



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**FUNCIÓN DE MIR-7 EN EL CONTROL POST-TRANSCRIPCIONAL DE LAS
PROTEÍNAS DEL CITOESQUELETO SEPTINA1, SEPTINA8 Y PROFILINA2 Y
SU IMPORTANCIA EN LA DIFERENCIACIÓN NEURONAL HIPOTALÁMICA**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias**

PRESENTA:

**Biól. Experimental
Jimena Alejandra López Mejía**

TUTOR PRINCIPAL

**Dra. Leonor Pérez Martínez
Instituto de Biotecnología**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**Dr. José Luis Reyes Taboada
Instituto de Biotecnología
Dr. Luis Cárdenas Torres
Instituto de Biotecnología**

Cuernavaca, Morelos. 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

MIEMBROS DEL COMITÉ JURADO

Dra. Susana López Charretón (IBT- UNAM)

M. en C. Ma. Del Carmen Quinto Hernández (IBT- UNAM)

Dra. Denhi Schnabel Peraza (IBT-UNAM)

Dra. Magdlena Guerra Crespo (IFC-UNAM)

Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán (IBT-UNAM)

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Neuroinmunobiología del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) bajo la tutoría de la Dra. Leonor Pérez Martínez. Este proyecto se realizó gracias al financiamiento otorgado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT, IN213316 y PAPIIT IN212316) y del CONACYT (155290).

Agradecimientos

Principalmente a mi tutora la Dra. Leonor Pérez Martínez quién me permitió ser parte de su grupo, gracias por compartir su tiempo, conocimiento y consejo para la realización mi tesis y por permitirme adquirir este conocimiento y experiencia. Participar en su grupo determinó un nuevo interés en mí por la neurobiología. Apreció mucho su ayuda y paciencia.

Al Dr. Gustavo Pedraza por su gran disposición y tiempo para resolver mis dudas referentes a diversas metodologías del laboratorio, aprendí mucho de su consejo y guía.

A mi comité tutorial integrado por el Dr. José Luis Reyes Taboada y el Dr. Luis Cárdenas Martínez por su tiempo, atención e invaluable recomendaciones en la realización y orientación del presente trabajo y gracias por compartirme y contagiarme su pasión por sus temas de investigación.

A los miembros de mi jurado de examen la Dra. Susana López Charretón, la M. en C. Ma. del Carmen Quinto Hernández, la Dra. Denhi Schnabel Peraza, la Dra. Magdalena Guerra Crespo, y el Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán por su punto de vista crítico y contribución en la finalización de mi proyecto de maestría, tuve la oportunidad de tomar clases con algunos de ustedes y aprecio mucho su labor al transmitir su conocimiento.

Al T.A. Oswaldo López Gutiérrez, por todo el apoyo técnico en los procedimientos de biología molecular que fueron primordiales para la obtención de resultados en mi investigación y representaron un gran aprendizaje.

A la M. en C. Verónica Jimenez Jacinto de la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática del IBt y a la Dra. Leticia Vega Alvarado del Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico de la UNAM, por su valioso trabajo y ayuda en la obtención de los datos de secuenciación.

A la M. en C. Sol Díaz de León y la Dra. Martha Pedraza Escalona, por el rigor, paciencia y ayuda en el desarrollo de mi tesis.

A la Dra. Karla Meza Sosa por compartir conmigo la información obtenida en el laboratorio, así como ayudarme con diversas dudas respecto a los antecedentes de mi trabajo. Al Dr. David Valle por su ayuda con el manejo de software utilizado en la investigación y la información de la transcriptómica. Al Dr. Iván Velasco y a su técnico el Dr. Daniel Cortés Pérez por su donación de material y su gran disposición de ayuda.

Y a Clara Maritza Díaz Aldama por su asistencia y guía en lo referente a todos los temas administrativos.

Dedicatoria

A Dios que me ha permitido vivir una vida llena de grandes retos, aprendizaje y alegría.

A mi mamá Rosy Mejía, por ser la única persona con la paciencia disponible para preguntarme y tratar de entender las cosas que hago, gracias por tu escucha, consejo y ejemplo que me empujan a seguir adelante. A mi papá Sergio López por su apoyo y atenciones que me alegran y hacen mi vida más ligera. A mi familia mi tía July, Mimí, Maricela, mi abu Mercedes y mis primos Fer, y Emmanuel, sigamos siempre pendientes de cada uno cuidándonos y queriéndonos siempre, gracias por todo su cariño.

A mi novio Víctor gracias por tu apoyo incondicional, por la comprensión y por seguirme el ritmo. No importa lo que nos falte por vivir, lo importante es que vamos juntos.

A los Dres. Leonor y Gustavo por los consejos y detalles personales; a todo el grupo NIB; gracias Sol por el coaching de laboratorio y personal eres lo más, Oswaldo me llevo un gran amigo, gracias por la segunda oportunidad, todas las enseñanzas y los consejos; Dra. Martha gracias por la amabilidad y ayuda, Nilda una sonrisa en sábado es lo máximo cuando se trabaja en fin de semana gracias, Tonalí business partner gracias por tu comprensión y éxito en todo. Rafa, Edgardo, Tomás gracias por su ayuda en el lab y gracias por su amistad. Toño y Alonso compartimos mucho tiempo de trabajo y personal, los voy a extrañar. Masami y Fernanda fue un gran reto ayudarles y compartir lo hasta ahora aprendido, fue un gusto conocerlas.

A todos los NIBs antes mencionados, así como Cristi, Azu, Roberto, Elisa, Eladio, Angélica, Erik, Jorge, Alejandro, Nico, Víctor, Bolívar, Uriel, Rubicelí, gracias por los pequeños y grandes detalles, están locos y son unos apasionados increíbles gracias por su amistad, los quiero. ¡A César, cuánta falta nos haces!

A mis compañeros de maestría por las reuniones de estudio, la escucha, los pasteles de cumpleaños y los partidos de fut, fue un gusto conocerlos.

Abreviaturas

- **µg**: microgramos
- **µl**: microlitros
- **3'UTR**: región 3' no traducida
- **5'UTR**: región 5' no traducida
- **AgRP**: proteína relacionada a Agouti
- **AHN**: núcleo hipotalámico anterior
- **ANR**: cresta neural anterior
- **AN**: núcleo arcuato
- **ANSC**: células troncales neurales de adulto
- **aPV**: núcleo anterior paraventricular
- **ARNT2**: translocador nuclear de receptores de hidrocarburos arilo 2
- **Arp2/3**: proteína relacionada a actina 2/3
- **ASPM**: microcefalia asociada al huso mitótico anormal
- **AVE**: endodermo visceral anterior
- **AVP**: vasopresina
- **BDNF**: factor neurotrófico derivado del cerebro
- **bHLH**; hélice bucle hélice básico
- **BMP**: proteína morfogénica de hueso
- **CDCR1**: antígeno 1 relacionado a degeneración del cerebelo
- **ce**: cerebelo
- **CoREST**: corepresor de REST
- **CREB**: proteína de unión a elementos de respuesta cAMP
- **CRH**: hormona liberadora de corticotropina
- **DA**: dopamina
- **DLHP**: punto de visagra dorso-lateral
- **DMN**: núcleo hipotalámico dorsomedial
- **DNA**: ácido desoxiribonucleico
- **DRG**: raíz dorsal gangliónica
- **DVE**: endodermo visceral distal
- **E**: día embrionario
- **EMT**: transición epitelial-mesenquimal
- **ESCs**: células troncales embrionarias
- **ETS**: E26 específico de transformación
- **Exe**: ectodermo extraembrionario
- **FGF**: factor de crecimiento de fibroblastos
- **FT**: factor de transcripción
- **GFP**: proteína verde fluorescente
- **GHRH**: hormona liberadora de hormona de crecimiento
- **GnRH**: hormona liberadora de gonadotropina
- **GO**: ontología genética
- **GSK3**: glucogéno cinasa 3
- **h**: horas
- **Hnrpk**: ribonucleoproteína nuclear heterogénea K
- **ICM**: masa celular interna
- **IPs**: progenitores neuronales intermedios
- **iSO**: organizador del istmo
- **Itgb11**: integrina beta-1
- **Klf4**: factor similar a Kruppel 4
- **Klf2**: factor similar a Kruppel 2

- **Lamc1**: laminina gama-1
- **lncRNAs**: RNAs largos no codificantes
- **MAP**: proteína de unión a microtúbulos
- **Mash1**: homólogo 1 de achaete scute en mamíferos también conocido como ASCL1
- **MeCP2**: proteína de unión a metil CpG
- **MENA**: homólogo del *Drosophila enabled* en ratón
- **MET**: transición mesenquimal-epitelial
- **MHB**: límite entre el mesencéfalo y romboencéfalo
- **MHP**: punto de visagra medio
- **miRNA mimics**: miRNA sintetizado de manera sintética con la misma función
- **miRNA**: microRNA (hace referencia al miRNA maduro o guía)
- **miRNA***: microRNA complementario
- **mRNA**: RNA mensajero
- **MSI2**: homólogo de Musashi 12
- **n-Myc**: intercambiable con c-Myc
- **NECs**: células neuroepiteliales
- **NFIA**: factor nuclear IA
- **NGF**: factor de crecimiento nervioso
- **Ngn1**: neurogenina 1
- **Ngn2**: neurogenina 2
- **NSCs**: células troncales neurales
- **NPY**: neuropeptido Y
- **NT3/4**: neurotrofina 3
- **nts**: nucleótidos
- **Otp**: ortopedia
- **OXT**: oxitocina
- **p53**: gen supresor de tumores p53
- **Par3**: proteína de partición defectuosa 3
- **Par6**: proteína de partición defectuosa 6
- **Pfn**: profilina
- **PI**: progenitores intermedios
- **PtdIns(4,5)P2**: fosfatidilinositol 4,5bifosfato
- **Ptbp1**: proteína 1 de unión a intervalo de polipirimidinas
- **PrPc**: proteína priónica celular
- **pre-mirNA**: miRNA precursor
- **pri-miRNA**: transcrito primario de miRNA
- **PVN**: núcleo paraventricular
- **PVZ**: zona periventricular
- **RE1**: elemento represor 1
- **REST**: factor de transcripción silenciador de RE1
- **RISC**: complejo silenciador inducido por miRNAs
- **RGCs**: células de la glía radial
- **RMST**: transcrito 2 asociado a rhabdomyosarcoma
- **RNAs**: ácido ribonucleico
- **RNA Pol II**: polimerasa II de ácido ribonucleico
- **RhoA**: homólogo de la familia de Ras, miembro A
- **ROCK**: cinasa dependiente de RhoA
- **Sp1**: proteína de especificidad 1
- **SHH**: Sonic hedgehog
- **Sim1**: homólogo a single-minded 1
- **SCN**: núcleo superequiasmático

- **Scp1:** fosfatasa pequeña de CTD
- **Sept:** septina
- **SGZ:** zona subgranular
- **siRNAs:** pequeños RNAs interferentes
- **SNC:** sistema nervioso central
- **SST:** somatostatina
- **SON:** núcleo supraóptico
- **Sox2/9:** caja-2/9 del gen y determinante del sexo *Sry*
- **STAT6:** transductor de señal y activador de la transcripción
- **SVZ:** zona subventricular
- **Tfcp2l1:** factor de transcripción similar a cp2-1
- **TGF- β :** factor de crecimiento transformante β
- **T β RI:** receptor de TGF β tipo I
- **TLX:** receptor nuclear huérfano tailless
- **TPML:** transcritos por millón de lectura
- **TRH:** hormona liberadora de tirotropina
- **VE:** endodermo visceral
- **VMN:** núcleo hipotalámico ventromedial
- **VZ:** zona ventricular
- **WIP:** proteína de interacción con WASP
- **ZLI:** zona limitante intratalámica

INDICE

	Abreviaturas	7
	Resumen	13
	Abstract	14
I.	Introducción	15
	I.I Desarrollo del sistema nervioso central	15
	I.II Neurogénesis	17
	I.III Rearreglos del citoesqueleto durante la neurogénesis	21
	I.IV Regulación de la neurogénesis	23
	I.IV.I Regulación epigenética	23
	I.IV.II Regulación post-transcripcional	24
	I.IV.II.I miRNAs	24
	I.IV.II.I.I miR-7	26
	I.V El hipotálamo	27
	I.V.I Factores de transcripción en el desarrollo del hipotálamo	28
	I.V.II Función de miR-7 en el hipotálamo	30
II.	Antecedentes	31
	II.I Factores de transcripción importantes en la determinación del fenotipo TRHérgico	31
	II.II Ensayo de “pull-down” para la identificación de los genes blanco de miR-7 en una línea celular hipotalámica embrionaria	31
	II.III identificación de blancos de miR-7	32
	II.III.I Septina1 y Septina8, generalidades y función durante la neurogénesis	33
	II.III.II Pfn2, generalidades y función durante la neurogénesis	35
	II.IV Análisis transcriptómicos de RNAseq y miRseq en el hipotálamo	36
III.	Justificación	38
IV.	Hipótesis	39
V.	Objetivos	39
	V.II Objetivo general	39
	V.III Objetivos particulares	39
VI.	Materiales y métodos	39
	VI.I Cultivo celular	39
	VI.II Análisis bioinformático de sitios de unión para miR-7	40
	VI.III Análisis del enriquecimiento de vías de señalización en blancos de “pull-down”	40
	VI.IV Análisis de enriquecimiento de vías para generar redes de interacción en citoesqueleto	41
	VI.V Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	41
	VI.V.I 3’UTRs nativas	41
	VI.V.II 3’UTRs mutagénicas	42
	VI.VI Electroforesis de DNA en gel	43
	VI.VII Purificación de DNA	43

VI.VIII	Obtención de clonas	43
VI.VIII.I	Obtención de clonas recombinantes nativas	43
VI.VIII.II	Obtención de clonas recombinantes mutantes	46
VI.VIII.III	Obtención de clonas con vector de disrupción de gen letal	46
VI.VIII.IV	Restricción diagnóstica	47
VI.IX	Purificación y secuenciación	47
VI.X	Transfecciones	47
VI.X.I	Cotranfección de miRNAs y 3'UTRs y ensayos de luciferasa	47
VI.X.II	Tranfección de miRNAs y 3'UTRs para ensayos de Western-blot	48
VI.XI	Extracción de proteína y Western-blots	49
VI.XII	Extracción de RNA, transcripción reversa y qPCR de miR-7	49
VI.XIII	Análisis estadístico	50
VII.	Resultados	51
VII.I	La regulación del citoesqueleto es una vía representativa en el conjunto de genes del "pull-down" de miR-7	50
VII.II	Características termodinámicas y de conservación de <i>Sept1</i> , <i>Sept8</i> y <i>Pfn2</i> los hacen ser candidatos blancos de miR-7	59
VII.III	miR-7 reconoce sitios de unión altamente conservados en la 3'UTR de <i>Sept8</i> y <i>Pfn2</i>	60
VII.IV	En cada familia de clasificación <i>Sept1</i> y <i>Sept8</i> tienen la más alta probabilidad de ser blancos de miR-7	61
VII.V	Obtención de construcciones recombinantes nativas y mutantes de <i>Sept1</i> , <i>Sept8</i> y <i>Pfn2</i>	62
VII.VI	Expresión de miR-7 en líneas celulares mHypo-N1 y HEK-293	63
VII.VII	Ensayos de transfección y actividad de luciferasa	64
VII.VII.I	Cotransfección de células N1 con la 3'UTR de <i>Sept8.1</i> , <i>Sept8.2</i> y <i>Pfn26</i>	64
VII.VII.II	Cotransfección de células HEK-293 con la 3'UTR de <i>Sept1</i> , <i>Sept8.1</i> , <i>Sept8.2</i> y <i>Pfn2</i>	66
VII.VIII	Western-blot de células mHypoE-N1 transfectadas con miR-7	71
VII.IX	Western-blot de células HEK-293 transfectadas con miR-7	72
VII.X	Niveles proteicos de SEPT1, SEPT8 y PFN2 en la línea celular ESC-R1	75
VIII.	Discusión	77
IX.	Conclusión	84
X.	Perspectivas	85
XI.	Referencias	86
XII.	Figuras suplementarias	101
	Fig .1 Genes que participan en la vía "Regulación del citoesqueleto de actina"	101
	Fig S.2 Genes que participan en la vía de enriquecimiento "Citoesqueleto, regulación del rearrreglo del citoesqueleto"	102
	Fig S.3 Características de 3'UTR de clonas y amplicón clonado	

en psiCHECK-2	103
Fig S4. Resultados del alineamiento de la secuenciación de las clonas recombinante de Sept8.1, Sept8.2 y Pfn2 en el vector psiCHECK-2	105
Fig S.5 Alineamiento y secuenciación de 3'UTRs mutantes	107
Fig S.6 Efecto de la transfección de miR-7 en la traducción de las proteínas SEPT1, SEPT8 y PFN2 en células HEK-293 en 24 y 36 h	108
Fig S.7 Densitometría de la transfección de miR-7 en la traducción de las proteínas SEPT1, SEPT8 y PFN2 en células HEK-293 en 24 h	109

Resumen

El sistema nervioso central surge durante la gastrulación, o etapa trilaminar embrionaria, a partir del ectodermo y forma en el adulto el cerebro y la médula espinal. El cerebro está formado por estructuras discretas con funciones específicas que interactúan para el correcto funcionamiento de este órgano. Para nuestro grupo de trabajo, el hipotálamo es una estructura de fundamental interés pues conecta al SNC con el sistema endócrino y es capaz de responder a diversos estímulos, para controlar funciones como el control de la ingesta, el peso corporal y gasto energético, el balance de agua, los ciclos circadianos, el sueño etc.; es decir, mantiene la homeostasis corporal. Con respecto al desarrollo del hipotálamo, se conocen diversos factores de transcripción importantes que son indispensables para la expresión de neurotransmisores y hormonas específicas. No obstante, se desconoce el programa de diferenciación específico que lleva al desarrollo de los fenotipos presentes en el hipotálamo, así como los factores que lo regulan. En este sentido, se sabe que el control post-transcripcional llevado a cabo por microRNAs ejerce un rol importante en la regulación de la neurogénesis.

El citoesqueleto neuronal sufre múltiples cambios durante todas las etapas de su desarrollo y maduración, que le permiten cambiar la morfología redonda de un precursor a la de una neurona madura formada de diversas dendritas cortas y un axón largo que se dirigen a localizaciones específicas para hacer sinapsis y contribuir a la funcionalidad neuronal. Así pues, la regulación de los componentes del citoesqueleto; es decir: los microfilamentos de actina, microtúbulos, filamentos intermedios y septinas es de suma importancia en el desarrollo del cerebro. MiR-7 es un microRNA que tiene funciones relevantes en la diferenciación cortical y del bulbo olfatorio, además está conservado evolutivamente por lo que se considera parte de su “huella molecular”. Éste microRNA es relevante en el hipotálamo pues se expresa de manera importante en varios de los núcleos que lo conforman y en nuestro laboratorio se encontró que tiene como blanco funcional al factor de transcripción Klf4 importante para el desarrollo de neuronas hipotalámicas que producen hormona liberadora de tirotrópina.

Mediante la información obtenida por un ensayo de “pull-down”, o captura de blancos de miR-7 en una línea celular embrionaria hipotalámica se identificó un conjunto de genes importantes en el citoesqueleto neuronal, entre los que se encontró a Septina1, Septina8 y Profilina2, que se expresan enriquecidos en el sistema nervioso central, pero se desconoce su función en la neurogénesis hipotalámica. Se hizo uso de tres plataformas bioinformáticas TargetScan, miRanda-miRSVR y PITA; y se confirmó que Septina1, Septina8 y Profilina2 son blancos probables de miR-7 por sus características termodinámicas y de conservación. Dicha interacción se validó por ensayos de luciferasa únicamente para Septina1 y Profilina2; y se mostró que esta unión es específica ya que mutaciones de la 3'UTR en el sitio de unión de miR-7 inhiben dicha interacción. A pesar de que no se identificó los efectos de la inhibición reflejados en una disminución en los niveles proteicos de ambos blancos, resulta de interés ahondar en el estudio del efecto biológico de la unión entre miR-7 y la 3'UTR de Septina1 y Profilina2. Lo anterior, ofrece la posibilidad de conocer cómo la regulación del citoesqueleto neuronal impacta en la diferenciación y funcionalidad hipotalámica, así como en la homeostasis corporal.

Abstract

The central nervous system arises during the gastrulation from the ectoderm, this phase is also known as the embryonic trilaminar stage, and forms the adult brain and spinal cord. The brain is formed by discrete structures with specific functions which interact for the proper functioning of this organ. The hypothalamus is of fundamental interest for our work group since it connects the CNS to the endocrine system, and it can respond to various stimuli to control functions such as control of ingestion, body weight and energy expenditure, water balance, circadian cycles, sleep etc.; in other words, it maintains body homeostasis. Regarding the developmental process of the hypothalamus there are several important transcription factors known to be necessary for the expression of specific neurotransmitters and hormones. However, the specific differentiation program that leads to the development of different phenotypes in the hypothalamus, as well as the factors that regulate it is unknown. Concerning this, it is known that the post-transcriptional control carried out by microRNAs plays an important role in the regulation of neurogenesis.

The neuronal cytoskeleton undergoes multiple structural changes during all its developmental stages and maturation, shifting shape from an all rounded precursor to that of a mature neuron that is formed by several short dendrites and a long axon that place themselves in specific locations to make synapses and contribute to neuronal functionality. Therefore, the regulation of the cytoskeletal components; actin microfilaments, microtubules, intermediate filaments and septins, is of great importance in the development of the brain. MiR-7 is a microRNA with relevant functions in the differentiation of cortical and olfactory bulb precursors, and in addition it is considered as the “molecular footprint” of the hypothalamus since it is evolutionarily conserved in neurosecretory centers. This miRNA is relevant in the hypothalamus because it is expressed in some of its nuclei. Our laboratory found that the transcription factor Klf4 is a functional target of miR-7 and important for the development of hypothalamic neurons that produce thyrotropin releasing hormone.

The information obtained by a miR-7 pull-down assay pointed out several important genes in the hypothalamic neuronal cytoskeleton, among which were *Septin1*, *Septin8* and *Profilin2*. The expression of these three genes is known to be enriched in the CNS, but their function in hypothalamic neurogenesis is unknown. Using three bioinformatic platforms such as TargetScan, miRanda-miRSVR and PITA we confirmed that *Septin1*, *Septin8* and *Profilin2* are likely functional targets of miR-7 for its thermodynamic and conservation characteristics. The interaction between miR-7 and its targets *Septin1* and *Profilin2* was validated by luciferase assays, this was specific since mutations on the 3'UTR at the binding site of miR-7 inhibit such interaction. Although the effects of inhibition were not identified in a decrease of protein levels of both targets, we have a further interest in studying the biological effect of the binding between miR-7 and 3'UTR of *Septin1* and *Profilin2*. The above findings offer the possibility of knowing how the regulation of the neuronal cytoskeleton impacts on hypothalamic differentiation and functionality, as well as on body homeostasis.

I. Introducción

I.1 Desarrollo del sistema nervioso central

El sistema nervioso central (SNC), formado por el cerebro y la médula espinal, surge de la capa más externa de la gástrula, es decir el ectodermo. El desarrollo embrionario llega a la etapa trilaminar o de gastrulación aproximadamente en los días embrionarios (E) 5.5 a 6.5 en el ratón y en la tercera semana de gestación en los humanos (**Figura 1**; Gilbert; 2000; Tang et al., 2016). Durante la etapa de preimplantación, que comprende la fertilización, segmentación y compactación; el desarrollo embrionario del humano y el ratón es muy similar morfológicamente a pesar de haber diferencias claras en el tiempo de desarrollo y la expresión genética. Por ejemplo, en la preimplantación ambos organismos expresan factores de pluripotencia como *Klf4* (factor similar a Kruppel 4), *Tfcp2l1* (factor de transcripción similar a cp2-1) pero difieren por ejemplo expresando *Klf2* (factor similar a Kruppel 2) en ratones, pero en humanos no (Tang et al., 2016). Posteriormente la morfología comienza a cambiar en el periodo de postimplantación a partir de la gastrulación. En los humanos la morfología es planar durante el desarrollo, el epiblasto e hipoblasto forman un disco bilaminar, o blastocisto, rodeado por la cavidad amniótica y el blastocele. Alrededor del día embrionario (E) 16 en el extremo posterior del embrión se forma la línea primitiva, que se extiende hacia la mitad de la parte anterior (Gilbert, 2000). Las células del epiblasto que siguen proliferando sufren una transición epitelial-mesenquimal (EMT) y migran a través de la línea primitiva, las que migran más profundo y desplazan al hipoblasto forman el endodermo, las que quedan en el medio el mesodermo y las que permanecen en la superficie forman el ectodermo (Stiles y Jernigan, 2010). Este proceso genera un disco plano trilaminar con las tres capas germinales.

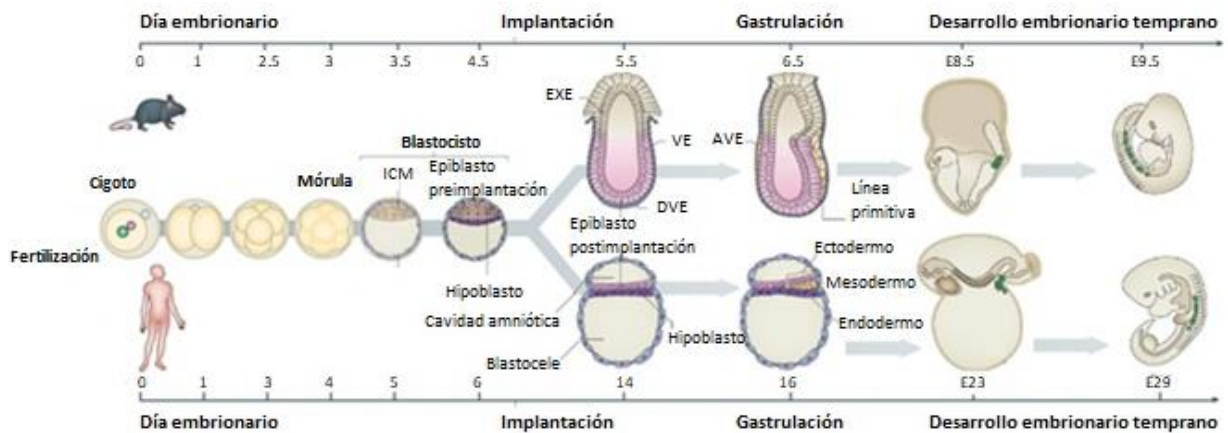


Figura 1. El desarrollo del embrión de ratón y de humano es muy similar durante la etapa de pre-implantación. A partir de la fertilización el cigoto unicelular representa a la célula troncal totipotencial que puede dar origen al embrión y sus estructuras extraembrionarias. El cigoto se segmenta pasando por la etapa de mórula y posteriormente forma el blastocisto. La ICM da origen al embrión, de ella se forma el disco bilaminar o blastocisto. Posteriormente el blastocisto se implanta y a continuación se da el proceso de gastrulación a partir de la línea primitiva se señaliza a las células que migran y se forman el endodermo, mesodermo y ectodermo respectivamente. En la etapa post-implantación la diferencia radica en que el humano forma un disco trilaminar plano y en él la línea primitiva, mientras que el ratón forma una estructura de copa en la cual el hipoblasto genera el VE y el trofoblasto el EXE, cuyas interacciones generan la estructura de copa. Después la región más distal de VE, el DVE migra anteriormente generando el AVE y en la región posterior se genera la línea primitiva por la cual migran las células del epiblasto en la gastrulación. AVE, endodermo visceral anterior; DVE, endodermo visceral distal; EXE; ectodermo extraembrionario; ICM, masa celular interna; VE, endodermo visceral. (Tomado de Tang et al., 2016).

En el ratón en la etapa de implantación las células del epiblasto forman un epitelio con forma de copa, mientras las células del hipoblasto se desarrollan en el endodermo visceral (VE) que recubre el epiblasto y las células del ectodermo extra-embrionario (EXE), de origen trofoectodérmico. Por su parte el EXE forma una copa invertida sobre el epiblasto de tal manera que se cuenta con un embrión con forma de huevo (Tang et al., 2016; Riviera-Pérez y Hadjantonakis; 2014). Antes de la formación de la línea primitiva en el E 5.5 el endodermo visceral distal (DVE) migra hacia la parte anterior y forma el endodermo visceral anterior (AVE), las interacciones entre estas estructuras llevan a la gastrulación que inicia con la formación de la línea primitiva en el E 6.5. De este modo surge en la superficie del epiblasto las células del ectodermo, después por un proceso de EMT e ingresión a través de la línea primitiva el mesodermo y a continuación las células del endodermo definitivo sufren un proceso de transición mesenquimal-epitelial (MET), egresan y se intercalan con el VE (Riviera-Pérez y Hadjantonakis; 2014). La principal diferencia se encuentra en la formación del endodermo a nivel morfológico, pero posteriormente ambos organismos se encuentran organizados en tres capas embrionarias y tienen un desarrollo embrionario temprano similar.

El primer paso en el desarrollo del SNC posterior al surgimiento del ectodermo es la inducción neural en la que se bloquea la diferenciación hacia el linaje epidérmico y con ello se determina a las células al linaje neural formando la placa neural (Weinstein et al., 1999). La placa neural se forma como un ensanchamiento del ectodermo por la elongación de sus células distribuidas en una sola capa pseudoestratificada (Schoenwolf, 1988). Las células de la placa neural se dividen por mitosis y se distribuyen a lo largo del eje antero-posterior al mismo tiempo que ocurre un proceso llamado extensión convergente que las compacta hacia la línea media organizando la placa como una banda alargada y compacta (Sausedo et al., 1997; Jacobson et al., 1988). Durante la inducción neural en los mamíferos es importante la participación de dos centros organizadores el nodo y el AVE, ambos secretan sustancias inhibitorias de las proteínas morfogénicas de hueso (BMP), necesarias para la diferenciación epidérmica, de modo que al final de la gastrulación las células localizadas a lo largo de la línea media de la capa del ectodermo se han transformado en progenitores neurales (Stiles y Jernigan, 2010).

El siguiente paso en el desarrollo del SNC es la neurulación o desarrollo del tubo neural, en el cual los extremos anteriores de la placa neural se engrosan, se alzan y se curvan hacia el interior para fusionarse y formar el tubo neural (Copp et al., 2003). La fusión inicia en el centro del tubo neural y después procede en dirección rostral o caudal, dando lugar a la neurulación primaria que genera al SNC y secundaria que genera la médula espinal (Nieuwstein et al. 1993). Existen tres puntos que funcionan a manera de bisagra durante el doblamiento del neuroepitelio. El primero es el punto de bisagra medio (MHP) el cual forma el surco neural, debido a que las células epidérmicas laterales empujan a las células de la placa neural hacia la línea media, anclando la placa neural a la notocorda debajo (Schoenwolf, 1991). El segundo y tercer punto son la bisagra dorso-lateral (DLHP) derecha e izquierda que quedan elevadas aún en contacto con las células epidérmicas y ayudan a que la placa se doble hacia el centro (Smith et al., 1991). Estos dos movimientos forman los pliegues neurales que se elevan y conforme se acercan convergen y se fusionan el uno con el otro cerrando el tubo neural (Gilbert, 2000). En mamíferos, las células de la cresta neural, que forman estructuras del cuello y la cara, migran y dejan de formar parte del tubo neural antes del cierre de los pliegues, mientras que en la parte de la médula espinal migran hasta el cierre del tubo neural (Nichols, 1981).

El último paso en el desarrollo del SNC es la diferenciación del tubo neural, el cual en los mamíferos es una estructura recta que comienza a diferenciarse inclusive antes de que se cierre el tubo en la parte dorsal (Gilbert, 2000). Concomitante al proceso de gastrulación inicia el desarrollo

del eje antero-posterior y dorso-ventral. Respecto al eje antero-posterior, dividimos al SNC en prosencéfalo o cerebro anterior, mesencéfalo o cerebro medio, romboencéfalo o cerebro posterior y medula espinal (**Figura 2.A**). Excluyendo a la médula espinal, consecutivamente el prosencéfalo se divide en dos, el telencéfalo y el diencefalo. El mesencéfalo permanece sin dividirse y el romboencéfalo se divide en el metencéfalo y el mielencéfalo (**Figura 2.B**), mencionados en orden anterior a posterior; cada una de las cinco vesículas tiene diferentes derivados enlistados en la **Figura 2.C** (Sadler, 2012; Gilbert, 2000).

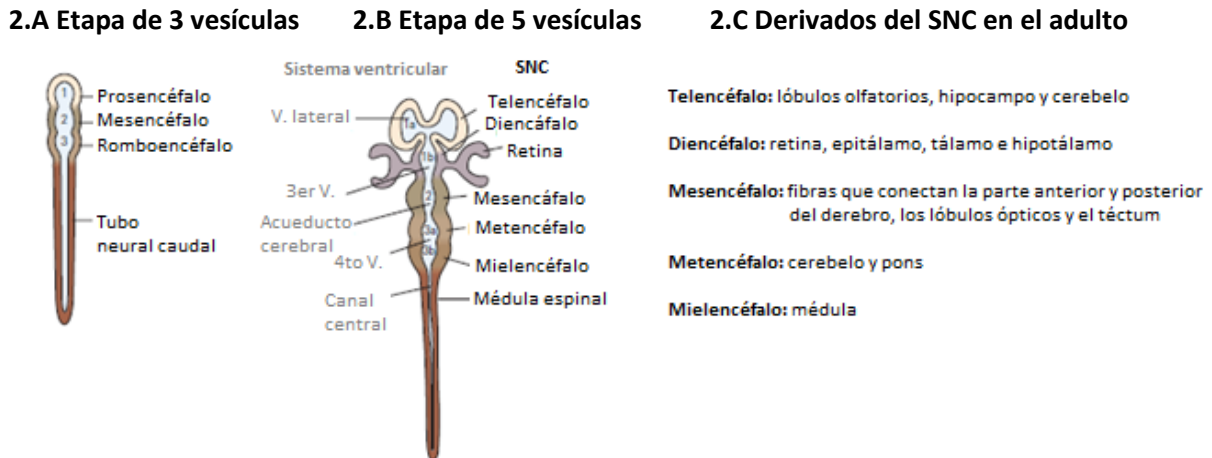


Figura 2. (A) El proceso del tubo neural inicia con la diferenciación en la parte anterior de tres vesículas que dividen al cerebro en cerebro anterior (prosencéfalo, 1), medio (mesencéfalo, 2) y posterior (romboencéfalo, 3). (B) El prosencéfalo se divide a la postre en el telencéfalo y el diencefalo y el cerebro posterior se divide en metencéfalo y mielencéfalo, mientras que el mesencéfalo no se divide. Además, la parte del lumen da lugar al sistema ventricular del cerebro generando el V. lateral, el tercer V., el acueducto cerebral, el cuarto V. y el canal central. (C) En el cerebro adulto cada vesícula se diferencia en las diferentes estructuras enlistadas. Abreviaciones: V, ventrículo. (A y B tomado de Kandel et al., 2013; C tomado de Gilbert, 2000).

I.II Neurogénesis

La neurogénesis es el proceso por el cual se generan todas las neuronas funcionales a partir de células troncales neurales (NSC) y células progenitoras neurales (NPCs). Existen 5 poblaciones identificadas de NSC bien descritas en la revisión publicada por el grupo de Gage y colaboradores estas son: las células neuroepiteliales del ectodermo, los progenitores neurales tempranos localizados en la placa neural, los progenitores neurales tardíos localizados en el tubo neural, las células de la glía radial (RGC) localizadas en el lumen del tubo neural o zona subventricular (SVZ) y las células troncales neurales de adulto (ANSCs) localizadas en los dos nichos neurogénicos adultos la SVZ anterior y la zona subgranular (SGZ), que generan respectivamente, neuronas del bulbo olfatorio y neuronas del giro dentado del hipocampo en ratones (Altman, 1970; Luskin, 1993; Riquelme et al., 2008; Santa Olalla y Covarrubias et al., 1999; Gage et al., 2000). La neurogénesis se puede describir como una serie de cinco pasos ordenados, explicados brevemente a continuación. El primer paso es la adquisición de la competencia neural en la que las células neuroepiteliales (NECs) forman la placa neural y posteriormente el tubo neural; estas células constituyen la zona ventricular (VZ; Gotz y Huttner, 2005; Stiles et al., 2010). Las NECs son una población de células mitóticas que se dividen por división simétrica, generando dos células idénticas; y más tarde en el desarrollo durante el segundo paso se restringe su potencial al dividirse por división asimétrica, generando una célula progenitora y una neurona (Temple et al., 2001; Stiles et al., 2010). El tercer paso en la neurogénesis es la expresión de genes que promueven la diferenciación y regulan el

número de progenitores, es decir, los genes proneurales o factores de transcripción (FT) de tipo hélice bucle hélice básico (bHLH; Murre et al., 1998). El cuarto paso es la conversión de los progenitores neurales a neuronas postmitóticas, es decir, que salen del ciclo celular de modo irreversible (Jan y Jan., 1997). Y el quinto paso es la migración y ulterior diferenciación y maduración de las neuronas en su lugar de destino. El fenotipo especificado depende del programa genético de diferenciación de cada neurona dado por la regionalización y el momento de su nacimiento (Vetter y Dorsky, 2005). A continuación, se explican brevemente algunos de los pasos de la neurogénesis pasando por la regionalización del SNC, así como por la expresión de genes proneurales y la maduración neuronal.

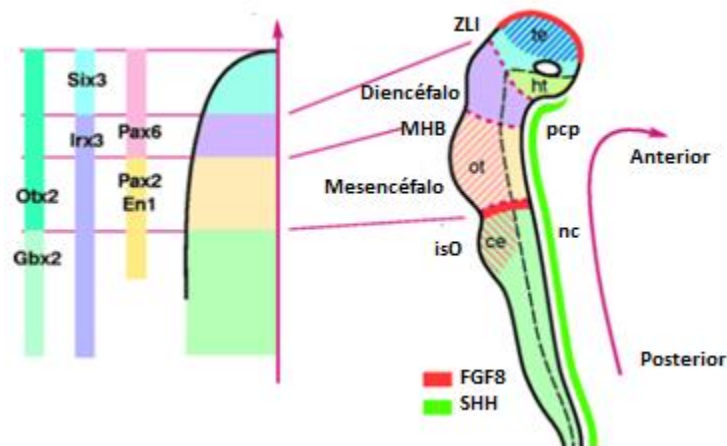
Durante la neurogénesis temprana se establecen núcleos de señalización que secretan morfógenos a lo largo de los ejes antero-posterior, tales como como el AVE y el nodo; y dorso-ventral como la placa del techo o la placa del piso (Gilbert, 2000). Los núcleos de señalización son importantes para refinar la regionalización de la placa y tubo neural y determinar la diferenciación específica de las neuronas (Cavodeassi y Houart, 2011). Un morfógeno se define como una señal secretada capaz de establecer dos destinos diferentes en un área de células relativamente homogénea de manera directa, a largo plazo y dependiente de un gradiente de concentración (Jaeger et al., 2008; Yu et al., 2009). Los principales morfógenos del SNC son la proteína morfogénica de hueso (BMP), sonic hedgehog (SHH), el sitio de integración relacionado con wntless (WNT), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y el ácido retinoico (RA; Paridaen y Huttner, 2014). Los morfógenos mantienen su efecto posterior a la regionalización de cada eje, ayudando a concluir los procesos de diferenciación por la expresión específica de FT que determinan los diferentes destinos celulares de las NPCs durante la neurogénesis (Martynoga et al., 2012). Los genes proneurales tempranos *Mash1* (homólogo 1 de achaete scute en mamíferos) y *Ngn1* (Neurogenina 1) promueven la determinación neuronal a la vez que suprimen la capacidad de diferenciación hacia el linaje glial (Sun et al.; 2001). Experimentos han mostrado que ratones mutantes para los genes proneurales *Ngn1* y Neurogenina 2 (*Ngn2*) no pueden generar los ganglios craneales y desarrollan menos neuronas ventrales (Fode et al., 1998). Los genes tempranos se expresan en células que proliferan en la VZ; mientras que los tardíos como *Ath3*, *Math3* y *NeuroD* se expresan en células que han salido del ciclo celular y migran hacia la periferia para diferenciarse (Lee et al., 1995; Roztocil et al., 1997).

Los dos ejes principales son el antero-posterior y el dorso-ventral, ambos se forman a partir de la expresión de diferentes morfógenos y FT. La región anterior se refiere a la cabeza hasta el límite entre el cerebro medio y posterior; y el tronco es la región caudal contigua (Darnell, 2005). La determinación del eje antero-posterior se inicia por la participación del nodo que produce proteínas inhibitoras de BMP como Noggin, Cordina y Folistatina; y después por la participación en la parte anterior del AVE el cual secreta Cerberus y antagonistas de WNT que inducen la parte anterior o de la cabeza (Bowmeester et al., 1996; Kaznskaya et al., 2000; Mukhopadhyay et al., 2001). WNT es un factor de caudalización que se expresa en el tronco; además de él, también FGF induce la formación del tronco y ayuda en su regionalización (Lamb y Harland, 1995). Por su parte, el RA es importante en la región del romboencéfalo y el tronco, y participa en la señalización de los genes de homeocaja *Hox*; los *Hox* tienen elementos de respuesta a RA (RAREs) que responden a concentraciones altas o bajas de RA en la parte anterior o posterior, respectivamente (Simeone et al., 1995). Además, se conocen diversos FT que se expresan a lo largo del eje antero-posterior (**Figura 3.A**) que se corresponden con límites establecidos entre regiones; por ejemplo, en el organizador del istmo (iSO) que divide el cerebro medio y el posterior, la zona limitante intratálámica (ZLI) que divide el

telencéfalo y el diencefalo y el límite mesencefálico romboencefálico (MHB) que divide la región media y posterior del encéfalo (MHB; Millet et al., 1999, Darnell et a., 2005; Matsunaga et al., 2000).

En eje dorso-ventral se establece a partir de la región superior e inferior del tubo neural, llamados respectivamente placa del techo y placa del piso (Dessaud et al., 2008). SHH se expresa en la placa del piso y controla la regionalización ventral en cinco dominios, activando la señalización mediada por los FT Gli que a su vez incrementan la expresión del FT Pax6 y atenúan a Pax3 y Pax7 (Litingtung y Chiang, 2000). Los cinco dominios comenzando de la parte más ventral son: de interneuronas v3, motoneuronas (MN) y después los dominios de interneuronas v2, v1 y v0 (Darnell et al., 2005). SHH se expresa en la placa del piso y establece el patrón de cinco dominios de diferenciación ventrales; el primero de interneuronas v3, después en dirección dorsal las motoneuronas (MN) y después los dominios de interneuronas v2, v1 y v0 (Darnell et al., 2005). SHH controla la regionalización ventral en cinco dominios, activando la señalización mediada por los FT Gli que a su vez incrementan la expresión del FT Pax6 y atenúan a Pax3 y Pax7 (Litingtung y Chiang, 2000). En esta región ventral, SHH inhibe en un modo dependiente del gradiente de concentración a los FT de tipo I: Dbx1, Dbx2 e Irx3, a la vez que incrementa la expresión de los FT de tipo II como Nkx2.2 y Nkx6.1 (Briscoe et al., 2000). Las expresiones de estos y otros FT en cada dominio ventral se muestran en la **Figura 3.B**. Por otra parte, en la parte dorsal se expresan diversos factores de crecimiento de la familia de TGF- β como BMP-4, Dorsalina y Activina (Lee et al., 1998). En esta región, los BMP promueven la expresión de los Pax que se inhiben en la región ventral Pax3 y Pax7 (Darnell, 2005). A diferencia de cómo actúa SHH en la parte ventral como morfógeno, se cree que las señales dorsales determinan áreas específicas, siendo los BMPs (4, 5 y 7), así como Wnt-1 y Wnt3a los encargados de determinar la región de las interneuronas más dorsales, mientras que Activina lo hace en la región más ventral, de modo que se determina un total de 6 dominios: dl1, dl2, dl3, dl4, dl5 y dl6 comenzando de la parte más dorsal (**Figura 3.B**; Helms et al., 2005). Y por último el tercer eje es el de la asimetría izquierda- derecha, este eje se establece desde la gastrulación pues la rotación de los cilios en el nodo embrionario crea un flujo que especifica la activación por medio de FGF8 de Nodal y Lefty-2 del lado izquierdo del embrión y finalmente Nodal activa al FT Pitx2 (Gilbert, 2000).

3.A Regionalización del eje antero-posterior



3.b Regionalización del eje dorso-ventral

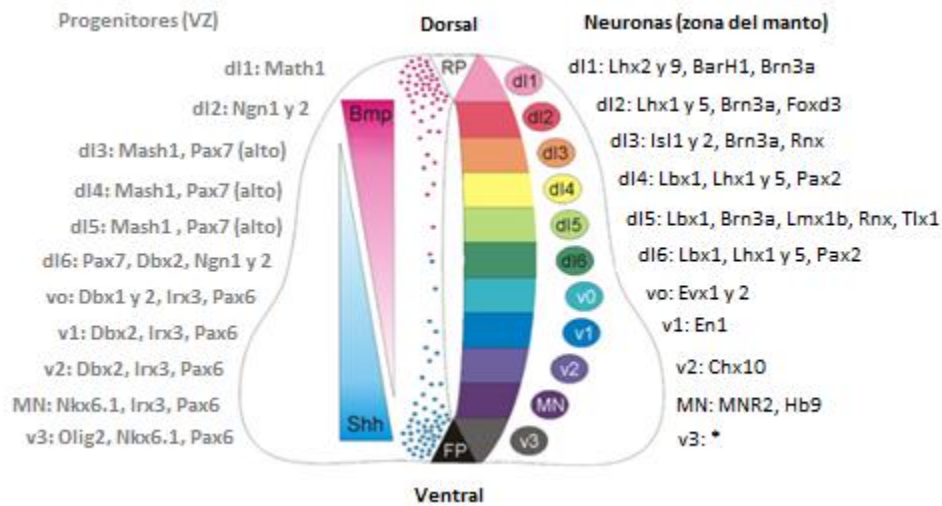


Figura 3. Los procesos de regionalización del tubo neural inician con la expresión diferencial de morfógenos, lo cual lleva su vez a la expresión de FT que delimitan la expresión genética de los progenitores neurales comprometiéndolos a un linaje determinado. **(3.A)** El eje antero-posterior está determinado inicialmente por la expresión de Wnt en la parte posterior e inhibidores de él en la parte anterior delimitados por el MHB. Posteriormente, se establece la expresión inicial de los FT *Otx2* y *Gbx2* que en conjunto con otros determinan los límites de la ZLI y el ISO. **(3.B)** El eje dorso-ventral se determina por la expresión de factores de crecimiento de la familia de TGF- β y *Shh* que determinan 6 tipos de neuronas dorsales (dl1-dl6) y 5 ventrales (v0-v3 y MN). A la izquierda se encuentran los genes que identifican los dominios de los progenitores que se desarrollan en la VZ y a la derecha los que identifican a las neuronas en la capa del manto, la región donde se diferencian. Abreviaciones: ANR, cresta neural anterior; BMP, proteína morfogénica de hueso; ce, cerebelo; dl, dorsolateral; FGF8, factor de crecimiento de fibroblastos 8, FP, placa del piso; ht, hipotálamo; ITZ, zona limitante intratálámica; ISO, organizador del istmo; MHB, límite del mesencéfalo y el romboencéfalo; nc, notocorda; ot, tectum óptico; pcp, placa precordial; RP, placa del techo; *Shh*, Sonic hedgehog; te, telencéfalo. **(3.A)** tomado de Kobayashi et al., 2002; **(3.B)** tomado de Wilson y Maden., 2005 y Avilez et al., 2013).

Los genes de maduración se expresan una vez que los progenitores han salido del ciclo celular y se han comprometido a un destino neuronal específico. La expresión secuencial de FT se puede comparar con la expresión de un “código” de genes expresados por las NSCs que va a controlar la síntesis de neurotransmisores y sus receptores, así como moléculas para la guía axonal que a su vez controlarán la inervación y dependencia trófica de las neuronas (Vetter et al., 2005). Un ejemplo de genes de maduración son los FT de tipo POU u homeocaja que se expresan en las neuronas neuro-sensoriales de mamíferos. En el ratón existen 3 genes de este tipo *Brn-3.0*, *Brn-3.1* y *Brn-3.2* que regulan las proyecciones celulares; por ejemplo, con la pérdida del gen *Brn-3.2* las células del ganglio retinal migran correctamente, pero producen proyecciones características de dendritas y no de axones (Erkman et al., 1996 y 2000). Otro ejemplo, los genes E26 específico de transformación (ETS) también sirven para la maduración de las motoneuronas. La proteína Pea3 se expresa sólo si se produce factor neurotrófico derivado del cerebro (GDNF) en el músculo; en caso de no expresarse las motoneuronas se diferencian de manera incorrecta (Haase et al., 2002). Durante la maduración muchas neuronas mueren; sin embargo, aquellas que sobreviven lo hacen gracias al efecto de neurotrofinas, sustancias que producen las neuronas en sitios de sinapsis y son tomados por neuronas aferentes que hacen conexiones con ellas (Huang y Reichardt, 2001). La hipótesis neurotrófica establece que durante el desarrollo las neuronas compiten por las neurotrofinas, que son una familia de proteínas secretadas compuesta por el factor de crecimiento neurotrófico (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina 3 (NT3) y

neurotrofina 4 (NT4; Hallbook, 1999). Únicamente aquellas neuronas que establecen conexiones con otras son capaces de obtener más neurotrofinas y sobrevivir (Oppenheim, 1989).

I.III Rearreglos del citoesqueleto durante la neurogénesis

La intrincada red de conexiones del sistema nervioso está formada por billones de neuronas conectadas entre sí por uniones sinápticas, esto demanda un citoesqueleto altamente desarrollado. El citoesqueleto está compuesto a su vez por tres componentes principales; los microfilamentos de actina, los filamentos intermedios y los microtúbulos que interactúan entre sí continuamente (Díaz-Nido y Avila, 2007). El primer cambio del citoesqueleto se da durante la neurogénesis cuando una ESCs se compromete a un linaje ya sea neural o epitelial y pasa de ser una célula con morfología redonda a una con polaridad apicobasal (Compagnucci, et al., 2014). Posteriormente las NPCs rompen la simetría celular de tres modos: deciden entre la división simétrica o asimétrica, determinan el surgimiento de la primera extensión o neurita y orientan asimétricamente los microtúbulos para la determinación del axón (Compagnucci et al., 2016).

La decisión respecto al tipo de división celular depende de la orientación del huso mitótico y por consecuencia el plano de división en el que se realiza, si el plano es vertical (perpendicular a la superficie ventricular) la división es simétrica y ambas células heredan los mismos componentes generando dos NPCs. Si por el contrario, el plano es, en sentido general oblicuo u horizontal (paralelo a la superficie ventricular) las células heredan componentes diferentes y una se determina a diferenciarse mientras la otra permanece como NPC (Fish et al., 2006). La proteína microcefalia asociada al huso mitótico anormal (ASPM) tiene una función importante determinando el plano de división celular, pues en los ratones “knockdown” de ASPM la localización del huso mitótico cambia y ocurren más divisiones asimétricas, de igual modo, mutaciones de dicho gen generan microcefalia en humanos (Fish et al., 2006; Morin et al., 2007).

Posteriormente, se genera una neurita, todas las neuritas crecen a partir de prolongaciones terminales llamadas conos de crecimiento (Lowery y Van Vactor., 2009). En el cono de crecimiento la actina controla la motilidad de las neuritas dirigiendo su forma y crecimiento, mientras los microtúbulos dan estructura al eje del axón y median su elongación, ambos procesos ocurren de manera simultánea (Bradke y Dotti, 2000). Se sabe que tanto el posicionamiento del centrosoma, así como la expresión de N-cadherina están relacionados con la determinación del axón (De Anda et al., 2005; Gärtner et al., 2012). El cono de crecimiento de la neurita que se convertirá en axón aumenta de tamaño y sus microfilamentos se vuelven más dinámicos, mientras los de las otras neuritas son más estáticos (Bradke y Dotti, 1999). Se ha propuesto un modelo de avance de los conos de crecimiento llamado de protrusión, engrosamiento y consolidación (Steiss et al., 2010). En la protrusión existe una extensión de los lamelopodios y filopodios por la polimerización de actina, posteriormente durante el engrosamiento, los arcos de actina condensada, producto del flujo retrogrado de actina y la contracción de miosina, se despolimerizan y permiten el avance de los microtúbulos junto con vesículas y organelos hacia el cono de crecimiento. En la fase final de elongación, el eje del axón se alarga por la polimerización de los microtúbulos (Steiss et al., 2010). Los microtúbulos que alargan el eje del axón se generan a partir del centrosoma y orientan su extremo “más” hacia la parte distal del axón (Gonzalez-Billault et al., 2002), mientras que los microtúbulos de las neuritas se generan igual, pero después son cortados por catanina y transportados por proteínas motoras como la dineína a las neuritas, en donde se orientan de manera que dirigen sus extremos “más”, o de crecimiento, tanto a la parte distal como proximal (Bass y Ahmad, 2001). Este proceso se conoce como descentralización y es importante para la

ramificación de los axones, así como la generación de dendritas y sus espinas, pudiéndose producir microtúbulos acentrosomales a partir de la nucleación en el Golgi (Jaworski et al., 2009; Ori-McKenney et al., 2012). Además de su papel en la generación de microtúbulos acentrosomales, el aparato de Golgi es importante en el control del flujo axoplásmico, pues genera un flujo de las proteínas recién sintetizadas hacia el axón o las dendritas según sean necesarias (Bradke y Dotti, 1997 y 1998).

Las proteínas pertenecientes a la familia de las Rho GTPasas, CDC42, Rac1 y RhoA están involucradas en la transducción de señales que llevan a la remodelación de los microfilamentos en respuesta a señales extracelulares (Dickson, 2001). CDC42 estimula la formación de filopodios, Rac1 la de lamelopodios y RhoA participa en la retracción del cono de crecimiento (Meyer y Feldman, 2002). Las proteínas de unión a microtúbulos (MAP) estabilizan de manera diferencial a estos, de modo que la proteína tau funciona en los axones y MAP2 en las dendritas (Harada et al., 1994). Dicha estabilización no es permanente, pues necesita existir inestabilidad para el crecimiento y esto es controlado por la fosforilación de MAPs por medio de la glucogéno cinasa 3 (GSK3; Ulloa et al., 1994; Goold et al., 1999). Por otra parte, mientras las neuritas maduran, los microtúbulos se estabilizan para mantener la morfología y transportar organelos (Bass et al., 1991).

Los axones maduran una vez que han alcanzado sus sitios blanco y en ese momento el citoesqueleto del cono de crecimiento se remodela para formar el citoesqueleto de una terminal sináptica, en el cual ya no hay motilidad ni extensión y se observa la acumulación de sinapsina, una proteína que une a las vesículas con el citoesqueleto de actina (Ceccaldi et al., 1995). La mielinización del axón es también una señal de maduración, caracterizada por el crecimiento radial del axón, la cual es consecuencia de la fosforilación de los filamentos intermedios o neurofilamentos (Julien, 1999). El ancho radial se observa reducido en ratones con neurofilamentos mutantes o en ratones con mutaciones en el gen de mielina llamado "*Trembler*", en los cuales los neurofilamentos NF-M y NF-H se encuentran menos fosforilados, lo que resulta en una separación angosta entre neurofilamentos similar a lo que ocurre en los nodos de Ranvier (De Waeah et al., 1992).

El estudio de las neuronas hipocampales en cultivo nos permite resumir que la polarización neuronal se genera en cinco etapas ordenadas. Inicialmente las células extienden lamelopodios (etapa 1), diversas prolongaciones cortas llamadas neuritas surgen de ellos (etapa 2). Posteriormente, una de las neuritas comienza a alargarse más rápido que las otras y forma el axón (etapa 3), mientras las otras neuritas se alargan poco (etapa 3). Después de varios días, las neuritas restantes crecen y adquieren características de dendritas (etapa 4) y finalmente el axón y las dendritas maduran, forman contactos sinápticos y de este modo se propagan las señales eléctricas a través de la red neuronal (etapa 5; Wiggin et al., 2005; **Figura 5**). Existen proteínas que tienen distribuciones diferentes según la etapa específica de la polarización. Por ejemplo, las proteínas PAR3 y PAR6 (partición defectuosa) se localizan en el cuerpo de la neurona y en el extremo más distal de las neuritas en la etapa 2, y posteriormente sólo se localizan en el cuerpo de la neurona y en el axón recién formado (Wiggin et al., 2005). La etapa 3 es importante pues marca el inicio de la polarización, la neuromodulina se segrega al axón en donde es importante para el crecimiento de éste (Benowitz et al., 1987).

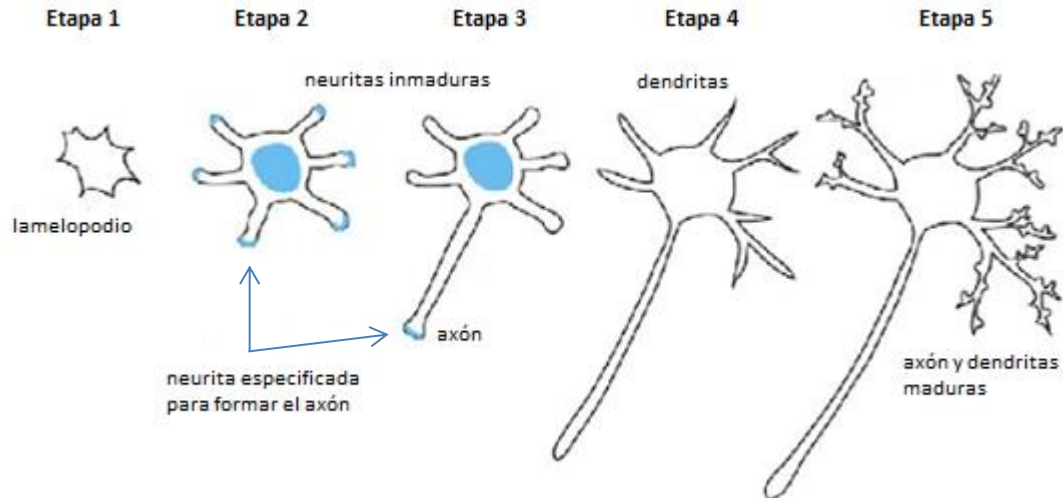


Figura 5. Se muestran los cambios en la forma de las neuronas durante la diferenciación neuronal. Como se indica en el texto, este proceso consta de 5 etapas en las que un progenitor sale del ciclo celular de manera permanente y produce extensiones las cuales finalmente se diferencian en axón y dendritas funcionales. Las flechas indican la localización de las proteínas PAR3 y PAR6 (Modificado de Wiggin et al., 2005).

I.IV Regulación de la neurogénesis

Como se mencionó en el apartado anterior los morfógenos y diversos FT juegan un papel fundamental en la neurogénesis. La expresión de cada gen en el momento y localización específica se da por una por una intrincada red de regulación a nivel post-transcripcional dada por diversos ácidos ribonucleicos no codificantes (ncRNAs) así como remodeladores epigenéticos.

I.IV.I Regulación epigenética

Las modificaciones epigenéticas que involucran la metilación del DNA (ácido desoxiribonucleico) y la modificación de histonas, están involucradas en el control temporal y espacial de la expresión génica durante la neurogénesis, así como en el cambio de producción de neuronas a glía (Muhchiyic et al., 2013). La cromatina de los progenitores neurales tempranos se encuentra en un estado más abierto con respecto a los progenitores neurales tardíos (Kishi et al., 2012). Al inicio de la neurogénesis, la metilación de genes gliales como *Gfap* y genes de la vía de JAK-STAT inhibe el cambio de neurogénesis a gliogénesis y su consecutiva desmetilación determina el tiempo de diferenciación glial (Fan et al., 2005). Un ejemplo de como ocurre este proceso es la diferenciación de astrocitos, en la cual la vía de Notch induce la expresión del factor nuclear IA (NFIA), promoviendo la disociación de las metiltransferasas de los promotores de algunos de estos genes (Namihira et al., 2009). El complejo mSWI/SNF es un remodelador de nucleosomas dependiente de ATP. Entre las subunidades que lo conforman se encuentran BAF155 y BAF170, los cuales interaccionan con el FT Pax6 (Touc et al., 2013). BAF170 compete con BAF150 y modifica la eucromatina de manera tal que recluta al complejo corepresor REST (factor de transcripción silenciador de RE1) al elemento RE1 presente en la región regulatoria del gen *Pax6* reprimiendo los genes que induce y evitando así la generación de progenitores intermedios y progenitores corticales tardíos (Tuoc et al., 2013).

I.IV.II Regulación post-transcripcional

El procesamiento del ácido ribonucleico mensajero (mRNAs) juega un papel importante en la diferenciación y desarrollo de los mamíferos, en específico es importante durante la neurogénesis y se puede llevar a cabo por diferentes mecanismos como son el splicing alternativo y la regulación ejercida por ncRNAs como los RNA largos no codificantes (lncRNAs) o micro RNAs (miRNAs; Paridaen et al., 2014). Estos últimos son de interés específico en el presente trabajo, por lo que se explicarán un poco más a fondo que los otros. El splicing alternativo de un mRNA juega un papel importante en la diferenciación y desarrollo, pues se refleja en la producción de diferentes proteínas a partir de un transcrito primario; por ejemplo, el splicing alternativo del represor transcripcional REST por el factor neuronal de splicing nSR100, lleva a la desrepresión de genes neurogénicos y a su vez favorece la diferenciación (Calarco et al., 2011; Raj et al., 2011).

Por su parte, los lncRNAs tienen actividades relacionadas con múltiples funciones biológicas, tanto de diferenciación como en el desarrollo y se expresan en el cerebro; en este contexto participan en el control de la neurogénesis (Fatica et al., 2014; Mercer et al., 2008). Los loci de los lncRNAs codifican para transcritos de más de 200 nucleótidos que mediante modificaciones de la cromatina y de control post-transcripcional modifican la expresión génica (Fatica y Bozzoni, 2014). En el cerebro, el FT Sox2 se une al DNA de sus blancos transcripcionales y mantiene su identidad como células troncales; sin embargo, al inicio de la neurogénesis Sox2 interacciona con el lncRNA RMST (transcrito 2 asociado a rhabdomyosarcoma), el cual tiene una expresión específica en el cerebro y al unirse a Sox2 y a la cromatina activa la expresión de genes neurogénicos como *Ascl* y *Ngn* (Ng et al., 2013). Por otro lado, el lncRNA Miat se expresa en células de las RGCs comprometidas a la diferenciación, inhibiendo la proliferación (Aprea et al., 2013).

I.IV.II.I miRNAs

Los miRNAs son RNAs pequeños no codificantes con una longitud promedio de 22 nucleótidos (nt) que se unen a la región 3' no traducida (3'UTR) de sus mRNA blanco a través de un apareamiento imperfecto para reprimir su traducción o un apareamiento perfecto para mediar su degradación; lo primero es más común en animales y lo segundo en plantas (Bartel et al., 2004). La región de unión de los miRNAs a su mRNA blanco se conoce como secuencia "semilla" y se define como una región limitada del nucleótido 2 al 8 en la secuencia 5' no traducida (5'UTR) del miRNA (Ghildiyal et al., 2009). Sin embargo, también se sabe que existen algunos miRNAs en moscas y mamíferos que se unen a sus blancos por apareamiento casi perfecto y dirigen su escisión endonucleolítica (Ghildiyal et al., 2009). Respecto a su biogénesis, los miRNAs son transcritos principalmente por la RNA polimerasa II (RNA Pol II), generando un transcrito primario de miRNA (pri-miRNA), éste es cortado en el núcleo por la RNasa tipo III, Drosha, en un miRNA precursor (pre-miRNA) con una longitud de 60 a 70 nts, plegado a manera de una horquilla (Bartel et al., 2004). Posteriormente, el pre-miRNA se exporta al citoplasma por el sistema de exportina 5 y ahí es cortado por Dicer, otra RNasa tipo III, en fragmentos de cadena doble, produciendo un miRNA maduro y un miRNA pasajero (miRNA*) (Bartel et al., 2004). El miRNA maduro se incorpora al complejo RISC, y el complejo que forman reconoce los mRNAs blanco, a diferencia del miRNA* que es degradado (Bartel et al., 2004).

Los miRNAs han sido estudiados en mamíferos y se sabe que juegan un papel importante en una amplia gama de procesos, incluyendo la diferenciación celular, apoptosis, el desarrollo, el desarrollo de cáncer, la migración e invasión, etc. (Yu et al., 2013; Bartel et al., 2004; Kloosterman et al., 2006 y Krützfeldt et al., 2006). Muchos de los miRNAs neurales se expresan en patrones

espacio-temporales específicos, lo cual sugiere que tienen funciones en el control del desarrollo del SNC. Temprano en la neurogénesis, el número de NSCs producidas se determina por la proliferación de estas y por una fase de apoptosis (Buss y Oppenheim, 2004). MiR-29 se expresa de manera temprana y promueve la proliferación mediante la inhibición de factores pro-apoptóticos de la familia BH3, como Bim, Bmf, Puma, Bak, y Hrk (Kole et al., 2011; **Figura 4**). La vía de AKT y PI3K es importante en el crecimiento y autorenovación de las NSC; PTEN es un regulador negativo de esta vía y es reprimido por el cluster miR17-92, compuesto por los miRNAs miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1, and miR-92a; si la expresión del cluster se pierde las NSCs dejan de proliferar (Bian et al., 2013). Por su parte, el oncogen *MYC* regula positivamente a PTEN y a miR17-92 (Osella et al., 2011, **Figura 4**).

En cuanto a miR-124, este es un miRNA altamente conservado, se expresa tanto en la proliferación como en la diferenciación neuronal y su expresión ectópica en células que no son neuronas lleva a la expresión de genes neurales (Li et al., 2010; Sun et al., 2014). MiR-124 promueve la diferenciación neuronal inhibiendo a sus blancos: PTBP1 (proteína 1 de unión a intervalo de polipirimidinas), SCP1 (fosfatasa pequeña de CTD), LAMC1 (laminina gama-1) e ITGB1 (integrina beta-1; Lyengar. et al., 2014). PTPB1 se une al pre-mRNA de *Ptpb22* e induce su degradación por medio de mutaciones terminadoras; PTPB2 es necesario para el correcto splicing de diversos genes en neuronas adultas (Licatalosi et al., 2012). SCP1 y REST son represores de genes neurales en células que no son neuronas, SCP1 es reclutado por REST que se une a un elemento en la región regulatoria de los genes llamado elemento represor 1 (RE1), ambos represores deben ser inhibidos para la correcta diferenciación por la expresión de genes neuronales (Li et al., 2010). Existe un ciclo de retroalimentación entre miR-124 y REST; REST funciona como complejo junto con las proteínas MeCP2 (proteína de unión a metil CpG) y CoREST (corepresor de REST), ambos blancos de miR-124, y por otro lado existen elementos RE1 en el promotor de los tres loci de miR-124 (Conaco et al., 2006). Además, se ha involucrado a miR-124 en el desarrollo neuronal temprano durante el surgimiento de neuritas posiblemente regulando al citoesqueleto y tardíamente uniéndose a RhoG, favoreciendo la diferenciación dendrítica y axonal pues aumenta el número de ramificaciones de ambas (Yu et al., 2009; Schumcher y Franke, 2013).

Los miRNAs también son importantes regulando la plasticidad sináptica pues participan en procesos de formación y extensión de neuritas y axones, es decir regulan al citoesqueleto neuronal (Lyengar et al., 2014). MiR-132 y miR-134 funcionan regulando la morfología de las espinas dendríticas, miR-134 lo hace regulando a LIMK-1 (cinasa de dominio LIM1) durante la morfogénesis de las espinas dendríticas, así como su crecimiento dendrítico inhibiendo al represor traduccional Pumb2 (Pumilio 2; Schratt et al., 2006; Fiore et al., 2009). Por su parte, miR-132 promueve la extensión axonal de las neuronas de la raíz dorsal gangliónica (DRG) de ratón mediante la represión del activador de la GTPasa de Ras *Rasa1* y en conjunto con miR-219 ha sido implicado en el control de los ritmos circadianos (Hancock et al., 2014; Cheng et al., 2007). En contraparte, miR-9 y miR-138 inhiben a dos proteínas importantes para la extensión axonal, MAP1B y SIRT1 (Dajas et al., 2012; Liu et al., 2013). Los miRNAs también han sido implicados en la regeneración de los axones post-lesión; por ejemplo, en respuesta a la lesión del nervio ciático hay una sobreproducción de miR-21 y miR-431 en las neuronas del DRG. Se ha demostrado que ambos miRNAs aumentan la extensión axonal en células del DRG en cultivo teniendo respectivamente como blancos a *Spry2* y *Kreen1* (Strickland et al., 2011; Wu et al., 2013). Por lo tanto, los miRNAs tienen funciones importantes tanto en etapas tempranas como en etapas tardías de la diferenciación neuronal y están sujetos, al igual que los genes, a una amplia red de regulación, lo cual los lleva a estar finamente regulados; la interacción

correcta de FT, sus genes blanco y sus reguladores transcripcionales como los miRNAs hace posible que la neurogénesis se lleve a cabo.

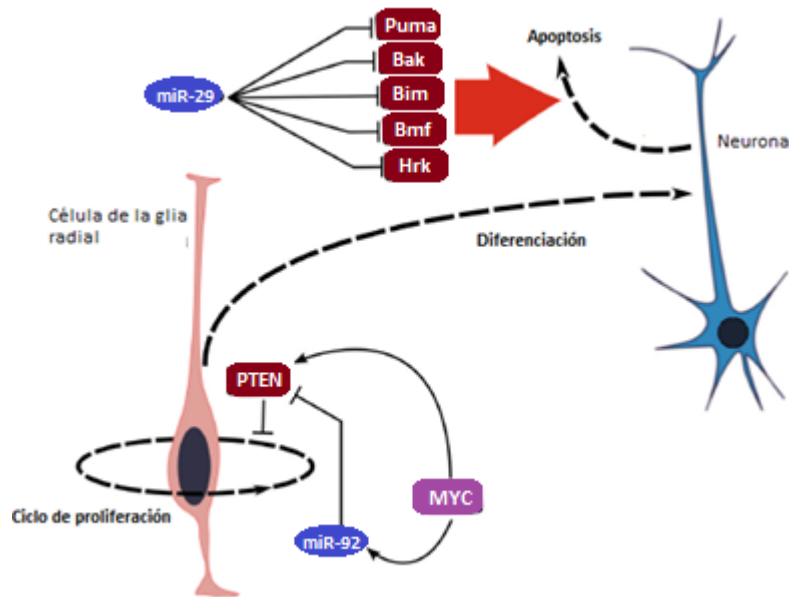


Figura 4. Los miRNAs participan en la regulación del sistema nervioso regulando la proliferación de los progenitores neurales, tal es el caso del cluster de miR17-92 (miR-92). A su vez este miRNA se encuentra regulado por MYC, el cual también inhibe a PTEN, que es un represor de la proliferación de las células de la glía radial. Por otro lado, la regulación de los miRNAs también se da evitando la apoptosis de las neuronas jóvenes, miR-29 inhibe un conjunto de genes pro-apoptóticos de la familia BH3. Abreviaciones MYC, oncogen MYC; PTEN, homólogo de fosfatasa y tensina. (Obtenido de Iyengar et al., 2014).

II.IV.II.I.I miR-7

La función e importancia de miR-7, ha quedado de manifiesto en diversas investigaciones apuntando a su papel fundamental en el desarrollo del SNC y la diferenciación neuronal (Pollock et al., 2014; De Chivigny et al., 2012; Cui et al., 2014). La función de miR-7 es esencial para que los progenitores neurales produzcan progenitores intermedios que posteriormente se integran a la corteza como neuronas maduras, y este proceso es mediado por los genes de la vía del gen supresor de tumores *p53*, *Ak1* y *p21* cuya expresión debe ser atenuada por miR-7 para el correcto desarrollo de la corteza (Pollock et al., 2014). El silenciamiento de miR-7 en esta región produce defectos cerebrales relacionados a la microencefalia (Pollock et al., 2014). Pax6 es un FT importante para la diferenciación neuronal dopaminérgica del bulbo olfatorio (De Chivigny et al., 2012). El mensajero de Pax6 se expresa en las regiones dorsal, dorsolateral y ventrolateral del ventrículo lateral cerebral, pero debido al patrón de expresión de miR-7, su proteína sólo se genera en la parte dorsal, y únicamente las NSCs dorsales se especifican al fenotipo dopaminérgico, generando interneuronas que posteriormente se integran al bulbo olfatorio postnatal (De Chivigny et al., 2012). Conjuntamente, miR-7 está involucrado en la regulación de la diferenciación de NSCs mediante el control post-transcripcional de *Klf4* (factor similar a Kruppel 4); este miRNA se une tanto *in vitro* como *in vivo* a la 3'UTR de *Klf4* (Cui et al., 2014). Lo anterior se debe a que miR-7 induce el arresto en la fase G1/S del ciclo celular, es decir, miR-7 inhibe la proliferación y promueve la diferenciación neuronal; se demostró que tal resultado es mediado en parte por la inhibición de *Klf4*, pues utilizando un siRNA de *Klf4* se aumenta tanto la cantidad de células arrestadas en G1/S así como los marcadores de diferenciación neuronal como *Tuj1* (Cui et al., 2014).

I.V El hipotálamo

El hipotálamo controla e integra las funciones del sistema nervioso y el sistema endócrino de tal manera que desempeña un papel de importancia vital para el mantenimiento de la homeostasis corporal. El hipotálamo forma parte del diencéfalo y se localiza en su parte ventral, su límite anterior es el quiasma óptico y el caudal, los tubérculos mamilares. Arriba de él se encuentra el tálamo y forma el piso y parte de las paredes laterales del 3er ventrículo (Snell et al., 2007). Su localización lo hace responsivo a diversos estímulos hormonales y toxicológicos, pues en el 3er ventrículo la barrera hematoencefálica es permeable (Parent et al., 2011). Por sus conexiones anatómicas con la hipófisis, las neuronas hipotalámicas se clasifican en neuronas magnocelulares y parvicelulares (Pérez Martínez y Charli, 2006). Las neuronas magnocelulares proyectan fibras nerviosas que viajan desde los núcleos supraóptico y paraventricular hasta el lóbulo posterior de la hipófisis en donde liberan oxitocina (OXT) y vasopresina (AVP) directamente al torrente sanguíneo. Las neuronas parvicelulares se conectan con el lóbulo anterior de la hipófisis proyectando fibras nerviosas hacia la eminencia media y el infundíbulo, que a su vez se conectan con el sistema portahipofisiario. Estas neuronas secretan hormonas estimulantes o inhibitorias de 6 tipos diferentes: hormona liberadora de corticotropina (CRH), hormona liberadora de tirotrina (TRH), somatostatina (SST), hormona liberadora de hormona de crecimiento (GHRH), hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), y dopamina (DA; Hall, 2007). A nivel celular el hipotálamo está compuesto por células dispuestas a manera de núcleos con diferentes características morfológicas y funcionales que les permiten controlar funciones vegetativas, endócrinas y de comportamiento; la función de dichos núcleos y su división en cuatro regiones a lo largo del eje antero-posterior y dos zonas medial-lateral se describe en la **Tabla 1** (Freeman, 2003).

Región	Zona	Núcleo (n.) / abreviación	Funciones
1. Preóptica	Medial	Órgano vasculoso de la lámina terminal / (OVLt)	Osmorecepción y quimiorrecepción.
		Órgano subfornical	Centro de sed, sensible a las concentraciones de angiotensina.
		N. medial preóptico / (PON)	Disipación de calor.
		N. intermedio	Núcleo sexual dimórfico.
2. Supraóptica	Medial	N. anterior / (AHN)	Disipación de calor, excitación parasimpática.
		N. supraquiasmático / (SCN)	Reloj biológico, regulador del ritmo circadiano.
		N. paraventricular (PVN)	Secreción de hormona antidiurética (ADH) y oxitocina.
3. Tuberal	Ambas	N. supraóptico (SON)	Secreción de ADH, oxitocina y osmorecepción.
	Medial	N. ventromedial / (VMN)	Centro de saciedad, si se elimina se produce un comportamiento violento.
		N. dorsomedial / (DMN)	Estimulación del aparato digestivo.
		Zona periventricular	Control de la hipófisis anterior (AP).
		N. arcuato / (AN)	Control de la AP, regulación del peso y el apetito.
	Ambas	N. tuberomamilar	Excitación y vigilia.
	Lateral	N. lateral tuberal	Su función se desconoce.
Área hipotalámica lateral		Centro del hambre	
4. Mamilar	Medial	Cuerpo mamilar	Memoria a corto plazo, experiencias emocionales.
		N. posterior	Conservación del calor, excitación simpática.
Región 2., 3. y 4.	Lateral	Área hipotalámica lateral	Diversas funciones de núcleos intersticiales del haz del prosencéfalo medio.

Tabla 1. Función principal de los núcleos hipotalámicos. La tabla muestra enlistadas las principales funciones reportadas para cada núcleo hipotalámico en las cuatro regiones definidas del hipotálamo a lo largo del eje antero-posterior (Tomado de Freeman et al., 2003 y Lechan et al., 2013).

I.V.I Factores de transcripción en el desarrollo del hipotálamo

La mayoría de las células del diencefalo provienen de precursores que rodean la zona proliferativa del tercer ventrículo; sin embargo, también hay contribución de células que provienen del telencefalo y contribuyen a la parte rostral del hipotálamo (Szarek et al., 2010; Tobet et al., 1995). Respecto al programa de expresión de genes que lleva al desarrollo, diferenciación y mantenimiento de las neuronas neuroendócrinas, se sabe poco; sin embargo, se conoce principalmente el desarrollo de las estructuras que componen el hipotálamo medial entre ellas el núcleo arcuato (AN), el núcleo ventromedial (VMN) y el núcleo paraventricular (PVN), así como el núcleo supraóptico (SON) y el área anterior del núcleo periventricular (aPV). Se conoce que hay expresión tejido-específica de algunos FT que participan en el proceso de diferenciación de estos núcleos, tal conocimiento se ha adquirido por el estudio de ratones nulos para cada factor (Pérez Martínez y Charli, 2006; Jo y Chua, 2009).

El FT de tipo homeocaja *Orthopedia* (*Otp*) se expresa inicialmente en diencefalo de ratón en el E10 y al E17 se limita su expresión únicamente en la región preóptica y postóptica que generan tres núcleos hipotalámicos. El PVN produce las hormonas TRH, CRH, OXT y AVP; el SON: OXT y AVP; y el aPV: SST (Acampora et al., 1999). Los ratones “knockout” de *Otp* no forman ninguno de los tres núcleos antes mencionados, ni expresan los neuropéptidos correspondientes, y los efectos terminan siendo letales para el embrión (Acampora et al., 1999). La generación del “knockout” de *Otp* se hizo reemplazando el gen con un gen reportero, de tal modo que se observó que en dicho modelo existe una reducción en el número de células, por lo cual es posible que *Otp* sea necesario para producir factores que afecten la proliferación y mantenimiento de neuronas que generan el PVN, SON y aPV (Acampora et al., 1999). Por lo anterior se ha propuesto a *Otp* como el FT que inicia la neurogenesis hipotalámica al regular el estado de proliferación de las NPCs y otros FT actúan en etapas posteriores de la diferenciación de los diferentes fenotipos neuronales (Pérez Martínez y Charli, 2006).

Los FT *Sim1* y *Arnt2* pertenecen a la familia PAS de los bHLH y forman heterodímeros, ambos controlan la diferenciación de ciertos linajes neuroendócrinos en el hipotálamo (Michaud et al., 2000). Al igual que en los “knockout” de *Otp*, se reemplazó cada uno de los genes *Sim1* y *Arnt2* con un gen reportero y con ellos se descubrió que en los ratones nulos para ambos FT existe un número disminuido de células en los núcleos PVN y SON que resulta en la ausencia de TRH, CRH, OXT, AVP y SST (Michaud et al., 1998 y 2000). Así pues, la deficiencia individual de cada FT permite que las neuronas nazcan normalmente, pero fallan en formar los núcleos, es decir, la falta de su expresión no afecta el número de neuronas, pero si su coalescencia y migración para formar el PVN y el SON (Michaud et al., 1998 y 2000). Por su parte, los ratones heterocigos del gen *Sim1* desarrollan obesidad tempranamente debido al subdesarrollo del hipotálamo neuroendócrino (Michaud et al., 2001). Los genes *Brain-2* (*Brn2*) y *Sim2* son blancos del FT *Sim1* y sus fenotipos mutantes han sido descritos en ratones en los que el PVN y el SON son hipocelulares. *Brn2* es un FT de tipo POU que se requiere para la diferenciación y sobrevivencia de tipos celulares neuroendócrinos en el PVN y el SON que producen AVP, OXT y CRH; sin embargo, la expresión de TRH y de SST no se ve afectada (Nakai et al., 1995). La expresión de *Brn2* se compromete en ausencia de *Otp*; *Sim1* y *Arnt2* lo que indica que *Brn2* media los efectos de estos FT. *Sim2* es homólogo a *Sim1*, aunque se desconoce el factor con el que dimeriza, los ratones mutantes para dicho gen tienen un aPV hipocelular y son deficientes en neuronas productoras de TRH y SST (Goshu et al., 2002).

El VMN es difícil de estudiar, pues no secreta un neurotransmisor específico; sin embargo, se descubrió que el ratón “knockout” de *SF-1* (factor esteroideogénico 1) genera animales hiperfágicos que no tienen un VMN definido (Majdic et al., 2002). Las neuronas con marcaje positivo de SF-1 también expresan el receptor de melanocortina 4 (MCR4) y BDN, si la expresión de MCR4 o Trk-B, el receptor de BDNF, disminuye se genera el mismo fenotipo que el “knockout” de *SF-1* (Xu et al., 2003). Se desconoce si hay un efecto en la diferenciación en neuronas “knockout” de *SF-1*; sin embargo, se sabe con certeza que sí afecta su migración y coalescencia, pues estas neuronas se dispersan y no forman el VMN (Davis et al., 2004). El AN posee neuronas POMC/CART (proopiomelanocortina /tránsito regulado por anfetamina y cafeína) y NPY/ AgRP (neuropeptido/ proteína r-Agouti) involucradas en el comportamiento de alimentación, la regulación del sistema nervioso autónomo y el metabolismo de sustratos (Ellacot et al., 2004; Williams et al., 2005); así como neuronas liberadoras de GHRH, DA y neuronas productoras de kisspeptina (Bouyer et al., 2007; Ajika et al., 1993; Dungan et al., 2006). La mayoría de estas neuronas dependen de la actividad del FT proneural de tipo bHLH complejo achaete-scute 1 (*Ascl1*), también conocido como Mash1, importante para la producción de progenitores neurales (McNay et al., 2006; Horton et al., 1999). La pérdida de la expresión de *Ascl1* causa que las neuronas AN y VMN se desarrollen como estructuras anatómicamente diferentes y tengan altas tasas de muerte celular (Jo y Chua, 2009). Con la pérdida de *Ascl1* hay una reducción aproximada de 90% de las neuronas positivas para *SF-1*, POMC, NPY/AgRP y catecolaminas, pero únicamente desaparece el linaje GHRH; esto sucede debido a que las células “knockout” de los *Ascl1*^{-/-} expresan muy poco *GSH1* (genomic screen de homeocaja 1), un FT necesario para la expresión de GHRH (Li et al., 1996). Por último, el FT hélice-bucle-hélice “nesciente” 2 (*Nhlh2*) es importante en el AN, los ratones nulos para el gen *Nhlh2* presentan obesidad hiperfágica debido a la reducción de la expresión y actividad de la prohormona convertasa 1 que sintetiza α -MSH (hormona estimulante de melanocitos α) a partir de POMC (Good et al., 1997; Jing et al., 2004). Además, el ratón “knockout” para *Nhlh2* es infértil debido a que se reduce la migración de las neuronas GnRH a sus sitios hipotalámicos finales (Kruger et al., 2004).

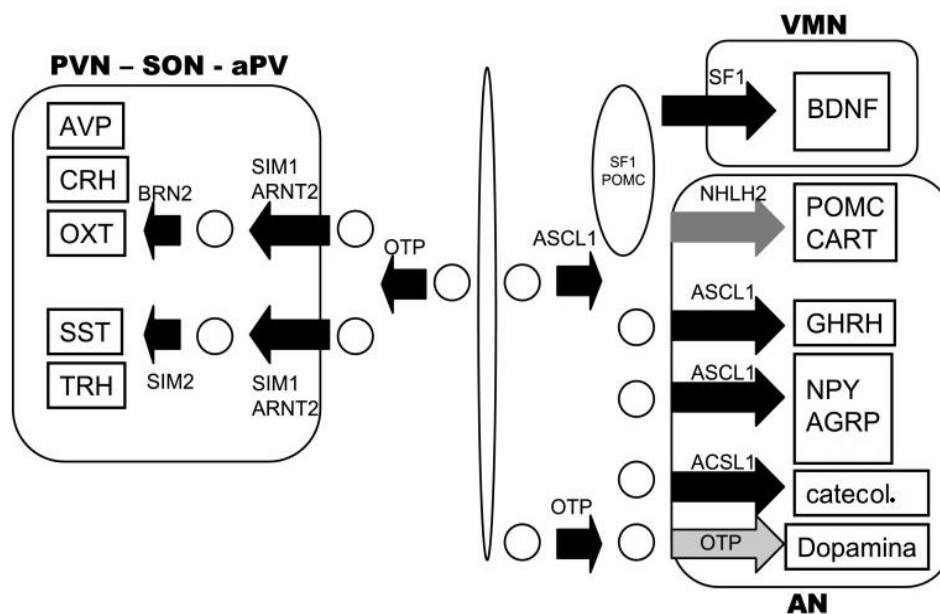


Figura 6. Los FT OTP y ASCL1 median la proliferación y migración de los progenitores a los núcleos mediales hipotalámicos. OTP y ASCL1 regulan la proliferación de progenitores de diversos tipos celulares del PVN, SON, aPV y el AN. Por su parte

el FT SF-1 regula la migración y coalescencia de las células del VMN que expresan BDNF. SIM1 y ARNT2 se necesitan para la migración de todas las neuronas del PVN. En este núcleo se sabe que BRN2 se necesita para la diferenciación de las neuronas que expresan AVP, CRH y OXT, mientras que SIM2 es necesario para la diferenciación de las neuronas que expresan SST y TRH. El FT NHLH2 es importante para la expresión de POMC pues modula la expresión de la convertasa 1 que produce MSH. Cabe mencionar que existe una población doble positiva para SF-1 y POMC, pero se desconocen los FT que la determinan. Abreviaciones: AN: núcleo arcuato; AgRP, proteína relacionada con Agouti; aPV; núcleo periventricular anterior; ARNT2, receptor nuclear translocador de arilhidrocarbon 2, ASCL1, complejo achaete-scute 1; AVP, vasopresina; BDNF, factor neurotrófico derivado del cerebro; BRN2, Brain-2; CART, transcrito regulado por cocaína y metanfetamina; catecol., catecolaminas; CRH, hormona liberadora de corticotropina; FT, factor de transcripción; GHRH, hormona liberadora de hormona del crecimiento; NHLN2, hélice-bucle-hélice naciente 2; NPY, neuropéptido Y; OXT, oxitocina; POMC, proopiomelanocortina; PVN: núcleo paraventricular; SF-1, factor esteroideogénico 1; SIM1 y 2, homólogo de simple-minded de *Drosophila* 1 y 2; SON: núcleo supraóptico; SST; somatostatina; TRH; hormona liberadora de tirotrópina; VMN: núcleo ventromedial (Tomado de Jo y Chua, 2009).

I.V.II Función de miR-7 en el hipotálamo

En una búsqueda de los miRNAs más enriquecidos en el hipotálamo adulto de rata y ratón se encontró que miR-7a, miR-137 y miR-153 se encuentran enriquecidos específicamente en dicha región, siendo miR-7a el más expresado de los tres (Herzer et al., 2012). En ratón existen 3 loci de miR-7, en el cromosoma 13, miR-7a-1; en el 7, miR-7a-2; y en el 17 miR-7b. Los tres tienen la misma semilla; sin embargo, miR-7b difiere en un nucleótido hacia la región 3' y presenta una adenina en vez de un uracilo. Dadas las funciones del hipotálamo, se puso especial atención en las regiones hipotalámicas relacionadas con los comportamientos de la alimentación y homeostasis del peso corporal; en ambos organismos se encontró lo mismo, miR-7a se encuentra enriquecido SON, SCN, PVN, el órgano subfornical y en la parte media del AN, principalmente en la parte dorsomedial (DMH) y ventromedial (VMH; Herzer et al., 2012). La expresión en la región ventromedial del núcleo arcuato se colocaliza con la de miR-7a en las neuronas que producen NPY y AgRP, ambas neuronas orexigénicas y no colocalizan con las neuronas anorexigénicas POM/CART (Herzer et al., 2012). Por lo tanto, la función de miR-7 en esta localización específica es controlar la expresión proteica de genes orexigénicos y de este modo regular la ingesta de comida.

Además de lo inicialmente descrito, en cuanto al papel neurogénico de miR-7 en regiones como la corteza o el bulbo olfatorio, estudios previos han demostrado que miR-7 se expresa diferencialmente en el cerebro adulto de murinos y su función es evolutivamente conservada. La investigación realizada en el anélido *Platynereis dumerilii* y en el pez cebra, identificó que la huella molecular que caracteriza a la región a partir de la cual se forman los centros neurosecretorios está formada por los FT Nk2.1 (receptor similar a lectina 3 de células nk), Rx (homeocaja retinal), Vax (homeocaja ventral anterior) y Otp (Tessmar et al., 2007). Similar al patrón de expresión de los FT, miR-7 se expresa en las mismas áreas y colocaliza con las neuronas RFamidérgicas y vasotocinérgicas. Dadas las características mencionadas, se propone que fueron los centros con funciones neurosecretorias y sensoriales los que iniciaron el desarrollo evolutivo de los centros neurosecretorios como el hipotálamo (Tessmar et al., 2007).

II. Antecedentes

II.I Factores de transcripción importantes en la determinación del fenotipo neuronal TRHérgico

Como se mencionó en apartados anteriores se conocen algunos de los FT fundamentales para el desarrollo de algunos fenotipos del hipotálamo neuroendócrino importantes para el desarrollo de núcleos de la zona medial del hipotálamo y se conoce que de entre ellos algunos son de expresión temprana como *Otp* y otros de expresión tardía tales como *Sim1*, *Sim2* y *Arnt2* (Michaud et al., 2001; Perez y Charli, 2006; Jo y Chua, 2009). Sin embargo, nuestro conocimiento de los mecanismos moleculares que activan y regulan tales factores de transcripción dista de estar completo y aún falta por conocer muchos aspectos del desarrollo embrionario y de la diferenciación neuronal hipotalámica. En este sentido nuestro laboratorio ha colaborado ampliando el conocimiento del programa de FT importantes para el fenotipo hipotalámico TRHérgico.

Haciendo uso de microarreglos se obtuvo información del perfil transcriptómico de neuronas TRHérgicas de rata del día E 17; y se identificaron tres FT cuya expresión esta enriquecida en este fenotipo neuroendocrino: *Klf4* (factor similar a Krüppel 4), *Klf10* (factor similar a Krüppel 4) también conocido como *Tieg* (gen temprano inducible por $Tgf-\beta$) y *Atf3* (factor activador de la transcripción 3). Después se identificó que *Klf4* se expresa durante el desarrollo del hipotálamo de rata y es fundamental para la maduración del fenotipo TRHérgico. *Klf4* en conjunto con el FT *Sp1* se une al promotor del gen de *Trh* regulando su expresión (Pérez-Monter et al., 2011). En contraste, los ratones “knockout” para *Klf4* presentan una expresión disminuida de *Trh* y en consecuencia menos niveles de proteína; sin embargo, el hipotálamo no mostro cambios observables histológicamente (Pérez-Monter et al., 2014). Finalmente, debido a que la expresión de *Klf10* se encuentra enriquecida en neuronas TRHérgicas fetales, se investigó cómo $TGF\beta 2$ induce la expresión de *Trh* por medio de un mecanismo dependiente de FT *Klf10* y del $T\beta RI$ (receptor de $TGF\beta$ tipo I; Martínez-Armenta et al., 2014). Además, ratones “knockout” para *Klf10* presentan una expresión disminuida de *Trh* en comparación a animales silvestres; estos resultados señalan que la señalización de $TGF\beta$ por medio de *Klf10* es importante en el establecimiento de la expresión de *Trh* en el hipotálamo embrionario (Martínez-Armenta et al., 2014).

II.II Ensayo de “pull-down” para la identificación de los genes blanco de miR-7 en una línea celular hipotalámica embrionaria

En nuestro laboratorio se demostró al igual que en el artículo de Cui et al. (2014) que *Klf4* es blanco directo de miR-7, hecho que tiene diversas implicaciones biológicas durante el desarrollo del sistema nervioso central (Meza-Sosa, et al., 2014). De acuerdo con lo anteriormente publicado, se sabe que la disminución de los niveles proteicos de KLF4 es indispensable para la migración y maduración neuronal (Quin et al., 2011 y 2012). Esto indica que la expresión de *Klf4* debe ser regulada de manera muy precisa durante las distintas etapas del proceso de diferenciación neuronal. Debido a que miR-7 se expresa de manera importante en el cerebro (Choudhury et al., 2013) y tiene como blancos a genes como *Klf4* con funciones en la diferenciación neuronal, es posible que miR-7 regule de manera muy precisa varios de los eventos necesarios para la neurogénesis, como la salida irreversible del ciclo celular de las NSCs, la migración y la maduración neuronal a través de regular diversos genes. En ese sentido, a través ensayos de RT-qPCR se determinó la expresión de miR-7 en diversas etapas del desarrollo hipotalámico de ratón y se observó que los niveles de miR-7 aumentan aproximadamente 5 veces del día E 12 al E 15, etapa en la cual las NSCs salen del ciclo celular, después ocurre otro aumento de 3 veces del día E 15 al E 18

donde hay la mayor actividad neurogénica en el hipotálamo murino y finalmente aumento 4 veces del d al P 7 al P 14, período en el cual sucede la maduración neuronal (Tesis de doctorado Meza-Sosa, 2014; **Figura 7**).

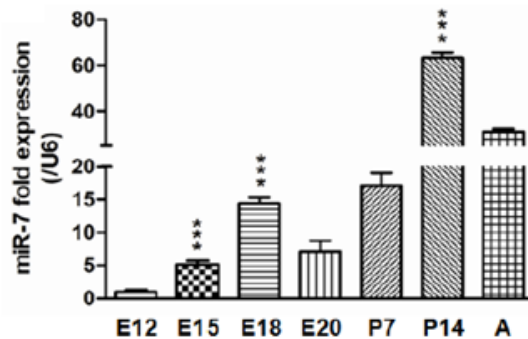


Figura 7. La expresión de miR-7 en el telencéfalo de los días embrionarios (E) 12, E15 e hipotálamo de E18, E20, postnatal (P) 7, P14 y adulto se determinó por ensayo de RT-qPCR. (Tomado de tesis de doctorado Meza-Sosa, 2014).

Con el objetivo de identificar genes blanco de miR-7, adicionales a *Klf4*, en un contexto neuronal hipotalámico, la Dra. Karla Meza-Sosa realizó en su tesis de doctorado un análisis de “pull-down” o captura de blancos de miR-7 siguiendo el protocolo previamente publicado (Lal et al., 2011). Este estudio permitió identificar un total de 1,323 blancos de miR-7 en la línea mHypoE-N1, enriquecidos más de 2 veces (> 2 fold) y con un rango de descubrimiento falso (FDR) < de 0.0001 (Tesis de doctorado Meza-Sosa, 2014; Meza-Sosa et al., manuscrito en preparación).

II.III Identificación de blancos de miR-7

A partir de la lista de los 1,323 blancos de miR-7 obtenidos por medio del ensayo de “pull-down” se vaciaron los blancos en dos bases de datos de enriquecimiento de vías de señalizacion y de creación de redes de interacción (Materiales y métodos). En ambos análisis surgieron más de diez genes blanco participantes en procesos de remodelación y regulación del citoesqueleto. Sin embargo, nos interes  investigar tres blancos específicos por su enriquecimiento específico en el sistema nervioso central, puesto que muchos otros tienen una expresión más general; y por ser blancos novedosos, pues no se conoce cuál es su función en el SNC pero se sabe que participan en el rearrreglo del citoesqueleto. Estos tres blancos fueron *Septina1*, *Septina8* y *Profilina2*. Aunque se conoce que la expresión de los tres está enriquecida en el cerebro, la función molecular de estos tres blancos no ha sido reportada en el desarrollo o diferenciación del hipotálamo. *Pfn2* es un gen que participa en la “Regulación del citoesqueleto de actina” y en la “Regulación del rearrreglo del citoesqueleto”, indicadas respectivamente por las plataformas de enriquecimiento KEGG y Metacore. Por su parte, las septinas son genes cuyas funciones específicas son poco conocidas, se reportaron únicamente con el enriquecimiento de vías dentro de la clasificación de “Invasión bacteriana de células epiteliales”, indicada por KEGG; sin embargo, se sabe que las septinas interactúan con el citoesqueleto y la expresión de ambos genes *Sept1* y *Sept8* se encuentra específicamente enriquecida en el cerebro (Dolat et. al, 2014; Shimoyama et al., 2003; Witke et al., 1998), por lo que su estudio representa un área novedosa de investigación tanto en el contexto del SNC y aún más en el desarrollo específico del hipotálamo.

II.III.I Septina1 y Septina8, generalidades y función durante la neurogénesis

Las septinas (Sept) se definen como una familia de guanosina trifosfatasa (GTPasas) conservadas en los eucariotas, funcionan como el cuarto elemento del citoesqueleto, pues tienen un aspecto filamentoso, interactúan con las membranas celulares, con los microfilamentos de actina, los microtúbulos y además son importantes en la dinámica del citoesqueleto (Mostowy et al., 2012; Trimble et al., 2011). Basados en la homología con las septinas de levadura se sabe que las septinas de mamíferos se pliegan en complejos de octámeros para después formar filamentos compuestos de dos copias de una septina de cada familia del siguiente modo: SEPT9–7–6–2–2–6–7–SEPT9; esta composición es flexible y tejido-específica debido a la redundancia de las septinas (Versele et al., 2005). El complejo unitario de formación de filamentos es un octámero; sin embargo, se sabe que las septinas también pueden interactuar formando homómeros u heterodímeros, o bien hexámeros (Dolat et al., 2014).

Los estudios de secuenciación genómica han mostrado que existen 13 genes de septinas en mamíferos, clasificadas en base a su similitud en cuatro grupos llamados por el nombre de un solo miembro, como sigue (Russel y Hall, 2005; Peterson et al., 2007; **Figura 8**):

- Sept2, que incluye a *Sept1*, *Sept2*, *Sept4* y *Sept5*.
- *Sept6*, que incluye a *Sept6*, *Sept8*, *Sept10*, *Sept11* y *Sept14*, los miembros de esta familia son catalíticamente inactivos y están siempre unidos a GTP.
- *Sept7*, el único miembro.
- *Sept9*, que incluye a *Sept3*, *Sept9* y *Sept12*.

Estos genes pueden ser procesados por “splicing” alternativo y producir un conjunto de diferentes polipéptidos. El caso más llamativo es el “splicing” que se da en para el gen de *Sept9*, el cual produce 18 mRNAs y 15 polipéptidos diferentes (Mostowy et al., 2012). Cabe mencionar que debido a que la *Sept7* es el único gen no redundante, el fenotipo de ratones nulos para *Sept7* es letal durante la embriogénesis (Mostowy et al., 2012). Interesantemente los ratones “knockout” de *Sept3*, *4*, *5* ó *6* tienen cambios de fenotipos sutiles e inclusive los dobles “knockout” para *Sept4* y *6*, o *Sept3* y *5* no tienen defectos morfológicos severos (Froese et al., 2008). En células de mamíferos la expresión de septinas parece ser necesaria en el proceso de división celular. De manera interesante, la mayoría de las septinas identificadas en mamíferos se expresan en niveles altos en el cerebro y en neuronas post-mitóticas, sugiriendo que su función en estos organismos se extiende más allá que el observado en levaduras, que es en donde se descubrieron y son más conocidas por su función en la citocinesis (Mostowy et al., 2012).

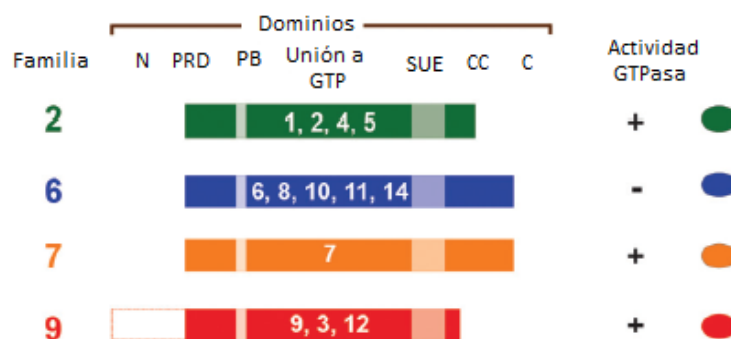


Figura 8. En la figura se muestran las 4 familias de septinas nombradas 2, 6, 7 y 9 con cada uno de sus elementos. En la parte superior se muestran los dominios de cada familia N- aminoterminal, PRD-dominio rico en prolina, PB-polibásico, de unión a GTP, SUE-elemento único de septinas, CC: hélice super-enrollada y C-carboxi terminal. De igual manera se indica que solo la familia 6 no tiene actividad de GTPasa (Tomado de Dolat et al., 2014).

En nuestro laboratorio, se determinó que *Sept1* y *Sept8* son blancos de miR-7 en el contexto neuronal hipotalámico, dicha interacción no ha sido investigada en este contexto ni en el neurogénesis en general, a pesar de que se ha reportado que ambas septinas se expresan en el SNC (Dolat et. al, 2014; Shimoyama et al., 2003). En cuanto a *Sept1*, se sabe que tanto *in-vivo* como *in-vitro* esta interacciona con AuroraB; una de las tres cinasas Aurora, que participan en la segregación de cromosomas y la citocinesis en mamíferos (Qi et al., 2005). *Sept1* es fosforilado en 3 residuos de serina (248, 307 y 315) por AuroraB y durante la citocinesis, ambas proteínas se colocalizan en el surco de segmentación, lo cual sugiere que AuroraB regula la dinámica del ensamblaje y desensamblaje de *Sept1*, favoreciendo la segregación de células hijas (Qi et al., 2005). La sobreexpresión de una AuroraB sin actividad de cinasa interrumpe las interacciones cinetocoro-microtúbulo, la formación del surco de segmentación y la citocinesis resultando en poliploidía (Terada et al., 1998). Se piensa que la fosforilación de Sept1 por AuroraB tiene el mismo efecto de la fosforilación de las proteínas vimentina, desmina y GFAP de los filamentos intermedios por AuroraB y ROCK; por lo que pierden la capacidad de formar filamentos, lo cual permite el desensamblaje de estos y el progreso de la citocinesis (Kosako et al., 1997; 1999; 2000 y Qi et al., 2005). La función biológica de *Sept8* también se desconoce, pero se sabe que está enriquecida en las presinápsis y que interactúa con diversas proteínas de vesículas sinápticas; por lo tanto, *Sept8* podría estar involucrada en la liberación de neurotransmisores (Shiryaev et. al, 2012). Por otro lado, se ha demostrado que *Sept8* es capaz de interactuar con *Sept5* (o CDCrel-1) la cual se expresa principalmente en el sistema nervioso e interactúa con la proteína syntaxina, uniéndose directamente vía su dominio SNARE (Blaser et al., 2004). Además, la sobreexpresión de *Sept5* inhibe la exocitosis en células HIT-T15 (insuloma de hamster), mientras que mutantes negativas de *Sept5* aumentan la tasa de exocitosis (Beites et al., 1999).

Además de la función anterior, se conoce que la expresión desregulada de las septinas se relaciona con el desarrollo de enfermedades y tumores en varios tejidos (Hall et al., 2005). *Sept1* se relaciona con el desarrollo de cáncer colorectal y oral; en este último se sabe que su elevada expresión contribuye a la progresión del cáncer (Kato et al. 2007). Igualmente, se le relaciona con el desarrollo de carcinomas de células escamosas (SCC) del cuello y cabeza. En tal contexto es probable que *Sept1* participe en el contacto entre células o las células y sus substratos, pues se encuentra enriquecida en los lamelopodios junto con *Sept4* y *Sept5*, siendo que normalmente se localiza difusamente en el citoplasma (Mizutani et al., 2013; Squire et al., 2002). Igualmente, existe una alta expresión de *Sept1* en cáncer de mama, en donde se le llama serológicamente antígeno de cáncer de mama NY BR 24 (Russell y Hall, 2005, Singh et al., 2011). El único hallazgo reportado hasta el momento respecto a *Sept1* y su función en el contexto neuronal indica que *Sept1* se expresa en los ovillos neurofibrilares de los cerebros post mortem de pacientes con enfermedad de Alzheimer, junto con *Sept2* y *Sept4*. Debido a esta asociación con la proteína tau hiperfosforilada, es posible que estas tres septinas sean constituyentes integrales en la formación de los ovillos neurofibrilares (Kinoshita et al., 1998). Por último, también se sabe que *Sept8* y *Sept5* se expresan en el ojo y la expresión de *Sept8* es alta en las membranas retinales patológicas con dos retinopatías proliferativas que forman membranas fibrosas como cicatrices; por lo tanto, se piensa que *Sept8* juega un papel importante en la patogénesis de proliferación y migración retinal (Pache et al. 2005; Xin et al., 2007). Al igual que para *Sept1*, se conoce una función para *Sept8* en el contexto de Alzheimer, puesto que la sobreexpresión de una variante transcripcional de *Sept8* relacionada con la

enfermedad es capaz de aumentar la vida media de BACE1 mediante la prevención de su degradación (Kurkinen et al., 2016).

II.III.II Profilina2, generalidades y función durante la neurogénesis

En la actualidad sabemos que las profilinas se expresan en animales, plantas, levaduras y amibas, e inclusive algunos virus codifican una proteína similar a profilina (Witke et al., 2004). La principal función descrita para las profilinas es su unión a los monómeros de actina-G de modo 1:1; sin embargo, existen otras proteínas en la célula con la misma función (Witke et al., 2004). Las profilinas tienen una mayor afinidad por actina-ATP ($K_d=0.1 \mu\text{M}$) que por actina-ADP ($K_d=0.5 \mu\text{M}$); y funcionan como intercambiador de nucleótidos aumentando en 1,000 veces la velocidad en la cual actina-G intercambia ADP por ATP (Paavilainen et al., 2004; Witke et al., 2004). Estructuralmente además del sitio de unión a actina las profilinas tienen otros dos dominios, uno de unión a fosfoinosítoles, principalmente PIP_2 y PIP_3 , que se sobrelapa parcialmente con el sitio de unión a actina, por lo que los fosfolípidos previenen la unión de actina a profilina; y un tercer dominio de unión a intervalos de poli-L-prolina (Figura 9; Lambrechts et al., 2006).

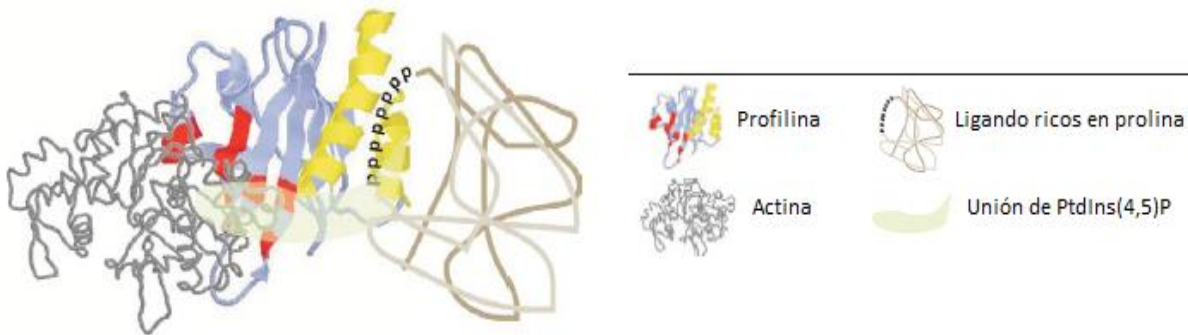


Figura 9. Las profilinas tienen tres dominios de unión. En rojo se muestra el de unión a actina, en amarillo el de unión a intervalos de poli-L-prolina o proteínas ricas en prolina y en gris el de unión a fosfoinosítoles entre ellos PtdIns (4,5) P, el cual se sobrelapa con los dos dominios anteriores y por eso tiene una función regulatoria. Se muestran también la estructura de la actina y de PtdIns (4,5) P unidos a sus respectivos dominios (Tomado de Paavilainen et al., 2004).

Existen cuatro genes de profilina en mamíferos, uno de ellos con dos variantes por “splicing” alternativo lo cual genera 5 isoformas. *Pfn1* expresada ubicuamente y está relacionada con funciones de generales de motilidad como citocinesis y migración y adhesión (Jockusch et al., 2007). Esta función se ve reflejada en que el ratón “knockout” de *Pfn1* es letal en la etapa de preimplantación embrionaria (Witke et al., 2001). *Pfn2* expresada principalmente en el SNC, *Pfn3* expresada en el riñón y testículos y *Pfn4* expresada únicamente en testículos (Witke et al., 1998; Hu et al., 2001; Obermann et al., 2005). *Pfn2a*, la principal variante por “splicing”, se expresa mayormente en el cerebro y su expresión se encuentra regulada a lo largo del desarrollo embrionario; mientras que *Pfn2b* se identificó en el riñón (Lambrechts et al., 2000). Por lo tanto, en el cerebro de mamíferos se expresan sólo *Pfn1* y *Pfn2a* y ambos se producen diferencialmente durante el desarrollo; a pesar de que se conoce su función en la regulación de la dinámica de actina, su función específica en las neuronas se desconoce (Michaelsen et al., 2010).

El modelo “knockout” de *Pfn2* es viable y no presenta ningún defecto del desarrollo en corteza, hipocampo o cerebelo; las pruebas de memoria muestran que no hay afectación en la potenciación a largo plazo (LTP) o la memoria y en cuanto a estructura, las sinapsis de estas tres

regiones y del núcleo estriado son iguales en número y morfología *in vivo* (Boyl et al., 2007). Sin embargo, en las neuronas hipocampales de los ratones “knockout”, se presenta una mayor excitabilidad y exocitosis de neurotransmisores debido a un aumento en el anclaje de vesículas presinápticas y una hiperactivación del núcleo estriado que se refleja como un aumento en el comportamiento de búsqueda de novedad o “novelty seeking” (Boyl et al., 2007). *Pfn2* juega un papel importante en el proceso de neuritogénesis; el grupo de Boyl et al. (2007) reportó que, a pesar de no haber cambios en el número y morfología de las sinapsis de la corteza, el hipocampo y el cerebelo de los ratones *Pfn2*^{-/-}, si hay un aumento en el número de neuritas producidas por las neuronas hipocampales *in vitro*, durante las primeras 24 h, pero este efecto se pierde a las 48 h. Esto coincide con la investigación realizada previamente por el grupo de Da Silva et al. (2003), que indica que la inhibición de cualquiera de los tres componentes de la vía de señalización de RhoA, (homólogo de la familia de Ras, miembro A), ROCK (cinasa dependiente de RhoA), *Pfn2* produce un aumento en el número de neuritas y en la longitud de éstas (Da Silva et al., 2003). Por el contrario, la sobreexpresión de *Pfn2* disminuye el número y longitud de neuritas aún cuando las células se siembren en presencia de neurotrofinas como BDNF, NGF, NT3, o en cajas cubiertas con laminina, las cuales promueven el crecimiento de neuritas (Da Silva et al., 2003). Los efectos observados en las neuritas son producto de cambios en la estabilidad de actina, en el caso de la sobreexpresión de *Pfn2*, ésta causa un aumento en la actina-F estabilizando más a los microfilamentos de actina y eso impide el surgimiento y extensión de neuritas. Contrariamente, en la inhibición o disminución de *Pfn2* se reduce la actina polimerizada y entonces se producen más neuritas y de mayor longitud (Wolven et al., 2000; Da Silva et al., 2003).

Más tarde en el desarrollo, la *Pfn2* también juega un papel importante relacionado con la morfología de las dendritas y sus espinas. Mediante el uso de RNA de interferencia (RNAi) se produjo un “knockout” de *Pfn2* y se estudiaron sus efectos en neuronas del hipocampo, demostrando que en dicho modelo hay una reducción significativa en la complejidad de las dendritas (determinada por su longitud y ramificaciones) y el número de espinas; la sobreexpresión de *Pfn1* en dichos ratones previene la pérdida de espinas, pero no restaura la complejidad dendrítica (Michaelsen et al., 2010). Probablemente las diferentes funciones de las profilinas se deben a diferentes afinidades por los efectores que también se encuentran involucrados en la dinámica de actina, la proteína *Pfn1* se une preferentemente con PIP2, mientras *Pfn2* se une con la formina mDia2 (Lambrechts et al., 1997; Michaelsen et al., 2010). Ambas vías estimulan el ensamblaje de filamentos de actina, pero en diferentes compartimentos neuronales; *Pfn1* en el compartimento de las espinas y *Pfn2a* en el compartimento de las dendritas (Michaelsen et al., 2010). Además, la sobreexpresión del receptor de pan-neurotrofina p75NTR causa una reducción de la complejidad dendrítica que es rescatada a niveles similares a los controles por la sobreexpresión de *Pfn2* (Zagrebelsky et al., 2005; Michaelsen et al., 2010).

II.IV Análisis transcriptómicos de RNAseq y miR-seq en el hipotálamo

En seguimiento al ensayo de captura de miR-7, durante su tesis de doctorado la Dra. Karla Meza-Sosa determinó el perfil de expresión de miRNAs y el transcriptoma del hipotálamo en desarrollo. Para ello, disectó el diencefalo al día E 12 y los hipotálamos en los días E 15, E 18, E 20, postnatal (P) 7 (P 7), P 14 y adulto (A). Este estudio permitió en primera instancia, corroborar observaciones previas de nuestro grupo (Tesis de doctorado Meza-Sosa, 2014) al determinar que la expresión de miR-7 se regula de manera diferencial durante el desarrollo del hipotálamo. Todos los resultados fueron expresados en número de transcritos por millón de lecturas o TPM (Figura 10). El transcrito de miR-7 aumento progresivamente, del día E 12 al E 15 aumentó un 19%, en este periodo los NPCs salen del ciclo celular, después del día E 15 al E 18 aumentó un 14%, estos días tienen la mayor

actividad neurogénica en el hipotálamo y por último del día E 18 al P 7 aumentó un 7%, en este lapso las neuronas se encuentran en la etapa de diferenciación y maduración. Finalmente, en el último periodo de P 7 a adulto, en donde la mayoría de las neuronas han madurado y establecido conexiones sinápticas con múltiples otras, hubo una disminución mínima del 1% (**Figura 10.A**).

Para el caso del transcrito de *Sept1* hubo una disminución gradual conforme progresa el desarrollo de -17% del E 12 al E 15, un -45% del E 15 al E 18 y -215% del E 18 al P 7. En contraste, al final del P 7 al adulto, hubo un aumento del 54% (**Figura 10.B**). Observando ambos patrones podemos decir que hay una correlación inversa entre los transcritos de miR-7 y *Sept1*. En cuanto al transcrito de *Sept8* hubo un aumento mínimo del día E 12 al E 15 del 1%, seguido de una disminución del -20% del E 15 al E 18, del E 18 al P 7 hubo un aumento de 21% y finalmente del P 7 a adulto un aumento de 15% (**Figura 10.C**); por consiguiente, observamos que el patrón de expresión en el E12, E15 y el P7 es muy similar y hay una sola disminución en el día 18. Por último, para el transcrito de *Pfn2* existe un aumento del 8% del E 12 al E 15, seguido de un 9% del E 15 al E 18 y un 5% del E 18 al P 7, y del P 7 a adulto una disminución de -17% (**Figura 10.D**); es decir, en relación con miR-7 tiene el mismo patrón, aumentos graduales en días embrionarios y hasta P 7 y una disminución en adulto.

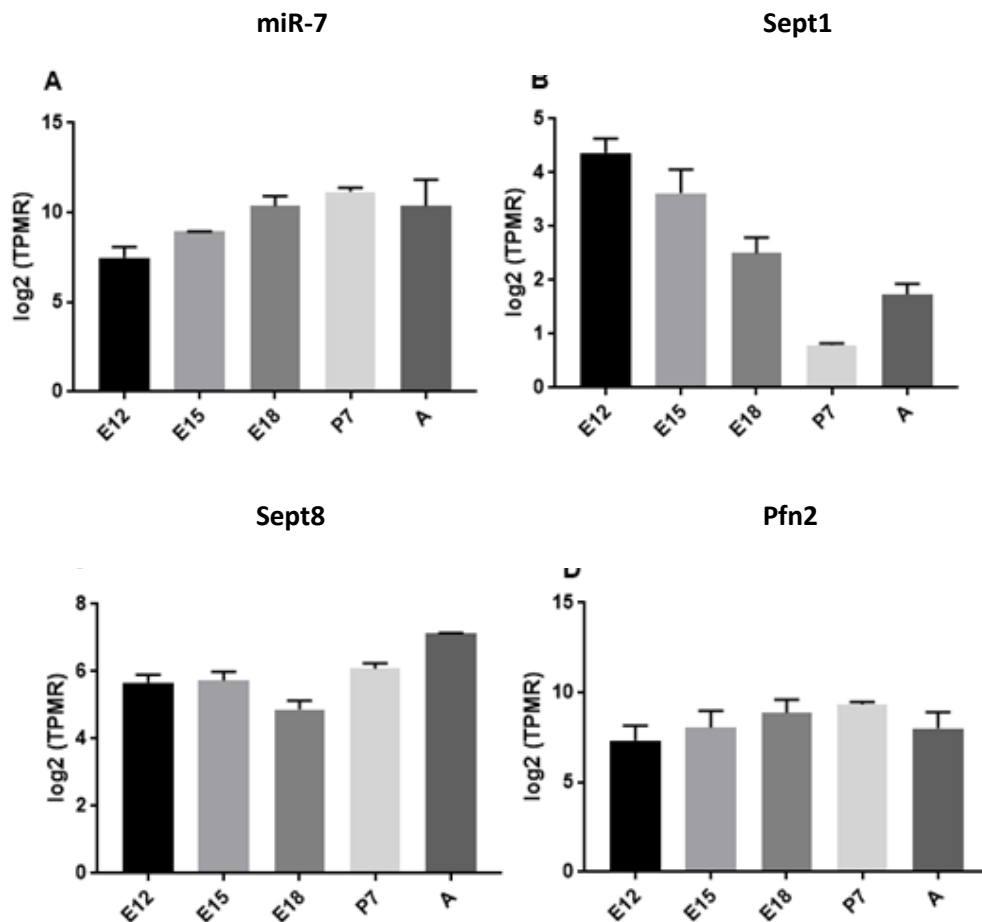


Figura 10. Esquematización del nivel de los transcritos de miR-7 (A), *Sept1* (B), *Sept8* (C) y *Pfn2* (D). Los niveles de transcrito de los genes de interés se obtuvieron por duplicado analizando las muestras obtenidas de los diencéfalos de los días embrionarios E12, E15 y los hipotálamos del día E18 postnatal 7 y adulto. Número de experimentos n=2. TPML: transcritos por millón de lectura.

III. Justificación

La neurogenesis embrionaria es un proceso altamente regulado en el que la correcta activación de programas genéticos y el control de la expresión de estos en tiempos y localizaciones específicas es de suma importancia para el correcto desarrollo del SNC. Respecto al control de la expresión génica se sabe que específicamente en el SNC el control post-trascricional de los miRNAs es de suma importancia, pues 70% de los miRNAs conocidos se expresan en el cerebro; es decir, mucho más que cualquier otro órgano en vertebrados (Yoguita et al., 2014). El miRNA que despertó nuestro interés fue miR-7, que participa regulando la salida del ciclo celular de las NSCs favoreciendo la diferenciación neuronal, su expresión es fundamental para la correcta diferenciación de la corteza cerebral y el bulbo olfatorio (Cui et al., 2014; Pollock et al., 2014; De Chivigney et al.; 2012). Además, miR-7 forma parte de la “huella molecular” evolutiva de los centros neurosecretorios y se encuentra enriquecido específicamente en diversos núcleos que conforman al hipotálamo.

Conocer más acerca de los factores de transcripción y sus mecanismos de regulación durante el desarrollo embrionario y diferenciación del hipotálamo es de suma importancia pues se sabe muy poco acerca de ellos y los programas genéticos necesarios para la determinación de los diferentes fenotipos hipotalámicos. En este sentido en nuestro laboratorio se ha colaborado ampliando el conocimiento de los factores de transcripción importantes para el fenotipo hipotalámico TRHérgico y se ha encontrado que dos factores de transcripción de la familia de los KLFs; Klf-4 Y Klf-10 así como el FT Atf3, son importantes para el desarrollo de este fenotipo. Identificar que un miRNA tal como miR-7 se une a la 3'UTR del FT Klf4 abre un abanico de posibilidades en cuanto a que miR-7 puede tener otros blancos en el contexto celular analizado que sean de fundamental importancia para el desarrollo del hipotálamo. Entre los blancos obtenidos del “pull-down” de miR-7 en una línea celular hipotalámica embrionaria de ratón surgieron tres blancos novedosos: *Sept1*, *Sept8* y *Pfn2*, los cuales codifican proteínas del citoesqueleto neuronal y cuya expresión se encuentra enriquecida en el cerebro (Dolat et. al, 2014; Shimoyama et al., 2003; Hu et al., 2001).

La remodelación del citoesqueleto neuronal es fundamental durante la neurogénesis, para la polarización, proliferación, migración, diferenciación y maduración neuronal, así como la plasticidad neuronal postnatal. Por lo tanto, el citoesqueleto neuronal es la base de la conectividad y por consiguiente de la funcionalidad cerebral. No hay información concerniente a la función hipotalámica de los tres blancos publicada hasta el momento; sin embargo, se ha relacionado a ambas septinas, *Sept1*, *Sept8* con los procesos patogénicos que llevan al desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (Kinoshita et al, 1998; Kurkinen et al., 2016) y se sabe que *Pfn2* es importante en la citoarquitectura de las dendritas de neuronas del hipocampo (Michaelsen et al., 2010). Conocer si los genes *Sept1*, *Sept8* y *Pfn2* son blancos funcionales de miR-7 y a su vez determinar si su inhibición es necesaria para la diferenciación neuronal, nos ayudará a entender a nivel molecular cuál es la posible función de estas proteínas en el citoesqueleto neuronal hipotalámico. Esta información contribuirá a conocer más del desarrollo del hipotálamo, lo cual es importante desde el punto de vista clínico pues diversos defectos en el desarrollo de éste llevan a padecimientos tales como diabetes insípida, hipogonadismo, defectos en el nervio óptico, obesidad, retraso mental y otros padecimientos (Michaud, 2001).

IV. Hipótesis

MiR-7 controla la dinámica del citoesqueleto durante el proceso de diferenciación neuronal a través de regular post-transcripcionalmente a *Sept1*, *Sept 8* y/o *Pfn2*.

V. Objetivos

V.I Objetivo general

Demostrar que miR-7 controla el grado de diferenciación celular mediante el control post-transcripcional de los genes que codifican a las proteínas del citoesqueleto SEPT1, SEPT8 y PFN2.

V.II Objetivos particulares

1. Corroborar que *Sept1*, *Sept8* y *Pfn2* son blancos de miR-7.
2. Demostrar que miR-7 regula la diferenciación neuronal a través de controlar los niveles de proteína de SEPT1, SEPT8 y/o PFN2.

VI. Materiales y métodos

VI.I Cultivo celular

Las células embrionarias hipotalámicas mHypoE-N1, mHypoE-N46 y mHypoA-NPY, así como las células de riñón embrionario humano HEK-293 se cultivaron en medio DMEM (Medio Eagle modificado por Dulbecco) suplementado al 10% con suero bovino fetal (SFB), 50 U/mL de penicilina 50 µg/mL de estreptomina y glutamina al 2 mM, que se mantuvieron en una atmósfera de cultivo a 37° C, 5% de CO₂ y 90% de humedad. Una vez el cultivo llegó a confluencia, se hizo un pase seriado, las células se lavaron con 1 ml de tampón fosfato salino (PBS) y se tripsinizaron durante uno o dos minutos a 37°C, tiempo en el que se despegaron del fondo de la caja. Después se añadió un volumen de medio DMEM igual al de tripsina para detener la acción de la enzima, se resuspendió la mezcla y se obtuvo una alícuota para realizar el conteo celular, utilizando la cámara de Neubauer y el método de tinción por exclusión de azul de tripano para contabilizar únicamente células vivas. En base a curvas de crecimiento de cada línea celular se determinó la cantidad de células necesarias para obtener confluencia en 24 ó 48 h y sembrar las células a dicha densidad. Dicho cultivo fue considerado como el pase seriado consecutivo de la línea celular. Para preservar la línea celular se congelaron los viales de células, siguiendo el procedimiento de lavado y desprendimiento celular por tripsinización antes mencionado, después el contenido total de la caja de cultivo se centrifugó y se depositó en un criotubo resuspendiéndose en 10% de DMSO y 90% de SFB. Los criotubos se depositaron inmediatamente en hielo seco, se trasladaron a -70°C y a las 48 h a nitrógeno líquido.

También se utilizaron ESCs de ratón llamadas ES-R1, para la obtención de proteína de estadios de proliferación y diferenciación. Dichas células fueron diferenciadas a motoneuronas por un periodo de 9 días. Las ESC fueron donadas por el Dr. Iván Velasco del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Inicialmente las ESCs fueron mantenidas brevemente en condiciones de proliferación, en medio KO DMEM suplementado al 15% con suero fetal de ternera (SFT), 1% de aminoácidos no esenciales, 2 mM de glutamax, 55 µM de β-mercaptoetanol y 50 U/mL, de penicilina estreptomina en una incubadora a 37°C, 5% de CO₂ y 90% de humedad. Para diferenciarlas se pasó el cultivo a cajas de Petri no adherentes, condición bajo la cual las ESCs se diferencian a cuerpos embrioides (EBs). Del día 2 al 6 los EBs se cultivaron en presencia de 2 µM de ácido retinoico y 10 µM de

purmorfamina, después, en el día 6 se disociaron los EBs y se sembraron sobre cubreobjetos cubiertos con poli-L-ornitina y fibronectina en medio neurobasal suplementado en medio N2B27, compuesto de medio DMEM-F12 suplementado con N-2 y B-27 y penicilina estreptomina, en una incubadora a 37°C, 5% de CO₂ y 90% de humedad por tres días más (Cortes et al., 2016).

VI.II Análisis bioinformático de sitios de unión a miR-7

Se hizo un análisis inicial de los blancos de miR-7 obtenidos por el ensayo de “pull-down” utilizando 3 herramientas bioinformáticas: miRanda-miRSVR, PITA y TargetScan. MiRanda-miRSVR (<http://www.microrna.org>; Bertel et al., 2010) y PITA (<https://www.genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07>; Kertesz et al., 2007), éstas coinciden en que para su análisis toman en cuenta la unión con la semilla, la accesibilidad del sitio en el mRNA y la conservación y la energía libre, pero además PITA toma en cuenta la abundancia del sitio de unión, por lo tanto, es la herramienta de análisis más completa. Por su parte TargetScan Mouse 7.1 (http://www.targetscan.org/mmu_71/; Lewis et al., 2005) toma en cuenta la unión con la semilla y la conservación (Peterson et al., 2014). Y miRanda-miRSVR muestra en su portal dos scores, el primero Phast Cosns que muestra el grado de conservación del sitio de unión en la 3'UTR, el cual omitimos pues para esto se utilizó TargetScan, y el segundo el miRSV score que es representativo de la fuerza del efecto regulatorio de un miRNA en una determinada 3'UTR, y está creado en base a un algoritmo de nueve transfecciones hechas en células HeLa que se correlacionan con otros parámetros del contexto en el cual se une el miRNA (Bertel et al., 2010). En el programa sólo se introduce el gen blanco y la especie en que se busca; es decir, en ratón o *Mus musculus*.

En el caso de PITA, éste otorga datos termodinámicos de ΔG_{open} , ΔG_{duplex} y $\Delta \Delta G$ que son valores de la accesibilidad del sitio blanco y la unión del miRNA, así como la posición de unión de miR-7 a la 3'UTR y el tipo de semilla dado en un formato x:y:z, en el que “x” es el tamaño de la semilla, “y” los mismatches y “z” los tipos de unión G:U o wobble. En el programa se introdujo la longitud completa de la 3'UTR obtenida de ENSEMBL (<http://www.ensembl.org/index.html>, versión 87), así como la de miR-7 obtenida de mirbase (www.mirbase.com, versión 21) y se seleccionó la opción de ratón para el organismo analizado. Por último, para el caso de TargetScan Mouse7.1, éste muestra sitios blancos conservados buscando regiones conservadas de tipo 8mer, 7mer o 6mer, que se unen en las posiciones 2 a 8 de la semilla del miRNA, añadiendo una A en la posición 1 de la semilla, es decir en un total de 8 nts y para el 7mer y para 6mer un total de 7 ó 6 nts. Así mismo, se muestran algunos sitios poco conservados. Además, TargetScan provee otros datos importantes como el score acumulativo llamado context++ referente a la eficacia de unión entre el miRNA y el blanco, así como también el PCT que se refiere a la probabilidad de que los blancos estén conservados. Para el análisis se introdujo únicamente el nombre del gen de interés en formato de ID de gen y por último la familia de miRNAs conservada que se busca, en este caso la familia de mmu-miR7-5p, es decir, el miR-7 maduro.

VI.III Análisis del enriquecimiento de vías de señalización en blancos de “pull-down”

El análisis de captura de blancos de miR-7 en la línea celular hipotalámica N1 consistió en el método que usa oligonucleótidos de miRNA biotinilados y el uso de perlas cubiertas con estreptavidina para la captura del complejo de miR-7 y sus blancos (Lal et al., 2011, Tesis de doctorado Meza-Sosa, 2014). En este “pull-down” se identificaron un total de 1,323 blancos de miR-7 en el contexto Gene Set Analysis Toolkit (www.webgestalt.org) versión 2015 (Zhang et al., 2005) haciendo un análisis de vías de enriquecimiento, para la cual se hizo uso de las vías de la Enciclopedia de Kyoto de genes

y genomas (KEGG pathways) basándonos en la base de datos para ratón, dándole como entrada los registros de Entrez que codifican para proteína. Además, el programa realizó una prueba estadística hipergeométrica, que es la prueba por default que el portal realiza para el enriquecimiento y ajustando los múltiples valores de p por el método de Benjamini y Hochberg (1995). Finalmente, se utilizó un valor de significancia de $p > 0.5$ y se consideró a una vía representativa con un mínimo de dos genes por categoría. Los datos analizados arrojan las vías más enriquecidas en orden ascendente según su valor p ajustado (adjP) por la prueba de Benjamini y Hochberg, así como el valor crudo de p antes del ajuste (rawP). Los otros datos que ofrece el análisis son el número de genes de una categoría (C), genes en el conjunto insertado y en la categoría (O), el número esperado en la categoría (E) y el grado de enriquecimiento (R).

VI.IV Análisis de enriquecimiento de vías para generar redes de interacción en citoesqueleto

Se utilizó la plataforma para análisis de enriquecimiento de vías llamada Metacore que es parte de las herramientas del portal en línea de ThomsonReuters (<https://portal.genego.com>). En dicha plataforma se hizo un análisis de ontología de genes (GO) para generar redes de interacción directa entre proteínas a partir de los blancos de miR-7 relacionados con el citoesqueleto. El valor de p determinado para la significancia fue de $p > 0.001$. La vía utilizada como base para la red de interacción fue la vía de “Citoesqueto- Regulación de rearrreglos del citoesqueleto” que fue la 11va con valor más alto de p, de los genes que se dieron como entrada 24 son elementos de dicha red y únicamente 8 interaccionaron entre sí. Debido a esto se tomó como referencia la red anteriormente generada por Webgestalt de modo que por medio de un análisis combinatorio se generó la red final de interacción, que fue menor a 50 elementos, generando 28 elementos que interaccionaron entre sí (exceptuando *Sept1* y *Sept8* que se añadieron porque son el objeto de estudio de la presente investigación). Si bien la red generada hace interaccionar a los elementos directamente, no todos ellos fueron introducidos como “input” o entrada, es decir no todos son blancos de miR-7, solamente aquellos que tienen un punto rojo del lado derecho son los que se introdujeron por el usuario. Es importante mencionar que la vía de “Citoesqueto- Regulación de rearrreglos del citoesqueleto” se compone en total de 183 elementos y aquellos elementos de la red que no fueron blancos de miR-7, se encuentran incluidos dentro del total de la vía de señalización “Citoesqueto-Regulación de rearrreglos del citoesqueleto”. El enriquecimiento de vías despliega un total de hasta 100 vías enriquecidas con los datos introducidos y además otorga datos de el $-\log(p\text{-value})$, el valor de p, el valor del enriquecimiento de descubrimiento falso (FDR) y un enriquecimiento de los genes que uno introduce en el análisis y los genes totales involucrados en una vía.

VI.V Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

VI.V.I 3'UTRs nativas

Una vez que se determinó el sitio de unión de miR-7 a cada uno de nuestros blancos *Sept1*, *Sept8* y *Pfn2* se diseñaron primers para la amplificación de las 3'UTR en el vector psiCHECK-2; las enzimas de restricción utilizadas para clonar las regiones seleccionadas de las 3'UTR fueron XhoI (CTCGAG, rojo) sentido y PmeI (GTTTAAAC, rojo) antisentido. El siguiente listado muestra los primers, la longitud del primer y del amplicón de cada 3'UTR, y la temperatura específica de amplificación:

- | | | | |
|--------------|--------------|-------------------------------|-------------------|
| <i>Sept1</i> | Sentido: | TATTCTCGAGTACCGCCTGTCTCG | Longitud: 25 nts |
| | Antisentido: | CGGTTGTTTAAACGGAGGCTTTTCTGGAG | Longitud: 30 nts |
| | Amplicón: | 217 nts | Temperatura: 64°C |

- *Sept8.1* Sentido: ACACCTCGAGACCTTCTCCATAAC Longitud: 26 nts
 Antisentido: AAAAGTTTAAACAGAGAGGAACCAGGCGAA Longitud: 30 nts
 Amplicón: 405 nts Temperatura: 60°C
- *Sept8.2* Sentido: CAACCTCGAGTAGCCAATATATTATCCA Longitud: 29 nts
 Antisentido: TCATGTTTAAACTGCACAACAGAGATTAAT Longitud: 30 nts
 Amplicón: 353 nts Temperatura: 60°C
- *Pfn2* Sentido: GCTACTCGAGCTGTAAAGTATTAGGGGAAA Longitud: 30 nts
 Antisentido: GAAAGTTTAAACGTACAGAGGCATGCACTT Longitud: 30 nts
 Amplicón: 542 nts Temperatura: 60°C

Los oligonucleótidos para Sept8 fueron dos pares para amplificar semillas separadas por aproximadamente 2000 nts por lo cual se llamaron *Sept8.1* y *Sept8.2*. Para las reacciones de PCR se utilizó 1.25 unidades de la amplificasa de BioTecMol, 1x del buffer de reacción y 1x de MgCl₂, 1 pimol/μl de oligonucleótidos sentido y antisentido y utilizando como templado base para la amplificación 100 ng de DNA genómico de ratones adultos C57BL/6J en un volumen de 25 μl de reacción. El programa para la amplificación en el termociclador fue el siguiente:

- Desnaturalización inicial de 95°C durante 5 min
 - Denaturalización de 95°C durante 45 seg
 - Alineamiento específico para cada 3'UTR durante 30 seg
 - Extensión de 72°C durante 1 min por un total de 35 ciclos
 - Extensión final de 72°C durante 7 minutos.
- } por 35 ciclos

Las temperaturas de alineamiento de las 3'UTR se determinaron a partir de hacer una estandarización con un gradiente de temperatura de 58°, 60°, 62°, 64°, 66° y 68°C, a partir de esto se observó en cuál temperatura la amplificación fue mejor y en base a ello se fijó el alineamiento para cada producto.

VI.V.II 3'UTRs mutagénicas

Para determinar la especificidad de la unión de miR-7 a la 3'UTR nativa de los mensajeros de *Sept1*, *Sept8* y *Pfn2* se generaron 3'UTRs mutantes. Se diseñaron oligonucleótidos para introducir mutaciones en el sitio de la 3'UTR en donde se une la semilla de miR-7, siguiendo las instrucciones del fabricante del kit "QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit" (Agilent Technologies). Se mutaron 2 nucleótidos de un codón, de modo que la complementariedad entre la 3'UTR y el miR-7 se modificó, apareándose menos nucleótidos entre ambos, interrumpiendo de este modo la interacción del miRNA y la 3'UTR correspondiente. A continuación, se enlistan los oligos mutagénicos con el prefijo MUT, los dos nucleótidos mutados señalados en rojo, la región de la semilla subrayada en amarillo y se la longitud de ambos:

- MUT-*Sept1* Sentido: CCATCCGACTT CGTCACCCGC GCGGCTCTAAG
 Antisentido: CTTAGAGCCGCGC GGGTGACG AAGTCGGATGG
 Longitud: 32 nts
- MUT-*Sept8.1* Sentido: TCCAGAGCCGGTGGCT GAACTTCCATTACAGTGTC

Antisentido: GAACTGTAAATGGAAGTTCAGCCACCGGCTCTGGA

Longitud: 36 nts

- MUT-Sept8.2 Sentido: TGCAATTTCTAGAGTTTAAATGATCGACCCATCGGCTGTGGCAA
 Antisentido: TTGCCACAGCCGATGGGTCGATCTTAAACTCTAGAAATTGCA
 Longitud: 42 nts
- MUT-Pfn2 Sentido: TCCTTGGCTCATCTAGTCTGCTTTTGTAGCGCATGGTTG
 Antisentido: CAACCATGCGCTACAAAAAGACAGACTAGATGAGCCAAGGA
 Longitud: 40 nts

VI.VI Electroforesis de DNA en gel

Los productos de PCRs y digestiones diagnósticas se separaron en un gel de agarosa al 1% en buffer TBE (Tris-boratos- EDTA) 0.5x o bien en buffer TAE 1x (Tris-Acetato-EDTA) diluidos en agua destilada (preparados según Sambrook et al., 2001) utilizando como buffer de corrida el mismo buffer 1x y corriendo el gel en un voltaje de 100 volts. Para visualizar el DNA se tiñó el gel en una solución de Bromuro de Etidio en una concentración de 1 µg/µl durante diez minutos, para posteriormente obtener la imagen del gel mediante un transiluminador de luz UV (BioRad).

VI.VII Purificación de DNA

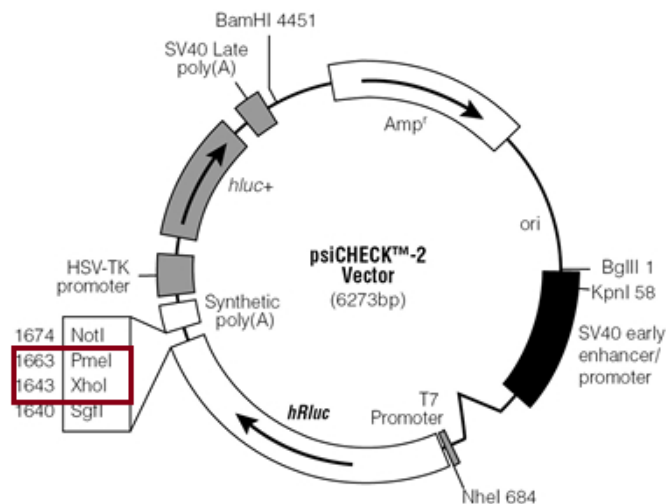
Después de realizar la tinción y visualización de las bandas del DNA de interés, éstas se cortaron tratando de minimizar el volumen del gel y se introdujeron en tubos eppendorf con buffer especial para disolver el gel. Posteriormente, se siguió el protocolo para la purificación del DNA utilizando el kit "GeneJET Gel Extraction Kit". El DNA final se eluyó en el buffer proporcionado por el kit y posteriormente se cuantificó lo obtenido por medio de nanodrop.

VI.VIII Obtención de clonas

VI.VIII.I Obtención de clonas recombinantes nativas (digestión, ligación y transformación)

El vector que se utilizó para clonar fue psiCHECK-2 (Promega), este vector permite ligar la 3'UTR de interés río abajo del gen de luciferasa de *Renilla*, por lo cual, la actividad bioluminiscente de dicha enzima es tomada como el valor de lectura de actividad de luciferasa experimental, y en otro marco de lectura se encuentra el gen de luciferasa de *Firefly* que se considera un control interno de transfección. Además, el vector cuenta con el gen de ampicilina *Amp* como antibiótico de selección de clonas y diversas enzimas que cortan dejando extremos cohesivos (**Figura 11.A**). Se usaron las enzimas XhoI y PmeI (New England Biolabs) para digerir el vector y las 3'UTRs utilizando para ambas digestiones un mismo buffer compatible sin actividad estrella por un lapso de 2 h en un baño maría a 37°C, siguiendo las instrucciones del fabricante (New England Biolabs).

11.A



11.B

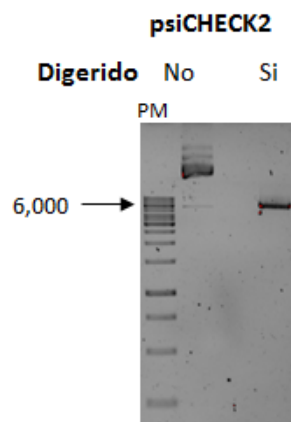


Figura 14. Vector psiCHECK-2 para clonación de 3'UTRs nativas. (A) Se muestra esquematizado el mapa del vector psiCHECK-2 cuya longitud es de 6,237 pb, haciendo énfasis en los sitios de restricción utilizados, es decir, XhoI y PmeI (recuadro rojo). **(B)** Vector circular y linealización por digestión doble del vector psiCHECK-2 con las enzimas XhoI y PmeI.

Después de cada digestión los productos se corrieron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% para rectificar la linealización del vector (**Figura 11.B**) y para confirmar la calidad de las digestiones revisando no haya degradación de los productos. Cuando se tuvieron los insertos y vector digeridos adecuadamente se procedió a la ligación de los productos de las 3'UTRs de *Sept1*, *Sept8.1*, *Sept8.2* y *Pfn2* con el vector utilizando una relación 5:1 inserto:vector y haciendo uso de la T4 DNA ligasa (Fermentas) e incubando toda la noche a temperatura ambiente. Cada 3'UTR ligada al vector generó un tamaño diferente al vector vacío, según el tamaño del inserto (**Figura 12**). El vector vacío tiene un tamaño de 6,273 nts, mientras que psiCHECK2 ligado a *Sept1* tiene un tamaño de 6,461 nts (**Figura 12.A**), ligado a *Sept8.1* de 6,645 nts (**Figura 12.B**), a *Sept8.2* de 6,593 nts (**Figura 12.C**) y a *Pfn2* de 6,782 nts (**Figura 12.D**).

La transformación de colonias se hizo en cepas quimiocompetentes de *E. coli* DH5 α de las cuales se utilizaron 100 μ l, se les agrego 5 μ l de vector con inserto ligado (psi-*Sept1*, psi-*Sept8.1*, psi-*Sept8.2* y psi-*Pfn2*). Los controles para las transformaciones fueron el vector vacío con y sin ligasa, controles positivo y negativo respectivamente. Dichos tubos se incubaron por 20 min en hielo, inmediatamente después se les dio un shock térmico de 45 seg, seguido por 2 min en hielo. Posteriormente se incubó la alícuota de transformación con 900 μ l de medio LB (Luria-Bertani) líquido a 37°C en agitación constante durante 1 hora. Una vez transcurrida la hora de recuperación se plaquearon 200 μ l de la transformación del vector con el uso de perlas de vidrio en cajas de LB adicionado con ampicilina 100 μ g/ml para la selección de las colonias. Dichas cajas se incubaron toda la noche en el horno a 37°C. A la mañana siguiente se seleccion 3 colonias de cada 3'UTR transformada, cada una de las cuales se inoculó en 5 ml de medio LB adicionado con ampicilina (100 μ g/ml) y se dejó crecer toda la noche. Al día siguiente a partir de este inóculo se hizo una miniprep y a partir de ella se siguieron dos estrategias para corroborar la presencia del inserto en el vector. La primera fue tomar 1 ng de DNA plasmídico y a partir de este amplificar la 3'UTR por PCR y la

segunda fue hacer una restricción diagnóstica de dicho producto amplificado para revisar la identidad del inserto. Cuando se amplificó el producto del tamaño adecuado y la restricción diagnóstica resultó correcta, los insertos se mandaron a secuenciar para confirmar la presencia del inserto de la 3'UTR de *Sept1*, *Sept8.1*, *Sept8.2* y *Pfn2* en el vector psiCHECK-2.

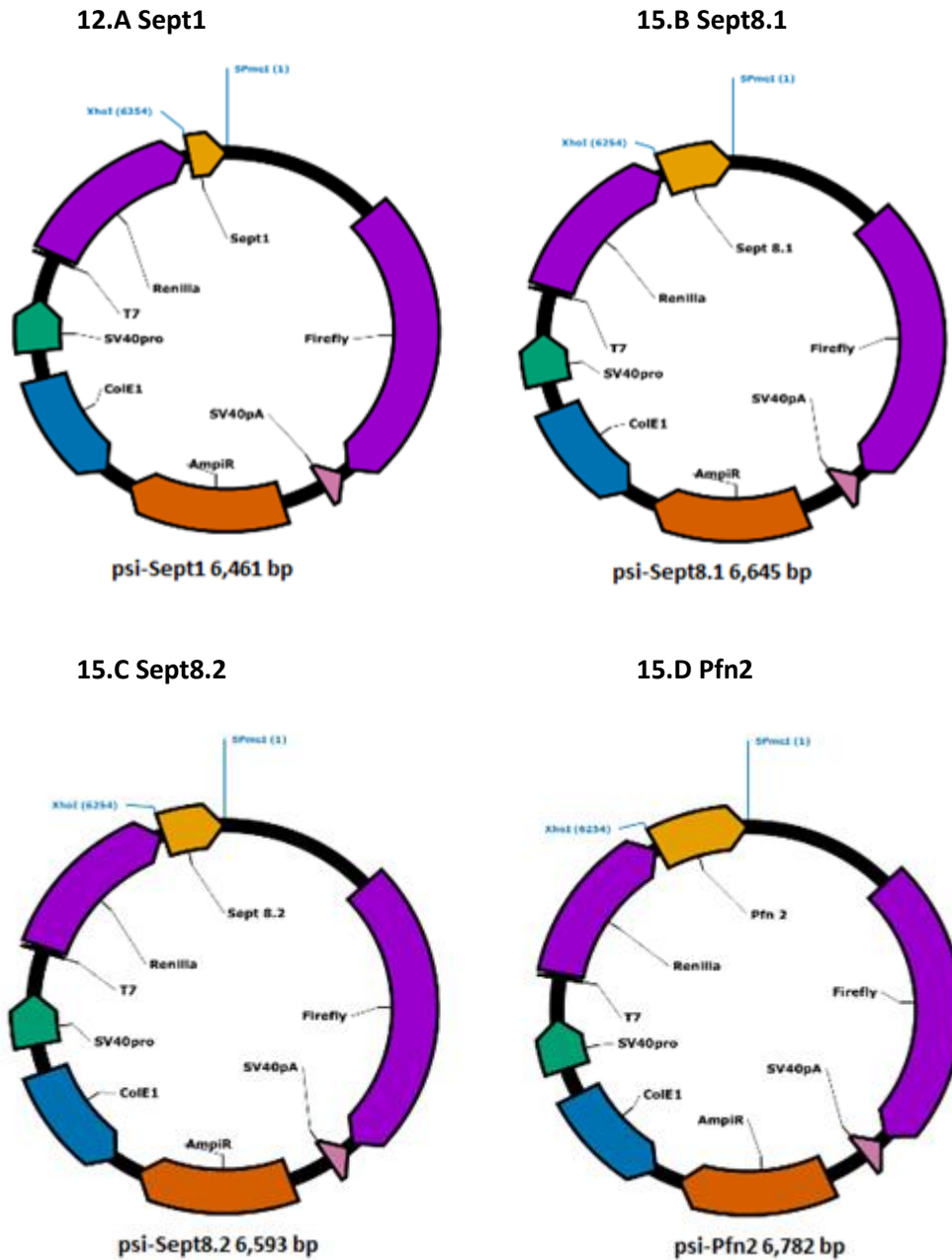


Figura 12. Se muestra el mapa del vector psiCHECK-2 con cada uno de los fragmentos de 3'UTR nativas *Sept1* (A), *Sept8.1* (B), *Sept8.2* (C) *Pfn2* (D), clonadas en amarillo río abajo del gen de luciferasa de Renilla (morado); también se muestra esquematizado el promotor SV40 y T7, el sitio de poliadenilación de SV40 SV40pA, el gen de resistencia a ampicilina, el origen de replicación Col E1 y el gen de luciferasa de Firefly (morado), así como los sitios de restricción utilizados XhoI y Pme en azul y por último la longitud de cada vector en pares de bases (pb).

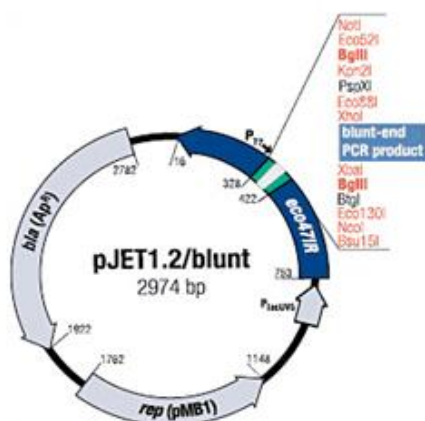
VI.VIII.II Obtención de clonas recombinantes mutantes

Inmediatamente después de haber realizado la PCR mutagénica, el producto se digirió con 1 μ l de la enzima DpnI, como indicó el fabricante del kit mutagénico, durante 1 h en un baño maría a 37°C; dicho procedimiento tiene el propósito de digerir ADN parental metilado o hemimetilado que se usó como templado, de manera que únicamente queda íntegro el ADN que contiene las mutaciones que se diseñaron. Después de la digestión, transformamos el vector del mismo modo que el vector de las 3'UTR nativas (**Figura suplementaria 4**).

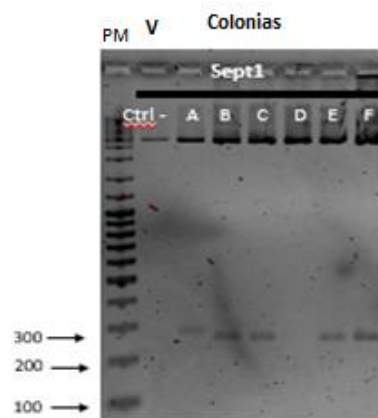
VI.VIII.III Obtención de clonas con vector de interrupción de gen letal

Inicialmente no se pudo clonar el gen de *Sept1* en el vector psiCHECK-2, por lo que se clonó como DNA pasajero en el vector pJET1.2/blunt de 2,974 pb (**Figura 13**), en el cual se utiliza el método de interrupción de un gen letal. Con este método, solo las bacterias transformadas con plásmidos recombinantes pueden formar colonias. Y aquellas moléculas del vector que no disponen de inserto de la 3'UTR de *Sept1* son letales para la bacteria *E. coli*. Es decir, el gen letal proporciona una selección positiva del vector con inserto; por lo tanto, en este método no es necesario utilizar controles de ligación. El mapa del vector muestra que el inserto de *Sept1* (**Figura 13.A**) se introduce en el sitio de clonación múltiple que cuenta con diversos sitios de restricción. Los plásmidos que se obtuvieron de la ligación de *Sept1* en el vector pJET1.2/blunt se caracterizaron por digestión con la enzima de restricción BglII para liberar el fragmento de 3'UTR ligado y confirmar que la ligación fue exitosa (**Figura 13.B**). Estos fragmentos fueron purificados del gel y posteriormente fueron digeridos con las enzimas de restricción XhoI y PmeI para ser clonados dentro del vector psiCHECK-2, siguiendo la estrategia utilizada para los vectores de *Sept8.1*, *Sept8.2* y *Pfn2*. Se caracterizó que la ligación dentro del vector psiCHECK-2 fue correcta mediante una digestión diagnóstica con la enzima BamHI que generó dos fragmentos de tamaños 2,913 y de 3,548 nt (**Figura 13.C**, carril 1 y 2), mientras que en el último carril (**Figura 13.C**), se observa el vector psiCHECK-2 vacío que se corta solo en un sitio con la enzima BamHI y por lo tanto sólo se lineariza. Al igual que con las previas clonas, habiendo confirmado la presencia del inserto se mandó a secuenciar el plásmido recombinante a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del IBt. La secuencia obtenida se alineó con la secuencia esperada para el respectivo gen de *Sept1* usando ClustalX y la alineación fue perfecta incluyendo el sitio semilla (**Figura suplementaria 4**, recuadro rojo).

13.A



16.B



16.C

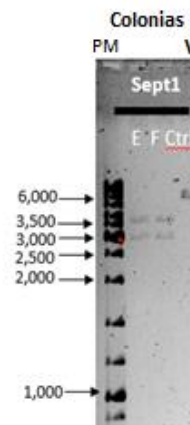


Figura 13. (A) Se muestra el mapa del vector pJET1.2/blunt esquematizado que muestra el promotor T7, el sitio, el origen de replicación Col E1 y el gen de resistencia a ampicilina y en naranja los dos sitios de restricción utilizados para constatar la presencia del inserto de la enzima BglII así como la longitud del vector que es de 3,205 pb. **(B)** Digestión con enzima BglII del vector vacío V o Ctrl- linearizado y colonias recombinantes de Sept1 de la A a la F. **(C)** En los dos primeros carriles del gel de agarosa se pueden observar las colonias recombinantes R o F que se digirieron con BamHI generando los fragmentos de 2,913 y de 3,548 nt, mientras que en el último carril V se observa el vector psiCHECK2 vacío que se corta sólo en un sitio con la enzima BamHI y por lo tanto sólo se lineariza. Los productos se resolvieron en geles de agarosa al 1% y fueron teñidos con BrEt. PM, peso molecular; Col, colonias y V, vector vacío.

VI.VIII.IV Restricción diagnóstica

Para identificar los fragmentos clonados dentro de los vectores se llevaron a cabo restricciones diagnósticas, que cortaran en algún punto medio los insertos de tal manera que antes de la secuenciación se tiene una certeza de que el fragmento clonado es el adecuado. Para dichas restricciones se utilizaron diferentes enzimas, se digirió un total de 2 µg de DNA plasmídico en un volumen total de 30 µl con una concentración de 1x de buffer y 1 µl de la enzima correspondiente durante 2 h en baño maría a 37°C. Posteriormente se revisó la identidad de los fragmentos por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1% y se comparó contra un marcador de peso molecular. Posterior a este paso se purificó y secuenció el vector con el inserto deseado.

VI.IX Purificación y secuenciación

Para mandar a secuenciar cada inserto clonado en el vector psiCHECK-2, ya sea una 3'UTR nativa o una 3'UTR mutagénica se hizo una miniprep utilizando el kit Gene Jet Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific). Se cuantifico el DNA plasmídico limpio y se resuspendieron 300 ng de éste en 15 µl de agua MilliQ. A esta alícuota se le añadieron 1 µl de oligo sentido o antisentido a una concentración 10 pmol/µl para su secuenciación. Una vez secuenciadas, cada secuencia se alineó con la secuencia teórica diseñada utilizando el programa ClustalX y se comprobó que las secuencias enviadas para cada 3'UTR eran correctas.

VI.X Transfecciones

VI.X.I Cotransfección de miRNAs, 3'UTRs y ensayos de luciferasa

Las transfecciones para lectura de luciferasa fueron todas cotransfecciones de miRNAs clonados en el vector pcDNA3.1 (Invitrogen) y 3'UTRs nativas o mutantes clonadas en el vector psiCHECK-2 (Promega). Para las cotransfecciones se sembró en cajas Petri de 35 mm un total de 375mil células mHypoE-N1; para cada condición de cotransfección se sembraron dos cajas Petri. Dicha cantidad de células llegó a confluencia de 80 a 90% después de 48 h de haber sido sembradas. Una vez en dicha confluencia las células se lavaron con 500 µl de PBS 1x y el medio de cultivo se cambió por el mismo medio DMEM, pero sin suplementar. Para cada caja de Petri se prepararon:

- 3 µl de lipofectamina más 47 µl de medio DMEM no suplementado, que se dejó incubar 5 min a temperatura ambiente.
- 100 ng de vector vacío psiCHECK-2, o de las 3'UTRs nativas correspondientes más una cantidad creciente de 200, 400, 800 y 1000 ng de pcDNA3.1, miR-7 o miR-881. Dependiendo de la cantidad de µl que sumaran ambos vectores en cada caso se completó el volumen a 50 µl de la mezcla de ambos vectores con medio DMEM no suplementado y se dejó incubar 20 min a temperatura ambiente.

La mezcla total de 100 μ l de transfección fue agregada a cada caja de cultivo identificada con los vectores correspondientes y se incubó durante 4 h en la incubadora a 37°C, 5% de CO₂ y 90% de humedad. Una vez que transcurrió el tiempo se quitó el medio de cultivo DMEM no suplementado y se agregó medio DMEM suplementado al 10% y adicionado con antibióticos y glutamina como se indica en el apartado de cultivo celular. Dos días después de la transfección, al cumplirse 48 h, las células se lavaron con 500 μ l de PBS y consecutivamente se cosecharon agregándoles 100 μ l de buffer de lisis y raspando el contenido de cada caja. Siguiendo las instrucciones del kit de “Dual-Luciferase Reporter Assay System” el contenido de cada tubo se centrifugó para separar únicamente a las proteínas de la lisis celular, y con 5 μ l de dicho lisado y 15 μ l del buffer lisis se procedió a leer cada luciferasa en el luminómetro, cada una con 100 μ l de su respectivo buffer. Para calcular las RLUs se utilizó la siguiente fórmula:

$$RLUs = \frac{\text{MUESTRA*miRX(Renilla/Firefly)}/\text{MUESTRA*pcDNA(Renilla/Firefly)}}{\text{CONTROL*miRX(Renilla/Firefly)}/\text{CONTROL*pcDNA(Renilla/Firefly)}}$$

En la cual “MUESTRA” se refiere a una 3’UTR ya sea *Sept1*, *Sept8.1*, *Sept8.2* y *Pfn2*, y “CONTROL” a psiCHECK2 vacío y se normalizaron tomando los valores de pcDNA vacío como 1. Este diseño inicial se hizo para estandarizar en que concentración de miR-7 las unidades relativas de luciferasa disminuyen más. Una vez teniendo los resultados se fijaron las dos mejores cantidades de miR-7 para cada 3’UTR:

- *Pfn2*: 400 y 800 ng de miR-7.
- *Sept1*, *Sept8.1* y *Sept8.2*: 800 y 1000 ng de miR-7.

A partir de dichas concentraciones se hicieron los experimentos por triplicado para determinar la significancia estadística de cada cotransfección y adicionalmente se agregó la 3’UTR mutante a cada experimento para determinar la especificidad de la respuesta de cada 3’UTR y medir las unidades relativas de luciferasa de cada caso.

VI.X.II Tranfección de miRNAs y 3’UTRs para ensayos de Western-blot

El otro experimento de transfección realizado fue una transfección únicamente con pcDNA3.1, miR-7 en cantidades crecientes y miR-881 bajo las mismas condiciones de las cotransfecciones. El objetivo de este experimento fue realizar la transfección de miR-7 y ver su efecto a nivel de traducción mediante el análisis de estas por Western-blot. A diferencia del apartado anterior, las proteínas de dichos experimentos se extrajeron en otro buffer de lisis indicado en el apartado de Western-blot. Las concentraciones utilizadas para el vector fueron las siguientes:

- pcDNA3.1: 200ng
- miR-7: 250, 500, 1000 y 2000ng
- miR-881: 1000ng

Las concentraciones cambian respecto a las de los ensayos de luciferasa para representar un aumento en múltiplos de 250ng.

VI.XI Extracción de proteína y Western-blots

Se hicieron Western-blots extrayendo proteína de diferentes líneas celulares, una vez teniendo un 90% a 100% de confluencia, se quitó el medio de la caja y se lavó con 500 μ l de PBS, después se retiró el PBS la caja y se le agregó 200 μ l de cocktail de extracción de proteínas compuesto de:

inhibidor de proteasas Complete 10x (Roche), suplementado con Ortovanadato 100mM, PMSF 1 μ M, y DTT 0.1M, y diluido en medio TLB (Triton Lysis Buffer). Cada caja de cultivo se raspó con un cosechador de células, se centrifugó su contenido y se recuperó únicamente el sobrenadante de la lisis celular. Mediante una curva estándar de BSA se determinó la concentración de proteínas de cada sobrenadante por el método de Bradford y se hicieron cálculos para obtener los μ g de proteína necesaria para el ensayo.

Las proteínas fueron resueltas en geles de 12.5% de acrilamida y un amperaje de 35mA por gel. Después se hizo una transferencia húmeda a membranas de nitrocelulosa usando un voltaje de 100 volts durante 90 min. Después de la transferencia la membrana de nitrocelulosa se tiñó con rojo de Ponceau para observar las proteínas y la calidad de la transferencia; posteriormente la membrana se dejó bloqueando en leche baja en grasa al 5% en TBS 1x y Tween-20 0.1% durante 1 h. Pasado esto, la membrana se incubó con los anticuerpos primarios, SEPT1 (T-16, goat), SEPT8 (C-5, mouse), PFN2 (4K-6, mouse) y ACTINA (I-19, goat) todos de Santa Cruz, durante toda la noche a -4°C. Al siguiente día la membrana se incubó con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana se reveló utilizando los sustratos Western Lightning Plus-ECL (Perkin Elmer Inc) y films radiográficos (Kodak Films). Para hacer el análisis por densitometría en el experimento de las transfecciones de miR-7, se utilizó el software de Image Lab (Bio Rad) para obtener los valores de intensidad de cada banda que generaron las proteínas analizadas SEPT1, SEPT8 y PFN2 y su respectiva ACTINA. El cálculo se hizo dividiendo la intensidad de la banda de proteína entre su respectivo control de carga y normalizando a 1 los valores de las células transfectadas con el vector vacío, es decir, pcDNA3.1.

VI.XII Extracción de RNA, transcripción reversa y qPCR de miR-7

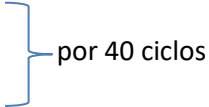
Se extrajo RNA de células embrionarias hipotalámicas mHypoE-N1 y mHypoE-N46, células hipotalámicas adultas mHypoA-NPY, dos líneas de neuroblastoma de ratón N2A y de humano SYHY5Y, así como células embrionarias humanas de riñón HEK-293. La extracción se hizo siguiendo un método modificado de Chomczynski y Sacchi (1987), utilizando tiocianato de guanidina y extracción con fenol cloroformo. El RNA extraído se cuantificó por nanodrop, para tomar únicamente 1 μ g de RNA de cada línea celular el cual fue poliadenilado y retrotranscrito por medio del kit NCode miRNA First-Strand cDNA Synthesis siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Como control de la retroranscripción se utilizó únicamente 1 μ g de RNA, pero no se le agregó retrotranscriptasa. A partir del cDNA generado se tomó 1 μ l y se le añadió 300 nM de oligo sentido y 200 nM de antisentido. El oligo antisentido lo provee el kit Ncode antes mencionado y se considera un oligo universal (Invitrogen), el oligo sentido se diseñó así:

- miR-7a Sentido: TGGAAGACTAGTGATTTTGGTGT Longitud: 23 nts
Universal: GTGCAGGGTCCGAGGT Longitud: 16 nts

Además, se usó a la proteína del spliceosoma U6 como control interno de la amplificación, para lo cual se usaron los oligos reportados previamente por Visionte y colaboradores (2006):

- U6 Sentido: TGGAAGACTAGTGATTTTGGTGT Longitud: 23 nts
Universal: GTGCAGGGTCCGAGGT Longitud: 16 nts

El qPCR se realizó siguiendo las instrucciones del kit Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2x (Thermo Scientific) y utilizando el siguiente programa:

- Desnaturalización inicial de 95°C durante 10 min
 - Denaturalización de 95°C durante 15 seg
 - Alineamiento a 62°C durante 30 seg
 - Denaturalización de 95°C durante 15 seg
 - Curva de fusión de 60°C a 90°C aumentando en 0.5°C
- 
- por 40 ciclos

Los resultados de la expresión de miR-7 se reportaron en términos de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, usando al RNA pequeño U6 como control interno y a HEK-293 como muestra calibradora ajustada a 1.

VI.XIII Análisis estadístico

En aquellos resultados en los que la n es mayor a uno (n=2 o n=3) presentan sus datos como promedio \pm error estándar (SEM). Se hicieron pruebas estadísticas para determinar la significancia de las medias. La prueba de Tukey para las lecturas de luciferasa en donde *p \leq 0.05, **p \leq 0.01 y ***p \leq 0.0001. Y para los Westen-blots se utilizó la prueba de t de Student en donde *p \leq 0.05. Las gráficas y los análisis se hicieron utilizando el software de estadístico de Prisma.

VII. Resultados

VII.I La regulación del citoesqueleto es una vía representativa de los genes blanco de miR-7

El análisis de “pull-down” realizado en un contexto neuronal hipotalámico embrionario dio como resultado un total de 1,323 genes blanco de miR-7, los cuales se introdujeron en dos plataformas de análisis diferentes para determinar de qué procesos o vías de señalización forman parte. El primer análisis realizado fue un enriquecimiento de vías de señalización por medio del uso de la Enciclopedia de Kyoto de genes y genomas (KEGG) utilizando el software en línea de Webgestalt (www.webgestalt.org). Este programa analiza un conjunto de genes y los incluye en diferentes vías de señalización acorde a su anotación. Introduciendo el total de genes se obtuvo que estos participan en un total de 28 vías (**Tabla 2**). El análisis de KEGG proporciona los siguientes datos: número de genes de una categoría (C), genes en el conjunto insertado y en la categoría (O), el número esperado en la categoría (E), el grado de enriquecimiento (R) y el valor de p crudo sin ajuste para los múltiples análisis (rawP) y los de p ajustados (adjP) para integrar los valores de significancia de los diferentes grupos por el método de Benjamini y Hochberg (**Tabla 2**). El valor estadístico de p se ajustó a un valor de $p > 0.05$, los resultados se encuentran en el orden del menor al mayor valor de p ajustado (adj p). Notablemente, en los resultados se observó enriquecida una vía del citoesqueleto, el cual es de nuestro interés específico. Además, entre las primeras tres vías con mayor valor de significancia se encuentran respectivamente la vía de señalización de insulina, la vía de señalización de MAPK (proteínas cinasas activadas por mitógenos) y un tipo de cáncer (**Figura 11**). De entre las primeras 10 vías señaladas la “Vía de señalización de neurotrofinas” muestra la vía más relacionada con la neurogénesis representada en el total de los 1,323 blancos, puesto que éstas son indispensables en el desarrollo por su papel en favorecer la sobrevivencia de las neuronas (Oppenheim, 1989); ninguno de nuestros blancos se incluye en esta vía, pero sus resultados llevan a la modificación del citoesqueleto de actina pues las neurotrofinas favorecen el crecimiento y direccionamiento axonal así como la sinapsis (KEGG).

La vía de interés principal que apareció en el enriquecimiento de las vías de KEGG relacionada con la diferenciación neuronal por medio de cambios del citoesqueleto fue la “Regulación del citoesqueleto de actina”, la cual contiene a las profilinas incluida *Pfn2* y está localizada por sus valores de significancia en el lugar 23 (**Tabla 2**), con un valor de p crudo de 5.2×10^{-3} y de p ajustado de 0.033, con 19 miembros distribuidos en 13 elementos de la vía (**Figura suplementaria 1**) dentro de un total de 215 genes. Dentro de la vía de señalización se muestran en rojo los genes que resultaron blancos de miR-7 en el ensayo de “pull-down” y forman parte de la regulación del citoesqueleto de actina (**Figura 14**), según la anotación de KEGG. Ahora bien, dentro de cada elemento en la vía hay diferentes miembros y sólo algunos son parte del conjunto introducido de genes blanco de miR-7; por ejemplo, dentro del elemento de profilina se encuentran las cuatro formas de profilina, pero sólo la *Pfn2* resultó ser blanco de miR-7 en el ensayo de “pull-down” (**Figura suplementaria 1**). Las septinas no se encontraron mencionadas en la vía de remodelación de actina anotada por KEGG, pero modificando el valor de significancia de p a $p > 0.1$ se volvió a realizar el análisis y se encontró a *Sept1* dentro de la vía llamada “Invasión bacteriana de células epiteliales” (**Figura 15**) en la posición 37 (no mostrado). Como se ha mencionado antes, el hecho de que las septinas no se hayan encontrado en la vía de “Remodelación de la actina” no quiere decir que no tengan función en esta vía, sólo que específicamente se desconoce la función de ambas, *Sept1* y *Sept8*, en el funcionamiento de los microfilamentos y por lo tanto no se encuentran aún anotadas específicamente en esta vía. Si se observa la **Figura 15** se puede identificar

que la *Sept1* se encuentra relacionada en ese contexto con la polimerización de actina; lo cual ha sido demostrado solo en el contexto de la infección por *Listeria monocytogene* (KEGG).

#	Nombre de la vía	C	O	E	R	rawP	adjP
1	Vía de señalización de insulina	137	20	6.31	3.17	4.88E-06	0.0005
2	Vía de señalización de MAPK	268	30	12.35	2.43	7.22E-06	0.0005
3	Cáncer de próstata	89	14	4.10	3.41	5.44E-05	0.0028
4	Proteólisis mediada por ubiquitinas	139	17	6.40	2.65	2.00E-04	0.0043
5	Cáncer de células no-pequeñas de pulmón	55	10	2.53	3.95	2.00E-04	0.0043
6	Cáncer de células pequeñas de pulmón	86	13	3.96	3.28	2.00E-04	0.0043
7	Fagocitosis mediada por F gamma R	90	13	4.15	3.14	2.00E-04	0.0043
8	Vía de señalización de neurotrofinas	130	16	5.99	2.67	3.00E-04	0.0057
9	Biosíntesis de glicosaminglicanos - keratán sulfato	15	5	0.69	7.24	4.00E-04	0.0068
10	Vía de señalización de quimiocinas	183	19	8.43	2.25	8.00E-04	0.0101
11	Glioma	66	10	3.04	3.29	8.00E-04	0.0101
12	Vía de señalización del receptor de células B	76	11	3.50	3.14	7.00E-04	0.0101
13	Factores de transcripción basales	35	7	1.61	4.34	9.00E-04	0.0105
14	Vías relacionadas con cáncer	322	28	14.83	1.89	1.00E-03	0.0109
15	Endocitosis	219	21	10.09	2.08	1.30E-03	0.0132
16	Vía de señalización de Jak-STAT	153	16	7.05	2.27	1.90E-03	0.0181
17	Vía de señalización de ErbB	87	11	4.01	2.74	2.10E-03	0.0181
18	Cáncer colorectal	63	9	2.90	3.10	2.30E-03	0.0194
19	Cáncer endometrial	52	8	2.40	3.34	2.50E-03	0.0200
20	Reparación de escisión de nucleótidos	43	7	1.98	3.53	3.30E-03	0.0251
21	Leucemia aguda mieloide	57	8	2.63	3.05	4.40E-03	0.0318
22	Cáncer pancreático	71	9	3.27	2.75	5.20E-03	0.0329
23	Regulación del citoesqueleto de actina	215	19	9.90	1.92	5.20E-03	0.0329
24	Biosíntesis de glicosilfosfatidilinositol	25	5	1.15	4.34	5.10E-03	0.0329
25	Uniones gap	88	10	4.05	2.47	7.20E-03	0.0421
26	Guía de axones	130	13	5.99	2.17	7.00E-03	0.0421
27	Vía de señalización de VEGF	76	9	3.50	2.57	8.10E-03	0.0456
28	Vías metabólicas	1175	72	54.13	1.33	8.60E-03	0.0467

Tabla 2. Vías de señalización enriquecidas en blancos de miR-7 analizadas con KEGG. Haciendo uso de la Enciclopedia de Kyoto de genes y genomas se analizó el total de blancos de miR-7 que resultó en 28 vías de señalización las cuales se encuentran ordenadas tomando en cuenta su valor de p crudo (rawP) y ajustado (adjP). Además, se proporcionan el número de genes de una categoría (C), después los números de genes en el conjunto dado y en la categoría (O), el número esperado en la categoría (E), el grado de enriquecimiento (R).

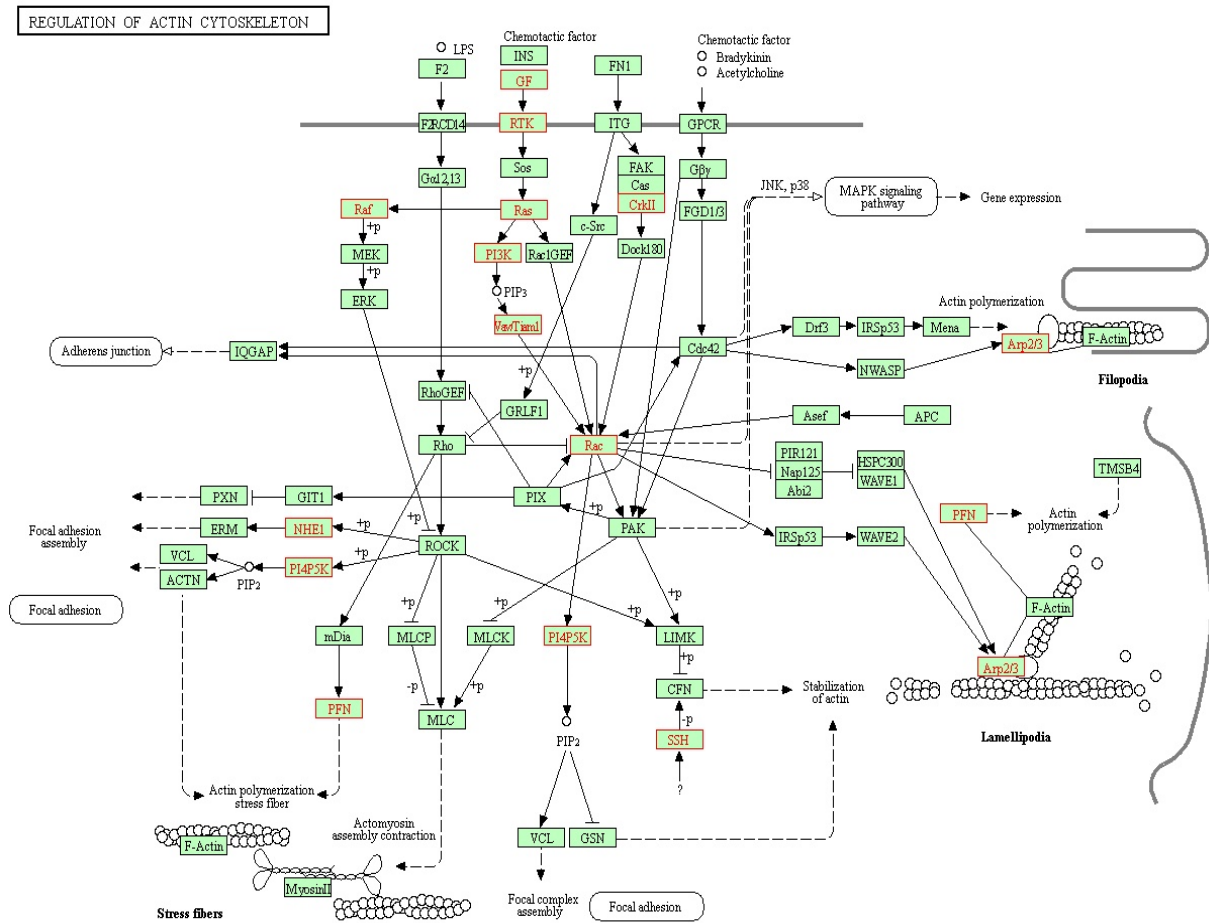


Figura 14. Elementos de la vía de “Regulación del citoesqueleto de actina” obtenidos por KEGG pathways, en rojo se muestran los elementos que son parte de los 1,323 blancos del “pull-down” de miR-7.

Invasión bacteriana de células epiteliales

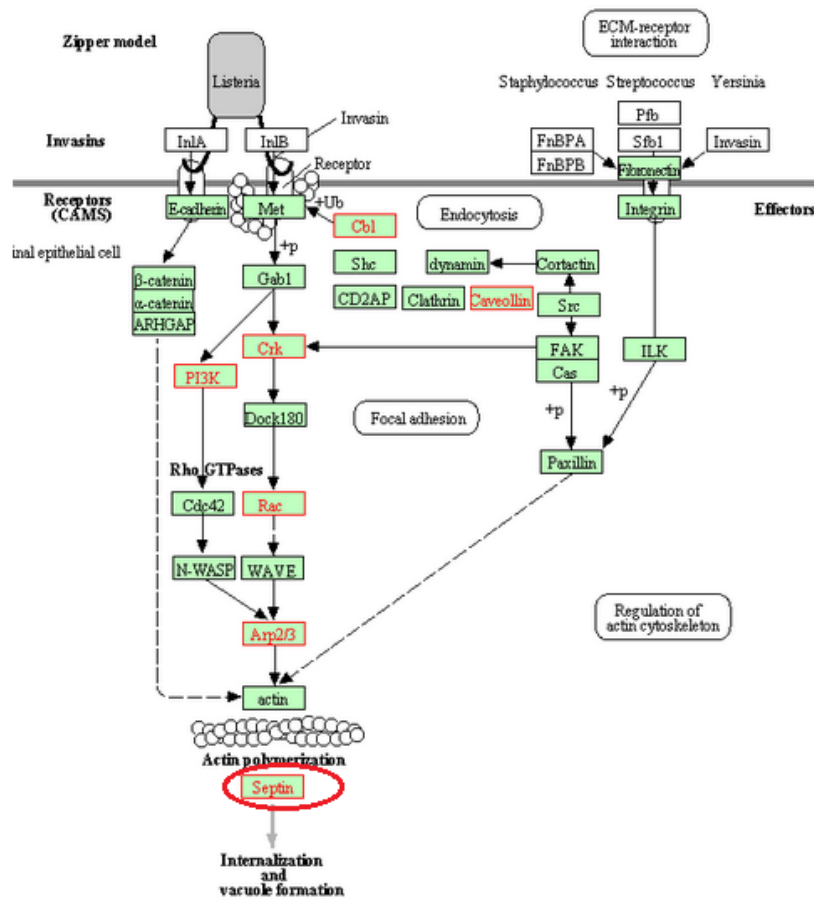


Fig 15. Vías de enriquecimiento “Invasión bacteriana de células epiteliales”. Elementos de la vía “Invasión bacteriana de células epiteliales” obtenidos por KEGG pathways, con el texto en rojo se muestran los elementos que son parte de los 1,323 blancos del pull-down de miR-7. Los demás valores obtenidos en dicha vía fueron C=70; O=8; E=3.22; R=2.48; rawP=0.0149; adjP=0.0612, donde C es el número de genes de una categoría, O el número de genes en el set dado y en la categoría, E el número esperado en la categoría, R el enriquecimiento, rawP el valor crudo de p antes del ajuste y adjP el valor de p ajustado por la prueba de Benjamini y Hochberg.

Tomar en cuenta sólo una base de datos para el enriquecimiento de blancos es inadecuado, puesto que revisando otras bases se pueden encontrar anotaciones diferentes; por dicha razón decidimos usar la plataforma de Metacore disponible en el portal online de ThomsonReuters (<https://portal.genego.com>). El valor estadístico de p se ajustó a un valor de $p > 0.001$, es decir, un valor con mayor significancia que el obtenido por KEEG, bajo el cual la vía “Citoesqueleto, regulación de rearrreglos del citoesqueleto” (**Tabla 3**) apareció enriquecida en la posición número 11. Arriba de dicha vía hay diversos procesos relacionados con la transición de G1 a S del ciclo celular (**Tabla 3**), esta etapa es importante en la neurogénesis, pues en ella se arrestan los NPCs que son células postmitóticas para de tal modo dejar de dividirse, quedar en G0 e iniciar su diferenciación (Cui et al., 2014). La expresión de interleucina 2 (IL-2) se relaciona con los procesos de neurogénesis del hipocampo y el septum, pues ratones “knockout” para IL-2 muestran defectos en la citoarquitectura de esas dos regiones del cerebro, así como una reducción en los niveles de BDNF y un aumento de NGF (Beck et al., 2005). Igualmente, arriba de la posición 11 se encontraron vías relacionadas con genes antiapoptóticos como las MAPK que se asegura de que los NPCs postmitóticos no mueran y

por lo tanto puedan seguir el programa de diferenciación al cual se han comprometido y la señalización mediada por JAK/STAT que además de ser antiapoptótica es importante en el SNC pues participa en procesos de proliferación neuronal, como en el caso de JAK2 o de diferenciación en el caso de JAK3 (Lu et al., 2006; Nicolas et al., 2013).

La vía de enriquecimiento “Citoesqueleto, regulación del rearrreglo del citoesqueleto” se compone por un total de 183 genes, dentro de los que sólo 24 son parte de los 1,323 blancos de miR-7. Esta vía tiene un valor de p de 2.22×10^{-4} , un FDR de 3.732×10^{-3} y un $-\log(\text{p-value})$ aproximado de 3.7 (**Tabla 3**). Para su mayor estudio, la vía se analizó utilizando el enriquecimiento de vías y formación de redes con interacciones directas, a partir de ellas se generó una red (**Figura 16**), en la que se observa que los 24 genes se establecen como 17 elementos en la interacción y no todos estos interactúan directamente. Únicamente ocho genes situados dentro del citoplasma interactuaron; por otro lado, también lo hicieron dos localizados en el citoplasma y la membrana (**Figura 16**). La lista de los 24 genes y los elementos que representan en la red se enlista en la **Figura suplementaria 2** con números romanos.

#	Nombre de la vía	p-value	FDR	Set / Total
1	Ciclo celular G1-S, regulación de factores de crecimiento	1.39 E-07	2.18 E-05	32/195
2	Desarrollo hematopoyesis, vía de la eritropoyetina	4.94 E-06	2.38 E-04	23/136
3	Regulación del inicio de la traducción	5.30E-06	2.38 E-04	22/127
4	Ciclo celular G1-S, regulación de interleucinas	6.05 E-06	2.38 E-04	22/128
5	Inflamación, señalización de IL-2	1.06 E-05	3.32 E-04	19/104
6	Apoptosis, anti-apoptosis mediada por señalización externa vía de MAPK y JAK/STAT	2.09 E-05	5.46 E-04	26/179
7	Apoptosis, mitocondria apoptótica	4.13 E-05	9.26 E-04	15/77
8	Transducción de señales, señalización de CCK	5.02 E-05	9.85 E-04	18/106
9	Inflamación, señalización de TREM1	1.36 E-04	2.36E-03	21/145
10	Desarrollo, regulación de la transición epitelio mesenquimal	1.69 E-04	2.66 E-03	28/225
11	Citoesqueleto, regulación del rearrreglo del citoesqueleto	2.22 E-04	3.73 E-03	24/183

Tabla 3. Vías de señalización enriquecidas en blancos de miR-7 con Metacore. Resultado del enriquecimiento de vías en los 1,323 blancos de miR-7, resultando en más de 50 vías de señalización de las cuales únicamente se encuentran enlistadas las primeras once. El p-value, muestra resultados menores al fijado de $p > 0.001$, el FDR refleja la probabilidad de que un dato sea falso, entre este valor más se aproxime a cero menos probabilidad hay de que eso suceda. El coeficiente de Set/Total habla del número de genes dentro de la vía que fueron introducidos en el conjunto inicial, es decir, son blancos de miR-7 entre el total de genes que componen la vía.

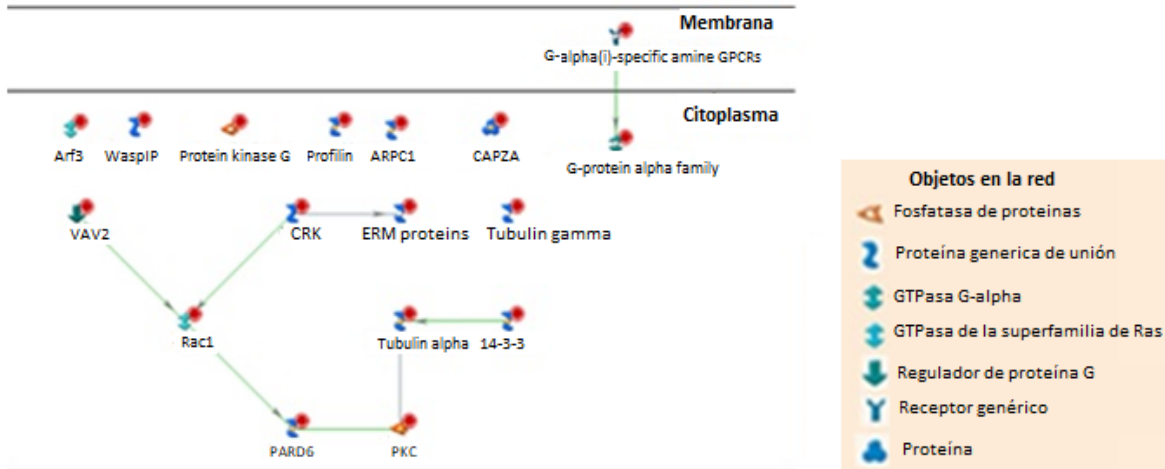


Figura 16. Resultado de la red de interacción generada por la vía “Citoesqueleto, regulación del rearrreglo del citoesqueleto” que representa a 24 genes como 17 elementos en la red, de los cuales sólo ocho interactúan directamente. Estos ocho se muestran en la parte inferior de la red unidos por flechas en las cuales las flechas verdes indican activación y para las flechas grises no se especifica la función de la interacción. En el recuadro se muestra el tipo de objeto que aparece en la red.

Para entender mejor las interacciones entre nodos revisamos la literatura para esclarecer la interacción entre cada proteína y su relevancia en el contexto de la neurogénesis y el SNC. Las proteínas que están unidas por una línea se relacionan con los microtúbulos, pues la proteína 14-3-3 se une a la tubulina alfa, y PKC es capaz de fosforilarla y esto está relacionado con favorecer el crecimiento de los microtúbulos y disminuir las catástrofes (De et al., 2014). Junto con Par6, Par3, aPKC forma un polímero que participa en la determinación de la polaridad celular en los eucariotas (Betschinger et al., 2003). Por su parte Rac1 y Vav-2, se relacionan más con los microfilamentos de actina, específicamente Vav-2 es un factor intercambiador de guanina (GEF) de Rac1 que provoca su activación y Rac-1 promueve la formación de lamelopodios (Abe et al., 2000; Meyer y Feldman, 2002). Por último, la proteína CRK es capaz de activar a Rac cuando las proteínas Sos y Dock1, ambas GEFs, se unen a su dominio SH3N (Birge et al., 2009). Además, CRK se relaciona con la motilidad celular porque interactúa con proteínas ERM, tales como ezrina, radixina y moesina, activando RhoA y promoviendo la motilidad hacia el ácido hialurónico (Tsuda et al., 2004). De entre las 8 proteínas que interaccionaron únicamente la proteína 14-3-3 se expresa de manera enriquecida en el cerebro y las demás tienen una expresión más bien ubicua (Pozuelo et al., 2004; Sluchanko y Gusev, 2010). En resumen, los blancos que interaccionan entre sí tienen funciones relacionadas a la polaridad celular, el crecimiento de microtúbulos y las modificaciones del citoesqueleto mediadas por Rac1. Con base en el análisis de KEGG y Metacore, identificamos que en el conjunto total de genes blanco de miR-7, obtenidos por “pull-down”, se encuentran enriquecidas las vías relacionadas con la regulación del citoesqueleto.

Para integrar la información de ambas plataformas se realizó una red de interacción conjunta (**Figura 17**) haciendo uso de todos los blancos de miR-7 señalados por los análisis bioinformáticos de KEGG y Metacore, permitiendo al programa de metacore añadir proteínas que no sean blancos bioinformáticos, pero sí proteínas que hagan interactuar nodos. De tal manera que, por ejemplo, si se añade la proteína actina se unen 5 nodos. La red se limitó a un número máximo de 50 proteínas para limitar su tamaño y ser más específicos, lo cual dio como resultado la siguiente figura:

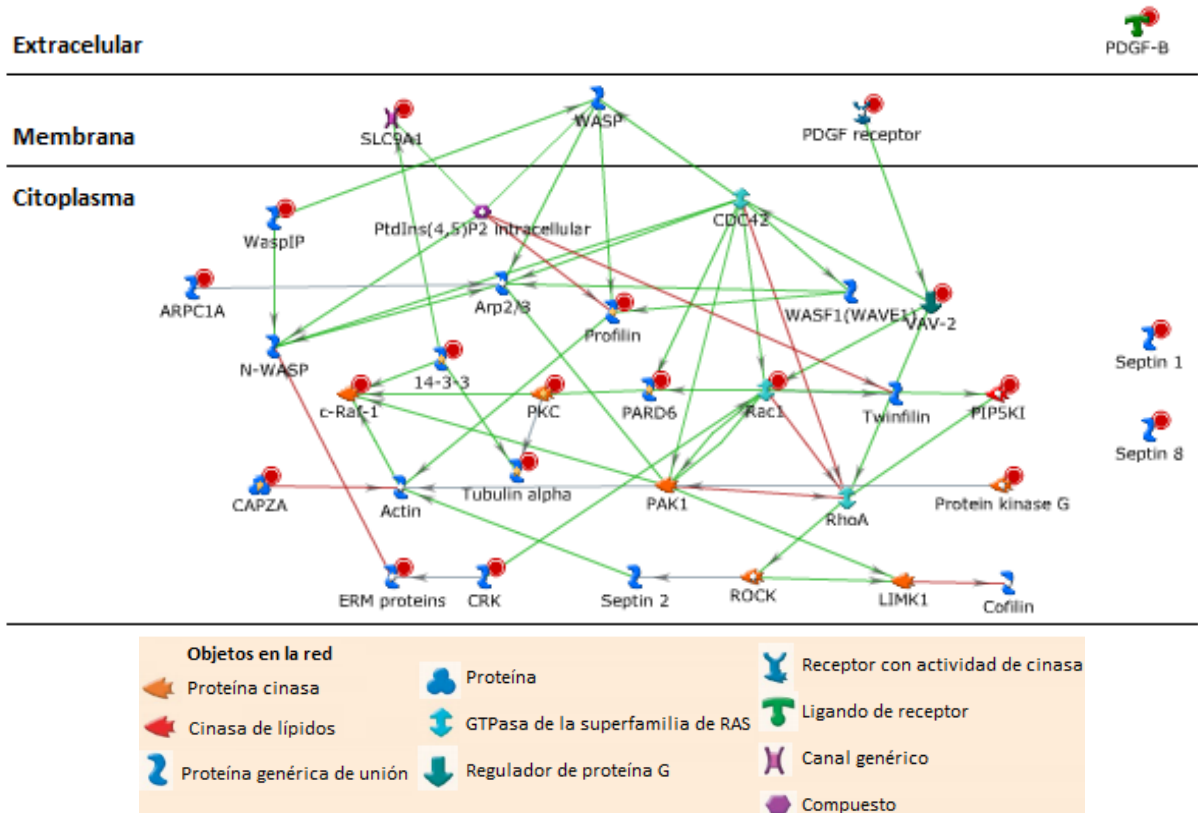


Figura 17. Red de interacción conjunta entre KEGG y Metacore. Esta red fue generada por la vía “Regulación del citoesqueleto de actina” y la vía “Citoesqueleto, regulación del rearrreglo del citoesqueleto”, creadas respectivamente por KEGG y Metacore. La vía se compone de 35 elementos, los que son blanco de miR-7 tienen un círculo rojo en su parte superior derecha. En el recuadro se muestra el tipo de objeto que aparece en la red. Las flechas de color significan en verde activación, en rojo inhibición y en gris función no determinada.

La clasificación de los componentes que son y no blancos de miR-7, es la siguiente:

- Veinte genes blanco de miR-7, identificados en el análisis de enriquecimiento de vías relacionadas al citoesqueleto por KEGG o Metacore, con un punto rojo en la esquina superior derecha:
14-3-3, ARPC1A (parte de Arp2/3), CAPZA, c-Raf1, CRK, ERM protein (Myliip), PARD6, PDGF receptor (Pdgfra), PDGF-B (Pdgfb), Profilin (Profilin2), PKC, PKG, PIP5KI, Rac1, VAV2, Sept1, Sept8, SLC9A1, Tubulin-alpha, y WASP-IP.
- Quince genes que no son blancos de miR-7 en el pull-down, pero agregan elementos que son nodos en la red y hacen que diversos elementos interactúen entre sí:
Actin, Arp2/3 (el complejo completo), Cofilina, CDC-42, LIMK, N-WASP, PAK1, PIP2, RhoA, ROCK, Sept2, Twinfilina, WASF1 (WAVE1) y WASP.

Dentro de este conjunto de 35 genes los únicos que han sido reportados como blancos biológicos funcionales de miR-7 son Pfn2, Myliip y c-Raf-1 (Latreille et al., 2015; Liu et al., 2014). En cuanto a otros posibles blancos de miR-7 en la red se muestran las proteínas WaspIP (Wipf1) y 14-3-3 η (eta) que, aunque no han sido reportadas en la literatura, si lo han sido sus proteínas parálogas Wipf2 y 14-3-3 ζ (zeta; Latreille et al., 2015; Wu et al., 2013). En caso de que haya una conservación en la secuencia de sus genes y específicamente tengan una 3'UTR similar, WaspIP y 14-3-3 η (eta) pueden ser probables blancos de miR-7. De los blancos en la red podemos observar que los que se

conectan con más nodos son las tres Rho GTPasas Rac1, Cdc42 y RhoA, actina, Profilina, PAK1, WASP, N-WASP y c-Raf-1; pues cada uno de ellos interactúa con más de tres elementos. De manera interesante, ninguna de las dos septinas, Sept1 o Sept8 interactuaron con otra proteína; pero sí lo hizo Sept2. Cabe mencionar que Sept2 forma parte de las septinas más estudiadas pues se conoce su estructura cristalográfica, tiene una expresión ubicua, se ha comprobado su unión a actina y funciona como proteína de andamiaje durante la citocinesis (Dolat et al., 2014; Beise y Trimble, 2014). Interesantemente Sept2 es una proteína redundante y pertenece a la misma familia de Sept1.

VII.II Características termodinámicas y de conservación de Sept1, Sept8 y Pfn2 los hacen ser candidatos blancos de miR-7

El algoritmo de PITA determina tres valores termodinámicos; el primero el ΔG_{open} , que es la energía libre de Gibbs que se necesita para dejar accesible el sitio de unión en el mRNA, es decir, que éste pierda su conformación secundaria y se abra. El segundo o ΔG_{duplex} , que es la energía necesaria para formar el dúplex entre el mRNA blanco y la semilla del miRNA. Finalmente, el valor del $\Delta\Delta G$, que toma en cuenta a ambos y se computa del siguiente modo $\Delta\Delta G = \Delta G_{duplex} - \Delta G_{open}$ (Kertesz et al., 2007). El hecho de que la predicción bioinformática de la unión entre un miRNA y una 3'UTR tenga un valor de $\Delta\Delta G < -10$ muestra una alta probabilidad de que esa unión sea funcional a nivel endógeno. Al inicio del proyecto se analizaron los genes de interés *Sept1*, *Sept8* y *Pfn2* de ratón usando diferentes bases de datos, entre ellas Ensembl y NCBI (Tabla 4.A). *Sept1* se localiza en el cromosoma 7, tiene 11 exones y presenta 10 variantes de splicing, pero produce sólo un mensajero que codifica una proteína. *Sept8* se localiza en el cromosoma 11, tiene 10 exones, presenta 7 variables de splicing y tres mensajeros que codifican proteínas. Por último, *Pfn2* se localiza en el cromosoma 3, tiene 3 exones, y 4 variables por splicing que producen un mensajero que codifica para una proteína. Esto es según lo publicado por NCBI; sin embargo, por lo publicado en la literatura sabemos que existen dos isoformas *Pfn2 a* y *b*, que generan dos proteínas diferentes, por lo que enunciamos en la tabla que son dos isoformas (Di Nardo et al., 2000).

Para cada gen se escogió la variante de splicing más larga de cada gen y se analizó usando PITA revisando la 5'UTR, la secuencia codificante (CDS) y 3'UTR de cada gen en búsqueda de sitios de unión a miR-7 (Kertesz et al., 2007). En cuanto a la CDS, en el caso del gen de *Sept1* miR-7 la predicción bioinformática indica que se une en el exón 2 con un valor de $\Delta\Delta G$ de -8.27 y para el gen de *Sept8* en el exón 5 con un valor de $\Delta\Delta G$ de -5.1, en cada caso con una unión de tipo 8:1:1. Esto significa que es con menor afinidad que en la 3'UTR y por lo tanto tiene una menor probabilidad de ser funcional. En el caso del análisis del gen de *Pfn2*, miR-7 por predicción bioinformática se une únicamente a su 3'UTR. Dado que el mecanismo más conocido de acción de un microRNA sobre un mensajero es por la interacción con su respectiva 3'UTR, trabajamos sólo con dichas regiones, prefiriendo uniones 08:00:00, 08:00:01 u 08:01:00 (Tabla 4.B).

4.A

Gen	NCBI status	Cromosoma	Variantes por splicing (ENSEMBL)	Mensajeros	Exones (NCBI)	3UTR (nt)
<i>Sept1</i>	Validado	7	10	1	11	316
<i>Sept8</i>	Validado	11	7	3	10	3060
<i>Pfn2</i>	Validado	3	4	2	3	1322

4.B

miR-7a en gen	Posición	Semilla	ΔG_{duplex}	ΔG_{open}	$\Delta \Delta G$	miRSVR score
<i>Sept1</i>	163	08:01:00	-13.4	-7.15	-6.24	ND
<i>Sept8.1</i>	450	08:00:01	-22.65	-12.42	-10.22	-0.278
<i>Sept8.2</i>	2245	08:01:01	-11	-6.16**	-4.83**	ND
<i>Pfn2</i>	480	08:00:00	-19	-10.14	-8.85	-0.936

Tabla 4. Características de los genes de *Sept1*, *Sept8* y *Pfn2*. (A) Descripción de los genes obtenidos a partir de diferentes bases de datos como NCBI Gene o ENSEMBL, señalando la localización en los cromosomas, variantes de splicing, mensajeros reportados, número de exones y tamaño de las 3'UTRs. (B) Datos de unión de miRNA: 3'UTR determinados por medio de PITA con valores de $\Delta \Delta G$ y tipo de semilla, así como con miRanda y el valor del score miRSVR. ND, no determinado. ** El valor de $\Delta \Delta G$ de *Sept8.2* sólo se había determinado para el ΔG_{duplex} por lo que globalmente era de -11, pero posteriormente se determinó su valor de ΔG_{open} reduciendo el score a un valor de $\Delta \Delta G$ de 4.83.

La 3'UTR de *Sept1* tiene una longitud de 316 nts (Tabla 4.A), dentro de la cual existen 3 sitios de unión al sitio semilla de miR-7. Tomando en cuenta el tipo de unión y los valores termodinámicos se decidió amplificar por PCR esta región de unión al miRNA que inicia en la posición 163 respecto al inicio de la 3'UTR, puesto que es el que tiene un $\Delta \Delta G$ más negativo de -6.24 y además presenta una unión al miRNA de tipo 08:01:00, es decir más favorable, mientras las otras dos son 08:01:01 (Figura suplementaria 3.A). A pesar de los datos de PITA, el software de miRanda-miRSVR no determinó que exista una unión favorable entre miR-7 y *Sept1*.

La 3'UTR de *Sept8* es la de mayor longitud entre los tres genes estudiados en este trabajo de investigación siendo de 3,060 nts (Tabla 4.A) y presentó 6 sitios de unión a la semilla de miR-7 (Figura suplementaria 3.B). Inicialmente, se decidió clonar los dos sitios con mejores valores termodinámicos de unión con miR-7; estos fueron los sitios situados en la posición 450 y 2,245 respecto al inicio de la 3'UTR, los cuales llamamos *Sept8.1* y *Sept8.2* que inicialmente presentaron valores de $\Delta \Delta G$ de -10.22 y -11, respectivamente (Tabla 4.B). El valor de la $\Delta \Delta G$ de *Sept8.2* originalmente había sido determinado únicamente para el ΔG_{duplex} cuyo valor es de -11, pero en la última actualización de la plataforma se determinó el valor de ΔG_{open} en -6.16, el cual se resta como valor absoluto al valor del $\Delta \Delta G_{\text{duplex}}$ y lo disminuye hasta -4.83 (Tabla 4.B). Esto hace a *Sept8.2* menos probable de ser blanco de miR-7; sin embargo, decidimos amplificar y trabajar con esta región para comparar ambos sitios y el efecto post-transcripcional de diferentes semillas de miR-7. Por otro lado, el análisis por miRanda-miRSVR encontró que existe una unión fuerte en la posición correspondiente a la *Sept8.1* con un valor de -0.278, reforzándolo como blanco más probable de miR-7.

Para finalizar, la 3'UTR de *Pfn2* tiene una longitud de 1322 nts (Tabla 4.A) y presenta 4 sitios de unión a miR-7 (Figura suplementaria 3.C), dentro de los cuales se decidió amplificar por PCR el sitio en la posición 480 respecto al inicio de la 3'UTR, pues tiene una unión muy favorable debido a su unión de tipo 08:00:00, el valor negativo más alto de $\Delta \Delta G$ entre los tres blancos de -8.85 y un score de miRanda-miRSVR de -0.936, es decir mejor que el de la 3'UTR de *Sept8.1*. Los análisis realizados por PITA y miRanda-miRSVR coinciden al indicar que tanto *Sept8* como *Pfn2* son blancos probables de miR-7, dados sus valores termodinámicos de $\Delta \Delta G$, siendo *Pfn2* el mejor candidato. Además del contexto termodinámico, también se tomó en cuenta el grado de conservación entre diferentes especies que existe entre cada gen blanco estudiado mostrado en el siguiente apartado (Tabla 5).

VII.III miR-7 reconoce sitios de unión altamente conservados en la 3'UTR de *Sept8* y *Pfn2*

La conservación del sitio de unión a miR-7 en la 3'UTR de un gen entre diversas especies es un indicador de la función o relevancia del control post-transcripcional del miRNA sobre el mRNA en cuestión. El análisis realizado en TargetScanMouse7.1 mostró que entre especies sólo se encuentran conservados el sitio de *Sept8* localizado entre la posición 450 y 460 respecto al inicio de la 3'UTR, así como el sitio de *Pfn2* localizado entre la posición 480 y 490 respecto al inicio de la 3'UTR (**Tabla 5.A**, recuadro rojo). Ambos sitios se amplificaron por PCR para su posterior clonación y corresponden a los fragmentos aquí llamados *Sept8.1* y *Pfn2*. En el caso de *Sept1*, este se encuentra determinado por el software como poco conservado, como lo muestra el valor de PCT <0.1; el valor llamado PCT oscila entre 0 y 1 y corresponde a una estimación Bayesiana de probabilidad de que un sitio conservado en una rama de un árbol filogenético se encuentre conservado debido a que se le une un miRNA, entre más se aproxime este valor a 1 más conservado se encuentra (Friedman et al., 2009). Comparando únicamente las 3'UTRs de *Sept1* de ratón y de humano se identificó que el sitio donde se une miR-7 en humano se encuentra recorrido hacia el extremo 3', pues respecto al inicio de la 3'UTR se encuentra en la posición 233 a 240, en vez de 164 a 170 (no mostrado). En el caso de *Pfn2*, el PCT tiene un score alto de 0.68, con *Sept8* el valor no se encuentra determinado a pesar de su conservación aparente y el score de PCT de *Sept1* es muy pequeño, pues es menor a 0.1.

Cabe mencionar que los sitios de unión de miR-7 con la 3'UTR de *Sept1*, *Sept8* (específicamente con *Sept8.1*) y *Pfn2* coinciden entre bases de datos, por lo que una vez habiendo hecho los tres análisis bioinformáticos se comprobó que los mejores sitios fueron los reportados en la **Tabla 5.B**. Como se mencionó anteriormente, los tres transcritos de miR-7 tienen la misma semilla; no obstante, el miRNA mostrado en la unión con las 3'UTRs es miR-7a, pues éste es el más expresado en el hipotálamo de ratón y rata adulta (Herzer et al., 2012).

5.A

Especie	Abreviatura	<i>Sept1</i>	<i>Sept8</i>	<i>Pfn2</i>
		..160.....170...	450.....460.	...480.....490..
Humano	Hsa	ACACCGCCACUUC	G--GUCUU-CCAUUUAC	UUAGUCUCCUUUU
Ratón	Mmu	UUCGUCUUC CGCGC	G--GUCUU-CCAUUUAC	CUAGUCUCCUUUU
Rata	Rno	UCCGCCUUCUAUAC	G--GUCUU-CCAUUUAC	UUAGUCUCCUUUU
Conejo	Ocu	U--GCCUCUCCCCG	.-.-.-.-.-.-.-.-.-.-	UUAGUCUCCUUUC
Chimpancé	Ptr	CACCGCCACUUCCC	G--GUCUU-CCAUUUAC	UUAGUCUCCUUUU
Rhesus	Mml	CACCGCCACUUCCC	G--GUCUU-CCAUUUAC	UUAGUCUCCUUUU
Perro	Cfa	GCCACGCC-----	G--GUCUU-CCAUUUAC-	UUAGUCUCCUUUU
Gato	Fca	GCCACGCC-----	G--GUCUU-CCAUUUAC-	UUAGUCUCCUUUU
Conservación		Poco conservado	G...GUCUU.CCAUUUAC	UUAGUCUCCUUUU
		miR-7a/b	miR-7a/b	miR-7a/b

5.B

Unión de mmu-miR-7 y 3'UTR	Posición predicha de unión	Unión a semilla	Score de contexto ++	PCT
164-170 of Sept1 3' UTR mmu-miR-7a	5' ...GGCCCAUCCGACUUCGUCUCCG... 3' UGUUGUUUUAGUGAUCAGAAGGU	7mer-m8	-0.21	<0.1
448-455 of Sept8 3' UTR mmu-miR-7a	5' ...CAGAGCCGGUGGCGUCUCCA... 3' UGUUGUUUUAGUGAUCAGAAGGU	8mer	-0.09	NA
482-488 of Pfn2 3' UTR mmu-miR-7a	5' ...UCCUUGGCUCAUCA--GUCUCCU... 3' UGUUGUUUUAGUGUUCAGAAGGU	7mer-m8	-0.43	0.68

Tabla 5. Conservación de sitio blanco de miR-7 en 3'UTR de Sept1, Sept8 y Pfn2 obtenida por TargetScan Mouse 7.1 (A) Conservación del sitio de unión a miR-7 en diversos organismos, el rectángulo en rojo marca los sitios conservados y la secuencia consenso se muestra en color rojo en la parte inferior de cada tabla. **(B)** Predicción bioinformática del sitio de unión a miR-7 que muestra la secuencia y posición del gen en donde se aparea miR-7, el tipo de unión de la semilla. El score PCT indica cuanto la probabilidad de que el blanco del miRNA sea conservado, y el score de contexto ++ la probabilidad de eficiencia de unión del microRNA con la 3'UTR.

VII.IV En cada familia de clasificación Sept1 y Sept8 tienen la más alta probabilidad de ser blancos de miR-7

Debido a la poca bibliografía disponible respecto a las septinas Sept1 y Sept8, y a que estas son redundantes entre ellas, decidimos analizar bioinformáticamente, utilizando PITA, los datos de la unión termodinámica entre las septinas en estudio y miR-7 comparándolas con los miembros de sus respectivas familias mostradas a continuación:

- Sept2, que incluye a Sept1, Sept2, Sept4 y Sept5.
- Sept6, que incluye a Sept6, Sept8, Sept10, Sept11 y Sept14.

El análisis mostró que no todos los miembros de las familias se unen a miR-7, en el caso de la familia Sept2, Sept4, y en el caso de la familia Sept6, Sept10 y Sept14, no se unen. Interesantemente, los datos mostraron que de entre los miembros de cada familia, Sept1 y Sept8 tienen los $\Delta\Delta G$ más altos para la unión con miR7 (**Tabla 6.A y 6.B**). Esta información es de suma importancia pues apoya el hecho de porqué estas septinas fueron las únicas que se obtuvieron por el “pull-down” de miR-7 hecho en células mHypoE-N1, indicando que el ensayo es sensible y preciso. Cabe mencionar que estos valores de $\Delta\Delta G$ son diferentes a los dados en la **Tabla 4**, puesto que estos scores son los totales de todos los sitios de unión a miR-7 en cada 3'UTR correspondiente.

6.A

Blancos Predichos de Familia 2	microRNA	Sitio	Score $\Delta\Delta G$
Sept1_3utr_296mmu	mmu-miR-7a	3	-8.52
Sept2_3utr_2039mmu	mmu-miR-7a	5	-2.69
Sept5_3utr_957mmu	mmu-miR-7a	2	5.41

6.B

Blancos Predichos de Familia 6	microRNA	Sitio	Score $\Delta\Delta G$
Sept8_3utr_3060mmu	mmu-miR-7a	6	-10.25
Sept6_3utr_1902mmu	mmu-miR-7a	3	-6.99
Sept11_3utr_6018mmu	mmu-miR-7a	15	-6.54

Tabla 6. Valores promedio de $\Delta\Delta G$ para la unión de miR-7 a la 3'UTR de diferentes miembros de las familias de septinas. (A) Valores de $\Delta\Delta G$ correspondientes a la familia 2 de septinas, la *Sept1* tiene el valor más alto de $\Delta\Delta G$ -8.52, seguido de *Sept2* -2.69 y por último *Sept5* 5.41. (B) Valores de $\Delta\Delta G$ correspondientes a la familia 6 de septinas, la *Sept8* tiene el valor más alto de $\Delta\Delta G$ -10.25, seguido de *Sept6* -6.99 y *Sept11* -6.54.

VII.V Obtención de construcciones recombinantes nativas y mutantes de *Sept1*, *Sept8* y *Pfn2*

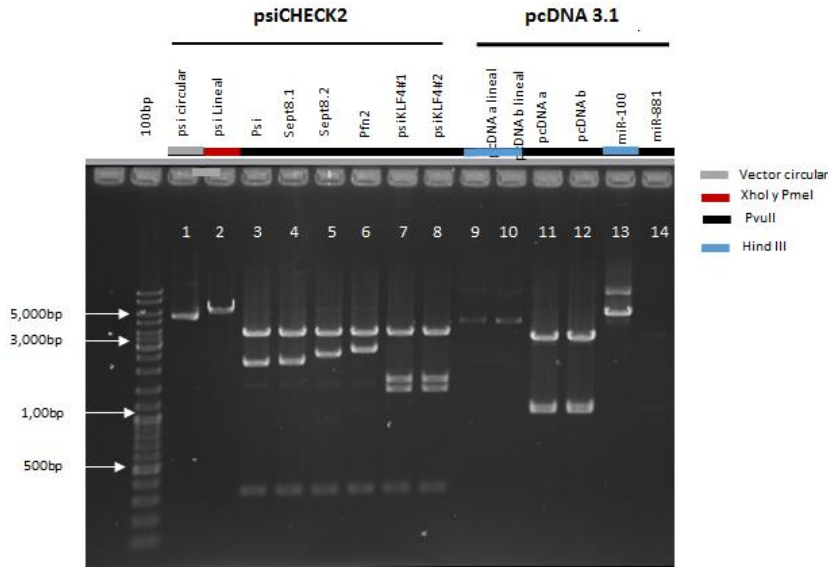
Se generaron clonas recombinantes de las 3'UTRs de *Sept1*, *Sept8* y *Pfn2* para cotransfectarlas con miR-7 y poder validar la interacción de la semilla del microRNA con la 3'UTR nativa. Esto se logró mediante la clonación de las regiones de la 3'UTR donde se une el miR-7 en el vector psiCHECK-2. Todas las clonas se caracterizaron por PCR a partir de una cantidad mínima de plásmido, es decir 1 ng y mediante digestión diagnóstica (**Figura 18**); previo a mandarse secuenciar. Las clonas de *Sept1*, *Sept8.1*, *Sept8.2* y *Pfn* se alinearon perfectamente con las respectivas secuencias diseñadas, y específicamente en el sitio de unión de miR-7. Por su parte las clonas mutagénicas se clonaron en el mismo vector, es decir psiCHECK-2, pero no se obtuvo la clona mutante para la 3'UTR denominada *Sept8.1*. Al igual que en el caso de las 3'UTRs nativas estas clonas se analizaron por PCR y digestión diagnóstica previo a secuenciarse. Todas las clonas nativas y mutantes (exceptuando *Sept8.1*) se generaron exitosamente.

Carril	3'UTR	Tamaño	Carril	miRNA	Tamaño
3	psiCHECK2	2,188	11	pcDNA	3,326
4	Sept8.1	2,560	12	pcDNA	3,326
5	Sept8.2	2,508	13	miR-100	5,660 y 166
6	Pfn2	2,697	14	miR-881	3,470
7	KLF4a	1,461 y 1,667			
8	KLF4b	1,461 y 1,667			

Tabla 7. Fragmentos producidos por las digestiones diagnósticas de los plásmidos a utilizar. Estos fragmentos son los diferenciales producidos por la digestión de la 3'UTR de *Sept8.1*, *Sept8.2*, *Pfn2* y *KLF4* y los miRNAs100 y 881 así como los vectores en los que están clonados.

En la Figura 18 se muestra el gel de la restricción diagnóstica de los dos vectores utilizados es decir psiCHECK-2 y pcDNA 3.1, así como la digestión de todos los insertos clonados en estos vectores y utilizados en las cotransfecciones. Para el caso de los fragmentos ligados en psiCHECK-2 hay dos fragmentos comunes de tamaño de 338 nt y 3,747 nt (**Figura 18.A**). Para el caso de los fragmentos ligados en el vector pcDNA3.1 los fragmentos comunes son de 1,096 nt y 1,091 nt que se identifican como una única banda en el gel (**Figura 18.A**). Las construcciones de los miRNAs utilizados ya se encontraban clonadas en el laboratorio previo a este trabajo y fueron usadas por la Dra. Meza-Sosa (2014). Por la anterior razón y porque las 3'UTRs clonadas no presentan unión a miR-881 o lo hacen, pero con un score termodinámico desfavorable, se determinó usar el miR-881 como control negativo de transfección para todas las transfecciones. Por lo tanto, en adelante no se volvió a trabajar con la 3'UTR de miR-100. De la misma manera se hizo una restricción diagnóstica para miR-7, el cual se encuentra ligado en el vector pcDNA 3.1, utilizando las enzimas HindIII y PstI produciendo 4 fragmentos de 4,022 nts, 1,421 nts, 302 nts y 10 nts (no mostrado; **Figura 18.B**).

18.A



18.B

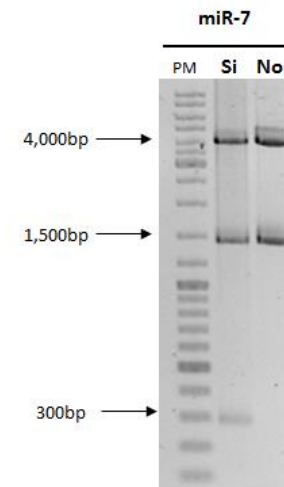


Figura 18. Caracterización de plásmidos por restricción diagnóstica. (A) Gel de la restricción diagnóstica de los plásmidos a transfectar que muestra los tamaños de cada fragmento de digestión diagnóstica. En gris se muestra el vector circular, en rojo la digestión hecha con XhoI y PmeI, en negro PvuII y en azul HindIII. **(B).** Fragmentos generados a partir de la digestión de miR7 con las enzimas HindIII y PstI. Los productos se resolvieron en gels de agarosa al 1% y fueron teñidos con BrEt. PM, peso molecular.

VII.VI Expresión de miR-7 en líneas celulares mHypo-N1 y HEK-293

Es necesario proceder a hacer experimentos *in-vitro* después de hacer los análisis bioinformáticos correspondientes. Debe existir expresión tanto de miR-7 como de los genes de *Sept1*; *Sept8* y *Pfn2* para analizar los efectos post-transcripcionales del miRNA. Como se menciona en los antecedentes, la Dra. Meza-Sosa comprobó la expresión diferencial de los transcritos de miR-7 y de los blancos *Sept1*, *Sept8* y *Pfn2* en el desarrollo del diencéfalo e hipotálamo de ratones.

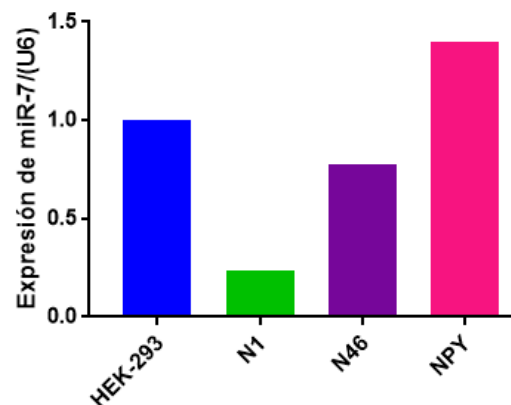


Figura 19. Patrón de expresión de miR-7 en líneas celulares embrionarias y adultas. Se muestra la expresión diferencial de miR-7 en tres líneas celulares hipotalámicas, dos embrionarias N1 y N46; y una adulta NPY en comparación con la

muestra calibradora HEK-293. Los resultados se expresaron en términos de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, usando como control interno el RNA pequeño nucleolar U6. Número de experimentos $n=1$, sin estadística. RLUs: unidades relativas de luciferasa.

Sin embargo, en esta investigación se trabajó con dos líneas celulares, por lo que conocer el patrón de expresión de los transcritos del miR-7 y sus blancos del citoesqueleto resultan fundamentales. La confirmación de la expresión se realiza por medio de ensayos de northern blot, hybridación *in-situ* o qPCR, nosotros usamos esta última técnica como experimento preliminar para determinar los niveles de expresión de miR-7 en células embrionarias hipotalámicas mHypoE-N1 y mHypoE-N46, células hipotalámicas adultas mHypoA-NPY, así como dos líneas de neuroblastoma de ratón N2A y de humano SYHY5Y (no mostradas en la gráfica) y HEK-293. El análisis de la expresión del transcrito de miR-7 se determinó en términos de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizando el valor de HEK-293 como muestra calibradora ajustada a 1 y usando al RNA pequeño U6 como control interno.

En comparación con la muestra calibradora HEK-293, la expresión del transcrito de miR-7 es menor en un 76% en células mHypoE-N1 y 33% en células mHypoE-N46, mientras que en células hipotalámicas adultas mHypoA-NPY es mayor en un 40% (**Figura 19**). En contraste, la expresión del transcrito de miR-7 en neuroblastomas es mucho mayor, pues N2A y SYHY5Y expresan un aumento de 55 y 33 veces (550% y 330%, no mostrado) respectivamente. Por consiguiente, pueden ser modelos adecuados para el estudio de la inhibición de miR-7 por uso de una esponja específica del mismo miRNA. A pesar de que este es un resultado preliminar, valida el estudio de miR-7 en ambas líneas celulares, en las que miR-7 se expresa menos en el contexto de la línea celular de mHypoE-N1 que en HEK-293. En contraste, no se analizó la expresión de los transcritos de *Sept1*, *Sept8* y *Pfn2* en las dos líneas celulares usadas, por lo cual, medirlos queda como una perspectiva pendiente a realizarse también por qPCR; sin embargo, al contar con los anticuerpos específicos se realizaron Western-blots que confirmaron la expresión de los tres transcritos y su respectiva proteína.

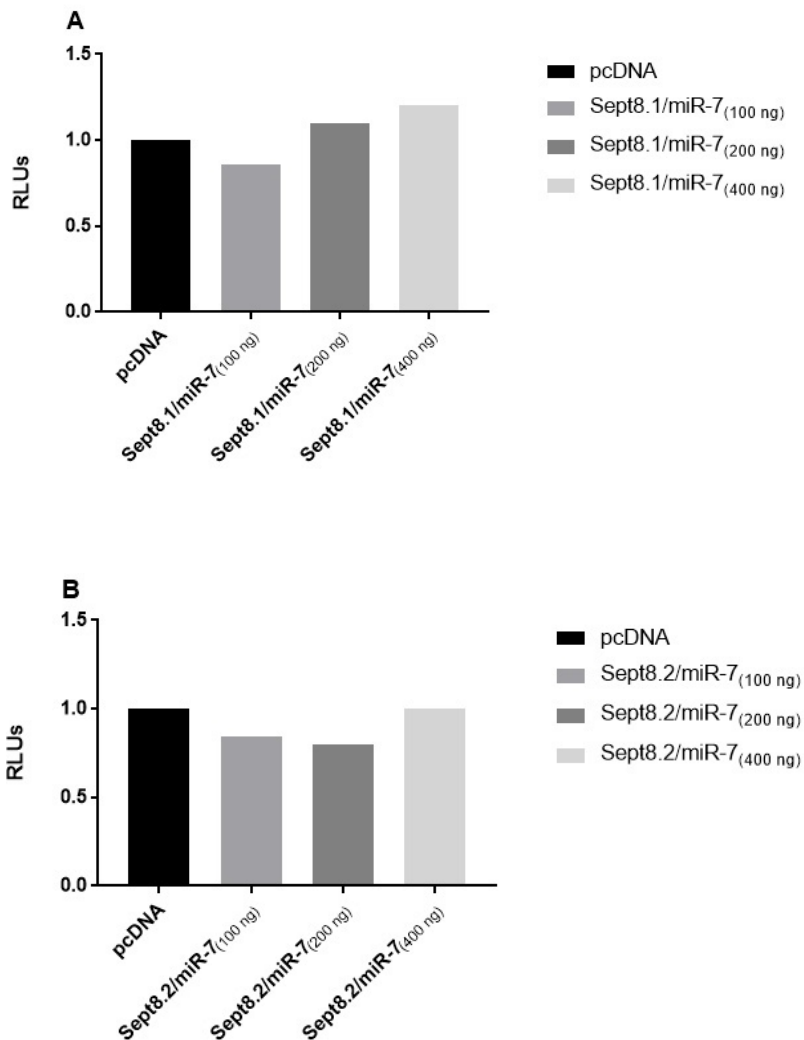
VII.VII Ensayos de transfección y actividad de luciferasa

VII.VII.I Cotransfección de células mHypo-N1 con la 3'UTR de *Sept8.1*, *Sept8.2* y *Pfn2*

El primer experimento de transfección se realizó en células mHypoE-N1 pues en este contexto se realizó el ensayo de “pull-down” de miR-7 (Tesis de doctorado Meza-Sosa, 2014). Al momento de realizar dicha prueba se contó exclusivamente con las 3'UTRs obtenidas directamente por la transformación en el vector psiCHECK-2; es decir, no se utilizó la 3'UTR de *Sept1*, pero sí las de *Sept8.1*, *Sept8.2* y *Pfn2*. Para todas las transfecciones realizadas en esta investigación se decidió mantener fija la concentración de cada 3'UTR en 100 ng y se trabajó con un gradiente de concentración de miR-7. Para el experimento de cotransfección en células mHypoE-N1 las concentraciones crecientes de miR-7 fueron de 100 ng, 200 ng y 400 ng. Los datos obtenidos se normalizaron tomando como referencia equivalente a 1 el valor de las RLUs de la cotransfección del vector vacío pcDNA (400 ng) y la 3'UTR en cuestión. La interacción de miR-7 y *Sept1*, *Sept8* y *Pfn2* se validó inicialmente por medio del ensayo de “pull-down”, por lo cual el propósito de la transfección en células mHypo-N1 sólo fue de reconfirmar tal interacción mediante un método diferente. Además, el antecedente del “pull-down” establece que la interacción no se dio de manera aleatoria, sino que una proteína Ago2 cargada con un miR-7 maduro se unió *in-vitro* a la 3'UTR en cuestión.

Los resultados obtenidos de la cotransfección son interesantes, con la 3'UTR de *Sept8.1* se disminuyó la actividad del gen reportero en un 14% con 100 ng de miR-7 únicamente (**Figura 19.A**); con *Sept8.2* disminuyó en un 16% con 200 ng y un 20% con 400 ng de miR-7 (**Figura 19.B**). Y por último la única 3'UTR que respondió de manera creciente y gradual a todas las concentraciones de

miR-7 fue *Pfn2*, que disminuyó la actividad del gen reportero en un 16% y 20% y 30% con 100 ng, 200 ng y 400 ng de miR-7, respectivamente (**Figura 19.C**). El resultado obtenido para dicha 3'UTR no nos sorprendió, puesto que en el contexto β -pancreático se ha demostrado que *Pfn2* es un blanco funcional de miR-7, involucrado en la exocitosis de las vesículas de insulina (Latreille et al., 2014). Es notorio que con 100 ng de miR-7 la respuesta de inhibición post-transcripcional para los tres genes es similar; por consiguiente, esta concentración de miRNA no sirve como buen referente y en adelante se trabajó a partir de 200 ng de miR-7. Los resultados sugieren que ambas 3'UTRs, *Pfn2* y *Sept8*, son blancos de miR-7 en el contexto de la línea celular hipotalámica mHypoE-N1, esto a su vez valida, los resultados del ensayo de "pull-down" de miR-7 en el contexto embrionario hipotalámico de ratón.



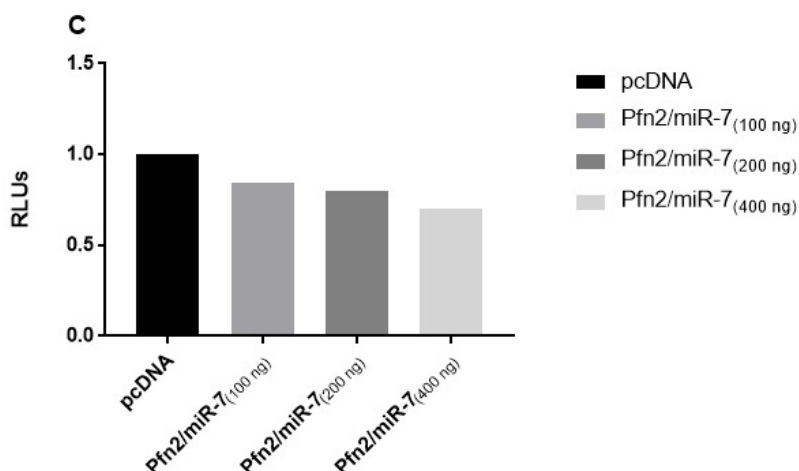


Figura 19. Cotransfección de células mHypoE-N1 con la 3'UTR de *Sept8.1*(A), *Sept8.2* (B) y *Pfn2*(C) y miR-7. Los resultados se normalizaron tomando a pcDNA (y psicCHECK 3'UTR) con el valor de 1. RLU, unidades relativas de luciferasa. Número de experimentos n=1, sin estadística. RLU: unidades relativas de luciferasa.

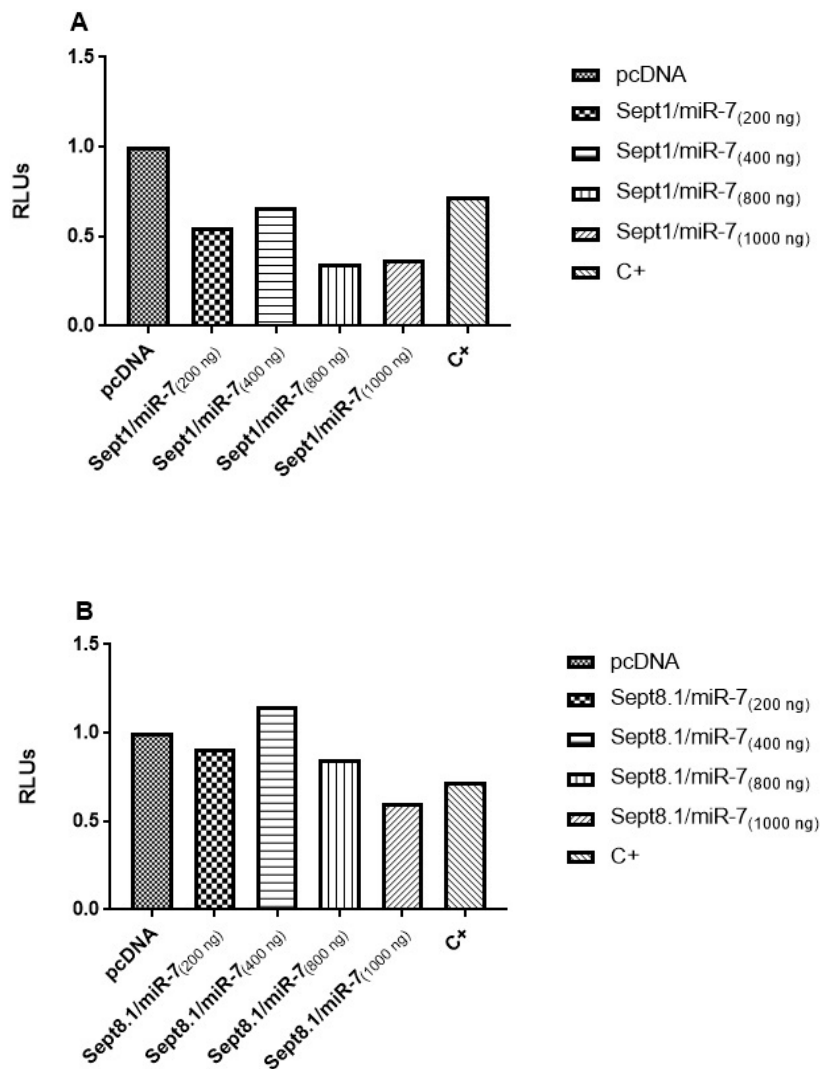
VII.VII.II Cotransfección de células HEK-293 con la 3'UTR de *Sept1*, *Sept8.1*, *Sept8.2* y *Pfn2*

Dado que contamos con un indicio de que en las células mHypoE-N1 las 3'UTRs de *Sept8.1*, *Sept8.2* y *Pfn2* son probables blancos de miR-7, decidimos realizar más ensayos de transfección con todas las 3'UTRs, incluyendo la de *Sept1*. Una práctica común en los ensayos de validación de blancos de miRNAs es llevar a cabo los ensayos de cotransfección y lectura de la actividad de luciferasa en líneas celulares caracterizadas por su alta eficiencia de transfección, por lo cual decidimos llevar a cabo los ensayos usando la línea celular HEK-293 (embrionaria de riñón humano), utilizada rutinariamente en nuestro laboratorio para validación de blancos de miRNAs. Por lo tanto, el propósito de ambas cotransfecciones en diferentes líneas celulares es el mismo, queremos validar que las 3'UTRs obtenidas por medio del ensayo de "pull-down" son blancos funcionales de miR-7 en un contexto biológico embrionario. Cambiar de línea celular asegura una alta eficiencia de transfección y resultados confiables.

En todos los experimentos de transfección se puso una cantidad fija de 100 ng de vector psiCHECK-2 o de los plásmidos recombinantes que contienen la 3'UTR de interés clonada y un gradiente de concentración de miR-7 creciente de 200 ng, 400 ng, 800 ng y 1,000 ng. Comenzamos a transfectar miR-7 a partir de una concentración de 200 ng, pues se determinó en la cotransfección en mHypoE-N1 que los efectos con 100 ng de miR-7 son muy poco perceptibles (**Figura 19**). Tomando en cuenta que *Klf4* es un blanco comprobado de miR-7 (Cui et al., 2014), se incluyó su 3'UTR con el control positivo de miR-145 (Meza-Sosa et al., 2014); este control sirvió para validar la transfección y replicar los resultados previos de la Dra. Meza-Sosa. El control negativo fue miR-881 con la 3'UTR correspondiente al experimento. Finalmente, para graficar los datos, estos fueron normalizados a 1 con el valor de la transfección del vector vacío pcDNA (en la concentración más alta de 1,000ng) y psiCHECK-2.

Los resultados de la inhibición de la actividad de luciferasa transfectando *Sept1* fueron los siguientes: 45% con 200 ng, 34% con 400 ng, 65% con 800 ng y 63% con 1000 ng de miR-7; con miR-145, como control positivo, y la 3'UTR de *Klf4* una disminución de 28%, por lo cual este control es adecuado pues inhibe al gen reportero (**Figura 20.A**). Para el caso de la cotransfección con *Sept8*,

los resultados fueron que para *Sept8.1* una disminución de la actividad de luciferasa de 9% con 200 ng, nada con 400 ng, 15% con 800 ng y 40% con 1000 ng de miR-7 (**Figura 20.B**). El efecto del control positivo y la 3'UTR de *Klf4* fue adecuado pues inhibió a la luciferasa en un 28% (**Figura 20.B**). En cuanto al sitio de *Sept8.2* transfectado con concentraciones crecientes de miR-7, los valores de la inhibición del gen reportero fueron los siguientes: ningún cambio con 200 ng, un 6% con 400 ng, 20% con 800 ng y 15% con 1000 ng de miR-7 (**Figura 20.C**). Mientras que el control negativo funcionó, pues la actividad de luciferasa fue mayor a 100%, particularmente un 11%, es decir no induce inhibición de *Sept8.2*. Por último, la cotransfección de *Pfn2* con diferentes concentraciones de miR-7 dio como resultado una inhibición de 46% con 200 ng, 52% con 400 ng, 44% con 800 ng y 58% con 1000 ng (**Figura 20.D**). El control negativo funcionó, pues no inhibió la actividad del reportero y fue mayor por un 55% (**Figura 20.D**). En resumen, en el contexto de las células HEK-293 parece haber una mayor inhibición de miR-7 sobre a 3'UTR de *Sept1*, seguida de *Pfn2* y por último de *Sept8.1* más que *Sept8.2* (**Figura 20**).



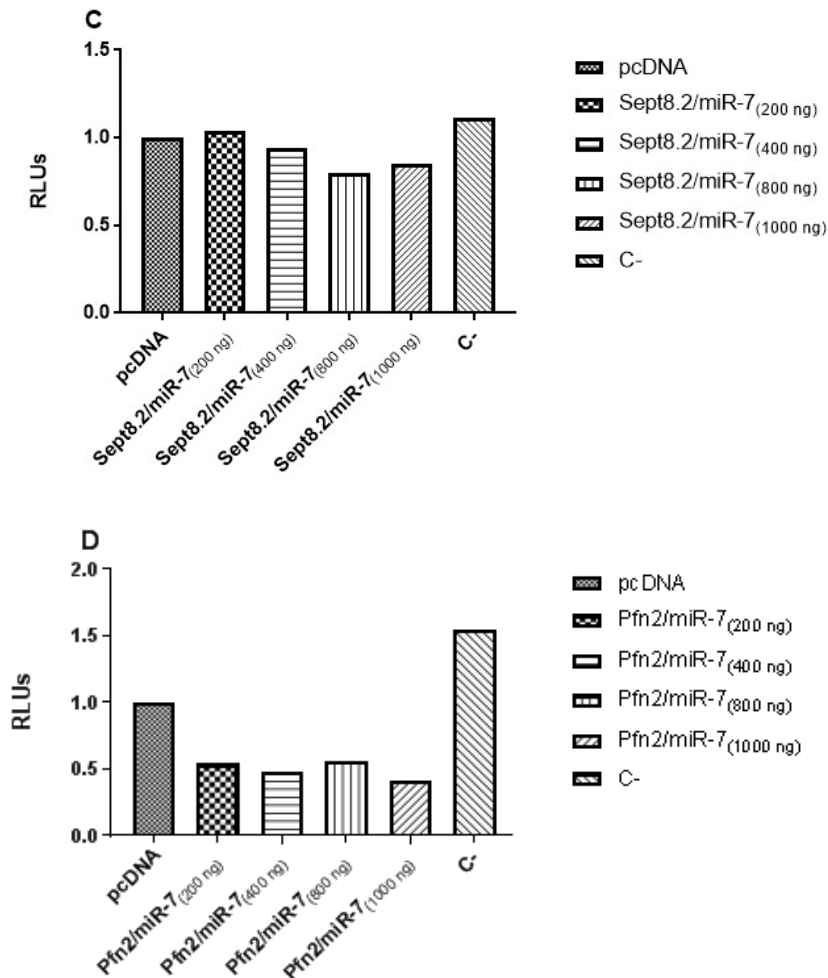


Figura 20. Cotransfección de células HEK-293 con la 3'UTR nativa de *Sept1* (A), *Sept8.2* (B) y *Pfn2* (C) con miR-7 como miR experimental, miR-145 y miR-881 como controles positivos (C+) o (C-) negativo con la 3'UTR de KLF4. Los resultados se normalizaron tomando pcDNA con el valor de 1. RLU, unidades relativas de luciferasa. Número de experimentos n=1, sin estadística. RLU: unidades relativas de luciferasa.

Los resultados obtenidos de las cuatro transfecciones anteriores (**Figura 20**) sentaron las bases para diseñar los experimentos de cotransfección (por triplicado) de las 3'UTR nativas y mutagénicas diseñadas. A partir de este experimento, además del control del vector vacío, usamos únicamente miR-881 como control negativo (C-) y descartamos el posterior uso de miR-145. No nos fue posible generar la 3'UTR mutagénica de *Sept8.1*, por lo tanto, los resultados y las conclusiones obtenidas de dicha 3'UTR fueron únicamente obtenidas de la 3'UTR nativa en la **Figura 20**. A partir de estos resultados de cotransfección (**Figura 20**), se escogieron las dos concentraciones de miR-7 más eficientes para inhibir la actividad del gen reportero de luciferasa, las cuales fueron las siguientes para cada 3'UTR:

- Para *Pfn2*: 400 ng y 800 ng de miR-7 y
- Para *Sept1* y *Sept8.2*: 800 ng y 1000 ng de miR-7

Al igual que en los experimentos previos, las 3'UTRs nativas y mutantes se transfectaron en una concentración fija de 100 ng, por su parte tanto el vector vacío pcDNA como el C- se transfectaron en una concentración de 1000 ng.

La cotransfección de la 3'UTR nativa de *Sept1* realizada por triplicado mostró un aumento estadísticamente significativo de la actividad de luciferasa en un 53% y 60% con 800 ng y 1000 ng de miR-7, en comparación con el vector vacío (pcDNA, **Figura 21.A**). Esta inhibición fue menor en la 3'UTR mutante, o *Sep1Δmut*, con valores de inhibición menores 18 y 21% con 800 ng y 1000 ng de miR-7. Las mutantes rescataron la actividad de luciferasa, en comparación a las 3'UTRs nativas, y este rescate fue estadísticamente significativo en la cotransfección con 1000 ng de miR-7 (**Figura 21.A**). Respecto al control negativo, este mostro una tendencia a disminuir la actividad de luciferasa un 26%, contrario a lo que se predecía, por lo cual no es un control negativo óptimo para *Sept1*.

Respecto a la cotransfección de la 3'UTR nativa de *Sept8.2* con miR-7, se inhibió la actividad de luciferasa a un 10% y 12% con concentraciones de 800 ng y 1000 ng de miR-7, respectivamente. Contrario a lo esperado la cotransfección de *Sep8.21Δmut* alcanzó un 22% y un 2%, con de 800 ng y 1000 ng de miR-7; es decir, con 800 ng de miR-7 *Sep8.21Δmut* alcanzó una mayor inhibición que ambas 3'UTR nativas; sin embargo, ninguno de los datos fue estadísticamente significativo y el experimento sólo muestra tendencias (**Figura 21.B**). En el caso del control este se comportó de manera adecuada, pues no inhibió la actividad del gen reportero. Por lo tanto, para *Sept8.2* miR-881 es un buen control negativo.

Finalmente, en la cotransfección de la 3'UTR nativa de *Pfn2* con miR-7 se inhibió la actividad de luciferasa un 52% con 400 ng y 54% con 800 ng (**Figura 21.C**). En el caso de la cotransfección de *Pfn21Δmut* la inhibición fue menor, pues tuvo valores de de 11% y 8% con 400 y 800 ng de miR-7, respectivamente (**Figura 21.C**). La disminución de la actividad de luciferasa fue estadísticamente significativa para las dos concentraciones diferentes de 3'UTR nativa, comparadas con el control del vector vacío, así como las dos concentraciones comparando 3'UTR nativas y mutantes (**Figura 21.C**). De tal modo que nuestro hallazgo coincide con lo publicado por Latreille et al., (2014); señalando a *Pfn2* como un blanco funcional de miR-7; pero en esta ocasión en un contexto hipotalámico en vez de pancreático. Por su parte el control negativo inhibió a la luciferasa en el triplicado, más no de modo significativo **Figura 21.C**).

Los experimentos de cotransfección de miR-7 y las 3'UTR de estudio llevados a cabo por triplicado en células HEK-293, (**Figura 21**) indican que *Pfn2* y *Sept1* son blancos directos de miR-7; pues en respuesta a dos concentraciones crecientes de miR-7 se observó una disminución estadísticamente significativa de la actividad del gen reportero de luciferasa. Analizando detenidamente la estadística de ambas gráficas se puede señalar que la disminución para *Pfn2* es estadísticamente significativo con una $p > 0.0001$ y en el caso de *Sept1* con una $p > 0.01$. Además, las concentraciones de cotransfección de miR-7 y *Pfn2* son menores que las del miRNA y *Sept1*, por lo tanto, *Pfn2* es un mejor blanco de miR-7 que *Sept1*. Por último, cabe mencionar que en cuanto a los resultados de la cotransfección de miR-7 con *Sept8.2* se puede descartar a esta región de la 3'UTR de *Sept8* como blanco de miR-7 y en el futuro será mejor trabajar con la 3'UTR denominada *Sept8.1*.

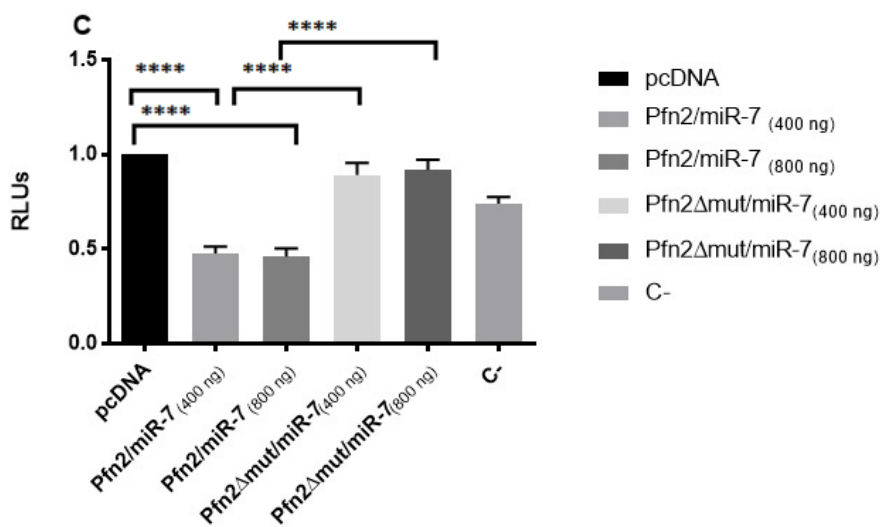
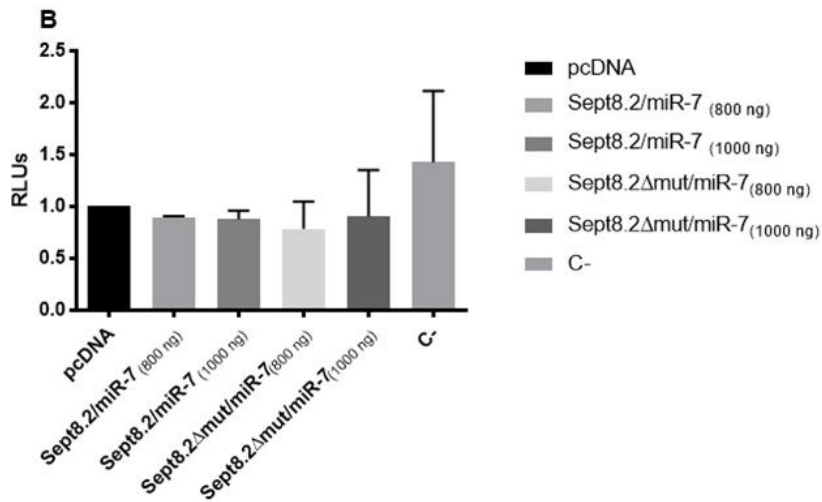
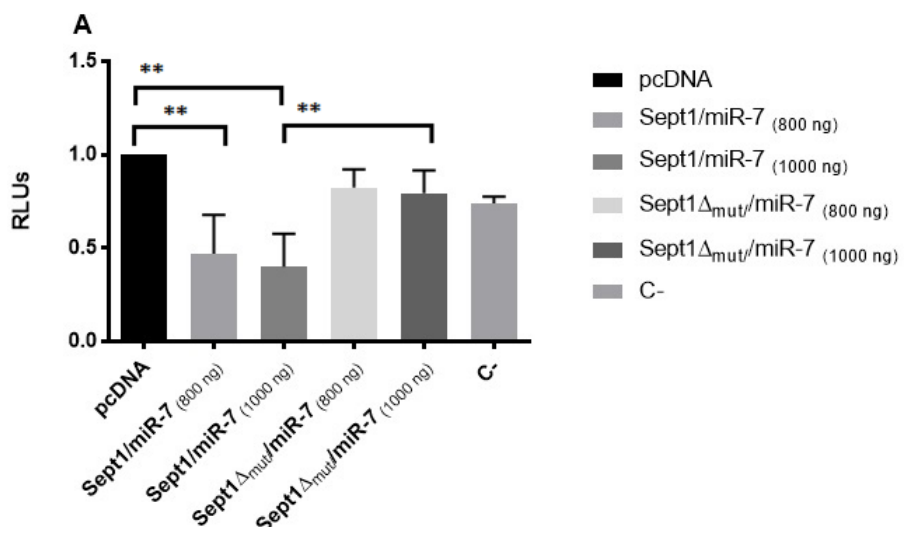
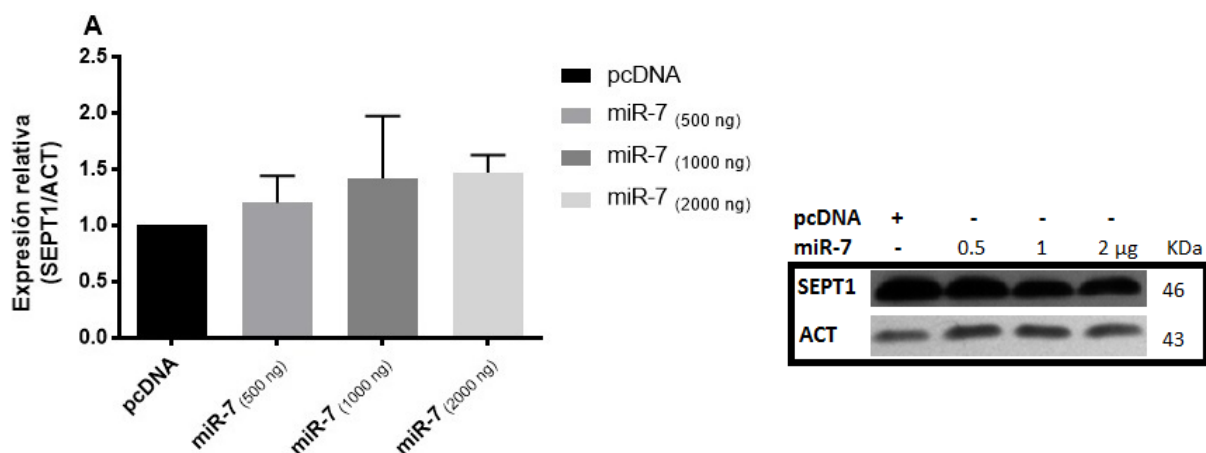


Figura 21. Cotransfección de células HEK-293 con la 3'UTR nativa y mutante de *Sept1* (A), *Sept8.2* (B) y *Pfn2* (C) con miR-7 y miR-881 como control negativo. Los resultados se normalizaron tomando pcDNA con el valor de 1. Número de experimentos n=3. RLU, unidades relativas de luciferasa. Prueba estadística de Tukey, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ y **** $P \leq 0.0001$.

VII.VIII Western-blot de células mHypoE-N1 transfectadas con miR-7

Con el objetivo de determinar si la interacción determinada por los ensayos de luciferasa entre miR-7 y la 3'UTR de *Sept1*, *Sept8* y *Pfn2* impacta sobre sus niveles proteicos, se realizaron ensayos tipo Western-blot usando anticuerpos específicos. Para ello, las células mHypoE-N1 fueron transfectadas con distintas concentraciones de miR-7 (0.5 μg , 1 μg y 2 μg) y se analizaron los niveles proteicos de Sept1, Sept8 y Pfn2, 48 h post-transfección. Los valores proteicos se determinaron por densitometría, en términos de valores relativos, es decir corregidos contra su respectiva cantidad de proteína actina y normalizando a 1 el valor del vector vacío (pcDNA).

En el contexto de las células embrionarias hipotalámicas los niveles de la proteína de Sept1 no se ven disminuidos por miR-7 (**Figura 22.A**), pues los niveles de proteína Sept1 no se redujeron en respuesta a ninguna de las concentraciones crecientes de miR-7 por debajo del control del vector vacío. Por su parte, la proteína de Sept8 si mostró una tendencia a disminuir de manera inversa a la concentración de miR-7, pues los valores de disminución fueron de un 3% con 0.5 μg de miR-7, 7% con 1 μg y 20% con 2 μg (**Figura 22.B**). En el caso de Pfn2 la transfección de miR-7 mostró una tendencia a aumentar los niveles proteicos en un 20% con 0.5 μg , y a disminuir con concentraciones mayores, un 49% con 1 μg y 34% con 2 μg ; los cuales fueron mayores a la inhibición proteica de Sept8 (**Figura 22.C**). En los recuadros negros a la derecha de cada inciso de la **Figura 22** se muestra un inmunoblot representativo a partir del cual se hizo la densitometría de cada proteína y la respectiva detección de actina. Cabe recalcar que los efectos de inhibición de miR-7 en los niveles proteicos de Sept8 y Pfn2 en este contexto son sólo tendencias, pues el experimento fue realizado una sola vez; sin embargo, coinciden con los resultados de la inhibición de la actividad del gen reportero de luciferasa, pues en ellos se mostró que por la disminución significativa de la actividad de luciferasa Pfn2 es un blanco funcional de miR-7 (**Figura 18**). El Western-blot de Sept1 y Sept8, se hizo por duplicado y el de Pfn2 una sola ocasión.



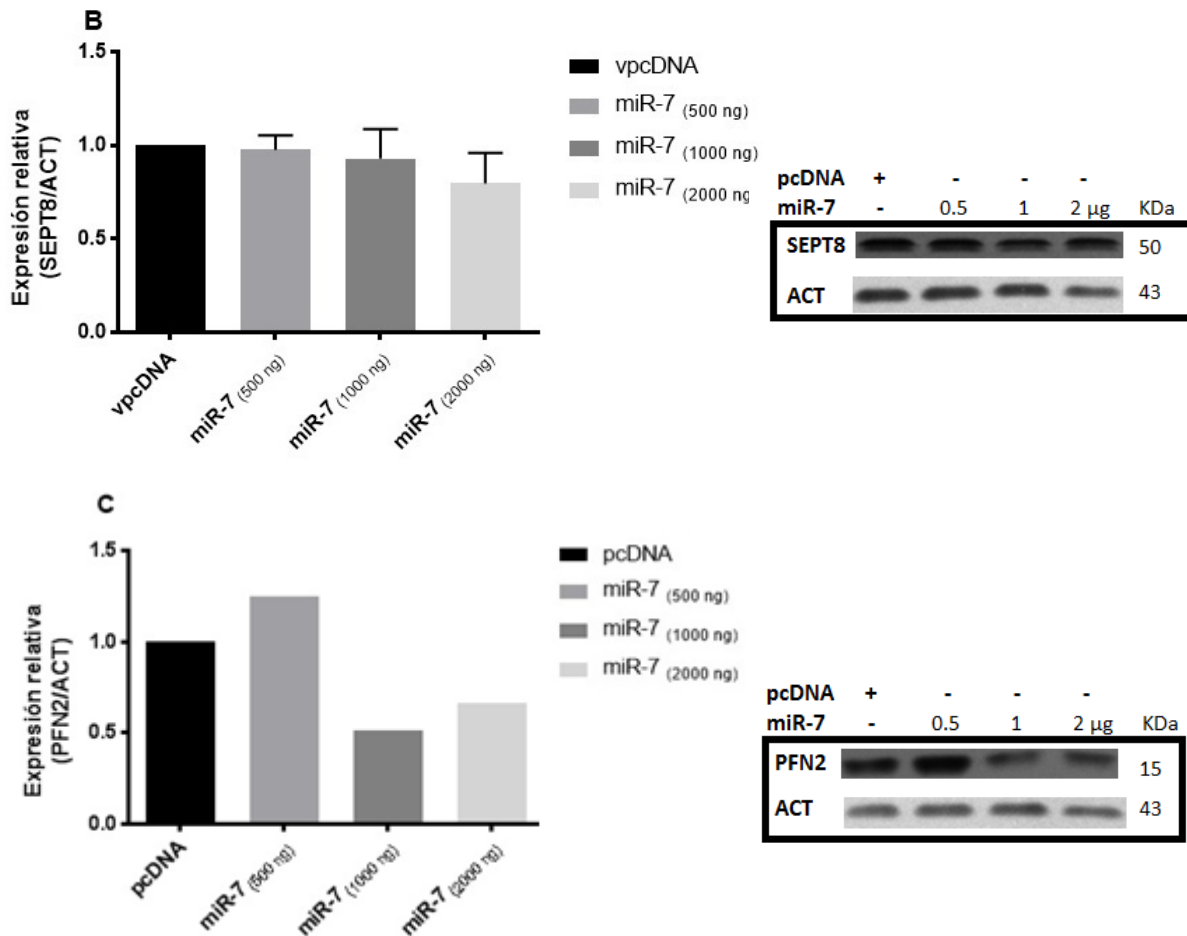


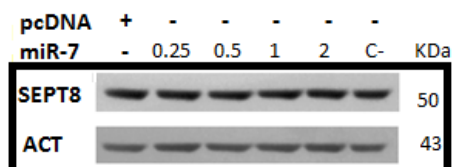
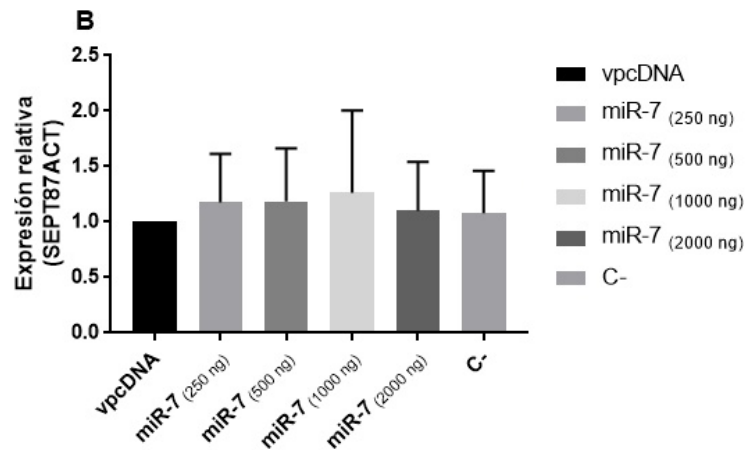
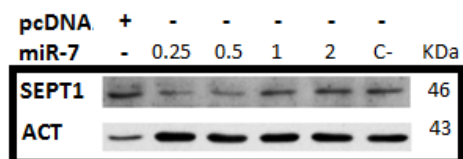
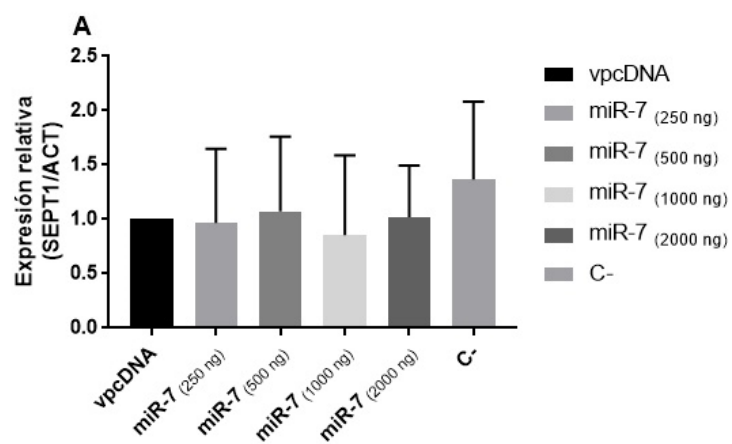
Figura 22. Densitometría y Western-blot de proteínas obtenidas células mHypoE-N1 en la cotransfección de miR-7 y miR-881 como control negativo con la 3'UTR de Sept1 (A), Sept8 (B) y Pfn2 (C). Se muestra gráficamente la densitometría de cada Western-blot obtenida a partir de la división del valor de densitometría experimental/el valor de densitometría de actina normalizando a 1 el valor del vector vacío y se muestra el inmunoblot correspondiente del lado derecho. ACT, actina. Número de experimentos n=2 para Sept1 y Sept8 y n=1 para Pfn2. Sin estadística.

VII.IX Western-blot de células HEK-293 transfectadas con miR-7

Los experimentos de cotransfección realizados en la línea celular HEK-293 se realizaron por triplicado y permitieron identificar que la interacción entre Sept1 y Pfn2 con miR-7 es estadísticamente significativa. Se decidió complementar la información y analizar el efecto de la sobreexpresión de miR-7 en los niveles proteicos de Sept1, Sept8 y Pfn2. Al igual que las células mHypo-N1, la línea celular HEK-293 se transfectó con distintas concentraciones de miR-7 (0.5 μ g, 1 μ g y 2 μ g) y 48 h después se hizo un Western-blot con anticuerpos específicos para las tres proteínas de estudio. Los valores proteicos se determinaron por densitometría, en términos de valores relativos, es decir cada uno fue corregido con su respectiva cantidad de la proteína actina y normalizando a 1 el valor del vector vacío (pcDNA).

La transfección de miR-7 en células HEK-291 mostró una tendencia a inhibir el nivel proteico de Sept1 únicamente usando 1 μg del miRNA reduciéndose un 14% en comparación con el control del vector vacío; para el caso del control negativo, éste funcionó bien pues no inhibió el nivel de proteína de Sept1 y aumento un 37% (**Resultados 23.A**). En el caso de la proteína Sept8, ésta no mostró ninguna inhibición en respuesta a la sobreexpresión de miR-7; los niveles de su proteína se mantuvieron estables y muy similares tanto entre muestras experimentales como con el control vacío (**Resultados 23.B**). El control negativo funcionó correctamente en la transfección de Sept8, pues no inhibió la proteína y aumentó un 8% (**Resultados 23.B**). Para terminar, la proteína Pfn2 fue la más sensible a la sobreexpresión de miR-7 disminuyendo 5% con 0.25 μg , 11% con 0.5 μg , 16% con 1 μg y 17% con 2 μg (**Figura 23.C**). Mientras que el control negativo disminuyó un 12% el nivel proteico; por lo que niveles debajo de 16% no son representativos de inhibición, además los datos sólo fueron tendencias no significativas.

Con base en los ensayos de luciferasa (**Resultados 21**) y sus respectivas disminuciones estadísticamente significativas, se esperaba que la sobreexpresión de miR-7 disminuyera los niveles proteicos de Sept1 y Pfn2; pero no fue el caso. Cabe mencionar que los experimentos de Western-blot mostraron tendencias a disminuir a partir de 1 μg de miR-7 para Sept1 y Pfn2 (**Figura 23.A y 23.C**). Interpretar los datos del efecto de la transfección de miR-7 en la traducción proteica resultó difícil, por esa razón decidimos hacer el mismo ensayo de Western-blot, pero a diferentes tiempos, es decir más cortos. Acortar el tiempo de análisis nos permitirá determinar si lo que ocurrió es que los cambios proteicos no se pudieron detectar en el tiempo de 48 h post-transfección o, si los tiempos menores; es decir 24 y 36h, son mejores mostrando la disminución proteica post-transcripcional ejercida por miR-7. La respuesta es la segunda posibilidad planteada anteriormente, tiempos más cortos, específicamente 24 h post-transfección muestran una mayor inhibición proteica (**Figura suplementaria 6 y 7**). Dicho efecto se puede explicar de modo que, aunque miR-7 regula post-transcripcionalmente al mensajero de dichos genes, lo hace de un modo reversible, es decir que el efecto de la inhibición se ve tan pronto el mensajero se produce (lapso comprendido en 24 h, **Figura suplementaria 6**) y posteriormente se pierde tal regulación. Por lo tanto, si la célula necesita de la proteína que codifica el gen, está debe tener mecanismos distintos al control del miRNA que promuevan la transcripción del mRNA blanco por encima de los niveles de miR-7, de tal manera que este miRNA no puede contender con el aumento del transcrito blanco y no disminuyan los niveles de proteína en tiempos más prolongados (36 y 48 h). También existe la posibilidad de que la transcripción de miR-7 podría estar siendo inhibida conforme pasa el tiempo y por lo tanto su efecto post-transcripcional se pierde. Es necesario realizar más Western-blot a distintos tiempos y en intervalos más cortos para determinar si miR-7 regula los niveles proteicos de Sept1 y Pfn2.



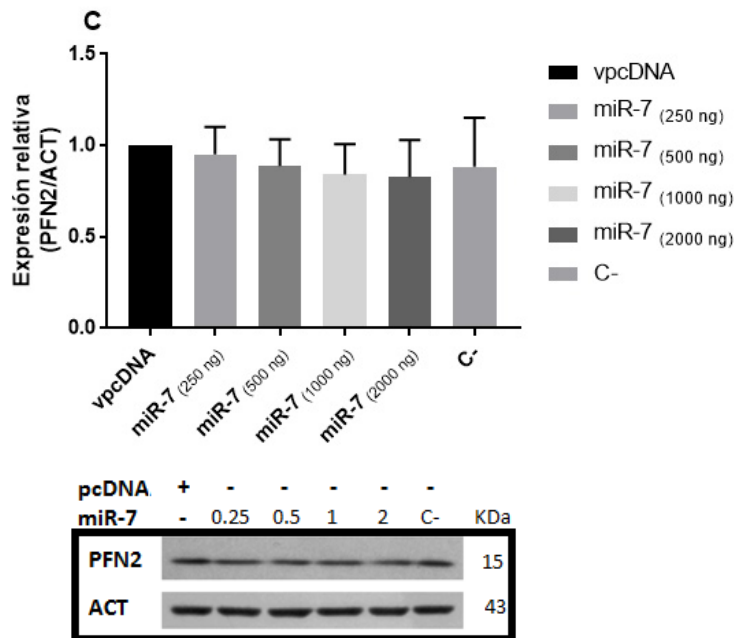


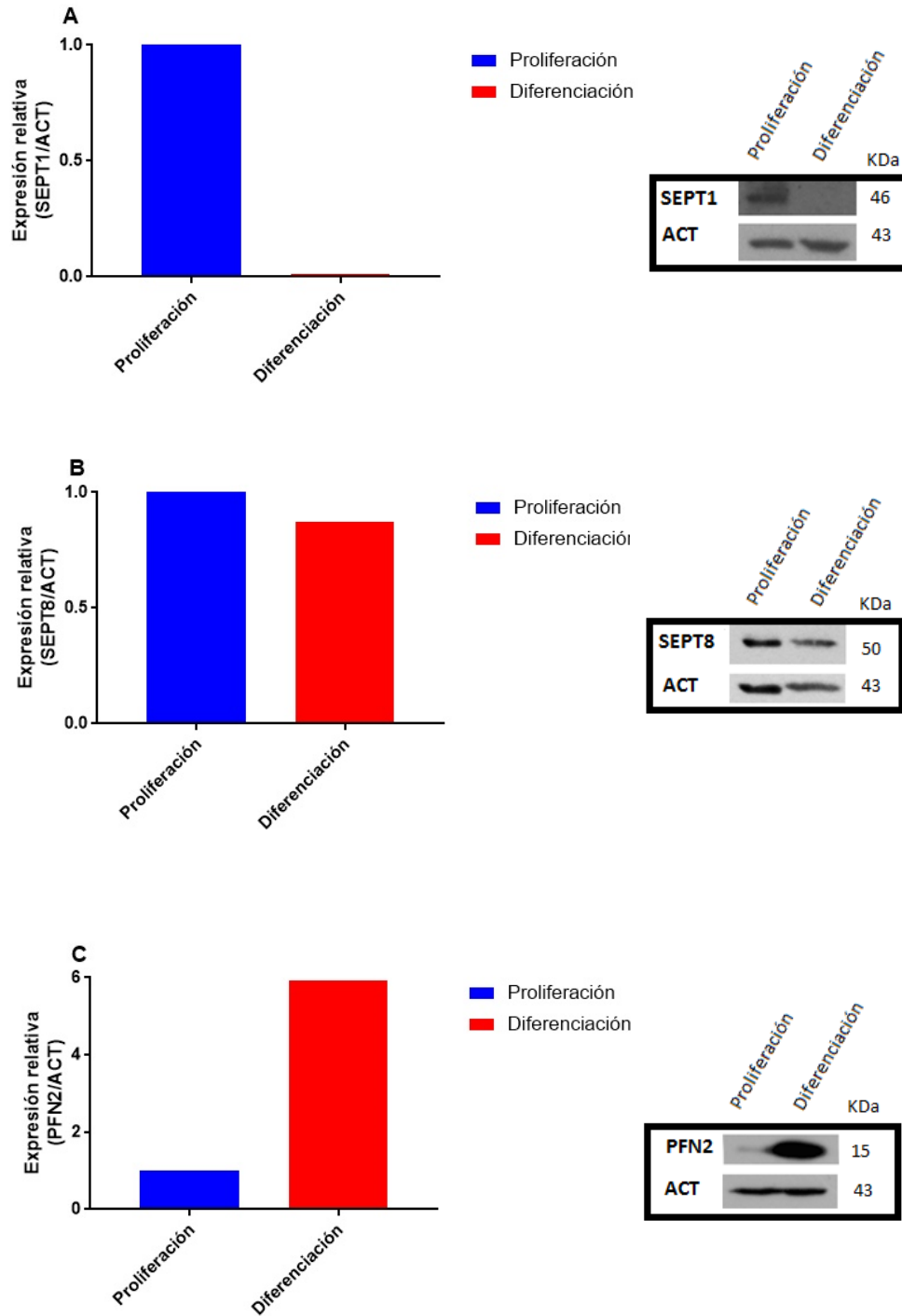
Figura 23. Densitometría y Western-blot de proteínas obtenidas de células HEK-293 en la cotransfección de miR-7 y miR-881 como control negativo, con la 3'UTR de SEPT1 (A), SEPT8 (B) y PFN2 (C). Se muestra gráficamente la densitometría de cada inmunoblot obtenida a partir de la división del valor de densitometría experimental/el valor de densitometría de actina normalizando a 1 el valor del vector vacío y debajo se muestra el inmunoblot correspondiente. Número de experimentos n=3. Prueba estadística t-sudent *p<0.05.

VII.X Niveles proteicos de SEPT1, SEPT8 y PFN2 en la línea celular ESC-R1

La Dra. Meza-Sosa determinó los niveles del transcrito de miR-7 en la ontogenia de ratón y observó que estos aumentan en etapas importantes como lo son, la salida del ciclo celular, el periodo de mayor actividad neurogénica en el hipotálamo y finalmente en la maduración neuronal. La línea celular con la que se trabajó en el "pull-down" es una línea celular embrionaria que representa un "pool" o mezcla de los días 15, 17 y 18, es decir coincide con el período de mayor actividad neurogénica en el hipotálamo, por lo que el estudio de nuestros blancos realizado en esta línea es específico de esta etapa. En el contexto del desarrollo embrionario, también resulta interesante conocer la expresión de los blancos en etapas más tempranas; de este modo, decidimos monitorear la expresión proteica de nuestros blancos en una línea de células troncales embrionarias en estado de proliferación y diferenciación neuronal. El Dr. Ivan Velasco donó células congeladas ESC-R1, de ratón, en etapa de proliferación y de diferenciación para analizar los niveles de proteína de Sept1, Sept8 y Pfn2 en ambas etapas del desarrollo neuronal. Esta línea celular de células troncales embrionarias ESC-R1 se diferenció según lo publicado por Córtes et al. (2016) durante 9 días con ácido retinoico.

De las células en ambas condiciones se prepararon extractos proteicos y se determinaron los niveles específicos de Sept1, Sept8 y Pfn2 en etapa de proliferación y diferenciación por Western-blot. Estos resultados se normalizaron a 1 con el nivel proteico en la etapa de proliferación y se expresaron como valores relativos dividiendo el valor experimental entre el del control de carga. Como se muestra en la **Figura 24.A**. Sept1 se expresa mayormente durante la etapa de proliferación, y disminuye en un 99.9% en la diferenciación, es decir tiene una expresión extremadamente baja

en esta etapa. En cuanto a la proteína de Sept8, ésta disminuyó en un 13% durante la diferenciación (**Figura 24.B**) mientras que, en contraste, los niveles de Pfn2 aumentaron de manera drástica en esta etapa, expresándose 5.9 veces (590%) más que en la proliferación (**Figura 24.C**).



Resultados 24. Densitometría y Western-blot de los niveles proteicos de los genes de interés en una línea celular de ESC-R1 diferenciada hacia neuronas dopaminérgicas con ácido retinoico durante 9 días. Los valores densitométricos se normalizaron a 1 respecto al valor en la proliferación. Número de experimentos n=1, sin estadística.

VIII. Discusión

Los miRNAs son pequeños RNAs endógenos que cumplen una función crítica en diversos procesos biológicos, regulando post-transcripcionalmente múltiples mRNAs blanco y por consecuencia sus niveles proteicos (Bartel et al., 2004). Dicho de otro modo, un miRNA puede tener varios cientos de genes blanco y a su vez un sólo gen puede ser blanco de múltiples miRNAs, creando una intrincada red de regulación (Krek et al., 2005). Aproximadamente un 70% de los miRNA conocidos en vertebrados se expresan en el cerebro, señalando que su función es fundamental en este órgano (Yoguita et al., 2014). Se sabe que miR-7 se expresa de modo enriquecido tanto en el páncreas como en el cerebro (Choudry et al., 2013).

Estudios previos han puesto en evidencia que miR-7 es importante en la diferenciación de la corteza cerebral de ratón, ya que disminuye la expresión de los genes de la vía de p53, *Ak1* y *p21*, permitiendo que los NPCs produzcan progenitores intermedios que migran y se integran como neuronas maduras en la corteza (Pollock et al., 2014). Este miRNA es igualmente importante en el desarrollo del bulbo olfatorio, pues miR-7 regionaliza a las interneuronas de la parte dorsal del ventrículo lateral, limitando la región de expresión del FT Pax6 a sólo dicha región y únicamente tales interneuronas se integran al bulbo; contrario a las de las regiones ventral y ventrolateral (de Chevigny et al., 2012). En el contexto hipotalámico se sabe que miR-7 forma parte de la “huella molecular” del hipotálamo, su expresión se encuentra conservada en anélidos y vertebrados, tales como pez cebra, ratón e inclusive en humanos (Tessmar et al., 2007; Berezikov et al., 2006).

La expresión de miR-7 se encuentra enriquecida en diversos núcleos del hipotálamo adulto de ratón y rata, tales como el núcleo supraóptico, supraquiasmático, paraventricular, la parte ventromedial y dorsomedial del núcleo arcuato y en el órgano subfornical (Herzer et al., 2012). Si bien la expresión de miR-7 es importante tanto en el desarrollo de la corteza y el bulbo olfatorio, hasta el momento se desconoce su participación en la diferenciación neuronal hipotalámica. Se sabe que en cultivos de NSCs la expresión de miR-7 aumenta conforme estas células se diferencian, lo cual provoca que disminuyan los niveles proteicos de sus blancos como *klf4*, favoreciendo la diferenciación neuronal (Qin et al., 2011). *klf4* es uno de los cuatro factores de reprogramación somática utilizado en la generación de células troncales pluripotentes inducidas o iPSCs; en el contexto del desarrollo del SNC se sabe que los niveles proteicos de Klf4 cambian dinámicamente siendo altos en las NSCs, bajando en la diferenciación neuronal y aumentando de nuevo durante la diferenciación glial para dar origen a los astrocitos y oligodendrocitos (Qin et al., 2012; Takahashi et al., 2007).

La sobreexpresión de *Klf4* en ratones transgénicos reduce la autorenovación de los NPCs de la zona subventricular y atenúa la autorenovación de NSCs en cultivo; además, en dichos ratones transgénicos se observan efectos característicos de hidrocefalia, como ventrículos agrandados y cilios ependimales defectuosos o fusionado, de este modo el correcto desarrollo de los cilios relaciona a *Klf4* con la regulación del citoesqueleto neuronal (Qin et al., 2011). Esto fue comprobado por Qin et al. (2012), quienes mostraron que la sobreexpresión de *Klf4* en NPCs inhibe la formación de neuritas y la migración neuronal, favoreciendo la diferenciación glial. Lo anterior demuestra como un blanco funcional de miR-7, con una función importante en la diferenciación neuronal, se encuentra involucrado en la regulación del citoesqueleto neuronal.

El ensayo de “pull-down” de miR-7 realizado en la línea mHypoE-N1 arrojó un total de 1,323 genes blanco (Tesis de doctorado Meza-Sosa, 2014), los cuales fueron analizados usando las plataformas KEGG y Metacore para determinar las vías de señalización en las cuales participan, entre ellas vías relacionadas con procesos de regulación y remodelación del citoesqueleto. En el

contexto de los procesos del citoesqueleto el resultado de ambos análisis de enriquecimiento nos permitió generar una red de interacción conjunta, que mostro que los genes que interactúan con más nodos son las tres Rho GTPasas Rac1, Cdc42 y RhoA, actina, Profilina, PAK1, WASP, N-WASP y c-Raf-1; pues cada uno de ellos interactúa con más de tres elementos. Además, comparando los elementos de ambas vías individualmente, hay cinco genes comunes: ARPC1A (Arp2/3), CRK, Profilin (Profilin2), Rac1 y Vav2, esto valida la funcionalidad de ambos análisis, que a pesar de posicionar las vías relacionadas con la regulación del citoesqueleto en diferentes posiciones, coinciden en señalar los mismos genes como posibles blancos de miR-7 importantes en tales vías. Es decir, el número de interacciones y los genes en común entre las vías señalan a Rac1 y Pfn2, como blancos tentativos de miR-7 con funciones de importancia en el citoesqueleto de actina. Por último, de entre los 20 genes blanco de miR-7 en la vía conjunta se analizó la conservación del sitio de unión a miR-7 a través de diferentes especies: CRK, con un PCT de 0.71, es decir, mayor al de Pfn2 de 0.68, y al de CAPZA1 y c-Raf, ambas con un PCT de 0.67. Es decir, diversas estrategias bioinformáticas, así como el análisis de interacciones proteicas señalan a Pfn2 como clave en la regulación del citoesqueleto neuronal; lo cual no confirma su participación en la regulación, pero si lo hace un mejor probable blanco que otros candidatos. La interacción de miR-7 con la 3'UTR de *Pfn2* ha sido reportada en el contexto β -pancreático, lo cual apoya la hipótesis que señala que miR-7 regula a la proteína del citoesqueleto Pfn2 en un contexto embrionario hipotalámico.

La estrategia inicial por seguir cuando se estudia la posible unión de un miRNA a un mRNA blanco es hacer un análisis bioinformático de los sitios de unión del miRNA a la 3'UTR. Esto se hace mediante una revisión de sus parámetros termodinámicos y de conservación de su semilla (Kuhn et al., 2008). Las 3'UTRs de cada gen se analizaron usando las plataformas de miRanda-miRSVR, PITA y TargetScan, teniendo en cuenta que si por lo menos dos de estas herramientas señalan que teóricamente miR-7 se une a la 3'UTR, éste es un buen blanco por estudiar. En base a este análisis los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Gen	miRanda	$\Delta\Delta G$	PITA	TargetScan	
	miRSVR		Semilla	PCT	Score de C++
Sept1	ND	-6.24	08:01:00	-0.21	<0.01
Sept8	-0.278 ¹	-10.22 ¹	08:00:01 ¹	-0.09 ¹	ND
		-4.83 ²	08:01:01 ²		
Pfn2	-0.936	-8.85	08:00:00	-0.43	0.68

*Los índices superiores en Sept8 indican si nos referimos al sitio clonado como Sept8.1 u Sept8.2.

Por lo tanto, *Sept1* fue sugerida como posible blanco por PITA y TargetScan, mientras que *Sept8.1* y *Pfn2* fueron indicados por las tres herramientas. Cada herramienta utilizada puede diferir encontrando o no a un cierto gen como blanco; sin embargo, es notable que para los tres casos *Pfn2* es el mejor blanco probable de miR-7, mientras *Sept8.2* parece el peor. Observando estos parámetros no se recomendaría clonar el sitio de *Sept8.2*; sin embargo, la decisión se hizo cuando sólo se contaba con un valor de $\Delta\Delta G$ de -11, el cuál era entre las cuatro 3'UTRs el más negativo. Ese valor cambio con la actualización de PITA a un valor de -4.83; y haberlo clonado nos permitió trabajar los 4 posibles tipos de semillas, y aprender que en caso de tener una unión con un $\Delta\Delta G$ mayor a -5 y semilla desfavorable, no vale la pena clonar y es mejor buscar otro sitio de unión u otro blanco. En este caso se contó con la 3'UTR de *Sept8.1* y ambos bloques se unen al miRNA de modo diferente. En nuestra experiencia es mejor clonar sitios con semillas tipo 08:00:00, seguidos de los 08:01:00 y los 08:00:01, con valores favorables de $\Delta\Delta G$.

Como parte de la aproximación inicial al estudio de un miRNA, la interacción de éste y la 3'UTR puede ser validada por medio del diseño de un ensayo de gen reportero. En el caso de este trabajo se utilizaron dos vectores para a cotransfección; pcDNA3.1, en el que se tiene la clona de miR-7, y el vector psiCHECK-2, en donde se clonó la 3'UTR nativa y mutante de cada gen *Sept1*, *Sept8* (1 y 2) y *Pfn2*, río abajo del gen de luciferasa para transfectar de manera transitoria las líneas celulares mHypoE-N1 y HEK-293. La racionalización de tal experimento es que la unión de miR-7 a la 3'UTR blanco va a reprimir la producción de la proteína reportera reduciendo su actividad, lo cual puede ser cuantificado. Los experimentos de expresión de luciferasa realizados en las células mHypoE-N1 sirvieron para comprobar lo obtenido en el "pull-down" de miR-7 en esta línea celular, señalando una tendencia que *Sept8* y *Pfn2* sean posibles blancos de miR-7, por la inhibición de la actividad de luciferasa.

La línea celular HEK-293 fue la elegida para realizar los ensayos por triplicado debido a su alta eficiencia de transfección. Analizando los resultados obtenidos se obtuvo que en este contexto *Sept1* y *Pfn2* son blancos probables de miR-7. En contraste, *Sept8.2* parece no ser un blanco de miR-7, lo cual era previsible por su poca accesibilidad termodinámica y su falta de conservación. En el caso de *Sept8.1* no se generó su clona mutante, pero el indicio de un experimento preliminar mostró que es probable que también sea blanco de miR-7 pues cuenta con mejores predicciones bioestadísticas de unión reflejadas en un único experimento de luciferasa. Entre las perspectivas del proyecto se encuentra generar dicha mutante y repetir las cotransfecciones con miR-7 en este contexto celular. Integrando la información obtenida de la validación de los blancos observamos que hay similitudes pues en ambas líneas celulares *Pfn2* es el mejor blanco para la inhibición de miR-7; pero en el caso de las septinas, *Sept1* es un buen blanco de miR-7 en células HEK-293, mientras *Sept8* es un mejor blanco de miR-7 en células mHypoE-N1.

El paso de validación de la unión del miR-7 a la 3'UTR de *Sept1*, *Sept8* y *Pfn2*, establece el punto de partida para investigar la función de la unión del miRNA al transcrito blanco, para lo cual es necesario responder tres interrogantes diferentes (Kuhn et al., 2008):

1. ¿El miRNA y el mRNA se coexpresan?
2. ¿Cuál es el efecto del miRNA en la proteína blanco?
3. ¿Qué efecto tiene la expresión del miRNA en una función biológica determinada?

La primera pregunta se respondió por medio de un qPCR de miR-7 comparando la expresión de miR-7 en células HEK-293 normalizada a 1, y tres líneas celulares hipotalámicas; dos de origen embrionario, una adulta y dos líneas de neuroblastoma. En cuanto a la expresión más alta, ésta se dio en las líneas de neuroblastoma N2A y SYHY5Y, lo cual se relaciona bien con el antecedente que señala que miR-7 tiene funciones de oncomiR (miRNA promotor de tumores), favoreciendo la proliferación e invasividad de los tumores cerebrales (Visani et al., 2015). Respecto a las células hipotalámicas la expresión de miR-7 fue mayor en células de adulto mHypoA-NPY, después en mHypo-N46 y por último en mHypo-N1, con respecto a células HEK-293. Este experimento confirmó que miR-7 se expresa en las dos líneas celulares de nuestro interés. Aunado a esto, el antecedente del "pull-down" y los primeros Western-blots realizados para estandarizar el uso de los anticuerpos nos permitieron saber que también los tres blancos del citoesqueleto se expresan en células mHypo-N1 y HEK-293.

La segunda interrogante por investigar es el efecto del miRNA en la proteína blanco, pues si un blanco predicho es un "verdadero blanco", dicha proteína disminuirá su concentración conforme la expresión del miRNA se aumente. Esto se analizó, mediante la transfección transitoria de miR-7, en las dos líneas celulares utilizadas, mHypoE-N1 y HEK-293, analizando los niveles proteicos

posterior a 48 h de transfección. En el contexto de la línea celular mHypo-N1, el análisis de Western-blot se llevó a cabo sólo una vez y mostró que en respuesta a miR-7 existe una tendencia a que los niveles proteicos de *Sept8* y *Pfn2* disminuyan. Notablemente, esto coincide también con una tendencia de disminución de la actividad del gen reportero de luciferasa en esta línea celular.

Por su parte, los ensayos de Western-blot realizados en HEK-293 se hicieron por triplicado y se analizaron estadísticamente. En estos ensayos se observó una tendencia de disminución de los niveles de las proteínas *Sept1* y *Pfn2* en respuesta a 1 μ g de miR-7, esto se aproxima a las concentraciones que generaron la mayor inhibición de actividad del gen reportero de luciferasa para cada una; es decir, 1000 ng para *Sept1* y 800 ng para *Pfn2*. Sin embargo, dichos resultados no son estadísticamente significativos, por lo cual sugerimos realizar más experimentos de Western-blot en intervalos de tiempo más cortos que 48 h. El tiempo de análisis de los niveles de proteína se debe tener en cuenta, pues hicimos experimentos preliminares que mostraron que si los niveles de proteína se analizan 24 h post-transfección los efectos de inhibición son mayores, por ejemplo: transfectando 2 μ g de miR-7 los niveles de proteína de *Sept1* disminuyen un 37%, los de *Sept8* un 45% y los de *Pfn2* un 19%. Tales niveles no se observaron en 36 ni 48 h post-transfección; en este caso es necesario realizar la extracción de proteína y Western-blot por triplicado y analizar de nuevo si la inhibición es estadísticamente significativa, inclusive en 12 h post-transfección.

A continuación, explicaremos una situación del desarrollo embrionario que podría provocar que *Pfn2* no sea inhibida por miR-7 durante la neurogénesis hipotalámica. Un análisis de la totalidad de la 3'UTR de *Pfn2*, tanto de ratón como de humano, mostró que en el área contigua al sitio de unión de miR-7 se unen seis miembros de los siguientes tres clusters parálogos marcados con un asterisco: miR-17-92 (miR-17*, miR-18a, miR-19a, miR-19b-1, miR-20a*, miR-92a-1), miR-106a-363 (miR-106a*, miR-18b, miR-19b-2, miR-20b*, miR-92a-2, miR-363) y miR-106b-25 (miR-106b*, miR-93*, miR-25). Estos miRNAs están separados del sitio de unión de miR-7 por menos de 40 o 30nt en ratón y humano, respectivamente, lo cual puede provocar que la unión de un miRNA del cluster con la 3'UTR interfiera con la unión de miR-7 a la misma. El principal cluster de nuestro interés es miR17-92; el cual puede actuar como miRNA supresor de tumores u oncomiR dependiendo del contexto celular (Khuu et al., 2016). Este cluster de seis miRNAs se expresa de manera alta al principio del desarrollo embrionario y su "knockout" es letal, provocando la muerte de los ratones por defectos en los pulmones y el corazón (Ventura et al, 2008).

Es importante tener en cuenta que la regulación de los miRNAs sobre sus genes blanco puede ser directa por la unión del miRNA con la 3'UTR y ocurrir a nivel post-transcripcional, o puede ser indirecta, por la inhibición de un FT que se una a la región promotora del blanco, y la regulación sucedería a nivel transcripcional. Sin embargo, en ambos casos el resultado es el mismo, el nivel de proteína se reduce (Cloonan et al., 2015). Por lo tanto, al actuar en conjunto con otros procesos reguladores de la expresión, como pueden ser FT, los miRNAs pueden actuar en múltiples niveles y con mayor eficiencia (Tsang et al., 2007). Lo anterior genera dos opciones de interacción entre miRNAs y FT: que la transcripción del miRNA y el gen blanco sean co-reguladas positivamente por un FT río arriba de ambos; lo que generaría circuitos conocidos como tipo I. O que tal FT río arriba reprima la transcripción del gen blanco y simultáneamente active la transcripción del miRNA, que a su vez inhibe la traducción del gen blanco, generando circuitos conocidos como tipo II (Tsang et al., 2007). Los circuitos tipo II son más prevalentes en las células, pues los transcritos blanco de varios miRNAs con expresión tejido-específica tienden a disminuir en donde se expresan los miRNAs que los regulan (Farj et al., 2005; Sood et al., 2006). En contraste, existe poca evidencia de circuitos de tipo I; sin embargo, un buen ejemplo es el mediado por miR-17 que reprime al factor de transcripción E2F1, y a su vez ambos son activados transcripcionalmente por c-Myc en células

humanas (O'Donnell et al., 2005). A pesar de que los circuitos de tipo I parecen incoherentes a primera vista, son importantes pues proporcionan funciones regulatorias necesarias para el mantenimiento de la expresión estable de proteínas (Tsang et al., 2007). Como se comentó anteriormente, se encontró por un análisis bioinformático que miR-17 tiene una alta probabilidad de unión a la 3'UTR de *Pfn2*, si tal interacción es funcional biológicamente, c-Myc podría estar generando un circuito tipo I favoreciendo la transcripción de miR-17 y de uno de sus blancos, y los niveles altos de miR-17 interferirían con la unión de miR-7 a la 3'UTR de *Pfn2*, y los niveles de proteína de *Pfn2* se mantendrían estables.

También la regulación de los miRNAs es un proceso importante durante el desarrollo. Como se comentó en la introducción en ratón existen 3 loci de miR-7: miR-7a-1, miR-7a-2 y miR-7b, transcritos de los cromosomas 13, 7 y 17; los cuales comparten la secuencia de la semilla, pero miR-7b difiere en un nucleótido (Pollock et al., 2014), mientras en humano se nombran a los genes miR-7-1, miR-7-2, y miR-7-3 y todos tienen la misma secuencia (Martinez-Sanchez et al., 2016). MiR-7a-2 y miR-7b, son transcritos de locis intergénicos, mientras que miR7a-1 se localiza en un intrón del gen de la ribonucleoproteína nuclear heterogénea K (*Hnrpk*; Martinez-Sanchez et al., 2016). La expresión de miR-7a se encuentra enriquecida en el hipotálamo, así como en los islotes pancreáticos, la hipófisis, y las glándulas suprarrenales de ratones y humanos (Landgraf et al., 2007). En el contexto de los islotes pancreáticos miR-7 se transcribe gracias a la expresión de dos FT de tipo bHLH *Ngn3* y *NeuroD* (Kreddo-Russo et al., 2012). Como se mencionó en la introducción durante la neurogénesis *NGN* es un gen proneural temprano expresado en células en proliferación y *NeuroD* uno tardío expresado en células que han salido del ciclo celular (Lee et al., 1995; Roztocil et al., 1997).

Se conoce que hay una regulación a nivel post-transcripcional del transcrito de miR-7 generado a partir del locus de la proteína *Hnrpk* en células no neuronales para que el miRNA se encuentre enriquecido únicamente en células neuronales. Esto ocurre en humanos y ratones gracias a dos proteínas HuR (antígeno de Hu, R) que funciona como adaptador para la proteína MSI2 (homólogo de Musashi I 2), la cual se une al bucle terminal del pri-miR estabilizándolo y evitando su procesamiento (Choudhury et al., 2013). Además, recientemente se describió un nuevo mecanismo de control post-transcripcional mediado por un RNA circular llamado ciRS-7, enriquecido en el cerebro, que contiene un total de 73 sitios de unión a miR-7 y actúa como esponja o secuestrador de miR-7 (Hansen et al., 2013; Memczak et al., 2013). La expresión de ciRS-7 coincide entre los islotes pancreáticos y las neuronas (Xu et al., 2015). Interesantemente ciRS-7 se encuentra enriquecido en el cerebelo, y se expresa mayormente en neuroblastomas que no se adhieren al sustrato. Cabe mencionar que la proteína priónica celular (*PrPc*) induce la expresión de ciRS-7 y no de su gen huésped *CDR1*, en células HEK-293 (Satoh y Yamamura, 2004). En este contexto, es probable que la regulación de HuR y MSI2 pueda estar inhibiendo la maduración del miR-7 transfectado en células HEK-293, debido a que estas no son de origen neuronal, y ello también correlaciona con el antecedente que relaciona a la *PrPc* con la inducción de ciRS-7 en células HEK-293. Es decir, ambos mecanismos post-transcripcionales pueden influir en los resultados obtenidos. Cabe mencionar que la función de ciRS-7 no es sólo como esponja y también puede funcionar como amortiguador o repositorio de miR-7 dependiendo de los estímulos celulares; por lo que su regulación es fina y específica. En caso de una sobreexpresión lo más probable es que ciRS-7 actúe como esponja para atenuar el exceso del miR-7.

Recapitulando la información previa, para determinar por qué las proteínas del citoesqueleto no fueron inhibidas por miR-7 tenemos que realizar una transfección transitoria de miR-7 en células HEK-293 para extraer, analizar y comparar las proteínas a las 12, 24, y 36 y 48 h en

experimentos realizados por triplicado. Si estas replicas mostraran ser estadísticamente significativas podríamos avanzar a la tercera interrogante de investigación: ¿Qué efecto tiene la expresión del miRNA en una función biológica determinada? Si no, entonces podríamos detectar la expresión de MSI2 y HuR, o ciRS-7 en las células HEK-293 y compararlo con los niveles en las células neuronales hipotalámicas para determinar si la expresión de tales inhibidores de miR-7 tienen un efecto global reflejado en la tasa de inhibición post-transcripcional y los niveles proteicos.

Por último, la interrogante de investigación más importante es: ¿Cuál es la función del miRNA en una función biológica determinada? En este sentido, es prudente sintetizar las funciones conocidas de nuestros tres blancos *Sept1*, *Sept8* y *Pfn2* y tratar de proponer en base a los resultados obtenidos una posible función, la cual a pesar de ser una predicción, puede guiar las perspectivas para resolver la pregunta de investigación a futuro. En el caso de las septinas, *Sept1* y *Sept8*, la falta de bibliografía relativa a su papel en el SNC presenta una complicación, así como un área de oportunidad. Ambas septinas se expresan de manera enriquecida en el SNC y han sido relacionadas con la enfermedad de Alzheimer (Dolat et al., 2014; Shimoyama et al., 2003; Kinoshita et al., 1998; Kurkinen et al., 2016). Por lo tanto, se sabe de antemano que su expresión existe en el SNC adulto, pero no se conoce en la embriogénesis. En ese sentido nuestro trabajo aporta una nueva perspectiva a la función de la regulación del citoesqueleto en los procesos de diferenciación neuronal hipotalámica. Un artículo recientemente publicado señala que la expresión de *Sept1* no es capaz de rescatar un defecto en las ramificaciones de las dendritas hipocampales causado por el “knockdown” de *Sept5* con un RNA de interferencia (shRNA); sin embargo, la expresión ectópica de *Sept2* y *Sept4*, rescata el defecto y colocaliza con *Sept7* en las dendritas (Kaplan et al., 2017). Lo anterior a pesar de que todas las septinas antes mencionadas pertenecen a la misma familia, de *Sept2*, y son consideradas redundantes. Es posible que la función biológica de *Sept1* este más orientada a la citocinesis por su interacción con AuroraB en el surco de segmentación y porque el “knockdown” de *Sept1* en oocitos de ratón causa defectos en el huso mitótico y una incorrecta segregación de cromosomas (Qui et al., 2005; Zhu et al., 2011). Esta función en la citocinesis encaja muy bien con los datos de RNA-seq y el inmunoblot en células ESC-R1, puesto que la expresión de *Sept1* es alta al inicio de la neurogénesis y disminuye conforme se diferencian las células. Es posible que miR-7 regule post-transcripcionalmente a *Sept1*, dada la significancia estadística de los ensayos de luciferasa y las tendencias de disminución proteica obtenidas en células HEK-293.

Sept8 forma parte de la familia de Sept6, compuesta por *Sept6*, *8*, *10*, *11* y *14*; por medio de RNA de interferencia y experimentos de sobreexpresión se conoce que Sept6 es importante tanto en la formación de espinas dendríticas como en la arborización axonal (Tada et al., 2007; Hu et al., 2012). Las funciones de *Sept8* reportadas en la literatura están poco relacionadas con las dendritas o los axones, y más bien se relacionan con las membranas y vesículas. *Sept8* está enriquecida en las presinápsis e interactúa con diversas proteínas para formar los complejos SNARE (receptores de proteínas de fijación soluble de NSF) y la liberación de neurotransmisores; interactúa con *Sept5*; cuyo “knockout” tiene defectos en la secreción de serotonina (Blaser et al., 2004). Dicha interacción también es importante en las retinopatías proliferativas que se caracterizan por una alta expresión de *Sept8* (Ito et al., 2009; Beites et al., 1999; Blaser et al., 200). No hay modelos reportados de un “knockout” de *Sept8*; sin embargo, por sus interacciones en el SNC es probable que en hipotálamo también regule procesos relacionados con exocitosis de vesículas y neurotransmisores, por lo que tentativamente su expresión es más importante en neuronas diferenciadas. Los datos de RNA-seq y el inmunoblot en células ESC-R1, muestran que *Sept8* se mantiene expresándose de manera relativamente estable al inicio de la neurogénesis, disminuyendo notablemente en el E 18 mostrado en el RNA-seq, después estabilizándose y aumentando en adulto. Esta disminución nos llama la atención puesto que el conjunto de progenitores a partir del cual se genera la línea celular mHypoE-

N1 con la que trabajamos es de los días 15,17 y 18. Es probable que en esta etapa de mayor actividad neurogénica en el hipotálamo las funciones celulares de excitación no sean tan importantes y aumenten en adelante en la medida que las células se diferencian. Por lo tanto, dado que *Sept8* aumenta su expresión a la par que lo hace miR-7, y no se ve inhibido es probable que no sea un buen blanco de miR-7. Cabe mencionar también que las septinas son genes que sufren “splicing alternativo, y a pesar de haber escogido la variante transcripcional más larga, nuestros resultados se encuentran limitados a que trabajamos únicamente con una sola variante que puede, o no, reflejar lo que sucede *in-vivo*.

Respecto a *Pfn2* se sabe que tiene una función importante en el desarrollo temprano inhibiendo la neurogénesis (Da Silva et al., 2003) y juega un papel importante en la citoarquitectura de las dendritas de neuronas del hipocampo (Michaelson et al., 2010). Además, éste es un blanco comprobado de miR-7 en un contexto pancreático (Latreille et al., 2014); sin embargo, se desconoce su función en el desarrollo neuronal hipotalámico. Dado que éste fue el mejor blanco bioinformático y en la validación de la unión de miR-7 por ensayos de gen reportero, se decidió analizar más a fondo la extensión completa de su 3'UTR por medio de miRanda-miRSVR. Este análisis mostró que existen más de 45 miRNAs que se unen a la 3'UTR de *Pfn2* con un buen score de conservación, parte del cluster miR17-92, que se expresa de manera alta al principio del desarrollo embrionario, su “knockout” es letal (Ventura et al, 2008).

Estos datos muestran que entre la diversidad de miRNAs que se unen a *Pfn2* existen varios que tienen una expresión importante durante el desarrollo temprano, por ejemplo, miR-17 y miR-20a en conjunto con la expresión de miR-7, estos miRNAs pueden estar participando de manera sinérgica en el control postranscripcional de *Pfn2*; o bien competir entre ellos por el sitio de unión a la 3'UTR por impedimentos estéricos durante el desarrollo del hipotálamo. Se observó mediante RNAseq que el transcrito de *Pfn2* se comporta de la misma manera que el transcrito de miR-7 en el desarrollo neuronal hipotalámico, aumentando progresivamente del día E 12 al P 7 y se atenúa ligeramente en adulto. La expresión proteica de *Pfn2* se correlaciona directamente con la tendencia de aumento en el transcrito en el contexto de la línea celular ESC-R1, pues el nivel de proteína de *Pfn2* es bajo en proliferación y aumenta en la diferenciación. Por lo tanto, es probable que por el número de miRNAs que se unen en la proximidad del sitio de unión de miR-7, que este miRNA sea necesario más no suficiente para lograr disminuir los niveles proteicos de *Pfn2*.

IX. Conclusión

MiR-7 es un miRNA conservado evolutivamente que está circunscrito a todos los controles transcripcionales y post-transcripcionales. Sin embargo, sorprende su enriquecimiento en el hipotálamo, un centro neurosecretorio compuesto por cerca de 300 o más fenotipos neuronales y con funciones fisiológicas muy variadas; desde regular la ingesta o gasto de energía, hasta las conductas de vigilia, conducta sexual y de enojo, a través de su comunicación con el sistema endócrino mediante la hipófisis. De manera interesante este miRNA cuenta con regulador post-transcripcional tan específico como lo es CiRS-7, enriquecido en el cerebro con funciones de esponja, repositorio o amortiguamiento de miR-7.

Interesantemente miR-7 es regulado y a la vez regula, en el contexto del hipotálamo embrionario. MiR-7 cuenta con tres blancos del citoesqueleto novedosos por tener enriquecimiento específico al SNC; específicamente el más interesante es *Pfn2*, pues existe una publicación que confirma que es un blanco de miR-7 en otro contexto celular. No se tiene ninguna idea de la función que puedan tener estos genes del citoesqueleto en la neurogénesis; sin embargo, este trabajo amplía nuestro conocimiento de ellos, identificando a *Pfn2* y *Sept1* como blancos de interacción con miR-7. Es probable que *Sept8* no sea un buen blanco de miR-7, pero en caso de resolver con certeza estadística el efecto del miRNA en la proteína blanco de los otros dos genes, es muy probable que *Sept1* y *Pfn2* sean inhibidas por miR-7. Ahondar en el estudio de sus funciones y el efecto post-transcripcional de miR-7 sobre estos blancos del hipotálamo no sólo es completamente novedoso sino muy interesante; y en la medida que se trabaje con las 3'UTR completas, alguna variante transcripcional y un sistema *in-vivo* ad hoc se puede descubrir si miR-7 controla la dinámica del citoesqueleto durante el proceso de diferenciación neuronal hipotalámico regulando post-transcripcionalmente a los genes de *Sept1* y *Pfn2*.

Un concepto emergente en el campo de la neurogénesis plantea que las neuronas que tienen sistemas de neurotransmisores comunes, por ejemplo noradrenérgicas, usan un mismo programa principal de diferenciación génica y reclutan componentes específicos para su fenotipo. Poder descubrir que alguna de nuestras proteínas es parte del programa principal de diferenciación de algún fenotipo hipotalámico específico sería muy enriquecedor, pues el conocimiento se podría extrapolar a programas de diferenciación ya conocidos por sus interacciones con otras proteínas y ellos nos acercaría a conocer la función de nuestros genes de interés. El conocimiento generado aporta nuevas bases para continuar la investigación con la certeza de que estudiar más a fondo estos tres blancos en el cerebro expandirá nuestro entendimiento limitado de los mecanismos moleculares de diferenciación neuronal hipotalámica.

X. Perspectivas

- Clonar la 3'UTR mutante faltante de *Sept8*, es decir *Sept8.1* y repetir las transfecciones en la línea celular HEK-293 con la 3'UTR nativa y mutante, así como realizar los ensayos de Western-blot por triplicado para confirmar si la interacción entre miR-7 y *Sept8.1* es biológicamente funcional.
- Medir por qPCR los transcritos de *Sept1*, *Sept8* y *Pfn2* en mHypoE-N1 y HEK-293.
- Cotransfectar miR-7 y el cluster de miR-17-92 en células HEK-293 para investigar si el efecto sinérgico de estos miRNAs es capaz de disminuir los niveles proteicos de PFN2. Cabe mencionar que se cuenta con dicha construcción (miR17-92) en el laboratorio pues fue clonada para investigar su función en el desarrollo neuronal hipotalámico (Tesis de licenciatura Ortega-Gurrola, 2017).
- Confirmar en HEK-293 la funcionalidad de una esponja de miR-7 (generada en el laboratorio) con 7 sitios de unión consecutivos a miR-7, de modo que la actividad de la luciferasa se rescate por medio de la inhibición de la represión post-transcripcional de miR-7.
- Realizar ensayos de análisis por hibridación fluorescente in situ para caracterizar la expresión de *Sept1*, *Sept8* y *Pfn2* en el hipotálamo en desarrollo y adulto.
- Estandarizar una técnica para la generación de neuroesferas hipotalámicas, entre el período de los días E 15 y E 18 de mayor neurogénesis en el hipotálamo y establecer estas células como el modelo experimental biológico en el cual se pruebe el efecto de la transfección de miR-7 o de su inhibición por medio de la esponja. Esto supondría no tener que trabajar con construcciones de las 3'UTRs y sólo modificar los niveles endógenos de tales proteínas.

XI. Referencias

- 1) Abe, K., Rossman, K. L., Liu, B., Ritola, K. D., Chiang, D., Campbell, S. L. et al., Der, C. J. (2000). Vav2 is an activator of Cdc42, Rac1, and RhoA. *J. Biol. Chem.* 275, 10141–10149.
- 2) Acampora, D., Postiglione, M. P., Avantaggiato, V., Di Bonito, M., Vaccarino, F. M., Michaud, J., y Simeone, A. (1999). Progressive impairment of developing neuroendocrine cell lineages in the hypothalamus of mice lacking the *Orthopedia* gene. *Genes Dev.* 13, 2787–2800.
- 3) Ajika, K., y Hökfelt, T. (1973). Ultrastructural identification of catecholamine neurones in the hypothalamic periventricular-arcuate nucleus-median eminence complex with special reference to quantitative aspects. *Brain Res.* 57, 97–117.
- 4) Aprea, J., Prenninger, S., Dori, M., Ghosh, T., Monasor, L. S., Wessendorf, E. et al., Calegari, F. (2013). Transcriptome sequencing during mouse brain development identifies long non-coding RNAs functionally involved in neurogenic commitment. *EMBO J.* 32, 3145–3160.
- 5) Aruga, J., y Mikoshiba, K. (2011). Role of BMP, FGF, calcium signaling, and *Zic* proteins in vertebrate neuroectodermal differentiation. *Neurochem. Res.* 36, 1286–1292.
- 6) Avilés, E. C., Wilson, N. H., y Stoeckli, E. T. (2013). Sonic hedgehog and Wnt: antagonists in morphogenesis but collaborators in axon guidance. *Front. Cell Neurosci.* 86, 1–17.
- 7) Baas, P. W., y Ahmad, F. J. (2001). Force generation by cytoskeletal motor proteins as a regulator of axonal elongation and retraction. *Trends Cell Biol.* 11, 244–249.
- 8) Baas, P. W., Slaughter, T., Brown, A., y Black, M. M. (1991). Microtubule dynamics in axons and dendrites. *J. Neurosci. Res.* 30, 134–153.
- 9) Baker, J. C., Beddington, R. S., y Harland, R. M. (1999). Wnt signaling in *Xenopus* embryos inhibits *bmp4* expression and activates neural development. *Genes Dev.* 13, 3149–3159.
- 10) Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116, 281–297.
- 11) Beck, R. D., King, M. A., Ha, G. K., Cushman, J. D., Huang, Z., y Petitto, J. M. (2005). IL-2 deficiency results in altered septal and hippocampal cytoarchitecture: relation to development and neurotrophins. *J. Neuroimmunol.* 160, 146–153.
- 12) Beise, N., y Trimble, W. (2011). Septins at a glance. *J. of Cell Science*, 124, 4141–4146.
- 13) Benowitz, L. I., y Routtenberg, A. (1987). A membrane phosphoprotein associated with neural development, axonal regeneration, phospholipid metabolism, and synaptic plasticity. *Trends in Neurosci.* 10, 527–532.
- 14) Berezikov, E., Thuemmler, F., van Laake, L. W., Kondova, I., Bontrop, R., Cuppen, E., & Plasterk, R. H. A. (2006). Diversity of microRNAs in human and chimpanzee brain. *Nature Gen.* 38), 1375–1377.
- 15) Betschinger, J., Mechtler, K., y Knoblich, J. A. (2003). The Par complex directs asymmetric cell division by phosphorylating the cytoskeletal protein Lgl. *Nature* 422, 326–330.
- 16) Bian, S., Hong, J., Li, Q., Schebelle, L., Pollock, A., Knauss, J. L. et al., Sun, T. (2013). MicroRNA cluster miR-17-92 regulates neural stem cell expansion and transition to intermediate progenitors in the developing mouse neocortex. *Cell Rep.* 3, 1398–1406.
- 17) Birge, R. B., Kalodimos, C., Inagaki, F., y Tanaka, S. (2009). Crk and CrkL adaptor proteins: networks for physiological and pathological signaling. *Cell Comm. Signal.* 7, 1–23.
- 18) Bläser, S., Horn, J., Würmell, P., Bauer, H., Strümpell, S., Nurden, P. et al., Zieger, B. (2004). The novel human platelet septin SEPT8 is an interaction partner of SEPT4. *Thromb. Haemos.* 91, 959–966.
- 19) Bouwmeester, T., Kim, S., Sasai, Y., Lu, B., y De Robertis, E. M. (1996). Cerberus is a head-inducing secreted factor expressed in the anterior endoderm of Spemann's organizer. *Nature* 382, 595–601.

- 20) Bouyer, K., Loudes, C., Robinson, I. C. A. F., Epelbaum, J., y Faivre-Bauman, A. (2007). Multiple co-localizations in arcuate GHRH-eGFP neurons in the mouse hypothalamus. *J. Chem. Neuroanat.* 33, 1–8.
- 21) Bradke, F., y Dotti, C. G. (1997). Neuronal polarity: vectorial cytoplasmic flow precedes axon formation. *Neuron* 19, 1175–1186.
- 22) Bradke, F., y Dotti, C. G. (1998). Membrane traffic in polarized neurons. *Biochim. Biophys. Acta* 1404, 245–258.
- 23) Bradke, F., y Dotti, C. G. (1999). The role of local actin instability in axon formation. *Science*, 283, 1931–1944.
- 24) Bradke, F., y Dotti, C. G. (2000). Differentiated neurons retain the capacity to generate axons from dendrites. *Curr. Biol.* 10, 1467–1470.
- 25) Brady, S. T. (1985). A novel brain ATPase with properties expected for the fast axonal transport motor. *Nature* 317, 73–85.
- 26) Briscoe, J., Pierani, A., Jessell, T. M., y Ericson, J. (2000). A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* 101, 435–445.
- 27) Buss, R. R., y Oppenheim, R. W. (2004). Role of programmed cell death in normal neuronal development and function. *Anat. Sci. Int.* 79, 191–197.
- 28) Bylund, M., Andersson, E., Novitsch, B. G., y Muhr, J. (2003). Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity. *Nature Neurosci.* 6, 1162–1168.
- 29) Calarco, J. A., Zhen, M., y Blencowe, B. J. (2011). Networking in a global world: establishing functional connections between neural splicing regulators and their target transcripts. *RNA* 17, 775–791.
- 30) Camarero, G., Tyrsin, O. Y., Xiang, C., Pfeiffer, V., Pleiser, S., Wiese, S. et al., Rapp, U. R. (2006). Cortical migration defects in mice expressing A-RAF from the B-RAF locus. *Mol. Cell. Biol.* 26, 7103–7115.
- 31) Cavodeassi, F., y Houart, C. (2012). Brain regionalization: of signaling centers and boundaries. *Dev. Neurobiol.* 72, 218–33.
- 32) Ceccaldi, P. E., Grohovaz, F., Benfenati, F., Chierregatti, E., Greengard, P., y Valtorta, F. (1995). Dephosphorylated synapsinI anchors synaptic vesicles to actin cytoskeleton: an analysis by videomicroscopy. *J. Cell Biol.* 128, 905–12.
- 33) Chen, L., Melendez, J., Campbell, K., Kuan, C.-Y., & Zheng, Y. (2009). Rac1 deficiency in the forebrain results in neural progenitor reduction and microcephaly. *Dev. Biol.* 325, 162–170.
- 34) Cheng, H.-Y. M., Papp, J. W., Varlamova, O., Dziema, H., Russell, B., Curfman, J. P. et al., Obrietan, K. (2007). microRNA Modulation of Circadian-Clock Period and Entrainment. *Neuron* 54, 813–829.
- 35) Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162, 156–159.
- 36) Choudhury, N. R., de Lima Alves, F., de Andres-Aguayo, L., Graf, T., Caceres, J. F., Rappsilber, J., & Michlewski, G. (2013). Tissue-specific control of brain-enriched miR-7 biogenesis. *Genes Dev.* 27, 24–38.
- 37) Cloonan, N. (2015). Re-thinking miRNA-mRNA interactions: Intertwining issues confound target discovery. *BioEssays* 37, 379–388.
- 38) Cohen, M., Kicheva, A., Ribeiro, A., Blassberg, R., Page, K. M., Barnes, C. P., y Briscoe, J. (2015). Ptch1 and Gli regulate Shh signalling dynamics via multiple mechanisms. *Nature Comm.* 6709, 1–12.
- 39) Compagnucci, C., Nizzardo, M., Corti, S., Zanni, G., y Bertini, E. (2014). In vitro neurogenesis: development and functional implications of iPSC technology. *Cell. Mol. Life Sci.* 71, 1623–1639.

- 40) Compagnucci, C., Piemonte, F., Sferra, A., Piermarini, E., y Bertini, E. (2016). The cytoskeletal arrangements necessary to neurogenesis. *Oncotarget* 7, 19414–19429.
- 41) Conaco, C., Otto, S., Han, J.-J., y Mandel, G. (2006). Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103(7), 2422–7.
- 42) Copp, A. J., Greene, N. D. E., y Murdoch, J. N. (2003). The genetic basis of mammalian neurulation. *Nature Rev. Genet.* 4, 784–793.
- 43) Cortés, D., Robledo-Arratia, Y., Hernández-Martínez, R., Escobedo-Ávila, I., Bargas, J., y Velasco, I. (2016). Transgenic GDNF Positively Influences Proliferation, Differentiation, Maturation and Survival of Motor Neurons Produced from Mouse Embryonic Stem Cells. *Front. Cell. Neurosci.* 217, 1–16.
- 44) Cui, Y., Xiao, Z., Chen, T., Wei, J., Chen, L., Liu, L., Dai, J. et al., (2014). The miR-7 identified from collagen biomaterial-based three-dimensional cultured cells regulates neural stem cell differentiation. *Stem Cells Dev.* 23, 393–405.
- 45) Cunliffe, V. T., y Ingham, P. W. (1999). Switching on the notochord. *Genes Dev.* 13, 1643–1656.
- 46) Da Silva, J. S., Medina, M., Zuliani, C., Di Nardo, A., Witke, W., y Dotti, C. G. (2003). RhoA/ROCK regulation of neuritogenesis via profilin Ila-mediated control of actin stability. *J. Cell Biol.* 162, 1267–1279.
- 47) Dajas-Bailador, F., Bonev, B., Garcez, P., Stanley, P., Guillemot, F., y Papalopulu, N. (2012). microRNA-9 regulates axon extension and branching by targeting Map1b in mouse cortical neurons. *Nature Neurosci.* 15, 697–699.
- 48) Darnell, D. K. (2005). Anteroposterior and Dorsoventral Patterning. In Jacobson, M. y Rao, M (Eds.), *Developmental Neurobiology* (pp. 41–65). New York, NY. Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers.
- 49) Dave, R. K., Ellis, T., Toumpas, M. C., Robson, J. P., Julian, E., Adolphe, C. et al., Wainwright, B. J. (2011). Sonic hedgehog and notch signaling can cooperate to regulate neurogenic divisions of neocortical progenitors. *PloS One*, 6, e14680.
- 50) Davis, A. M., Seney, M. L., Stallings, N. R., Zhao, L., Parker, K. L., y Tobet, S. A. (2004). Loss of steroidogenic factor 1 alters cellular topography in the mouse ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J. of Neurobiol.* 60, 424–436.
- 51) de Chevigny, A., Coré, N., Follert, P., Gaudin, M., Barbry, P., Béclin, C., & Cremer, H. (2012). miR-7a regulation of Pax6 controls spatial origin of forebrain dopaminergic neurons. *Nature Neurosci.* 15, 1120–1126.
- 52) De, S., Tsimounis, A., Chen, X., y Rotenberg, S. A. (2014). Phosphorylation of α -tubulin by protein kinase C stimulates microtubule dynamics in human breast cells. *Cytoskeleton* 71, 257–272.
- 53) de Anda, F. C., Pollarolo, G., Da Silva, J. S., Camoletto, P. G., Feiguin, F., y Dotti, C. G. (2005). Centrosome localization determines neuronal polarity. *Nature* 436(7051), 704–718.
- 54) de Waegh, S. M., Lee, V. M., y Brady, S. T. (1992). Local modulation of neurofilament phosphorylation, axonal caliber, and slow axonal transport by myelinating Schwann cells. *Cell* 68, 451–463.
- 55) Dessaud, E., McMahon, A. P., y Briscoe, J. (2008). Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network. *Dev.* 135, 2489–2503.
- 56) Díaz-Nido, J., y Avila, J. (2004). The cytoskeleton. In Davies, R.W. y Morris, B.J. (Eds.), *Molecular Biology of the Neuron* (2nd ed., pp. 317–356). Great Britain, UK. Oxford University Press.
- 57) Dickson, B. J. (2001). Rho GTPases in growth cone guidance. *Curr. Op. Neurobiol.* 11, 103–110.
- 58) DiTella, M. C., Feiguin, F., Carri, N., Kosik, K. S., y Cáceres, A. (1996). MAP-1B/TAU functional redundancy during laminin-enhanced axonal growth. *J. Cell Sci.* 109, 467–77.
- 59) Dolat, L., Hu, Q., y Spiliotis, E. T. (2014). Septin functions in organ system physiology and pathology. *Biological Chemistry*, 395, 123–141.

- 60) Dungan, H. M., Clifton, D. K., y Steiner, R. A. (2006). Minireview: kisspeptin neurons as central processors in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology*, 147, 1154–1168.
- 61) Ellacott, K. L. J., y Cone, R. D. (2004). The central melanocortin system and the integration of short- and long-term regulators of energy homeostasis. *Recent Prog. Horm. Res*, 59, 395–408.
- 62) Erkman, L., McEvelly, R. J., Luo, L., Ryan, A. K., Hooshmand, F., O’Connell, S. M. et al., Rosenfeld, M. G. (1996). Role of transcription factors Brn-3.1 and Brn-3.2 in auditory and visual system development. *Nature* 381, 603–616.
- 63) Erkman, L., Yates, P. A., McLaughlin, T., McEvelly, R. J., Whisenhunt, T., O’Connell, S. M. et al., Rosenfeld, M. G. (2000). A POU domain transcription factor-dependent program regulates axon pathfinding in the vertebrate visual system. *Neuron* 28, 779–792.
- 64) Fan, G., Martinowich, K., Chin, M. H., He, F., Fouse, S. D., Hutnick, L. et al., Sun, Y. E. (2005). DNA methylation controls the timing of astroglialogenesis through regulation of JAK-STAT signaling. *Dev.* 132, 3345–3356.
- 65) Fang, W.-Q., Chen, W.-W., Fu, A. K. Y., y Ip, N. Y. (2013). Axin directs the amplification and differentiation of intermediate progenitors in the developing cerebral cortex. *Neuron*, 79, 665–679.
- 66) Farh, K. K.-H., Grimson, A., Jan, C., Lewis, B. P., Johnston, W. K., Lim, L. P., Bartel, D. P. (2005). The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution. *Science* 310, 1817–21.
- 67) Fatica, A., y Bozzoni, I. (2014). Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development. *Nature Rev. Gen.* 15, 7–21.
- 68) Fiore, R., Khudayberdiev, S., Christensen, M., Siegel, G., Flavell, S. W., Kim, T.-K. et al., Schrott, G. (2009). Mef2-mediated transcription of the miR379-410 cluster regulates activity-dependent dendritogenesis by fine-tuning Pumilio2 protein levels. *EMBO J.* 28, 697–710.
- 69) Fish, J. L., Kosodo, Y., Enard, W., Pääbo, S., y Huttner, W. B. (2006). *Aspm* specifically maintains symmetric proliferative divisions of neuroepithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103, 10438–10443.
- 70) Fode, C., Gradwohl, G., Morin, X., Dierich, A., LeMeur, M., Goridis, C., y Guillemot, F. (1998). The bHLH protein Neurogenin 2 is a determination factor for epibranchial placode-derived sensory neurons. *Neuron* 20, 483–494.
- 71) Freeman, J. L., Harvey, A. S., Rosenfeld, J. V., Wrennall, J. A., Bailey, C. A., y Berkovic, S. F. (2003). Generalized epilepsy in hypothalamic hamartoma: evolution and postoperative resolution. *Neurology* 60, 762–777.
- 72) Friedman, R. C., Farh, K. K.-H., Burge, C. B., y Bartel, D. P. (2008). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Gen. Res.* 19, 92–105.
- 73) Froese, C. D., y Trimble, W. S. (2008). The functions of Septins in Mammals. In Hall, P.A., Russel, H. y Pringle, J.R. (Eds.), *The Septins* (pp. 187–209). Chichester, UK. John Wiley y Sons, Ltd.
- 74) Fukuchi-Shimogori, T., y Grove, E. A. (2001). Neocortex patterning by the secreted signaling molecule FGF8. *Science* 294, 1071–4.
- 75) Gage, F. H. (2000). Mammalian neural stem cells. *Science* 287, 1433–1438.
- 76) Gallera, J. (1971). Primary induction in birds. *Adv. Morphogenet.* 9, 149–80.
- 77) Gangaraju, V. K., y Lin, H. (2009). MicroRNAs: key regulators of stem cells. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 116–125.
- 78) Gärtner, A., Fornasiero, E. F., Munck, S., Vennekens, K., Seuntjens, E., Huttner, W. B. et al., Dotti, C. G. (2012). N-cadherin specifies first asymmetry in developing neurons. *EMBO J.* 31, 1893–1903.

- 79) Ghildiyal, M., y Zamore, P. D. (2009). Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature Rev. Genet.* 10, 94–108.
- 80) Giesemann, T., Rathke-Hartlieb, S., Rothkegel, M., Bartsch, J. W., Buchmeier, S., Jockusch, B. M., y Jockusch, H. (1999). A role for polyproline motifs in the spinal muscular atrophy protein SMN. Profilins bind to and colocalize with smn in nuclear gems. *J. Biol. Chem.* 274, 37908–38014.
- 81) Gilbert, S. F. (2000). Early Mammalian Development. In *Developmental biology*. (6th ed.) Massachusetts, MA. Sunderland.
- 82) Goley, E. D., & Welch, M. D. (2006). The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 7, 713–726.
- 83) González-Billault, C., Engelke, M., Jiménez-Mateos, E. M., Wandosell, F., Cáceres, A., y Avila, J. (2002). Participation of structural microtubule-associated proteins (MAPs) in the development of neuronal polarity. *J. of Neurosci. Res.* 67, 713–719.
- 84) Good, D. J., Porter, F. D., Mahon, K. A., Parlow, A. F., Westphal, H., y Kirsch, I. R. (1997). Hypogonadism and obesity in mice with a targeted deletion of the *Nhlh2* gene. *Nature Genet.* 15, 397–401.
- 85) Goshu, E., Jin, H., Fasnacht, R., Sepenski, M., Michaud, J. L., y Fan, C.-M. (2002). Sim2 mutants have developmental defects not overlapping with those of Sim1 mutants. *Mol. Cell. Biol.* 22, 4147–4157.
- 86) Götz, M., Hartfuss, E., y Malatesta, P. (2002). Radial glial cells as neuronal precursors: a new perspective on the correlation of morphology and lineage restriction in the developing cerebral cortex of mice. *Brain Res. Bull.* 57, 777–788.
- 87) Guerra-Crespo, M., Pérez-Monter, C., Janga, S. C., Castillo-Ramírez, S., Gutiérrez-Rios, R. M., Joseph-Bravo, P. et al., Charli, J.-L. (2011). Transcriptional profiling of fetal hypothalamic TRH neurons. *BMC Genom.* 22, 483–494.
- 88) Haase, G., Dessaud, E., Garcès, A., de Bovis, B., Birling, M., Filippi, P. et al., deLapeyrière, O. (2002). GDNF acts through PEA3 to regulate cell body positioning and muscle innervation of specific motor neuron pools. *Neuron*, 35(5), 893–905. Hajdo-Milasinovic, A., Ellenbroek, S. I. J., van Es, S., van der Vaart, B., & Collard, J. G. (2007). Rac1 and Rac3 have opposing functions in cell adhesion and differentiation of neuronal cells. *J. Cell Sci.* 120, 555–566.
- 89) Hall, J. E. (2007). Guyton and Hall textbook of medical physiology (12th ed). Philadelphia, PA. Elsevier.
- 90) Hallböök, F. (1999). Evolution of the vertebrate neurotrophin and Trk receptor gene families. *Curr. Op. Neurobiol.* 9, 616–621.
- 91) Hancock, M. L., Preitner, N., Quan, J., y Flanagan, J. G. (2014). MicroRNA-132 is enriched in developing axons, locally regulates *Rasa1* mRNA, and promotes axon extension. *J. Neurosci.* 34, 66–78.
- 92) Harada, A., Oguchi, K., Okabe, S., Kuno, J., Terada, S., Ohshima, T. et al., Hirokawa, N. (1994). Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature* 369, 488–491.
- 93) Hayashi, K., Ishikawa, R., Ye, L. H., He, X. L., Takata, K., Kohama, K., y Shirao, T. (1996). Modulatory role of drebrin on the cytoskeleton within dendritic spines in the rat cerebral cortex. *The J. of Neuroscience: The Official J. Soc. Neurosci.* 16, 7161–7170.
- 94) Helms, A. W., Battiste, J., Henke, R. M., Nakada, Y., Simplicio, N., Guillemot, F., y Johnson, J. E. (2005). Sequential roles for *Mash1* and *Ngn2* in the generation of dorsal spinal cord interneurons. *Dev.* 132, 2709–2719.
- 95) Hofer, M. M., y Barde, Y.-A. (1988). Brain-derived neurotrophic factor prevents neuronal death in vivo. *Nature* 331, 261–262.

- 96) Horton, S., Meredith, A., Richardson, J. A., y Johnson, J. E. (1999). Correct coordination of neuronal differentiation events in ventral forebrain requires the bHLH factor MASH1. *Mol. Cell. Neurosci.* 14, 355–369.
- 97) Hu, E., Chen, Z., Fredrickson, T., y Zhu, Y. (2001). Molecular cloning and characterization of profilin-3: a novel cytoskeleton-associated gene expressed in rat kidney and testes. *Exp. Nephrol.* 9, 265–274.
- 98) Hu, Q., Milenkovic, L., Jin, H., Scott, M. P., Nachury, M. V., Spiliotis, E. T., & Nelson, W. J. (2010). A Septin Diffusion Barrier at the Base of the Primary Cilium Maintains Ciliary Membrane Protein Distribution. *Science*, 329, 436–439.
- 99) Huang, E. J., y Reichardt, L. F. (2001). Neurotrophins: Roles in Neuronal Development and Function. *Ann. Rev. Neurosci.* 24, 677–736.
- 100) Ito, H., Atsuzawa, K., Morishita, R., Usuda, N., Sudo, K., Iwamoto, I., Mizutani, K., Katoh-Semba, R., Nozawa, Y., Asano, T., Nagata, K. (2009). Sept8 controls the binding of vesicle-associated membrane protein 2 to synaptophysin. *J. Neurochem.* 108, 867–888.
- 101) Ivanovska, I., Ball, A. S., Diaz, R. L., Magnus, J. F., Kibukawa, M., Schelter, J. M. et al., Cleary, M. A. (2008). MicroRNAs in the miR-106b family regulate p21/CDKN1A and promote cell cycle progression. *Molecular and Cellular Biology*, 28, 2167–74.
- 102) Iyengar, B. R., Choudhary, A., Sarangdhar, M. A., Venkatesh, K. V., Gadgil, C. J., y Pillai, B. (2014). Non-coding RNA interact to regulate neuronal development and function. *Front. Cell. Neurosci.* 24, 8–47.
- 103) Jacobson, A. G., y Sater, A. K. (1988). Features of embryonic induction. *Dev.* 104, 341–359.
- 104) Jaeger, J., Irons, D., y Monk, N. (2008). Regulative feedback in pattern formation: towards a general relativistic theory of positional information. *Dev.* 135, 3175–3183.
- 105) Jan, Y. N., y Jan, L. Y. (2001). Asymmetric cell division in the *Drosophila* nervous system. *Nature Rev. Neurosci.* 2, 772–779.
- 106) Janesick, A., Abbey, R., Chung, C., Liu, S., Taketani, M., y Blumberg, B. (2013). ERF and ETV3L are retinoic acid-inducible repressors required for primary neurogenesis. *Dev.* 140, 3095–3106.
- 107) Jaworski, J., Kapitein, L. C., Gouveia, S. M., Dortland, B. R., Wulf, P. S., Grigoriev, I. et al., Hoogenraad, C. C. (2009). Dynamic Microtubules Regulate Dendritic Spine Morphology and Synaptic Plasticity. *Neuron* 61, 85–100.
- 108) Jing, E., Nillni, E. A., Sanchez, V. C., Stuart, R. C., y Good, D. J. (2004). Deletion of the Nhlh2 transcription factor decreases the levels of the anorexigenic peptides alpha melanocyte-stimulating hormone and thyrotropin-releasing hormone and implicates prohormone convertases I and II in obesity. *Endocrinol.* 145, 1503–1513.
- 109) Jo, Y.H., y Chua, S. (2009). Transcription factors in the development of medial hypothalamic structures. *AJP: Endocrinol. Metab.* 297, 563–567.
- 110) Joo, E., Surka, M. C., Trimble, W. S., McPherson, P. S., Grinstein, S., Trimble, W. S. et al, (2007). Mammalian SEPT2 Is Required for Scaffolding Nonmuscle Myosin II and Its Kinases. *Dev. Cell*, 13, 677–690.
- 111) Johansson, A., Driessens, M., y Aspenström, P. (2000). The mammalian homologue of the *Caenorhabditis elegans* polarity protein PAR-6 is a binding partner for the Rho GTPases Cdc42 and Rac1. *J. Cell Sci.* 113, 3267–3275.
- 112) Jockusch, B.M., Murk, K., Rothkegel, M. (2007). The profile of profilins. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 159, 131–149.
- 113) Julien, J. P. (1999). Neurofilament functions in health and disease. *Curr. Op. Neurobiol.* 9, 554–560.
- 114) Kandel, E.R., Schwartz, J.H., James H., y Jessell, T.M. (2000). Principles of neural science (5th ed.) U.S.A. McGraw-Hill, Health Professions Division.

- 115) Kazanskaya, O., Glinka, A., y Niehrs, C. (2000). The role of *Xenopus dickkopf1* in prechordal plate specification and neural patterning. *Dev.* 127, 4981–4992.
- 116) Keith, B., Adelman, D. M., y Simon, M. C. (2001). Targeted mutation of the murine arylhydrocarbon receptor nuclear translocator 2 (*Arnt2*) gene reveals partial redundancy with *Arnt*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 6692–6697.
- 117) Kinoshita, A., Kinoshita, M., Akiyama, H., Tomimoto, H., Akiguchi, I., Kumar, S. et al., Kimura, J. (1998). Identification of Septins in Neurofibrillary Tangles in Alzheimer's Disease. *Am. J. Pathol.* 153, 1551–1560.
- 118) Kishi, Y., Fujii, Y., Hirabayashi, Y., y Gotoh, Y. (2012). HMGA regulates the global chromatin state and neurogenic potential in neocortical precursor cells. *Nature Neurosci.* 15, 1127–1133.
- 119) Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S. et al., Shimizu, N. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392, 605–618.
- 120) Klappacher, G. W., Lunyak, V. V., Sykes, D. B., Sawka-Verhelle, D., Sage, J., Brard, G. et al., Glass, C. K. (2002). An induced Ets repressor complex regulates growth arrest during terminal macrophage differentiation. *Cell*, 109, 169–180.
- 121) Kloosterman, W. P., y Plasterk, R. H. A. (2006). The Diverse Functions of MicroRNAs in Animal Development and Disease. *Developmental Cell* 11, 441–450.
- 122) Kneussel, M., Brandstätter, J. H., Laube, B., Stahl, S., Müller, U., y Betz, H. (1999). Loss of postsynaptic GABA(A) receptor clustering in gephyrin-deficient mice. *J. Neurosci.* 19, 9289–9297.
- 123) Kobayashi, D., Kobayashi, M., Matsumoto, K., Ogura, T., Nakafuku, M., y Shimamura, K. (2002). Early subdivisions in the neural plate define distinct competence for inductive signals. *Dev.* 129, 83–93.
- 124) Kokoeva, M. V., Yin, H., y Flier, J. S. (2007). Evidence for constitutive neural cell proliferation in the adult murine hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* 505, 209–220.
- 125) Kokoeva, M. V., Yin, H., y Flier, J. S. (2005). Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science* 310, 679–683.
- 126) Kole, A. J., Swahari, V., Hammond, S. M., y Deshmukh, M. (2011). miR-29b is activated during neuronal maturation and targets BH3-only genes to restrict apoptosis. *Genes Dev.* 25, 125–130.
- 127) Kosako, H., Amano, M., Yanagida, M., Tanabe, K., Nishi, Y., Kaibuchi, K., y Inagaki, M. (1997). Phosphorylation of glial fibrillary acidic protein at the same sites by cleavage furrow kinase and Rho-associated kinase. *J. Biol. Chem.* 272, 10333–10336.
- 128) Kosako, H., Goto, H., Yanagida, M., Matsuzawa, K., Fujita, M., Tomono, Y. et al., Inagaki, M. (1999). Specific accumulation of Rho-associated kinase at the cleavage furrow during cytokinesis: cleavage furrow-specific phosphorylation of intermediate filaments. *Oncogene* 18, 2783–2788.
- 129) Kosako, H., Yoshida, T., Matsumura, F., Ishizaki, T., Narumiya, S., y Inagaki, M. (2000). Rho-kinase/ROCK is involved in cytokinesis through the phosphorylation of myosin light chain and not ezrin/radixin/moesin proteins at the cleavage furrow. *Oncogene* 19, 6059–64.
- 130) Krützfeldt, J., y Stoffel, M. (2006). MicroRNAs: a new class of regulatory genes affecting metabolism. *Cell Metabol.* 4, 9–12.
- 131) Kuhn, D. E., Martin, M. M., Feldman, D. S., Terry, A. V., Nuovo, G. J., Elton, T. S., & Elton, T. S. (2008). Experimental validation of miRNA targets. *Methods* 44, 47–54.
- 132) Kurkinen, K. M. A., Marttinen, M., Turner, L., Natunen, T., Mäkinen, P., Haapalinna, F. et al., Hiltunen, M. (2016). SEPT8 modulates β -amyloidogenic processing of APP by affecting the sorting and accumulation of BACE1. *J. Cell Sci.* 129

- 133) Khuu, C., Utheim, T. P., & Sehic, A. (2016). The Three Paralogous MicroRNA Clusters in Development and Disease, miR-17-92, miR-106a-363, and miR-106b-25. *Scientifica* 2016, 1–10.
- 134) Lamb, T. M., y Harland, R. M. (1995). Fibroblast growth factor is a direct neural inducer, which combined with noggin generates anterior-posterior neural pattern. *Dev.* 121, 3627–3636
- 135) Lambrechts, A., Braun, A., Jonckheere, V., Aszodi, A., Lanier, L. M., Robbens, J. et al., Ampe, C. (2000). Profilin II is alternatively spliced, resulting in profilin isoforms that are differentially expressed and have distinct biochemical properties. *Mol. Cell Biol.* 20, 8209–8219.
- 136) Lambrechts, A., Verschelde, J. L., Jonckheere, V., Goethals, M., Vandekerckhove, J., y Ampe, C. (1997). The mammalian profilin isoforms display complementary affinities for PIP2 and proline-rich sequences. *The EMBO J.* 16, 484–494.
- 137) Latreille, M., Hausser, J., Stützer, I., Zhang, Q., Hastoy, B., Gargani, S. et al., Stoffel, M. (2014). MicroRNA-7a regulates pancreatic β cell function. *J. Clin. Invest.* 124, 2722–2735.
- 138) Lechan, R. M., y Toni, R. (2000). *Functional Anatomy of the Hypothalamus and Pituitary. Endotext.*
- 139) Lee, J. E., Hollenberg, S. M., Snider, L., Turner, D. L., Lipnick, N., y Weintraub, H. (1995). Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein. *Science* 268, 836–44.
- 140) Lee, K. J., Mendelsohn, M., y Jessell, T. M. (1998). Neuronal patterning by BMPs: a requirement for GDF7 in the generation of a discrete class of commissural interneurons in the mouse spinal cord. *Genes Dev.* 12, 3394–407.
- 141) Leibowitz, S. F., Hammer, N. J., y Chang, K. (1981). Hypothalamic paraventricular nucleus lesions produce overeating and obesity in the rat. *Physiol. Behav.*, 27, 1031–40.
- 142) Li, H., Zeitler, P. S., Valerius, M. T., Small, K., y Potter, S. S. (1996). Gsh-1, an orphan Hox gene, is required for normal pituitary development. *EMBO J.* 15, 714–24.
- 143) Li, X., y Jin, P. (2010). Roles of small regulatory RNAs in determining neuronal identity. *Nature Rev. Neurosci.* 11, 329–338.
- 144) Licatalosi, D. D., Yano, M., Fak, J. J., Mele, A., Grabinski, S. E., Zhang, C., y Darnell, R. B. (2012). Ptbp2 represses adult-specific splicing to regulate the generation of neuronal precursors in the embryonic brain. *Genes Dev.* 26, 1626–1642.
- 145) Litingtung, Y., y Chiang, C. (2000). Control of Shh activity and signaling in the neural tube. *Dev. Dyn.* 219, 143–154.
- 146) Liu, Q., y Paroo, Z. (2010). Biochemical Principles of Small RNA Pathways. *Annual Review of Biochemistry*, 79(1), 295–319.
- 147) Liu, Z., Jiang, Z., Huang, J., Huang, S., Li, Y., Yu, S. et al., Liu, X. (2014). miR-7 inhibits glioblastoma growth by simultaneously interfering with the PI3K/ATK and Raf/MEK/ERK pathways. *Int. J. Oncol.* 44, 1571–1580.
- 148) Longtine, M. S., DeMarini, D. J., Valencik, M. L., Al-Awar, O. S., Fares, H., De Virgilio, C., y Pringle, J. R. (1996). The septins: roles in cytokinesis and other processes. *Curr. Op. Cell Biol.* 8, 106–119.
- 149) Lowery, L. A., y Van Vactor, D. (2009). The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nature Reviews. Mol. Cell Biol.* 10, 332–343.
- 150) Lu, Z., y Xu, S. (2006). ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. *IUBMB Life* 58, 621–631.
- 151) Majdic, G., Young, M., Gomez-Sanchez, E., Anderson, P., Szczepaniak, L. S., Dobbins, R. L. et al., Parker, K. L. (2002). Knockout Mice Lacking Steroidogenic Factor 1 Are a Novel Genetic Model of Hypothalamic Obesity. *Endocrinol.* 143, 607–614.

- 152) Malynn, B. A., de Alboran, I. M., O'Hagan, R. C., Bronson, R., Davidson, L., DePinho, R. A., y Alt, F. W. (2000). N-myc can functionally replace c-myc in murine development, cellular growth, and differentiation. *Genes Dev.* 14, 1390–1399.
- 153) Mammoto, A., Sasaki, T., Asakura, T., Hotta, I., Imamura, H., Takahashi, K. et al., Takai, Y. (1998). Interactions of drebrin and gephyrin with profilin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243, 86–89.
- 154) Martynoga, B., Drechsel, D., y Guillemot, F. (2012). Molecular Control of Neurogenesis: A View from the Mammalian Cerebral Cortex. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, 8359–8359.
- 155) Matsunaga, E., Araki, I., y Nakamura, H. (2000). Pax6 defines the di-mesencephalic boundary by repressing En1 and Pax2. *Dev.* 127, 2357–2365.
- 156) McNay, D. E. G., Pelling, M., Claxton, S., Guillemot, F., y Ang, S.-L. (2006). Mash1 is required for generic and subtype differentiation of hypothalamic neuroendocrine cells. *Mol. Endocrinol.* 20, 1623–1632
- 157) Memczak, S., Jens, M., Elefsinioti, A., Torti, F., Krueger, J., Rybak, A. et al., Rajewsky, N. (2013). Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature* 495, 333–338.
- 158) Mercer, T. R., Dinger, M. E., Sunkin, S. M., Mehler, M. F., y Mattick, J. S. (2008). Specific expression of long noncoding RNAs in the mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 716–721.
- 159) Meyer, G., y Feldman, E. L. (2002). Signaling mechanisms that regulate actin-based motility processes in the nervous system. *J. Neurochem.* 83, 490–503.
- 160) Meza-Sosa, K. F., Pérez-García, E. I., Camacho-Concha, N., López-Gutiérrez, O., Pedraza-Alva, G., y Pérez-Martínez, L. (2014). MiR-7 promotes epithelial cell transformation by targeting the tumor suppressor KLF4. *PLoS One*, 9, e103987.
- 161) Meza-Sosa, K.F. (2014). microRNAs: reguladores del desarrollo del hipotálamo y del proceso de transformación celular. (Tesis doctoral no publicada). Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biotecnología, Cuernavaca, México.
- 162) Michaelsen, K., Murk, K., Zagrebelsky, M., Dreznjak, A., Jockusch, B. M., Rothkegel, M., & Korte, M. (2010). Fine-tuning of neuronal architecture requires two profilin isoforms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107, 15780–15795.
- 163) Michaud, J. L., Boucher, F., Melnyk, A., Gauthier, F., Goshu, E., Lévy, E. et al., Fan, C. M. (2001). Sim1 haploinsufficiency causes hyperphagia, obesity and reduction of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Hum. Mol. Genet.* 10, 1465–1473.
- 164) Michaud, J. L., DeRossi, C., May, N. R., Holdener, B. C., y Fan, C. M. (2000). ARNT2 acts as the dimerization partner of SIM1 for the development of the hypothalamus. *Mechanisms of Development*, 90, 253–261.
- 165) Michaud, J. L., Rosenquist, T., May, N. R., y Fan, C. M. (1998). Development of neuroendocrine lineages requires the bHLH-PAS transcription factor SIM1. *Genes Dev.* 12, 3264–3275.
- 166) Millet, S., Campbell, K., Epstein, D. J., Losos, K., Harris, E., y Joyner, A. L. (1999). A role for Gbx2 in repression of Otx2 and positioning the mid/hindbrain organizer. *Nature* 401, 161–174.
- 167) Mizuseki, K., Kishi, M., Matsui, M., Nakanishi, S., y Sasai, Y. (1998). Xenopus Zic-related-1 and Sox-2, two factors induced by chordin, have distinct activities in the initiation of neural induction. *Dev.* 125, 579–587.
- 168) Morin, X., Jaouen, F., y Durbec, P. (2007). Control of planar divisions by the G-protein regulator LGN maintains progenitors in the chick neuroepithelium. *Nature Neurosci.* 10, 1440–1458.

- 169) Mostowy, S., y Cossart, P. (2012). Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 183–194.
- 170) MuhChyi, C., Juliandi, B., Matsuda, T., y Nakashima, K. (2013). Epigenetic regulation of neural stem cell fate during corticogenesis. *International J. Dev. Neurosci.* 31, 424–433.
- 171) Mukhopadhyay, M., Shtrom, S., Rodriguez-Esteban, C., Chen, L., Tsukui, T., Gomer, L. et al., Westphal, H. (2001). Dickkopf1 is required for embryonic head induction and limb morphogenesis in the mouse. *Dev. Cell* 1, 423–434.
- 172) Murre, C., McCaw, P. S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L. Y., Jan, Y. N. et al., Lassar, A. B. (1989). Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cel* 58, 537–544.
- 173) Namihira, M., Kohyama, J., Semi, K., Sanosaka, T., Deneen, B., Taga, T., y Nakashima, K. (2009). Committed neuronal precursors confer astrocytic potential on residual neural precursor cells. *Dev. Cell* 16, 245–255.
- 174) Neufeld, T. P., y Rubin, G. M. (1994). The *Drosophila* peanut gene is required for cytokinesis and encodes a protein similar to yeast putative bud neck filament proteins. *Cell* 77, 371–379.
- 175) Ng, S.-Y., Bogu, G. K., Soh, B. S., y Stanton, L. W. (2013). The long noncoding RNA RMST interacts with SOX2 to regulate neurogenesis. *Mol. Cell* 51, 349–359.
- 176) Nichols, D. H. (1981). Neural crest formation in the head of the mouse embryo as observed using a new histological technique. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 64, 105–20.
- 177) Nicolas, C. S., Amici, M., Bortolotto, Z. A., Doherty, A., Csaba, Z., Fafouri, A. et al., Peineau, S. (2013). The role of JAK-STAT signaling within the CNS. *JAK-STAT* 2, e22925.
- 178) Nieuvestein, R. A. J., Hartwig, N. G., Vermeij-Keers, C., y Valk, J. (1993). Embryonic development of the mammalian caudal Neural Tube. *Teratol.* 48, 21–31.
- 179) Obermann, H., Raabe, I., Balvers, M., Brunswig, B., Schulze, W., y Kirchhoff, C. (2005). Novel testis-expressed profilin IV associated with acrosome biogenesis and spermatid elongation. *Mol. Hum. Reprod.* 11, 53–64
- 180) Oppenheim, R. W. (1989). The neurotrophic theory and naturally occurring motoneuron death. *Trends Neurosci.* 12, 252–255
- 181) Ori-McKenney, K. M., Jan, L. Y., y Jan, Y.-N. (2012). Golgi outposts shape dendrite morphology by functioning as sites of acentrosomal microtubule nucleation in neurons. *Neuron* 76(5), 921–930.
- 182) Ortega-Gurrola, A. (2017). Papel del cluster miR-17-92a en el desarrollo hipotalámico murino. (Tesis de licenciatura no publicada). Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biotecnología, Cuernavaca, México.
- 183) Osella, M., Bosia, C., Corá, D., y Caselle, M. (2011). The role of incoherent microRNA-mediated feedforward loops in noise buffering. *PLoS Comp. Biol.* 7, e1001101.
- 184) Pache, M., Zieger, B., Bläser, S., y Meyer, P. (2005). Immunoreactivity of the septins SEPT4, SEPT5, and SEPT8 in the human eye. *J. Histochem. Cytochem.* 53, 1139–1147.
- 185) Papanayotou, C., Mey, A., Birot, A.-M., Saka, Y., Boast, S., Smith, J. C. et al., Stern, C. D. (2008). A mechanism regulating the onset of Sox2 expression in the embryonic neural plate. *PLoS Biology*, 6, e2.
- 186) Parent, A.-S., Naveau, E., Gerard, A., Bourguignon, J.-P., y Westbrook, G. L. (2011). Early developmental actions of endocrine disruptors on the hypothalamus, hippocampus, and cerebral cortex. *J. Toxicol. Environ. Health B. Crit. Rev.* 14, 328–345.
- 187) Paridaen, J. T., y Huttner, W. B. (2014). Neurogenesis during development of the vertebrate central nervous system. *EMBO Rep.* 15, 351–364.

- 188) Penzel, R., Oschwald, R., Chen, Y., Tacke, L., y Grunz, H. (1997). Characterization and early embryonic expression of a neural specific transcription factor xSOX3 in *Xenopus laevis*. *Int. J. Dev. Biol.* 41, 667–77.
- 189) Pérez-Martínez y Charli, J.-L. (2006). Factors involved in the establishment of hypothalamic neuroendocrine phenotypes. *Mol. Endocrinol.* 661, 127–147.
- 190) Pérez-Monter, C., Martínez-Armenta, M., Miquelajauregui, A., Furlan-Magaril, M., Varela-Echavarría, A., Recillas-Targa, F. et al., Pérez-Martínez, L. (2011). The Krüppel-like factor 4 controls biosynthesis of thyrotropin-releasing hormone during hypothalamus development. *Mol. Cell. Endocrinol.* 333, 127–133.
- 191) Peterson, S. M., Thompson, J. A., Ufkin, M. L., Sathyanarayana, P., Liaw, L., Congdon, C. B. (2014). Common features of microRNA target prediction tools. *Front. Genet.* 5, 1–10.
- 192) Pollock, A., Bian, S., Zhang, C., Chen, Z., & Sun, T. (2014). Growth of the developing cerebral cortex is controlled by MicroRNA-7 through the p53 pathway. *Cell Rep.* 7, 1184–1196.
- 193) Pozuelo, R.M., Geraghty KM, Wong BH, Wood NT, Campbell DG, Morrice N, Mackintosh C. et al., (2004).
- 194) 14-3-3-affinity purification of over 200 human phosphoproteins reveals new links to regulation of cellular metabolism, proliferation and trafficking. *Biochem. J.* 15, 395–408.
- 195) Qi, M., Yu, W., Liu, S., Jia, H., Tang, L., Shen, M. et al., Yu, L. (2005). Septin1, a new interaction partner for human serine/threonine kinase aurora-B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336, 994–1000.
- 196) Qin, S., Liu, M., Niu, W., y Zhang, C.-L. (2011). Dysregulation of Kruppel-like factor 4 during brain development leads to hydrocephalus in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108, 21117–21121.
- 197) Qin, S., & Zhang, C.-L. (2012). Role of Kruppel-like factor 4 in neurogenesis and radial neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Mol. Cell Biol.*, 32, 4297–4305.
- 198) Raj, B., O’Hanlon, D., Vessey, J. P., Pan, Q., Ray, D., Buckley, N. J. et al., Blencowe, B. J. (2011). Cross-regulation between an alternative splicing activator and a transcription repressor controls neurogenesis. *Molecular Cell* 43, 843–850.
- 199) Rajalingam, K., Wunder, C., Brinkmann, V., Churin, Y., Hekman, M., Sievers, C. et al., Rudel, T. (2005). Prohibitin is required for Ras-induced Raf-MEK-ERK activation and epithelial cell migration. *Nature Cell Biol.* 7, 837–843.
- 200) Rashidi, B., Reisi, P., Ghaedamini, A., Golbidi, M., Shabrang, M., y Arabpoor, Z. (2015). Effect of cholecystokinin on learning and memory, neuronal proliferation and apoptosis in the rat hippocampus. *Adv. Biomed. Res.* 227, 1–4.
- 201) Ridley, A. J. (2015). Rho GTPase signalling in cell migration. *Curr. Op. Cell Biol.*, 36, 103–112.
- 202) Rogers, C. D., Moody SA, Casey ES. (2009) Neural induction and factors that stabilize a neural fate. *Birth Defects Res. C. Embryo Today* 87, 249–262.
- 203) Rogers, C. D., Ferzli, G. S., y Casey, E. S. (2011). The response of early neural genes to FGF signaling or inhibition of BMP indicate the absence of a conserved neural induction module. *BMC Dev. Biol.* 74, 1–11.
- 204) Roztocil, T., Matter-Sadzinski, L., Alliod, C., Ballivet, M., y Matter, J. M. (1997). NeuroM, a neural helix-loop-helix transcription factor, defines a new transition stage in neurogenesis. *Dev.* 124), 3263–3272.
- 205) Rubio, M.P., Geraghty, K. M., Wong, B. H. C., Wood, N. T., Campbell, D. G., Morrice, N., y Mackintosh, C. (2004). 14-3-3-affinity purification of over 200 human phosphoproteins reveals new links to regulation of cellular metabolism, proliferation and trafficking. *Biochem. J.* 379, 395–408.

- 206) Ryu, S., Mahler, J., Acampora, D., Holzschuh, J., Erhardt, S., Omodei, D. et al., Driever, W. (2007). Orthopedia homeodomain protein is essential for diencephalic dopaminergic neuron development. *Curr.Biol.* 17, 873–880.
- 207) Saade, M., Gutiérrez-Vallejo, I., Le Dréau, G., Rabadán, M. A., Miguez, D. G., Buceta, J., y Martí, E. (2013). Sonic hedgehog signaling switches the mode of division in the developing nervous system. *Cell Rep.* 4, 492–503.
- 208) Sadler, T.W., Thomas W. y Langman, J. (2011). *Langman's medical embryology.* (12th ed.) Baltimore, MD. Lippincott Williams y Wilkins.
- 209) Santa-Olalla, J., y Covarrubias, L. (1999). Basic fibroblast growth factor promotes epidermal growth factor responsiveness and survival of mesencephalic neural precursor cells. *J. Neurobiol.*, 40, 14–27.
- 210) Sausedo, R. A., Smith, J. L., y Schoenwolf, G. C. (1997). Role of nonrandomly oriented cell division in shaping and bending of the neural plate. *J. Comp. Neurol.* 381, 473–488.
- 211) Schafer, D. A., Jennings, P. B., y Cooper, J. A. (1996). Dynamics of capping protein and actin assembly in vitro: uncapping barbed ends by polyphosphoinositides. *J. Cell Biol.* 135, 169–179.
- 212) Schneider, R., Osterburg, J., Buchner, A., y Pietrowsky, R. (2009). Effect of intranasally administered cholecystokinin on encoding of controlled and automatic memory processes. *Psychopharmacol.* 202, 559–567.
- 213) Schoenwolf, G. C. (1988). Microsurgical analyses of avian neurulation: separation of medial and lateral tissues. *J. Comp. Neurol.* 276, 498–507.
- 214) Schoenwolf, G. C. (1991). Cell movements driving neurulation in avian embryos. *Dev.* 2, 157–168.
- 215) Schoenwolf, G. C., y Desmond, M. E. (1984). Descriptive studies of occlusion and reopening of the spinal canal of the early chick embryo. *Anatom. Rec.* 209, 251–263.
- 216) Schratt, G. M., Tuebing, F., Nigh, E. A., Kane, C. G., Sabatini, M. E., Kiebler, M., y Greenberg, M. E. (2006). A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature* 439, 283–299.
- 217) Schumacher, S., y Franke, K. (2013). miR-124-regulated RhoG. *Small GTPases* 4, 42–46.
- 218) Seo, S., Herr, A., Lim, J.-W., Richardson, G. A., Richardson, H., y Kroll, K. L. (2005). Geminin regulates neuronal differentiation by antagonizing Brg1 activity. *Genes Dev.* 19, 1723–1734.
- 219) Sgouras, D. N., Athanasiou, M. A., Beal, G. J., Fisher, R. J., Blair, D. G., y Mavrothalassitis, G. J. (1995). ERF: an ETS domain protein with strong transcriptional repressor activity, can suppress ets-associated tumorigenesis and is regulated by phosphorylation during cell cycle and mitogenic stimulation. *EMBO J.*, 14, 4781–4793.
- 220) Siegenthaler, J. A., Ashique, A. M., Zarbalis, K., Patterson, K. P., Hecht, J. H., Kane, M. A. et al., Pleasure, S. J. (2009). Retinoic acid from the meninges regulates cortical neuron generation. *Cell* 139(3), 597–609.
- 221) Simeone, A., Avantaggiato, V., Moroni, M. C., Mavilio, F., Arra, C., Cotelli, F. et al., Acampora, D. (1995). Retinoic acid induces stage-specific antero-posterior transformation of rostral central nervous system. *Mech. Dev.* 51, 83–98.
- 222) Sirajuddin, M., Farkasovsky, M., Hauer, F., Kühlmann, D., Macara, I. G., Weyand, M. et al., Wittinghofer, A. (2007). Structural insight into filament formation by mammalian septins. *Nature* 449, 311–315.
- 223) Sluchanko, N. N., y Gusev, N. B. (2010). 14-3-3 proteins and regulation of cytoskeleton. *Biochem.* 75, 1528–1546.
- 224) Smith, J. L., y Schoenwolf, G. C. (1991). Further evidence of extrinsic forces in bending of the neural plate. *J. Comp. Neurol.* 307, 225–236.

- 225) Snell, R. S. (2006). *Clinical neuroanatomy*. (6th ed.) Baltimore, MD. Lippincott Williams y Wilkins.
- 226) Sood, P., Krek, A., Zavolan, M., Macino, G., & Rajewsky, N. (2006). Cell-type-specific signatures of microRNAs on target mRNA expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 103, 2746–51.
- 227) Stuessi, M., y Bradke, F. (2011). Neuronal polarization: the cytoskeleton leads the way. *Dev. Neurobiol.* 71, 430–444.
- 228) Stiles, J., y Jernigan, T. L. (2010). The basics of brain development. *Neuropsychol. Rev.* 20, 327–348.
- 229) Spiliotis, E. T., Hunt, S. J., Hu, Q., Kinoshita, M., & Nelson, W. J. (2008). Epithelial polarity requires septin coupling of vesicle transport to polyglutamylated microtubules. *J Cell Biol.*, 180, 295–303.
- 230) Strickland, I. T., Richards, L., Holmes, F. E., Wynick, D., Uney, J. B., y Wong, L.-F. (2011). Axotomy-induced miR-21 promotes axon growth in adult dorsal root ganglion neurons. *PLoS One*, 6, e23423.
- 231) Sun, E., y Shi, Y. (2015). MicroRNAs: Small molecules with big roles in neurodevelopment and diseases. *Experimental Neurology*, 268, 46–53.
- 232) Sun, Y., Nadal-Vicens, M., Misono, S., Lin, M. Z., Zubiaga, A., Hua, X. et al., Greenberg, M. E. (2001). Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms. *Cell* 104(3), 365–376.
- 233) Szarek, E., Cheah, P.-S., Schwartz, J., y Thomas, P. (2010). Molecular genetics of the developing neuroendocrine hypothalamus. *Mol. Cell. Endocrinol.* 323, 115–123.
- 234) Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., y Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* 131, 861–872.
- 235) Takemoto, T., Uchikawa, M., Kamachi, Y., y Kondoh, H. (2006). Convergence of Wnt and FGF signals in the genesis of posterior neural plate through activation of the Sox2 enhancer N-1. *Dev.*, 133, 297–306.
- 236) Tang, W. W. C., Kobayashi, T., Irie, N., Dietmann, S., y Surani, M. A. (2016). Specification and epigenetic programming of the human germ line. *Nature Rev. Gen.*, 17, 585–600.
- 237) Temple, S. (2001). The development of neural stem cells. *Nature* 414, 112–117.
- 238) Tessmar-Raible, K., Raible, F., Christodoulou, F., Guy, K., Rembold, M., Hausen, H., & Arendt, D. (2007). Conserved Sensory-Neurosecretory Cell Types in Annelid and Fish Forebrain: Insights into Hypothalamus Evolution. *Cell* 129, 1389–1400.
- 239) Tobet, S. A., Nozaki, M., Youson, J. H., y Sower, S. A. (1995). Distribution of lamprey gonadotropin-releasing hormone-III (GnRH-III) in brains of larval lampreys (*Petromyzon marinus*). *Cell Tiss. Res.* 279, 261–270.
- 240) Tropepe, V., Sibilia, M., Ciruna, B. G., Rossant, J., Wagner, E. F., y van der Kooy, D. (1999). Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon. *Dev. Biol.* 208, 166–188.
- 241) Tsang, J., Zhu, J., & van Oudenaarden, A. (2007). MicroRNA-mediated feedback and feedforward loops are recurrent network motifs in mammals. *Molecular Cell* 26, 753–67.
- 242) Tsuda, M., Makino, Y., Iwahara, T., Nishihara, H., Sawa, H., Nagashima, K. et al., Tanaka, S. (2004). Crk associates with ERM proteins and promotes cell motility toward hyaluronic acid. *J. Biol. Chem.* 279, 46843–46850.
- 243) Tuoc, T. C., Boretius, S., Sansom, S. N., Pitulescu, M.-E., Frahm, J., Livesey, F. J., y Stoykova, A. (2013). Chromatin regulation by BAF170 controls cerebral cortical size and thickness. *Dev. Cell* 25, 256–269.

- 244) Ulloa, L., Díez-Guerra, F. J., Avila, J., y Díaz-Nido, J. (1994). Localization of differentially phosphorylated isoforms of microtubule-associated protein 1B in cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci.* 6
- 245) 1, 211–23.
- 246) Ventura, A., Young, A. G., Winslow, M. M., Lintault, L., Meissner, A., Erkland, S. J. et al., Jacks, T. (2008). Targeted Deletion Reveals Essential and Overlapping Functions of the miR-17-92 Family of miRNA Clusters. *Cell* 132, 875–886.
- 247) Versele, M., y Thorner, J. (2005). Some assembly required: yeast septins provide the instruction manual. *Trends in Cell Biol.* 15, 414–424.
- 248) Vetter, M. L., y Dorsky, R. I. (2005). Neurogenesis. In Jacobson, M. y Rao, M (Eds.), *Developmental Neurobiology* (pp. 129–150). New York, NY. Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers.
- 249) Visani, M., Acquaviva, G., Marucci, G. Ragazzi, M., Franceschi, E. Brandes Alva, A., Tallini, G., Pession, A., de Biase, D. (2015). MicroRNA in Brain Neoplasia: A Review. *Int. J. Brain Disord. Treat.* 2469, 1–16.
- 250) Visone, R., Pallante, P., Vecchione, A., Cirombella, R. Ferracin, M. Ferraro, A., Volinia, S., Coluzzi, S., Leone, V., Borbone, E., Liu, C-G., Petrocca, F., Troncione, G., Calin, G. A., Scarpa, A., Colato, C., Tallini, G., Santoro, M., Croce C. M., Fuscol, A. (2006). Specific microRNAs are downregulated in human thyroid anaplastic carcinomas. *Oncogene.* 26, 7590–7595.
- 251) Wang, H., Ge, G., Uchida, Y., Luu, B., y Ahn, S. (2011). Gli3 is required for maintenance and fate specification of cortical progenitors. *J. of Neurosci.* 31, 6440–6458.
- 252) Wang, X., Kibschull, M., Laue, M. M., Lichte, B., Petrasch-Parwez, E., y Kilimann, M. W. (1999). Aczonin, a 550-kD putative scaffolding protein of presynaptic active zones, shares homology regions with Rim and Bassoon and binds profilin. *J. Cell Biol.* 147, 151–162.
- 253) Weinstein, D. C., y Hemmati-Brivanlou, A. (1999). Neural Induction. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 411–433
- 254) Wiggin, G. R., Fawcett, J. P., y Pawson, T. (2005). Polarity Proteins in Axon Specification and Synaptogenesis. *Dev. Cell* 8, 803–816.
- 255) Williams, D. L., y Schwartz, M. W. (2005). The melanocortin system as a central integrator of direct and indirect controls of food intake. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* , 289, 2-3.
- 256) Wilson, L., y Maden, M. (2005). The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube. *Dev. Biol.* 282, 1–13.
- 257) Witke, W., Podtelejnikov, A. V, Di Nardo, A., Sutherland, J. D., Gurniak, C. B., Dotti, C., y Mann, M. (1998). In mouse brain profilin I and profilin II associate with regulators of the endocytic pathway and actin assembly. *EMBO J.*, 17, 967–976.
- 258) Witke, W., Sutherland, J. D., Sharpe, A., Arai, M., y Kwiatkowski, D. J. (2001). Profilin I is essential for cell survival and cell division in early mouse development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 3832–3836.
- 259) Wolven, A. K., Belmont, L. D., Mahoney, N. M., Almo, S. C., y Drubin, D. G. (2000). In vivo importance of actin nucleotide exchange catalyzed by profilin. *J. Cell Biol.* 150, 895–904.
- 260) Woods, S.C., Seeley, R.J. (2000) Adiposity signals and the control of energy homeostasis. *Nutrition.* 16, 894–902.
- 261) Wrobel, C. N., Mutch, C. A., Swaminathan, S., Taketo, M. M., y Chenn, A. (2007). Persistent expression of stabilized beta-catenin delays maturation of radial glial cells into intermediate progenitors. *Dev. Biol.* 309, 285–297.
- 262) Wu, D., y Murashov, A. K. (2013). MicroRNA-431 regulates axon regeneration in mature sensory neurons by targeting the Wnt antagonist Kremen1. *Front. Mol. Neurosci.* 35, 1–6.

- 263) Wu, L., Wei, X., Fan, Y., Miao, J., Wang, L., Zhang, Y. et al., Yuan, Z. (2013). Altered expression of 14-3-3 ζ protein in spinal cords of rat fetuses with spina bifida aperta. *PloS One*, 8, e70457.
- 264) Xin, X., Pache, M., Zieger, B., Bartsch, I., Prünste, C., Flammer, J., y Meyer, P. (2007). Septin expression in proliferative retinal membranes. *J. Histochem. Cytochem.* 55, 1089–1094.
- 265) Xu, B., Goulding, E. H., Zang, K., Cepoi, D., Cone, R. D., Jones, K. R. et al., Reichardt, L. F. (2003). Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nature Neurosci.* 6, 736–742.
- 266) Yan, B., Neilson, K. M., y Moody, S. A. (2009). Notch signaling downstream of foxD5 promotes neural ectodermal transcription factors that inhibit neural differentiation. *Dev. Dyn.* 238, 1358–1365.
- 267) Yang, N., Higuchi, O., Ohashi, K., Nagata, K., Wada, A., Kangawa, K. et al., Mizuno, K. (1998). Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature* 393, 809–812.
- 268) Yip, D. J., Corcoran, C. P., Alvarez-Saavedra, M., DeMaria, A., Rennick, S., Mears, A. J. et al., Picketts, D. J. (2012). Snf2l regulates Foxg1-dependent progenitor cell expansion in the developing brain. *Dev. Cell* 22, 871–878.
- 269) Yu, J.-Y., Chung, K.-H., Deo, M., Thompson, R. C., y Turner, D. L. (2008). MicroRNA miR-124 regulates neurite outgrowth during neuronal differentiation. *Exp. Cell Res.* 314, 2618–2633.
- 270) Yu, S. R., Burkhardt, M., Nowak, M., Ries, J., Petrášek, Z., Scholpp, S. et al., Brand, M. (2009). Fgf8 morphogen gradient forms by a source-sink mechanism with freely diffusing molecules. *Nature* 461, 533–536.
- 271) Zagrebelsky, M., Holz, A., Dechant, G., Barde, Y.-A., Bonhoeffer, T., y Korte, M. (2005). The p75 neurotrophin receptor negatively modulates dendrite complexity and spine density in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 25, 9989–9999.
- 272) Zhang, H., Webb, D. J., Asmussen, H., Niu, S., & Horwitz, A. F. (2005). A GIT1/PIX/Rac/PAK signaling module regulates spine morphogenesis and synapse formation through MLC. *J. Neurosci.* 25, 3379–388.
- 273) Zhang, L., Wei, X., Zhang, Y., Xu, S., Chen, X., Wang, C., y Wang, Q. (2013). CCK-8S increased the filopodia and spines density in cultured hippocampal neurons of APP/PS1 and wild-type mice. *Neurosci. Lett.* 542, 47–52.
- 274) Zhu, J., Qi, S. T., Wang, Y.P., Wang, Z.B., Ouyang, Y.C., Hou, Y., Schatten, H., Sun, Q. Y. (2011). Septin1 is required for spindle assembly and chromosome congression in mouse oocytes. *Dev. Dyn.* 240,2281-2289.
- 275) Zinin, N., Adameyko, I., Wilhelm, M., Fritz, N., Uhlén, P., Ernfors, P. et al. (2014). MYC proteins promote neuronal differentiation by controlling the mode of progenitor cell division. *EMBO Rep.* 15, 383–391.

XII. Figuras suplementarias

Figura suplementaria 1

#	Gen	Incluido en	# Elem.	Nombre del gen
1	Arpc1a	ARP2/3	I	Complejo de la subunidad 1A de la proteína relacionada con actina 2/3
2	Crk	CRKII	II	Homólogo del oncogen CT10 de virus de sarcoma v-crk
3	Pdgfb	GF	III	Polipéptido beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas
4	Slc9a1	NHE1	IV	Cargador de solutos de la familia 9
5	Pik3cb	PI3K	V	Polipéptido b-catalítico de la fosfatidilinositol-3 cinasa
6	Pik3r2	PI3K	V	Subunidad regulatoria, peptido 2 de fosfatidilinositol-5-fosfato-4-cinasa
7	Pip4k2a	PI4P5K	VI	Fosfatidilinositol-5-fosfato-4 cinasa tipo II alfa
8	Pip4k2b	PI4P5K	VI	Fosfatidilinositol-5-fosfato-4 cinasa tipo II beta
9	Pip4k2c	PI4P5K	VI	Fosfatidilinositol-5-fosfato-4 cinasa tipo II gamma
10	Pip5k1b	PI4P5K	VI	Fosfatidilinositol-4-fosfato-5 cinasa tipo I beta
11	Pfn2	PFN	VII	Profilina 2
12	Rac1	RAC	VIII	C3 substrato botulínico 1, relacionado a RAS
13	Raf1	RAF	IX	Oncogen viral 1 v-raf de leucemia
14	Rras	RAS	X	Oncogen del subgrupo R de sarcoma de rata Harvey
15	Rras2	RAS	X	Homólogo 2 del oncogen viral relacionado a RAS (r-ras)
16	Mras	RAS	X	RAS de músculo y microespinas
17	Pdgfra	RTK	XI	Alfa polipéptido del receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas
18	Ssh1	SSH	XII	Homólogo de slingshot (Drosophila)
19	Vav2	Vav/	XIII	Oncogen Vav2

Fig S1. Genes que participan en la vía regulación del citoesqueleto de actina. Elementos de la vía de regulación del citoesqueleto de actina obtenidos por KEGG pathways. El total de genes que participan en la vía "Regulación del citoesqueleto de actina" son 19, como se muestra en la lista. De estos genes, algunos se encuentran en la misma clasificación en números romanos, de tal manera que aparecen como 13 elementos en la vía.

Figura suplementaria 2

Los siguientes 24 genes conforman la red llamada “Citoesqueleto, regulación del rearrreglo del citoesqueleto” y se muestran como 17 elementos en la red de interacción generada por la vía. En números romanos se muestran los elementos que conforman cada nodo en la red de manera que en Metacore la anotación toma como gen la clasificación principal y después señala la variante del gen, bajo una misma clasificación.

#	Símbolo de gen	Incluido en	# Elem.	Nombre del gen
1	14-3-3	14-3-3	I	Proteína de activación tirosina 3-monooxigenasa /triptófano 5-monooxigenase
2	14-3-3 eta	14-3-3	I	Proteína de activación tirosina 3-monooxigenasa/triptófano 5-monooxigenase, polipéptido eta
3	ARF3	ARF3	II	Factor 3 ADP-ribosilación
4	ARPC1	ARPC1	III	Subunidad 1, complejo de la proteína relacionada con actina 2/3
5	ARPC1A	ARPC1	III	Subunidad 1A, complejo de la proteína relacionada con actina 2/3
6	CAPZA	CAPZA	IV	Proteína de capping (filamentos de actina) de la línea del músculo z, alfa
7	CAPZA1	CAPZA	IV	Proteína de capping (filamentos de actina) de la línea del músculo z, alfa 1
8	CRK	CRK	V	Homólogo del oncogen CT10 de virus de sarcoma v-crk
9	ERM proteins	ERM proteins	VI	Proteína de interacción con la cadena Iregulatoria lugera de miosina
10	G-protein alpha-i family	G-protein alpha-i family	VII	Proteína de unión a nucleótido de guanina (proteína G), alfa inhibitoria 2
11	Galpha(i)-specific amine GPCRs	Galpha(i)-specific amine GPCRs	VIII	Receptor adrenérgico alfa 2
12	PARD6	PARD6	IX	Par-6 (partición defectuosa 6)
13	PARD6B	PARD6	IX	Par-6 (partición defectuosa 6) homólogo beta (<i>C. elegans</i>)
14	PKC	PKC	X	Proteína cinasa C
15	PKC-lambda/iota	PKC	X	Proteína cinasa C, iota
16	Profilin	Profilin	XI	Profilina
17	Profilin II	Profilin	XI	Profilina 2
18	Protein kinase G	Protein kinase G	XII	Proteína cinasa dependiente de cGMP, tipo II
19	Rac1	Rac1	XIII	C3 substrato botulínico 1, relacionado a RAS
20	Tubulin alpha	Tubulin alpha	XIV	Tubulina, alfa 1B
21	Tubulin alpha 1A	Tubulin alpha	XIV	Tubulina, alfa 1A
22	Tubulin gamma	Tubulin gamma	XV	Tubulina, gama 2
23	VAV-2	VAV-2	XVI	Oncogen Vav2
24	WaspIP	WaspIP	XVII	Miembro 1 de la familia de proteínas de interacción con WAS/WASL

Fig S2. Genes que participan en la vía de enriquecimiento “Citoesqueleto, regulación del rearrreglo del citoesqueleto”. Elementos que conforman los 24 genes como 17 elementos en la red de interacción generada por la vía “Citoesqueleto, regulación del rearrreglo del citoesqueleto”. En números romanos se muestran los elementos que conforman cada nodo en red de manera que en Metacore la anotación toma como gen la clasificación principal y después señala la variante del gen, bajo una misma clasificación.

Figura suplementaria 3

3.A.

Gen	microRNA	Posición	Semilla	ΔG_{duplex}	ΔG_{open}	$\Delta \Delta G$
Sept1	mmu-miR-7a	238	08:01:01	-10.8	-2.64	-8.15
Sept1	mmu-miR-7a	277	08:01:01	-8.8	-2.01	-6.78
Sept1	mmu-miR-7a	163	08:01:00	-13.4	-7.15	-6.24

Región amplificada de 217nt, a partir del nucleótido 1 al 217 de la 3'UTR de *Sept1*, semilla marcada en amarillo.

```

1  tattccccaa  tacgcgctgt  cctcgcctct  gctcaccgct  aatcggctat  cccatccccg
61  cgctggacag  cccagcgccc  aatccgggga  tccagagggt  aggctgccc  ttgcacttaa
121 accagatccc  tccaatccgg  aagttaaagg  cccatccgac  ttcgctctcc  gcgcggctct
181 aagaggaccg  cactccaaga  aaagcctccc  caccact

```

3.B.

Gen	microRNA	Posición	Semilla	ΔG_{duplex}	ΔG_{open}	$\Delta \Delta G$
Sept8	mmu-miR-7a	450	08:00:01	-22.65	-12.42	-10.22
Sept8	mmu-miR-7a	2437	08:01:01	-13.4	-6.55	-6.84
Sept8	mmu-miR-7a	2245	08:01:01	-11	-6.16	-4.83
Sept8	mmu-miR-7a	2268	08:01:01	-11.2	-11.13	-0.067
Sept8	mmu-miR-7a	213	08:01:01	-10.2	-10.22	0.022
Sept8	mmu-miR-7a	2866	08:01:01	-9.2	-10.2	1

Región amplificada de 405nt, a partir del nucleótido 241 al 646 de la 3'UTR de *Sept8* denominada *Sept8.1*, semilla marcada en amarillo.

```

241 -acaccttgt  gacccttctc  ccataacatg  gtgtgaggac  ggactgggag  ccggtacaga
301 ctccagtgtt  tacagctttg  ccatgtcccc  acctgctggc  ctcaggctgc  ctgggcctgg
361 ccagctatcc  ttctctatgc  aaatgcgtca  aagccatgac  tgctggaacc  caaaactgac
421 aaggtttatt  ttttcagag  ccggtggctg  gctctccatt  tacagtgtca  ctattccttg
481 atggagcagt  tatgtgcccg  ctctggtgat  ggcccagcc  agtgatgcta  ggcccaattg
541 ttcatcatca  agccggcgac  tcatgtggtg  cctgccctag  gcgtggcctg  cggctctggca
601 gatccgtgct  acagaattcg  cctggttctc  ctctatttta  atttt

```

Región amplificada de 353nt, a partir del nucleótido 1981 al 2346 de la 3'UTR de *Sept8* denominada *Sept8.2*, semilla marcada en amarillo

```

1981 caacctct  cctagccaat  atattattcc  agagaccagg  atgacctage
2041 aggcaggcc  actggttgta  taaaagacag  gattgcaggc  tcacaatcca  tgcagagaac
2101 tctgaagcca  gcaaattgta  ccaccatccc  ccgctgctca  ccaaacatgg  gcgtactgga
2161 aggcgttat  actcagtgcc  cgcctttgac  ctaaagctgg  ccagcatccc  tggggaacc
2221 tgacttgcaa  tttctagagt  ttaagatcttcc  catcggct  gtggcaagct  ctccccctgt
2281 gtggaatttt  gttatcttta  tttagctgag  gttaaattaa  tctctgttgt  gcaagaaaaa
2341 catga

```

3.C

Gen	microRNA	Posición	Semilla	ΔG_{duplex}	ΔG_{open}	$\Delta \Delta G$
Pfn2	mmu-miR-7a	480	08:00:00	-19	-10.14	-8.85
Pfn2	mmu-miR-7a	42	08:01:01	-11.2	-10.55	-0.64
Pfn2	mmu-miR-7a	64	08:01:01	-9.86	-10.15	0.29
Pfn2	mmu-miR-7a	99	08:01:01	-9.2	-17.79	8.59

Región amplificada de 542nt, a partir del nucleótido 3 al 544 de la 3'UTR de Pfn2, semilla marcada en amarillo.

```

1  --gctaggca gactgctgtaag tattagggga aaattgctct taaattttcc tagctgtaag
61 cttaagctc ctttgtatcc ctctgttggg gggaaagggt gtctttcttt ctgcccttc
121 ccctaaaata attgtgttca ttttgtttt gttccttgt gtactccagc attggttata
181 gtcatgggaa aggaaggtgt ccacgcaggc acaattaaca agaaacata tgaactcgct
241 ttatactga agaggtctgt aaccacctt tatctggcat cataattgca gcacaaat
301 gatttgcatg atatctgaa actgggggaa ggggcatgc caagttgggc atcacttcgt
361 cttagcagtt agtggattac tgattactaa aataggttaa tagtaagcaa ggtgccggtg
421 tacagtctct aactgcatca gtgtctttc agcactttg agcatttcct tggtcatct
481 agtcttccttt ttgtagcgca tggttgggag gaaaaaagtgc atgccctctgt acgtcacacc
541 tttc

```

Fig S3. Características de 3'UTR de clonas y amplicón clonado en psiCHECK-2. (A) Sitios de unión de miR-7 sobre la 3'UTR de Sept1 **(A)**, Sept8 **(B)** y Pfn2 **(C)** amplicón clonado en psiCHECK-2.

Figura suplementaria

4.A

```

      10      20      30      40      50      60      70
Sept8.1_fwd_guide_405bp .....ACACCTCGAGACCCTTCTCCCAATAACATGGTGTGAGAGCGGACTGGGAGCCGGTACAGACTCCAGTGTTTACAGCTT
15396 .....ATCGCTCGAGACCCTTCTCCCAATAACATGGTGTGAGAGCGGACTGGGAGCCGGTACAGACTCCAGTGTTTACAGCTT
Clustal Consensus * .....

      110     120     130     140     150     160     170
Sept8.1_fwd_guide_405bp .....TCAGGCTGCCCTGGGCTGGCCAGCTATCCCTCTCTATGCAAAATGGTCAAAGCCATGACTGCTGGAAACCCAAAACGTG
15396 .....TCAGGCTGCCCTGGGCTGGCCAGCTATCCCTCTCTATGCAAAATGGTCAAAGCCATGACTGCTGGAAACCCAAAACGTG
Clustal Consensus .....

      210     220     230     240     250     260     270
Sept8.1_fwd_guide_405bp .....CGGTGGCTGGTCTTCCCTTTACAGGTGCACATTCCTTGTGAGAGCAGTTATGTGCCCGCTCTGGTGTATGGCCCCAG
15396 .....CGGTGGCTGGTCTTCCCTTTACAGGTGCACATTCCTTGTGAGAGCAGTTATGTGCCCGCTCTGGTGTATGGCCCCAG
Clustal Consensus .....

      310     320     330     340     350     360     370
Sept8.1_fwd_guide_405bp .....TCATCATCAAGCCGGGACTCATGTGGTGCCTGCCCTAGGCGTGGCGTGGCGTGGCAGATCCGTGCTACAGAAATT
15396 .....TCATCATCAAGCCGGGACTCATGTGGTGCCTGCCCTAGGCGTGGCGTGGCGTGGCAGATCCGTGCTACAGAAATT
Clustal Consensus .....

      .....
Sept8.1_fwd_guide_405bp .....CTTTTT
15396 .....CCTAG-
Clustal Consensus .....
    
```

4.B

```

      10      20      30      40      50      60      70
Sept8.1_rev_guide_405bp .....AAAAAGTTTAAACGAGAGGAACAGGGGAATTCTGTAGCACGGATCTGCCAGCCGAGCCACCCCTAGGGCAGGC
15397 .....CTAGGTTTAAACGAGAGGAACAGGGGAATTCTGTAGCACGGATCTGCCAGCCGAGCCACCCCTAGGGCAGGC
Clustal Consensus * .....

      110     120     130     140     150     160     170
Sept8.1_rev_guide_405bp .....GATGAACAATTAGGCTAGCATCACTGGCTGGGGCCATCACAGAGCGGGACATAACTGCTCCATCAAGGAATAGT
15397 .....GATGAACAATTAGGCTAGCATCACTGGCTGGGGCCATCACAGAGCGGGACATAACTGCTCCATCAAGGAATAGT
Clustal Consensus .....

      210     220     230     240     250     260     270
Sept8.1_rev_guide_405bp .....CACCGGCTCTGGAAAAAATAAACCTTGTCAAGTTTGGGTTCCAGCAGTCATGGCTTTGACCATTTGCATAGAGAAG
15397 .....CACCGGCTCTGGAAAAAATAAACCTTGTCAAGTTTGGGTTCCAGCAGTCATGGCTTTGACCATTTGCATAGAGAAG
Clustal Consensus .....

      310     320     330     340     350     360     370
Sept8.1_rev_guide_405bp .....CCTGAGCCAGCAGGTGGGACATGGCAAGCTGTAAACACTGGAGTCTGTACCGGCTCCCAAGTCCGCTCCTCACACC
15397 .....CCTGAGCCAGCAGGTGGGACATGGCAAGCTGTAAACACTGGAGTCTGTACCGGCTCCCAAGTCCGCTCCTCACACC
Clustal Consensus .....

      .....
Sept8.1_rev_guide_405bp .....GGTGT
15397 .....CGGAT
Clustal Consensus * .....
    
```

4.C

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
Sept8.2_fwd_353 .....CAACTCGAGTAGCCAATATATTATTCAGAGACCCAGGATGACCTAGCAGGCAAGTCCACTGGTGTATAAAGACAGGATTG
15398 .....ATCGCTCGAGTAGCCAATATATTATTCAGAGACCCAGGATGACCTAGCAGGCAAGTCCACTGGTGTATAAAGACAGGATTG
Clustal Consensus .....

      110     120     130     140     150     160     170     180
Sept8.2_fwd_353 .....CAGAGAACTCTGAAGCCAGCAAAATGTACACCATCCCCCGTCTCACCAAAATGGGCTACTGGAAAGCTTTATACTCA
15398 .....CAGAGAACTCTGAAGCCAGCAAAATGTACACCATCCCCCGTCTCACCAAAATGGGCTACTGGAAAGCTTTATACTCA
Clustal Consensus .....

      210     220     230     240     250     260     270     280
Sept8.2_fwd_353 .....AAAGCTGGCAGCATCCCTGGGAAACCTGACTTGCAATTTCTAGAGTTTATGATCTTCCATCGGCTGTGCCAAGCTCTTCC
15398 .....AAAGCTGGCAGCATCCCTGGGAAACCTGACTTGCAATTTCTAGAGTTTATGATCTTCCATCGGCTGTGCCAAGCTCTTCC
Clustal Consensus .....

      310     320     330     340     350
Sept8.2_fwd_353 .....TATCTTTATTTAGCTGAGGTTAAATTAATCTCTGTGTGCGAGTTTAAACATGA
15398 .....TATCTTTATTTAGCTGAGGTTAAATTAATCTCTGTGTGCGAGTTTAAACATGA
Clustal Consensus .....
    
```

4.D

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
Sept8.2_rev_353  TCAATGTTAAACTGCACACAGAGATTAATTTAACTCAGCTAAATAAGATAACAAAATTCACACAGGGGAAGACTTGGC
15399            TCAATGTTAAACTGCACACAGAGATTAATTTAACTCAGCTAAATAAGATAACAAAATTCACACAGGGGAAGACTTGGC
Clustal Consensus
      110     120     130     140     150     160     170     180
Sept8.2_rev_353  CTTAAACTTAGAAATTCGAAGTCAGGTTCCCCAGGATGCTGCCAGCTTAAAGTCAGAGGGGGGCACTGAGTATAACAGC
15399            CTTAAACTTAGAAATTCGAAGTCAGGTTCCCCAGGATGCTGCCAGCTTAAAGTCAGAGGGGGGCACTGAGTATAACAGC
Clustal Consensus
      210     220     230     240     250     260     270     280
Sept8.2_rev_353  TTGTTGAGCACCGGGGATGTTGTTCAATTTGCTGGCTTCAGAGTTCTGCTCATGATGTTGAGGCTGCAATCCTGCTTT
15399            TTGTTGAGCACCGGGGATGTTGTTCAATTTGCTGGCTTCAGAGTTCTGCTCATGATGTTGAGGCTGCAATCCTGCTTT
Clustal Consensus
      310     320     330     340     350
Sept8.2_rev_353  TGCCTGCTAGGTCATCCTGCTCTCGAATAAATATATTGGCTCTCGAGGAT
15399            TGCCTGCTAGGTCATCCTGCTCTCGAATAAATATATTGGCTCTCGAGGAT
Clustal Consensus

```

4.E

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
Pfn2_fwd_542bp  GCTACTCGAGCTGTTAAGTATTAGGGGAAAATGGCTCTTAAATTTTCTAGCTGAAGCTTAAAGTCTCCCTTTGATCCCTCTG
15390_Pfn2f     GCTACTCGAGCTGTTAAGTATTAGGGGAAAATGGCTCTTAAATTTTCTAGCTGAAGCTTAAAGTCTCCCTTTGATCCCTCTG
Clustal Consensus
      120     130     140     150     160     170     180     190
Pfn2_fwd_542bp  GCCCCTTCCCCTAAATAAATGTTGTTCAATTTTGTGTTTTCCTTGTGTAAGTCCAGCATGGTTATAGTCATGGAAAGGAA
15390_Pfn2f     GCCCCTTCCCCTAAATAAATGTTGTTCAATTTTGTGTTTTCCTTGTGTAAGTCCAGCATGGTTATAGTCATGGAAAGGAA
Clustal Consensus
      230     240     250     260     270     280     290     300
Pfn2_fwd_542bp  AAAACATATGAACCTCGCTTATACCTGAAGAGGTCGTAAACCAACCTTATCTGGCATCATAAATTCAGCACAAATGATTT
15390_Pfn2f     AAAACATATGAACCTCGCTTATACCTGAAGAGGTCGTAAACCAACCTTATCTGGCATCATAAATTCAGCACAAATGATTT
Clustal Consensus
      340     350     360     370     380     390     400     410
Pfn2_fwd_542bp  GGGCATGCCAAGTTGGGCATCACTCGTCTAGCAGTTAGTGGATTACTGATTACTAAAATAGGTTAATAGTAAGCAAGGTGC
15390_Pfn2f     GGGCATGCCAAGTTGGGCATCACTCGTCTAGCAGTTAGTGGATTACTGATTACTAAAATAGGTTAATAGTAAGCAAGGTGC
Clustal Consensus
      450     460     470     480     490     500     510     520
Pfn2_fwd_542bp  GTCTTTTCAGCACTTTGGAGCATTTCTTGGCTCATCTAGTCTTCCCTTTGTAGGCGATGGTTGGGAGGAAAAGTGCATGCC
15390_Pfn2f     GTCTTTTCAGCACTTTGGAGCATTTCTTGGCTCATCTAGTCTTCCCTTTGTAGGCGATGGTTGGGAGGAAAAGTGCATGCC
Clustal Consensus

```

4.F

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
Pfn2_rev_542bp  GAAAGTTTAAAGCTACAGAGGCATGCATTTTTCTCCCAACCATGCGCTACAAAAGGAAGACTAGATGAGCCAGGAAATGC
15391            GAAAGTTTAAAGCTACAGAGGCATGCATTTTTCTCCCAACCATGCGCTACAAAAGGAAGACTAGATGAGCCAGGAAATGC
Clustal Consensus
      120     130     140     150     160     170     180     190
Pfn2_rev_542bp  AGTTAGAGACTGTACACCGGCACCTTGCTTACTATTAACCTATTTAGTAATCAGTAATCCACTAACTGCTAAGAGCAAGTGA
15391            AGTTAGAGACTGTACACCGGCACCTTGCTTACTATTAACCTATTTAGTAATCAGTAATCCACTAACTGCTAAGAGCAAGTGA
Clustal Consensus
      230     240     250     260     270     280     290     300
Pfn2_rev_542bp  CAGTTTCAAGATATCATGCAATCATTATTGTGTCGAATATGATGCCAGATAAAGGTTGGTTACAGACCTCTCAGGTATA
15391            CAGTTTCAAGATATCATGCAATCATTATTGTGTCGAATATGATGCCAGATAAAGGTTGGTTACAGACCTCTCAGGTATA
Clustal Consensus
      340     350     360     370     380     390     400     410
Pfn2_rev_542bp  TTGTGCCTGCGTGGACACCTTCCCTTCCCATGACTATAACCAATGCTGGAGTACACAAGGAAACAAAACAAAATGAACAAA
15391            TTGTGCCTGCGTGGACACCTTCCCTTCCCATGACTATAACCAATGCTGGAGTACACAAGGAAACAAAACAAAATGAACAAA
Clustal Consensus
      450     460     470     480     490     500     510     520
Pfn2_rev_542bp  AGACACCTTTCCCAACCAACAGAGGATACAAAGGAGACTTAAGCTTACAGCTAGGAAAATTTAAGAGCAATTTCCCTTAAT
15391            AGACACCTTTCCCAACCAACAGAGGATACAAAGGAGACTTAAGCTTACAGCTAGGAAAATTTAAGAGCAATTTCCCTTAAT
Clustal Consensus

```

4.G

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
Fwd_Sept1_217  TATTCCCAATACCGCTGTCTCGCCTCTGTCACCGCTAATCGGCTATCCCATCCCCGGCTGGACAGCCAGCGCCAAATCCGGGGATCCAGAGGGTAGGCCTGC
2785            TCGAGTACCGCTGTCTCGCCTCTGTCACCGCTAATCGGCTATCCCATCCCCGGCTGGACAGCCAGCGCCAAATCCGGGGATCCAGAGGGTAGGCCTGC
Clustal Consensus
      120     130     140     150     160     170     180     190     200     210
Fwd_Sept1_217  TTGCACTTAAACAGATCCCTCCAATCCGGAATTTAAGGCCATCCGACTTGTCTTCCGCGGCTTAAGAGGACCGCACTCAAAGAAAAGCCTCCCAACCACT
2785            TTGCACTTAAACAGATCCCTCCAATCCGGAATTTAAGGCCATCCGACTTGTCTTCCGCGGCTTAAGAGGACCGCACTCAAAGAAAAGCCTCCCAACCACT
Clustal Consensus

```

Fig S4. Resultados del alineamiento de la secuenciación de las clonas recombinantes de Sept8.1, Sept8.2 y Pfn2 en el vector psiCHECK-2. (A) Secuencia sentido de la 3'UTR de Sept8.1 y (B) secuencia antisentido de Sept8.1. (C) Secuencia sentido de la 3'UTR de Sept8.2 y (D) secuencia antisentido de Sept8.2. (E) Secuencia sentido de la 3'UTR de Pfn2 y (F) secuencia antisentido de Pfn2. Recuadro rojo marca sitio de unión a miR-7 para cada secuencia sentido. (G) Muestra la secuencia sentido de la 3'UTR de Sept1 después de haber sido sacada del vector pJet1.2/blunt. En el recuadro rojo se muestra el sitio de unión a la semilla de miR-7.

Figura suplementaria 5

5.A

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
Sept1_nat          TATTCCCCAA-TACCGCCTGTCCTCGCCTCTGCTCACCGCTAATCGGCTATCCCATCCCCG
11702 CCGARCTTCGTGGAGCGCGTCTGAAGAGCGAGCAGTAAATTCAGGCGATCGCTCGAGTACCGCCTGCTCTCGCCTCTGCTCACCGCTAATCGGCTATCCCATCCCCG
Clustal Consensus          * * * * *

      120      130      140      150      160      170      180      190      200      210
Sept1_nat CTTGGACAGCCAGCCCAATCCGGGATCCAGAGGATAGGCCTGCCCTTGCACTTAAACCCAGATCCCTCCAAATCCGGAAGTTTAAAGGCCATCCGACTTGTCTTCC
11702 CTTGGACAGCCAGCCCAATCCGGGATCCAGAGGATAGGCCTGCCCTTGCACTTAAACCCAGATCCCTCCAAATCCGGAAGTTTAAAGGCCATCCGACTTGTCTTCC
Clustal Consensus          * * * * *

      230      240      250      260      270      280      290      300      310      320
Sept1_nat GGGCTCTAAGAGGACCGCACTCAAGAAAAGCCTCCCCACCACT
11702 GGGCTCTAAGAGGACCGCACTCAAGAAAAGCCTCCGTTTAAACCTAGAGCGCCGCTGCCCGCAATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGGTTTTT
Clustal Consensus          * * * * *

```

5.B

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
Sept8.2_nat          CAACCTCTCC-TAGCCAATATATTCCAGAGCCAGGATGACCTAGCAGGCAGGTCCACTGGT
11705 GCRCTCGTGGAGCGCGTCTGAAGAGCGAGCAGTAAATTCAGGCGATCGCTCGAGTAGCCAATATATTCCAGAGCCAGGATGACCTAGCAGGCAGGTCCACTGGT
Clustal Consensus          * * * * *

      120      130      140      150      160      170      180      190      200      210
Sept8.2_nat TATAAAGACAGGATTCAGGCTCACAATCCATGCAGAGAACTCTGAAGCCAGCAAAATGACCCACATCCCCCGCTGCTCACAAACATGGCGCTACTGGAAGGCTG
11705 TATAAAGACAGGATTCAGGCTCACAATCCATGCAGAGAACTCTGAAGCCAGCAAAATGACCCACATCCCCCGCTGCTCACAAACATGGCGCTACTGGAAGGCTG
Clustal Consensus          * * * * *

      230      240      250      260      270      280      290      300      310      320
Sept8.2_nat ATACTCAGTCCCGCCTTTGACCTAAAGCTGCCAGCATCCCTGGGAAACCTGACTTGCAATTTCTAGAGTTTATGACTTTCCATCGGCTGTGCCAAGCTCTTCCC
11705 ATACTCAGTCCCGCCTTTGACCTAAAGCTGCCAGCATCCCTGGGAAACCTGACTTGCAATTTCTAGAGTTTATGACTTTCCATCGGCTGTGCCAAGCTCTTCCC
Clustal Consensus          * * * * *

      340      350      360      370      380      390      400      410      420      430
Sept8.2_nat GTGTGGAATTTTGTATCTTTATTTAGCTGAGGTTAAATTAATCTCTGTGTGCAAGAAAACATGA
11705 GTGTGGAATTTTGTATCTTTATTTAGCTGAGGTTAAATTAATCTCTGTGTGCAAGTTTAAACCTAGAGCGCCGCTGCCCGCAATAAAATATCTTTATTTTCATTAC
Clustal Consensus          * * * * *

```

5.C

```

Pfn2          GCTAGGCAGACTGTTAAGTATTAGGGAAAATGCTCTTAAATTTTCTAGCTGTAAAGCT
Pfn2MUT_a AHRGRCTTCGTGGAGCGCGTCTGAAGAGCGAGCAGTAAKTCTAGGYNCATCGCTCGAGCTGTTAAGTATTAGGGAAAATGCTCTTAAATTTTCTAGCTGTAAAGCT
Clustal Consensus          * * * * *

      120      130      140      150      160      170      180      190      200      210
Pfn2          AGCTCCTTTGTATCCCTCTGTTGGTGGGAAAAGTGTCTTTCTTTCTGCCCTTCCCTTAAATAATTGTGTTCAATTTTGTTTGTTTCTTGTACTCCAGCAT
Pfn2MUT_a AGCTCCTTTGTATCCCTCTGTTGGTGGGAAAAGTGTCTTTCTTTCTGCCCTTCCCTTAAATAATTGTGTTCAATTTTGTTTTCTTGTACTCCAGCAT
Clustal Consensus          * * * * *

      230      240      250      260      270      280      290      300      310      320
Pfn2          GTTATAGTCATGGGAAAGGAGGCTCCACCGCAGGCACAATTAACAGAAAACATATGAACCTCGCTTTATACCTCAAGAGGCTCTGAACCAACCTTATCTGCCATCA
Pfn2MUT_a GTTATAGTCATGGGAAAGGAGGCTCCACCGCAGGCACAATTAACAGAAAACATATGAACCTCGCTTTATACCTCAAGAGGCTCTGAACCAACCTTATCTGCCATCA
Clustal Consensus          * * * * *

      340      350      360      370      380      390      400      410      420      430
Pfn2          ATTCAGCACAAATAATGATTTGCATGATATCTTAAACTGGGGAAAGGGGATGCCAAGTTGGGCATCACTTCCTTACAGTGTAGTGGATTACTGATTAATAAAA
Pfn2MUT_a ATTCAGCACAAATAATGATTTGCATGATATCTTAAACTGGGGAAAGGGGATGCCAAGTTGGGCATCACTTCCTTACAGTGTAGTGGATTACTGATTAATAAAA
Clustal Consensus          * * * * *

      450      460      470      480      490      500      510      520      530      540
Pfn2          GGTAAATAGTAAGCAAGGTGCCGGTACAGTCTTAACTCCATCAGTGTCTTTGAGCACTTTGGAGCATTTCCCTGGCTCATCTAGTCTTCTTTTACGCCATG
Pfn2MUT_a GGTAAATAGTAAGCAAGGTGCCGGTACAGTCTTAACTCCATCAGTGTCTTTGAGCACTTTGGAGCATTTCCCTGGCTCATCTAGTCTTCTTTTACGCCATG
Clustal Consensus          * * * * *

      560      570      580      590      600      610      620      630      640      650
Pfn2          TGGGAGAAAAGTGCATCCCTCTGACGTACACCTTTC
Pfn2MUT_a TGGGAGAAAAGTGCATCCCTCTGACGTAAACCTAGAGCGCCGCTGCCCGCAATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGGVATTTGTGTGAAG
Clustal Consensus          * * * * *

```

Fig S5. Alineamiento y secuenciación de 3'UTRs mutantes. Secuencia sentido de la 3'UTR mutante de *Sept1* (A), *Sept8.2* (B) y *Pfn2* (C). En el recuadro rojo se muestra el sitio de unión a la semilla de miR-7.

Figura suplementaria 6

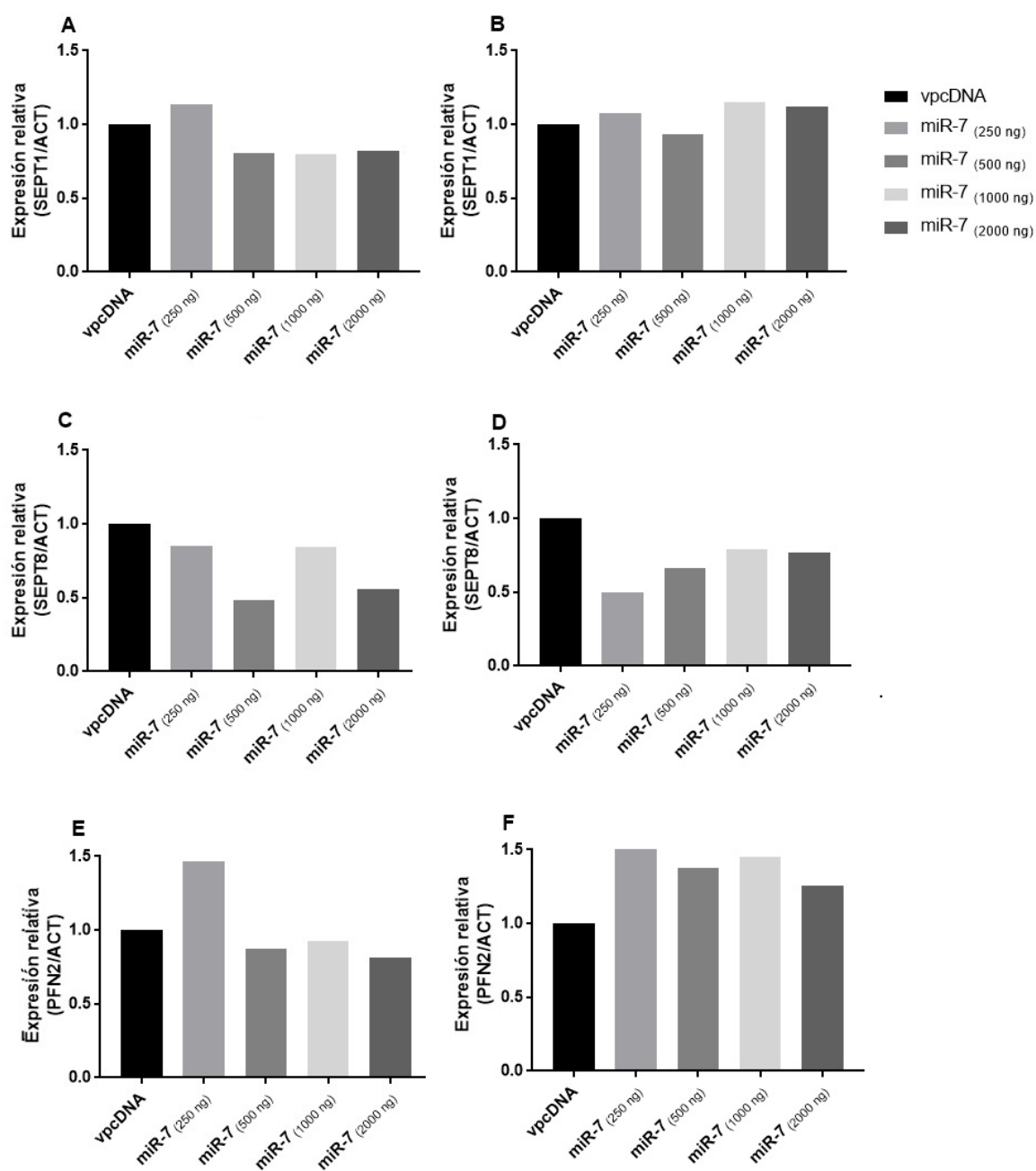


Fig S6. Efecto de la transfección de miR-7 en la traducción de las proteínas SEPT1, SEPT8 y PFN2 en células HEK-293 en 24 hrs (A, C, E) y 36hrs (B, D, F) A partir de la transfección de miR7 en concentraciones de 250ng, 500ng, 1000ng y 2000ng se hizo un Western-blot en tiempos diferentes del triplicado, disminuyendo en dos intervalos de 12 hrs cada uno es decir en 36hrs y 24 hrs. para monitorear el efecto del miRNA sobre la producción de proteína de SEPT1, SEPT8 y PFN2. Los valores fueron obtenidos a partir de la división del valor de densitometría experimental/ el valor de densitometría de actina normalizando a 1 el valor del vector vacío. Número de experimentos n=1. Ud: unidades densitométricas.

Figura suplementaria 7

• 24 horas

A

3' UTR Sept1	Ud
pcDNA	1.00
pc miR-7 [250ng]	1.13
pc miR-7 [500ng]	0.81
pc miR-7 [1000ng]	0.82
pc miR-7 [2000ng]	0.63

C

3' UTR Sept8	Ud
pcDNA	1.00
pc miR-7 [250ng]	0.85
pc miR-7 [500ng]	0.48
pc miR-7 [1000ng]	0.84
pc miR-7 [2000ng]	0.55

E

3' UTR Pfn2	Ud
pcDNA	1.00
pc miR-7 [250ng]	1.46
pc miR-7 [500ng]	0.87
pc miR-7 [1000ng]	0.93
pc miR-7 [2000ng]	0.81

• 36 horas

B

3' UTR Sept1	Ud
pcDNA	1.00
pc miR-7 [250ng]	1.07
pc miR-7 [500ng]	0.93
pc miR-7 [1000ng]	1.14
pc miR-7 [2000ng]	1.11

D

3' UTR Sept8	Ud
pcDNA	1.00
pc miR-7 [250ng]	1.02
pc miR-7 [500ng]	1.08
pc miR-7 [1000ng]	0.86
pc miR-7 [2000ng]	1.04

F

3' UTR Pfn2	Ud
pcDNA	1.00
pc miR-7 [250ng]	1.62
pc miR-7 [500ng]	1.38
pc miR-7 [1000ng]	1.45
pc miR-7 [2000ng]	1.25

Fig. S7 Densitometría de la transfección de miR-7 en la traducción de las proteínas SEPT1, SEPT8 y PFN2 en células HEK-293 en 24 hrs (A, C, E) y 36hrs (B, D, F). Tabla con los valores densitométricos del Western-blot de la transfección de miR-7 en células HEK-293, la tabla (A) y (B) corresponden a la SEPT1 de 24 y 36 hrs; la tabla (C) y (D) corresponden a SEPT8 de 24 y 36 hrs y la tabla (E) y (F) a PFN2 de 24 y 36 hrs.

