



Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Psicología

---

**Efecto de la neuroinflamación sobre la  
proliferación de células progenitoras neurales en  
el giro dentado adulto**

TESIS

Que para obtener el título de:

**Licenciado en Psicología**

Presenta:

**José Eduardo Domínguez Rivas**

Directora de Tesis:

**Dra. Angélica Zepeda Rivas**

Revisora:

**Dra. Laura Elisa Ramos Languren**

Ciudad Universitaria, CDMX, 2020





Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

Este trabajo fue realizado en el laboratorio C210 del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM bajo la tutoría y supervisión de la Dra. Angélica Zepeda Rivera y la Candidata a Dra. Martha Pérez Domínguez, con apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT 282470) y del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT 208518), así como las becas de terminación de estudios y titulación del PAPIIT

## **AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

A la Facultad de Psicología y al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

A mi tutora la Dra. Angélica Zepeda Rivera y a la Candidata a Dra. Martha Pérez Domínguez por su apoyo y guía en la concepción y realización de este trabajo.

A la Dra. Clorinda Arias Álvarez y la Dra. María Evangelina Ávila Muñoz por sus acertados comentarios para enriquecer este proyecto.

A la QFB Patricia Ferrera Boza por su apoyo técnico en el laboratorio.

Al Dr. Miguel Tapia Rodríguez por su apoyo técnico en microscopía confocal.

A la Dra. Laura Elisa Ramos Languren por su revisión y observaciones a este trabajo.

A los miembros del sínodo por sus comentarios y aportes a este trabajo:

Dr. Mario Alberto Arias García

Dra. Claudia Gómez Acevedo

Dr. Daniel Osorio Gómez

## **Mi familia y amigos**

A mi madre, Norma, por todo el apoyo y toda la confianza que me has brindado desde siempre. Sin ti no hubiera logrado nada.

A mis hermanos Emilio y Esteban, a mi hermana Mariana, por tantas risas, por tantos memes y por motivarme a seguir avanzando.

A Chela, Paty y Jaime, por tanto, por estar ahí siempre para mí y por ser unos grandes ejemplos a seguir.

A Liliana, por existir, por ayudarme a descubrirme y conocerme mejor, por haber construido conmigo esta gran amistad desde hace más de seis años.

A Ángel y Ana, por todas las risas y todo el chisme, tanto *shade* y tanta amistad.

Al resto de mis familiares y amigos que han contribuido en mi formación personal o académica a lo largo de los años.

## **En Biomédicas**

A la Dra. Angélica Zepeda, agradezco que haya aceptado que me uniera a su grupo de investigación, todas sus enseñanzas y apoyo a lo largo de estos años. Gracias por ser un gran ejemplo como persona y como científica.

A Martha, por ser mi hermana mayor académica, por enseñarme prácticamente todo lo que sé sobre neurogénesis y sobre el trabajo en el laboratorio.

A Eva, por ser una gran amiga y por enseñarme tanto sobre la academia y sobre la vida.

A todos los integrantes del laboratorio, por las risas, por ayudarme a sobrellevar las desgracias que inevitablemente se cruzaron en mi camino y por compartir conmigo su pasión por la investigación: César, Kari H., Manuel, La Vale, Nelly, Liz, Isela, Denisse, Kari S. y Elizabeth.

## **En Psicología**

A la Dra. Olga Rojas, por inculcar en mí desde inicios de la carrera la motivación y amor por la investigación y las neurociencias, así como su apoyo a lo largo de mi formación.

A José Luis Baroja, por dar una clase tan buena, por reavivar mi pasión por la estadística y la programación y por llenarme de motivación en los últimos semestres de la carrera.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>1</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>2</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>8</b>
<b>ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL GIRO DENTADO DEL HIPOCAMPO</b>	<b>9</b>
ZONA SUBGRANULAR DEL GIRO DENTADO	12
<b>NEUROGÉNESIS HIPOCAMPAL ADULTA</b>	<b>14</b>
FASES DE PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS PRECURSORAS NEURALES	15
Células tipo 1	15
Células progenitoras neurales	17
<i>Progenitores tipo 2</i>	17
<i>Progenitores tipo 3</i>	18
FASES DE MADURACIÓN E INTEGRACIÓN NEURONAL	19
<b>FUNCIONES DE LAS NUEVAS NEURONAS EN EL GIRO DENTADO ADULTO</b>	<b>21</b>
<b>MODULACIÓN DE LA NEUROGÉNESIS HIPOCAMPAL</b>	<b>22</b>
<b>NEUROGÉNESIS EN UN CONTEXTO NEUROINFLAMATORIO</b>	<b>23</b>
NEUROINFLAMACIÓN	23
NEUROINFLAMACIÓN INDUCIDA POR LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE LPS	28
NEUROINFLAMACIÓN Y NEUROGÉNESIS	30
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>35</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>35</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>35</b>
GENERAL	35
PARTICULARES	36

<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>37</b>
<b>ANIMALES</b>	<b>37</b>
<b>TRATAMIENTO</b>	<b>37</b>
<b>EVALUACIÓN DE PARÁMETROS DE CONDUCTA ASOCIADA A MALESTAR</b>	<b>38</b>
PESO CORPORAL	38
CONDUCTA EXPLORATORIA	38
<b>ADMINISTRACIÓN DE BRDU</b>	<b>39</b>
<b>ANÁLISIS DE CONTENIDO PROTEICO MEDIANTE <i>WESTERN BLOT</i></b>	<b>39</b>
<b>ANÁLISIS POR INMUNOFLUORESCENCIA</b>	<b>40</b>
<b>MICROSCOPIA CONFOCAL Y CONTEOS CELULARES</b>	<b>42</b>
<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICOS</b>	<b>43</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>44</b>
<b>DISMINUCIÓN TRANSITORIA EN EL PESO CORPORAL Y CONDUCTA EXPLORATORIA TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE LPS</b>	<b>44</b>
<b>PERFIL PROINFLAMATORIO TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE LPS</b>	<b>45</b>
RESPUESTA MICROGLIAL	45
NIVELES DE PRO-IL-1B	47
<b>MODULACIÓN DIFERENCIAL DE LA PROLIFERACIÓN DE LAS NUEVAS CÉLULAS PROGENITORAS NEURALES HIPOCAMPALES TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE LPS</b>	<b>47</b>
<b>DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS</b>	<b>50</b>
<b>CONCLUSIÓN</b>	<b>56</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>57</b>
<b>APÉNDICE A. PREPARACIÓN DE REACTIVOS</b>	<b>74</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1. HIPOCAMPO EN MAMÍFEROS ADULTOS</b>	<b>10</b>
<b>FIGURA 2. ORGANIZACIÓN ANATÓMICA Y CONECTIVIDAD DEL HIPOCAMPO</b>	<b>12</b>
<b>FIGURA 3. PROCESO DE NEUROGÉNESIS HIPOCAMPAL ADULTA</b>	<b>13</b>
<b>FIGURA 4. VÍA DE SEÑALIZACIÓN ACTIVADA POR LPS</b>	<b>26</b>
<b>FIGURA 5. MODULACIÓN DE LA NEUROGÉNESIS HIPOCAMPAL ADULTA EN UN CONTEXTO PROINFLAMATORIO</b>	<b>34</b>
<b>FIGURA 6. DISEÑO EXPERIMENTAL</b>	<b>38</b>
<b>FIGURA 7. LA ADMINISTRACIÓN DE LPS PROMUEVE UNA DISMINUCIÓN TRANSITORIA EN PARÁMETROS DE CONDUCTA ASOCIADA A MALESTAR</b>	<b>45</b>
<b>FIGURA 8. LA ADMINISTRACIÓN DE LPS PROMUEVE ACTIVACIÓN MICROGLIAL Y UN AUMENTO DE PRO-IL-1B</b>	<b>46</b>
<b>FIGURA 9. LA ADMINISTRACIÓN DE LPS PROMUEVE UNA DISMINUCIÓN EN EL NÚMERO DE PROGENITORES 2B 7 DÍAS DESPUÉS DE LA INYECCIÓN</b>	<b>49</b>
<b>FIGURA 10. ESQUEMA DEL EFECTO SOBRE LOS PROGENITORES NEURALES 7 DÍAS DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE LPS</b>	<b>51</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>Ascl1</b>	<i>Achaete-scute homolog 1</i>
<b>BDNF</b>	Factor de crecimiento derivado del cerebro ( <i>Brain derived neurotrophic factor</i> )
<b>BLBP</b>	Proteína cerebral de unión a lípidos ( <i>Brain lipid binding protein</i> )
<b>BMP</b>	Proteína morfogénica ósea ( <i>Bone morphogenic protein</i> )
<b>BrdU</b>	5-bromo-2'-desoxiuridina
<b>°C</b>	Grados celsius
<b>CA1</b>	<i>Cornu Ammonis 1</i>
<b>CA3</b>	<i>Cornu Ammonis 3</i>
<b>CD11b</b>	Molécula de cúmulo de diferenciación 11b ( <i>Cluster of differentiation molecule 11b</i> )
<b>CD68</b>	Molécula de cúmulo de diferenciación 68 ( <i>Cluster of differentiation molecule 68</i> )
<b>CE</b>	Corteza entorrinal
<b>CDK</b>	Cinasa dependiente de ciclinas
<b>CG</b>	Capa granular del giro dentado
<b>Cl<sup>-</sup></b>	Cloruro
<b>CPATs</b>	Célula progenitora de amplificación transitoria
<b>CPNs</b>	Células precursoras neurales
<b>CTN</b>	Célula troncal neural

<b>d</b>	Día(s)
<b>DAMP</b>	Patrón molecular asociado a daño ( <i>Damage associated molecular pattern</i> )
<b>DCX</b>	Doblecortina
<b>EA</b>	Enfermedad de Alzheimer
<b>EP</b>	Enfermedad de Parkinson
<b>EROs</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>FGF-2</b>	Factor de crecimiento de fibroblastos tipo 2 ( <i>Fibroblast growth factor-2</i> )
<b>GABA</b>	Ácido <i>gamma</i> -aminobutírico ( <i>Gamma-aminobutyric acid</i> )
<b>GD</b>	Giro dentado
<b>GFAP</b>	Proteína ácida fibrilar glial ( <i>Glial fibrillary acidic protein</i> )
<b>h</b>	Hora(s)
<b>Hes5</b>	<i>Hairy and enhancer of split 5</i>
<b>Iba1</b>	Molécula adaptadora de unión a calcio ionizado ( <i>Ionized calcium-binding adaptor molecule 1</i> )
<b>i.c.v.</b>	Intracerebroventricular
<b>IGF-1</b>	Factor de crecimiento insulínico tipo 1 ( <i>Insulin-like growth factor-1</i> )
<b>i.i.p.</b>	Inyección intraperitoneal
<b>IKK</b>	Cinasa IκB ( <i>IκB kinase</i> )
<b>IκB</b>	Cinasa inhibidora de NF-κB ( <i>NF-κB inhibitor kinase</i> )

<b>pro-IL-1<math>\beta</math></b>	Precursor de Interleucina 1- <i>beta</i>
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina 1- <i>beta</i>
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IRAK 4/1</b>	Cinasa asociada al receptor de interleucina-1 4/1 ( <i>Interleukin-1 receptor associated kinase 4/1</i> )
<b>JAK/STAT</b>	Cinasas Janus/proteínas de transducción de señales y activadoras de la transcripción ( <i>Janus kinases/signal transducer and activator of transcription proteins</i> )
<b>kg</b>	Kilogramo(s)
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>LTP</b>	Potenciación a largo plazo ( <i>Long term potentiation</i> )
<b>MD-2</b>	Proteína de diferenciación mielóide 2 ( <i>Myeloid differentiation protein 2</i> )
<b>mg</b>	Miligramo(s)
<b>MHC II</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad tipo 2 ( <i>Major histocompatibility complex-II</i> )
<b>min</b>	Minuto(s)
<b>ml</b>	Mililitro(s)
<b>MyD88</b>	Proteína de respuestas primaria de diferenciación mielóide 88 ( <i>Myeloid differentiation primary response protein 88</i> )
<b>NB</b>	Neuroblasto

<b>NeuN</b>	Antígeno de núcleo neuronal ( <i>Neuronal nuclei antigen</i> )
<b>NeuroD1</b>	Factor de diferenciación neurogénica tipo 1 ( <i>Neurogenic differentiation factor-1</i> )
<b>NF-κB</b>	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras <i>kappa</i> de las células B activadas ( <i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> )
<b>Ngn2</b>	Neurogenina 2
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>p21</b>	Inhibidor de la cinasa dependiente de ciclinas 1A
<b>p53</b>	Proteína supresora de tumores 53
<b>PAMP</b>	Patrón molecular asociado a patógeno ( <i>Pathogen associated molecular pattern</i> )
<b>Pax6</b>	<i>Paired box protein 6</i>
<b>PCNA</b>	Antígeno nuclear de células proliferantes ( <i>Proliferating cell nuclear antigen</i> )
<b>pHH3</b>	Histona 3 fosforilada en la serina 10
<b>Prox1</b>	<i>Prospero homeobox protein 1</i>
<b>PSA-NCAM</b>	Molécula de adhesión celular neural polisialilada ( <i>Polysialylated-neural cell adhesion molecule</i> )
<b>RRP</b>	Receptor de reconocimiento de patrones
<b>Shh</b>	<i>Sonic hedgehog</i>
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>Sox1</b>	<i>SRY (Sex determining region Y)-box protein 1</i>

<b>Sox2</b>	<i>SRY (Sex determining region Y)-box protein 2</i>
<b>Tbr2</b>	<i>T-box brain protein 2</i>
<b>TIRAP</b>	<i>TIR domain containing adaptor protein</i>
<b>TLR</b>	Receptor tipo Toll ( <i>Toll-like receptor</i> )
<b>TMEM119</b>	Proteína transmembranal 119 ( <i>Transmembrane protein 119</i> )
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral <i>alpha</i> ( <i>Tumor necrosis factor-alpha</i> )
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento vascular endotelial ( <i>Vascular endothelial growth factor</i> )
<b>Wnt</b>	<i>Wingless-type MMTV integration site</i>
<b>ZSG</b>	Zona subgranular
<b>ZSV</b>	Zona subventricular

\*Términos en inglés en *itálicas*

## RESUMEN

La generación de nuevas neuronas o neurogénesis en el giro dentado del hipocampo continúa a lo largo de la vida de diversas especies animales, incluyendo a los roedores. Este proceso da inicio tras la activación de las células troncales neurales o células tipo 1. Estas dan lugar a células progenitoras neurales de amplificación transitoria o células tipo 2a (células Tbr2<sup>+</sup>/DCX<sup>-</sup>) y 2b (células Tbr2<sup>+</sup>/DCX<sup>+</sup>), que a su vez dan origen a las células tipo 3 (células Tbr2<sup>-</sup>/DCX<sup>+</sup>) y que al salir de ciclo celular generan nuevas neuronas granulares. Se ha descrito que los diferentes tipos de progenitores pueden responder de manera diferente ante un mismo estímulo. La neuroinflamación es una característica propia de diversas patologías e induce una desregulación del proceso neurogénico. La administración sistémica de lipopolisacárido (LPS) se ha usado ampliamente como modelo de inducción de inflamación en el cerebro. Esta respuesta neuroinflamatoria inducida por LPS promueve consistentemente una reducción en la tasa neurogénica neta. El grupo de trabajo en el que se llevó a cabo esta tesis ha demostrado previamente que 7 días (d) después de una única administración sistémica de LPS el perfil neuroinflamatorio continúa e induce una reducción sostenida en el número de células BrdU<sup>+</sup>/DCX<sup>+</sup>. Sin embargo, se desconoce si este efecto es consecuencia de la afectación de algún tipo de progenitor. Por lo tanto, en este trabajo se evaluó el efecto inducido por LPS en las diferentes subpoblaciones de progenitores neurales hipocampales. Para ello, se administró una inyección intraperitoneal (i.i.p.) de solución salina (1 ml/kg) o LPS (1 mg/kg) a ratones macho de 2 meses de edad y se sacrificaron 7 d después. Para la cuantificación de células progenitoras, se administraron 3 pulsos de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU, 50 mg/kg; 1 i.i.p./d) antes del sacrificio. Nuestros resultados muestran que: 1) el perfil neuroinflamatorio persiste después de 7 d de la administración de LPS, como se ha reportado anteriormente; 2) en animales a los que se les administró solución salina la mayor proporción de células BrdU<sup>+</sup> son progenitores tipo 2b y; 3) en condiciones neuroinflamatorias inducidas por LPS el número de células tipo 2b que proliferaron se ve reducido. Estos datos sugieren que las subpoblaciones de progenitores neurales responden de manera diferencial ante el mismo estímulo neuroinflamatorio. Asimismo, ya que los progenitores tipo 2b parecen contribuir en mayor proporción a la expansión de la poza de células, concluimos que la desregulación en la proliferación o sobrevivencia de este tipo de progenitores contribuye a la disminución en el número de nuevas neuronas que se observa 7 d después de la inducción de la neuroinflamación.

*Palabras clave:* neurogénesis, LPS, células progenitoras neurales, neuroinflamación

## INTRODUCCIÓN

Hasta antes de la segunda mitad del siglo XX, se consideraba como consenso en la comunidad neurocientífica que el desarrollo del cerebro se limitaba a un período crítico, que comprendía desde la etapa prenatal hasta la niñez y después permanecía relativamente sin cambios y con un número predeterminado de neuronas (Allen, 1912; Himwich, 1962). A pesar de que varios psicólogos y neurocientíficos postularon que los cambios en el cerebro de organismos adultos son fundamentales para el correcto desarrollo y funcionamiento cognitivo (James, 1890; Ramón y Cajal, 1913; revisado en Berlucchi & Buchtel, 2009), no fue hasta la década de los sesenta que diversos estudios demostraron que múltiples aspectos del sistema nervioso central (SNC) pueden ser modificados incluso en la etapa adulta (Bach-y-Rita, Collins, Saunders, White, & Scadden, 1969; Bliss & Lømo, 1973; Clark, Allard, Jenkins, & Merzenich, 1988; Diamond, Krech, & Rosenzweig, 1964; Merzenich et al., 1984). Este proceso, denominado plasticidad cerebral o neuroplasticidad, hace referencia al conjunto de mecanismos que generan cambios en la estructura y la función del cerebro (Merzenich, Nahum, & Van Vleet, 2013; Sweatt, 2016). Esta característica está presente en el SNC de diversas especies animales, incluido el ser humano, y ocurre desde los niveles molecular, sináptico y celular, hasta el nivel de mapas corticales (Jakovcevski et al., 2015; Obernier et al., 2018; Rocchetti et al., 2015; Zepeda, Sengpiel, Guagnelli, Vaca, & Arias, 2004). Asimismo, se han descrito diversos estímulos que promueven cambios plásticos en el cerebro, como procesos de aprendizaje, estímulos medioambientales, lesiones y patologías (Abs et al., 2018; Aguilar-Arredondo & Zepeda, 2018; Hüttenrauch, Salinas, & Wirths, 2016; Lim et al., 2018).

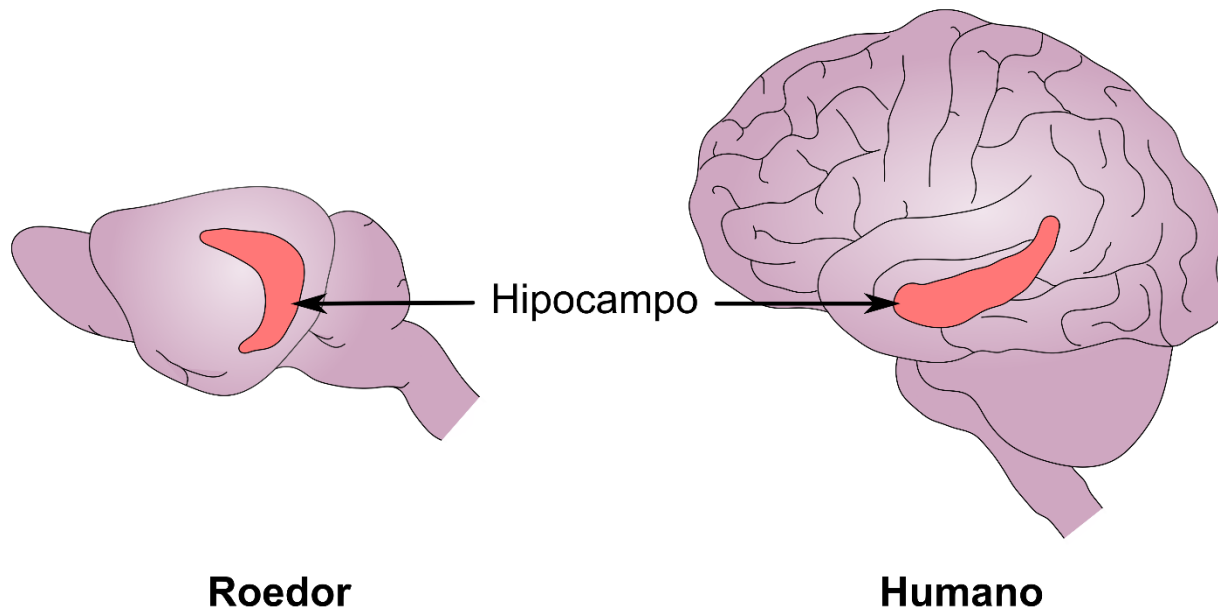
El proceso de generación de nuevas neuronas a partir de células troncales, también conocido como neurogénesis, en el SNC de organismos adultos es uno de estos procesos plásticos más recientemente identificados y su ocurrencia se ha descrito en diferentes zonas del cerebro de especies como peces (Birse, Leonard, & Coggeshall, 1980), reptiles (Lopez-García, Molowny, García-Verdugo, & Ferrer, 1988), aves (Goldman & Nottebohm, 1983) y mamíferos (Altman & Das, 1965), incluido el ser humano (Eriksson et al., 1998), aunque la evidencia en el tejido de estos últimos ha promovido



un gran debate en años recientes (Moreno-Jiménez et al., 2019; Sorrells et al., 2018). En mamíferos adultos se han descrito consistentemente dos áreas discretas del cerebro donde ocurre la generación de nuevas neuronas: la zona subventricular (ZSV) de las paredes de los ventrículos laterales (Altman, 1969; Lois & Alvarez-Buylla, 1993) y la zona subgranular (ZSG) del giro dentado (GD) del hipocampo (Altman & Das, 1965; Gould et al., 1999). La neurogénesis hipocampal es particularmente relevante debido a que contribuye al funcionamiento del GD y del hipocampo en general, además de que se ha asociado a diferentes procesos cognitivos, como ciertas formas de aprendizaje y memoria, regulación emocional y cognición temporal y espacial (revisado en Aimone et al., 2014; Cameron & Glover, 2015; Deng, Aimone, & Gage, 2010). En la siguiente sección se describirá la anatomía y conectividad general del giro dentado y posteriormente se profundizará en el papel de esta estructura como nicho neurogénico para finalmente detallar el proceso neurogénico.

### **Estructura y función del giro dentado del hipocampo**

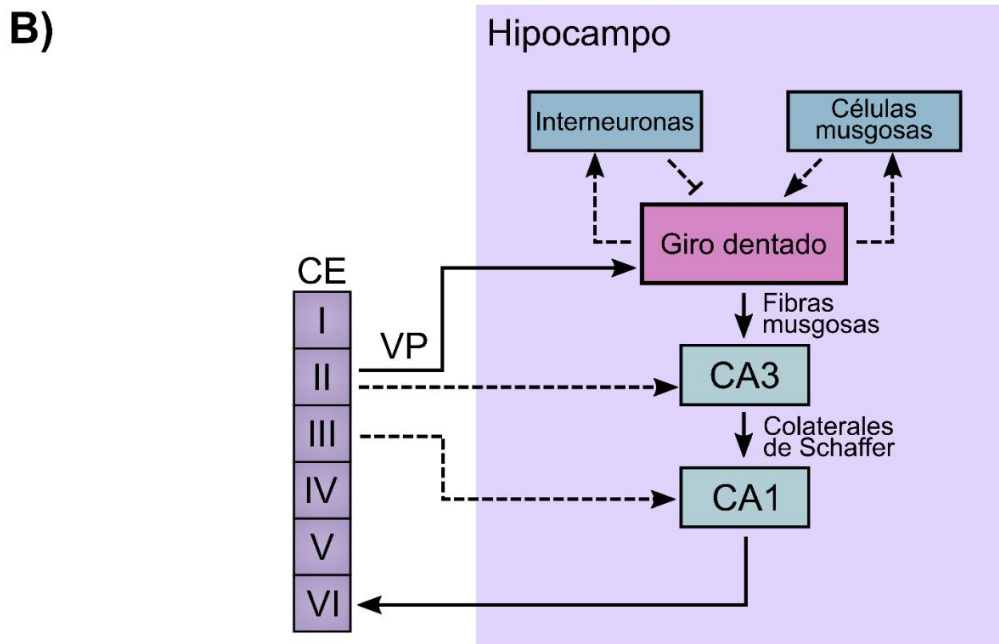
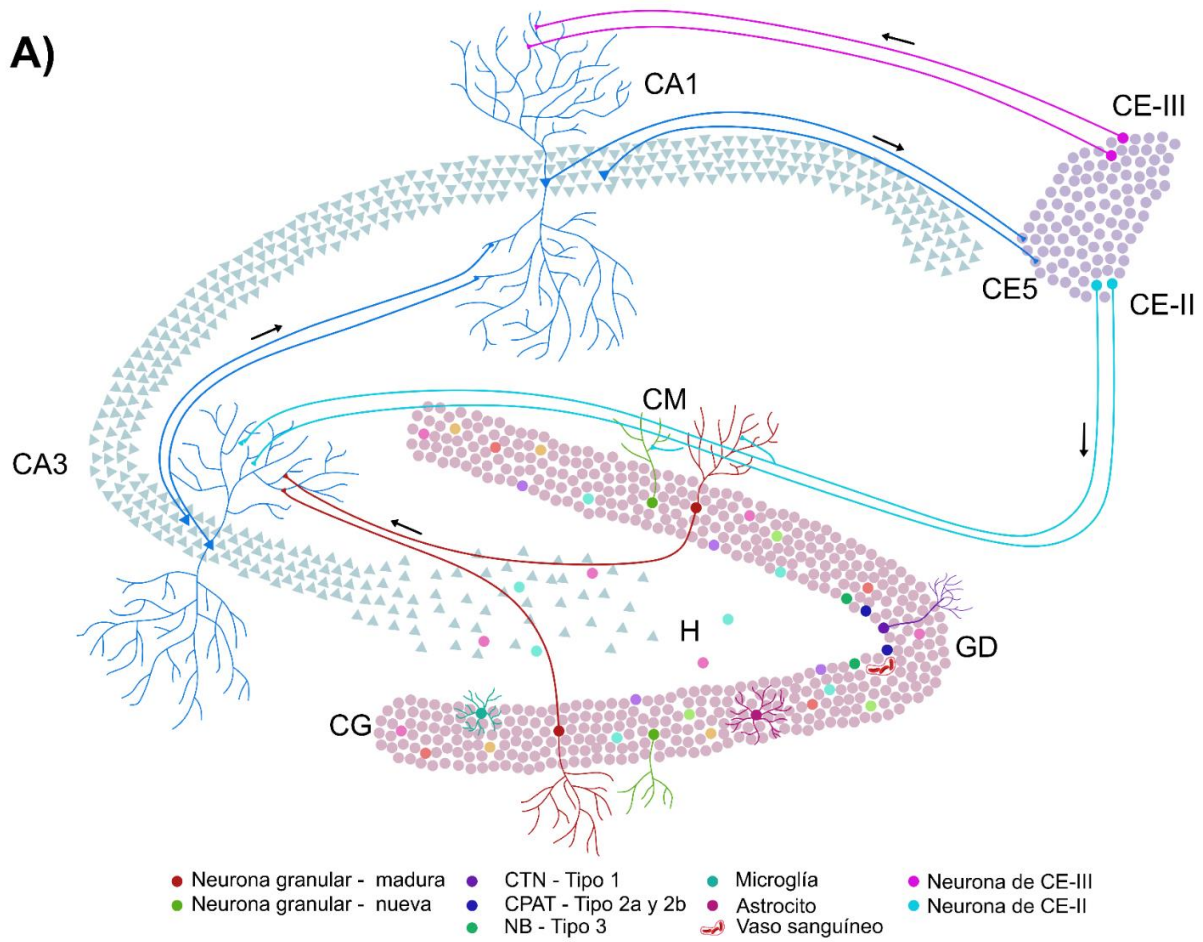
La ZSG, una de las dos regiones mejor descritas donde ocurre la generación continua células neuronales, se encuentra en el GD que, a su vez, es parte del hipocampo (**Fig. 1**). El GD es una estructura formada por tres capas o láminas distintas (**Fig. 2.A**) (revisado en Amaral, Scharfman, & Lavenex, 2007): 1) La capa molecular, que es una zona relativamente desprovista de células, donde se encuentran las prolongaciones dendríticas de las células granulares, algunas interneuronas y las fibras axónicas que forman la vía perforante proveniente de la corteza entorrinal (CE); 2) La capa granular (CG) que está formada en gran parte por los somas de neuronas granulares densamente empaquetadas, además de contener interneuronas piramidales conocidas como células de canasta, entre otras células. Esta capa puede dividirse en tres zonas, la lámina suprapiramidal, la lámina infrapiramidal y la cresta, donde se unen las dos láminas; 3) La capa polimórfica o hilus, que es la región más interna del GD y donde se encuentran las células musgosas que inervan a las dendritas de las neuronas de la CG en ambos



**Figura 1. Hipocampo en mamíferos adultos.** Esquema de la localización y morfología del hipocampo en los cerebros adultos de roedor y ser humano.

hemisferios, así como otro tipos de neuronas fusiformes e interneuronas. En esta zona se encuentran los axones de las neuronas de la CG, formando las fibras musgosas que se extienden hacia el área CA3 del hipocampo. El GD recibe proyecciones principalmente de la capa II de la CE y, en menor medida de las capas III, V y VI, a través de la vía perforante. La CE también envía y recibe proyecciones desde otras áreas del hipocampo, como CA1 (**Fig. 2.B**). De igual manera, se han observado vías de comunicación con el GD desde el núcleo septal, núcleos hipotalámicos y núcleos del tallo encefálico.

El GD recibe eferencias de diferentes modalidades sensoriales, como visual, olfativa, auditiva, vestibular y somatosensorial, provenientes de la corteza perirrinal y la CE lateral, también información espacial de las células *grid* de la CE dorsomedial (Coutureau & Di Scala, 2009; Hargreaves, Rao, Lee, & Knierim, 2005; Witter, Groenewegen, Lopes da Silva, & Lohman, 1989). El GD tiene la capacidad de procesar de manera conjunta los diversos estímulos percibidos, es decir, asociar a cada objeto un contexto, en función del espacio y otras características particulares (Kesner, Taylor, Hoge, & Andy, 2015). Asimismo, se ha asociado con la capacidad de transformar experiencias o eventos

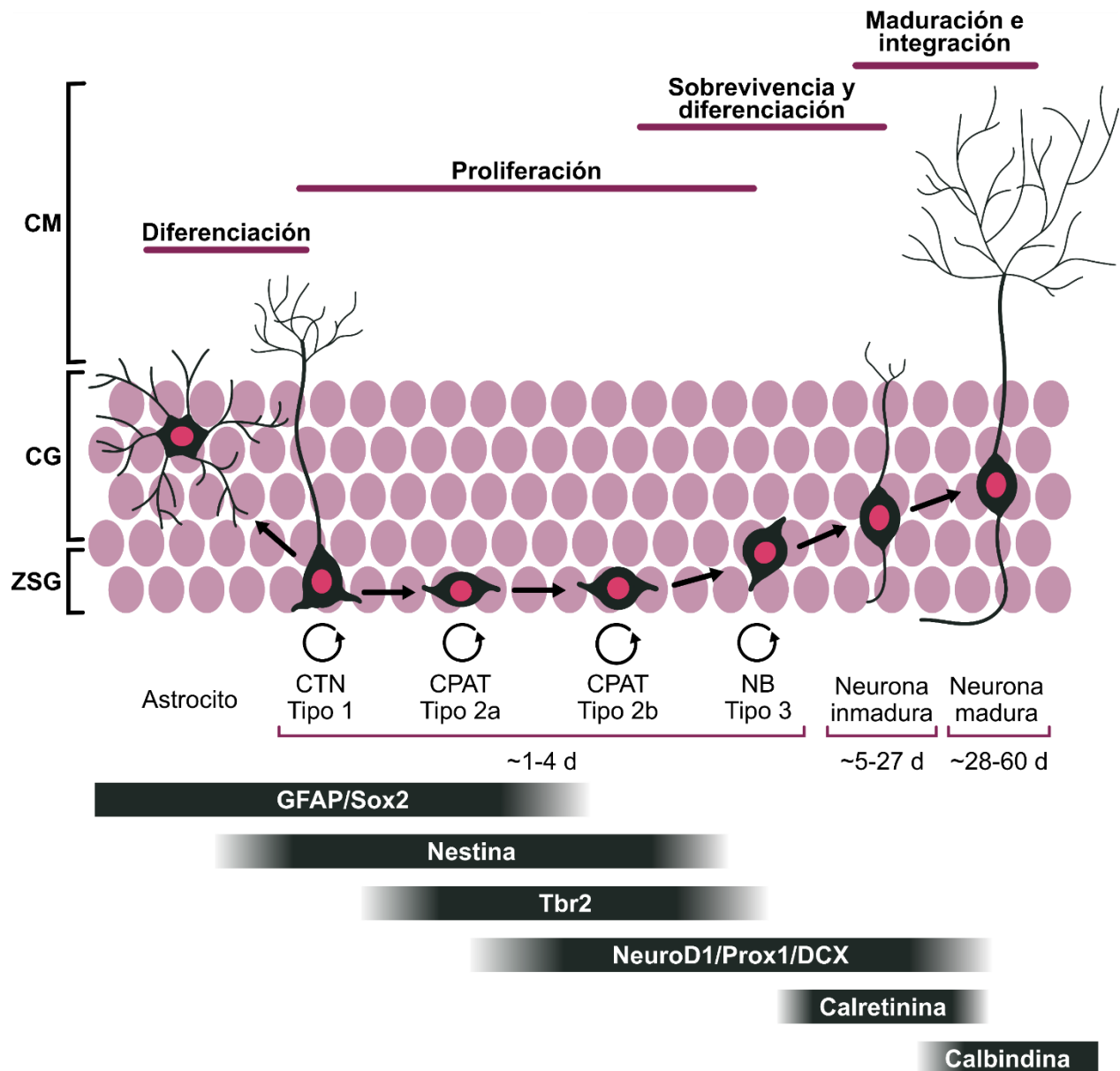


**Figura 2. Organización anatómica y conectividad del hipocampo. A)** Ilustración de la organización anatómica de las principales vías de comunicación entre las diferentes estructuras hipocámpales. Se representan las diferentes células que forman parte y regulan el proceso neurogénico hipocámpal (Modificado de Aimone, et al., 2014). Las flechas indican la dirección de los circuitos neurales. **B)** Esquema de la red neural hipocámpal. El giro dentado recibe aferencias principalmente de la capa II de la corteza entorrinal mediante la vía perforante, envía sus proyecciones hacia el área CA3, que a su vez envía sus axones hacia el área CA1. Por último, CA1 envía proyecciones hacia la capa VI de la corteza entorrinal, cerrando el *loop* hipocámpal. Las neuronas granulares del giro dentado también proyectan hacia interneuronas del hilus y células musgosas, que a su vez envían proyecciones inhibitorias y excitadoras, respectivamente, hacia las mismas neuronas granulares (Modificado de Deng, Aimone & Gage, 2010). GD, giro dentado; CM, capa molecular; CG, capa granular; H, hilus; CA1 y CA3, *Cornu ammonis* 1 y 3; CE, corteza entorrinal; VP, vía perforante; CTN, célula troncal neural; CPAT, célula progenitora de amplificación transitoria; NB, neuroblasto.

similares en representaciones distintas que no se superponen, una función conocida como separación de patrones. Se ha demostrado que el GD puede llevar a cabo este tipo de discriminación de estímulos en los niveles espacial, olfativo y contextual (Gilbert, Kesner, & Lee, 2001; Spanswick & Sutherland, 2010; Weeden, Hu, Ho, & Kesner, 2014; revisado en Kesner, 2018). Respecto al procesamiento de información contextual, más allá de la separación de patrones, también se ha demostrado la implicación del GD en procesos de aprendizaje y memoria dependientes de contexto (Aguilar-Arredondo & Zepeda, 2018; Lee & Kesner, 2004).

### **Zona subgranular del giro dentado**

La ZSG del GD es una región fina de células que se encuentra entre la CG y el hilus. Esta región contiene un microambiente en el que residen las células troncales neurales adultas y permite que ocurra la neurogénesis adulta, por lo que también es conocida como “nicho neurogénico” (**Fig. 3**). Este nicho está formado por componentes celulares, como las células troncales mismas, su progenie inmediata, neuronas granulares maduras e inmaduras y otros tipos neuronales, astrocitos, células endoteliales y células del sistema inmune, como macrófagos perivasculares y microglía (revisado en Aimone et al., 2014; Cope & Gould, 2019; Ekdahl, 2012; Song, Olsen, Sun, Ming, & Song, 2016); y componentes moleculares, como neurotransmisores, factores de crecimiento,



**Figura 3. Proceso de neurogénesis hipocampal adulta.** Esquema de las distintas etapas y tipos de células que conforman el proceso neurogénico. Se muestran la duración general de cada etapa y los marcadores moleculares comúnmente utilizados para la identificación de las diferentes fases del proceso, así como de la progresión de linaje. CM, capa molecular; CG, capa granular; ZSG, zona subgranular; CTN, célula troncal neural; CPAT, célula progenitora de amplificación transitoria; NB, neuroblasto; GFAP, *Glial fibrillary acidic protein*; Sox2, *Sex determining region Y-box protein 2*; Tbr2, *T-box brain protein 2*; NeuroD1, *Neurogenic differentiation factor-1*; Prox1, *Prospero homeobox protein 1*; DCX, Doblecortina.

morfógenos y hormonas, así como matriz extracelular (revisado en Berg, Belhoue, Song, & Simon, 2013; Choe, Pleasure, & Mira, 2016; Fournier & Duman, 2012; Mahmoud, & Wainwright, & Galea, 2016) & Simon, 2013; Choe, Pleasure, & Mira, 2016; Fournier & Duman, 2012; Mahmoud, & Wainwright, & Galea, 2016). En conjunto, dichos componentes promueven, en condiciones fisiológicas, que todas las fases del proceso neurogénico ocurran a una tasa y temporalidad altamente reguladas.

### **Neurogénesis hipocampal adulta**

La neurogénesis hipocampal adulta es una secuencia organizada de eventos moleculares y celulares que da inicio tras la activación de las células troncales y culmina con la generación de neuronas que se integran funcionalmente a circuitos preexistentes del GD. La caracterización de este proceso se remonta a los estudios pioneros que utilizaron timidina tritiada ( $^3\text{H-TdR}$ ), un radioisótopo que se incorpora a los núcleos de células en proliferación (Altman & Das, 1965; Kaplan & Hinds, 1977). Estos trabajos demostraron la existencia de células que se dividen en el hipocampo de mamíferos adultos, pero sin determinar realmente si eran células con linaje neuronal. No fue hasta la utilización del análogo de timidina BrdU (5-bromo-2'-desoxiuridina), que también se incorpora a células proliferantes, así como de técnicas avanzadas de inmunodetección y microscopía, que se permitió la identificación y seguimiento de linaje en células con actividad proliferativa en el GD (Kuhn, Dickinson-Anson, & Gage, 1996; Seki & Arai, 1993). La evaluación de marcadores endógenos de proliferación, como Ki67 o el antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA, por sus siglas en inglés), y de marcadores expresados por células a lo largo del proceso neurogénico, ha contribuido a comprender las distintas fases del proceso (Ben Abdallah, Slomianka, Vyssotski, & Lipp, 2010; Hodge et al., 2008; revisado en von Bohlen und Halbach, 2011). Actualmente, también se utilizan modelos transgénicos y técnicas de marcaje con retrovirus, que permiten el análisis morfológico y funcional a largo plazo de las células nacidas en la etapa adulta. (Cuartero et al., 2019; Ninkovic, Mori, & Götz, 2007).

En términos generales, se pueden identificar cuatro fases en el proceso neurogénico hipocampal: proliferación, diferenciación, sobrevivencia y maduración. En función de

características morfológicas y expresión de marcadores moleculares específicos, se pueden establecer al menos seis fenotipos celulares o etapas de desarrollo dentro del proceso neurogénico. El proceso inicia con la activación de las células troncales neurales (células tipo 1), que pueden dar origen a otra célula precursora idéntica o a una célula progenitora neural con mayor capacidad proliferativa (células tipo 2a y 2b). A su vez, estos progenitores pueden autorrenovarse o dar lugar a otro progenitor con un mayor compromiso de linaje (célula tipo 3 o neuroblasto), en conjunto, estos cuatro tipos celulares se conocen como células precursoras neurales (CPNs). Tras la salida de ciclo celular de los progenitores tipo 3, estos dan origen a una nueva neurona que madura y adquiere las características morfológicas y funcionales de una neurona granular glutamatérgica. (**Fig. 3**) (Revisado en Aguilar-Arredondo, Arias, & Zepeda, 2015; Kempermann, Song, & Gage, 2015). El proceso neurogénico ocurre de manera constitutiva, pero, como se describirá más adelante, se han identificado diversos eventos que pueden modularlo tanto a la alta como a la baja incidiendo en la plasticidad del GD y en la ejecución de tareas de aprendizaje y memoria dependientes de hipocampo.

## **Fases de proliferación y diferenciación de células precursoras neurales**

### ***Células tipo 1***

La neurogénesis hipocampal adulta da inicio con la activación de células precursoras con características propias de células troncales. Estas, conocidas como células troncales neurales (CTNs) adultas, células tipo glía radial o células tipo 1, son células que presentan una tasa baja de proliferación, es decir, son quiescentes (Lugert et al., 2010), tienen una capacidad de autorrenovación a largo plazo (Bonaguidi et al., 2011) y, al ser células multipotentes, pueden dar origen a astrocitos y neuronas (Bonaguidi et al., 2011; Gebara et al., 2016).

Las células tipo 1 hipocampales tienen una morfología radial, su soma se encuentra en la ZSG del GD y tienen un único proceso apical que se extiende desde la CG hacia la capa molecular, así como procesos pequeños orientados horizontalmente a lo largo de la ZSG (Gebara et al., 2016; Kosaka & Hama, 1986; Seri, García-Verdugo, Collado-

Morente, McEwen, & Alvarez-Buylla, 2004). Se ha descrito que estas células presentan propiedades características de astrocitos, como expresión de GFAP (del inglés *Glial fibrillary acidic protein*) y Vimentina. Este tipo celular tiene contactos directos con vasos sanguíneos y propiedades electrofisiológicas similares a las de los astrocitos (Filippov et al., 2003; Garcia, Doan, Imura, Bush, & Sofroniew, 2004; Moss et al., 2016; Palmer et al., 2000; Seri et al., 2004). Asimismo, estas células expresan marcadores asociados a células troncales, como los factores de transcripción Sox1 (del inglés *Sex determining region Y-box protein 1*), Sox2 (del inglés *Sex determining region Y-box protein 2*) Hes5 (del inglés *Hairy and enhancer of split 5*), Pax6 (del inglés *Paired box protein 6*), y Ascl1 (del inglés *Achaete-scute homolog 1*) y, las proteínas BLBP (del inglés *Brain lipid binding protein*), Nestina y Prominina 1 (Beckervordersandforth et al., 2014; Ellis et al., 2004; Gebara et al., 2016; Kim, Ables, Dickel, Eisch, & Johnson, 2011; Nacher et al., 2005; Seri et al., 2004).

El mantenimiento de la identidad de célula troncal y la quiescencia de las células tipo 1, son procesos esenciales para asegurar la ocurrencia de la neurogénesis a lo largo de la vida de los organismos. Las células tipo 1 tienen contactos con diversas células que residen en el GD, como neuronas, astrocitos, oligodendrocitos, microglía y células endoteliales de vasos sanguíneos (Gebara et al., 2016; Song et al., 2012). Asimismo, algunas vías de señalización, como las de Wnt (*Wingless-type MMTV integration site*), Notch, Shh (del inglés *Sonic hedgehog*) y BMPs (del inglés *Bone morphogenic protein*), así como del neurotransmisor GABA (del inglés *Gamma-aminobutyric acid*), están asociadas a la regulación del balance entre la quiescencia y proliferación de las células troncales. Estas vías de señalización regulan la expresión de genes asociados a la adquisición del linaje neuronal (Ables et al., 2010; Han et al., 2008; Jang et al., 2013; Mira et al., 2010; Song et al., 2012).



## ***Células progenitoras neurales***

### *Progenitores tipo 2*

Tras la activación y división asimétrica de las células tipo 1, estas dan lugar a células que forman parte de etapas consecutivas de progenitores intermedios con una alta tasa proliferativa y autorrenovación limitada. Estas células son conocidas como tipo 2 o células progenitoras de amplificación transitoria (CPATs). Debido a que presentan varias rondas de división simétrica, a estas células se les atribuye la expansión de la poza de células que continúan con el desarrollo de nuevas neuronas (Encinas, Vaahtokari, & Enikolopov, 2006; Kronenberg et al., 2003). Las células tipo 2 tienen una morfología distinta de las células tipo 1, ya que presentan un soma circular u ovalado, carecen de un proceso apical y tienen procesos que se extienden horizontalmente en la ZSG (Seki & Arai, 1993; Seri et al., 2004; Steiner et al., 2006).

Las células tipo 2 pueden categorizarse en dos subtipos, las células tipo 2a que continúan expresando marcadores moleculares asociados a las células tipo 1, como BLBP, Sox2, Nestina y Pax6 (Hodge et al., 2008; Kronenberg et al., 2003; Steiner et al., 2006), además de los factores de transcripción Ascl1, Ngn2 (Neurogenina 2) y Tbr2 (del inglés *T-box brain protein 2*) (Hodge et al., 2008; Kim et al., 2011; Roybon et al., 2009); y las células tipo 2b, que siguen expresando Nestina, además de marcadores moleculares como los factores de transcripción Tbr2, NeuroD1 (del inglés *Neurogenic differentiation factor 1*) y Prox1 (del inglés *Prospero homeobox protein 1*), así como las proteínas PSA-NCAM (del inglés *Polysialylated-neural cell adhesion molecule*) y DCX (doblecortina) (Hodge et al., 2008, 2012; Kronenberg et al., 2003; Steiner et al., 2006). Se ha propuesto que en la transición de células 2a a células 2b sucede el cambio más evidente hacia la adquisición de un linaje neuronal, ya que los progenitores tipo 2b comienzan a expresar factores de transcripción y otras proteínas que se han asociados a la generación y desarrollo de neuronas, como NeuroD1, Prox1, DCX y PSA-NCAM. Además, estas células ya no expresan marcadores relacionados con una identidad de célula precursora o troncal como BLBP o Sox2 (Kempermann et al., 2015).

Se ha descrito que los progenitores tipo 2a son la población de progenitores intermedios con la mayor actividad mitótica (Hodge et al., 2008; Kronenberg et al., 2003). Por lo tanto, el modelo prevalente actual postula que la amplificación de células en el GD ocurre mediante división simétrica de los progenitores tipo 2a y en menor medida mediante la división de progenitores tipo 2b y 3. Otros grupos de investigación, incluido en el que se llevó a cabo esta tesis, han propuesto que las células tipo 2b son las que contribuyen en mayor proporción a la expansión de la poza (Lugert et al., 2012). Estos resultados discordantes, pueden ser atribuidos a las dificultades técnicas que se presentan tanto en la evaluación de la temporalidad, como en la cuantificación del nacimiento de nuevas células desde la activación de las células precursoras, ya que la incorporación de marcajes retrovirales y de BrdU no se restringe a las CPNs y el seguimiento de linaje mediante modelos transgénicos carece de especificidad hacia los tipos celulares. Por lo anterior, resulta importante llevar a cabo análisis exhaustivos de la tasa proliferativa y de autorrenovación, así como de la contribución a la expansión de la poza, de las diferentes subpoblaciones de progenitores.

### *Progenitores tipo 3*

Los neuroblastos (NB) o células tipo 3 se originan tras la división de los progenitores tipo 2b. Estas células constituyen la última fase de proliferación celular del proceso neurogénico y representan la transición entre células progenitoras hacia neuronas postmitóticas inmaduras. Morfológicamente presentan un soma redondo, procesos más largos que los de las células tipo 2 y aumenta la proporción de células con una orientación vertical. Estas células ya no expresan marcadores moleculares asociados a las células tipo 1 (i.e. Nestina o Sox2) y continúan expresando marcadores relacionados con el desarrollo neuronal, como NeuroD1, Prox1, PSA-NCAM y DCX (Hodge et al., 2008; Kronenberg et al., 2003; Steiner et al., 2006). Aunque la migración celular en la CG da comienzo con las células tipo 2b, se observa un aumento en la tasa de migración en los NBs. Se ha reportado que este tipo celular migra de manera paralela a la ZSG siguiendo las paredes de los vasos sanguíneos que se encuentran en esta área (Seki, Namba, Mochizuki, & Onodera, 2007; Sun et al., 2015). Asimismo, se ha descrito que en la etapa

de progenitores tipo 3 ocurre la primera fase de sobrevivencia celular, debido a que se observan altos niveles de células apoptóticas PSA-NCAM<sup>+</sup> en los primeros días tras la división celular inicial aproximadamente 30-70% de las células continúa con el proceso de desarrollo neuronal (Cameron & McKay, 2001; Dayer, Ford, Cleaver, Yassaee, & Cameron, 2003; Kuhn et al., 2005; Sierra et al., 2010).

La actividad proliferativa, la diferenciación y sobrevivencia de todas las células progenitoras (tipo 2a, 2b y 3) son reguladas por diversos factores asociados al nicho neurogénico. Por ejemplo, algunos factores neurotróficos y de crecimiento, como VEGF (del inglés *Vascular endothelial growth factor*), BDNF (del inglés *Brain derived neurotrophic factor*), IGF-1 (del inglés *Insulin-like growth factor-1*) y FGF-2 (del inglés *Fibroblast growth factor-2*), tienen efectos reguladores sobre la proliferación, migración y sobrevivencia de CPNs. Por otra parte, la microglía y los astrocitos, células asociadas a la respuesta inmune en el SNC, influyen directamente sobre el proceso neurogénico, regulando cada una de las fases. Se ha demostrado que la microglía sensa constantemente el nicho y fagocita células progenitoras que no sobreviven (Sierra et al., 2010). Los astrocitos y las células microgliales liberan diversos factores que inciden sobre la tasa de proliferación y sobrevivencia (Cao et al., 2013; Kohman et al., 2012).

### **Fases de maduración e integración neuronal**

Los progenitores tipo 3, al salir de ciclo celular, generan neuronas granulares inmaduras, con una morfología redonda, una dendrita apical definida y una orientación vertical. Estas células migran radialmente distancias cortas posicionándose en la mitad interior de la CG (Espósito et al., 2005; Matthews et al., 2010; Sun et al., 2015). Las neuronas inmaduras se caracterizan por la expresión transitoria de la proteína de unión a calcio calretinina, así como el inicio de la expresión del marcador postmitótico neuronal NeuN (del inglés *Neuronal nuclei antigen*) (Brandt et al., 2003; Espósito et al., 2005). Además, algunos marcadores como NeuroD1, Prox1, PSA-NCAM y DCX aún se expresan en estas células (Espósito et al., 2005; Schmidt-Hieber, Jonas, & Bischofberger, 2004; Steiner et al., 2004).

En los primeros días tras la salida de ciclo celular, las neuronas comienzan a extender su axón hacia el hilus y consecutivamente hacia el área CA3 del hipocampo, integrándose a las fibras musgosas en la tercera semana de desarrollo. El axón alcanza su longitud máxima alrededor de la cuarta semana del nacimiento de la neurona (Sun et al., 2013; Zhao, Teng, Summers Jr, Ming, & Gage, 2006). Tanto el desarrollo como la maduración de los contactos sinápticos glutamatérgicos con células piramidales de CA3, interneuronas del hilus y células musgosas puede durar hasta 8 semanas, aunque las respuestas postsinápticas en CA3 se observan desde la segunda semana del nacimiento de la célula (Boyden, Zhang, Bamberg, Nagel, & Deisseroth, 2005; Gu et al., 2012; Li et al., 2005; Toni et al., 2008). Las neuronas jóvenes son inicialmente despolarizadas por GABA, debido a las altas concentraciones intracelulares de Cl<sup>-</sup>. Entre la segunda y cuarta semana después de su nacimiento, la respuesta a GABA de las nuevas neuronas cambia de despolarización a hiperpolarización, correlacionando con la extensión de dendritas hacia la vía perforante proveniente de la CE del hipocampo y el inicio de respuestas excitadoras ante glutamato (Espósito et al., 2005; Piatti et al., 2011; Toni et al., 2007; Zhao et al., 2006). Adicionalmente, se ha mostrado que en comparación con las neuronas maduras, las neuronas jóvenes presentan un umbral menor para la inducción de potenciación a largo plazo (LTP) y los niveles de potenciación sináptica están incrementados (Ge, Yang, Hsu, Ming, & Song, 2007; Schmidt-Hieber et al., 2004).

Durante las dos semanas posteriores a la salida de ciclo celular ocurre la segunda etapa de sobrevivencia celular, que está altamente regulada por los requerimientos de actividad del circuito hipocampal. En esta etapa las neuronas que no logran establecer conexiones con el área CA3 y la CE entran en un proceso de muerte apoptótica (Biebl, Cooper, Winkler, & Kuhn, 2000; Kuhn et al., 2005). Las neuronas que logran sobrevivir, aproximadamente un 3% (Ramirez-Amaya, Marrone, Gage, Worley, & Barnes, 2006), continúan con el proceso de maduración, cambian la expresión de calretinina por la de calbindina, prosiguen con la generación y desarrollo de contactos sinápticos y tras varias semanas llegan a ser indistinguibles electrofisiológicamente de cualquier neurona granular madura (Laplagne et al., 2007; Ramirez-Amaya, Marrone, Gage, Worley, & Barnes, 2006; revisado en Kempermann et al., 2015; Toni & Schinder, 2016).

## **Funciones de las nuevas neuronas en el giro dentado adulto**

El hecho de que las neuronas generadas en el GD adulto se integren a los circuitos preexistentes es un indicador de que estas nuevas células cumplen con alguna función asociada a dicha estructura. Los primeros estudios que evaluaron la función de la neurogénesis hipocampal adulta mostraron que al reducir este proceso mediante la administración de acetato de metilazoximetanol, un inhibidor del ciclo celular, a ratas adultas se observaba un déficit en una tarea de condicionamiento del miedo con demora (Shors et al., 2001; Shors, Townsend, Zhao, Kozorovitskiy, & Gould, 2002). Diversos estudios posteriores han asociado la generación de nuevas neuronas con procesos de aprendizaje y memoria dependientes de hipocampo (revisado en Cameron & Glover, 2015; Deng et al., 2010). Muchos de estos trabajos muestran que la reducción del proceso neurogénico, mediante métodos como irradiación o fármacos antimetabólicos, provoca un peor desempeño en tareas relacionadas con cognición espacial y contextual, como la prueba del laberinto acuático de Morris (Garthe, Behr, & Kempermann, 2009; Snyder, Hong, McDonald, & Wojtowicz, 2005; Zhang, Zou, He, Gage, & Evans, 2008), el laberinto de Barnes (Raber et al., 2004; Zhang et al., 2008), y condicionamiento del miedo al contexto (Drew, Denny, & Hen, 2010; Snyder et al., 2005; Winocur, Wojtowicz, Sekeres, Snyder, & Wang, 2006). Asimismo, se ha demostrado que al utilizar protocolos que aumentan la neurogénesis hipocampal, como el ejercicio físico y el ambiente enriquecido, el desempeño en estas mismas tareas mejora significativamente (Fan, Li, Zheng, Hua, & Zuo, 2016; Kohman et al., 2012; Marlatt, Potter, Lucassen, & van Praag, 2012).

Una de las funciones dependientes de GD que más se ha relacionado con la neurogénesis es la separación de patrones. Las neuronas granulares del GD codifican las aferencias provenientes de la CE formando representaciones independientes en función de la similitud de la información procesada, que posteriormente son relegadas al área CA3 del hipocampo (Leutgeb, Leutgeb, Moser, & Moser, 2007; McHugh et al., 2007). Se ha propuesto que la adición de nuevas neuronas en este circuito promueve la codificación de nueva información evitando la interferencia con representaciones generadas anteriormente, es decir, la discriminación de estímulos similares o separación

de patrones (Appleby & Wiskott, 2009; Clelland et al., 2009; McAvoy, Besnard, & Sahay, 2015).

### **Modulación de la neurogénesis hipocampal**

Como se ha mencionado anteriormente, en el nicho neurogénico existen interacciones complejas entre los diferentes componentes celulares y moleculares que permiten el nacimiento y desarrollo de las nuevas neuronas. La modificación en los niveles de estos componentes, su eliminación o la adición de uno nuevo tienen el potencial de modular las diferentes fases del proceso neurogénico y, por lo tanto, la tasa neta de nuevas neuronas que maduran y se integran a los circuitos hipocampales.

Se han identificado varios factores extrínsecos al organismo que tienen un impacto positivo sobre el proceso neurogénico en roedores. Por ejemplo, el ejercicio físico, generalmente correr en una rueda, promueve un aumento en la proliferación de las CPNs hipocampales y en algunos casos se observa una mayor sobrevivencia de las nuevas neuronas (Bednarczyk et al., 2011; Farioli-Vecchioli et al., 2014; van Praag, Christie, Sejnowski, & Gage, 1999). Mientras que el enriquecimiento ambiental, definido como estimulación sensorial y motriz que promueve un incremento de las interacciones sociales, experiencias de aprendizaje y ejercicio físico de los animales (Clemenson, Gage, & Stark, 2018), aumenta significativamente la sobrevivencia de las nuevas neuronas (Kempermann, Brandon, & Gage, 1998; Kempermann, Kuhn, & Gage, 1997; Monteiro, Moreira, Massensini, Moraes, & Pereira, 2014). La modulación de la neurogénesis adulta por los factores anteriormente mencionados, tiene un impacto, no solo sobre el número de nuevas neuronas que se generan, sino también sobre la funcionalidad de las mismas, pues se ha observado un mejor desempeño en tareas de aprendizaje y memoria dependientes de hipocampo tras la exposición a estos eventos (Garthe, Roeder, & Kempermann, 2016; Yau et al., 2011). Asimismo, se ha demostrado que ciertos tipos de daño al SNC, como isquemia, lesiones excitotóxicas y crisis epilépticas, incrementan la tasa neurogénica hipocampal (Aguilar-Arredondo & Zepeda, 2018; Kawai et al., 2004; Parent et al., 1997; Zepeda et al., 2013).

Por otra parte, también se han descrito eventos que disminuyen la neurogénesis hipocampal. El envejecimiento en roedores se ha asociado con un declive en diversas funciones cognitivas, incluidas las del hipocampo. Se ha demostrado que durante el envejecimiento la producción de nuevas neuronas disminuye significativamente, lo cual podría estar asociado al declive en la capacidad cognitiva (Bizon, Lee, & Gallagher, 2004; Morgenstern, Lombardi, & Schinder, 2008). Diversos trastornos neurodegenerativos también se han asociado a una disminución en capacidades cognitivas y a una reducción en la neurogénesis hipocampal. Por ejemplo, en modelos animales de la enfermedad de Alzheimer se observa una reducción en la proliferación, sobrevivencia y diferenciación de las células que nacen en el GD adulto (Cotel, Jawhar, Christensen, Bayer, & Wirths, 2012; Hamilton & Holscher, 2012; Krezymon et al., 2013). Efectos similares se han encontrado en modelos de la enfermedad de Parkinson (Suzuki et al., 2010; Winner et al., 2004, 2008).

Una característica que tienen en común los eventos antineurogénicos antes mencionados es la presencia de procesos inflamatorios en el cerebro, tanto en humanos como en modelos animales (Dobbs et al., 1999; Maeda et al., 2007; Sparkman & Johnson, 2008; Yuqiang et al., 2015). Diversos trabajos apuntan a que la neuroinflamación podría estar contribuyendo al deterioro cognitivo que se presenta en el envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas (Lourenco et al., 2013). En las siguientes secciones se profundizará sobre el proceso neuroinflamatorio, así como su efecto sobre la neurogénesis hipocampal y sus funciones.

## **Neurogénesis en un contexto neuroinflamatorio**

### **Neuroinflamación**

La inflamación es la respuesta del organismo ante un daño o patógeno, cuya función principal es destruir o aislar la causa de la alteración, remover el tejido dañado y restaurar el estado homeostático. En términos generales, el sistema inmune puede dividirse en dos subcategorías: el sistema inmune innato y el sistema inmune adaptativo (Iwasaki & Medzhitov, 2015; Kumar, Kawai, & Akira, 2011). El primero comprende a las células que

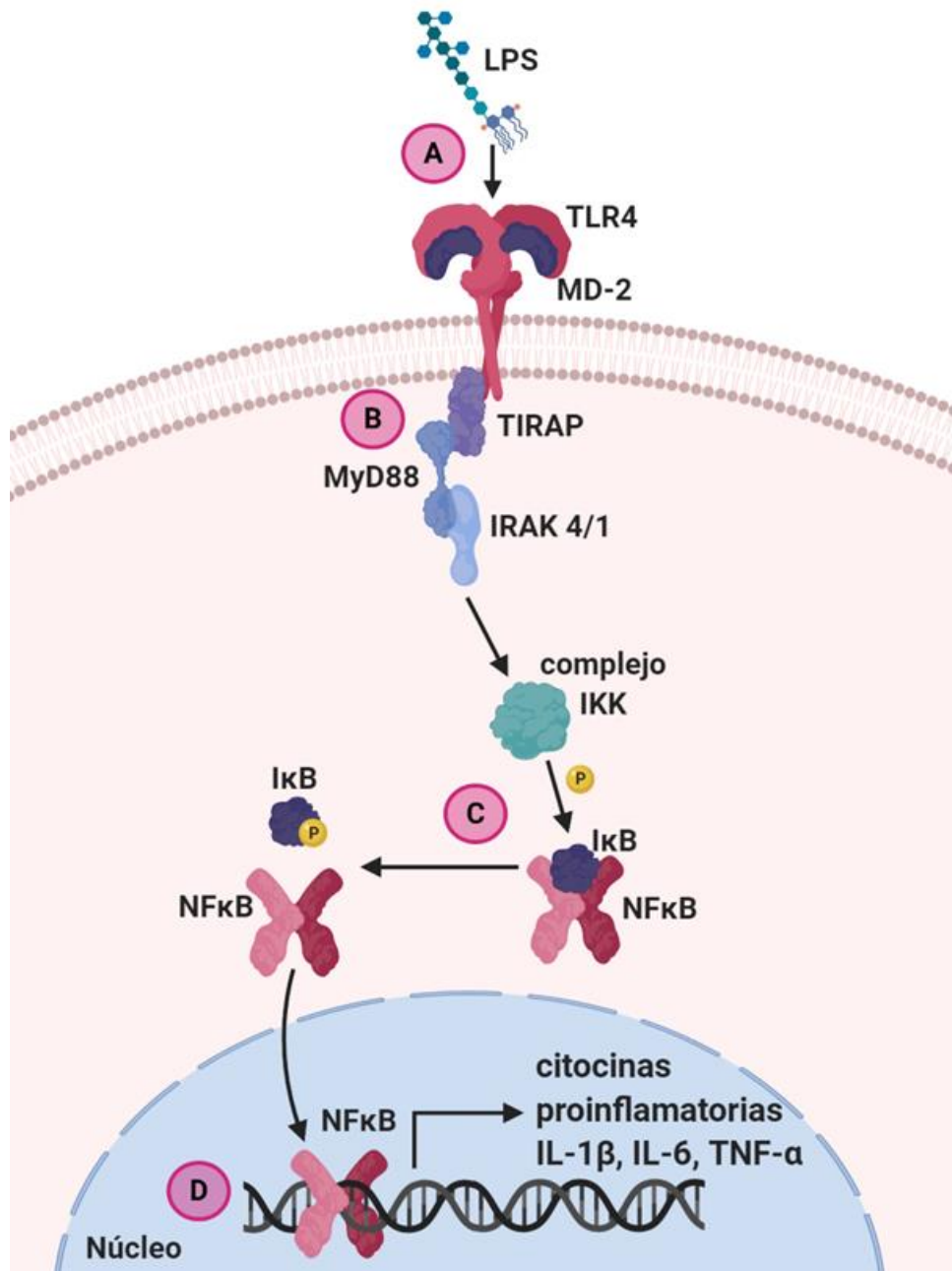
reconocen y responden a patógenos de manera inmediata e inespecífica. La activación de la respuesta innata promueve el reclutamiento de células inmunes al sitio de infección o daño, la activación del sistema del complemento y la remoción del agente que causa la alteración. Comúnmente, la respuesta neuroinflamatoria se ha asociado a este subsistema (Newton & Dixit, 2012). La respuesta del sistema inmune adaptativo consiste en el reconocimiento y generación de respuestas especializadas para la eliminación efectiva de un agente de daño o patógeno, así como el desarrollo de memoria inmune a largo plazo (Yatim & Lakkis, 2015).

Los procesos inflamatorios en el cerebro adulto se han asociado al inicio y desarrollo de distintas patologías neurológicas vinculadas a un declive cognitivo. La enfermedad de Alzheimer (EA) es el tipo de demencia más común en el mundo, alrededor de 50 millones de personas la padecen (OMS, 2018). En México se tiene registro de alrededor de 600,000 casos (Secretaría de Salud, 2016). La EA es un trastorno neurodegenerativo crónico caracterizado por un declive en diversas habilidades cognitivas, muerte neuronal y la presencia de dos marcadores histopatológicos: la formación de placas de  $\beta$ -amiloide y de marañas neurofibrilares (dos Santos Picanço et al., 2018). En cerebros de pacientes con EA se ha observado una activación prolongada de las células microgliales y astrocitos, posiblemente en respuesta a la presencia del péptido  $\beta$ -amiloide (Kinney et al., 2018; Osborn, Kamphuis, Wadman, & Hol, 2016). La enfermedad de Parkinson (EP) es otro tipo de enfermedad neurodegenerativa con una prevalencia de alrededor de 8 millones de personas en el mundo (OMS, 2019) y aproximadamente 60,000 en México (Instituto Mexicano del Seguro Social, 2018). Este trastorno se caracteriza por un déficit en el sistema motor asociado a la muerte de neuronas dopaminérgicas nigroestriatales y la presencia de cuerpos de Lewy, tal como un declive en funciones ejecutivas, memoria de trabajo y procesos de atención (Poewe et al., 2017). Asimismo, en el tejido cerebral de pacientes con EP se ha observado un aumento de procesos inflamatorios como astrocitosis y activación microglial en la sustancia nigra (Joshi & Singh, 2018). Por otra parte, uno de los trastornos neuropsicológicos es la depresión mayor, que afecta más de 264 millones de personas en el mundo (OMS, 2020) y alrededor de 5 millones en México (Secretaría de Salud, 2018). Este trastorno se caracteriza por una desregulación emocional y del estado de ánimo, pérdida de motivación y déficits neurocognitivos (Otte



et al., 2016). De la misma manera que en las enfermedades neurodegenerativas antes mencionadas, se han observado marcadores de activación inmune en el cerebro de pacientes diagnosticados con depresión mayor, como activación microglial y astrocítica, además de mayor actividad de macrófagos perivasculares (Leonard, 2018).

La neuroinflamación comprende una cascada de procesos inmunológicos, fisiológicos, bioquímicos y conductuales, que está mediada por la producción de citocinas, quimiocinas, compuestos lipídicos y especies reactivas de oxígeno (EROs). La respuesta neuroinflamatoria ocurre tras la activación de las células residentes del tejido cerebral con función inmune innata, es decir, de la microglía, también de los astrocitos y de las células del sistema inmune periférico infiltradas en el SNC (Engelhardt, 2008; Olson & Miller, 2004; Schiltz & Sawchenko, 2002; Yu & Lau, 2000). El primer paso de la cascada inflamatoria es el reconocimiento del estímulo desencadenante, generalmente infección o daño al tejido. Regularmente, esto sucede cuando se reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés), que son motivos moleculares expresados por patógenos específicos; o patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), moléculas endógenas que señalizan presencia de daño o necrosis y son reconocidas por el sistema inmune. Estos patrones moleculares pueden unirse a receptores de reconocimiento de patrones (RRPs), tales como los receptores tipo Toll (TLRs, por sus siglas en inglés), que se expresan en la microglía y los astrocitos (Bsibsi, Ravid, Gveric, & Van Noort, 2002). Tras el reconocimiento de estos ligandos, se activan vías de señalización que culminan en la activación de NF- $\kappa$ B (del inglés *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*). Este factor de transcripción se mantiene en un estado de inactivación al estar unido a una proteína inhibidora, I $\kappa$ B (del inglés *NF- $\kappa$ B inhibitor kinase*). Tras la transducción de la señal, NF- $\kappa$ B se activa y se transloca al núcleo, donde induce la expresión de citocinas proinflamatorias, como IL-1 $\beta$  (interleucina 1-*beta*), IL-6 (interleucina 6) y TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral *alpha*) (**Fig. 4**) (Bianchi, Giambanco, & Donato, 2010; Heyen, Ye, Finck, & Johnson, 2000; Matsusaka et al., 1993). Estas proteínas son los mediadores principales de la respuesta proinflamatoria y en conjunto con otras moléculas, como quimiocinas, reclutan células efectoras del sistema inmune, que a su vez sostienen la respuesta proinflamatoria manteniendo la liberación de citocinas, además de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, así



**Figura 4. Vía de señalización activada por LPS.** **A)** La cascada neuroinflamatoria da inicio tras el reconocimiento de la molécula de LPS por el complejo receptor TLR/MD-2; **B)** la transducción de la señal da inicio tras el reclutamiento de diversas proteínas adaptadoras, como TIRAP, MyD88, IRAK 4 e IRAK 1; **C)** posteriormente el complejo de cinasas IKK se activa y fosforila a la proteína inhibidora IκB activando al factor de transcripción NFκB; **D)** al ser activado, NFκB se transloca al núcleo e induce la expresión de citocinas proinflamatorias. LPS, lipopolisacárido; TLR4, Receptor tipo Toll 4; MD-2, *Myeloid differentiation protein 2*; TIRAP, *TIR domain containing adaptor protein*; MyD88, *Myeloid differentiation primary response protein 88*; IRAK 4/1, *Interleukin-1 receptor associated kinase 4/1*; IKK, *IκB kinase*; IκB, *Inhibitor of NFκB*; NFκB, *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*; IL-1β, interleucina 1-beta; IL-6, interleucina 6; TNF-α, factor de necrosis tumoral alpha.

como diversas proteinasas. Estas son moléculas destructivas tanto para el patógeno como para el organismo huésped (Lyman, Lloyd, Ji, Vizcaychipi, & Ma, 2014; Ramesh, Maclean, & Philipp, 2013). La respuesta proinflamatoria también puede ser inducida por medio de mecanismos asociados a otros receptores, como receptores tipo NOD y receptores a citocinas proinflamatorias (Chen, Shaw, Kim, & Nuñez, 2009; Chen & Goeddel, 2002). Finalmente, cierto tiempo después de iniciada la respuesta, inicia un programa coordinado de resolución de la inflamación en el cual se liberan citocinas antiinflamatorias y mediadores pro-resolución especializados (i.e. lipoxinas, maresinas, protectinas y resolvinas). En conjunto estos compuestos inhiben el reclutamiento de más células del sistema inmune y la producción de mediadores proinflamatorios, además de inducir la apoptosis de las células efectoras y la fagocitosis de las mismas y otros residuos celulares, permitiendo así la cicatrización del tejido dañado y el regreso a un estado homeostático (Hong, Gronert, Devchand, Moussignac, & Serhan, 2003; Schwab & Serhan, 2006; Xian et al., 2016; revisado en Serhan et al., 2007).

La microglía es una de las células principales que funcionan como efectoras y mediadoras de la neuroinflamación. Comúnmente, este tipo celular se describe como los macrófagos residentes del parénquima cerebral y se consideran parte del sistema inmune innato del SNC (Prinz & Priller, 2014; Yang, Han, Kaur, Crane, & Parsa, 2010). Se ha establecido que la microglía tiene un linaje distinto al de las otras células gliales que se encuentran en el tejido cerebral, pues se ha demostrado que células tipo macrófago se producen en el desarrollo embrionario a partir de células troncales hematopoyéticas del saco vitelino, que después migran hacia el tejido neural en desarrollo diferenciándose en células microgliales (Alliot, Godin, & Pessac, 1999; revisado en Ginhoux, Lim, Hoeffel, Low, & Huber, 2013). Mientras que astrocitos y oligodendrocitos se originan dentro del mismo tejido cerebral, a partir de células troncales neurales (revisado en Rowitch & Kriegstein, 2010).

En condiciones fisiológicas, las células microgliales se encuentran en un estado “inactivo”, en el que presentan una morfología altamente ramificada, somas circulares y expresan de manera constitutiva proteínas como Iba1 (del inglés *Ionized calcium-binding adapter molecule 1*), CD11b (del inglés *Cluster of differentiation molecule 11b*) y TMEM119 (del inglés *Transmembrane protein 119*) asimismo, presentan una regulación

a la baja de proteínas de activación como MHC II (del inglés *Major histocompatibility complex-II*) y CD68 (del inglés *Cluster of differentiation molecule 68*). En este estado, la microglía sensa constantemente su microambiente y migra a lo largo del tejido (Ginhoux et al., 2010; Ito et al., 1998; Nimmerjahn, Kirchhoff, & Helmchen, 2005; Sierra et al., 2010). Ya que las células microgliales expresan diferentes tipos de RRP y receptores de citocinas, estas tienen la capacidad de reconocer DAMPs, PAMPs y mediadores proinflamatorios (Olson & Miller, 2004; Pinteaux, Parker, Rothwell, & Luheshi, 2002). Cuando esto sucede y en función de la severidad del daño o infección, la microglía presenta en varios estados consecutivos y reversibles de activación, en los que el soma comienza a elongarse y los procesos se retraen, hasta que, en algunos casos, la microglía presenta una morfología ameboides y sin elongaciones aparentes (Boche, Perry, & Nicoll, 2013; Kreutzberg, 1996). La microglía puede presentar dos tipos de activación : M1 o activación clásica, en la que se producen y liberan mediadores proinflamatorios (citocinas proinflamatorias, prostaglandinas, EROs, etc.) y se considera como un estado que promueve neurotoxicidad y; M2 o activación alternativa, un estado que promueve la neuroprotección, ya que se producen y liberan mediadores antiinflamatorios (citocinas antiinflamatorias, factores de crecimiento, mediadores pro-resolución, etc.) (revisado en Orihuela, McPherson, & Harry, 2016; Tang & Le, 2016).

### **Neuroinflamación inducida por la administración sistémica de LPS**

En las últimas décadas el dogma de un SNC “inmuno-privilegiado” ha sido abandonado debido a diversos trabajos que han demostrado un conjunto de interacciones complejas entre los sistemas nervioso e inmune. La evidencia sugiere que el sistema inmune tiene un papel central en la regulación de la funcionalidad del cerebro, modulando procesos de aprendizaje y memoria, plasticidad sináptica y neurogénesis (Pribiag & Stellwagen, 2014; Trakhtenberg & Goldberg, 2011; Yirmiya & Goshen, 2011). En condiciones fisiológicas, algunos mecanismos inmunes son activados por estímulos ambientales, regulando positivamente la remodelación de circuitos neurales, promoviendo la consolidación de ciertos tipos de memoria, LTP en el hipocampo y el nacimiento de nuevas neuronas (Avital et al., 2003; Derecki et al., 2010; Ziv et al., 2006). En un contexto

de activación del sistema inmune, la producción de mediadores proinflamatorios interrumpe el balance necesario que permite que se lleven a cabo las acciones normales de dicho sistema y produce efectos negativos sobre los procesos neurológicos y conductuales antes mencionados (Cunningham et al., 2009; Di Filippo et al., 2013; Riazi et al., 2015).

Un modelo comúnmente utilizado para la inducción de procesos neuroinflamatorios es la administración sistémica de lipopolisacárido (LPS), que son endotoxinas presentes en la membrana exterior de bacterias Gram-negativas (Raetz & Whitfield, 2002). Una molécula de LPS está formada por un glucolípidio denominado lípido A, un heteropolisacárido denominado núcleo y el antígeno O (Schnaitman & Klena, 1993). El LPS es considerado un potente activador del sistema inmune innato, ya que el lípido A funciona como un PAMP y es reconocido, principalmente, por los receptores TLR4 (Fitzgerald, Rowe, & Golenbock, 2004; Poltorak et al., 1998), iniciando así las cascadas de señalización antes mencionadas y culminando con la producción de mediadores proinflamatorios (Lu, Yeh, & Ohashi, 2008; Zuckerman, Evans, & Guthrie, 1991). Se ha demostrado de manera consistente que la administración sistémica de LPS genera un estado inflamatorio en el parénquima cerebral (Cazareth, Guyon, Heurteaux, Chabry, & Petit-Paitel, 2014; Hines, Choi, Hines, Phillips, & MacVicar, 2013; Pardon, 2015; Qin et al., 2007; Skelly, Hennessy, Dansereau, & Cunningham, 2013) mediante diversos mecanismos que dan inicio tras la activación del sistema inmune periférico. Por ejemplo, los nervios aferentes vago y trigémino, activados por citocinas producidas localmente, pueden mediar la activación inmune del sistema límbico e hipotalámico (Diogenes, Ferraz, Akopian, Henry, & Hargreaves, 2011; Hosoi, Okuma, Matsuda, & Nomura, 2005; Laye et al., 1995; Yilmaz et al., 2008). Asimismo, algunos mediadores proinflamatorios pueden ingresar al tejido nervioso a través de la barrera hematoencefálica o generar su disrupción, provocando la infiltración de células del sistema inmune, como leucocitos, neutrófilos y macrófagos (Banks, 2005; Banks et al., 2015; Chen et al., 2003; Gurney, Estrada, & Rosenberg, 2006; Rummel, Inoue, Poole, & Luheshi, 2010). Algunas moléculas inflamatorias circulantes pueden ser transportadas por receptores solubles o difundir directamente hacia el SNC a través de los órganos circunventriculares (Harré et al., 2002; Pan et al., 2011).

En conjunto, la inflamación sistémica y central promueven cambios conductuales conocidos como *sickness behavior* o conducta asociada a malestar. Estos cambios incluyen anhedonia, pérdida de motivación por el consumo de alimentos y agua, lo que causa pérdida de peso, interacción social y conducta exploratoria disminuida, conducta tipo depresión, entre otros. Estos signos conductuales generalmente son transitorios y se resuelven en los días posteriores al reto inmunológico (Hines et al., 2013; Yirmiya et al., 2001).

Tras la administración sistémica de LPS se ha observado activación de células microgliales y astrocitos en diferentes estructuras cerebrales, incluido el hipocampo (Cazareth et al., 2014; Monje, Toda, & Palmer, 2003; Skelly et al., 2013). También se ha observado un aumento en la producción y liberación de citocinas, quimiocinas, especies reactivas de oxígeno y prostaglandinas (Skelly et al., 2013). Al administrar una única inyección de LPS se ha descrito un pico de producción de mediadores proinflamatorios pocas horas después del reto. Interesantemente, a pesar de que la producción de estas moléculas comienza a decaer después de dicho pico, aún se pueden observar varios días después mayores niveles en comparación con animales control (Cazareth et al., 2014; Pérez-Domínguez, Ávila-Muñoz, Domínguez-Rivas, & Zepeda, 2019; Qin et al., 2007). Este estado inflamatorio inducido por LPS tiene efectos negativos sobre la plasticidad sináptica en el hipocampo, además de afectar el desempeño en tareas de aprendizaje y memoria asociadas a esta estructura (Cunningham et al., 2009; Cunningham & Sanderson, 2008; Maggio, Shavit-Stein, Dori, Blatt, & Chapman, 2013).

### **Neuroinflamación y neurogénesis**

Tomando en cuenta que la administración de LPS genera un estado neuroinflamatorio a largo plazo y que se ha demostrado que tiene efectos negativos sobre la función del cerebro, diversos estudios han utilizado este modelo con el objetivo de evaluar cómo se modula el nacimiento de nuevas neuronas en el hipocampo de animales adultos. El primer trabajo con esta finalidad mostró que una única administración intraperitoneal de LPS a ratas hembra ocasionó una reducción significativa en el número de células BrdU<sup>+</sup>/DCX<sup>+</sup> incluso 7 d después de su administración y que este efecto podía revertirse

tras la administración de indometacina, un fármaco antineuroinflamatorio (Monje et al., 2003). Además, se ha demostrado consistentemente que la administración aguda de LPS genera una regulación a la baja de la neurogénesis, a nivel de proliferación y supervivencia de las nuevas células generadas. En ratas tratadas con LPS se ha reportado una disminución en las células que expresan pHH3 (Histona 3 fosforilada en la serina 10), un marcador endógeno de proliferación celular, a las 5 h después de una sola administración de LPS, indicando que las CPNs responden rápidamente a la neuroinflamación, así como una reducción en las células BrdU<sup>+</sup> hacia las 24 h posteriores a dicha administración (Fujioka & Akema, 2010). En otro trabajo, tras un tratamiento de una inyección diaria de LPS durante 5 d consecutivos y evaluando 3 h después de la última administración, se observó un decremento en el número de células BrdU<sup>+</sup>/DCX<sup>+</sup> y un aumento en los niveles del inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas p21 (Zonis et al., 2013). Esta proteína está implicada en el aumento en el arresto del ciclo celular, mediante la inhibición de diferentes complejos ciclina/CDK y PCNA (Karimian, Ahmadi, & Yousefi, 2016); así como en la disminución de procesos de muerte apoptótica, mediante la modulación de las vías de señalización de CDKs, de p53 y de caspasa 3 (Jänicke, Sohn, Essmann, & Schulze-Osthoff, 2007; Karimian et al., 2016). Se ha reportado que en diferentes modelos de administración a largo plazo (3-6 semanas) de LPS, la supervivencia de las nuevas neuronas se ve reducida y se mantiene afectada la proliferación de las células DCX<sup>+</sup> (Bastos, Moriya, Inui, Katura, & Nakahata, 2008; Ormerod et al., 2013; Valero, Mastrella, Neiva, Sánchez, & Malva, 2014). Cuando la administración de LPS es intracerebroventricular (i.c.v.) y crónica se observa una disminución en el número de células BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup>, indicando una afectación de la supervivencia de las nuevas neuronas generadas (Ekdahl, Claassen, Bonde, Kokaia, & Lindvall, 2003).

Los mecanismos celulares o moleculares mediante los cuales el LPS lleva a cabo sus efectos sobre la neurogénesis hipocampal no han sido del todo descritos. Se ha demostrado que algunas citocinas proinflamatorias específicas tienen un papel importante en la regulación del efecto sobre las diferentes etapas del proceso neurogénico (Revisado en Kohman & Rhodes, 2013; Pérez-Domínguez, Tovar-y-Romo, & Zepeda, 2018). En ratones transgénicos que sobreexpresan la citocina IL-6 se observa

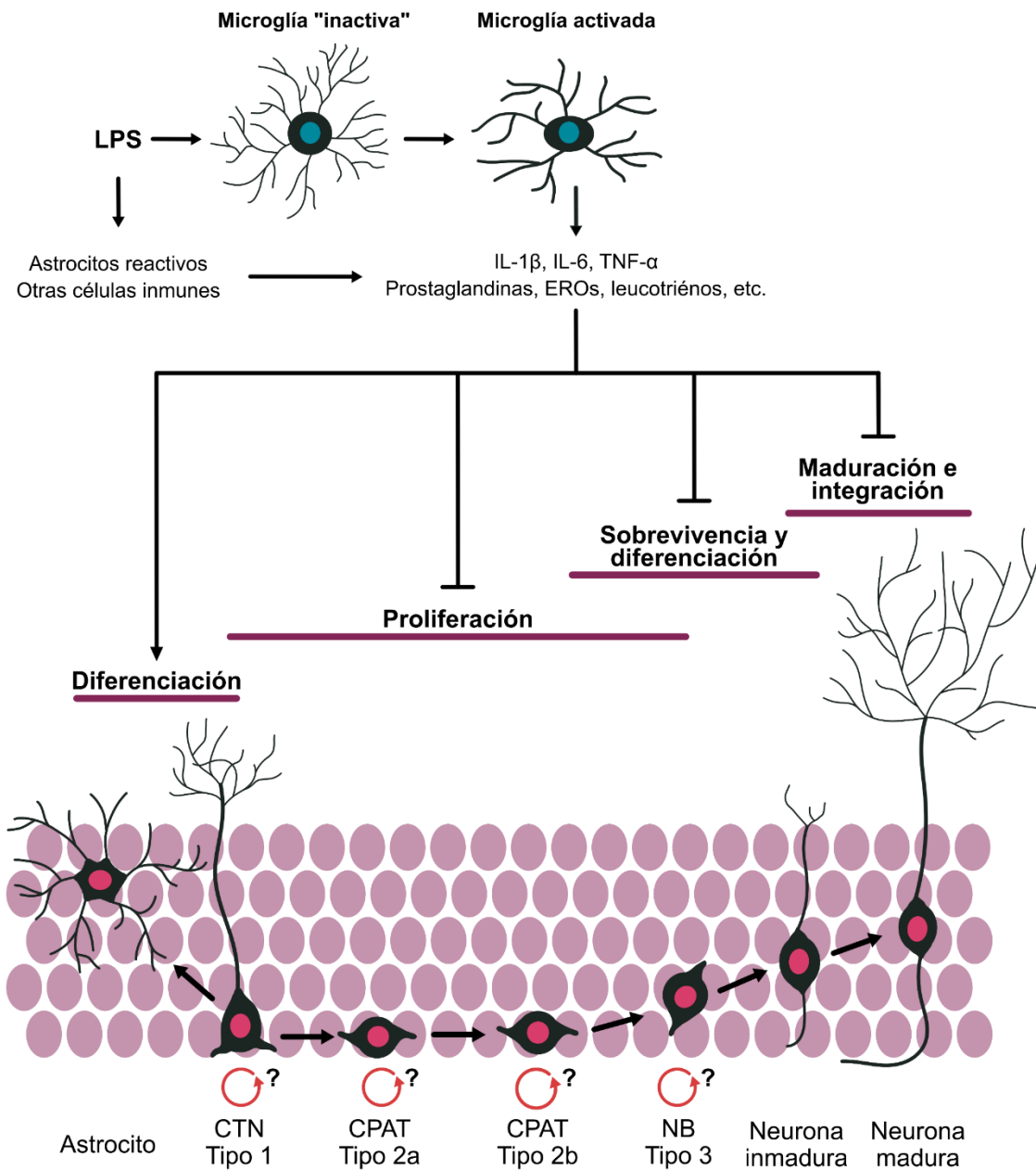
un decremento en la proliferación, diferenciación y sobrevivencia de las CPNs hipocampales (Valliéres, Campbell, Gage, & Sawchenko, 2002). Datos de un modelo *in vitro* en el que se expone a células tipo 1 hipocampales de rata adulta a IL-6 muestran una disminución en la producción de neuronas (Monje et al., 2003). Efectos antineurogénicos similares han sido reportados para TNF- $\alpha$ , en un modelo de administración sistémica con el que se demostró que esta citocina tiene un efecto negativo sobre la proliferación en el GD (Seguin, Brennan, Mangano, & Hayley, 2009). Asimismo, el tratamiento con TNF- $\alpha$  promueve una reducción de células DCX<sup>+</sup> y una afectación en la diferenciación neuronal y en el desarrollo de neuritas en modelos *in vitro* (Chen & Palmer, 2013; Keohane, Ryan, Maloney, Sullivan, & Nolan, 2010). Por otra parte, la administración i.c.v. de IL-1 $\beta$  produce una reducción en el número de células proliferantes en el GD adulto (Koo & Duman, 2008). En el hipocampo de ratones que sobreexpresan IL-1 $\beta$  de manera crónica se observa una reducción en la proliferación celular y un aumento en la diferenciación astrocítica (M. D. Wu, Montgomery, Rivera-Escalera, Olschowka, & O'Banion, 2013) (**Fig. 5**).

La mayoría de los trabajos mencionados que han utilizado la administración sistémica de LPS, han evaluado el efecto sobre la neurogénesis a corto plazo (2-24 h) o administrado las inyecciones de BrdU en intervalos muy cercanos a la inyección de LPS. Por lo tanto, los resultados obtenidos coinciden en el tiempo con la respuesta inflamatoria temprana, cuando el pico de expresión de mediadores proinflamatorios ocurre. En un estudio llevado a cabo por nuestro grupo de trabajo también se demostró que, después de una sola inyección de LPS y 4 d después administrar una inyección de BrdU por 3 d consecutivos, existe activación microglial y astrocítica, así como niveles elevados de IL-6, indicando que la respuesta proinflamatoria se mantiene 7 d después de la administración de LPS. Además, se observa una reducción en el número de células BrdU<sup>+</sup>/DCX<sup>+</sup>, demostrando que el efecto antineurogénico continúa en el tiempo incluso más allá del pico proinflamatorio (Pérez-Domínguez et al., 2019). En otro estudio de nuestro grupo se demostró mediante citometría de flujo que después de 7 d de administrar LPS por vía intraperitoneal hay una acumulación de células progenitoras Tbr2<sup>+</sup> totales y una disminución en el porcentaje de células Tbr2<sup>+</sup> en las fases S, G2 y M del ciclo celular, indicando una modificación en la temporalidad del ciclo celular o un



posible arresto del mismo en los progenitores tipo 2 (Melo-Salas, Pérez-Domínguez, & Zepeda, 2018).

Aun cuando se ha reportado una disminución en el número de células DCX<sup>+</sup> tras la administración sistémica de LPS, hasta el momento no se ha analizado la contribución de la modulación de la proliferación de cada una de las subpoblaciones de progenitores neurales a dicho efecto (**Fig. 5**).



**Figura 5. Modulación de la neurogénesis hipocampal adulta en un contexto proinflamatorio.** Moléculas asociadas a patógenos como LPS promueven la activación de las células microgliales y otras células del sistema inmune. En este contexto se producen y liberan en el nicho neurogénico mediadores proinflamatorios, como citocinas, especies reactivas de oxígeno (EROs) y otros. Este estado neuroinflamatorio tiene un efecto negativo sobre las diferentes etapas del proceso neurogénico. No se ha descrito cómo se ve afectada la proliferación de cada una de las subpoblaciones de progenitores neurales. LPS, lipopolisacárido; IL-1 $\beta$ , interleucina 1-*beta*; IL-6, interleucina 6; TNF- $\alpha$ , factor de necrosis tumoral *alpha*; CTN, célula troncal neural; CPAT, célula progenitora de amplificación transitoria; NB, neuroblasto.

## **JUSTIFICACIÓN**

La inflamación sistémica genera una respuesta neuroinflamatoria, la cual se ha vinculado al desarrollo de distintas patologías neurodegenerativas, así como a cambios en procesos plásticos en el cerebro y a una disminución en la producción de nuevas neuronas en el hipocampo adulto. Se ha demostrado que esto tiene como consecuencia la alteración en el desempeño en tareas específicas de aprendizaje y memoria. Se ha reportado que la neuroinflamación inducida por la administración sistémica de lipopolisacárido (LPS) genera cambios en la actividad proliferativa de progenitores neurales. Sin embargo, hasta el momento se desconoce en qué medida se afecta la actividad proliferativa de las diferentes poblaciones de células progenitoras que dan lugar a las nuevas neuronas granulares, es decir, células progenitoras tipo 2a, 2b y 3.

## **HIPÓTESIS**

La neuroinflamación hipocampal inducida por la administración sistémica de LPS en ratones adultos, inducirá una disminución en la proliferación de poblaciones específicas de células progenitoras neurales.

## **OBJETIVOS**

### **General**

Evaluar el efecto de la neuroinflamación sostenida inducida por LPS sistémico sobre las poblaciones de células progenitoras tipo 2a (BrdU<sup>+</sup>/Tbr2<sup>+</sup>/DCX<sup>-</sup>) y 2b (BrdU<sup>+</sup>/Tbr2<sup>+</sup>/DCX<sup>+</sup>), así como células tipo 3 y neuronas inmaduras (BrdU<sup>+</sup>/Tbr2<sup>-</sup>/DCX<sup>+</sup>) para conocer su contribución a la disminución del número de nuevas neuronas en el giro dentado del ratón adulto.

## Particulares

1. Validar la reproducibilidad del modelo de inflamación utilizado mediante la evaluación de la respuesta sistémica analizando parámetros como la prueba de campo abierto y la cuantificación del peso corporal.
2. Complementar la caracterización del perfil neuroinflamatorio inducido por la administración sistémica de LPS mediante inmunofluorescencia y análisis de contenido proteico del marcador microglial Iba1 y del precursor de IL-1 $\beta$  (pro-IL-1 $\beta$ ) en el hipocampo.
3. Evaluar el efecto de la neuroinflamación sostenida inducida por la administración sistémica de LPS en la proliferación de las poblaciones específicas de células progenitoras neurales hipocampales utilizando la estimación semiestereológica del número de células BrdU<sup>+</sup> que colocalizan con Tbr2 (células tipo 2a), Tbr2 y DCX (células tipo 2b) o DCX (células tipo 3 o neuronas inmaduras) mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal.

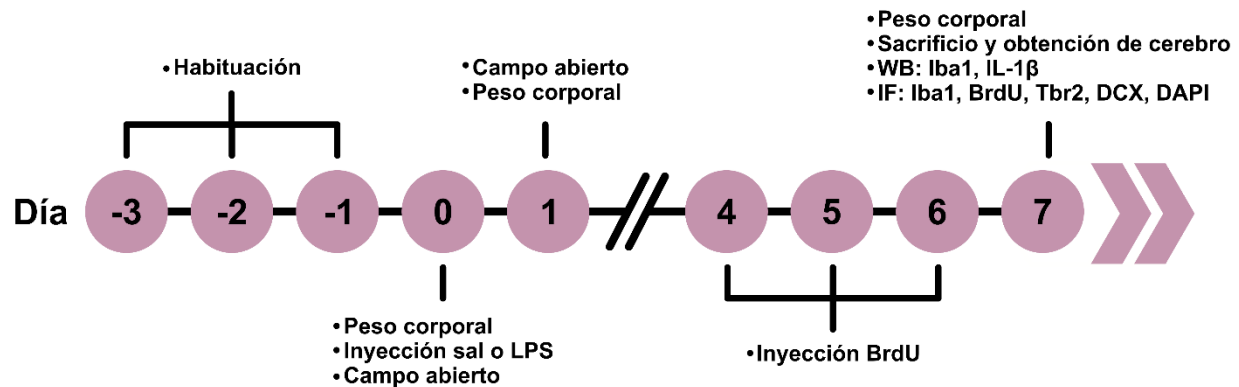
## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales

Se utilizaron ratones C57BL/6 machos de 8 semanas de edad, que se alojaron en caja estándar para ratón en grupos de 2-6 en una sala con ciclo invertido con fases luz/obscuridad de 12 horas (h) (luces encendidas a las 19:00 h), con acceso a comida y agua *ad libitum*. Los animales se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos experimentales en función del tratamiento administrado (solución salina o LPS). El manejo de los animales se hizo de acuerdo con los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

### Tratamiento

Con el objetivo de inducir neuroinflamación mediante la administración sistémica de LPS, el grupo experimental de ratones (n=7) recibió una inyección intraperitoneal (i.i.p.) de LPS de *Escherichia coli* (1 mg/kg; #L3129; serotipo O127:B8, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) disuelto en solución salina estéril (0.9% NaCl) y; el grupo control (n=7) recibió una i.i.p. de solución salina estéril (1 ml/kg; 0.9% NaCl). Se decidió utilizar dicha dosis de LPS, ya que se ha demostrado de manera consistente que induce un perfil proinflamatorio en roedores y modula negativamente el proceso neurogénico (Monje et al., 2003; Pérez-Domínguez et al., 2019). La administración se llevó a cabo en la fase oscura del ciclo de luz/obscuridad para todos los sujetos. Los animales se sacrificaron después de 7 d tras la administración de solución salina o LPS y se extrajo el cerebro para los análisis posteriores (**Fig. 6**).



**Figura 6. Diseño experimental.** Los 3 d anteriores al inicio del tratamiento se llevó a cabo un proceso de habituación al investigador. El día 0 se registró el peso corporal y se administró una inyección intraperitoneal de solución salina (1ml/kg) o LPS (1 mg/kg). 2 y 24 h después de la inyección se aplicó la prueba de campo abierto. Los días 4, 5 y 6 se administró una inyección intraperitoneal de BrdU (50 mg/kg). En el día 7 los animales fueron sacrificados y se llevaron a cabo los análisis. Sal, solución salina; LPS, lipopolisacárido; WB, *western blot*; Iba1, *Ionized calcium-binding adaptor molecule 1*; pro-IL-1 $\beta$ , precursor de Interleucina 1-*beta*; BrdU, 5-bromo-2'-desoxiuridina; Tbr2, *T-box brain protein 2*; DCX, Doblecortina; DAPI, 4',6-diamidino-2-fenilindol.

## Evaluación de parámetros de conducta asociada a malestar

### Peso corporal

Uno de los parámetros evaluados con el objetivo de validar algunos signos asociados a la inflamación inducida por la administración sistémica de LPS es el peso corporal. Los registros se llevaron a cabo antes de la administración de LPS (n=7) o solución salina (n=7) (d 0), así como 24 h (d 1) y 7 d (d 7) post-inyección.

### Conducta exploratoria

Con el fin de evaluar el estado general de los animales se analizó la actividad exploratoria espontánea utilizando para ello la tarea de campo abierto. Se colocó a cada ratón, de manera individual, en una esquina de una arena de campo abierto (hecha de acrílico, paredes y base blancas, 40 x 40 x 25 cm) dividida en 16 recuadros (10 x 10 cm) y se les permitió explorarla libremente durante 5 minutos (min). La actividad motora de cada

animal se videograbó y se registró el número de cruces (al menos la mitad del cuerpo) durante ese período. La arena se iluminó por un lado con luz roja y antes de cada ensayo se utilizó solución limpiadora (ver Apéndice A). Esta evaluación se llevó a cabo a las 2 y 24 h tras la administración de solución salina (n=3) o LPS.(n=3). Los ratones de todos los grupos se pre-expusieron a la arena de campo abierto durante 5 min 1 d antes de la evaluación. Esto con el fin de evitar que la conducta innata exploratoria de los ratones enmascarara el efecto del LPS. Con el objetivo de promover habituación al experimentador, todos los ratones se colocaron en el brazo del investigador y se les permitió explorar libremente durante 5 min por 3 d consecutivos antes de la evaluación conductual. Todos los procedimientos se llevaron a cabo durante la fase oscura del ciclo luz/obscuridad.

### **Administración de BrdU**

Con el objetivo de marcar e identificar nuevas células en la ZSG, se administró durante 3 d consecutivos previos al sacrificio una i.i.p. diaria de 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU; 50 mg/kg, #19-160, Sigma-Aldrich) disuelto en solución salina estéril (0.9% NaCl) precalentada a 60°C. Este protocolo de administración se utilizó para poder evaluar la proliferación de las células progenitoras en un contexto de neuroinflamación inducida por la administración sistémica de LPS.

### **Análisis de contenido proteico mediante *western blot***

Después de 7 d de la inyección de LPS (n=4) o solución salina (n=4), se administró a los ratones una sobredosis de pentobarbital sódico (210 mg/kg, Pisabental, PiSA Agropecuaria, Guadalajara, Jal., MEX). Se llevó a cabo la extracción del cerebro y se lavó con PBS frío (*Phosphate-buffered saline*, por sus siglas en inglés; ver Apéndice A). En seguida se disectó el hipocampo y se homogenizó en 600 µl de buffer de lisis (ver Apéndice A). Las muestras se sonicaron con 1 pulso de 40 A durante 10 segundos, se incubaron (30 min en hielo, con resuspensión cada 10 min) y se centrifugaron (13,000

rpm, 10 min a 4°C). Finalmente, los sobrenadantes proteicos se transfirieron a tubos nuevos y se mantuvieron a -20°C hasta su posterior procesamiento.

Con el fin de evaluar los niveles proteicos en hipocampo de la proteína Iba1 expresada por microglía y de pro-IL-1 $\beta$ , se llevó a cabo la técnica de *western blot* con muestras de animales sacrificados 7 d después de la administración de solución salina o LPS. Se cuantificaron las muestras mediante el método de Lowry modificado con el kit DC™ Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). Posteriormente, se mezclaron 60  $\mu$ g de muestra con buffer de carga Laemmli 2x (ver Apéndice A) y se cargaron en geles SDS-PAGE al 12% de poliacrilamida-tris-glicina (ver Apéndice A) para la separación de las proteínas por medio de electroforesis. Dichas proteínas se transfirieron a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) y se bloquearon durante 1 noche a 4°C con TBS (ver Apéndice A) con Tween 20 al 0.1% (TBS-T 0.1%) y leche en polvo libre de grasa al 5%. Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios anti-pro-IL-1 $\beta$  (1:2500, mouse, #AHC0612, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), anti-Iba1 (1:250, rabbit, #016-20001, Wako Chemicals, Richmond, VA, USA) y anti- $\beta$ -actina (1:8000, mouse, #A5316, Sigma-Aldrich) en solución de bloqueo (TBS-T 0.1% - leche 5%) durante 3 noches a 4°C. Posteriormente se hicieron tres lavados de 10 min con TBS-T 0.1% y se incubó con el anticuerpo secundario HRP (*horseradish peroxidase conjugated*) correspondiente: anti-mouse (1:1500, rabbit, #616520, Invitrogen, Waltham, MA, USA, para revelar la señal de pro-IL-1 $\beta$ ), anti-mouse (1:3000, rabbit, #616520, Invitrogen, para revelar la señal de  $\beta$ -actina) o anti-rabbit (1:3000, goat, #ab205718, Abcam) durante 1 noche a 4°C. Después, la señal se detectó empleando el sustrato Immobilon quimioluminiscente de HRP para transferencias “Western” (#WBKLS0500, Millipore, Burlington, MA, USA) y utilizando películas de luz BioMax (Carestream, Rochester, NY, USA). El análisis cuantitativo se llevó a cabo mediante el software FIJI (Versión v1.52k; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

### **Análisis por inmunofluorescencia**

7 d después de la inyección de LPS o solución salina, se administró a los ratones una sobredosis intraperitoneal de pentobarbital sódico (210 mg/kg) y se llevó a cabo una



perfusión transcárdica con solución salina (0.9% NaCl) y paraformaldehído al 4% (PFA 4%) disuelto en PB 0.1 M (*Sodium phosphate buffer*, ver Apéndice A) fríos. En seguida se extrajeron los cerebros y se mantuvieron en PFA 4% durante al menos 48 h. Posteriormente, los cerebros se deshidrataron en gradientes de sacarosa (15 y 30% en PB por 48 h cada uno) y finalmente se obtuvieron secciones coronales de 40  $\mu\text{m}$  con un criostato Microm™ HM550 (Thermo Fisher Scientific). Las secciones se mantuvieron en una solución de criopreservación (ver Apéndice A) a 4°C para su posterior procesamiento.

Con el objetivo de evaluar el número y distribución de células progenitoras que proliferaron en el GD en ambos grupos de animales (n=3 para cada grupo) y evaluar los cambios morfológicos a nivel cualitativo de las células microgliales (n=3 para cada grupo), se procesó el tejido para llevar a cabo un análisis tipo estereológico. Se utilizaron seis secciones coronales de cerebro seriadas (una de cada seis) con 240  $\mu\text{m}$  de separación entre cada una y el protocolo de inmunofluorescencia se llevó a cabo con el tejido en flotación. Inicialmente se hicieron tres lavados con PBS con Tritón-X al 0.1% (PBS-Tx 0.1%) y se permeabilizó durante 30 min con PBS-Tx 0.3%. Después, para la recuperación antigénica de las moléculas de interés, las secciones se transfirieron a buffer de citratos (ver Apéndice A) en ebullición durante 10 min y después durante 45 min a temperatura ambiente. Posteriormente, para la detección de BrdU se desnaturalizó el DNA con ácido clorhídrico (HCl) 1N a 37°C por 30 min, se neutralizó el pH con un lavado de 10 min con solución de borato de sodio 0.1 M pH 8.5 (ver Apéndice A) y se hicieron tres lavados con PBS. Después se hizo el bloqueo de reconocimiento inespecífico incubando el tejido en una solución de PBS-Tx 0.3% y 10% suero normal de caballo (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) a temperatura ambiente durante 2 h. Los anticuerpos primarios se incubaron durante tres noches en solución de bloqueo a 4°C: anti-Iba1 (1:250, rabbit, #019-19741, Wako Chemicals) para el análisis morfológico de microglía, anti-BrdU (1:500, mouse, #11 170 376 001, Roche, Basel, CHE) para la estimación de proliferación, anti-Tbr2 (1:200, rabbit, #ab23345, Abcam) y anti-DCX (1:250, goat, #sc-8066, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) para la estimación de células progenitoras. Después de cinco lavados con PBS-Tx 0.3% se incubaron los anticuerpos secundarios correspondientes en solución de bloqueo durante 1 noche a 4°C

y en oscuridad: Alexa Fluor 488 anti-goat (1:250, donkey, #A11055, Invitrogen), Alexa Fluor 555 anti-mouse (1:500, donkey, #A31570, Invitrogen), Alexa Fluor 647 anti-rabbit (1:500, donkey, #A31573, Invitrogen, para revelar la señal de Iba1) y Alexa Fluor 647 anti-rabbit (1:300, donkey, #A31573, Invitrogen, para revelar la señal de Tbr2). Los núcleos celulares se tiñeron mediante la incubación del tejido por 10 min en una solución de PBS con DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol, 1:500, #10 236 276 001, Roche). Finalmente se hicieron cinco lavados con PBS, se procedió a montar las secciones en laminillas pretratadas con poli-L-lisina (Sigma-Aldrich) y se aplicó medio de montaje para fluorescencia (#S3023, Dako).

### **Microscopía confocal y conteos celulares**

Para la detección y conteo de células BrdU<sup>+</sup>, Tbr2<sup>+</sup>, BrdU<sup>+</sup>/Tbr2<sup>+</sup>/DCX<sup>-</sup>, BrdU<sup>+</sup>/Tbr2<sup>+</sup>/DCX<sup>+</sup> y BrdU<sup>+</sup>/Tbr2<sup>-</sup>/DCX<sup>+</sup>, así como células microgliales Iba1<sup>+</sup>, se utilizó el microscopio confocal Nikon A1R+STORM (Nikon Corporation, Tokio, JPN). Se empleó un objetivo 40x de inmersión en aceite y la captura de imágenes digitales se llevó a cabo con el programa NIS Elements – Microscope Imaging Software (Nikon Corporation). La adquisición de las imágenes de células microgliales se realizó con un espejo resonante obteniendo reconstrucciones ópticas en el plano “z” con un grosor de 25.2 μm, con un total de 63 cortes ópticos con 0.4 μm de separación entre cada uno. El análisis morfológico cualitativo se llevó a cabo tras obtener una proyección de suma con el software FIJI. La adquisición de las imágenes de CPNs se realizó con un espejo galvanométrico obteniendo reconstrucciones ópticas en el plano “z” con un grosor de 21 μm, con un total de 15 cortes ópticos con 1.4 μm de separación entre cada uno. Las estimaciones tipo estereológicas se llevaron a cabo en una de cada seis secciones coronales a lo largo del eje anteroposterior del hipocampo dorsal; el análisis se llevó a cabo en cinco regiones de interés por cada GD: un campo en la cresta, dos en la lámina suprapiramidal y dos en la lámina infrapiramidal. Los campos se eligieron utilizando como criterio la detección del mayor número de células BrdU<sup>+</sup> en todos los casos, con el fin de cuantificar la mayor cantidad posible de células progenitoras que proliferaron tras la administración de BrdU. Mediante una proyección ortogonal en el software FIJI, se

consideró a una célula como tal si aparecía en al menos dos cortes ópticos adyacentes. Las estimaciones celulares se obtuvieron tras multiplicar el número total de células cuantificadas por seis.

### **Análisis estadísticos**

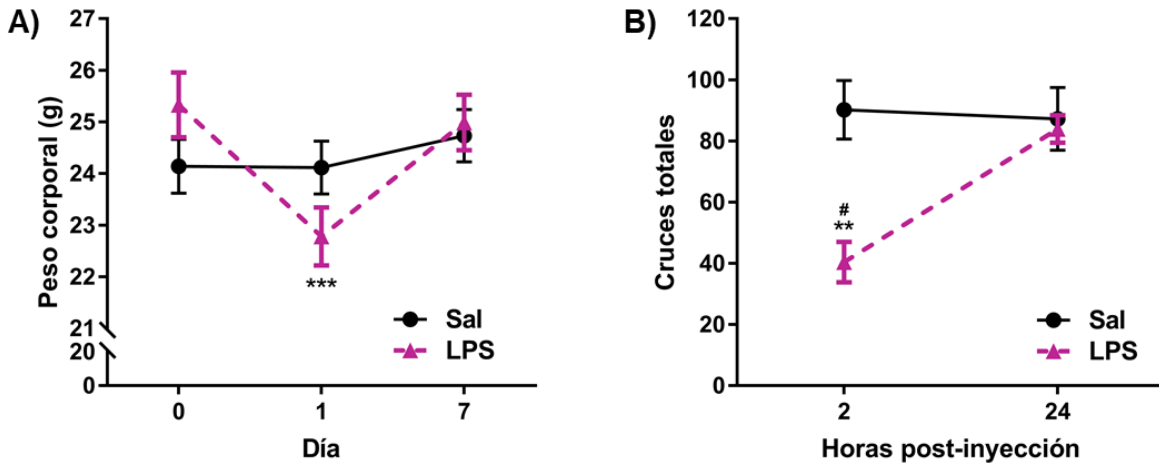
Todos los análisis se hicieron con el paquete estadístico Statistica (Versión 12.5) y todas las gráficas con el lenguaje de programación R (Versión 3.5.1) con el software RStudio (Versión 1.1.456). Todos los valores se expresan como media  $\pm$  error estándar de la media (EEM). Se corroboró que todos los datos se distribuyeran normalmente y presentaran homogeneidad de varianzas. Posteriormente se llevó a cabo la prueba paramétrica ANOVA mixto para los datos de peso corporal y campo abierto y, la prueba *t* de Student para pruebas independientes para el resto de los conjuntos de datos. Las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS

### Disminución transitoria en el peso corporal y conducta exploratoria tras la administración de LPS

Con el objetivo de evaluar parámetros sistémicos asociados a la inflamación inducida por LPS, se registraron el peso corporal y la actividad espontánea en la prueba de campo abierto después del tratamiento. En el análisis de peso, un ANOVA mixto reveló un efecto significativo del día de la evaluación ( $F_{(2,42)} = 60.35$ ,  $p < 0.0001$ ), así como una interacción significativa entre el día y tratamiento ( $F_{(2,42)} = 40.45$ ,  $p < 0.0001$ ). 1 d después la administración de LPS se observó una disminución significativa en el peso de los animales en comparación con la evaluación previa a la inyección (LPS D0  $25.333 \pm 0.629$  g vs LPS D1  $22.783 \pm 0.561$  g;  $p < 0.0001$ , prueba *post-hoc* de Bonferroni) y se observó una recuperación en el peso corporal 7 d tras el tratamiento (LPS D0  $25.333 \pm 0.629$  g vs LPS D7  $24.992 \pm 0.537$  g;  $p = 1.0$ , prueba *post-hoc* de Bonferroni) (**Fig. 7.A**). Estos datos sugieren que la administración de LPS genera una respuesta a nivel sistémico que se ve reflejada en la pérdida transitoria de peso corporal.

Respecto a la conducta exploratoria, las evaluaciones en la prueba de campo abierto se hicieron 2 h post-inyección y 24 h post-inyección. Un ANOVA mixto reveló un efecto significativo del tratamiento ( $F_{(1,4)} = 28.20$ ,  $p = 0.006$ ), así como del tiempo de evaluación ( $F_{(2,8)} = 96.49$ ,  $p < 0.0001$ ), también se observó una interacción significativa entre los dos factores ( $F_{(2,8)} = 21.17$ ,  $p = 0.0006$ ). En el grupo tratado con LPS, 2 h después del tratamiento se registró un menor número de cruces en comparación con el número de cruces a las 24 h (LPS 2h  $40.4 \pm 6.675$  cruces vs LPS 24h  $84.0 \pm 4.509$  cruces;  $p = 0.024$ , prueba *post-hoc* de Bonferroni) y con los cruces del grupo control (Sal 2h  $90.25 \pm 9.551$  cruces vs LPS 2h  $40.4 \pm 6.675$  cruces;  $p = 0.005$ , prueba *post-hoc* de Bonferroni) (**Fig. 7.B**). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos control y experimental a las 24 h (Sal 24h  $87.25 \pm 10.299$  cruces vs LPS 24h  $84.0 \pm 4.509$  cruces;  $p = 1.0$ , prueba *post-hoc* de Bonferroni). En conjunto, los resultados de peso corporal y conducta locomotora indican que una única i.i.p. de LPS induce una disminución transitoria en parámetros sistémicos relacionados a conducta asociada a malestar.

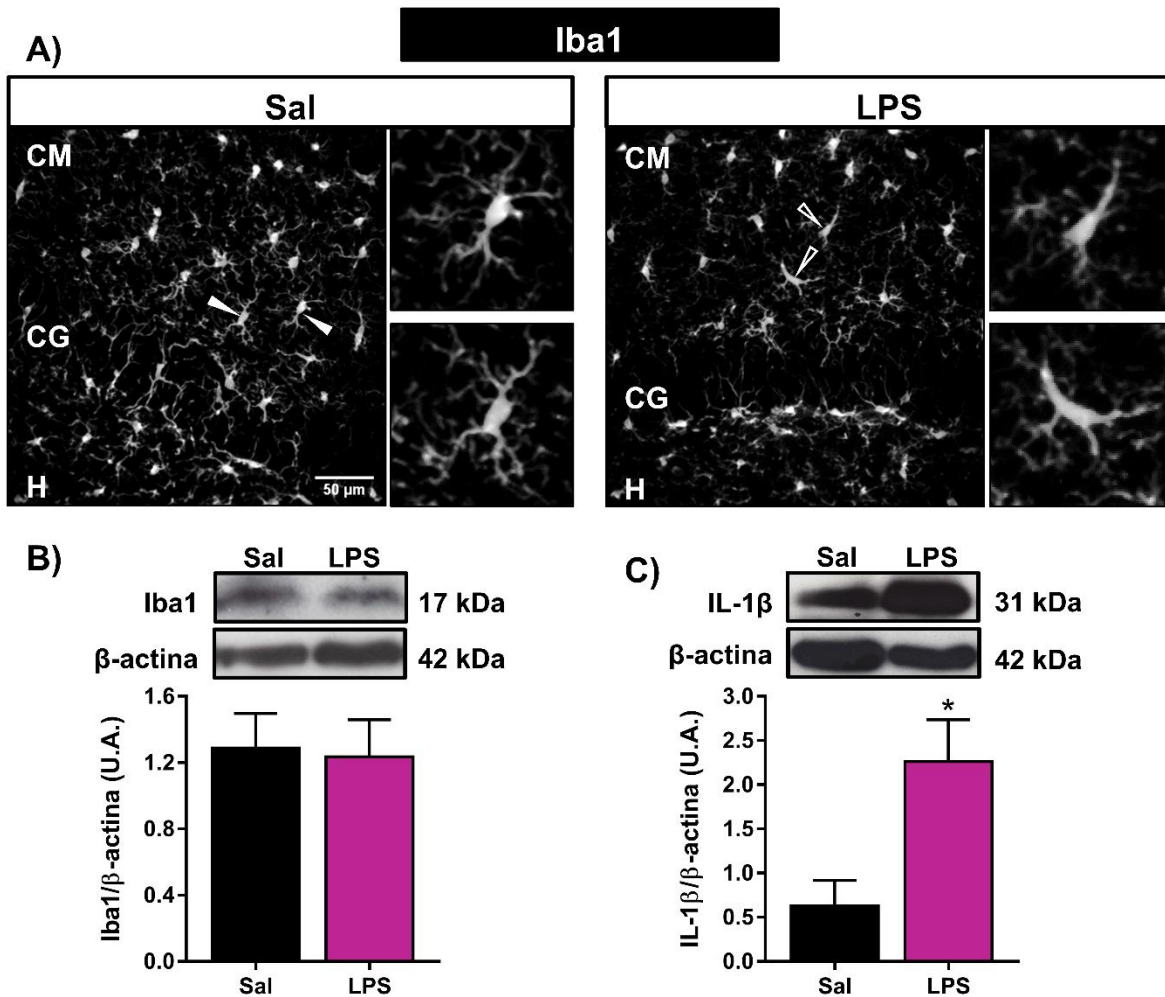


**Figura 7. La administración de LPS promueve una disminución transitoria en parámetros de conducta asociada a malestar. A)** Evaluación de peso corporal a los 0, 1 y 7 d tras la administración de solución salina o LPS. (n= 11-12, ANOVA mixto, prueba *post-hoc* de Bonferroni. \*\* p<0.01, Sal 2h vs LPS 2h; # p<0.05, LPS 2h vs LPS 24h). **B)** Cuantificación de cruces totales en la prueba de campo abierto a las 2 y 24 h tras la administración de solución salina o LPS. (n = 3 para ambos grupos, ANOVA mixto, prueba *post-hoc* de Bonferroni. \*\*\*p < 0.001). Las gráficas representan la media ± EEM. Sal: solución salina; LPS: lipopolisacárido; ANOVA: análisis de varianza.

## Perfil proinflamatorio tras la administración de LPS

### Respuesta microglial

Para evaluar la respuesta de la microglía 7 d después de la administración sistémica de LPS se llevó a cabo el análisis morfológico cualitativo de la activación microglial en el GD y un análisis del contenido proteico de Iba1 en hipocampo total. En animales tratados con solución salina se observó que la microglía presenta somas pequeños y procesos delgados y altamente ramificados, esta morfología se ha asociado a un estado de inactivación. En contraste, en el grupo tratado con LPS se observó a la microglía con somas alargados y procesos más gruesos, así como menor número de ramificaciones, características propias de un estado de activación de las células microgliales. (**Fig. 8.A**). Al comparar a los dos grupos en el contenido proteico de Iba1 no se observaron diferencias significativas ( $p = 0.87$ , *t* de Student) (**Fig. 8.B**). Estos datos indican que la



**Figura 8. La administración de LPS promueve activación microglial y un aumento de pro-IL-1 $\beta$ .** **A)** Imágenes de microscopía confocal que muestran la inmunofluorescencia de Iba1. Magnificaciones digitales de las células señaladas con las cabezas de flecha. **B)** Inmunoblot representativo y gráfica del análisis de contenido proteico de Iba1. Los niveles de la proteína fueron normalizados con  $\beta$ -actina. **C)** Inmunoblot representativo y gráfica del análisis de contenido proteico de pro-IL-1 $\beta$ . Los niveles de la proteína fueron normalizados con  $\beta$ -actina. Las gráficas representan la media  $\pm$  EEM. n=4, prueba *t* de Student, prueba *post-hoc* de Bonferroni. \**p* < 0.05. Sal: solución salina; LPS: lipopolisacárido; CM: capa molecular; CG: capa granular; H: hilus.

activación microglial se mantiene 7 d después de la administración de LPS y que en esta ventana temporal no parece haber una mayor síntesis de la proteína Iba1 o un mayor número de estas células en el hipocampo.

## Niveles de pro-IL-1 $\beta$

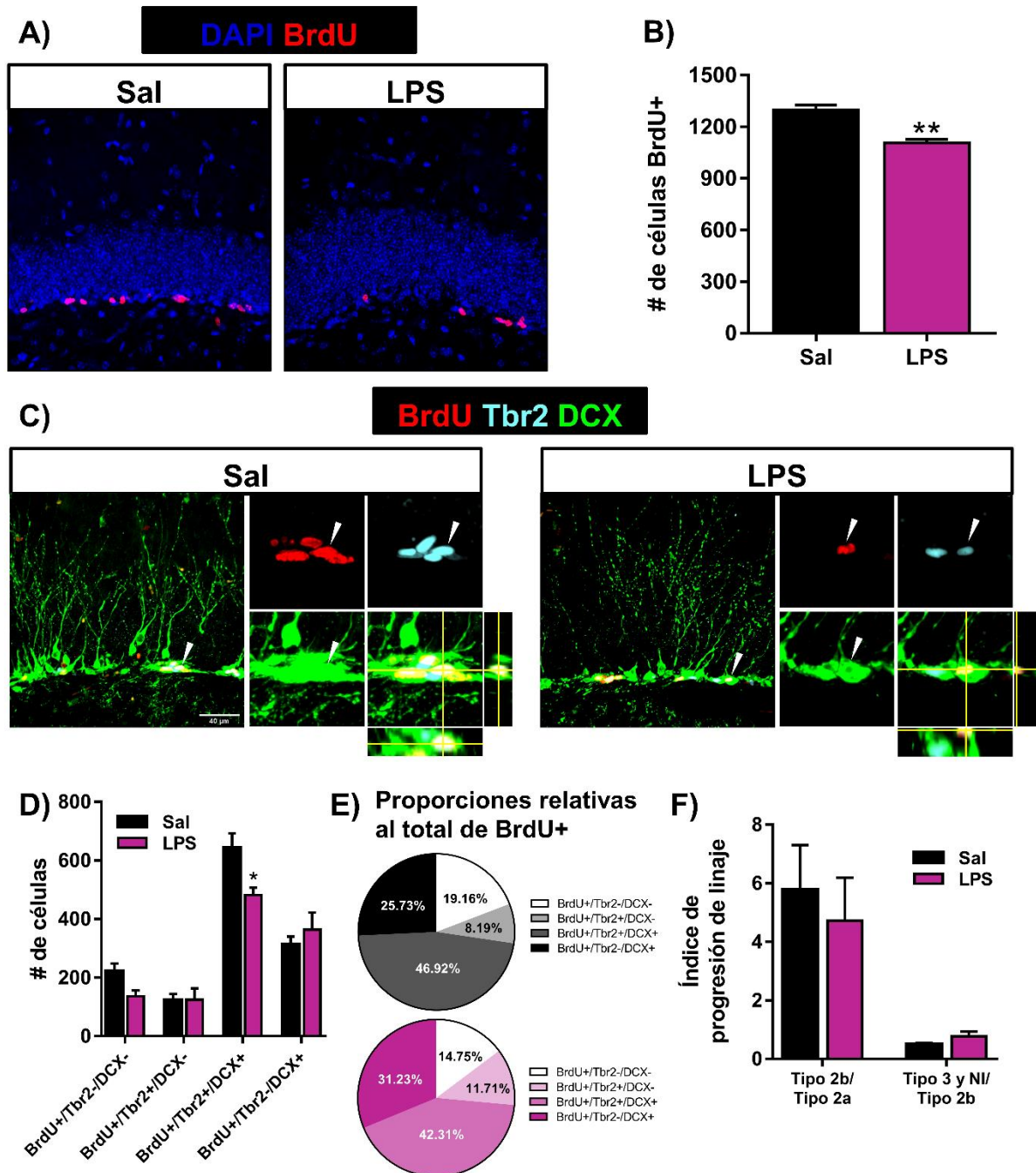
Los niveles proteicos del pro-IL-1 $\beta$ , el precursor de uno de los mediadores clásicos de la respuesta proinflamatoria, se analizaron mediante *western blot*. La prueba de *t* de Student reveló un aumento significativo de los niveles de pro-IL-1 $\beta$  ( $t = -2.95$ ,  $p = 0.026$ , *t* de Student) en el grupo tratado con LPS (Sal  $0.629 \pm 0.288$  A.U. vs LPS  $2.261 \pm 0.474$  A.U.) (**Fig. 8.C**). Este resultado indica que una única i.i.p. de LPS mantiene elevada la síntesis del precursor de la citocina proinflamatoria IL-1 $\beta$  aún 7 d después.

## Modulación diferencial de la proliferación de las nuevas células progenitoras neurales hipocampales tras la administración de LPS

Con el objetivo de evaluar la tasa de nacimiento de las CPNs hipocampales tras la administración de LPS, analizamos tres marcadores: BrdU, un marcador exógeno de proliferación de una cohorte específica de células; Tbr2, un factor de transcripción expresado por las CPATs (tipo 2a y 2b) y; DCX, una proteína asociada a microtúbulos expresada por células tipo 2b, tipo 3 y neuronas inmaduras.

En condiciones control se observó un mayor número y proporción de células tipo 2b (BrdU<sup>+</sup>/Tbr2<sup>+</sup>/DCX<sup>-</sup>) en comparación con el resto de las subpoblaciones analizadas, lo cual podría indicar que estas son las células que contribuyen en mayor medida a la expansión de la poza de células (**Fig. 9.D-E**). Asimismo, después de 7 d tras la administración sistémica de LPS se observó una disminución del 15% del número total de células BrdU<sup>+</sup> ( $t = 5.39$ ,  $p = 0.006$ , *t* de Student) en comparación con el grupo control (**Fig. 9.A-B**). Por otra parte, no se encontró una diferencia significativa entre los grupos en el número total de células Tbr2<sup>+</sup> ( $p = 0.262$ , *t* de Student). Al analizar el fenotipo específico de estas células, se encontró que los animales tratados con LPS mostraban una disminución significativa del 25% en el número de las células progenitoras tipo 2b (BrdU<sup>+</sup>/Tbr2<sup>+</sup>/DCX<sup>+</sup>;  $t = 2.8$ ,  $p = 0.049$ , *t* de Student). En las otras poblaciones celulares, es decir, las células BrdU<sup>+</sup> que no se lograron asociar a ningún fenotipo específico (BrdU<sup>+</sup>/Tbr2<sup>-</sup>/DCX<sup>-</sup>), las células progenitoras tipo 2a (BrdU<sup>+</sup>/Tbr2<sup>+</sup>/DCX<sup>-</sup>), progenitores tipo 3 y neuronas inmaduras (BrdU<sup>+</sup>/Tbr2<sup>-</sup>/DCX<sup>+</sup>) (**Fig. 9.C-D**), no se encontró ningún efecto significativo ( $p = 0.073$ ,  $p = 0.967$  y  $p = 0.477$ , respectivamente, *t* de Student). Con

el objetivo de evaluar a las subpoblaciones celulares de interés con respecto al total de células BrdU<sup>+</sup> y de analizar el número de células de una población comparándola con la población anterior, se llevaron a cabo un análisis de proporciones y un índice de progresión de linaje, respectivamente. Estas evaluaciones no revelaron ningún cambio significativo ( $p > 0.05$  para todas las comparaciones, *t* de Student) (Fig. 9.E-F).





**Figura 9. La administración de LPS promueve una disminución en el número de progenitores 2b 7 días después de la inyección. A)** Imágenes de microscopía confocal que muestran la inmunofluorescencia de BrdU (rojo) y DAPI (azul) en la lámina suprapiramidal del GD. **B)** Estimación semiestereológica del número de células BrdU+. **C)** Imágenes de microscopía confocal que muestran la inmunofluorescencia de BrdU (rojo), Tbr2 (azul) y DCX (verde) en la lámina suprapiramidal del giro dentado. Las cabezas de flecha blancas indican una célula progenitora 2b (BrdU/Tbr2/DCX). **D)** Estimación semiestereológica del número de células de las diferentes subpoblaciones evaluadas. **E)** Análisis de proporciones de cada una de las subpoblaciones evaluadas con relación al total de células BrdU+. **F)** Análisis de progresión de linaje, que muestra la razón del número de células de una subpoblación específica con relación a la subpoblación anterior en el proceso neurogénico. Las gráficas representan la media  $\pm$  EEM. n=3, prueba *t* de Student, prueba *post-hoc* de Bonferroni. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01. Sal: solución salina; LPS: lipopolisacárido; CM: capa molecular; CG: capa granular; H: hilus.

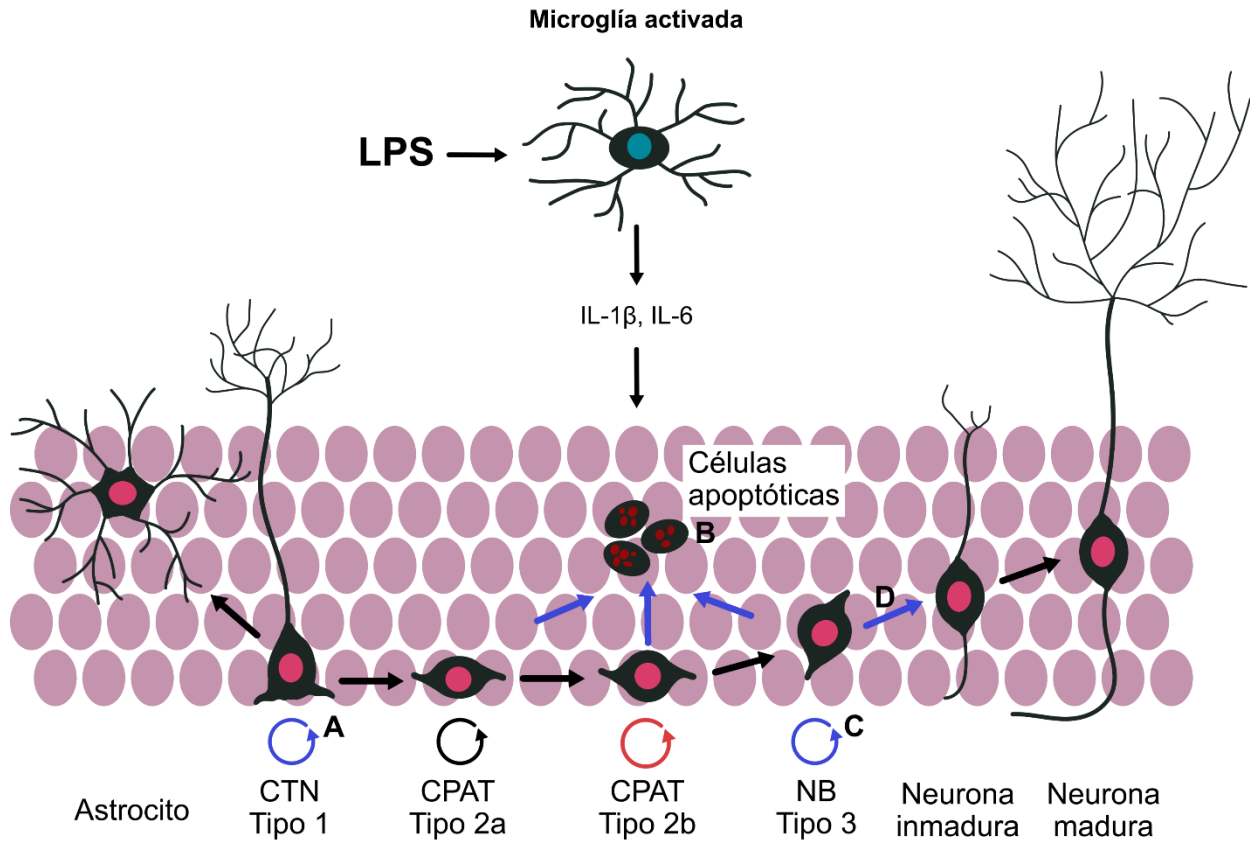
## DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS

La neurogénesis hipocampal adulta es un proceso plástico que inicia con la proliferación de CPNs y culmina con la generación de nuevas neuronas granulares funcionales. La neurogénesis se ha asociado a la funcionalidad del GD y del hipocampo (Aimone et al., 2014; Kempermann et al., 2015). Este es un proceso dinámico que depende de la regulación de factores celulares y moleculares del nicho neurogénico. Se ha demostrado que la neuroinflamación regula a la baja distintas fases del proceso neurogénico (Kohman & Rhodes, 2013).

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que 7 d después de una única administración sistémica de LPS se mantiene una respuesta proinflamatoria en el tejido hipocampal y se observa una reducción en la neurogénesis hipocampal, específicamente una reducción de las células progenitoras tipo 2b (**Fig. 10**).

Como se mencionó anteriormente, la mayoría de las evaluaciones del efecto de la neuroinflamación inducida por LPS se han hecho a tiempos cortos después de la inyección (Bastos et al., 2008; Fujioka & Akema, 2010; Ormerod et al., 2013; Zonis et al., 2013), correlacionando con el pico de producción de mediadores proinflamatorios. Nuestro grupo de trabajo reportó previamente que la respuesta neuroinflamatoria continúa 7 d después del reto y que está caracterizada por la activación de la microglía y los astrocitos, así como por niveles elevados de las citocinas proinflamatorias IL-6 (Pérez-Domínguez et al., 2019) y TNF- $\alpha$  (datos no publicados). El perfil proinflamatorio observado en el trabajo reportado coincidió en el tiempo con una disminución en el número de células BrdU<sup>+</sup>/DCX<sup>+</sup>, que podía deberse a un efecto negativo del LPS sobre la proliferación y sobrevivencia de esta población celular.

Se ha descrito que una única administración sistémica de LPS produce signos sistémicos asociados a la respuesta inflamatoria (i.e. conducta asociada a malestar) (Yirmiya et al., 2001). En este trabajo mostramos una reducción en la conducta exploratoria espontánea y en el peso corporal asociados a la administración de LPS. Con lo que corroboramos que dos de los signos asociados a la respuesta sistémica se presentan después del tratamiento. Como se ha reportado anteriormente, estas respuestas se resuelven dentro de un período de 24 h tras el reto con LPS, para la



**Figura 10. Esquema del efecto sobre los progenitores neurales 7 días después de la administración de LPS.** Con este modelo de inducción de neuroinflamación (1 i.i.p. de LPS 1 mg/kg) se induce un perfil proinflamatorio, caracterizado por activación microglial y un aumento en los niveles de pro-IL-1 $\beta$  e IL-6 (Pérez-Domínguez, et al. 2019), que se mantiene 7 d después de la inyección. Este contexto inflamatorio promueve una disminución en el número de las células progenitoras tipo 2b (indicado con flecha roja). Varias preguntas continúan abiertas (indicado con flechas azules): **A)** Evaluar el efecto sobre la proliferación de las células tipo 1; **B)** analizar la contribución de la muerte apoptótica de las CPNs a la disminución observada; **C)** determinar si se observa un efecto en la proliferación de las células tipo 3; **D)** evaluar si se ve afectada la salida de ciclo celular de las células tipo 3, así como la sobrevivencia de las neuronas inmaduras.

conducta motora, y de una semana, para el peso corporal (Pérez-Domínguez et al., 2019).

En términos de la respuesta neuroinflamatoria a nivel celular y molecular en el hipocampo, los resultados de este trabajo muestran que una inyección de LPS promueve un perfil proinflamatorio caracterizado por activación microglial y niveles incrementados de pro-IL-1 $\beta$  después de 7 d. Esto concuerda con reportes previos y datos obtenidos

previamente por nuestro grupo, en los que se muestran diferentes marcadores que indican un contexto proinflamatorio días después de administrar LPS, como aumento en los niveles de proteínas de activación microglial, aumento en los niveles de citocinas proinflamatorias y activación astrocítica (Cazareth et al., 2014; Monje et al., 2003; Pérez-Domínguez et al., 2019; Qin et al., 2007). Como se mencionó anteriormente, la administración de LPS induce un pico de producción de mediadores proinflamatorios en la primeras horas tras el reto (Qin et al., 2007). Interesantemente, en este trabajo observamos elevado a pro-IL-1 $\beta$  en tejido hipocampal en comparación con niveles control aún después de 7 d de la administración única de LPS, que podría asociarse también a un aumento en la citocina proinflamatoria IL-1 $\beta$ , que es la que se libera al medio extracelular y tiene los efectos proinflamatorios previamente mencionados. Asimismo, nuestros resultados muestran que no existe una asociación entre la activación microglial y los niveles de Iba 1 en el hipocampo, lo cual podría sugerir que 7 d después de la administración de LPS no hay cambios en el número de células microgliales ni en la producción de Iba1. Es importante tomar en cuenta que nuestro análisis de contenido proteico se llevó a cabo en homogenados totales de hipocampo, lo cual podría estar enmascarando efectos en subestructuras específicas. Aunque en otros modelos se ha mostrado una correlación entre la activación de la microglía y la síntesis de Iba1, se ha demostrado que tras la administración sistémica de LPS hay un pico en los niveles de mRNA de Iba1 24 h después de la inyección y estos niveles ya no son diferentes al control 48 h después, lo que indica que a este tiempo ya no hay un aumento en la síntesis de esta proteína (Norden, Trojanowski, Villanueva, Navarro, & Godbout, 2015).

En conjunto, los datos del perfil inflamatorio muestran que el modelo utilizado por nuestro grupo en trabajos publicados anteriormente es reproducible. Además, este trabajo aporta a la caracterización del estado neuroinflamatorio inducido por LPS 7 d después del reto inmunológico, al proveer evidencia experimental de un incremento de pro-IL-1 $\beta$ , de tal modo que ahora se sabe que continúa elevada la actividad de las 3 citocinas principales que median la respuesta neuroinflamatoria (i.e. IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ ).

Consistentemente se ha demostrado que en un contexto proinflamatorio se promueve una regulación a la baja del proceso neurogénico hipocampal (Fujioka & Akema, 2010;

Monje et al., 2003; C.-W. Wu et al., 2007; Zonis et al., 2013). La mayoría de estos trabajos ha enfocado su atención en evaluar los cambios en el número de células DCX<sup>+</sup>, generalmente colocalizando con BrdU. DCX es un marcador que engloba a dos poblaciones diferentes de progenitores neurales y neuronas inmaduras, lo cual no permite evaluar la posible ocurrencia de efectos diferenciales de los procesos neuroinflamatorios sobre los diferentes tipos celulares asociados al proceso neurogénico. En este trabajo se analizó la respuesta de las CPATs tipo 2a (BrdU<sup>+</sup>/Tbr2<sup>+</sup>/DCX<sup>-</sup>) y 2b (BrdU<sup>+</sup>/Tbr2<sup>+</sup>/DCX<sup>+</sup>), así como tipo 3 y neuronas inmaduras (BrdU<sup>+</sup>/Tbr2<sup>-</sup>/DCX<sup>+</sup>), ante un contexto proinflamatorio en una ventana temporal más allá del pico proinflamatorio previamente descrito.

Este trabajo contribuye a la noción de que de entre los tres tipos de células progenitoras identificadas, las células tipo 2b son las que tienen la capacidad de proliferación más alta (Lugert et al., 2012). Nuestros resultados muestran que esta población representa aproximadamente un 47% del total de las células BrdU<sup>+</sup> en animales tratados con solución salina. Nuestra evidencia sugiere que las células tipo 2a contribuyen en menor medida a la expansión de la poza de células, pues con base en nuestros resultados, esta población representa aproximadamente el 8%. Es de relevancia señalar que la cohorte de células marcadas con BrdU bajo nuestro protocolo de administración depende de la proliferación y sobrevivencia de las CPNs durante los 3 d anteriores al sacrificio. De igual manera, es importante destacar que otros grupos han reportado que la expansión de la poza celular depende de las células tipo 2a (Hodge et al., 2008; Kronenberg et al., 2003). Resultará de interés que en futuros trabajos se evalúe la capacidad proliferativa de cada una de estas subpoblaciones mediante la utilización de técnicas que permitan un análisis más finos de ciclo celular.

Nuestros resultados muestran que la respuesta neuroinflamatoria sostenida, inducida por la administración de LPS, coincide en el tiempo con una disminución significativa en el número de células progenitoras BrdU<sup>+</sup>/Tbr2<sup>+</sup>/DCX<sup>+</sup> o células tipo 2b, lo cual sugiere una desregulación en la capacidad proliferativa o en la tasa de sobrevivencia de esta subpoblación. Se han descrito diferentes mecanismos por los que un contexto proinflamatorio podría inducir modificaciones en la progresión del ciclo celular. Algunas EROs pueden inducir arresto del ciclo en distintos tipos celulares mediante la activación

de la vía del inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas p21 (Barnouin et al., 2002; McGrath, 1998). Asimismo, se ha observado que citocinas proinflamatorias, como IL-6, regulan a la baja la proliferación y autorrenovación de precursores neurales de la ZSV mediante modificaciones en la vía JAK/STAT (del inglés *Janus kinases/signal transducer and activator of transcription* proteins), asociada al control de diversos mecanismos de proliferación (Bauer, 2009). Estos procesos podrían explicar la reducción en la proliferación de los progenitores neurales que reportamos en este trabajo.

De manera interesante, no se observan cambios significativos en las proporciones de las poblaciones respecto al total de células BrdU<sup>+</sup> ni en la progresión de linaje, de tal modo que parece ser que solo se está afectando el número de progenitores, pero no el progreso de los mismo a lo largo del proceso neurogénico. En uno de los trabajos de nuestro grupo, se observó una disminución en el número células Tbr2<sup>+</sup> en fases S, G2 y M del ciclo celular, lo cual podría deberse a una afectación en la proliferación de los progenitores 2b. Ninguna otra subpoblación celular evaluada parece estar afectada en esta ventana temporal (Melo-Salas et al., 2018). Esto podría explicarse con los datos de otro proyecto de nuestro grupo (datos no publicados), en los que 7 d después de la administración de LPS se observa una disminución en el número y proporción de células DCX<sup>+</sup> que reentran a ciclo celular (tipo 2b y 3), es decir, que continúan con actividad proliferativa. De igual manera, se observa un aumento en el número y proporción de células DCX<sup>+</sup> fuera de ciclo celular, en otras palabras, progenitores DCX<sup>+</sup> con una capacidad proliferativa disminuida. Nuestras observaciones podrían deberse a este fenómeno, es decir, a una reducción en la proporción de progenitores en ciclo (BrdU<sup>+</sup>/Tbr2<sup>+</sup>/DCX<sup>+</sup> y BrdU<sup>+</sup>/Tbr2<sup>-</sup>/DCX<sup>+</sup>) y un aumento en progenitores tipo 3 fuera de ciclo y células postmitóticas (BrdU<sup>+</sup>/Tbr2<sup>-</sup>/DCX<sup>+</sup>). Al observarse estos efectos contrarios en la población BrdU<sup>+</sup>/Tbr2<sup>-</sup>/DCX<sup>+</sup> podría estarse enmascarando el efecto sobre la dinámica proliferativa de las células tipo 3 en respuesta a un contexto proinflamatorio. Debido a que se han observado estos efectos contrarios, es relevante la utilización de diferentes protocolos de administración de BrdU, así como la cuantificación de células positivas al marcador endógeno de proliferación Ki67 y a diferentes proteínas que permitan distinguir a las células tipo 3 y a las neuronas inmaduras; esto proveería una respuesta concisa a este problema.

Asimismo, es importante realizar en futuros experimentos un análisis de procesos de muerte celular y de mecanismos de proliferación en cada uno de los subtipos de CPNs con el objetivo de cuantificar la contribución de estos procesos a la regulación negativa que tiene un contexto proinflamatorio sobre la neurogénesis (**Fig. 10**).

Como se ha mencionado anteriormente, la neurogénesis hipocampal está implicada de manera importante en procesos cognitivos dependientes de hipocampo, como la separación de patrones y el aprendizaje espacial y contextual (Aimone et al., 2014). Hasta el momento no se ha profundizado en la caracterización del efecto que tiene la reducción neurogénica inducida por inflamación sobre estas habilidades cognitivas. Sin embargo, en otros modelos en los que se induce una reducción de la neurogénesis se ha observado un peor desempeño en tareas como el laberinto acuático de Morris, separación de patrones y condicionamiento de miedo al contexto (Clelland et al., 2009; Drapeau et al., 2003; Drew et al., 2010). Es de importancia conocer si estas mismas tareas se ven afectadas tras un reto inflamatorio sistémico y si la modulación a la baja de la neurogénesis podría explicar dichos cambios. De igual manera resulta interesante la posibilidad el rescate de la proliferación de CPNs con protocolos de ejercicio físico o de la integración de las neuronas a circuitos hipocampales mediante la exposición a un ambiente enriquecido.

## CONCLUSIÓN

La neuroinflamación, un proceso propio de diversas patologías, tiene efectos negativos sobre la plasticidad cerebral y algunos procesos cognitivos. Se ha observado que tras la administración sistémica de LPS se genera un estado neuroinflamatorio a largo plazo, que a su vez genera una disminución en la tasa neurogénica. En este trabajo se muestra que 1) 7 d después de la administración de LPS se mantiene un estado proinflamatorio caracterizado por la activación microglial y aumento en los niveles del precursor de la citocina proinflamatoria IL-1 $\beta$  y; 2) que dicho estado coincide en el tiempo con una disminución en las células progenitoras neurales tipo 2b, los progenitores que contribuyen en mayor proporción a la expansión de la poza de células, lo que puede contribuir al efecto negativo sobre la generación de nuevas neuronas en el hipocampo adulto.



## REFERENCIAS

- Ables, J. L., DeCarolis, N. A., Johnson, M. A., Rivera, P. D., Gao, Z., Cooper, D. C., ... Eisch, A. J. (2010). Notch1 Is Required for Maintenance of the Reservoir of Adult Hippocampal Stem Cells. *The Journal of Neuroscience*, 30(31), 10484–10492. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.4721-09.2010>
- Abs, E., Poorthuis, R. B., Apelblat, D., Muhammad, K., Pardi, M. B., Enke, L., ... Letzkus, J. J. (2018). Learning-Related Plasticity in Dendrite-Targeting Layer 1 Interneurons. *Neuron*, 100(3), 684–699. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.09.001>
- Aguilar-Arredondo, A., Arias, C., & Zepeda, A. (2015). Evaluating the functional state of adult-born neurons in the adult dentate gyrus of the hippocampus: from birth to functional integration. *Reviews in the Neurosciences*, 26(3), 269–279. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2014-0071>
- Aguilar-Arredondo, A., & Zepeda, A. (2018). Memory retrieval-induced activation of adult-born neurons generated in response to damage to the dentate gyrus. *Brain Structure and Function*, 223(6), 2859–2877. <https://doi.org/10.1007/s00429-018-1664-7>
- Aimone, J. B., Li, Y., Lee, S. W., Clemenson, G. D., Deng, W., & Gage, F. H. (2014). Regulation and Function of Adult Neurogenesis: From Genes to Cognition. *Physiological Reviews*, 94(4), 991–1026. <https://doi.org/10.1152/physrev.00004.2014>
- Allen, E. (1912). *The cessation of mitosis in the central nervous system of the albino rat* (Vol. 19). Baltimore: Waverly Press.
- Alliot, F., Godin, I., & Pessac, B. (1999). Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Developmental Brain Research*, 117(2), 145–152. [https://doi.org/10.1016/S0165-3806\(99\)00113-3](https://doi.org/10.1016/S0165-3806(99)00113-3)
- Altman, J. (1969). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *Journal of Comparative Neurology*, 137(4), 433–457. <https://doi.org/10.1002/cne.901370404>
- Altman, J., & Das, G. D. (1965). Autoradiographic and Histological Evidence of Postnatal Hippocampal Neurogenesis in Rats. *The Journal of Comparative Neurology*, 124, 319–335. <https://doi.org/10.1002/cne.901240303>
- Amaral, D. G., Scharfman, H. E., & Lavenex, P. (2007). The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Progress in Brain Research*, 163, 3–22. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)63001-5](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)63001-5)
- Appleby, P. A., & Wiskott, L. (2009). Additive neurogenesis as a strategy for avoiding interference in a sparsely-coding dentate gyrus. *Network: Computation in Neural Systems*, 20(3), 137–161. <https://doi.org/10.1080/09548980902993156>
- Avital, A., Goshen, I., Kamsler, A., Segal, M., Iverfeldt, K., Richter-Levin, G., & Yirmiya, R. (2003). Impaired Interleukin-1 Signaling Is Associated With Deficits in Hippocampal Memory Processes and Neural Plasticity. *Hippocampus*, 13(7), 826–834. <https://doi.org/10.1002/hipo.10135>
- Bach-y-Rita, P., Collins, C. C., Saunders, F. A., White, B., & Scadden, L. (1969). Vision Substitution by Tactile Image Projection. *Nature*, 221(5184), 963–964. <https://doi.org/10.1038/221963a0>
- Banks, W. A. (2005). Blood-Brain Barrier Transport of Cytokines: A Mechanism for Neuropathology. *Current Pharmaceutical Design*, 11(8), 973–984. <https://doi.org/10.2174/1381612053381684>
- Banks, W. A., Gray, A. M., Erickson, M. A., Salameh, T. S., Damodarasamy, M., Sheibani, N., ... Reed, M. J. (2015). Lipopolysaccharide-induced blood-brain barrier disruption: Roles of cyclooxygenase, oxidative stress, neuroinflammation, and elements of the neurovascular

- unit. *Journal of Neuroinflammation*, 12(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0434-1>
- Barnouin, K., Dubuisson, M. L., Child, E. S., De Mattos, S. F., Glassford, J., Medema, R. H., ... Lam, E. W. F. (2002). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Induces a Transient Multi-phase Cell Cycle Arrest in Mouse Fibroblasts through Modulating Cyclin D and p21Cip1 Expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(16), 13761–13770. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111123200>
- Bastos, G. N., Moriya, T., Inui, F., Katura, T., & Nakahata, N. (2008). Involvement of cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide-induced impairment of the newborn cell survival in the adult mouse dentate gyrus. *Neuroscience*, 155(2), 454–462. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.06.020>
- Bauer, S. (2009). Cytokine Control of Adult Neural Stem Cells: Chronic versus Acute Exposure. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1153, 48–56. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.03986.x>
- Beckervordersandforth, R., Deshpande, A., Schäffner, I., Huttner, H. B., Lepier, A., Lie, D. C., & Götz, M. (2014). In Vivo Targeting of Adult Neural Stem Cells in the Dentate Gyrus by a Split-Cre Approach. *Stem Cell Reports*, 2(2), 153–162. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.01.004>
- Bednarczyk, M. R., Hacker, L. C., Fortin-Nunez, S., Aumont, A., Bergeron, R., & Fernandes, K. J. L. (2011). Distinct Stages of Adult Hippocampal Neurogenesis Are Regulated by Running and the Running Environment Matthew. *Hippocampus*, 21(12), 1334–1347. <https://doi.org/10.1002/hipo.20831>
- Ben Abdallah, N. M.-B., Slomianka, L., Vyssotski, A. L., & Lipp, H.-P. (2010). Early age-related changes in adult hippocampal neurogenesis in C57 mice. *Neurobiology of Aging*, 31(1), 151–161. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2008.03.002>
- Berg, D. A., Belnoue, L., Song, H., & Simon, A. (2013). Neurotransmitter-mediated control of neurogenesis in the adult vertebrate brain. *Development*, 140(12), 2548–2561. <https://doi.org/10.1242/dev.088005>
- Berlucchi, G., & Buchtel, H. A. (2009). Neuronal plasticity: historical roots and evolution of meaning. *Experimental Brain Research*, 192(3), 307–319. <https://doi.org/10.1007/s00221-008-1611-6>
- Bianchi, R., Giambanco, I., & Donato, R. (2010). S100B/RAGE-dependent activation of microglia via NF- $\kappa$ B and AP-1. Co-regulation of COX-2 expression by S100B, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . *Neurobiology of Aging*, 31(4), 665–677. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2008.05.017>
- Biebl, M., Cooper, C. M., Winkler, J., & Kuhn, H. G. (2000). Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neuroscience Letters*, 291(1), 17–20. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(00\)01368-9](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(00)01368-9)
- Birse, S. C., Leonard, R. B., & Coggeshall, R. E. (1980). Neuronal increase in Various Areas of the Nervous System of the Guppy, *Lebistes*. *The Journal of Comparative Neurology*, 194(2), 291–301. <https://doi.org/10.1002/cne.901940202>
- Bizon, J. L., Lee, H. J., & Gallagher, M. (2004). Neurogenesis in a rat model of age-related cognitive decline. *Aging Cell*, 3(4), 227–234. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9728.2004.00099.x>
- Bliss, T. V. P., & Lømo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of Physiology*, 232, 331–356. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1973.sp010273>
- Boche, D., Perry, V. H., & Nicoll, J. A. R. (2013). Review: Activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 39(1), 3–18. <https://doi.org/10.1111/nan.12011>
- Bonaguidi, M. A., Wheeler, M. A., Shapiro, J. S., Stadel, R. P., Sun, G. J., Ming, G., & Song, H. (2011). In Vivo Clonal Analysis Reveals Self-Renewing and Multipotent Adult Neural Stem Cell Characteristics. *Cell*, 145(7), 1142–1155. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.05.024>

- Boyden, E. S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G., & Deisseroth, K. (2005). Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nature Neuroscience*, 8(9), 1263–1268. <https://doi.org/10.1038/nn1525>
- Brandt, M. D., Jessberger, S., Steiner, B., Kronenberg, G., Reuter, K., Bick-Sander, A., ... 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. [https://doi.org/10.1016/S1044-7431\(03\)00207-0](https://doi.org/10.1016/S1044-7431(03)00207-0)
- Bsibsi, M., Ravid, R., Gveric, D., & Van Noort, J. M. (2002). Broad Expression of Toll-Like Receptors in the Human Central Nervous System. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 61(11), 1013–1021. <https://doi.org/10.1093/jnen/61.11.1013>
- Cameron, H. A., & Glover, L. R. (2015). Adult Neurogenesis: Beyond Learning and Memory. *Annual Review of Psychology*, 66(1), 53–81. <https://doi.org/10.1146/annurev-psych-010814-015006>
- Cameron, H. A., & McKay, R. D. G. (2001). Adult Neurogenesis Produces a Large Pool of New Granule Cells in the Dentate Gyrus. *The Journal of Comparative Neurology*, 435(4), 406–417. <https://doi.org/10.1002/cne.1040>
- Cao, X., Li, L.-P., Qin, X.-H., Li, S.-J., Zhang, M., Wang, Q., ... Zhu, X.-H. (2013). Astrocytic Adenosine 5'-Triphosphate Release Regulates the Proliferation of Neural Stem Cells in the Adult Hippocampus. *Stem Cells*, 31, 1633–1643. <https://doi.org/10.1002/stem.1408>
- Cazareth, J., Guyon, A., Heurteaux, C., Chabry, J., & Petit-Paitel, A. (2014). Molecular and cellular neuroinflammatory status of mouse brain after systemic lipopolysaccharide challenge: Importance of CCR2/CCL2 signaling. *Journal of Neuroinflammation*, 11(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-132>
- Chen, Grace, Shaw, M. H., Kim, Y.-G., & Nuñez, G. (2009). NOD-Like Receptors: Role in Innate Immunity and Inflammatory Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 4(1), 365–398. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092239>
- Chen, Guoqing, & Goeddel, D. V. (2002). TNF-R1 Signaling: A Beautiful Pathway. *Science*, 296(5573), 1634–1635. <https://doi.org/10.1126/science.1071924>
- Chen, Y., Hallenbeck, J. M., Ruetzler, C., Bol, D., Thomas, K., Berman, N. E. J., & Vogel, S. N. (2003). Overexpression of Monocyte Chemoattractant Protein 1 in the Brain Exacerbates Ischemic Brain Injury and Is Associated With Recruitment of Inflammatory Cells. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 23(6), 748–755. <https://doi.org/10.1097/01.WCB.0000071885.63724.20>
- Chen, Z., & Palmer, T. D. (2013). Differential roles of TNFR1 and TNFR2 signaling in adult hippocampal neurogenesis. *Brain, Behavior, and Immunity*, 30, 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.01.083>
- Choe, Y., Pleasure, S. J., & Mira, H. (2016). Control of Adult Neurogenesis by Short-Range Morphogenic-Signaling Molecules. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(3), 1–20. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018887>
- Clark, S. A., Allard, T., Jenkins, W. M., & Merzenich, M. M. (1988). Receptive fields in the body-surface map in adult cortex defined by temporally correlated inputs. *Nature*, Vol. 332, pp. 444–445. <https://doi.org/10.1038/332444a0>
- Clelland, C. D., Choi, M., Romberg, C., Clemenson Jr., G. D., Fragniere, A., Tyers, P., ... Bussey, T. J. (2009). A Functional Role for Adult Hippocampal Neurogenesis in Spatial Pattern Separation. *Science*, 325(5937), 210–213. <https://doi.org/10.1126/science.1173215>
- Clemenson, G. D., Gage, F. H., & Stark, C. E. L. (2018). Environmental Enrichment and Neuronal Plasticity. In M. V. Chao (Ed.), *The Oxford Handbook of Developmental Neural Plasticity* (pp. 1–42). <https://doi.org/10.1093/oxfordhb/9780190635374.013.13>
- Cope, E. C., & Gould, E. (2019). Adult Neurogenesis, Glia, and the Extracellular Matrix. *Cell Stem Cell*, 24(5), 690–705. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.03.023>
- Cotel, M.-C., Jawhar, S., Christensen, D. Z., Bayer, T. A., & Wirths, O. (2012). Environmental

- enrichment fails to rescue working memory deficits, neuron loss, and neurogenesis in APP/PS1KI mice. *Neurobiology of Aging*, 33(1), 96–107. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.02.012>
- Coutureau, E., & Di Scala, G. (2009). Entorhinal cortex and cognition. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 33(5), 753–761. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2009.03.038>
- Cuartero, M. I., de la Parra, J., Pérez-Ruiz, A., Bravo-Ferrer, I., Durán-Laforet, V., García-Culebras, A., ... Moro, M. Á. (2019). Abolition of aberrant neurogenesis ameliorates cognitive impairment after stroke in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 129(4), 1536–1550. <https://doi.org/10.1172/jci120412>
- Cunningham, C., Champion, S., Lunnon, K., Murray, C. L., Woods, J. F. C., Deacon, R. M. J., ... Perry, V. H. (2009). Systemic Inflammation Induces Acute Behavioral and Cognitive Changes and Accelerates Neurodegenerative Disease. *Biological Psychiatry*, 65(4), 304–312. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.07.024>
- Cunningham, C., & Sanderson, D. J. (2008). Malaise in the water maze: Untangling the effects of LPS and IL-1 $\beta$  on learning and memory. *Brain, Behavior, and Immunity*, 22(8), 1117–1127. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2008.05.007>
- Dayer, A. G., Ford, A. A., Cleaver, K. M., Yassaee, M., & Cameron, H. A. (2003). Short-Term and Long-Term Survival of New Neurons in the Rat Dentate Gyrus. *The Journal of Comparative Neurology*, 460(4), 563–572. <https://doi.org/10.1002/cne.10675>
- Deng, W., Aimone, J. B., & Gage, F. H. (2010). New neurons and new memories: How does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nature Reviews Neuroscience*, 11(5), 339–350. <https://doi.org/10.1038/nrn2822>
- Derecki, N. C., Cardani, A. N., Yang, C. H., Quinnes, K. M., Crihfield, A., Lynch, K. R., & Kipnis, J. (2010). Regulation of learning and memory by meningeal immunity: a key role for IL-4. *Journal of Experimental Medicine*, 207(5), 1067–1080. <https://doi.org/10.1084/jem.20091419>
- Di Filippo, M., Chiasserini, D., Gardoni, F., Viviani, B., Tozzi, A., Giampà, C., ... Calabresi, P. (2013). Effects of central and peripheral inflammation on hippocampal synaptic plasticity. *Neurobiology of Disease*, 52, 229–236. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.12.009>
- Diamond, M. C., Krech, D., & Rosenzweig, M. R. (1964). The Effects of an Enriched Environment on the Histology of the Rat Cerebral Cortex. *The Journal of Comparative Neurology*, 123(1), 111–119. <https://doi.org/10.1002/cne.901230110>
- Diogenes, A., Ferraz, C. C. R., Akopian, A. N., Henry, M. A., & Hargreaves, K. M. (2011). IPS Sensitizes TRPV1 via Activation of TIR4 in Trigeminal Sensory Neurons. *Journal of Dental Research*, 90(6), 759–764. <https://doi.org/10.1177/0022034511400225>
- Dobbs, R. J., Charlett, A., Purkiss, A. G., Dobbs, S. M., Weller, C., & Peterson, D. W. (1999). Association of circulating TNF- $\alpha$  and IL-6 with ageing and parkinsonism. *Acta Neurologica Scandinavica*, 100(1), 34–41. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.1999.tb00721.x>
- dos Santos Picanço, L. C., Ozela, P. F., de Brito Brito, M. de F., Pinheiro, A. A., Padilha, E. C., Braga, F. S., ... da Silva Hage-Melim, L. I. (2018). Alzheimer's Disease: A Review from the Pathophysiology to Diagnosis, New Perspectives for Pharmacological Treatment. *Current Medicinal Chemistry*, 25, 3141–3159. <https://doi.org/10.2174/0929867323666161213101126>
- Drapeau, E., Mayo, W., Arousseau, C., Le Moal, M., Piazza, P.-V., & Abrous, D. N. (2003). Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(2), 14385–14390. <https://doi.org/10.1073/pnas.2334169100>
- Drew, M. R., Denny, C. A., & Hen, R. (2010). Arrest of Adult Hippocampal Neurogenesis in Mice Impairs Single- But Not Multiple-Trial Contextual Fear Conditioning. *Behavioral Neuroscience*, 124(4), 446–454. <https://doi.org/10.1037/a0020081>

- Ekdahl, C. T. (2012). Microglial activation - tuning and pruning adult neurogenesis. *Frontiers in Pharmacology*, 3, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00041>
- Ekdahl, C. T., Claassen, J.-H., Bonde, S., Kokaia, Z., & Lindvall, O. (2003). Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(23), 13632–13637. <https://doi.org/10.1073/pnas.2234031100>
- Ellis, P., Fagan, B. M., Magness, S. T., Hutton, S., Taranova, O., Hayashi, S., ... Pevny, L. (2004). SOX2, a Persistent Marker for Multipotential Neural Stem Cells Derived from Embryonic Stem Cells, the Embryo or the Adult. *Developmental Neuroscience*, 26(2–4), 148–165. <https://doi.org/10.1159/000082134>
- Encinas, J. M., Vaahokari, A., & Enikolopov, G. (2006). Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(21), 8233–8238. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601992103>
- Engelhardt, B. (2008). The Blood-Central Nervous System Barriers Actively Control Immune Cell Entry into the Central Nervous System. *Current Pharmaceutical Design*, 14(16), 1555–1565. <https://doi.org/10.2174/138161208784705432>
- Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A.-M., Nordborg, C., Peterson, D. A., & Gage, F. H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Medicine*, 4(11), 1313–1317. <https://doi.org/10.1038/3305>
- Espósito, M. S., Piatti, V. C., Laplagne, D. A., Morgenstern, N. A., Ferrari, C. C., Pitossi, F. J., & Schinder, A. F. (2005). Neuronal Differentiation in the Adult Hippocampus Recapitulates Embryonic Development. *The Journal of Neuroscience*, 25(44), 10074–10086. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3114-05.2005>
- Fan, D., Li, J., Zheng, B., Hua, L., & Zuo, Z. (2016). Enriched Environment Attenuates Surgery-Induced Impairment of Learning, Memory, and Neurogenesis Possibly by Preserving BDNF Expression. *Molecular Neurobiology*, 53(1), 344–354. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-9013-1>
- Farioli-Vecchioli, S., Mattera, A., Micheli, L., Ceccarelli, M., Leonardi, L., Sarulli, D., ... Tirone, F. (2014). Running Rescues Defective Adult Neurogenesis by Shortening the Length of the Cell Cycle of Neural Stem and Progenitor Cells. *Stem Cells*, 32(7), 1968–1962. <https://doi.org/10.1002/stem.1679>
- Filippov, V., Kronenberg, G., Pivneva, T., Reuter, K., Steiner, B., Wang, L. P., ... 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. [https://doi.org/S1044-7431\(03\)00060-5](https://doi.org/S1044-7431(03)00060-5)
- Fitzgerald, K. A., Rowe, D. C., & Golenbock, D. T. (2004). Endotoxin recognition and signal transduction by the TLR4/MD-2 complex. *Microbes and Infection*, 6(15), 1361–1367. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2004.08.015>
- Fournier, N. M., & Duman, R. S. (2012). Role of vascular endothelial growth factor in adult hippocampal neurogenesis: Implications for the pathophysiology and treatment of depression. *Behavioural Brain Research*, 227(2), 440–449. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.04.022>
- Fujioka, H., & Akema, T. (2010). Lipopolysaccharide acutely inhibits proliferation of neural precursor cells in the dentate gyrus in adult rats. *Brain Research*, 1352, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.07.032>
- Garcia, A. D. R., Doan, N. B., Imura, T., Bush, T. G., & Sofroniew, M. V. (2004). GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nature Neuroscience*, 7(11), 1233–1241. <https://doi.org/10.1038/nn1340>
- Garthe, A., Behr, J., & Kempermann, G. (2009). Adult-Generated Hippocampal Neurons Allow the Flexible Use of Spatially Precise Learning Strategies. *PLoS ONE*, 4(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005464>

- Garthe, A., Roeder, I., & Kempermann, G. (2016). Mice in an Enriched Environment Learn More Flexibly Because of Adult Hippocampal Neurogenesis. *Hippocampus*, 26(2), 261–271. <https://doi.org/10.1002/hipo.22520>
- Ge, S., Yang, C., Hsu, K., Ming, G., & Song, H. (2007). A Critical Period for Enhanced Synaptic Plasticity in Newly Generated Neurons of the Adult Brain. *Neuron*, 54(4), 559–566. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.05.002>
- Gebara, E., Bonaguidi, M. A., Beckervordersandforth, R., Sulta, S., Udry, F., Gijs, P.-J., ... Toni, N. (2016). Heterogeneity of Radial Glia-Like Cells in the Adult Hippocampus. *Stem Cells*, 34(4), 997–1010. <https://doi.org/10.1002/stem.2266>
- Gilbert, P. E., Kesner, R. P., & Lee, I. (2001). Dissociating Hippocampal Subregions: A Double Dissociation Between Dentate Gyrus and CA1. *Hippocampus*, 11(6), 626–636. <https://doi.org/10.1002/hipo.1077>
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., ... Merad, M. (2010). Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages. *Science*, 701(6005), 841–845. <https://doi.org/10.1126/science.1194637>
- Ginhoux, F., Lim, S., Hoeffel, G., Low, D., & Huber, T. (2013). Origin and differentiation of microglia. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7(MAR), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00045>
- Goldman, S. A., & Nottebohm, F. (1983). Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(8), 2390–2394. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.8.2390>
- Gould, E., Reeves, A. J., Fallah, M., Tanapat, P., Gross, C. G., & Fuchs, E. (1999). Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(9), 5263–5267. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.9.5263>
- Gu, Y., Arruda-Carvalho, M., Wang, J., Janoschka, S. R., Josselyn, S. A., Frankland, P. W., & Ge, S. (2012). Optical controlling reveals time-dependent roles for adult-born dentate granule cells. *Nature Neuroscience*, 15(12), 1700–1706. <https://doi.org/10.1038/nn.3260>
- Gurney, K. J., Estrada, E. Y., & Rosenberg, G. A. (2006). Blood-brain barrier disruption by stromelysin-1 facilitates neutrophil infiltration in neuroinflammation. *Neurobiology of Disease*, 23(1), 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.02.006>
- Hamilton, A., & Holscher, C. (2012). The effect of ageing on neurogenesis and oxidative stress in the APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>deltaE9</sup> mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Research*, 1449, 83–93. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.02.015>
- Han, Y.-G., Spassky, N., Romaguera-Ros, M., García-Verdugo, J. M., Aguilar, A., Schneider-Maunoury, S., & Alvarez-Buylla, A. (2008). Hedgehog signaling and primary cilia are required for the formation of adult neural stem cells. *Nature Neuroscience*, 11(3), 277–284. <https://doi.org/10.1038/nn2059>
- Hargreaves, E. L., Rao, G., Lee, I., & Knierim, J. J. (2005). Major Dissociation Between Medial and Lateral Entorhinal Input to Dorsal Hippocampus Eric. *Science*, 308, 1792–1794. <https://doi.org/10.1126/science.1110449>
- Harré, E.-M., Roth, J., Pehl, U., Kueth, M., Gerstberger, R., & Hübschle, T. (2002). Selected Contribution: Role of IL-6 in LPS-induced nuclear STAT3 translocation in sensory circumventricular organs during fever in rats. *Journal of Applied Physiology*, 92, 2657–2666. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00822.2001>. highlighted
- Heyen, J. R. R., Ye, S., Finck, B. N., & Johnson, R. W. (2000). Interleukin (IL)-10 inhibits IL-6 production in microglia by preventing activation of NF-κB. *Molecular Brain Research*, 77(1), 138–147. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(00\)00042-5](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(00)00042-5)
- Himwich, W. A. (1962). Biochemical and Neurophysiological Development of the Brain in the Neonatal Period. *International Review of Neurobiology*, 4(C), 117–158. [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(08\)60021-5](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(08)60021-5)
- Hines, D. J., Choi, H. B., Hines, R. M., Phillips, A. G., & MacVicar, B. A. (2013). Prevention of

- LPS-Induced Microglia Activation, Cytokine Production and Sickness Behavior with TLR4 Receptor Interfering Peptides. *PLoS ONE*, 8(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060388>
- Hodge, R. D., Kowalczyk, T. D., Wolf, S. A., Encinas, J. M., Rippey, C., Enikolopov, G., ... Hevner, R. F. (2008). Intermediate Progenitors in Adult Hippocampal Neurogenesis: Tbr2 Expression and Coordinate Regulation of Neuronal Output. *The Journal of Neuroscience*, 28(14), 3707–3717. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.4280-07.2008>
- Hodge, R. D., Nelson, B. R., Kahoud, R. J., Yang, R., Mussar, K. E., Reiner, S. L., & Hevner, R. F. (2012). Tbr2 Is Essential for Hippocampal Lineage Progression from Neural Stem Cells to Intermediate Progenitors and Neurons. *Journal of Neuroscience*, 32(18), 6275–6287. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0532-12.2012>
- Hong, S., Gronert, K., Devchand, P. R., Moussignac, R. L., & Serhan, C. N. (2003). Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells: Autacoids in anti-inflammation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(17), 14677–14687. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300218200>
- Hosoi, T., Okuma, Y., Matsuda, T., & Nomura, Y. (2005). Novel pathway for LPS-induced afferent vagus nerve activation: Possible role of nodose ganglion. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 120(1–2), 104–107. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2004.11.012>
- Hüttenrauch, M., Salinas, G., & Wirths, O. (2016). Effects of Long-Term Environmental Enrichment on Anxiety, Memory, Hippocampal Plasticity and Overall Brain Gene Expression in C57BL6 Mice. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 9(AUG), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00062>
- Ito, D., Imai, Y., Ohsawa, K., Nakajima, K., Fukuuchi, Y., & Kohsaka, S. (1998). Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Molecular Brain Research*, 57(1), 1–9. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(98\)00040-0](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(98)00040-0)
- Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2015). Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature Immunology*, 16(4), 343–353. <https://doi.org/10.1038/ni.3123>
- Jakovcevski, M., Ruan, H., Shen, E. Y., Dincer, A., Javidfar, B., Ma, Q., ... Akbarian, S. (2015). Neuronal Kmt2a/Mll1 Histone Methyltransferase Is Essential for Prefrontal Synaptic Plasticity and Working Memory. *The Journal of Neuroscience*, 35(13), 5097–5108. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3004-14.2015>
- James, W. (1890). *The Principles of Psychology, Vol. 1*. London: MacMillan.
- Jang, M.-H., Bonaguidi, M. A., Kitabatake, Y., Sun, J., Song, J., Kang, E., ... Song, H. (2013). Secreted Frizzled-Related Protein 3 Regulates Activity-Dependent Adult Hippocampal Neurogenesis. *Cell Stem Cell*, 12(2), 215–223. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.11.021>
- Jänicke, R. U., Sohn, D., Essmann, F., & Schulze-Osthoff, K. (2007). The Multiple Battles Fought by Anti-Apoptotic p21. *Cell Cycle*, 6(4), 407–413. <https://doi.org/10.4161/cc.6.4.3855>
- Joshi, N., & Singh, S. (2018). Updates on immunity and inflammation in Parkinson disease pathology. *Journal of Neuroscience Research*, 96(3), 379–390. <https://doi.org/10.1002/jnr.24185>
- Kaplan, M. S., & Hinds, J. W. (1977). Neurogenesis in the adult rat: Electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science*, 197(4308), 1092–1094. <https://doi.org/10.1126/science.887941>
- Karimian, A., Ahmadi, Y., & Yousefi, B. (2016). Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA Repair*, 42, 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.04.008>
- Kawai, T., Takagi, N., Miyake-Takagi, K., Okuyama, N., Mochizuki, N., & Takeo, S. (2004). Characterization of BrdU-Positive Neurons Induced by Transient Global Ischemia in Adult Hippocampus. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 24(5), 548–555. <https://doi.org/10.1097/01.WCB.0000117807.29980.1A>
- Kempermann, G., Brandon, E. P., & Gage, F. H. (1998). Environmental stimulation of 129/SvJ

- mice causes increased cell proliferation and neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Current Biology*, 8(16), 939–944. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(07\)00377-6](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(07)00377-6)
- Kempermann, G., Kuhn, H. G., & Gage, F. H. (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*, 395(386), 493–495. <https://doi.org/10.1038/386493a0> DO
- Kempermann, G., Song, H., & Gage, F. H. (2015). Neurogenesis in the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harbor Perspectives Biol*, 7(9), 1–14. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018812>
- Keohane, A., Ryan, S., Maloney, E., Sullivan, A. M., & Nolan, Y. M. (2010). Tumour necrosis factor- $\alpha$  impairs neuronal differentiation but not proliferation of hippocampal neural precursor cells: Role of Hes1. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 43(1), 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2009.10.003>
- Kesner, R. P. (2018). An analysis of dentate gyrus function (an update). *Behavioural Brain Research*, 354(July 2017), 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.07.033>
- Kesner, R. P., Taylor, J. O., Hoge, J., & Andy, F. (2015). Role of the dentate gyrus in mediating object-spatial configuration recognition. *Neurobiology of Learning and Memory*, 118, 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.11.004>
- Kim, E. J., Ables, J. L., Dickel, L. K., Eisch, A. J., & Johnson, J. E. (2011). Ascl1 (Mash1) Defines Cells with Long-Term Neurogenic Potential in Subgranular and Subventricular Zones in Adult Mouse Brain. *PLoS ONE*, 6(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018472>
- Kinney, J. W., Bemiller, S. M., Murtishaw, A. S., Leisgang, A. M., Salazar, A. M., & Lamb, B. T. (2018). Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions*, 4, 575–590. <https://doi.org/10.1016/j.trci.2018.06.014>
- Kohman, R. A., Clark, P. J., DeYoung, E. K., Bhattacharya, T. K., Venghaus, C. E., & Rhodes, J. S. (2012). Voluntary wheel running enhances contextual but not trace fear conditioning. *Behavioural Brain Research*, 226(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.08.031>
- Kohman, R. A., & Rhodes, J. S. (2013). Neurogenesis, inflammation and behavior. *Brain, Behavior, and Immunity*, 27(1), 22–32. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.09.003>
- Koo, J. W., & Duman, R. S. (2008). IL-1 $\beta$  is an essential mediator of the antineurogenic and anhedonic effects of stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(2), 751–756. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708092105>
- Kosaka, T., & Hama, K. (1986). Three-Dimensional Structure of Astrocytes in the Rat Dentate Gyrus. *The Journal of Comparative Neurology*, 249(2), 242–260. <https://doi.org/10.1002/cne.902490209>
- Kreutzberg, G. W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in Neurosciences*, 19(8), 312–318. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(96\)10049-7](https://doi.org/10.1016/0166-2236(96)10049-7)
- Krezymon, A., Richetin, K., Halley, H., Roybon, L., Lassalle, J.-M., Francès, B., ... Rampon, C. (2013). Modifications of Hippocampal Circuits and Early Disruption of Adult Neurogenesis in the Tg2576 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *PLoS ONE*, 8(9), 9–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076497>
- Kronenberg, G., Reuter, K., Steiner, B., Brandt, M. D., Jessberger, S., Yamaguchi, M., & Kempermann, G. (2003). Subpopulations of Proliferating Cells of the Adult Hippocampus Respond Differently to Physiologic Neurogenic Stimuli. *The Journal of Comparative Neurology*, 467(4), 455–463. <https://doi.org/10.1002/cne.10945>
- Kuhn, H. G., Biebl, M., Wilhelm, D., Li, M., Friedlander, R. M., & Winkler, J. (2005). Increased generation of granule cells in adult Bcl-2-overexpressing mice: a role for cell death during continued hippocampal neurogenesis. *European Journal of Neuroscience*, 22(8), 1907–1915. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04377.x>
- Kuhn, H. G., Dickinson-Anson, H., & Gage, F. H. (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *The Journal of Neuroscience*, 16(6), 2027–2033. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-06-02027.1996>



- Kumar, H., Kawai, T., & Akira, S. (2011). Pathogen Recognition by the Innate Immune System. *International Reviews of Immunology*, 30(1), 16–34. <https://doi.org/10.3109/08830185.2010.529976>
- Laplagne, D. A., Kamienkowski, J. E., Espósito, M. S., Piatti, V. C., Zhao, C., Gage, F. H., & Schinder, A. F. (2007). Similar GABAergic inputs in dentate granule cells born during embryonic and adult neurogenesis. *European Journal of Neuroscience*, 25(10), 2973–2981. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05549.x>
- Laye, S., Bluthé, R.-M., Kent, S., Combe, C., Médina, C., Parnet, P., ... Dantzer, R. (1995). Subdiaphragmatic vagotomy blocks induction of IL-1 $\beta$  mRNA in mice brain in response to peripheral LPS. *American Journal of Physiology*, 268(5), 1327–1331. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1995.268.5.R1327>
- Lee, I., & Kesner, R. P. (2004). Differential Contributions of Dorsal Hippocampal Subregions to Memory Acquisition and Retrieval in Contextual Fear-Conditioning. *Hippocampus*, 14(3), 301–310. <https://doi.org/10.1002/hipo.10177>
- Leonard, B. E. (2018). Inflammation and depression: a causal or coincidental link to the pathophysiology? *Acta Neuropsychiatrica*, 30(1), 1–16. <https://doi.org/10.1017/neu.2016.69>
- Leutgeb, J. K., Leutgeb, S., Moser, M.-B., & Moser, E. I. (2007). Supporting Online Material for Pattern Separation in Dentate Gyrus and CA3 of the Hippocampus. *Science*, 315(5814), 961–966. <https://doi.org/10.1126/science.1135801>
- Li, X., Gutierrez, D. V., Hanson, M. G., Han, J., Mark, M. D., Chiel, H., ... Herlitze, S. (2005). Fast noninvasive activation and inhibition of neural and network activity by vertebrate rhodopsin and green algae channelrhodopsin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(49), 17816–17821. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509030102>
- Lim, A. S. P., Gaiteri, C., Yu, L., Sohail, S., Swardfager, W., Tasaki, S., ... De Jager, P. L. (2018). Seasonal plasticity of cognition and related biological measures in adults with and without Alzheimer disease: Analysis of multiple cohorts. *PLoS Medicine*, 15(9), 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002647>
- Lois, C., & Alvarez-Buylla, A. (1993). Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(5), 2074–2077. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.5.2074>
- Lopez-García, C., Molowny, A., García-Verdugo, J. M., & Ferrer, I. (1988). Delayed postnatal neurogenesis in the cerebral cortex of lizards. *Developmental Brain Research*, 43(2), 167–174. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(88\)90096-X](https://doi.org/10.1016/0165-3806(88)90096-X)
- Lourenco, M. V., Clarke, J. R., Frozza, R. L., Bomfim, T. R., Forny-Germano, L., Batista, A. F., ... De Felice, F. G. (2013). TNF- $\alpha$  Mediates PKR-Dependent Memory Impairment and Brain IRS-1 Inhibition Induced by Alzheimer's  $\beta$ -Amyloid Oligomers in Mice and Monkeys. *Cell Metabolism*, 18(6), 831–843. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.11.002>
- Lu, Y.-C., Yeh, W.-C., & Ohashi, P. S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, 42(2), 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.01.006>
- Lugert, S., Basak, O., Knuckles, P., Haussler, U., Fabel, K., Götz, M., ... 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. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.03.017>
- Lugert, S., Vogt, M., Tchorz, J. S., Müller, M., Giachino, C., & Taylor, V. (2012). Homeostatic neurogenesis in the adult hippocampus does not involve amplification of Ascl1 high intermediate progenitors. *Nature Communications*, 3(670). <https://doi.org/10.1038/ncomms1670>
- Lyman, M., Lloyd, D. G., Ji, X., Vizcaychipi, M. P., & Ma, D. (2014). Neuroinflammation: The role and consequences. *Neuroscience Research*, 79(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2013.10.004>

- Maeda, J., Ji, B., Irie, T., Tomiyama, T., Maruyama, M., Okauchi, T., ... Suhara, T. (2007). Longitudinal, Quantitative Assessment of Amyloid, Neuroinflammation, and Anti-Amyloid Treatment in a Living Mouse Model of Alzheimer's Disease Enabled by Positron Emission Tomography. *The Journal of Neuroscience*, 27(41), 10957–10968. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0673-07.2007>
- Maggio, N., Shavit-Stein, E., Dori, A., Blatt, I., & Chapman, J. (2013). Prolonged systemic inflammation persistently modifies synaptic plasticity in the hippocampus: Modulation by the stress hormones. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 6(DEC), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2013.00046>
- Mahmoud, R., Wainwright, S. R., & Galea, L. A. M. (2016). Sex hormones and adult hippocampal neurogenesis: Regulation, implications, and potential mechanisms. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 41, 129–152. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2016.03.002>
- Marlatt, M. W., Potter, M. C., Lucassen, P. J., & van Praag, H. (2012). Running Throughout Middle-Age Improves Memory Function, Hippocampal Neurogenesis, and BDNF Levels in Female C57Bl/6J Mice. *Developmental Neurobiology*, 72(6), 943–952. <https://doi.org/10.1002/dneu.22009>
- Matsusaka, T., Fujikawa, K., Nishio, Y., Mukaida, N., Matsushima, K., Kishimoto, T., & Akira, S. (1993). Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(21), 10193–10197. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.21.10193>
- Matthews, E. A., Morgenstern, N. A., Piatti, V. C., Zhao, C., Jessberger, S., Schinder, A. F., & Gage, F. H. (2010). A Distinctive Layering Pattern of Mouse Dentate Gyrus is Generated by Developmental and Adult Neurogenesis. *The Journal of Comparative Neurology*, 518(22), 4479–4490. <https://doi.org/10.1002/cne.22489>
- McAvoy, K., Besnard, A., & Sahay, A. (2015). Adult hippocampal neurogenesis and pattern separation in DG: a role for feedback inhibition in modulating sparseness to govern population-based coding. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 9, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2015.00120>
- McGrath, S. A. (1998). Induction of p21 WAF/CIP1 during Hyperoxia. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 18(2), 179–187. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.18.2.2964m>
- McHugh, T. J., Jones, M. W., Quinn, J. J., Balthasar, N., Coppari, R., Elmquist, J. K., ... Tonegawa, S. (2007). Dentate Gyrus NMDA Receptors Mediate Rapid Pattern Separation in the Hippocampal Network. *Science*, 317(5834), 94–99. <https://doi.org/10.1126/science.1140263>
- Melo-Salas, M. S., Pérez-Domínguez, M., & Zepeda, A. (2018). Systemic Inflammation Impairs Proliferation of Hippocampal Type 2 Intermediate Precursor Cells. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 38(8), 1517–1528. <https://doi.org/10.1007/s10571-018-0624-3>
- Merzenich, M. M., Nahum, M., & Van Vleet, T. M. (2013). Neuroplasticity: Introduction. In M. M. Merzenich, M. Nahum, & T. M. Van Vleet (Eds.), *Progress in Brain Research* (Vol. 207, pp. 21–26). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63327-9.10000-1>
- Merzenich, M. M., Nelson, R. J., Stryker, M. P., Cynader, M. S., Schoppmann, A., & Zook, J. M. (1984). Somatosensory Cortical Map Changes Following Digit Amputation in Adult Monkeys. *The Journal of Comparative Neurology*, 224(4), 591–605. <https://doi.org/10.1002/cne.902240408>
- Mira, H., Andreu, Z., Suh, H., Lie, D. C., Jessberger, S., Consiglio, A., ... Gage, F. H. (2010). Signaling through BMPR-IA Regulates Quiescence and Long-Term Activity of Neural Stem Cells in the Adult Hippocampus. *Cell Stem Cell*, 7(1), 78–89. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.04.016>
- Monje, M. L., Toda, H., & Palmer, T. D. (2003). Inflammatory Blockade Restores Adult Hippocampal Neurogenesis. *Science*, 302(5651), 1760–1765.

- <https://doi.org/10.1126/science.1088417>
- Monteiro, B. M. M., Moreira, F. A., Massensini, A. R., Moraes, M. F. D., & Pereira, G. S. (2014). Enriched Environment Increases Neurogenesis and Improves Social Memory Persistence in Socially Isolated Adult Mice. *Hippocampus*, 24(2), 239–248. <https://doi.org/10.1002/hipo.22218>
- Moreno-Jiménez, E. P., Flor-García, M., Terreros-Roncal, J., Rábano, A., Cafini, F., Pallas-Bazarra, N., ... Llorens-Martín, M. (2019). Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease. *Nature Medicine*, 25(4), 554–560. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0375-9>
- Morgenstern, N. A., Lombardi, G., & Schinder, A. F. (2008). Newborn granule cells in the ageing dentate gyrus. *Journal of Physiology*, 586(16), 3751–3757. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.154807>
- Moss, J., Gebara, E., Bushong, E. A., Sánchez-Pascual, I., O'Laio, R., El M'Ghari, I., ... Toni, N. (2016). Fine processes of Nestin-GFP-positive radial glia-like stem cells in the adult dentate gyrus ensheath local synapses and vasculature. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(18), E2536–E2545. <https://doi.org/10.1073/pnas.1514652113>
- Nacher, J., Varea, E., Blasco-Ibañez, J. M., Castillo-Gomez, E., Crespo, C., Martinez-Guijarro, F. J., & McEwen, B. S. (2005). Expression of the transcription factor Pax6 in the adult rat dentate gyrus. *Journal of Neuroscience Research*, 81(6), 753–761. <https://doi.org/10.1002/jnr.20596>
- Newton, K., & Dixit, V. M. (2012). Signaling in Innate Immunity and Inflammation. *Cold Spring Harbor Perfect Bioll*, 4(3). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006049> Cite
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., & Helmchen, F. (2005). Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo. *Science*, 308(5726), 1314–1318. <https://doi.org/10.1126/science.1110647>
- Ninkovic, J., Mori, T., & Götz, M. (2007). Distinct Modes of Neuron Addition in Adult Mouse Neurogenesis. *The Journal of Neuroscience*, 27(40), 10906–10911. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.2572-07.2007>
- Norden, D. M., Trojanowski, P. J., Villanueva, E., Navarro, E., & Godbout, J. P. (2015). Sequential Activation of Microglia and Astrocyte Cytokine Expression Precedes Increased Iba-1 or GFAP Immunoreactivity Following Systemic Immune Challenge. *Glia*, 64(2), 300–316. <https://doi.org/10.1002/glia.22930>
- Obernier, K., Cebrian-Silla, A., Thomson, M., Parraguez, J. I., Anderson, R., Guinto, C., ... Alvarez-Buylla, A. (2018). Adult Neurogenesis Is Sustained by Symmetric Self-Renewal and Differentiation. *Cell Stem Cell*, 22, 221–234.e8. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.01.003>
- Olson, J. K., & Miller, S. D. (2004). Microglia Initiate Central Nervous System Innate and Adaptive Immune Responses through Multiple TLRs. *The Journal of Immunology*, 173(6), 3916–3924. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.6.3916>
- Orihuela, R., McPherson, C. A., & Harry, G. J. (2016). Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *British Journal of Pharmacology*, 173(4), 649–665. <https://doi.org/10.1111/bph.13139>
- Ormerod, B. K., Hanft, S. J., Asokan, A., Haditsch, U., Lee, S. W., & Palmer, T. D. (2013). PPAR $\gamma$  activation prevents impairments in spatial memory and neurogenesis following transient illness. *Brain, Behavior, and Immunity*, 29, 28–38. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.10.017>
- Osborn, L. M., Kamphuis, W., Wadman, W. J., & Hol, E. M. (2016). Astroglialosis: An integral player in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology*, 144, 121–141. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.01.001>
- Otte, C., Gold, S. M., Penninx, B. W., Pariante, C. M., Etkin, A., Fava, M., ... Schatzberg, A. F. (2016). Major depressive disorder. *Nature Reviews Disease Primers*, 2(3), 1–20. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.65>
- Palmer, T. D., Willhoite, A. R., & Gage, F. H. (2000). Vascular Niche for Adult Hippocampal Neurogenesis. *The Journal*, 494, 479–494. <https://doi.org/10.1002/1096->

- 9861(20001002)425:4%3C479::AID-CNE2%3E3.0.CO;2-3
- Pan, W., P. Stone, K., Hsuchou, H., K. Manda, V., Zhang, Y., & J. Kastin, A. (2011). Cytokine Signaling Modulates Blood-Brain Barrier Function. *Current Pharmaceutical Design*, 17(33), 3729–3740. <https://doi.org/10.2174/138161211798220918>
- Pardon, M.-C. (2015). Lipopolysaccharide hyporesponsiveness: Protective or damaging response to the brain? *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 56(3), 903–913.
- Parent, J. M., Yu, T. W., Leibowitz, R. T., Geschwind, D. H., Sloviter, R. S., & Lowenstein, D. H. (1997). Dentate Granule Cell Neurogenesis Is Increased by Seizures and Contributes to Aberrant Network Reorganization in the Adult Rat Hippocampus Jack. *The Journal of Neuroscience*, 17(10), 3727–3738. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-10-03727.1997>
- Pérez-Domínguez, M., Ávila-Muñoz, E., Domínguez-Rivas, E., & Zepeda, A. (2019). The detrimental effects of lipopolysaccharide-induced neuroinflammation on adult hippocampal neurogenesis depend on the duration of the pro-inflammatory response. *Neural Regeneration Research*, 14(5), 817–825. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.249229>
- Pérez-Domínguez, M., Tovar-y-Romo, L. B., & Zepeda, A. (2018). Neuroinflammation and physical exercise as modulators of adult hippocampal neural precursor cell behavior. *Reviews in the Neurosciences*, 29(1), 1–20. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2017-0024>
- Piatti, V. C., Davies-Sala, M. G., Espósito, M. S., Mongiat, L. A., Trincherro, M. F., & Schinder, A. F. (2011). The Timing for Neuronal Maturation in the Adult Hippocampus Is Modulated by Local Network Activity. *The Journal of Neuroscience*, 31(21), 7715–7728. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1380-11.2011>
- Pinteaux, E., Parker, L. C., Rothwell, N. J., & Luheshi, G. N. (2002). Expression of interleukin-1 receptors and their role in interleukin-1 actions in murine microglial cells. *Journal of Neurochemistry*, 83(4), 754–763. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.01184.x>
- Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C. M., Halliday, G. M., Brundin, P., Volkman, J., ... Lang, A. E. (2017). Parkinson disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 1–21. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.13>
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., ... Beutler, B. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: Mutations in Tlr4 gene. *Science*, 282(5396), 2085–2088. <https://doi.org/10.1126/science.282.5396.2085>
- Pribiag, H., & Stellwagen, D. (2014). Neuroimmune regulation of homeostatic synaptic plasticity. *Neuropharmacology*, 78(C), 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.06.008>
- Prinz, M., & Priller, J. (2014). Microglia and brain macrophages in the molecular age: From origin to neuropsychiatric disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(5), 300–312. <https://doi.org/10.1038/nrn3722>
- Qin, L., Wu, X., Block, M. L., Liu, Y., Breese, G. R., Hong, J.-S., ... Crews, F. T. (2007). Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia*, 55(5), 453–462. <https://doi.org/10.1002/glia.20467>
- Raber, J., Rola, R., LeFevour, A., Morhardt, D., Curley, J., Mizumatsu, S., ... Fike, J. R. (2004). Radiation-Induced Cognitive Impairments are Associated with Changes in Indicators of Hippocampal Neurogenesis. *Radiation Research*, 162(1), 39–47. <https://doi.org/10.1667/RR3206>
- Raetz, C. R. H., & Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*, 71(1), 635–700. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414>
- Ramesh, G., Maclean, A. G., & Philipp, M. T. (2013). Cytokines and Chemokines at the Crossroads of Neuroinflammation, Neurodegeneration, and Neuropathic Pain. *Mediators of Inflammation*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/480739>
- Ramirez-Amaya, V., Marrone, D. F., Gage, F. H., Worley, P. F., & Barnes, C. A. (2006). Integration of New Neurons into Functional Neural Networks. *The Journal of Neuroscience*, 26(47), 12237–12241. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.2195-06.2006>
- Ramón y Cajal, S. (1913). *Estudios sobre la degeneración y regeneración del sistema nervioso*

- (Vols. 1-2). Madrid: Imp. de Hijos de Nicolás Moya.
- Riazi, K., Galic, M. A., Kentner, A. C., Reid, A. Y., Sharkey, K. A., & Pittman, Q. J. (2015). Microglia-Dependent Alteration of Glutamatergic Synaptic Transmission and Plasticity in the Hippocampus during Peripheral Inflammation. *Journal of Neuroscience*, *35*(12), 4942–4952. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4485-14.2015>
- Rocchetti, J., Isingrini, E., Dal Bo, G., Sagheby, S., Menegaux, A., Tronche, F., ... Giros, B. (2015). Presynaptic D2 Dopamine Receptors Control Long-Term Depression Expression and Memory Processes in the Temporal Hippocampus. *Biological Psychiatry*, *77*(6), 513–525. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.03.013>
- Rowitch, D. H., & Kriegstein, A. R. (2010). Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature*, *468*(7321), 214–222. <https://doi.org/10.1038/nature09611>
- Roybon, L., Hjalt, T., Stott, S., Guillemot, F., Li, J.-Y., & Brundin, P. (2009). Neurogenin2 Directs Granule Neuroblast Production and Amplification while NeuroD1 Specifies Neuronal Fate during Hippocampal Neurogenesis. *PLoS ONE*, *4*(3), e4779. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004779>
- Rummel, C., Inoue, W., Poole, S., & Luheshi, G. N. (2010). Leptin regulates leukocyte recruitment into the brain following systemic LPS-induced inflammation. *Molecular Psychiatry*, *15*(5), 523–534. <https://doi.org/10.1038/mp.2009.98>
- Schiltz, J. C., & Sawchenko, P. E. (2002). Distinct Brain Vascular Cell Types Manifest Inducible Cyclooxygenase Expression as a Function of the Strength and Nature of Immune Insults. *The Journal of Neuroscience*, *22*(13), 5606–5618. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-13-05606.2002>
- Schmidt-Hieber, C., Jonas, P., & Bischofberger, J. (2004). Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature*, *429*(6988), 184–187. <https://doi.org/10.1038/nature02553>
- Schnaitman, C. A., & Klena, J. D. (1993). Genetics of Lipopolysaccharide Biosynthesis in Enteric Bacteria. *Microbiological Reviews*, *57*(3), 655–682.
- Schwab, J. M., & Serhan, C. N. (2006). Lipoxins and new lipid mediators in the resolution of inflammation. *Current Opinion in Pharmacology*, *6*(4), 414–420. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2006.02.006>
- Seguin, J. A., Brennan, J., Mangano, E., & Hayley, S. (2009). Proinflammatory cytokines differentially influence adult hippocampal cell proliferation depending upon the route and chronicity of administration. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, *5*(1), 5–14.
- Seki, T., & Arai, Y. (1993). Highly Polysialylated Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM-H) Is Expressed by Newly Generated Granule Cells in the Dentate Gyrus of the Adult Rat. *The Journal of Neuroscience*, *13*(6), 2351–2358. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.13-06-02351.1993>
- Seki, T., Namba, T., Mochizuki, H., & Onodera, M. (2007). Clustering, Migration, and Neurite Formation of Neural Precursor Cells in the Adult Rat Hippocampus. *The Journal of Comparative Neurology*, *259*, 244–259. <https://doi.org/10.1002/cne>
- Serhan, C. N., Brain, S. D., Buckley, C. D., Gilroy, D. W., Haslett, C., O'Neill, L. A. J., ... Wallace, J. L. (2007). Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *The FASEB Journal*, *21*(2), 325–332. <https://doi.org/10.1096/fj.06-7227rev>
- Seri, B., García-Verdugo, J. M., Collado-Morente, L., McEwen, B. S., & Alvarez-Buylla, A. (2004). Cell Types, Lineage, and Architecture of the Germinal Zone in the Adult Dentate Gyrus. *The Journal of Comparative Neurology*, *478*(4), 359–378. <https://doi.org/10.1002/cne.20288>
- Shors, T. J., Miesegaes, G., Beylin, A., Zhao, M., Rydel, T., & Gould, E. (2001). Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature*, *410*(6826), 372–376. <https://doi.org/10.1038/35066584>
- Shors, T. J., Townsend, D. A., Zhao, M., Kozorovitskiy, Y., & Gould, E. (2002). Neurogenesis May Relate to Some But Not All Types of Hippocampal-Dependent Learning. *Hippocampus*,

- 12(5), 578–584. <https://doi.org/10.1002/hipo.10103>
- Sierra, A., Encinas, J. M., Deudero, J. J. P., Chancey, J. H., Enikolopov, G., Overstreet-Wadiche, L. S., ... Maletic-Savatic, M. (2010). Microglia Shape Adult Hippocampal Neurogenesis through Apoptosis-Coupled Phagocytosis. *Cell Stem Cell*, 7(4), 483–495. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.08.014>
- Skelly, D. T., Hennessy, E., Dansereau, M.-A., & Cunningham, C. (2013). A Systematic Analysis of the Peripheral and CNS Effects of Systemic LPS, IL-1B, TNF- $\alpha$  and IL-6 Challenges in C57BL/6 Mice. *PLoS ONE*, 8(7), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069123>
- Snyder, J. S., Hong, N. S., McDonald, R. J., & Wojtowicz, J. M. (2005). A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory. *Neuroscience*, 130(4), 843–852. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.10.009>
- Song, J., Olsen, R. H. J., Sun, J., Ming, G., & Song, H. (2016). Neuronal Circuitry Mechanisms Regulating Adult Mammalian Neurogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(8), 1–20. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018937>
- Song, J., Zhong, C., Bonaguidi, M. A., Sun, G. J., Hsu, D., Gu, Y., ... Song, H. (2012). Neuronal circuitry mechanism regulating adult quiescent neural stem-cell fate decision. *Nature*, 489(7414), 150–154. <https://doi.org/10.1038/nature11306>
- Sorrells, S. F., Paredes, M. F., Cebrian-Silla, A., Sandoval, K., Qi, D., Kelley, K. W., ... Alvarez-Buylla, A. (2018). Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature*, 555(7696), 377–381. <https://doi.org/10.1038/nature25975>
- Spanswick, S. C., & Sutherland, R. J. (2010). Object/context-specific memory deficits associated with loss of hippocampal granule cells after adrenalectomy in rats. *Learning and Memory*, 17(5), 241–245. <https://doi.org/10.1101/lm.1746710>
- Sparkman, N. L., & Johnson, R. W. (2008). Neuroinflammation Associated with Aging Sensitizes the Brain to the Effects of Infection or Stress. *NeuroImmunoModulation*, 15(4–6), 323–330. <https://doi.org/10.1159/000156474>
- Steiner, B., Klempin, F., Wang, L. P., 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. <https://doi.org/10.1002/glia.20407>
- Steiner, B., Kronenberg, G., Jessberger, S., Brandt, M. D., Reuter, K., & Kempermann, G. (2004). Differential Regulation of Gliogenesis in the Context of Adult Hippocampal Neurogenesis in Mice. *Glia*, 46(1), 41–52. <https://doi.org/10.1002/glia.10337>
- Sun, G. J., Sailor, K. A., Mahmood, Q. A., Chavali, N., Christian, K. M., Song, H., & Ming, G. (2013). Seamless Reconstruction of Intact Adult-Born Neurons by Serial End-Block Imaging Reveals Complex Axonal Guidance and Development in the Adult Hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 33(28), 11400–11411. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1374-13.2013>
- Sun, G. J., Zhou, Y., Stadel, R. P., Moss, J., Yong, J. H. A., Ito, S., ... Ming, G. (2015). Tangential migration of neuronal precursors of glutamatergic neurons in the adult mammalian brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(30), 9484–9489. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508545112>
- Suzuki, K., Okada, K., Wakuda, T., Shinmura, C., Kameno, Y., Iwata, K., ... Mori, N. (2010). Destruction of Dopaminergic Neurons in the Midbrain by 6-Hydroxydopamine Decreases Hippocampal Cell Proliferation in Rats: Reversal by Fluoxetine. *PLoS ONE*, 5(2), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009260>
- Sweatt, J. D. (2016). Neural plasticity and behavior – sixty years of conceptual advances. *Journal of Neurochemistry*, 139, 179–199. <https://doi.org/10.1111/jnc.13580>
- Tang, Y., & Le, W. (2014). Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Molecular Neurobiology*, 53(2), 1181–1194. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-9070-5>

- Toni, N., Laplagne, D. A., Zhao, C., Lombardi, G., Ribak, C. E., Gage, F. H., & Schinder, A. F. (2008). Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nature Neuroscience*, *11*(8), 901–907. <https://doi.org/10.1038/nn.2156>
- Toni, N., & Schinder, A. F. (2016). Maturation and Functional Integration of New Granule Cells into the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *8*(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018903>
- Toni, N., Teng, E. M., Bushong, E. A., Aimone, J. B., Zhao, C., Consiglio, A., ... Gage, F. H. (2007). Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus. *Nature Neuroscience*, *10*(6), 727–734. <https://doi.org/10.1038/nn1908>
- Trakhtenberg, E. F., & Goldberg, J. L. (2011). Neuroimmune Communication. *Science*, *334*(6052), 47–48. <https://doi.org/10.1126/science.1213099>
- Valero, J., Mastrella, G., Neiva, I., Sánchez, S., & Malva, J. O. (2014). Long-term effects of an acute and systemic administration of LPS on adult neurogenesis and spatial memory. *Frontiers in Neuroscience*, *8*, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00083>
- Vallières, L., Campbell, I. L., Gage, F. H., & Sawchenko, P. E. (2002). Reduced Hippocampal Neurogenesis in Adult Transgenic Mice with Chronic Astrocytic Production of Interleukin-6. *The Journal of Neuroscience*, *22*(2), 486–492. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-02-00486.2002>
- van Praag, H., Christie, B. R., Sejnowski, T. J., & Gage, F. H. (1999). Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*(23), 13427–13431. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.23.13427>
- von Bohlen und Halbach, O. (2011). Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus. *Cell and Tissue Research*, *345*(1), 1–19. <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1196-4>
- Weeden, C. S. S., Hu, N. J., Ho, L. U. N., & Kesner, R. P. (2014). The Role of the Ventral Dentate Gyrus in Olfactory Pattern Separation. *Hippocampus*, *24*(5), 553–559. <https://doi.org/10.1002/hipo.22248>
- Winner, B., Lie, D. C., Rockenstein, E., Aigner, R., Aigner, L., Masliah, E., ... Winkler, J. (2004). Human Wild-Type  $\alpha$ -Synuclein Impairs Neurogenesis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *63*(11), 1155–1166. <https://doi.org/10.1093/jnen/63.11.1155>
- Winner, B., Rockenstein, E., Lie, D. C., Aigner, R., Mante, M., Bogdahn, U., ... Winkler, J. (2008). Mutant  $\alpha$ -synuclein exacerbates age-related decrease of neurogenesis. *Neurobiology of Aging*, *29*(6), 913–925. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2006.12.016>
- Winocur, G., Wojtowicz, J. M., Sekeres, M., Snyder, J. S., & Wang, S. (2006). Inhibition of Neurogenesis Interferes With Hippocampus-Dependent Memory Function. *Hippocampus*, *16*(3), 296–304. <https://doi.org/10.1002/hipo.20163>
- Witter, M. P., Groenewegen, H. J., Lopes da Silva, F. H., & Lohman, A. H. M. (1989). Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal region. *Progress in Neurobiology*, *33*(3), 161–253. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(89\)90009-9](https://doi.org/10.1016/0301-0082(89)90009-9)
- Wu, C.-W., Chen, Y.-C., Yu, L., Chen, H., Jen, C. J., Huang, A.-M., ... Kuo, Y.-M. (2007). Treadmill exercise counteracts the suppressive effects of peripheral lipopolysaccharide on hippocampal neurogenesis and learning and memory. *Journal of Neurochemistry*, *103*(6), 2471–2481. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04987.x>
- Wu, M. D., Montgomery, S. L., Rivera-Escalera, F., Olschowka, J. A., & O'Banion, M. K. (2013). Sustained IL-1 $\beta$  expression impairs adult hippocampal neurogenesis independent of IL-1 signaling in nestin+ neural precursor cells. *Brain, Behavior, and Immunity*, *32*, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.03.003>
- Xian, W., Wu, Y., Xiong, W., Li, L., Li, T., Pan, S., ... Shang, Y. (2016). The pro-resolving lipid mediator Maresin 1 protects against cerebral ischemia/reperfusion injury by attenuating the pro-inflammatory response. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *472*(1), 175–181. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.02.090>

- Yang, I., Han, S. J., Kaur, G., Crane, C., & Parsa, A. T. (2010). The role of microglia in central nervous system immunity and glioma immunology. *Journal of Clinical Neuroscience*, *17*(1), 6–10. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2009.05.006>
- Yatim, K. M., & Lakkis, F. G. (2015). A Brief Journey through the Immune System. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, *10*(7), 1274–1281. <https://doi.org/10.2215/CJN.10031014>
- Yau, S.-Y., Lau, B. W.-M., Tong, J.-B., Wong, R., Ching, Y.-P., Qiu, G., ... So, K.-F. (2011). Hippocampal Neurogenesis and Dendritic Plasticity Support Running-Improved Spatial Learning and Depression-Like Behaviour in Stressed Rats. *PLoS ONE*, *6*(9), e24263. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024263>
- Yilmaz, M. S., Goktalay, G., Millington, W. R., Myer, B. S., Cutrera, R. A., & Feleder, C. (2008). Lipopolysaccharide-induced hypotension is mediated by a neural pathway involving the vagus nerve, the nucleus tractus solitarius and alpha-adrenergic receptors in the preoptic anterior hypothalamic area. *Journal of Neuroimmunology*, *203*(1), 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2008.06.023>
- Yirmiya, R., & Goshen, I. (2011). Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain, Behavior, and Immunity*, *25*(2), 181–213. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.10.015>
- Yirmiya, R., Pollak, Y., Barak, O., Avitsur, R., Ovadia, H., Bette, M., ... Weidenfeld, J. (2001). Effects of Antidepressant Drugs on the Behavioral and Physiological Responses to Lipopolysaccharide (LPS) in Rodents. *Neuropsychopharmacology*, *24*(5), 531–544. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(00\)00226-8](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(00)00226-8)
- Yu, A. C. H., & Lau, L. T. (2000). Expression of interleukin-1 alpha, tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 genes in astrocytes under ischemic injury. *Neurochemistry International*, *36*(4–5), 369–377. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(99\)00145-X](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(99)00145-X)
- Yuqiang, L., Zheng, Z., Lin, H., Li, Z., Jinyu, Z., Yuehua, W., ... Tingxiu, L. (2015). Phytic acid attenuates inflammatory responses and the levels of NF-κB and p-ERK in MPTP-induced Parkinson's disease model of mice. *Neuroscience Letters*, *597*, 132–136. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.04.040>
- Zepeda, A., Aguilar-Arredondo, A., Michel, G., Ramos-Languren, L. E., Escobar, M. L., & Arias, C. (2013). Functional recovery of the dentate gyrus after a focal lesion is accompanied by structural reorganization in the adult rat. *Brain Structure and Function*, *218*(2), 437–453. <https://doi.org/10.1007/s00429-012-0407-4>
- Zepeda, A., Sengpiel, F., Guagnelli, M. A., Vaca, L., & Arias, C. (2004). Functional Reorganization of Visual Cortex Maps after Ischemic Lesions Is Accompanied by Changes in Expression of Cytoskeletal Proteins and NMDA and GABAA Receptor Subunits. *The Journal of Neuroscience*, *24*(8), 1812–1821. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3213-03.2004>
- Zhang, C.-L., Zou, Y., He, W., Gage, F. H., & Evans, R. M. (2008). A role for adult TLX-positive neural stem cells in learning and behaviour. *Nature*, *451*(7181), 1004–1007. <https://doi.org/10.1038/nature06562>
- Zhao, C., Teng, E. M., Summers Jr, R. G., Ming, G., & Gage, F. H. (2006). Distinct Morphological Stages of Dentate Granule Neuron Maturation in the Adult Mouse Hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, *26*(1), 3–11. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3648-05.2006>
- Ziv, Y., Ron, N., Butovsky, O., Landa, G., Sudai, E., Greenberg, N., ... Schwartz, M. (2006). Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nature Neuroscience*, *9*(2), 268–275. <https://doi.org/10.1038/nn1629>
- Zonis, S., Ljubimov, V. A., Mahgerefteh, M., Pechnick, R. N., Wawrowsky, K., & Chesnokova, V. (2013). p21Cip restrains hippocampal neurogenesis and protects neuronal progenitors from apoptosis during acute systemic inflammation. *Hippocampus*, *23*(12), 1383–1394. <https://doi.org/10.1002/hipo.22192>
- Zuckerman, S. H., Evans, G. F., & Guthrie, L. (1991). Transcriptional and post-transcriptional



mechanisms involved in the differential expression of LPS-induced IL-1 and TNF mRNA.  
*Immunology*, 73(4), 460–465.

## APÉNDICE A. Preparación de reactivos

### 1. Solución limpiadora

Agregar 100 ml de etanol y 100 de Extran® a 800 ml de agua desionizada. Almacenar a temperatura ambiente (TA).

### 2. Ácido clorhídrico (HCl) 2N

Agregar 16.6 ml de HCl concentrado a 83.4 ml de agua desionizada. Almacenar a TA.

### 3. PBS (*Phosphate-buffered saline*) 1x, pH 7.4

Disolver 8 g de NaCl (137 mM), 0.2 g de KCl (2.7 mM), 1.44 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (10 mM) y 0.24 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1.8 mM) en 800 ml de agua desionizada. Ajustar pH con HCl 2N. Aforar a 1L. Almacenar a TA o 4°C.

### 4. Buffer de lisis (RIPA buffer)

Agregar 2.5 ml de stock Tris 1M (50 mM), 175 mg de NaCl (60 mM), 50 mg de SDS (dodecilsulfato sódico; 0.1%), 25 mg de DOC (ácido desoxicólico; 0.5%), 5 ml de NP-40 (Nonil fenoxipolietoxietanol, 1%) y 2 ml de stock 25x cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche; 2%) a 40.5 ml de agua Milli-Q® (Merck, Darmstadt, DEU). Almacenar a 4°C.

### 5. Buffer de carga Laemmli 2x

Agregar 0.625 ml de Tris-HCl 2M (pH 6.8, 125 mM), 4 ml de SDS 10% (4%), 1 ml de β-mercaptoetanol (10%), 2 ml de glicerol (20%), azul de bromofenol 0.1% (0.004%) a 1.975 ml de agua desionizada,

### 6. Buffer para gel concentrador 4x, pH 6.8

Agregar 18 g de Tris base (1.5 M) y 0.4 g de SDS (0.4%) a 80 ml de agua desionizada. Ajustar pH con HCl 2N. Aforar a 100 ml. Almacenar a 4°C.

## 7. Buffer para gel separador 4x, pH 8.8

Agregar 6 g de Tris base (0.5 M) y 0.4 g de SDS (0.4%) a 80 ml de agua desionizada. Ajustar pH con HCl 2N. Aforar a 100 ml. Almacenar a 4°C.

## 8. Gel para electroforesis

a. **Gel concentrador:** Agregar 0.33 ml de 30% acrilamida/bisacrilamida, 0.5 ml de buffer para gel concentrador, 1.1 ml de agua desionizada, 20 µl de persulfato de amonio y 5 µl de TEMED.

b. **Gel separador al 12%:** Agregar 4 ml de 30% acrilamida/bisacrilamida, 2.5 ml de buffer para gel separador, 3.4 ml de agua desionizada, 100 µl de persulfato de amonio y 4 µl de TEMED.

## 9. TBS 1x, pH 7.5

Disolver 2.42 g de Tris base (20 mM) y 8.015 g de NaCl (137 mM) en 800 ml de agua desionizada. Ajustar pH con HCl 2N. Aforar a 1L. Almacenar a TA.

## 10. PB (*Sodium phosphate buffer*), pH 7.4

a. **PB 0.1 M:** Disolver 3.1 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y 10.9 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  en 800 ml de agua desionizada. Ajustar pH con HCl 2N. Aforar a 1L. Almacenar a TA o 4°C

b. **PB 0.2 M:** Disolver 6.2 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y 21.8 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  en 800 ml de agua desionizada. Ajustar pH con HCl 2N. Aforar a 1L. Almacenar a Ta o 4°C

## 11. Paraformaldehído (PFA) al 4%

Disolver 40 g de PFA en 1L de PB 0.1 M. Mezclar y calentar a < 60°C. Pasar la solución a través de un filtro de 0.2 µm. Almacenar a 4°C. Siempre utilizar fresco.

## 12. Solución de criopreservación

Agregar 250 ml de etilenglicol (25%) y 250 ml de glicerol (25%) a 500 ml de agua desionizada. Pasar la solución a través de papel filtro. Almacenar a 4°C.

**13. Buffer de citratos, pH 6.0**

Disolver 2.94 g de citrato de sodio dihidratado (10 mM) en 1L de agua desionizada. Ajustar pH con HCl 2N. Agregar 0.5 ml de Tween 20 (0.05%). Almacenar a TA o 4°C.

**14. Buffer de borato de sodio, pH 8.5**

Disolver 3.814 g de  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  (0.1 M) en 80 ml de agua desionizada. Ajustar pH con HCl 2N. Aforar a 100 ml. Almacenar a TA.