



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**TÍTULO DEL PROYECTO**

**LA PROTEÍNA GREMLINA-1 COMO REGULADORA DE LA NEUROGÉNESIS EN EL  
GIRO DENTADO DEL HIPOCAMPO**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**Q.F.B. REYES ALVA MARÍA GUADALUPE**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. GERARDO BERNABÉ RAMÍREZ RODRÍGUEZ**  
INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA RAMÓN DE LA FUENTE MUÑIZ

**COMITÉ TUTORA: DRA. DIANA MARÍA ESCALANTE ALCALDE**

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

**DRA. LUCIA ALBA MARTÍNEZ MOTA**

INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA RAMÓN DE LA FUENTE MUÑIZ

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., MARZO, 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**TÍTULO DEL PROYECTO**

**LA PROTEÍNA GREMLINA-1 COMO REGULADORA DE LA NEUROGÉNESIS EN EL  
GIRO DENTADO DEL HIPOCAMPO**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**Q.F.B. REYES ALVA MARÍA GUADALUPE**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. GERARDO BERNABÉ RAMÍREZ RODRÍGUEZ**

**INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA RAMÓN DE LA FUENTE MUÑIZ**

**COMITÉ TUTORA: DRA. DIANA MARÍA ESCALANTE ALCALDE**

**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM**

**DRA. LUCIA ALBA MARTÍNEZ MOTA**

**INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA RAMÓN DE LA FUENTE MUÑIZ**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2022**

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ENTIDAD FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/253/2022

ASUNTO: Oficio de Jurado

**M. en C. Ivonne Ramírez Wence**  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
P r e s e n t e


Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **25 de octubre de 2021** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** de la estudiante **REYES ALVA MARÍA GUADALUPE** con número de cuenta **519020641** con la tesis titulada "**LA PROTEÍNA GREMLINA-1 COMO REGULADORA DE LA NEUROGÉNESIS EN EL GIRO DENTADO DEL HIPOCAMPO**", realizada bajo la dirección del **DR. GERARDO BERNABÉ RAMÍREZ RODRÍGUEZ**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. MÓNICA LAMAS GREGORI  
Vocal: DR. DANIEL REYES HARO  
Vocal: DR. ALONSO MARTÍNEZ CANABAL  
Vocal: DRA. MARÍA DEL CARMEN VIVAR ESTUDILLO  
Secretario: DRA. DIANA MARÍA ESCALANTE ALCALDE

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

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 10 de marzo de 2022

**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**



## **Agradecimientos Institucionales**

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por la oportunidad de desarrollarme académicamente.

Agradezco al CONACyT por la beca otorgada para mis estudios de maestría.

Agradezco a los miembros de mi comité tutorial la Dra. Diana María Escalante Alcalde y la Dra. Lucía Alba Martínez Mota por el apoyo y los comentarios que me brindaron durante el desarrollo de mi investigación.

Finalmente, agradezco al Dr. Gerardo Bernabé Ramírez Rodríguez por recibirme en el laboratorio y brindarme su tiempo, apoyo y los recursos para dirigir mi formación académica durante la maestría y la investigación.

## **Agradecimientos personales**

Agradezco a mi madre y padre por su paciencia y confianza que me brindaron la fuerza y determinación para concluir mis estudios y dar pie a que continúe con mis sueños y esperanzas; y con su amor forjaron la persona que soy.

Agradezco a mis hermanos por su presencia que me alentó a seguir adelante con sus charlas que le dan otro color a la realización de una tesis.

Agradezco a mi amigo Sergio por los momentos y por todas sus charlas que me motivan a seguir buscando los misterios del universo.

Agradezco al Dr. Gerardo Bernabé por darme la experiencia de ser parte de un grupo de trabajo de investigación y guiarme para crecer en esta área. A la Dra. Edith por su apoyo y sus charlas en el laboratorio que me permitieron seguir creciendo como persona y académicamente. Al QFB. Leonardo por la enseñanza de las técnicas de laboratorio que utilicé para realizar mi proyecto de investigación.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio David, Natalia, Andrea, Jorge y Eunice por compartir los éxitos y frustraciones que hay en un proyecto de investigación porque el apoyo es importante dentro de un laboratorio.

Agradezco al laboratorio de Neurogénesis del Instituto de Psiquiatría “Ramón de la Fuente”, donde lleve a cabo la investigación de mi tesis.

# Índice

Abreviaturas	
Resumen .....	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
Fundamentos biológicos.....	4
Hipocampo.....	4
Giro Dentado.....	4
Tipo de células en el giro dentado.....	6
Comunicación entre capas.....	6
Neurogénesis.....	7
Regulación de la neurogénesis .....	8
Proteínas morfogenéticas de hueso (Bmp).....	11
Antecedentes.....	12
Hipótesis.....	13
Objetivo .....	13
Metodología.....	14
Presencia de grem-1 en el GD.....	14
Sujetos experimentales.....	14
Tratamientos .....	14
Cuantificación de los niveles de grem-1 .....	15
Inmunomarcaje de grem-1, Ki67 y Dcx.....	15
Análisis Estadístico.....	17
Resultados.....	18
La proteína grem-1 se expresa en el GD.....	18
Los tratamientos proneurogénicos inducen un aumento en el número de células positiva a Ki67.....	19
El ejercicio voluntario y el ambiente enriquecido aumentan el número de células positiva a DCX.....	22
Cuantificación de grem-1 en el GD .....	28
Correlación negativa de la concentración de grem-1 con el número de células positivas a Ki67.....	30
Discusión .....	31
Conclusiones.....	33
Referencias Bibliográficas.....	34



## Abreviaturas

AENR	Ambiente enriquecido
BI	Índice de ramificación
Bmp	Proteínas morfogenéticas de hueso
Bmpr	Receptor de las proteínas morfogenéticas de hueso
BrdU	Bromodesoxiuridina
CA	Cuerno de Amón
Dcx	Doblecortina
Gaba	Ácido aminobutírico
GD	Giro dentado
Grem-1	Gremlina-1
Gsk-3 $\beta$	Quinasa de glucógeno sintasa tres beta
HIPP	Célula hilo asociada a la vía perforante
LTP	Potenciación a largo plazo
Tgf- $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta
Vegf	Factor de crecimiento endotelial vascular
Vegf-r2	Receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular
ZSG	Zona subgranular

## Resumen

La neurogénesis es el proceso de generación de neuronas a partir de células troncales. Este proceso es regulado por estímulos ambientales y por factores moleculares. No se conoce la participación de todas las moléculas involucradas en la regulación de la neurogénesis ni cómo los estímulos ambientales alteran los factores moleculares. En este trabajo se aborda el estudio de la proteína gremlina-1 (grem-1) y su posible papel en el proceso de la neurogénesis. Grem-1 es una proteína morfogenética, su mRNA se ha observado en el giro dentado de ratones C57BL/6 adultos, una zona considerada neurogénica. Nuestro trabajo se centró en dilucidar si la proteína grem-1 está presente en el giro dentado y si correlaciona con el proceso de neurogénesis. La pregunta a responder es: ¿grem-1 participa de manera activa en la regulación de la neurogénesis en roedores adultos? y ¿si los niveles de grem-1 se alteran en el giro dentado ante estímulos ambientales? En un modelo murino se realizó una inmunohistoquímica de grem-1 en el giro dentado y se cuantificó la cantidad grem-1 con diferentes estímulos previamente reportados como proneurogénicos. Los estímulos probados fueron ejercicio voluntario, ambiente enriquecido y fluoxetina. Se identificó la presencia de grem-1 en el giro dentado de ratones adultos, una alta correlación negativa de la proliferación celular con la concentración de grem-1; y una disminución de la concentración de grem-1 con los tratamientos proneurogénicos. Se concluye que grem-1 podría estar participando de manera activa en la neurogénesis.

## **Abstract**

The neurogenesis is the process of stem cells differentiation into new neurons. Its regulation is modulated by environmental stimuli and molecular factors. Despite of the interest in neurogenesis regulation there are a lot of molecular factors involved in the regulation of neurogenesis that remain unexplored, as does the question of how environmental stimuli affect these molecular factors. In this paper, we address the study of the gremlina-1 (grem-1) protein and its possible participation in the regulation of neurogenesis. Grem-1 is a morphogenetic protein, its mRNA has been observed in the dentate gyrus of adult C57BL/6 mice. This study focuses on answering if grem-1 protein is present in the dentate gyrus and if it correlates with the neurogenesis process. Therefore, the main question would be: grem-1 is involved in the neurogenesis regulation in adult mice? And, is the grem-1 quantity in the dentate gyrus is modified by environmental stimuli? We made a grem-1 immunohistochemistry in the dentate gyrus and we quantified grem-1 protein quantity under stimuli reported as proneurogenic in a murine model. We evaluated with voluntary exercise, environmental enrichment and fluoxetine. We found the grem-1 protein presence in the dentate gyrus in adult mice and a strong negative correlation between the cellular proliferation and grem-1 quantity. Finally, we found that grem-1 decreases with the proneurogenic stimuli tested. We concluded that grem-1 could be involved in the regulation of neurogenesis. In this way, we propose to continue with the research of the transduction pathways, in order to identify the role of grem-1.

## Introducción

La neurogénesis es un proceso de generación de nuevas neuronas a partir de células troncales. Este proceso ocurre desde el desarrollo embrionario hasta la etapa adulta y contribuye al mantenimiento y regeneración del sistema nervioso. La importancia del estudio de la neurogénesis se justifica con base en biología y sus alcances terapéuticos. A pesar de la importancia de la neurogénesis aún no se conocen todos los factores moleculares involucrados en la regulación de este proceso ni como los estímulos ambientales los afectan. Por tal motivo, este estudio se enfoca en un factor molecular que posiblemente está involucrado en la regulación de la neurogénesis.

El factor molecular de interés es la proteína grem-1. El mRNA de esta proteína se ha observado en el giro dentado de ratones adultos. Cabe destacar que la zona subgranular del giro dentado es una zona considerada neurogénica (Jin, 2016). Existen evidencias que sugieren que grem-1 podría estar implicada en la regulación de la neurogénesis. Grem-1 es antagonista de las proteínas morfogenéticas de hueso (Bmp), las cuales promueven la diferenciación de las células troncales neuronales (Bonaguidi et al., 2008; Zhu et al., 2017; Kim et al., 2012; Wordingera et al., 2009). Además, estudios *in vitro*, de cultivo primario de células precursoras neuronales de hipocampo, muestran una respuesta en la promoción de la diferenciación a neuronas en presencia de grem-1 (Olivares-Hernández, 2014). Dado lo anterior es de interés la investigación de grem-1 en la neurogénesis ya que no se conoce si se traduce a proteína en el giro dentado ni si tiene un efecto sobre la regulación de la neurogénesis.

El objetivo del proyecto es corroborar si grem-1 promueve la neurogénesis. Se propone evaluar si la cantidad de grem-1 correlaciona con el aumento de proliferación y maduración de nuevas neuronas bajo distintos estímulos proneurogénicos, en un modelo *in vivo*. Para corroborar la presencia de grem-1 se realizaron inmunohistoquímicas contra grem-1 en el giro dentado de ratones adultos. También se evaluó si grem-1 es susceptible a estímulos ambientales que hayan sido reportados como proneurogénicos. Los estímulos fueron ejercicio voluntario, ambiente enriquecido y fluoxetina.

Se presenta una breve descripción anatómica y fisiológica del hipocampo para mostrar las implicaciones conductuales y cognitivas del giro dentado. Esto con la intención de evidenciar los alcances del proyecto sobre la neurogénesis en esta zona y conocer como sus factores moleculares, como grem-1, pueden contribuir al funcionamiento del hipocampo. Posteriormente, se presenta como ocurre la regulación de la neurogénesis en la zona subgranular del giro dentado para comprender como los factores externos influyen en ella. Además, se presenta un posible modelo sobre el mecanismo que podría involucrar a grem-1 por medio de la señalización de las BMP. Finalmente, se presentan los resultados obtenidos, la discusión en este contexto y la conclusión del estudio.

# Fundamentos biológicos

## Hipocampo

El hipocampo, llamado cuerno de Amón (CA), es una estructura localizada en la parte medial del lóbulo temporal del cerebro de mamíferos, junto con el hipotálamo y la amígdala forman parte del sistema límbico (Rodríguez-Sáez, 2012); además, junto con el giro dentado, el subículo y la corteza entorrinal componen la formación hipocampal (Amaral et al., 2007; Chauhan et al., 2021). A lo largo de su eje transversal se puede dividir en CA1, CA2, CA3 y CA4 (Cuerno de Amón 1, 2, 3 y 4 respectivamente) y el giro dentado (GD) (Yang & Wang, 2017). Se piensa que el giro dentado otorga neuroplasticidad al hipocampo, debido a que en este ocurre neurogénesis (Bruel-Jungerman et al., 2005; Haukvik et al., 2018; Kempermann et al., 2002; Llorens-Martín et al., 2007; Vivar et al., 2012). Se considera que el hipocampo es una estructura esencial para las funciones cognitivas como el aprendizaje, la formación de la memoria episódica y espacial, así como la regulación del comportamiento emocional (Deng et al., 2010; Haukvik et al., 2018; Ramírez et al., 2013; Scoville & Milner, 1957)

Las funciones del hipocampo están distribuidas a través del eje dorsal-ventral (septo-temporal). Se ha asociado la región ventral con la regulación de las emociones y respuesta al estrés, mientras que, la región dorsal para la orientación espacial y memoria (Fanselow & Dong, 2010; Haukvik et al., 2018; Kjelstrup et al., 2008; Steffenach, Witter, Moser, & Moser, 2005; A. Tanti & Belzung, 2013). Se sugiere que, estas diferencias funcionales entre las estructuras se deben a las distintas conexiones del hipocampo con la corteza entorrinal (Steffenach et al., 2005), la amígdala y el hipotálamo (Petrovich et al., 2001). Cabe destacar que las funciones distribuidas a lo largo del eje septo-temporal aunque son distintas y complementaria, ambas contribuyen en el procesamiento espacial y las conductas emocionales (Olivares- Hernández, 2014). Los autores Kjelstrup et al. (2008), reportaron que la información espacial puede ser transmitida por todo el eje septo-temporal, incluso en la región más ventral, donde la conectividad con las regiones cerebrales somatosensoriales y visuales no son directas (Kjelstrup et al., 2008).

Alteraciones morfológicas y en el funcionamiento del hipocampo se asocian con depresión, bipolaridad, epilepsia, estrés postraumático, isquemia cerebral, trastornos degenerativos del envejecimiento cerebral, y en enfermedades como Alzheimer y Parkinson (Haukvik et al., 2018; Kempermann et al., 2002). Por tal motivo, la mayoría de los tratamientos farmacológicos de los trastornos emocionales actúan sobre el hipocampo (Encinas et al., 2006; Ramírez-Rodríguez et al., 2011; Tanti & Belzung, 2013). Varios autores sugieren que la disminución en la neurogénesis del giro dentado en el hipocampo adulto puede explicar varios aspectos de los trastornos emocionales, enfermedades neurodegenerativas y del deterioro cognitivo debido a la edad (Haukvik et al., 2018; Jacobs et al., 2000; Kempermann et al., 2002; Scoville & Milner, 2000).

## Giro Dentado

El GD es una región curva dentro del hipocampo, presente en mamíferos y está formada por tres capas conservadas: la capa molecular, la granular y la polimórfica (Rodríguez-Sáez, 2012). Modula la comunicación de la información del “circuito trisináptico” que está constituido por la corteza entorrinal-GD-CA, cabe destacar que, la corteza entorrinal es la que proporciona la mayor cantidad de señales al GD, mediante la vía perforante (Amaral et al., 2007; Hevner, 2016).

El GD en mamífero está plegado de manera cóncava en forma de “C” o “V”, presenta una capa de neuronas granulares y está delimitado por la fisura del hipocampo. En ratas, dentro del GD se encuentra CA3 y contiene aproximadamente un millón de células granulares mientras que en humanos 15 veces más. Se piensa que en el giro dentado de adultos ocurre neurogénesis de manera constitutiva debido a que las células progenitoras durante el desarrollo embrionario migran hacia el GD (Amaral et al., 2007; Hevner, 2016).

Como se mencionó el GD está formado por tres capas: la capa molecular, la capa de células granulares que forman la *fascia dentata*; y la capa polimórfica o zona del *hilus*. La zona subgranular está entre la capa granular y la capa polimórfica. En esta zona están las células troncales neurales que se diferencian a nuevas neuronas (Hevner, 2016; Taleisnik, 2012). Por lo tanto, esta área es de interés para este estudio.

La capa molecular es la más superficial, en ratas tiene un grosor de ~250µm, está constituida por las dendritas de las células granulares, las dendritas de las células piramidales en canasta y otras dendritas de las células de la capa polimórfica, así como las fibras de la vía perforante de la corteza entorrinal. La capa molecular presenta al menos 2 tipos de neuronas. Estas neuronas son inmunoreactivas para marcadores de neuronas gabaérgicas. Tienen un soma en forma triangular o multipolar, con axones que dan origen a un plexo terminal, restringido a 2/3 de la capa molecular. Mientras que el otro tipo se asemeja a un candelabro o a células axo-axónicas, similar a las células de la neocorteza. Estas células pueden inervar los segmentos iniciales del axón de hasta mil células granulares (Amaral et al., 2007; Hevner, 2016)

La capa granular tiene un espesor entre 4 a 8 neuronas, un grosor de ~60µm y rodea a la capa polimórfica o *hilus*. Se compone en su mayoría del soma de las células granulares densamente empaquetadas. Las células granulares tienen un soma elíptico de 10-18µm, forman un árbol dendrítico en forma de cono. Las ramificaciones se extienden por toda la capa molecular y finalizan en la fisura del hipocampo o en la superficie ventricular. En roedores, la capa granular tiene 1.2 millones de células granulares densamente empaquetadas. Además, de otras neuronas como las células en canasta piramidal cuya ubicación está en el límite de la capa granular y la polimórfica (Amaral et al., 2007).

La zona subgranular está entre la capa granular y el *hilus* del hipocampo. Contiene las dendritas y el soma de las células piramidales en canasta y otros tipos celulares con diferentes morfologías dendríticas y configuración axonal. Algunas de estas células son multipolares con muchas dendritas espinosas que entran a la capa molecular y polimórfica. Mientras que otras presentan una forma alargada con una distribución dendrítica similar (Amaral et al., 2007; Taleisnik, 2012).

La capa polimórfica es la más profunda formada en su mayoría de células musgosas, las cuales presentan una morfología en triángulo o en forma de estrella. También se encuentran las células fusiformes, las cuales pueden tener o no espinas y de forma irregular. Otro tipo de célula multipolar con espina larga, llamada célula hilo asociada a la vía perforante (HIPP cell, por sus siglas en inglés) presenta espinas con ramificaciones en todo su cuerpo y dendritas. Sus axones llegan hasta 2/3 de la capa molecular y terminan con sinapsis inhibitorias simétricas sobre las dendritas de las células granulares (Amaral et al., 2007).

## **Tipo de células en el giro dentado**

### *Células granulares*

Las células granulares presentan poca variación morfológica y su soma mide entre 10-18 $\mu$ m. La secreción de moléculas varía a lo largo de la vida de la neurona y su posición (Hevner, 2016). Estas células son glutamatérgicas y tienen transportadores de zinc. Tienen axones desmielinizados llamados fibras musgosas con un diámetro de 0.2-0.5 $\mu$ m, las cuales son inmunoreactivas para sustancias neuroactivas, como opioides. Las fibras musgosas forman una capa que está justo por encima de la capa de células piramidales y es llamada *stratum lucidum*. También, se ha observado que las fibras musgosas se extienden a lo largo de una extensión transversal de CA3 al nivel septo-temporal (Amaral et al., 2007).

### *Células musgosas*

El soma de las células musgosas es de 25-35 $\mu$ m y presenta una forma triangular o multipolar. Son células excitatorias glutamatérgicas que reciben su nombre debido a que las dendritas proximales cuentan con espinas muy ramificadas de gran tamaño llamadas excrescencias espinosas (Ribak et al., 1985; Vivar et al., 2012). Presentan hasta tres dendritas delgadas ramificadas que se extienden a lo largo de la capa polimórfica y en algunas ocasiones alcanzan hasta la capa molecular. No hay evidencia de que las dendritas de este tipo de células entren a la región CA3 en roedores. Las proyecciones provenientes de las células musgosas se localizan en cualquier nivel del GD y están distribuidas longitudinalmente a lo largo del eje septal y temporal. Las células musgosas reciben una gran inervación proveniente de las células granulares (Amaral et al., 2007; Hevner, 2016).

### *Células piramidales en canasta*

Estas células generalmente se encuentran entre la capa granular y la capa polimórfica. El soma presenta una forma de pirámide de 25-35 $\mu$ m de diámetro. El número de estas células no permanece constante a través de la extensión septo-temporal. Las terminales dendríticas, del plexo formado por las células en canasta, son gabaérgicas y su comunicación es simétrica e inhibitoria. Se ha observado, que en ratas las proyecciones formadas por estas células se originan tanto del lado ipsilateral como del contralateral del giro dentado asociándose a las proyecciones comisurales (Amaral et al., 2007). Este tipo de células está presente en la zona subgranular del GD.

## **Comunicación entre capas**

La comunicación entre las capas del giro dentado es a través de los diferentes tipos de células. El GD se comunica con CA3 a través de un espacio donde no hay células llamado *stratum lucidum*, formado entre los *stratum pyramidale* y *radiatum* los cuales establecen contacto con las fibras musgosas del giro dentado (Hevner, 2016; Olivares-Hernández, 2014). Otra región con la que se comunica el GD es la corteza entorrinal, la cual provee la mayor cantidad de señalizaciones por la vía perforante. En roedores la vía perforante se divide en medial y lateral, ambas provenientes de la corteza entorrinal, respectivamente. Las proyecciones de la corteza entorrinal lateral terminan en la superficie de la capa molecular. Mientras que las del área entorrinal medial terminan a la mitad de la capa molecular (Hevner, 2016; Rodríguez-Sáez, 2012).

## Neurogénesis

La neurogénesis es el proceso de diferenciación a nuevas neuronas, a partir de células troncales y representa un medio de mantenimiento, regeneración y plasticidad del sistema nervioso (Goldman, 2001; Taleisnik, 2012). Este proceso ocurre tanto en el desarrollo embrionario como en la etapa adulta y está estrictamente regulado de manera dinámica en función del medio (Jin, 2016).

Durante el desarrollo embrionario de mamíferos los precursores neuronales son originados del neuroepitelio, desde el cual se determinan las células troncales neurales o también llamadas células tipo glía radial, las cuales migran desde el tubo neural, formando la cavidad de la zona subgranular (ZSG), donde permanecen hasta la etapa adulta. Después del nacimiento, las células troncales neuronales se mantienen quiescentes en la zona subgranular. Los estímulos ambientales extrínsecos e intrínsecos promueven el inicio de la neurogénesis (Brooker et al., 2017; Jin, 2016; Mira et al., 2010; Wang et al., 2005).

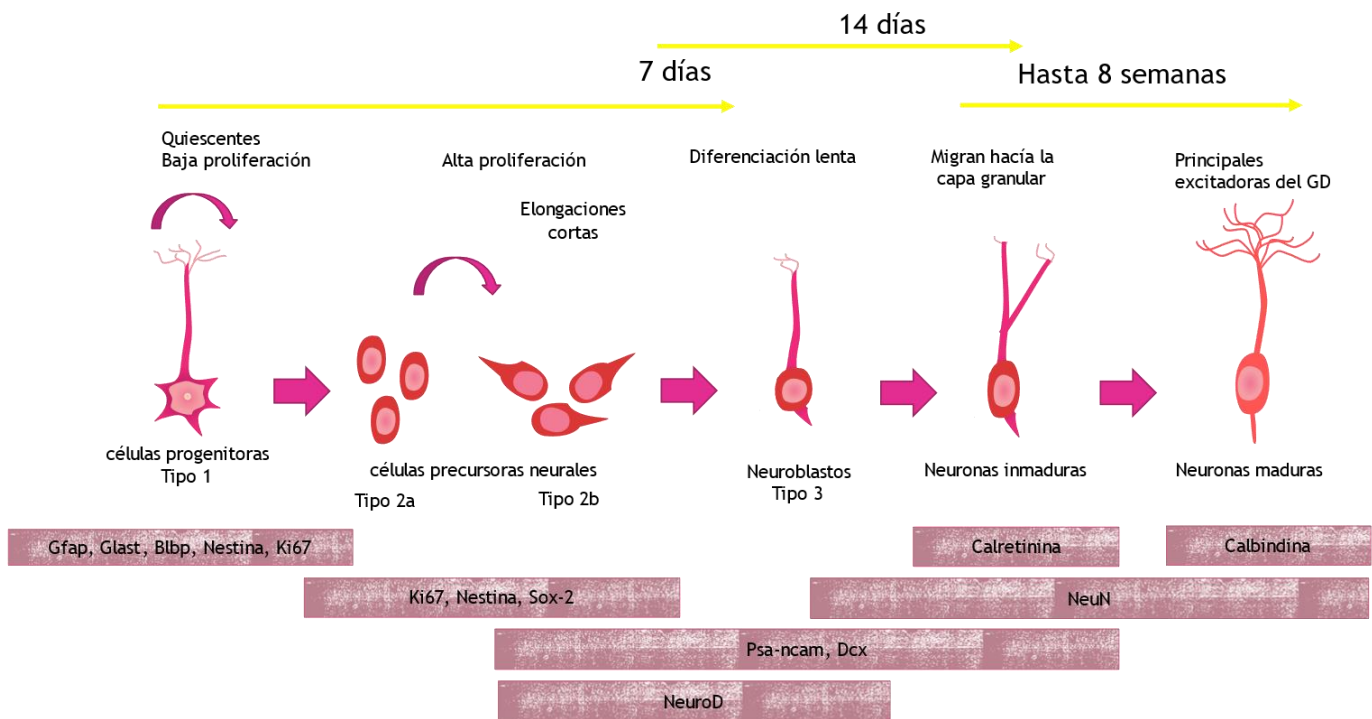
La neurogénesis en mamíferos adultos es constitutiva en dos áreas: la zona subventricular de los ventrículos laterales y la zona subgranular del GD del hipocampo (Hevner, 2016; Jin, 2016). Sin embargo, se ha observado en otros sitios bajo ciertas condiciones experimentales como: el estriado y con baja frecuencia en la corteza cerebral. Además, se han reportado células progenitoras distribuidas por el sistema nervioso central (Jin, 2016; Ramírez et al., 2013; Taleisnik, 2012).

Las células troncales neuronales en la ZSG presentan la capacidad de autorrenovación y son llamadas células tipo 1. Su morfología presenta un soma triangular y alargado que alcanza la capa de células granulares (Amaral et al., 2007; Kempermann et al., 2004). Presentan dos acomodos espaciales, uno horizontal y otro vertical. El arreglo horizontal no posee prolongación radial, se extiende en paralelo al *hilus*, tiene prolongaciones secundarias y son células precursoras de oligodendrocitos (Rodríguez-Sáez, 2012). Mientras que las células verticales son radiales, con una prolongación que crece hacia la capa molecular, con un soma grande en forma redondeada, triangular o poligonal (Rodríguez-Sáez, 2012; Kempermann et al., 2004; Olivares-Hernández, 2014).

Las células verticales tipo 1 generan a las células precursoras o progenitoras, llamadas células tipo 2, por división asimétrica. Las células tipo 2 presentan alta capacidad proliferativa y son de transición entre las células con fenotipo glial a células con linaje neuronal. Estas se clasifican en células tipo 2a y células tipo 2b. Las 2a son pequeñas, con un soma redondeado, carecen de elongaciones y presentan alta capacidad proliferativa y dan origen a las células 2b. Las 2b se subdividen de acuerdo con la orientación de sus prolongaciones. Las células D2v son de orientación vertical y las D2h son de orientación horizontales y paralelas a la capa granular. Por último, las células D2i presentan prolongaciones invertidas respecto a la capa granular apuntando al *hilus* (Olivares-Hernández, 2014; Rodríguez-Sáez, 2012; Taleisnik, 2012, Kempermann et al., 2004). Cuando las elongaciones de las células tipo 2 alcanzan la capa granular se definen como células tipo 3 o neuroblastos. Las células tipo 3 coinciden con la salida del ciclo celular, poseen prolongaciones radiales hacia la capa molecular y hacia el *hilus*; presentan baja proliferación y son de transición de neuroblastos a neuronas inmaduras (**Figura 1**). Mientras las neuronasaún son inmaduras, migran dentro de la capa granular para alcanzar su diferenciación terminal (Rodríguez-Sáez, 2012; Taleisnik, 2012, Kempermann et al., 2004).



La duración promedio de la neurogénesis en el ratón (*Mus musculus*) adulto es hasta de 56 días e incluso puede durar meses dependiendo del microambiente celular. Posterior a la mitosis, pueden pasar hasta 7 días en presentar una morfología de neurona inmadura. La extensión de sus axones hacia el CA3 comienza alrededor del día 11. En el día 14 las dendritas apicales se extienden a la mitad de la capa molecular pero aún carecen de espinas, además, comienzan las conexiones con las dendritas de las células piramidales de CA3. Entre el día 15 y 21 se empiezan a ramificar las extensiones y las espinas excitatorias, las cuales al día 18 ya se integraron a la vía perforante (Jin, 2016).



**Figura 1.** Representación de la neurogénesis en el GD de roedores adultos. Características y marcadores de las diferentes fases de maduración de la neurona (Kempermann et al., 2004; Taleisnik, 2012).

## Regulación de la neurogénesis

La neurogénesis está regulada por el microambiente y algunos componentes de la matriz extracelular pueden influir en el estado de quiescencia de las células troncales neuronales (Muncie & Weaver, 2018). La proteína nogina está en la matriz extracelular y promueve la salida de quiescencia de las células troncales por medio de la vía de las proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs). Posiblemente grem-1, funcione de manera similar a nogina, ya que ambas proteínas son antagonistas de las BMPs. Ambos factores se han descrito como determinantes para la diferenciación durante el desarrollo (Ji et al., 2016). Por lo anterior, es de interés conocer si grem-1 está involucrada en la generación de las nuevas neuronas del giro dentado del hipocampo.

El microambiente neurogénico en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo de mamíferos adultos (Hevner, 2016), contiene factores neurogénicos como: el factor de crecimiento tipo insulina, el factor de crecimiento de fibroblastos, el factor de crecimiento epidermal, el factor neurotrófico derivado del cerebro (Chen et al., 2018; Kuhn et al., 1997; Nandi et al., 2018), la hormona de crecimiento, estradiol y estrona. Todos estos factores están implicados en el destino celular, la proliferación y supervivencia (Olivares-Hernández, 2014; Ormerod et al., 2003; Tanapat et al., 1999). Cabe destacar que el

microambiente neurogénico es susceptible a los estímulos ambientales. A pesar de lo anterior, se sugiere un estado de equilibrio, entre la tasa de muerte y la generación de nuevas neuronas ya que el número total de células granulares no varía en animales adultos (Amaral et al., 2007).

### *Estímulos ambientales*

Los estímulos ambientales como el ambiente enriquecido (AENR), el ejercicio físico voluntario (Van Praag et al., 1999; Klein et al., 2016; Kronenberg et al., 2006; Brown et al., 2003) y el uso de antidepresivos (Wang et al., 2008; Brooker et al., 2017; Encinas et al., 2006; Ramírez-Rodríguez et al., 2011) son capaces de modificar el microambiente neurogénico. La eficacia de los estímulos ambientales en la neurogénesis depende del tiempo de exposición (Clemenson et al., 2015; Curlik et al., 2013; Kempermann, et al., 2002; Kempermann et al., 1998; Kronenberg et al., 2006).

El ambiente enriquecido es la manipulación ambiental diseñada para proporcionar a los roedores diferentes estímulos visuales, táctiles, propioceptivos, sociales y mayor actividad física. Se caracteriza por ser un entorno con juguetes, túneles, objetos de colores y/o ruedas para correr (Brown et al., 2003; Clemenson et al 2015; Van Praag et al., 1999). El ambiente enriquecido aumenta significativamente el volumen del giro dentado, mejora la neurogénesis del hipocampo incrementando la supervivencia celular (Llorens-Martín et al., 2007; Van Praag et al., 1999; Schloesser et al., 2010), la memoria espacial, el comportamiento exploratorio y la actividad locomotora (Frick & Fernandez, 2003; Kempermann et al., 2002). En humanos, el enriquecimiento del ambiente disminuye el riesgo de desarrollar enfermedades neurodegenerativas y trastornos psiquiátricos, además de retrasar el deterioro cognitivo relacionado con la edad (Arendash et al., 2004; Kronenberg et al., 2006; Kempermann et al., 2002; Schloesser, et al., 2010; Duman et al., 2008). Efectos similares han sido encontrados en un modelo murino con estrés psicosocial crónico donde el ambiente enriquecido elimina los rasgos conductuales sumisos y tipo depresivo adoptados en respuesta al estrés (Schloesser et al., 2010). Actualmente, no se cuenta con un protocolo para establecer cuáles y cuántos objetos incluye un ambiente enriquecido y el tiempo de exposición. Aunque estas dos manipulaciones mejoran la neurogénesis, existe evidencia de que impactan en diferentes fases del proceso neurogénico.

Varios autores han separado la rueda para correr, del resto de los objetos que conforman el ambiente enriquecido. Reportaron que la neurogénesis se favorece ligeramente más cuando hay una rueda para correr, que cuando solo hay túneles, objetos y/o juguetes (Brown et al., 2003; Van Praag et al., 1999; Van Praag et al., 1999; Steiner et al., 2008). El ambiente enriquecido sin rueda para correr estimula la supervivencia ejerciendo mayor influencia en las células tipo 2b y tipo 3 (Beauquis et al., 2010; Clemenson et al., 2015; Fabel et al., 2009; Kronenberg et al., 2003; Steiner et al., 2008; Olson et al., 2006). En roedores C57BL/6 expuestos a 10 días de ambiente enriquecido con túneles de colores y juguetes, no aumenta la proliferación y el número de células positivas a Dcx, pero sí incrementa la longitud y maduración dendrítica de células positivas a Dcx, y la maduración dendrítica y espinas en las células piramidales (Beauquis et al., 2010; Brown et al., 2003). Efectos similares se han reportado con exposición de 10 días al ambiente enriquecido en un modelo de diabetes-1 (Beauquis et al., 2010). El ambiente enriquecido aumenta los niveles de sinaptofisina, factor neurotrófico derivado del cerebro, y el factor de crecimiento endotelial vascular (Vegf) (Bayne, 2018; Clemenson et al., 2015; Olson et al., 2006).

Por otra parte, la rueda para correr tiene como propósito estimular el ejercicio voluntario y es considerado como un estímulo proneurogénico en roedores (Van Praag et al., 1999; Lafenêtre et al., 2010; Pinar et al., 2018). Estimula el incremento de la proliferación de células precursoras, especialmente las células tipo 2a (Brown et al., 2003; Clemenson et al., 2015; Fabel et al., 2009; Klein et al., 2016; Kronenberg et al., 2006; Steiner et al., 2008; Van Praag et al., 1999), lo anterior se ha reportado en roedores C57BL/6 jóvenes y edad avanzada (Kronenberg et al., 2006; Kempermann et al., 2002). Kronenberg et al., 2006, reportaron que el punto máximo de proliferación se alcanza entre los 3 y 10 días. Los autores observaron que a pesar de continuar con el tratamiento durante 32 días la proliferación regresa al estado base previo al tratamiento. Además, con 10 y 32 días de tratamiento se incrementa el número de células positivas a Dcx y de Calretinina, sugiriendo un aumento en la maduración celular (Kronenberg et al., 2006). Con 21 días de ejercicio voluntario, a parte del aumento de la neurogénesis, también hay un incremento en los niveles del factor neurotrófico derivado del cerebro (Fuss et al., 2010). Por otra parte, en ratas Sprague-Dawley expuestas a 17 días de ejercicio voluntario se incrementa la proliferación celular, la longitud, la arborización dendrítica y la densidad de las espinas de las células granulares (Eadie et al., 2005). A través de estas alteraciones en la morfología dendrítica, se favorece la neuroplasticidad del giro dentado (Eadie et al., 2005; Lafenêtre et al., 2010; Vivar C., 2012).

#### *Antidepresivos (Fluoxetina)*

Una consecuencia del mecanismo de acción de algunos fármacos antidepresivos es regular positivamente la neurogénesis en el hipocampo adulto. Sin embargo, los mecanismos por los cuales ejercen su efecto aún no se conocen completamente (Brooker et al., 2017; A. Tanti & Belzung, 2013). La fluoxetina es un fármaco inhibidor de la recaptura de la serotonina, utilizado para el tratamiento de los trastornos del estado de ánimo (Encinas, et al., 2006; Ramírez-Rodríguez et al., 2011; Vivar C., 2012). La fluoxetina ejerce mayor influencia en las células precursoras tempranas (Encinas et al., 2006). En roedores transgénicos (Nestina-CFPnuc) el tratamiento con fluoxetina durante 15 días incrementa los precursores neuronales en el giro dentado (Encinas et al., 2006). En roedores SvEv129 expuestos 28 días a fluoxetina aumentó la proliferación celular, la maduración dendrítica y la potenciación a largo plazo (LTP) de células granulares (Wang et al., 2008).

Brooker et al (2017) observaron que durante 14 días de tratamiento con fluoxetina se incrementó la proliferación celular y los niveles de la proteína nogina. Además, disminuyó el nivel de la proteína morfogenética de hueso 4 (Bmp4) y el complejo fosfo-Smad1/5/8, que participan en el mantenimiento de la quiescencia celular en roedores C57BL/6. Con el fin de conocer si el aumento de la Bmp4 inhibe los efectos neurogénicos y conductuales del tratamiento con fluoxetina, sobreexpusieron la proteína Bmp4 con un lentivirus y posteriormente expusieron durante 15 días con fluoxetina a ratones C57BL/6. No se observó aumento en el número de células positivas a BrdU/mm<sup>3</sup> y de BrdU + Sox2, y no hubo cambio en el comportamiento tipo depresivo. Lo anterior sugiere que el efecto de la fluoxetina sobre la depresión se reduce por la sobreexpresión de Bmp-4. Por último, se preguntaron si la inhibición de las BMPs, por medio de nogina aumenta la neurogénesis y altera el comportamiento. Al sobreexpresar nogina por medio de un lentivirus durante 15 días observaron un incremento en las células positivas a Dcx y una disminución en el comportamiento similar al de la ansiedad. Lo anterior indica que la señalización de las Bmp en el giro dentado regula el comportamiento depresivo y se ve alterado con fluoxetina (Brooker et al., 2017).

## Proteínas morfogenéticas de hueso (Bmp)

Las Bmp regulan la neurogénesis limitando la proliferación y especificación del destino neuronal (Bonaguidi et al., 2008). Se ha observado que en altas proporciones inhiben la neurogénesis y promueven la diferenciación glial (astrocitos). Pertenecen a la súper familia del factor de crecimiento transformante beta (Tgf- $\beta$ ), se conocen 20 variantes, los cuales inician la cascada de señalización al unirse a sus receptores. Todas son secretadas como precursoras con una región hidrofóbica de 50-100 aminoácidos (Robert J. et al., 2009; Sebald et al., 2007).

Los receptores de Bmp (Bmpr) son cinasa treonina serina, heterodiméricos y generan la fosforilación de las proteínas Smads 1, 5 y 8 que se translocan al núcleo e inducen cambios en la expresión genética. En el GD del adulto, se ha observado que la señalización inducida por las Bmp promueve la quiescencia en las células tipo 1 (Bonaguidi et al., 2008; Del Brutto & García, 2014; Mikawa & Sato, 2014; Mira et al., 2010) y por tal motivo se les atribuye el papel de reguladoras negativas de la neurogénesis. De la misma forma la Bmp4 en las células precursoras dirigen el destino hacia la diferenciación glial (Gomeset al., 2003; Gross et al., 1996; Mira et al., 2010). Hay evidencia de que Bmp2 y Bmp4 se expresan en la zona subgranular, en las células tipo 1 (Bonaguidi et al., 2008; Hayashi et al., 2016; Mikawa & Sato, 2014; Tang et al., 2009).

Los antagonistas de Bmp son nogina, grem-1, folistatina, cordina, neurogenesina, etcétera. La inhibición de Bmp promueve la salida de quiescencia de las células progenitoras (Hernández -Cruz, 2018). La proteína nogina al unirse a Bmp-4 evita la quiescencia de las células tanto en un modelo *in vivo* como *in vitro* (Bonaguidi et al., 200; Brooker et al., 2017).

### Antagonistas de Bmp (Gremlina-1)

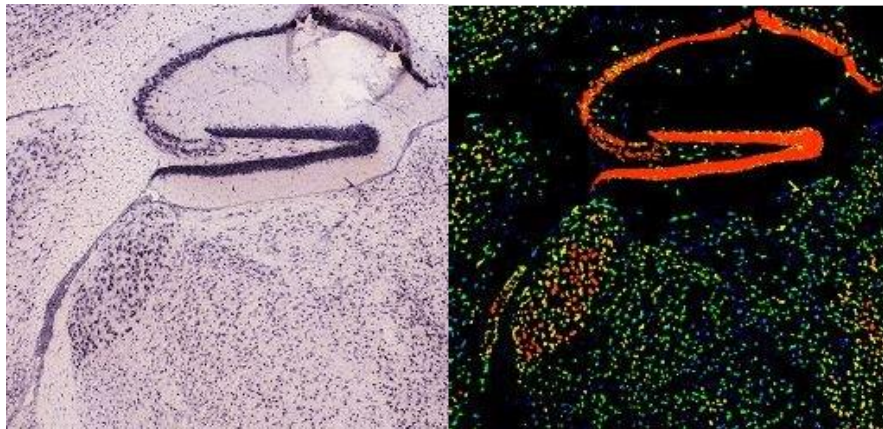
La proteína grem-1 es codificada por el gen *DRM*. En humanos está en el cromosoma 15q13-q15. Es una proteína de 20.7kDa con 184 aminoácidos, 42 sitios de glicosilación y un péptido señal. Contiene una región rica en cisteínas y un motivo *knot* de cisteína. Perteneció a la familia DAN y tiene dominios similares a las proteínas Tgf- $\beta$  y Vegf. Grem-1 se encuentra en forma secretada, asociada a la membrana plasmática y en los compartimentos del aparato de Golgi (Rodriguez-Diez et al., 2014). La forma secretada tiene una masa de 28kDa y representa la forma glicosilada. Gremlina cuenta con tres isoformas debidas a *splicing* alternativo. La isoforma 1 es la más común, mientras que las isoformas 2 y 3 presentan la eliminación de aminoácidos, 39-79 y 10-79 respectivamente (Kim et al., 2012; Robert J. Wordinger, Gulab Zodea, and Abbot F. Clark, 2009).

Hay evidencia de que grem-1 es un potente inhibidor de Bmp. Grem-1 forma heterodímeros con los ligandos Bmp-2, Bmp-4 y con menor afinidad a Bmp-7 e interactúa intracelularmente con el precursor de Bmp4 (Kim et al., 2012; Robert J. Wordinger et al., 2009). Grem-1 permite la proliferación y mantenimiento de las propiedades de las células troncales (Koli et al., 2016). También se ha descrito que tiene funciones tanto pro y antiinflamatorias en función del contexto de las células endoteliales por la interacción directa con el Receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (Vegf-r2) (Koli et al., 2016).

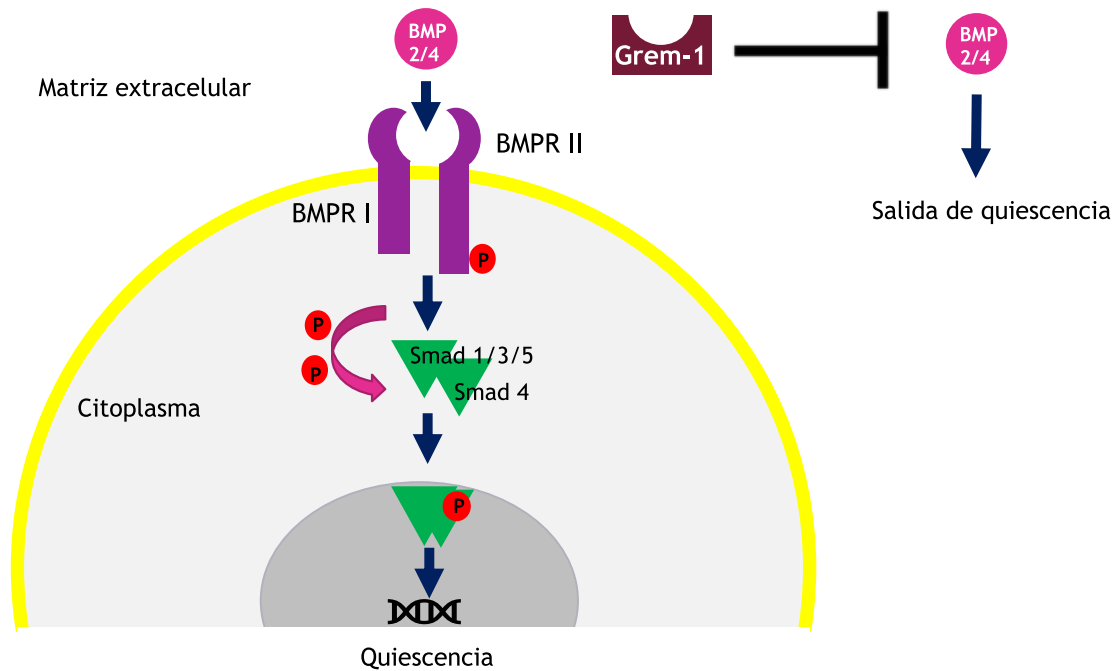
## Antecedentes

La proteína grem-1 es ortóloga y altamente conservada, se identificó por primera vez en la cresta neural de embriones de *Xenopus* junto con otras proteínas como Cerberus y Dan. Estas proteínas controlan procesos de crecimiento y desarrollo embrionario de *Xenopus* mediante la inhibición de varios ligandos de la familia Tgf- $\beta$  (Hsu, Economides, Wang, Eimon, & Harland, 1998).

En ratones adultos está presente el mRNA de grem-1 en el giro dentado del hipocampo (**Figura 2**) (“Brain- Map,” 2019, Grem-1 RP\_050317\_04\_F06 - sagittal). Sin embargo, aún no se ha descrito su función en esta zona. Estudios *in vitro* en células precursoras aisladas del hipocampo de ratones adultos, relacionan la participación de grem-1 como antagonista de Bmp para favorecer la neurogénesis. Se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de grem-1 sobre células precursoras aisladas del hipocampo. Se observó que se requiere 1ng/mL de grem-1 para alcanzar el pico máximo en la proliferación celular. De manera interesante, se encontró que en concentraciones mayores de grem-1 (10, 100ng/mL y 1ug/mL), se mantiene el aumento en la proliferación, sin embargo, la viabilidad celular disminuye hasta un 33%. Células precursoras tratadas con 1ng/mL de grem-1 en condiciones de proliferación mostraron una mayor proporción de neuronas que de astrocitos en ausencia de factores solubles. Sugiriendo que el mecanismo implicado en la diferenciación neural puede involucra la inhibición de la vía de señalización de las Bmp (**Figura 3**) (Hernández -Cruz, 2018).



**Figura 2.** Expresión del mRNA. Se observa el mRNA de grem-1 en cortes sagitales de cerebro que contienen el giro dentado del hipocampo del ratón adulto. A) ISH B) Expresión *in situ*. El color verde indica baja expresión y el color naranja mucha expresión. Tomado de “Allen Brain-Map, 2019, Grem-1 RP\_050317\_04\_F06 – sagittal”.



**Figura 3.** Representación simplificada de la vía de las BMPs y posible participación de grem-1.

Dado lo anterior, resulta de interés comprobar la presencia de la proteína grem-1 en el giro dentado e investigar su comportamiento bajo estímulos ambientales que previamente han mostrado un efecto proneurogénico. En concreto se espera responder si ¿grem-1 participa en la regulación de la neurogénesis en el adulto? y ¿si los estímulos ambientales proneurogénicos podrían modular la expresión de grem-1?

## Hipótesis

Si grem-1 está en la zona subgranular del giro dentado entonces incrementa la generación de neuronas nuevas. A su vez, la concentración de grem-1 incrementa ante estímulos ambientales proneurogénicos. Por lo tanto, grem-1 podría estimular la neurogénesis ante estímulos ambientales.

## Objetivo

El objetivo general es conocer si la proteína grem-1 participa en el proceso neurogénico del GD en roedores adultos.

### Objetivos particulares

- Identificar la presencia de grem-1 en la zona subgranular del GD.
- Cuantificar la variación de la cantidad de grem-1 en el GD de roedores adulto bajo diferentes condiciones (control, ejercicio voluntario, fluoxetina y ambiente enriquecido).

## Metodología

Se utilizaron roedores de la cepa C57BL/6 debido a que son la cepa más sensible para evaluar los niveles de proliferación celular y diferenciación de neuroblastos en comparación con otras cepas (C57BL/6, BALB/c, OD1 y 129/SvJ) (Kempermann, Kuhn, & Gage, 1997).

### Presencia de grem-1 en el GD

Se utilizaron cortes coronales de cerebro de tres ratones macho de la cepa C57BL/6 en condiciones estándar con alimento y agua *ad libitum*, en ciclos de luz oscuridad estándar de 12 horas, obtenidos de la reserva de tejidos del laboratorio de Neurogénesis. Los cortes utilizados fueron de 40µm a la altura del hipocampo de la región dorsal y ventral preservados en una solución crioprotectora (50% PBS 1X, 25% Glicerol, 25% etilenglicol) hasta su utilización.

Para eliminar el exceso de la solución crioprotectora los cortes se lavaron tres veces con una solución de TBS 1X. Para identificar la presencia de grem-1 se realizó una inmunohistoquímica. Se utilizó el anticuerpo policlonal contra grem-1 (Novus, Nb100-56883) a 5 concentraciones diferentes (10µg/500µL, 7.5µg/500µL, 5µg/500µL, 2.5µg/500µL y 1.25µg/µL) para determinar la concentración necesaria de visualización de la inmunorreactividad. Durante la inmunohistoquímica se dejó el anticuerpo primario un día a 4°C en homogenización. Al siguiente día se colocó el anticuerpo secundario biotinilado de cabra (1:250). Se utilizó el sistema fosfatasa alcalina y el sustrato azul diluido en ácido clorhídrico 150mM. Posteriormente, el tejido se montó en medio Neumount (Millipore) para su observación en un microscopio óptico Leica (DM500 acoplado a una cámara ICC50; Buffalo Grove, IL, USA) en campo claro.

### Sujetos experimentales

El uso de los ratones y su sacrificio fue aprobado por el comité de ética del Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz” (INPRFM). Durante los experimentos, los ratones fueron tratados de acuerdo con los lineamientos establecidos por la Norma Oficial Mexicana “NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”.

Se realizó un *p*ie de cría con diez hembras donadas por el bioterio de CINVESTAV Zacatenco, 2 machos y 2 hembras donadas por el Instituto de Neurobiología de la UNAM, de la cepa C57BL/6. Los ratones se criaron hasta las 8 semanas de edad en una jaula de 20x35x20cm, con ciclos de luz oscuridad normales de 12 horas, alimento en pellet (lab diet 5001) y agua del grifo *ad libitum*. Ratones macho de 9 semanas, del *p*ie de cría, fueron separados aleatoriamente para los tratamientos.

### Tratamientos

Los tratamientos duraron 14 días y se aplicaron a cuatro grupos de ratones. Cada grupo fue formado por 3 machos de 9 semanas de edad separados por tratamiento. Cada grupo, a excepción de fluoxetina, se le inyectó solución salina durante los 14 días de tratamiento.

- Control: se dejaron con las condiciones de cría.
- Ejercicio voluntario: en una caja de 34x44x20cm con tres ruedas.
- Ambiente enriquecido: en una caja de 34x44x20cm con túneles de plástico de diferente tamaño, color y textura.

- Fluoxetina: se mantuvieron las condiciones del control, además se les administró fluoxetina (10mg/kg) en solución salina durante todos los 14 días, como se presenta en el trabajo de Brooker et al., 2017.

Un día posterior al término de los tratamientos los ratones se sacrificaron por decapitación para obtener el cerebro. El cerebro se dividió en el hemisferio izquierdo y derecho. El hemisferio izquierdo se utilizó para la obtención de la proteína total del giro dentado y el derecho para inmunohistoquímica.

#### *Disección del GD*

Inmediatamente después del sacrificio el hemisferio izquierdo se lavó en PBS 1X frío (4°C). Se colocó en una caja petri con solución de mantenimiento a -4°C (210mM Sacarosa, 20mM KCl, 2mM MnSO<sub>4</sub>, 1.25mM Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>, 25mM NaHCO<sub>3</sub>, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 10mM D-glucosa). El GD se diseccionó con una navaja de 500µm y una espátula en un esteroscopio. Se realizaron cortes coronales para separar las regiones del mesencéfalo, rombencéfalo y el cerebelo. Una vez liberado el GD, se sonicó 15 segundos tres veces en un tubo eppendorf con 200µL de RIPA (20mM Tris-Hcl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 1 mM EGTA, 1% NP-40, 1% deoxicolato de sodio, 25 mM fosfato de sodio, 1mM b-glicerofosfato, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 µg/ml leupeptina). Para obtener la proteína, se centrifugó durante 14 minutos a 12,000 rpm a 4°C. El sobrenadante se recuperó y se almacenó a -20°C hasta su utilización.

#### **Cuantificación de los niveles de grem-1**

Se realizó un ELISA con el kit de grem-1 DY956 (R&D Systems). En una placa de 96 pozos se dejó incubando el anticuerpo de captura durante 12h para su adhesión. Posteriormente, la placa se lavó con una solución de PBS con Tween-20 al 0.05% y se dejó secar. Se adicionó la proteína diluida con el reactivo de dilución del kit y se adicionó el anticuerpo de detección del kit a 200ng/mL. Después de dos horas se colocó la enzima estreptavidina-HRP durante 20 minutos, y se utilizó como sustrato H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con Tetrametilbencidina en una dilución 1:1. Se leyó en el espectrofotómetro a 450nm (GloMax, Promega).

#### **Inmunomarcaje de grem-1, Ki67 y Dcx**

El hemisferio derecho se colocó en paraformaldehído al 4% por 24 horas. Posteriormente se pasó a sacarosa al 30% y se dejó ahí hasta su utilización. Se realizaron cortes coronales de 40µm de grosor en un microtomo Leica SM2010 R (BioSystems, USA). Al momento de realizar los cortes, la platina del microtomo estuvo sobre hielo seco. Los cortes se almacenaron en placas con solución crioprotectora (50% PBS 1X, 25% Glicerol, 25% etilenglicol). Se realizaron inmunohistoquímicas de la proteína grem-1 para confirmar su presencia en el GD.

La inmunohistoquímica de grem-1 se realizó como se describió anteriormente utilizando sólo la concentración de 7µg/500µL del anticuerpo primario. Se capturaron imágenes con el microscopio óptico Leica (DM500 acoplado a una cámara ICC50; Buffalo Grove, IL, USA) con el objetivo de 4 y 10x. Para el análisis de densitometría óptica integrada, las imágenes fueron procesadas en formato TIFF a través del programa ImageJ 1.52. Se evaluaron 4 cortes del giro dentado por cada roedor.

Para corroborar el efecto de los estímulos proneurogénicos en los ratones, se realizaron inmunohistoquímicas de los marcadores Ki67 y Dcx. La proteína nuclear Ki67 se expresa en todos los mamíferos y está presente en todas las fases del ciclo celular, excepto en la fase de arresto (G0). Esta proteína se considera como un marcador endógeno de la proliferación celular (Kee, Sivalingam, Boonstra, & Wojtowicz, 2002; Takagi et al., 2014). Dcx es una proteína asociada a los microtúbulos



(Moslehi et al., 2019), está presente durante dos etapas del proceso neurogénico: la expansión clonal de células precursoras y en la etapa de migración y selección de nuevas neuronas (Plümpe et al., 2006).

Las proteínas Ki67 y Dcx se identificaron con un anticuerpo primario de conejo (1:150; Abcam, ab92742 y 1:1000; Abcam, ab2253, respectivamente). El tejido se incubó con el anticuerpo durante toda la noche en agitación constante a 4°C. Al siguiente día se colocó el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a biotina (1:250) durante dos horas. Se utilizó el sistema avidina-peroxidasa de rábano (ABC-4100 de Vector Labs) seguido de la adición del sustrato diaminobencidina (SK-4100 de Vector Labs). El tejido se montó en cubreobjetos gelatinizados y se cubrió con Neomount (Millipore). Finalmente, las células positivas a Ki67 y a Dcx se cuantificaron en campo claro de un microscopio óptico Leica (DM500 acoplado a una cámara ICC50; Buffalo Grove, IL, USA).

Ki67 y Dcx se cuantificaron en la ZSG en dos cortes dorsales y dos ventrales de cada hipocampo de cada individuo. Se realizaron comparaciones entre la región anatómica dorsal-ventral dentro de los mismos individuos y entre tratamientos. La cuantificación se realizó contando la marca positiva adyacente a la línea que corresponde a la zona subgranular.

Para la Dcx también se clasificó por categorías y se realizaron comparaciones entre ellas. La Dcx se clasificó en tres categorías modificando la propuesta por Plümpe y colaboradores (2006). Las categorías fueron de acuerdo con la maduración dendrítica: A) células con o sin elongaciones cortas; B) células que presentan una elongación mayor a la longitud del soma o bien células que presentan una prolongación que cruza la capa granular; y C) células que tienen prolongaciones que alcanzan la capa molecular con dos o más nodos de ramificación (Plümpe et al., 2006) (**Figura 4**).

Se utilizó el método de Sholl para cuantificar el número máximo de neuritas presentes en las células y su extensión desde el soma en la categoría C de Dcx (Bird & Cuntz, 2019; García-Segura & Perez-Marquez, 2014). El análisis de Sholl es una herramienta geométrica para medir indirectamente la supervivencia y el grado de ramificación de las nuevas neuronas. Se analizaron imágenes en el software CellTarget ([http://www3.uah.es/biologia\\_celular/JPM/CellTarget/CellTarget.html](http://www3.uah.es/biologia_celular/JPM/CellTarget/CellTarget.html)), capturadas a 10x con un microscopio óptico Leica (DM500 acoplado a una cámara ICC50; Buffalo Grove, IL, USA). Se cuantificó con círculos de 10µm de diámetro el número de intersecciones desde el soma hasta la capa molecular (10-150µm). Se obtuvo, el índice de ramificación BI propuesto por García-Segura & Perez-Marquez, (2014) para distinguir diferencias en el grado de arborización dendrítico (**Figura 5, panel A, B**). Este índice compara la diferencia en el número de intersecciones realizadas en pares de círculos con respecto a la distancia del soma neuronal del método de Sholl. Cuando el valor de BI es igual cero, indica que las neuritas no se han ramificado (García-Segura & Perez-Marquez, 2014).

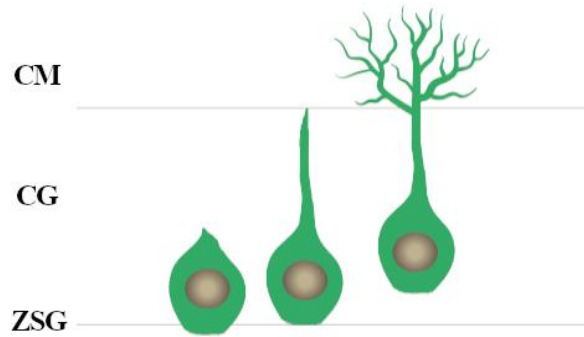
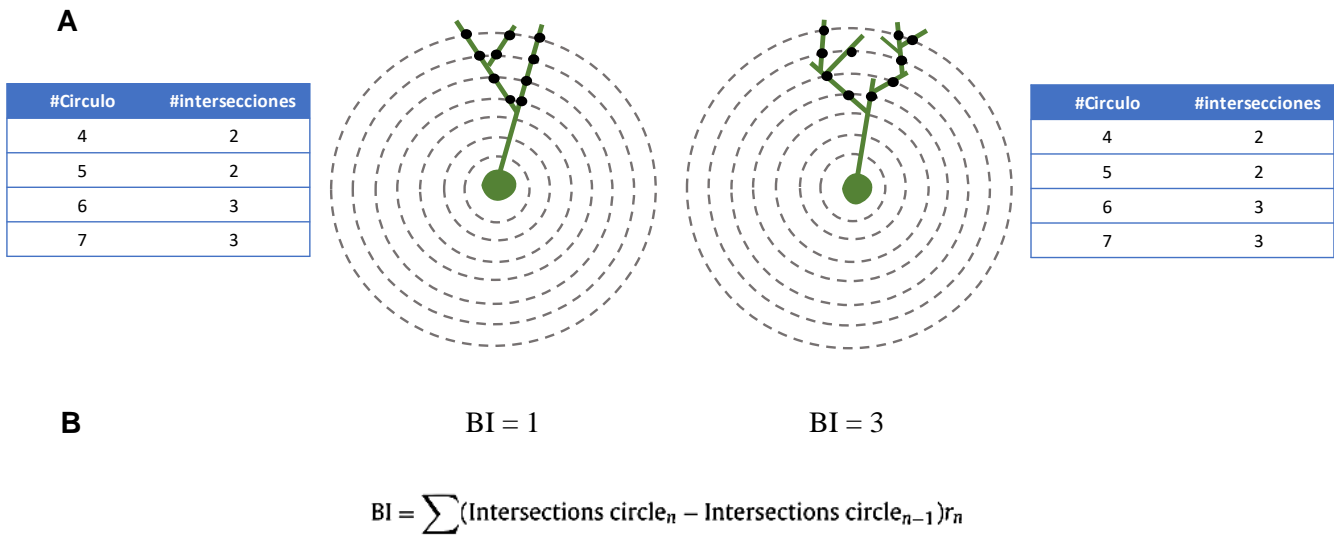


Figura 4. Esquematación de las categorías de Dcx. Izquierda A, Centro B, Derecha C



**Figura 5.** Complejidad dendrítica de las células categoría C. A) Análisis de Sholl. Se observa que diferentes morfologías pueden dar el mismo número de intersecciones. B) Índice de ramificación. Este índice es relativo a la cantidad de ramificaciones de la neurita, por lo tanto, indica la complejidad detrítica y es útil para discriminar entre diferentes morfologías neuronales.

## Análisis Estadístico

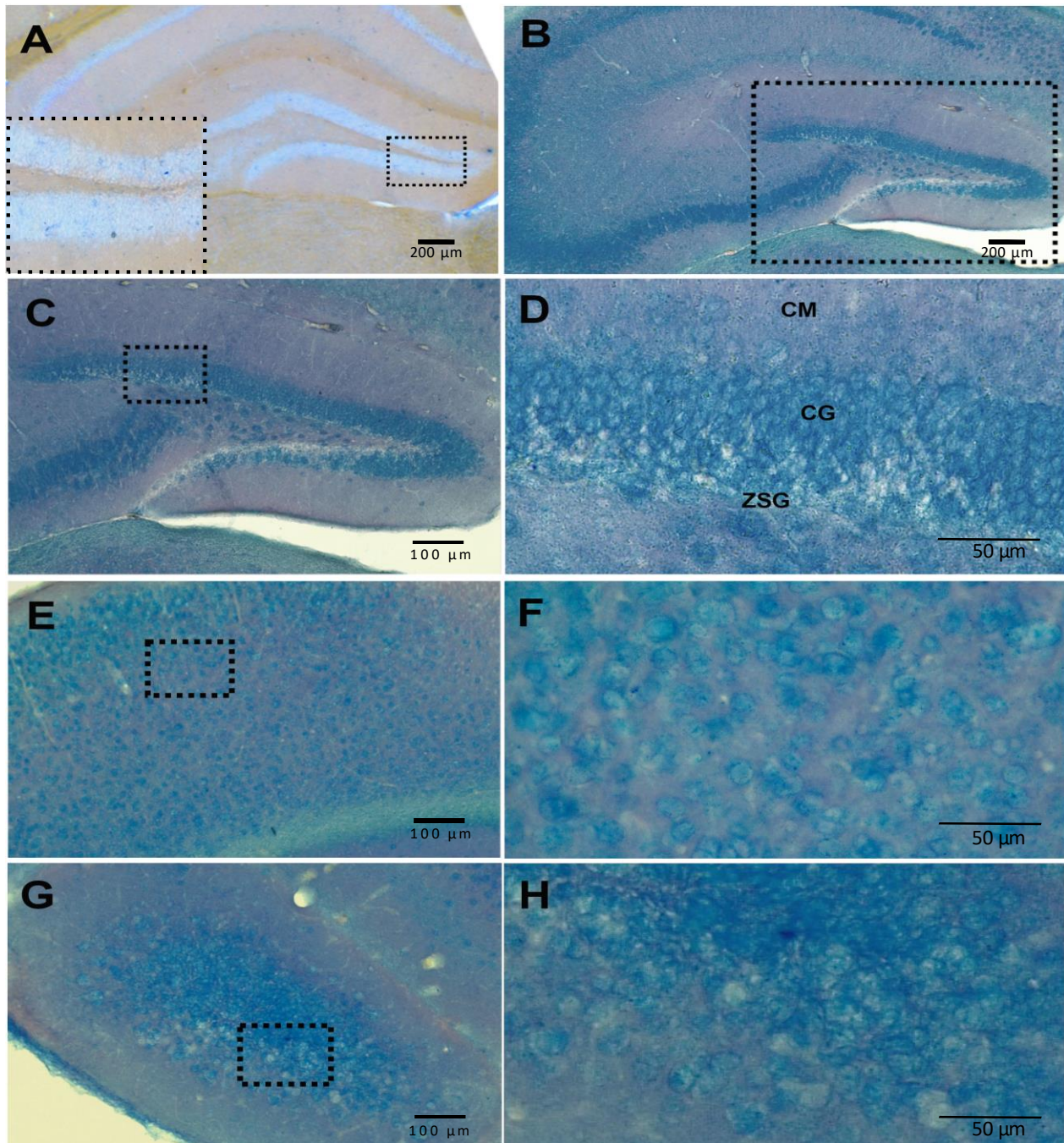
Los análisis estadísticos fueron realizados en Wolfram Mathematica 12.1. Se realizó un análisis de varianza de una vía para probar las diferencias en la concentración de grem-1 y otro para la cantidad de células positivas a Ki67 de acuerdo con cada tratamiento, como prueba *post hoc* se utilizó la prueba de comparación de medias de Bonferroni. Cuando hubo una diferencia evidente en los gráficos que resultó no significativo se realizó una prueba de *t* de student para corroborar el análisis. Por otra parte, dado que la distribución de los datos de Dcx no se asemejan a la distribución gaussiana se realizó una prueba de Krustal Wallis se utilizó la prueba Student-Newman-Keuls *pos hoc*.

Las diferencias estadísticamente significativas se consideraron con un valor de  $p < 0.05$ . Se realizó un análisis de varianza de dos vías. Los factores fueron tratamiento y la región anatómica dorsal/ventral y como variable dependiente la cantidad de células positivas a Ki67 y a Dcx. Además, se realizó una correlación entre la concentración de grem-1 con la cantidad de células positivas a Ki67, Dcx y de la categoría C.

## Resultados

### La proteína grem-1 se expresa en el GD

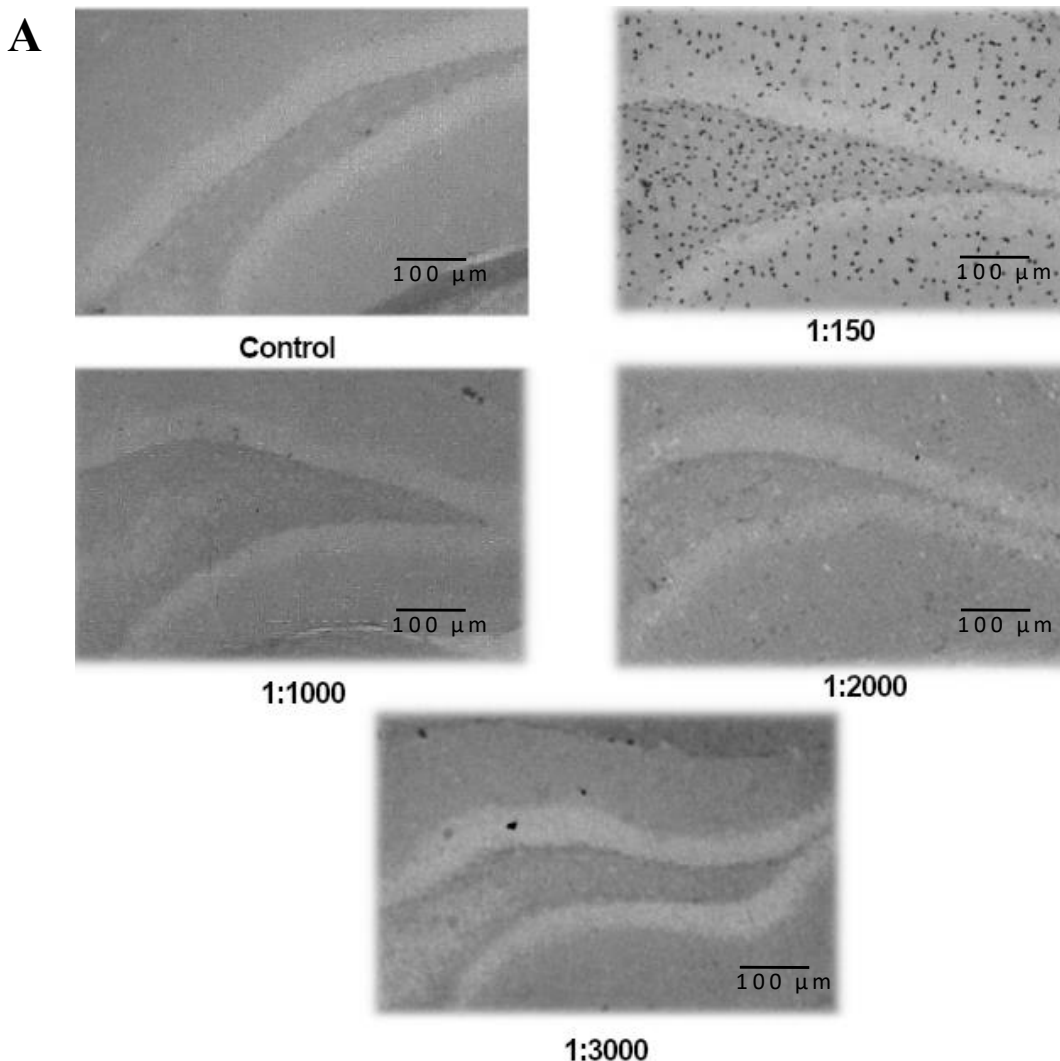
Hay inmunorreactividad de grem-1 en la zona granular, ligeramente en la zona subgranular, en el *hilus* del GD y en CA3 (**Figura 6, Panel B, C, D**). También se encontró inmunorreactividad en otras áreas como en la corteza, el tálamo y en los bulbos (**Figura 6, Panel E, F, G, y H**). Este resultado sugiere que la proteína grem-1 se encuentra localizada en el GD del hipocampo.

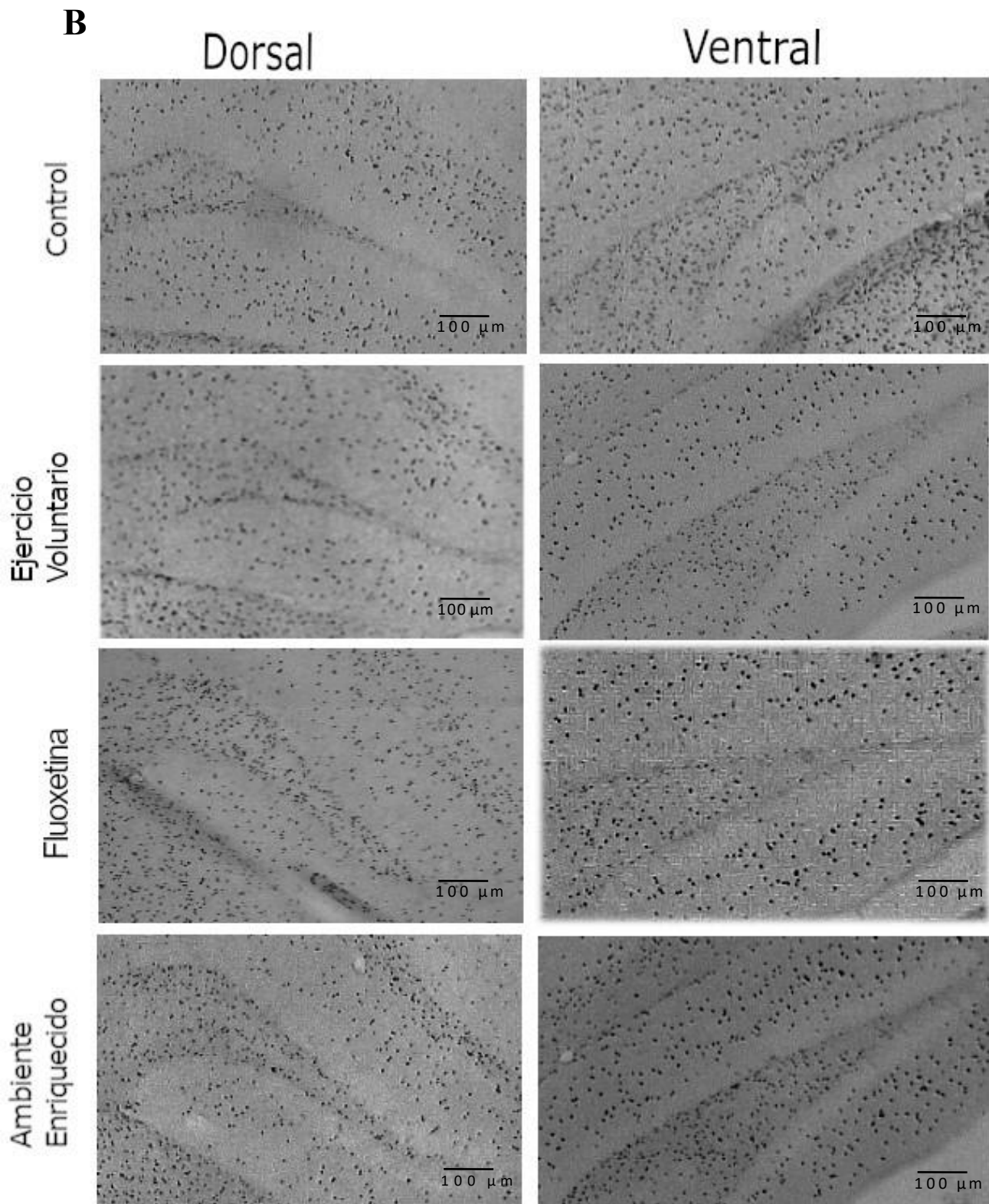


**Figura 6.** Inmunorreactividad de grem-1 en cortes coronales de roedores macho. A) Control negativo de grem-1. B) Hipocampo. C, E y G) Giro dentado, corteza y bulbo olfatorio. D, F y H) acercamientos de C, E y D), respectivamente. Abreviaciones CM capa molecular, CG capa granular, ZSG zona subgranular. Imágenes tomadas a 4x (A y B), 10x (C, E y G) y 40x (D, F y H).

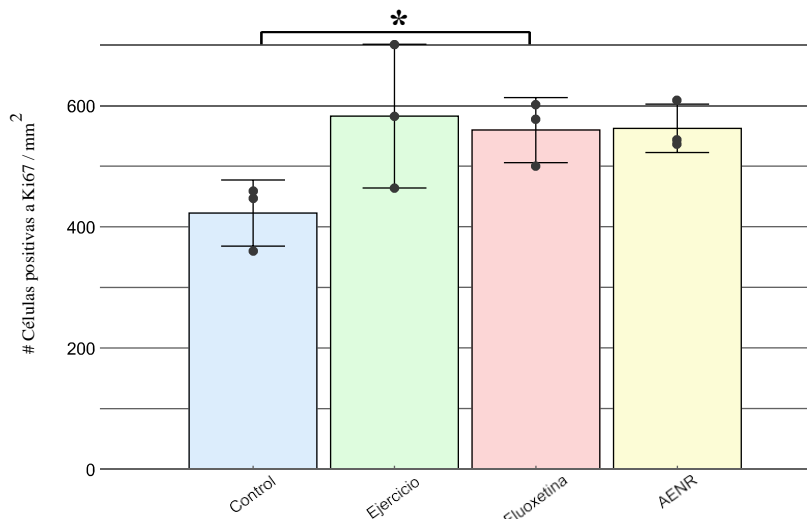
### Los tratamientos proneurogénicos inducen un aumento en el número de células positiva a Ki67

Para determinar los cambios en la proliferación de las células precursoras por efecto de tratamiento cuantificamos mediante inmunohistoquímicas, la cantidad de células positivas a Ki67 en la ZSG (**Figura 7, Panel B**). Se realizó una dilución del anticuerpo para determinar la concentración a la cual se observa la marca. La concentración que se utilizó es 1:150 (**Figura 7, Panel A**). No se observan diferencias estadísticamente significativas entre la cantidad de células positivas a Ki67 entre tratamientos ( $F_{(3,8)}=3.013$ ,  $p=0.094$ ). Se observa un ligero incremento de las células en todos los tratamientos. En ejercicio voluntario del 37% (582 células), en fluoxetina del 23% (559 células) y con el ambiente enriquecido del 24% (562 células) con relación al grupo control (422 células) (**Figura 8**). La prueba de *t* de *student* mostró que el número de células positivas a Ki67 bajo el tratamiento con fluoxetina ( $p=0.0057$ ) es diferente respecto al control. El ejercicio voluntario y el ambiente enriquecido ( $p>0.05$ ) no mostraron diferencias del número de células positivas a Ki67.





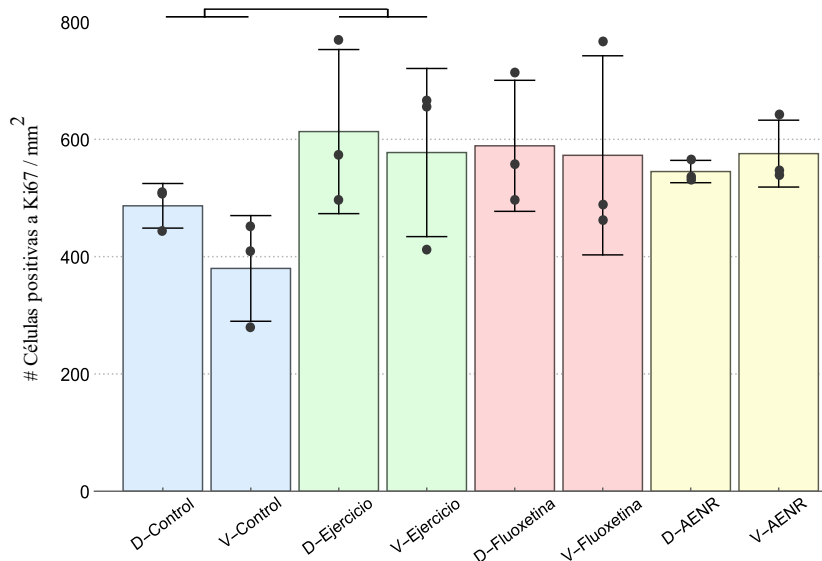
**Figura 7.** Micrografías de la marca de la proteína Ki67 en cortes coronales del giro dentado. A) Control negativo y diluciones a diferente concentración del anticuerpo Ki67. B) Distribución de la marca de Ki67 en diferentes tratamientos proneurogénicos a una dilución de 1:150.



**Figura 8.** Representación gráfica de la cantidad total de células positivas a Ki67/mm<sup>2</sup> de los diferentes tratamientos durante 14 días. El ANOVA no mostró diferencias significativas por efecto de los diferentes tratamientos. En cambio, la prueba de *t* de student mostró que el tratamiento fluoxetina es diferente al control.  $\bar{x}$ = 422.52, 582.451, 559.51, 562.25; SE 31.50, 68.45, 30.94, 23.11; n= 3. Se muestra el valor medio +/- el error estándar. Se muestra el valor medio +/- el error estándar.

*La actividad física voluntaria incrementa el número de células positivas a Ki67.*

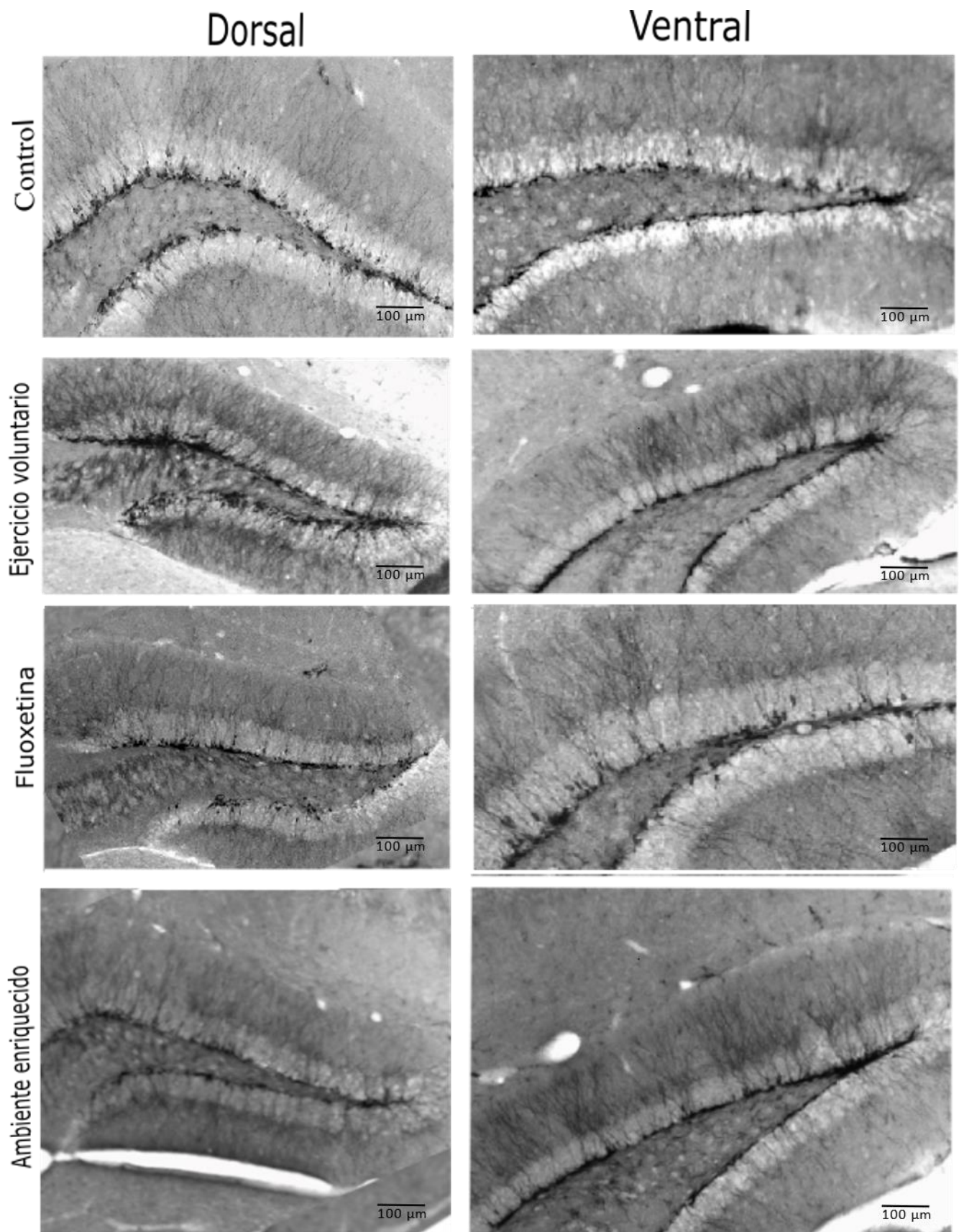
Se realizó un análisis de varianza de dos vías del número de células positivas a Ki67 de cada tratamiento como factor uno y la región anatómica como factor dos, es decir, la región dorsal y ventral del giro dentado. Con el análisis de interacción del ANOVA de dos vías no se obtuvo evidencia estadística que mostrara una dependencia o interacción de la región anatómica y la variación del número de células positivas a Ki67 en cada tratamiento ( $F_{(3,16)}=1.548$ ,  $p=0.241$ ). No se encontró diferencias significativas del número de células positivas a Ki67 entre regiones dorsal y ventral en ningún tratamiento ( $F_{(1,16)}=0.0181$ ,  $p=0.895$ ) (**Figura 9**). Los tratamientos provocaron cambios en el número de células positivas a Ki67 ( $F_{(3,16)}=3.249$ ,  $p=0.050$ ). Particularmente la actividad física voluntaria presenta un mayor número de células positivas a Ki67 que el grupo control ( $p=0.040$ ). No se encontraron diferencias significativas en el número de células positivas a Ki67 de los grupos de ambiente enriquecido y fluoxetina contra el grupo control ( $p=0.113$  y  $p=0.066$ , respectivamente).



**Figura 9.** Representación gráfica de la cantidad total de células positivas a Ki67/mm<sup>2</sup> por región anatómica de los diferentes tratamientos. El asterisco indica diferencia estadísticamente significativa del factor tratamiento. El ejercicio voluntario es diferente respecto al control. Los tratamientos fluoxetina y AENR no mostraron diferencias respecto al control. Dorsal  $\bar{x}$ = 4869.64, 613.20, 588.91, 545.07; SE 21.96, 80.76, 64.49, 10.99; Ventral  $\bar{x}$ = 379.88, 577.46, 572.70, 575.62; SE 52.02, 82.75, 98, 32.92. Se muestra el valor medio +/- el error estándar.

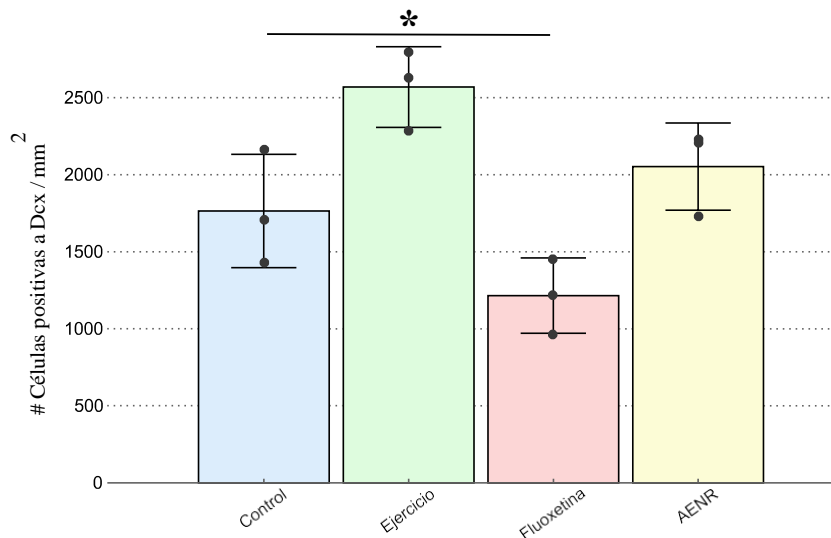
### El ejercicio voluntario y el ambiente enriquecido aumentan el número de células positiva a DCX

Se cuantificó el número de células positivas a Dcx para medir si los tratamientos incrementan la maduración de nuevas neuronas (**Figura 10**). Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la cantidad de células positivas a Dcx entre los tratamientos ( $H_{(3)}=9.974$ ,  $p=0.019$ ), sugiriendo distintos niveles de maduración. El grupo expuesto al ejercicio voluntario (2569 células) mostró un incremento del 45.63% en el número de células positivas a Dcx respecto al control (1764 células) ( $p<0.05$ ). Mientras que en fluoxetina (1215 células) se observó una disminución del 31.12% en el número de células positivas a Dcx respecto al control ( $p<0.05$ ). Por último, el ambiente enriquecido (2052 células) no mostró diferencias estadísticamente significativas del número de células positivas a Dcx ( $p>0.05$ ), sin embargo, mostró un aumento del 16.32% (**Figura 11**).



**Figura 10.** Micrográficas de la presencia de Dcx en cortes coronales del giro dentado en diferentes condiciones.

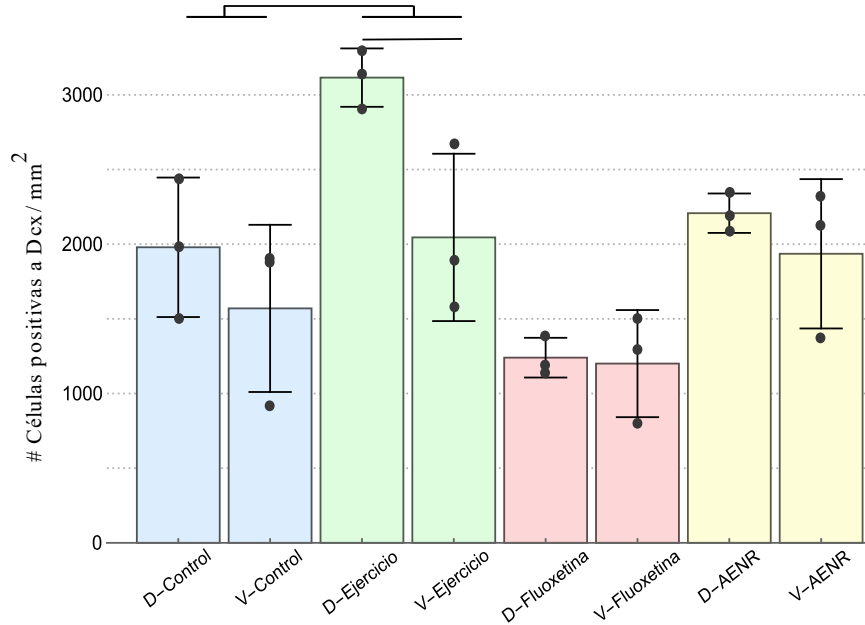




**Figura 11.** Representación gráfica de la cantidad total de células positivas a Dcx/mm<sup>2</sup> de los diferentes tratamientos durante 14 días. Se observó diferencias estadísticamente significativas del número total de células positivas a Dcx entre los tratamientos. El grupo de ejercicio voluntario y el grupo de fluoxetina son diferentes respecto al control ( $p < 0.05$ ).  $\bar{x} = 1764, 2569, 1215, 2052$ ;  $SE = 212.5, 151.1, 141.4, 163.5$ ;  $n = 3$ . Se muestra el valor medio  $\pm$  el error estándar.

### *El ejercicio voluntario incrementa las células positivas a Dcx en la región dorsal*

De la misma manera que con Ki67 se realizó un análisis de varianza de dos vías de las células positivas a Dcx en cada tratamiento por región anatómica dorsal y ventral del giro dentado. No se observó interacción entre el número de células positivas a Dcx en cada tratamiento con la región anatómica ( $F_{(3,16)} = 1.807$ ,  $p = 0.186$ ). El factor tratamiento provocó cambios en el número de células positivas a Dcx ( $F_{(3,16)} = 11.960$ ,  $p < 0.001$ ). El grupo de actividad física voluntaria presentó un mayor número de células positivas a Dcx que el grupo control ( $p = 0.019$ ). No se encontraron diferencias significativas entre el grupo de ambiente enriquecido y el grupo de fluoxetina respecto al grupo control ( $p = 1$  y  $p = 0.179$ , respectivamente). El ambiente enriquecido y ejercicio voluntario mostraron diferencias respecto al grupo de fluoxetina ( $p = 0.013$  y  $< 0.001$ , respectivamente). Por último, el factor región anatómica indicó diferencias estadísticamente significativas del número de células positivas a Dcx ( $F_{(1,16)} = 7.417$ ,  $p = 0.015$ ). El grupo ejercicio voluntario tuvo un incremento del 52.31% de células positivas a Dcx en el área dorsal (3115.57) respecto a la región ventral (1070.14 células) ( $p = 0.005$ ) (**Figura 12**). Sugiriendo un aumento de maduración en la región dorsal debido al ejercicio voluntario.

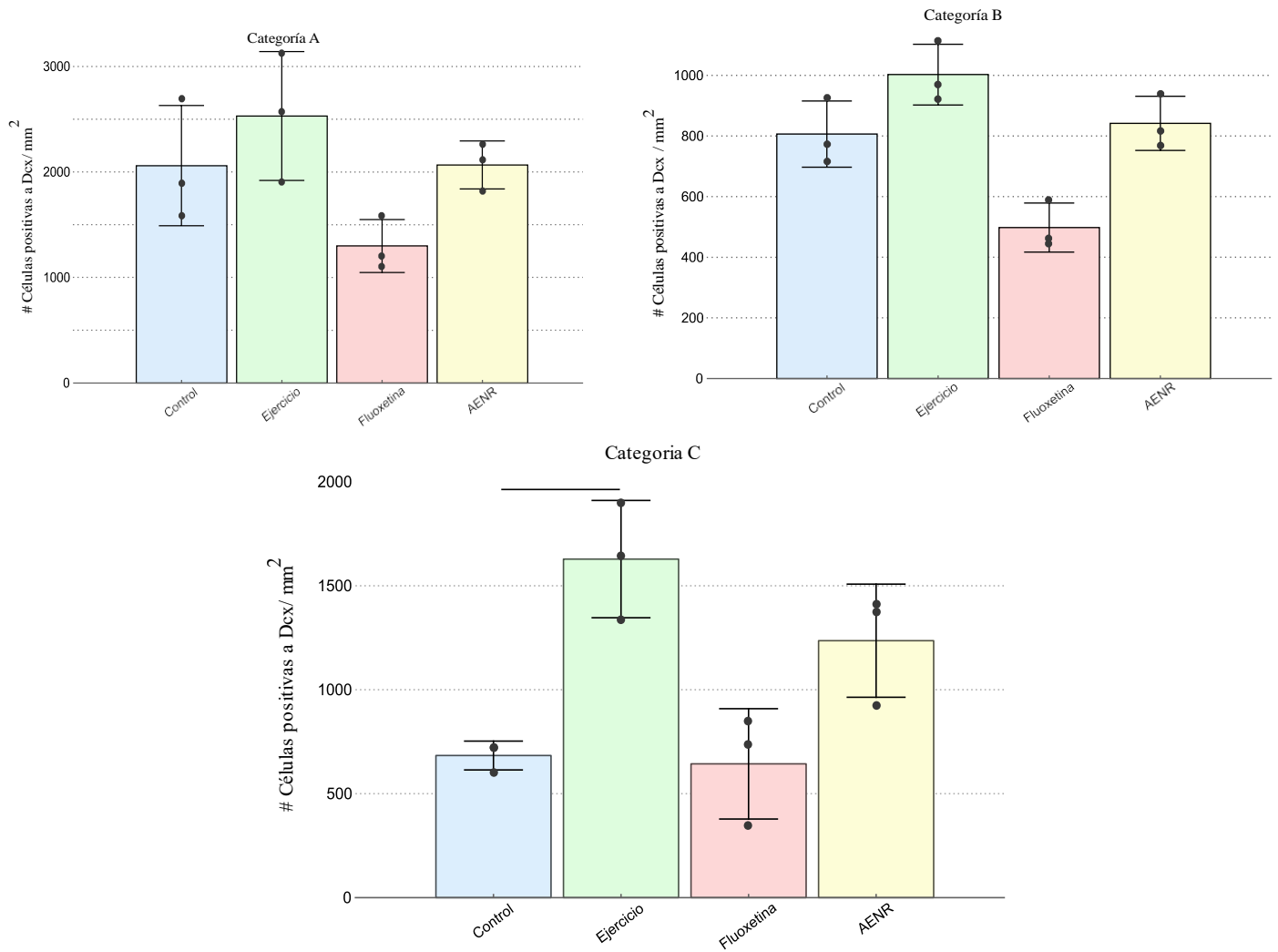


**Figura 12.** Representación gráfica de la cantidad total de células positivas a Dcx/mm<sup>2</sup> de la región ventral y dorsal de los diferentes tratamientos durante 14 días. El asterisco indica diferencia estadísticamente significativa del factor tratamiento. El ejercicio voluntario es diferente respecto al control ( $p=0.019$ ). También el factor región mostró diferencias entre el área dorsal con el área ventral del grupo ejercicio voluntario ( $p=0.005$ ). Ventral  $\bar{x}= 1570.04, 2045.42, 1200.30, 1935.78$ ; SE= 323.19, 323.47, 207.08, 288.69; Dorsal  $\bar{x}=1979.28, 3115.57, 1240.09, 2207.69$ ; SE= 269.68, 112.9, 76.80, 76.21;  $n= 3$ . Se muestra el valor medio +/- el error estándar.

### Maduración dendrítica

Para saber si hay diferencias en la variación de la maduración dendrítica cuantificamos el número de células positivas a Dcx por categorías. En un ANOVA de dos vías no se encontró interacción entre la región anatómica y el nivel de maduración de las neuronas, este último, medido con las células positivas a Dcx por categorías en cada tratamiento ( $F_{(18,44)}=1.322, p=0.221$ ). Con respecto al número de células positivas a Dcx de cada región anatómica no se observaron diferencias significativas ( $F_{(6,44)}= 20.120, p=1$ ).

Se realizaron ANOVAs de una vía por cada categoría. En la categoría C se identificó que el ejercicio voluntario incremento un 138% el número de células (16282) en comparación con el grupo control ( $F_{(3,11)}=11.688, p=0.008$ ) (6836 células) (**Figura 13**). La categoría B ( $F_{(3/11)} =14.639, p=0.001$ ) mostró diferencias del número de células positivas a Dcx entre el ejercicio (10027 células) y el ambiente enriquecido (8419 células) en comparación con fluoxetina (4981 células) ( $p=0.007$  y  $p=0.047$ , respectivamente), pero no contra el control (8063 células). Fluoxetina tuvo una disminución del 30% de las células positivas a Dcx en comparación al control. Por último, en la categoría A no se modificó el número de células positivas a Dcx de ningún tratamiento A ( $F_{(3/11)}=3.836, p=0.057$ ).



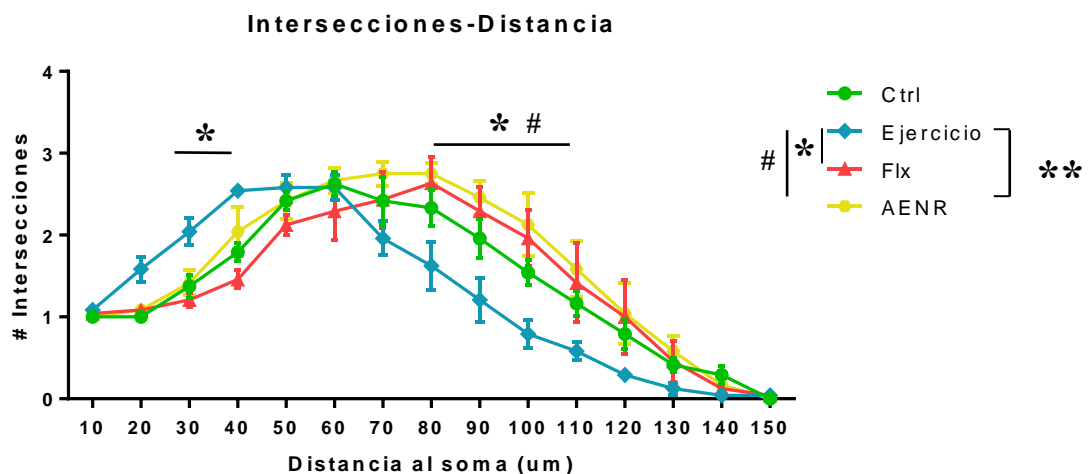
**Figura 13.** Maduración dendrítica de células positivas a Dcx/mm<sup>2</sup> entre diferentes tratamientos durante 14 días. Cuantificación de la categoría A, la categoría B y la categoría C. El asterisco muestra las diferencias estadísticamente significativas de la categoría C entre tratamientos, el ejercicio voluntario es diferente respecto al control ( $p=0.008$ ).  $\bar{x}_A= 20593.61, 25299.57, 12987.96, 20657.35$ ;  $SE_A= 3291.90, 3528.58, 1446.99, 1314.6$ ;  $\bar{x}_B= 8063.65, 10027.87, 4981.32, 8419.08$ ;  $SE_B= 630.26, 577.80, 466.67, 515.89$ ;  $\bar{x}_C= 6836.03, 16282.56, 6434.72, 12358.29$ ;  $SE_C= 400.38, 1628.01, 1531.97, 1570.81$ ;  $n= 3$ . Se muestra el valor medio +/- el error estándar.

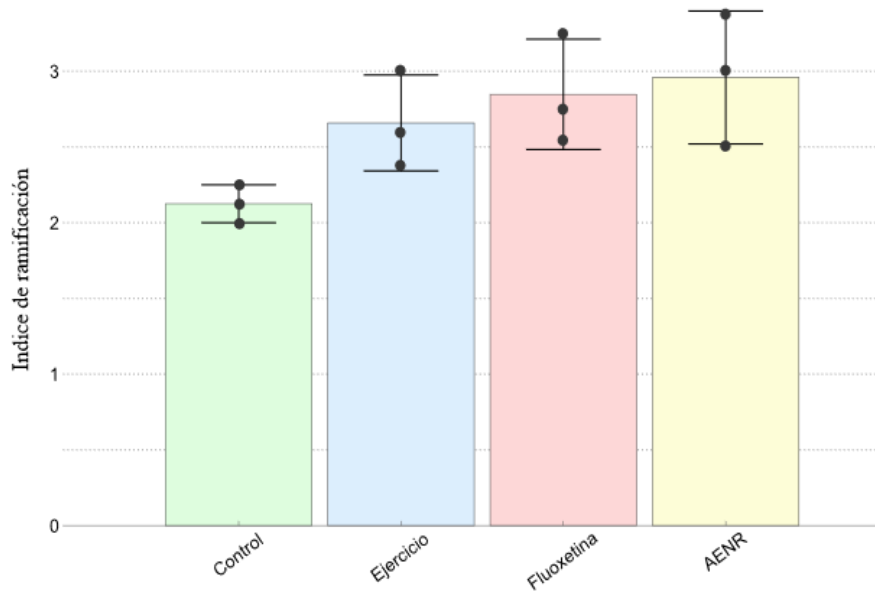
Se realizó un análisis de Sholl para medir el grado de ramificación de las neuronas inmaduras con los diferentes tratamientos y si influyen en la supervivencia de las células de la categoría C. Se realizó un ANOVA de dos vías, como factor uno fueron los tratamientos y el factor dos fue la distancia desde el soma, en este último se consideró el número de intersecciones dado cada círculo. El ANOVA de dos vías indicó que hay interacción entre los factores tratamiento y la distancia desde el soma ( $F_{(42,120)}=2.711$   $p<0.001$ ). Esto sugiere que los tratamientos si tienen un efecto sobre las ramificaciones dendríticas. Con respecto a los tratamientos se observó que el ambiente enriquecido aumenta 26% el número de intersecciones a lo largo del soma en comparación con el grupo sometido a ejercicio voluntario ( $p<0.001$ ). Sin embargo, ninguno de los tratamientos mostró aumento en la ramificación dendrítica con respecto al grupo control ( $p=0.422$ ). La distancia desde el soma mostró diferencias significativas ( $F_{(14,120)}=67.78$   $p<0.001$ ). El grupo de fluoxetina y de ambiente enriquecido presentaron intersecciones a mayor distancia de la terminación dendrítica con respecto al soma (en las distancias de 30, 40, 80, 90, 100 y 110 $\mu\text{m}$  y 70, 80, 90, 100 y 110 $\mu\text{m}$  respectivamente) en comparación del ejercicio voluntario (ambos,  $p<0.05$ ).

Se encontró una tendencia similar del número de intersecciones en el recorrido desde el soma hasta la terminación dendrítica en todos los tratamientos. Se observa que el ejercicio voluntario presenta una mayor cantidad de intersecciones próximas al soma y a su vez es el tratamiento con una disminución más próxima al soma en comparación con el control. El ambiente enriquecido es el tratamiento que presentó mayor número de intersecciones distales al soma (**Figura 14, panel A**).

Posteriormente, con los datos de Sholl, se buscó reconocer la variación morfológica por tratamiento a partir del índice de ramificación. El índice de ramificación estima morfologías basándose en el incremento de intersecciones con relación al incremento del área. Se encontró un incremento del índice de ramificación en todos los tratamientos, esto sugiere que los tratamientos promueven la ramificación dendrítica. Sin embargo, un ANOVA de una vía mostró diferencias entre los tratamientos ( $F_{(3,8)}=3.715$ ,  $p=0.061$ ) (**Figura 14, panel B**).

**A**



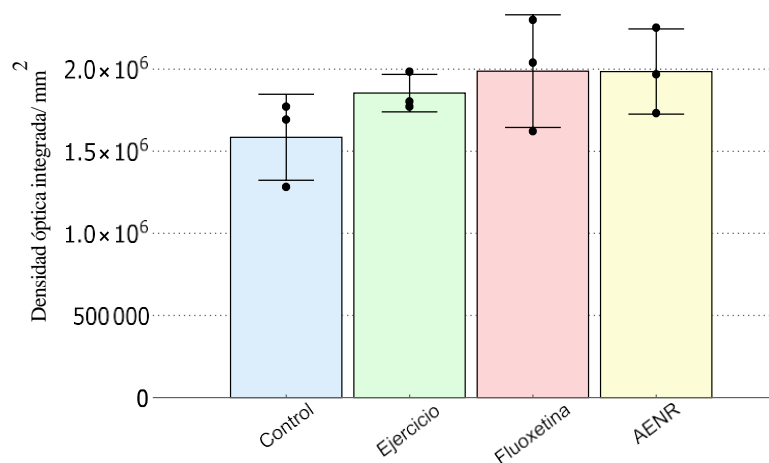
**B**

**Figura 14.** Complejidad dendrítica de las células de categoría C de los distintos tratamientos durante 14 días. A) Análisis de Sholl, se observó que hay interacción entre el tratamiento y el factor intersecciones a lo largo de la distancia desde el soma. El factor intersecciones a lo largo de la distancia desde el soma mostró diferencias entre la fluoxetina y el AENR respecto al ejercicio voluntario (30, 40, 80, 90, 100 y 110um; #,70, 80, 90, 100 y 110um) ( $p < 0.05$ ). También el factor tratamiento mostró diferencias entre el AENR respecto al ejercicio voluntario (\*\*)( $p < 0.001$ ). B) Comparación del índice de ramificación entre tratamientos. No se observó diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0.061$ ).  $\bar{x} = 2.12, 2.65, 2.54, 2.95$ ;  $SE = 0.07, 0.18, 0.48, 0.25$ ;  $n = 3$ . Se muestra el valor medio +/- el error estándar.

### Cuantificación de grem-1 en el GD

*No hay variación de los inmunoprecipitados de grem-1 bajo diferentes tratamientos*

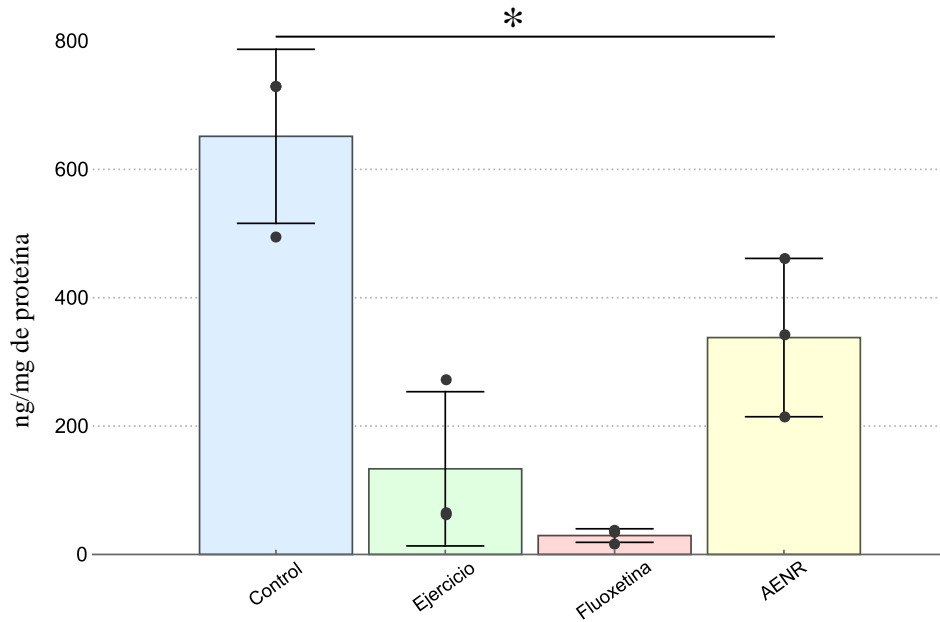
Para conocer si hay variación de los inmunoprecipitados de grem-1 por efecto de tratamiento se evaluó la densidad óptica integrada, es decir, el número de píxeles de los inmunoprecipitados del giro dentado de las microfotografías capturadas de cada tratamiento. No se encontraron diferencias entre la cantidad de inmunoprecipitados en los diferentes tratamientos (ANOVA  $F_{(3,6)} = 1.997$ ,  $p = 0.219$ ) (**Figura 15**).



**Figura 15.** Densidad óptica integrada de las inmunohistoquímicas de grem-1. No se observó diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos.  $\bar{x} = 1.585e+006, 1.854e+006, 1.987e+006, 1.985e+006$ ;  $SE = 151293, 65727, 198085, 149916$ ;  $n = 3$ . Se muestra el valor medio +/- el error estándar.

*La concentración de grem-1 disminuye con los tratamientos proneurogénicos*

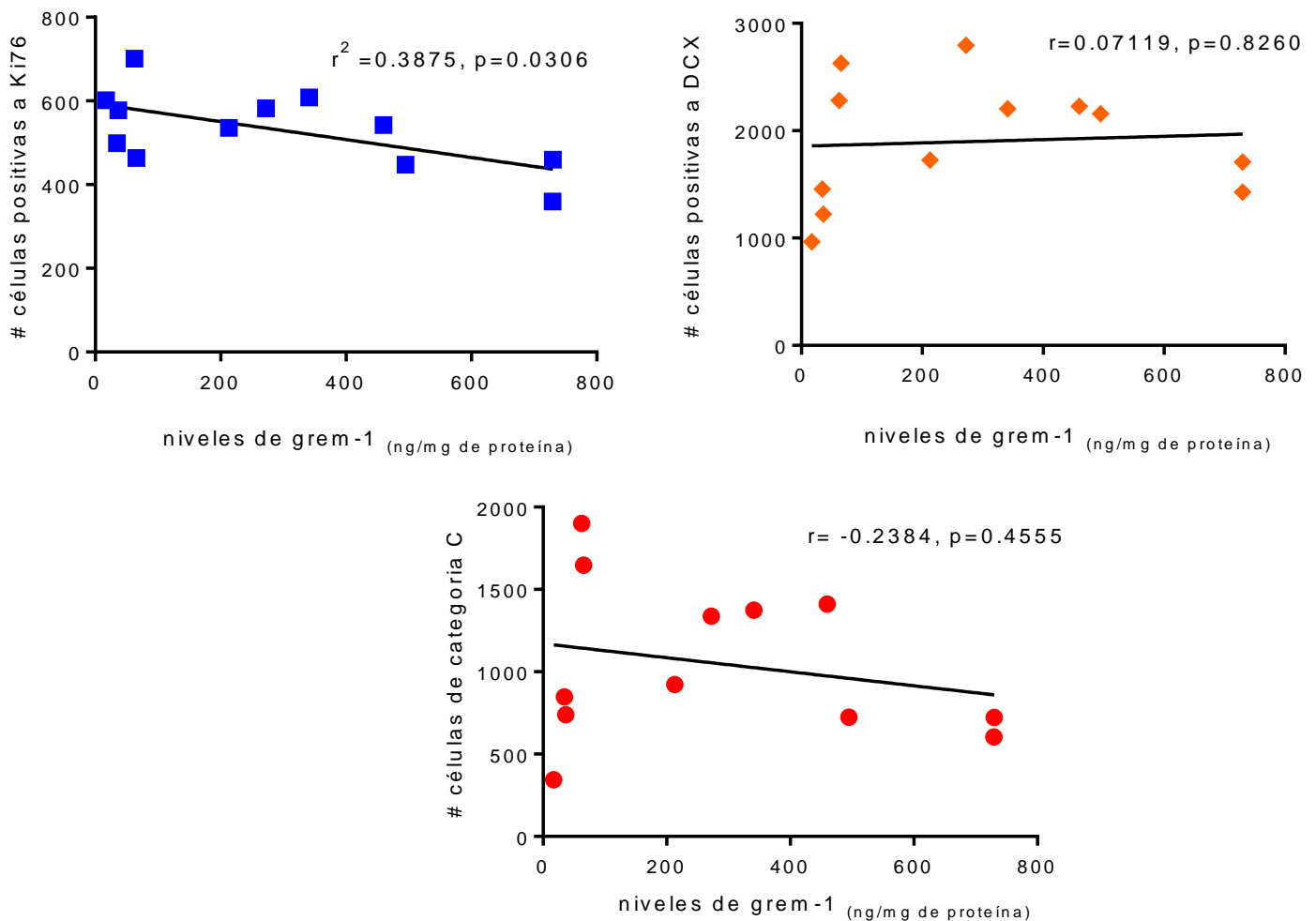
Se buscó si la concentración de grem-1 varía por tratamiento con un ELISA en muestras de GD. Con una ANOVA se encontraron diferencias significativas en la concentración de grem-1 ( $F_{(3,11)}=18.723$   $p<0.001$ ). Los tratamientos mostraron menor cantidad estadísticamente significativa de la concentración de grem-1 respecto al control. El ejercicio voluntario disminuyó un 79%, fluoxetina un 95% y el ambiente enriquecido un 48% (control 651.50ng/mg, actividad física voluntaria 133.42 ng/mg;  $p=0.002$ , fluoxetina 29.42 ng/mg;  $p=0.001$ , ambiente enriquecido 337.91 ng/mg;  $p= 0.048$ ) (Figura 16).



**Figura 16.** Cuantificación de grem-1 de los diferentes tratamientos. Se observó diferencias estadísticamente significativas de la cantidad de grem-1 entre los tratamientos. Los grupos ejercicio voluntario, Fluoxetina y AENR muestran menor cantidad de grem-1 respecto al control ( $p<0.05$ ).  $\bar{x}$ = 651.50ng/mg, 133.42 ng/mg, 29.42 ng/mg, 337.91 ng/mg; SE= 78287, 69371, 6095, 71213; n= 3. Se muestra el valor medio +/- el error estándar.

### Correlación negativa de la concentración de grem-1 con el número de células positivas a Ki67.

Se buscó si la concentración de grem-1 en el GD correlaciona con los marcadores de la neurogénesis Ki67, Dcx y con relación a la categoría C de maduración. El análisis de dependencia mostró que el número de células positivas a Ki67 es dependiente con la concentración de grem-1 ( $p=0.0306$ ). Mientras que el número de células positivas a Dcx y de la categoría C es independiente ( $p=0.8260$ ,  $p=0.4555$ , respectivamente). De acuerdo, a la prueba de dependencia se realizó una regresión línea con el marcador Ki67 para ver el grado de variación dependiente a la concentración de grem-1. Se encontró una débil variación con el marcador Ki67 ( $r^2=0.3875$ ) mostrando poca variación dependiente. Por otra parte, se realizó una correlación lineal de Dcx y de la categoría C. No se encontró variación conjunta del número de células positivas a Dcx ( $r=0.07119$ ) ni de la categoría C ( $r=0.2384$ ) con la concentración de grem-1 (Figura 17).



**Figura 17.** Representación gráfica de la correlación y regresión lineal entre los niveles de grem-1 y los marcadores de la neurogénesis. A) Correlación de los niveles de grem-1 con el número de células positivas a Ki67. B) Correlación de los niveles de grem-1 con el número de células positivas a Dcx. C) Correlación de los niveles de grem-1 con el número de células positivas a Dcx de categoría C.

## Discusión

A pesar de que se conocen algunos factores involucrados en la regulación de la neurogénesis todavía quedan muchos aspectos por dilucidar, por lo cual es relevante el estudio de otras moléculas. En este sentido, se propone a la proteína grem-1 como candidata debido a la presencia de su mRNA en el giro dentado y su actividad morfogénica. Como punto inicial, en este proyecto se confirmó la presencia de la proteína grem-1 en roedores adultos en la capa granular, el *hilus* y poca presencia en la zona subgranular del GD, lo que sugiere una posible participación en la diferenciación neuronal. Otro punto de interés fue analizar el comportamiento de grem-1 bajo distintos estímulos proneurogénicos.

En este proyecto se sugiere que un posible mecanismo de grem-1 es a nivel de las células progenitoras, ya que estudios *in vitro* muestran que este tipo de células en presencia de la proteína dirigen su destino celular hacia neuronas (Hernández -Cruz, 2018). Una posible acción de grem-1 sobre la neurogénesis es como antagonistas de las proteínas Bmp. El mecanismo reportado de las Bmp, en especial de las Bmp-2 y -4, es mantener en quiescencia a las células progenitoras en la zona subragular del GD (Bonaguidi et al., 2008; Hayashi et al., 2016; Mikawa & Sato, 2014; Tang et al., 2009). Por lo tanto, se propone que grem-1 puede actuar como antagonista de Bmp-2 y -4 en el giro dentado (Kim et al., 2012; Robert J. Wordinger et al., 2009), de esta manera grem-1 estaría permitiendo la ruta de diferenciación de las células progenitoras hacia neuronas. Esta idea se soporta ya que la acción de Bmp4 en el giro dentado dirige el destino celular hacia glía (Zhu et al., 2017, Bonaguidi et al., 2008; Hayashi et al., 2016; Mikawa & Sato, 2014; Tang et al., 2009).

Debido a que los estímulos proneurogénicos modifican los niveles de factores moleculares (Bdnf, Vegf, Fgf, entre otros) en el microambiente neurogénico (Fuss et al., 2010; Bayne, 2018; Clemenson et al., 2015), en este proyecto se buscó si grem-1 es susceptible a cambios como consecuencia de la presencia de estímulos proneurogénicos. En este trabajo se evaluó que el ejercicio voluntario, el ambiente enriquecido y fluoxetina fueran estímulos proneurogénicos antes de medir su efecto sobre grem-1.

El ejercicio voluntario mostró una tendencia de aumento en los marcadores de la neurogénesis, lo cual se observó con el incremento en el número de células positivas a Ki67, Dcx, el número de células de la categoría C, pero con un valor bajo del índice de ramificación, lo anterior concuerda con lo reportado por varios autores (Fuss et al., 2010; Pinar et al., 2018; Plümpe et al., 2006; Tanti et al., 2013; Kronenberg et al., 2006; Van Praag et al., 1999). Esto indica que la exposición, al menos por 14 días, tanto en hembras como en machos de la cepa C57BL/6J, incrementa las células positivas a Ki67 y Dcx. Con respecto a la falta de diferencia en el aumento de la proliferación observada en el número de células positivas a Ki67 en el grupo de ejercicio voluntario, que contrasta con lo reportado por Kronenberg et al., 2006 en roedores C57BL/6J expuestos a 3 y 10 días, se propone que fue debida a la varianza de los datos. Una posible explicación a la dispersión es la influencia tanto de la genética como del tiempo de exposición sobre la proliferación y diferenciación a neuroblastos (Christie et al., 2008; Fuss et al., 2010; Kempermann et al., 1997; Kim et al., 2018; Moreno-Jiménez et al., 2019). Otra causa es debido a la inespecificidad de la marca del anticuerpo como consecuencia de una saturación del sistema, ya que se observó inmunoprecipitados en zonas donde no hay proliferación como en la corteza cerebral. Por lo cual, se considera realizar una reevaluación del marcador Ki67. Se ha documentado que el ejercicio voluntario tiene mayor impacto sobre el número de células precursoras neuronales medido con el aumento de células positivas a BrdU en ratones C57BL/6 (Brown et al., 2003; Steiner et



al., 2008; Van Praag et al., 1999; Fabel et al., 2009), este contraste sugiere que el ejercicio tiene efecto en la proliferación, diferenciación y maduración de las células

El ambiente enriquecido mostró una tendencia de aumento en el número de células positivas Ki67, Dcx y de la categoría C, con un alto índice de ramificación. A partir de los 10 días de exposición, se observó el aumento en los marcadores Dcx y Ki67. No obstante, esta diferencia se ha reportado en un contexto patológico (Beauquis et al., 2010). Otros autores (Llorens-Martín et al., 2007; Moreno-Jiménez et al., 2019) reportaron un incremento en el número de células positivas a Dcx, en la ramificación y maduración dendrítica de células nuevas generadas en roedores C57BL/6 durante una exposición de 8 semanas a ambiente enriquecido. La discrepancia entre los resultados mencionados podría deberse a la carencia de homogeneización del ambiente enriquecido en los métodos utilizados (Clemenson et al., 2015; Curlik & Shors, 2013; Kempermann et al., 2002; Kempermann, Kuhn, & Gage, 1998; Kronenberg et al., 2006). Entre las diferencias de los objetos para crear un ambiente enriquecido se encuentra la textura, el color, el tamaño de los objetos, el tiempo de exposición, la combinación con una rueda (Llorens-Martín et al., 2007; Moreno-Jiménez et al., 2019; Kronenberg et al., 2006). Los resultados obtenidos en este proyecto dependen de los objetos utilizados para la implementación del ambiente enriquecido. Una posible solución a la discrepancia en los resultados podría ser la homogenización en las variables para montar un ambiente enriquecido.

El grupo con fluoxetina disminuyó significativamente el número de células positivas a Dcx y de categoría C. Por otra parte, se obtuvo un valor alto en el índice de ramificación y una tendencia de aumento en el número de células positivas a Ki67, cabe recalcar que los resultados de Ki67 no son contundentes debido a la inespecificidad del anticuerpo. Varios autores reportaron un incremento significativo de la proliferación, medida con el número de células positivas a BrdU, en ratones adultos C57BL/6, SvEv129 y transgénicos nestin-CFPnuc tratados con fluoxetina durante 14 y 28 días (Brooker et al., 2017; Encinas et al., 2006; Wang et al., 2008). Por otra parte, evidencia sugiere que el efecto de fluoxetina sobre los ratones C57BL/6 está en función de una condición patológica preexistente (David et al., 2010). Además, los resultados son susceptibles del efecto diferencial de fluoxetina sobre el tipo de célula a lo largo de la región dorsoventral (Zhou et al., 2016). Por último, se sugiere que la administración de fluoxetina aumenta la tasa de muerte celular de neuronas inmaduras, promoviendo morfologías más desarrolladas en las células que sobreviven (Wang et al., 2008). Lo anterior se puede aplicar a lo que se observó con el aumento del valor del índice de ramificación, concordando con los reportes de que fluoxetina promueve la ramificación dendrítica.

Finalmente, en cuanto al efecto de los estímulos proneurogénicos sobre grem-1 se observó que su concentración disminuye significativamente con todos los tratamientos. Como se mencionó se propone que el mecanismo por el cual grem-1 ejerce su efecto es a través de acción antagonista sobre las Bmp. La regresión lineal sugiere una dependencia débil del número de células positivas a Ki67 con la concentración de grem-1, sin embargo, se propone realizar el análisis con otros marcadores de proliferación como BrdU. Esta variación podría ser debida a la formación del complejo grem-1/Bmp2,-4. Este complejo promueve la proliferación, lo que ocasiona un aumento en las células positivas a Ki67. Por lo cual, se sugiere que la acción de grem-1 sobre la neurogénesis es indirecta. Una explicación es que el anticuerpo utilizado en la ELISA fue específico para grem-1, por lo cual no detectó el complejo grem-1/Bmp4. Se propone cuantificar grem-1 total, por medio del anticuerpo específico y el anticuerpo para el complejo. Además, cuantificar si hay un incremento en la traducción y transcripción del gen de grem-1.

Con los resultados obtenidos no se alcanza a responder como participa grem-1 en la neurogénesis, sin embargo, se puede esbozar un modelo biológico de su participación. Se propone que las células granulares de la zona granular del GD son las que secretan grem-1 a la matriz extracelular, por lo cual se contribuye a la generación del microambiente neurogénico. A su vez grem-1 en su forma secretada interactúa con BMP-2, -4, también presentes en la matriz extracelular, promoviendo la proliferación de las células troncales en la zona subgranular del giro dentado.

Dado lo anterior, surgen preguntas específicas que ayudarán a resolver esta interrogante. Una pregunta de interés es conocer la dinámica de grem-1 ya que sólo se analizó un punto en el proceso. Además, comprobar si grem-1 es parte de la vía de transducción de señales que permite la proliferación de las células troncales a través de la inhibición de Bmp. Para esto se propone buscar el complejo grem-1/Bmp2,-4. Esto ayudará a responder la ambigüedad del contraste de los análisis de correlación. Para conocer si la proliferación de las células troncales depende del complejo grem-1/Bmp2,-4 se propone hacer análisis de regresión o correlación lineal. Por último, es de interés saber si la administración exógena de grem-1 en el giro dentado tiene un efecto directo sobre la neurogénesis. Resolver estas preguntas permitirá llenar lagunas de los factores moleculares sobre la regulación de la neurogénesis.

## **Conclusiones**

Los resultados mostraron que la proteína grem-1 se encuentra presente en el microambiente neurogénico del giro dentado en ratones adultos. Se encontró una disminución de los niveles de grem-1 bajo condiciones proneurogénicas, por lo cual se concluye que grem-1 participa en la regulación de la neurogénesis. Sin embargo, nuestros resultados no son resolutivos para indicar el mecanismo de acción ni en qué fase de la neurogénesis participa. Pero dan pie a que se continúe con la investigación de la participación de la proteína grem-1 en la neurogénesis.

## Referencias Bibliográficas

- 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)
- Arendash, G. W., Garcia, M. F., Costa, D. A., Cracchiolo, J. R., Wefes, I. M., & Potter, H. (2004). Environmental enrichment improves cognition in aged Alzheimer's transgenic mice despite stable  $\beta$ -amyloid deposition. *NeuroReport*, 15(11), 1751–1754. <https://doi.org/10.1097/01.wnr.0000137183.68847.4e>
- Beauquis, J., Roig, P., de Nicola, A. F., & Saravia, F. (2010). Short-term environmental enrichment enhances adult neurogenesis, vascular network and dendritic complexity in the hippocampus of type 1 diabetic mice. *PLoS ONE*, 5(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013993>
- Bird, A. D., & Cuntz, H. (2019). Dissecting Sholl Analysis into Its Functional Components. *Cell Reports*, 27(10), 3081–3096.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.04.097>
- Bonaguidi, M. A., Peng, C.-Y., McGuire, T., Falciglia, G., Gobeske, K. T., Czeisler, C., & Kessler, J. A. (2008). Noggin Expands Neural Stem Cells in the Adult Hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 28(37), 9194–9204. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3314-07.2008>
- Brooker, S. M., Gobeske, K. T., Chen, J., Peng, C.-Y., & Kessler, J. A. (2017). Hippocampal bone morphogenetic protein signaling mediates behavioral effects of antidepressant treatment. *Molecular Psychiatry*, 22(6), 910–919. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.160>
- Brown, J., Cooper-Kuhn, C. M., Kempermann, G., Van Praag, H., Winkler, J., Gage, F. H., & Kuhn, H. G. (2003). Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis. *European Journal of Neuroscience*, 17(10), 2042–2046. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02647.x>
- Bruel-Jungerman, E., Laroche, S., & Rampon, C. (2005). New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. *European Journal of Neuroscience*, 21(2), 513–521. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.03875.x>
- Christie, B. R., Eadie, B. D., Kannangara, T. S., Robillard, J. M., Shin, J., & Titterness, A. K. (2008). Exercising our brains: How physical activity impacts synaptic plasticity in the dentate gyrus. *NeuroMolecular Medicine*, 10(2), 47–58. <https://doi.org/10.1007/s12017-008-8033-2>
- Clemenson, G. D., Deng, W., & Gage, F. H. (2015). Environmental enrichment and neurogenesis: From mice to humans. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 4, 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2015.02.005>
- Couillard-despres, S., Winner, B., Schaubeck, S., Aigner, R., Vroemen, M., Kuhn, H., Bogdahn, U. (2005). Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. 21, 1–14. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03813.x>

- Curlik, D. M., & Shors, T. J. (2013). Training your brain: Do mental and physical (MAP) training enhance cognition through the process of neurogenesis in the hippocampus? *Neuropharmacology*, 64, 506–514. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.07.027>
- David, J., Denis, Benjamin Adam Samuels, Quentin Rainer, Jing-Wen Wang, Douglas Marsteller, Indira Mendez, Michael Drew, Douglas A. Craig, Bruno P. Guiard, Jean-Philippe Guilloux, Roman P. Artymyshyn, Alain M Gardier, Christophe Gerald, Irina A. Antonijevic, E. David Leonardo, and René Hen. (2009). Behavior effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression are mediated by both neurogenesis-dependent and independent mechanisms. *Neuron*. 62(4): 479–493. <https://doi:10.1016/j.neuron.2009.04.017>.
- 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>
- Duman, C. H., Schlesinger, L., Russell, D. S., & Duman, R. S. (2008). Voluntary exercise produces antidepressant and anxiolytic behavioral effects in mice. *Brain Research*, 1199, 148–158. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.12.047>
- Encinas, J. M., Vaahtokari, A., & Enikolopov, G. (2006). Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(21), 8233–8238. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601992103>
- Fabel, K., Wolf, S. A., Ehninger, D., Babu, H., Leal-Galicia, P., & Kempermann, G. (2009). Additive effects of physical exercise and environmental enrichment on adult hippocampal neurogenesis in mice. *Frontiers in Neuroscience*, 3(NOV), 1–7. <https://doi.org/10.3389/neuro.22.002.2009>
- Fanselow, M. S., & Dong, H. W. (2010). Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures? *Neuron*, 65(1), 7–19. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.11.031>
- Frick, K. M., & Fernandez, S. M. (2003). Enrichment enhances spatial memory and increases synaptophysin levels in aged female mice. *Neurobiology of Aging*, 24(4), 615–626. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(02\)00138-0](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(02)00138-0)
- Fuss, J., Ben Abdallah, N. M. B., Vogt, M. A., Touma, C., Pacifici, P. G., Palme, R., ... Gass, P. (2010). Voluntary exercise induces anxiety-like behavior in adult C57BL/6J mice correlating with hippocampal neurogenesis. *Hippocampus*, 20(3), 364–376. <https://doi.org/10.1002/hipo.20634>
- Garcia-Segura, L. M., & Perez-Marquez, J. (2014). A new mathematical function to evaluate neuronal morphology using the Sholl analysis. *Journal of Neuroscience Methods*, 226, 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2014.01.016>
- Goldman, S. A. (2001). Neural progenitor cells of the adult human brain. In M. S. Rao (Ed.), *Stem cells and CNS development* (1st ed., pp. 177–206). Human Press.

- Gomes, W. A., Mehler, M. F., & Kessler, J. A. (2003). Transgenic overexpression of Bmp4 increases astroglial and decreases oligodendroglial lineage commitment. *Developmental Biology*, 255(1), 164–177. [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(02\)00037-4](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(02)00037-4)
- Gross, R. E., Mehler, M. F., Mabie, P. C., Zang, Z., Santschi, L., & Kessler, J. A. (1996). Bone morphogenetic proteins promote astroglial lineage commitment by mammalian subventricular zone progenitor cells. *Neuron*, 17(4), 595–606. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80193-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80193-2)
- Haukvik, U. K., Tamnes, C. K., Söderman, E., & Agartz, I. (2018). Neuroimaging hippocampal subfields in schizophrenia and bipolar disorder: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Psychiatric Research*, 104(August), 217–226. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2018.08.012>
- Hernández-Cruz, V. C. (2018). Participación de la proteína gremlina-1 en el proceso neurogénico del giro dentado del hipocampo del cerebro adulto. UNAM.
- Hevner, R. F. (2016). Evolution of the mammalian dentate gyrus. *Journal of Comparative Neurology*, 524(3), 578–594. <https://doi.org/10.1002/cne.23851>
- Hsu, D. R., Economides, A. N., Wang, X., Eimon, P. M., & Harland, R. M. (1998). The *Xenopus* dorsalizing factor Gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize Bmp activities. *Molecular Cell*, 1(5), 673–683. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80067-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80067-2)
- Jacobs, B., van Praag, H., & Gage, F. (2000). Adult brain neurogenesis and psychiatry a no. *Mol Psychiatry*, May(5(3)), 262–269.
- Ji, C., Huang, J., Xu, Q., Zhang, J., Lin, M., Tu, Y., He, L., Bi, Z., & Cheng, B. (2016). Gremlin inhibits UV-induced skin cell damages via activating VEGFR2-Nrf2 signaling. *Oncotarget*, 7(51), 84748–84757. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12454>
- Jin, X. (2016). The role of neurogenesis during development and in the adult brain. *European Journal of Neuroscience*, 44(6), 2291–2299. <https://doi.org/10.1111/ejn.13251>
- Kee, N., Sivalingam, S., Boonstra, R., & Wojtowicz, J. M. (2002). The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *Journal of Neuroscience Methods*, 115(1), 97–105. [https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(02\)00007-9](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(02)00007-9)
- Kempermann, G., Kuhn, H. G., & Gage, F. H. (1997). Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(19), 10409–10414. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.19.10409>
- Kempermann, G., Kuhn, H. G., & Gage, F. H. (1998). Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *Journal of Neuroscience*, 18(9), 3206–3212. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.18-09-03206.1998>
- Kempermann, G., Gast, D., & Gage, F. H. (2002). Neuroplasticity in old age: Sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. *Annals of*

Neurology, 52(2), 135–143. <https://doi.org/10.1002/ana.10262>

- Kempermann, G., Jessberger, S., Steiner, B., & Kronenberg, G. (2004). Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends in Neurosciences*, 27(8), 447–452. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.05.013>
- Kim, M., Yoon, S., Lee, S., Ha, S. A., Kim, H. K., Kim, J. W., & Chung, J. (2012). Gremlin-1 induces Bmp-independent tumor cell proliferation, migration, and invasion. *PLoS ONE*, 7(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035100>
- Kim, J. W., Nam, S. M., Yoo, D. Y., Jung, H. Y., Hwang, I. K., Seong, J. K., & Yoon, Y. S. (2018). Strain-specific differential expression of astrocytes and microglia in the mouse hippocampus. *Brain and Behavior*, 8(5), 1–13. <https://doi.org/10.1002/brb3.961>
- Kjelstrup, K. B., Solstad, T., Brun, V. H., Hafting, T., Leutgeb, S., Witter, M. P., Moser, M. B. (2008). Finite scale of spatial representation in the hippocampus. *Science*, 321(5885), 140–143. <https://doi.org/10.1126/science.1157086>
- Koli, K., Sutinen, E., Rönty, M., Rantakari, P., Fortino, V., Pulkkinen, V., Greco, D., Sipilä, P., & Myllärniemi, M. (2016). Gremlin-1 Overexpression in Mouse Lung Reduces Silica-Induced Lymphocyte Recruitment - A Link to Idiopathic Pulmonary Fibrosis through Negative Correlation with CXCL10 Chemokine. *PloS One*, 11(7), e0159010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159010>
- 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. *Journal of Comparative Neurology*, 467(4), 455–463. <https://doi.org/10.1002/cne.10945>
- Kronenberg, G., Bick-Sander, A., Bunk, E., Wolf, C., Ehninger, D., & Kempermann, G. (2006). Physical exercise prevents age-related decline in precursor cell activity in the mouse dentate gyrus. *Neurobiology of Aging*, 27(10), 1505–1513. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.09.016>
- Kuhn, H. G., Winkler, J., Kempermann, G., Thal, L. J., & Gage, F. H. (1997). Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *Journal of Neuroscience*, 17(15), 5820–5829. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.17-15-05820.1997>
- Lafenêtre, P., Leske, O., Ma-Högemeie, Z., Haghikia, A., Bichler, Z., Wahle, P., & Heumann, R. (2010). Exercise can rescue recognition memory impairment in a model with reduced adult hippocampal neurogenesis. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 3(FEB), 1–9. <https://doi.org/10.3389/neuro.08.034.2009>
- Liu, Y., Chen, Z., Cheng, H., Chen, J., & Qian, J. (2016). Gremlin promotes retinal pigmentation epithelial (RPE) cell proliferation, migration and VEGF production via activating VEGFR2-Akt-mTORC2 signaling. *Oncotarget*, 8(1), 979–987.

- Llorens-Martín, M. V., Rueda, N., Martínez-Cué, C., Torres-Alemán, I., Flórez, J., & Trejo, J. L. (2007). Both increases in immature dentate neuron number and decreases of immobility time in the forced swim test occurred in parallel after environmental enrichment of mice. *Neuroscience*, 147(3), 631–638. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.04.054>
- Marlatt, W., Michael, Michelle C. Potter, Paul J. Lucassen, Henriette van Praag.(2012) Running throughout middle-age improves memory function, hippocampal neurogenesis, and BDNF levels in female C57BL/6J mice. *Neurobiology*, 72(6), <https://doi.org/10.1002/dneu.22009>.
- Matzen, J., Buchheim, K., van Landeghem, F. K. H., Meierkord, H., & Holtkamp, M. (2008). Functional and morphological changes in the dentate gyrus after experimental status epilepticus. *Seizure*, 17(1), 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2007.07.008>
- Mikawa, S., & Sato, K. (2014). Noggin expression in the adult rat brain. *Neuroscience*, 258, 16–33. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.11.006>
- Mira, H., Andreu, Z., Suh, H., Chichung Lie, D., Jessberger, S., Consiglio, A., Emeterio, J. S., Hortigüela, R., Marqués-Torrejón, M. Á., Nakashima, K., Colak, D., Götz, M., Fariñas, I., & 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. <http://doi.org/10.1016/j.stem.2010.04.016>
- Moreno-Jiménez, E. P., Jurado-Arjona, J., Avila, J., & Martín, M. L. (2019). The social component of environmental enrichment is a pro-neurogenic stimulus in adult c57BL6 female mice. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7(APR), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00062>
- Moslehi, M., Ng, D. C. H., & Bogoyevitch, M. A. (2019). Doublecortin X (Dcx) serine 28 phosphorylation is a regulatory switch, modulating association of Dcx with microtubules and actin filaments. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1866(4), 638–649. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2019.01.003>
- Muncie, J. M., & Weaver, V. M. (2018). The Physical and Biochemical Properties of the Extracellular Matrix Regulate Cell Fate. In *Current Topics in Developmental Biology* (1st ed., Vol. 130). ElsevierInc. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2018.02.002>
- Nandi, S., Karina, A., Pablo, L., Pablo, C., & Jean, H. (2018). Neurotrophin and FGF signaling adapter proteins, FRS2 and FRS3, regulate dentate granule cell maturation and excitatory synaptogenesis. *Physiology & Behavior*, 176(1), 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.11.017>.
- Olivares-Hernández, J. D. (2014). Efecto de la administración intracerebro ventricular de la hormona de crecimiento sobre la supervivencia celular del giro dentado del hipocampo de ratas adultas. Universidad Veracruzana.
- Ormerod, B. K., Lee, T. T. Y., & Galea, L. A. M. (2003). Estradiol initially enhances but subsequently suppresses (via adrenal steroids) granule cell proliferation in the dentate gyrus of adult female rats. *Journal of Neurobiology*, 55(2), 247–260. <https://doi.org/10.1002/neu.10181>

- Peter J. Clark, Rachel A. Kohman, Daniel S. Miller, Tushar K. Bhattacharya, Erik H. Haferkamp, and J. S. R. (2010). Adult hippocampal neurogenesis and c-Fos induction during escalation of voluntary wheel running in C57BL/6J mice. *Behavioural Brain Research*, 213(1), 1-246–2527. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.05.007>.Adult
- Petrovich, G. D., Canteras, N. S., & Swanson, L. W. (2001). Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. *Brain Research Reviews*, 38(1–2), 247–289. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(01\)00080-7](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(01)00080-7)
- Phani, S., Jablonski, M., Pelta-Heller, J., Cai, J., & Iacovitti, L. (2013). Gremlin is a novel VTA derived neuroprotective factor for dopamine neurons. *Brain Research*, 1500, 88–98. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.01.017>
- Pinar, C., Yau, S., Sharp, Z., Shamei, A., Fontaine, C. J., Meconi, A. L., Christie, B. R. (2018). Effects of Voluntary Exercise on Cell Proliferation and Neurogenesis in the Dentate Gyrus of Adult FMR1 Knockout Mice. *Brain Plasticity*, 4(2), 185–195. <https://doi.org/10.3233/bpl-170052>
- Plümpe, T., Ehninger, D., Steiner, B., Klempin, F., Jessberger, S., Brandt, M., Kempermann, G. (2006). Variability of doublecortin-associated dendrite maturation in adult hippocampal neurogenesis is independent of the regulation of precursor cell proliferation. *BMC Neuroscience*, 7, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-7-77>
- Ramírez, G., Silva, C., Gómez, L., Ortiz, L., Torres, M. O., & Meraz, M. A. (2013). Las zonas neurogénicas en el adulto y su relación con las enfermedades neuropsiquiátricas. *Artículo Original Salud Mental*, 3636(3), 201–210. <https://doi.org/10.17711/SM.0185-3325.2013.026>
- Ramírez-Rodríguez, G., Laguna-Chimal, J., Vega-Rivera, N. M., Ortiz-López, L., Méndez-Cuesta, L., Estrada-Camarena, E. M., & Babu, H. (2011). Los fármacos antidepresivos como reguladores de la neurogénesis hipocámpica de roedores y humanos adultos. *Salud Mental*, 34(6), 497–506.
- Rodríguez-Sáez, S. (2012). Activación de la neurogénesisen el hipocampo de ratón adulto por factores embrionarios. (UVA; Vol. 33). <https://doi.org/10.1073/pnas.0703993104>
- Robert J. Wordingera, Gulab Zodea, and Abbot F. Clarka. (2009). Focus on molecules:Grem1. 87(2), 78–79. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2007.11.016>.Focus
- Rodrigues-Diez, R., Rodrigues-Diez, R. R., Lavoiz, C., Carvajal, G., Droguett, A., Garcia-Redondo, A. B., Rodriguez, I., Ortiz, A., Egido, J., Mezzano, S., & Ruiz-Ortega, M. (2014). Gremlin Activates the Smad Pathway Linked to Epithelial Mesenchymal Transdifferentiation in Cultured Tubular Epithelial Cells. *BioMed Research International*, 2014, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2014/802841>
- Rodríguez-Sáez, S. (2012). Activación de la neurogénesisen el hipocampo de ratón adulto por factores embrionarios. (Vol. 33) [UVA]. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703993104>



- Sebald, W., Nickel, O., Seher, A., & Müller, T. D. (2007). Bone Morphogenetic Proteins. *Handbook of Biomineralization: Biological Aspects and Structure Formation*, 3, 19–33. <https://doi.org/10.1002/9783527619443.ch46>
- Schloesser, R. J., Lehmann, M., Martinowich, K., Manji, H. K., & Herkenham, M. (2010). Environmental enrichment requires adult neurogenesis to facilitate the recovery from psychosocial stress. *Molecular Psychiatry*, 15(12), 1152–1163. <https://doi.org/10.1038/mp.2010.34>
- Scoville, W. B., & Milner, B. (2000). Memory and the Medial Temporal Lobe: Patient H. M. Loss of Recent Memory After Bilateral Hippocampal Lesions. *Journal Of Neuropsychiatry*, 20(5026), 103–113.
- Steffenach, H. A., Witter, M., Moser, M. B., & Moser, E. I. (2005). Spatial memory in the rat requires the dorsolateral band of the entorhinal cortex. *Neuron*, 45(2), 301–313. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.12.044>
- Steiner, B., Zurborg, S., Hörster, H., Fabel, K., & Kempermann, G. (2008). Differential 24 h responsiveness of Prox1-expressing precursor cells in adult hippocampal neurogenesis to physical activity, environmental enrichment, and kainic acid-induced seizures. *Neuroscience*, 154(2), 521–529. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.04.023>
- Takagi, M., Nishiyama, Y., Taguchi, A., & Imamoto, N. (2014). Ki67 antigen contributes to the timely accumulation of protein phosphatase 1 $\gamma$  on anaphase chromosomes. *Journal of Biological Chemistry*, 289(33), 22877–22887. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.556647>
- Taleisnik, S. (2012). *Neurogénesis* (S. Taleisnik (ed.); 1st ed.). Encuentro grupo editor.
- Tanapat, P., Hastings, N. B., Reeves, A. J., & Gould, E. (1999). Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *Journal of Neuroscience*, 19(14), 5792–5801. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-14-05792.1999>
- Tanti, A., & Belzung, C. (2013). Neurogenesis along the septo-temporal axis of the hippocampus: Are depression and the action of antidepressants region-specific? *Neuroscience*, 252, 234–252. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.08.017>
- Tanti, A., Westphal, W. P., Girault, V., Brizard, B., Devers, S., Leguisquet, A. M., Belzung, C. (2013). Region-dependent and stage-specific effects of stress, environmental enrichment, and antidepressant treatment on hippocampal neurogenesis. *Hippocampus*, 23(9), 797–811. <https://doi.org/10.1002/hipo.22134>
- Van Praag, H., Kempermann, G., & Gage, F. H. (1999). Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature Neuroscience*, 2(3), 266–270. <https://doi.org/10.1038/6368>

- Vivar, C., Potter, M. C., Choi, J., Lee, J. Y., Stringer, T. P., Callaway, E. M., Gage, F. H., Suh, H., & Van Praag, H. (2012). Monosynaptic inputs to new neurons in the dentate gyrus. *Nature Communications*, 3(May), 1107–1111. <https://doi.org/10.1038/ncomms2101>
- Vivar C., P. M. and V. P. H. (2012). All About Running: Synaptic Plasticity, Growth Factors and Adult Hippocampal Neurogenesis. In *Curr Topics Behav Neurosciences* (pp. 189–210). <https://doi.org/10.1007/7854>
- Wang, G., Zhang, H., Zhao, Y., Li, J., Cai, J., Wang, P., Meng, S., Feng, J., Miao, C., Ding, M., Li, D., & Deng, H. (2005). Noggin and bFGF cooperate to maintain the pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 330(3), 934–942. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.03.058>
- Wang, J. W., David, D. J., Monckton, J. E., Battaglia, F., & Hen, R. (2008). Chronic fluoxetine stimulates maturation and synaptic plasticity of adult-born hippocampal granule cells. *Journal of Neuroscience*, 28(6), 1374–1384. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3632-07.2008>
- Yan, K., Qiulian, W., H., Y. D., H., L. C., Nasiha, R., Isabel, T., Jennifer, D., F., K. M., B., H. A., & N., R. J. (2014). Glioma cancer stem cells secrete Gremlin1 to promote their maintenance within the tumor hierarchy. *Genes and Development*, 28, 1085–1100. <https://doi.org/10.1101/gad.235515.113>
- Zhu, J. de, Wang, J. jie, Ge, G., & Kang, C. sheng. (2017). Effects of Noggin-Transfected Neural Stem Cells on Neural Functional Recovery and Underlying Mechanism in Rats with Cerebral Ischemia Reperfusion Injury. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 26(7), 1547–1559. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2017.02.034>