



División de Ciencias Biológicas y de la Salud

**“El factor de transcripción CREB regula la actividad del promotor
del microRNA-7 en neuronas hipotalámicas embrionarias“**

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestra en Biología Experimental

PRESENTA

Lic. en Biol. Exp. Azucena Zavaleta Bahena

Comité Tutorial

Codirectoras:

Dra. Anabel Jiménez Anguiano

Dra. Leonor Pérez Martínez

Asesor:

Dr. Gustavo Pedraza Alva

23 de septiembre de-2016.

“El programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”.

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 302014.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa

Fecha : 22/09/2016
Página : 1/1

CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO

La Universidad Autónoma Metropolitana extiende la presente CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO de MAESTRA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL de la alumna AZUCENA ZAVALA BAHENA, matrícula 2133801922, quien cumplió con los 176 créditos correspondientes a las unidades de enseñanza aprendizaje del plan de estudio. Con fecha veintitrés de septiembre del 2016 presentó la DEFENSA de su EXAMEN DE GRADO cuya denominación es:

El factor de transcripción CREB regula la actividad del promotor del microRNA-7 en neuronas hipotalámicas embrionarias

Cabe mencionar que la aprobación tiene un valor de 40 créditos y el programa consta de 216 créditos.

El jurado del examen ha tenido a bien otorgarle la calificación de:

Aprobada

JURADO

Presidenta

DRA. MINA KONIGSBERG FAINSTEIN

Secretaria

DRA. MARIA DE LOURDES ALVAREZ ARELLANO

Vocal

DR. EDMUNDO BONILLA GONZALEZ

Vocal

M. EN B. CAROLINA ABARCA CAMACHO

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Neuroinmunobiología del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) bajo la tutoría de la Dra. Leonor Pérez Martínez y con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (donativos 155290 y 154542) y de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA)-PAPIIT de la UNAM (donativos IN213316 y IN212316).

Así como del Área de Neurociencias del Departamento de Biología de la Reproducción de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM)-Iztapalapa con apoyo del proyecto # 1440725 bajo la tutoría de la Dra. Anabel Jiménez Anguiano.

Miembros del Comité Tutorial

Codirectora interna:

Dra. Anabel Jiménez Anguiano.

Área de Neurociencias. Depto. Biología de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Codirectora externa:

Dra. Leonor Pérez Martínez.

Laboratorio de Neuroinmunobiología. Depto. Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesor

Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva.

Laboratorio de Neuroinmunobiología. Depto. Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México

Dedicatoria

Este proyecto lo realice por amor a la ciencia, por las ganas de superación y aprender de los mejores investigadores.

Con la promesa que le hice a mi madre, la Señora Yolanda Bahena Cruz, quien confió en mi capacidad siempre y tenía la esperanza de que un día terminara una carrera.

Hoy el esfuerzo que ella y mi padre hicieron de salir de la comunidad en la sierra de Guerrero en que vivíamos por darnos una vida mejor valió la pena, porque superé las barreras impuestas y mi meta por ser una mejor persona está en proceso.

Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento y admiración a la Dra. Leonor Pérez Martínez, quien me recibió desde la licenciatura en su grupo de investigación, el laboratorio de Neuroinmunobiología del Instituto de Biotecnología de la UNAM y me permitió acercarme al mundo de la ciencia. Al Dr. Gustavo Pedraza por aportar siempre algo positivo a mi proyecto, a todos los integrantes del laboratorio por ser una familia, amigos y colegas, a Karla, Fabián, Angie, Elisa, Sol, Nilda, Martha, Tonali, Jimena, Laura, Jonathan, Tomás, César y los demás, así como al Técnico Oswaldo López por enseñarme y ayudarme en todo momento.

También a la Dra. Karla Fabiola Mesa Sosa por enseñarme el quehacer científico, por su tiempo y conocimientos transmitidos, de quien aprendí que el cielo es el límite, por su sonrisa cool.

A la Dra. Anabel Jiménez Anguiano por ser parte de este proyecto y conversaciones interminables derivadas de este, por tolerar mis 5 minutos de frustración y hacerme ver el lado bueno y malo de las cosas.

Al posgrado de Biología experimental por aceptarme y darme la oportunidad de aprender, al coordinador, los profesores y demás personal

A mis amigos de la UAM, con quienes compartí momentos de alegría, frustración y cansancio, a Karen, Marco, Mariana, Maribel, Gabriela, Abraham, Atzín, Itzel, Karina, gracias por su amistad.

Quiero agradecer a mi familia, a mi padre Efraín Zavaleta y mis hermanos Rubén, Eriberto, Angelina, Benjamín, Marisela, Guadalupe, David y Fernanda por su apoyo, por ser mi motivación y tener siempre una palabra para disminuir mi amargura.

Estoy agradecida con la vida por contar con mi esposo Alejandro Moran y mi hija de 8 meses Camila, con quienes aprendo algo nuevo cada día y me dan un motivo para sonreír pese a las adversidades.

Índice

ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	4
INTRODUCCIÓN.....	5
Desarrollo del Sistema Nervioso Central.....	5
Desarrollo del hipotálamo.....	7
Ortopedia.....	7
Sim 1 y Arnt2.....	8
Diferenciación neuronal.....	12
microRNAs.....	13
Biosíntesis de los microRNAs.....	14
El factor de transcripción CREB.....	17
Neurotrofinas.....	20
ANTECEDENTES.....	23
Los microRNAs en el desarrollo del SNC.....	23

JUSTIFICACIÓN	28
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	30
HIPÓTESIS.....	30
OBJETIVOS.....	31
General	31
Particulares	31
MATERIAL Y MÉTODOS.....	32
Predicción bioinformática de los sitios de unión para el promotor del microRNA-7 y de conservación.....	32
Línea celular	33
Clonación de los bloques del promotor del microRNA-7	33
Transfección de células en cultivo y ensayos de luciferasa	35
Análisis estadístico	36
RESULTADOS	37
Análisis bioinformático del promotor del microRNA-7.....	37
Conservación de los sitios de unión en el promotor del microRNA-7b	40
IL-4 no regula la actividad del promotor del microRNA-7b	41

CREB regula el promotor del microRNA-7	43
Las neurotrofinas BDNF y NGF regulan la actividad el promotor del microRNA-7b	45
Efecto de BDNF-CREB sobre el promotor del microRNA-7b	46
El dibutiril AMPc regula el promotor del microRNA-7b	48
DISCUSIÓN	50
CONCLUSIONES.....	55
PERSPECTIVAS	55
REFERENCIAS	56

ABREVIATURAS

Ago Argonauta

AgRP Péptido Relacionado con Agouti

Ak1 Adenilato ciclasa 1

AMPc Adenosin Monofosfato Cíclico

Arnt2 Traslocador nuclear del receptor de aril hidrocarburos 2

ATF-1 Factor de transcripción dependiente de AMPc-1

BDNF Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro

BHLH Hélice-asa-hélice-dominio básico

Ca Calcio

CO₂ Bióxido de carbono

CREB Elemento de respuesta a AMPc

CTN Células Troncales Neurales

dbAMPc Dibutiril AMPc

DGCR8 del inglés Di George syndrome critical region gene 8 protein

DNA Ácido Desoxirribonucleico

ERK Cinasa Regulada por Señales Extracelulares

GPCRs Receptores Acoplados a Proteínas G

GTP Guanosina Tri-Fosfato

HNRNPK Ribonucleoproteína heterogénea nuclear K

IL-4 Interleucina-4

Kb Kilobases

KLF4 del inglés Kruppel-like factor 4

MAPK Proteína Cinasa Activadas por Mitógenos

mL mililitros

ng nanogramos

NGF Factor de Crecimiento Nervioso

NPC Células Progenitoras Neurales

NPY Neuropeptido Y

NT Neurotrofina

OTP Ortopedia

pb pares de bases

PGSF1 Factor Específico de la Glándula Pituitaria 1

PKA Proteína Cinasa A

POMC Proopiomelanocortina

RISC Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA

RLU Unidades Relativas de Luciferasa

RNA Ácido Ribonucleico

SFB Suero Fetal Bovino

SNC Sistema Nervioso Central

SNP Sistema Nervioso Periférico

STAT6 Transductor de Señales y Activador de la Transcripción 6

TH Tirosina Hidroxilasa

TRK Receptor Tirosina Cinasa

α -MSH Hormona Estimulante de Melanocitos

μ L microlitros

RESUMEN

El cerebro humano contiene aproximadamente 100 billones de neuronas y 10 veces más el número de células gliales; tal número resulta de una compleja red molecular de regulación durante la proliferación de las células pluripotentes y el adecuado desarrollo hasta establecer los circuitos funcionales encargados de controlar las funciones más importantes para mantener la homeostasis del organismo, tales como la ingesta de alimento, el comportamiento sexual y la termoregulación, entre otros.

La complejidad del Sistema nervioso así como la gran diversidad de tipos celulares surge de la combinación de programas genéticos llevados a cabo por factores de transcripción en un grupo de Células Troncales Neurales (CTN). Por otro lado, el Sistema Nervioso Central (SNC) de mamíferos presenta una alta expresión de microRNAs, los cuales funcionan como importantes reguladores post-transcripcionales de la expresión génica en procesos como, proliferación, adquisición y mantenimiento de un fenotipo dado, entre muchos otros.

En este trabajo nos centramos en la regulación de un microRNA que se expresa de manera espacio-temporal en diferentes áreas del SNC, específicamente en el hipotálamo; el microRNA-7, que a su vez presenta un perfil de expresión diferencial en etapas cruciales de la neurogénesis hipotalámica y sugiere una participación en la diferenciación de las poblaciones neuronales. Por otro lado, la expresión de este microRNA al darse en etapas tempranas del desarrollo sugiere que puede estar bajo de señales neurogénicas, como son las neurotrofinas BDNF y NGF así como el factor de transcripción CREB

ABSTRACT

The human brain contains about 100 billion neurons and 10 times the number of glial cells; such number results from a complex molecular regulatory network for the proliferation of pluripotent cells and the proper development to establish responsible functional circuits to control the most important functions to maintain homeostasis in the body, such as food intake, sexual behavior, thermoregulation, among others.

The complexity of the nervous system as well as the wide variety of cell types arises from the combination of genetic programs carried out by transcription factors in a group of neural stem cells (NSC). On the other hand, the Central Nervous System (CNS) of mammals has a high expression of microRNAs, which function an important post-transcriptional regulators of gene expression in processes such as proliferation, acquisition and maintenance of a given phenotype, among many others.

In this paper we focus on the regulation of a microRNA that is expressed so spatiotemporal in different areas of the CNS, specifically in the hypothalamus; microRNA-7, at the same time presents a profile of differential expression in crucial stages of hypothalamic neurogenesis and suggests an involvement in the differentiation of neuronal populations. Furthermore, this microRNA expression that occurs in early development stages suggests that may be downstream of neurogenic signals, such as BDNF and neurotrophin NGF as well as the transcription factor CREB.

INTRODUCCIÓN

Desarrollo del Sistema Nervioso Central

El sistema nervioso (SN) comienza a desarrollarse en un estadio relativamente tardío de la embriogénesis, una vez que se ha generado el ectodermo, que da origen a los principales tejidos del SNC y periférico (SNP). Las células neuronales y gliales que lo conforman derivan de la capa de células ectodérmicas localizadas a lo largo de la línea media en la parte dorsal del embrión durante su estadio de gástrula. Según va adquiriendo propiedades neurales, esta capa ectodérmica forma la placa neural, que es un epitelio cilíndrico. Las células ectodérmicas que no siguen el programa neural de diferenciación forman parte de la epidermis de la piel. Poco después de formarse la placa neural ésta comienza a plegarse y a formar una estructura tubular, el llamado tubo neural, mediante un proceso denominado *neurulación*. La región caudal del tubo neural da origen a la médula espinal, mientras que la región rostral se convierte en el encéfalo, durante este estadio las células se dividen rápidamente. Además, la extensión de esta proliferación celular no es uniforme a lo largo del tubo neural; algunas regiones del epitelio neural se expanden a ritmos diferentes y comienzan a formar las diversas regiones especializadas del SNC maduro. Las proliferaciones celulares de la parte rostral del tubo neural inducen inicialmente la formación de tres vesículas cerebrales: el prosencéfalo, el mesencéfalo y el rombencéfalo (**Figura 1**) [1].

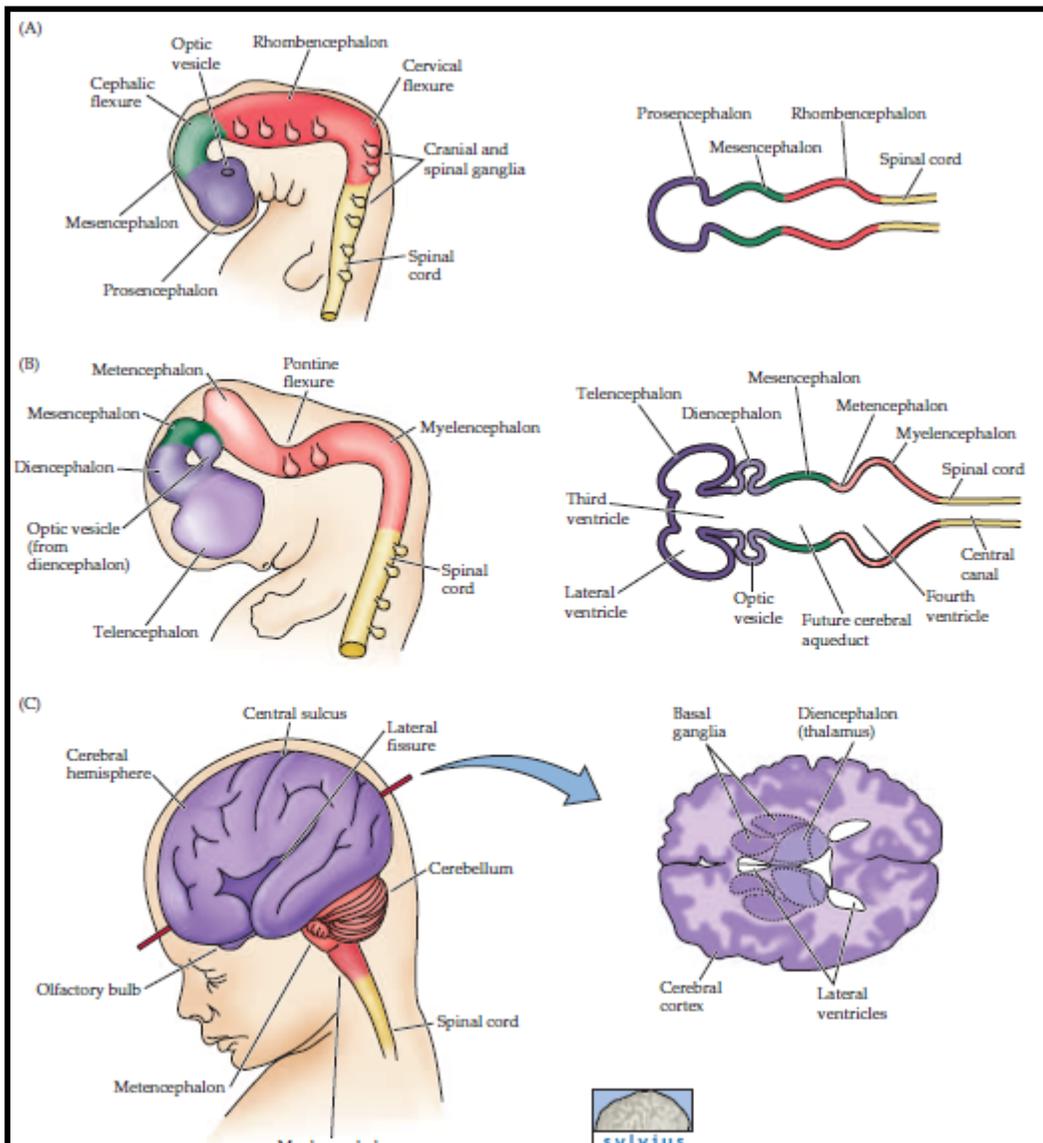


Figura 1. Especificación regional del desarrollo del Sistema Nervioso. (A) temprano en la gestación el tubo neural comienza a subdividirse en prosencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo. La médula espinal se diferencia a partir de la región posterior del tubo neural. (B) Además se distinguen el telencéfalo y diencefalo del prosencéfalo; otras dos divisiones-el metencéfalo y mielencéfalo-derivados del rombencéfalo. Estas subregiones dan lugar a los rudimentos de las mayores subdivisiones funcionales del sistema nervioso, mientras que los espacios entre estos eventualmente forman los ventrículos del cerebro maduro. (C) El cerebro fetal y la médula espinal claramente se diferencian al final del segundo trimestre. Varias subdivisiones incluyendo la corteza cerebral y cerebelo, son vistas desde la superficie lateral [50].

Desarrollo del hipotálamo

El hipotálamo es la estructura que regula la homeostasis en los animales, esto lo hace mediante la integración de señales sensoriales externas e internas, procesándolas y a continuación ejerciendo señales autónomas y liberando péptidos neuroendocrinos para mantener la homeostasis [2]. En vertebrados, el hipotálamo reside ventralmente al tálamo, dorsalmente a la glándula pituitaria anterior y está estructuralmente compuesto de varios núcleos de poblaciones celulares interconectadas. Cada núcleo contiene varios tipos neuronales y estos funcionan de una manera coordinada dentro y entre núcleos para regular las funciones fisiológicas tales como: el metabolismo, el equilibrio hídrico, la saciedad, la función reproductiva, el ritmo circadiano, así como las respuestas emocionales [2], [3]. El hipotálamo al contener compartimentos anatómicos y sus diversas poblaciones de células neuronales establecen una elaborada conectividad con todas las partes del SN, por lo cual es importante determinar el mecanismo que dirige el desarrollo de sus núcleos así como la especificación de las poblaciones neuronales que lo habitan. A continuación se describen los factores de transcripción que regulan el desarrollo del hipotálamo.

Ortopedia

Ortopedia (Otp) es un factor de transcripción conservado evolutivamente en vertebrados y a su vez se expresa en dominios hipotalámicos conservados [4]–[6], donde tiene un papel importante en la diferenciación de núcleos neurosecretorios incluyendo el núcleo periventricular anterior, paraventricular, supraóptico, arcuato y

ventromedial [7]–[9]. Se ha demostrado que Otp es esencial para el desarrollo de neuronas dopaminérgicas del diencéfalo en pez cebra y ratón. En pez cebra, los embriones carentes de Otp están desprovistos de neuronas dopaminérgicas en el hipotálamo y el tubérculo posterior mientras que su sobreexpresión induce la expresión ectópica de marcadores dopaminérgicos como Tirosina Hidroxilasa (TH) y transportadores de dopamina, indicando que Otp puede instruir la identidad dopaminérgica [10], [11] (Figura 2). En ratón, el mutante homocigoto para Otp muere después del nacimiento y muestra un deterioro progresivo de eventos de desarrollo neuroendocrino fundamental como la disminución de la proliferación celular, migración celular anormal y falla en la diferenciación terminal de neuronas de los núcleos paraventricular, supraóptico y arcuato [7]. Otp contribuye con el establecimiento del patrón del hipotálamo y la región preóptica, además de ser requerido para la diferenciación de células que expresan Oxitocina, Arginina Vasopresina, Hormona liberadora de Corticotropina y Somatostatina [7], [12].

Sim 1 y Arnt2

Estos factores de transcripción pertenecen a la familia de factores de transcripción tipo Hélice-asa hélice- básico (bHLH, por sus siglas en inglés). Estudios en pez cebra y ratón muestran que el complejo heterodimérico formado por Sim1-Arnt2 regula la diferenciación hipotalámica *in vivo* [13], [14]. En ratón, la carencia de Sim 1 y Arnt2 provoca la muerte después del nacimiento debido a la ausencia del núcleo anterior periventricular, paraventricular y arcuato, similar al fenotipo del ratón nulo para Otp [15], [16]. Sin embargo, el ratón nulo para Otp muestra un decremento de casi 30%

en el tamaño cerebral [12], mientras la ausencia de Sim1, Sim2 y Arnt2 muestra deterioro en el desarrollo que se correlaciona con la deficiencia en la migración y diferenciación neuronal [15], [17].

Sim1, Arnt2 y Otp funcionan a lo largo de vías paralelas, se requieren para la expresión de Sim2 en el núcleo periventricular para la diferenciación de neuronas que secretan la hormona liberadora de tirotrópina y en el núcleo anterior periventricular para la diferenciación de neuronas que secretan somatostatina. En el núcleo periventricular y supraóptico, estos factores de transcripción son requeridos para el mantenimiento de la expresión de Brn2, un dominio POU necesario para el desarrollo de neuronas productoras de Oxitocina, Arginina vasopresina y Hormona liberadora de corticotropina [12], [17]

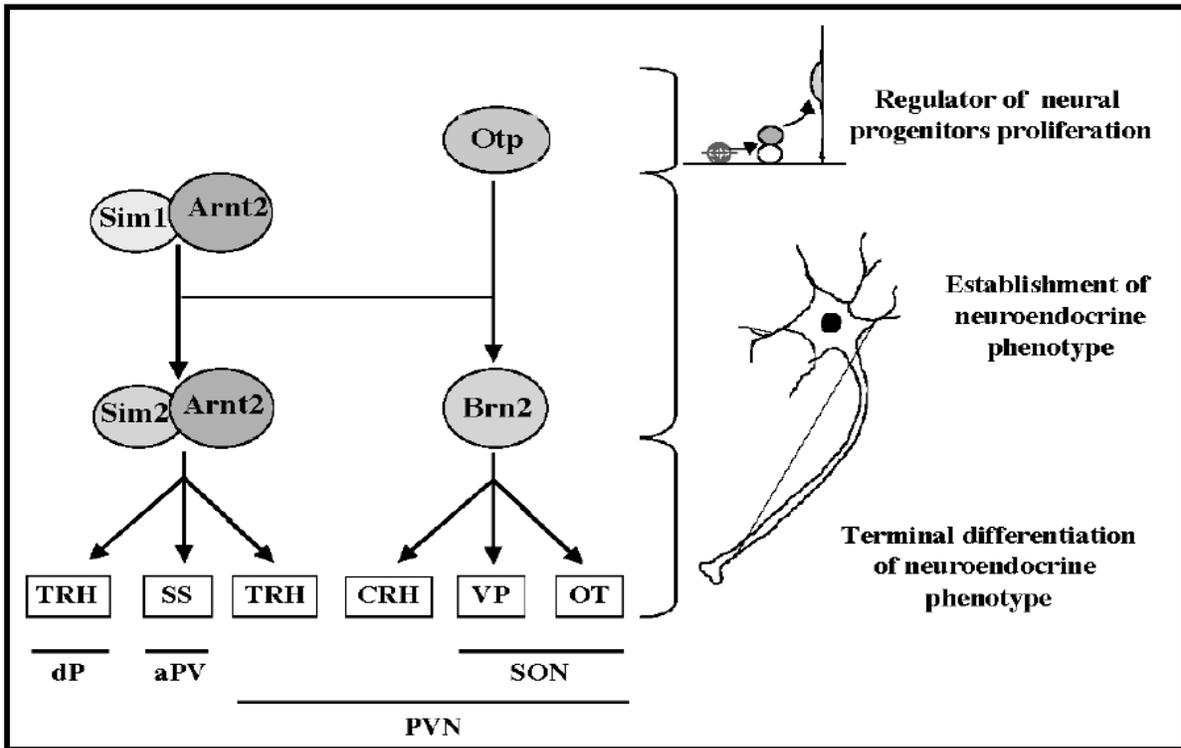


Figura 2. Factores de transcripción reguladores del desarrollo de fenotipos neuroendocrinos hipotalámicos. Este modelo está basado en el fenotipo de ratón "Knock-out" para los factores de transcripción. dp: área preóptica dorsal, aPV: Periventricular anterior, PVN: Núcleo Paraventricular, SON: Núcleo Supraóptico [126].

La formación de los núcleos hipotalámicos está organizada por la generación y migración de neuronas específicas. Estudios genéticos muestran que la delección de genes lleva a defectos en la neurogénesis y a su vez afecta las distintas funciones hipotalámicas, resultando en cambios fisiológicos y de comportamiento (**Tabla 1**) [18].

A continuación se hace una breve descripción de los factores que participan en la formación del hipotálamo y su fisiología.

Gen y su mutación	Fenotipo desarrollado	Consecuencia funcional	Referencias
Delección de Mash1	Falla en la neurogénesis del núcleo ARC y VMN	Desconocido	(McNay et al. 2006; Sommer et al. 1995; Yi et al. 2008)
Delección de Otp	Falla en la formación del núcleo aPV/PVN/SON	Disrupción en la respuesta al estrés	(Wang & Lufkin 2000; Acampora et al. 1999; Blechman et al. 2007; Amir-Zilberstein et al. 2012)
Delección heterocigoto de Sim 1	Reducción de Oxitocina	Obesidad	(Kublaoui et al. 2008; Tolson & Wang 2010; Michaud 2001)
Delección de Ngn3	Decremento en neuronas que expresan POMC y SF-1 y aumento de células NPY	Obesidad	(Pelling et al. 2011; Anthwal et al. 2013)
Delección de Nhlh2	Disrupción en la migración de células GnRH	Infertilidad	Good et al 1997; Good et al 2013
Delección de SF-1	Falla en la formación de VMN	Obesidad y ansiedad	(Luo et al. 1995; Kim et al. 2009; Zhao et al. 2004; Kim et al. 2011; Zhao et al. 2008)
Delección de Lhx1	Disrupción en la producción de neuropéptidos AVP, Vip y Grp	Disrupción en el ritmo circadiano	(Bedont et al. 2014)

Tabla 1. Papel de genes del desarrollo en la formación del hipotálamo y su fisiología.

Ngn3: Neurogenina3, POMC: Proopiomelanocortina, SF-1: Factor Esteroidogénico, NPY: Neuropeptido Y, GnRH: Hormona Liberadora de Hormona del Crecimiento, VMN: Núcleo Ventromedial, AVP: Arginina Vasopresina, VIP: Péptido Intestinal Vasoactivo, Grp: Péptido Liberador de Gastrina [18].

Adicionalmente, la neurogénesis hipotalámica en ratón ocurre entre los días embrionarios 10.5-18.5, cuando las nuevas células generadas por la expansión del nicho de células precursoras neurales (NPC por sus siglas en inglés) delinean dos zonas ventriculares proliferativas distintas; la parte media y la ventral de la pared del tercer ventrículo [19].

La expresión de diferentes factores de transcripción es inducida por un conjunto intrincado de morfógenos, que actúan de manera espacio temporal, lo que confiere una identidad espacial intrínseca a las células progenitoras hipotalámicas.

Diferenciación neuronal

La identidad de un neuropéptido o neurotransmisor que una neurona sintetizará como molécula de señalización química y sus estructuras de destino se determinan durante la fase terminal del proceso de diferenciación. Este proceso es regulado por factores epigenéticos que eventualmente llevan a la inducción de factores genéticos (por ejemplo, factores de transcripción). El desarrollo del SN es influenciado por señales extracelulares. Señales ambientales de factores de crecimiento, matriz extracelular, neurotrofinas, hormonas y neurotransmisores regulan la diferenciación a múltiples niveles: control del ciclo celular de los precursores neurales, migración, sinaptogénesis, sobrevivencia neuronal y fenotipo neurotransmisor [20].

Durante el desarrollo embrionario, la neurogénesis consiste en la generación de neuronas a partir de CTN, desde su proliferación, compromiso neuronal, migración, diferenciación y formación de circuitos funcionales [21], [22].

Por otro lado, las CTN poseen dos características; la autorenovación y multipotencia, la autorenovación consiste en divisiones celulares simétricas, donde se generan dos células hijas con el mismo destino y por otro lado la multipotencia se debe a divisiones asimétricas, donde se genera una célula hija idéntica a la célula troncal y una segunda que es diferente. Durante el desarrollo, las células neuroepiteliales,

consideradas como células troncales, sufren divisiones simétricas, divisiones proliferativas, para generar dos células hijas idénticas a la que les dio origen. Estas divisiones son seguidas por divisiones asimétricas para su autorenovación, donde se genera una célula hija mas diferenciada como una célula progenitora o una neurona. Las células progenitora sufren divisiones asimétricas, divisiones diferenciadas, que generan dos neuronas, células posmitóticas diferenciadas terminalmente [23].

La identidad de los diferentes tipos de células neuronales es determinada por la expresión combinada de factores de transcripción, como ya se mencionó y modulados a su vez por otros reguladores de la expresión génica, incluidos los microRNAs. De este modo los microRNAs pueden controlar interruptores genéticos y regular así la expresión de determinantes del destino celular de una manera espacio-temporal.

microRNAs

Los microRNAs son una clase de RNAs pequeños no codificantes de aproximadamente 22 nucleótidos que regulan la expresión de genes de una gran variedad de organismos por medio del apareamiento de bases con uno o más RNAs mensajeros. Su número aún no ha sido determinado, pero la base de datos miRbase reporta 1527 microRNAs en el genoma humano, 741 en ratón y 408 en rata. Aproximadamente el 70% se expresan en el SNC[24], [25] y se estima que regulan más del 60% de genes que participan a su vez en la regulación de procesos como proliferación celular, diferenciación, apoptosis y migración, muchos de estos

importantes durante el desarrollo embrionario temprano así como del SNC [24], [26]–[28].

Biosíntesis de los microRNAs

La biosíntesis de los microRNAs es un proceso que comienza en el núcleo y termina en el citoplasma, donde realiza su función (**Figura 3**). En la vía canónica, los genes de los microRNAs se transcriben por la polimerasa II, la cual produce una molécula larga de RNA de aproximadamente 1kb de longitud, conocida como microRNA primario (pri-miRNA), el cual forma una estructura tipo tallo-asa que es cortada en el núcleo por una RNasa de tipo III, conocida como Drosha, en asociación con DGCR8 en mamíferos, mientras que en *Drosophila melanogaster* y *C. elegans* se asocia con Pasha [29], [30]. Drosha corta asimétricamente ambas cadenas en los sitios cercanos a la base de la estructura primaria en forma de horquilla, produciendo un pre-miRNA de entre 60 y 70 nucleótidos de longitud [30]. El pre-miRNA es exportado al citoplasma de manera activa a través de la exportina 5 en un proceso dependiente de Guanosina Trifosfato (GTP). Una vez en el citoplasma, el pre-miRNA se libera del complejo y la molécula es cortada por otra RNasa tipo III llamada Dicer [31]. Dicer corta la estructura de tallo-asa dando origen a un dúplex de RNA de entre 18 y 23 nucleótidos, que se considera el miRNA maduro, mientras que la otra cadena es degradada. Una vez formado el dúplex se recluta al Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA (RISC por sus siglas en inglés) el cual contiene diversas proteínas dentro de las cuales se encuentra Argonauta (Ago), quien tiene actividad helicasa y

separa las cadenas del dúplex, seleccionando aquella que posee el extremo 5' menos estable termodinámicamente hablando para que sea el miRNA maduro.

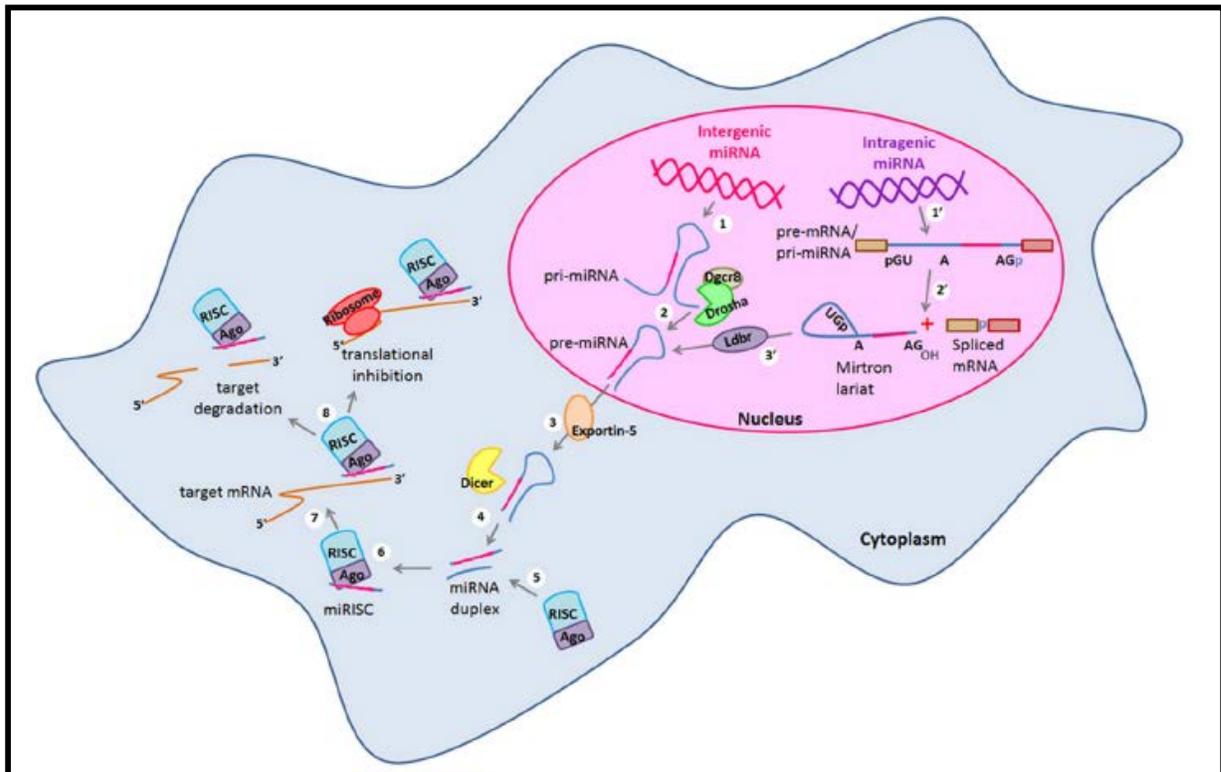


Figura 3. Biogénesis canónica y no canónica de los miRNAs. La biogénesis de los microRNAs (miRNAs) intergénicos comienza con 1) transcripción de los genes por la polimerasa II para generar transcritos largos conocidos como miRNAs primarios (pri-miRNAs) el cual es 2) procesado por el complejo microprocesador formado por Drosha y Dgcr8 en el núcleo, generando un miRNA precursor (pre-miRNA). Por otro lado, los microRNAs intragénicos también son 1) transcritos como parte del pre-mRNA de una serie de genes que codifican proteínas los cuales son 2) empalmados por la maquinaria de empalme alternativo dando lugar al mRNA empalmado y al mirtron que contiene el futuro miRNA. Después de esto, el mirtron es 3) procesado por la enzima Ldbr y finalmente el pre-miRNA es generado. En este punto convergen las dos vías 3) el pre-miRNA es transportado al citosol por la exportina 5 para ser 4) procesado por la RNasa tipo III. Después de eso, 5) una de las hebras del miRNA dúplex (miRNA maduro) recluta al complejo RISC, 6) el miRNA maduro es llevado al RISC formando el miRISC, 7) miRNA es guiado por RISC hacia su RNAm diana y unido a su 3'UTR por complementariedad de secuencias. 8) Finalmente el miRNA maduro regula negativamente la expresión de sus genes blanco ya sea por degradación o inhibición la traducción [127].

Una vez que el pre-miRNA se procesa, se origina una molécula de doble cadena conocida como microRNA dúplex. Las dos cadenas del pre-miRNA tienen afinidad por las proteínas Ago y esta unión lleva a la maduración del microRNA. Sin embargo, solo una cadena madura puede ser incorporada dentro del complejo ribonucleoproteico conocido como “Complejo de silenciamiento inducido por RNA” (RISC, del cual Dicer, Ago (1-4) y TRBP son sus componentes) [32], [33]. En general, cuando la complementariedad es perfecta o casi perfecta, el RNAm es silenciado por degradación. En contraste, si la complementariedad es imperfecta la traducción del RNAm blanco es inhibida [34], [35]. Una característica general de los microRNA de mamífero es su apareamiento imperfecto con el RNA blanco, el cual determinará la manera en la que realiza su función. Los microRNA inhiben la expresión de genes, ya sea por la inducción de la deadenilación del RNAm, la degradación o la represión de la traducción [36]. En resumen, después de que RISC guía al microRNA a su blanco, el RNAm se escinde por la proteína Ago si la complementariedad es perfecta. De lo contrario, si la secuencia es imperfecta entre el microRNA y el RNAm causará deadenilación y eliminación del casquillo del RNAm, lo que lleva a la pérdida de la cola poli-(A) en el extremo 3' y la estructura de casquillo en el extremo 5'. Los RNAm desestabilizados se escinden adicionalmente por cualquiera de las exonucleasas o endonucleasas. Como alternativa, los microRNA pueden prevenir el inicio de la traducción a través de la interacción entre Ago y factores de iniciación [37].

Los microRNAs tienen un papel clave en la regulación de la expresión génica a nivel post-transcripcional en una amplia variedad de procesos celulares como ya se

mencionó, sin embargo, su expresión espacio-temporal sugiere que a su vez necesita de señales neurogénicas que controlen su transcripción. Durante la neurogénesis, las cascadas de transducción de señales que regulan la expresión génica a nivel transcripcional, sirven para convertir proteínas activadoras de la transcripción a partir de un estado inactivo a un estado activo, donde se da la unión al ADN. De manera interesante, una proteína activadora que funciona como factor de transcripción durante la diferenciación neuronal y supervivencia es la proteína de unión en respuesta a elementos respuesta a AMPc (CREB).

El factor de transcripción CREB

CREB es una familia de factores de transcripción constituida por tres miembros; CREB (cAMP Response Element Binding Element Response, por sus siglas en inglés), CREM (cAMP response Element Modulator, por sus siglas en inglés) y ATF-1 (Activator Transcription Factor 1, por sus siglas en inglés) [38], [39].

El factor de transcripción CREB es quizá el modulador más importante de los cambios celulares en el SN [40]. Muchos factores compiten y cooperan para regular la actividad postranscripcional de CREB, hay más de 6000 sitios de unión para CREB en el genoma [41] y muchos de estos sitios contienen la secuencia CRE palindrómica de 8 nucleótidos (5'- TGACGTCA - 3'), pero otros elementos de unión a CREB solo tienen un subconjunto de nucleótidos (5'- TGAGG - 3') o tienen múltiples sustituciones en el sitio CRE [38].

La fosforilación en la serina-133 de CREB inicia la traducción de estímulos extracelulares en la expresión de genes [42]. Fue identificado como el primer efector de la vía AMPc, uniéndose y activando la transcripción del promotor de su gen diana somatostatina [43], otras moléculas que pueden fosforilar a CREB en el SNC han sido identificadas. Protein cinasas (como PKA) inducida por la estimulación de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs, por sus siglas en inglés), o bien aumentando la concentración intracelular de calcio/calmodulina a través de la actividad sináptica vía canales de calcio sensibles al voltaje (VSCC por sus siglas en inglés) y la estimulación de la vía de la proteína cinasa IV dependiente de calmodulina (CaMKIV por sus siglas en inglés), factores de crecimiento/receptor tirosina cinasa (Ras/Erk/RSK2)[44], [45] o en respuesta al estrés y citocinas inflamatorias (MAPK; PI3/Akt) llevan a la fosforilación de CREB [40]. También puede ser fosforilado por la activación de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) en cultivos primarios de neuronas [46]. La activación mediada por NMDA de la protein cinasa II dependiente de calcio/calmodulina (CaMKII por sus siglas en inglés) es responsable de la fosforilación de CREB, la asociación específica entre la señalización NMDA y la fosforilación de CREB es neuroprotectora en células ganglionares de la retina [47]. La estimulación del receptor de estrógenos resulta en la fosforilación de CREB en la región CA1 del hipocampo de rata en la etapa adulta durante la modulación de la plasticidad sináptica [48], sugiriendo que CREB es un factor importante en el establecimiento de redes de señalización neuronales funcionales nuevas. El factor de crecimiento de fibroblastos (FGF por sus siglas en

inglés) vía receptor FGF (FGFR1) lleva a la fosforilación de CREB en progenitores neurales activando la cinasa ribosomal S6 (RSK1) [49].

Por otro lado, CREB es un importante mediador de los efectos de las neurotrofinas, un grupo de factores solubles que controlan diferentes aspectos de la diferenciación neuronal. Por lo tanto podemos decir que diversas vías conllevan la fosforilación de CREB en el SNC (Figura 4).

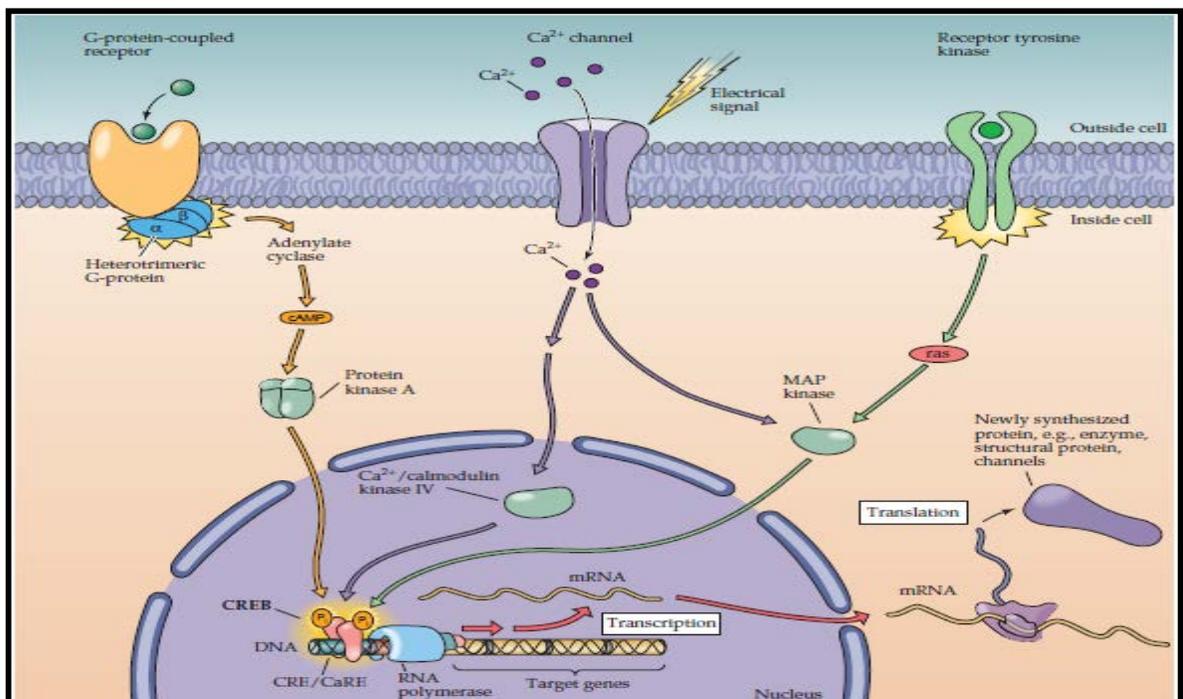


Figura 4. Regulación transcripcional de CREB. Múltiples vías de señalización convergen mediante la activación de cinasas que fosforilan a CREB. Estas incluyen a PKA, Ca²⁺/Calmodulin cinasa IV y MAPK. La fosforilación de CREB le permite unirse a sus coactivadores (no mostrado), para estimular a la RNA polimerasa y comenzar la síntesis de RNA. El RNA es procesado y exportado al citoplasma donde sirve como RNAm para la traducción a proteína [50].

Neurotrofinas

Las neurotrofinas son un grupo de proteínas que regulan la diferenciación neuronal, el crecimiento y la sobrevivencia, a diferencia de otras moléculas de señalización celular y moléculas de adhesión tiene una expresión limitada principalmente a las neuronas y se detectaron por primera vez en poblaciones de neuronas posmitóticas que han sido generadas en el SNC y SNP naciente [50]. Dentro de esta familia se encuentran el Factor de Crecimiento Nervioso (NGF por sus siglas en inglés) el Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF por sus siglas en inglés) la Neurotrofina 3 (NT3) y la Neurotrofina 4/5 (NT 4/5). NGF fue el primero en descubrirse, en el año 1951, promoviendo la sobrevivencia y crecimiento de neuronas sensoriales y simpáticas durante el desarrollo. Por otro lado, se observó que BDNF mostró un efecto neurotrófico similar en cultivos de neuronas sensoriales, y su secuencia era homóloga a la de NGF [51].

La acción selectiva de las neurotrofinas surge de su interacción por dos clases de receptores: los receptores TRK (con actividad tirosina cinasa) y el receptor p75. Existen tres receptores TRK, cada uno de ellos es una sola proteína transmembranal con un dominio tirosina cinasa citoplasmático. TrkA es principalmente un receptor para NGF, TrkB es un receptor para BDNF y la neurotrofina 4, y TrkC es un receptor para la neurotrofina 3. Además, todas las neurotrofinas pueden activar el receptor p75, el cual se expresa solo en subconjuntos de neuronas, lo que nos habla de la selectividad entre los ligandos y sus receptores así como la especificidad en la interacción de las neurotrofinas [50].

La señalización vía receptores Trk o p75 puede llevar a cambios en tres dominios: sobrevivencia celular/muerte, diferenciación celular y proceso de crecimiento así como la actividad dependiente de la estabilización sináptica o eliminación. Cada clase de receptor (Trk o p75) puede emplear distintas cascadas de señalización intracelular que lleve a cambios en el estado celular (motilidad, adhesión, etc.) o expresión génica. La comprensión de efectos específicos de las interacciones neurotróficas para cualquier célula se basa en tres tipos de información: las neurotrofinas disponibles a nivel local, la combinación de receptores en la neurona correspondiente y la vía de señalización utilizada por esa neurona [50].

En CTN se ha demostrado que NGF en conjunto con colágena promueve la proliferación e inhibe la diferenciación neuronal a través de la activación de la fosforilación de ERK1/2, efecto mediado por CiclinaD1 y Hes1 [52]. Adicionalmente, participa en la migración de oligodendrocitos en el SNC y células de Shawn en el SNP a través de p75 [53], [54] así como también en la inducción del desarrollo de neuritas en CTN [55] y este efecto es desencadenado por la regulación a la baja de la expresión del factor de transcripción ATF5 [56]. También regula su diferenciación hacia un fenotipo neuronal maduro [57]. La señalización de NGF lleva a la diferenciación a neuronas y astrocitos, pero no a oligodendrocitos [58]–[61].

BDNF es esencial para eventos de desarrollo del SNC como proliferación, migración, diferenciación, sobrevivencia, apoptosis y plasticidad sináptica [62].

BDNF ejerce sus efectos a través de la activación de TrkB y p75, donde este último participa en la supervivencia neuronal postmitótica, además se demostró que p75 define una población de células en la zona subventricular que persiste en la edad adulta y es capaz de responder a la estimulación de neurotrofinas, por lo cual se sugiere que p75 es un marcador específico postnatal. Por otro lado, TrkB parece participar en los mecanismos de proliferación, mientras que la neurogénesis se produce a través de la activación solo de p75, independiente de TrkB [63]. Además, BDNF es la única neurotrofina capaz de afectar el desarrollo dendrítico de neuronas de la zona subventricular a través de la alta afinidad con el receptor TrkB [64]. La diferenciación retardada de CTN causada por la inhibición de la producción de óxido nítrico se revierte con BDNF, probablemente por la sobre regulación de la expresión de p75 (Wu, 1996). Además, el óxido nítrico inhibe la proliferación celular pero este efecto es abolido por BDNF, indicando que p75 también participa en la regulación de la proliferación [65]. Lo anterior sugiere que la neurogénesis inducida por BDNF está mediada por la interacción con su receptor, ya sea TrkB o p75.

ANTECEDENTES

Los microRNAs en el desarrollo del SNC

Dentro del SNC, los microRNAs presentan una función conservada entre especies [66] y presentan un perfil de expresión tejido-específico durante su desarrollo [67]. Algunos estudios muestran la importancia de los microRNAs en la diferenciación neuronal y desarrollo del SNC a través de la delección de proteínas clave en la biogénesis de estos como Dicer o para su función como es Ago, quien es parte de RISC [68]. El ratón deficiente para Dicer muere en la etapa embrionaria antes de ocurrir la neurogénesis, por otro lado la mutante condicional para Dicer presenta defectos durante el desarrollo del SNC como es la reducción en el tamaño del prosencéfalo, como posible resultado de la apoptosis de neuronas en diferenciación [69]. La caracterización del perfil de expresión de 119 microRNAs en ratón y humano indican que estos microRNAs son filogenéticamente conservados, órgano-enriquecidos y órgano-específicos. De manera interesante, 13 de estos microRNAs están enriquecidos en el SNC. Además, 8 microRNAs se inducen durante la diferenciación neuronal en células embrionarias de humano y ratón después de la aplicación de ácido retinoico, sugiriendo que pueden tener una función conservada en el desarrollo neural de mamíferos [70]. De estos microRNAs, el microRNA-7 esta conservado evolutivamente y se encuentra enriquecido en diferentes áreas del SNC, específicamente dentro del hipotálamo, lo cual nos sugiere su participación para la diferenciación terminal así como el mantenimiento del fenotipo.

El microRNA-7 es un microRNA codificado por un único gen en moscas y tres loci genómicos diferentes en mamíferos. En humano la expresión del microRNA-7 deriva de tres loci genómicos, MIR7-1 localizado dentro de un intrón del gen HNRNPK en el cromosoma 9, el MIR7-2 localizado en una región intergénica del cromosoma 15 y MIR7-3 que se encuentra en un intrón de PGSF1a en el cromosoma 19. Cada gen del microRNA-7 es transcrito como un único transcrito primario (pri-miR-7-1, pri-miR-7-2 y pri-miR-7-3) los cuales son procesados en tres transcritos precursores únicos [71] y dan lugar a la misma secuencia madura del microRNA-7, además su expresión es regulada transcripcionalmente y controlado durante su procesamiento. En ratón también hay tres loci para este microRNA (miR-7a-1, miR7a-2 y miR7b) y de igual manera miR-7a-1 es encontrado en el intrón del gen Hnrnpk en el cromosoma 13. miR7a-2 y miR7b están localizados en regiones intergénicas en el cromosoma 7 y 17 respectivamente . miR7a-1 y miR-7a-2 generan la misma secuencia madura, llamada miR-7a, mientras que la secuencia madura de miR-7b difiere por un solo nucleótido. De manera importante, la región semilla de miR-7a y miR-7b es la misma y reconoce los mismos blancos (miRbase 2014).

La existencia de múltiples genes que dan origen al microRNA-7 que son regulados de manera independiente, es consistente con su importancia funcional sobre el curso de la evolución [72].

El microRNA-7 se expresa en tejido cerebral en humano y ratón y su biogénesis se inhibe en células no neuronales [73], su inducción contribuye a la extensión de neuritas en CTN diferenciadas [74]. En neuronas corticales reprime el crecimiento de

neuritas. Además, promueve diferenciación de oligodendrocitos y regula a α -sinucleína, lo que sugiere su papel en la enfermedad de Parkinson [75], [76].

Recientemente se demostró que reprime el desarrollo de neuronas dopaminérgicas en el bulbo olfatorio, lo que indica que este microRNA con otros genes es esencial para el desarrollo y función del SN [77].

Durante el desarrollo de la corteza, su expresión se observa desde el día embrionario 12.5 (E12.5) hasta el día postnatal 0 (P0). A través del uso de una esponja para el microRNA-7, que es un transcrito complementario del microRNA maduro que inhibe su actividad, se observó que en el ratón transgénico condicional generado para la esponja del microRNA-7, la inhibición de su actividad en la corteza provoca un defecto similar a microcefalia, debido a la sobre regulación de la vía p53 y genes importantes en la regulación de la sobrevivencia y diferenciación neuronal como Ak1 y p21. El microRNA-7 permite la transición de células gliales radiales a progenitores intermedios, previniendo la apoptosis y dando como resultado la generación de los diferentes tipos neuronales que forman las capas de la corteza, controlando de esta manera su tamaño [78]. De manera interesante, el microRNA-7 se encuentra enriquecido en el hipotálamo, en la edad adulta, mostrando una expresión diferencial, la isoforma "a" se encuentra altamente expresada en los núcleos supraquiasmático, paraventricular, periventricular, supraóptico, dorsomedial y arcuato. Específicamente se encuentra en las poblaciones neurales del núcleo ventromedial y arcuato, sugiriendo un papel en la regulación neuronal hipotalámica [79].

Por otro lado, el microRNA-7 se expresa en etapas embrionarias de manera diferencial, al inicio de la neurogénesis hipotalámica así como en la etapa postnatal, donde las neuronas inmaduras adquieren un fenotipo maduro, caracterizado por la producción de un neuropéptido específico. En etapas más tardías, es posible que este microRNA regule genes involucrados en distintos procesos celulares que participan ya sea en la salida irreversible del ciclo celular o en la adquisición de un fenotipo, así como el mantenimiento de este. Por lo tanto, este microRNA puede estar regulando la expresión de inductores del ciclo celular o genes involucrados en reprimir la expresión de inhibidores de la progresión del ciclo celular [80]. En células troncales neurales, el microRNA-7 regula negativamente su proliferación a través de la inducción del arresto del ciclo celular en la fase G1/S, promoviendo su diferenciación a través de reprimir la expresión de KLF4 [81].

Recientemente, un estudio empleado el análisis de “pull-down” en células hipotalámicas embrionarias para obtener el enriquecimiento significativo de los genes blanco del microRNA-7 dio como resultado un total de 1323 blancos, entre ellos reguladores del desarrollo del SNC y del hipotálamo [80]. Por lo anterior no es de sorprender que la transcripción del microRNA-7 sea también controlada de manera específica durante la neurogénesis, específicamente la que se da en el hipotálamo para generar las diversas poblaciones que co-existen en los diversos núcleos. Sin embargo, la gran mayoría de las señales que controlan la expresión del miR-7 durante en el hipotálamo se desconoce. Se sabe que los miR-7a-1 y miR-7a-2 son

independientemente y directamente regulados por el factores de transcripción como HOXD10 [82] y c-Myc [83] así como IL-4 [84].

JUSTIFICACIÓN

El desarrollo del SN de los mamíferos resulta de una serie de eventos coordinados que incluyen una red transcripcional, señalización celular, acciones celulares y organización estructural. Entre la red regulatoria sofisticada se encuentran los microRNAs, reguladores cruciales durante el desarrollo embrionario, neurogénesis adulta y estímulos ambientales [37].

El hipotálamo a través de redes neuronales específicas desempeña un papel fundamental en la regulación de la homeostasis del organismo [85]. A pesar de la importancia de la función de las poblaciones neuronales de los diferentes núcleos, poco se sabe acerca de su desarrollo. Como se mencionó anteriormente, el microRNA-7 tiene un patrón de expresión en diferentes zonas del cerebro y se encuentra conservado entre especies; en humanos se encuentra enriquecido en la glándula pituitaria e hipotálamo y se expresa en bajos niveles en otras regiones como la sustancia nigra, estriado, bulbo olfatorio y corteza [86][87]. Este patrón de expresión neuroendocrino es similar entre diferentes especies como humano, ratón, rata, cerdo, pez cebra y anélidos [79], [86], [88]–[90] e indica que el microRNA-7 puede tener un papel funcional en el desarrollo y diferenciación neuronal. De manera importante se observó que la ingesta de alimentos una función afectada por la disrupción de componentes de la biosíntesis de los microRNAs. La ingesta es regulada por las poblaciones orexigénicas (AgRP y Neuropéptido Y (NPY) del núcleo arcuato así como las poblaciones anorexigénicas (α -MSH y POMC) del núcleo ventrolateral. Experimentos recientes indican que la expresión de Dicer en el

hipotálamo participa en el control del peso corporal y a su vez las neuronas que expresan AgRP y POMC también expresan Dicer (RNAsa que participa en la biosíntesis de los microRNAs). La delección condicional de Dicer en neuronas POMC resulta en obesidad, seguida de la reducción de AgRP, NPY y el receptor de grelina entre otros, además los animales presentan un comportamiento parecido a la ansiedad [91], [92]. Actualmente, el estudio del neurodesarrollo se basa en identificar el papel de los factores de transcripción en el hipotálamo y moléculas de señalización, así como la identificación y caracterización de los mecanismos moleculares y bioquímicos que regulan las diversas regiones hipotalámicas durante su organización, su diferenciación y conectividad, donde curiosamente, algunos de estos factores esenciales durante el desarrollo se expresan también en el hipotálamo maduro, como es el caso del microRNA-7, el cuál es importante en el desarrollo de la corteza y al estar expresado en el hipotálamo también indica una función en el establecimiento de los fenotipos neuronales, sin embargo aún no se conocen las señales que lo regulan.

Por lo anterior y debido a que los microRNAs se expresan de manera espacio temporal nos resulta interesante identificar las moléculas río arriba que pueden regular la transcripción del microRNA-7 en el hipotálamo durante la adquisición de un fenotipo específico.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Qué moléculas regulan la transcripción del microRNA-7 en neuronas hipotalámicas embrionarias?

HIPÓTESIS

Si el microRNA-7 se expresa durante el desarrollo del hipotálamo y el factor de transcripción CREB regula la neurogénesis, entonces es posible que CREB pueda activar la transcripción del microRNA-7.

OBJETIVOS

General

- Determinar si CREB regula el promotor del microRNA-7 en neuronas hipotalámicas embrionarias.

Particulares

- Identificar mediante análisis bioinformático potenciales elementos de unión a factores de transcripción que regulen la actividad del promotor del microRNA-7.
- Determinar si alguno de estos factores de transcripción identificados bioinformáticamente regulan el promotor del microRNA-7 en un modelo *in vitro*.
- Precisar la vía de señalización mediante la cual el o los factores de transcripción identificados regulan el promotor del microRNA-7.

MATERIAL Y MÉTODOS

Predicción bioinformática de los sitios de unión para el promotor del microRNA-7 y de conservación.

Para identificar los posibles sitios de unión del microRNA-7 se utilizó la base de datos ECR Browser (<https://ecrbrowser.dcode.org/>) que permite visualizar y analizar regiones conservadas evolutivas en los genomas de especies secuenciadas, creando un perfil de conservación teniendo como base las secuencias de los promotores predichos de este (Figura 5), seleccionando solo aquellos que tienen un alto grado de conservación multiespecie. Posteriormente a través del programa ensemble (<http://www.ensembl.org/index.html>) se realizó un alineamiento múltiple de aquellos sitios de unión para factores de transcripción de nuestro interés.

Promotor	Ubicación	Secuencia	Tamaño (pb)
microRNA-7a-2 (1)	Cromosoma 7	78886586 - 78886841	256
microRNA-7a-2 (2)	Cromosoma 7	78887585 – 78887781	206
microRNA-7b (3)	Cromosoma 17	56241602 – 56241753	156

Figura 5. Promotores predichos del microRNA-7. La isoforma 7a-2, ubicada en el cromosoma 7 tiene dos promotores (1 y 2), mientras que la isoforma 7b dentro del cromosoma 17 tiene sólo 1 promotor.

Línea celular

Se utilizó la línea celular derivada de hipotálamo de embrión de ratón mHypoE-N1, cultivada en medio DMEM (Gibco, USA), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), penicilina (100 unidades/mL), estreptomycin (100 µg) y glutamina al 1%, las cuales se incubaron a 37°C y con 5% de CO₂.

Clonación de los bloques del promotor del microRNA-7

Los promotores descritos por Kredo-Russo [93] fueron amplificados por PCR (reacción en cadena de polimerasa) a partir de ADN genómico de ratones de la cepa C57/SJL utilizando los siguientes oligos:

Promotor 1: directo 5'-ATATTCTCCAGCCTGCCTCA-3' y reverso 5'-GAAAAGTGACCTGCCCTTGA-3'.

Promotor 2: directo 5'-GGAGGGGTAGAGCAAAGAGG-3' y reverso 5'-TCTGGGCCAGCCTCTAATTG-3'.

Promotor 3: directo 5'-TTTTGGACGGATGCCTGACT-3' y reverso 5'-CTTTATGCGCTTAAGGGGAAG-3'.

Los productos obtenidos fueron separados en un gel de agarosa al 1% y purificados con el kit de extracción de geles QIAQuick (Qiagen, USA). Estos productos fueron digeridos y posteriormente ligados utilizando la enzima T4 ADN ligasa (Thermo Scientific, Canadá) para su clonación en el vector reportero de luciferasa pGL3-Básic (previamente digerido con las enzimas correspondientes). El producto de ligación fue

transformado en células quimiocompetentes DH5 α . Las células transformadas fueron sembradas en cajas petri con medio YT2X adicionado con ampicilina 50 μ g/mL. Se verificó la clonación de los bloques por medio de PCR de colonia, utilizando los oligos del vector RV primer 3 y GLprimer2. El ADN plasmídico de aquellas colonias que presentaron los insertos fueron purificados con el kit “High Pure Plasmid Isolation” (Roche Applied Science, Germany). Después se procedió a la secuenciación del ADN de los plásmidos en un analizador de genes Applied Biosystems 3100 (Foster City, CA, USA).

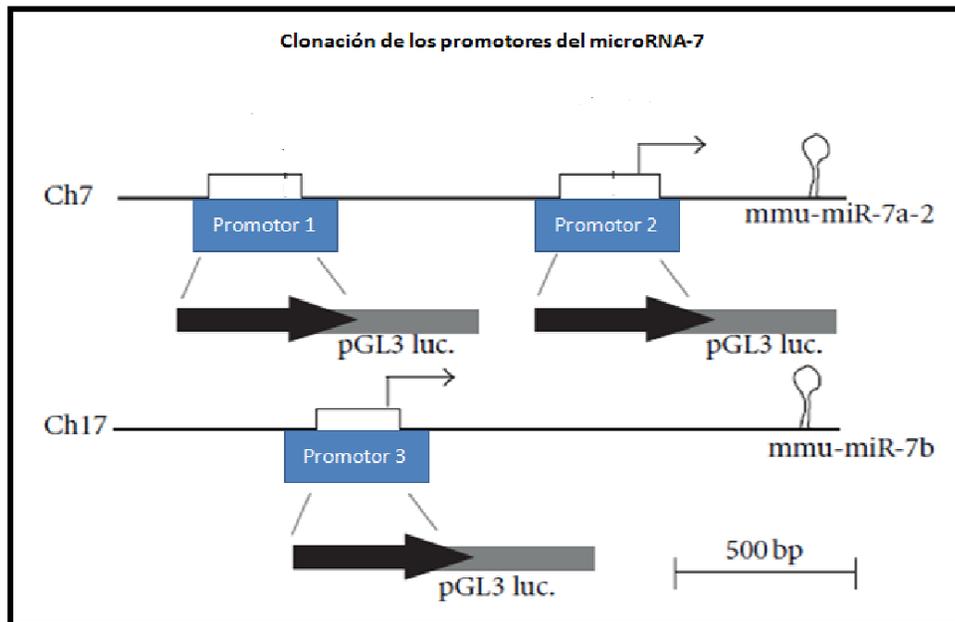


Figura 6. Clonación de los promotores del microRNA. Representación esquemática de las secuencias conservadas, río arriba de la horquilla del microRNA7-a2; promotor 1 y 2 y promotor 3 del microRNA-7b, los cuales están subclonados río arriba del reportero para luciferasa pGL3-básico. (Figura tomada y modificada de [93]).

Transfección de células en cultivo y ensayos de luciferasa

Para las transfecciones de células en cultivo se sembraron 120,000 células mHypoE-N1 en cajas Petri de 35 mm y mantenidas en medio DMEM suplementado con 10% SFB. Una hora antes de la transfección se retiró el medio a las cajas y se colocaron 600 µl de medio DMEM no suplementado. En un microtubo se colocaron 3 µl de lipofectamina 2000 Invitrogen y se llevó a 50 µl. En otro microtubo se colocó el DNA a transfectar y se llevó a 50 µl. Se utilizaron 800 ng del plásmido a transfectar (CREB) en el caso de las células mHypoEn1 y de 80 ng de plásmido que sirvió como control de transfección (Renilla). Se dejó reposar la lipofectamina al menos cinco minutos a temperatura ambiente, tras los cuales se mezclaron la lipofectamina y el

ADN a transfectar. Se incubaron durante 25 min para después agregar la mezcla a la caja Petri. Se incubaron las células con la mezcla de transfección a 37°C en la incubadora durante 4 h, transcurrido este tiempo se retiró la mezcla de transfección y se añadió medio DMEM suplementado con 10% de SFB. En el caso del estímulo con IL-4 (50 ng/μL), NGF (50 μg/L) y BDNF (40 μg/L), se realizó a las 4 h post-transfección, dejando incubar durante 48 h mas para ser cosechadas usando 100 μL del buffer de lisis pasiva del kit Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega). Para medir la actividad de luciferasa, se usaron 5 μL de extracto con 15 μL del buffer (1X) incluido en el kit. Las unidades relativas de luciferasa (RLUs por su nombre en inglés) se calcularon haciendo el cociente de (Muestra_{Renilla} /Muestra_{firefly}) (Control_{Renilla}/Control_{firefly}), calculando la RLU de cada muestra y normalizado tomando como 1 los experimentos hechos con el vector pGL3-Basic vacío. Los ensayos para la determinación de luciferasa se realizaron mediante luminometría, utilizando el producto comercial Dual Luciferase® Reporter Assay System (Promega, Madison, EE.UU.) siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de los ensayos fueron analizados estadísticamente mediante la prueba t-Student para determinar las diferencias significativas entre los grupos de estudio.

RESULTADOS

Análisis bioinformático del promotor del microRNA-7

Como se mencionó anteriormente, en el ratón existen 3 loci que dan origen al microRNA-7; microRNA-7a-1 se encuentra en un intrón en el cromosoma 13, microRNA-7a-2 en el cromosoma 7 y el microRNA-7b en el cromosoma 17. Se ha descrito que el microRNA-7a-2 tiene 2 promotores mientras que el microRNA-7b sólo tiene uno. Para el microRNA-7a-2 se obtuvieron dos secuencias, una de 256 pb (denominada promotor 1) y otra de 206 pares de bases (promotor 2), localizada 1420 y 450 pares de bases río arriba del sitio de inicio de la transcripción de este microRNA, respectivamente. Para el microRNA-7b se obtuvo una secuencia de 156 pares de bases (promotor 3) que se encuentra 1235 pares de bases río arriba del inicio de la transcripción del microRNA-7b [93]. Con la finalidad de identificar factores de transcripción que potencialmente pueden interactuar con los promotores del microRNA-7a2 y 7b, se realizó una búsqueda de sitios de unión para elementos de regulación transcripcional hasta ahora descritos en el promotor del microRNA-7 con el programa ECR browser, dando como resultado múltiples elementos respuesta a factores de transcripción. Estos factores se seleccionaron de acuerdo a su grado de conservación entre las especies; del microRNA-7a-2 que tiene dos promotores, se identificaron 24 FT conservados y 21 FT para el promotor 1 y 2, respectivamente, el promotor del microRNA-7b tiene unión para 16 FT. Asimismo, de esta lista seleccionamos los FT que son importantes para el desarrollo del SNC. De manera interesante, el promotor del microRNA-7b tiene sitios de unión para STAT6 y CREB (**Figura R1**). STAT6 es componente de la vía de IL-4, diversas evidencias indican

que es importante en la proliferación glial y supervivencia neuronal [94], [95]. Además regula al microRNA-7 en la fusión de macrófagos en células gigantes multinucleadas, característica distintiva de la respuesta granulomatosa a la inflamación, infección y cuerpos extraños [84]. Por otro lado, seleccionamos a CREB, el cual se sabe es importante durante el neurodesarrollo [96] y su activación podría ser mediada por neurotrofinas, entre ellas BDNF, que de manera interesante se expresa en el hipotálamo embrionario [97] donde participa en la diferenciación de al menos el fenotipo TRHérgico hipotalámico [98].



Figura R1. Factores de transcripción con sitios de unión en el promotor del microRNA-7. a) Sitios de unión de los factores de transcripción a la secuencia de 256 pb del promotor 1 del microRNA-7a-2, b) Sitios de unión de los factores de transcripción de la secuencia de 206 pb del promotor 2 del microRNA-7a-2, c) Sitios de unión de los factores de transcripción a la secuencia de 156 pb del promotor 3 del microRNA-7b.

Conservación de los sitios de unión en el promotor del microRNA-7b

El programa bioinformático *Ensembl genome browser* es un navegador de genomas, específicamente de vertebrados, que apoya la investigación en genómica comparativa, evolución, variación de secuencias así como regulación transcripcional. Entre sus funciones se encuentra realizar múltiples alineaciones, predecir funciones regulatorias y coleccionar datos sobre enfermedades (<http://www.ensembl.org/index.html>). Con ayuda de este programa bioinformático se realizó el alineamiento de la secuencia del promotor del microRNA-7b, localizado en el cromosoma 17 de ratón en la posición 56241602-56241753. Como resultado obtuvimos que la secuencia de unión para el factor de transcripción CREB (cctaTGAGGtaatc) está conservada entre diferentes especies (área sombreada), mientras que para el factor de transcripción STAT6 se encontró un sitio de unión (gccTTcc) se encuentra también conservado (área sombreada) **(Figura R2)**. La conservación de los sitios de unión para CREB y STAT6 en el promotor del microRNA-7b sugiere que es probable que estos factores de transcripción regulen la expresión del microRNA-7b.



Figura R2. Conservación de los factores de transcripción CREB y STAT6. La secuencia del promotor del microRNA-7b (Chr17: 56241602-56241753) presenta sitios filogenéticamente conservados para CREB y STAT6. Alineamiento del promotor del microRNA-7b donde se muestra la conservación multispecie del sitio putativo de unión para CREB y STAT6, las áreas sombreadas muestran la posición del sitio de unión en la secuencia obtenido a través del programa bioinformático *Ensemble genome browser*.

IL-4 no regula la actividad del promotor del microRNA-7b

De los factores de transcripción con unión al promotor del microRNA-7b se obtuvo STAT6; componente de la vía de IL-4. Se ha sugerido que IL-4 promueve la neurogénesis en células progenitoras neurales de ratón adulto cocultivadas con microglía estimuladas con IL-4 en presencia de péptidos β -Amiloides ($A\beta$, por sus siglas en inglés) [99], además se ha demostrado que participa en procesos como proliferación [100], [101], diferenciación celular [94], control de la sobrevivencia neuronal [95], [102], arreglo del citoesqueleto y fenotipo de células gliales [103]. Por

otro lado, se ha demostrado que IL-4 regula al microRNA-7 en la fusión de macrófagos en células gigantes multinucleadas, característica distintiva de la respuesta granulomatosa a la inflamación, infección y cuerpos extraños [84]. Para determinar la posible funcionalidad de IL-4 sobre la actividad transcripcional del microRNA-7b se realizaron ensayos de actividad de la luciferasa y para ello se transfectaron de manera transitoria construcciones que contenían el promotor 3' de este microRNA junto con el plásmido control Renilla en la línea celular mHypoE-N1 y posteriormente se determinó la expresión de los genes reporteros luciferasa y renilla, siendo el primero un indicador de la activación transcripcional del promotor del microRNA-7b. Los resultados no mostraron un efecto estadísticamente significativo de IL-4 en la actividad transcripcional del promotor del gen para el microRNA-7b **(Figura R3)**.

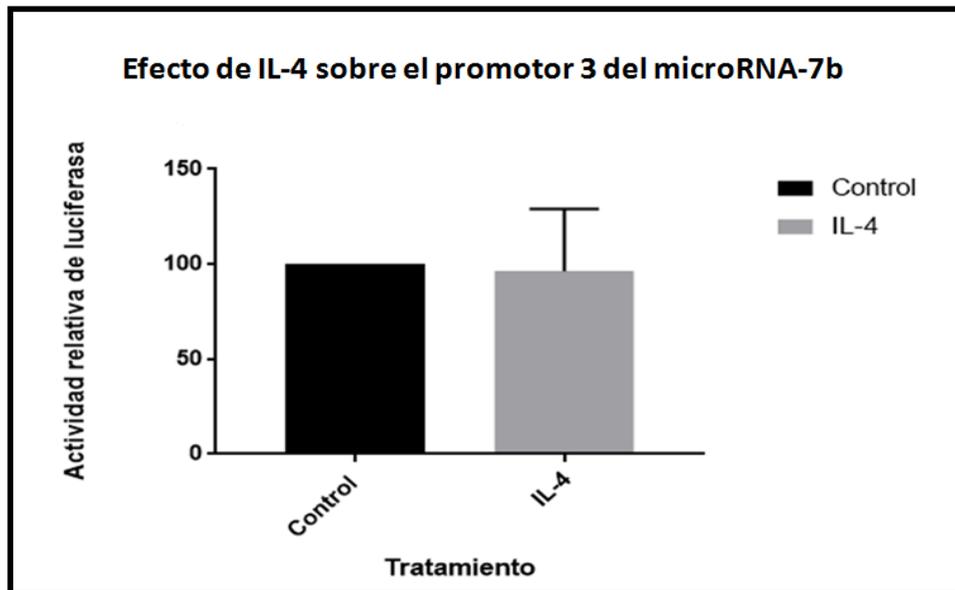


Figura R3. Efecto de IL-4 sobre el promotor 3 del microRNA-7b. Cuantificación de la actividad relativa de luciferasa. Células hipotalámicas embrionarias estimulas con IL-4 (50 ng/μl), donde observamos que el tratamiento no tiene efecto y no hay diferencia significativa, n=3 (por duplicado), pGL3-Basic sirve como control. $\bar{x} \pm$ desviación estándar

CREB regula el promotor del microRNA-7

CREB es un factor de transcripción que participa en la neurogénesis [104], su deleción provoca defectos durante el neurodesarrollo [105], [106], además participa en la sobrevivencia y maduración de neuronas recién generadas [107], sugiriendo que CREB puede tener una función neurogénica específica, ya sea en proliferación, sobrevivencia y diferenciación en zonas neurogénicas de acuerdo a la etapa de desarrollo posnatal del cerebro.

Del análisis bioinformático, se observó que CREB está conservado, por lo que podría regular el promotor 3 correspondiente al micoRNA-7b. Para determinarlo de manera experimental, se llevó a cabo la sobreexpresión en células hipotalámicas

embrionarias del día 17.5 de la línea celular mHypo-N1 con el promotor del microRNA-7b y con CREB usando como control el vector pGL3-básico. La expresión de CREB incrementó aproximadamente la actividad de luciferasa ~ 5 veces en comparación con el control, de manera significativa (**Figura R4**). Adicionalmente se usó el promotor del microRNA-7a-2 como control negativo, el cual no tiene sitio de unión para CREB. Nuestro experimento nos indica que el promotor del microRNA-7b es regulado positivamente por el factor de transcripción CREB.

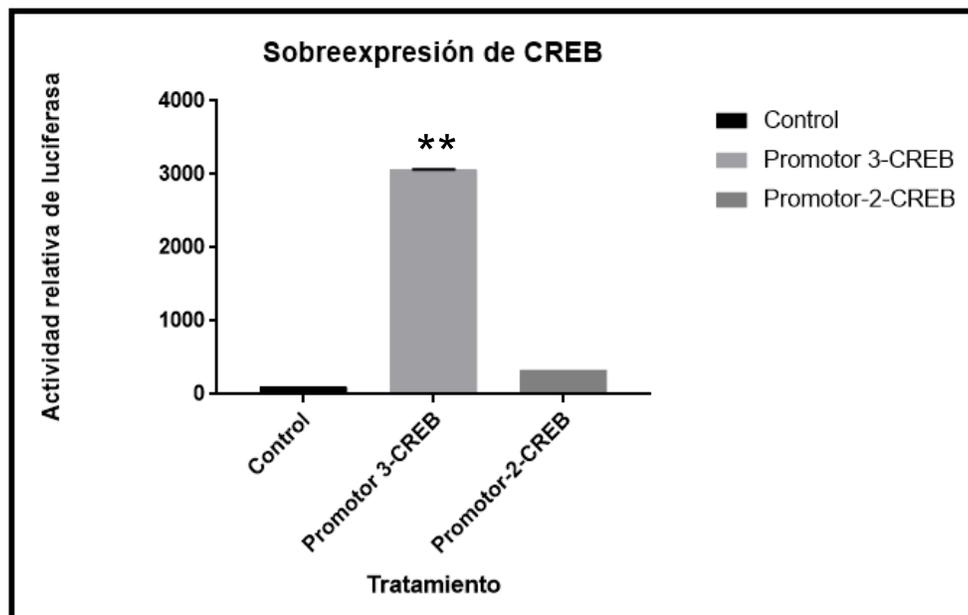


Figura R4. Efecto de CREB sobre el promotor 3 del microRNA-7b. Cuantificación de la actividad relativa de luciferasa. La co-transfección del promotor 3 y CREB aumentó ~ 5 veces la actividad con respecto al control, de manera significativa. Se utilizó el promotor 2 del microRNA-7a-2, el cual no tiene sitio de unión para CREB como control negativo, n=3 (por duplicado), **p<0.01 vs control, $\bar{x} \pm$ desviación estándar.

Las neurotrofinas BDNF y NGF regulan la actividad el promotor del microRNA-7b

Una vez que determinamos que CREB regula positivamente la actividad del promotor del microRNA-7b, decidimos identificar que vía de señalización regula a CREB. Una de las vías que lo regula es la de las neurotrofinas BDNF y NGF. En el caso de BDNF, se une a su receptor de alta afinidad TrkB, resultando en el reclutamiento de proteínas que activan tres cascadas de transducción de señales diferentes. Una de ellas es la activación de Shc/Grb2, Ras, Raf, cinasa activada por MEK y ERK, donde activan uno o más factores de transcripción como CREB y la proteína de unión a CREB (CBP) que regulan la expresión de genes que codifican proteínas implicadas en la plasticidad neuronal, resistencia al estrés y sobrevivencia celular.

Se ha observado que BDNF y NGF participan en el mantenimiento y desarrollo neuronal así como en la proliferación y diferenciación de CTN [108]. Por lo tanto proponemos que las neurotrofinas NGF y BDNF regulan la actividad del microRNA-7. Como se observa en la **Figura R5**, los tratamientos con NGF y BDNF aumentaron la actividad de luciferasa 1.3 y 1.5 veces, respectivamente, con respecto al control, de manera significativa. Nuestra conclusión de este experimento es que NGF y BDNF aumentan la actividad del promotor del microRNA-7b.

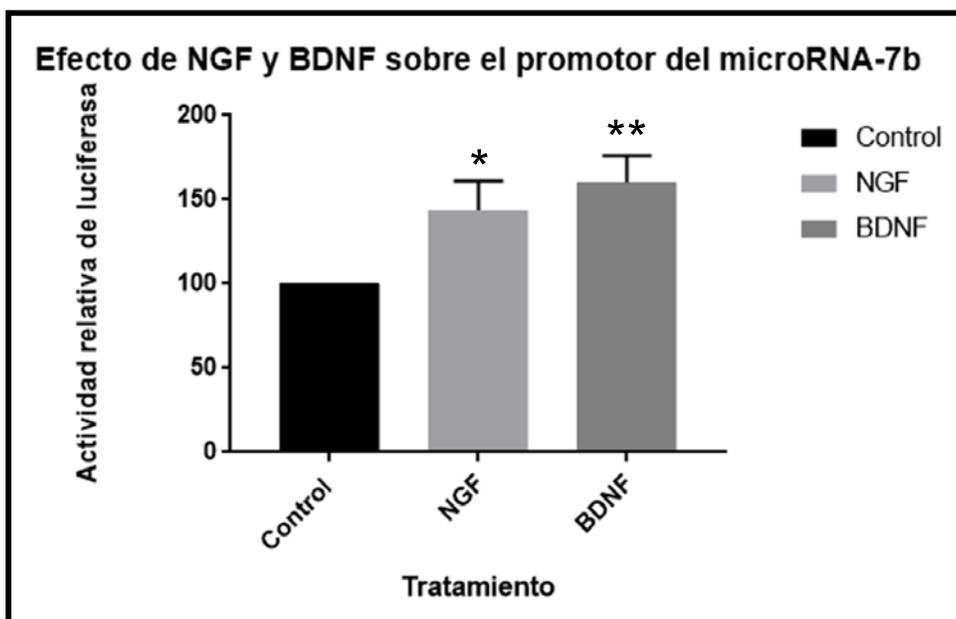


Figura R5. Efecto de NGF y BDNF sobre el promotor 3 del microRNA-7. Células de la línea mHypoE-N1 transfectadas con el bloque 3 del microRNA-7b (800 ng/ μ L), tratadas a las 4 horas con NGF (50 μ g/L) y BDNF (40 μ g/L). El tratamiento con NGF aumentó 1.3 veces la actividad de luciferasa, mientras que BDNF lo hizo en 1.5 aproximadamente, con respecto al control, de manera significativa. (pGL3-Basic sin el promotor 3), n=3 (por duplicado). \bar{x} \pm desviación estándar. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ vs control.

Efecto de BDNF-CREB sobre el promotor del microRNA-7b

Una vez que se determinó que CREB regula la actividad del promotor del microRNA-7b así como las neurotrofinas NGF y BDNF, sugerimos que BDNF a través de CREB podría controlar la transcripción de este microRNA en neuronas hipotalámicas embrionarias.

En la **Figura R6** podemos observar que la sobreexpresión de CREB así como el promotor 3 (microRNA-7b) sin la sobre-expresión de CREB aumentan los niveles de luciferasa, sugerimos que esto podría deberse a la unión de CREB endógeno al

promotor, también se muestra que la sobreexpresión de CREB induce un aumento (~ 2 veces con respecto a su control) en la actividad del promotor del microRNA-7b. Por otro lado, el tratamiento con BDNF no aumenta la actividad de luciferasa con respecto al tratamiento con el promotor solamente, asimismo no se observa un efecto al sobreexpresar a CREB y estimular con BDNF en comparación con el tratamiento en el que se sobreexpresa a CREB. Estos datos sugieren que en células hipotalámicas embrionarias CREB no está río debajo de vía de señalización mediada por BDNF.

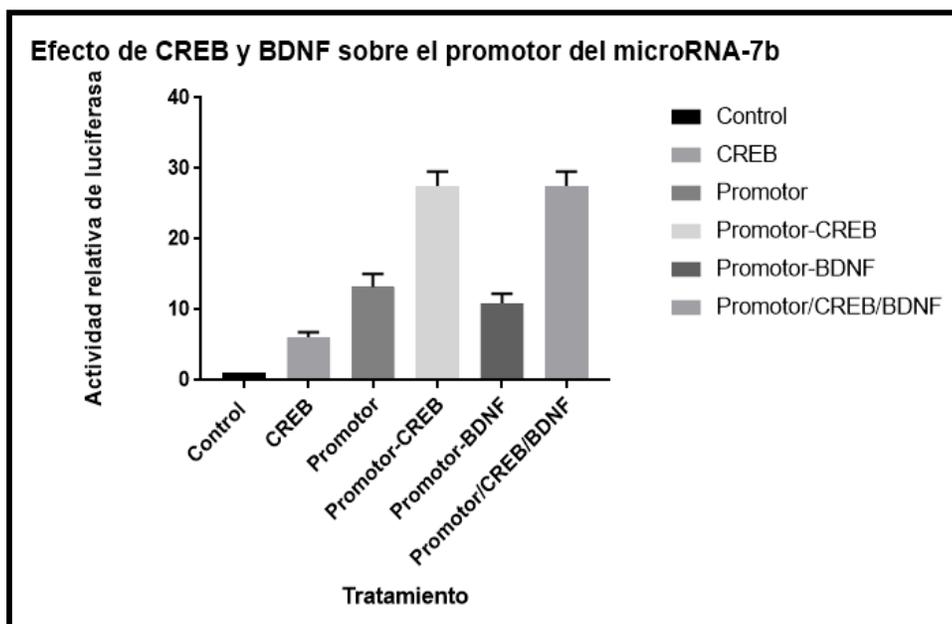


Figura R6.Efecto de CREB y BDNF sobre el promotor 3 del microRNA-7b. Células de línea mHypoN1 promotor 3 del microRNA-7b, CREB (800 ng/ μ l) y estimuladas 4 h después con BDNF (40 μ g/L). Se observa que el tratamiento con CREB sobre el vector vacío presenta un efecto, así como también el tratamiento con el promotor 3 sin CREB. Sin embargo el tratamiento de ambos aumenta la actividad casi 2 veces con respecto a su control. Por el contrario, la presencia de BDNF no tiene efecto en la actividad y el tratamiento en la sobreexpresión de CREB presenta la misma actividad que su control, donde no hay estímulo con BDNF. El promotor es la secuencia de 106 pb, correspondientes al promotor 3 del microRNA-7b, n=2 (por duplicado). $\bar{x} \pm$ desviación estándar.

El dibutiril AMPc regula el promotor del microRNA-7b

CREB es un factor de transcripción activado por diferentes señales extracelulares como los receptores tirosina-cinasa (Trk), receptores NMDA, canales de calcio o receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). En este caso los receptores NMDA, canales de calcio y GPCRs llevan al aumento de los niveles de calcio que a su vez activan a la Adenilato ciclasa y esta a su vez al AMPc y PKA para fosforilar a CREB, con el fin de elucidar que señales río arriba regulan a CREB para que este pueda controlar la expresión del microRNA-7, decidimos usar un análogo de AMPc; el Dibutiril AMPc (dbAMPc), que conlleva a la activación de PKA. PKA es un heterotetrámero formado por dos subunidades catalíticas y dos reguladoras. Cada subunidad reguladora tiene dos sitios de unión al AMPc. Tras la unión del AMPc a las subunidades reguladoras, se liberan las subunidades catalíticas activándose la PKA [109]. Una vez activada, la PKA se trasloca al núcleo [110] donde, entre otros efectos, fosforila y activa proteínas cinasas y una serie de factores de transcripción que regulan la expresión génica [109]. CREB a través de la fosforilación de la Serina 133 [110], [111], regula la expresión de genes específicos que tienen en su promotor la secuencia consenso CRE [109], [112]. La **figura R7** muestra que el tratamiento con dbAMPc aumentó la actividad relativa de luciferasa con respecto al control. Esto podría indicar que esta vía activa directamente a CREB en las células hipotalámicas embrionarias. Para verificar si la activación del promotor del microRNA-7b es a través de CREB vía AMPc/PKA, se uso un inhibidor de PKA, H89, el cual inhibe su fosforilación. Como se puede observar la inducción mediada por CREB disminuye con la aplicación del inhibidor H89; lo cual sugiere que el efecto transactivador de

CREB sobre el promotor del miR-7b es parcialmente mediada por esta vía. Por otro lado, como control negativo se usó el promotor del microRNA-7a-2 que no posee sitios de unión para CREB. Con estos experimentos proponemos que la vía AMPc/PKA regula positivamente a CREB y éste a su vez al microRNA-7b.

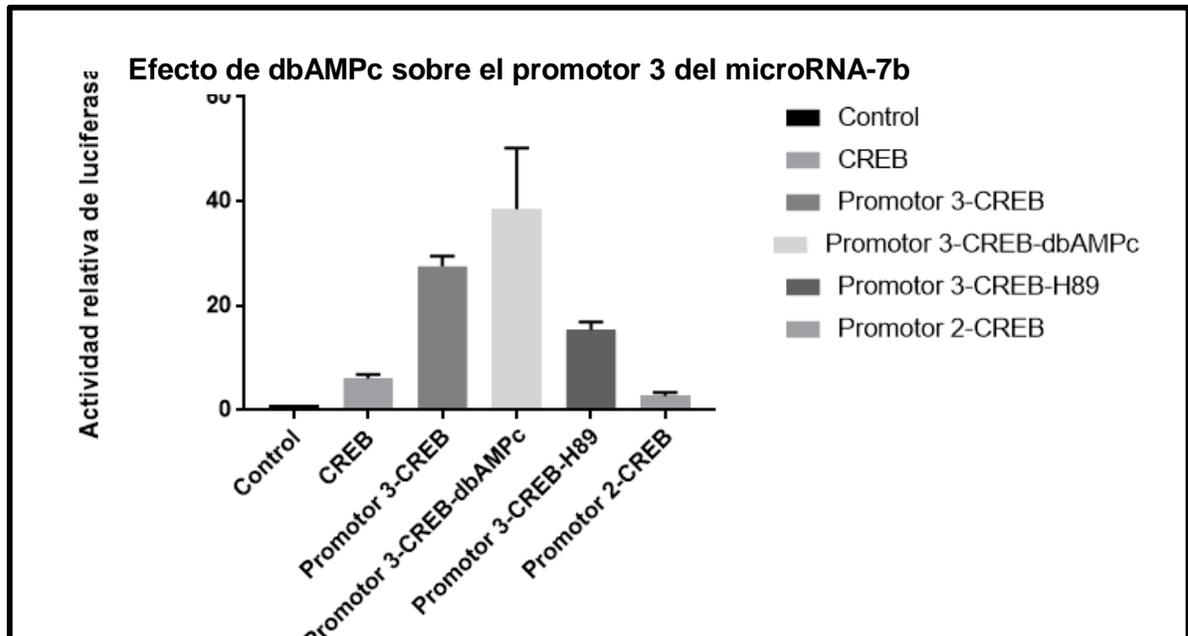


Figura R7. Cuantificación de la actividad relativa de luciferasa. Células de la línea mHypoE-N1 transfectadas con el promotor 3 del microRNA-7b, el promotor 2 del microRNA-7a-2, CREB (800 ng/ μ L), 24 h después se estimularon con dbAMPc (1 mM), en el tratamiento con el inhibidor H89, se estimuló también a las 24 h por 30 min, 24 h después fueron cosechadas. El control es el vector pGL3-Basic vacío, el tratamiento de sobreexpresión de CREB aumentó a ligeramente la actividad relativa de luciferasa, CREB y el promotor 3 aumentaron 2 veces aproximadamente, el dbAMPc aumentó un 1.8 veces y con el inhibidor disminuyó 0.6 veces respecto al tratamiento con el promotor 3 y CREB, n=2 (por duplicado). $\bar{x} \pm$ desviación estándar.

DISCUSIÓN

El microRNA-7 se expresa diferencialmente durante el desarrollo del hipotálamo de ratón [79]. Este microRNA presenta un aumento en la transición del día embrionario (E) 12 al día E15, etapa en la que los precursores neurales salen del ciclo celular, seguido de un aumento del día post-natal (P) 7 al P14 donde las neuronas inmaduras comienzan su maduración y finalmente otro incremento del día E15 al día E18 donde se da la mayor actividad neurogénica en el hipotálamo murino [80] .

Debido a la expresión diferencial del microRNA en etapas críticas de la neurogénesis, fue importante determinar que vías inducen su expresión. Mediante un análisis bioinformático, se identificaron diferentes sitios de unión para factores de transcripción involucrados en el control del ciclo celular, proliferación y diferenciación celular.

De los factores de transcripción identificados, varios de ellos participan en el neurodesarrollo, algunos de ellos del hipotálamo, específicamente SF1 con un sitio de unión en el promotor 2 del microRNA-7a-2, participa en la diferenciación terminal de neuronas en el núcleo ventromedial [113]. Por otro lado Neurogenina 3, tiene un sitio de unión, es un gen proneural que funciona como factor de transcripción y se expresa en el hipotálamo embrionario en la etapa neurogénica [114]; asimismo, se ha demostrado que regula la expresión del microRNA-7 en un contexto pancreático [93],. Por lo tanto, determinar si existe una correlación entre la expresión del microRNA-7 y Neurogenina 3 en el desarrollo del hipotálamo resulta interesante.

De los factores de transcripción seleccionamos a STAT6 y CREB, puesto que son componentes de vías que participan en la diferenciación neuronal como ya lo mencionamos. De manera interesante ambos se encuentran conservados entre diferentes especies de mamíferos euterios, lo que sugiere su funcionalidad.

Como primera aproximación experimental para determinar la regulación del microRNA-7, nos pareció interesante probar si IL-4 tenía efecto sobre el promotor del microRNA-7b, el cual presenta un sitio de unión para el transductor de señales y activador de la transcripción 6 (STAT6). Sin embargo, en neuronas hipotalámicas embrionarias no tuvo efecto. Lo anterior puede deberse a que las neuronas hipotalámicas embrionarias no tienen el receptor para IL-4 o a que se observó que IL-4 regula positivamente al microRNA-7a [84] y no necesariamente también regule al microRNA-7b a pesar del sitio de unión para STAT6. En este caso sería interesante determinar la respuesta a diferentes tiempos y concentraciones.

Por otro lado, el promotor del microRNA-7b, que se expresa en el núcleo arcuato y dorsomedial, núcleo encargados en el control de la ingesta entre otras funciones importantes [79] tiene 2 sitios de unión conservados para CREB. En los resultados podemos observar que la sobreexpresión de CREB en neuronas hipotalámicas embrionarias aumentó más de 5 veces la actividad relativa de luciferasa, con respecto al tratamiento control, por lo tanto, podemos decir que CREB regula positivamente el promotor del microRNA-7b.

En el caso de la regulación de la transcripción del microRNA-7 nos pareció interesante determinar si las neurotrofinas BDNF y NGF regulan la expresión del microRNA-7. BDNF a su vez juega un papel importante en la supervivencia y diferenciación de determinadas poblaciones de neuronas durante el desarrollo [115]–[120]. Además, en la diferenciación neuronal se ha observado la participación de BDNF en la regulación de distintos microRNAs. En la diferenciación de células SH-SY5Y, una línea celular de neuroblastoma humano existe una posible implicación del microRNA-125, cuyos niveles se incrementan después de la aplicación de ácido retinoico y BDNF, donde además su expresión ectópica aumenta la diferenciación con crecimiento de neuritas [121]. El microRNA-375 también participa en la diferenciación de neuritas; en células de neuroblastoma humano BE (2)-M17 la exposición a BDNF aumentó su extensión, mientras que la sobre-expresión del microRNA-375 disminuye la acción de BDNF. Curiosamente, el crecimiento de neuritas promovido por BDNF es inhibido por el silenciamiento de HuD (proteína de unión al ARN neuronal) o por la sobreexpresión del microRNA, lo que sugiere que el microRNA-375 suprime el crecimiento de neuritas a través de disminuir los niveles de HuD [122].

De manera interesante, NGF y BDNF aumentaron los niveles de luciferasa 1.5 veces y 1.6 veces respectivamente, lo que indica que las neurotrofinas sí regulan la actividad del promotor del microRNA-7b de manera significativa.

La fosforilación de CREB puede llevarse a cabo por diversas vías en el SNC, entre ellas BDNF, quien estimula la neurogénesis [123]. Para determinar si el efecto en el

promotor del microRNA-7b se debe a BDNF a través de CREB, se llevó a cabo la sobre-expresión de CREB y estimulación con BDNF en un cultivo de neuronas hipotalámicas embrionarias, los resultados indican que BDNF es una de las vías encargadas de regular al microRNA pero no a través de CREB.

Así mismo, CREB es regulado por otras vías de señalización, factores de crecimiento y la despolarización con K^+ [124]. CREB se encuentra río abajo de las vías AMPc/PKA y MAPK/ERK1/2. La activación de estas vías transmite las señales de calcio al núcleo, donde se activan diversos factores, entre ellos CREB. A su vez PKA actúa como modulador de la duración y magnitud de la activación de ERKs [125]. Con el fin de determinar si la cascada activada por receptores NMDA, canales de calcio y GPCR a través de AMPc/PKA activa CREB se utilizó un agonista de AMPc, el dibutilil AMPc, que activa a PKA. El tratamiento con dbAMPc aumentó la actividad de luciferasa. Por lo tanto la vía de señalización AMPc/PKA puede ser la que este ejerciendo efecto sobre CREB para activar la transcripción del microRNA-7. Para confirmar que el aumento de CREB se debe a la cascada activada por AMPc/PKA utilizamos el inhibidor de PKA, H89.

Observamos que aunque se reducen los niveles de la actividad luciferasa, estos no llegan a los niveles basales, lo cual puede indicar una vía alternativa que este compensando la disminución de CREB, que podría ser a través de otras vías antes mencionadas.

En humano hay 3 loci que dan lugar a la misma secuencia madura del microRNA-7. De igual manera, en ratón existen 3 loci para el microRNA-7, sin embargo, existen 2 isoformas, el microRNA-7a-2 y el microRNA-7b que poseen la misma secuencia semilla aunque difieren en un solo nucleótido, no afectando su funcionalidad. Debido a esto, los resultados obtenidos mediante el análisis bioinformático acerca de las vías que pudieran estar regulando la expresión del microRNA-7 en ratón sugieren una función similar de estos factores de transcripción en humano.

Los resultados obtenidos nos indican que a través del análisis bioinformático podemos predecir la regulación de moléculas importantes en el desarrollo así como las vías de las que forman parte con el fin de elucidar el mecanismo molecular, en este caso del desarrollo hipotalámico. La regulación de la transcripción de los microRNAs comienza a analizarse, debido a que su expresión se da de manera espacio temporal, con el fin de controlar diferentes procesos para el desarrollo como lo es la proliferación, diferenciación y maduración en el SNC, donde los microRNAs se encuentran enriquecidos. En el hipotálamo también existe la expresión diferencial de microRNAs, como el microRNA-7, que tiene dos isoformas y a su vez se expresa durante el desarrollo y se mantiene en la etapa adulta así como en los diferentes núcleos, lo que nos habla de la función que tiene en el mantenimiento de éstos. Por otro lado, el microRNA-7 en el contexto hipotalámico tiene 1323 blancos, involucrados en diversos procesos [80], sugiriendo que participa con otras vías para mantener los diversos tipos neuronales que coexisten en el hipotálamo.

CONCLUSIONES

- CREB regula positivamente el promotor del microRNA-7b de manera significativa.
- IL-4 no regula al promotor del microRNA-7b.
- Las neurotrofinas NGF y BDNF regulan al promotor del microRNA-7b de manera significativa.
- La vía AMPc/PKA-CREB presenta una tendencia a regular el promotor del microRNA-7b.

PERSPECTIVAS

- Determinar la regulación del microRNA-7 de manera experimental por factores de transcripción involucrados en la neurogénesis, resultado del análisis bioinformático como Ngn3 y SF1.
- Definir si la vía AMPc/PKA activa a CREB para controlar la expresión de miR-7b.
- Analizar si en respuesta a la activación de CREB, el microRNA-7b regula sus genes blanco involucrados en proliferación como p21 o en la diferenciación como KLF4.

REFERENCIAS

- [1] E. R. Kandel, J. H. Schwartz, and T. M. Jessell, *Principles of Neural Science*, vol. 3, 2000.
- [2] C. A. Pearson and M. Placzek, “Development of the Medial Hypothalamus: Forming a Functional Hypothalamic-Neurohypophyseal Interface,” *Curr. Top. Dev. Biol.*, vol. 106, pp. 49–88, 2013.
- [3] Y. Machluf, A. Gutnick, and G. Levkowitz, “Development of the zebrafish hypothalamus,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1220, no. 1, pp. 93–105, 2011.
- [4] A. Simeone, M. R. D’Apice, V. Nigro, J. Casanova, F. Graziani, D. Acampora, and V. Avantaggiato, “Orthopedia, a novel homeobox-containing gene expressed in the developing CNS of both mouse and drosophila,” *Neuron*, vol. 13, no. 1, pp. 83–101, 1994.
- [5] S. M. Bardet, M. Martinez-de-la-Torre, R. G. Northcutt, J. L. R. Rubenstein, and L. Puelles, “Conserved pattern of OTP-positive cells in the paraventricular nucleus and other hypothalamic sites of tetrapods,” *Brain Res. Bull.*, vol. 75, no. 2–4, pp. 231–235, 2008.
- [6] L. Del Giacco, A. Pistocchi, F. Cotelli, A. E. Fortunato, and P. Sordino, “A peek inside the neurosecretory brain through Orthopedia lenses,” *Developmental Dynamics*, vol. 237, no. 9, pp. 2295–2303, 2008.
- [7] D. Acampora, M. P. Postiglione, V. Avantaggiato, M. Di Bonito, F. M. Vaccarino, J. Michaud, and A. Simeone, “Progressive impairment of developing neuroendocrine cell lineages in the hypothalamus of mice lacking the Orthopedia gene,” *Genes Dev.*, vol. 13, no. 21, pp. 2787–2800, 1999.
- [8] J. Blechman, N. Borodovsky, M. Eisenberg, H. Nabel-Rosen, J. Grimm, and G. Levkowitz, “Specification of hypothalamic neurons by dual regulation of the homeodomain protein Orthopedia,” *Development*, vol. 134, pp. 4417–4426, 2007.
- [9] J. L. Eaton and E. Glasgow, “Zebrafish orthopedia (otp) is required for isotocin cell development,” *Dev. Genes Evol.*, vol. 217, no. 2, pp. 149–158, 2007.
- [10] S. Ryu, J. Mahler, D. Acampora, J. Holzschuh, S. Erhardt, D. Omodei, A. Simeone, and W. Driever, “Orthopedia Homeodomain Protein Is Essential for Diencephalic Dopaminergic Neuron Development,” *Curr. Biol.*, vol. 17, no. 10, pp. 873–880, 2007.
- [11] M. Pérez-Martín, M. Cifuentes, J. M. Grondona, M. D. López-Ávalos, U. Gómez-

- Pinedo, J. M. García-Verdugo, and P. Fernández-Llebrez, “IGF-I stimulates neurogenesis in the hypothalamus of adult rats,” *Eur. J. Neurosci.*, vol. 31, pp. 1533–1548, 2010.
- [12] W. Wang and T. Lufkin, “The murine *Otp* homeobox gene plays an essential role in the specification of neuronal cell lineages in the developing hypothalamus.,” *Dev. Biol.*, vol. 227, no. 2, pp. 432–449, 2000.
- [13] J. Michaud and V. T. King, “Anthropology and Development in South-East Asia: Theory and Practice,” *J. Asian Stud.*, vol. 59, no. 4, p. 1094, 2000.
- [14] H. Löhr, S. Ryu, and W. Driever, “Zebrafish diencephalic A11-related dopaminergic neurons share a conserved transcriptional network with neuroendocrine cell lineages.,” *Development*, vol. 136, no. 6, pp. 1007–1017, 2009.
- [15] J. L. Michaud, T. Rosenquist, N. R. May, and C. M. Fan, “Development of neuroendocrine lineages requires the bHLH-PAS transcription factor SIM1,” *Genes Dev.*, vol. 12, no. 20, pp. 3264–3275, 1998.
- [16] B. Keith, D. M. Adelman, and M. C. Simon, “Targeted mutation of the murine arylhydrocarbon receptor nuclear translocator 2 (*Arnt2*) gene reveals partial redundancy with *Arnt*.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 12, pp. 6692–6697, 2001.
- [17] E. Goshu, H. Jin, J. Lovejoy, J.-F. Marion, J. L. Michaud, and C.-M. Fan, “*Sim2* contributes to neuroendocrine hormone gene expression in the anterior hypothalamus.,” *Mol. Endocrinol.*, vol. 18, no. 5, pp. 1251–62, 2004.
- [18] Y. Gao and T. Sun, “Molecular regulation of hypothalamic development and physiological functions.,” *Mol. Neurobiol.*, 2015.
- [19] L. Sousa-Ferreira, L. P. de Almeida, and C. Cavadas, “Role of hypothalamic neurogenesis in feeding regulation,” *Trends in Endocrinology and Metabolism*, vol. 25, pp. 80–88, 2014.
- [20] L. Pérez-Martínez and J. Charlie, “Factors involved in the establishment of hypothalamic neuroendocrine phenotypes,” *Mol. Endocrinol.*, pp. 1–21, 2006.
- [21] G. li Ming and H. Song, “Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions,” *Neuron*, vol. 70, pp. 687–702, 2011.
- [22] L. Zhao, K. W. Kim, Y. Ikeda, K. K. Anderson, L. Beck, S. Chase, S. a Tobet, and K. L. Parker, “Central nervous system-specific knockout of steroidogenic factor 1 results in increased anxiety-like behavior.,” *Mol. Endocrinol.*, vol. 22, no. October, pp. 1403–1415, 2008.
- [23] S. K. McConnell, “Strategies for the generation of neuronal diversity in the developing

central nervous system.,” *J. Neurosci.*, vol. 15, no. 11, pp. 6987–6998, 1995.

- [24] A. M. Krichevsky, K.-C. Sonntag, O. Isacson, and K. S. Kosik, “Specific microRNAs modulate embryonic stem cell-derived neurogenesis.,” *Stem Cells*, vol. 24, pp. 857–864, 2006.
- [25] F. Ji, X. Lv, and J. Jiao, “The role of microRNAs in neural stem cells and neurogenesis.,” *J. Genet. Genomics*, vol. 40, pp. 61–6, 2013.
- [26] M. J. Koudijs, M. J. Den Broeder, A. Keijser, E. Wienholds, S. Houwing, E. M. H. C. Van Rooijen, R. Geisler, and F. J. M. Van Eeden, “The zebrafish mutants *dre*, *uki*, and *lep* encode negative regulators of the Hedgehog signaling pathway,” *PLoS Genet.*, vol. 1, pp. 0223–0234, 2005.
- [27] E. Wienholds, W. P. Kloosterman, E. Miska, E. Alvarez-Saavedra, E. Alvarez, E. Berezikov, E. de Bruijn, H. R. Horvitz, E. De Bruijn, S. Kauppinen, R. H. A. Plasterk, W. Trust, T. Henry, W. Building, and T. C. Road, “MicroRNA expression in zebrafish embryonic development - supplement,” *Science*, vol. 309, pp. 310–1, 2005.
- [28] J. A. Nielsen, P. Lau, D. Maric, J. L. Barker, and L. D. Hudson, “Integrating microRNA and mRNA expression profiles of neuronal progenitors to identify regulatory networks underlying the onset of cortical neurogenesis.,” *BMC Neurosci.*, vol. 10, p. 98, 2009.
- [29] G. M. Borchert, W. Lanier, and B. L. Davidson, “RNA polymerase III transcribes human microRNAs.,” *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 13, pp. 1097–1101, 2006.
- [30] J. Han, Y. Lee, K. H. Yeom, J. W. Nam, I. Heo, J. K. Rhee, S. Y. Sohn, Y. Cho, B. T. Zhang, and V. N. Kim, “Molecular Basis for the Recognition of Primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 Complex,” *Cell*, vol. 125, pp. 887–901, 2006.
- [31] G. Hutvagner, J. McLachlan, A. E. Pasquinelli, E. Bálint, T. Tuschl, and P. D. Zamore, “A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the *let-7* small temporal RNA.,” *Science*, vol. 293, pp. 834–838, 2001.
- [32] F. Frank, N. Sonenberg, and B. Nagar, “Structural basis for 5’-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2.,” *Nature*, vol. 465, pp. 818–822, 2010.
- [33] M. Ghildiyal, J. Xu, H. Seitz, Z. Weng, and P. D. Zamore, “Sorting of *Drosophila* small silencing RNAs partitions microRNA* strands into the RNA interference pathway.,” *RNA*, vol. 16, pp. 43–56, 2010.
- [34] S. M. Hammond, “microRNA detection comes of age.,” *Nat. Methods*, vol. 3, no. 1, pp. 12–13, 2006.
- [35] S. M. Elbashir, S. M. Elbashir, W. Lendeckel, W. Lendeckel, T. Tuschl, and T. Tuschl, “RNA interference is mediated 1- and 22-nucleotide RNAs,” *Genes Dev.*, vol. 15, pp.

188–200, 2001.

- [36] N. Bushati and S. M. Cohen, “microRNA functions.,” *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 23, pp. 175–205, 2007.
- [37] D. D. Cao, L. Li, and W. Y. Chan, “MicroRNAs: Key regulators in the central nervous system and their implication in neurological diseases,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 17, no. 6. 2016.
- [38] B. Mayr and M. Montminy, “Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB.,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 2, no. 8, pp. 599–609, 2001.
- [39] J. Don and G. Stelzer, “The expanding family of CREB/CREM transcription factors that are involved with spermatogenesis,” in *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2002, vol. 187, no. 1–2, pp. 115–124.
- [40] B. E. Lonze and D. D. Ginty, “Function and Regulation of CREB Family Transcription Factors in the Nervous System CREB and its close relatives are now widely accepted,” *Neuron*, vol. 35, pp. 605–623, 2002.
- [41] S. Impey, S. R. McCorkle, H. Cha-Molstad, J. M. Dwyer, G. S. Yochum, J. M. Boss, S. McWeeney, J. J. Dunn, G. Mandel, and R. H. Goodman, “Defining the CREB regulon: A genome-wide analysis of transcription factor regulatory regions,” *Cell*, vol. 119, no. 7, pp. 1041–1054, 2004.
- [42] T. Yamashima, “PUFA-GPR40-CREB signaling hypothesis for the adult primate neurogenesis,” *Progress in Lipid Research*, vol. 51, no. 3. pp. 221–231, 2012.
- [43] M. R. Montminy and L. M. Bilezikjian, “Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene.,” *Nature*, vol. 328, no. 6126, pp. 175–178, 1987.
- [44] a Ghosh, D. D. Ginty, H. Bading, and M. E. Greenberg, “Calcium regulation of gene expression in neuronal cells.,” *J. Neurobiol.*, vol. 25, no. 3, pp. 294–303, 1994.
- [45] D. D. Ginty, A. Bonni, and M. E. Greenberg, “Nerve growth factor activates a Ras-dependent protein kinase that stimulates c-fos transcription via phosphorylation of CREB,” *Cell*, vol. 77, no. 5, pp. 713–725, 1994.
- [46] C. A. Ghiani, L. Beltran-Parrazal, D. M. Sforza, J. S. Malvar, A. Seksenyan, R. Cole, D. J. Smith, A. Charles, P. A. Ferchmin, and J. De Vellis, “Genetic program of neuronal differentiation and growth induced by specific activation of NMDA receptors,” *Neurochem. Res.*, vol. 32, no. 2, pp. 363–376, 2007.
- [47] H. Takeda, Y. Kitaoka, Y. Hayashi, T. Kumai, Y. Munemasa, H. Fujino, S. Kobayashi, and S. Ueno, “Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II regulates the

- phosphorylation of CREB in NMDA-induced retinal neurotoxicity,” *Brain Res.*, vol. 1184, no. 1, pp. 306–315, 2007.
- [48] K. Sharma, R. D. Mehra, P. Dhar, and U. Vij, “Chronic exposure to estrogen and tamoxifen regulates synaptophysin and phosphorylated cAMP response element-binding (CREB) protein expression in CA1 of ovariectomized rat hippocampus,” *Brain Res.*, vol. 1132, no. 1, pp. 10–19, 2007.
- [49] Y. Hu, X. Fang, S. M. Dunham, C. Prada, E. K. Stachowiak, and M. K. Stachowiak, “90-kDa ribosomal S6 kinase is a direct target for the nuclear fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1): Role in FGFR1 signaling,” *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 28, pp. 29325–29335, 2004.
- [50] D. Purves, *Neuroscience Third Edition*, vol. 3. 2004.
- [51] J. Leibrock, F. Lottspeich, A. Hohn, M. Hofer, B. Hengerer, P. Masiakowski, H. Thoenen, and Y. A. Barde, “Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor.,” *Nature*, vol. 341, no. 6238, pp. 149–152, 1989.
- [52] B. Wang, Y. Gao, Z. Xiao, B. Chen, J. Han, J. Zhang, X. Wang, and J. Dai, “Erk1/2 promotes proliferation and inhibits neuronal differentiation of neural stem cells,” *Neurosci. Lett.*, vol. 461, no. 3, pp. 252–257, 2009.
- [53] V. Triaca and P. Tirassa, “Circulating NGF antibody alters the distribution of NG2 and CD56 positive cells in the brain of an animal model of inflammatory disorder,” *Archives Italiennes de Biologie*, vol. 141, no. 2–3. pp. 127–139, 2003.
- [54] E. S. Anton, G. Weskamp, L. F. Reichardt, and W. D. Matthew, “Nerve growth factor and its low-affinity receptor promote Schwann cell migration.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 91, no. 7, pp. 2795–2799, 1994.
- [55] M. Lin, L. Yang, R. Fu, and H. Zhao, “Cloning of the eukaryotic expression vector with nerve growth factor in rats and its effects on proliferation and differentiation of mesencephal neural stem cells of fetal rats ,” *J.Huazhong.Univ.Sci.Technolog.Med.Sci.* , vol. 28, no. 1672–0733 (Print), pp. 513–516, 2008.
- [56] J. M. Angelastro, J. L. Mason, T. N. Ignatova, V. G. Kukekov, G. B. Stengren, J. E. Goldman, and L. a Greene, “Downregulation of activating transcription factor 5 is required for differentiation of neural progenitor cells into astrocytes.,” *J. Neurosci.*, vol. 25, no. 15, pp. 3889–3899, 2005.
- [57] B. O. Benoit, T. Savarese, M. Joly, C. M. Engstrom, L. Pang, J. Reilly, L. D. Recht, A. H. Ross, and P. J. Quesenberry, “Neurotrophin channeling of neural progenitor cell differentiation,” *J Neurobiol*, vol. 46, pp. 265–280, 2001.
- [58] M. B. Lachyankar, P. J. Condon, P. J. Quesenberry, N. S. Litofsky, L. D. Recht, and A.

- H. Ross, “Embryonic precursor cells that express Trk receptors: induction of different cell fates by NGF, BDNF, NT-3, and CNTF.,” *Exp. Neurol.*, vol. 144, no. 2, pp. 350–360, 1997.
- [59] K.-C. Choi, D.-S. Yoo, K.-S. Cho, P.-W. Huh, D.-S. Kim, and C.-K. Park, “Effect of single growth factor and growth factor combinations on differentiation of neural stem cells.,” *J. Korean Neurosurg. Soc.*, vol. 44, no. 6, pp. 375–381, 2008.
- [60] K. ichi Nakajima, H. Miyazaki, N. Niisato, and Y. Marunaka, “Essential role of NKCC1 in NGF-induced neurite outgrowth,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 359, no. 3, pp. 604–610, 2007.
- [61] S. Levenberg, J. a Burdick, T. Kraehenbuehl, and R. Langer, “Neurotrophin-induced differentiation of human embryonic stem cells on three-dimensional polymeric scaffolds.,” *Tissue Eng.*, vol. 11, no. 3–4, pp. 506–512, 2005.
- [62] K. Bartkowska, K. Turlejski, and R. L. Djavadian, “Neurotrophins and their receptors in early development of the mammalian nervous system,” *Acta Neurobiol. Exp. (Wars.)*, vol. 70, no. 4, pp. 454–467, 2010.
- [63] K. M. Young, T. D. Merson, A. Sotthibundhu, E. J. Coulson, and P. F. Bartlett, “p75 neurotrophin receptor expression defines a population of BDNF-responsive neurogenic precursor cells.,” *J. Neurosci.*, vol. 27, no. 19, pp. 5146–55, 2007.
- [64] E. Gascon, L. Vutskits, H. Zhang, M. J. Barral-Moran, P. J. Kiss, C. Mas, and J. Z. Kiss, “Sequential activation of p75 and TrkB is involved in dendritic development of subventricular zone-derived neuronal progenitors in vitro,” *Eur. J. Neurosci.*, vol. 21, no. 1, pp. 69–80, 2005.
- [65] C. Lameu, C. A. Trujillo, T. T. Schwindt, P. D. Negraes, M. M. Pillat, K. L. P. Morais, I. Lebrun, and H. Ulrich, “Interactions between the NO-citrulline cycle and brain-derived neurotrophic factor in differentiation of neural stem cells,” *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 35, pp. 29690–29701, 2012.
- [66] Y. Zhao and D. Srivastava, “A developmental view of microRNA function,” *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 32, no. 4, pp. 189–197, 2007.
- [67] M. Coolen and L. Bally-Cuif, “MicroRNAs in brain development and physiology,” *Current Opinion in Neurobiology*, vol. 19, no. 5, pp. 461–470, 2009.
- [68] R. Fiore, G. Siegel, and G. Schratt, “MicroRNA function in neuronal development, plasticity and disease,” *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, vol. 1779, no. 8, pp. 471–478, 2008.
- [69] E. V. Makeyev, J. Zhang, M. A. Carrasco, and T. Maniatis, “The MicroRNA miR-124 Promotes Neuronal Differentiation by Triggering Brain-Specific Alternative Pre-

mRNA Splicing,” *Mol. Cell*, vol. 27, no. 3, pp. 435–448, 2007.

- [70] L. F. Sempere, S. Freemantle, I. Pitha-Rowe, E. Moss, E. Dmitrovsky, and V. Ambros, “Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation.,” *Genome Biol.*, vol. 5, no. 3, p. R13, 2004.
- [71] M. Ha and V. N. Kim, “Regulation of microRNA biogenesis.,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 15, no. 8, pp. 509–524, 2014.
- [72] J. Horsham, F. Kalinowski, M. Epis, C. Ganda, R. Brown, and P. Leedman, “Clinical Potential of microRNA-7 in Cancer,” *J. Clin. Med.*, vol. 4, no. 9, pp. 1668–1687, 2015.
- [73] P. Landgraf, M. Rusu, R. Sheridan, A. Sewer, N. Iovino, A. Aravin, S. Pfeffer, A. Rice, A. O. Kamphorst, M. Landthaler, C. Lin, N. D. Socci, L. Hermida, V. Fulci, S. Chiaretti, R. Foà, J. Schliwka, U. Fuchs, A. Novosel, R. U. Müller, B. Schermer, U. Bissels, J. Inman, Q. Phan, M. Chien, D. B. Weir, R. Choksi, G. De Vita, D. Frezzetti, H. I. Trompeter, V. Hornung, G. Teng, G. Hartmann, M. Palkovits, R. Di Lauro, P. Wernet, G. Macino, C. E. Rogler, J. W. Nagle, J. Ju, F. N. Papavasiliou, T. Benzinger, P. Lichter, W. Tam, M. J. Brownstein, A. Bosio, A. Borkhardt, J. J. Russo, C. Sander, M. Zavolan, and T. Tuschl, “A Mammalian microRNA Expression Atlas Based on Small RNA Library Sequencing,” *Cell*, vol. 129, pp. 1401–1414, 2007.
- [74] A. Khoshnan and P. H. Patterson, “Elevated IKK?? accelerates the differentiation of human neuronal progenitor cells and induces MeCP2-dependent BDNF expression,” *PLoS One*, vol. 7, 2012.
- [75] L.-C. Cheng, E. Pastrana, M. Tavazoie, and F. Doetsch, “miR-124 regulates adult neurogenesis in the subventricular zone stem cell niche.,” *Nat. Neurosci.*, vol. 12, pp. 399–408, 2009.
- [76] C. Zhao, G. Sun, P. Ye, S. Li, and Y. Shi, “MicroRNA let-7d regulates the TLX/microRNA-9 cascade to control neural cell fate and neurogenesis.,” *Sci. Rep.*, vol. 3, p. 1329, 2013.
- [77] A. de Chevigny, N. Coré, P. Follert, M. Gaudin, P. Barbry, C. Béclin, and H. Cremer, “miR-7a regulation of Pax6 controls spatial origin of forebrain dopaminergic neurons,” *Nature Neuroscience*, vol. 15, pp. 1120–1126, 2012.
- [78] A. Pollock, S. Bian, C. Zhang, Z. Chen, and T. Sun, “Growth of the developing cerebral cortex is controlled by MicroRNA-7 through the p53 pathway,” *Cell Rep.*, vol. 7, pp. 1184–1196, 2014.
- [79] S. Herzer, A. Silahtaroglu, and B. Meister, “Locked Nucleic Acid-Based In Situ Hybridisation Reveals miR-7a as a Hypothalamus-Enriched MicroRNA with a Distinct Expression Pattern,” *J. Neuroendocrinol.*, vol. 24, no. 12, pp. 1492–1504, 2012.

- [80] K. F. Meza-Sosa, “microRNAs: reguladores del desarrollo del hipotálamo y del proceso de transformación celular,” Universidad Nacional Autónoma de México, 2015.
- [81] Y. Cui, Z. Xiao, T. Chen, J. Wei, L. Chen, L. Liu, B. Chen, X. Wang, X. Li, and J. Dai, “The miR-7 identified from collagen biomaterial-based three-dimensional cultured cells regulates neural stem cell differentiation.,” *Stem Cells Dev.*, vol. 23, no. 4, pp. 393–405, 2014.
- [82] S. D. N. Reddy, K. Ohshiro, S. K. Rayala, and R. Kumar, “MicroRNA-7, a homeobox D10 target, inhibits p21-activated kinase 1 and regulates its functions,” *Cancer Res.*, vol. 68, no. 20, pp. 8195–8200, 2008.
- [83] Y. T. Chou, H. H. Lin, Y. C. Lien, Y. H. Wang, C. F. Hong, Y. R. Kao, S. C. Lin, Y. C. Chang, S. Y. Lin, S. J. Chen, H. C. Chen, S. Der Yeh, and C. W. Wu, “EGFR promotes lung tumorigenesis by activating miR-7 through a Ras/ERK/Myc pathway that targets the Ets2 transcriptional repressor ERF,” *Cancer Res.*, vol. 70, no. 21, pp. 8822–8831, 2010.
- [84] J. R. Sissons, J. J. Peschon, F. Schmitz, R. Suen, M. Gilchrist, and A. Aderem, “Cutting edge: microRNA regulation of macrophage fusion into multinucleated giant cells.,” *J. Immunol.*, vol. 189, no. 1, pp. 23–7, 2012.
- [85] G. J. Morton, D. E. Cummings, D. G. Baskin, G. S. Barsh, and M. W. Schwartz, “Central nervous system control of food intake and body weight.,” *Nature*, vol. 443, no. 7109, pp. 289–95, 2006.
- [86] K. K.-H. Farh, A. Grimson, C. Jan, B. P. Lewis, W. K. Johnston, L. P. Lim, C. B. Burge, and D. P. Bartel, “The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution.,” *Science*, vol. 310, no. 5755, pp. 1817–1821, 2005.
- [87] E. Junn, K.-W. Lee, B. S. Jeong, T. W. Chan, J.-Y. Im, and M. M. Mouradian, “Repression of alpha-synuclein expression and toxicity by microRNA-7.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 31, pp. 13052–7, 2009.
- [88] M. Bak, A. Silahatoglu, M. Møller, M. Christensen, M. F. Rath, B. Skryabin, N. Tommerup, and S. Kauppinen, “MicroRNA expression in the adult mouse central nervous system.,” *RNA*, vol. 14, pp. 432–444, 2008.
- [89] M. Latreille, J. Hausser, I. Stutz, Q. Zhang, B. Hastoy, S. Gargani, J. Kerr-Conte, F. Pattou, M. Zavolan, J. L. S. Esguerra, L. Eliasson, T. Ruckelshausen, P. Rorsman, and M. Stoffel, “MicroRNA-7a regulates pancreatic β cell function,” *J. Clin. Invest.*, vol. 124, no. 6, pp. 2722–2735, 2014.
- [90] H. Li, Q. Xi, Y. Xiong, X. Cheng, Q. Qi, L. Yang, G. Shu, S. Wang, L. Wang, P. Gao, X. Zhu, Q. Jiang, Y. Zhang, and L. Yuan, “A comprehensive expression profile of microRNAs in porcine pituitary,” *PLoS One*, vol. 6, no. 9, 2011.

- [91] Y. Greenman, Y. Kuperman, Y. Drori, S. L. Asa, I. Navon, O. Forkosh, S. Gil, N. Stern, and A. Chen, "Postnatal ablation of POMC neurons induces an obese phenotype characterized by decreased food intake and enhanced anxiety-like behavior.," *Mol. Endocrinol.*, vol. 27, no. July, pp. 1091–102, 2013.
- [92] M. Schneeberger, R. Gomis, and M. Claret, "Hypothalamic and brainstem neuronal circuits controlling homeostatic energy balance," *Journal of Endocrinology*, vol. 220, no. 2. 2014.
- [93] S. Kredon-Russo, A. Ness, A. D. Mandelbaum, M. D. Walker, and E. Hornstein, "Regulation of pancreatic microRNA-7 expression," *Exp. Diabetes Res.*, vol. 2012, 2012.
- [94] C. Brodie, A. Oshiba, H. Renz, K. Bradley, and E. W. Gelfand, "Nerve growth-factor and anti-CD40 provide opposite signals for the production of IgE in interleukin-4-treated lymphocytes," *Eur. J. Immunol.*, vol. 26, no. 1, pp. 171–178, 1996.
- [95] D. M. Araujo and C. W. Cotman, "Trophic effects of interleukin-4, -7 and -8 on hippocampal neuronal cultures: potential involvement of glial-derived factors," *Brain Res.*, vol. 600, no. 1, pp. 49–55, 1993.
- [96] S. Dworkin and T. Mantamadiotis, "Targeting CREB signalling in neurogenesis," *Expert Opin Ther Targets*, vol. 14, no. 8, pp. 869–879, 2010.
- [97] C. Loudes, F. Petit, C. Kordon, and a Faivre-Bauman, "Distinct populations of hypothalamic dopaminergic neurons exhibit differential responses to brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neurotrophin-3 (NT3).," *Eur. J. Neurosci.*, vol. 11, no. 2, pp. 617–24, 1999.
- [98] M. Guerra-Crespo, C. Pérez-Monter, S. C. Janga, S. Castillo-Ramírez, R. M. Gutiérrez-Rios, P. Joseph-Bravo, L. Pérez-Martínez, and J.-L. Charli, "Transcriptional profiling of fetal hypothalamic TRH neurons.," *BMC Genomics*, vol. 12, no. 1, p. 222, 2011.
- [99] O. Butovsky, M. Koronyo-Hamaoui, G. Kunis, E. Ophir, G. Landa, H. Cohen, and M. Schwartz, "Glatiramer acetate fights against Alzheimer's disease by inducing dendritic-like microglia expressing insulin-like growth factor 1.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 31, pp. 11784–11789, 2006.
- [100] M. L. Estes, K. Iwasaki, B. S. Jacobs, and B. P. Barna, "Interleukin-4 down-regulates adult human astrocyte DNA synthesis and proliferation," *Am. J. Pathol.*, vol. 143, no. 2, pp. 337–341, 1993.
- [101] B. P. Barna, M. L. Estes, J. Pettay, K. Iwasaki, P. Zhou, and gene H. Barnett, "Human astrocyte growth regulation: interleukin-4 sensitivity and receptor expression," *J. Neuroimmunol.*, vol. 60, no. 1–2, pp. 75–81, 1995.

- [102] a Sholl-Franco, K. G. Figueiredo, and E. G. de Araujo, "Interleukin-2 and interleukin-4 increase the survival of retinal ganglion cells in culture.," *Neuroreport*, vol. 12, no. 1, pp. 109–12, 2001.
- [103] F. Wirjatijasa, F. Dehghani, R. A. Blaheta, H. W. Korf, and N. P. Hailer, "Interleukin-4, interleukin-10, and interleukin-1-receptor antagonist but not transforming growth factor- β induce ramification and reduce adhesion molecule expression of rat microglial cells," *J. Neurosci. Res.*, vol. 68, no. 5, pp. 579–587, 2002.
- [104] S. Dworkin, J. Malaterre, F. Hollande, P. K. Darcy, R. G. Ramsay, and T. Mantamadiotis, "cAMP response element binding protein is required for mouse neural progenitor cell survival and expansion," *Stem Cells*, vol. 27, no. 6, pp. 1347–1357, 2009.
- [105] C. A. G. Marshall, S. O. Suzuki, and J. E. Goldman, "Gliogenic and neurogenic progenitors of the subventricular zone: Who are they, where did they come from, and where are they going?," *Glia*, vol. 43, no. 1, pp. 52–61, 2003.
- [106] F. D. Miller and A. S. Gauthier, "Timing Is Everything: Making Neurons versus Glia in the Developing Cortex," *Neuron*, vol. 54, no. 3, pp. 357–369, 2007.
- [107] R. Jagasia, K. Steib, E. Englberger, S. Herold, T. Faus-Kessler, M. Saxe, F. H. Gage, H. Song, and D. C. Lie, "GABA-cAMP response element-binding protein signaling regulates maturation and survival of newly generated neurons in the adult hippocampus.," *J. Neurosci.*, vol. 29, no. 25, pp. 7966–77, 2009.
- [108] F. Liu, A. Xuan, Y. Chen, J. Zhang, L. Xu, Q. Yan, and D. Long, "Combined effect of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor on neuronal differentiation of neural stem cells and the potential molecular mechanisms.," *Mol. Med. Rep.*, pp. 1–7, 2014.
- [109] B. L. Kee, J. Arias, and M. R. Montminy, "Adaptor-mediated recruitment of RNA polymerase II to a signal-dependent activator," *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 5, pp. 2373–2375, 1996.
- [110] M. Hagiwara, "[Transcriptional regulation by cAMP and calcium]," *Nihon Yakurigaku Zasshi*, vol. 107, no. 2, pp. 47–52, 1996.
- [111] G. A. Gonzalez and M. R. Montminy, "Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133," *Cell*, vol. 59, no. 4, pp. 675–680, 1989.
- [112] A. J. Shaywitz and M. E. Greenberg, "CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals.," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 68, pp. 821–861, 1999.

- [113] P. V. Tran, M. B. Lee, O. Mar??n, B. Xu, K. R. Jones, L. F. Reichardt, J. R. Rubenstein, and H. A. Ingraham, "Requirement of the orphan nuclear receptor SF-1 in terminal differentiation of ventromedial hypothalamic neurons," *Mol. Cell. Neurosci.*, vol. 22, no. 4, pp. 441–453, 2003.
- [114] M. Pelling, N. Anthwal, D. McNay, G. Gradwohl, A. B. Leiter, F. Guillemot, and S. L. Ang, "Differential requirements for neurogenin 3 in the development of POMC and NPY neurons in the hypothalamus," *Dev. Biol.*, vol. 349, pp. 406–416, 2011.
- [115] R. M. Lindsay, H. Thoenen, and Y. a Barde, "Placode and neural crest-derived sensory neurons are responsive at early developmental stages to brain-derived neurotrophic factor.," *Dev. Biol.*, vol. 112, no. 2, pp. 319–28, 1985.
- [116] R. F. Alderson, A. L. Alterman, Y. A. Barde, and R. M. Lindsay, "Brain-derived neurotrophic factor increases survival and differentiated functions of rat septal cholinergic neurons in culture.," *Neuron*, vol. 5, no. 3, pp. 297–306, 1990.
- [117] B. Knüsel, J. W. Winslow, A. Rosenthal, L. E. Burton, D. P. Seid, K. Nikolics, and F. Hefti, "Promotion of central cholinergic and dopaminergic neuron differentiation by brain-derived neurotrophic factor but not neurotrophin 3.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 88, no. 3, pp. 961–5, 1991.
- [118] A. Ghosh, J. Carnahan, and M. E. Greenberg, "Requirement for BDNF in Activity-Dependent Survival of Cortical Neurons," *Science (80-.)*, vol. 263, no. 5153, pp. 1618–1623, 1994.
- [119] L. a Mamounas, M. E. Blue, J. a Siuciak, and C. a Altar, "Brain-derived neurotrophic factor promotes the survival and sprouting of serotonergic axons in rat brain.," *J. Neurosci.*, vol. 15, no. 12, pp. 7929–39, 1995.
- [120] P. M. Schwartz, P. R. Borghesani, R. L. Levy, S. L. Pomeroy, and R. A. Segal, "Abnormal cerebellar development and foliation in BDNF(-/-) mice reveals a role for neurotrophins in CNS patterning," *Neuron*, vol. 19, no. 2, pp. 269–281, 1997.
- [121] Y. K. Lee, I. S. Choi, Y. H. Kim, K. H. Kim, S. Y. Nam, Y. W. Yun, M. S. Lee, K. W. Oh, and J. T. Hong, "Neurite outgrowth effect of 4-o-methylhonokiol by induction of neurotrophic factors through ERK activation," *Neurochem. Res.*, vol. 34, no. 12, pp. 2251–2260, 2009.
- [122] K. Abdelmohsen, E. R. Hutchison, E. K. Lee, Y. Kuwano, M. M. Kim, K. Masuda, S. Srikantan, S. S. Subaran, B. S. Marasa, M. P. Mattson, and M. Gorospe, "miR-375 inhibits differentiation of neurites by lowering HuD levels.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 30, no. 17, pp. 4197–210, 2010.
- [123] Q. Zhang, G. Liu, Y. Wu, H. Sha, P. Zhang, and J. Jia, "BDNF promotes EGF-induced proliferation and migration of human fetal neural stem/progenitor cells via the

PI3K/Akt pathway,” *Molecules*, vol. 16, no. 12, pp. 10146–10156, 2011.

- [124] S. Impey, K. Obrietan, S. T. Wong, S. Poser, S. Yano, G. Wayman, J. C. Deloulme, G. Chan, and D. R. Storm, “Cross talk between ERK and PKA is required for Ca²⁺ stimulation of CREB-dependent transcription and ERK nuclear translocation,” *Neuron*, vol. 21, no. 4, pp. 869–883, 1998.
- [125] S. Baldassa, R. Zippel, and E. Sturani, “Depolarization-induced signaling to Ras, Rap1 and MAPKs in cortical neurons,” *Mol. Brain Res.*, vol. 119, no. 1, pp. 111–122, 2003.
- [126] J. P.-M. L. Charli, “Factors involved in the establishment of hypothalamic neuroendocrine phenotypes,” *Mol. Endocrinol.*, pp. 1–21, 2006.
- [127] K. F. Meza-Sosa, G. Pedraza-Alva, and L. PÃ©rez-MartÃ©nez, “microRNAs: key triggers of neuronal cell fate,” *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 8, p. 175, 2014.

