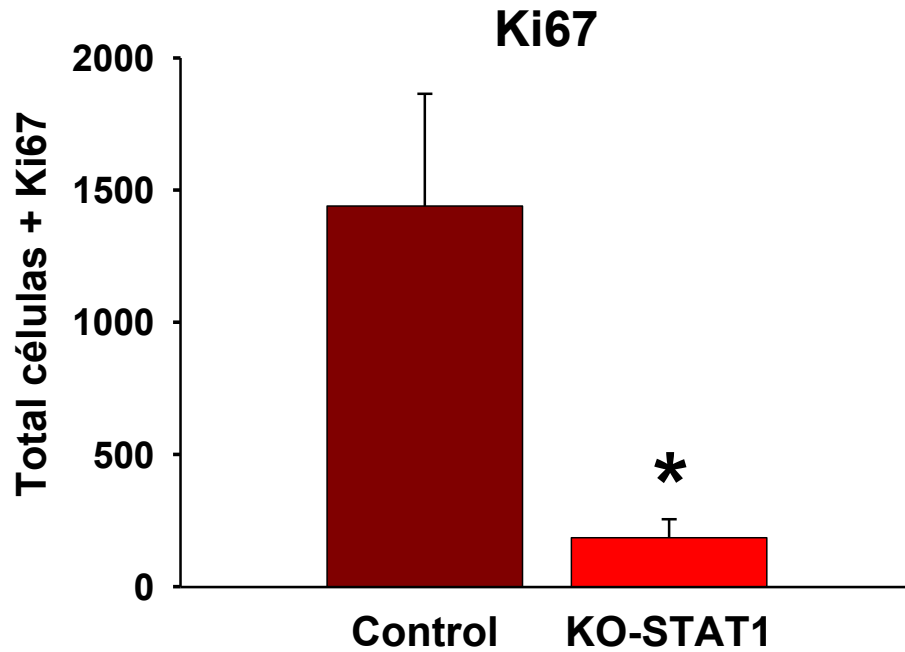


Figura 9. Media \pm eem del número total de células positivas a Ki67 en roedores KO-STAT1 *versus* su grupo control, que muestra una diferencia significativa entre ambos grupos *p = 0.016 por la prueba de U de Mann-Whitney.

Sobrevivencia celular

Al cuantificar el número de células positivas a BrdU se observó un menor número de células en el animal KO-STAT1 en comparación con su grupo control y cuya diferencia resultó ser significativa (Figura 10 y Figura 11).

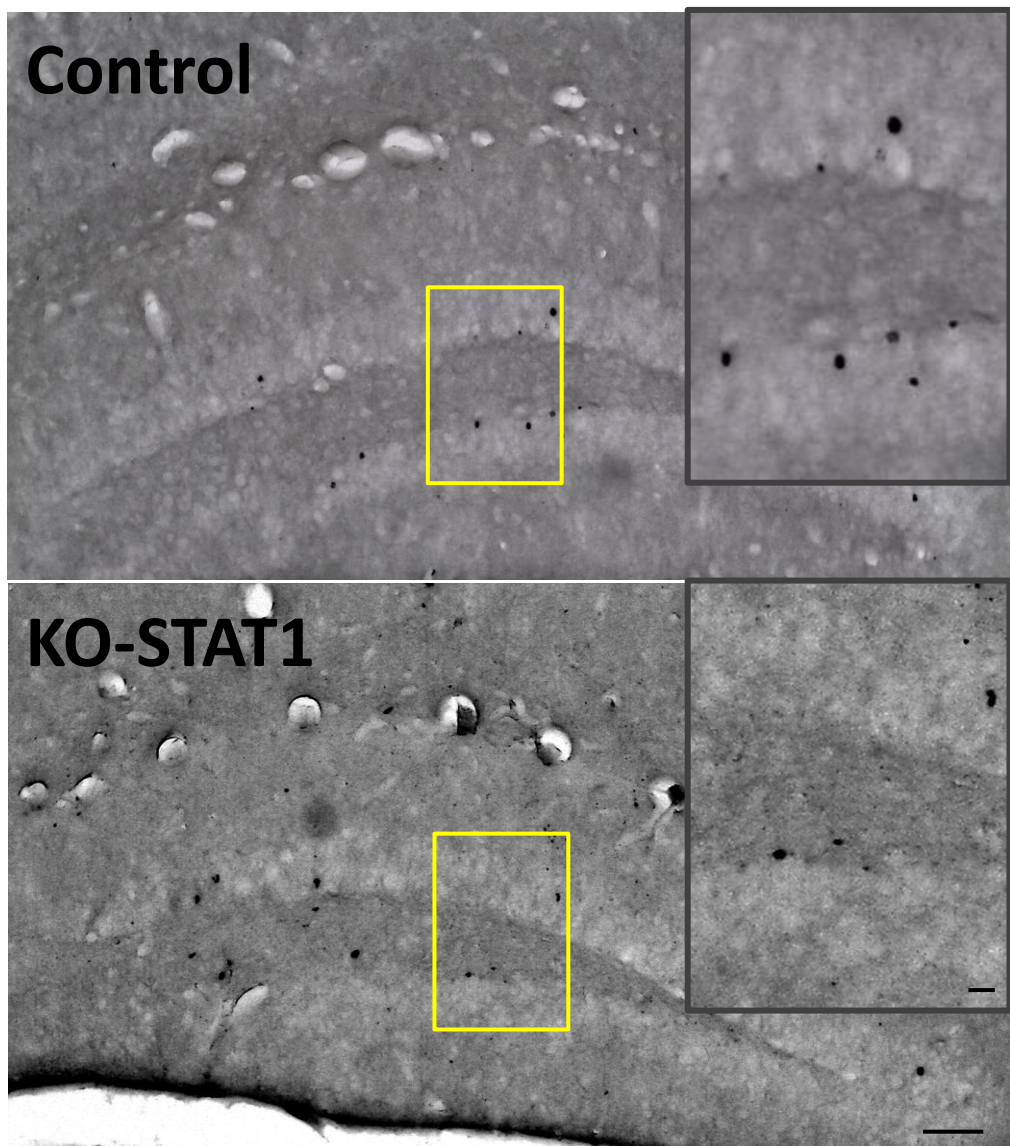


Figura 10. Fotografía que muestra las células positivas a BrdU, por técnica de inmunohistoquímica, en el GD del hipocampo del ratón KO-STAT1 *versus* su grupo control. Barras de calibración = 100µm, 20µm (amplificación)

.SOBREVIVENCIA CELULAR

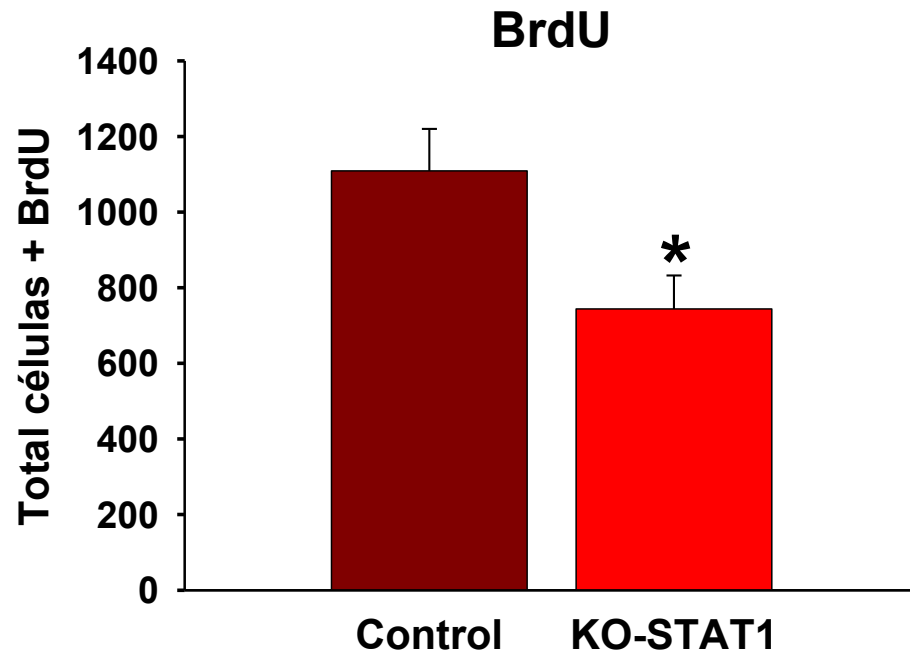


Figura 11. Media \pm eem del número total de células positivas a BrdU (bromodesoxiuridina) en roedores KO-STAT1 *versus* su grupo control que muestra una diferencia significativa entre ambos grupos * $p = 0.033$ por la prueba t-student no pareada.

Estadios intermedios del proceso neurogénico

Para observar la etapa subsecuente del proceso neurogénico que incluye a los neuroblastos y a las neuronas inmaduras jóvenes, se utilizó el marcador DCX (Figura 12), el cual resulta importante para dilucidar los diferentes grados de complejidad de los procesos dendríticos.

La cuantificación de células presentes en la ZSG y en la CCG del GD reflejó una disminución significativa en el número absoluto de las células positivas a DCX en los ratones KO para STAT-1 en comparación con el grupo control. Ver Figura 14.

- Se observó la existencia de diferencias proporcionales entre las categorías de células del tipo F, entre ambos grupos de comparación. La categoría de células del tipo F, se encontró en menor proporción en los animales KO-STAT1 ($n < 30\%$) en comparación con su grupo control ($n \geq 60\%$) (Figura 13).
- Se obtuvo que la proporción del porcentaje del total de células positivas a DCX en la categoría F en los animales KO-STAT1 presentó una disminución estadísticamente significativa entre ambos grupos de comparación ($p < 0.001$ / prueba de t-student) (Figura 14).

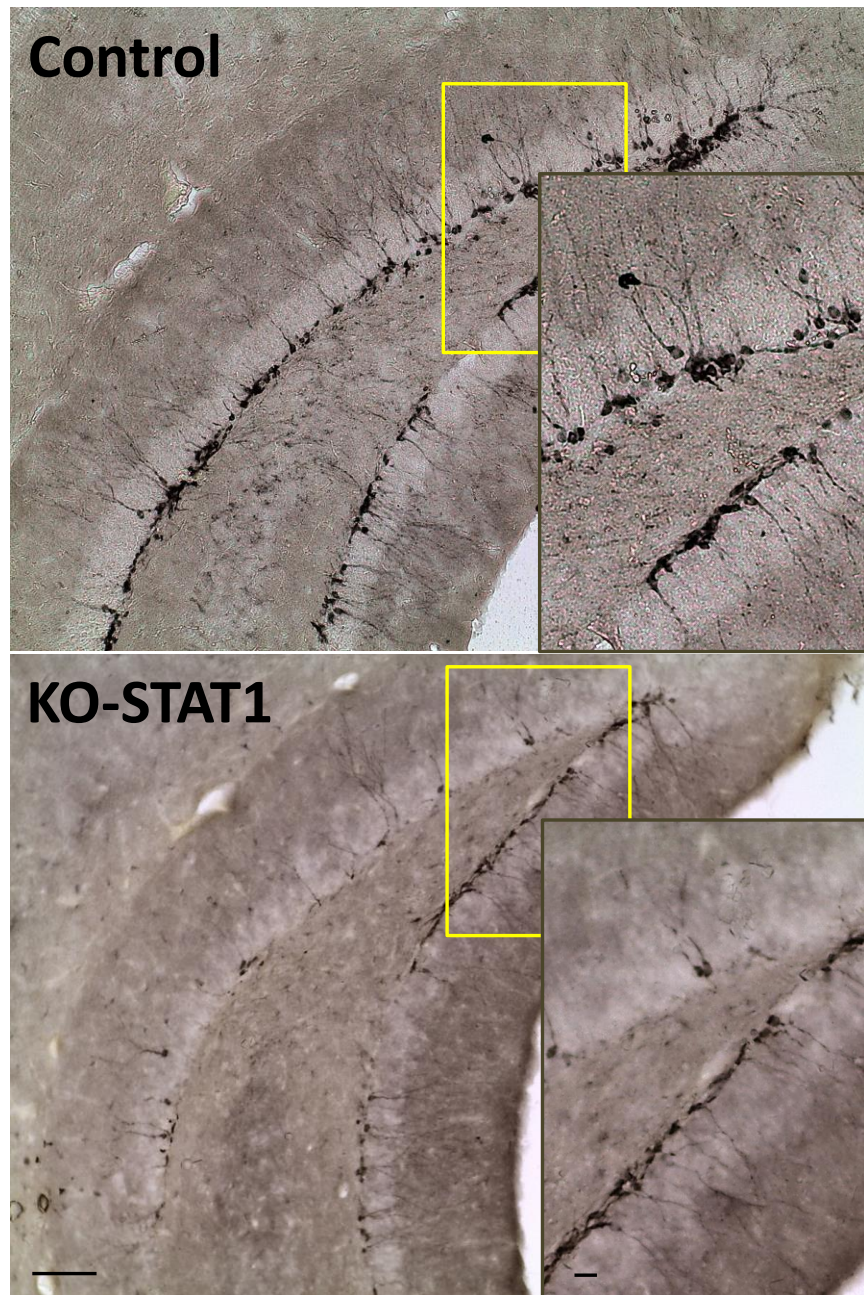


Figura 12. Fotografía que muestra las células positivas a DCX, por técnica de inmunohistoquímica, en el GD del hipocampo del ratón KO-STAT1 *versus* su grupo control. Barras de calibración = 100μm, 20μm (amplificación).

ESTADIOS INTERMEDIOS DEL PROCESO NEUROGÉNICO

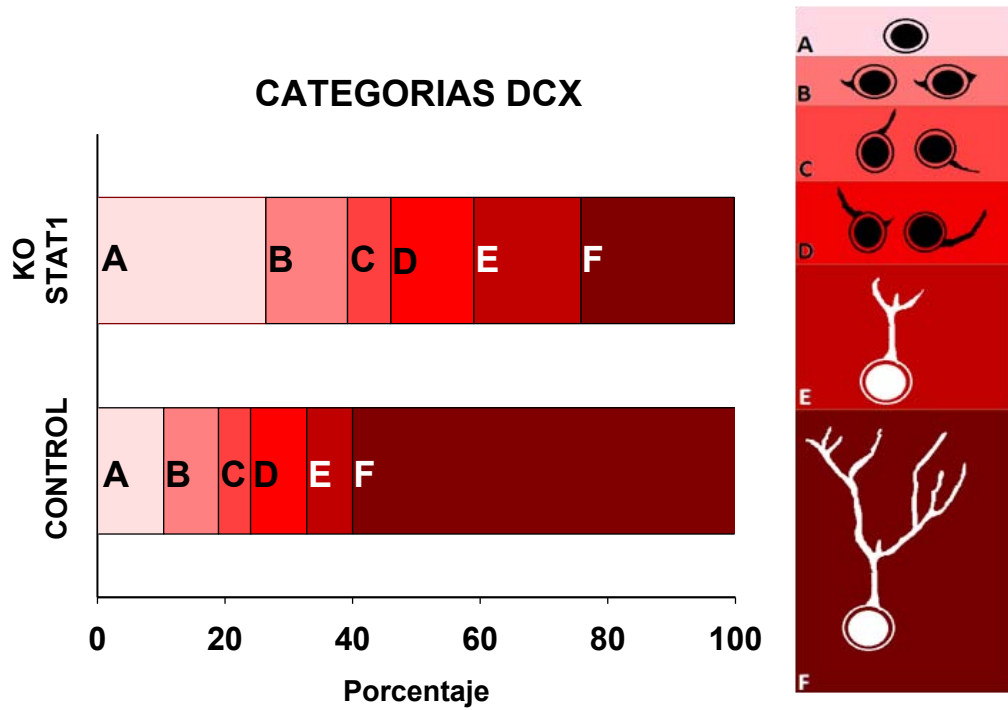


Figura 13. Porcentaje de categorías de células positivas DCX (doble cortina) en roedores KO-STAT1 *versus* su grupo control. Se observa que existen diferencias proporcionales entre las categorías en la mayor parte de las categorías destacando las del tipo A y del tipo F, del grupo KO-STAT1 *versus* su grupo control.

ESTADIOS INTERMEDIOS DEL PROCESO NEUROGÉNICO

Distribución absoluta de morfologías

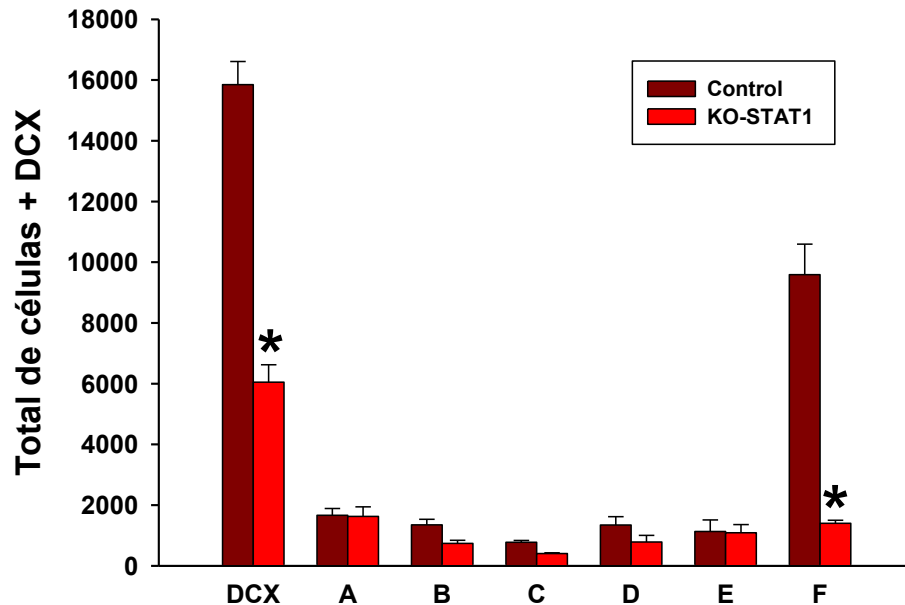


Figura 14. Media \pm eem del número total de células positivas a DCX (doble cortina) y distribución absoluta de morfologías en roedores KO-STAT1 *versus* su grupo control, que muestra una diferencia significativa entre ambos grupos * $p < 0.001$ prueba de t-student para DCX. Para la comparación de las categorías se aplicó la prueba de ANOVA de dos vías para las categorías

Neuronas granulares inmaduras

Al realizar la cuantificación del número de células positivas a calretinina, marcador celular que permite la identificación de neuronas granulares inmaduras en proceso de maduración, se encontró una disminución significativa en la población de células del grupo de los animales KO-STAT1 en comparación con su grupo control (Figura 15 y Figura 16)

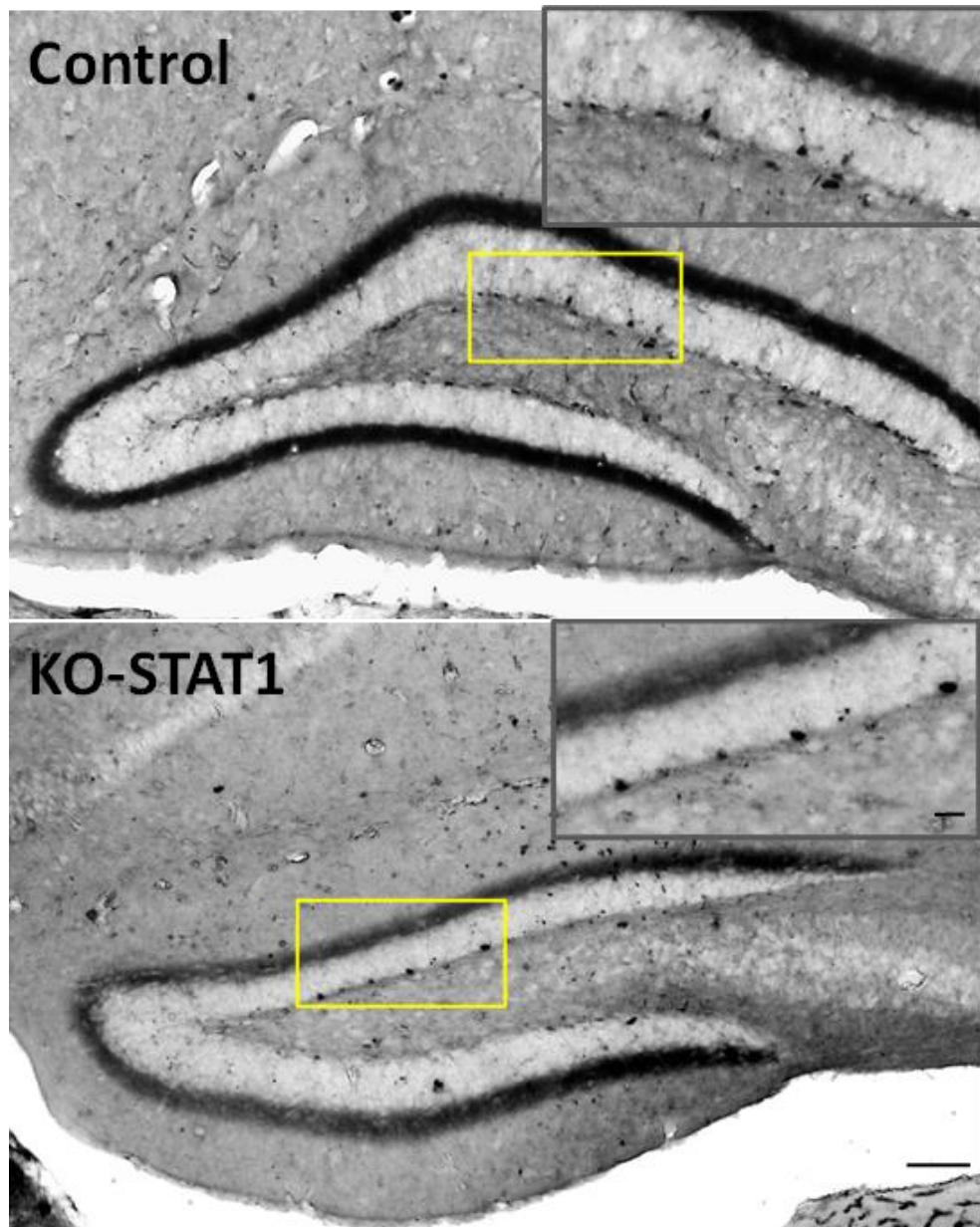


Figura 15. Fotografía que muestra las células positivas a calretinina, por técnica de inmunohistoquímica, en el GD del hipocampo del ratón KO-STAT1 *versus* su grupo control. Barras de calibración = 100µm, 20µm (amplificación).

NEURONAS GRANULARES INMADURAS

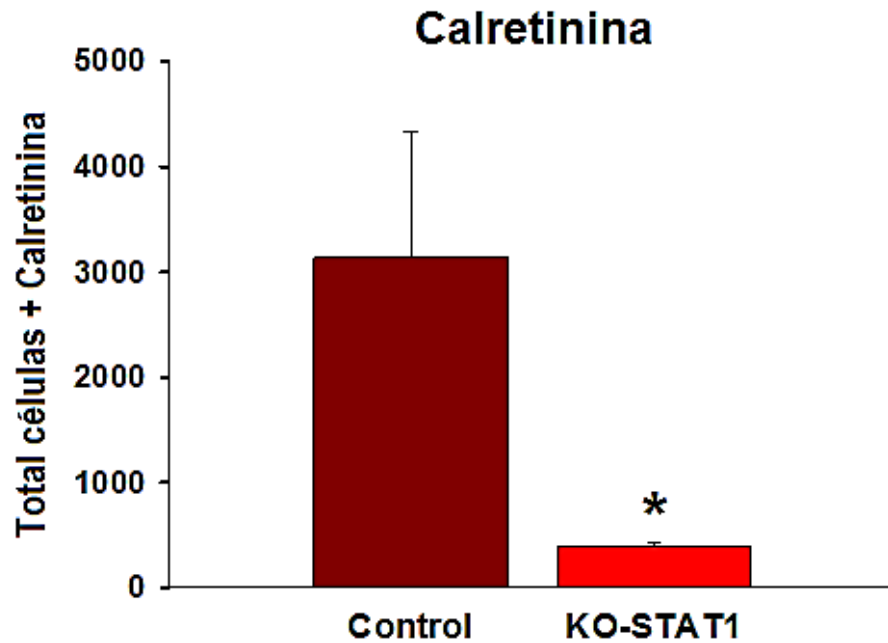


Figura 16. Media \pm eem del número total de células positivas a calretinina en roedores KO-STAT1 *versus* su grupo control, que muestra una diferencia significativa entre ambos grupos * $p=0.036$ por la prueba de U de Mann-Whitney.

Posterior a la obtención de estos primeros resultados al observar que de manera general en todas las etapas del proceso neurogénico, los animales KO-STAT1 presentaron una disminución significativa en comparación con su grupo control, se tomó la decisión de evaluar con mayor detalle las etapas iniciales del proceso neurogénico, para poder hallar el nivel de afección causada por la ausencia de la proteína STAT1.

Células madre tipo glía radial

Una de las primeras etapas del proceso neurogénico es en el que se distinguen las células madre tipo glía radial, que expresan la presencia de la proteína GFAP, y que a su vez se caracterizan porque pueden ser precursoras de otras células madre semejantes, células gliales y neuronas.

En la cuantificación de las células madre de la glía radial se encontró un aumento significativo de la población de células en los animales KO-STAT1 en comparación con su grupo control (Figura 17 y Figura 18).

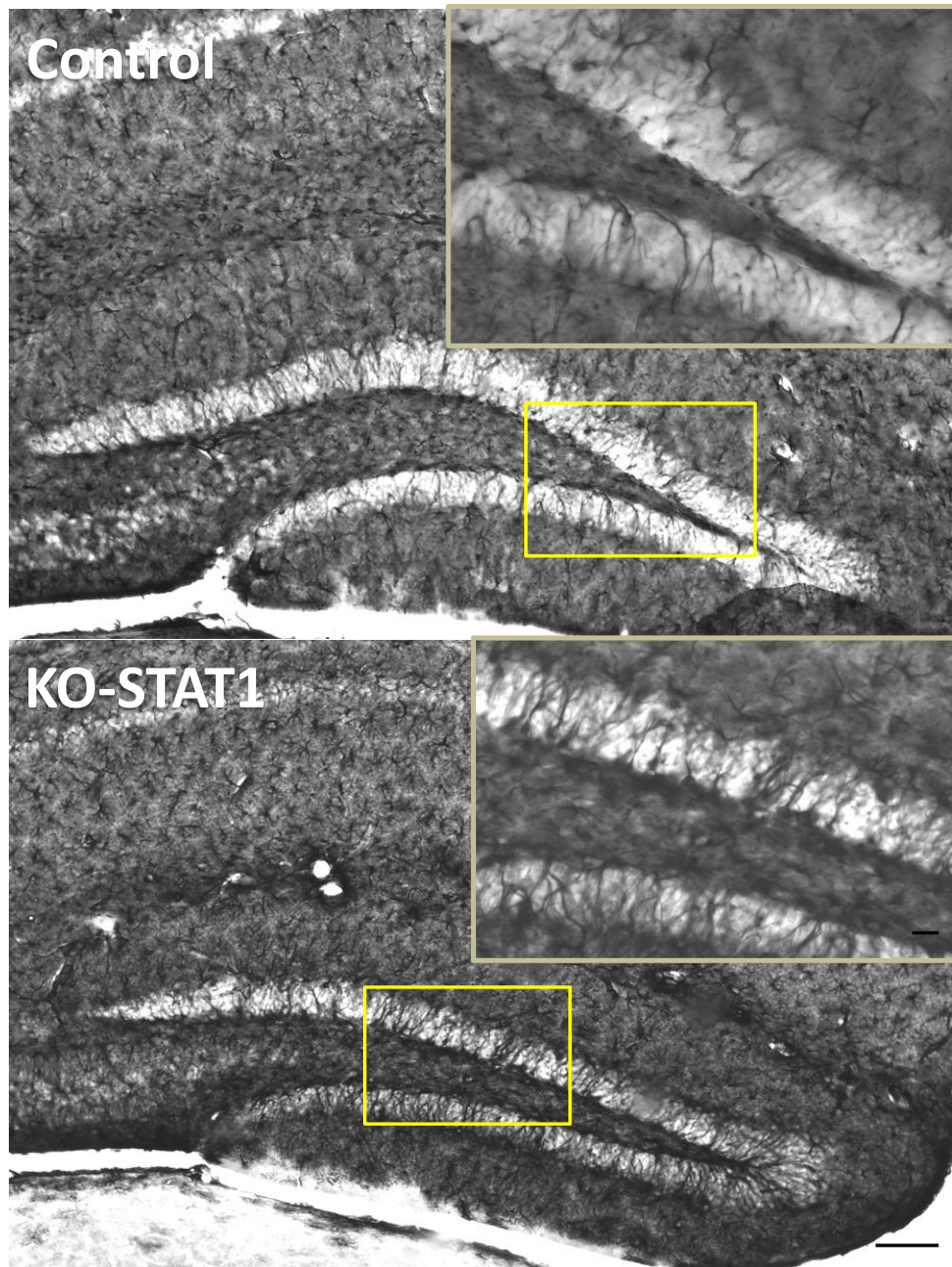


Figura 17. Fotografía que muestra las células positivas a GFAP, por técnica de inmunohistoquímica, en el GD del hipocampo del ratón KO para STAT1 *versus* su control. Barras de calibración = 100μm, 20μm (amplificación).

CÉLULAS MADRE TIPO GLÍA RADIAL

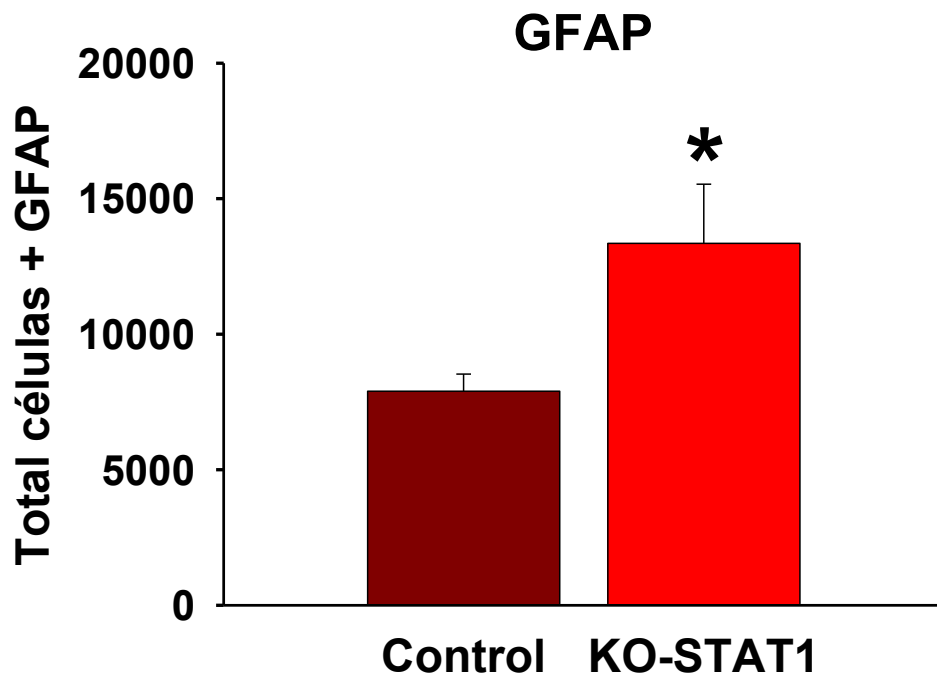


Figura 18. Media \pm eem del número total de procesos positivos a GFAP (proteína ácida fibrilar glial) en roedores KO para STAT1 *versus* su grupo control que muestra una diferencia significativa entre ambos grupos * ($p = 0.01$) por la prueba de prueba t-student.

Células madre de la glía radial, células del tipo 2a y células tipo 2b

La etapa posterior a las células madre tipo glía radial también fue evaluada por medio del marcador SOX2, el cual se expresa tanto en células tipo 1, tipo 2a y células tipo 2b. En la Figura 19 se observan fotografías representativas de células positivas a SOX2 en los dos grupos de estudio.

Al realizar la cuantificación del total de células positivas a este marcador se observó un aumento significativo en las poblaciones de células de los animales KO-STAT1 con respecto a su grupo control (Figura 20).

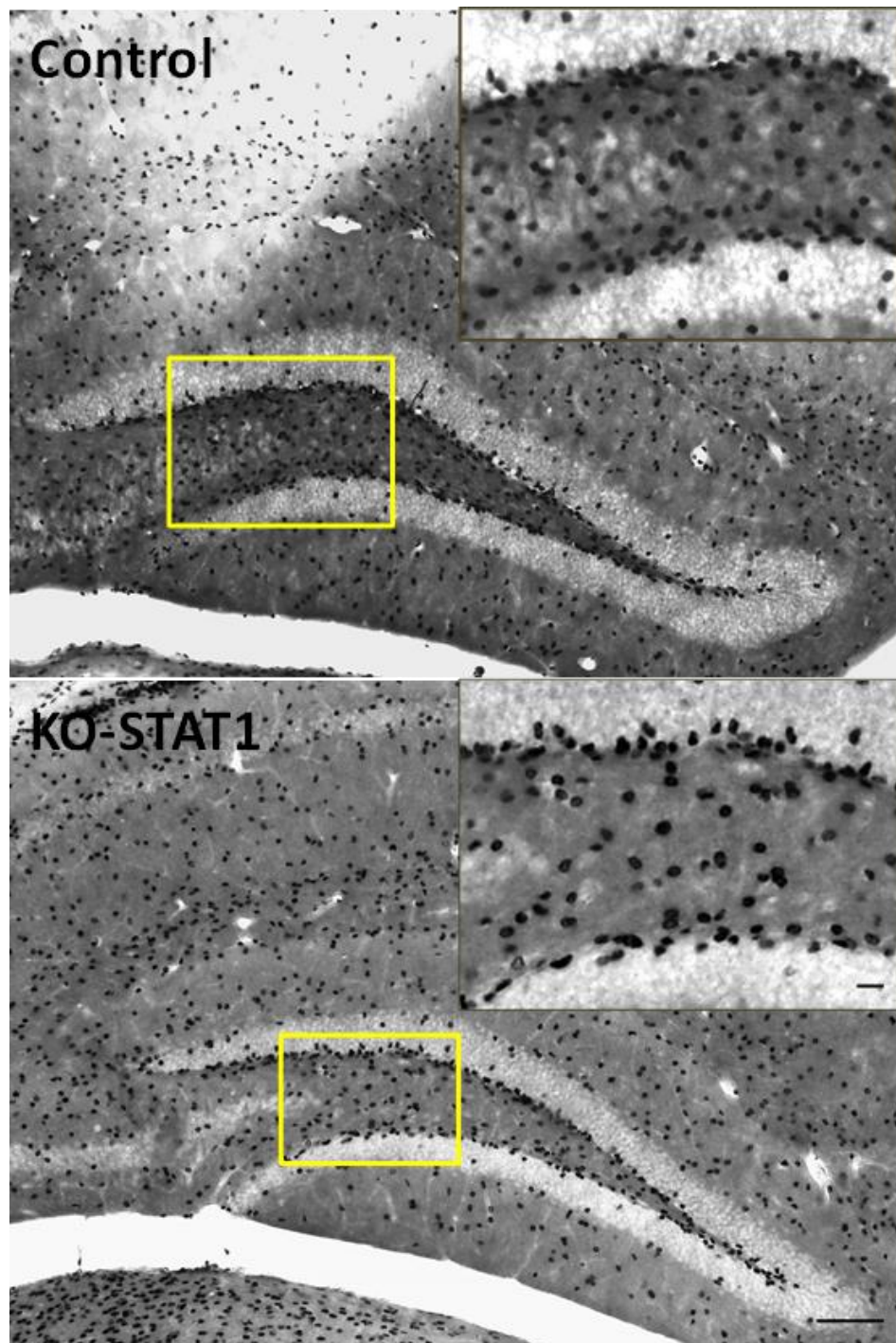


Figura 19. Fotografía que muestra las células positivas a SOX2, por técnica de inmunohistoquímica, en el GD del hipocampo del ratón KO para STAT1 *versus* su grupo control. Barras de calibración = 100μm, 20μm (amplificación).

CÉLULAS MADRE DE LA GLÍA RADIAL, CÉLULAS DEL TIPO 2A Y 2B

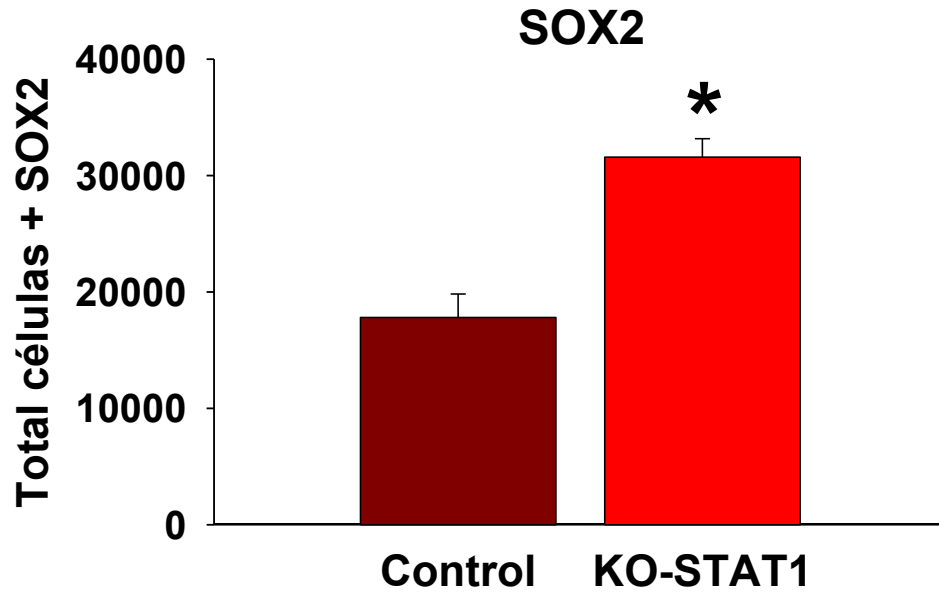


Figura 20. Media \pm eem del número total de células positivas a SOX2 (proteína de la región determinante del sexo Y- 2) en roedores KO para STAT1 *versus* su grupo control, que muestra una diferencia significativa entre ambos grupos * $p = 0.008$ por la prueba de prueba t-student.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

GENERAL

En el presente trabajo se encontró que el proceso neurogénico en el GD del hipocampo adulto se ve afectado de forma negativa en ausencia de la proteína STAT1. Esto se apoya en el hecho de que las poblaciones celulares de los animales KO-STAT1, disminuyeron de manera significativa desde las etapas de proliferación, sobrevivencia, diferenciación, hasta las etapas de maduración, en comparación con su grupo control; lo que indica que la proteína STAT1, resulta importante para el desarrollo de nuevas neuronas.

En este sentido debido a que en todas las etapas del proceso neurogénico se observó una afección en cuanto al número de células, se pensó que era probable que STAT1 fuese una molécula clave para cada una de las etapas de la neurogénesis.

Sin embargo, al revisar con mayor detalle las primeras etapas del proceso neurogénico, se observó que las poblaciones de células precursoras: células madre tipo glía radial y células madre de la glía radial, células del tipo 2a y 2b, se encontraron en mayor proporción en el modelo KO-STAT1 en comparación con su grupo control, lo que probablemente indica que la señal de STAT1 es clave para que las células madre precursoras, adquieran un adecuado compromiso celular que las lleve hacia el linaje de células del tipo neuronal.

Los resultados aquí obtenidos concuerdan con lo previamente reportado sobre la relevancia de la vía JAK-STAT en la neurogénesis:

Pereira y colaboradores 2015, muestran la participación de la vía canónica del IFN- γ en el proceso neurogénico mediante su interacción con STAT1, donde el IFN- γ funciona controversialmente como inductor principal de la inhibición sobre la proliferación de precursores y a su vez como propulsor de la diferenciación neuronal en células de la ZSV de la etapa postnatal y adulta, en un modelo en rata, tanto *in vivo* como *in vitro*.

Sin embargo en el modelo KO-STAT1 en comparación con el tipo silvestre en el mismo estudio, ellos no observan cambios en el proceso neurogénico de la ZSV ni aún con el aumento del IFN- γ , lo que confirma que este actúa mediante STAT1.

De los resultados que aquí se muestran con relación al estudio de Pereira y colaboradores 2015, se sostiene que la participación de STAT1 está implicada en la regeneración de neuronas de manera específica en diferentes etapas y en diferentes nichos neurogénicos.

Garza y colaboradores en 2008, observan que STAT3 y Akt participa en la regulación de la proliferación celular del GD del ratón adulto. En 2009 Müller y colaboradores muestran que el CNTF induce la señal de STAT3, y es esencial para la formación de nuevas neuronas, y para el mantenimiento de la ZSG del giro dentado adulto.

Con relación a lo reportado por Garza y colaboradores 2008 y Müller y colaboradores 2009. Los resultados del presente estudio muestran que STAT1 también forma parte del mantenimiento de la formación de nuevas neuronas de la ZSG del hipocampo adulto.

Los estudios previos junto con los resultados del presente estudio hacen pensar por qué el proceso neurogénico en la ZSG no muestra una detención definitiva.

Aunque el número de células del animal KO-STAT1 en las etapas de proliferación, supervivencia, diferenciación, maduración e integración sináptica es menor al grupo control, no se muestra una eliminación total del proceso neurogénico, es decir algunas células persisten.

Esto sugiere que es posible que al disminuir la proteína STAT1, una o varias de las proteínas de la familia STAT (como el caso de STAT3 y STAT5) que suelen activarse junto con STAT1 en la neurogénesis, tiendan a mantener la homeostasis y traten de compensar el proceso neurogénico. Lo que en cierta forma convierte a STAT1 en una proteína de importancia más no una proteína esencial para que se lleve a cabo la neurogénesis.

CÉLULAS MADRE TIPO 1, CÉLULAS TIPO 2A Y 2B.

LA PROLIFERACIÓN CELULAR

En 2006 Jung y colaboradores observaron que el G-CSF, induce la proliferación de NSCs humanas en el cerebro adulto de la rata, a través VEGF y la activación de STAT3 y STAT5.

Los grupos de estudio de Bauer en 2009, Gómez-Nicola y colaboradores en 2011 han observado que la activación de STAT1, STAT3 y STAT5 favorece la proliferación celular en NSCs de la ZSV.

Los resultados del presente estudio muestran que STAT1 puede estar involucrada en el proceso de la proliferación de las células madre tipo 1 y células del tipo 2a y tipo 2b en la ZSG del hipocampo adulto, ya que al estar STAT1 ausente, el número de células en esta etapa no se ve disminuido, si no por el contrario, el número de células madre tipo 1 y tipo 2 se encuentra en mayor número en el animal KO-STAT1 en comparación con el grupo control, lo que sugiere que estas no pueden transitar hacia el tipo celular 3.

En este sentido el estudio de Pereira y colaboradores 2015 muestra como el IFN- γ activa a STAT1 al inducir la fosforilación de esta proteína el aminoácido Tyr701 (STAT1 fosforilada) dentro del núcleo de células positivas a Nestina, en la etapa de proliferación, así como durante la diferenciación de los neuroblastos.

En el caso de Pereira y colaboradores 2015 la activación del IFN- γ y STAT1, disminuyen la proliferación en las células positivas a Nestina que son análogas a las células positivas a GFAP y SOX2 (células del tipo 1 y tipo 2 respectivamente) del presente trabajo, que en contraste en ausencia de STAT1, la etapa de proliferación se muestra disminuida, aunque el número de células positivas a GFAP y SOX2 es mayor.

Esto sugiere que las células positivas a GFAP y SOX2 se mantienen en un estado pausado, lo que tendría sentido debido a que el marcador Ki67 indica células que están en la fase de S del ciclo celular, donde propiamente se replica el material genético dentro del núcleo de la célula madre para que posteriormente se de origen a las células hijas por medio de mitosis.

Al no estar STAT1 la población de células en proliferación es menor en el animal KO-STAT1 en comparación con su grupo control, lo que indica que STAT1 en el GD del hipocampo adulto tiene una función importante en esta etapa.

ETAPA DE SOBREVIVENCIA

En el presente estudio la etapa de supervivencia, que comprende la irrupción de la apoptosis, se ve disminuida en ausencia de STAT1, debido a que el número de células positivas a BrdU fue menor en el animal KO-STAT1 en comparación con su grupo control.

En contraste el estudio de Pereira y colaboradores muestra que el IFN- γ y la activación de STAT1 disminuye la supervivencia esto puede deberse tal vez a que la zona de estudio de Pereira y colaboradores 2015 es la ZSV del BO, mientras que en este estudio es la ZSG del GD, lo que sugiere que en esta etapa se opere un mecanismo diferente.

A su vez los diferentes modelos de estudio empleados influyen en la observación del fenómeno. En presente trabajo sólo se tiene el modelo *in vivo* y no el *in vitro*, lo cual lleva a pensar en la realización de estudios futuros *in vitro* sobre las células del ratón KO-STAT1 y del tipo silvestre para el proceso neurogénico de la ZSG, así como la utilización del modelo en rata.

Por otra parte es posible que esto también pueda deberse a que STAT1 con su carácter multifacético, no sólo actúe de manera transcritora como es el caso de Pereira y colaboradores 2015, sino también como proteína activa de diferentes procesos.

ESTADIOS INTERMEDIOS DEL PROCESO NEUROGÉNICO

Pereira y colaboradores 2015 observan que la etapa de diferenciación donde los neuroblastos comienzan su desarrollo, se ven favorecida con la presencia del IFN- γ y la activación de STAT1.

En el presente trabajo se observa que al estar ausente la proteína STAT1, el número de neuroblastos y el número de células de los subsecuentes estadios intermedios, se ven afectados sobre todo en etapas de desarrollo avanzadas, de manera significativa en el animal KO-STAT1 en comparación con su grupo control.

Esto resulta importante debido a que STAT1 en ambos casos de estudio da indicio de favorecer el proceso de diferenciación de los neuroblastos.

En este sentido las etapas intermedias se vuelven un blanco importante de STAT1, pues es indispensable que los neuroblastos den paso al desarrollo de neuronas inmaduras con procesos dendríticos complejos, para que posteriormente estas neuronas alcancen las etapas maduras de la neurogénesis

ETAPA DE MADURACIÓN NEURONAL

Se observa que el número de células positivas a calretinina, marcador celular que identifica a las neuronas granulares inmaduras, que posteriormente se convertirán en neuronas maduras para integrarse a los circuitos neurales existentes, es menor en el animal KO-STAT1 en comparación con su grupo control.

Esto resulta importante debido a que en la etapa de transición de las neuronas granulares inmaduras hacia neuronas maduras, se da una selección por mecanismos moleculares de manera que las neuronas que no tengan los suficientes requisitos para lograr una adecuada maduración son eliminadas durante el proceso

En este sentido el animal KO-STAT1, se ve con desventaja para desarrollar la subsecuente etapa de maduración neuronal que involucra la integración sináptica.

POSIBLES VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN EL PROCESO NEUROGÉNICO

De los interferones que están implicados en la vía JAK-STAT se destaca el IFN- γ que activa STAT1 y regula las etapas proliferación y diferenciación en la neurogénesis (Pereira y cols., 2015). A su vez se ha reportado que el IFN- γ , reduce la proliferación e induce apoptosis por la sobre-regulación de la señal de p21 y caspasa 3 en las NSCs (Mäkelä y cols. 2010).

Lo mismo sucede con el IFN- β , cuya acción controversial es reportada por Hirsch y colaboradores 2009; Lum y colaboradores 2009; Arscott y colaboradores 2011; Nicolas y colaboradores 2013 debido a que puede inhibir o estimular la proliferación y diferenciación de NPCs, y en ambos casos, logra la activación de las proteínas STAT.

Esto es debido a que la transcripción de genes mediada por el IFN- γ es dada a través de vía de señalización JAK-STAT y otros mecanismos que implican a las MAP cinasas y PI3-K, [ambos casos involucrados en la señal de la sobrevivencia neuronal; (Ortega y cols., 2010)], CaMKII [cuya vía de señalización es importante para el almacenamiento de memoria implícita y explícita; (Mayford y cols., 1996)] y NF-kB [importante factor de transcripción para la función glial y neuronal; (O'Neill y Kaltschmidt, 1997)], que generalmente actúan ya sea en cooperación o de forma paralela con la señal JAK-STAT para la regulación de las muchas facetas de la biología del IFN- γ , donde de manera interesante este último inicialmente se describió como un agente anti-viral, anti-microbiano y que actualmente se consolida como regulador de la apoptosis y del control del ciclo celular (Gough y cols., 2008).

Esto resulta importante debido a que la señal canónica del IFN- γ puede ser un referente para indagar sobre el posible mecanismo que opera en el proceso neurogénico en el modelo KO-STAT1 utilizado en el presente trabajo.

El mecanismo propuesto por Sun y colaboradores 2010, muestra una conexión directa de STAT1 al promotor Shh, donde el IFN- γ , el cual activa a STAT1, induce una rápida transcripción de Shh, que resulta ser resistente a la inhibición de síntesis de proteínas, para inducir un incremento significativo en la proliferación celular de GNP.

Otro de los estudios que muestran resultados con relación a las mismas vías de señalización del IFN- γ y la señal de Shh es el de Walter y colaboradores 2012, donde mencionan que el IFN- γ induce un fenotipo desregulado de NSPCs, las cuales expresan simultáneamente marcadores neurales y gliales, así como propiedades electrofisiológicas determinadas.

Al igual que el grupo de Sun y colaboradores 2010 hallaron que el IFN- γ induce una sobre-regulación de STAT1 y Shh, más confirmaron que el dímero fosforilado de STAT1 es capaz de entrar al núcleo en orden de la unión de la secuencia de GAS en la región promotora Shh; lo que indica que la liberación del IFN- γ y la sobrerregulación de STAT1 está ligada directamente en la inducción de la vía Shh por los dímeros fosforilados de STAT1 que entran al núcleo y funcionan como factores de transcripción.

De ser que un mecanismo semejante reportado por estos dos grupos de estudio (Sun y cols., 2010, Walter y cols., 2012), operara en el GD del hipocampo, este podría explicar porque los procesos de proliferación y diferenciación en etapas intermedias del animal KO-STAT1 en el presente trabajo se ven afectados de forma negativa.

Si en el caso de la proliferación de la ZSG fuese inducida por la proteína Shh en células del tipo 1 y tipo 2, sería coherente que al no estar presente STAT1, disminuya la proliferación del animal KO-STAT1, debido a que STAT1 es inductor de la activación de Shh.

Si bien es cierto que el IFN- γ mediante la activación de STAT1, propicia una adecuada diferenciación en neuroblastos (Pereira y cols., 2015), es probable que al estar ausente la proteína STAT1, también disminuya la

inducción de Shh y consecuentemente se vea afectado negativamente el desarrollo de neuroblastos y neuronas jóvenes, incluso pese a que muy probablemente el IFN- γ , activara otras proteínas de la familia STAT o una transcripción independiente de genes, que por sí mismo el IFN- γ puede activar aún en ausencia de la función de STAT1 conforme a lo reportado por Gough y colaboradores 2008.

Por otra parte Imitola y colaboradores 2013, observan que el incremento de STAT1 en NSCs de la ZSV, induce un aumento de células positivas a SOX2 (células del tipo 1 y 2) en un modelo animal de esclerosis múltiple (EAE por sus siglas en inglés).

También observan que la capacidad de renovación de las NSCs, aumenta con los ratones KO-STAT1, los cuales exhiben un incremento en la proliferación de poblaciones de neuroesferas *in vitro* y un incremento en la proliferación y sobrevivencia de la neurogénesis de NSCs *in vivo*, lo que coincide con Pereira y colaboradores 2015 pero que resulta contrario a lo que aquí se muestra en el caso de la etapa de proliferación y sobrevivencia de NSCs de la ZSG del GD.

Ellos reportan que la activación de STAT1 durante la inducción del modelo EAE, es mediada por el IFN- γ lo que produce células en el fluido cerebroespinal (CSF por sus siglas en inglés), y que a su vez que la red de genes de STAT1 es inducida por el IFN- γ en NSCs.

En el mismo estudio de Imitola y colaboradores 2013, en un modelo KO-STAT1, las células fueron resistente al efecto de deterioro del IFN- γ ., lo puede ser debido a que STAT1 es el segundo mensajero del IFN- γ , y al no estar presente STAT1, la señal del IFN- γ se ve irrupida.

El aspecto quizás más relevante del estudio de Imitola y colaboradores 2013, es que uno de los genes que incrementó en las NSCs del modelo KO-STAT1 en el núcleo de transcripción de las NSC, fue el factor SOX9, el cual es crítico para la renovación y diferenciación de NSCs.

Esto resulta interesante ya que el IFN- γ disminuye la expresión de SOX9 de una manera dependiente de STAT1, donde este último se une a tres regiones diferentes del promotor SOX9, donde STAT1 actúa como un represor transcriptor de SOX9, lo que en cierto modo lleva a pensar que en el modelo de estudio del presente trabajo valdría revisar si este factor se mantiene activo en el GD del hipocampo adulto durante la ausencia de la proteína STAT1.

Finalmente los aportes sobre la proteína STAT1 del presente estudio junto con los previamente realizados por los diferentes grupos de investigación, son de suma importancia debido a las múltiples funciones que STAT1 desempeña en la neurogénesis.

STAT1, el cual se descubrió en las células asesinas naturales del sistema inmune, ahora se sabe que puede desempeñar una función importante sobre la proliferación y diferenciación celular, aun cuando sus niveles (al igual que STAT3 y otras moléculas), pueden disminuir a lo largo del crecimiento y desarrollo desde la etapa embrionaria hasta la adulta (Nicolas y *cols.*, 2009) y donde esta última se ve influenciada por los efectos del envejecimiento que dan lugar al decrecimiento del proceso neurogénico, por lo que los mecanismos que mantienen vigente la renovación de neuronas en el cerebro adulto, son relevantes para el mantenimiento y estabilidad del circuito neuronal de esta etapa adulta (Galvan y Jin, 2007).

Esto confirma que la función de una molécula depende de la etapa, lugar y sistema en el que se localiza y de las moléculas y factores con las que interacciona.

El esfuerzo por dilucidar el mecanismo por el cual STAT1 influye en las primeras etapas del proceso neurogénico no es el último paso que se puede dar para el estudio del complejo desarrollo y funcionalidad de la neurogénesis.

Indagar sobre este modelo KO-STAT1 para estudios posteriores sobre si esta pausa en el proceso neurogénico puede confirmar afecciones del tipo cognitivo en la memoria y el aprendizaje, también son uno de los eslabones que hay que integrar a este camino.

Lo que sugiere la realización de estudios que incluyan a aquellas neuronas que logran tener un desarrollo hasta la etapa de maduración en ausencia de la proteína STAT1, para ver si realmente estas neuronas maduras tienen la capacidad de dar un buen funcionamiento a la integridad sináptica y por ende a todas las capacidades a las que está conferida la integración de las redes neuronales.

A continuación se presenta un resumen de la neurogénesis en el animal KO-STAT1 *versus* su control. Ver Figura 21.

Comparación del proceso neurogénico observado en el animal KO-STAT1 versus su control

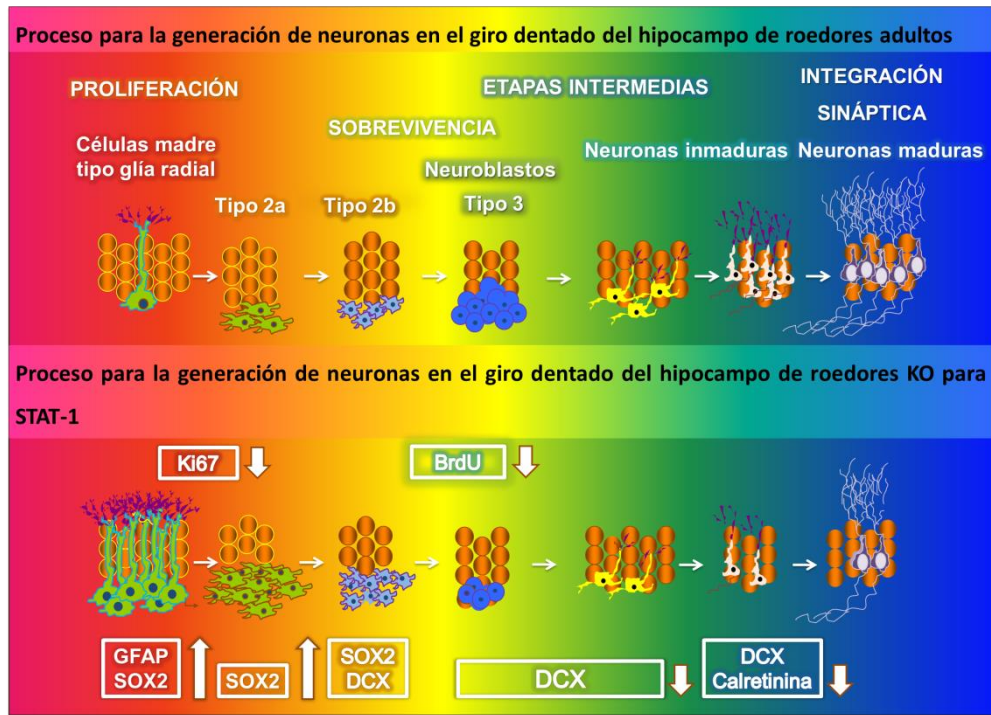


Figura 21. Breve representación del proceso neurogénico observado en el presente modelo de estudio: KO-STAT1 *versus* su control. Las flechas blancas indican el incremento o decremento de las poblaciones celulares en el animal KO-STAT1 en comparación con su grupo control. El fondo de colores degradados que representa las diferentes etapas del proceso neurogénico, coincide con el cambio de los distintos tipos celulares de cada etapa, así como también se muestran los marcadores celulares correspondientes utilizados para observar los respectivos estadios celulares de la neurogénesis. Obsérvese que las poblaciones celulares de las células madre tipo glía radial, células del tipo 2a y células del tipo 2b en el caso del animal KO-STAT1, se encuentran en un mayor número en comparación con el animal control. Por el contrario en las etapas de proliferación, sobrevivencia y estadios intermedios que involucran a los neuroblastos y a las neuronas inmaduras granulares del proceso neurogénico del animal KO-STAT1 presentan un menor número de células en comparación con su grupo control. Esquema modificado y proporcionado de autoría del Dr. Gerardo Bernabé Ramírez Rodríguez.

CONCLUSIÓN

La presencia de la proteína STAT1 en el proceso neurogénico del giro dentado del hipocampo adulto, es importante para que las células del tipo 1, 2a y 2b puedan comprometerse a ser células del tipo 3 y así seguir a las subsecuentes etapas de diferenciación, maduración e integración sináptica.

Perspectivas

La señal canónica del IFN- γ , inicia con la estimulación del mismo, lo que da lugar a la oligomerización de las subunidades del receptor, la activación de las cinasas 1 y 2 de JAK que facilita la transfosforilación de JAKs y las subunidades del receptor.

Es entonces que STAT1 es reclutada hacia el receptor donde pasa a ser fosforilada en tirosina, y forma un homodímero, el cual es la serina fosforilada. El homodímero fosforilado transloca hacia el núcleo y se une a GAS en promotores para iniciar la transcripción de genes (Gough y cols., 2008).

Una tercera parte de los ISGs estimulados por IFNs son regulados por el IFN- γ en ausencia de la función de STAT1. Se ha propuesto que, en ausencia de STAT1, la señal del IFN- γ es al menos parcialmente mantenida a través de la compensación de otros miembros de la familia STAT.

Esto resulta interesante ya que existen estudios que muestran que el IFN- γ puede activar tanto a STAT3 como a STAT5, y que la expresión y fosforilación de STAT3 puede aumentar en ausencia de STAT1 (en el modelo KO-STAT1) (Gough y cols., 2008).

Se podría explicar porque en el presente trabajo el animal KO-STAT1, puede presentar neurogénesis, aunque no de una manera óptima, ya que si bien STAT3 y STAT5 pueden ser agentes proneurogénicos, no logran restaurar en su totalidad las poblaciones celulares en el animal KO-STAT1 en comparación con su grupo control.

También hay registro de que STAT2 y su activación a través del IFN- γ también se da en ausencia de STAT1 (Gough y *cols.*, 2007), lo cual resulta relevante debido a que ofrece una alternativa más al posible mecanismo que se opera en el GD del hipocampo adulto en ausencia de la proteína STAT1.

Sin embargo Gough y colaboradores 2008 mencionan que existe un subgrupo de genes que son transcritos de manera similar en células del tipo silvestre y del tipo KO-STAT1, lo que puede implicar que las vías dependientes de STAT1, no son un plan de contingencia celular para las raras circunstancias de la deficiencia de STAT1.

Esto puede ser debido a que existen vías de señalización que actúan enteramente en paralelo para la señal JAK-STAT1 seguida de la estimulación con el IFN- γ (Gough y *cols.*, 2008), lo que puede dar como resultado un efecto homeostático sobre las vías de señalización en compensación de la ausencia de la proteína STAT1.

Glosario de términos y abreviaturas

ADN: ácido desoxido ribonucleico. En este se contiene la información genética de un organismo.

ARN: ácido ribonucleico. Asiste al ADN para la transcripción y traducción de proteínas.

CA: *Cornu Ammonis* o también llamada asta de Amón, es una estructura del hipocampo la cual se divide en tres regiones, CA1, CA2, CA3.

Célula madre: células indiferenciadas o escasamente diferenciadas que poseen la capacidad de regenerar uno o más de los tipos celulares que constituyen a un ser vivo. Pueden ser embrionarias (generan todos los tipos celulares) o adultos (generan células especializadas de diferentes tejidos-no todos).

Célula multipotente: son las que sólo pueden diferenciarse en células especializadas de la misma línea germinal.

Célula pluripotente: son células con capacidad de diferenciarse en cualquier tipo de célula, de cualquier línea germinal.

Célula totipotente: son las células que participan inicialmente en el desarrollo embrionario, incluyendo el cigoto y las células resultantes de las sucesivas divisiones celulares (fase de mórula); son células madre con capacidad de generar un organismo.

Cerebelo: parte posterior del encéfalo encargado de la coordinación muscular, la sensibilidad y movimientos voluntarios.

Cinasa: proteína enzimática que regula a otras proteínas mediante la fosforilación.

Citosina: base nitrogenada que forma parte de los ácidos nucleicos.

Córtex: también llamado corteza cerebral, es la parte más externa del cerebro. Recubre los hemisferios cerebrales y está conformado de células nerviosas.

Cuerpo calloso: haz de fibras nerviosas que conecta los hemisferios derecho e izquierdo coordinando las funciones de ambos.

Enfermedad de Alzheimer (EA): enfermedad que se caracteriza por la degeneración de las células nerviosas que conlleva a la pérdida de los procesos cognitivos, tales como la memoria.

Esclerosis múltiple (EM): enfermedad del tipo inflamatorio que daña la cubierta de las fibras nerviosas (mielina) del sistema nervioso.

Factor de transcripción: proteína que coordina y regula la expresión de un gen o de un grupo de genes.

Fosforilación: proceso químico mediante el cual se une un grupo fosfato a una proteína, a un glúcido o a otro compuesto.

Gen: fragmento de ADN que se haya dispuesto con un orden fijo en los cromosomas de los seres vivos y que será el que determinará la aparición de determinados caracteres heredados en un organismo. Serie de nucleótidos que almacena la información que se requiere para sintetizar una macromolécula que posee una función específica.

Glía: grupo de células del SN más abundante. Células del soporte neuronal.

Glioblasto: células del SN que se crean en la zona ventricular del neuroepitelio del tubo neural. Proviene de las células progenitoras y conservan su capacidad proliferativa durante toda la vida.

Homeostasis: estado de equilibrio y estabilidad en el cual un organismo funciona efectivamente.

Hormona: sustancia química producida por una glándula endócrina cuya función es efectuada en una célula diana.

Lectina: glicoproteína natural con reconocimiento específico.

Mielocitomatosis: enfermedad que se caracteriza por tumores en cráneo o hueso.

Neocorteza: áreas de más reciente aparición evolutiva de la corteza cerebral.

Neuroblastoma: tumor maligno formado por células nerviosas embrionarias.

Neurona: unidad fundamental del sistema nervioso. Célula conformada por un soma, un axón y dendritas. Integra la información sináptica.

Postnatal: etapa posterior al nacimiento.

Promotor: región de ADN que controla la iniciación de la transcripción de una determinada porción del ADN a ARN.

Prosencéfalo: cerebro primitivo anterior, que se desarrolla durante la etapa embrionaria.

Proteína recombinante: aquella que se obtiene a partir de una especie o una línea celular distinta a la célula original.

Protooncogen: gen cuyos productos promueven el crecimiento y la división de la célula.

Receptor: proteína de membrana que contiene un sitio de unión a otra molécula para llevar a cabo una función.

Reelina: es una proteína que se expresa en cerebro y en médula espinal, la sangre y otros órganos y tejidos. Es crucial el proceso de migración neuronal.

Replicación: es el proceso en el cual se copian las cadenas del ADN de una célula para dar origen a dos cadenas de ADN hijas, este proceso es semi-conservativo y bidireccional.

Sinapsis: conexión que se da entre dos células nerviosas a través de la hendidura sináptica para excitar o inhibir una señal.

Superficie pial: capa que colinda con la materia gris y el fluido cerebroespinal.

Traducción: proceso por el cual un ARN mensajero, un ARN de transferencia y el ribosoma realizan la síntesis de proteínas.

Transcripción (del ADN): proceso por el cual se sintetiza una molécula de ARN mensajero utilizando un fragmento de ADN como molde.

Transductor: molécula que traduce una señal bioquímica.

BIBLIOGRAFÍA

- ALTMAN, J. & BAYER, S. A. 1990. Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *Journal of Comparative Neurology*, 301, 365-381.
- ARSCOTT, W. T., SOLTYS, J., KNIGHT, J. & MAO-DRAAYER, Y. 2011. Interferon β -1b directly modulates human neural stem/progenitor cell fate. *Brain research*, 1413, 1-8.
- BABU, H., CHEUNG, G., KETTENMANN, H., PALMER, T. D. & KEMPERMANN, G. 2007. Enriched monolayer precursor cell cultures from micro-dissected adult mouse dentate gyrus yield functional granule cell-like neurons. *PLoS One*, 2, e388-e388.
- BAUER, S. 2009. Cytokine control of adult neural stem cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1153, 48-56.
- BONNI, A., SUN, Y., NADAL-VICENS, M., BHATT, A., FRANK, D. A., ROZOVSKY, I., STAHL, N., YANCOPOULOS, G. D. & GREENBERG, M. E. 1997. Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway. *Science*, 278, 477-483.
- BORDEY, A. 2006. Adult neurogenesis: basic concepts of signaling. *Cell Cycle*, 5, 722-728.
- BROWN, J. P., COUILLARD-DESPRÉS, S., COOPER-KUHN, C. M., WINKLER, J., AIGNER, L. & KUHN, H. G. 2003. Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *Journal of Comparative Neurology*, 467, 1-10.
- BUCKINGHAM, S. D., JONES, A. K., BROWN, L. A. & SATTELLE, D. B. 2009. Nicotinic acetylcholine receptor signalling: roles in Alzheimer's disease and amyloid neuroprotection. *Pharmacological Reviews*, 61, 39-61.
- CHIBA, T., YAMADA, M., SASABE, J., TERASHITA, K., SHIMODA, M., MATSUOKA, M. & AISO, S. 2009. Amyloid- β causes memory impairment by disturbing the JAK2/STAT3 axis in hippocampal neurons. *Molecular psychiatry*, 14, 206-222.
- DAHLSTRAND, J., ZIMMERMAN, L. B., MCKAY, R. & LENDAHL, U. 1992. Characterization of the human nestin gene reveals a close evolutionary relationship to neurofilaments. *Journal of Cell Science*, 103, 589-597.
- DALE, M. & RANG, H. 2008. RANG & DALE, Farmacología+ Student Consult. *RANG & DALE, Farmacología+ Student Consult-9788480863032-95, 00.*

- DEDONI, S., OLIANAS, M. C. & ONALI, P. 2010. Interferon- β induces apoptosis in human SH-SY5Y neuroblastoma cells through activation of JAK-STAT signaling and down-regulation of PI3K/Akt pathway. *Journal of neurochemistry*, 115, 1421-1433.
- FERRI, A. L., CAVALLARO, M., BRAIDA, D., DI CRISTOFANO, A., CANTA, A., VEZZANI, A. & NICOLIS, S. K. 2004. Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. *Development*, 131, 3805-3819.
- FONTAINE, R., CASES, O., LELIEVRE, V., MESPLES, B., RENAULD, J.-C., LORON, G., DEGOS, V., DOURNAUD, P., BAUD, O. & GRESSENS, P. 2008. IL-9/IL-9 receptor signaling selectively protects cortical neurons against developmental apoptosis. *Cell Death & Differentiation*, 15, 1542-1552.
- FOSHAY, K. M. & GALLICANO, G. I. 2008. Regulation of Sox2 by STAT3 initiates commitment to the neural precursor cell fate. *Stem cells and development*, 17, 269-278.
- GALVAN, V. & JIN, K. 2007. Neurogenesis in the aging brain. *Clinical interventions in aging*, 2, 605.
- GARCIA, A. D. R., DOAN, N. B., IMURA, T., BUSH, T. G., & SOFRONIEW, M. V. 2004. GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nature neuroscience*, 7, 1233-1241.
- GARZA, J. C., GUO, M., ZHANG, W. & LU, X.-Y. 2008. Leptin increases adult hippocampal neurogenesis in vivo and in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 18238-18247.
- GÓMEZ-NICOLA, D., VALLE-ARGOS, B., PALLAS-BAZARRA, N. & NIETO-SAMPEDRO, M. 2011. Interleukin-15 regulates proliferation and self-renewal of adult neural stem cells. *Molecular biology of the cell*, 22, 1960-1970.
- GOUGH, D. J., GOULD, J. A., HERTZOG, P. J., MESSINA, N., SABAPATHY, K., TRAPANI, J. A., CLARKE, C. J. & JOHNSTONE, R. W. 2007. 44 The Constitutive Secretion of Type I Interferon is Necessary for Maintenance of STAT1 Expression and Cross-Talk between Type I and II IFN. *Cytokine*, 39, 12-13.
- GOUGH, D. J., LEVY, D. E., JOHNSTONE, R. W. & CLARKE, C. J. 2008. IFN γ signaling—Does it mean JAK-STAT? *Cytokine & growth factor reviews*, 19, 383-394.
- HIRSCH, M., KNIGHT, J., TOBITA, M., SOLTYS, J., PANITCH, H. & MAO-DRAAYER, Y. 2009. The effect of interferon- β on mouse neural progenitor cell survival and differentiation. *Biochemical and biophysical research communications*, 388, 181-186.

- HO, K. S. & SCOTT, M. P. 2002. Sonic hedgehog in the nervous system: functions, modifications and mechanisms. *Current opinion in neurobiology*, 12, 57-63.
- IHLE, J. N. 2001. The Stat family in cytokine signaling. *Current opinion in cell biology*, 13, 211-217.
- IMITOLA, J., ELYAMAN, W., OLAH, M., ORENT, W., KHOURY, S. & STAROSSOM, S. Stat1 Regulates Neural Stem-cell Function by Transcriptional Regulation of SOX9. *MULTIPLE SCLEROSIS JOURNAL*, 2013. SAGE PUBLICATIONS LTD 1 OLIVERS YARD, 55 CITY ROAD, LONDON EC1Y 1SP, ENGLAND, 1391-1391.
- JUNG, K.-H., CHU, K., LEE, S.-T., KIM, S.-J., SINN, D.-I., KIM, S. U., KIM, M. & ROH, J.-K. 2006. Granulocyte colony-stimulating factor stimulates neurogenesis via vascular endothelial growth factor with STAT activation. *Brain research*, 1073, 190-201.
- KEE, N., SIVALINGAM, S., BOONSTRA, R., & WOJTOWICZ, J. M. 2002. The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *Journal of neuroscience methods*, 115, 97-105.
- KEMPERMANN, G., JESSBERGER, S., STEINER, B. & KRONENBERG, G. 2004. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends in neurosciences*, 27, 447-452.
- KEMPERMANN, G., KUHN, H. G. & GAGE, F. H. 1997. Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94, 10409-10414.
- KIM, J., JUNG, J., LEE, H. J., KIM, J., WANG, H., KIM, S. & MOON, C. 2009. Differences in immunoreactivities of Ki-67 and doublecortin in the adult hippocampus in three strains of mice. *Acta histochemica*, 111, 150-156
- KRIEGSTEIN, A. & ALVAREZ-BUYLLA, A. 2009. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annual review of neuroscience*, 32, 149.
- LIM, C. P. & CAO, X. 2006. Structure, function, and regulation of STAT proteins. *Molecular biosystems*, 2, 536-550.
- LUCASSEN, P., MEERLO, P., NAYLOR, A., VAN DAM, A., DAYER, A., FUCHS, E., OOMEN, C. & CZECH, B. 2010. Regulation of adult neurogenesis by stress, sleep disruption, exercise and inflammation: Implications for depression and antidepressant action. *European Neuropsychopharmacology*, 20, 1-17.
- LUM, M., CROZE, E., WAGNER, C., MCLENACHAN, S., MITROVIC, B. & TURNLEY, A. 2009. Inhibition of neurosphere proliferation by

- IFN γ but not IFN β is coupled to neuronal differentiation. *Journal of neuroimmunology*, 206, 32-38.
- MAHMOUD, G. S. & GROVER, L. M. 2006. Growth hormone enhances excitatory synaptic transmission in area CA1 of rat hippocampus. *Journal of Neurophysiology*, 95, 2962-2974.
- MÄKELÄ, J., KOIVUNIEMI, R., KORHONEN, L. & LINDHOLM, D. 2010. Interferon- γ produced by microglia and the neuropeptide PACAP have opposite effects on the viability of neural progenitor cells. *PloS one*, 5, e11091.
- MANGOURA, D., PELLETIERE, C., LEUNG, S., SAKELLARIDIS, N. & WANG, D. X. 2000. Prolactin concurrently activates src-PLD and JAK/Stat signaling pathways to induce proliferation while promoting differentiation in embryonic astrocytes. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 18, 693-704.
- MAYFORD, M., BACH, M. E., HUANG, Y.-Y., WANG, L., HAWKINS, R. D. & KANDEL, E. R. 1996. Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene. *Science*, 274, 1678-1683.
- MERAZ, M. A., WHITE, J. M., SHEEHAN, K. C., BACH, E. A., RODIG, S. J., DIGHE, A. S., KAPLAN, D. H., RILEY, J. K., GREENLUND, A. C. & CAMPBELL, D. 1996. Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell*, 84, 431-442.
- MÜLLER, S., CHAKRAPANI, B. P., SCHWEGLER, H., HOFMANN, H. D. & KIRSCH, M. 2009. Neurogenesis in the dentate gyrus depends on ciliary neurotrophic factor and signal transducer and activator of transcription 3 signaling. *Stem Cells*, 27, 431-441.
- NAM, S. M., KIM, Y. N., KIM, J. W., KYEONG, D. S., LEE, S. H., SON, Y., SHIN, J. H., KIM, J., YI, S. S. & YOON, Y. S. 2016. Hairy and Enhancer of Split 6 (Hes6) Deficiency in Mouse Impairs Neuroblast Differentiation in Dentate Gyrus Without Affecting Cell Proliferation and Integration into Mature Neurons. *Cellular and molecular neurobiology*, 36, 57-67.
- NAMBA, T., MOCHIZUKI, H., ONODERA, M., MIZUNO, Y., NAMIKI, H. & SEKI, T. 2005. The fate of neural progenitor cells expressing astrocytic and radial glial markers in the postnatal rat dentate gyrus. *European Journal of Neuroscience*, 22, 1928-1941.
- NICOLAS, C. S., AMICI, M., BORTOLOTTI, Z. A., DOHERTY, A., CSABA, Z., FAFOURI, A., DOURNAUD, P., GRESSENS, P., COLLINGRIDGE, G. L. & PEINEAU, S. 2013. The role of JAK-STAT signaling within the CNS. *JAK-STAT*, 2.

- O'NEILL, L. A. & KALTSCHMIDT, C. 1997. NF- κ B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends in neurosciences*, 20, 252-258.
- ORTEGA, F., PÉREZ-SEN, R., MORENTE, V., DELICADO, E. G. & MIRAS-PORTUGAL, M. T. 2010. P2X7, NMDA and BDNF receptors converge on GSK3 phosphorylation and cooperate to promote survival in cerebellar granule neurons. *Cellular and molecular life sciences*, 67, 1723-1733.
- PATRÍCIO, P., MATEUS-PINHEIRO, A., SOUSA, N. & PINTO, L. 2013. Re-cycling Paradigms: Cell Cycle Regulation in Adult Hippocampal Neurogenesis and Implications for Depression. *Molecular Neurobiology*, 48, 84-96.
- PEREIRA, L., MEDINA, R., BAENA, M., PLANAS, A. M. & POZAS, E. 2015. IFN gamma regulates proliferation and neuronal differentiation by STAT1 in adult SVZ niche. *Frontiers in cellular neuroscience*, 9.
- PLANAS, A., GORINA, R. & CHAMORRO, A. 2006. Signalling pathways mediating inflammatory responses in brain ischaemia. *Biochemical Society Transactions*, 34, 1267-1270.
- PLÜMPE, T., EHNINGER, D., STEINER, B., KLEMPIN, F., JESSBERGER, S., BRANDT, M., RÖMER, B., RODRIGUEZ, G. R., KRONENBERG, G. & KEMPERMANN, G. 2006. Variability of doublecortin-associated dendrite maturation in adult hippocampal neurogenesis is independent of the regulation of precursor cell proliferation. *BMC neuroscience*, 7, 77.
- RAMÍREZ-RODRIGUEZ, G., BENÍTEZ-KING, G. & KEMPERMANN, G. 2007. Formación de neuronas nuevas en el hipocampo adulto: neurogénesis. *Salud Mental*, 30, 12.
- RAMÍREZ-RODRÍGUEZ, G., KLEMPIN, F., BABU, H., BENÍTEZ-KING, G., & KEMPERMANN, G. 2009. Melatonin modulates cell survival of new neurons in the hippocampus of adult mice. *Neuropsychopharmacology*, 34, 2180-2191.
- REGIS, G., PENSA, S., BOSELLI, D., NOVELLI, F. & POLI, V. Ups and downs: the STAT1: STAT3 seesaw of Interferon and gp130 receptor signalling. *Seminars in cell & developmental biology*, 2008. Elsevier, 351-359.
- SCHINDLER, C., LEVY, D. E. & DECKER, T. 2007. JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 20059-20063.
- SEKI, T., SAWAMOTO, K., PARENT, J. M. & ALVAREZ-BUYLLA, A. 2011. Neurogenesis in the Adult Brain I: Neurobiology, Springer Science & Business Media.

- SRIRAM, K., BENKOVIC, S. A., HEBERT, M. A., MILLER, D. B. & O'CALLAGHAN, J. P. 2004. Induction of gp130-related Cytokines and Activation of JAK2/STAT3 Pathway in Astrocytes Precedes Up-regulation of Glial Fibrillary Acidic Protein in the 1-Methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine Model of Neurodegeneration KEY SIGNALING PATHWAY FOR ASTROGLIOSIS IN VIVO? *Journal of biological chemistry*, 279, 19936-19947.
- SUN, L., TIAN, Z. & WANG, J. 2010. A direct cross-talk between interferon- γ and sonic hedgehog signaling that leads to the proliferation of neuronal precursor cells. *Brain, behavior, and immunity*, 24, 220-228.
- TORRES-PÉREZ, M., TELLEZ-BALLESTEROS, R. I., ORTIZ-LÓPEZ, L., ICHWAN, M., VEGA-RIVERA, N. M., CASTRO-GARCÍA, M., & RAMIREZ-RODRIGUEZ, G. B. 2015. Resveratrol Enhances Neuroplastic Changes, Including Hippocampal Neurogenesis, and Memory in Balb/C Mice at Six Months of Age. *PloS one*, 10, e0145687
- TSAI, M. C., CHEN, W. J., TSAI, M. S., CHING, C. H. & CHUANG, J. I. 2011. Melatonin attenuates brain contusion-induced oxidative insult, inactivation of signal transducers and activators of transcription 1, and upregulation of suppressor of cytokine signaling-3 in rats. *Journal of pineal research*, 51, 233-245.
- UND HALBACH, O. V. B. 2007. Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell and tissue research*, 329, 409-420.
- WALTER, J., HARTUNG, H.-P. & DIHNÉ, M. 2012. Interferon gamma and sonic hedgehog signaling are required to dysregulate murine neural stem/precursor cells. *PloS one*, 7, e43338.
- WEN, S., LI, H. & LIU, J. 2009. Dynamic signaling for neural stem cell fate determination. *Cell Adhesion & Migration*, 3, 107-117.
- XU, Z., XUE, T., ZHANG, Z., WANG, X., XU, P., ZHANG, J., LEI, X., LI, Y., XIE, Y. & WANG, L. 2011. Role of signal transducer and activator of transcription-3 in up-regulation of GFAP after epilepsy. *Neurochemical research*, 36, 2208-2215.
- ZIEGLER, A. N., LEVISON, S. W. & WOOD, T. L. 2015. Insulin and IGF receptor signalling in neural-stem-cell homeostasis. *Nature Reviews Endocrinology*, 11, 161-170.