



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**“EFECTO DE LA INFLAMACIÓN AGUDA SOBRE EL CICLO CELULAR Y LA
PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS PRECURSORAS NEURALES EN UN
MODELO *EX VIVO*.”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Lic. B.D.MARLENE SINAI MELO SALAS

TUTOR PRINCIPAL
DRA. ANGÉLICA ZEPEDA RIVERA
[Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. ANAYANSI MOLINA HERNÁNDEZ
[Instituto Nacional de Perinatología.](#)

DR. LUIS BERNARDO TOVAR Y ROMO.
[Instituto de Fisiología Celular.](#)

Ciudad de México. Junio, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

MIEMBROS DEL JURADO DE EXAMEN PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS.

PRESIDENTE	Dra. Castro Obregón Susana.
VOCAL	Dra. Escalante Alcalde Diana María.
VOCAL	Dr. Buijs Rudolf Marinus.
VOCAL	Dr. Covarrubias Robles Luis Fernando.
SECRETARIO	Dra. Pérez Martínez Leonor.



El presente trabajo fue realizado en el “Departamento de medicina genómica y toxicología ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM” y fue dirigido por la Dra. Angélica Zepeda Rivera.

AGRADECIMIENTOS A BECAS Y APOYOS.

-La presente investigación se realizó gracias al programa UNAM-DGAPA-PAPIIT clave: IN203015 y clave: IN208518.

-La presente tesis se realizó gracias a la beca para estudios de maestría otorgada por CONACyT. En el programa “Maestría en ciencias bioquímicas” en la Universidad Nacional Autónoma de México. Nombre del becario: Marlene Sinai Melo Salas. Numero de becario: 584245. CVU: 701004.

AGRADECIMIENTOS ACADEMICOS.

-A mi tutora, la Dra. Angélica Zepeda Rivera. Dra. Ange, a usted le debo mucho, me ayudo a crecer profesionalmente y personalmente. Le agradezco infinitamente toda la confianza y la paciencia que me brindo, fue una tutora excelente. Usted es una mujer que admiro mucho y considero que es un ejemplo académico a seguir. Estar en su equipo de trabajo fue una excelente decisión académica. Siempre la llevaré en mi corazón.

-De manera especial agradezco el apoyo técnico que se me brindo en el “Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo”. En especial agradezco al **M. en C. Carlos Castellanos Barba**, al **M. en C. Erik Espindola** y la **Dra. Andrea Bedoya** por su ayuda técnica y científica en los análisis por citometría de flujo que se presentan en esta tesis.

-Agradezco el apoyo académico de los miembros de mi comité tutor y de los miembros del jurado de examen.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES.

-Le dedico esta tesis a mis papás, Eva Salas y Javier Melo ya que mucho del esfuerzo fué de ellos. **Mamá y papá:** Gracias por el cariño, el apoyo, la comprensión y los consejos que me han brindado, me han hecho una mujer fuerte.

-Agradezco a la **Dra. Hortensia Galeana Sánchez** que ha sido para mí un mentor de vida académica y parte de mi familia.

- Agradezco a todos los miembros del equipo de trabajo del laboratorio C210 que durante todo este tiempo fueron mi familia académica. Agradezco en especial a la **Dra. Ana Brígida Clorinda Arias**, por el apoyo académico y orientación que me brindo durante mi maestría y a la **Lic. Patricia Suyapa Ferrera** por su ayuda técnica en el laboratorio.

- Agradezco también a todos mis compañeros que compartieron “casa” conmigo durante estos casi 3 años. Liz, Pau, Manu, Iker, Brandon, Martha, Abril, Karina A., Eva, Cesar, Andrea, Karina Hernandez, y Nelly, de cada uno recuerdo algo especial, gracias por sus consejos académicos y de vida, siempre tendrán un lugar muy grande en mi corazón.

Una persona es fuerte cuando todo su ser esta en equilibrio y lleno de paz.
La sinceridad, la coherencia, la seguridad, el optimismo y la paciencia dentro de uno mismo son los mejores aliados.

Trabaja en eso, valdrá la pena.

-Sinai-

ÍNDICE

RESUMEN.	7
1. ANTECEDENTES.	8
1.1 Neurogénesis en el cerebro adulto.	
1.2 Neurogénesis en el hipocampo.	
1.2.1 Importancia funcional de la neurogénesis en el hipocampo.	
1.2.2 El hipocampo y la zona subgranular del giro dentado del hipocampo como nicho neurogénico.	
1.2.3 Células precursoras neurales (CPNs).	
1.2.4 Etapas del proceso neurogénico en el cerebro adulto.	
1.2.5 Factores que regulan la neurogénesis en el cerebro adulto.	
1.2.6 Inflamación y neurogénesis.	
1.3 Ciclo celular y su regulación en el hipocampo.	
1.4 Estudio del ciclo celular por citometría de flujo.	
1.5 Ensayo de formación de neuroesferas como herramienta para el estudio de la capacidad de proliferar de las células precursoras neurales.	
2. JUSTIFICACIÓN.	24
3. HIPÓTESIS.	24
4. OBJETIVOS.	24
4.1. Objetivo general.	
4.2. Objetivos particulares.	
4.3. Objetivos metodológicos.	
5. MATERIALES Y MÉTODOS.	25
5.1. Modelo animal y modelo de inflamación por LPS.	
5.2. Validación del modelo de inflamación aguda por LPS.	
5.2.1. Prueba de campo abierto.	
5.2.2. Registro del peso corporal.	
5.2.3. Medición de los niveles de la citocina pro inflamatoria IL-6.	
5.3. Evaluación del efecto de la inflamación aguda sistémica sobre la capacidad proliferativa de las CPNs de hipocampo y sobre el número de CPNs capaces de formar neuroesferas a través del ensayo de formación de neuroesferas.	
5.4. Soluciones para citometría de flujo.	
5.5. Anticuerpos empleados en el análisis por citometría de flujo.	
5.6. Estandarización del protocolo para el análisis de las distintas fases del ciclo celular (G0, G1, S, G2, M) por citometría de flujo en las células precursoras neurales de hipocampo.	
5.6.1. Parámetros de adquisición de muestras en el citómetro de flujo Attune NxT.	
5.6.2. Estrategia de análisis para la identificar la población objetivo: células precursoras neurales de hipocampo (CPNs).	
5.6.3. Identificación de la fase del ciclo celular (G0, G1, S, G2 y M) en la que se encuentran las células precursoras neurales de hipocampo.	
5.6.4. Identificación de las fases del ciclo celular en el que se encuentran los diferentes tipos de células precursoras neurales de hipocampo.	
5.7. Evaluación del efecto de la inflamación aguda sistémica sobre la progresión del ciclo celular de las células precursoras neurales de hipocampo.	
5.8. Análisis estadístico.	

6. RESULTADOS.	44
6.1. La administración intraperitoneal de LPS causa reducción en la movilidad y disminución en el peso corporal.	
6.2. La inflamación aguda sistémica disminuye el número de células precursoras neurales de hipocampo capaces de formar neuroesferas.	
6.3. La inflamación aguda sistémica causada por la administración de LPS disminuye el porcentaje de células precursoras neurales de hipocampo en fase S, G2 y M del ciclo celular.	
6.4. La inflamación aguda sistémica causada por la administración de LPS no afecta el porcentaje de células precursoras neurales de hipocampo BLBP+/TBR2- (CPNs tipo 1).	
6.5. La inflamación aguda sistémica causada por la administración de LPS no afecta la distribución de las células precursoras neurales de hipocampo BLBP+/TBR2- (CPNs tipo 1) en las distintas fases del ciclo celular.	
6.6. La inflamación aguda sistémica causada por la administración de LPS induce un mayor porcentaje de células precursoras neurales de hipocampo TBR2+ (CPNs tipo 2).	
6.7. La inflamación aguda sistémica causada por la administración de LPS disminuye el número de células precursoras neurales de hipocampo TBR2+ (CPNs tipo 2) en la fase S, G2 y M del ciclo celular.	
7. DISCUSIÓN.	57
8. CONCLUSIONES.	64
9. ANEXOS.	65
Anexo 1. Estrategia de análisis para la identificación del estadio del ciclo celular (G0, G1, G2, M) de los diferentes tipos de células precursoras.	
10. REFERENCIAS.	68

RESUMEN

La neurogénesis en el cerebro adulto se define como el proceso de formación de nuevas neuronas a partir de células precursoras neurales (CPNs) que tienen la capacidad de diferenciarse hacia neurona. Existen 3 tipos de CPNs: Tipo 1 o células precursoras tipo glía radial, tipo 2 o células precursoras de amplificación transitoria y tipo 3 o neuroblastos.

La neurogénesis es un proceso complejo que abarca varias etapas que incluyen: la activación y la proliferación de las células precursoras, la diferenciación hacia neurona y la maduración neuronal. La fase de proliferación involucra a los tres tipos de CPNs. Cuando las CPNs tipo 1 se activan son capaces de auto renovarse o bien por medio de divisiones asimétricas dar lugar a las CPNs tipo 2. Las CPNs tipo 2 proliferan y al continuar con su diferenciación hacia neurona dan lugar a las CPNs tipo 3.

La neurogénesis es un proceso que puede ser modulado negativamente. La inflamación por la administración de LPS, un lipopolisacárido de origen bacteriano, es un factor que se conoce disminuye la neurogénesis *in vivo*. Un paso crítico que determina la producción neta de nuevas neuronas es la proliferación de las CPNs, sin embargo se desconoce si la disminución neurogénica que ocurre tras un evento inflamatorio se debe a la disminución del número de CPNs capaces de proliferar y en particular, si algún tipo específico de estas células se ve afectado.

Para analizar este objetivo, se les administró a ratones C57BL/6 de 8 semanas una dosis de LPS (1mg/Kg de peso) vía intraperitoneal. Como control se administró NaCl al 0.9% estéril. Los animales se sacrificaron siete días después de la administración y se procedió según la estrategia experimental. A través de la utilización del ensayo de formación de neuroesferas se demostró que la administración de LPS disminuye en un 50% el número de CPNs capaces de formar neuroesferas en comparación con el control y no afecta la capacidad proliferativa de las CPNs. En este trabajo se estudió si la inflamación causada por la administración de LPS impide la progresión del ciclo celular de las CPNs. Siete días posteriores a la administración de LPS se analizó por citometría de flujo la fase del ciclo celular en la que se encontraban las CPNs. Se encontró una disminución en el porcentaje de CPNs totales en fase S, G2 y M del ciclo celular en los ratones administrados con LPS en comparación con el control. Posteriormente, con el fin de analizar si la inflamación afecta de manera selectiva la progresión del ciclo celular de algún tipo específico de CPN, se obtuvo el porcentaje de CPNs tipo 1 y tipo 2 y se evaluó la distribución de estas células en cada fase del ciclo celular. En las CPNs provenientes de los ratones tratados con LPS no se encontraron cambios en la población de células tipo 1 ni en el número, ni en la distribución de células en cada fase del ciclo celular. En las CPNs tipo 2 se observó un mayor porcentaje de células y un menor porcentaje de estas células en fase S, G2 y M. Los resultados de este estudio apuntan a que la disminución en la neurogénesis en hipocampo que ocurre después de un evento de inflamación por LPS se debe en cierta medida a la disminución del número de células precursoras neurales capaces de proliferar y se propone que la afectación es a nivel de la disminución de las CPNs tipo 2 en fase S, G2 y M del ciclo celular.

1. ANTECEDENTES.

1.1. Neurogénesis en el cerebro adulto.

El cerebro es un órgano plástico que es capaz de responder y adaptarse ante cambios en su medio externo e interno. Una manifestación de plasticidad cerebral en el adulto es la neurogénesis o formación de neuronas. La neurogénesis adulta se define como el proceso de formación de nuevas neuronas en el cerebro a partir de células precursoras neurales (CPNs) que tienen la capacidad de diferenciarse hacia neurona.

Existen 3 tipos de CPNs: Tipo 1 o células precursoras tipo glía radial, tipo 2 o células precursoras de amplificación transitoria y tipo 3 o neuroblastos.

La neurogénesis en el cerebro adulto es un proceso complejo que abarca varias fases que incluyen: la activación y la proliferación de las células precursoras, la diferenciación hacia neurona, la supervivencia de las nuevas células, la maduración y la integración de las neuronas en la red neuronal preexistente (revisado en, Kempermann et al., 2016).

En roedores se conocen dos sitios principales donde se lleva a cabo la neurogénesis en el cerebro adulto: la zona subventricular de los ventrículos laterales (ZSV) (Altman 1969; Doetsch et al., 1999) y en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo (ZSG) (Cameron et al., 1993; Kuhn, et al. 1996).

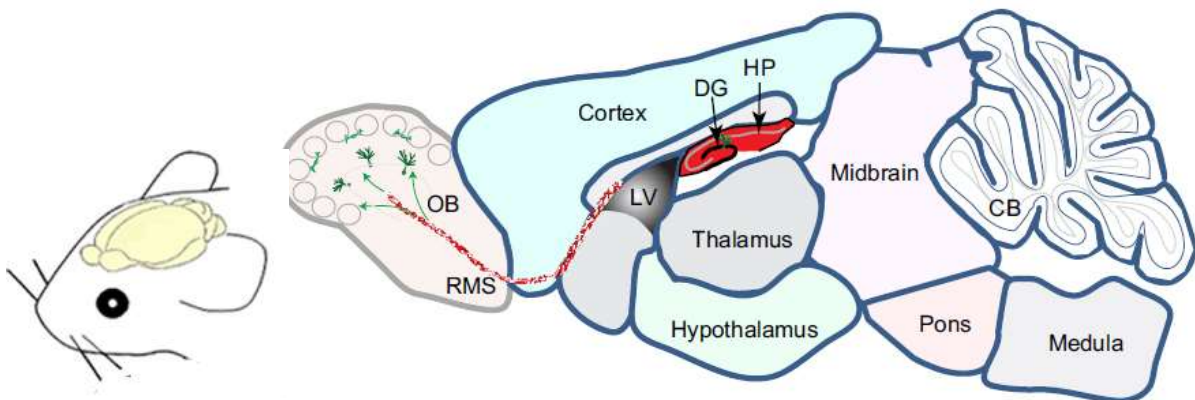


Figura 1. Representación de la vista sagital de un cerebro de roedor, que muestra la localización de los dos nichos principales de neurogénesis. DG (giro dentado) en la HP (formación hipocampal) y LV (ventrículos laterales). RMS (vía rostral migratoria). OB (bulbo olfatorio). Imagen tomada de: Ming y Song., 2011.

1.2. Neurogénesis en el hipocampo.

1.2.1. Importancia funcional de la neurogénesis en el hipocampo.

El hipocampo está implicado en la modulación de algunas formas de aprendizaje y memoria, en particular, se cree que el giro dentado realiza una codificación de la información que recibe integrando tanto el objeto visual como la información espacial suministrada por la vía perforante para crear una memoria de una representación espacial "total" (Kesner y Rolls., 2015).

Las nuevas células granulares del giro dentado están vinculadas con el aprendizaje de tipo espacial, la retención de la memoria espacial a largo plazo, la separación de patrones (un proceso que transforma recuerdos similares en representaciones no superpuestas), el condicionamiento de traza y la memoria de miedo al contexto (Deng et al., 2010; Aimone et al., 2011; Tronel et al., 2012; Shors et al., 2001; Ko et al., 2009).

Estudios en modelos animales indican que la reducción en la cantidad de nuevas células produce déficits en la memoria espacial (en particular la retención de memoria a largo plazo en la prueba del laberinto acuático de Morris) y déficits en la memoria dependiente al contexto (específicamente el desempeño de tareas conductuales de condicionamiento de miedo al contexto) (Ko et al., 2009; Saxe et al., 2006; Tronel et al., 2012). Del mismo modo, ratones a los que se les reduce la neurogénesis después de la irradiación con rayos X muestran deficiencias en dos pruebas de separación de patrones espaciales: la prueba de laberinto de brazo radial y la cámara operante (una tarea de memoria basada en una pantalla táctil) (Clelland et al., 2009).

1.2.2. El hipocampo y la zona subgranular del giro dentado del hipocampo como nicho neurogénico.

El nombre "hipocampo" deriva de su forma que es semejante a un caballito de mar; en griego Hippos= caballo, Kampi= curva. El hipocampo consiste en dos capas delgadas de neuronas plegadas una sobre otra; una capa es llamada giro dentado y está constituida por neuronas granulares y la otra es llamada cuerno de Amón (CA) y está constituida por neuronas piramidales (**Figura 2**).

El hipocampo recibe información de la corteza entorrinal (que a su vez recibe información de múltiples áreas corticales y sensoriales) por medio de un conjunto de axones que conforman la "vía perforante". La vía perforante medial envía la información espacial,

mientras que la vía perforante lateral envía la información visual del objeto; por ejemplo, olores u objetos (Hunsaker et al., 2007). Los axones de la vía perforante hacen sinapsis con las neuronas granulares del giro dentado. Los axones de las neuronas del giro dentado (que en su conjunto conforman las fibras musgosas) hacen sinapsis con las neuronas piramidales de CA3. Los axones de las neuronas de CA3 llamadas colaterales de Shaffer forman sinapsis con las neuronas piramidales en CA1 (ver **figura 3**, Toni y Schinder., 2015).

La zona subgranular del giro dentado del hipocampo (ZSG) es una banda estrecha de tejido entre la capa de células granulares y el hilus (Amaral y Lavenex., 2007) (**Figura 3**). En la ZSG residen las CPNs por lo que se le conoce como nicho neurogénico. El microambiente en la ZSG es permisivo para la formación de nuevas neuronas ya que a nivel celular está compuesto por diferentes tipos de células precursoras, neuronas inmaduras, neuronas maduras, astrocitos y microglía (**Figura 4**). A nivel molecular, en la ZSG se encuentran diversos neurotransmisores, citocinas, químicinas, factores neurotróficos, factores de crecimiento, entre otras moléculas las cuales son liberadas por las propias células presentes en el nicho (Zhao et al., 2008). La ZSG también presenta plexos vasculares por lo que el nicho está en contacto constante con las moléculas periféricas circulantes, nutrientes y factores liberados por las propias células endoteliales de la barrera hematoencefálica, dichos elementos celulares y moleculares influyen a distintos niveles en el proceso neurogénico; por ejemplo, en experimentos *in vitro* los astrocitos del hipocampo son capaces de regular la neurogénesis al aumentar la proliferación de las células precursoras y aumentar la tasa de diferenciación neuronal (Song et al., 2002). También, en la ZSG la microglía se ha visto involucrada en la regulación de la neurogénesis a través de la fagocitosis de las neuronas recién nacidas que no continúan con el proceso de maduración y entran en un proceso apoptótico (Sierra et al., 2010).

En conjunto el microambiente celular y molecular del nicho neurogénico puede influir y regular de manera positiva o negativa el proceso neurogénico.

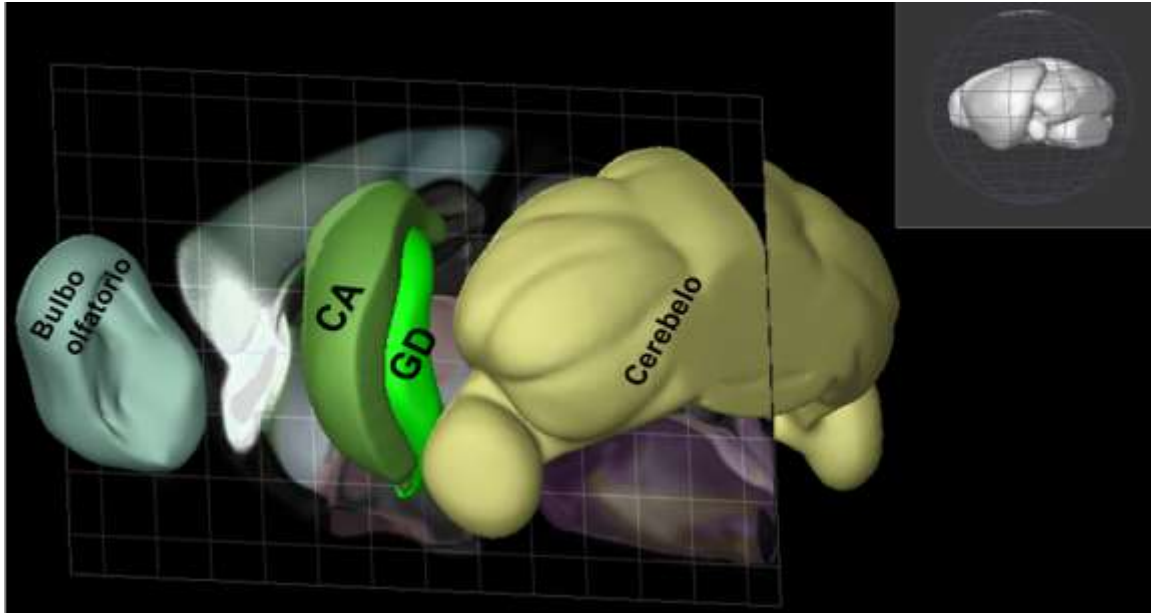


Figura 2. Vista sagital de un modelo tridimensional de cerebro de ratón donde se observa la localización espacial del hipocampo en en cerebro. CA: Cuerno de Amón. GD: Giro dentado. Imagen modificada tomada de: Brain Explorer, Allen Institute for Brain Science.

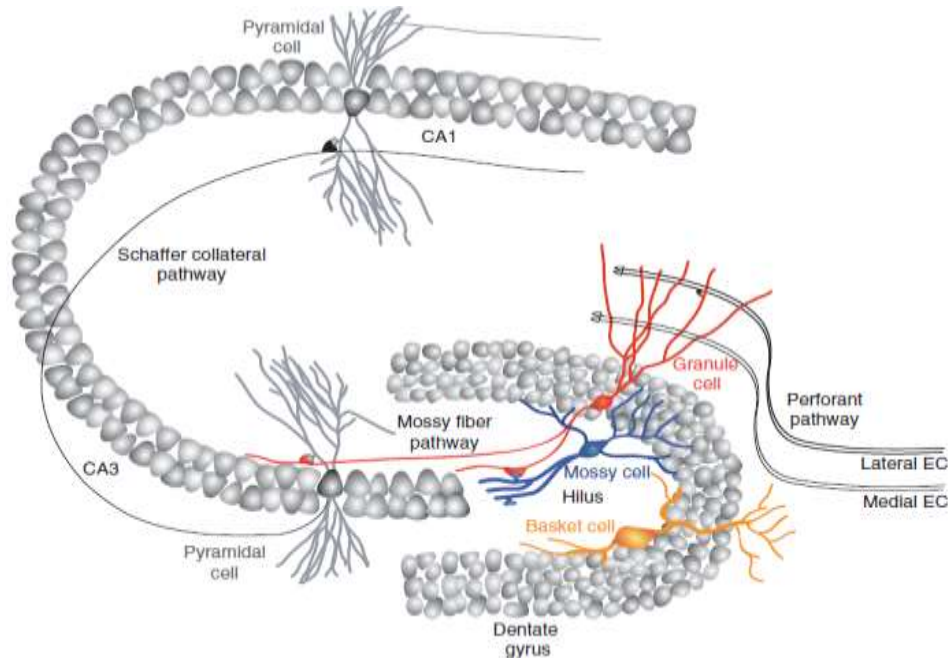


Figura 3. Esquematación de la conectividad en el hipocampo. (CA): cuerno de Amón. (EC): corteza entorrinal. Pyramidal cell: célula piramidal, Schaffer colateral pathway: vía colateral de Schaffer, Mossy fiber pathway: vía de las fibras de Mossy. Mossy cell: células de Mossy, Dentate gyrus: Giro dentado, Pyramidal cell: célula piramidal, Granule cell: célula granular, Basket cell: célula en cesta. Imagen tomada de: Toni et al., 2016.

B

Adult hippocampal niche

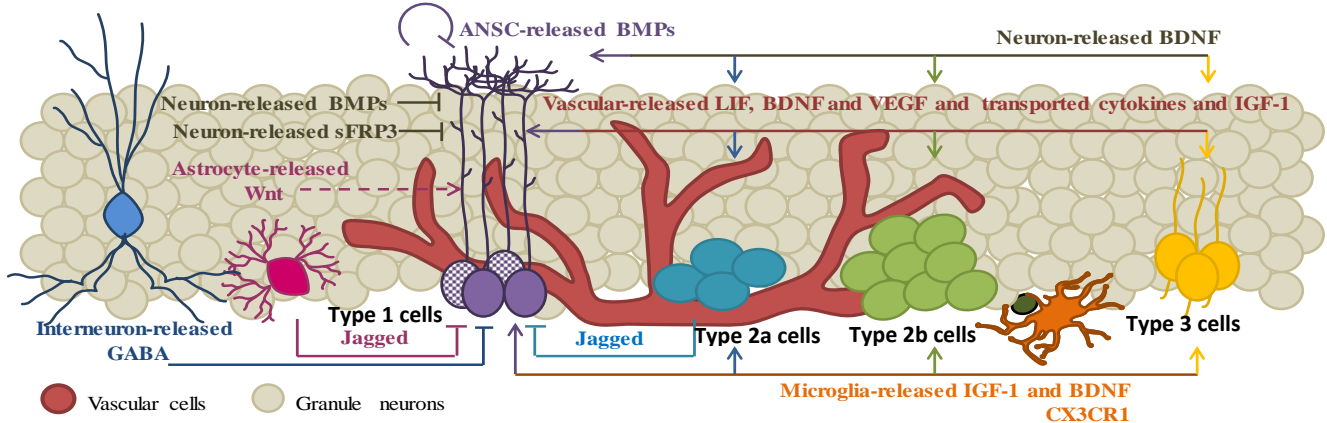


Figura 4. Ilustración esquemática del microambiente celular fisiológico en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo en el que se muestran algunos factores tróficos involucrados en la progresión de la maduración celular, así como vías de señalización y neurotransmisores que participan en la diferenciación celular. Imagen modificada tomada de Pérez et al., 2017.

1.2.3. Células precursoras neurales (CPNs).

En el hipocampo adulto las células precursoras que dan origen a las nuevas neuronas residen en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo.

Existen diferentes “tipos” de CPNs y su clasificación se basa en diferentes particularidades como su morfología, su tasa de proliferación y la expresión de diferentes proteínas. Se han descrito 3 tipos de CPNs: las CPNs Tipo 1 o células precursoras tipo glía radial, las CPNs tipo 2 o células precursoras de amplificación transitoria y las CPNs tipo 3 o neuroblastos (revisado en Bonaguidi et al., 2016 y Kempermann et al., 2016). Las CPNs tipo 1 presentan características de glía radial y muestran un único proceso que se extiende de forma apical a través de la capa granular y se arboriza en la capa molecular. Las CPNs tipo 1 expresan proteínas como nestina, vimentina, GFAP (proteína acídica fibrilar glial), BLBP (proteína cerebral de unión a lípidos) y el factor de transcripción SOX2. En lo que refiere a la proliferación, las CPNs tipo 1 presentan actividad proliferativa baja en comparación con las CPNs tipo 2, aproximadamente entre el 1 y 2% de estas células incorporan BrdU (un análogo de timidina que se incorpora en la fase S del ciclo celular) tras un pulso, por lo que se definen como una población de células precursoras quiescentes (Encinas et al., 2011). Al activarse las CPNs tipo 1 pueden auto renovarse

mediante la proliferación simétrica y generar así otra CPN 1 o bien mediante la división asimétrica neurogénica pueden dar lugar a una CPN tipo 2. Las CPNs tipo 1 también pueden diferenciarse hacia astrocito (Encinas et al., 2011, revisado en Bonaguidi et al., 2016). Las CPNs tipo 2 tienen forma redonda u ovalada con procesos horizontales cortos paralelos a la ZSG y no presentan el proceso apical que presentan las CPNs tipo 1. Las CPNs tipo 2 dejan de expresar el marcador de glía radial GFAP y expresan los factores de transcripción TBR2 y Mash1. Las CPNs tipo 2 se clasifican a su vez en CPNs tipo 2a y tipo 2b. Las CPNs tipo 2a, se pueden diferenciar de las CPNs tipo 2b ya que estas últimas comienzan a expresar la proteína de citoesqueleto doblecortina (DCX) y los factores de transcripción NeuroD y Prox-1 (Kronenberg et al., 2003, revisado en Beckervordersandforth et al., 2016 y Kempermann et al., 2016). En lo que se refiere a la proliferación, estas células muestran actividad proliferativa alta en comparación con las células tipo 1, aproximadamente del 10% al 20% de estas células incorporan BrdU tras un pulso (Encinas et al., 2011). Debido a su alta tasa de proliferación, estas células también son conocidas como “células de amplificación transitoria”. Las CPNs tipo 3 o neuroblastos se diferencian de las CPNs tipo 2b ya que dejan de expresar TBR2 y aumenta la expresión de DCX, una proteína asociada a microtúbulos relacionada con la migración de las neuronas inmaduras. Además, las CPNs tipo 3 expresan la proteína polisialica de adhesión neural (PSA-NCAM, por sus siglas en inglés). En cuanto a las características morfológicas, las CPNs tipo 3 exhiben prolongaciones neuríticas hacia la zona granular del giro dentado (Kronenberg, G., et al., 2003, Encinas, J., et al., 2011). En la **figura 5** se esquematizan las fases del proceso neurogénico así como los principales acontecimientos y proteínas que se expresan a través del proceso neurogénico.

Las diferentes proteínas que se expresan en cada tipo de CPNs, aunque no son exclusivos de un tipo en particular de célula ayudan su marcaje y a su identificación experimental (Kempermann et al., 2016).

1.2.4. Etapas del proceso neurogénico en el cerebro adulto.

El proceso neurogénico se puede dividir en 4 etapas: 1) fase de proliferación de las células precursoras, 2) fase de diferenciación hacia neurona, 3) fase de supervivencia y 4) fase de maduración e integración de las neuronas en la red neuronal pre existente.

La primera fase conocida como “fase de expansión” o “fase de proliferación” involucra a los tres tipos de CPNs e implica la expansión por proliferación del “pool” de CPNs. El

proceso neurogénico comienza con las células tipo 1. Las células tipo 1 regularmente se encuentran en un estado quiescente (Encinas et al., 2011). Cuando las CPNs tipo 1 se activan, son capaces de auto renovarse por medio de una división simétrica o bien por medio de divisiones asimétricas dar lugar a las CPNs tipo 2. En relación con la proliferación, el factor de transcripción TBR2 se considera importante para la transición de las células tipo 1 a las células tipo 2 ya que suprime la expresión de Sox2 que está relacionado con mantener a las células en un estado indiferenciado (Hodge et al., 2008, Hodge et al., 2012). Las CPNs tipo 2 a y b como se mencionó anteriormente, muestran actividad proliferativa alta en comparación con las células tipo 1 (Encinas et al., 2011). Las CPNs tipo 2b dan lugar a las CPNs tipo 3 que salen de ciclo para diferenciarse en neuronas inmaduras. En condiciones normales, las CPNs tipo 3 presentan una tasa de proliferación baja en comparación a las células tipo 2. Una vez que las células salen de ciclo celular se consideran como neuronas inmaduras y expresan marcadores post-mitóticos como el factor de transcripción NeuN y la proteína de unión a calcio: calretinina (Cameron et al., 1993, Brandt et al., 2003). La mayoría de las neuronas inmaduras se eliminan mucho antes de que realicen conexiones funcionales en CA3 o reciban correctamente entradas de la corteza entorrinal, a esta fase se le conoce como fase de supervivencia post mitótica y se refiere a la muerte por apoptosis en los primeros días de las neuronas inmaduras (Biebl et al., 2000). Las neuronas inmaduras que sobreviven entran al proceso de maduración para convertirse en neuronas maduras. Por último, en la fase de maduración tardía las neuronas expresan la proteína de unión a calcio calbindina (Brandt et al., 2003), muestran una arborización dendrítica completa similar a la de las neuronas preexistentes en la capa granular y pasan por una fase de maduración de espinas y aumento en la plasticidad sináptica (Schmidt et al., 2004).

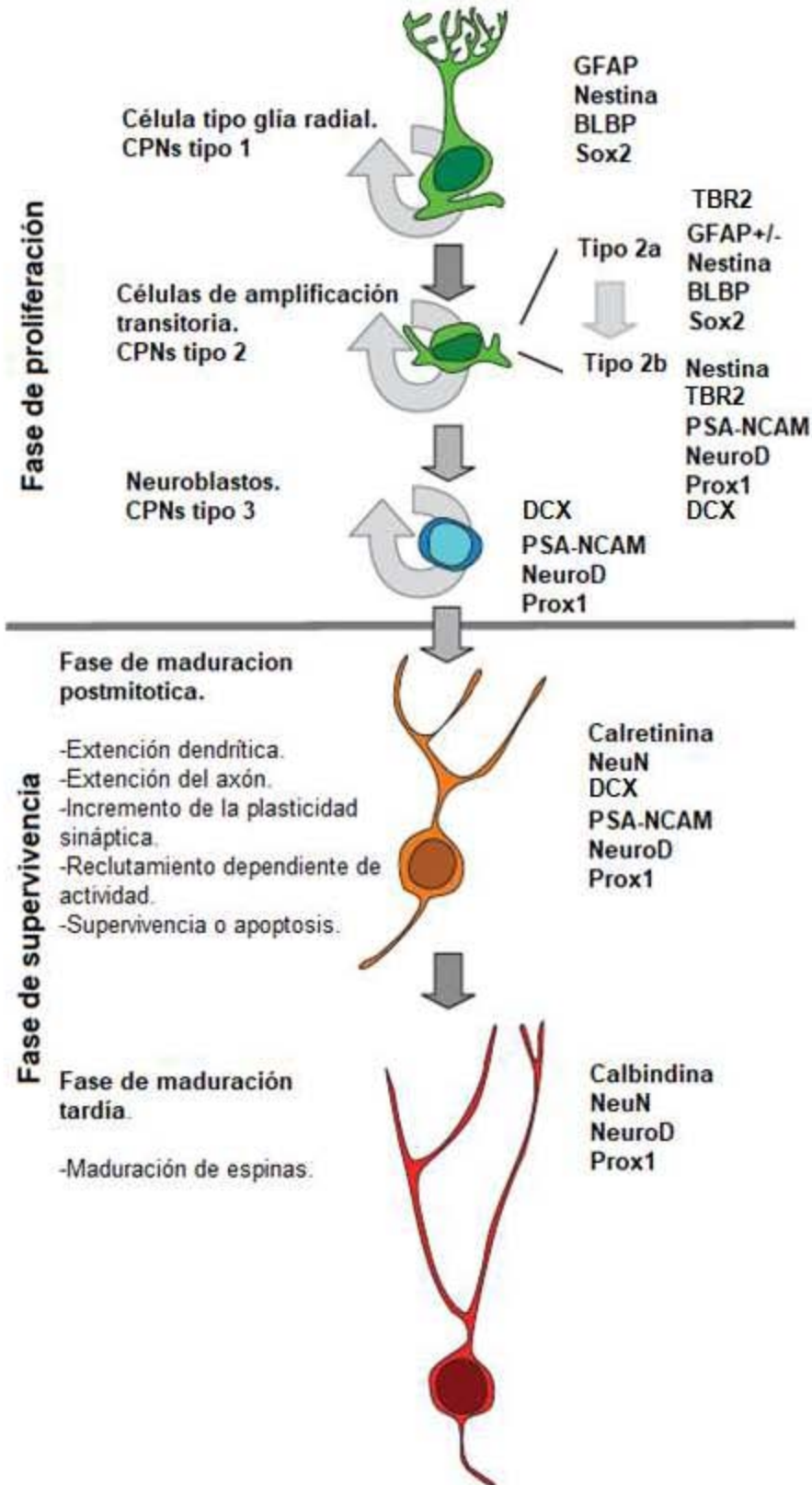


Figura 5. Esquema del proceso neurogénico y sus principales características.

Imagen modificada tomada de: Kempermann et al., 2016.

1.2.5. Factores que regulan la neurogénesis en el cerebro adulto.

La neurogénesis en el adulto es un proceso dinámico que puede ser modulado tanto positivamente como negativamente. Se conocen factores que aumentan la neurogénesis y afectan a diferentes etapas del proceso neurogénico; por ejemplo, el ejercicio aumenta la proliferación de CPNs en el hipocampo (Van Praag et al., 1999; Brown et al., 2003), mientras que la exposición a un ambiente enriquecido aumenta la supervivencia de las células en el periodo temprano post-mitótico (Kempermann y Gage., 1997; Revisado en Zhao et al., 2008). Por otro lado, numerosos estudios indican que el estrés disminuye la proliferación en la ZSG del GD, dicha disminución se asocia a la liberación de corticosteroides y liberación de citocinas pro-inflamatorias como la IL-1 β (Schoenfeld, y Gould., 2012; Revisado en Mirescu y Gould., 2006). Un factor importante que se conoce disminuye la neurogénesis es la inflamación, este factor es de interés en el presente proyecto por lo que se tratará a detalle a continuación.

1.2.6. Inflamación y neurogénesis

La inflamación es la respuesta natural de un organismo a un daño o infección y generalmente está mediada por citocinas pro-inflamatorias como interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), además de mediadores lipídicos como leucotriénos y prostaglandinas. La inflamación se asocia con un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno así como óxido nítrico. Juntos, estos mediadores pro-inflamatorios conducen al aumento en el flujo de la sangre local y a la adhesión y extravasación de neutrófilos, linfocitos y monocitos circulantes (Newton et al., 2012). En el cerebro, la microglía es la principal célula en la respuesta inflamatoria aunque otros tipos de células como células endoteliales de la barrera hematoencefálica, astrocitos y células infiltradas como linfocitos, monocitos y neurotrófilos pueden producir mediadores pro-inflamatorios y contribuir al ambiente inflamatorio (Sierra et al. 2014).

El estudio de la inflamación en el cerebro es importante debido a que diversas patologías neurológicas están ligadas a un ambiente inflamatorio; por ejemplo, la depresión tanto en pacientes humanos como en modelos animales está asociada al incremento en la expresión de citocinas pro-inflamatorias (Anisman y Merali., 1999, Dantzer et al., 2008). De igual manera, la neuroinflamación acompaña y a veces antecede al desarrollo de patologías neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer y Parkinson, por lo que

la inflamación se considera un factor patogénico para la neurodegeneración (Wee., 2010, Chung et al., 2010; Heppner et al., 2015).

La repercusión de la inflamación en el proceso de la formación de nuevas neuronas en el cerebro adulto ha sido foco de múltiples estudios realizados en los últimos años. La mayor parte del conocimiento de los efectos de la inflamación sobre el cerebro proviene de estudios en los que se administraron lipopolisacáridos (LPS) o citocinas pro-inflamatorias para inducir un estado inflamatorio.

El LPS es un componente de la pared celular de bacterias gram negativas que actúa como un potente activador del sistema inmune innato a través de los receptores tipo Toll (TLR). La administración de LPS induce procesos inflamatorios ya que produce una respuesta innata aguda a través de la activación del receptor TLR4 (Newton et al., 2012). La activación del receptor TLR4 por LPS conduce a la producción de mediadores inflamatorios como citocinas y quimiocinas (Carpentier y Palmer., 2009). En el cerebro las células endoteliales de la vasculatura cerebral, la microglía, los astrocitos, las neuronas y las CPNs expresan el receptor TLR4 (Okun et al., 2011).

En relación al impacto de la inflamación sobre el proceso neurogénico, tanto la administración intra cerebral, como sistémica de LPS tienen un efecto negativo sobre él. La infusión crónica de LPS (0.25µ/hora/28días) en el cerebro de ratones adultos causa la activación de la microglía (medida por el aumento en el número de células ED1 positivas) y suprime la neurogénesis evidenciada por la disminución de células BrdU/NeuN positivas en la ZSG del GD del hipocampo (Ekdahl et al., 2003). De igual manera, la administración de una única inyección intraperitoneal de LPS (1mg/kg de peso) disminuye la neurogénesis en el hipocampo. Dicha disminución está evidenciada por la reducción en el giro dentado de un 35% de células BrdU+ que co-expresan DCX que es una proteína propia de neuroblastos. En este último estudio, la disminución de la neurogénesis se asoció a la liberación de citocinas pro-inflamatorias IL-1, IL-6 y TNFα por la microglía activada (Monje et al., 2003), aunque la IL-6 por sí sola inhibe la neurogénesis (Vallieres et al., 2002). La disminución de la neurogénesis tras un evento inflamatorio, también se ha asociado a la liberación de óxido nítrico por la microglía y a la presencia de las enzimas COX-1 y COX-2 que son responsables de la síntesis de prostaglandinas en la microglía y en las células peri vasculares del cerebro (Ruso et al. 2011, Carreira et al., 2014, Packer, et al., 2003).

En los últimos años los estudios se han centrado en los diferentes factores celulares y moleculares que intervienen en la neuroinflamación y en su relación con la disminución de la neurogénesis, sin embargo, aún quedan preguntas importantes por resolver; por ejemplo, aunque se sabe que la inflamación sistémica causada por la administración de LPS provoca disminución de la neurogénesis evidenciada por la disminución de células DCX+/BrdU+ en hipocampo, se desconoce si la inflamación afecta la proliferación de tipos específicos de células precursoras neurales. Este trabajo se centró en estudiar si la inflamación aguda sistémica causada por la administración de LPS disminuye la capacidad proliferativa de las CPNs y si impide la progresión del ciclo celular en algún tipo específico de célula precursora neural.

1.3. **Ciclo celular y su regulación en el hipocampo.**

El ciclo celular es una serie ordenada de acontecimientos que conducen a la división celular. Las células quiescentes residen en la fase llamada "G0" y pueden ser inducidas a entrar a el ciclo celular por estimulación mitogénica. Tras entrar a ciclo, la primera fase se conoce como "fase G1". En G1 la célula tienen un número diploide de cromosomas, crece y comienza la producción de elementos necesarios para la síntesis de ADN que ocurre en la segunda fase, "Fase S". Posteriormente la célula continua en crecimiento o en "fase G2" y finalmente entra a mitosis (M), fase en la cual la célula se divide.

El control del ciclo celular está coordinado por la acción de cinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y sus respectivas ciclinas. Los complejos cinasa-ciclina fosforilan diversas proteínas favoreciendo la progresión del ciclo celular; por ejemplo, la proteína de retinoblastoma (pRb) es una proteína que en su forma no fosforilada permanece unida al factor de transcripción E2F. La asociación de pRb con E2F impide que E2F se transloque al núcleo y promueva la expresión de sus genes blanco los cuales codifican proteínas involucradas en la progresión del ciclo celular como la ciclina A y la ciclina E. En la fase G1 del modelo canónico del ciclo celular, la ciclina D forma un complejo con CDK4/6. Dicho complejo fosforila a la proteína pRb, la fosforilación promueve que pRb libere a E2F y se promueva la expresión de sus genes blanco. El complejo CDK2-ciclina E, mantiene fosforilado a pRb y posteriormente, el complejo CDK2-ciclina A regula positivamente la entrada a la fase S/G2. Finalmente el complejo CDK1-ciclina B, también llamado "complejo promotor de la mitosis" permite el inicio de la mitosis (revisado en Bertoli et al., 2013, Villard et al., 2001).

Existen diferentes puntos de control o “checkpoints” para la progresión hacia cada una de las fases del ciclo celular. La progresión del ciclo celular es regulada negativamente por dos familias de inhibidores de CDKs (CDKI): la familia INK4/ARF donde se encuentran las proteínas p16^{Ink4a}, p15^{Ink4b}, p18^{Ink4c} y p19^{Ink4d} y la familia Cip/Kip donde se encuentran p21^{Cip1}, p27^{Kip1} y p57^{Kip2}. Las proteínas de la familia INK4 principalmente inhiben la formación del complejo Ciclina D/CDK4-6, mientras que las proteínas de la familia Cip/Kip además de inhibir la formación del complejo Ciclina D/CDK4-6 también pueden inhibir a los complejos ciclina E/CDK2 y ciclina A/CDK2 (revisado en, Satyanarayana y Kaldis., 2009, Besson et al., 2008).

En el hipocampo, la desregulación del ciclo celular representa un cambio en la homeostasis de la neurogénesis adulta (revisado en Farioli-Vecchioli y Tirone., 2015). La acetilasa de histonas HDAC3, está altamente expresada en el cerebro. Un estudio reciente indica que la HDAC3 se requiere para la correcta progresión del ciclo celular de las CPNs en el giro dentado a través de la regulación de CDK1. HDAC3 estabiliza a CDK1 y promueve la progresión del ciclo celular. Cuando la HDAC3 no se encuentra presente, la CDK1 se degrada a través de la vía ubiquitina-proteosoma y esto resulta en un paso impedido de la fase G2 a M (Jiang y Hsieh., 2014). Otras moléculas relacionadas con el ciclo celular están involucradas en el proceso de diferenciación; por ejemplo, la ciclina D1 promueve la diferenciación hacia astrocitos, mientras que la ciclina D2 promueve la diferenciación hacia neurona (revisado en Farioli-Vecchioli y Tirone., 2015).

En torno al papel que ejercen los inhibidores de CDKs, el inhibidor p21^{Cip1} se requiere para detener la proliferación de las CPNs. Si se elimina la expresión de p21^{Cip1} aumenta la neurogénesis medida a través del número de células BrdU+ y BrdU+/DCX+ (Pechnick et al., 2008, Pechnick et al., 2011).

De manera interesante, eventos patológicos como la inflamación influyen en la regulación de la expresión de moléculas del ciclo celular, como evidencia, en un modelo *in vivo* de inflamación aguda sistémica causada por la administración de LPS (ip.1mg/kg de peso por 5 días) se reportó un aumento en la expresión de p21^{Cip1} en células DCX+ (neuroblastos) en la ZSG del hipocampo además de la disminución de células DCX+/BrdU+ (Zonis et al, 2013).

Resulta importante estudiar la regulación del ciclo celular de las células precursoras neurales ya que un paso crítico que determina la producción neta de nuevas neuronas es

la proliferación de las células precursoras. Como se mencionó anteriormente, existen eventos patológicos como la inflamación que son capaces de inducir la expresión de reguladores negativos del ciclo celular.

En el presente trabajo fue de interés evaluar si la inflamación impide la correcta progresión del ciclo celular de tipos específicos de células precursoras neurales utilizando para ello la técnica de citometría de flujo asociada a fluorescencia (FACS).

1.4. Estudio del ciclo celular por citometría de flujo.

Medir el contenido de ADN de las células es un método establecido para detectar en qué fase del ciclo celular se encuentran las células en un momento determinado. Los núcleos celulares contienen diferentes cantidades de ADN dependiendo de la etapa en la que se encuentren, por ejemplo, después de recibir señales para la proliferación, las células diploides salen de la fase de reposo G₀ y entran en la fase G₁, en esta etapa las células diploides mantienen su ploidía reteniendo dos conjuntos completos de cromosomas (2N). A medida que las células entran en la fase de síntesis (S) comienza la replicación del ADN y en esta fase, las células contienen cantidades variables de ADN. La replicación del ADN continúa hasta que el contenido de ADN alcanza un estado tetraploide (4N) con dos veces el contenido de ADN del estado diploide. Las células tetraploides en la fase G₂ comienzan a prepararse para la división y entran en la fase de mitosis (M) donde las células se dividen en dos células hija diploides idénticas (2N).

El análisis del ciclo celular por citometría de flujo se basa en la capacidad de teñir con colorantes al ADN en las células de una manera estequiométrica donde la cantidad de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de ADN dentro de la célula. Hoechst es un colorante ampliamente utilizado en el estudio de las fases del ciclo celular ya que se intercala en el ADN bicatenario, en regiones ricas en Adenina y Timina y permite distinguir los núcleos celulares.

Cuando se analizan por citometría de flujo las células teñidas con el colorante nuclear se obtiene una distribución "estrecha" de intensidades fluorescentes, esto se muestra como un histograma de intensidad de fluorescencia (eje X) frente al número de células con cada intensidad observada (eje Y). Dado que todas las células en fase G₀ y G₁ tienen el mismo contenido de ADN, se debe detectar la misma fluorescencia de cada célula en G₀/G₁ y esta se presenta como un único pico en el histograma. Este pico tiene una distribución

gaussiana en forma de campana debido a la variación discreta en la medición de la fluorescencia en cada una de las células así como a la variabilidad en la unión del colorante al ADN. El contenido de ADN aumenta progresivamente hasta completar la fase S. Las células en fase G2 y M también producen un pico gaussiano en el histograma de contenido de ADN con una posición media aproximadamente del doble que la del pico G1 (Pozarowski y Darzynkiewicz., 2004).

En los análisis del ciclo celular donde solo se utiliza un colorante de ADN, no es posible distinguir la fase G0 de la fase G1 debido a que en ambas fases hay el mismo contenido de ADN. Para distinguir entre las fases G0 y G1 se utiliza por ejemplo, un anticuerpo que reconoce a la proteína Ki67, esta proteína no se encuentra en las células que están en fase G0. La proteína Ki-67 está predominantemente localizada en la periferia y en los componentes fibrillares densos del nucléolo durante la interfase y durante la mitosis se traslada a la periferia de los cromosomas condensados. Estudios sobre la función de Ki67 colocan a la proteína como una proteína de andamiaje necesaria para el ensamblaje de la capa pericromosómica en los cromosomas mitóticos condensados (Booth et al., 2014) y como un mediador esencial de la organización de la herocromatina (Sobecki et al., 2016).

La citometría de flujo se utiliza como una herramienta importante en el estudio del ciclo celular de diferentes tipos de células; por ejemplo, el estudio del ciclo celular por citometría de flujo se puede utilizar para estudiar si un tratamiento influye en la progresión del ciclo celular; por ejemplo al mantener a la población celular arrestada en alguna fase del ciclo celular o bien en un estado quiescente y esto a su vez permite comprender como se regula el ciclo celular bajo diferentes condiciones.

En este trabajo se utilizó la técnica de análisis del ciclo celular por citometría de flujo para evaluar en qué fase del ciclo celular (G0, G1 o S/ G2/M) se encuentran las células precursoras neurales tipo 1 y tipo 2 provenientes de ratones administrados con LPS con el fin de evaluar si la inflamación impide la progresión del ciclo celular de un subtipo específico de CPNs.

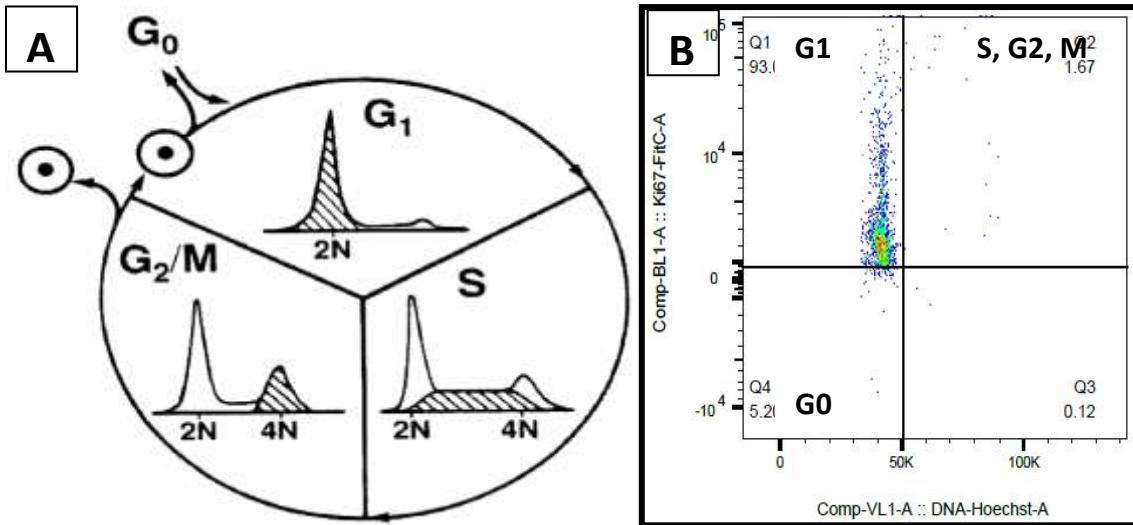


Figura 6: A) Ejemplo de histograma que muestra el contenido de ADN durante cada fase del ciclo celular. En el histograma, el “eje X” representa el contenido de ADN, mientras que el “eje Y” representa la cuenta hipotética de células. La región sombreada corresponde al área que representa cada fase. Imagen obtenida de “Basics of DNA Cell Cycle Analysis”. Pozarowski y Darzynkiewicz, 2004. B) Ejemplo del análisis del ciclo celular por citometría de flujo en el que se utilizó el colorante de ADN Hoechst y el marcaje de la proteína Ki67 para definir cada una de las fases del ciclo celular. La señal de Ki67 se representa en el “eje X”, mientras que la señal de Hoechst se representa en el “eje Y”.

1.5. Ensayo de formación de neuroesferas como herramienta para el estudio de la proliferación de las células precursoras neurales.

Las células precursoras neurales cultivadas en un medio de cultivo con factores que promueven la proliferación, proliferan y forman agregados en forma de esfera son llamados “neuroesferas”. El ensayo de formación de neuroesferas es útil como una herramienta para evidenciar la presencia de células con capacidad de proliferar. El número de neuroesferas formadas es el reflejo del número de CPNs presentes que son capaces de proliferar (Jensen y Parmar., 2006; Babu et al., 2011; Bull y Bartlett., 2005).

El ensayo de obtención de neuroesferas consiste en la obtención de tejido, donde se sabe se encuentran las CPNs, en el caso del hipocampo las CPNs se encuentran en el giro dentado. El tejido es disgregado por métodos físicos y bioquímicos que involucran la utilización de enzimas como tripsina y DNAasa así como membranas que permiten la

separación del tejido en células individuales. Las células se cultivan en condiciones de proliferación en medio libre de suero, complementado con diversos nutrientes y factores de crecimiento como EGF y FGF-2. En condiciones ideales una sola célula precursora es capaz de generar una neuroesfera después de varias divisiones celulares. Las neuroesferas obtenidas directamente de los cultivos primarios son llamadas “neuroesferas primarias”. Las neuroesferas crecen como estructuras esféricas tridimensionales flotantes, la composición celular de la neuroesfera es heterogénea, cada neuroesfera puede tener CPNs en diferentes estados de diferenciación. El tamaño de las neuroesferas obtenidas de un cultivo con hipocampo adulto varía de entre 30 a 300 μm de diámetro después de 10 días en cultivo (**Figura 8**).

En este trabajo se utilizó el ensayo de neuroesferas para evaluar si la inflamación aguda sistémica afecta 1) el número de células precursoras neurales capaces de formar neuroesferas y 2) la capacidad proliferativa de las células precursoras neurales medida en base al tamaño de las neuroesferas.

2. JUSTIFICACIÓN.

Aunque se sabe que la inflamación aguda sistémica causada por la administración de LPS provoca disminución de la neurogénesis evidenciada por la disminución de células DCX+/BrdU+ en hipocampo, se desconoce si la inflamación afecta la proliferación de tipos específicos de células precursoras neurales. En este trabajo se estudió si la inflamación aguda sistémica causada por la administración de LPS causa arresto del ciclo celular en algún tipo específico de célula precursora neural.

3. HIPÓTESIS.

La inflamación aguda sistémica inducida por la administración de LPS disminuye el número de células precursoras neurales capaces de proliferar debido a que la inflamación causa arresto del ciclo celular en tipos específicos de células precursoras neurales.

4. OBJETIVOS.

4.1. Objetivo general.

Analizar la influencia de la inflamación aguda sistémica por la administración de LPS en la progresión del ciclo celular de distintos tipos de células precursoras neurales de hipocampo.

4.2. Objetivos particulares.

1. Analizar el número y tamaño de las neuroesferas formadas a partir de cultivos de células precursoras neurales de hipocampo provenientes de ratones administrados con LPS para evaluar si la inflamación aguda sistémica afecta el número de células precursoras neurales capaces de formar neuroesferas y la capacidad proliferativa de las células precursoras neurales.
2. Analizar el porcentaje de CPNs tipo 1 y tipo 2 presentes en los ratones administrados con LPS con el fin de evaluar si la inflamación afecta el número de células de alguna población en específico.
2. Identificar la fase del ciclo celular (fase G0, G1 o S/ G2/M) en el que se encuentran las células precursoras neurales totales, las CPNs tipo 1 y las CPNs tipo 2 provenientes de ratones administrados con LPS con el fin de evaluar si la inflamación impide la progresión del ciclo celular de un subtipo específico de CPNs.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Modelo animal y modelo de inflamación por LPS.

Se utilizó el modelo de inflamación aguda por LPS previamente descrito (Monje et al., 2003). A ratones C57BL/6 de 8 semanas de edad se les administró una dosis única de LPS (1mg/Kg de peso) por vía intraperitoneal. Al grupo control se le administró el volumen correspondiente a su peso del vehículo (veh) de solución salina fisiológica (SSF) que corresponde a NaCl al 0.9% estéril. Los ratones se alojaron por siete días en ciclo invertido de luz: oscuridad en grupos de 4 ratones en cajas estándar para ratón con libre acceso a comida y agua. Siete días después de la inyección de LPS (día 8) los animales se sacrificaron por inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico y se procedió según la estrategia experimental (**Ver figura 8 A y B**).

5.2. Validación del modelo de inflamación aguda por LPS.

La administración periférica de LPS causa en los ratones un estado inflamatorio que se puede evidenciar por menor movilidad debido al malestar general, pérdida de peso de los animales principalmente por la disminución en la ingesta de comida y agua y un aumento en el cerebro de citocinas pro-inflamatorias como la IL-6 (Engelanda et al., 2001, Kozak et al., 1994, Zonis et al., 2013).

Con el fin de validar el modelo de inflamación aguda sistémica que se utilizó en este trabajo se realizaron las siguientes pruebas: prueba de campo abierto, registro del peso corporal y medición de los niveles de la citocina pro inflamatoria IL-6.

5.2.1. Prueba de campo abierto.

Esta prueba se utiliza para análisis de movilidad y se basa en el comportamiento innato de exploración de los ratones. El ratón se coloca en la caja de prueba y se registra el número de cruces que realiza.

Para la realización de esta prueba se utilizó una caja de campo abierto que consiste en una caja de acrílico de piso y paredes lisas y blancas, con medidas de 40 cm X 40 cm X 30 cm dividida en 16 cuadrantes iguales 10cm X 10cm (**Figura 7**). Se emplearon 15 ratones C57BL/6 de 8 semanas de edad. A un grupo experimental (n=8) se le administró

una dosis única de LPS (1mg/Kg de peso) por vía intraperitoneal (Monje, et al., 2003). Al grupo control (n=7) se administró el volumen correspondiente a su peso del vehículo (NaCl al 0.9%)

Dos horas después de la inyección de LPS o de vehículo (veh), los sujetos realizaron la prueba de campo abierto la cual consistió en colocar a los ratones en la caja de campo antes descrita y registrar el número total de cruces en los cuadrantes que realizaron durante un periodo de cinco minutos. Todos los ratones se colocaron en la caja de campo abierto un día antes de la inyección para habituar a los animales y así evitar enmascaramiento de los síntomas por la conducta innata de exploración que despliegan los ratones (Engelanda et al., 2001). Un menor número de cruces totales en la prueba evidenciaría menor movilidad y por lo tanto malestar general en los ratones (Engelanda et al., 2001, Kozak et al., 1994).

5.2.2. Registro del peso corporal.

Una de las manifestaciones del malestar causado por la administración de LPS es la pérdida de peso de los animales principalmente por la disminución en la ingesta de comida y agua (Kozak et al., 1994).

Se empleó un total de 12 ratones C57BL/6 de 8 semanas de edad. Un grupo experimental (n=5) se administró con una única dosis de LPS (1mg/Kg de peso) por vía intraperitoneal (Monje et al., 2003). Al grupo control (n=7) se le administró el volumen correspondiente a su peso del vehículo. Los ratones se pesaron antes y 24 horas después de la inyección. La disminución en el peso corporal 24 horas después de la administración de LPS evidenciaría malestar en los ratones a causa de la administración de LPS (Kozak et al., 1994).

5.2.3. Medición de los niveles de la citocina pro inflamatoria IL-6.

Un análisis que se desarrolló en paralelo a este trabajo bajo el mismo modelo de inflamación aguda por LPS y las mismas condiciones experimentales corresponde al trabajo de doctorado de la M. en C. Martha Pérez Domínguez. En el mencionado trabajo se utilizaron 7 ratones (SSF, n= 4, LPS, n=3) y se demostró el aumento significativo de la citocina pro inflamatoria IL-6 en el hipocampo medido a través de Western blot 7 días posteriores a la administración de LPS (que corresponde al día en que los ratones en el

presente trabajo se sacrificaron). Aunque estos resultados no se presentan en esta tesis forman parte de la validación del modelo de inflamación por LPS que se utilizó en este trabajo.

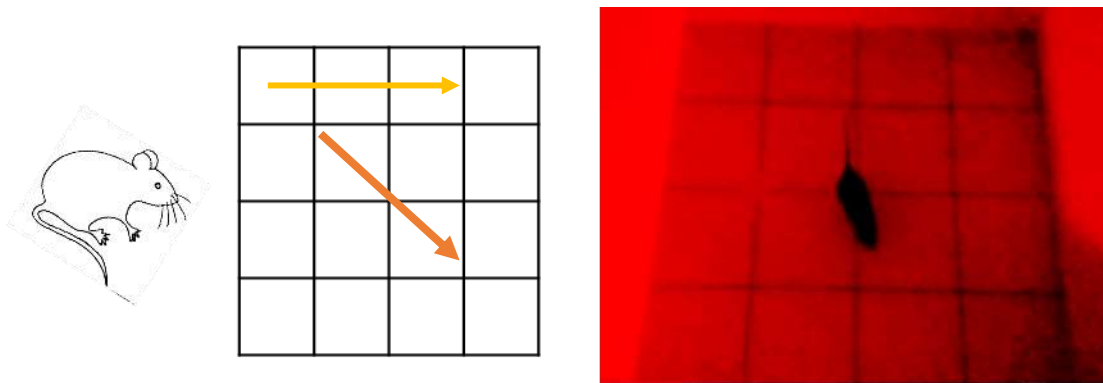


Figura 7: Esquema representativo y fotografía de la caja utilizada para la prueba de campo abierto.

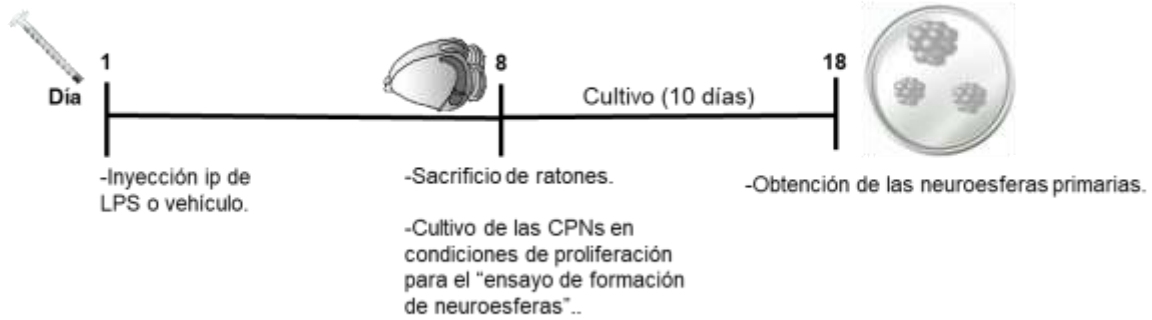
5.3. Evaluación del efecto de la inflamación aguda sistémica sobre la capacidad proliferativa de las CPNs de hipocampo y sobre el número de CPNs capaces de formar neuroesferas a través del ensayo de formación de neuroesferas.

Se utilizó el modelo de inflamación por LPS que se mencionó anteriormente (Apartado 5.1). Se emplearon 7 ratones C57BL/6 de 8 semanas de edad. Un grupo de ratones (n=4) se inyectaron intraperitonealmente con una dosis de LPS (1mg/Kg de peso), mientras que el grupo control (n=3) se administró con el vehículo. Siete días después de la inyección de LPS (**Ver figura 8 A**) se realizó el cultivo primario de células de hipocampo para la obtención de neuroesferas como se especifica a continuación. Se realizó un cultivo independiente por cada ratón. Los ratones se sacrificaron, se extrajo el cerebro y por micro disección se obtuvo el hipocampo que contiene la zona subgranular donde residen las CPNs. El tejido se disgregó por digestión enzimática con tripsina, seguida por la adición de inhibidor de tripsina, DNasa y disgregación mecánica por filtración en membrana de 40 μ , con lo anterior se obtuvo una suspensión de células de hipocampo que incluía CPNs (Gage et al., 1995., Brewer et. al., 2007., Walker et al., 2014). Por cultivo se sembraron un total de 1,920,000 células en una placa de 24 pozos, a una concentración de 240,000 células por mililitro de medio de proliferación, el cual consistió en medio DMEM/F12 (Gibco®) suplementado con 2 mM de glutamina (GlutaMAX, Gibco®), 2% de suplemento B-27 (Gibco®), 0.696U/ml de Heparina, 100U/ml de

penicilina-estreptomicina (Pen/Strep, Gibco®), 10ng/ml del factor bFGF (Prepotech®) y 20 ng/ml del factor EGF (Prepotech®). Las neuroesferas presentes diez días después del cultivo se consideraron como neuroesferas primarias.

Con el objeto de analizar si la inflamación inducida por la inyección de LPS afecta la capacidad proliferativa de las CPNs y el número de CPNs de hipocampo capaces de formar neuroesferas se contaron y midieron las neuroesferas primarias. La disminución en el número de las neuroesferas sería indicativo de un menor número de CPNs capaces de formar neuroesferas, mientras que la disminución en el tamaño de las CPNs sería indicativo de la disminución de la capacidad proliferativa de las CPNs. Se contó el número total de neuroesferas primarias obtenidas por hipocampo de ratón tras diez días de cultivo con ayuda del microscopio invertido Olympus acoplado a una cámara fotográfica. Se tomaron fotografías de cada una de las neuroesferas y se calculó su diámetro con el programa Image J (NIH) (**Figura 9**).

A) Estrategia experimental utilizada para estudiar la influencia de la inflamación sobre la capacidad proliferativa de las CPNs y el número de CPNs capaces de formar neuroesferas.



B) Estrategia experimental utilizada para estudiar la influencia de la inflamación sobre la progresión del ciclo celular de distintos tipos de células precursoras neurales de hipocampo.

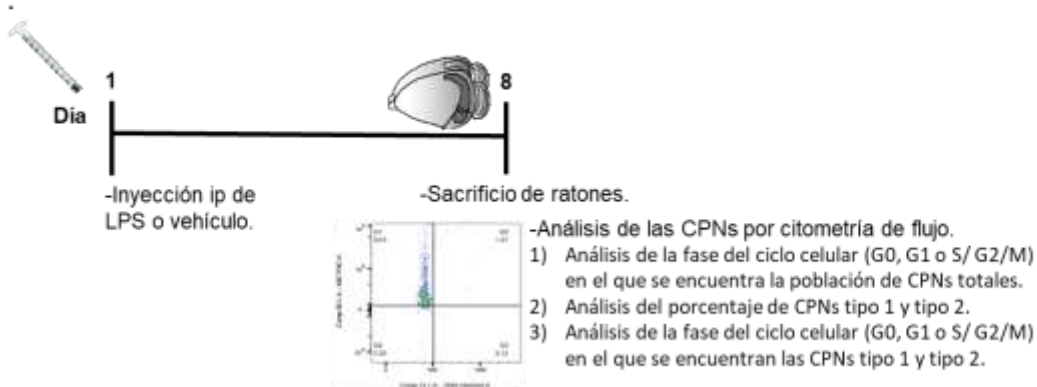


Figura 8 A y B. Esquema de las estrategias experimentales que se utilizaron para evaluar la influencia de la inflamación aguda sistémica por la administración de LPS en las CPNs. A) Estrategia experimental utilizada para estudiar la influencia de la inflamación sobre la capacidad proliferativa de las CPNs y el número de CPNs capaces de formar neuroesferas. B) Estrategia experimental utilizada para estudiar la influencia de la inflamación sobre la progresión del ciclo celular de distintos tipos de células precursoras neurales de hipocampo. **Consideraciones:** Los experimentos "Ensayo de formación de neuroesferas" y "Análisis de las CPNs por citometría de flujo" se realizaron en grupos independientes de ratones. La estrategia experimental fue idéntica desde la administración de LPS (día 1) hasta el día 8, donde se procedió a realizar el cultivo de las CPNs para el ensayo de neuroesferas o bien se procedió realizar el análisis por citometría de flujo. Para más información revisar los **apartados 5.3 y 5.7.**

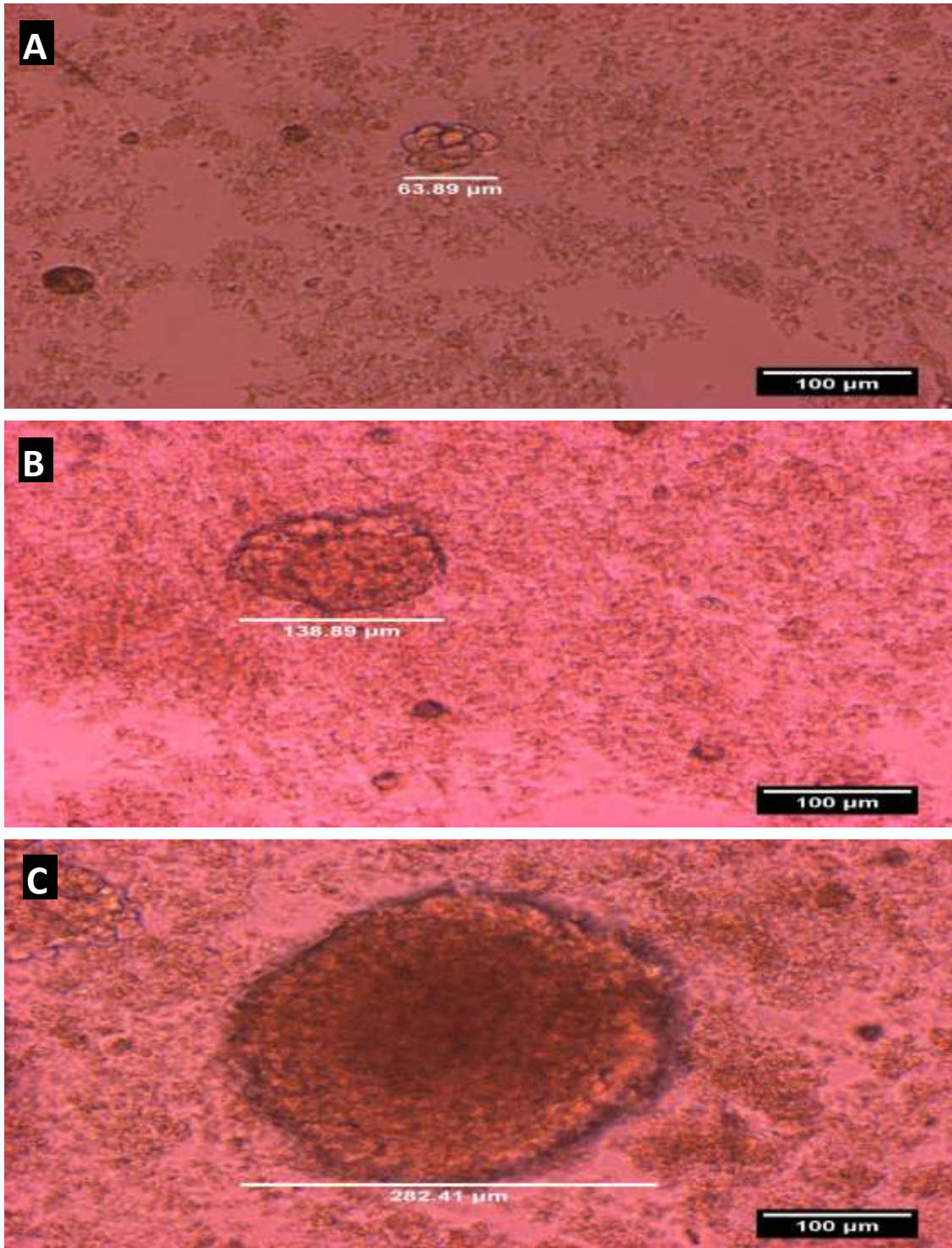


Figura 9. Microfotografías representativas de las neuroesferas primarias (NE) de diferentes tamaños obtenidas a partir de células de hipocampo adulto control cultivadas por 10 días. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio Olympus invertido acoplado a una cámara fotográfica. A) NE de 63.89 μm, B) NE de 138.89 μm y C) NE de 282.41 μm.

5.4 Soluciones para citometría de flujo.

Para fijar y permeabilizar las células se utilizó el kit comercial “eBioscience Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set” de la marca eBioscience®. Las soluciones de trabajo se prepararon según las instrucciones del fabricante como se indica a continuación.

Para preparar la *solución de trabajo de fijación/permeabilización* se mezcló una parte de la solución “Foxp3 fixation/permeabilization concentrado” con tres partes de la solución “Foxp3 fixation/permeabilization diluyente”

Para preparar la *solución de trabajo de buffer de permeabilización 1X* se mezcló 1:9 la solución “Permeabilization buffer 10X” con agua milliQ.

5.5 Anticuerpos empleados en el análisis por citometría de flujo.

Todos los anticuerpos se prepararon en buffer de permeabilización 1X con 2% de suero de caballo y se emplearon a la concentración señalada en la siguiente tabla. La solución de Texas red-avidina se preparó en buffer de bicarbonato.

Molécula identificada	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
Ki-67	anti ki-67-FITC de eBioscience concentración 1.5:1000	*N.A.
Control de isotipo para FitC.	Rat IgG2a K Isotype control FITC de eBioscience. Concentración 1.5:1000.	*N.A.
TBR2	Anti TBR2. Ac. hecho en pollo de Millipore. Concentración 2.5:1000.	Ac. Biotinilado, hecho en burro anti pollo, de Millipore. Concentración 2.5:1000. Mas Texas red-Avidina. Concentración 2.5:1000.
Nestina	Anti Nestina. Ac. hecho en ratón de ebioscience. Concentración 2.5:1000.	Ac. AF 555, hecho en burro anti ratón, de Millipore. Concentración 2.5:1000.
Brain lipid binding protein (BLBP)	Anti BLBP. Ac. hecho en conejo de ebioscience.	Ac. AF 546, hecho en burro anti conejo, de Millipore.

	Concentración 2.5:1000.	Concentración 2.5:1000.
Neuro D	Anti Neuro D. Ac. hecho en cabra de ebioscience. Concentración 2.5:1000.	Ac. AF 633, hecho en burro anti cabra, de Millipore. Concentración 2.5:1000.

Tabla 1. Anticuerpos empleados en el análisis por citometría de flujo. *N.A.: No aplica, ya que el anticuerpo está directamente acoplado a un fluorocromo. Ac.: Anticuerpo.

5.6. Estandarización del protocolo para el análisis de las distintas fases del ciclo celular (G0, G1, S, G2, M) por citometría de flujo en las células precursoras neurales de hipocampo.

5.6.1. Parámetros de adquisición de muestras en el citómetro de flujo Attune NxT.

Las muestras se adquirieron en el citómetro Attune NxT® de la marca Termofisher y posteriormente los datos se analizaron con el programa FlowJo®.

Los datos de fluorescencia del colorante de ADN se adquirieron en modo lineal, mientras que los datos para todos los anticuerpos acoplados a fluorocromos se adquirieron en modo logarítmico.

5.6.2. Estrategia de análisis para la identificar la población objetivo: células precursoras neurales de hipocampo (CPNs).

Para analizar por citometría de flujo una población específica de células en una muestra heterogénea primero se debe de ubicar la población de interés en la ventana de análisis al momento de adquirir la muestra, para ello, se utilizan distintos parámetros entre ellos tamaño (FSC) y complejidad/granularidad (SSC) que se pueden representar en una gráfica de puntos conocida como “dot plot”, donde una población de células aparecerá como una acumulación de puntos en un sitio específico del gráfico debido a que una población homogénea de células regularmente tiene las mismas características de tamaño y complejidad, lo que representado en una gráfica provoca que todos eventos adquiridos se sitúen en un mismo sitio de la gráfica. El primer paso fue ajustar los voltajes de detección para localizar en el dot plot de FSC vs SSC la población objeto de estudio. Para cumplir este objetivo se llevaron a cabo varias aproximaciones de ajuste, la primera aproximación se basó en el tamaño de las células. Utilizando un patrón estándar de perlas de 10µm de diámetro para citometría se ubicó en la gráfica el lugar donde se ubicaban

estas perlas con tamaño parecido al de nuestras células de interés que ronda entre los 7 y 10 μm de diámetro. Una segunda aproximación de ajuste se realizó tomando en cuenta que el tamaño de las CPNs es un poco menor que el de los linfocitos de peritoneo el cual ronda entre los 9 y 14 μm de diámetro, por lo que se ajustaron los voltajes y parámetros de detección para visualizar linfocitos en el citómetro y utilizando estos mismos parámetros se adquirió nuestra muestra celular. Para discriminar las células de los restos celulares se agregó el colorante de ADN Hoechst y se realizó un dot plot de tamaño (FSC-A) contra la señal de Hoechst-A donde se marcó una región que abarcara todos los eventos positivos para la señal de Hoechst, esta región se llamó “*DNA-Hoechst-A, Tamaño-A subset*” (**Figura 10 A**). Para discriminar las células solas (single cells) de las células pegadas o dobletes, se realizó un dot plot proveniente de la región antes mencionada donde se graficó FSC-H contra FSC-A, en esta representación las células solas presentan una correlación lineal entre los valores de FSC-H y FSC-A, por lo que se presentan en una línea recta. Considerando lo anterior, se marcó una segunda región trazando una línea en diagonal que abarcara los eventos que tuvieran una correlación lineal, esta región se le llamó “*single cells*” (**Figura 10 B**). Por último, para identificar dónde se localizan los eventos que representan a las células solas, se realizó un tercer dot plot SSC-A contra FSC-A proveniente de la región “*single cells*”, esta nueva región se le llamo “*CPN*”, haciendo referencia a que en esta región se encontraron los eventos que posiblemente representaban a las células de nuestro interés (**Figura 10 C**). Para confirmar que los eventos en esta región ciertamente se tratan de CPNs, se utilizó una última aproximación basada en la detección de marcadores propios de células progenitoras: Nestina, TBR2 y NeuroD. Los eventos ubicados en la región “*CPN*” fueron positivos para todos estos marcadores, lo que confirmó que con los parámetros utilizados, es posible analizar la población de interés (CPNs) (**Figura 11**).

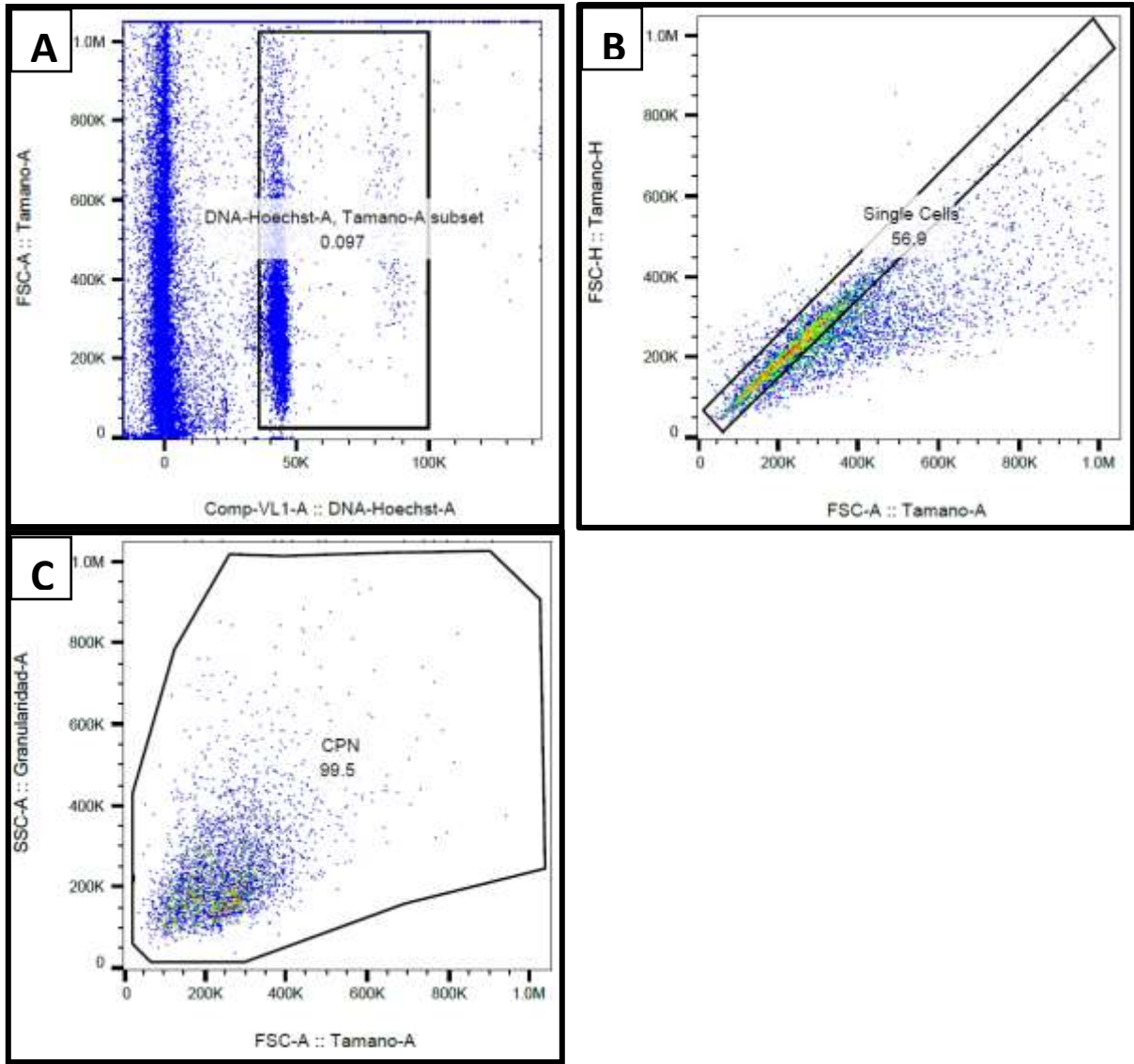


Figura 10. Dot-plots utilizados para la exclusión de los desechos e identificación de la población objetivo. A) Dot plot de tamaño (FSC-A) contra la expresión de Hoechst-A, se muestra la región “DNA-Hoechst-A, Tamaño-A subset”. B) Dot plot FSC-H contra FSC-A proveniente de la región “DNA-Hoechst-A, Tamaño-A subset” muestra la región “single cells”. C) Dot plot de tamaño contra granularidad proveniente de “single cells” muestra la región “CPN”.

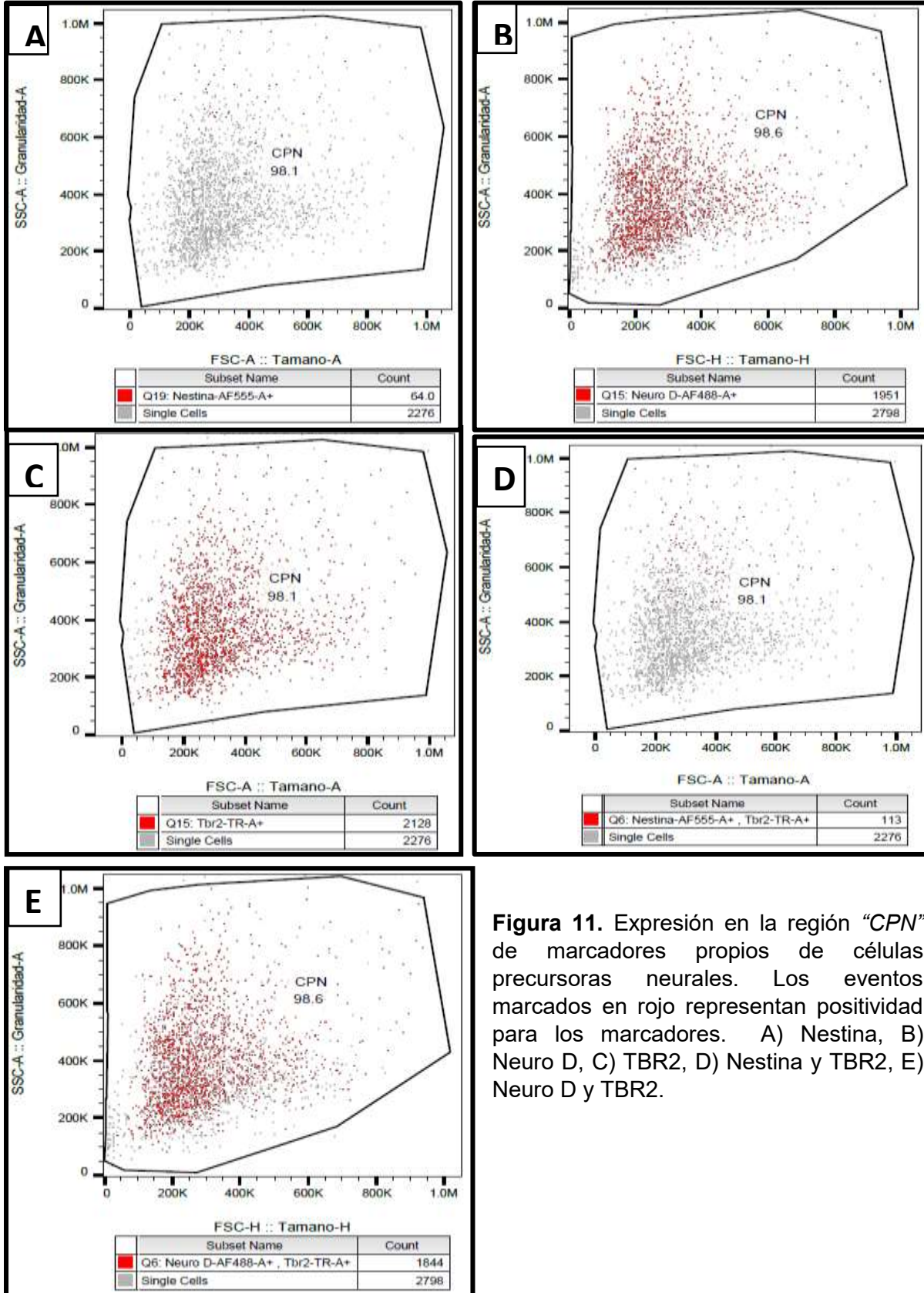


Figura 11. Expresión en la región “CPN” de marcadores propios de células precursoras neurales. Los eventos marcados en rojo representan positividad para los marcadores. A) Nestina, B) Neuro D, C) TBR2, D) Nestina y TBR2, E) Neuro D y TBR2.

5.6.3. Identificación de la fase del ciclo celular (G0, G1, S, G2 y M) en la que se encuentran las células precursoras neurales de hipocampo.

Una vez ubicada la población de interés (“CPN”) se procedió a implementar el análisis de las etapas del ciclo celular. Se marcó el ADN con Hoechst y la proteína Ki67 con un anticuerpo acoplado al fluorocromo FitC.

Se realizó un dot plot de la señal de FitC contra la señal de Hoechst. Primero, para descartar la fluorescencia proveniente de pegado inespecífico se utilizó un control de isotipo que consiste en una inmunoglobulina de la misma clase que el anticuerpo utilizado para reconocer la proteína Ki67 también acoplado a FitC pero sin especificidad, con este control se estableció el eje negativo de fluorescencia para FitC, todo por arriba del eje se consideró positivo para la expresión de Ki67 (Ki67+) y todo por debajo del eje se consideró negativo para Ki67 (Ki67-).

Posteriormente, para establecer el eje de división entre las fases G0 y G1 de las fases S, G2 y M se tomó en cuenta la dinámica conocida del contenido de ADN durante el ciclo celular donde G0 y G1 tienen el mismo contenido de ADN que se visualiza en el dot plot como una acumulación de eventos con una misma intensidad de fluorescencia. En este punto se estableció un eje de división y todo evento a la derecha se consideró en fase S, G2 y M (**Figura 12 A**).

Tras aplicar la estrategia de análisis anterior, se obtuvo un dot plot dividido en cuatro cuadrantes; en el cuadrante inferior izquierdo (Q4) se encontraron los eventos Ki67- que representaron a las células en fase G0, en el cuadrante superior izquierdo (Q1), se encontraron los eventos Ki67+ que representaron a las células en fase G1 y por último, en el cuadrante superior derecho (Q2) se encontraron los eventos Ki67+ que representaron a las células en fase S, G2 y M (**Figura 12 B**). Con la aplicación de esta estrategia de análisis se logró medir la proporción de células en ciclo (Ki67+), fuera de ciclo (Ki67-) y en cada una de las fases (G0, G1, S, G2 y M).

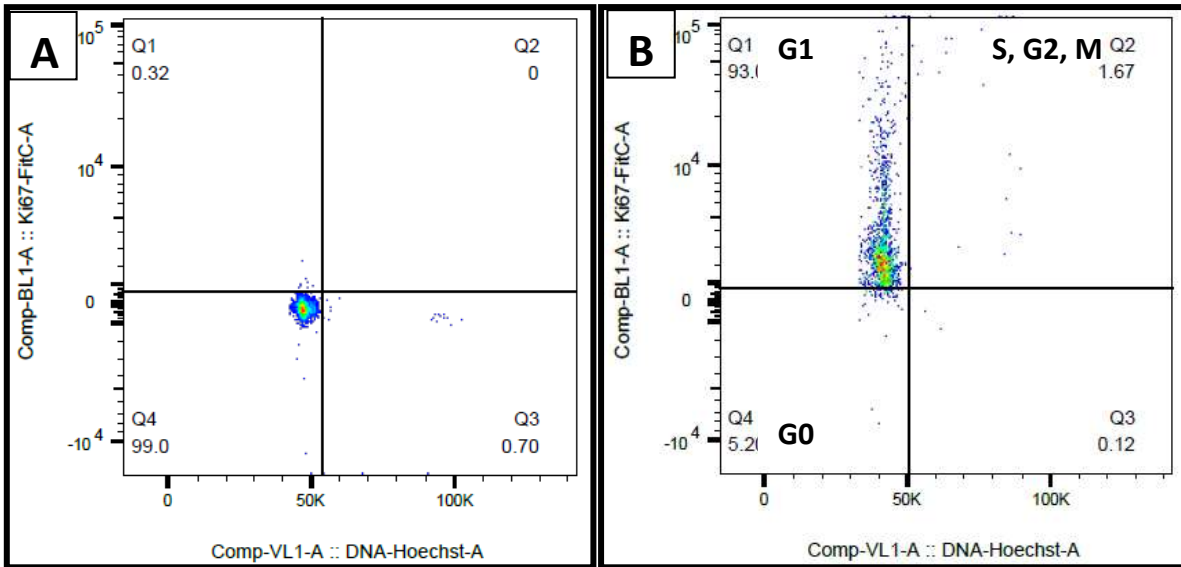


Figura 12. Ejemplo de análisis del ciclo celular de células precursoras neurales de hipocampo utilizando Hoechst y la expresión de Ki67. Los dot plots provienen de la región “CPN”. A) Control de isotipo para descartar la fluorescencia proveniente de pegado inespecífico y establecer el eje de positividad. B)

5.6.4. Identificación de las fases del ciclo celular en el que se encuentran los diferentes tipos de células precursoras neurales de hipocampo.

Una vez ubicada nuestra población de análisis “CPN” se implementó el análisis del ciclo celular de las diferentes poblaciones de células progenitoras. Se realizó un dot plot de la región CPN donde se graficaron las combinaciones de las señales de los fluorocromos que identifican las distintas poblaciones de CPNs, como se indica en la **tabla 2**. Primero para descartar la fluorescencia proveniente de pegado inespecífico se utilizó el control de pegado inespecífico el cual consistió en una muestra de células permeabilizadas marcadas con Hoechst más el control de isotipo Rat IgG2a K FITC y únicamente los anticuerpos secundarios utilizados. Con este control se establecieron los ejes negativos de fluorescencia (**Figura 13A**). Tras aplicar la estrategia de análisis mencionada se obtuvo un dot plot dividido en cuatro cuadrantes; en el cuadrante inferior izquierdo, se encontraron los eventos dobles negativos (eventos que no expresaron ninguno de los marcadores estudiados), en el cuadrante superior izquierdo, se encontraron los eventos positivos únicamente al marcador graficado en el eje “Y”, en el cuadrante inferior derecho se encontraron los eventos positivos únicamente al marcador graficado en el eje “X” y por

último, en el cuadrante superior derecho se encontraron los eventos dobles positivos que representaron a las células que expresan los dos marcadores (**Figura 13B**).

El cuadrante donde se encontró la población de interés se analizó siguiendo el protocolo para el análisis de las etapas del ciclo celular con Hoechst y Ki67 que se mencionó anteriormente (**Figura 13C**). Con la aplicación de esta estrategia de análisis se logró medir la proporción de células en fase G0, G1, S, G2 y M del ciclo celular en las poblaciones de CPNs: BLBP+/TBR2- (CPNs tipo 1), TBR2+ (CPNs tipo 2) y Nestina-/TBR2+ (CPNs Tipo 2).

Marcaje de identificación	Población	Fluorocromos utilizados
Sin marcaje	Todas las células	N.A.
BLBP+/TBR2-	CPNs tipo 1	BLBP (AF 546) / TBR2 (Texas red; TR)
TBR2+	CPNs tipo 2	TBR2 (Texas red; TR)
Nestina-/TBR2+	CPNs tipo 2	Nestina (AF 555) / TBR2 (Texas red; TR)

Tabla 2. Marcadores utilizados para la identificación de las distintas poblaciones de células precursoras neurales de hipocampo.

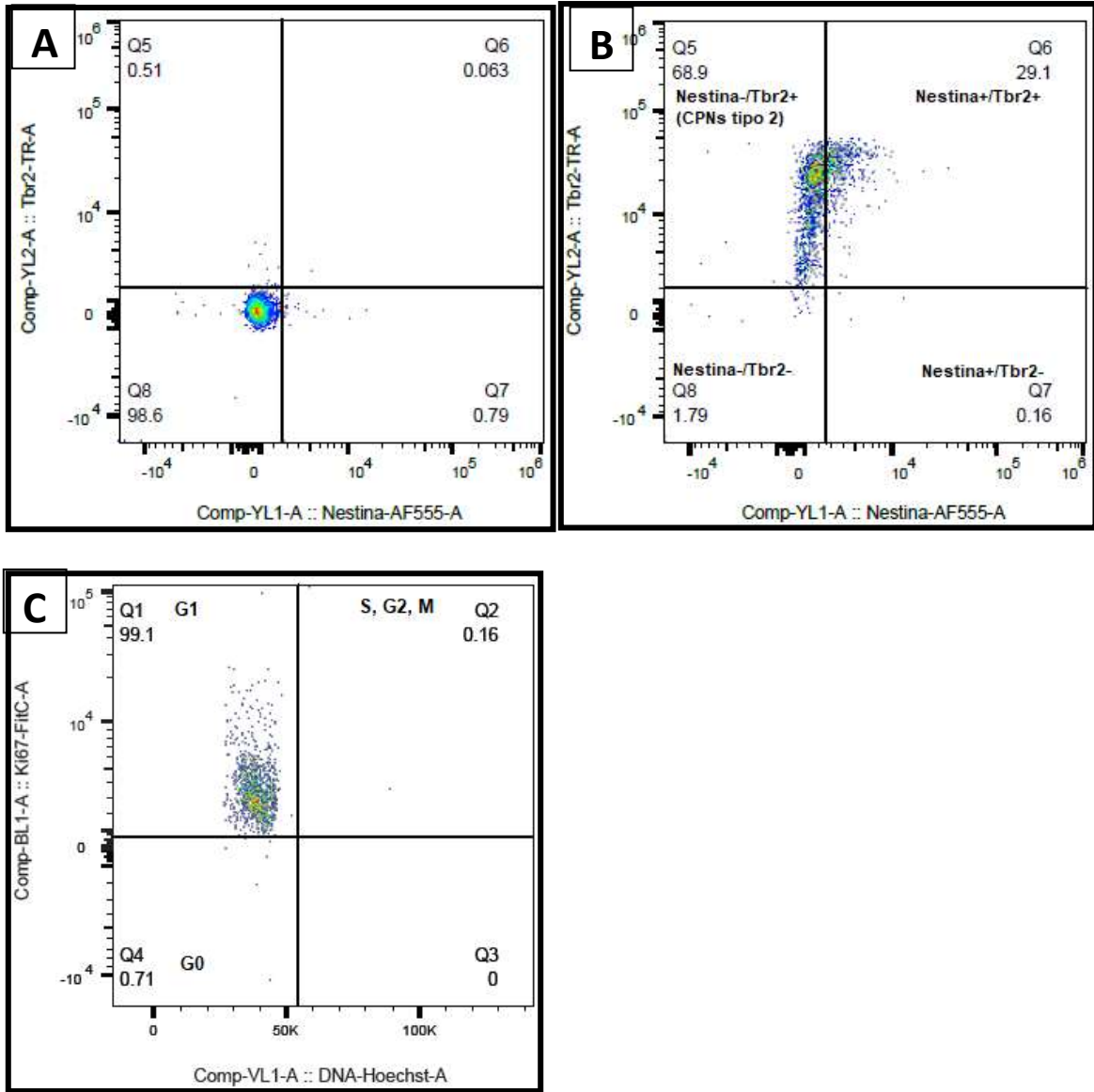


Figura 13. Ejemplo del análisis del ciclo celular de la población de células precursoras neurales Nestina-/TBR+. A) Control para descartar la fluorescencia proveniente de pegado inespecífico y establecer el eje de positividad. B) Se muestra el análisis con la combinación de los marcadores TBR2 y Nestina utilizado para la identificación de la población de las células precursoras neurales tipo 2 (Nestina-/TBR2+). Los dot plots A y B provienen de la región “CPN”. C) Ejemplo del análisis del ciclo celular de las células Nestina-/TBR2+. El dot plot proviene del cuadrante Q5 de B el cual corresponde a las células Nestina-/TBR2+.

5.7. Evaluación del efecto de la inflamación aguda sistémica sobre la progresión del ciclo celular de las células precursoras neurales de hipocampo.

Se utilizó el modelo de inflamación por LPS que se mencionó anteriormente (**Apartado 5.1**). Se emplearon 9 ratones C57BL/6 de 8 semanas de edad. Un grupo de ratones (n=5) se inyectaron intraperitonealmente con una dosis de LPS (1mg/Kg de peso), mientras que el grupo control (n=4) se administró con el vehículo. Siete días después de la inyección de LPS (**Ver figura 8 B**) se analizaron las CPNs por citometría de flujo. Se realizó un análisis independiente por cada ratón siguiendo el protocolo que se detalla a continuación. Los ratones se sacrificaron, se extrajo el cerebro y se obtuvo el hipocampo, posteriormente el tejido se procesó de la misma manera que para el ensayo de formación de neuroesferas (**Apartado 5.3**) hasta el paso donde se obtuvo la suspensión de células de hipocampo. En este punto debido a que la suspensión de células provenía directamente de la disgregación de un tejido y estaba compuesta de una población heterogénea de células y restos celulares, se adaptó un protocolo de limpieza basado en el protocolo publicado por Harish, B. y colaboradores en el 2011 que se fundamenta en la separación por gradiente de densidades con percoll® y se detalla a continuación. La suspensión de células se centrifugó y se re-suspendió a temperatura ambiente en un volumen final de 4.68 ml de medio DMEM F12. Se agregaron 1.32 ml de buffer de percoll®, de manera que quedó a una concentración final de 22% vol/vol de Percoll®. Se verificó que el percoll® quedara perfectamente mezclado. La suspensión se centrifugó 15 minutos a 1590 rpm a 18°C en una centrifuga Eppendorf 5804R, con rotor A-4-44. Después de la centrifugación se apreciaron dos fases: una fase lechosa en la parte superior del tubo con las células que no se dividen o post-mitóticas (astrocitos, neuronas, etc., así como restos de mielina) y una fase en la parte inferior (pellet), con la fracción enriquecida de células precursoras neurales y eritrocitos (Harish, B., et al. 2011; Mahalakshmi, S., et al. 2006; Palmer, T., et al. 1999) (**Figura 14 A**). Se desecharon cuidadosamente 3ml de la parte superior y el pellet se lavó una vez con 3ml de PBS para retirar el percoll®. Se contó el número de células vivas en la suspensión con ayuda de la cámara de Neubauer y azul de tripano para discriminar células vivas de muertas, las células muertas incorporan el colorante y se aprecian azules (**Figura 14 B**).

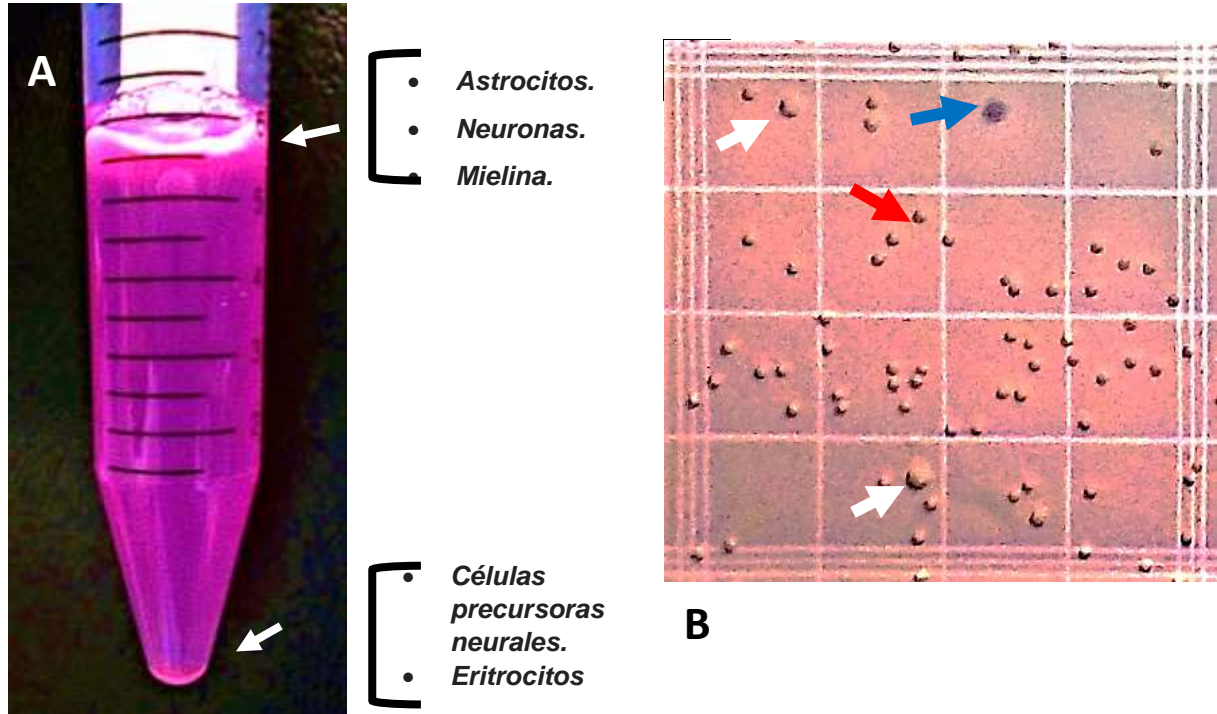


Figura 14. A) Fotografía posterior a la centrifugación de la mezcla de células con percoll®. Son visibles 2 fases que se señalan por medio de flechas, en la fase superior se encuentran astrocitos neuronas y mielina y en la fase inferior o pellet, se encuentran CPNs y eritrocitos. **B)** Fotografía que muestra el cuadrante central de la cámara de Neubauer, las flechas blancas señalan las células que hasta este paso se contaron como células precursoras. La flecha roja señala un ejemplo de cómo se visualizan los eritrocitos. Y la flecha azul señala un ejemplo de cómo se visualizan las células muertas.

Las células obtenidas por cada ratón se distribuyeron en 2 tubos eppendorf®, cada tubo con aproximadamente 30,000 células. Un tubo se utilizó para el análisis del ciclo celular de todas las CPNs y de las CPNs tipo 2 (TBR2+ y Nestina -/TBR2+) y el otro tubo se utilizó para análisis del ciclo celular de las CPNs tipo 1 (BLBP+/TBR2-).

Posteriormente se procedió a fijar y a marcar las células. Para la fijación y permeabilización de las células se utilizó el kit comercial “Foxp3/Transcription Factor Staining” de eBioscience®, recomendado para la detección de antígenos nucleares. Siguiendo las indicaciones de este kit a cada tubo se le agregó 1ml de la solución de trabajo para fijación/permeabilización y se incubó 1 hora a temperatura ambiente (T.A). Concluida la incubación se procedió a bloquear los sitios de unión inespecífica con suero

de caballo al 2% por 1 hora a T.A. Posteriormente se agregó 1ml de la solución de trabajo de buffer de permeabilización 1X, se centrifugó 7min a 1,500 rpm y se recuperó el pellet. A continuación se procedió al marcaje para la identificación de las distintas poblaciones de CPNs. Los marcajes utilizados para la identificación de las diferentes poblaciones así como los fluorocromos y las concentraciones de anticuerpos utilizadas se especificaron en la tabla 2 y 1 respectivamente. En el caso de los marcajes donde se emplearon anticuerpos primarios y secundarios primero se agregaron los anticuerpos primarios correspondientes, la muestra se incubó por 3 horas a T.A y transcurrida la incubación se realizó un lavado con 1 ml de la solución de trabajo de buffer de permeabilización 1X. La muestra se centrifugó por 7min a 1,500 rpm, se recuperó el pellet, posteriormente se agregaron los anticuerpos secundarios y se incubó por 3 horas a T.A. Como control de pegado inespecífico se utilizó una muestra de células a la que se le agregó el control de isotipo: Rat IgG2a K Isotype control FITC (eBioscience®), más cada uno de los anticuerpos secundarios utilizados según el marcaje. Cada condición experimental contó con su propio control.

Transcurrida la incubación del anticuerpo secundario se realizó un lavado con 1 ml de la solución de trabajo de buffer de permeabilización 1X, se centrifugó por 7min a 1,500 rpm y se recuperó el pellet que contenía las células marcadas. Con el objetivo de marcar el ADN para el análisis del ciclo celular se realizó una tinción con el colorante Hoechst, cada muestra se incubó por 10min a T.A con solución de Hoechst a una concentración final de 40µg/ml. Inmediatamente después de la incubación con Hoechst, las muestras se adquirieron en el citómetro Attune NxT de ThermoFisher y posteriormente se analizaron los datos con el programa FlowJo y siguiendo la estrategia de análisis que se indica en el **Anexo 1**.

Los análisis que se realizaron por citometría de flujo a las CPNs de hipocampo fueron los siguientes:

- 1) Análisis de la fase del ciclo celular (fase G0, G1 o S/ G2/M) en el que se encuentra la población de CPNs totales.
- 2) Análisis del porcentaje de CPNs tipo 1 y tipo 2.
- 3) Análisis de la fase del ciclo celular (fase G0, G1 o S/ G2/M) en el que se encuentran las CPNs tipo 1 y tipo 2.

5.8. Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico se utilizó la prueba t de student para datos no pareados con un intervalo de confianza del 95%. Una $p < 0.05$ se consideró significativa. El procesamiento estadístico se realizó con el programa "GraphPad Prisma" versión 5.00 para Windows.

6. RESULTADOS

6.1. La administración intraperitoneal de LPS causa reducción en la movilidad y disminución en el peso corporal de los ratones.

Con el fin de validar el modelo de inflamación aguda tras la inyección de LPS, se realizó la prueba de campo abierto para medir movilidad y se registró el peso corporal. Dos horas después de la inyección de LPS, el número de cruces totales realizados por los ratones administrados con LPS en la prueba de campo abierto fue significativamente menor comparado con el control, lo que indica que tras la inyección de LPS los ratones presentan menor movilidad (**Figura 15**).

Los ratones se pesaron antes y 24 horas después de la inyección. Como se esperaba, veinticuatro horas después de la inyección, los ratones administrados con LPS disminuyeron de peso (**Figura 16**).

La reducción en la movilidad y la disminución del peso corporal evidencian malestar causado por la administración intraperitoneal de LPS.

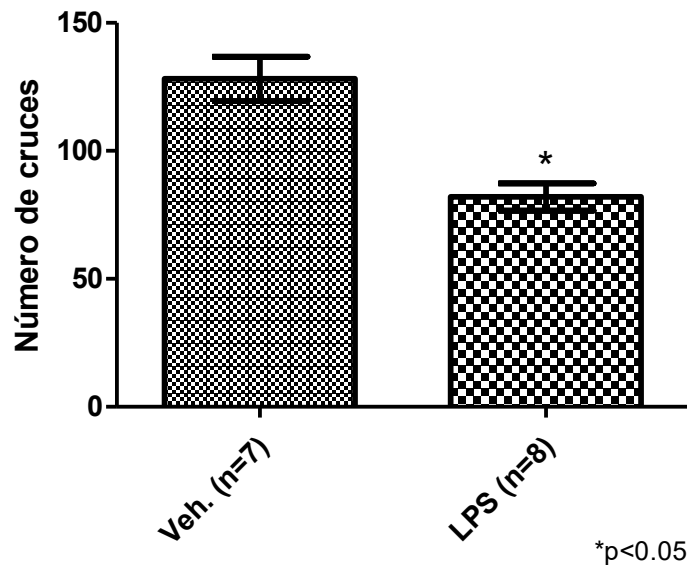


Figura 15. La administración intraperitoneal de LPS causa reducción en la movilidad. Los ratones administrados con LPS mostraron un menor número de cruces totales en la prueba de campo abierto en comparación con los ratones administrados con el vehículo. Los datos se presentan como la media \pm SEM. n=número de ratones. Veh. n= 7, LPS n=8. t de student. *p < 0.05. Veh.=Vehículo (control)

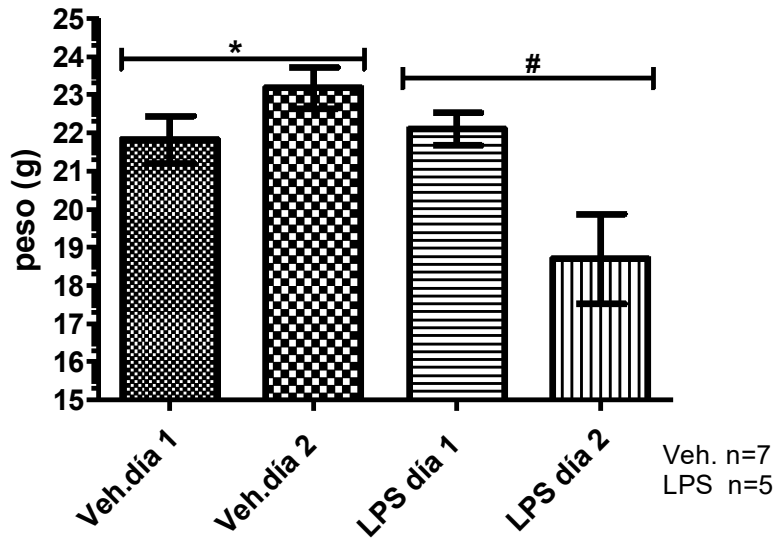


Figura 16. La administración intraperitoneal de LPS causa disminución en el peso corporal. Se observó disminución del peso corporal en los ratones administrados con LPS un día posterior a la inyección en comparación con los ratones administrados con el vehículo. Los datos se presentan como la media \pm SEM. (Veh. n= 7, LPS n=8; t de student. * p <0.05 diferencia comparando veh. día 1 vs veh. día 2, # p <0.05: diferencia comparando LPS día 1 con LPS día 2. n= número de ratones. Veh.=Vehículo (control), g= gramos.

6.2. La inflamación aguda sistémica disminuye el número de células precursoras neurales de hipocampo capaces de formar neuroesferas.

Con el fin de analizar si la inflamación aguda sistémica resultante de la administración de LPS afecta la proliferación de las CPN de hipocampo se realizó el ensayo de formación de neuroesferas, con este ensayo es posible medir el número de células precursoras neurales presentes capaces de formar neuroesferas y la capacidad proliferativa de las células precursoras neurales en base al tamaño de las neuroesferas.

Se encontró una disminución significativa aproximadamente del cincuenta por ciento en el número de neuroesferas formadas a partir del cultivo de CPNs proveniente de los ratones administrados con LPS comparado con el control (**Figura 17**). No se encontró diferencia en el tamaño de las neuroesferas (**Figura 18**).

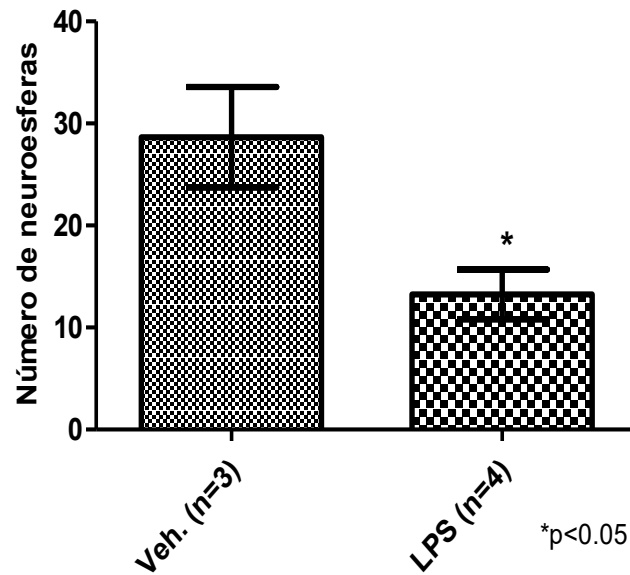


Figura 17. La inflamación aguda sistémica resultante de la administración de LPS disminuye el número de neuroesferas formadas a partir de cultivos de células precursoras neurales de hipocampo. Los cultivos de las células precursoras neurales de hipocampo provenientes de los ratones administrados con LPS presentan un menor número de neuroesferas en comparación con los cultivos control. Se realizó un cultivo por raton. Los datos se presentan como la media \pm SEM, del conteo del número de neuroesferas de 3 cultivos independientes para el control y 4 cultivos independientes para LPS. t de student. * $p < 0.05$. Veh.=Vehículo (control)

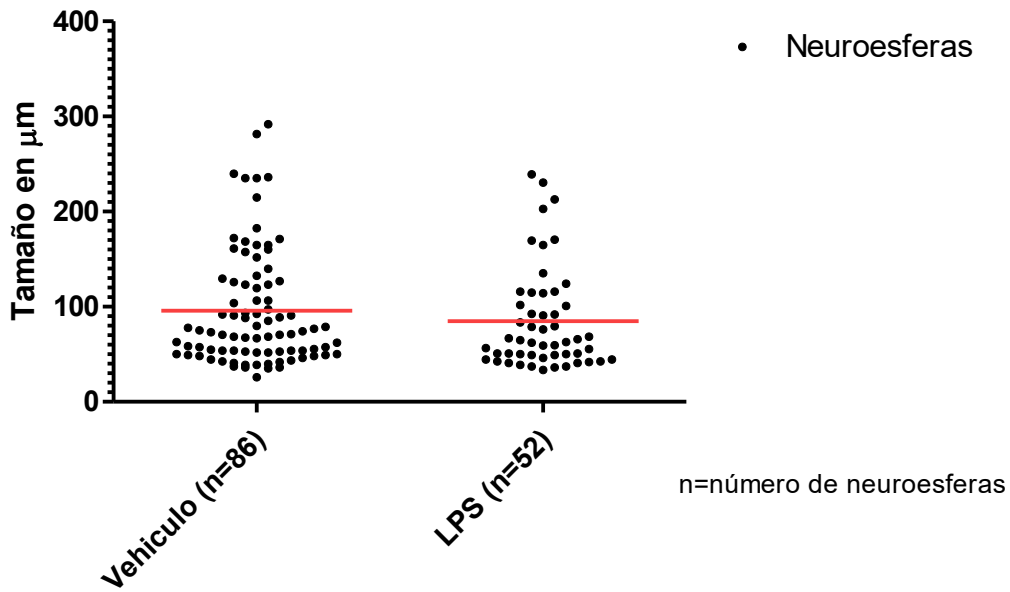


Figura 18. La inflamación aguda sistémica resultante de la administración de LPS no afecta el tamaño de las neuroesferas formadas a partir de cultivos de células precursoras neurales de hipocampo. La gráfica muestra el diámetro en micras de todas las neuroesferas encontradas en 3 cultivos independientes para el control y 4 cultivos independientes para LPS (un cultivo por ratón). Cada punto en la gráfica representa una neuroesfera. La línea roja indica la media del tamaño de las neuroesferas. Veh.=Vehículo (control). n=número de neuroesferas. t de student.

Una de las posibles hipótesis que explica la disminución del número de CPNs capaces de formar neuroesferas es la disminución del número de células precursoras neurales capaces de proliferar, por lo que en el presente trabajo se evaluó si la inflamación afecta de manera negativa la progresión a alguna fase del ciclo celular de las CPNs.

6.3. La inflamación aguda sistémica causada por la administración de LPS disminuye el porcentaje de células precursoras neurales de hipocampo en fase S, G2 y M del ciclo celular.

Con el fin de analizar si la inflamación aguda sistémica causada por la administración de LPS afecta de manera negativa la progresión a alguna fase del ciclo celular de las CPNs, se evaluó el porcentaje de CPNs en cada fase del ciclo celular.

Los resultados obtenidos del análisis por citometría de flujo mostraron una disminución en el porcentaje de CPNs en fase S, G2 y M del ciclo celular en las células provenientes de los ratones administrados con LPS en comparación con el porcentaje en S, G2 y M de las células provenientes de los ratones administrados con el vehículo (**Figura 19 F**). No se encontraron cambios en el porcentaje de células en G0 y G1 (**Figura 19 D y E**).

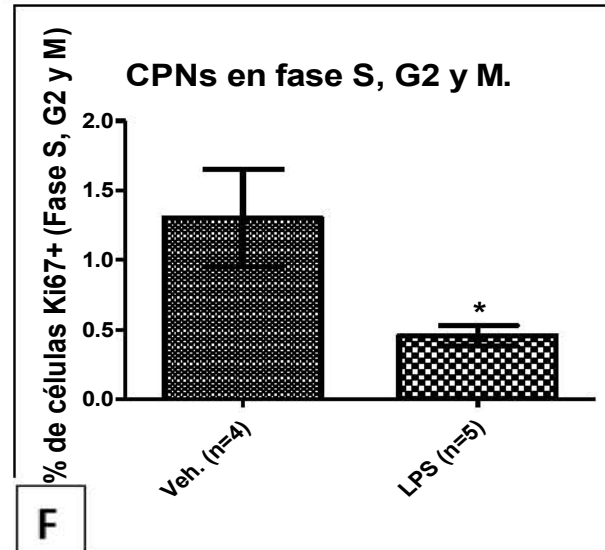
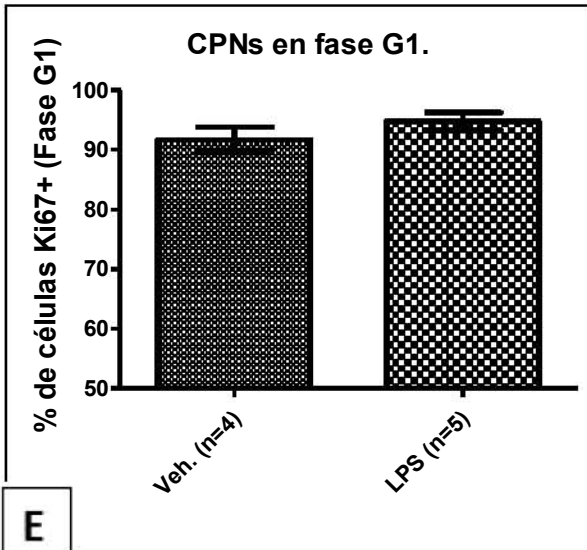
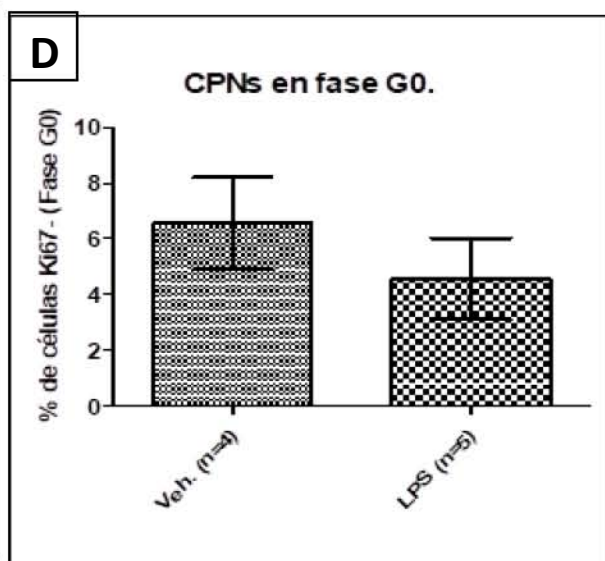
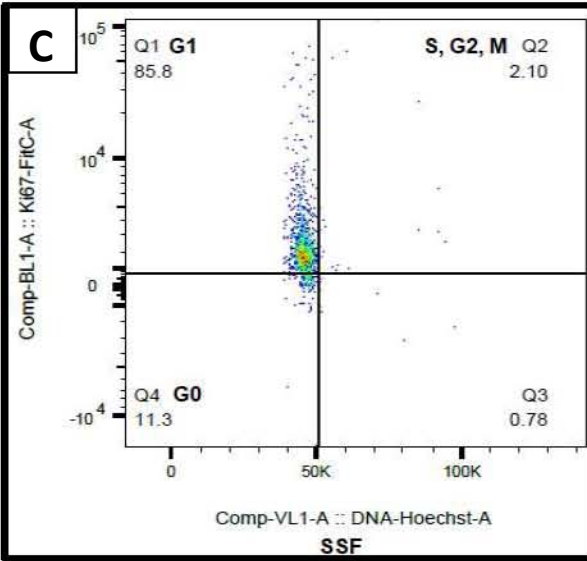
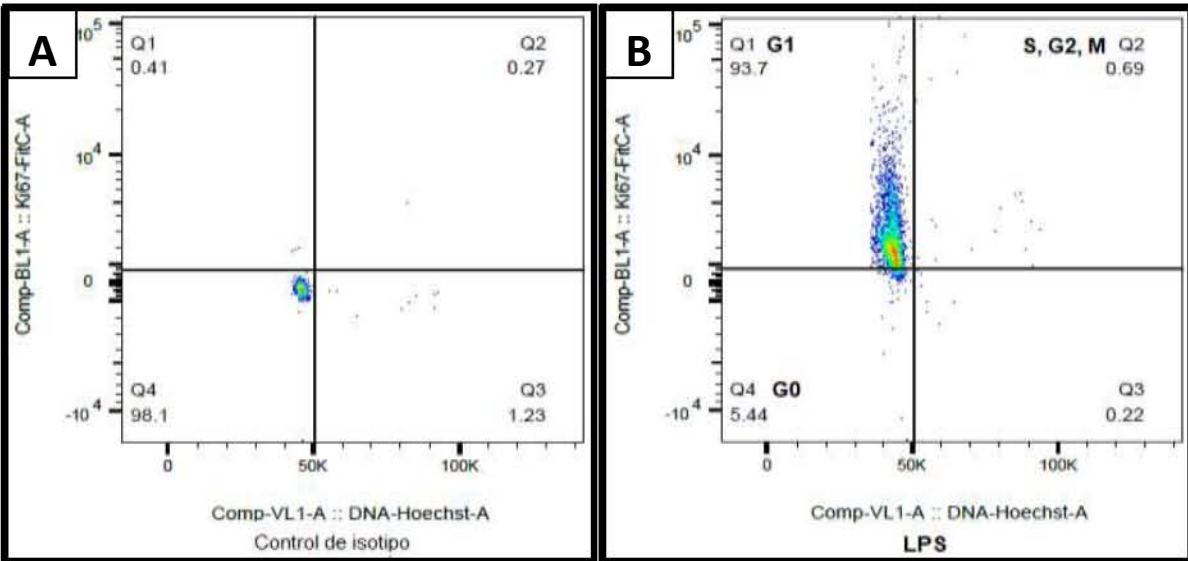


Figura 19. La inflamación aguda sistémica causada por la administración de LPS disminuye el porcentaje de células precursoras neurales de hipocampo en fase S, G2 y M del ciclo celular. A) Control para descartar la fluorescencia proveniente de pegado inespecífico y establecer el eje de positividad. B) Imagen representativa del análisis del ciclo celular de CPNs provenientes de un ratón administrado con LPS. C) Imagen representativa del análisis del ciclo celular de CPNs provenientes de un ratón control administrado con el vehículo. D) Gráfica del porcentaje de CPN en fase G0. E) Gráfica del porcentaje de CPN en fase G1. F) Gráfica del porcentaje de CPN en fase S, G2 y M. Los datos se presentan como la media \pm SEM, del porcentaje de células analizadas provenientes de 4 ratones control y 5 ratones administrados con LPS. t de student. *p < 0.05. Veh.=Vehículo (control), n=número de ratones.

Posteriormente, con el fin de analizar si la inflamación afecta de manera selectiva la progresión del ciclo celular de algún tipo específico de CPN, se midió el porcentaje de CPNs tipo 1 y tipo 2 y se evaluó la distribución de estas células en cada fase del ciclo celular.

6.4. La inflamación aguda sistémica causada por la administración de LPS no afecta el porcentaje de células precursoras neurales de hipocampo BLBP+/TBR2- (CPNs tipo 1).

Con fin de analizar si tras un evento de inflamación causado por la administración de LPS se afecta el número de células precursoras neurales tipo 1, se realizó un análisis por citometría para evaluar el porcentaje de CPNs tipo 1 (BLBP+/TBR2-) en los ratones administrados con LPS. No se encontró diferencia en el porcentaje de células BLBP+/TBR2- (CPNs tipo 1) entre el grupo LPS y el grupo control (vehículo) (**Figura 20**).

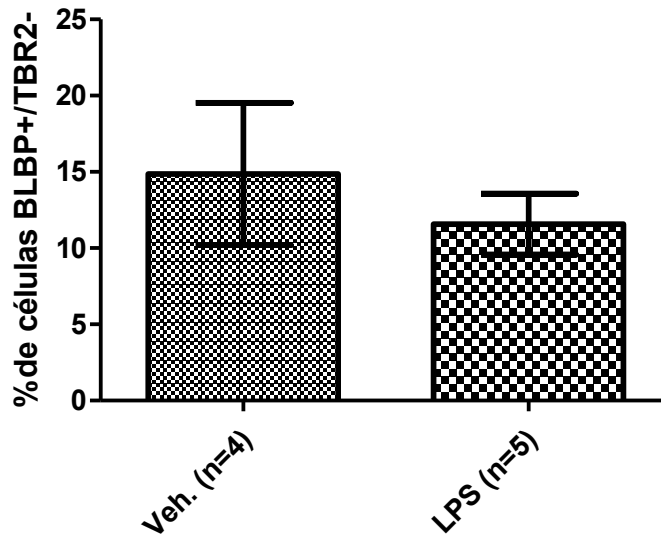


Figura 20. La inflamación aguda sistémica causada por la administración de LPS no afecta en el porcentaje de células precursoras neurales BLBP+/TBR2- (Células precursoras neurales tipo 1). Los datos se presentan como la media \pm SEM, del porcentaje de células analizadas provenientes de 4 ratones control y 5 ratones administrados con LPS. t de student. Veh.=Vehículo (control), n=número de ratones.

6.5. La inflamación aguda sistémica causada por la administración de LPS no afecta la distribución de las células precursoras neurales de hipocampo BLBP+/TBR2- (CPNs tipo 1) en las distintas fases del ciclo celular.

Con el fin de analizar si la inflamación aguda sistémica causada por la administración de LPS afecta de manera negativa la progresión a alguna fase del ciclo celular de las CPNs tipo 1, se evaluó el porcentaje de CPNs tipo 1 (BLBP+/TBR2-) en cada fase del ciclo celular. No se encontró diferencia en el porcentaje de células BLBP+/TBR2- (CPNs tipo 1) en las fases G0, G1, S, G2 y M del ciclo celular, entre los grupos LPS y control (Vehículo) (Figura 21 A, B y C).

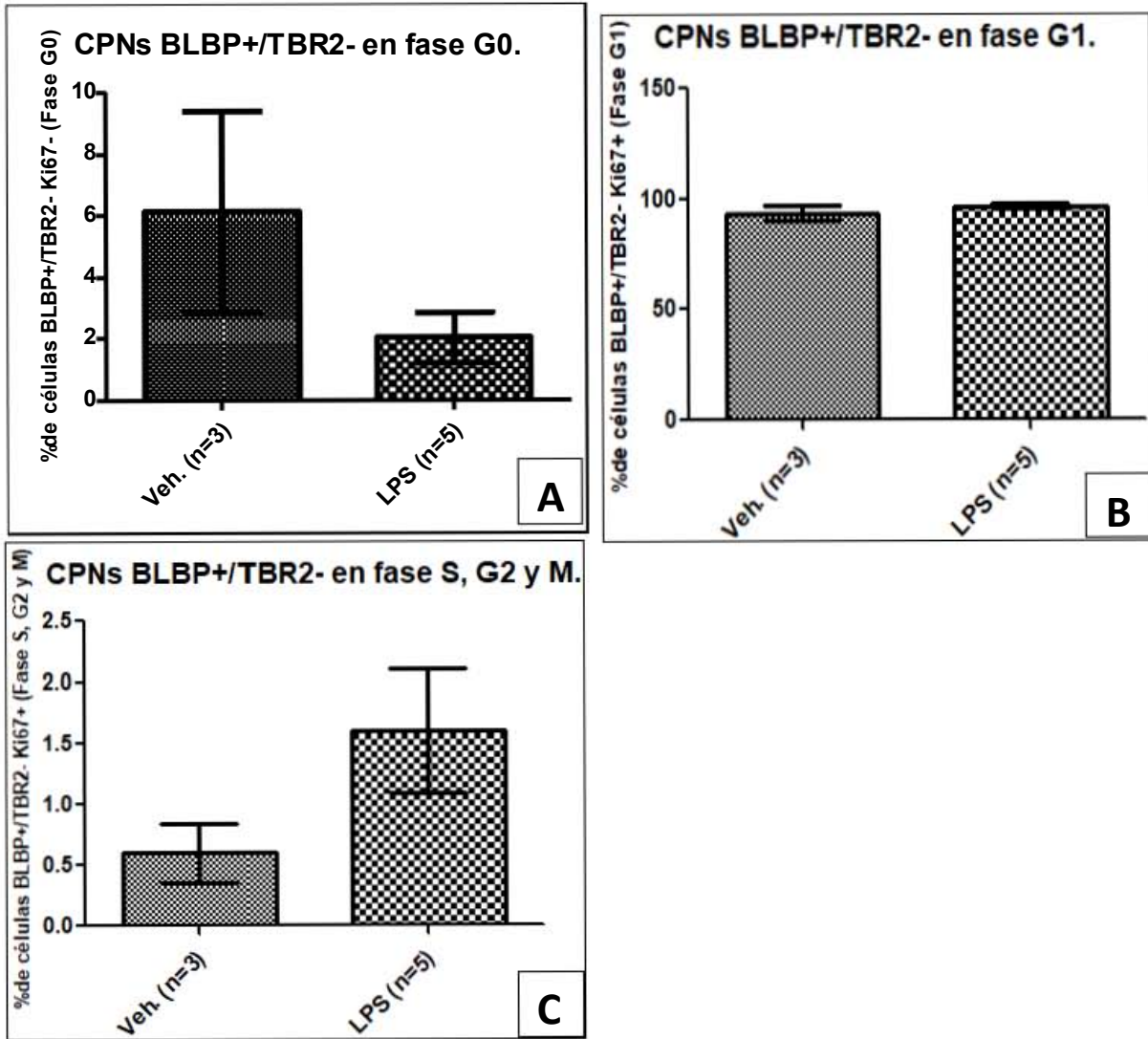


Figura 21. La inflamación aguda sistémica causada por la administración de LPS no afecta la distribución de células BLBP+/TBR2- (Células precursoras neurales tipo 1) en las distintas fases del ciclo celular. A) Gráfica del porcentaje de CPN BLBP+/TBR2- en fase G0. B) Gráfica del porcentaje de CPNs BLBP+/TBR2- en fase G1. C) Gráfica del porcentaje de CPN BLBP+/TBR2- en fase S, G2 y M. Los datos se presentan como la media \pm SEM, del porcentaje de células analizadas provenientes de 3 ratones control y 5 ratones administrados con LPS. t de student. Veh.=Vehículo (control), n=número de ratones.

6.6. La inflamación aguda sistémica causada por la administración de LPS induce un mayor porcentaje de células precursoras neurales de hipocampo TBR2+ (CPNs tipo 2).

Con el fin de analizar si tras un evento de inflamación causado por la administración de LPS se afecta el número de las CPNs tipo 2; se realizó un análisis por citometría de flujo donde se midió el porcentaje de CPNs tipo 2 (TBR2+) en los ratones administrados con LPS. Se encontró un mayor porcentaje de células TBR2+ en los ratones administrados con LPS comparado con el grupo control ($p < 0.05$) (Figura 22).

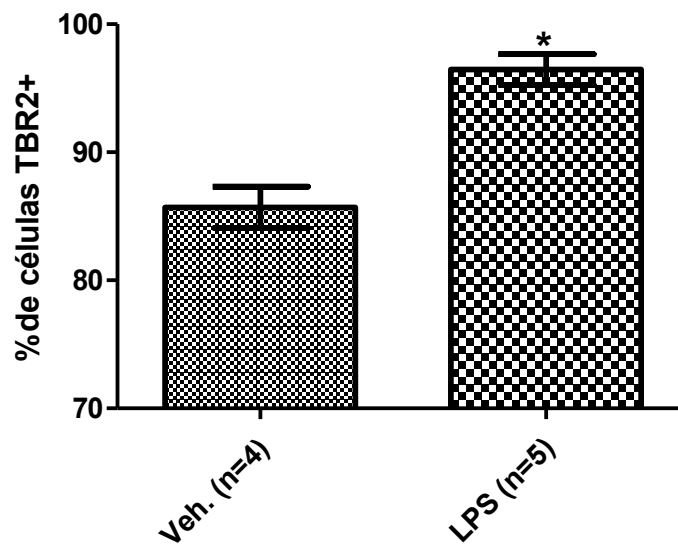
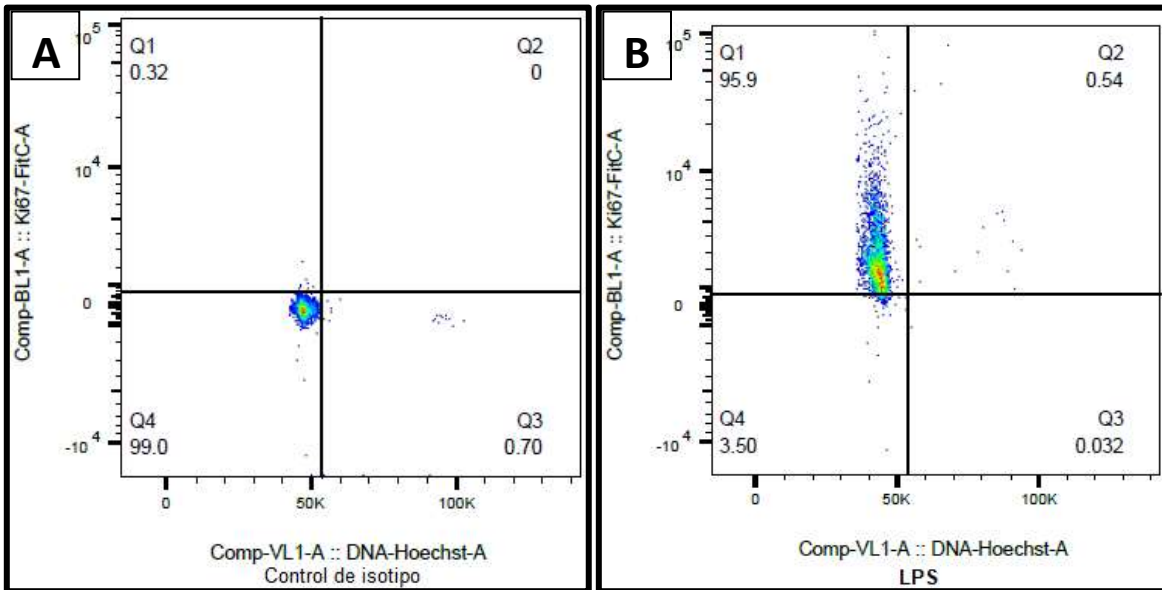


Figura 22. La inflamación aguda sistémica causada por la administración de LPS induce un mayor porcentaje de células TBR2+ (células precursoras neurales tipo 2). Los datos se presentan como la media \pm SEM, del porcentaje de células analizadas provenientes de 4 ratones control y 5 ratones administrados con LPS. t de student. * $p < 0.05$. Veh.=Vehículo (control), n=número de ratones.

6.7. La inflamación aguda sistémica causada por la administración de LPS disminuye el número de células precursoras neurales de hipocampo TBR2+ (CPNs tipo 2) en la fase S, G2 y M del ciclo celular.

Con el fin de analizar si la inflamación aguda sistémica causada por la administración de LPS afecta de manera negativa la progresión a alguna fase del ciclo celular de las CPNs tipo 2, se evaluó el porcentaje de células TBR2+ (CPNs tipo 2) en cada fase del ciclo celular.

Los resultados obtenidos del análisis por citometría de flujo mostraron una disminución en el porcentaje de células en la fase S, G2 y M del ciclo celular en las células TBR2+ (CPNs tipo 2) provenientes de los ratones administrados con LPS en comparación con el porcentaje de células en S, G2 y M de las células TBR2+ (CPNs tipo 2) provenientes de los ratones administrados con el vehículo (**Figura 23 F**), acorde a este hallazgo, el porcentaje de células Nestina-/TBR2+, también consideradas CPNs tipo 2 en fase S, G2 y M del ciclo celular también fue significativamente menor en el grupo LPS con respecto al control (**Figura 23 G**). No se encontraron cambios en el porcentaje de células en G0 y G1 (**Figura 23 D y E**).



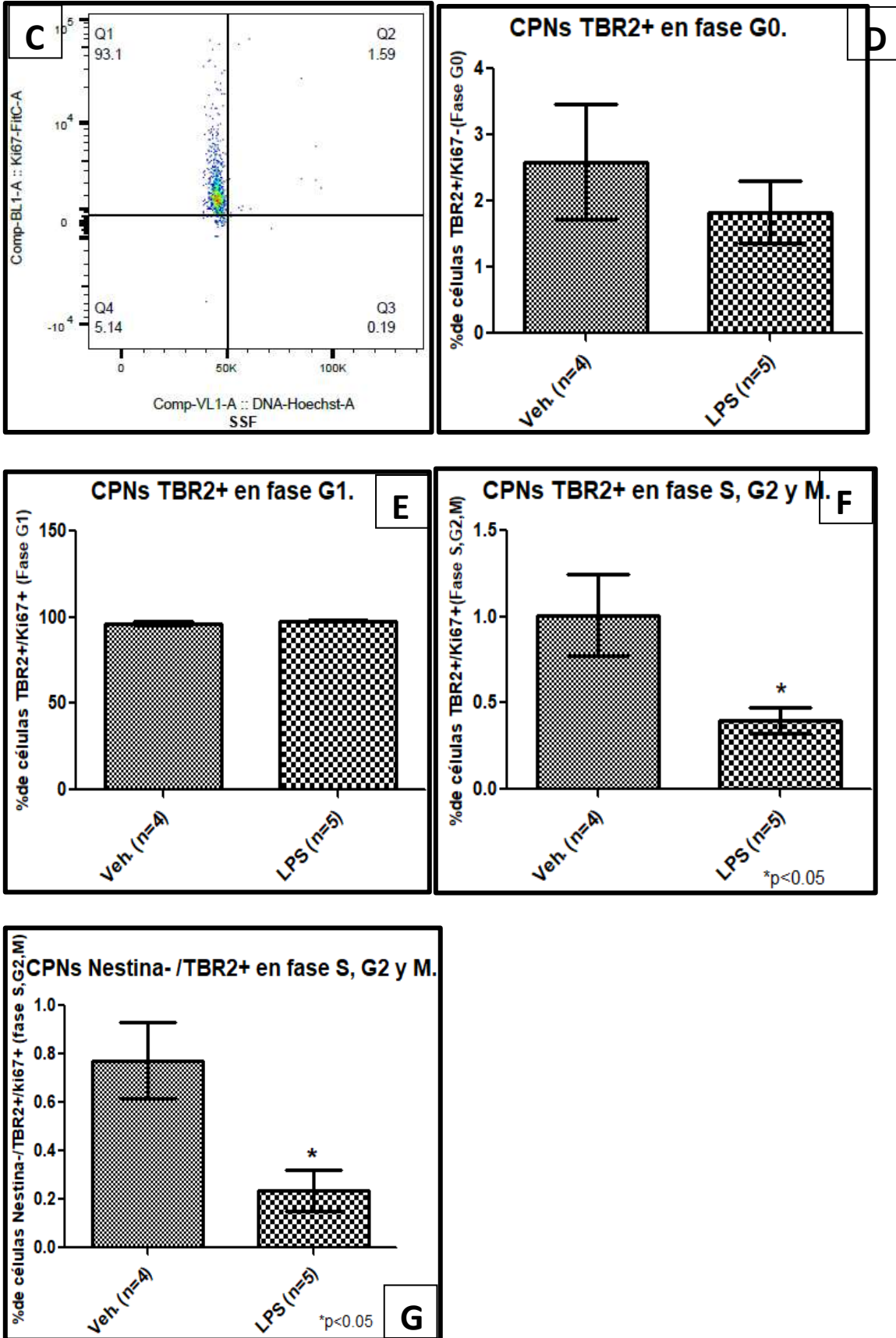


Figura 23. La inflamación aguda sistémica causada por la administración de LPS disminuye el número de células TBR2+ (células precursoras neurales tipo 2) en fase S, G2 y M del ciclo celular. A) Control para descartar la fluorescencia proveniente de pegado inespecífico y establecer el eje de positividad. B) Imagen representativa del análisis del ciclo celular de una muestra proveniente un ratón administrado con LPS. C) Imagen representativa del análisis del ciclo celular de una muestra proveniente un ratón administrado con el vehículo (SSF). D) Gráfica del porcentaje de células TBR2+ en fase G0. E) Gráfica del porcentaje de células TBR2+ en fase G1. F) Gráfica del porcentaje de células TBR2+ en fase S, G2 y M. G) Gráfica del porcentaje de células Nestina-/TBR2+ en fase S, G2 y M. Los datos se presentan como la media \pm SEM, del porcentaje de células analizadas provenientes de 4 ratones control y 5 ratones administrados con LPS. t de student. *p < 0.05, Veh.=Vehículo (control), n=número de ratones..

En la **tabla 3** se presenta un resumen de los resultados obtenidos tras analizar por citometría de flujo las poblaciones y el ciclo celular de las CPNs provenientes de hipocampo de ratones administrados con LPS y sacrificados al día 7 posterior a la administración. El cambio se reporta con respecto al control (**Tabla 3**).

Marcaje de identificación	Población	%De células	%Ki67- (Fase G0)	%Ki67+ (Fase G1)	%Ki67+ (Fase S, M)
Sin marcaje	Todas las CPNs	NA	SC	SC	Disminuye (LPS;0.45% vs Veh.; 1.30%)
Bibp+/TBR2-	CPNs Tipo 1	SC	SC	SC	SC
TBR2+	CPNs Tipo 2	Aumenta (LPS; 96.46% vs Veh.; 85.70%)	SC	SC	Disminuye (LPS;0.39% vs Veh.; 1.0%)
Nestina-/TBR2+	CPNs Tipo 2	SC	SC	SC	Disminuye (LPS;0.23% vs Veh.; 0.77%)

Tabla 3. Se muestran los resultados de los análisis realizados por citometría de flujo a las células precursoras neurales obtenidas del hipocampo de ratones administrados con LPS. El cambio se reporta con respecto al control (disminuye o aumenta con respecto al control). Acotaciones: NA; No Aplica. SC; Sin Cambio. Veh; Vehículo.

7. DISCUSIÓN

La neurogénesis en el hipocampo adulto es un proceso dinámico que puede ser modulado tanto positivamente como negativamente. La inflamación por la administración de LPS es un factor que se conoce disminuye la neurogénesis hipocampal *in vivo* (Ekdahl et al., 2003, Monje et al., 2003) y un paso crítico que determina la producción neta de nuevas neuronas, es la proliferación de las células precursoras (CPNs). Hasta la fecha se carecía de evidencia si la proliferación de tipos específicos de células precursoras neurales se afecta tras un evento inflamatorio.

En este estudio a través del ensayo de formación de neuroesferas se evaluó el número de células precursoras neurales de hipocampo capaces de formar neuroesferas y la capacidad proliferativa de las CPNs tras un evento inflamatorio ocasionado por la administración de LPS. Se demostró que la administración de LPS disminuye aproximadamente en un 50% el número de células precursoras neurales de hipocampo capaces formar neuroesferas. Un resultado similar de disminución del número de CPNs capaces de formar neuroesferas se observó en un estudio *ex vivo* de Hofer y colaboradores en el 2011, donde infectaron ratas intra cisternalmente con la bacteria *Streptococcus pneumoniae*, posterior a la infección se realizó el ensayo de formación de neuroesferas con las CPNs de hipocampo y se encontró disminución en el número neuroesferas formadas en los cultivos provenientes de ratas infectadas, sin embargo en ese proyecto no se abundó en la causa que subyace la disminución del número de neuroesferas formadas (Hofer et al., 2011).

Aunque en este trabajo se encontró, como se mencionó anteriormente, la disminución en el número de neuroesferas formadas no se encontró diferencia en el tamaño de estas neuroesferas con respecto al control, lo que parece indicar que aunque disminuye el número de CPNs capaces de formar neuroesferas, las CPNs que están presentes tienen la misma capacidad proliferativa.

La disminución del número de CPNs capaces de formar neuroesferas que encontramos después de un evento inflamatorio por la administración de LPS, puede deberse a que tras el evento inflamatorio: 1) Hay un menor número de CPNs capaces de proliferar, ya sea porque no son capaces de responder a factores de crecimiento o porque están arrestadas en alguna fase del ciclo celular, o bien 2) Hay un menor número total de CPNs debido por ejemplo a que las CPNs se murieron.

En relación con las hipótesis anteriores, tras la administración periférica de LPS ocurren diferentes eventos que pueden explicar la disminución del número de CPNs capaces de formar neuroesferas. Diferentes grupos han demostrado que la administración sistémica de LPS, induce la activación de la microglía (Monje et al., 2003) y la expresión de mRNA y proteína de las citocinas pro-inflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α en el cerebro (Zonis et al., 2013, Monje et al., 2003). Resultados en nuestro laboratorio apoyan estas observaciones. En el modelo de inflamación empleado en este trabajo, se encontró que 8 días después de una única inyección intraperitoneal de LPS (1mg/kg de peso), aumenta la interleucina 6 (IL-6) e incrementa la microglía con morfología ameboidea característica de microglía activada (Pérez y Zepeda, datos no publicados).

Las CPNs tienen receptores para las diferentes citocinas, por lo que las citocinas liberadas en el nicho por la microglía activada o bien por otras células fuente de citocinas como los astrocitos, los monocitos, los neutrófilos o las células endoteliales de la vasculatura cerebral (Sierra et al., 2014, Borsini et al., 2015), podrían estar implicadas en la disminución del número de CPNs con capacidad de formar neuroesferas.

Las CPNs de hipocampo expresan el receptor tipo 1 de IL-1 β (IL-1RI) (Koo y Duman., 2008). En estudios *in vitro* se encontró que la adición de la IL-1 β a cultivos de CPNs de GD de hipocampo adulto causa la disminución de CPNs en proliferación, medida por una menor incorporación de BrdU por las células (Ryan et al., 2013). Con respecto al mecanismo por el cual la proliferación se ve afectada, en este mismo estudio se reportó que la disminución de la proliferación por la IL-1 β correlaciona con la disminución de la expresión del factor de transcripción TLX (también conocido con *tailless* o NR2E1) que se expresa en CPNs Nestina+, DCX+ y GFAP+ (Shi et al., 2004, Ryan et al., 2013, Sobhan y Funa., 2017). TLX activa la expresión del gen para Wnt7a. Wnt7a promueve la señalización por β -catenina (Qu et al., 2009), una molécula que en el núcleo actúa como un co-activador transcripcional que promueve la expresión de genes relacionados con la proliferación de las CPNs como el gen para la proteína Ciclina D1 (Qu et al., 2013), la cual es necesaria para la progresión de la fase G1 a S del ciclo celular. Un estudio reveló que la adición de IL-1 β a cultivos de CPNs de embrión de rata disminuye los niveles de β -catenina y aumenta la activación de la cinasa GSK-3 β la cual se expresa en CPNs Nestina+, DCX+ y GFAP+ y se sabe fosforila a β -catenina y favorece su degradación, por lo que se propone que uno de los mecanismos por el cual la IL-1 β disminuye la proliferación de las CPNs es a través de la activación de GSK-3 β y de la posterior

degradación de β -catenina (Green y Nolan., 2012). Acorde a la propuesta anterior, tras la incubación de CPNs con IL-1 β disminuyen las células BrdU/Nestina positivas y disminuyen los niveles de la Ciclina D1 (Koo y Duman., 2008). Por otro lado, algunos reportes indican que la IL-1 β derivada de la microglía activada puede inducir arresto del ciclo celular en las CPNs a través de la inducción de la expresión de p53 y el inhibidor de cinasas dependiente de ciclina p21, el cual se sabe, retiene la progresión del ciclo celular y arresta a la célula en la fase G1 (Guadagno et al., 2015). De manera interesante, en relación con el papel del p21 en la inflamación, en un estudio realizado por Zonis y colaboradores en el 2013, se reportó que la inflamación sistémica causada por la administración i.p. de LPS (1mg/kg de peso/ por 5 días) disminuye la neurogénesis medida por la disminución de las células BrdU+/DCX+ a la par que incrementa la expresión de p21 (Zonis et al. 2013).

El IFN γ es otra citocina producida en eventos inflamatorios por la microglía activada y los astrocitos (Dafny, 2005, De Simone et al., 1998). Las CPNs de hipocampo, expresan receptores para interferón gamma; específicamente, las CPNs nestina positivas presentan el receptor IFN γ R2. Un estudio *in vitro* realizado por Makela y colaboradores en el 2010, mostró que el IFN γ es capaz de disminuir la proliferación de CPNs, en el mencionado estudio, las CPNs provenientes de neuroesferas primarias de hipocampo se cultivaron en condiciones de proliferación y se trataron con IFN γ , el tratamiento con IFN γ redujo el número de neuroesferas formadas. Los autores concluyeron que el IFN γ puede afectar de dos maneras a las CPNs: puede disminuir la proliferación a través del aumento en la expresión del inhibidor del ciclo celular p21 y el resultante arresto del ciclo celular y también puede estimular la muerte celular por apoptosis a través de la activación de la caspasa 3 (Makela et al., 2010).

Otra citocina que se incrementa en un evento inflamatorio es TNF- α . En un estudio con una línea celular de CPNs derivadas de hipocampo de embrión de rata (HiB59) se demostró que TNF- α causa muerte de las CPNs a través de apoptosis (Cacci et al. 2005).

Además de las citocinas; las prostaglandinas, algunas moléculas relacionadas con la activación del sistema complemento y las especies reactivas de oxígeno son mediadores importantes en la respuesta inmunológica que pueden estar asociadas a la disminución

del número de CPNs capaces de formar neuroesferas que encontramos en el presente trabajo.

Las prostaglandinas son mediadores de la respuesta inmunológica sintetizados por las enzimas ciclooxigenasas (COX) principalmente en la microglía activada. En un estudio realizado por Bastos en el 2008, se inyectó a ratones con una única inyección de LPS (1mg/kg de peso), y posteriormente una única inyección del marcador de proliferación BrdU. Siete días después se encontró una disminución en el giro dentado de células BrdU positivas que correlacionó con el aumento de células COX-2 positivas. De manera interesante, la disminución de las células BrdU positivas fue prevenida por el tratamiento con un inhibidor selectivo de la COX-2 después de la inyección con LPS (Bastos et al., 2008). Aunque la medición de la proliferación en este estudio fue inespecífico (ya que se contaron las células totales BrdU positivas sin estudiar una población de células en específico) es un estudio que sitúa a la ciclooxigenasa 2 y a sus productos como posibles mediadores inflamatorios involucrados en la disminución de la proliferación de las CPNs tras un evento inflamatorio sistémico por LPS, de hecho, la señalización de la prostaglandina 2 a través del receptor EPE1, conlleva a una disminución de las CPNs TBR2 positivas (Keene et al., 2009).

El sistema complemento es una vía parte del sistema inmune innato que se activa tras la estimulación con LPS. En el cerebro las moléculas del sistema complemento son producidas por microglía y astrocitos (revisado en Blatteis et al., 2004, Orsini et al., 2014). Las CPNs adultas expresan el receptor 2 a sistema complemento (Cr2). El tratamiento de cultivos primarios de CPNs de hipocampo de ratón con IFN- α y C3d, dos ligandos del receptor Cr2, causa la disminución de neuroesferas formadas a comparación de los cultivos no tratados, el efecto se revierte al tratar los cultivos con anti-Cr2, lo que sugiere que la activación del sistema complemento tras un evento inflamatorio puede estar involucrada en la disminución CPNs capaces de formar neuroesferas (Moriyama et al., 2011).

Finalmente, las especies reactivas de oxígeno producidas durante el evento inflamatorio también pueden estar relacionadas con la disminución del número de CPNs capaces de formar neuroesferas. El óxido nítrico actúa como regulador negativo de la proliferación celular y suprime la neurogénesis en la ZSG del hipocampo adulto (Zhu et al. 2006).

Referente al posible mecanismo un estudio se reportó que la microglía activada con LPS e IFN γ incrementa la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la formación de óxido nítrico (ON). El ON tiene un efecto anti- proliferativo en las CPNs a través de la formación de especies reactivas de oxígeno como el peroxinitrito, el cual provoca la nitración y consecuente inhibición de la señalización del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR), el cual está relacionado con la proliferación de las CPNs (Carreira et al., 2014). Una acotación importante con respecto al presente trabajo es que el medio de proliferación que utilizamos para el ensayo de neuroesferas contenía el factor de crecimiento EGF, por lo que la disminución de las neuroesferas formadas puede deberse a que las CPNs no responden correctamente a este factor de crecimiento y por lo tanto no proliferan.

En conjunto, la evidencia presentada anteriormente sustenta las hipótesis propuestas al inicio para explicar la disminución del número de CPNs capaces de formar neuroesferas tras un evento inflamatorio causado por la administración de LPS.

En este trabajo se estudió si la inflamación causada por la administración de LPS impide la progresión del ciclo celular de las CPNs. Siete días posteriores a la administración de LPS se analizó por citometría de flujo la fase del ciclo celular en la que se encontraban las CPNs. Debido a los reportes que existen que relacionan la disminución de la proliferación de CPNs tras la adición de citocinas pro inflamatorias con la disminución de los niveles de ciclina D1 (ciclina necesaria para la progresión de la fase G1 a S) y el aumento del inhibidor del ciclo celular p21 (Koo y Duman., 2008, Guadagno et al., 2015, Makela et al., 2010, Zonis et al., 2013), se esperaba encontrar en las CPNs provenientes de los ratones tratados con LPS un aumento de CPNs en fase G0 o bien un aumento de células en la fase G1 acompañado de una disminución de células en fase S/G2 y M de ciclo celular, lo cual nos podría hablar de un arresto celular en G1. Sin embargo nosotros encontramos únicamente la disminución del número de CPNs totales en las fases S/G2 y M del ciclo celular, por lo que probablemente la inflamación no impide la progresión del ciclo celular.

Dado que las diferentes poblaciones de CPNs presentan diferentes características en cuanto actividad proliferativa, una pregunta interesante a resolver era si tras el evento inflamatorio, algún tipo específico de CPNs se ve particularmente afectado, tanto en el número de células presentes como en la distribución de células en las diferentes etapas

del ciclo celular. En cuanto a actividad proliferativa, las CPNs tipo 1 se activan y se dividen en raras ocasiones por lo que se consideran como una población de células precursoras quiescentes, que se mantienen en G₀ y rara vez entran a ciclo, mientras que las células tipo 2, a diferencia de las CPNs tipo 1, tienen una alta tasa proliferativa (Encinas et al., 2011). Tomando en cuenta lo anterior, la disminución en el número de CPNs con capacidad de formar neuroesferas podría deberse a tres posibles eventos: 1) que hubiera una menor activación de las CPNs tipo 1 y por lo tanto un mayor número de CPNs tipo 1 en estado quiescente (G₀), 2) que las CPNs tipo 2 estuvieran arrestadas en alguna fase del ciclo celular, por ejemplo G₁, o bien 3) que hubiera un menor número de células en las fases S/G₂ y M del ciclo celular como se encontró, tras evaluar a toda la población de CPNs.

La estrategia que aplicamos fue medir el porcentaje de CPNs tipo 1 (BLBP+/TBR2-) y tipo 2 (TBR2+ y Nestina-/TBR2+) y evaluar en cada población el porcentaje de CPNs en fase G₀, G₁ y S/G₂/M del ciclo celular. En las CPNs provenientes de los ratones tratados con LPS, no encontramos cambios en la población de células tipo 1 ni en el número, ni en la distribución de células en cada fase del ciclo celular, pero de manera interesante, se observó un mayor porcentaje de células TBR2+ y un menor porcentaje de estas células en fase S, G₂ y M, lo anterior podría deberse a que las células TBR2+ presentan en esta condición una menor capacidad de completar el ciclo lo que daría lugar a una menor capacidad de diferenciación, que a su vez explicaría la acumulación del número de estas células. En relación también con el hallazgo de un mayor porcentaje de CPNs tipo 2, cabe mencionar que aunque no encontramos diferencias significativas (control vs LPS) en la distribución de CPNs tipo 1 en cada fase del ciclo celular, se observa que en las CPNs provenientes de los ratones administrados con LPS el porcentaje de CPNs tipo 1 en fase G₀ tiende a disminuir, mientras que el porcentaje de células en las fases S, G₂ y M tiende a aumentar con respecto al control, lo que sugiere una posible activación y entrada a ciclo de las CPNs tipo 1. La hipótesis anterior estaría acorde con el aumento en el porcentaje de CPNs tipo 2 que se encontró en este estudio, sin embargo la hipótesis anterior no se puede afirmar ya que los datos no son estadísticamente significativos, por lo que es necesario aumentar el número de sujetos estudiados.

El mecanismo por el cual la inflamación disminuye el porcentaje de CPNs en fase S/G₂ y M del ciclo celular necesita más investigación, sin embargo podría estar relacionado con

la activación mitogénica de las células. Las CPNs y en especial las CPNs con alta tasa proliferativa como las tipo 2 expresan receptores a diversos factores de crecimiento con dominios de activación tirosina cinasa, por ejemplo los receptores para EGF y FGF-2 (Codega et al., 2014, Pastrana, E., et al. 2009). La activación de estos receptores tiene efectos mitogénicos en la célula que son mediados a través de la activación de diversas vías como la vía de las MAPKs y la vía de PIP3/AKT las cuales favorecen la progresión del ciclo de la fase G1 a S (Wee y Wang., 2017). Como se mencionó anteriormente, las especies reactivas de oxígeno generadas durante el evento inflamatorio pueden provocar la nitración de las tirosinas de los receptores y la consecuente inactivación del receptor, lo que podría explicar la disminución de las CPNs en fase S, G2 y M. En las CPNs provenientes de los ratones tratados con LPS, el hallazgo de la disminución de las CPNs en fase S/G2 y M y la hipótesis de que esta disminución es a causa de la inhibición de la activación de los receptores a factores de crecimiento está acorde con el hallazgo de un menor número de neuroesferas formadas en los cultivos de CPNs provenientes de los ratones administrados con LPS, ya que el medio de proliferación para el ensayo de formación de neuroesferas contiene los factores de crecimiento EGF y FGF y de acuerdo con la hipótesis de inactivación de los receptores (Carreira et al., 2014) las CPNs no estarían respondiendo a estos factores mitogénicos.

Otra hipótesis que explicaría la disminución del porcentaje de CPNs en fase S, G2 y M del ciclo celular es que el evento inflamatorio provoque un alargamiento en la duración de la fase G1 del ciclo celular, lo que ocasionaría que las CPNs pasen más tiempo en la fase G1 y a raíz de eso una aparente disminución del porcentaje de células en las fases S, G2 y M del ciclo. La modulación de la duración del ciclo celular y en especial el alargamiento en la duración de la fase G1 en progenitores neurales se ha observado en otras patologías como son daño cerebral, donde el alargamiento de la fase G1 se relacionó con la salida de ciclo y diferenciación hacia neurona (Zhang, 2008).

Como acotación final, en este estudio no se descarta que la disminución en el número de CPNs capaces de formar neuroesferas pueda deberse a que haya un menor número total de CPNs debido a muerte celular, por ejemplo por un proceso apoptótico como se sugiere que ocurre en distintos estudios realizados a través de la adición *in vitro* de citocinas inflamatorias (Monje et al., 2003, Ben-Hur et al., 2003, Iosif et al., 2006, Makela et al.,

2010), sin embargo en este estudio no se realizó ninguna aproximación para evaluar apoptosis.

8. CONCLUSIÓN.

Aunque se sabe que la inflamación aguda sistémica causada por la administración de LPS provoca disminución de la neurogénesis evidenciada por la disminución de células DCX+/BrdU+ en hipocampo, se desconocía si la inflamación afecta la proliferación de tipos específicos de células precursoras neurales. Los resultados de este estudio apuntan a que la disminución en la neurogénesis en hipocampo que ocurre después de un evento de inflamación por LPS se debe en cierta medida a la disminución del número de células precursoras capaces de proliferar y se propone que la afectación es a nivel de la disminución de las CPNs tipo 2 en fase S, G2 y M del ciclo celular.

9. ANEXOS.

Anexo 1. Estrategia de análisis para la identificación del estadio del ciclo celular (G0, G1, G2, M) de los diferentes tipos de células precursoras.

Los datos adquiridos se analizaron con el programa FlowJo® siguiendo la siguiente estrategia.

1) Se realizó un dot plot de tamaño (FSC-A) contra la expresión de Hoechst-A. Se estableció una región que abarcara todos los eventos que expresaran Hoechst, esta región se llamó “*DNA-Hoechst-A, Tamaño-A subset*” (**Figura 10 A**),

2) Para discriminar las células solas (single cells) de células pegadas o dobletes se realizó un dot plot proveniente de la región *DNA-Hoechst-A, Tamaño-A subset*, donde se graficó FSC-H contra FSC-A. En esta representación, las células solas presentan una correlación lineal entre los valores de FSC-H y FSC-A, por lo que se presentan en una línea recta. Considerando esto se realizó una segunda región trazando una línea en diagonal que abarcara los eventos que tuvieran una correlación lineal. A esta región se le llamó “*Single cells*”. (**Figura 10 B**).

3) Por último para localizar en un dot plot de tamaño contra granularidad los eventos que representan células solas, se realizó un tercer dot plot SSC-A contra FSC-A proveniente de la región “single cells”. A esta nueva región se le llamó “*CPN*” (**Figura 10 C**).

4) A partir de esta región se realizaron los análisis de poblaciones y de ciclo celular como se indica a continuación:

A. Análisis del ciclo celular de todas las CPNs.

1A) Se realizó un dot plot proveniente de la región *CPN*, donde se graficó la señal de FitC (fluorocromo utilizado para la detección de Ki67) contra la señal de Hoechst.

2A) Para establecer los ejes de positividad para Ki67 se utilizó el control de isotipo para descartar el pegado inespecífico, que consistió en una muestra de CPNs donde se le adiciono una inmunoglobulina de la misma clase que el anticuerpo utilizado para reconocer la proteína Ki67, también acoplado a FitC pero sin especificidad, en el caso de los marcajes donde se utilizaron anticuerpos primarios y secundarios, al control se le agrego solo el anticuerpo secundario. Con este control se estableció el eje negativo de

fluorescencia para FitC, todo por arriba del eje se consideró positivo para la expresión de Ki67 (Ki67+) y todo por debajo del eje se consideró negativo para Ki67 (Ki67-).

3A) Posteriormente, para establecer el eje de división entre las fases G0 y G1 de las fases S, G2 y M nos basamos en la dinámica conocida del contenido de ADN durante el ciclo celular, donde G0 y G1 tienen el mismo contenido de ADN que se visualiza en el dot plot como una acumulación de eventos con una misma intensidad de fluorescencia. En este punto se estableció un eje de división y todo evento a la derecha se consideró en fase S, G2 y M. (**Figura 13 A**).

4A) Tras aplicar la estrategia de análisis mencionada se obtuvo un dot plot dividido en cuatro cuadrantes; En el cuadrante inferior izquierdo (Q4) encontramos los eventos Ki67- que representan a las células en fase G0, en el cuadrante superior izquierdo (Q1) encontramos los eventos Ki67+ que representan a las células en fase G1, mientras que en el cuadrante superior derecho (Q2) encontramos los eventos Ki67+ que representan a las células en fase S, G2 y M. (**Figura 13 B**).

B. Análisis para la identificación de las CPNs tipo 1 y el análisis de su ciclo celular.

En este estudio se consideraron como posibles CPNs tipo 1 a las CPNs positivas para el marcador BLBP y negativas para la expresión de TBR2, (BLBP+/TBR2-).

1B) Se realizó un dot plot proveniente de la región CPN, donde se graficó la señal de AF546 en el eje "X" (fluorocromo utilizado para la detección de BLBP) contra la señal de Texas red (fluorocromo utilizado para la detección de TBR2) en el eje "Y".

2B) Para establecer los ejes de positividad se utilizó un control de pegado inespecífico que consistió en una muestra de CPNs a la que no se le agregaron anticuerpos primarios y únicamente se le adicionaron los anticuerpos secundarios.

3B) Tras aplicar la estrategia anterior se obtuvo un dot plot dividido en cuatro cuadrantes; En el cuadrante inferior izquierdo, encontramos las CPNs dobles negativas; BLBP-/TBR2-, en el superior izquierdo las CPNs BLBP-/TBR2+, en el cuadrante superior derecho las CPNs BLBP-/TBR2+ y en el cuadrante inferior derecho las CPNs BLBP+/TBR2-, estas últimas las consideradas posibles CPNs tipo 1.

4B) A partir del cuadrante inferior derecho (BLBP+/TBR2-), donde encontramos las CPNs tipo 1, se realizó un dot plot donde se graficó la señal de FitC (fluorocromo utilizado para

la detección de Ki67) contra la señal de Hoechst. Y se procedió al análisis del ciclo celular de la misma manera como se indica de los apartados **2A** a **4A**.

C. Análisis para la identificación de las CPNs tipo 2 y el análisis de su ciclo celular.

En este estudio se consideraron como CPNs tipo 2 a las CPNs positivas para el marcador TBR2 y a las CPNs negativas para la expresión de Nestina y positivas para la expresión de TBR2, (Nestina-/TBR2+).

1C) Para el análisis de las células tipo 2 por la expresión de TBR2 (TBR2+) se realizó un dot plot proveniente de la región *CPN*, donde se graficó la señal de Texas red (fluorocromo utilizado para la detección de TBR2) en el eje "X" contra el tamaño (FSC).

2C) Para establecer los ejes de positividad se utilizó un control de pegado inespecífico que consistió en una muestra de CPNs a la que no se le agregaron anticuerpos primarios y únicamente se le adicionaron los anticuerpos secundarios. En el eje de las X se estableció el eje de positividad y todo a la derecha del eje se consideró como TBR2+.

3C) Se estableció una región de los eventos TBR2+ y se procedió al análisis del ciclo celular de la misma manera como se indica de los apartados **2A** a **4A**.

1C) Para el análisis con el doble marcaje (Nestina/TBR2), se realizó un dot plot proveniente de la región *CPN*, donde se graficó la señal de AF555 en el eje "X" (fluorocromo utilizado para la detección de Nestina) contra la señal de Texas red (fluorocromo utilizado para la detección de TBR2) en el eje "Y".

2C) Para establecer los ejes de positividad se utilizó un control de pegado inespecífico que consistió en una muestra de CPNs a la que no se le agregaron anticuerpos primarios y únicamente se le adicionaron los anticuerpos secundarios.

3C) Tras aplicar la estrategia anterior se obtuvo un dot plot dividido en cuatro cuadrantes; En el cuadrante inferior izquierdo, encontramos las CPNs dobles negativas; Nestina-/TBR2-, en el superior izquierdo las CPNs consideradas posibles CPNs tipo 2 (Nestina-/TBR2+), en el cuadrante superior derecho las CPNs Nestina-/TBR2+ y en el cuadrante inferior derecho las CPNs Nestina+/TBR2-.

4C) A partir del cuadrante superior izquierdo (Nestina-/TBR2+), donde encontramos las CPNs tipo 2, se realizó un dot plot donde se graficó la señal de FitC (fluorocromo utilizado para la detección de Ki67) contra la señal de Hoechst. Y se procedió al análisis del ciclo celular de la misma manera como se indica de los apartados **2A** a **4A**.

10. REFERENCIAS

1. Aimone, J., Deng, W. and Gage, F. (2011). Resolving new memories: a critical look at the dentate gyrus, adult neurogenesis, and pattern separation. *Neuron*. 70, 589–596.
2. Altman, J. (1969). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis: IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb, *J. Comp. Neurol.* 137, 433- 457.
3. Amaral, D. and Lavenex, P. (2007). Hippocampal neuroanatomy. In: Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J, editors. *The Hippocampus Book*. New York: Oxford University Press.
4. Anisman H. and Merali, Z. (1999). Anhedonic and anxiogenic effects of cytokine exposure. *Adv Exp Med Biol.* 461,199–233.
5. Babu, H., Jan, H., Kannan, S., Rünker, A., Palmer, T. and Kempermann, G. (2011). A protocol for isolation and enriched monolayer cultivation of neural precursor cells from mouse dentate gyrus. *Frontiers in neuroscience.* 5, 89.
6. Bastos, G., Moriya, T., Inui F, Katura T, Nakahata N. (2008). Involvement of cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide-induced impairment of the newborn cell survival in the adult mouse dentate gyrus. *Neuroscience.* 155, 454–62.
7. Beckervordersandforth, R., Zhang, C., and Chichung, D. (2016). Transcription-Factor-Dependent Control of Adult Hippocampal Neurogenesis. In: *Neurogenesis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
8. Bertoli, C., Skotheim J. and de Bruin R. (2013). Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 14 (8), 518-528.
9. Besson, A., Dowdy, S. and Roberts, J. (2008). CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell.* 14 (2), 159-69.
10. Biebl, M., Cooper, C., Winkler, J., Kuhn, H. (2000). Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neurosci Lett.* 291, 17–20.
11. Blatteis, C., Li, S., Li, Z., Perlik, V., Feleder, C. (2004). Signaling the brain in systemic inflammation: the role of complement. *Front Biosci.* 1 (9), 915-31.
12. Bonaguidi, M.A., Stadel, R.P., Berg, D.A., Sun, J., Ming, G., and Song, H. (2016). Diversity of neural precursors in the adult mammalian brain. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 8, a018838.
13. Booth, D., Takagi, M., Sanchez, L., Petfalski, E., Vargiu, G., Samejima, K., Imamoto, N., Ponting, C., Tollervey, D., Earnshaw, W., Vagnarelli, P. (2014). Ki-67 is a PP1-interacting protein that organises the mitotic chromosome periphery. *eLife.* 2014 (3), [e0164].
14. Borsini, A., Zunszain, P., Thuret, S., Pariante, C. (2015). The role of inflammatory cytokines as key modulators of neurogenesis. *Trends Neurosci.* 38, 145–157.
15. Brandt, M., Jessberger, S., Steiner, B., Kronenberg, G., Reuter, K., Bick-Sander, A., von der Behrens, W., Kempermann, G. (2003). Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Mol Cell Neurosci* 24, 603–613.

16. Brewer, G. and Torricelli, J. (2007). Isolation and culture of adult neurons and neurospheres. *Nature protocols*.
17. Brown, J., Cooper-Kuhn, C., Kempermann, G., Van Praag, H., Winkler, J., Gage, F., Kuhn, H. (2003). Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis. *Eur J Neurosci*. 17(10), 2042-6.
18. Bull, N. and Bartlett, P. (2005). The Adult Mouse Hippocampal Progenitor Is Neurogenic But Not a Stem Cell. *The Journal of Neuroscience*, 25(47), 10815–10821.
19. Cacci, E., Claasen, J., and Kokaia, Z. (2005). Microglia-derived tumor necrosis factor- α exaggerates death of newborn hippocampal progenitor cells *in vitro*. *J. Neurosci. Res.* 80, 789–797.
20. Cameron, H., Woolley, C., McEwen, B., Gould, E. (1993). Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 5, 337–344.
21. Carpentier, P. and Palmer, T. (2009). Immune Influence on Adult Neural Stem Cell Regulation and Function. *Neuron*. 64 (1), 79–92.
22. Carreira, B., Morte, M., Santos, A., Lourenço, A., Ambrósio, F., Carvalho, C. and Araújo, I. (2014). Nitric oxide from inflammatory origin impairs neural stem cell proliferation by inhibiting epidermal growth factor receptor signaling. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 8, 343.
23. Chung, Y., Ko, H., Bok, E., Park, E., Huh, S., Nam, J. (2010). The role of neuroinflammation on the pathogenesis of Parkinson's disease. *BMB Rep.* 43, 225–232.
24. Clelland, C., Choi, M., Romberg, C., Clemenson, G., Fragniere, A., Tyers, P., Jessberger, S., Saksida, L., Barker, R., Gage, F., and Bussey, T. (2009). A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science*. 325, 210–213.
25. Coras, R., Siebzehnrubl, F., Pauli, E., Huttner, H., Njunting, M., Kobow, K., Villmann, C., Hahnen, E., Neuhuber, W., Weigel, D., et al. (2010). Low proliferation and differentiation capacities of adult hippocampal stem cells correlate with memory dysfunction in humans. *Brain*. 133 (11), 3359–72.
26. Dafny, N. and Yang, P. (2005). Interferon and the central nervous system. *Eur J Pharmacol* 523. 1–15.
27. David, D., Wang, J., Samuels, B., Rainer, Q., David, I., Gardier, A., Hen, R. (2010). Implications of the functional integration of adult-born hippocampal neurons in anxiety-depression disorders. *Neuroscientist*. 16 (5), 578–91.
28. Dantzer, R., O'Connor, J., Freund, G., Johnson, R., Kelley, K. (2008). From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci*. 9 (1), 46–56.
29. De Simone R, Levi, G., Aloisi, F. (1998) Interferon gamma gene expression in rat central nervous system glial cells. *Cytokine*. 10, 418–422.
30. Deng, W., Aimone, J., and Gage, F. (2010). New neurons and new memories: How does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat. Rev. Neurosci*. 11, 339–350.
31. Doetsch, F., Caille, I., Lim, D., Garcia, J. Alvarez, A. (1999) Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97, 703–716.
32. Ekdahl, C., Claasen, J., Bonde, S., Kokaia, Z., Lindvall, O. (2003). Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100 (23).
33. Engeland, C., Nielsen, D., Kavaliers, M., Ossenkopp, K. (2001). Locomotor activity changes following lipopolysaccharide treatment in mice: a multivariate assessment of behavioral tolerance. *Physiology & Behavior*. 72, 481-491.

34. Farioli-vecchioli, S. and Tirone, F. (2015). Control of the Cell Cycle in Adult Neurogenesis and its Relation with Physical Exercise, 1, 41–54.
35. Gage, F.H. et al. (1995). Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 11879–11883.
36. Gage, F.H. (2000). Mammalian neural stem cells. *Science*. 287, 1433-1438.
37. Green, H.F. and Nolan, Y.M. (2012). Unlocking mechanisms in interleukin-1 β -induced changes in hippocampal neurogenesis a role for GSK-3 β and TLX. *Transl. Psychiatry* 2, e194.
38. Guadagno, J., Swan, P., Shaikh, R., Cregan, S. (2015). Microglia- derived IL-1 β triggers p53-mediated cell cycle arrest and apoptosis in neural precursor cells. *Cell Death Dis.* 6, e1779.
39. Harish B., et al. (2011). A protocol for isolation and enriched monolayer cultivation of neural precursor cells from mouse dentate gyrus. *Frontiers in Neuroscience*. (5).
40. Heppner, F., Ransohoff, R., and Becher, B. (2015). Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 16, 358–372.
41. Hodge, R., Kowalczyk, T., Wolf, S., Encinas, J., Rippey, C., Enikolopov, G., Hevner, R. (2008). Intermediate Progenitors in Adult Hippocampal Neurogenesis: TBR2 Expression and Coordinate Regulation of Neuronal Output, 28(14), 3707–3717.
42. Hodge RD, Nelson BR, Kahoud RJ, Yang R, Mussar KE, Reiner SL, Hevner RF. (2012). Tbr2 is essential for hippocampal lineage progression from neural stem cells to intermediate progenitors and neurons. *J Neurosci* 32, 6275–6287.
43. Hofer, S., Grandgirard, D., Burri, D., Fröhlich, T., and Leib, S. (2011). Bacterial meningitis impairs hippocampal neurogenesis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 70, 890–899.
44. Hunsaker, M., Mooy, G., Swift, J., and Kesner, R. (2007). Dissociations of the medial and lateral perforant path projections into dorsal DG, CA3, and CA1 for spatial and nonspatial (visual object) information processing. *Behavioral Neuroscience*, 121(4), 742-750.
45. Iosif, R., Ekdahl, C., Ahlenius, H., Pronk, C., Bonde, S., Kokaia, Z., Jacobsen, S., and Lindvall, O. (2006). Tumor necrosis factor receptor 1 is a negative regulator of progenitor proliferation in adult hippocampal neurogenesis. *J. Neurosci.* 26, 9703–9712.
46. Jensen, J., and Parmar, M. (2006). Strengths and Limitations of the Neurosphere Culture System, 34(3), 153–161.
47. Jiang Y, Hsieh J. (2014). HDAC3 controls gap 2/mitosis progression in adult neural stem/progenitor cells by regulating CDK1 levels PNAS. 111(37), 13541-6.
48. Keene, C., Chang, R., Stephen, C., Nivison, M., Nutt, S., Look, A., Breyer, R., Horner, P., Hevner, R., and Montine, T. (2009). Protection of hippocampal neurogenesis from toll-like receptor 4-dependent innate immune activation by ablation of prostaglandin E2 receptor subtype EP1 or EP2. *Am. J. Pathol.* 174, 2300–2309.
49. Kempermann, G., Kuhn, H., Gage, F. (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*. 386, 493-5.
50. Kempermann, G, Jessberger, S, Steiner, B, Kronenberg, G. (2004). Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci* 27, 447–452.
51. Kempermann, G., Krebs, J., Fabel, K. (2008). The contribution of failing adult hippocampal neurogenesis to psychiatric disorders. *Curr Opin Psychiatry*. 21(3), 290–5.
52. Kempermann, G., Song, H., and Gage, F. H. (2016). Neurogenesis in the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harbor. Perspect. Biol.* 8, a018838.
53. Keohane, A., Ryan, S., Maloney, E., Sullivan, A., and Nolan, Y. (2010). Tumour necrosis factor- α impairs neuronal differentiation but not proliferation of hippocampal neural precursor cells: role of Hes1. *Mol. Cell. Neurosci.* 43, 127–135.

54. Kesner, R., Rolls E. (2015). A computational theory of hippocampal function, and tests of the theory: new developments. *Neurosci Biobehav Rev.* 48,92–147.
55. Ko, H., Jang, D., Son, J., Kwak, C., Choi, J., Ji, Y., Lee, Y., Son, H., and Kaang, B.-K. (2009). Effect of ablated hippocampal neurogenesis on the formation and extinction of contextual fear memory. *Mol. Brain* 2, 1.
56. Koo, J. and Duman, R. (2008). IL-1beta is an essential mediator of the antineurogenic and anhedonic effects of stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 751–756.
57. Kowalczyk, A., Filipkowsky, R., Rylski, M., Wilczynsky, G., Konopacky, F., Jaworsky, J., Cyemerych, M., Sicinsky, P., Kaczmarek, L. (2004). The critical role of cyclin D2 in adult neurogenesis. *J Cell Biol.* 167(2), 209-13.
58. Kozak, W., Conn, C. and Kluger, M. (1994). Locomotor activity in unrestrained mice lipopolysaccharide induces fever and depresses. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 266, R125-R135.
59. Kronenberg, G., Reuter, K., Steiner, B., Brandt, M., Jessberger, S., Yamaguchi, M., and Delbru, M. (2003). Subpopulations of Proliferating Cells of the Adult Hippocampus Respond Differently to Physiologic Neurogenic Stimuli, *The journal of comparative neurology*, 467, 455–463.
60. Kuhn, H., Dickinson, H, Gage, F. (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci.* 16, 2027-33.
61. Mahalakshmi Shankaran, et al. (2006). Discovery of Novel Hippocampal Neurogenic Agents by Using an *in vivo* Stable Isotope Labeling Technique. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics.* 319 (3).
62. Ming GL, Song H. (2011) Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron.* 70(4), 687–702.
63. Mirescu, C. and Gould, E. (2006), Stress and adult neurogenesis. *Hippocampus.* 16, 233–238.
64. Monje, M., Toda, H., Palmer, T. (2003). Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science.* 302. 1760- 1764.
65. Moriyama, M., Fukuhara, T., Britschgi, M., He, Y., Narasimhan, R., Villeda, S., Molina, H., Huber, B., Holers, M., Wyss, T. (2011) Complement receptor 2 is expressed in neural progenitor cells and regulates adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci* 31, 3981 – 3989.
66. Newton, K., and Dixit, V. (2012). *Signaling in Innate Immunity and Inflammation.* Cold Spring Harbor Laboratory Press.
67. Okun, E., Griffioen, K., Mattson, M. Toll-like receptor signaling in neural plasticity and disease. *Trends Neurosci.* 2011 May. 34(5), 269-81.
68. Orsini, F., De Blasio, D., Zangari, R., Zanier, E. and De Simoni, M. (2014) Versatility of the complement system in neuroinflammation, neurodegeneration and brain homeostasis. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 380.
69. Packer, M., Stasiv, Y., Benraiss, A., Chmielnicki, E., Grinberg, A., Westphal, H., and others. (2003). Nitric oxide negatively regulates mammalian adult neurogenesis. *Proc Natl Aca. Sci U S A* 100. 9566–71.
70. Palmer, T., Markakis. E., Willhoite, A., Safar, F., and Gage, F. (1999). Fibroblast Growth Factor-2 Activates a Latent Neurogenic Program in Neural Stem Cells from Diverse Regions of the Adult CNS. *The Journal of Neuroscience.* 19(19), 8487–8497.
71. Pechnick, R., Zonis, S., Wawrowsky, K., Pourmorady, J., and Chesnokova, V. (2008). p21 Cip1 restricts neuronal proliferation in the subgranular zone of the dentate gyrus of the hippocampus, 1–6.

72. Pérez, M., Tovar, L., Zepeda, A. (2017) Neuroinflammation and physical exercise as modulators of adult hippocampal neural precursor cell behavior. *Rev. Neurosci.* 29(1), 1-20.
73. Piatti, V., Davies, M., Esposito, M., Mongiat, L., Trincherro, M., Schinder, A. (2011). The timing for neuronal maturation in the adult hippocampus is modulated by local network activity. *J Neurosci* 31, 7715–7728.
74. Pozarowski, P. and Darzynkiewicz, Z. (2004). Analysis of Cell Cycle by Flow Cytometry. En Axel, A. H. (Ed), *Checkpoint Controls and Cancer 2: Activation and Regulation Protocols*. Series: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 281. (pp. 301-311). Humana Press.
75. Qu, Q., Sun, G., Li, W., Murai, K., Ye, P., Li, W., et al. (2013) Wnt7a Regulates Multiple Steps of Neurogenesis. *Molecular and Cellular Biology*. 33(13), 2551–2559.
76. Qu, Q., Sun, G., Li, W., Yang, S., Ye, P., Zhao, C. et al. (2009). Orphan nuclear receptor TLX activates Wnt/b-catenin signalling to stimulate neural stem cell proliferation and self-renewal. *Nat Cell Biol.*12, 31–40.
77. Ryan, S.M. et al. (2013) Negative regulation of TLX by IL-1 beta correlates with an inhibition of adult hippocampal neural precursor cell proliferation. *Brain Behav. Immun.* 33, 7–13.
78. Satyanarayana A, Kaldis P. (2009). Mammalian cell-cycle regulation: several CDKs, numerous cyclins and diverse compensatory mechanism. *Oncogene*. 28 (33), 2925-39.
79. Saxe, M., Battaglia, F., Wang, J., Malleret, G., David, D., Monckton, J., Garcia, A., Sofroniew, M., Kandel, E., Santarelli, L., et al. (2006). Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 17501–17506.
80. Schmidt, C., Jonas, P., Bischofberger, J. (2004). Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature* 429, 184–187.
81. Schoenfeld, T. and Gould, E. (2012) Stress, stress hormones, and adult neurogenesis. *Exp Neurol* 233, 12-21.
82. Shi, Y., Chichung Lie, D., Taupin, P., Nakashima, K., Ray, J., Yu, R., Gage, F. Evans, R., (2004). Expression and function of orphan nuclear receptor TLX in adult neural stem cells. *Nature*. 427, 78–83.
83. Shors, T., Miesegaes, G., Beylin, A., Zhao, M., Rydel, T., Gould, E. (2001). Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature*. 15. 410 (6826), 372-6.
84. Sierra, A., Encinas, J., Deudero, J., Chance, J., Enikolopov, G., Overstreet-Wadiche, L., Tsirka, S., Maletic, M. (2010) Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell*. 7, 483–495.
85. Sierra, A., Beccari, S., Diaz, I., Encina, S., Tremblay, M. (2014). Surveillance, phagocytosis, and inflammation: how never-resting microglia influence adult hippocampal neurogenesis. *Neural Plast.* 2014, 610343.
86. Sobecki, M., Mrouj, K., Camasses, A., Parisi, N., Nicolas, E., Lières, D., et al. (2016). The cell proliferation antigen Ki-67 organizes heterochromatin. *Sobecki et al. eLife.*;5:e13722.
87. Sobhan, P.K. and Funa, K. (2017). TLX—Its Emerging Role for Neurogenesis in Health and Disease. *Mol Neurobiol.* 54, 272–280.
88. Song, H., Stevens, C. F., and Gage, F. H. (2002). Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells, 39–44.
89. Toni, N. and Schinder, A. (2016). Maturation and Functional Integration of New Granule Cells into the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harbor. Perspect. Biol.* 8, a018838

90. Tronel, S., Belnoue, L., Grosjean, N., Revest, J., Piazza, P., Koehl, M., and Arous, D. (2012). Adult-born neurons are necessary for extended contextual discrimination. *Hippocampus*. 22, 292–298.
91. Vallieres, L., Campbell, I., Gage, F., Sawchenko, P. (2002). Reduced hippocampal neurogenesis in adult transgenic mice with chronic astrocytic production of interleukin-6. *J Neurosci*. 22, 486–92.
92. Van Praag, H., Kempermann, G., Gage, F. (1999). Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 2, 226–270.
93. Viallard, J., Lacombe, F., Belloc, F., Pellegrin, J., Reiffers, J. (2001). Molecular mechanisms controlling the cell cycle: fundamental aspects and implications for oncology. *Cancer Radiother*. 5(2), 109-29.
94. Walker, T. and Kempermann, G. (2014). One Mouse, Two Cultures: Isolation and Culture of Adult Neural Stem Cells. *J. Vis. Exp.* (84).
95. Wee Yong, V. (2010). Inflammation in neurological disorders: a help or a hindrance? *Neuroscientist* 16, 408–420.
96. Wee, P. and Wang, Z. (2017). Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers (Basel)*. 9(5), 52.
97. Zhang, R., Zhang, Z., Roberts, C., LeTourneau, Y., Lu, M., Zhang, L., Wang, Y., Chopp, M. (2008) Lengthening the G(1) phase of neural progenitor cells is concurrent with an increase of symmetric neuron generating division after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 28(3), 602-11.
98. Zhao, C., Teng, E., Summers, R., Jr, Ming, G., Gage, F. (2006). Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J Neurosci* 26. 3–11.
99. Zhao, C., Deng, W., and Gage, F. (2008). Review Mechanisms and Functional Implications of Adult Neurogenesis, 645–660.
100. Zonis, S., Ljubimov, V., Mahgerefteh, M., Pechnick, R., Wawrowsky, K., Chesnokova, V. (2013). p21Cip restrains hippocampal neurogenesis and protects neuronal progenitors from apoptosis during acute systemic inflammation: Inflammation-induced p21 restrains hippocampal neurogenesis. *Hippocampus*. 23, 1383-94.
101. Zhu, X., Hua, Y., Jiang, J., Zhou, Q., Luo, C., Han, X., Lu, Y., and Zhu, D. (2006). Neuronal nitric oxide synthase-derived nitric oxide inhibits neurogenesis in the adult dentate gyrus by down-regulating cyclic AMP response element binding protein phosphorylation. *Neuroscience* 141, 827–836.