



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE MEDICINA  
BIOMEDICINA

**PARTICIPACIÓN DE LA PROTEÍNA GREMLINA-1 EN EL PROCESO  
NEUROGÉNICO DEL GIRO DENTADO EN EL HIPOCAMPO DEL CEREBRO  
ADULTO**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**BIÓL. HERNANDEZ CRUZ VIRIDIANA CAROLINA**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. GERARDO BERNABÉ RAMÍREZ RODRÍGUEZ**  
INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA RAMÓN DE LA FUENTE MUÑIZ.  
**COMITÉ TUTOR: DRA. ERIKA MONSERRAT ESTRADA CAMARENA**  
INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA RAMÓN DE LA FUENTE MUÑIZ.  
**DRA. LAURA COLÍN BARENQUE**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM.

**CD. MX., NOVIEMBRE, 2018.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



OFICIO CPCB/1044/2018

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.


Lic. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 03 de septiembre de 2018, aprobó la ratificación del jurado que fue asignado en la reunión del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 08 de mayo de 2017, para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **HERNÁNDEZ CRUZ VIRIDIANA CAROLINA** con número de cuenta **409022803**, con la tesis titulada **"PARTICIPACIÓN DE LA PROTEÍNA GREMLINA-1 EN EL PROCESO NEUROGÉNICO DEL GIRO DENTADO EN EL HIPOCAMPO DEL CEREBRO ADULTO"**, realizada bajo la dirección del **DR. GERARDO BERNABÉ RAMÍREZ RODRÍGUEZ**:

Presidente: DR. JULIO EDUARDO ROQUE MORÁN ANDRADE  
Vocal: DRA. ANAYANSI MOLINA HERNÁNDEZ  
Secretario: DRA. ERIKA MONSERRAT ESTRADA CAMARENA  
Suplente: DRA. DIANA MARÍA ESCALANTE ALCALDE  
Suplente: DRA. LUCÍA ALBA MARTÍNEZ MOTA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 30 de octubre de 2018

  
**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**  
**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



## Agradecimientos Institucionales

---

- A) Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM., por el apoyo proporcionado durante el proceso de formación académica de posgrado.
  
- B) Al apoyo recibido del CONACyT, al otórgame una beca de maestría (CVU: 629851) durante el período comprendido del 01/08/2014 al 31/07/2016.
  
- C) A los miembros del Comité Tutor: Dr. Gerardo Bernabé Ramírez Rodríguez (Tutor principal) por su apoyo y dedicación durante el desarrollo del proyecto de investigación y mi formación académica., Dra. Erika Monserrat Estrada Camarena y Dra. Laura Colín Barenque por todo su esfuerzo e importantes aportaciones en el transcurso de la investigación y elaboración de escrito de tesis.

## Agradecimientos a título personal

---

Al Dr. Gerardo Bernabé Ramírez Rodríguez, por brindarme la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación, proporcionarme los recursos para consumir un peldaño más en la escalera de mi formación académica, y por depositar su paciencia, confianza y conocimiento durante mi estancia en el laboratorio.

Al Q.F.B. Leonardo Ortiz López por compartir su conocimiento, experiencia, dedicación y paciencia para la realización de este proyecto.

A los miembros del comité tutor: Dra. Erika Monserrat Estrada Camarena y Dra. Laura Colín Barenque, por sus aportaciones que me permitieron mejorar el proyecto de investigación y la presentación del trabajo. Sus cuestionamientos, ideas y experiencia han sido de gran utilidad para perfeccionar este proyecto.

A los miembros del Jurado: Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade, Dra. Anayansi Molina Hernández, Dra. Diana María Escalante Alcalde, Dra. Lucía Alba Martínez Mota; por apoyarme con sus observaciones que contribuyeron al enriquecimiento del presente trabajo.

## Dedicatorias

---

A mis padres por guiarme en el camino de la vida para lograr el éxito; ya que con su amor, sacrificio y dedicación me dieron las armas para vencer cualquier obstáculo, inculcándome valentía, perseverancia y honestidad. A ustedes les debo todos mis logros.

A Mauricio por su apoyo incondicional en todo momento y por motivarme a lograr mis metas.

A mis amigas Itzel, Ruth e Ivonne por sus oportunas intervenciones que me ayudaron a superar diversos obstáculos.

# Índice

---

## LISTA DE FIGURAS

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
NEUROGÉNESIS EN EL HIPOCAMPO ADULTO .....	3
<i>El proceso neurogénico.....</i>	<i>3</i>
<i>Regulación de la neurogénesis .....</i>	<i>5</i>
<i>Función de las nuevas neuronas.....</i>	<i>7</i>
LAS BMPs Y SUS ANTAGONISTAS .....	8
<i>Las BMPs.....</i>	<i>8</i>
<i>Señalización de las BMPs.....</i>	<i>8</i>
<i>Implicaciones de las BMPs en la neurogénesis adulta.....</i>	<i>10</i>
<i>La proteína gremlina como antagonista de las BMPs.....</i>	<i>11</i>
<i>Gremlina-1 .....</i>	<i>11</i>
<i>Gremlina-2 .....</i>	<i>13</i>
<i>La proteína gremlina-1 en el nicho neurogénico del giro dentado del hipocampo.....</i>	<i>13</i>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>15</b>
OBJETIVO GENERAL.....	15
OBJETIVOS PARTICULARES.....	15
<b>ANTECEDENTES.....</b>	<b>16</b>
<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>17</b>
OBTENCIÓN DE LAS CÉLULAS PRECURSORAS NEURALES .....	17
CULTIVO CELULAR Y CARACTERIZACIÓN DE LAS NPCSAH .....	17
ENSAYOS DE MORFOLOGÍA Y VIABILIDAD CELULAR DE LAS NPCSAH DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON GREMLINA-1.....	17
ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR EN LAS NPCSAH DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON GREMLINA-1 19	
<i>Proliferación celular con la técnica: detección de la incorporación de BrdU al DNA</i>	<i>19</i>
.....	19
<i>Proliferación celular con la técnica de neuroesferas .....</i>	<i>20</i>
ENSAYOS DE DIFERENCIACIÓN EN LAS NPCSAH A NEURONAS O GLÍA DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON GREMLINA-1.....	21

ENSAYOS COMPARATIVOS DE DIFERENCIACIÓN EN LAS NPCSAH A NEURONAS O GLÍA DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON GREMLINA-1 Y NOGGINA (ANTAGONISTAS DE LAS BMPs) .....	21
ENSAYOS PARA DETERMINAR LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR QUE PARTICIPA EN EL PROCESO NEUROGÉNICO DE LAS NPCSAH TRATADAS CON LA PROTEÍNA GREMLINA-1. ....	22
<i>Análisis de la vía canónica de las BMPs a través de los niveles de las proteínas Smad 1/5/9 en su estado fosforilado</i> .....	22
<i>Análisis de algunas vías no canónicas de las BMPs a través de los niveles de diversas proteínas en su estado activo</i> .....	23
INMUNOCITOQUÍMICA .....	24
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	25
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>26</b>
EFFECTO EN LA MORFOLOGÍA Y VIABILIDAD CELULAR DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON GREMLINA-1 EN LAS NPCSAH .....	26
<i>Cambios en la morfología celular</i> .....	26
<i>Cambios en la viabilidad celular</i> .....	29
EFFECTO EN LA PROLIFERACIÓN CELULAR DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON GREMLINA-1 EN LAS NPCSAH .....	31
<i>Proliferación celular por la incorporación de BrdU</i> .....	31
<i>Proliferación celular en neuroesferas</i> .....	34
EFFECTO EN LA DIFERENCIACIÓN DE LAS NPCSAH A NEURONAS O GLÍA DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON GREMLINA-1.....	37
<i>Diferenciación glial</i> .....	37
<i>Diferenciación neuronal</i> .....	37
EFFECTO COMPARATIVO EN LA DIFERENCIACIÓN DE LAS NPCSAH A NEURONAS O GLÍA DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON GREMLINA-1 Y NOGGINA (ANTAGONISTAS DE LA BMPs).....	39
DETERMINACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR QUE PARTICIPA EN EL PROCESO NEUROGÉNICO DE LAS NPCSAH TRATADAS CON LA PROTEÍNA GREMLINA-1. ....	44
<i>Efecto de la proteína gremlina-1 en la vía canónica de las BMPs a través de los niveles de proteínas Smad1/5/9 en su estado fosforilado comparado con noggina y BMP-4</i> .....	44
<i>Efecto de la proteína gremlia-1 en algunas vías no canónicas de las BMPs a través de los niveles de diversas proteínas en su estado activo comparado con noggina y BMP4</i> .....	46
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>49</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>55</b>
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	<b>56</b>



## Lista de Figuras

---

<b>Figura 1.</b> Neurogénesis en el hipocampo adulto. ....	<b>4</b>
<b>Figura 2.</b> Regulación de la neurogénesis adulta en el nicho neurogénico del hipocampo. ....	<b>6</b>
<b>Figura 3.</b> Señalización de las BMPs y su posible implicación en la neurogénesis adulta. ....	<b>9</b>
<b>Figura 4.</b> Expresión del mRNA de gremlina-1 en el hipocampo del ratón adulto C57BL/6. ....	<b>14</b>
<b>Figura 5.</b> Proceso experimental para evaluar la actividad de la proteína gremlina-1 sobre la morfología y viabilidad en las NPCsAH. ....	<b>18</b>
<b>Figura 6.</b> Proceso experimental para evaluar la proliferación en las NPCsAH después del tratamiento con gremlina-1. ....	<b>19</b>
<b>Figura 7.</b> Proceso experimental para evaluar la proliferación y diferenciación celular en las NPCsAH derivadas de neuroesferas después del tratamiento con gremlina-1. ....	<b>20</b>
<b>Figura 8.</b> Proceso experimental para evaluar los niveles de las pSmads 1/5/9 después del tratamiento con gremlina-1, noggina y BMP4. ....	<b>23</b>
<b>Figura 9.</b> Proceso experimental para identificar vías de señalización intracelular en las NPCsAH en neuroesferas después del tratamiento con gremlina-1, noggina y BMP4. ....	<b>24</b>
<b>Figura 10.</b> Cambio en la morfología celular de las NPCsAH después del tratamiento con gremlina-1 con factores de proliferación. ....	<b>27</b>
<b>Figura 11.</b> Cambios en la morfología celular de las NPsAH después del tratamiento con gremlina-1 sin factores de proliferación. ....	<b>28</b>
<b>Figura 12.</b> Viabilidad de NPCsAH tratadas con gremlina-1 con factores de proliferación. ....	<b>30</b>
<b>Figura 13.</b> Viabilidad de NPCsAH tratadas con gremlina-1 sin factores de proliferación. ....	<b>31</b>
<b>Figura 14.</b> Proliferación de NPCsAH tratadas con gremlina-1 con factores de proliferación. ....	<b>32</b>
<b>Figura 15.</b> Proliferación de NPCsAH tratadas con gremlina-1 sin factores de proliferación. ....	<b>33</b>
<b>Figura 16.</b> Número de neuroesferas de NPCsAH tratadas con gremlina-1. ....	<b>34</b>
<b>Figura 17.</b> Morfología de neuroesferas de NPCsAH después del tratamiento con gremlina-1. ...	<b>35</b>
<b>Figura 18.</b> Diámetro de neuroesferas de NPCsAH tratadas con gremlina-1. ....	<b>36</b>
<b>Figura 19.</b> Diferenciación celular a partir de NPCsAH en neuroesferas tratadas con gremlina-1. ....	<b>38</b>
<b>Figura 20.</b> Diferenciación glial a partir de neuroesferas de NPCsAH tratadas con gremlina-1. ...	<b>39</b>
<b>Figura 21.</b> Diferenciación neuronal a partir de neuroesferas de NPCsAH tratadas con gremlina-1. ....	<b>40</b>
<b>Figura 22.</b> Diferenciación celular a partir de NPCsAH en neuroesferas tratadas con gremlina-1, noggina y BMP4. ....	<b>41</b>
<b>Figura 23.</b> Diferenciación glial a partir de neuroesferas de NPCsAH tratadas con gremlina-1, noggina y BMP4. ....	<b>42</b>

<b>Figura 24.</b> Diferenciación neuronal a partir de neuroesferas de NPCsAH tratadas con gremlina-1, noggina y BMP4. ....	<b>43</b>
<b>Figura 25.</b> Análisis de los lisados por Western blot para las proteínas pSmad1/5/9 a partir de lisados celulares de NPCsAH en neuroesferas después del tratamiento con gremlina-1, noggina y BMP4 en diferentes intervalos de tiempo. ....	<b>44</b>
<b>Figura 26.</b> Niveles de expresión de las proteínas pSmad1/5/9 después del tratamiento con gremlina-1, noggina y BMP4 en diferentes intervalos de tiempo.....	<b>45</b>
<b>Figura 27.</b> Distribución de los spots de acuerdo al protocolo del fabricante.....	<b>46</b>
<b>Figura 28.</b> Arreglos de proteínas a partir de lisados celulares de NPCsAH en neuroesferas después del tratamiento con gremlina-1, noggina y BMP4.....	<b>47</b>
<b>Figura 29.</b> Detalle de los niveles de expresión de las proteínas afectadas por el tratamiento con BMP4 y sus antagonistas (gremlina-1 y noggina). ....	<b>48</b>
<b>Figura 30.</b> Propuesta de la vía de señalización de la proteína gremlina-1 como antagonista de las BMPs y su posible implicación en la neurogénesis adulta. ....	<b>54</b>

## Lista de abreviaturas

---

Abreviatura	Descripción en inglés
<b>AKT</b>	<i>Protein kinase B</i>
<b>ANOVA</b>	<i>Analysis of variance</i>
<b>BDNF</b>	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
<b>BLBP</b>	<i>Brain lipid-binding protein</i>
<b>BMPR</b>	<i>Bone morphogenetic proteins receptor</i>
<b>BMPs</b>	<i>Bone morphogenetic proteins</i>
<b>BrdU</b>	<i>5-Bromo-2'-deoxy-uridine</i>
<b>BSA</b>	<i>Bovine serum albumin.</i>
<b>DAN</b>	<i>Differential screening-selected gene abbreviative in Neublastoma</i>
<b>DAPI</b>	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
<b>DG</b>	<i>Dentate gyrus</i>
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
<b>DRM</b>	<i>Downregulated by v-mos</i>
<b>EGF</b>	<i>Epidermal growth factor</i>
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<b>Eph</b>	<i>Erythropoietin-producing human</i>
<b>Ephrins</b>	<i>Eph receptor-interacting proteins</i>
<b>FGF</b>	<i>Fibroblast growth factor</i>
<b>FGF-2</b>	<i>Fibroblast growth factor type-2</i>
<b>GFAP</b>	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
<b>GSK-3<math>\beta</math></b>	<i>Glycogen synthase kinase-3<math>\beta</math></i>
<b>HB-EGF</b>	<i>Heparin-binding EGF-like growth factor</i>
<b>HRP</b>	<i>Horseradish peroxidase.</i>
<b>ICSS</b>	<i>Intracranial self-stimulation</i>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	<i>Interferon gamma</i>
<b>IGF-1</b>	<i>Insulin-like growth factor-1</i>
<b>IHG-2</b>	<i>Induced in high glucose-2</i>
<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	<i>Interleukin-1 alpha</i>
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	<i>Interleukin-1 beta</i>
<b>IL-6</b>	<i>Interleukin-6</i>
<b>MAP2</b>	<i>Microtubule-associated protein 2</i>
<b>MAPK</b>	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
<b>miRNAs</b>	<i>Micro Ribonucleic acid</i>
<b>mRNA</b>	<i>Messenger Ribonucleic acid</i>
<b>NeuN</b>	<i>Neuronal nuclear</i>
<b>NeuroD</b>	<i>Neurogenic differentiation</i>
<b>NPCsAH</b>	<i>Neural precursor cells of adult hippocampal</i>

<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i>
<b>PDL/L</b>	<i>Poli-D-Lysine con Laminin</i>
<b>PI3K</b>	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase</i>
<b>Prox1</b>	<i>Prospero homeobox protein 1</i>
<b>PSA-NCAM</b>	<i>Polysialylated neuronal cell adhesion molecule</i>
<b>Rho</b>	<i>Ras homolog</i>
<b>SGZ</b>	<i>Subgranular zone</i>
<b>SHH</b>	<i>Sonic hedgehog</i>
<b>Sox-2</b>	<i>Sex determining Region Y-box 2</i>
<b>SVZ</b>	<i>Subventricular zone</i>
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<i>Transforming growth factor beta</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<i>Tumour necrosis factor alpha</i>
<b>Tsg</b>	<i>Twisted gastrulation</i>
<b>VEGF</b>	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
<b>WST-1</b>	<i>[2-(4-Iodophenyl)-3- (4-nitrophenyl)-5- (2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium]</i>

# Resumen

---

Durante el proceso de neurogénesis en el hipocampo del cerebro adulto, la generación de células gliales y neuronas granulares a partir de células precursoras ocurre constitutivamente en la zona subgranular del giro dentado. Este proceso, es finamente regulado por diversos factores que actúan negativa o positivamente en el microambiente o nicho neurogénico; en el cual, las células precursoras neurales desempeñan un papel fundamental para la generación de nuevas neuronas al responder a múltiples señales.

Las proteínas morfogénicas de hueso (BMPs) y sus antagonistas actúan en el hipocampo adulto mediando la neurogénesis y el compromiso neuronal. Al respecto, la expresión del mRNA que codifica para la proteína gremlina-1 (antagonista de BMPs) ha sido detectada en el nicho neurogénico del hipocampo en roedores adultos, lo cual sugiere que la proteína gremlina-1 podría contribuir a la formación de nuevas neuronas en el hipocampo del cerebro adulto.

En este trabajo se utilizaron células precursoras aisladas del giro dentado del hipocampo de roedores adultos C57BL/6, las cuales fueron tratadas con la proteína gremlina-1 para descubrir cómo afecta el proceso neurogénico; para lo cual, se realizaron pruebas de viabilidad, proliferación, diferenciación celular y señalización intracelular, además de comparar su función con noggina, antagonista de BMPs que ejerce un efecto pro-neurogénico y BMP4 que induce una diferenciación glial.

Nuestros resultados muestran que la proteína gremlina-1 favorece la neurogénesis adulta al incrementar la proliferación de las células precursoras y generar un mayor compromiso neuronal; estos efectos, pueden ser explicados por la inhibición de las proteínas Smad1/5/9 y la activación de la proteína GSK-3 $\beta$ .

# Abstract

---

Adult neurogenesis occurs in the subgranular zone (SGZ) in the adult hippocampus. The generation of glial and granular neurons from precursor cells is widely regulated by several positive or negative factors. Those factors differentially impact in the microenvironment or niche. In the niche, adult hippocampal neural precursor cells (NPCsAH) play a key role for the generation of neurons as a consequence of the reception of multiple signals.

Particularly, bone morphogenic proteins (BMPs) and their antagonists act in the hippocampus to mediate neurogenesis and the neuronal fate of precursor cells. In this sense, gremlin-1 protein a BMP antagonist is expressed in the niche of the hippocampus through its messenger in the adult mouse C57BL/6, location that suggests its possible role for the generation of new neurons in the hippocampus.

In this work, neural precursor cells isolated from the dentate gyrus of the hippocampus of adult C57BL/6 mice to show the effect of gremlin-1 on the viability, proliferation, differentiation and the intracellular signaling proteins activated by gremlin-1. In addition, the function of gremlin-1 was compared to that of noggina (another BMPs antagonist) and BMP4.

Our results showed that gremlin-1 protein favors adult neurogenesis by increasing the proliferation of precursor cells and generating greater neuronal involvement. These effects can be explained by the inhibition of the Smad1/5/9 proteins and the activation of the GSK-3 $\beta$  protein.

# Introducción

---

## Neurogénesis en el hipocampo adulto

### *El proceso neurogénico*

La neurogénesis adulta es definida como la producción de neuronas nuevas funcionales en el cerebro adulto. En los mamíferos se presenta constitutivamente en dos áreas del cerebro: en la zona subventricular (SVZ<sup>1</sup>) de los ventrículos laterales y en la zona subgranular (SGZ<sup>2</sup>) del giro dentado (DG<sup>3</sup>) del hipocampo (Eriksson *et al.*, 1998; Sanai *et al.*, 2004; Bergmann *et al.*, 2015). Específicamente en el giro dentado, las células precursoras neurales de la SGZ dan origen a las células gliales y neuronas granulares que se incorporan en la capa granular del DG (Stanfield y Trice, 1988; Ekenhoff y Rakic, 1998). Este proceso se lleva a cabo en diferentes etapas, entre las que se encuentran la proliferación de las células precursoras, la migración, la diferenciación, la sobrevivencia y la integración en los circuitos neuronales ya existentes (revisado en Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2007).

La progresión de la neurogénesis adulta en el DG (Figura 1) comienza a partir de células progenitoras (tipo astrocitos radiales), también conocidas como células tipo 1 de la SGZ; estas células tienen baja capacidad proliferativa (células radiales relativamente quiescentes) cuyos cuerpos celulares en forma triangular residen en la región de la SGZ y sus procesos apicales se extienden dentro de la capa molecular (Filippov *et al.*, 2003; Crowther y Song, 2014). Las células tipo 1 expresan la proteína de filamentos intermedios (nestina), la proteína de unión a lípidos del cerebro (BLBP<sup>4</sup>), la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP<sup>5</sup>) y el factor de transcripción Sox-2<sup>6</sup>, pero no expresan la proteína de unión a calcio S-100β (Seri *et al.*, 2004; Steiner *et al.*, 2006).

Posteriormente, por división asimétrica son generadas las células precursoras neurales (intermediarias, no-radiales u horizontales) también conocidas como células tipo 2 (Lugert *et al.*, 2010), las cuales poseen alta capacidad proliferativa y se distinguen por tener procesos cortos orientados horizontalmente en la zona granular y expresan Sox-2 pero no GFAP. Durante el desarrollo de las células tipo 2, se distinguen dos subtipos celulares: células tipo 2a que expresan nestina y células tipo 2b que expresa doblecortina (DCX), PSA-NCAM<sup>7</sup> y en algunas

---

<sup>1</sup> Por su abreviatura en inglés, *subventricular zone*.

<sup>2</sup> Por su abreviatura en inglés, *subgranular zone*.

<sup>3</sup> Por su abreviatura en inglés, *dentate gyrus*.

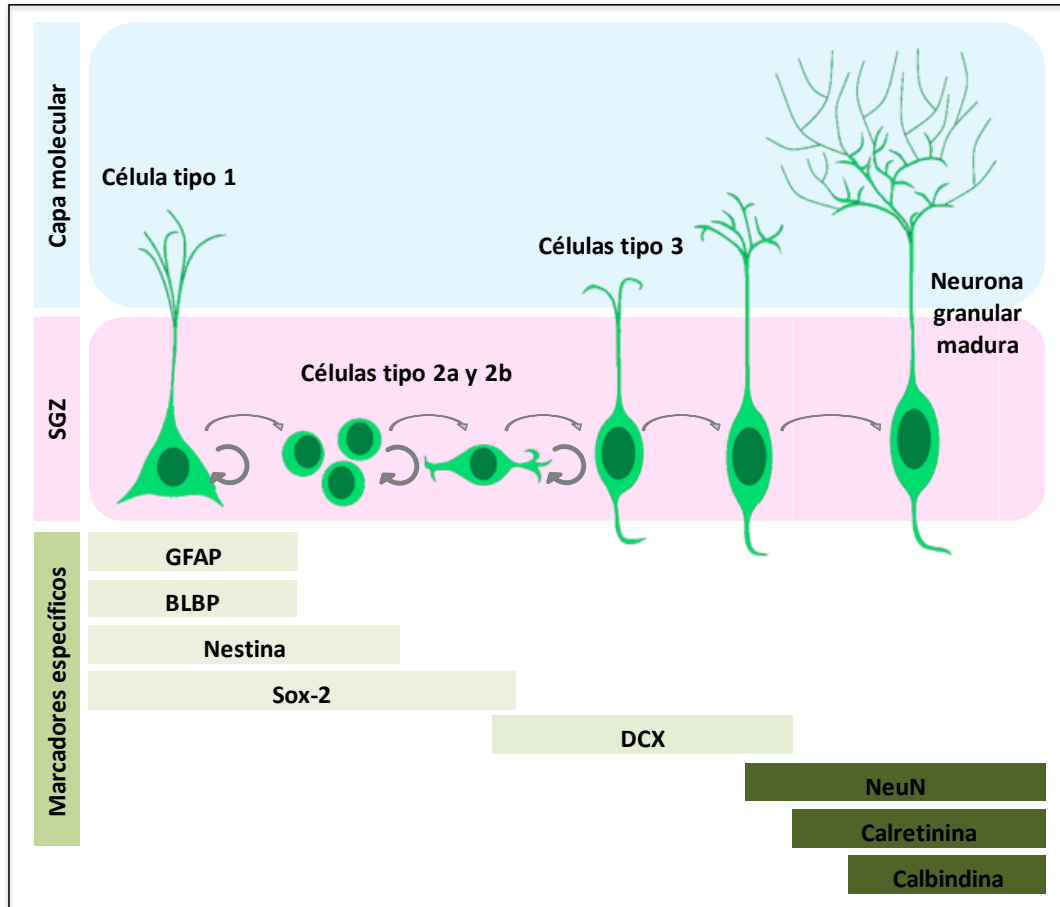
<sup>4</sup> Por su abreviatura en inglés, *brain lipid-binding protein*.

<sup>5</sup> Por su abreviatura en inglés, *glial fibrillary acidic protein*.

<sup>6</sup> Por su abreviatura en inglés, *sex determining Region Y-box 2*.

<sup>7</sup> Por su abreviatura en inglés, *polysialylated neuronal cell adhesion molecule*.

ocasiones se ha detectado la expresión de la proteína nuclear neuronal (NeuN<sup>8</sup>) (Suh *et al.*, 2007; Ehninger y Kempermann, 2007). En esta etapa inician los procesos de migración y diferenciación temprana.



**Figura 1. Neurogénesis en el hipocampo adulto.**

Las neuronas granulares maduras se desarrollan a partir de las células progenitoras neurales pasando por diferentes etapas [células tipo 1 (células progenitoras) → células tipo 2a → células tipo 2b (células precursoras) → células tipo 3 (neuroblastos) y → neuronas granulares maduras], las cuales se caracterizan por cambios en su morfología: los somas se localizan en la SGZ y los procesos neuríticos cambian de orientación hacia la capa molecular en algunas etapas del proceso. Los diferentes tipos celulares se pueden identificar al detectar la expresión de marcadores específicos (ilustrados en recuadros verdes, el tono más oscuro corresponde a los niveles más elevados de expresión) que pueden ser rastreados por diferentes técnicas de tinción. Modificado de Crowther y Song, 2014.

A continuación, se genera otro tipo celular que corresponde a neuronas inmaduras (neuroblastos) también conocidas como células tipo 3, que se caracterizan por expresar

<sup>8</sup> Por su abreviatura en inglés, *neuronal nuclear*.



algunos marcadores neuronales (DCX, NeuN, PSA-NCAM, NeuroD<sup>9</sup>, Prox1<sup>10</sup>) y presentar procesos de diferente longitud y complejidad correspondiente a un periodo de transición en el que su orientación cambia de horizontal a vertical, pueden mostrar dendritas que cruzan la zona granular del DG hacia la capa molecular y salen del ciclo celular para dar lugar a las neuronas inmaduras que expresan la proteína de unión a calcio y calretinina (Brandt *et al.*, 2003).

Finalmente, de cuatro a siete semanas después de haber iniciado el proceso neurogénico, las neuronas granulares nuevas maduran, presentan arborizaciones dendríticas complejas y expresan proteínas características de células neuronales como son la calbindina y NeuN (Van Praag *et al.*, 2002; Brandt *et al.*, 2003; Kempermann *et al.*, 2004). Estas neuronas tienen la capacidad de integrarse a los circuitos del hipocampo y muestran propiedades fisiológicas similares a las neuronas maduras (Laplagne *et al.*, 2006).

### *Regulación de la neurogénesis*

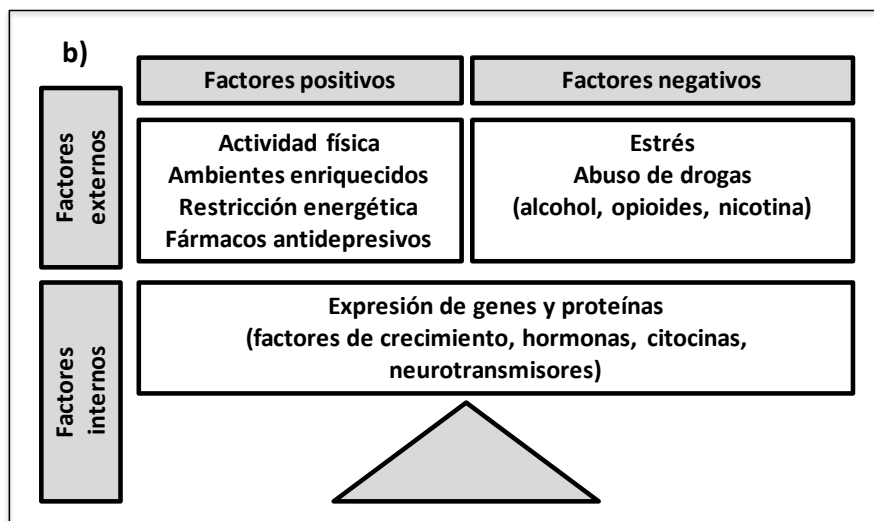
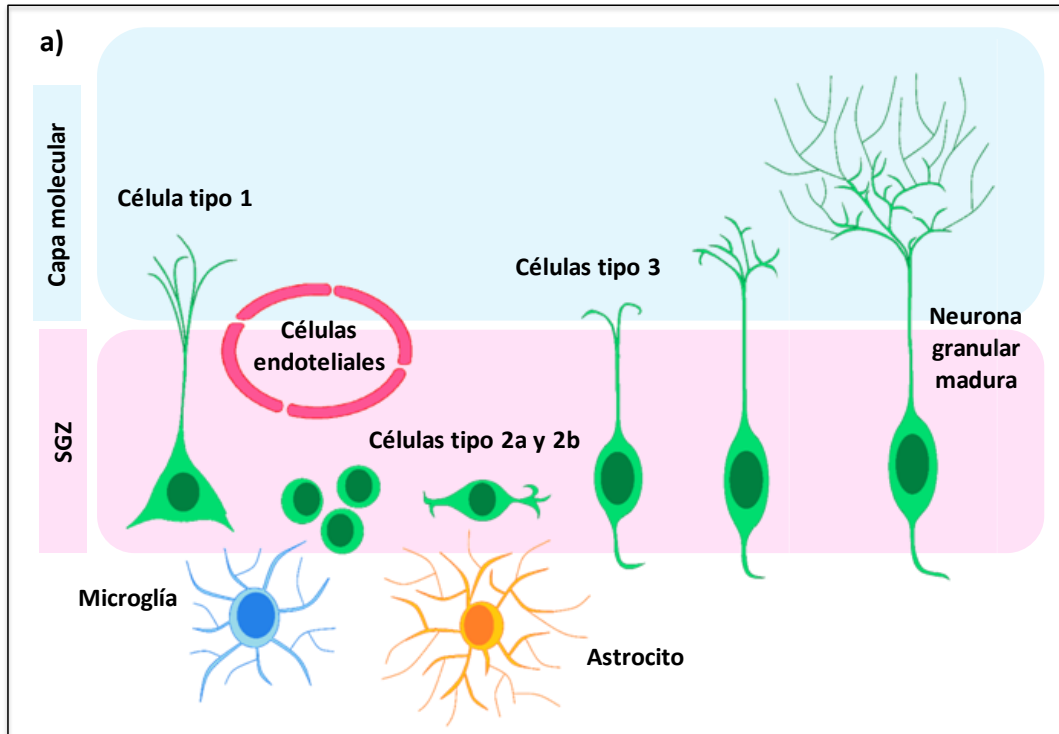
El proceso neurogénico es regulado de manera negativa o positiva a través de la acción de diversos factores que participan en diferentes etapas en un microambiente llamado nicho, el cual determina la permisividad neurogénica y regula el desarrollo neuronal de las células precursoras (Palmer *et al.*, 2000; Kempermann y Ehniger, 2008); por lo cual, los nichos son considerados unidades funcionales con las células precursoras para su auto-renovación y producción de células diferenciadas (Spradling *et al.*, 2001; Morrens *et al.*, 2012).

El nicho neurogénico de la SGZ del DG está formado por diversos componentes celulares (Figura 2a) entre los que se encuentran las células gliales (astrocitos y microglía), las células progenitoras (células tipo 1), las células precursoras (células tipo 2), los neuroblastos (células tipo 3), las neuronas granulares y las células endoteliales de los vasos sanguíneos; este conjunto de células contribuyen al microambiente a través la interacción de proteínas asociadas a la matriz extracelular y la secreción de proteínas, las cuales inciden en las diferentes estirpes celulares que coexisten en el nicho (Mercier *et al.*, 2002; Morrens *et al.*, 2012; Aimone *et al.*, 2014). Las células precursoras del hipocampo del cerebro adulto, como componente del nicho neurogénico, desempeñan un papel importante para la generación de neuronas a nivel celular (Gage *et al.*, 1998; Kempermann *et al.*, 2004) y molecular al expresar y responder a señales del microambiente regulando el proceso neurogénico (Turbic *et al.*, 2011).

---

<sup>9</sup> Por su abreviatura en inglés, *neurogenic differentiation*.

<sup>10</sup> Por su abreviatura en inglés, *prospero homeobox protein 1*.



**Figura 2. Regulación de la neurogénesis adulta en el nicho neurogénico del hipocampo.**

En el nicho neurogénico se encuentran diversos componentes celulares y moleculares, los cuales participan regulando la generación de nuevas neuronas granulares y células gliales en respuesta a diversos estímulos (Modificado de Aimone *et al.*, 2014). a) Animación representativa de los componentes celulares que se encuentran en el nicho neurogénico del hipocampo del cerebro adulto. b) Ejemplo de algunos factores internos o externos al nicho que pueden afectar el proceso neurogénico positiva o negativamente.

Los factores externos o internos que pueden ejercer algún efecto en el nicho durante el proceso neurogénico son diversos y han sido ampliamente investigados (Figura 2b) (revisado en Lieberwirth *et al.*, 2016). Entre los factores externos se encuentran los estímulos

ambientales (como la actividad física voluntaria, los ambientes enriquecidos y la restricción energética) y los estímulos farmacológicos (como el uso de antidepresivos) que actúan como reguladores positivos de la neurogénesis al promover la proliferación, diferenciación neuronal y la sobrevivencia (Van Praag *et al.*, 1999; Kempermann *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 2003; Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2011); por otra parte, el estrés y el abuso de drogas (incluyendo el alcohol, opioides y nicotina) pueden actuar negativamente reduciendo la proliferación y sobrevivencia celular (Eisch *et al.*, 2000; Abrous *et al.*, 2002; He *et al.*, 2005; Mirescu y Gould, 2006; Domínguez-Escriba *et al.*, 2006). Entre los factores internos podemos encontrar: la expresión de genes y proteínas (como Notch, Eph<sup>11</sup>/Ephrins<sup>12</sup>, Noggin y SHH<sup>13</sup>, también presentes durante el desarrollo embrionario) que participan en la regulación de la proliferación y diferenciación celular (Álvarez-Buylla y Lim, 2004); factores de crecimiento [como el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF<sup>14</sup>), el factor de crecimiento insulínico (IGF-1<sup>15</sup>), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF<sup>16</sup>), el factor de crecimiento epidermal (EGF<sup>17</sup>), el factor de crecimiento tipo EGF de unión a heparina (HB-EGF<sup>18</sup>), y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF<sup>19</sup>)] implicados en la regulación del destino celular y que pueden determinar el tamaño de la población neuronal o glial tanto en cerebros en desarrollo como en el cerebro adulto (revisado en: Arias-Carrión, 2007); hormonas (esteroides ováricos y estrógenos endógenos) que tienen un efecto estimulante en la proliferación celular de los precursores granulares (Tanapat *et al.*, 1999; Ormerod y Galea, 2001); citocinas inflamatorias que actúan positiva o negativamente sobre la proliferación y diferenciación neuronal, tales como la IL-1 $\alpha$ <sup>20</sup>, IL-1 $\beta$ <sup>21</sup>, IL-6<sup>22</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>23</sup> y TNF- $\alpha$ <sup>24</sup> (Borsini *et al.*, 2014), neurotransmisores (como el glutamato) y las monoaminas (como la serotonina, noradrenalina y la dopamina) (Gould, 1999; Nacher *et al.*, 2001; Kulkarni *et al.*, 2002; Höglinger *et al.*, 2004).

### *Función de las nuevas neuronas*

Se ha sugerido que la función de las nuevas neuronas en el DG del hipocampo es la de regular los procesos de aprendizaje, memoria y patrones de discriminación (Aimone *et al.*, 2011). Al respecto, se ha demostrado que algunos factores genéticos y ambientales que afectan a la

---

<sup>11</sup> Por su abreviatura en inglés, *erythropoietin-producing human*.

<sup>12</sup> Por su abreviatura en inglés, *Eph receptor-interacting proteins*.

<sup>13</sup> Por su abreviatura en inglés, *sonic hedgehog*.

<sup>14</sup> Por su abreviatura en inglés, *brain-derived neurotrophic factor*.

<sup>15</sup> Por su abreviatura en inglés, *insulin-like growth factor-1*.

<sup>16</sup> Por su abreviatura en inglés, *fibroblast growth factor*.

<sup>17</sup> Por su abreviatura en inglés, *epidermal growth factor*.

<sup>18</sup> Por su abreviatura en inglés, *heparin-binding EGF-like growth factor*.

<sup>19</sup> Por su abreviatura en inglés, *vascular endothelial growth factor*.

<sup>20</sup> Por su abreviatura en inglés, *interleukin-1 alpha*.

<sup>21</sup> Por su abreviatura en inglés, *interleukin-1 beta*.

<sup>22</sup> Por su abreviatura en inglés, *interleukin-6*.

<sup>23</sup> Por su abreviatura en inglés, *interferon gamma*.

<sup>24</sup> Por su abreviatura en inglés, *tumour necrosis factor alpha*.

neurogénesis del hipocampo causan cambios en el rendimiento cognitivo (Kempermann y Gage, 2002), la consolidación de la memoria (Ramírez-Amaya *et al.*, 2006) y el rendimiento en las tareas de aprendizaje (Revisado en Zhao *et al.*, 2008), en particular en el establecimiento y utilización de representaciones espaciales (Eichenbaum, 2000; Deng *et al.*, 2010).

Los factores que favorecen o dificultan el aprendizaje y la consolidación de la memoria, pueden actuar directamente en las células precursoras neurales a nivel proteómico. Por lo cual es necesario estudiar detalladamente los elementos que influyen en la neurogénesis adulta, ya que al profundizar en el conocimiento, se pueden abrir nuevas posibilidades para mejorar los procesos cognitivos y restablecer los procesos alterados por la enfermedad.

Al respecto, las proteínas morfogénicas de hueso (BMPs<sup>25</sup>) y sus antagonistas han mostrado un papel potencial en la regulación del proceso neurogénico adulto. En consecuencia, los estímulos que modifican los niveles de estas proteínas, también afectan el proceso neurogénico (Bonaguidi *et al.*, 2005 y 2008; Gobeske *et al.*, 2009; Bond *et al.*, 2014; Yousef *et al.*, 2015; Meyers *et al.*, 2016).

## Las BMPs y sus antagonistas

### *Las BMPs*

Las BMPs comprenden un extenso grupo de proteínas filogenéticamente conservadas; estas proteínas pertenecen a la super familia del factor de crecimiento transformante beta (TGF-β<sup>26</sup>), son glicosiladas y se asocian a la matriz extracelular. Se han identificado cerca de 22 miembros, de los cuales, al menos 11 se han encontrado en cerebro (Bragdon *et al.*, 2011).

Las BMPs actúan como importantes morfógenos durante la embriogénesis y el desarrollo, regulan la homeostasis de diversos tejidos en una amplia variedad de tipos celulares y procesos. No obstante, la deficiencia en la producción, funcionamiento y/o regulación de estas proteínas producen notables defectos o patologías severas en diversos órganos y tejidos, entre los que se encuentran el deterioro del riñón y pulmón, anomalías en la osificación y degeneración de las células germinales (Bragdon *et al.*, 2011; Wang, *et al.*, 2014; Brazil *et al.*, 2014).

### *Señalización de las BMPs*

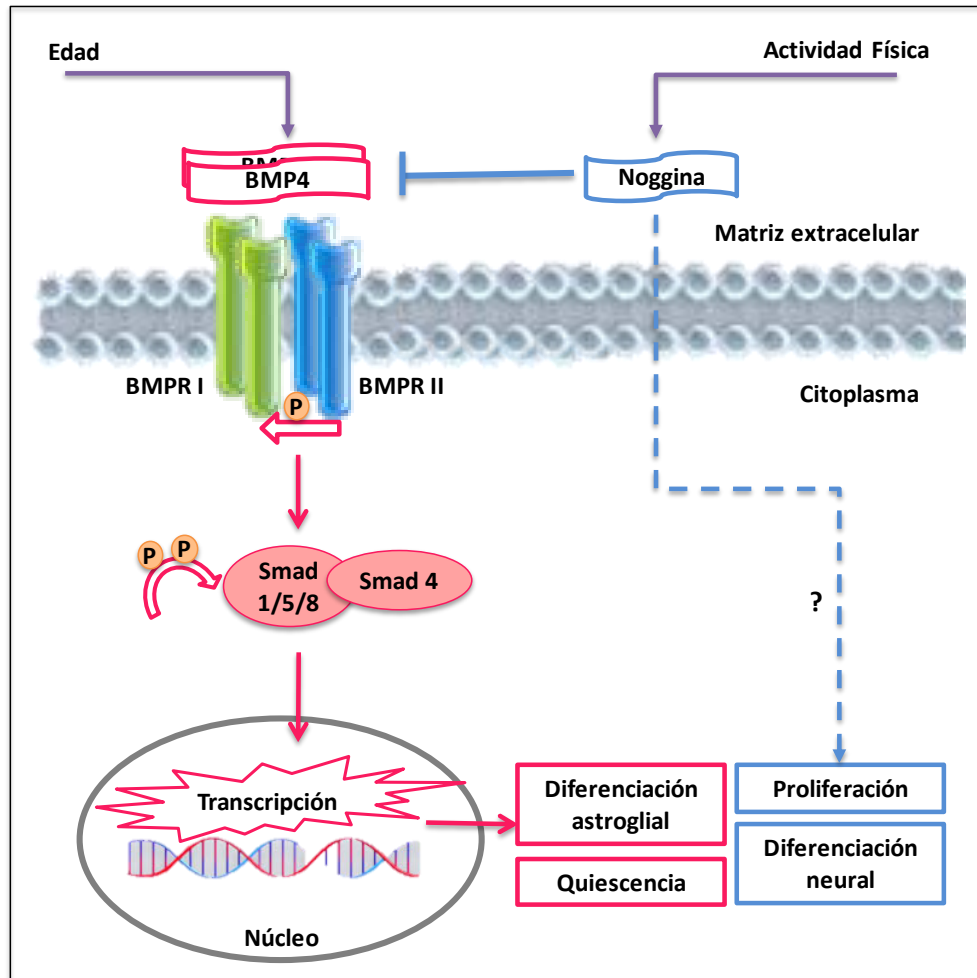
Las BMPs son sintetizadas como proteínas precursoras de 400-500 residuos de aminoácidos divididas en tres secciones: un péptido señal N-terminal, un prodominio de plegamiento y

---

<sup>25</sup> Por su abreviatura en inglés, *bone morphogenetic proteins*.

<sup>26</sup> Por su abreviatura en inglés, *transforming growth factor beta*.

secreción, y un péptido maduro C-terminal (Harrison *et al.*, 2011); las cuales son escindidas por pro-proteínas convertasas y el fragmento C-terminal de 50-100 residuos de aminoácidos es capaz de unirse a su receptor por medio de asociación no covalente (Bragdon *et al.*, 2011). Una vez que el ligando está unido al receptor de las BMPs (BMPR<sup>27</sup>), se pueden activar las vías de señalización canónica o no canónicas (Figura 3).



**Figura 3. Señalización de las BMPs y su posible implicación en la neurogénesis adulta.**

Después de la activación de los receptores tipo I y II de las BMPs por BMP4 se inicia la cascada de señalización por la vía canónica o no-canónica. La vía canónica (flechas rojas) permite la fosforilación de las proteínas Smad1, Smad5 y Smad8 (Smad1/5/8), las cuales se asocian con el mediador Smad4 formando un complejo que se transloca al núcleo y funciona como factor de transcripción regulando la expresión de genes que llevan a la quiescencia de las células precursoras y a la diferenciación astrogliar. Por otra parte, la inhibición de BMP4 a través de algunos antagonistas (en este caso noggina) impide la activación de Smad1/5/8 promoviendo la proliferación celular y la diferenciación neuronal a través de alguna vía no-canónica (flechas azules). Además, los niveles de BMP4 y noggina pueden estar regulados por factores externos, como la edad y la actividad física (Heldin *et al.*, 1997; Bonaguidi *et al.*, 2005 y 2008; Bragdon *et al.*, 2011; Heldin y Moustakas, 2012; Bond *et al.*, 2014).

<sup>27</sup> Por su abreviatura en inglés, *bone morphogenetic proteins receptor*.

La señalización canónica inicia con la cascada de transducción de señal por la activación del receptor de superficie, que forma un complejo heterotetrámero compuesto de dos homodímeros de receptores serina/treonina cinasa de tipo I y tipo II. El receptor tipo II (constitutivamente activo) transfosforila al receptor tipo I en un sitio rico en glicina-serina conocido como el dominio GS. La activación del receptor tipo I permite la fosforilación de sustratos intermediarios río abajo, proteínas Smad reguladas por receptor (R-Smad) (Heldin *et al.*, 1997). Las R-Smad involucradas en la señalización de BMPs son Smad1, Smad5 y Smad8 (Smad1/5/8), las cuales se asocian con el mediador Smad (co-Smad) también conocido como Smad4; este complejo se transloca al núcleo donde funciona como factor de transcripción y regula la expresión de genes junto con coactivadores y corepresores (Heldin y Moustakas, 2012).

La vía de señalización independiente de Smad (no canónica) incluye entrecruzamientos con otras vías de señalización, entre las que se encuentran las vías de MAP cinasa (MAPK<sup>28</sup>), GTPasas<sup>29</sup>-Rho<sup>30</sup> (Zhang, 2009), fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K<sup>31</sup>)/AKT<sup>32</sup> (Hiepen *et al.*, 2014), Wnt/ $\beta$ -catenina (Zhang *et al.*, 2013) y Hedgehog (Wiater *et al.*, 2006); sin embargo, los detalles de estas vías de señalización no están completamente descritas.

La señalización de las BMPs está ampliamente regulada por moduladores intracelulares y/o extracelulares. La regulación intracelular se lleva a cabo por inhibición directa de las Smad y por interacción con miRNAs<sup>33</sup>; mientras que extracelularmente se incluyen moduladores de membrana, agonistas y antagonistas de la señalización de las BMPs que regulan diversos procesos fisiológicos y estados de enfermedad (revisado en Brazil *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014).

### *Implicaciones de las BMPs en la neurogénesis adulta*

Las BMPs ejercen un efecto negativo en el proceso neurogénico en el hipocampo adulto. Se ha observado que el decremento de la neurogénesis adulta relacionado con la edad y el deterioro cognitivo está relacionado con el incremento en los niveles de expresión de las BMPs, específicamente BMP4. BMP4 inhibe la neurogénesis al promover la quiescencia de las células precursoras neurales y al incrementar el compromiso hacia una diferenciación astrogliar (Mira *et al.*, 2010; Bond *et al.*, 2014).

---

<sup>28</sup> Por su abreviatura en inglés, *mitogen-activated protein kinases*.

<sup>29</sup> También conocida como guanosina trifosfatasa.

<sup>30</sup> Por su abreviatura en inglés, *Ras homolog*.

<sup>31</sup> Por su abreviatura en inglés, *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*.

<sup>32</sup> Por su abreviatura en inglés, *protein kinase B*.

<sup>33</sup> Por su abreviatura en inglés, *micro Ribonucleic acid*.

Por otra parte, el efecto negativo que producen las BMPs en el proceso neurogénico puede ser revertido a través de sus antagonistas por unión directa a las BMPs. La interacción BMP-antagonista forma un complejo que impide la unión de las BMPs con su receptor (Nolan *et al.*, 2013) y provoca un efecto fisiológico adverso al reducir la diferenciación glial (Lim *et al.*, 2000). En este sentido, ha sido reportado que la actividad física promueve el aumento en los niveles de expresión de un antagonista de BMP4, la proteína noggina; este antagonista provoca una regulación positiva del proceso neurogénico, ya que promueve la proliferación de las células precursoras neurales e incrementa el compromiso de diferenciación neuronal (Bonaguidi *et al.*, 2005 y 2008; Gobeske *et al.*, 2009).

Algunos estímulos ambientales que modifican el proceso neurogénico en el hipocampo adulto pueden actuar directamente en la señalización de las BMPs y sus antagonistas (Figura 3) (Gobeske *et al.*, 2009); por lo tanto, la interacción BMP-antagonista es muy importante para regular la progresión de la neurogénesis y la perturbación de este sistema puede estar relacionado con el deterioro cognitivo. De manera que es necesario investigar otros antagonistas relacionados con la neurogénesis que han sido poco explorados, como es el caso de la gremlina-1.

### *La proteína gremlina como antagonista de las BMPs*

Los antagonistas de las BMPs son un grupo heterogéneo de moléculas glicosiladas que varían en secuencia en un rango de tamaño de 170-948 residuos de aminoácidos, este grupo incluye a 15 miembros clasificados en tres subgrupos basados en el tamaño del anillo de cisteína formado en su estructura nativa: la familia DAN<sup>34</sup> presenta un anillo de ocho cisteínas, Tsg<sup>35</sup> con un anillo de nueve cisteínas y cinco proteínas con el anillo de diez cisteínas entre los que se encuentra noggina (revisado en Bragdon *et al.*, 2011).

Al respecto, los miembros de la familia DAN se unen a las BMPs formando dímeros covalentes altamente estables (Kattamuri *et al.*, 2012a); especialmente las dos proteínas conocidas como gremlina han mostrado gran potencial regulando diversos procesos fisiológicos durante el desarrollo embrionario y en algunos tejidos adultos, siendo la más estudiada la proteína gremlina-1.

#### ***Gremlina-1***

La proteína gremlina-1, también conocida como DRM<sup>36</sup> o IHG-2<sup>37</sup> es una proteína de 184 residuos de aminoácidos (20.7 kDa) codificada por el gen *drm* (Topol *et al.*, 1997), que ejerce su acción como antagonista al unirse a dímeros de BMP2, BMP4 y BMP7; esta unión es selectiva e

---

<sup>34</sup> Por su abreviatura en inglés, *differential screening-selected gene abbreviative in Neubllastoma*.

<sup>35</sup> Por su abreviatura en inglés, *twisted gastrulation*.

<sup>36</sup> Por su abreviatura en inglés, *downregulated by v-mos*.

<sup>37</sup> Por su abreviatura en inglés, *induced in high glucose-2*.

impide la interacción ligando-receptor y en consecuencia la señalización a través de las proteínas Smad1/5/8. Se cree que esta proteína participa en la diferenciación específica del tejido y en la transformación celular, ya que su participación se ha descrito durante el desarrollo temprano, en tejidos adultos y en procesos de enfermedad como fibrosis y cáncer (Revisado en Wordinger *et al.*, 2008; Bragdon *et al.*, 2011, Church *et al.*, 2015).

Desde su descubrimiento, la proteína gremlina-1 se ha estudiado ampliamente en modelos de desarrollo embrionario, encontrando que ejerce su acción en células no diferenciadas regulando la proliferación, diferenciación y apoptosis en diversos tejidos (Merino *et al.*, 1999; Bardot *et al.*, 2000; Pereira *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2001; Ohyama *et al.*, 2001; Nicoli *et al.*, 2005; Frank *et al.*, 2006; Maciel *et al.*, 2007; Curran *et al.*, 2012; Suzuki *et al.*, 2012) incluyendo el sistema nervioso central (Huillard y Marx, 2004); mientras que durante la organogénesis, la desregulación por mutación o delección del gen *drm* provoca severas deformaciones de las extremidades, agenesia bilateral de los riñones, defectos pulmonares, bajo peso y corta longitud femoral conduciendo en algunos casos a la letalidad neonatal (Khokha *et al.*, 2003; Zuniga *et al.*, 2004; Michos *et al.*, 2004; Canalis *et al.*, 2012).

En cuanto a los tejidos adultos, la proteína gremlina-1 es altamente regulada; su expresión es alta en tejidos del cerebro, bazo, riñón y testículos, mientras que hay poca expresión en el corazón, hígado y el músculo esquelético; usualmente se presenta en células diferenciadas como neuronas (Topol *et al.*, 1997); sin embargo, su actividad en estos tejidos y diversos tipos celulares ha sido poco explorada y los hallazgos más recientes se limitan a procesos relacionados con enfermedad. Esta proteína, se ha identificado en algunos tipos de cáncer y se ha asociado a los procesos de proliferación celular, diferenciación, angiogénesis y migración (Sneddon *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2012; Mulvihill *et al.*, 2012; Karagiannis *et al.*, 2015; Koketsu *et al.*, 2015; Sato *et al.*, 2016). Los altos niveles de glucosa desencadenan la sobreexpresión de gremlina-1 por acción del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) (McMahon *et al.*, 2000), por lo cual ha sido relacionada con algunos trastornos característicos de la diabetes, entre estos se encuentran: la nefropatía diabética, en donde la gremlina-1 ha sido implicada en los cambios morfológicos de los túbulos del riñón (Lappin *et al.*, 2002; Wada *et al.*, 2002; Walsh *et al.*, 2007; Roxburgh *et al.*, 2009), y en modelos de retinopatía diabética donde contribuye a la transdiferenciación de las células epiteliales tubulares a un fenotipo similar a fibroblastos (Kane *et al.*, 2005). En los pulmones, la sobreexpresión de gremlina-1 inhibe a BMP7, lo que resulta en la apoptosis de miofibroblastos y el desarrollo de fibrosis; además, la presencia de niveles elevados de esta proteína puede ser utilizada como un marcador de hipertensión arterial pulmonar (Wellbrock *et al.*, 2015).

Por otra parte, la proteína gremlina-1 es importante para la reparación de fracturas y remodelación del hueso ya que regula la actividad de los osteoblastos (Pereira *et al.*, 2000; Worthley *et al.*, 2015) y puede estar involucrada en la diferenciación de monocitos a macrófagos mejorando la respuesta inmune (Beck *et al.*, 2016); además, su presencia en diferentes tejidos adultos sugiere que participa en diversos procesos fisiológicos contribuyendo a la homeostasis del individuo.



## ***Gremlina-2***

La proteína gremlina-2 también conocida como PRDC<sup>38</sup> es una proteína de secreción compuesta por 168 residuos de aminoácidos (17 kDa) que funciona como antagonista a través de la unión con BMP2, BMP4, BMP6 o BMP7 (Minabe-Saegusa *et al.*, 1998; Kattamuri *et al.*, 2012b); es codificada por el gen *Prdc*, el cual se ha propuesto como parálogo del gen que codifica para la proteína gremlina-1 (Sudo *et al.*, 2004). Se cree que la proteína gremlina-2 regula diversos procesos fisiológicos, aunque ha sido poco explorada.

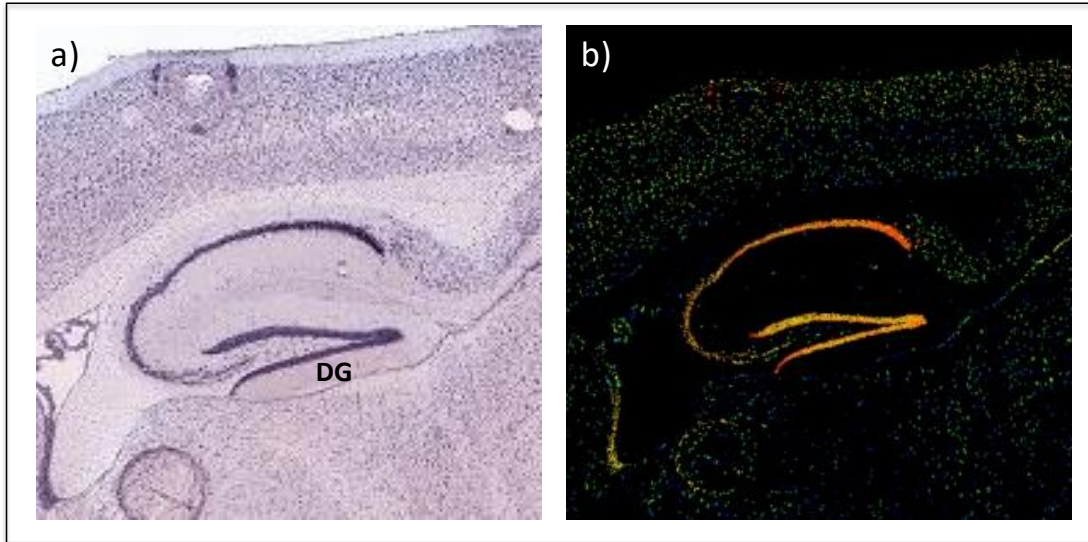
Al respecto, se ha encontrado que gremlina-2 participa en el desarrollo del sistema nervioso central durante la embriogénesis (Minabe-Saegusa *et al.*, 1998; Kriebitz *et al.*, 2009) y en el desarrollo del corazón regulando la lateralidad cardiaca y la diferenciación de cardiomiocitos (Müller *et al.*, 2013; Tanwar *et al.*, 2014); mientras que en tejidos adultos contribuye a la regulación parácrina del ovario (Sudo *et al.*, 2004), inhibe la diferenciación de osteoblastos suprimiendo la osteogénesis (Ideno *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2012) y puede estar involucrada en la integridad del endometrio (Tsubamoto *et al.*, 2016).

## ***La proteína gremlina-1 en el nicho neurogénico del giro dentado del hipocampo***

El mensajero que codifica para la proteína gremlina-1 se encuentra altamente expresado en el nicho neurogénico del DG del hipocampo en el ratón adulto C57BL/6 (Figura 4) (*Allen Brain Atlas*; <http://mouse.brain-map.org/experiment/show?id=69059946>); lo cual sugiere que la proteína gremlina-1 podría estar involucrada en el proceso para la formación de nuevas neuronas en el hipocampo adulto; sin embargo, la función de esta proteína en el proceso neurogénico no ha sido explorada.

---

<sup>38</sup> Por su abreviatura en inglés, *proteín related to Dan and Cerberus*.



**Figura 4. Expresión del mRNA de gremlina-1 en el hipocampo del ratón adulto C57BL/6.**  
a) Expresión del mRNA detectado por hibridación *in situ* en un corte sagital del cerebro adulto del ratón C57BL/6 donde se muestra una sección que contiene el hipocampo, en el que la mayor expresión se encuentra en el giro dentado (DG) y se muestra en color rojo-naranja en el panel b. Tomado de: *Allen Brain Atlas*; <http://mouse.brain-map.org/experiment/show?id=69059946>.

Entre los diversos factores que regulan la generación de nuevas neuronas en el hipocampo durante la etapa adulta, están incluidas algunas proteínas que favorecen o dificultan el proceso neurogénico, entre ellas se encuentra el equilibrio molecular entre las BMPs y sus antagonistas. Por lo anterior, el conocimiento del microambiente es importante, ya que a través de su manipulación es posible aumentar las posibilidades de éxito para inducir regeneración neuronal y amortiguar los efectos negativos que se presentan en algunas enfermedades que afectan el aprendizaje y memoria a causa de la deficiencia neurogénica.

En este sentido, la proteína gremlina-1 al actuar como antagonista de las BMPs podría contribuir a la formación de las nuevas neuronas en el DG a partir de las células precursoras que pueden ser aisladas del DG del hipocampo de roedores adultos de la cepa C57BL/6.

# Objetivos

---

## Objetivo general

Estudiar el efecto de la proteína gremlina-1 en el proceso neurogénico en células precursoras aisladas del giro dentado del hipocampo de roedores adultos de la cepa C57BL/6 (NPCsAH<sup>39</sup>).

## Objetivos particulares

Determinar el efecto en la morfología y viabilidad celular después del tratamiento con la proteína gremlina-1 en las NPCsAH.

Evaluar el efecto de la proteína gremlina-1 en la etapa neurogénica de proliferación celular en las NPCsAH.

Evaluar el potencial de diferenciación hacia un destino glial o neuronal a partir de las NPCsAH después del tratamiento con la proteína gremlina-1 en la etapa de proliferación.

Comparar si la proteína gremlina-1 altera de manera similar a noggina (otro antagonista de las BMPs), el compromiso de diferenciación de las NPCsAH hacia un destino glial o neuronal.

Determinar la vía de señalización a través de la cual la proteína gremlina-1 altera el proceso neurogénico en las NPCsAH, al comparar el efecto con noggina y BMP4.

---

<sup>39</sup> Por su abreviatura en inglés, *neural precursor cells of adult hippocampal*.

## Antecedentes

---

El conocimiento del microambiente neurogénico del giro dentado del hipocampo es importante, ya que se ha propuesto que, a través de su manipulación, es posible aumentar las posibilidades de éxito para inducir regeneración neuronal en el cerebro adulto y amortiguar los efectos negativos producidos en algunas enfermedades que afectan el aprendizaje y memoria a causa de la deficiencia neurogénica. En ese sentido, se sabe que diversos factores actúan en el hipocampo al favorecer o afectar la generación de nuevas neuronas durante la etapa adulta; algunos de estos factores han sido poco explorados y se requiere una mejor comprensión de su potencial, tal es el caso del equilibrio molecular entre las BMPs y sus antagonistas, lo cual resulta crucial para la homeostasis entre la generación del linaje astrogial o neuronal en el hipocampo a partir de células precursoras.

Gobeske y cols. reportaron por primera vez el efecto pro-neurogénico de BMP4 y su antagonista noggina en el hipocampo adulto. El incremento gradual de la actividad física en un modelo murino resultó en un aumento de la expresión de noggina correlacionado con el decremento de la expresión de BMP4 favoreciendo la proliferación de células precursoras y mejorando la capacidad de aprendizaje (Gobeske *et al.*, 2009); posteriormente, se encontró que la disminución de la neurogénesis relacionada con la edad ejercía un efecto contrario en los niveles de expresión de estas proteínas (Meyers *et al.*, 2016).

Sin embargo, noggina no es la única proteína que puede ejercer algún efecto durante el proceso neurogénico. Al respecto, Huguet y cols. al investigar la influencia de la autoestimulación intracraneal (ICSS<sup>40</sup>) sobre la expresión génica del hipocampo adulto que se relaciona con el mejoramiento cognitivo, encontraron una sobreexpresión de gremlina-1 (Huguet *et al.*, 2009). Además, el mensajero (mRNA<sup>41</sup>) que codifica para la proteína se encuentra altamente expresado en el giro dentado del hipocampo del ratón adulto C57BL/6 (Figura 4) (*Allen Brain Atlas*; <http://mouse.brain-map.org/experiment/show?id=69059946>); lo cual podría sugerir un posible papel de esta proteína en el proceso para la formación de nuevas neuronas en el hipocampo a partir de las células precursoras aisladas del giro dentado del hipocampo de roedores adultos jóvenes de la cepa C57BL/6.

---

<sup>40</sup> Por su abreviatura en inglés, *Intracranial self-stimulation*.

<sup>41</sup> Por su abreviatura en inglés, *messenger Ribonucleic acid*.

# Metodología

---

## Obtención de las células precursoras neurales

Se utilizaron células precursoras aisladas del hipocampo de ratones adultos C57BL/6 de 8 semanas de edad (Harlan, México). Los ratones fueron alojados en condiciones estándar de laboratorio, con ciclos invertidos de luz-obscuridad de 12 horas y acceso a comida y agua a voluntad (Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2009). Las células precursoras se aislaron del hipocampo adulto de acuerdo con lo descrito por Babu y cols. (2011); para lo cual, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical seguido de la extracción del cerebro, el cual se colocó en líquido cerebroespinal (LCE) artificial frío (aLCE) que contiene 124mM NaCl, 2.5mM KCl, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 25mM NaHCO<sub>3</sub> y 10mM D-glucosa. Se obtuvieron cortes coronales de 300µm utilizando un vibratomo para seccionar el hipocampo. Posteriormente el tejido del hipocampo fue disociado por digestión enzimática (Papaína 2.5U/mL, Dispasa 1U/mL y Desoxirribonucleasa 250U/mL) con apoyo de trituración mecánica y la suspensión celular se separó por centrifugación utilizando un gradiente de Percoll.

## Cultivo celular y caracterización de las NPCsAH

Los cultivos de NPCsAH fueron mantenidos en botellas de poliestireno de 25cm<sup>2</sup> (Corning, EUA) previamente recubiertas con Poli-D-Lisina (PDL; Sigma, EUA) y Laminina (Roche, México) (PDL/L) como matriz extracelular y conservados en condiciones estándar de incubación (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, ≥95% de humedad). Para mantener la proliferación celular constante, se adicionó 20ng/mL del factor de crecimiento epidermal humano (EGF; PeproTech, México) y 20ng/mL del factor de crecimiento de fibroblastos humano tipo 2 (FGF-2<sup>42</sup>; PeproTech, México) en medio de cultivo Neurobasal (Gibco, EUA) suplementado con B27 (Gibco, EUA) (Babu *et al.*, 2011). Las NPCsAH fueron caracterizadas mediante la detección de marcadores específicos de células precursoras por inmunofluorescencia utilizando anticuerpos para proteínas como GFAP, nestina y tubulina-βIII (datos no mostrados).

## Ensayos de morfología y viabilidad celular de las NPCsAH después del tratamiento con gremlina-1

Para determinar el efecto de la proteína gremlina-1 en las NPCsAH, se utilizaron los pasajes 25-33 de los cultivos primarios de las células previamente aisladas y caracterizadas.

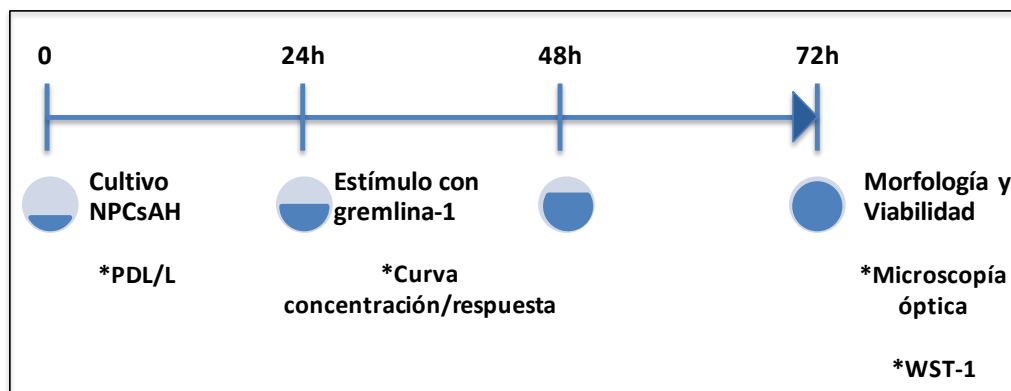
---

<sup>42</sup> Por su abreviatura en inglés, *fibroblast growth factor type-2*.

Las NPCsAH fueron cultivadas a una densidad de 15,000 células/cm<sup>2</sup> en placas de poliestireno de 96 pozos (Corning, EUA) previamente recubiertas con PDL/L y se dejaron en adherencia durante 24 horas. Las células fueron estimuladas con la proteína gremlina-1 (PreproTech, México) en diferentes concentraciones (1pg, 10pg, 100pg, 1ng, 10ng, 100ng y 1µg por mL) en presencia o ausencia de los factores de crecimiento FGF-2 y EGF durante 48 horas (Figura 5).

Para observar los cambios morfológicos se utilizó un microscopio invertido (Nikon, Japón) y se tomaron fotografías utilizando una cámara de alta resolución (Lumenera, Canadá) con el objetivo de 10x.

La viabilidad celular se determinó con el ensayo colorimétrico de cuantificación espectrofotométrica basada en la degradación de las sales de tetrazolium WST-1<sup>43</sup> a sales de formazán, las cuales se producen cuando las células son viables a través de la actividad mitocondrial (Mossman, 1983). Para lo cual, se adicionó a cada pozo 10µL de la solución WST-1/ECS (Millipore, México) por pozo y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos; transcurrido el tiempo, las sales de formazán fueron detectadas a 450nm en un lector de placas tipo ELISA<sup>44</sup> (Bio-TeK, EUA) y la densidad óptica fue expresada en porcentaje tomando como referencia a las células no tratadas con la proteína gremlina-1.



**Figura 5. Proceso experimental para evaluar la actividad de la proteína gremlina-1 sobre la morfología y viabilidad en las NPCsAH.**

Las NPCsAH fueron sembradas sobre matriz extracelular (PDL/L) y estimuladas con gremlina-1 a distintas concentraciones, con y sin factores de proliferación. Después de 48 horas de tratamiento (72h totales) se apreciaron los cambios morfológicos por microscopía óptica y se evaluó la viabilidad con el ensayo colorimétrico basada en la degradación de sales de tetrazolium WST-1.

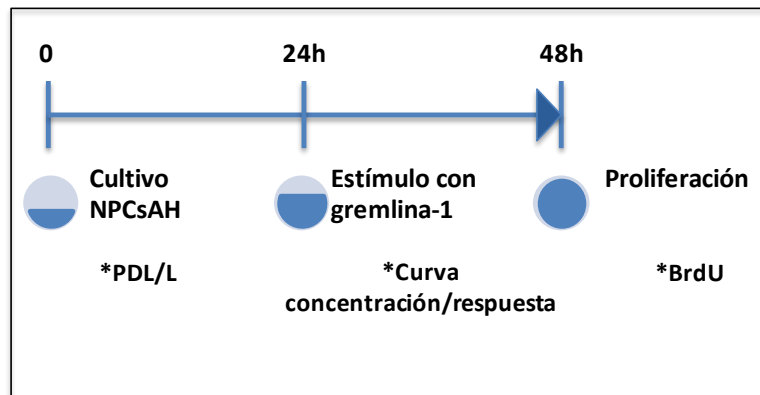
<sup>43</sup> [2-(4-Iodophenyl)-3- (4-nitrophenyl)-5- (2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium].

<sup>44</sup> Por su abreviatura en inglés, *enzyme-linked immunosorbent assay*.

## Ensayos de proliferación celular en las NPCsAH después del tratamiento con gremlina-1

### *Proliferación celular con la técnica: detección de la incorporación de BrdU<sup>45</sup> al DNA<sup>46</sup>*

Las NPCsAH fueron cultivadas a una densidad de 15,000 células/cm<sup>2</sup> en placas de poliestireno de 96 pozos previamente recubiertas con PDL/L y se dejaron en adherencia durante 24 horas. Las células fueron estimuladas con la proteína gremlina-1 en diferentes concentraciones (1pg, 10pg, 100pg, 1ng, 10ng, 100ng y 1µg por mL) en presencia o ausencia de los factores de crecimiento FGF-2 y EGF durante 24 horas. Posteriormente, se evaluó la proliferación celular con la técnica de incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU) al DNA durante la fase de síntesis del ciclo celular (Gratzner, 1982) por inmunocitoquímica (BrdU Kit III; Roche, México) de acuerdo al protocolo del fabricante. Las células que incorporaron BrdU dentro de su DNA fueron detectadas utilizando anticuerpos monoclonales contra BrdU conjugados con la enzima peroxidasa, la cual cataliza a su sustrato y genera un producto de color que fue detectado en un lector de placas tipo ELISA a 405nm. (Figura 6) y la densidad óptica fue expresada en porcentaje tomando como referencia a las células no tratadas con la proteína gremlina-1.



**Figura 6. Proceso experimental para evaluar la proliferación en las NPCsAH después del tratamiento con gremlina-1.**

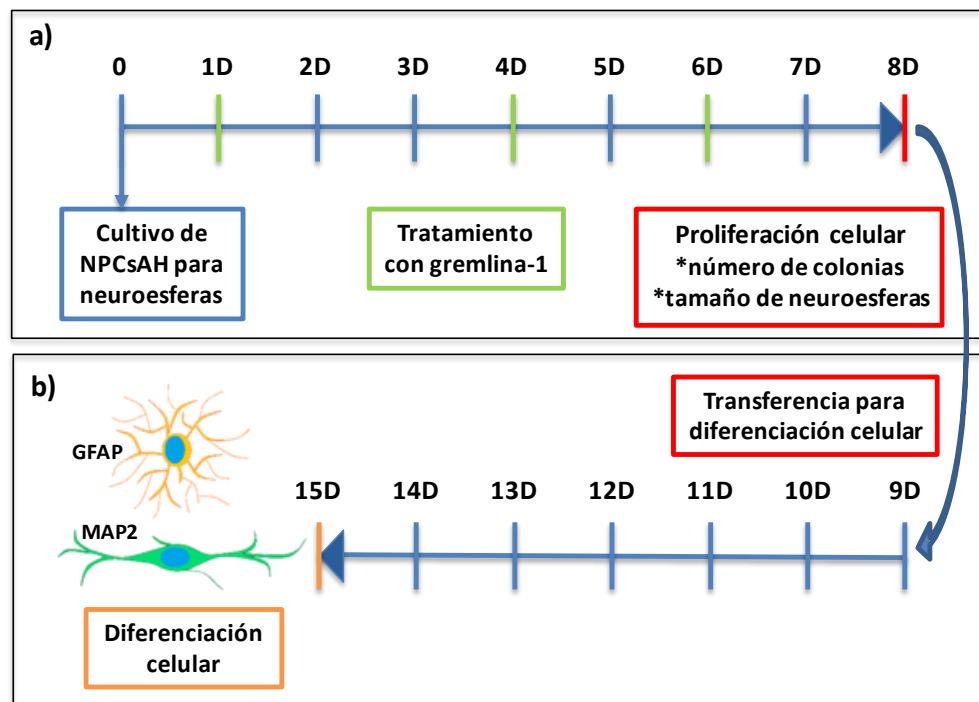
Las NPCsAH fueron sembradas sobre matriz extracelular (PDL/L) y estimuladas con gremlina-1 a distintas concentraciones, con y sin factores de proliferación. Después de 24 horas de tratamiento (48h totales) se evaluó la proliferación celular con la técnica de detección de la incorporación de BrdU al DNA por inmunocitoquímica.

<sup>45</sup> Por su abreviatura en inglés, *5-Bromo-2'-deoxy-uridine*.

<sup>46</sup> Por su abreviatura en inglés, *Deoxyribonucleic acid*.

## Proliferación celular con la técnica de neuroesferas

Las NPCsAH fueron cultivadas a una densidad de 20,000 células/cm<sup>2</sup> en condiciones de proliferación en placas de 96 pozos, libres de matriz extracelular. Después de 24 horas, las neuroesferas fueron estimuladas con diferentes concentraciones de la proteína gremlina-1 (0.1pg, 1pg, 10pg, 100pg y 1ng por mL) en tres pulsos durante siete días. Transcurrido el tiempo con el estímulo constante; se tomaron fotografías con un microscopio invertido y una cámara de alta resolución con el objetivo de 4x. Las imágenes fueron procesadas con el programa "Image J" (versión 1.48, EUA) para contar el número de esferas por condición y medir el diámetro de cada neuroesfera en  $\mu\text{m}$  (Figura 7a).



**Figura 7. Proceso experimental para evaluar la proliferación y diferenciación celular en las NPCsAH derivadas de neuroesferas después del tratamiento con gremlina-1.**

a) Para evaluar la proliferación celular después del tratamiento con gremlina-1, las NPCsAH fueron sembradas en el día 0 y se dejaron en incubación durante 24 horas para la formación de neuroesferas; los estímulos con la proteína fueron aplicados en los días 1, 4 y 6 (líneas verdes marcadas como: 1D, 4D y 6D); la evaluación de la proliferación se realizó en el octavo día (línea roja marcada como 8D) por microscopía óptica. b) Proceso de diferenciación en ausencia de factores de proliferación; las células en neuroesferas fueron transferidas para su adherencia a una placa recubierta con PDL/L y los mitógenos fueron retirados para inducir diferenciación celular, la cual fue evaluada el día 15 (línea naranja marcada como 15D) por microscopía de fluorescencia y las células GFAP y MAP2 positivas fueron cuantificadas.



## Ensayos de diferenciación en las NPCsAH a neuronas o glía después del tratamiento con gremlina-1

Las neuroesferas derivadas de las NPCsAH que se formaron durante siete días en presencia o ausencia de la proteína gremlina-1 en condiciones de proliferación, fueron transferidas a placas de 96 pozos con fondo de vidrio (Thermo scientific, EUA) previamente recubiertas con PDL/L para permitir su adherencia en ausencia de factores de proliferación y sin tratamiento con gremlina-1 durante siete días (Figura 7b). Transcurrido el tiempo, las células diferenciadas fueron fijadas y se detectaron proteínas específicas por inmunocitoquímica. Se realizó el marcaje de la proteína MAP2<sup>47</sup> para distinguir a las neuronas, el marcaje de la proteína GFAP para identificar las células gliales por inmunofluorescencia y los núcleos fueron marcados con DAPI<sup>48</sup>. El porcentaje de células diferenciadas a neuronas o glía fue estimado con respecto al total de células.

## Ensayos comparativos de diferenciación en las NPCsAH a neuronas o glía después del tratamiento con gremlina-1 y noggina (antagonistas de las BMPs)

Con el propósito de conocer si la proteína gremlina-1 ejerce su efecto como antagonista de las BMPs, se utilizaron otros tratamientos para comparar el efecto en el compromiso de diferenciación celular. La proteína noggina fue utilizada como control positivo, debido a que antagoniza a BMP4 e incrementa el compromiso neuronal de las células precursoras; mientras que, BMP4 se empleó como control negativo, ya que promueve la diferenciación glial de las células precursoras, de acuerdo con lo reportado por Bonaguidi y cols. (Bonaguidi *et al.*, 2005).

Las NPCsAH fueron cultivadas a una densidad de 20,000 células/cm<sup>2</sup> en condiciones de proliferación en placas de 96 pozos libres de matriz extracelular; después de 24 horas, las neuroesferas formadas fueron tratadas en grupos independientes con gremlina-1 (1ng por mL), noggina (250ng por mL) (PrepoTech, México) y BMP4 (50ng por mL) (PrepoTech, México) en tres pulsos durante siete días. Después, las neuroesferas fueron transferidas a placas de 96 pozos con fondo de vidrio previamente recubiertas con PDL/L para su adherencia y se dejaron en cultivo sin factores de proliferación ni tratamiento para inducir la diferenciación celular durante siete días.

---

<sup>47</sup> Por su abreviatura en inglés, *microtubule-associated protein 2*.

<sup>48</sup> Por la abreviatura en inglés de su nombre químico sistemático, *4',6-diamidino-2-phenylindole*.

Transcurrido el tiempo, las células diferenciadas fueron fijadas y se detectaron proteínas específicas por inmunocitoquímica. Se realizó el marcaje de la proteína MAP2 para distinguir a las neuronas y se identificó a la proteína GFAP para las células gliales por inmunofluorescencia; además, los núcleos fueron marcados con DAPI. El porcentaje de células diferenciadas a neuronas o glía fue estimado con respecto al total de células.

## Ensayos para determinar la vía de señalización intracelular que participa en el proceso neurogénico de las NPCsAH tratadas con la proteína gremlina-1.

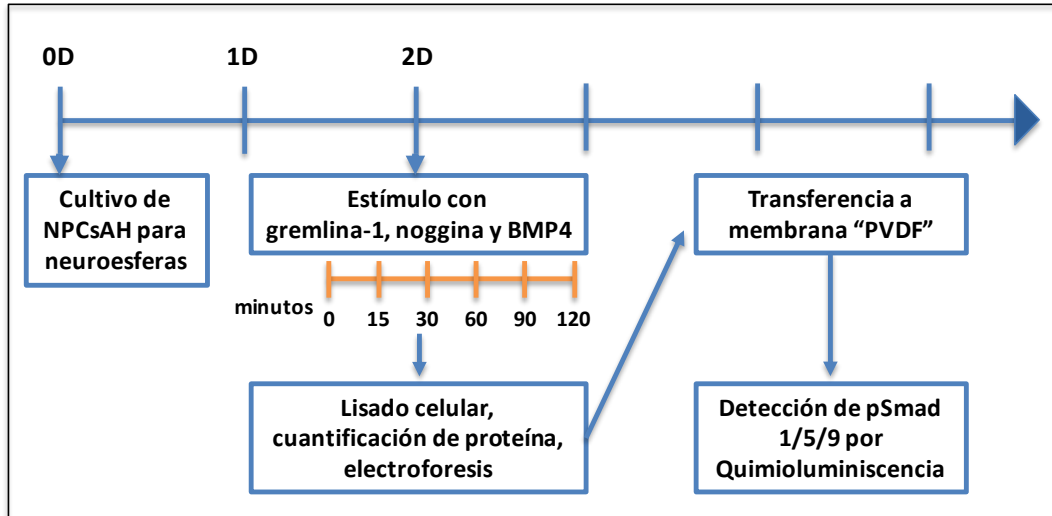
### *Análisis de la vía canónica de las BMPs a través de los niveles de las proteínas Smad 1/5/9 en su estado fosforilado*

Las células fueron sembradas en condiciones de proliferación a una densidad de 10,000 células/cm<sup>2</sup> en platos de cultivo de poliestireno de 35mm (Corning, EUA) libres de matriz extracelular; después de la formación de neuroesferas, las NPCsAH fueron estimuladas e incubadas en grupos independientes con la proteína gremlina-1 (1ng por mL), noggina (250ng por mL) y BMP4 (50ng por mL) durante diferentes intervalos de tiempo (0, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos). Las células se cosecharon y centrifugaron a 1200rpm recuperando el botón celular, el cual fue lisado con una solución amortiguadora de lisis para extracción de proteínas (RIPA; Sigma, EUA), los restos celulares fueron removidos por centrifugación y la proteína total se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976) (Bio-Rad, EUA). Las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida (Bio Rad, EUA) y transferidas a membranas de nitrocelulosa (Millipore, México). Las membranas fueron bloqueadas con 5% de albumina de suero bovino (BSA<sup>49</sup>; Sigma, EUA) en 0.05% de Tween 20-TBS (Sigma, EUA) e incubadas con los anticuerpos primarios para las proteínas Smad 1/5/9 en su estado fosforilado (Cell Signalling, EUA) y los anticuerpos secundarios de burro acoplados a peroxidasa de rábano (HRP<sup>50</sup>; Jackson ImmunoResearch, EUA). Finalmente, las bandas de proteína fueron detectadas con la técnica de quimioluminiscencia (Millipore, México) y la cantidad relativa de proteína se determinó con el programa ImageLab (Figura 8). Como control de carga se utilizó a la proteína 3-gliceraldehído-fosfato-deshidrogenasa (Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2013).

---

<sup>49</sup> Por su abreviatura en inglés, *bovine serum albumin*.

<sup>50</sup> Por su abreviatura en inglés, *horseradish peroxidase*.



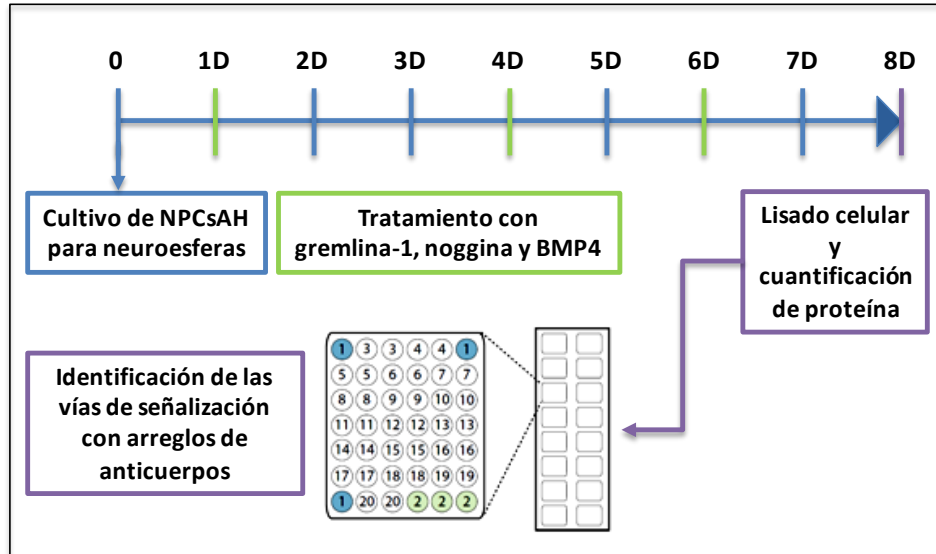
**Figura 8. Proceso experimental para evaluar los niveles de las pSmads 1/5/9 después del tratamiento con gremlina-1, noggina y BMP4.**

Las NPCSAH fueron sembradas para formar neuroesferas, las cuales se trataron en grupos independientes con gremlina-1, noggina y BMP4 durante diferentes intervalos de tiempo, las células fueron lisadas y la proteína se separó en geles de poliacrilamida; posteriormente, se realizó una transferencia a membranas de nitrocelulosa y las proteínas Smad 1/5/9 en su estado fosforilado fueron detectadas por quimioluminiscencia.

### *Análisis de algunas vías no canónicas de las BMPs a través de los niveles de diversas proteínas en su estado activo*

Las NPCSAH fueron cultivadas a una densidad de 10,000 células/cm<sup>2</sup> en condiciones de proliferación en platos de cultivo de poliestireno de 35mm libres de matriz extracelular. Después de 24 horas para la formación de neuroesferas, fueron estimuladas en grupos independientes con la proteína gremlina-1 (1ng por mL), noggina (250ng por mL) y BMP4 (50ng por mL) en tres pulsos durante siete días. Posteriormente, las células fueron cosechadas y centrifugadas a 1200rpm recuperando el botón celular. Se utilizó una solución amortiguadora de lisis para extracción de proteínas (RIPA), los restos celulares fueron removidos por centrifugación y la proteína total se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976) (Bio-Rad, EUA).

Para identificar algunas posibles vías de señalización implicadas en la actividad de la proteína gremlina-1, se utilizaron arreglos de anticuerpos para proteínas de señalización intracelular de acuerdo con protocolo del fabricante (Kit de arreglos de señalización intracelular, Cell Signalling, EUA). Los spots de proteína fueron detectados con la técnica de quimioluminiscencia y la cantidad relativa de proteína se determinó con el programa ImageLab (Versión 5.2.1; Bio-Rad, EUA) (Figura 9).



**Figura 9. Proceso experimental para identificar vías de señalización intracelular en las NPCSAH en neuroesferas después del tratamiento con grelina-1, noggina y BMP4.**

Las NPCSAH fueron sembradas para formar neuroesferas (0); los estímulos con grelina-1, noggina y BMP4 fueron en los días 1, 4 y 6 (líneas verdes marcadas como: 1D, 4D y 6D), en el octavo día (línea violeta marcada como 8D) se realizó el lisado celular, cuantificación de proteína por el método de Bradford y se identificaron algunas proteínas de señalización intracelular mediante un arreglo de anticuerpos.

## Inmunocitoquímica

Los cultivos de NPCSAH fueron fijados con paraformaldehído (TJ Baker, EUA) al 4% en solución salina amortiguada por fosfatos (PBS<sup>51</sup>; Gibco, EUA) 0.1M a pH 7.4 durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después, el fijador fue retirado y las células se lavaron con PBS. Para permeabilizar se utilizó Tritón X-100 (Sigma, EUA) al 0.5% durante 30 minutos, los sitios no específicos fueron bloqueados con 5% de BSA. Los anticuerpos primarios fueron diluidos en solución de bloqueo y se incubaron toda la noche a temperatura ambiente en agitación constante. Posteriormente, se retiró el anticuerpo primario correspondiente y se colocó el anticuerpo secundario durante 2 horas. Los anticuerpos primarios fueron los siguientes: anticuerpo de conejo anti-GFAP 1:500 (Dako, EUA) anticuerpo de ratón anti-MAP2 1:500 (Sigma, EUA); los anticuerpos secundarios fueron: anti-ratón de cabra conjugado con rodamina (Jackson Inmuno Research, EUA); anti-conejo de cabra conjugado con Fluoresceína (FITC) (Jackson Inmuno Research, EUA).

<sup>51</sup> Por su abreviatura en inglés, *phosphate buffered saline*.

Los experimentos se analizaron en un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse Ti y las imágenes de las células se analizaron con el analizador de imágenes NIS-Elements de Nikon. Para cada condición experimental se determinó el número de células con el programa Image J. Los valores absolutos en números de células se normalizaron por porcentajes y se realizó un análisis histográfico. Los experimentos se realizaron tres veces por duplicado observando al menos 3 campos elegidos al azar en 4-6 pozos por tratamiento.

## Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados con el programa SigmaPlot (Versión 12.5, *Systat Software*, EUA) aplicando un análisis de varianza de una vía, seguido de la prueba post hoc de Dunnett o Dunn's. Las diferencias fueron consideradas como significativas cuando se presentó un valor de  $p \leq 0.05$ .

## Resultados

---

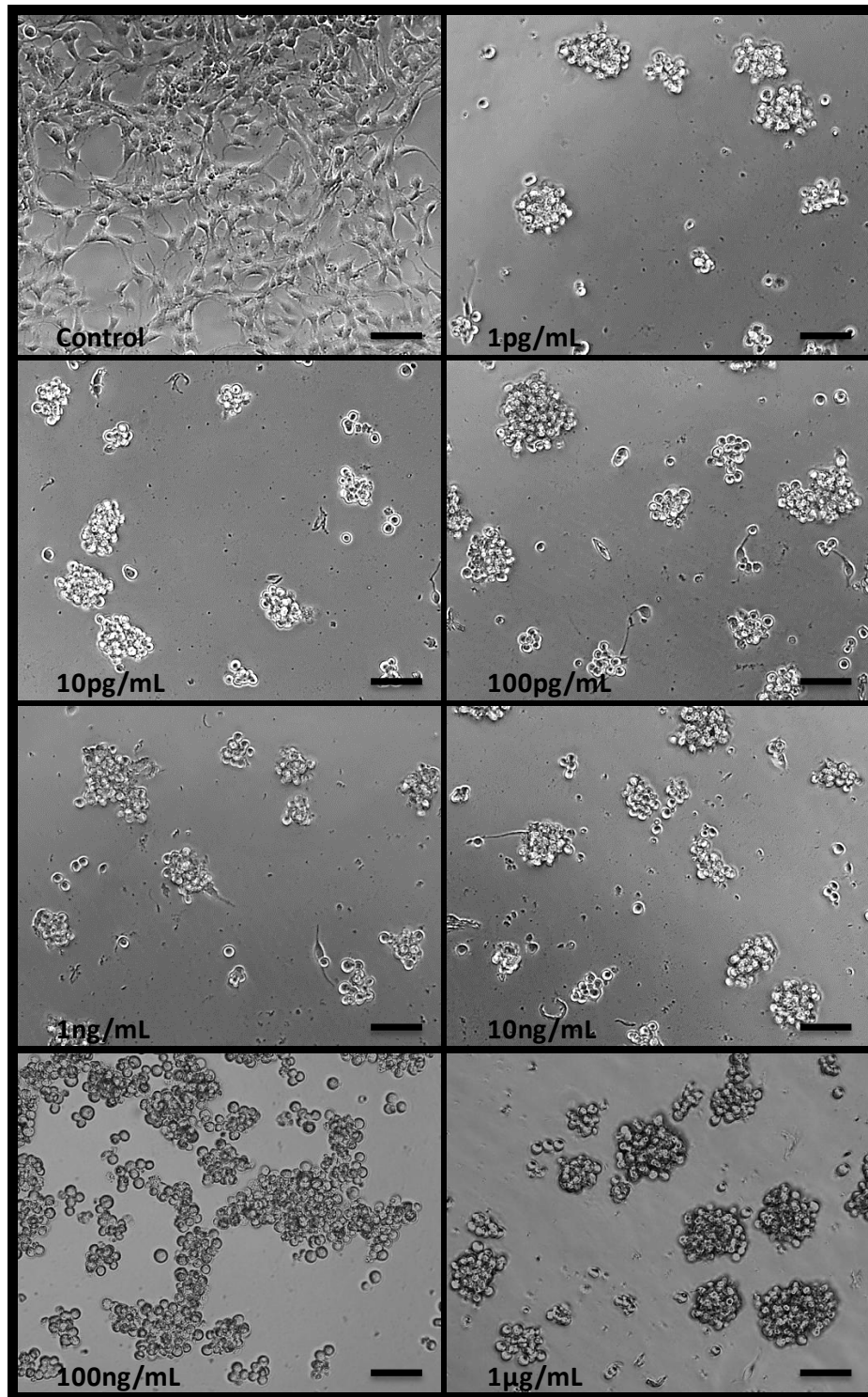
### Efecto en la morfología y viabilidad celular después del tratamiento con gremlina-1 en las NPCsAH

#### *Cambios en la morfología celular*

Al observar con microscopía óptica a las NPCsAH después de 48 horas con el tratamiento de gremlina-1 a diferentes concentraciones en presencia de los factores de crecimiento, se descubrió que esta proteína afecta la forma de las células sin perjudicar la adherencia al plato de cultivo (Figura 10).

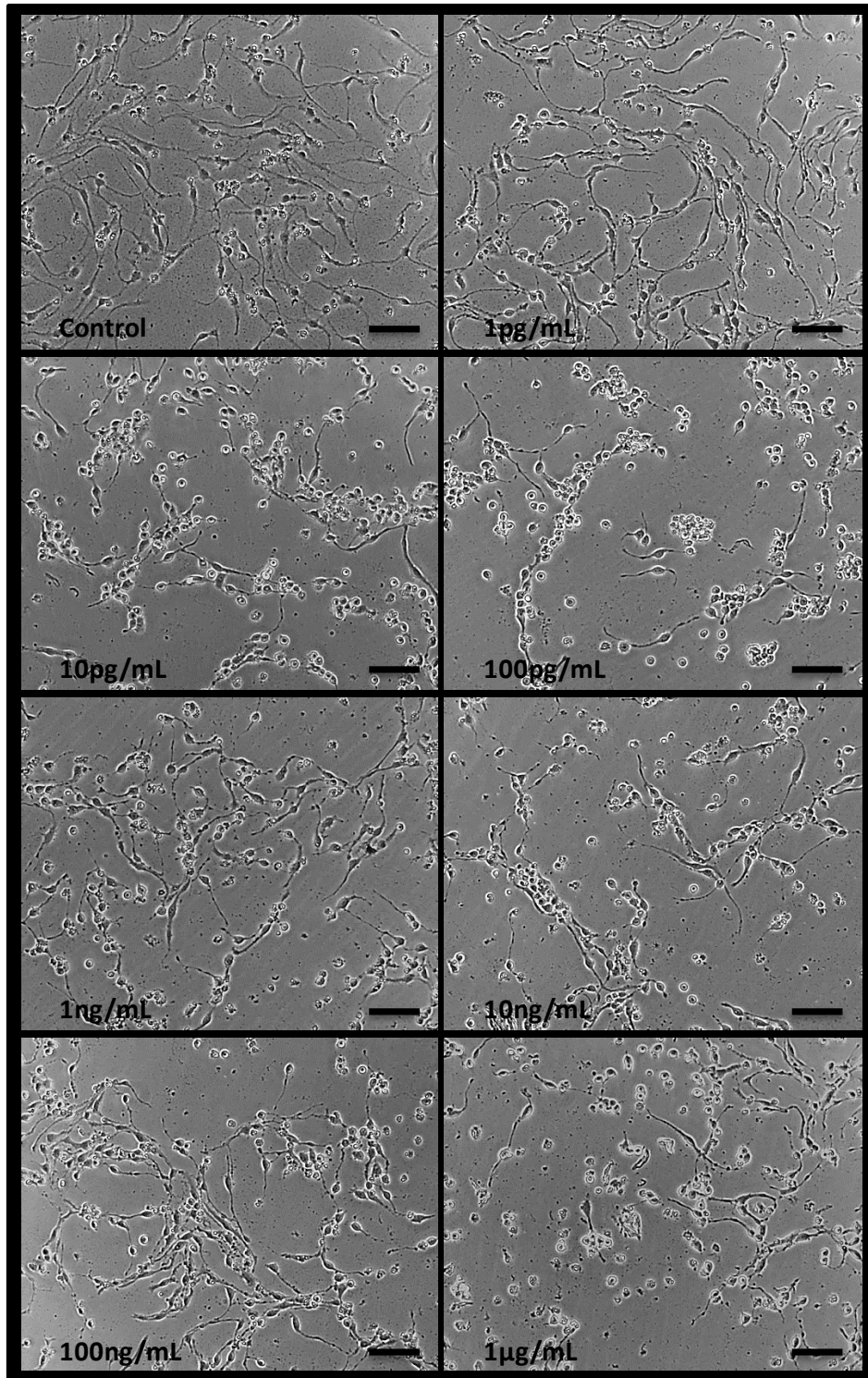
Las células no tratadas con la proteína gremlina-1 (control) se observaron de forma alargada con sus proyecciones citoplasmáticas habituales (dos o tres procesos neuríticos: morfología fusiforme y algunas células que presentan morfología más redondeada) y se encontraron homogéneamente extendidas en toda la superficie del pozo. Las células expuestas a las concentraciones más bajas de gremlina-1 (1pg y 10pg por mL) se observaron con una forma menos alargada (el tamaño de las proyecciones citoplasmáticas con respecto al control es reducido), presentaron un tamaño homogéneo entre sí y se extendieron en el fondo del pozo heterogéneamente. Las células tratadas con gremlina-1 a las concentraciones de 100pg, 1ng y 10ng por mL, mostraron morfología redondeada (sin las proyecciones citoplasmáticas habituales), el volumen celular fue distinto para cada célula en la misma población, además de formar grupos con distinta cantidad celular. Las células tratadas con gremlina-1 a concentraciones de 100ng y 1µg por mL presentaron formas redondeadas con distinto tamaño celular formando grupos muy compactos y fuertemente adheridos entre sí.

Para descartar el efecto de los factores de crecimiento sobre la actividad de la proteína gremlina-1, las NPCsAH fueron tratadas con gremlina-1 a diferentes concentraciones y cultivadas sin factores de proliferación durante 48 horas. Transcurrido el tiempo, se observaron cambios morfológicos distintos con respecto a las células que tienen los factores de proliferación (Figura 11).



**Figura 10. Cambio en la morfología celular de las NPCSAH después del tratamiento con gremlina-1 con factores de proliferación.**

Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos (15,000 células/cm<sup>2</sup>) por 24 horas para permitir su adherencia, posteriormente fueron tratadas con diferentes concentraciones de gremlina-1 durante 48 horas, con factores de proliferación. Las células fueron fotografiadas en campos al azar con el objetivo 10x y seleccionadas de tres ensayos independientes, donde cada condición fue evaluada por cuadruplicado. La barra equivale a 100µm.



**Figura 11. Cambios en la morfología celular de las NP-sAH después del tratamiento con gremlina-1, sin factores de proliferación.**

Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos (15,000 células/cm<sup>2</sup>) por 24 horas para permitir su adherencia, posteriormente fueron tratadas con diferentes concentraciones de gremlina-1 durante 48 horas, sin factores de proliferación. Las células fueron fotografiadas en campos al azar con el objetivo 10x y seleccionadas de tres ensayos independientes, donde cada condición fue evaluada por cuadruplicado. La barra negra equivale a 100µm.



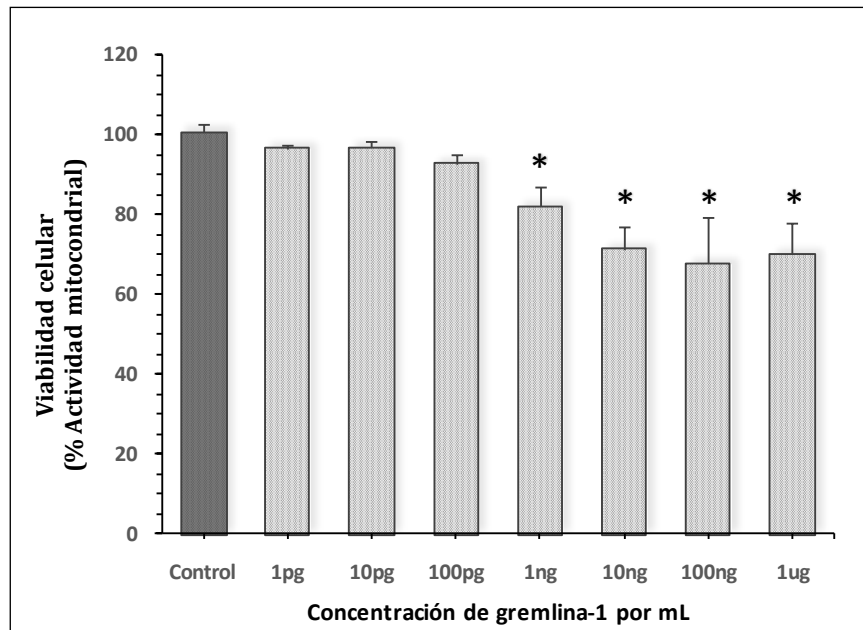
En las células no tratadas con la proteína gremlina-1 (control), los procesos neuríticos característicos de la diferenciación celular comenzaron a hacerse presentes; se observó el desarrollo de neuritas bien extendidas que comenzaban a establecer conexiones entre las neuritas de las células vecinas y ocuparon toda la superficie del pozo en forma homogénea. En las células sometidas a la concentración más baja de gremlina-1 (1pg por mL) no se observó algún efecto por el estímulo de la proteína con respecto al control. Conforme fue aumentada la concentración de gremlina-1 (de 10pg a 100ng por mL) en los cultivos celulares, los cambios morfológicos fueron más evidentes; las células presentaron una retracción de los procesos neuríticos de forma heterogénea y una reducción de tamaño. Con respecto a la concentración más alta (1µg por mL), las células se observaron de forma más redondeada, irregular y con pérdida de volumen celular de manera heterogénea.

De tal forma que la proteína gremlina-1 ejerce un efecto gradual sobre las NPCsAH en su morfología celular provocando una disminución de los procesos neuríticos conforme es aumentada su concentración, siendo más sensibles al cambio aquellas células que se encuentran en constante proliferación.

### *Cambios en la viabilidad celular*

Con el propósito de conocer el efecto de la proteína gremlina-1 sobre la viabilidad en las NPCsAH, las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de la proteína durante 48 horas en condiciones de proliferación. Después del tratamiento, la viabilidad celular fue evaluada a través de la actividad mitocondrial con la técnica de WST-1 y expresada en porcentaje. El efecto causado por la proteína gremlina-1 fue comparado con las células no tratadas (control), las cuales fueron consideradas con un porcentaje de viabilidad celular del 100%.

Las NPCsAH tratadas con las concentraciones más bajas de la proteína gremlina-1 (1pg, 10pg y 100pg por mL) no presentaron diferencia significativa en los valores de viabilidad con respecto al control, aunque se observó una reducción del 3 al 7%. Sin embargo, al utilizar concentraciones mayores de la proteína (a partir de 1ng/mL) se observó una disminución significativa en la viabilidad celular; después del tratamiento con 1ng, 10ng, 100ng y 1µg por mL de gremlina-1 se observó una pérdida del 19, 29, 33 y 31% respectivamente en la actividad mitocondrial de las células (Figura 12), lo que indica que la proteína afecta negativamente la viabilidad de las células a concentraciones mayores de 1ng/mL.

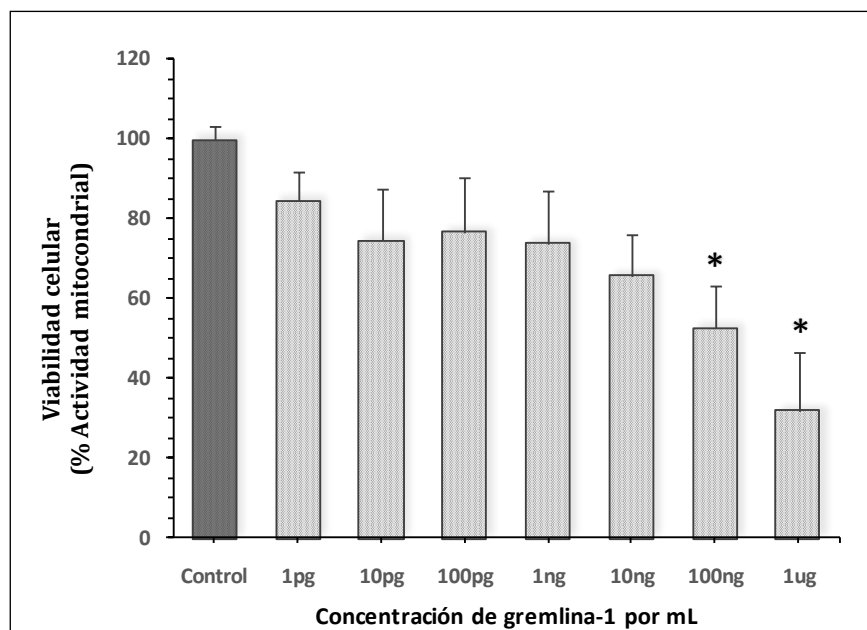


**Figura 12. Viabilidad de NPCSAH tratadas con gremlina-1 con factores de proliferación.**

Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos (15,000 células/cm<sup>2</sup>) por 24 horas para permitir su adherencia, posteriormente fueron tratadas con diferentes concentraciones de gremlina-1 durante 48 horas en condiciones de proliferación. En el eje de las ordenadas se muestran las concentraciones utilizadas de proteína (de 1pg a 1µg por mL) y células sin tratamiento (control); la viabilidad celular fue evaluada a través de la actividad mitocondrial con la técnica de WST-1 y expresada en porcentaje en el eje de las abscisas; las barras de error representan el error estándar. El gráfico es representativo de tres ensayos independientes, donde cada condición fue evaluada por cuadruplicado. Significancia, prueba de Dunnett (comparación contra el grupo control). \*p= 0.002.

Para descartar la interferencia del tratamiento de la proteína gremlina-1 asociado a los factores de proliferación sobre la viabilidad celular, el estímulo con la proteína se realizó en ausencia de dichos factores (Figura 13); con lo cual, se obtuvo un efecto negativo mayor en la actividad mitocondrial comparado con aquellas tratadas con los factores de proliferación; también hubo una mayor variabilidad de los datos al obtener errores estándar mayores.

No obstante, las células que recibieron los tratamientos con gremlina-1 a las concentraciones de 1pg a 10ng por mL mostraron una reducción no significativa en su actividad mitocondrial hasta el 34% con respecto al control; mientras que las concentraciones de 100ng y 1µg por mL mostraron diferencia significativa al reducir la viabilidad celular en un 47 y 68% respectivamente.



**Figura 13. Viabilidad de NPCsAH tratadas con gremlina-1 sin factores de proliferación.**

Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos (15,000 células/cm<sup>2</sup>) por 24 horas para permitir su adherencia, posteriormente fueron tratadas con diferentes concentraciones de gremlina-1 durante 48 horas en condiciones de diferenciación. En el eje de las ordenadas se muestran las concentraciones utilizadas de la proteína (de 1pg a 1µg por mL) y células sin tratamiento (control); la viabilidad celular fue evaluada a través de la actividad mitocondrial con la técnica de WST-1 y expresada en porcentaje en el eje de las abscisas; las barras de error representan el error estándar. El gráfico es representativo de tres ensayos independientes, donde cada condición fue evaluada por cuadruplicado. Significancia con prueba de Dunnett (comparación contra el grupo control). \*p= 0.005.

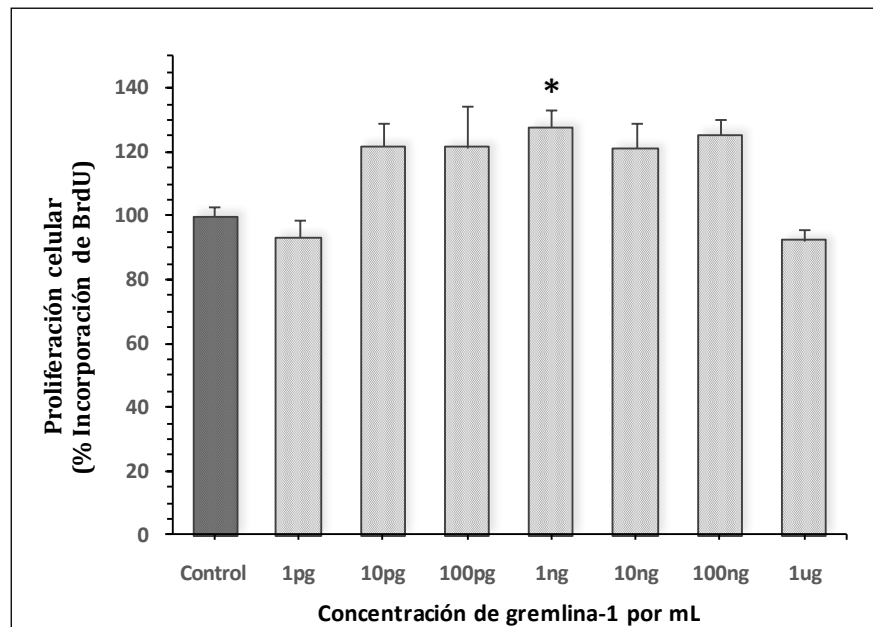
En cuanto a la viabilidad de las NPCsAH, el efecto que ejerce la proteína gremlina-1 en presencia o ausencia de los factores de proliferación es negativo y obedece a una relación concentración-respuesta; sin embargo, las concentraciones menores a 100pg/mL no impactan (Figura 12 y 13) la viabilidad de forma significativa.

## Efecto en la proliferación celular después del tratamiento con gremlina-1 en las NPCsAH

### *Proliferación celular por la incorporación de BrdU*

Para conocer si la proteína gremlina-1 modifica la capacidad de proliferación en las NPCsAH, se determinó la cantidad de células que incorporaron BrdU después de 24 horas de tratamiento con la proteína y los datos obtenidos fueron comparados en porcentaje.

Las NPCsAH tratadas con gremlina-1 con los factores de proliferación (Figura 14) presentaron un incremento en la incorporación de BrdU a partir de la concentración de 10pg/mL con un aumento del 22% por encima del control. El máximo incremento en este parámetro se presentó con el tratamiento de 1ng/mL que presentó un crecimiento de la población del 28%, siendo este significativo con respecto al control. Sin embargo, en concentraciones mayores (de 10ng a 100ng por mL) la proliferación celular se mantuvo sin aumento considerable con valores del 21 y 25% respectivamente, seguido de una disminución no significativa del 8% comparada con el control después del tratamiento de 1µg/mL.

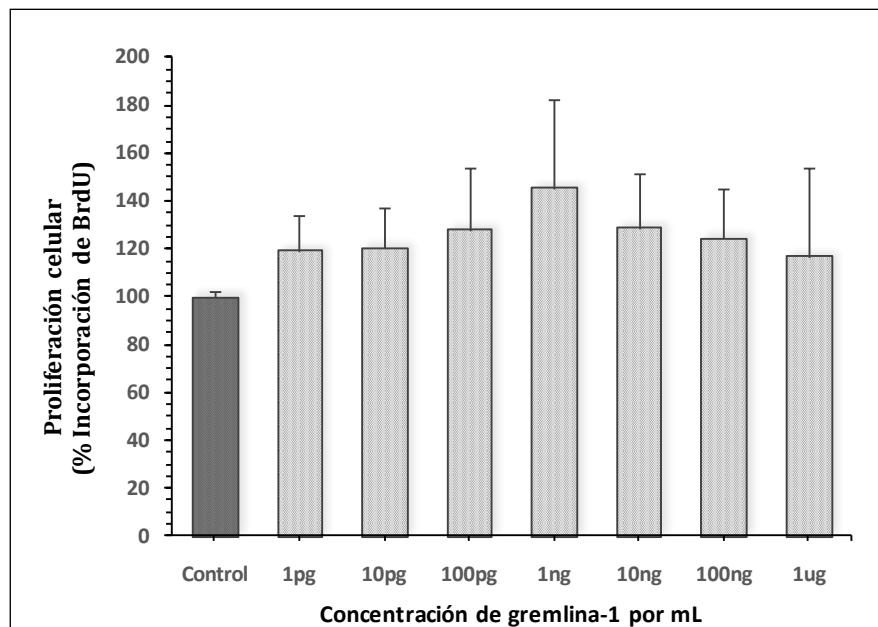


**Figura 14. Proliferación de NPCsAH tratadas con gremlina-1 con factores de proliferación.**

Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos (15,000 de células/cm<sup>2</sup>) por 24 horas para permitir su adherencia, posteriormente fueron tratadas con diferentes concentraciones de gremlina-1 durante 24 horas. En el eje de las ordenadas se muestran las concentraciones utilizadas de la proteína (de 1pg a 1µg por mL) y células sin tratamiento (control); la proliferación celular fue evaluada por la detección de la incorporación de BrdU al DNA y fue expresada en porcentaje en el eje de las abscisas; las barras de error representan el error estándar. El gráfico es representativo de al menos tres ensayos independientes, donde cada condición fue evaluada por cuadruplicado. Significancia prueba de Dunnett (comparación contra el grupo control). \*p= 0.001.

Con la finalidad de conocer si los factores utilizados para mantener la proliferación celular enmascaraban el efecto que pueda tener la proteína gremlina-1 por sí misma, las NPCsAH fueron tratadas en ausencia de los factores de proliferación (Figura 15); lo cual mostró un incremento en el porcentaje de incorporación de BrdU sin ser significativo. A partir de la concentración de 1pg/mL aumentó la proliferación celular 19% por encima del control; el máximo incremento se presentó con el tratamiento 1ng/mL, el cual provocó un crecimiento de

la población del 45%; a partir de 10ng hasta 1µg por mL se encontraron valores del 29 al 19% por encima del control, lo que indica un ligero decremento comparado con el tratamiento de 1ng/mL.



**Figura 15. Proliferación de NPCSAH tratadas con gremlina-1 sin factores de proliferación.**

Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos (15,000 de células/cm<sup>2</sup>) por 24 horas para permitir su adherencia, posteriormente fueron tratadas con diferentes concentraciones de gremlina-1 durante 24 horas. En el eje de las ordenadas se muestran las concentraciones utilizadas de la proteína (de 1pg a 1µg por mL) y células sin tratamiento (control); la proliferación celular fue evaluada por la detección de la incorporación de BrdU al DNA y fue expresada en porcentaje en el eje de las abscisas; las barras de error representan el error estándar. El gráfico es representativo de al menos tres ensayos independientes, donde cada condición fue evaluada por cuadruplicado. Significancia, prueba de Dunnett (comparación contra el grupo control). \*p= 0.050.

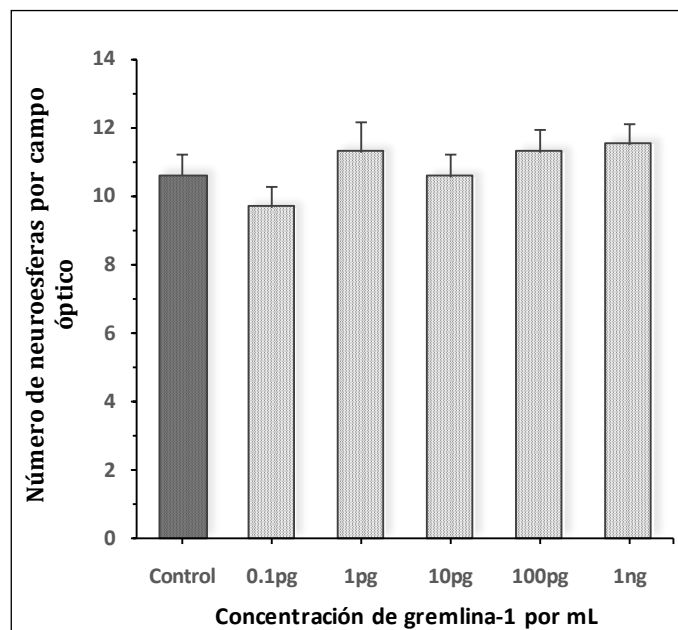
El efecto que promueve la proteína gremlina-1 en la incorporación de BrdU al DNA en las NPCSAH, únicamente se presentó cuando la proteína fue utilizada junto con los factores de proliferación (EGF y FGF-2); lo cual indica que la gremlina-1 está involucrada en el proceso de proliferación celular, pero es necesario utilizar los factores de proliferación durante el tratamiento.

Por otra parte, la disminución del porcentaje de viabilidad celular a partir del tratamiento con gremlina-1 a la concentración de 1ng/mL (Figura 12) y al aumento en la proliferación celular al utilizar 1ng/mL de la proteína (Figura 14), esta concentración se estableció como el tratamiento máximo para ser utilizado en los siguientes experimentos.

## *Proliferación celular en neuroesferas*

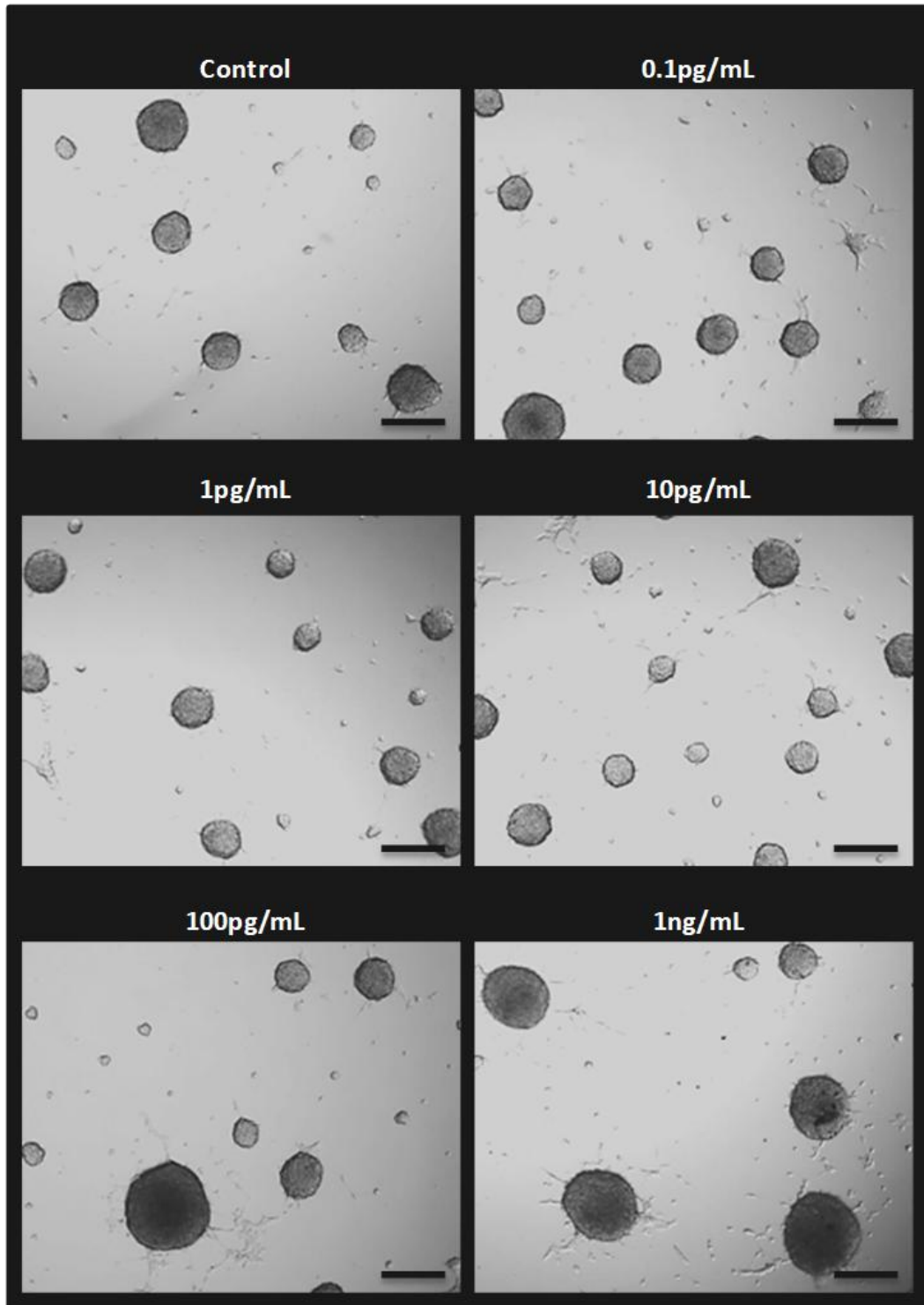
Debido a que los resultados procedentes de la incorporación de BrdU sugieren un efecto positivo sobre la proliferación celular con una concentración de 1ng/mL, se estudió el efecto de la gremlina-1 en el modelo de neuroesferas; para lo cual, se colocó el tratamiento de la proteína en las NPCsAH durante siete días a diferentes concentraciones y a través de fotografías por microscopía óptica, se contabilizó el número de esferas obtenidas y el diámetro de las mismas fue medido para estimar la capacidad clonogénica (auto-renovación) y el efecto en la proliferación celular respectivamente.

En cuanto al número de neuroesferas, se obtuvieron valores similares en todas las concentraciones utilizadas (Figura 16). Las células sin tratamiento (control) presentaron en promedio 11 neuroesferas por campo óptico, mientras que las células tratadas con gremlina-1 presentaron entre 10 y 11 neuroesferas; lo que indica, que la proteína no ejerció un efecto sobre el potencial de las NPCsAH para establecer nuevas colonias celulares después de 7 días de tratamiento.



**Figura 16. Número de neuroesferas de NPCsAH tratadas con gremlina-1.**

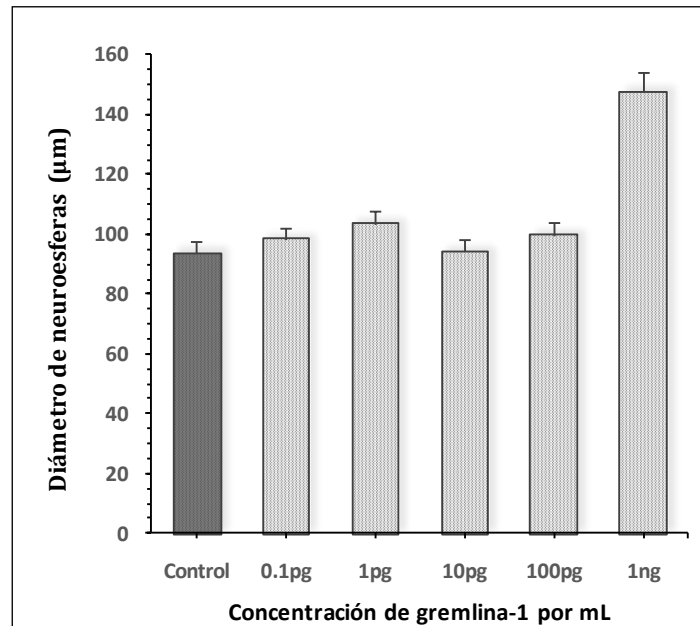
Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos (20,000 células/cm<sup>2</sup>) por 24 horas para permitir la formación de esferas, posteriormente fueron tratadas con gremlina-1 durante 7 días. En el eje de las ordenadas se muestran las concentraciones colocadas de la proteína (de 0.1pg a 1ng por mL) y células sin tratamiento (control); el número de neuroesferas fue cuantificado a partir fotografías de microscopía óptica con el objetivo 4x y expresado en el eje de las abscisas; las barras de error representan el error estándar. El gráfico es representativo de cinco ensayos independientes, donde cada condición fue evaluada por cuadruplicado. Significancia prueba de Dunnett (comparación contra el grupo control). \*p= 0.050.



**Figura 17. Morfología de neuroesferas de NPCSAH después del tratamiento con gremlina-1.** Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos (20,000 células/cm<sup>2</sup>) por 24 horas para permitir la formación de esferas, posteriormente fueron tratadas con gremlina-1 durante 7 días con diferentes concentraciones. Las células fueron fotografiadas en campos al azar con el objetivo de 4x y seleccionadas de tres ensayos independientes, donde cada condición fue evaluada por cuadruplicado. La barra equivale a 300μm.

Al utilizar el diámetro de las neuroesferas como una referencia para observar el efecto en la proliferación celular después de varios días de tratamiento, se encontró que la morfología de las esferas cambia ligeramente con el tratamiento de gremlina-1 (Figura 17). Bajo el tratamiento con gremlina-1, las esferas ligeramente adheridas al fondo del plato de cultivo presentaron bordes redondeados y bien definidos, algunas células ubicadas en la periferia de las neuroesferas exhibieron morfología fusiforme y las neuroesferas de mayor tamaño se observaron más oscuras debido a la gran cantidad de células que las conforman.

El análisis del diámetro de neuroesferas cultivadas con diferentes concentraciones de gremlina-1 durante 7 días, reveló un incremento significativo al utilizar la concentración de 1ng/mL; ya que se obtuvo un valor promedio de 148 $\mu$ m de diámetro por esfera, lo que representa 54 $\mu$ m más que el control con un valor de 94 $\mu$ m de diámetro (Figura 18). Este efecto sugiere que la concentración de 1ng/mL causa un cambio positivo en la proliferación celular en el modelo de neuroesferas.



**Figura 18. Diámetro de neuroesferas de NPCSAH tratadas con gremlina-1.**

Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos (20,000 células/cm<sup>2</sup>) por 24 horas para permitir la formación de esferas, posteriormente fueron tratadas con gremlina-1 durante 7 días. En el eje de las ordenadas se muestran las concentraciones colocadas de la proteína (de 0.1pg a 1ng por mL) y células sin tratamiento (control); el diámetro de las neuroesferas fue calculado a partir de fotografías de microscopía óptica con el objetivo 4x y expresado en micrómetros en el eje de las abscisas; las barras de error representan el error estándar. El gráfico es representativo de cinco ensayos independientes, donde cada condición fue evaluada por cuadruplicado. Significancia, prueba de Dunnett (comparación contra el grupo control). \*p= 0.001.



En cuanto al modelo de neuroesferas, no se encontraron cambios en la capacidad clonogénica después del tratamiento con la proteína gremlina-1. Sin embargo, se observó un efecto positivo en la proliferación celular con la concentración de 1ng/mL; este tratamiento, incrementa el diámetro de las neuroesferas (Figura 18) y aumenta la incorporación de BrdU en las células adherentes (Figura 14).

## Efecto en la diferenciación de las NPCsAH a neuronas o glía después del tratamiento con gremlina-1

El compromiso de diferenciación celular hacia un destino neuronal o glial a partir de las neuroesferas formadas con las NPCsAH durante siete días en presencia o ausencia de la proteína gremlina-1, fue evaluado como parte del proceso neurogénico después de inducir diferenciación celular durante siete días. Para lo cual, se identificaron proteínas que caracterizan a cada tipo celular, GFAP para las células gliales y MAP2 para las células neuronales (Figuras 19, 20 y 21). Los datos obtenidos fueron comparados con respecto al número total de células y se mostró en porcentaje.

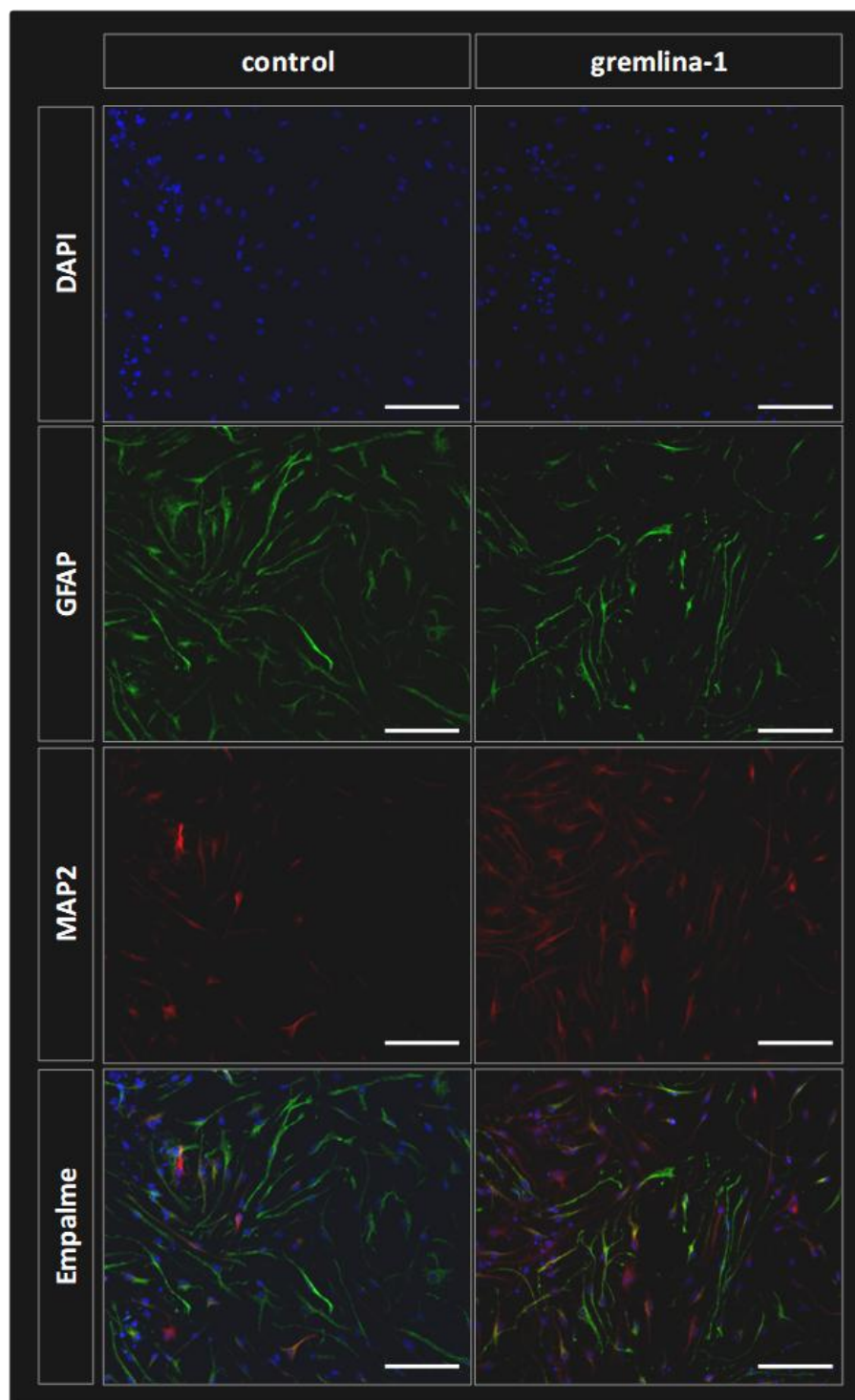
La proporción de células diferenciadas (Figura 19) muestra una mayor cantidad de células neurales después del tratamiento con gremlina-1 comparado con las células sin tratamiento. La morfología que se observa es característica de las células diferenciadas en cultivo, en donde se aprecian células gliales (GFAP positivas, mostradas en color verde) con al menos dos prolongaciones alargadas de distintas longitudes que pueden o no ramificarse; mientras que las células neuronales (MAP2 positivas, mostradas en color rojo) tienen procesos neuríticos más cortos y en menor cantidad con respecto a las células gliales.

### *Diferenciación glial*

La expresión de la proteína GFAP (Figura 20) mostró un cambio significativo en todos los cultivos tratados con gremlina-1, con respecto a las células sin tratamiento. En los cultivos control, se descubrió que el 96% de células son GFAP positivas, mientras que las células tratadas con gremlina-1 durante la fase de proliferación generaron del 61 al 59% de células gliales, 36% menos con respecto al control.

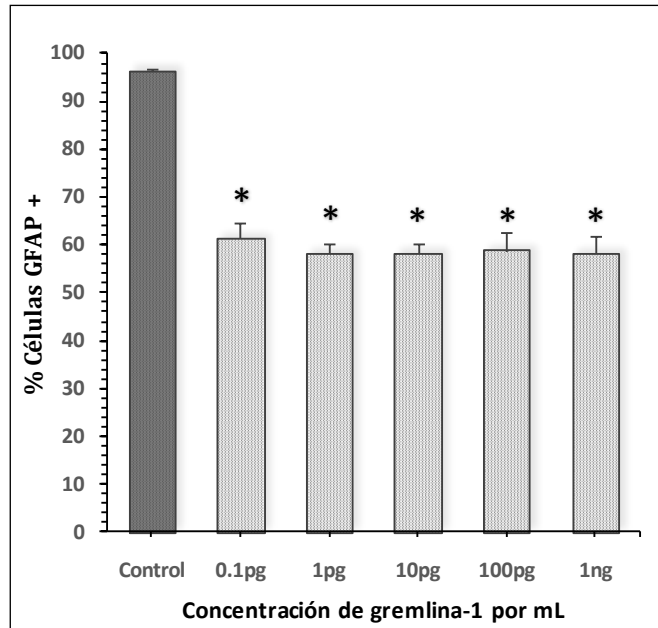
### *Diferenciación neuronal*

En cuanto a la expresión de la proteína MAP2 (Figura 21), se encontró que las células sin tratamiento presentan 3% de diferenciación neuronal; mientras que las células tratadas con gremlina-1 mostraron un incremento significativo que va de 39 a 46%. No obstante, las células precursoras que proliferaron con el tratamiento de la proteína gremlina-1 incrementaron su compromiso de diferenciación hacia un destino neuronal.



**Figura 19. Diferenciación celular a partir de NPCsAH en neuroesferas tratadas con gremlina-1.**

Las células fueron cultivadas en placas de 24 pozos (20,000 células/cm<sup>2</sup>) por 24 horas para permitir la formación de esferas, posteriormente fueron tratadas con gremlina-1 (1ng/mL) durante 7 días en condiciones de proliferación y fueron diferenciadas en ausencia de factores de crecimiento y la proteína gremlina-1. Las células diferenciadas fueron marcadas para GFAP y MAP2 por inmunofluorescencia y fotografiadas con el objetivo de 20x en microscopio de epifluorescencia. Las imágenes son representativas de tres ensayos independientes, donde cada condición fue evaluada por cuadruplicado. La barra equivale a 100µm.



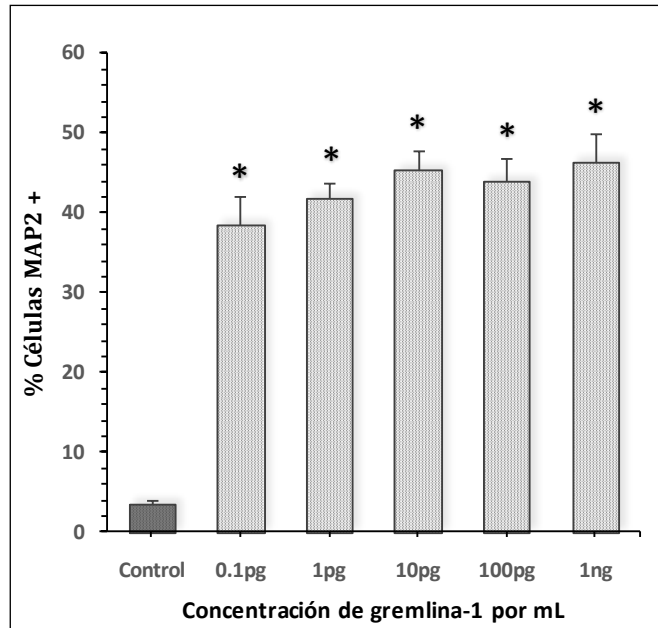
**Figura 20. Diferenciación glial a partir de neuroesferas de NPCsAH tratadas con gremlina-1.**

Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos (20,000 células/cm<sup>2</sup>) por 24 horas para permitir la formación de esferas, posteriormente fueron tratadas con gremlina-1 durante 7 días en condiciones de proliferación y fueron diferenciadas en ausencia de factores de crecimiento y la proteína gremlina-1. En el eje de las ordenadas se muestran las concentraciones utilizadas de gremlina-1 (de 0.1pg a 1ng por mL) y células sin tratamiento (control); la expresión de GFAP fue calculado a partir de microscopía de fluorescencia y expresada en porcentaje en el eje de las abscisas; las barras de error representan el error estándar. El gráfico es representativo de tres ensayos independientes, donde cada condición fue evaluada por cuadruplicado. \*Significancia, prueba de Dunnett (comparación contra el grupo control). \*p≤ 0.001.

El efecto de gremlina-1 sobre el proceso de diferenciación celular en los cultivos expuestos a la proteína durante su proliferación, se expresó con un incremento de células MAP2 positivas, al mismo tiempo que se presentó una disminución de células GFAP positivas de forma complementaria; lo que indica, que esta proteína podría estar involucrada en el compromiso de diferenciación celular.

### Efecto comparativo en la diferenciación de las NPCsAH a neuronas o glía después del tratamiento con gremlina-1 y noggina (antagonistas de la BMPs)

Los resultados anteriores llevan a la propuesta de que la proteína gremlina-1 puede alterar positivamente el proceso neurogénico *in vitro* en las etapas de proliferación y diferenciación neuronal. Por lo cual, en los siguientes resultados se muestra la comparación realizada con otra proteína altamente relacionada a la gremlina-1: noggina, una molécula ampliamente estudiada en el contexto de la neurogénesis como antagonista de BMP4.

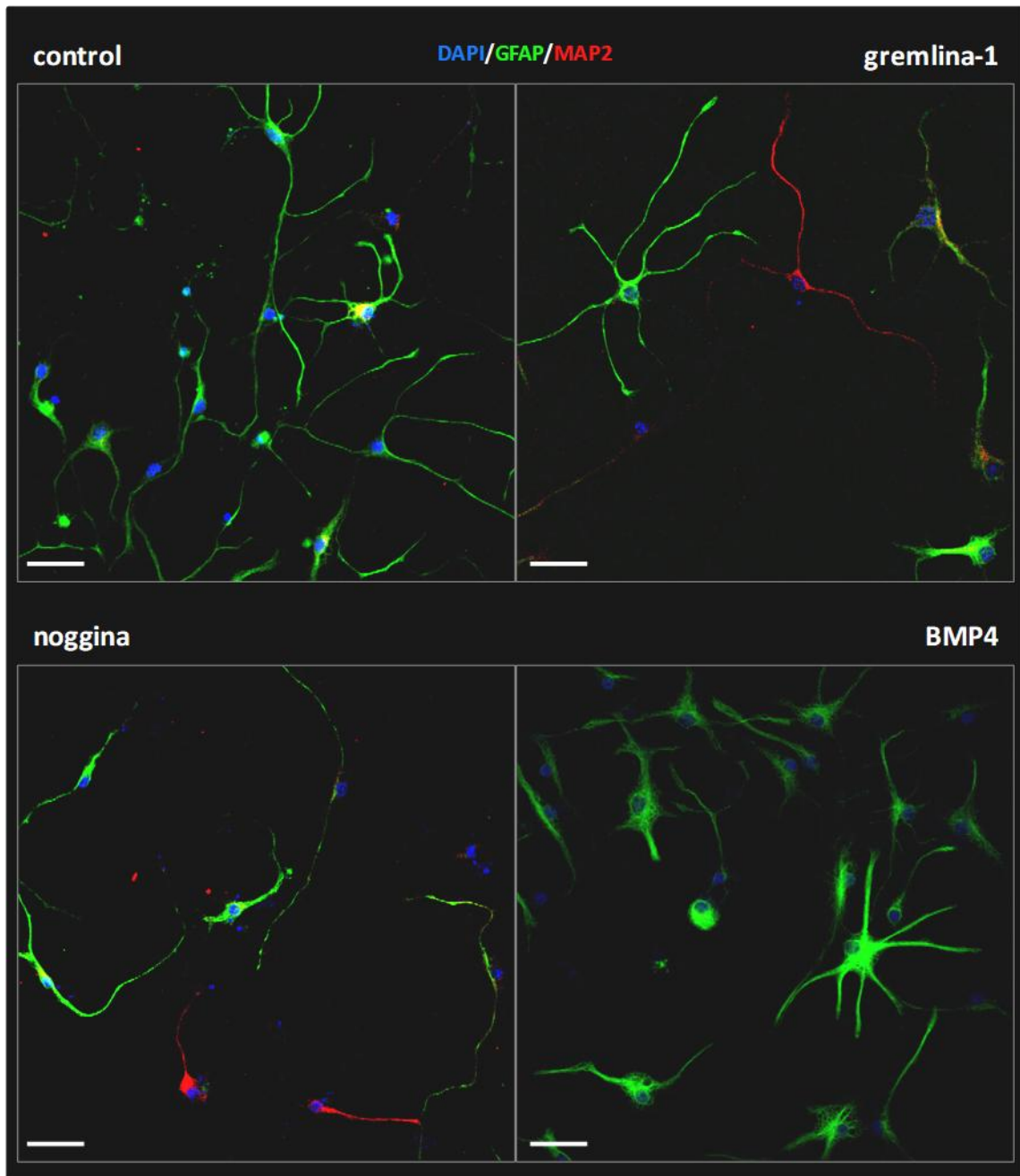


**Figura 21. Diferenciación neuronal a partir de neuroesferas de NPCSAH tratadas con gremlina-1.**

Las células fueron cultivadas en placas de 24 pozos (20,000 células/cm<sup>2</sup>) por 24 horas para permitir la formación de esferas, posteriormente fueron tratadas con gremlina-1 durante 7 días en condiciones de proliferación y fueron diferenciadas en ausencia de factores de crecimiento y la proteína gremlina-1. En el eje de las ordenadas se muestran las concentraciones utilizadas de gremlina-1 (de 0.1pg a 1ng por mL) y células sin tratamiento (control); la expresión de MAP2 fue calculado a partir de microscopía de fluorescencia y expresada en porcentaje en el eje de las abscisas; las barras de error representan el error estándar. El gráfico es representativo de tres ensayos independientes, donde cada condición fue evaluada por cuadruplicado. \*Significancia, prueba de Dunnett (comparación contra el grupo control). \*p≤ 0.001.

El efecto de gremlina-1 (1ng por mL) sobre el compromiso de diferenciación celular, se identificó a través de cambios en las proteínas que indican a que tipo celular pertenecen las células diferenciadas, GFAP para las células gliales, y MAP2 para las células neuronales (Figuras 22, 23 y 24). El efecto de gremlina-1 se comparó con el de noggina (250ng por mL) y BMP4 (50ng por mL).

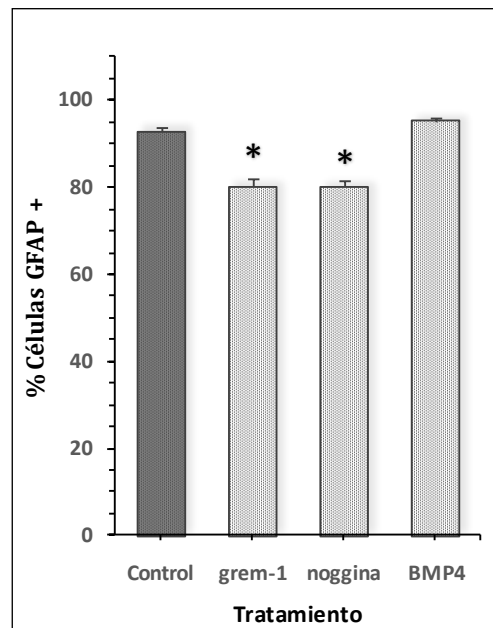
La morfología de las células diferenciadas se muestra en la Figura 22; en donde también se observa la proporción de las células positivas para GFAP (células gliales, en color verde) y las células MAP2 positivas (células neurales, en color rojo). Las células sin tratamiento tienen dos o tres procesos neuríticos con varias ramificaciones heterogéneas y en su mayoría son GFAP positivas; el grupo de células sometidas al tratamiento con gremlina-1 y noggina contienen una mayor cantidad marca para MAP2, tanto las células tratadas con gremlina-1 como las células tratadas con noggina presentan largos procesos neuríticos, aunque en menor cantidad y sin ramificar con respecto a las células control. Por otro lado, el tratamiento con BMP4 favoreció la formación de células con morfología tipo astrocito radial y la mayoría fueron GFAP positivas; estas células presentaron varios procesos neuríticos con varias ramificaciones, de tal manera que se observan ampliamente extendidas.



**Figura 22. Diferenciación celular a partir de NPCSAH en neuroesferas tratadas con gremlina-1, noggina y BMP4.**

Las células fueron cultivadas en placas de 24 pozos (20,000 células/cm<sup>2</sup>) por 24 horas para permitir la formación de esferas, posteriormente fueron tratadas durante 7 días en condiciones de proliferación con gremlina-1 (1ng/mL), noggina (250ng/mL) y BMP4 (50ng/mL). Después, fueron diferenciadas en ausencia de factores de crecimiento y de la proteína gremlina-1, noggina y BMP4. Las células fueron marcadas para GFAP y MAP2 por inmunofluorescencia y fotografiadas con el objetivo de 20x en microscopio de epifluorescencia. Las imágenes son representativas de tres ensayos independientes, donde cada condición fue evaluada por cuadruplicado. La barra equivale a 50µm.

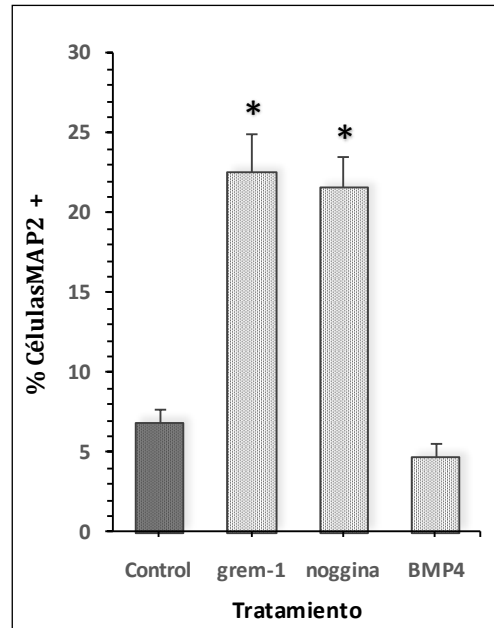
La expresión de la proteína GFAP (Figura 23) disminuyó significativamente en todos los cultivos tratados con gremlina-1 y noggina, mientras que el tratamiento con BMP4 no produjo algún cambio en la expresión de de la marca GFAP con respecto a las células sin tratamiento (control). Para el grupo control y las células tratadas con BMP4 se observó 93 y 95% de células diferenciadas respectivamente; mientras que las células tratadas con gremlina-1 y noggina representaron el 80% de diferenciación glial; lo que indica, una disminución del 13% con respecto al control, sin ser estadísticamente diferentes entre ellas.



**Figura 23. Diferenciación glial a partir de neuroesferas de NPCSAH tratadas con gremlina-1, noggina y BMP4.**

Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos (20,000 células/cm<sup>2</sup>) por 24 horas para permitir la formación de esferas; posteriormente fueron tratadas en tres pulsos durante 7 días en condiciones de proliferación con gremlina-1 (1ng/mL), noggina (250ng/mL) y BMP4 (50ng/mL). Después, fueron diferenciadas en ausencia de factores de crecimiento y las proteínas gremlina-1, noggina y BMP4. En el eje de las ordenadas se muestran los tratamientos utilizados. La expresión de GFAP fue calculada a partir de microscopía de fluorescencia y expresada en porcentaje en el eje de las abscisas; las barras de error representan el error estándar. El gráfico es representativo de tres ensayos independientes, donde cada condición fue evaluada por cuadruplicado. \*Significancia, prueba de Dunnett (comparación contra el grupo control). \*p≤ 0.001.

Con respecto a la expresión de MAP2 (Figura 24), se descubrió que las células sin tratamiento presentaron 7% de diferenciación neuronal; mientras que las células tratadas con gremlina-1 y noggina tuvieron un incremento significativo del 22% de diferenciación celular, lo que representa un incremento de 15% por encima del control. Con respecto al tratamiento con BMP4, la cantidad de neuronas se encontró ligeramente disminuida, 2% por debajo del control.



**Figura 24. Diferenciación neuronal a partir de neuroesferas de NPCSAH tratadas con gremlina-1, noggina y BMP4.**

Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos (20,000 células/cm<sup>2</sup>) por 24 horas para permitir la formación de esferas, posteriormente fueron tratadas en tres pulsos durante 7 días en condiciones de proliferación con gremlina-1 (1ng/mL), noggina (250ng/mL) y BMP4 (50ng/mL). Después, fueron diferenciadas en ausencia de factores de crecimiento y de las proteínas gremlina-1, noggina y BMP4. En el eje de las ordenadas se muestran los tratamientos utilizados. La expresión de MAP2 fue calculada a partir de microscopía de fluorescencia y expresada en porcentaje en el eje de las abscisas; las barras de error representan el error estándar. El gráfico es representativo de tres ensayos independientes, donde cada condición fue evaluada por cuadruplicado. \*Significancia, prueba de Dunnett (comparación contra el grupo control). \*p≤ 0.001.

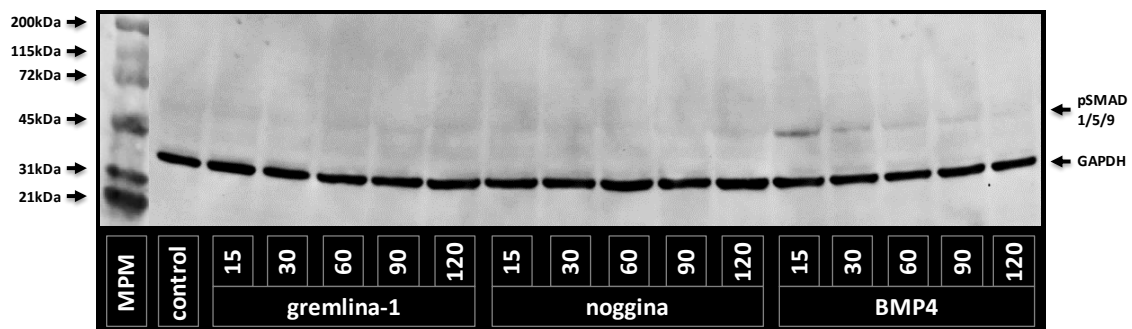
La diferenciación celular de los cultivos expuestos al tratamiento con gremlina-1 y noggina mostró un incremento considerable de células MAP2 positivas; de forma complementaria, se observó una disminución de células GFAP positivas; lo que indica, que los dos antagonistas (gremlina-1 y noggina) podrían tener una función similar para incrementar en compromiso de diferenciación neuronal; por otra parte, el tratamiento con BMP4 generó un aumento discreto en la formación de glía, además de favorecer la morfología tipo astrocito radial.

## Determinación de la vía de señalización intracelular que participa en el proceso neurogénico de las NPCSAH tratadas con la proteína gremlina-1.

### *Efecto de la proteína gremlina-1 en la vía canónica de las BMPs a través de los niveles de proteínas Smad1/5/9 en su estado fosforilado comparado con noggina y BMP-4*

En la vía de señalización de las BMPs y sus antagonistas (Figura 3) se muestra que a través de las proteínas Smad es regulada la quiescencia celular y diferenciación glial. No obstante, se evaluaron los niveles de expresión de las proteínas fosforiladas Smad 1/5/9 después del tratamiento con gremlina-1, noggina y BMP4, a diferentes tiempos.

Se observó que los niveles de Smad1/5/9 se encuentran en mayor cantidad en los lisados celulares derivados del tratamiento con BMP4 siendo mayor a partir de 15 minutos de incubación, seguido de una ligera disminución a tiempos mayores hasta ser similar al control entre 90 y 120 minutos (Figura 25).

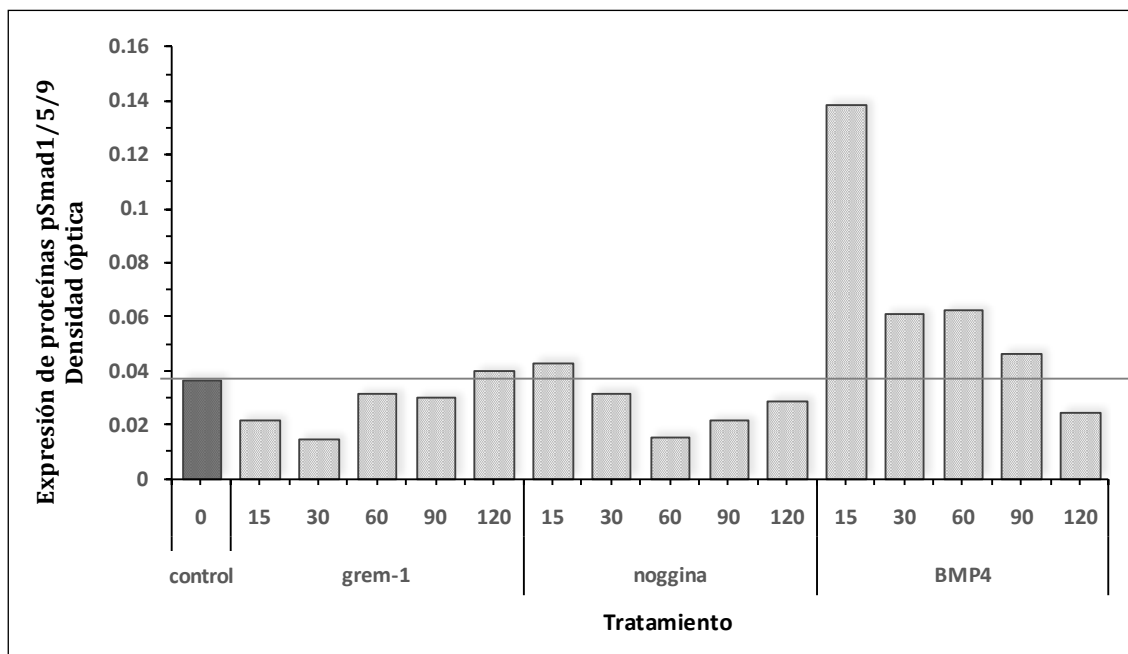


**Figura 25. Análisis de los lisados por *Western blot* para las proteínas pSmad1/5/9 a partir de lisados celulares de NPCSAH en neuroesferas después del tratamiento con gremlina-1, noggina y BMP4 en diferentes intervalos de tiempo.**

Las células fueron cultivadas en platos de cultivo de 35mm (10,000 células/cm<sup>2</sup>) permitiendo la formación y crecimiento de esferas, posteriormente fueron tratadas con gremlina-1 (1ng/mL), noggina (250ng/mL) y BMP4 (50ng/mL). Posteriormente, las células fueron lisadas después de 15, 30, 60, 90 ó 120 minutos y procesadas para la obtención de bandas específicas por *Western blot* y quimioluminiscencia. Las fotografías fueron seleccionadas de tres ensayos independientes, donde cada condición fue evaluada por duplicado.



En cuanto a la cantidad relativa de proteína activa (Figura 26), se confirmó la presencia de niveles más altos de las proteínas Smad fosforiladas después del tratamiento con BMP4; concretamente, se obtuvo una mayor densidad óptica en la banda correspondiente a los 15 minutos posteriores a la adición del ligando, donde se observó 3.7 veces la cantidad de proteína activa con respecto a las células no tratadas. Por otra parte, el tratamiento con los antagonistas gremlina-1 y noggina, produjo un ligero descenso en la densidad óptica de las bandas a los 30 y 60 minutos después del tratamiento respectivamente; lo que indica que las proteínas antagonistas gremlina-1 y noggina no activan a las proteínas Smad en comparación al efecto que produce la proteína BMP4.

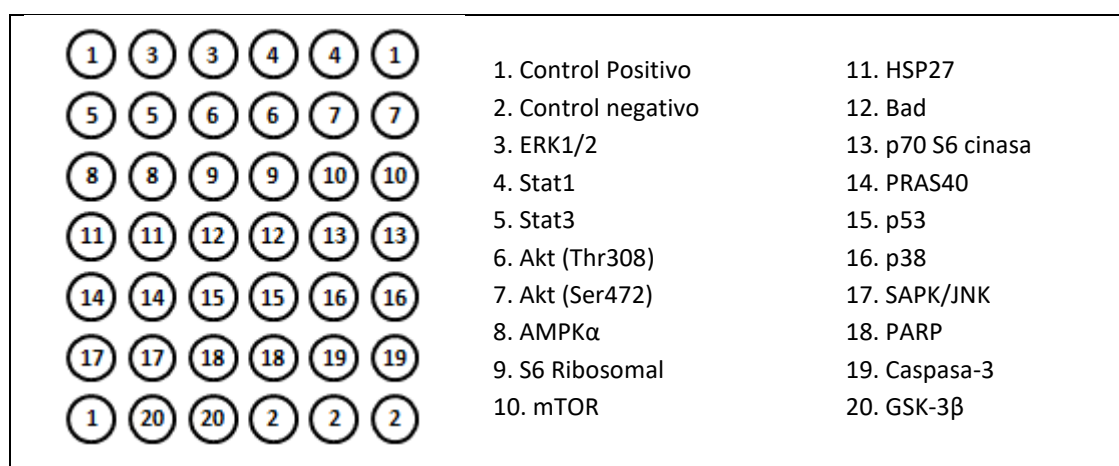


**Figura 26. Niveles de expresión de las proteínas pSmad1/5/9 después del tratamiento con gremlina-1, noggina y BMP4 en diferentes intervalos de tiempo.**

Las células fueron cultivadas en platos de cultivo de 35mm (10,000 células/cm<sup>2</sup>) permitiendo la formación y crecimiento de esferas, posteriormente fueron tratadas con gremlina-1 (1ng/mL), noggina (250ng/mL) y BMP4 (50ng/mL). Posteriormente, las células fueron lisadas después de 15, 30, 60, 90 ó 120 minutos y procesadas para la obtención de bandas específicas por *Western blot* y quimioluminiscencia. La expresión relativa de proteínas fue calculada a partir de fotografías con el programa ImageLab representada en unidades relativas en el eje de las abscisas. El gráfico es representativo de tres ensayos independientes, donde cada condición fue evaluada por duplicado.

## *Efecto de la proteína gremlina-1 en algunas vías no canónicas de las BMPs a través de los niveles de diversas proteínas en su estado activo comparado con noggina y BMP4*

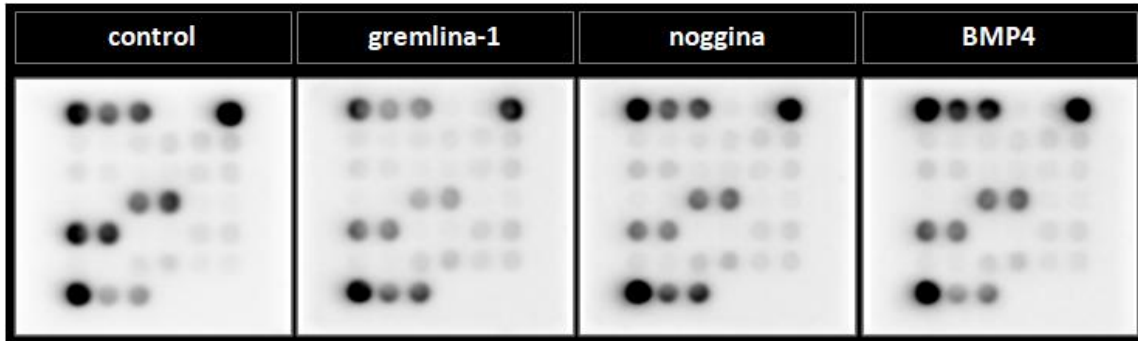
Como una exploración para conocer la vía de señalización por la cual ejerce su función la proteína gremlina-1 durante el proceso neurogénico, se utilizaron arreglos de anticuerpos para identificar 18 proteínas que regulan diversas respuestas fisiológicas. Los “spots” identificados a partir de lisados celulares se organizan como se muestra en la Figura 27. Los cambios relativos en la expresión de las proteínas activas se cuantificaron por densidad óptica; estos resultados fueron comparados contra los obtenidos en las células no tratadas (Figura 28 y tabla 1).



**Figura 27. Distribución de los spots de acuerdo con protocolo del fabricante**  
*PathScan® Intracellular Signaling Array Kit (Chemiluminescent Readout), Cell Signalling.*

Al comparar la cantidad relativa de cada proteína con respecto al control (Figura 28 y tabla 1), se encontraron cambios significativos en la expresión relativa de 12 proteínas después del tratamiento con gremlina-1, noggina y BMP4, los cuales se muestran en la tabla 1 con sombreado verde. Sin embargo, solo dos proteínas presentan cambios en su cantidad relativa después del tratamiento con los antagonistas gremlina-1 y noggina sin afectarse después del tratamiento con BMP-4: la caspasa-3 y GSK-3 $\beta$ <sup>52</sup> (Tabla 1, sombreado en azul y Figura 29); no obstante, la caspasa-3 y GSK-3 $\beta$  podrían estar involucradas en la vía de señalización por la que los antagonistas ejercen su acción.

<sup>52</sup> Por su abreviatura en inglés, *glycogen synthase kinase-3 $\beta$* .



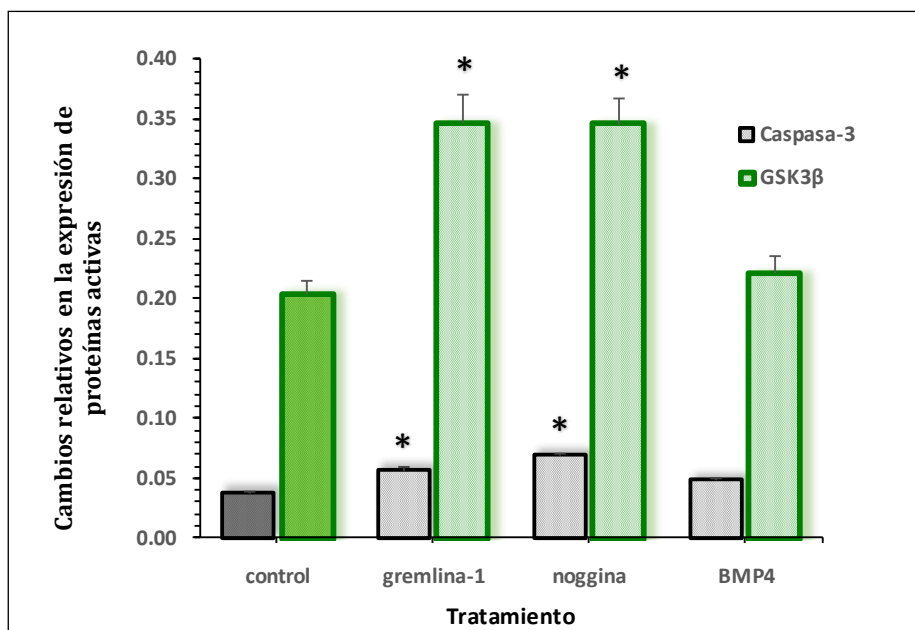
**Figura 28. Arreglos de proteínas a partir de lisados celulares de NPCSAH en neuroesferas después del tratamiento con gremlina-1, noggina y BMP4.**

Las células fueron cultivadas en platos de cultivo de 35mm (10,000 células/cm<sup>2</sup>) por 24 horas para permitir la formación de esferas, posteriormente fueron tratadas durante 7 días en condiciones de proliferación con gremlina-1 (1ng/mL), noggina (250ng/mL) y BMP4 (50ng/mL). Posteriormente, las células fueron lisadas y procesadas de acuerdo con las especificaciones del fabricante del kit y los spots fueron detectados con la técnica de quimioluminiscencia. Las fotografías fueron seleccionadas de tres ensayos independientes, donde cada condición fue evaluada por duplicado y la cantidad relativa de proteína se determinó con el programa ImageLab.

**Tabla 1. Cantidad relativa de proteínas de señalización intracelular.**

Proteína	Tratamiento			
	control	gremlina-1	noggina	BMP4
3 ERK ½	0.463 ± 0.020	0.459 ± 0.018	<b>0.321 ± 0.037*</b>	<b>0.569 ± 0.004*</b>
4 Stat1	0.002 ± 0.001	0.010 ± 0.002	<b>0.010 ± 0.002*</b>	<b>0.015 ± 0.002*</b>
5 Stat3	0.008 ± 0.002	0.015 ± 0.002	<b>0.026 ± 0.002*</b>	<b>0.025 ± 0.003*</b>
6 Akt (Thr308)	0.055 ± 0.001	0.061 ± 0.003	0.047 ± 0.002	<b>0.036 ± 0.008***</b>
7 Akt (Ser473)	0.039 ± 0.007	0.049 ± 0.005	0.028 ± 0.005	<b>0.080 ± 0.005*</b>
8 AMPKα	0.058 ± 0.011	0.106 ± 0.011	0.091 ± 0.004	0.112 ± 0.005
9 S6 Ribosomal	0.029 ± 0.004	0.018 ± 0.000	0.022 ± 0.001	<b>0.051 ± 0.005*</b>
10 mTOR	0.064 ± 0.003	0.085 ± 0.005	0.066 ± 0.006	0.069 ± 0.007
11 HSP27	0.001 ± 0.001	0.001 ± 0.001	<b>0.025 ± 0.001*</b>	0.001 ± 0.001
12 Bad	0.329 ± 0.011	0.317 ± 0.007	0.359 ± 0.012	0.359 ± 0.010
13 p70 S6 Kinase	0.012 ± 0.002	0.012 ± 0.003	<b>0.026 ± 0.004****</b>	0.013 ± 0.004
14 PRAS40	0.400 ± 0.019	0.444 ± 0.015	<b>0.343 ± 0.014**</b>	0.360 ± 0.002
15 p53	0.005 ± 0.002	0.003 ± 0.002	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
16 p38	0.080 ± 0.002	<b>0.155 ± 0.003*</b>	0.091 ± 0.001	<b>0.141 ± 0.008*</b>
17 SAP/JNK	0.001 ± 0.001	0.009 ± 0.001	0.021 ± 0.000	0.011 ± 0.002
18 PARP	0.093 ± 0.006	0.099 ± 0.007	0.101 ± 0.007	0.077 ± 0.002
19 Caspase-3	0.037 ± 0.002	<b>0.057 ± 0.004*</b>	<b>0.069 ± 0.003*</b>	0.048 ± 0.002
20 GSK-3β	0.205 ± 0.010	<b>0.347 ± 0.025*</b>	<b>0.346 ± 0.021*</b>	0.222 ± 0.015

Significancia, prueba de Dunnett (comparación contra el grupo control). \*p≤ 0.001, \*\*p=0.002, \*\*\*p=0.014, \*\*\*\*p=0.041,



**Figura 29. Detalle de los niveles de expresión de las proteínas afectadas por el tratamiento con BMP4 y sus antagonistas (gremlina-1 y noggina).**

Las células fueron cultivadas en platos de cultivo de 35mm (10,000 células/cm<sup>2</sup>) por 24 horas para permitir la formación de esferas, posteriormente fueron tratadas en tres pulsos durante 7 días en condiciones de proliferación con gremlina-1 (1ng/mL), noggina (250ng/mL) y BMP4 (50ng/mL). Posteriormente, las células fueron lisadas y procesadas de acuerdo a las especificaciones del fabricante del kit y los spots fueron detectados con la técnica de quimioluminiscencia. La expresión relativa de proteínas fue calculada a partir de fotografías con el programa ImageLab representada en unidades relativas en el eje de las abscisas. Las barras de error representan el error estándar. El gráfico es representativo de tres ensayos independientes, donde cada condición fue evaluada por duplicado. \*Significancia, prueba de Dunnett (comparación contra el grupo control). \*p ≤ 0.001.

## Discusión

---

El microambiente neurogénico del giro dentado del hipocampo en el cerebro adulto, está formado por diversos componentes celulares y moleculares que ejercen su efecto para favorecer o afectar la generación de nuevas neuronas, cuya función ha sido involucrada en los procesos de aprendizaje y memoria (Revisado en Kempermann y Ehninger, 2008; Aimone *et al.*, 2011); por lo cual, el conocimiento en la expresión y regulación de proteínas relacionadas con el proceso neurogénico y su posterior manipulación a través de intervenciones específicas, podrían amortiguar los efectos negativos producidos en algunas enfermedades que afectan el aprendizaje y memoria a causa de la deficiencia neurogénica. Al respecto, se ha detectado que el equilibrio molecular entre las BMPs y sus antagonistas resulta crucial para la homeostasis entre la generación del linaje astrogial o neuronal a partir de células precursoras (Bond *et al.*, 2014); sin embargo, han sido poco explorados y se requiere una mejor comprensión de su potencial.

Al investigar la influencia de la auto-estimulación intracraneal relacionada con el mejoramiento cognitivo, Huguet y cols. encontraron una sobreexpresión del gen que codifica para la proteína gremlina-1, un antagonista de BMPs (Huguet *et al.*, 2009), cuyo mensajero (mRNA) se encuentra altamente expresado en el giro dentado del hipocampo del ratón adulto C57BL/6 en condiciones normales (Allen *Brain Atlas*; <http://mouse.brain-map.org/experiment/show?id=69059946>).

Aunque la proteína gremlina-1 ha sido ampliamente estudiada en modelos de desarrollo embrionario (Merino *et al.*, 1999; Bardot *et al.*, 2000; Pereira *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2001; Ohyama *et al.*, 2001; Khokha *et al.*, 2003; Huillard y Marx, 2004; Michos *et al.*, 2004; Zuniga *et al.*, 2004; Nicoli *et al.*, 2005; Frank *et al.*, 2006; Maciel *et al.*, 2007; Canalis *et al.*, 2012; Curran *et al.*, 2012; Suzuki *et al.*, 2012) y en procesos de enfermedad en diversos tejidos adultos (McMahon *et al.*, 2000; Lappin *et al.*, 2002; Wada *et al.*, 2002; Kane *et al.*, 2005; Sneddon *et al.*, 2006; Walsh *et al.*, 2007; Roxburgh *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2012; Mulvihill *et al.*, 2012; Karagiannis *et al.*, 2015), su función en el nicho neurogénico se desconoce; no obstante, la proteína gremlina-1 ejerce su acción como antagonista de las BMPs y se cree que participa en la diferenciación específica del tejido y en la transformación celular (Revisado en Wordinger *et al.*, 2008; Bragdon *et al.*, 2011, Church *et al.*, 2015).

Por lo anterior, en este trabajo se revela el efecto de la proteína gremlina-1 en el proceso neurogénico al utilizar células precursoras aisladas del giro dentado del hipocampo de roedores adultos de la cepa C57BL/6 (NPCsAH).

Durante la evaluación del proceso de neurogénesis adulta en células precursoras del giro dentado del hipocampo, se observó que la utilización de los factores de crecimiento FGF-2 y EGF durante la etapa de proliferación celular son necesarios para investigar el efecto que ejerce la proteína gremlina-1; ya que al comparar las curvas concentración-respuesta de los cultivos

celulares tratados con gremlina-1 en ausencia de los factores de crecimiento, los resultados mostraron mayor variabilidad de datos, la morfología celular se ve afectada y la viabilidad celular disminuye considerablemente con respecto a las células tratadas con los factores de crecimiento; por lo tanto, en ensayos posteriores solo se eliminan los factores de crecimiento al inducir diferenciación celular.

En cuanto a la proliferación celular, la proteína gremlina-1 incrementa la incorporación de BrdU después de 48 horas de tratamiento; sin embargo, el efecto puede ser más eficiente al mantener la presencia del antagonista durante varias generaciones, tal como se muestra durante el desarrollo de neuroesferas. Al respecto, Bonaguidi y cols. muestran que al utilizar la proteína noggina como antagonista de las BMPs durante la proliferación de células precursoras durante varias generaciones, la expansión celular es ampliamente potenciada (Bonaguidi *et al.*, 2008). Lo anterior sugiere, que la exposición a la proteína gremlina-1 incrementa la capacidad proliferativa de las NPCsAH a partir de 48 horas de tratamiento debido a su efecto antagonista sobre las BMPs endógenas, ya que se conoce que las BMPs inhiben la neurogénesis al promover la quiescencia de las células precursoras neurales, en especial BMP4 (Mira *et al.*, 2010; Bond *et al.*, 2014); por lo tanto, prolongar el tiempo de tratamiento garantiza mantener a las células en constante división.

Durante la etapa de diferenciación celular del proceso neurogénico, se pueden obtener células gliales y neuronas maduras en diferente proporción; de tal manera que los cultivos celulares en presencia de EGF y FGF-2 generan predominantemente glía y es necesario agregar otro factor para cambiar la proporción (Bull y Bartlett, 2005), tal como sucede con las células control. Bonaguidi y cols. mostraron que al incrementar la expresión de la proteína BMP4 en cultivos de células precursoras aisladas de ratones transgénicos, la diferenciación glial se compromete y se obtiene más del 90% de células que expresan GFAP y al mismo tiempo presentan cambios morfológicos característicos de células gliales, lo cual es contrarrestado al utilizar a noggina como antagonista (Bonaguidi *et al.*, 2005). No obstante, al utilizar a las proteínas antagonistas de las BMPs endógenas: gremlina-1 y noggina, es posible comprometer a las NPCsAH hacia un linaje neuronal al generar una mayor cantidad de neuronas y reducir la cantidad de células gliales de forma complementaria.

Al comparar el efecto de la proteína gremlina-1 con noggina en nuestro estudio, se observó el efecto esperado; el tratamiento con gremlina-1 y noggina potencian la diferenciación neuronal; sin embargo, es necesario utilizar una mayor concentración de noggina con respecto a gremlina-1; en ambos casos, se promueve una mezcla de formas alargadas bipolares y tripolares con varios procesos neuríticos. La proteína noggina ha sido relacionada con una regulación positiva del proceso neurogénico, ya que el aumento en sus niveles de expresión incrementa el compromiso de diferenciación neuronal (Bonaguidi *et al.*, 2005 y 2008; Gobeske *et al.*, 2009). No obstante, al utilizar BMP4, la diferenciación glial se incrementa y promueve la morfología tipo astrocito (Mira *et al.*, 2010; Bond *et al.*, 2014).

Algunos estímulos ambientales que modifican el proceso neurogénico en el hipocampo adulto, pueden actuar directamente en la señalización de las BMPs y sus antagonistas (Gobeske *et al.*, 2009); por lo tanto, la interacción BMP-antagonista es muy importante para regular la progresión de la neurogénesis y la perturbación de este sistema puede estar relacionado con el deterioro cognitivo. Al respecto, las moléculas que han sido ampliamente exploradas como reguladores del proceso neurogénico adulto, tanto *in vivo* como *in vitro* son BMP4 y noggina (Lim *et al.*, 2000; Bonaguidi *et al.*, 2005; Mikawa *et al.*, 2006; Bragdon *et al.*, 2011; Mikawa y Sato, 2011; Meyers *et al.*, 2016), cuya vía de señalización mejor explorada es la vía canónica de las BMPs.

Al explorar el efecto de la proteína gremlina-1 en la vía de señalización canónica de las BMPs a través de los niveles de las proteínas Smad 1/5/9 en su estado fosforilado, se encontró que al adicionar el tratamiento de BMP4 las proteínas Smad fosforiladas (pSmad) aumentan su expresión; lo cual indica que el BMP4 ejerce su acción a través de la vía canónica de las Smad (Heldin *et al.*, 1997) potenciando la actividad de las BMPs endógenas. Por otra parte, los antagonistas (gremlina-1 y noggina) disminuyen los niveles de las pSmad, probablemente inhibiendo la actividad de las BMPs endógenas por unión directa a las BMPs. Al respecto, Bond y cols. reportaron que el incremento de los niveles de BMP4 corresponde a un aumento de los niveles de pSmad1/5/8, mientras que niveles más elevados de noggina reducen considerablemente la cantidad de pSmad1/5/8 (Bond *et al.*, 2014); lo que indica que la proteína gremlina-1 ejerce su efecto de forma similar a noggina al reducir los niveles de pSmad1/5/9.

Al determinar la vía de señalización a través de la cual la proteína gremlina-1 altera el proceso neurogénico en las NPCsAH comparada con noggina y BMP4, se encontró que la actividad de la proteína GSK-3 $\beta$  incrementa significativamente en las células tratadas con las proteínas antagonistas gremlina-1 y noggina, mientras que en las células expuestas al BMP4 no hubo cambio en la activación de GSK-3 $\beta$ ; lo cual puede afectar los cultivos celulares positiva o negativamente. En cuanto a los efectos negativos ejercidos por la proteína GSK-3 $\beta$ , Eom y cols. (2007) reportaron que en los cultivos de células precursoras aisladas del hipocampo expuestas a estrés genotóxico o al retirar los factores tróficos del medio de cultivo, se promueve la apoptosis a través de la proteína GSK-3 $\beta$  regulada por bax y caspasa-3 (Eom *et al.*, 2007); lo que indica que la proteína GSK-3 $\beta$  podría estar relacionada con la pérdida de la actividad mitocondrial (viabilidad celular) al utilizar concentraciones altas de gremlina-1 y al retirar los factores de crecimiento FGF-2 y EGF, que a su vez promueve el aumento en la activación de caspasa-3. Por otra parte, GSK-3 $\beta$  también puede afectar la neurogénesis positivamente, ya que se ha encontrado que la expresión del mensajero comienza en las NPCs del giro dentado del hipocampo e incrementa considerablemente en las células DCX positivas y permanece durante la vida de las neuronas (células positivas a NeuN), lo que indica que su expresión es importante durante la fase de diferenciación, maduración neuronal e integración a los circuitos neuronales ya existentes (Fuster-Matanzo *et al.*, 2013). No obstante, los efectos que puede provocar la proteína gremlina-1 en relación con incremento de GSK-3 $\beta$  aún no es claro, ya que su efecto puede depender del contexto y del estímulo que desencadene su activación sin

descartar el resultado del microambiente. Sin embargo, los resultados del presente trabajo podrían sugerir que la gremlina-1 puede favorecer la generación de neuronas *in vitro* a través de la activación de GSK-3 $\beta$ , hecho que requiere ser confirmado con el uso de inhibidores específicos de esa vía de señalización.

GSK-3 es una enzima serina/treonina-cinasa presente en dos isoformas (alfa y beta) con múltiples funciones biológicas. Se localiza en el citoplasma, el núcleo y/o la mitocondria donde fosforila diversas proteínas generalmente pefosforiladas y su actividad está fuertemente regulada positiva o negativamente (Medina y Wandosell, 2011). Cabe destacar que esta proteína está implicada en la regulación de la vía de señalización canónica de las BMPs cuyos sustratos intermediarios son las proteínas Smad reguladas por receptor (Fuentealba *et al.*, 2007); esta vía de señalización es esencial para la poliubiquitinación y la degradación por el proteosoma (Heldin y Moustakas, 2012) y puede ser regulada por la interacción BMP-antagonista (revisado en Brazil *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014); por lo cual, la proteína GSK-3 $\beta$  podría estar directamente relacionada con el decremento de los niveles de expresión de pSmad1/5/9 después del tratamiento con los antagonistas de BMPs usados en el presente estudio, gremlina-1 y noggina.

De acuerdo a los datos obtenidos, la proteína gremlina-1 puede ejercer su acción a diferentes niveles durante la neurogénesis adulta al promover la proliferación celular y diferenciación neuronal a través de la inhibición de las proteínas Smad de la vía de señalización canónica de las BMPs y la activación de la proteína GSK-3 $\beta$ ; por lo cual, se propone una vía de señalización que involucra la actividad de la proteína gremlina-1 en las células precursoras neurales del hipocampo adulto (Figura 29).

Las BMPs endógenas comienzan su actividad de señalización a través del receptor que activa la vía canónica de señalización y fosforila a las proteínas Smad1/5/9; después, el complejo Smad1/5/9 fosforilado (pSmad1/5/6) activa a Smad4 y se forman complejos oligoméricos que se translocan al núcleo (Heldin y Moustakas, 2012; Zhang *et al.*, 2015); esta señal regula la proliferación celular y genera una mayor proporción de células gliales con respecto a las células neurales. Al respecto, se ha observado que la sobreexpresión de BMP4 incrementa la densidad de astrocitos, mientras que la proliferación celular de las NPCs es reducida al inducir quiescencia celular (Gomes *et al.*, 2003; Bonaguidi *et al.*, 2005; Yousef *et al.*, 2015; Meyers *et al.*, 2016).

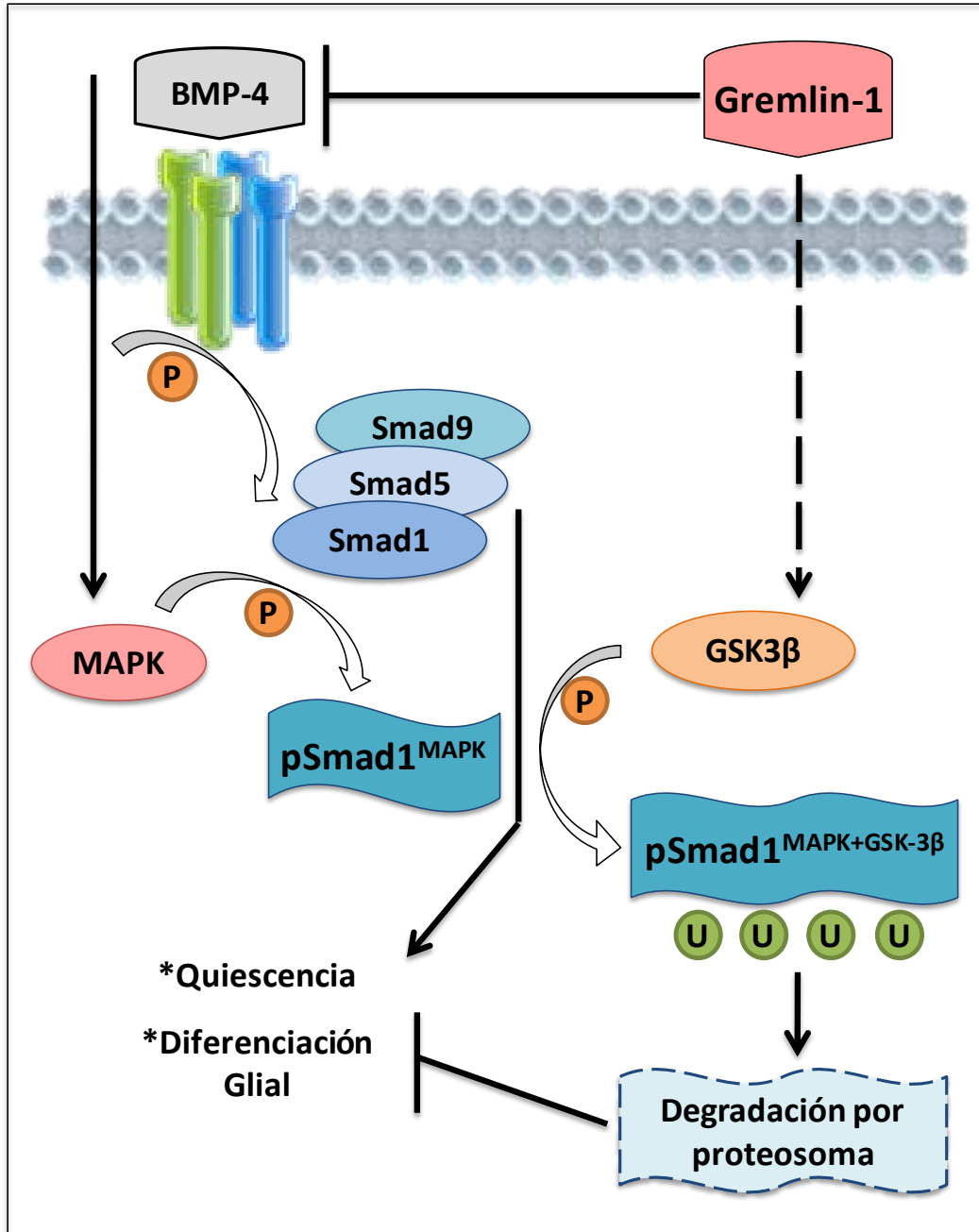
Por otra parte, la proteína gremlina-1 se une por afinidad a las BMPs endógenas e impide la señalización de la vía canónica al bloquear directamente la función fisiológica de las BMPs, lo cual coincide con lo que ocurre al utilizar a la proteína noggina como tratamiento (Bonaguidi *et al.*, 2008; Bond *et al.*, 2014; Church *et al.*, 2015). Simultáneamente, los niveles de GSK-3 $\beta$  en su forma activa aumentan por un mecanismo aún desconocido y la actividad de las proteínas Smad puede ser reprimida a través de un mecanismo similar al reportado por Fuentealba y cols., el cual indica, que la proteína Smad1 previamente fosforilada por las BMPs (pSmad1) es translocada al núcleo y sufre una segunda fosforilación mediada por las enzimas MAPK



(pSmad1<sup>MAPK</sup>); posteriormente, GSK-3 $\beta$  en su estado activo reconoce la “pre-fosforilación” y genera una tercera fosforilación de Smad1 (pSmad1<sup>MAPK+GSK-3 $\beta$</sup> ); la triple fosforilación provoca que sea transportada hacia el centrosoma, desencadene su poliubiquitinación y finalmente sea degradada por el proteosoma (Fuentealba *et al.*, 2007), lo que evita el efecto provocado por las BMPs.

Es probable que el destino que sufre Smad1 al ser degradada, también lo sea para otras proteínas Smad; sin embargo, es necesario realizar más estudios acerca de las vías de señalización canónica y no canónicas de las BMPs, así como el efecto del antagonista gremlina-1 y su papel en la regulación de la neurogénesis en el hipocampo del cerebro adulto.

Si bien es cierto que los resultados sugieren que la gremlina-1 favorece la diferenciación neuronal en un sistema controlado *in vitro*, es necesario realizar estudios adicionales en los que se administre gremlina-1 en un sistema *in vivo* para confirmar los hallazgos y descartar si esta proteína afecta a otras poblaciones celulares que participan en la generación de neuronas y que están contenidas en el microambiente del hipocampo.



**Figura 30. Propuesta de la vía de señalización de la proteína gremlina-1 como antagonista de las BMPs y su posible implicación en la neurogénesis adulta.**

Después de la activación de los receptores tipo I y II de las BMPs (RBMPs) por BMP4, se inicia la cascada de señalización por la vía canónica o no-canónica. La vía canónica permite la fosforilación de las proteínas Smad1, Smad5 y Smad9 para formar complejos que se translocan al núcleo, las células entran en quiescencia y se promueve la diferenciación astrogliar. Por otra parte, la proteína gremlina-1 impide la activación de los RBMPs por unión directa a las BMPs endógenas (BMP4) y al mismo tiempo induce (por un mecanismo aún desconocido) la activación de GSK-3β; a través de una vía de señalización no-canónica, pSmad1 es fosforilada por segunda ocasión por la enzima MAPK (pSmad1<sup>MAPK</sup>) y los niveles elevados de activación de GSK-3β inducen una tercera fosforilación (pSmad1<sup>MAPK+GSK-3β</sup>) que promueve la poliubiquitinación y degradación de Smad1 por el proteosoma, lo que permite la proliferación celular y la diferenciación neuronal.

## Conclusiones

---

La proteína gremlina-1 a la concentración de 1ng/mL, favorece el proceso neurogénico en células precursoras aisladas del giro dentado del hipocampo de roedores adultos de la cepa C57BL/6 (NPCsAH), al promover la proliferación celular y diferenciación neuronal a través de un mecanismo que puede involucrar la inhibición de las proteínas Smad de la vía de señalización canónica de las BMPs y la activación de la proteína GSK-3 $\beta$ .

## Literatura citada

---

- Abrous, D., Adriani, W., Montaron, M., Aourousseau, C., Rougon, G., Le Moal, M., Piazza, P. (2002). Nicotine self-administration impairs hippocampal plasticity. *Journal Neuroscience*, 22(9): 3656-3662.
- Aimone, J., Deng, W., Gage, F. (2011). Resolving new memories: a critical look at the dentate gyrus, adult neurogenesis, and pattern separation. *Neuron*, 70 (4): 589-596.
- Aimone, L., Li, Y., Lee, S., Clemenson, G., Deng, W., Gage F. (2014). Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition. *Physiological Reviews*, 94 (4): 991-1026.
- Álvarez-Buylla, A., Lim, D. (2004). For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron*, 41 (15): 683-686.
- Allen Brain Atlas; (2006). Expresión de la proteína gremlina-1 en corte sagital en C57BL/6J: <http://mouse.brain-map.org/experiment/show?id=69059946>. Obtenida el 24 de Agosto de 2015.
- Arias-Carrión, O., Olivares-Bañuelos, T., Drucker-Colín, R. (2007). Neurogénesis en el cerebro adulto. *Neurología*. 44 (9): 541-550.
- Babu, H., Claasen, J., Kannan, S., Rünker, A., Palmer, T., Kempermann, G. (2011). A protocol for isolation and enriched monolayer cultivation of neural precursor cells from mouse dentate gyrus. *Frontiers in Neuroscience*, 5: 89.
- Bardot, B., Lecoin, L., Huillard, E., Calothy, G., Marx, M. (2000). Expression pattern of the *drm/gremlin* gene during chicken embryonic development. *Mechanisms of Development*, 101 (1-2): 263-265.
- Beck, S., Simmet, T., Müller, I., Lang, F., Gawaz, M. (2016). Gremlin-1 C-Terminus Regulates Function of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF). *Cellular Physiology and Biochemistry*, 38 (2): 801-808.
- Bergmann, O., Spalding, K., Frisen, J. (2015). Adult neurogenesis in humans. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7 (7): a018994.
- Bonaguidi, M., McGuire T., Hu, M., Kan, L., Samanta, J., Kessler, J. (2005). LIF and BMP signaling generate separate and discrete types of GFAP-expressing cells. *Development*, 132 (24): 5503-5514.
- Bonaguidi, M., Peng, C., McGuire, T., Falciglia, G., Gobeske, K., Czeisler, C., Kessler, J. (2008). Noggin expands neural stem cells in the adult hippocampus. *Journal Neuroscience*, 28 (37): 9194-9204.
- Bond, A., Peng, C-Y., Meyers, E., Mcguire, T., Ewaleifoh O., Kessler, J. (2014). BMP Signaling Regulates the Tempo of Adult Hippocampal Progenitor Maturation at Multiple Stages of the Lineage. *Stem Cells*, 32 (8): 2201-2214.
- Borsini, A., Zunszain, P., Thuret, S., Pariante, C. (2014). The role of inflammatory cytokines as key modulators of neurogenesis. *Trends in Neurosciences*, 38 (3): 1-13.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Bragdon, B., Moseychuk, O., Saldanha, S., King, D., Julian, J., Nohe, A. (2011). Bone Morphogenetic Proteins: A critical review. *Cellular Signalling*, 23 (4): 609-620.
- 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. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 24 (3): 603-613.
- Brazil, D., Church, R., Suraa, S., Godson, C., Martin, F. (2014). BMP signalling: agony and antagonism in the family. *Trends in Cell Biology*, 25 (5): 249-264.
- 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. *European Journal of Neuroscience*, 17 (10): 2042-2046.
- Bull, N., Bartlett, P. (2005). The adult mouse hippocampal progenitor is neurogenic but not a stem cell. *The Journal of Neuroscience*, 25 (47): 10815-1082.
- Canalis, E., Parker, K., Zanotti, S. (2012). Gremlin1 is required for skeletal development and postnatal skeletal homeostasis. *Journal Cell Physiology*, 227 (1): 269-277.
- Church, R., Krishnakumar, A., Urbanek, A., Geschwindner, S., Meneely, J., Bianchi, A., Basta, B., Monaghan, S., Elliot, C., Strömstedt, M., Ferguson, N., Martin, F., Brazil, D. (2015). Gremlin1 preferentially binds to bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and BMP-4 over BMP-7. *Biochemical Journal*, 466: 55-68.
- Crowther, A., Song, J., (2014). Activity-dependent signaling mechanisms regulating adult hippocampal neural stem cells and their progeny. *Neuroscience Bulletin*, 30 (4): 542-556.
- Curran, S., Hickey, F., Watson, A., Godson, C., Brazil, D. (2012). Deletion of Gremlin1 increases cell proliferation and migration responses in mouse embryonic fibroblasts. *Cellular Signalling*, 24 (4): 889-898.
- Deng, W., Aimone, J., Gage, F. (2010). New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nature reviews Neuroscience*, 11 (5): 339-350.
- Dominguez-Escriba, L., Hernandez-Rabaza, V., Soriano-Navarro, M., Barcia, J., Romero, F., Garcia-Verdugo, J., Canales, J. (2006). Chronic cocaine exposure impairs progenitor proliferation but spares survival and maturation of neural precursors in adult rat dentate gyrus. *European Journal of Neuroscience*, 24 (2): 586-594.
- Eckenhoff, M., Rakic, P., (1998). Nature and fate of proliferative cells in the hippocampal dentate gyrus during the life span of the rhesus monkey. *Journal of Neuroscience*, 8 (8): 2729-2747.
- Ehninger, D., Kempermann, G. (2007). Neurogenesis in the adult hippocampus. *Cell and Tissue Research*, 331 (1): 243-250.
- Eichenbaum, H. (2000). Cortical-hippocampal system for declarative memory. *Nature reviews Neuroscience*, 1 (1): 41-50.
- Eisch, A., Barrot, M., Schad, C., Self, D., Nestler, E. (2000). Opiates inhibit neurogenesis in the adult rat hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97 (13): 7579-7584.
- Eom, T., Roth, K., Jope, R., (2007). Neural precursor cells are protected from apoptosis induced by trophic factor withdrawal or genotoxic stress by inhibitors of glycogen synthase kinase 3. *The Journal of Biological Chemistry*, 282 (31): 22856-22864.
- Eriksson, P., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A., Nordborg, C., Peterson, D., Gage, F. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Natural Medicines*, 4 (11): 1313-1317.
- Filippov, V., Kronenberg, G., Pivneva, T., Reuter, K., Steiner, B., Wang, L., Yamaguchi, M., Kettenmann, H., Kempermann, G. (2003). Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine

- hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 23 (3):373-382.
- Frank, N., Kho, A., Schatton, T., Murphy, G., Molloy, M., Zhan, Q., Ramoni, M., Frank, M., Kohane, I., Gussoni, E. (2006). Regulation of myogenic progenitor proliferation in human fetal skeletal muscle by BMP4 and its antagonist Gremlin. *The Journal of Cell Biology*, 175 (1): 99-110.
- Fuentealba, L., Eivers, E., Ikeda, A., Hurtado, C., Kuroda, H., Pera, E., Robertis, E. (2007). Integrating Patterning Signals: Wnt/GSK3 Regulates the Duration of the BMP/Smad1 Signal. *Cell*, 131 (5): 980-993.
- Fuster-Matanzo, A., Llorens-Martín, M., Sirerol-Piquer, M., García-Verdugo, J., Ávila, J., Hernández, F. (2013). Dual effects of increased glycogen synthase kinase-3 $\beta$  activity on adult neurogenesis. *Human Molecular Genetics*, 22 (7): 1300-1315.
- Gage, H., Kempermann, G., Palmer, T., Peterson, D., Ray, J. (1998). Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus. *Journal of Neurobiology*, 36 (2): 249-266.
- Gobeske, K., Das, S., Bonaguidi M., Weiss C., Radulovic, J., Disterhoft, J., Kessler, J. (2009). BMP Signaling Mediates Effects of Exercise on Hippocampal Neurogenesis and Cognition in Mice. *PLoS ONE*, 4 (10): e7506.
- Gomes, W., Mehler, M., Kessler, J. (2003). Transgenic overexpression of BMP4 increases astroglial and decreases oligodendroglial lineage commitment. *Developmental Biology*, 255: 164-177.
- Gould, E. (1999). Serotonin and hippocampal neurogenesis. *Neuropsychopharmacology*, 21 (2 Suppl): 46S-51S.
- Gratzner, H. (1982). Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science*, 218 (4571): 474-475.
- Harrison, C., Al-Musawi, S., Walton, K. (2011). Prodomains regulate the synthesis, extracellular localisation and activity of TGF- $\beta$  superfamily ligands. *Growth Factors (Chur, Switz)*, 29 (5): 174-186.
- He, J., Nixon, K., Shetty, A., Crews, F. (2005). Chronic alcohol exposure reduces hippocampal neurogenesis and dendritic growth of newborn neurons. *European Journal of Neuroscience*, 21 (10): 2711-2720.
- Heldin, C., Miyazono, K., ten Dijke, P. (1997). TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through Smad proteins. *Nature*, 390 (6659): 465-471.
- Heldin, C., Moustakas, A. (2012). Role of Smads in TGF $\beta$  signaling. *Cell and Tissue Research*, 347 (1): 21-36.
- Hiepen, C., Benn, A., Denkis, A., Lukonin, I., Weise, C., Boergermann, J., Knaus, P. (2014). BMP2-induced chemotaxis requires PI3K p55 $\gamma$ /p110 $\alpha$ -dependent phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate production and LL5 $\beta$  recruitment at the cytocortex. *BMC Biology*, 12: 43.
- Höglinger, G., Rizk, P., Muriel, M., Duyckaerts, C., Oertel, W., Caille, I., Hirsch, E. (2004). Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson's disease. *Nature Neuroscience*, 7 (7): 726-735.
- Huguet, G., Aldavert-Vera, L., Kádár, B., Peña De Ortiz, A., Morgado-Bernalb, C., Segura-Torres, P. (2009). Intracranial self-stimulation to the lateral hypothalamus, a memory improving treatment, results in hippocampal changes in gene expression. *Neuroscience*, 162: 359-374.

- Huillard, E., Marx, M. (2004). Localized Expression of *drm/gremlin* in the Central Nervous System of the Chicken Embryo. *Developmental Dynamics*, 229 (3): 688-694.
- Kane, R., Stevenson, L., Godson, C., Stitt, A., O'Brien, C. (2005). Gremlin gene expression in bovine retinal pericytes exposed to elevated glucose. *British Journal of Ophthalmology*, 89 (12): 1638-1642.
- Karagiannis, G., Musrap, N., Saraon, P., Treacy, A., Schaeffer, D., Kirsch, R., Riddell, R., Diamandis, E. (2015). Bone morphogenetic protein antagonist gremlin-1 regulates colon cancer progression. *Biological Chemistry*, 396 (2): 163-183.
- Kattamuri, C., Luedeke, M., Nolan, K., Rankin, S., Greis, K., Zorn, A., Thompson, T. (2012a). Members of the DAN family are BMP antagonists that form highly stable noncovalent dimers. *Journal of Molecular Biology*, 424 (5): 313-327.
- Kattamuri, C., Luedeke, D., Thompson, T. (2012b). Expression and purification of recombinant protein related to DAN and cerberus (PRDC). *Protein Expression and Purification*, 82 (2): 389-395.
- Kempermann, G., Kuhn, H., Gage, F. (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*, 386 (6624): 493-495.
- Kempermann, G., Gage, F. (2002). Genetic determinants of adult hippocampal neurogenesis correlate with acquisition, but not probe trial performance, in the water maze task. *European Journal of Neuroscience*, 16 (1): 129-136.
- Kempermann, G., Jessberger, S., Steiner, B., Kronenberg, G. (2004). Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends in Neurosciences*, 27 (8): 447-452.
- Kempermann G; Ehninger D; (2008). Neurogenesis in the adult hippocampus. *Cell Tissue Research*, 331 (1): 243-250.
- Khokha, M., Hsu, D., Brunet, L., Dionne, M., Harland, R. (2003). Gremlin is the BMP antagonist required for maintenance of Shh and Fgf signals during limb patterning. *Nature Genetics*, 34 (3): 303-307.
- Kim, M., Yoon, S., Lee, S., Ha, S., Kim, H., Kim, J., Chung, J. (2012). Gremlin-1 Induces BMP-Independent Tumor Cell Proliferation, Migration, and Invasion. *PLoS ONE*, 7 (4): e35100.
- Koketsu K., Yoshida, D., Kim, K., Ishii, Y., Tahara, S., Teramoto, A., Morita, A. (2015). Gremlin, a Bone Morphogenetic Protein Antagonist, Is a Crucial Angiogenic Factor in Pituitary Adenoma. *International Journal of Endocrinology*, 2015: ID 834137.
- Kriebitz, N., Kiecker, C., McCormick, L., Lumsden, A., Graham, A., Bell, E. (2009). PRDC regulates placode neurogenesis in chick by modulating BMP signalling. *Developmental Biology*, 336 (12) 280-292.
- Kulkarni, V., Jha, S., Vaidya, V. (2002). Depletion of norepinephrine decreases the proliferation, but does not influence the survival and differentiation, of granule cell progenitors in the adult rat hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, 16 (10): 2008-2012.
- Laplagne, D., Esposito, M., Piatti, V., Morgenstern, N., Zhao, C., Van Praag, H., Gage, F., Schinder, A. (2006). Functional convergence of neurons generated in the developing and adult hippocampus. *PLoS Biology*, 4 (12): e409.
- Lappin, D., McMahon, R., Murphy, M., Brady, H. (2002). Gremlin: an example of the re-emergence of developmental programmes in diabetic nephropathy. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 17 (Suppl 9): 65-67.
- Lieberwirth, C., Pan, Y., Liu, Y., Zhang, Z., Wang, Z. (2016). Hippocampal adult neurogenesis: Its regulation and potential role in spatial learning and memory. *Brain Research*, 1644: 127-140.

- Lim, D., Tramontin, A., Trevejo, J., Herrera, D., García-Verdugo, J., Alvarez-Buylla, A., (2000). Noggin antagonizes bmp signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron*, 28 (3): 713-726.
- Lugert, S., Basak, O., Knuckles, P., Haussler, U., Fabel, K., Gotz, M., Haas, C., Kempermann, G., Taylor, V., Giachino, C. (2010). Quiescent and active hippocampal neural stem cells with distinct morphologies respond selectively to physiological and pathological stimuli and aging. *Cell Stem Cell*, 6 (5): 445-456.
- Maciel, T., Melo, R., Schor, N., Campos, A. (2007). Gremlin promotes vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 44 (2): 370-379.
- McMahon, R., Murphy, M., Clarkson, M., Taal, M., Mackenzie, H., Godson, C., Martin, F., Brady, H. (2000). *IHG-2*, a Mesangial Cell Gene Induced by High Glucose, Is Human *gremlin*: Regulation by Extracellular Glucose Concentration, Cyclic Mechanical Strain, and Transforming Growth Factor- $\beta$ 1. *Journal of Biological Chemistry*, 275 (14): 9901-9904.
- Medina, M., Wandosell, F. (2011). Deconstructing GSK-3: The fine regulation of its activity. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2011: 1-16.
- Mercier, F., Kitasako, J., Hatton, G. (2002). Anatomy of the brain neurogenic zones revisited: Fractones and the fibroblast/macrophage network. *Journal of Comparative Neurology*, 451 (2): 170-188.
- Merino, R., Rodriguez-Leon, J., Macias, D., Gañan, Y., Economides, A., Hurler, J. (1999). The BMP antagonist Gremlin regulates outgrowth, chondrogenesis and programmed cell death in the developing limb. *Development*, 126 (3): 5515-5522.
- Meyers, E., Gobeske, K., Bond, A., Jarrett, J., Peng, C-Y., Kessler, J. (2016). Increased bone morphogenetic protein signaling contributes to age-related declines in neurogenesis and cognition. *Neurobiology of Aging*, 38: 164-175.
- Michos, O., Panman, L., Vintersten, K., Beier, K., Zeller, R., Zuniga, A. (2004). *Gremlin*-mediated BMP antagonism induces the epithelial-mesenchymal feedback signaling controlling metanephric kidney and limb organogenesis. *Development*, 131 (4): 3401-3410.
- Mikawa, S., Wang, C., Sato, K., (2006). Bone morphogenetic protein-4 expression in the adult rat brain. *Journal of Comparative Neurology*, 499 (4): 613-625.
- Mikawa, S., Sato, K., (2011). Noggin expression in the adult rat brain. *Neuroscience*, 184: 38-53.
- Minabe-Saegusa, C., Saegusa, H., Tsukahara, M., Noguchi, S. (1998). Sequence and expression of a novel mouse gene PRDC (protein related to DAN and cerberus) identified by a gene trap approach. *Development, Growth & Differentiation*, 40 (3): 343-353.
- Mira, H., Andreu, Z., Suh, H., Lie, D., Jessberger, S., Consiglio, A., San Emeterio, J., Hortiguera, R., Marques-Torres, M., Nakashima, K., Colak, D., Gotz, M., Farinas, I., Gage, F., (2010). Signaling through BMPRII regulates quiescence and long-term activity of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell*, 7: 78e89
- Mirescu, C., Gould, E. (2006). Stress and adult neurogenesis. *Hippocampus*, 16 (3): 233-238.
- Morrens, J., Van Den Broeck, W., Kempermann, G. (2012). Glial cells Adult neurogenesis. *Glia*, 60 (2): 159-174.
- Mossman, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65 (1-2): 55-63.
- Müller, I., Melville, D., Tanwar, V., Rybski, W., Mukherjee, A., Shoemaker, M., Wang, W., Schoenhard, J., Roden, D., Darbar, D., Knapik, E., Hatzopoulos, A. (2013). Functional modeling in zebrafish



- demonstrates that the atrial-fibrillation-associated gene *GREM2* regulates cardiac laterality, cardiomyocyte differentiation and atrial rhythm. *Disease Models & Mechanisms*, 6 (2): 332-341.
- Mulvihill, M., Kwon, Y-W., Lee, S., Fang, L., Choi, H., Ray, R., Kang, H., Mao, J-H., Jablons, D., Kim, J. (2012). Gremlin is Overexpressed in Lung Adenocarcinoma and Increases Cell Growth and Proliferation in Normal Lung Cells. *PLoS ONE*, 7 (8): e42264.
- Nacher, J., Rosell, D., Alonso-Llosa, G., McEwen, B. (2001). NMDA receptor antagonist treatment induces a longlasting increase in the number of proliferating cells, PSA-NCAM-immunoreactive granule neurons and radial glia in the adult rat dentate gyrus. *European Journal of Neuroscience*, 13 (3): 512-520.
- Nicoli, S., Gilardelli, C., Pozzoli, O., Presta, M., Cotelli, F. (2005). Regulated expression pattern of gremlin during zebrafish development. *Gene Expression Patterns*, 5 (4): 539-544.
- Nolan, K., Kattamuri, C., Luedeke, D., Deng, A., Jagpal, A., Zhang, F., Linhardt, R., Kenny, A., Zorn, A., Thompson, T., (2013). Structure of Protein Related to DAN and Cerberus (PRDC): Insights into the Mechanism of BMP Antagonism. *Structure*, 21 (8): 1417-1429.
- Ohyama, A., Saito, F., Ohuchi, H., Noji, S. (2001). Differential expression of two BMP antagonists, *gremlin* and *Follistatin*, during development of the chick feather bud. *Mechanisms of Development*, 100 (2): 331-333.
- Ormerod, B., Galea, L. (2001). Reproductive status influences cell proliferation and cell survival in the dentate gyrus of adult female meadow voles: a possible regulatory role for estradiol. *Neuroscience*, 102 (2): 369-379.
- Palmer, T., Willhoite, A., Gage, F. (2000). Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *Journal of Comparative Neurology*, 425 (4): 479-494.
- Pereira, R., Economides, A., Canalis, E. (2000). Bone Morphogenetic Proteins Induce Gremlin, a Protein That Limits Their Activity in Osteoblasts. *Endocrinology*, 141 (12): 4558-4563.
- Ramírez-Amaya, V., Marrone, D., Gage, F., Worley, P., Barnes, C. (2006). Integration of new neurons into functional neural networks. *Journal Neuroscience*, 26 (47): 12237-12241.
- Ramírez-Rodríguez, G., Benítez-King, G., Kempermann, G. (2007). Formación de neuronas nuevas en el hipocampo adulto: Neurogénesis. *Salud Mental*, 30 (3): 12-19.
- Ramírez-Rodríguez, G., Klempin, F., Babu, H., Benítez-King, G., Kempermann, G. (2009). Melatonin Modulates Cell Survival of New Neurons in the Hippocampus of Adult Mice. *Neuropsychopharmacology*, 34 (9): 2180-2191.
- Ramírez-Rodríguez, G., Laguna-Chimal, J., Vega-Rivera, N., Ortiz-López, L., Méndez-Cuesta, L., Estrada-Camarena, E., Babu, H. (2011). Los fármacos antidepresivos como reguladores de la neurogénesis hipocámpica de roedores y humanos adultos. *Salud mental*, 34 (6): 497-506.
- Ramírez-Rodríguez, G.; Babu, H.; Klempin, F.; Krylyshkina, O.; Baekelandt, V.; Gijbsers, R.; Debyser, Z.; Overall, R.; Nicola, Z.; Fabel, K.; Kempermann, G. (2013). The  $\alpha$  Crystallin domain of small heat shock protein b8 (Hspb8) acts as survival and differentiation factor in adult hippocampal neurogenesis. *Neuroscience*, 33 (13): 5785-5796.
- Roxburgh, S., Kattla, J., Curran, S., O'Meara, Y., Pollock, C., Goldschmeding, R., Godson, C., Martin, F., Brazil D. (2009). Allelic Depletion of *grem1* Attenuates Diabetic Kidney Disease. *Diabetes*, 58 (7): 1641-1650.
- Sanai, N., Tramontin, A., Quinones-Hinojosa, A., Barbaro, N., Gupta, N., Kunwar, S., Lawton, M., McDermott, M., Parsa, A., Manuel-García Verdugo, J., Berger, M., Alvarez-Buylla, A., (2004).

- Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature*, 427 (6976): 740-744.
- Sato, M., Kawana, K., Fujimoto, A., Yoshida, M., Nakamura, H., Nishida, H., Inoue, T., Taguchi, A., Takahashi, J., Adachi, K., Nagasaka, K., Matsumoto, Y., Wada-Hiraike, O., Oda, K., Osuga, Y., Fujii, T. (2016). Clinical significance of Gremlin 1 in cervical cancer and its effects on cancer stem cell maintenance. *Oncology Reports*, 35 (1): 391-397.
- Seri, B., García-Verdugo, J., Collado-Morente, L., McEwen, B., Álvarez-Buylla, A. (2004). Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *Journal of Comparative Neurology*, 478 (4): 359-378.
- Shi, W., Zhao, J., Anderson, K., Warburton, D. (2001). Gremlin negatively modulates BMP-4 induction of embryonic mouse lung branching morphogenesis. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 280 (5): L1030-L1039.
- Sneddon J., Zhen, H., Montgomery, K., van de Rijn, M., Tward, A., West, R., Gladstone, H., Chang, H., Morganroth, G., Oro, A., Brown, P., (2006). Bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is widely expressed by cancer-associated stromal cells and can promote tumor cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103 (40): 14842-14847.
- Spradling, A., Drummond-Barbosa, D., Kai, T. (2001). Stem cells find their niche. *Nature*, 414 (6859): 98-104.
- Stanfield, B., Trice, J., (1988). Evidence that granule cells generated in the dentate gyrus of adult rats extend axonal projections. *Experimental Brain Research*, 72 (2): 399-406.
- Steiner, B., Klempin, F., Wang, L., Kott, M., Kettenmann, H., Kempermann, G. (2006) Type-2 cells as link between glial and neuronal lineage in adult hippocampal neurogenesis. *Glia*, 54 (8): 805-814.
- Sudo, S., Avsian-Kretchmer, O., Wang, L., Hsueh, A. (2004). Protein related to DAN and cerberus is a bone morphogenetic protein antagonist that participates in ovarian paracrine regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (22): 23134-23141.
- Suh, H., Consiglio, A., Ray, J., Sawai, T., D'Amour, K., Gage, F. (2007). In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2<sup>+</sup> neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell*, 1 (5): 515-528.
- Suzuki, D., Yamada, A., Aizawa, R., Funato, S., Matsumoto, T., Suzuki, W., Takami, M., Miyamoto, Y., Suzawa, T., Yamamoto, M., Baba, K., Kamijo, R. (2012). BMP2 Differentially Regulates the Expression of *Gremlin1* and *Gremlin2*, the Negative Regulators of BMP Function, During Osteoblast Differentiation. *Calcified Tissue International*, 91 (1):88-96.
- Tanapat, P., Hastings, N., Reeves, A., Gould, E. (1999). Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *Journal Neurosciense*, 19 (14): 5792-5801.
- Tanwar, V., Bylund, J., Hu, J., Yan, J., Walthall, J., Mukherjee, A., Heaton, W., Wang, W., Potet, F., Rai, M., Kupersmidt, S., Knapik, E., Hatzopoulos, A. (2014). Gremlin 2 promotes differentiation of embryonic stem cells to atrial fate by activation of the JNK signaling pathway. *Stem Cells*, 32 (7): 1774-1788.
- Topol, L., Marx, M., Laugier, D., Bogdanova, N., Boubnov, N., Clausen, P., Calothy, G., Blair, D. (1997). Identification of *drm*, a Novel Gene Whose Expression Is Suppressed in Transformed Cells and Which Can Inhibit Growth of Normal but Not Transformed Cells in Culture. *Molecular and Cellular Biology*, 17 (8): 4801-4810.

- Tsubamoto, H., Sakata, K., Sakane, R., Inoue, K., Shibahara, H., Hao, H., Hirota, S. (2016). Gremlin 2 is Repressed in Invasive Endometrial Cancer and Inhibits Cell Growth In Vitro. *Anticancer Research*, 36 (1): 199-203.
- Turbic, A., Leong, S., Turnley, A., (2011). Chemokines and inflammatory mediators interact to regulate adult murine neural precursor cell proliferation, survival and differentiation. *PLoS One*, 6 (9): e25406.
- Van Praag, H., Christie, B., Sejnowski, T., Gage, F. (1999). Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96 (23): 13427-13431.
- Van Praag, H., Schinder, A., Christie, B., Toni, N., Palmer, T., Cage, F. (2002). Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*, 415 (6875): 1030-1034.
- Wada, J., Makino, H., Kanwar, Y. (2002). Gene expression and identification of gene therapy targets in diabetic nephropathy. *Kidney International*, 61 (Symposium 1): S73-S78.
- Walsh, D., Roxburgh, S., McGettigan, P., Berthier, C., Higgins, D., Kretzler, M., Cohen, C., Mezzano, S., Brazil D., Martin, F. (2007). Co-regulation of Gremlin and Notch signalling in diabetic nephropathy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1782 (1): 10-21.
- Wang, R., Green, J., Wang, Z., Deng, Y., Qiao, M., Peabody, M., Zhang, Q., Ye, J., Yan, Z., Denduluri, S., Idowu O., Li, M., Shen, C., Hu, A., Haydon, R., Kang, R., Mok, J., Lee, M., Luu, H., Shi, L. (2014). Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes and Diseases*, 1 (1): 87-105.
- Wellbrock, J., Harbaum, L., Stamm, H., Hennigs, J., Schulz, B., Klose, H., Bokemeyer, C., Fiedler, W., Lüneburg, N. (2015). Intrinsic BMP Antagonist Gremlin-1 as a Novel Circulating Marker in Pulmonary Arterial Hypertension. *Lung*, 193 (4): 567-570.
- Wiater, E., Harrison, C., Lewis, K., Gray, P., Vale, W. (2006). Identification of distinct inhibin and transforming growth factor beta-binding sites on betaglycan: functional separation of betaglycan co-receptor actions. *The Journal of Biological Chemistry*, 281 (25): 17011-17022.
- Wordinger, R., Zode, G., Clark, A. (2008). Focus on Molecules: Gremlin. *Experimental Eye Research*, 87 (2): 78-79.
- Worthley, D., Churchill, M., Compton, J., Tailor, Y., Rao, M., Si, Y., Levin, D., Schwartz, M., Uygur, A., Hayakawa, Y., Gross, S., Renz, B., Setlik, W., Martinez, A., Chen, X., Nizami, S., Lee, H., Kang, H., Caldwell, J., Asfaha S., Westphalen, C., Graham, T., Jin, G., Nagar, K., Wang, H., Kheirbek, M., Kolhe, A., Carpenter, J., Glaire, M., Nair, A., Renders, S., Manieri, N., Muthupalani, S., Fox, J., Reichert, M., Giraud, A., Schwabe, R., Pradere, J., Walton, K., Prakash, A., Gumucio, D., Rustgi, A., Stappenbeck, T., Friedman, R., Gershon, M., Sims, P., Grikscheit, T., Lee, F., Karsenty, G., Mukherjee, S., Wang, T. (2015). Gremlin 1 Identifies a Skeletal Stem Cell with Bone, Cartilage, and Reticular Stromal Potential. *Cell*, 160 (1-2): 269-284.
- Yousef, H., Morgenthaler, A., Schlesinger, C., Bugaj, L., Conboy, I., Schaffer, D. (2015). Age-Associated Increase in BMP Signaling inhibits Hippocampal Neurogenesis. *Stem Cells*, 33 (5): 1577-1588.
- Zhang, Y. (2009). Non-Smad pathways in TGF- $\beta$  signaling. *Cell Research*, 19 (1): 128-139.
- Zhang, R., Oyajobi, B., Harris, S., Chen, D., Tsao, C., Deng, H., Zhao, M. (2013). Wnt/ $\beta$ -catenin signaling activates bone morphogenetic protein 2 expression in osteoblasts. *Bone*, 52 (1): 145-156.
- Zhang, Y., Wang, S., Liu, S., Li, C., Wang, J. (2015). Role of Smad signaling in kidney disease. *International Urology and Nephrology*, 47 (12): 1965-1975.

- Zhao, C., Deng, W., Cage, F. (2008). Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell*, 132 (4): 645-660.
- Zuniga, A., Michos, O., Spitz, F., Haramis, A., Panman, L., Galli, A., Vintersten, K., Klasen, C., Mansfield, W., Kuc, S., Duboule, D., Dono, R., Zeller, R. (2004). Mouse limb deformity mutations disrupt a global control region within the large regulatory landscape required for Gremlin expression. *Genes & Development*, 18 (13): 1553-1564.

Este trabajo fue presentado parcialmente en la modalidad de cartel durante la XXXI Reunión Anual de Investigación en el Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz 2016.

## Participación de la proteína gremlina-1 en la neurogénesis a partir de células precursoras del hipocampo adulto

Hernández Cruz Viridiana Carolina\*, Ortiz López Leonardo\*, Ramírez Rodríguez Gerardo Bernabé\*

\*Laboratorio de Neurogénesis. Departamento de investigaciones clínicas.  
Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz  
viridiana\_biol@comunidad.unam.mx, leosan@imp.edu.mx, gbernabe@imp.edu.mx

### Introducción

Durante el proceso de neurogénesis que ocurre en la zona subgranular (SGZ) del giro dentado del hipocampo (GD) en la etapa adulta, la generación de células gliales y neuronas granulares a partir de células precursoras es finamente regulada negativa o positivamente por diversos factores que controlan el destino celular<sup>1</sup>. Particularmente, las proteínas morfogénicas de hueso (BMPs) y sus antagonistas actúan en el hipocampo mediando la neurogénesis y el compromiso neuronal<sup>2</sup>; al respecto, la proteína gremlina-1 ha sido detectada en el nicho neurogénico del hipocampo a través de su mensajero en el ratón adulto C57BL/6<sup>3</sup> (figura 1); lo cual ha sugerido una posible función para la formación de nuevas neuronas en el hipocampo.

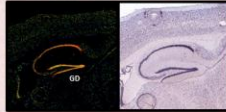
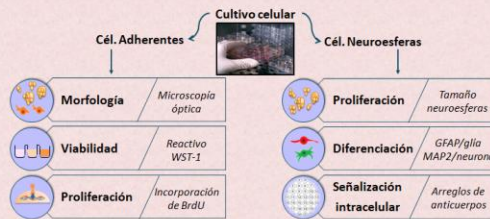


Figura 1. Expresión del mRNA de gremlina-1 en el hipocampo del ratón adulto C57BL/6. Se muestra alta concentración del mensajero (naranja) con respecto al tejido circundante (verde) en un corte sagital obtenido por la técnica de hibridación in situ.

### Objetivos

Estudiar el efecto de la proteína gremlina-1 sobre la viabilidad, proliferación, diferenciación y señalización intracelular; además de comparar su función con noggin, otro antagonista de BMPs, en células precursoras aisladas del giro dentado del hipocampo de roedores adultos (NPCsAH) C57BL/6.

### Método



### Resultados

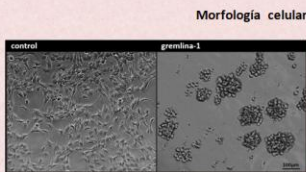
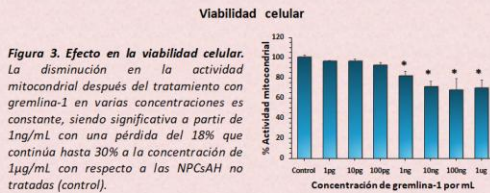


Figura 2. Cambio en la morfología celular. Se observa una reducción aparente del volumen celular, contracción de las proyecciones citoplasmáticas y formación de aglomerados celulares heterogéneos parecidos a neuroesferas en las células tratadas con gremlina-1 (1µg/ml) con respecto al control.



### Referencias

- Kempermann G, Ehninger D. Neurogenesis in the adult hippocampus. *Cell Tissue Research* 2008; 331:243-250.
- Bond AM, Bhalala OG, Kessler JA. The Dynamic Role of Bone Morphogenetic Proteins in Neural Stem Cell Fate and Maturation. *Developmental Neurobiology* 2012; 72(7):1068-1084.
- Allen Brain Atlas. Gen gremlin in Mus musculus (C57BL/6) 2015. From: <http://mouse.brain-map.org/experiment/show?id=69059946>.
- Fuentealba L, Evers E, Ireda A, et al. Integrating Patterning Signals: Wnt/GSK3 Regulates the Duration of the BMP/Smad1 Signal. *Cell* 2007; 131 (5): 980-993.

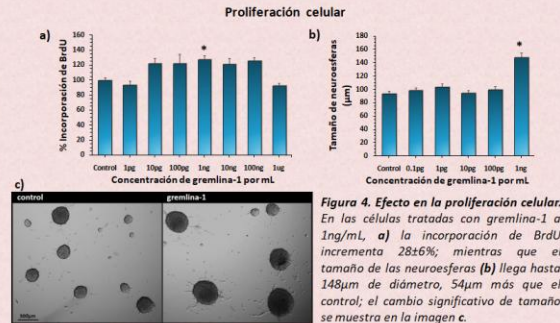


Figura 4. Efecto en la proliferación celular. En las células tratadas con gremlina-1 a 1ng/mL, a) la incorporación de BrdU incrementa 28±6%; mientras que el tamaño de las neuroesferas (b) llega hasta 148µm de diámetro, 54µm más que el control; el cambio significativo de tamaño se muestra en la imagen c.

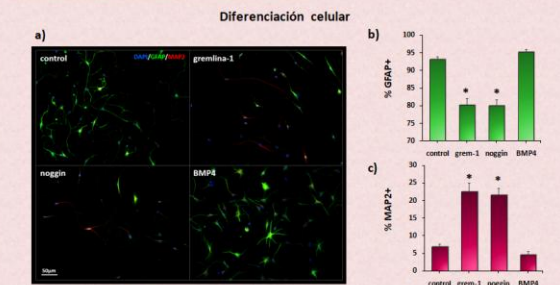


Figura 5. Efecto en la diferenciación celular. Después del tratamiento con gremlina-1 (1µg/mL) y noggin (250µg/mL) es favorecida la diferenciación neuronal; mientras que BMP4 (50µg/mL) promueve la morfología a tipo astrocito radial. a) expresión de GFAP (verde) y MAP2 (rojo) como marcadores específicos para células gliales y neuronas respectivamente, los núcleos fueron teñidos con DAPI. b) la expresión de GFAP fue reducida 13±2%; mientras que la expresión de MAP2 (c) incrementa 15±2% para las NPCsdH tratadas con gremlina-1 y noggin con respecto al control



Figura 6. Cambios en la señalización intracelular. De 18 moléculas analizadas, únicamente GSK-3β está involucrada en la función de los antagonistas gremlina-1 (1µg/mL) y noggin (250µg/mL), sin ser afectada la intensidad de quimioluminiscencia con el tratamiento de BMP4 (50µg/mL) con respecto al control. a) spots de arreglos de anticuerpos para la identificación de algunas vías de señalización; b) cantidad relativa de GSK3β.

### Conclusiones

La proteína gremlina-1 favorece la proliferación de las NPCsdH generando un pre-condicionamiento para inducir diferenciación neuronal de manera similar a noggin; estos antagonistas ejercen su función inhibiendo la actividad de las BMPs a través de GSK-3β, la cual está involucrada en la regulación de las proteínas Smads<sup>4</sup>.

Figura 7. Actividad de la proteína gremlina-1. La vía de señalización por la que pueden actuar los antagonistas de las BMPs.

