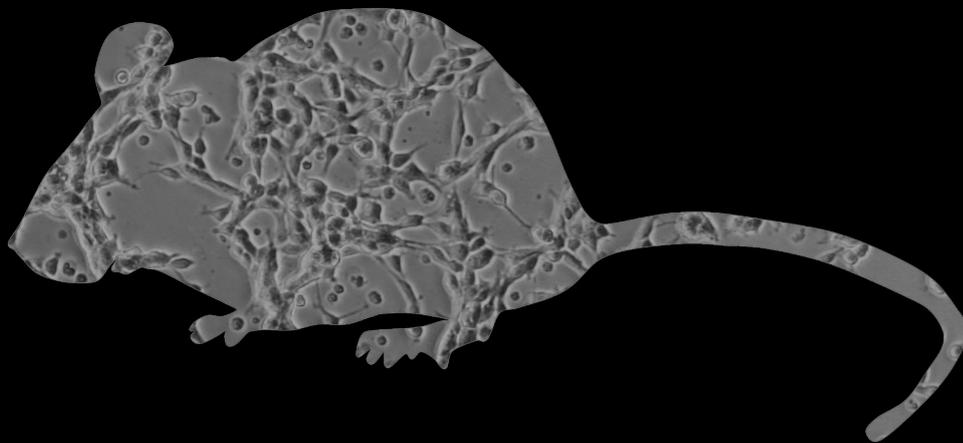


VNIVERSITAT Đ VALÈNCIA

Facultad de Ciencias Biológicas

Efectos del envejecimiento y el estrés oxidativo sobre la neurogénesis adulta en un modelo murino de senescencia acelerada



Raúl Soriano Cantón
2015



VNIVERSITAT E VALÈNCIA

Facultad de **C**iencias **B**iológicas

Departamento de Biología Celular y Parasitología

EFFECTOS DEL ENVEJECIMIENTO Y EL ESTRÉS
OXIDATIVO SOBRE LA NEUROGÉNESIS ADULTA EN
UN MODELO MURINO DE SENESCENCIA ACELERADA

Tesis doctoral presentada por D. Raúl Soriano Cantón
para optar al título de Doctor por la Universidad de Valencia

Dirigida por Dña. Isabel Fariñas Gómez
y D. Francisco Pérez Sánchez

Programa de doctorado: Neurociencias Básicas y Aplicadas

Valencia, 2015

Dña. **Isabel Fariñas Gómez**, Catedrática del Departamento de Biología Celular y Parasitología, de la Facultad de Biología de la Universidad de Valencia y D. **Francisco Pérez Sánchez**, Profesor Titular del Departamento de Biología Celular y Parasitología, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universitat de València

C E R T I F I C A N Q U E

D. **Raúl Soriano Cantón**, licenciado en Biología por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado **“Efectos del envejecimiento y el estrés oxidativo sobre la neurogénesis adulta en un modelo murino de senescencia acelerada”** para la obtención del grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Para que así conste, en cumplimiento de la legislación, firman el presente certificado en:

Burjassot a 29 de octubre del 2015

Dra. Isabel Fariñas Gómez

Dr. Francisco Pérez Sánchez

Durante la realización de esta tesis doctoral, el autor ha sido beneficiario de una beca predoctoral del Programa Nacional de Formación de Profesorado Universitario (FPU) concedida por el Ministerio de Educación (AP2008-02767) y un contrato de investigador no doctor de la Red de Terapia Celular del Instituto de Salud Carlos III concedido por el Ministerio de Economía y Competitividad (CPI-13-393).

La investigación se ha enmarcado dentro de los proyectos: “CIBER en Enfermedades Neurodegenerativas” (CIBERNED), CB06/05/0086, 2006-2016 y RETIC de Terapia Celular (TerCel), RD06/0010/0010 y RD12/0019/0008, 2006-2016 (ISCIII, MINECO); SAF2008-01006, 2008-2011 y SAF2011-13332, 2012-2014 (MINECO); PROMETEO2008/117, 2008-2012, ACOMP/2009/012, 2009 y ACOMP/2011/100, 2011 (Generalitat Valenciana).

Además, durante este trabajo se han establecido colaboraciones con los grupos de investigación del Dr. Ángel Ortega Valero (Departamento de Fisiología de la Universitat de València), de la Dra. Mercè Pallas (Departamento de Farmacología y Química Terapéutica; Universitat de Barcelona) y del Dr. Antonio Cuadrado Pastor (Departamento de Fisiopatología Endocrina y del Sistema Nervioso del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”-CSIC y Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UAM-CSIC, Madrid).

AGRADECIMIENTOS

Durante la elaboración de la presente tesis he tenido el placer de vivir, tanto a nivel profesional como en el aspecto personal, muchas experiencias enriquecedoras. Pese a lo complicado que resulta plasmar con palabras mi agradecimiento, por el apoyo recibido a lo largo de todos estos años, dedico esta tesis a todos los que, de uno u otro modo, han sido partícipes en su elaboración.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis, la Dra. Isabel Fariñas Gómez y el Dr. Francisco Pérez Sánchez, haberme permitido la realización de este trabajo de investigación en su grupo. Debo reconocer todo el tiempo y esfuerzo que han dedicado en mi formación y seguimiento, sin el cual no hubiera sido posible llevar a buen término este trabajo. Desde mi punto de vista, todavía más importante ha sido su transmisión de una manera de vivir la ciencia y de lo que realmente debe suponer una publicación, siempre lo tendré presente.

Es tal la cantidad de gente que he conocido y que en mayor o menor medida han influido en mi aptitud profesional que, seguramente, si intentara enumerarlos olvidaría poner alguno. Así que, aun a riesgo de parecer desagradecido, he decidido evitar nombrar específicamente a cada uno de los profesionales con los que he tenido la suerte de compartir mis dudas, preocupaciones y resultados. A todo aquel que lea este apartado pretendiendo encontrar su nombre, porque sabe que ha participado, de uno u otro modo, en la elaboración de esta tesis, le digo que tiene un sitio guardado en un lugar todavía más importante para mí, en mi recuerdo.

Aunque soy de la opinión de que uno debe discernir muy bien lo personal de lo profesional, he de reconocer que durante todo este tiempo en el laboratorio, además de excelentes compañeros de trabajo, he iniciado grandes amistades. A todos/as vosotros/as gracias por estar siempre ahí, por esos buenos momentos y por vuestro apoyo tanto dentro como fuera del laboratorio.

A todas esas amistades externas al laboratorio, con las que he compartido mis experiencias relacionadas con la ciencia y que han sufrido mis intentos de divulgación científica, muchas gracias por vuestro apoyo incondicional.

Gracias a mis padres y a mi hermano por inculcarme los valores de esfuerzo y tenacidad, por apoyarme en todo momento, incluso desde la distancia, y por permitirme cumplir lo que, desde mi realismo pesimista, sólo podía ser un sueño tras otro; sin duda a vosotros os debo todo lo que soy.

A mis padres,
Juan y Soledad

A mi hermano,
Toni

A mi "nicho",
Teruel

Y aprendí que estar quebrado
no es el infierno de Dante,
ni un currículum brillante,
la lámpara de Aladino,
cuando me hablan del destino
cambio de conversación.

(Joaquín Sabina)

SIGLAS / ACRÓNIMOS

8-OHdG	8-hidroxi-2'-desoxiguanosina	DMEM/F12	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium F12</i>
AA	ácido anacárdico	DMSO	dimetil sulfóxido
ABTS	2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato diamónico)	dsRNA	RNA de doble cadena
ACh	acetilcolina	dUTP	nucleótidos del tipo desoxiuridina
ac-H3	histona 3 acetilada en la lisina 9	ECM	matriz extracelular
ac-p53	p53 acetilado en la lisina 379	EGF	factor de crecimiento epidérmico
AD	enfermedad de Alzheimer	EGFr	receptor del factor de crecimiento epidérmico
AGT	angiotensinógeno	ESC	célula madre embrionaria
ANG	angiotensina	FACS	clasificación de células activadas por fluorescencia
Ara-C	citosina-β-D-arabinofuranósido	FerriIMB	ferrimioglobina
ARE	elemento de respuesta a antioxidantes	FGF2	factor de crecimiento de fibroblastos 2
ASC	célula madre adulta	G6PDH	glucosa-6P-deshidrogenasa
asf	fracción de área muestreada	GAPDH	gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
Aβ	β-amiloide	GCL	capa glomerular del bulbo olfatorio
BBB	barrera hematoencefálica	GCLC	subunidad catalítica de la glutamato-cisteína ligasa
BDNF	factor neurotrófico derivado del cerebro	GCLM	subunidad reguladora de la glutamato-cisteína ligasa
BIC	célula tipo B1 interpuesta	GDNF	factor neurotrófico derivado de la glía
BrdU	5-bromo-2'-desoxiuridina	GFAP	proteína ácida fibrilar glial
BSA	albúmina de suero bovino	GLAST	transportador de glutamato específico de astrocitos
CAT	catalasa	Gln	glutamina
CC	cuerpo caloso	Glu	glutamato
CDK	quinasa dependiente de ciclina	GPx	glutación peroxidasa
cDNA	DNA de cadena simple	GSH	glutación
ChAT	colinacetiltransferasa	GSR	glutación reductasa
CKI	inhibidor de quinasa dependiente de ciclina	GSSG	disulfuro de glutación o glutación oxidado
CNIO	Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas	H₂O	agua
CP	plexo coroideo	H₂O₂	peróxido de hidrógeno
CSF	líquido cefalorraquídeo	HAT	histona acetil transferasa
DAPI	4',6-diamino-2-fenolindol dihidrocloruro	HCNP	péptido neuroestimulante colinérgico
DCX	doblecortina		
DDR	respuesta a daño en el DNA		
DG	giro dentado del hipocampo		
DIV	días <i>in vitro</i>		

HDAC	histona desacetilasa	O₂⁻	anión superóxido
HEPES	ácido N-2-hidroxiethylpiperacina-N'-2'-etanesulfónico	OB	bulbo olfatorio
HGF	factor de crecimiento de hepatocitos	oIPC	precursor intermediario de oligodendrocito
HO-1	hemo oxigenasa	PB	tampón fosfato 0,1 M y pH 7,4
HPLC-MS/MS	cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas	PBS	tampón fosfato salino; tampón fosfato 0,1 M a pH 7,4 y NaCl 0,9 %
HRP	peroxidasa de rábano	PcG	proteínas del grupo Polycomb
ICQ	técnica inmunocitoquímica	PCR	reacción en cadena de la polimerasa
IGF1	factor de crecimiento insulínico tipo 1	PEDF	factor derivado del epitelio pigmentario
IHQ	técnica inmunohistoquímica	PEI	polietilenimina
iPSC	célula madre pluripotente inducida	PFA	paraformaldehído
i.p.	inyección intraperitoneal	PFTα	pifithrin-alpha
Kpi	tampón fosfato monopotásico	PGS	estructuras granulares positivas para ácido peryódico de Schiff
LB	medio Luria Bertani	Phe	fenilalanina
LRC	<i>Label Retaining Cells</i>	Plat-E	línea celular empaquetadora Platinum-E
LTP	potenciación a largo plazo	pp53	p53 fosforilado en la serina 18
LV	ventrículo lateral	PRC1	<i>polycomb repressive complex 1</i>
Lys	lisina	PRC2	<i>polycomb repressive complex 2</i>
MDA	malondialdehído	P-Tyr	tirosinas fosforiladas
MetaMB	metamioglobina	Q-PCR	PCR cuantitativas a tiempo real
MII1	<i>mixed lineage leukemia-1</i>	RAS	sistema renina-angiotensina
mRNA	RNA mensajero	RG	célula de la glía radial
NA	noradrenalina	RMS	camino migratorio rostral
Na₂SeO₃	selenito sódico	RNS	especies reactivas de nitrógeno
Na₃VO₄	ortovanadato sódico	ROS	especies reactivas de oxígeno
NaDoc	deoxicolato sódico	RT	temperatura ambiente
NaF	fluoruro sódico	RT-PCR	transcripción reversa unida a la amplificación del DNA obtenido mediante la técnica de PCR
ncRNA	RNA no codificante	SA β-gal	actividad β galactosidasa asociada a senescencia
nIPC	precursor intermediario de neurona	SAMP	ratón de senescencia acelerada propenso
NOX	NADPH oxidasa	SAMR	ratón de senescencia acelerada resistente
NP-40	nonilfenoxi polietoxietanol	SC	célula madre
Nqo1	NADPH quinona oxidoreductasa	SDS	dodecilsulfato sódico
NRF2	factor 2 asociado al factor nuclear eritroide 2	SE	subependimales
NSC	célula madre neural		
N-Tyr	tirosinas nitrosiladas		
O/N	durante toda una noche		
O₂	oxígeno		

SEM	error estándar de la media
SEZ	zona subependimaria
SGZ	zona subgranular
SHH	<i>Sonic Hedgehog</i>
shRNA	RNA de interferencia de horquilla corta
SNC	sistema nervioso central
SOD	superóxido dismutasa
ssf	fracción de secciones muestreadas
TAP	progenitor transitorio
TBA	ácido tiobarbitúrico
TBE	Tris-borato-EDTA; Tris (89 mM, pH 8,0), ácido bórico (89 mM), y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA; 2 mM)
TBS-T	Tris-HCl a 20 mM pH 7,6, NaCl 0,8 % y Tween-20 al 0,1 %
TdT	DNA transferasa terminal
TN-R	tenascina-R
TOR	<i>target of rapamycin</i>
TSA	tricostatina A
TUNEL	marcaje del extremo libre con
dUTP	mediante la DNA transferasa terminal
VEGF	factor de crecimiento endotelial vascular
VPA	ácido valpróico
VZ	zona ventricular
WM	<i>whole mount</i>
γH2AX	histona H2AX fosforilada en la serina 129

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
1.- Célula madre y concepto de nicho.....	3
2.- Neurogénesis adulta y células madre neurales	6
2.1.- La zona subependimaria y el bulbo olfatorio	10
2.2.- Origen embrionario de las células madre neurales	15
2.3.- Regulación de la neurogénesis adulta en la zona subependimaria	17
2.3.1.- La zona subependimaria como nicho de células madre neurales.....	17
2.3.2.- Regulación epigenética de las células madre neurales.....	20
2.3.3.- Reguladores del ciclo celular	22
2.4.- Ensayos <i>in vitro</i> de células madre neurales	25
3.- Envejecimiento y neurogénesis adulta	28
3.1.- Cambios en la zona subependimaria durante el envejecimiento	28
3.2.- Mecanismos asociados al envejecimiento en las células madre neurales.....	31
3.3.- Estrés oxidativo en el envejecimiento.....	37
4.- La cepa de ratones de senescencia acelerada (SAM)	40
4.1.- SAMP8, un modelo murino de desórdenes neurodegenerativos	42
4.2.- La neurogénesis adulta en la cepa SAMP8.....	46
OBJETIVOS	49
MATERIAL Y MÉTODOS.....	53
1.- Animales.....	55
1.1.- Cepas de ratones.....	55
1.2.- Genotipado de ratones.....	55
2.- Estudios <i>in vivo</i>	56
2.1.- Tratamientos <i>in vivo</i>	56
2.1.1.- Administración de 5-bromo-2'-desoxiuridina	56
2.1.2.- Administración de tricostatina A.....	57
2.2.- Técnicas histológicas	57
2.2.1.- Anestesia y perfusión.....	57
2.2.2.- Microtomía y seriado de cortes.....	57

2.2.3.- <i>Whole mount</i>	58
2.3.- Técnicas inmunohistoquímicas, histoquímicas y tinciones.....	58
2.3.1.- Inmunohistoquímica	58
2.3.2.- Técnica de marcaje del extremo libre con dUTP mediante la DNA transferasa terminal (TUNEL).....	59
2.3.3.- Técnica histoquímica para la detección de la actividad β galactosidasa asociada a senescencia.....	59
2.3.4.- Tinción con violeta de cresilo	59
2.4.- Microscopía electrónica de barrido	60
2.5.- Morfometría y recuentos celulares.....	60
3.- Estudio <i>in vitro</i> en cultivos de las células madre neurales	62
3.1.- Cultivos de las células madre neurales adultas de la zona subependimaria	62
3.2.- Expansión del cultivo de las células madre neurales	62
3.3.- Criopreservación de las células madre neurales	63
3.4.- Ensayo de formación de neuroesferas a baja densidad.....	63
3.5.- Ensayo de proliferación.....	63
3.6.- Tratamientos <i>in vitro</i>	64
3.7.- Técnicas inmunocitoquímicas	64
3.8.- Técnica citoquímica para la detección de la actividad β galactosidasa asociada a senescencia.....	65
3.9.- Medición de diámetros de las neuroesferas	65
4.- Análisis de expresión de RNA mensajeros.....	65
4.1.- Extracción de RNA y retrotranscripción	65
4.2.- Reacciones de PCR cuantitativas a tiempo real.....	66
5.- Inmunodetección de proteínas por Western-Blot.....	66
5.1.- Extracción proteínica.....	66
5.2.- Electroforesis y transferencia de proteínas.....	67
5.3.- Inmunodetección de proteínas.....	67
6.- Transducción celular	68
6.1.- Construcciones	68
6.2.- Transfección de construcciones sobre células productoras de retrovirus.....	68
6.3.- Transducción retroviral de las células madre neurales	69

7.- Ensayos de actividad del sistema de defensa antioxidante	69
7.1.- Actividad glutatión reductasa	69
7.2.- Actividad catalasa	70
7.3.- Actividad glucosa-6P-deshidrogenasa.....	70
7.4.- Actividad glutatión peroxidasa	70
7.5.- Determinación de los niveles de glutatión y disulfuro de glutatión	71
8.- Capacidad antioxidante total (TROLOX)	71
9.- Determinación de estrés oxidativo en proteínas.....	72
9.1.- Niveles de carbonilación proteínica	72
9.2.- Nitrosilación y fosforilación proteínica.....	72
10.- Niveles de malondialdehído	72
11.- Niveles de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina.....	73
12.- Análisis estadístico de los datos	73
Tabla 1: condiciones para PCR.....	74
Tabla 2: anticuerpos primarios	74
Tabla 3: anticuerpos secundarios	75
Tabla 4: tratamientos <i>in vitro</i>	75
Tabla 5: Sondas TaqMan para Q-PCR.....	76
RESULTADOS	77
1.- Caracterización de la zona subependimaria de la cepa SAMP8.....	79
1.1.- La zona subependimaria de los ratones SAMP8 posee un número elevado de células B1	81
1.2.- El aumento en la proliferación de las células madre neurales no conduce a una mayor neurogénesis	83
1.3.- La zona subependimaria presenta una citoarquitectura alterada.....	86
1.4.- La hiperproliferación de las células madre neurales está asociada a su posicionamiento anómalo.....	89
1.5.- La hiperproliferación conduce a un agotamiento del <i>pool</i> de células madre neurales.....	90

2.- Caracterización del cultivo de neuroesferas de la cepa SAMP8	94
2.1.- La hiperproliferación conduce al agotamiento de las células formadoras de esferas	94
3.- Análisis del estatus oxidativo de las neuroesferas de la cepa SAMP8	97
3.1.- NRF2 y las enzimas de fase II están sobreexpresadas	97
3.2.- Las actividades enzimáticas antioxidantes están alteradas	98
3.3.- La capacidad antioxidante total está disminuida	100
3.4.- La expresión NADPH oxidasa está incrementada.....	101
3.5.- La inhibición de la actividad NADPH oxidasa elimina la hiperproliferación.....	102
4.- Efectos del nivel de estrés, oxidativo y replicativo, en las neuroesferas de la cepa SAMP8	103
4.1.- El estrés oxidativo causa daño en macromoléculas	103
4.2.- La senescencia celular está mediada por p53.....	105
4.3.- La estabilización de p53 se debe a la activación de la respuesta a daño en el DNA	106
5.- Modulación epigenética de las células madre neurales de la zona subependimaria de la cepa SAMP8.....	108
5.1.- Los cultivos SAMP8 presentan niveles elevados de p19	108
5.2.- El incremento de los niveles de acetilación reproduce el fenotipo SAMP8 <i>in vitro</i> ..	108
5.3.- El incremento de los niveles de acetilación induce el posicionamiento anómalo de las células madre neurales en la zona subependimaria de la cepa SAMP8.....	110
5.4.- La inducción de senescencia mediante desregulación epigenética está mediada por la vía p19-p53.....	113
DISCUSIÓN.....	115
1.- Alteraciones de las poblaciones celulares de la zona subependimaria y su citoarquitectura	118
2.- Influencia del estatus oxidativo sobre la biología de las células madre neurales	123
3.- Mecanismos moleculares implicados en el comportamiento de las células madre neurales	127
CONCLUSIONES.....	133
BIBLIOGRAFÍA.....	137
ANEXO	165

INTRODUCCIÓN

1.- Célula madre y concepto de nicho

Toda célula madre (SC, del inglés *stem cell*) puede definirse básicamente como una célula indiferenciada, capaz de proliferar, que es capaz de automantenerse a la vez que da lugar a progenie diferenciada (Potten y Loeffler, 1990; Morrison y cols., 1997; Alison y cols., 2002; Alison y Islam, 2009). Esta definición se basa en los atributos funcionales que potencialmente posee y en ello radica la complejidad de su identificación. Por eso es interesante establecer una correcta descripción de dichas características. La *proliferación* consiste en un proceso con un patrón cíclico de cambios en la expresión génica que en última instancia dan lugar a la división de la célula. Otra característica es la *diferenciación*, que se define como un cambio cualitativo en el fenotipo celular como consecuencia de la síntesis de nuevos productos génicos. Por ello una misma célula puede verse sometida a varios eventos de diferenciación y solamente se puede indicar que está diferenciada cuando la comparamos con otra. Por el contrario, el concepto de *maduración* se puede considerar un cambio cualitativo que da lugar a una competencia funcional. La capacidad de *automantenerse* o también denominada de auto-renovación, es la que permite a las células madre de los tejidos adultos sustentar la renovación celular de los mismos a lo largo de toda la vida. Esta propiedad se basa en el potencial de las SC para generar al menos una célula con las mismas características cuando se divide. A nivel individual una SC que sufra una división simétrica generando dos células diferenciadas no satisface este requisito. Pero cuando se observa una población de SC, el conjunto de divisiones contribuye al automantenimiento de esta (Potten y Loeffler, 1990; Smith, 2006).

Una SC se puede catalogar en función del potencial que posee para generar, directa o indirectamente, determinada variedad de tipos celulares. El cigoto y las células generadas por este en las dos primeras divisiones, estadio de cuatro células, son *totipotentes*. Es decir, tienen capacidad para generar tanto los tejidos embrionarios como extraembrionarios (trofoblasto) necesarios para la formación del organismo completo (Alison y cols., 2002; Alison y Islam, 2009). Durante los estadios iniciales del desarrollo, el cigoto se divide dando lugar a la masa celular interna de la blástula, compuesta por las células madre embrionarias (ESC, del inglés *embryonic stem cells*) *pluripotentes*, con capacidad para generar todos los linajes celulares que formarán el organismo a partir de las tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo), pero no el trofoblasto (Thomson y cols., 1998; Odorico y cols., 2001). En la progresión del desarrollo embrionario las ESC van restringiendo su potencial, desde las que pueden dar lugar a todos los linajes que conforman un tejido concreto (*multipotentes*) hasta las que pueden generar uno o varios linajes pertenecientes a un tejido (*unipotentes* u *oligopotentes*) (Smith, 2006). La mayoría de tejidos adultos, tanto de la línea somática como de la germinal, mantienen un pequeño porcentaje de células madre *unipotentes* u *oligopotentes* (Alison y Islam, 2009). Existe una extensa lista de tejidos adultos en los que se ha descrito la presencia de SC adultas (ASC, del inglés *adult stem cells*): médula ósea, sangre circulante, cerebro, médula espinal, pulpa dental, vasos sanguíneos, músculo esquelético, epitelios de la piel y sistema digestivo, córnea, retina,

hígado, páncreas, folículos pilosos, glándulas mamarias, pulmón, riñón, útero, tubos seminíferos, etc. (Weissman, 2000b; Alison y Islam, 2009). En los últimos años se ha abierto una nueva línea de investigación con la generación de las células madre pluripotentes inducidas (iPSC, del inglés *induced pluripotent stem cells*). Mediante la transducción retroviral de cuatro factores de transcripción, cuya expresión es propia de las ESC, se consigue que cultivos de células somáticas maduras adquieran la pluripotencia propia de las ESC. La generación de iPSC sin la modificación del contenido genético y su posterior diferenciación dirigida podría permitir en un futuro su aplicación en terapia celular individualizada, evitando el rechazo inmunológico y el debate ético subyacente al uso de ESC (Takahashi y Yamanaka, 2006; Okita y cols., 2007; Takahashi y cols., 2007) (figura 1).

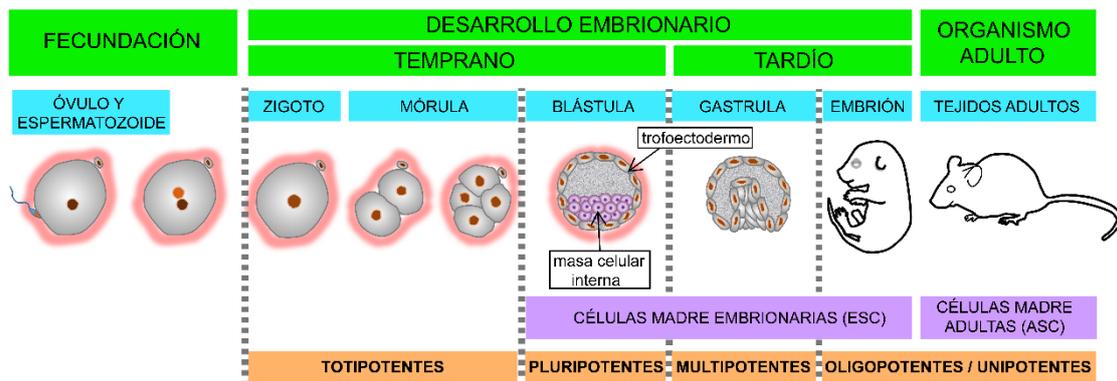


Figura 1. Las células madre a lo largo del desarrollo. Representación de los sucesivos estadios de desarrollo en animales, indicando el potencial de las diferentes poblaciones de células madre. En la progresión del desarrollo embrionario las células madre embrionarias (ESC) van restringiendo su potencial. El cigoto y las células de la mórula (hasta estadio de 4 células) son totipotentes, pudiendo formar un organismo completo. Las células de la masa celular interna de la blástula son pluripotentes; es decir, son capaces de generar todos los tejidos embrionarios. Más tarde, el potencial de ESC se limita a la generación de todos los linajes (multipotentes) o uno o varios linajes (unipotentes u oligopotentes) de un tejido. La mayoría de tejidos adultos mantienen poblaciones de células madre (ASC), con capacidad unipotente u oligopotente.

Generalmente las SC, sobre todo en los tejidos adultos con baja tasa de renovación en condiciones normales, presentan una quiescencia relativa con ciclos celulares largos y por lo tanto con una división lenta o incluso ocasional. En la mayoría de poblaciones de células madre, estas dan lugar a progenitores transitorios de división rápida (TAP, del inglés *transit amplifying precursors*) que se dividen unas pocas veces para finalmente diferenciarse en tipos celulares específicos (Díaz-Flores y cols., 2006). Todo ello permite una amplificación en la respuesta de generación de nuevas células y evita el desgaste replicativo de las SC (Potten y Loeffler, 1990).

El comportamiento de una SC viene determinado por el entorno en el que se encuentra, al cual denominamos nicho. Definimos este microambiente como el conjunto de componentes celulares y no celulares que interactúan con una población de SC dándole soporte físico y modulando su actividad, entendida esta como el balance entre proliferación y automantenimiento (Schofield, 1978; Spradling y cols., 2001; Fuchs y cols., 2004; Walker y cols., 2009; Rezza y cols., 2014). Las interacciones del nicho con las SC pueden producirse a través de contacto físico o por medio de factores difusibles. Las primeras comprenden tanto interacciones directas con

células del propio nicho como con moléculas de la matriz extracelular (ECM, del inglés *extracellular matrix*), mientras que las señales difusibles pueden ser de tipo autocrino, paracrino e incluso endocrino en función de la distancia de las fuentes que las generan. Asimismo la invasión y los metabolitos presentes en la zona también juegan un papel importante como factor de nicho (Scadden, 2006). Actualmente se ha propuesto que el nicho regula tanto a las SC como a los TAP (Walker y cols., 2009). Con el objetivo de garantizar el apropiado control en la respuesta de las SC, los programas genéticos intrínsecos de las SC están supeditados a la regulación ambiental por los factores de nicho (Li y Xie, 2005; Morrison y Kimble, 2006). Un desequilibrio en el balance entre proliferación y quiescencia o entre automantenimiento y diferenciación podría tener consecuencias negativas para el organismo, como la formación de tumores o la degeneración del órgano (Morrison y Kimble, 2006; Scadden, 2006).

La relevancia biológica de las SC se sustenta en su papel fundamental en la formación de los tejidos durante el desarrollo embrionario así como en la homeostasis tisular en el adulto. Esta última mediante la reposición celular tras la muerte celular normal (apoptosis) y la regeneración tisular, con limitaciones, tras lesión o enfermedad (Li y Xie, 2005). Estudios concretos han demostrado que ciertas células diferenciadas, derivadas de ASC, son completamente funcionales. Y unos pocos han confirmado que estas se integran en el tejido e interactúan correctamente con su entorno celular. Si bien es cierto que algunos tejidos poseen capacidad regenerativa únicamente en algunas etapas del desarrollo ontogénico, la ausencia de regeneración no siempre implica la inexistencia de SC, sino que puede deberse a la incapacidad del tejido dañado para promover la proliferación de estas o la diferenciación o integración de la progenie (Morrison y cols., 1997).

Debido al potencial terapéutico que ostentan, las ASC son actualmente uno de los campos de estudio principales de la biología. Una mejor caracterización de las poblaciones de ASC, de los mecanismos asociados a su regulación y de sus factores de nicho, así como el descubrimiento de nuevas poblaciones y factores, permitirá su uso extensivo en medicina regenerativa (Walker y cols., 2009). El conocimiento profundo de alguna de estas poblaciones, como por ejemplo la perteneciente a la epidermis, ya permite actualmente la generación de cultivos de piel para trasplantes autólogos. Además, las similitudes entre los diferentes nichos benefician el avance simultáneo del conocimiento en las diversas poblaciones (Reya y cols., 2001; Walker y cols., 2009). Por otra parte, se plantea la hipótesis de que una alteración del nicho que incremente las divisiones simétricas de las SC, generando dos SC en cada división, conlleva un mayor estrés replicativo y por lo tanto incrementa las posibilidades de aparición de cáncer. Esta hipótesis se basa en la evidencia del origen frecuente de cáncer a partir de ASC somáticas. Además, si el crecimiento y progresión de un tumor está dirigido por las denominadas SC cancerosas, este será dependiente del modo de división. Por ello también es interesante el estudio de los mecanismos que determinan el modo de división de las ASC, en la búsqueda de nuevos mecanismos en la supresión de tumores (Weissman, 2000a; Reya y cols., 2001; Morrison y Kimble, 2006).

2.- Neurogénesis adulta y células madre neurales

A finales del siglo XIX Santiago Ramón y Cajal desarrolló la teoría celular en el sistema nervioso, según la cual este se compone de células discretas. En cuanto a la capacidad regenerativa de los centros nerviosos, Cajal la restringió a la extensión de nuevas fibras a partir de los axones principales de las neuronas ya formadas y concluyó que los tractos principales eran incapaces de regenerarse a gran escala, atribuyéndolo a la ausencia en el ambiente del cerebro adulto de nutrientes y señales de dirección para los conos de crecimiento. Entre sus postulados se encontraba, también, la incapacidad de las neuronas para multiplicarse (Ramón y Cajal, 1928; ver revisión Lobato, 2008). Este dogma se mantuvo hasta pasada la segunda mitad del siglo XX. Uno de los motivos por los que se despreció la posibilidad de división neuronal es la complejidad estructural prevalente en las neuronas. Otra razón, de índole conceptual, surgió con la analogía del funcionamiento del cerebro con los ordenadores en los años 50, siendo irrazonable la adición de nuevos componentes durante su funcionamiento (Gage, 2002).

La teoría Hebbiana (Hebb, 1949; ver revisión Morris, 1999) postulaba que la plasticidad o adaptabilidad sináptica podía ser llevada a cabo por el “fortalecimiento de sinapsis” sin necesidad de reorganización estructural. Esta teoría permitió un cambio de concepción en cuanto a la inmutabilidad del sistema nervioso y en consecuencia surgieron múltiples ejemplos de reorganización sináptica y elongación de axones (Gage, 2002). Joseph Altman describió la primera evidencia de nuevas neuronas y glía en mamíferos adultos, en regiones asociadas a traumas, mediante técnica autorradiográfica tras la incorporación de timidina tritiada (H3) (Altman, 1962). Posteriormente demostró la existencia de neurogénesis adulta en el giro dentado del hipocampo (DG, del inglés *dentate gyrus*) (Altman, 1963; Altman y Das, 1965). Más tarde, describió la generación de nuevas neuronas granulares en el bulbo olfatorio (OB, del inglés *olfactory bulb*) en mamíferos adultos (Altman, 1969) a partir de las paredes de los ventrículos laterales (LV, del inglés *lateral ventricles*), que denominó camino migratorio rostral (RMS, del inglés *rostral migratory stream*). Debido a la ausencia de relevancia funcional, estos trabajos tuvieron escasa repercusión. La integración y supervivencia tras largos periodos de tiempo de las nuevas neuronas generadas fue demostrada por primera vez en ratas adultas (Kaplan y Hinds, 1977). En la década siguiente se demostró la neurogénesis adulta en aves. Los canarios adultos sustituían masivamente neuronas en los núcleos telencefálicos del canto cada año, durante la estación del cortejo (Goldman y Nottebohm, 1983; Paton y Nottebohm, 1984; Nottebohm, 1985). La neurogénesis adulta también fue descrita en poiquiloterms, tanto reptiles como peces. Mientras que en mamíferos se encontraba limitada a unas pocas regiones del cerebro, en el resto de vertebrados las nuevas neuronas eran generadas de forma continua en múltiples regiones del sistema nervioso central (SNC) (Zupanc, 2001; Garcia-Verdugo y cols., 2002). A pesar de las demostraciones anteriormente citadas, la comunidad científica, en una actitud antropocéntrica, fue de forma generalizada reticente a aceptar la neurogénesis en mamíferos adultos o crearla restringida a los mamíferos no primates (Rakic, 1974; Rakic, 1985).

Fue a partir de mediados de los 90 cuando la introducción de nuevas técnicas de marcaje junto con nuevos métodos de visualización, como la microscopía confocal, permitió el surgimiento de indicios robustos y en consecuencia la amplia aceptación del proceso de incorporación continuada de nuevas neuronas en el cerebro adulto. Una de ellas fue la 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU, *5-bromo-2'-deoxyuridine*), un análogo sintético de la timidina, que del mismo modo que los nucleósidos naturales, se incorpora al DNA de las células durante la fase de síntesis o fase S del ciclo celular (Gratzner, 1982). El uso de BrdU junto con la aparición de marcadores de proteínas específicas de neuronas (por ejemplo NeuN) permitió, mediante técnicas inmunohistoquímicas (IHQ), identificar las nuevas neuronas generadas (Kuhn y cols., 1996; Aimone y cols., 2014). Por otra parte, la técnica de marcaje genético mediante retrovirus, que permiten incorporar genes reporteros al genoma de las células proliferantes que infectan, hizo posible el seguimiento de la progenie de células progenitoras de regiones concretas (Walsh y Cepko, 1988; Luskin, 1993; Doetsch y cols., 1999a; van Praag y cols., 2002). Esto demostró la incorporación de nuevas neuronas durante toda la vida adulta de roedores, tanto en el giro dentado (DG) como en el OB a partir de la zona subependimaria (SEZ, del inglés *subependymal zone*) (figura 2). La incorporación de nuevas neuronas no era en una ratio reducida y constante, indicando que no se trataba de un excedente del desarrollo, sino que estaba fuertemente regulada por factores ambientales y comportamentales como estrés, edad, ejercicio y enriquecimiento ambiental (Aimone y cols., 2014). Con estas técnicas se confirmó la existencia de neurogénesis adulta continuada en casi todos los mamíferos examinados. Se demostró en humanos incluso de edad avanzada, indicando el potencial clínico de este fenómeno (Eriksson y cols., 1998). Coetáneamente, múltiples trabajos indicaron la existencia de poblaciones de SC neurales (NSC, del inglés *neural stem cells*) en el cerebro de roedores adultos, con capacidad para renovarse y dar lugar a células de los tres linajes neurales (neuronas, astrocitos y oligodendrocitos) *in vitro* y su ubicación localizada en dos nichos neurogénicos: la zona subependimaria (SEZ, del inglés *subependymal zone*), también denominada zona ventricular-subventricular (V-SVZ, del inglés *ventricular-subventricular zone*) en la pared de los ventrículos laterales donde se producen las nuevas neuronas del OB y la zona subgranular (SGZ, del inglés *subgranular zone*) donde se generan las nuevas neuronas del DG (Reynolds y Weiss, 1992; Richards y cols., 1992; Gage y cols., 1995; Palmer y cols., 1997). Dichos estudios superaron el problema mecánico propuesto para el proceso de neurogénesis, que postulaba la dificultad de división de las neuronas maduras debido a su complejidad estructural. Demostraron que las nuevas neuronas se podían generar, tal y como sucede durante el desarrollo, a partir de células indiferenciadas. Consecuentemente se consideró innecesaria la división de una neurona compleja durante el proceso de neurogénesis (Gage, 2002). Más tarde se demostró, mediante estudios *in vivo*, la naturaleza astrogliar de estas NSC (Doetsch y cols., 1999a; Seri y cols., 2001 ver revisión Alvarez-Buylla y cols., 2002).

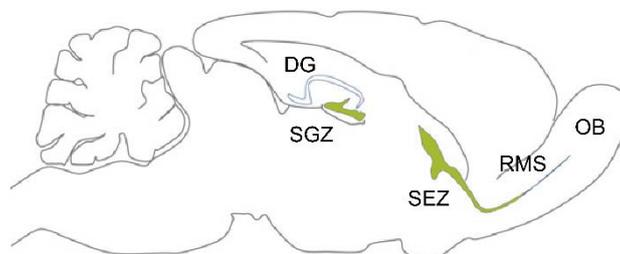


Figura 2. Nichos neurogénicos del cerebro de mamíferos adultos. Sección sagital de cerebro de ratón adulto, con las dos áreas que presentan neurogénesis indicadas en color verde. La región con mayor actividad neurogénica es la zona subependimaria (SEZ), a partir de la cual los neuroblastos generados (células A) migran a través del camino migratorio rostral (RMS) hasta los bulbos olfatorios (OB). La otra región neurogénica en mamíferos adultos es la zona subgranular (SGZ) del giro dentado del hipocampo (DG). Modificado de Nguyen y Hippenmeyer, 2014.

Actualmente se acepta de forma generalizada la neurogénesis en mamíferos adultos, tanto en la SEZ como en el DG (Ming y Song, 2011; Aimone y cols., 2014; Lim y Alvarez-Buylla, 2014). También existen muestras de neurogénesis adulta en otras áreas del SNC, entre las cuales se encuentra el propio OB (Fukushima y cols., 2002), corteza (Gould y cols., 1999; Gould, 2007; Cameron y Dayer, 2008), estriado, amígdala, sustancia negra (Zhao y cols., 2003), hipotálamo (Kokoeva y cols., 2005) y zona subcallosa (genera neuronas y oligodendrocitos) (Seri y cols., 2006), pero los trabajos tanto a favor como en contra de la existencia del fenómeno en estas otras zonas mantienen la controversia. En estas zonas ha sido difícil replicar de forma reiterada los indicios de neurogénesis (Aimone y cols., 2014). Las discrepancias entre los diversos estudios pueden ser debidas a las variaciones en la sensibilidad de los métodos utilizados, que en el caso de niveles reducidos de neurogénesis pueden comprometer las conclusiones finales. También las manipulaciones experimentales del modelo animal (modelos de isquemia, infusión de factores de crecimiento, introducción de retrovirus, manipulaciones farmacológicas, etc.) y el procesado de las muestras (desenmascaramiento de antígenos, congelación del tejido, etc.) pueden inducir daño y/o neurogénesis, alterando los resultados y conclusiones (Gould, 2007). Por definición se consideran neurogénicas aquellas regiones del cerebro que producen o reciben nuevas neuronas bajo condiciones normales, en ausencia de daño. Los estudios que han mostrado neurogénesis en estas áreas, en ausencia de daño u otras manipulaciones experimentales, han sido con una baja cantidad de neuronas en comparación con la vía SEZ-OB y la SGZ. No obstante, pese al reducido número de nuevas neuronas incorporadas, cabe la posibilidad de un papel funcional de estas (Shadlen y cols., 1996; Brecht y cols., 2004).

En humanos, la neurogénesis adulta en el hipocampo fue inicialmente confirmada, mediante los estudios de marcaje con BrdU, a partir de muestras de pacientes con cáncer (Eriksson y cols., 1998). Trabajos posteriores con marcadores histológicos, cuestionaron la relevancia funcional de esta neurogénesis basándose en la reducida extensión observada (Seress y cols., 2001; Seress, 2007). Recientemente, una técnica basada en los niveles de ^{14}C en el DNA, producidos por los ensayos de armamento nuclear del siglo XX, ha permitido confirmar la neurogénesis hipocampal humana y estimar las dinámicas de generación de nuevas neuronas (Spalding y cols., 2005; Kempermann, 2013; Spalding y cols., 2013). Estos estudios han concluido que la cantidad de nuevas neuronas generadas es superior respecto a los ratones, con una elevada tasa de renovación neuronal en el DG y, por el contrario que en roedores, con una caída neta del número de neuronas con la edad (Spalding y cols., 2013). La contribución de la neurogénesis adulta a la función hipocampal, demostrada en ratones mediante multitud de ensayos, sigue sin esclarecerse en humanos. Aunque no se ha podido demostrar, diversos indicios sugieren su contribución (Spalding y cols., 2013; Aimone y cols., 2014). La mayoría de estudios muestran la existencia de neurogénesis en la SEZ de humanos adultos, pero pese a su papel prominente durante el desarrollo postnatal, las evidencias indican una disminución drástica hasta un estado mayoritariamente inactivo (Sanai y cols., 2004; Quinones-Hinojosa y cols., 2006; Curtis y cols., 2007; Sanai y cols., 2011; Wang y cols., 2011; Ernst y cols., 2014). A pesar de la observación de neuroblastos en la SEZ humana adulta, los trabajos indican que la llegada de estos al OB a través del RMS es inexistente o muy limitada, al contrario de lo que sucede en el resto de mamíferos (Sanai y cols., 2004; Bergmann y cols., 2012; Ernst y cols., 2014; Wang y cols., 2014). No obstante, el trabajo de Curtis y colaboradores en 2007 demuestra la existencia de un RMS organizado y con presencia de neuroblastos, por lo que se mantiene el debate al respecto (Curtis y cols., 2007). Recientes evidencias sugieren destinos alternativos al OB para los neuroblastos generados en la SEZ, como el córtex prefrontal durante el desarrollo postnatal (Sanai y cols., 2011). Otro trabajo, basado en el marcaje con ^{14}C , muestra evidencias de la generación de interneuronas estriatales a partir de la SEZ durante toda la etapa adulta (Ernst y cols., 2014). Sin embargo, un artículo coetáneo plantea como destino principal de los pocos neuroblastos generados, en la SEZ adulta, el OB. Es por ello que la reivindicación de la neurogénesis estriatal en el humano adulto sigue siendo controvertida (Wang y cols., 2014). En el pasado se negó la existencia de neurogénesis en el cerebro de mamíferos adultos y, una vez asumida esta, pasó tiempo hasta que se aceptó su existencia en primates. Por ello debemos tener la mente abierta a la posibilidad de un cerebro “más neurogénico”. Solamente la aparición de nuevas técnicas, más sensibles y replicables, permitirá nuevos hallazgos y conclusiones (Gould, 2007). Pese a que en humanos se cree ausente o muy limitado el proceso de migración e incorporación de nuevas neuronas al OB, el estudio de la población de NSC presente en la SEZ puede aportar conocimientos relevantes en cuanto al funcionamiento de este tipo celular y su aplicación terapéutica.

2.1.- La zona subependimaria y el bulbo olfatorio

La región del cerebro de mamíferos adultos en la que se observa mayor actividad neurogénica es la SEZ. Se trata de una fina región en la pared de los LV de células en división (Alvarez-Buylla y Garcia-Verdugo, 2002). La citoarquitectura de la SEZ ha sido caracterizada con detalle mediante el uso de IHQ y microscopía electrónica. Preparaciones *whole mount* (WM) de las paredes laterales de los ventrículos han permitido visualizar características clave de la organización del nicho neurogénico (Doetsch y Alvarez-Buylla, 1996; Mirzadeh y cols., 2008; Mirzadeh y cols., 2010). Mediante criterios morfológicos, ultraestructurales y moleculares se ha establecido la existencia de cuatro tipos celulares principales en la SEZ. Además, mediante experimentos de trazado de linaje y de regeneración se han establecido las relaciones funcionales entre ellos (Doetsch y cols., 1997; Doetsch y cols., 1999a; Mirzadeh y cols., 2008; Chojnacki y cols., 2009). Las NSC, también denominadas células B1, dan lugar a progenitores intermedios (células tipo C) que se dividen varias veces de forma rápida antes de diferenciarse en neuroblastos (células tipo A), que migran hacia el OB, u oligodendroblastos, que se dirigen al cuerpo calloso (CC) (Menn y cols., 2006). A continuación se describen en detalle los principales tipos celulares que se observan en la SEZ (figura 3).

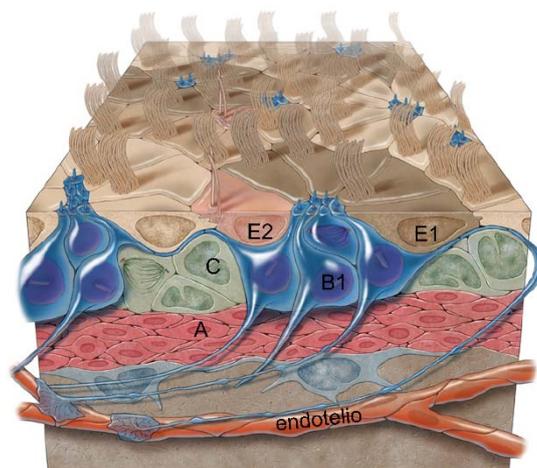


Figura 3. El nicho neurogénico de la zona subependimaria adulta. Modelo tridimensional de la zona subependimaria (SEZ) adulta ilustrando las células B1 (azul), células tipo C o TAP (verde) y células tipo A o neuroblastos (rojo). Obsérvense los procesos basales de las células B1 contactando con los vasos sanguíneos (naranja) y sus extremos apicales en la superficie ventricular. Las células endodermiales tipo E1 (marrón claro y oscuro) y E2 (color melocotón) confieren la organización en *pinwheels* alrededor de las superficies apicales de las células B1. Modificado de Mirzadeh y cols., 2008.

Las *células endimarias o tipo E* se disponen en una monocapa que delimita la SEZ de la cavidad ventricular, organizadas en los denominados *pinwheels*. Estas poseen unos procesos laterales altamente interdigitados y complejos de uniones estrechas y adherentes entre sí. La superficie apical, que contacta con la cavidad ventricular, contiene microvellosidades y cilios largos que hacen circular el líquido cefalorraquídeo (CSF, del inglés *cerebrospinal fluid*). Poseen núcleo esférico y cromatina dispersa y expresan los marcadores moleculares CD24, vimentina y S100 β . Entre ellas se distinguen dos tipos: las células endimarias multiciliadas (tipo E1) con al menos 50 cilios y las biciliadas (tipo E2) que representan solamente el 5 % del total (Mirzadeh y cols., 2008; Kriegstein y Alvarez-Buylla, 2009). Las mitocondrias son abundantes, localizándose bajo los cuerpos basales en las primeras y alrededor del núcleo en las segundas. Las E2 se distinguen de las E1 por su característico cuerpo basal de gran tamaño y por sus cilios parcialmente invaginados. Debido a estas características se ha planteado el posible papel de las E2 en señalización, como sensores mecánicos o químicos del CSF (Mirzadeh y cols., 2008).

Las *células B1* poseen una morfología altamente polarizada, con una pequeña superficie apical que posee un cilio corto no móvil en contacto con el ventrículo. En algunos casos, parte del soma celular se encuentra comprimido entre las células endimarias, haciendo contacto directo con el ventrículo. Se caracterizan por su largo proceso basal que, en la mayoría, contacta mediante una estructura especializada denominada *pie vascular*, con un vaso sanguíneo. Estos procesos basales, antes de contactar con los vasos sanguíneos, envuelven las cadenas de neuroblastos migradores formando los denominados gliotubos. También poseen extensiones lamelares de membrana laterales, a partir del cuerpo celular, que contactan con las zonas basales de las células endimarias adyacentes. Además, se observan pequeños procesos procedentes del cuerpo celular y de la zona proximal del largo proceso basal. Las células B1 se caracterizan por la expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, del inglés *glial fibrillary acidic protein*), vimentina, transportador de glutamato específico de astrocitos (GLAST, del inglés *astrocyte-specific glutamate transporter*), SOX2 y CD133 y la ausencia de expresión de los marcadores moleculares S100 β y CD24 (Mirzadeh y cols., 2008). Estos astrocitos son relativamente quiescentes y desempeñan el papel de NSC en la SEZ (Morshead y cols., 1994; Doetsch y cols., 1999a). Se encuentran agrupados en número variable, entre 1 y 9, y rodeados por células endimarias. La presencia de los extremos apicales de las B1 influye sobre la geometría de las endimarias y en consecuencia confiere una arquitectura característica en la pared ventricular de las regiones neurogénicas, cuyas unidades se denominan *pinwheels*. Las B1 suponen casi un tercio de las células que contactan con el ventrículo aunque debido a su reducida superficie apical, en comparación con las E, aparentan ser una mínima proporción. Uniones estrechas y adherentes consolidan el ensamblaje entre las B1 y de estas con las E, siendo las uniones adherentes B1-E asimétricas. Por debajo de los procesos basales de las B1 se localiza una capa de astrocitos dispersos de morfología multipolar denominados B2. Estas células, con la morfología típica astrocitaria, también se localizan en las zonas no neurogénicas (Doetsch y cols., 1997).

Los *progenitores intermedios (tipo C)* son de tamaño similar a las B1 pero, al contrario que estas, carecen de ramificaciones de filamentos intermedios y en consecuencia poseen una morfología esférica. En su citoplasma se observa un extenso aparato de Golgi. Su núcleo posee invaginaciones y la cromatina muestra condensación heterogénea. Los marcadores moleculares que los caracterizan son Dlx2, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFr, del inglés *epidermal growth factor receptor*), Mash1 y nestina (Doetsch y cols., 2002b; Parras y cols., 2004). Las células C se encuentran agrupadas entre sí y se localizan yuxtapuestas a las cadenas de neuroblastos (tipo A) y en contacto con células B1 y vasos sanguíneos. En ocasiones forman uniones especializadas con las células A (Doetsch y cols., 1997). Las células C son las de mayor capacidad proliferativa en la SEZ y suponen el 10 % de las células de la zona. Poseen una limitada capacidad de auto-renovación, dividiéndose simétricamente unas 3 veces para dar lugar tanto a neuroblastos migradores (tipo A) como a oligodendroblastos. Se desconoce si una misma célula puede producir ambos tipos o cada célula C tiene determinado el linaje que va a generar (Chojnacki y cols., 2009).

Los *neuroblastos (tipo A)* se caracterizan principalmente por su forma elongada con uno o dos procesos (unipolar o bipolar) y por poseer microtúbulos orientados a lo largo de su eje principal. Tienen abundante cromatina laxa con entre 2 y 4 nucléolos pequeños. También se caracterizan por su reducido citoplasma con muchos ribosomas libres y por un retículo endoplasmático rugoso y un aparato de Golgi pequeños. Se estima que se generan unos 30000 neuroblastos diarios. Los marcadores moleculares que los definen son NCAM, el marcador neuronal temprano TUJ1 (β III-tubulina) y Doblecortina (DCX, *doublecortin*). Distribuidos a lo largo de su superficie tienen pequeños complejos de unión que unen entre sí células semejantes. Se piensa que estas uniones están en continua modificación, permitiendo su avance en ausencia de glía radial (Doetsch y Alvarez-Buylla, 1996; Doetsch y cols., 1997). Los neuroblastos migran tangencialmente, mientras se dividen una o dos veces, hasta llegar al OB. Para ello, se agregan formando cadenas a lo largo del eje rostro-caudal. Estas cadenas se encuentran envueltas por las prolongaciones basales de las B1 o también llamados gliotubos, trazando el denominado RMS. Aunque la presencia de las B1 no es esencial para la migración de los neuroblastos (Wichterle y cols., 1997), los factores que secretan regulan la migración de estos (Mason y cols., 2001). Una vez en el OB se desplazan radialmente y se diferencian en interneuronas maduras y funcionales integradas en las capas glomerular (GCL, del inglés *glomerular cell layer*), granular y plexiforme externa (Whitman y Greer, 2007; Yang, 2008).

Mediante la eliminación de todos los precursores inmaduros (tipo C) y de los neuroblastos migradores (tipo A) de la SEZ, con el uso del antimetabólico citosina- β -D-arabinofuranósido (Ara-C), se observó la regeneración de la SEZ. Primero reaparecían las tipo C y seguidamente los A, regenerando la zona y mostrando una inesperada plasticidad (Doetsch y cols., 1999b) (figura 4).

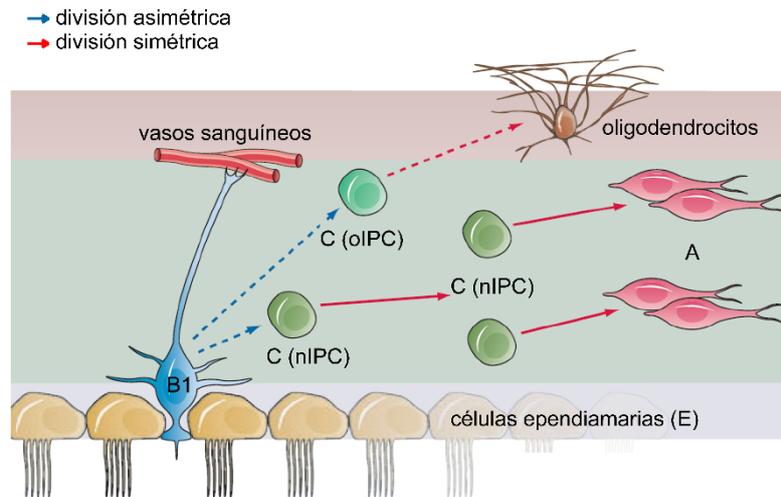


Figura 4. Tipos celulares y linajes en la zona subependimaria adulta. Representación esquemática de la zona subependimaria (SEZ) adulta con los linajes celulares presentes en esta. Las células tipo B1 dan lugar a las células C, que actúan como progenitores intermediarios de neuronas (nIPC) y de oligodendrocitos (oIPC). Los nIPC dan lugar a los neuroblastos (células A) que tras migrar al OB generan las neuronas. Los oIPC migran hasta el cuerpo calloso (CC) dando lugar a los oligodendrocitos. Modificado de Kriegstein y Alvarez-Buylla, 2009.

La migración de los neuroblastos a través del RMS se basa en la combinación e interacción de una extensa variedad de factores extracelulares que les confieren actividades de quimiorepulsión, quimioatracción y motogénicas. Mediante el uso de ensayos *in vitro* de migración, utilizando explantes de RMS de modelos murinos, han sido identificados multitud de reguladores de la migración de los neuroblastos. Entre ellos se incluyen moléculas de adhesión celular, moléculas de ECM, moléculas específicas de guía axonal, factores de crecimiento y neurotransmisores (Lledo y Saghatelian, 2005; Lledo y cols., 2006; Nguyen y Hippenmeyer, 2014). Entre las moléculas de adhesión destaca PSA-NCAM que es imprescindible para la correcta organización de las cadenas de neuroblastos. También se ha demostrado la intervención en este proceso de Integrinas, Galectina-3 y Trombospondina-1. Cuando los neuroblastos llegan al OB, mediante la acción de proteínas de ECM, estos se separan de la cadena y migran radialmente hasta su lugar de destino. La proteína Tenascina-R (TN-R) presente en la capa granular del OB interviene tanto en la separación de los neuroblastos de la cadena como en su migración radial. Por otra parte, la glicoproteína de ECM Reelina, presente en la capa mitral del OB, únicamente influye en el primer proceso (Nguyen y Hippenmeyer, 2014). La expresión de diversas moléculas de guía axonal y de sus respectivos receptores tiene relevancia en el proceso de migración tangencial e incluso radial de los neuroblastos. Entre ellas se encuentra la señal quimiorepulsiva a través de la vía SLIT-ROBO. SLIT1 y SLIT2 son expresados por el septum y los plexos coroideos (CP, del inglés *choroid plexus*) desencadenando la quimiorepulsión de los neuroblastos que, al igual que los astrocitos, expresan los receptores ROBO2 y ROBO3. En sentido opuesto, la expresión de SLIT1 por los neuroblastos y las células C induce la quimiorrepulsión de los astrocitos, contribuyendo a la formación y mantenimiento de

los gliotubos. También se conoce la intervención de las parejas molécula/receptor: Netrina-1/DCC, Neuregulinas1y3/Erb4, Efrina-B2/EphB2 y Semaforina/Plexina-B2 (Nguyen y Hippenmeyer, 2014). Por otra parte, se ha demostrado la influencia de multitud de factores de crecimiento: factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF1, *insulin-like growth factor-1*), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, *vascular endothelial growth factor*), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, *brain derived neurotrophic factor*), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, *hepatocyte growth factor*), factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF, *glial cell derived neurotrophic factor*), meteorina, cometina, factor de crecimiento epidérmico (EGF, *epidermal growth factor*) y factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2, *fibroblast growth factor 2*). Otros factores que intervienen en el proceso son: el morfógeno *Sonic Hedgehog* (SHH), DCX, Nogo-A/NgR1 y prokinetina2/Prokr1y2. Este último actúa como quimioatrayente de los neuroblastos a lo largo del RMS y como señal de disociación a la entrada del OB (Nguyen y Hippenmeyer, 2014). Entre los neurotransmisores implicados en la migración de los neuroblastos se encuentran GABA y glutamato (Glu). Son los astrocitos que forman los gliotubos los que, mediante la regulación de los niveles de GABA, controlan la velocidad de migración de los neuroblastos a través del receptor GABA_A (Nguyen y Hippenmeyer, 2014).

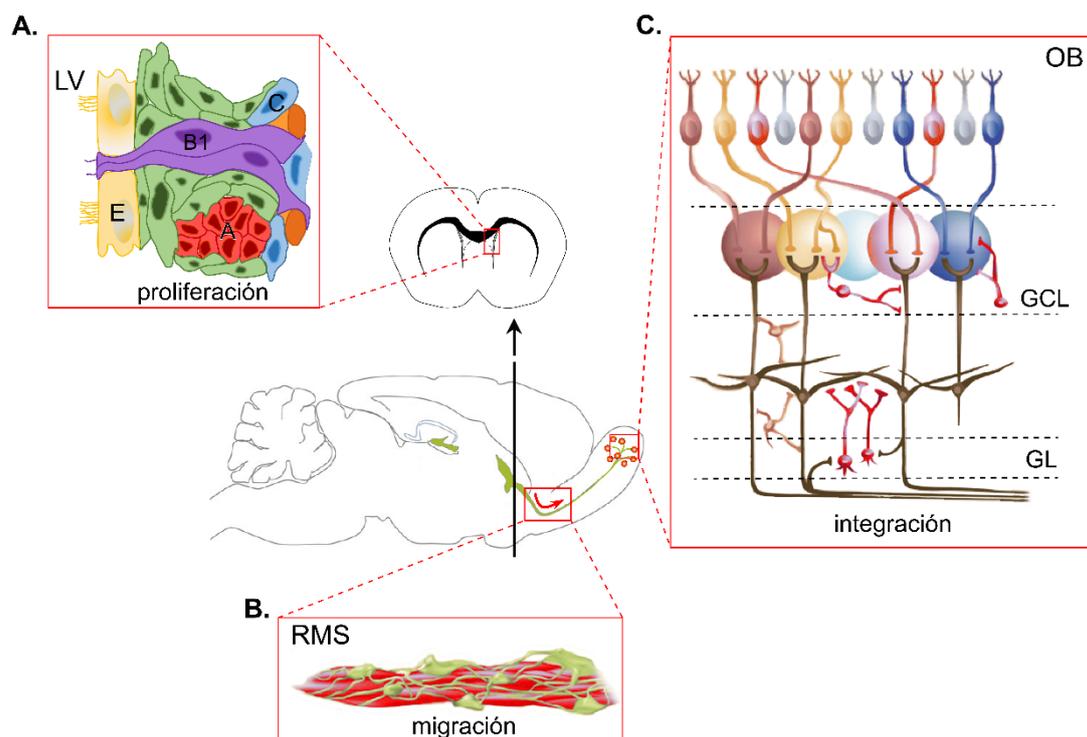


Figura 5. El proceso neurogénico en la vía SEZ-RMS-OB (zona subependimaria - camino migratorio rostral - bulbo olfatorio). Representación esquemática de una sección sagital del cerebro de ratón adulto (centro) y una sección coronal conteniendo la zona subependimaria (SEZ) (encima del anterior). La flecha del panel central indica el sentido de migración de los neuroblastos (rojo). **(A)** Ampliación de la sección coronal de la SEZ, zona de proliferación, donde se encuentran las células de tipo B1 (violeta), tipo C (azul), tipo A (rojo), tipo E (amarillo) en contacto con el ventrículo lateral (LV), astrocitos (verde) y vasos sanguíneos (naranja). **(B)** Ampliación de la sección sagital mostrando el camino migratorio rostral (RMS); formado por los gliotubos, compuestos por astrocitos (verde), a través de los cuales migran los neuroblastos (rojo). **(C)** Ampliación de sección coronal del bulbo olfatorio (OB), donde se muestran las capas glomerular (GCL) y granular (GL) en las cuales se integran los neuroblastos, diferenciándose en interneuronas (rojo). Modificado de Lledo y cols., 2008; Conover y Shook, 2011 y Nguyen y Hippenmeyer, 2014.

Las NSC de distintas zonas de la SEZ dan lugar a diferentes tipos de interneuronas en el OB (figura 5). Las neuronas GABAérgicas, que se integran en la capa granular y GCL, derivan de NSC localizadas en la zona lateral de la SEZ; mientras que las glutamatérgicas de la capa juxtaglomerular se originan en la parte dorsal de la SEZ (Lledo y cols., 2006; Merkle y cols., 2007; Brill y cols., 2009). Cada uno de los tipos de interneuronas generadas se produce preferentemente en distintas edades, siendo la hipótesis más plausible la prevalencia de la producción de las diferentes poblaciones de NSC en cada momento (Lledo y cols., 2008). La diversidad en la producción de interneuronas es debida en gran medida a diferencias autónomo-celulares entre las poblaciones de NSC, de tal forma que un trasplante de NSC de una zona a otra da lugar a las interneuronas que típicamente producen las NSC en la región de origen. Varios trabajos demuestran un origen embrionario diferente para las distintas poblaciones de NSC (Kelsch y cols., 2007; Merkle y cols., 2007; Young y cols., 2007). Se plantea la posibilidad de que modificaciones epigenéticas subyazcan a las diferencias en la expresión de factores de transcripción y en consecuencia a la determinación de estas (Lledo y cols., 2008; Lim y Alvarez-Buylla, 2014).

2.2.- Origen embrionario de las células madre neurales

Durante el desarrollo embrionario temprano de mamíferos, las células multipotentes, de origen ectodérmico, que forman el neuroepitelio monoestratificado del tubo neural, generan tanto neuronas como glía (astrocitos y oligodendrocitos), dando lugar a la mayoría de la diversidad celular del SNC. Estas células, denominadas neuroepiteliales, poseen dos procesos citoplasmáticos perpendiculares a la superficie ventricular, de tal forma que mantienen la cohesión del epitelio. Su extremo apical contacta con el lumen del ventrículo, donde proyecta un cilio primario, mientras que el basal contacta con la lámina basal del neuroepitelio original. Durante los primeros estadios del desarrollo, la mayoría de estas células se dividen simétricamente contribuyendo a la expansión del tubo neural. Si bien, algunas células neuroepiteliales generan neuronas tempranas. En los sucesivos estadios, coincidente con el comienzo de la neurogénesis, las células neuroepiteliales elongan su proceso basal, engrosando el tejido. Mientras, los somas celulares se mantienen junto al ventrículo en la VZ. Al mismo tiempo, estas células adquieren progresivamente características de células gliales y pasan a denominarse células de la glía radial (RG, del inglés *radial glial cells*). Van adquiriendo marcadores astrogliales típicos como GLAST, BLBP y TN-C y una variedad de proteínas de filamentos intermedios como RC1, RC2, nestina, vimentina y GFAP (Campbell y Gotz, 2002). Las RG mantienen su polaridad apical-basal, contactando basalmente con las meninges, lámina basal y vasos sanguíneos. Al igual que las neuroepiteliales, poseen uniones estrechas entre sí y se caracterizan por presentar migración nuclear intercínética. Estas se dividen asimétricamente generando precursores intermediarios de oligodendrocitos (oIPC, del inglés *oligodendrocyte precursors intermediaries*) o de neuronas (nIPC, del inglés *neuron precursors intermediaries*) o directamente neuronas, sirviendo al mismo tiempo de guías para la migración de las nuevas

neuronas. Se desconoce si una sola RG es multipotente o si, por el contrario, diferentes RG dan lugar a los distintos tipos celulares. Conforme se genera, esta progenie se va desplazando hacia la capa del manto para diferenciarse, de tal forma que el cerebro se engruesa y al mismo tiempo las RG se elongan. Al final del desarrollo embrionario la mayoría de las RG se separan del lado apical para finalmente convertirse en astrocitos. Al mismo tiempo las RG, que se mantienen como tal, continúan generando oIPC. Tras el nacimiento, una subpoblación de RG mantiene su contacto apical y continúa actuando como NSC, generando IPC. Progresivamente, algunas RG se convierten en células endimarias, mientras que otras adquieren las características de astrocitos de la SEZ (células tipo B1). Estas mantienen la organización epitelial, polaridad apical-basal y su función de NSC en el adulto (ver apartado 2.1 de esta introducción), generando nIPC y oIPC (Gotz y Huttner, 2005; Kriegstein y Alvarez-Buylla, 2009) (figura 6). En los vertebrados no mamíferos se ha observado que las RG persisten en el adulto y actúan, al igual que durante el desarrollo, como progenitores primarios de neuronas y glía y sus fibras guían la migración de las nuevas neuronas.

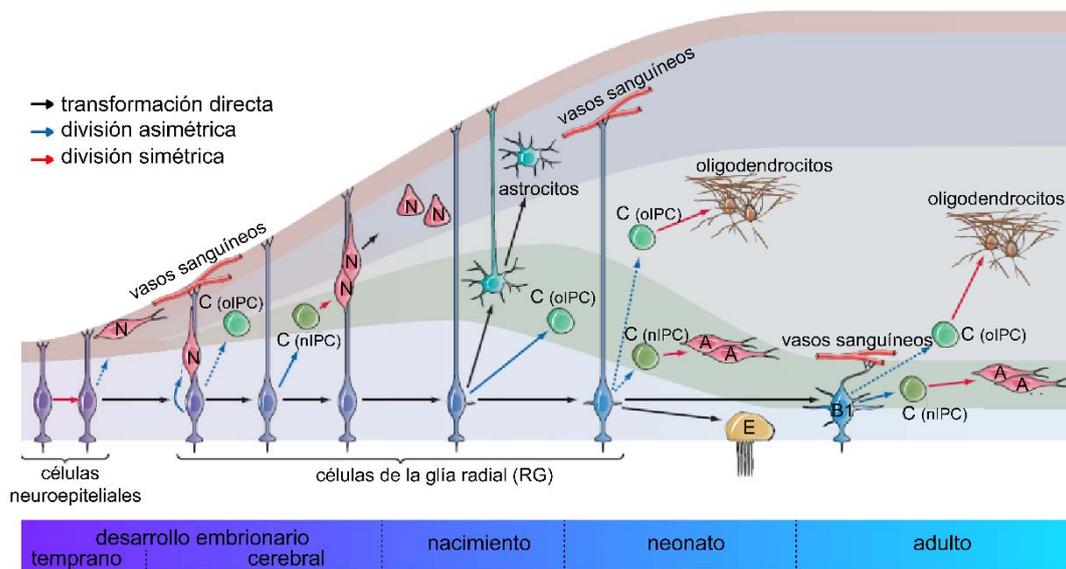


Figura 6. Naturaleza glial de las células madre neurales en el desarrollo y en el adulto. En el desarrollo temprano las células neuroepiteliales se dividen simétricamente aumentando su población. Probablemente algunas de ellas generan neuronas tempranas. Durante el desarrollo cerebral, el epitelio se engruesa, las células neuroepiteliales se elongan y se transforman en glía radial (RG). Estas se dividen asimétricamente dando lugar a neuronas directamente o indirectamente mediante la generación de progenitores intermediarios de neuronas (nIPC). También se cree que las RG generan oligodendrocitos a través de sus precursores (oIPC). A medida que se genera y diferencia la progenie, el cerebro se engruesa promoviendo la elongación de las RG. Al final del desarrollo embrionario la mayoría de las RG se desprenden de la parte apical y se transforman en astrocitos, al mismo tiempo continúa la generación de los oIPC. Tras el nacimiento, una subpoblación de la RG mantiene el contacto apical y su función como células madre neurales (NSC) generando precursores de neuronas (nIPC) y oligodendrocitos (oIPC). Algunas de ellas se transforman en células endimarias, mientras que otras se convierten en astrocitos adultos de la SEZ (células tipo B1) que actúan como NSC en el adulto. Las flechas con línea discontinua indican hipótesis no confirmadas experimentalmente. Modificado de Kriegstein y Alvarez-Buylla, 2009.

En el pasado se consideraba a las células gliales como un producto final de la diferenciación, caracterizadas por su función de soporte de las neuronas y con un origen temprano en el desarrollo diferente a estas. Estudios de trazado de linaje han permitido un cambio de concepción, mostrando que algunas células gliales (RG durante el desarrollo y subpoblaciones de astrocitos en los mamíferos adultos) actúan como NSC. Dichos estudios han demostrado que las NSC adultas son parte de un linaje que comienza con las células neuroepiteliales, continúa con las RG y termina con los astrocitos germinales de la SEZ en el cerebro postnatal y adulto (Merkle y Alvarez-Buylla, 2006; Kriegstein y Alvarez-Buylla, 2009).

2.3.- Regulación de la neurogénesis adulta en la zona subependimaria

La generación de nuevas neuronas en la SEZ está condicionada por multitud de factores intrínsecos y extrínsecos a las propias células progenitoras, así como por la interacción entre ellos. El conjunto de señales interviene en la capacidad de proliferación, automantenimiento y destino celular de las NSC y su progenie. Los factores extrínsecos que regulan la neurogénesis adulta comprenden desde moléculas generadas en el nicho hasta señales sistémicas. Intrínsecamente, modificaciones epigenéticas y reguladores del ciclo celular modulan el comportamiento de las NSC y su progenie (Silva-Vargas y cols., 2013).

2.3.1.- La zona subependimaria como nicho de células madre neurales

Las B1-NSC están expuestas a señales de tres compartimentos del nicho: el CSF/células endimarias, el nicho intermedio de la SEZ (células de la SEZ y otras células del nicho) y el nicho perivascular (Silva-Vargas y cols., 2013) (figura 7).

El compartimento del *CSF/células endimarias* es un importante foco de señalización sobre las NSC y su progenie (figura 7). La principal fuente de CSF son los CP, unos órganos formados por células epiteliales cúbicas que rodean un conjunto de capilares y tejido conectivo laxo (Bill y Korzh, 2014). Las células, endimarias modificadas, poseen lámina basal y uniones estrechas entre sí. Estas uniones evitan el paso de la mayoría de moléculas, formando parte de la barrera hematoencefálica (BBB, del inglés *blood-brain barrier*) (Pascual Garvi y cols., 2004). Además de su papel como regulador paracrino mediante la producción de CSF, los CP actúan como sistema de filtración, eliminación de metabolitos, sustancias extrañas y exceso de neurotransmisores del CSF. Los CP se encuentran flotando en el CSF, uno en cada uno de los cuatro ventrículos. El CSF posee funciones de protección física y transporte de iones. Su composición incluye una amplia variedad de moléculas de señalización, incluyendo señales sistémicas, que varía en función del momento de desarrollo y se altera en situaciones patológicas, reflejando el estado fisiológico del organismo. En él están presentes factores de crecimiento y ligandos implicados en la biología de las NSC, entre los que se encuentran TGF, IGF, PDGF, SHH, Wnt, BMP, Slit, FGF2, NT-3 y ácido retinóico (Hayamizu y cols., 2001; Lehtinen y cols., 2011; Lim y Alvarez-Buylla, 2014). La mayoría de estos factores son producidos o

transportados por los CP, aunque las células endimarias y de la SEZ así como los axones aferentes también producen algunos de ellos. Las células epiteliales de los CP expresan múltiples receptores que reconocen señales globales y responden a ellas modulando su secretoma. Pese a que solamente las B1-NSC están en contacto con el CSF, algunos factores presentes en el CSF penetran profundamente en la SEZ, uniéndose a prolongaciones de la lámina basal de los capilares que se ramifican de manera compleja y que se denominan fractones (Silva-Vargas y cols., 2013). La migración de los neuroblastos desde la SEZ hasta el OB también es regulada, al menos parcialmente, por gradientes de moléculas presentes en el CSF. Estos gradientes son establecidos por la presencia de un flujo rostral del CSF generado mediante el movimiento coordinado de los cilios de las células endimarias (Sawamoto y cols., 2006). Por otra parte, cada vez parece más relevante la adhesión entre las células endimarias en el mantenimiento de la quiescencia de las NSC (Silva-Vargas y cols., 2013). Además, las células endimarias aportan al nicho la secreción de factores difusibles como Noggin. Este factor antagoniza a las BMP secretadas por las NSC, cuya presencia favorece la diferenciación astrocitaria, de tal forma que permite la diferenciación neuronal (Lim y cols., 2000). Otras moléculas secretadas por las células endimarias son CXCR4, que interviene en la migración y supervivencia de los neuroblastos (Dziembowska y cols., 2005), y el factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF, *pigment epithelium-derived factor*) que regula la auto-renovación de las NSC de la SEZ (Ramirez-Castillejo y cols., 2006; Andreu-Agullo y cols., 2009).

El compartimento de nicho de la SEZ *intermedia* lo componen las NSC, su progenie y otras células presentes en la zona, que interactúan entre sí (figura 7). Las señales de retroalimentación (*feedback*) de los TAP y neuroblastos regulan directamente la proliferación de las B1-NSC mediante señales difusibles e interacciones célula-célula (Doetsch, 2003). Por ejemplo, en situación de homeostasis, la interacción directa entre células tipo C, que expresan EGFR, y las B1-NSC a través de Notch1, regula el número de NSC y su capacidad de auto-renovación (Aguirre y cols., 2010). Por otra parte, los astrocitos presentes en la SEZ parecen tener un papel relevante en la integración y propagación de múltiples señales a nivel autocrino y paracrino sobre la población de astrocitos con características de NSC (Taupin y cols., 2000; Lie y cols., 2005). Los neurotransmisores son también factores clave del nicho. De ellos, el GABA es el mayor regulador de la quiescencia/activación de las NSC. Este es generado por los neuroblastos, inhibiendo la proliferación de las B1-NSC, que expresan receptores específicos (GABA_AR) (Young y cols., 2011). La SEZ está ampliamente inervada por axones procedentes de distintas áreas cerebrales, que también controlan la proliferación de las NSC y los TAP. Entre ellas se encuentran las neuronas serotoninérgicas del núcleo del rafe y las dopaminérgicas de la sustancia negra y el área ventral tegmental (Simpson y cols., 1998; Lenington y cols., 2011). También se ha demostrado la implicación de otros neuromoduladores, como el óxido nítrico de las neuronas estriatales nitrérgicas, en la regulación del comportamiento de las NSC y su progenie (Matarredona y cols., 2005; Gray y Cheung, 2014). Una hipótesis plantea que la heterogeneidad regional de las NSC podría deberse a la inervación diferencial de la SEZ.

Además la interacción con otras células del nicho, como la microglía, es frecuente incluso en situaciones de homeostasis (Silva-Vargas y cols., 2013).

El compartimento de nicho *perivascular* lo componen los vasos sanguíneos que discurren por la SEZ y las células que se disponen alrededor o contactando con estos (figura 7). Los vasos sanguíneos están formados por células endoteliales con uniones estrechas y envueltas por pericitos, con la lámina basal rodeándolos (Tavazoie y cols., 2008; Silva-Vargas y cols., 2013). Los pies vasculares de las B1 envuelven este complejo que, en conjunto, forma parte de la BBB (Pascual Garvi y cols., 2004). A lo largo de la SEZ discurre un plexo vascular plano con el que contactan directamente tanto las células tipo C como las NSC. Dichos lugares de contacto carecen de la envoltura de pericitos o prolongaciones gliales, siendo esta una característica única en todo el SNC, permitiendo el acceso directo a diversas moléculas como factores de crecimiento, citoquinas, hormonas, oxígeno y nutrientes circulantes. En la SEZ no se observan indicios de proliferación de células endoteliales, indicando que se trata de una población altamente quiescente y por lo tanto que el proceso de angiogénesis es escaso o incluso nulo en condiciones de homeostasis (Tavazoie y cols., 2008). La lámina basal es una capa especializada de la ECM. Prolongaciones de la lámina basal, denominadas fractones, se extienden desde los vasos hasta la capa endimaria. Estos tienen la capacidad de unir y captar factores de crecimiento (Silva-Vargas y cols., 2013). El anclaje de las NSC y su progenie con los fractones, a lo largo de los vasos, parece ser un factor clave en el comportamiento de estas. La heterogeneidad en la composición de la ECM genera patrones locales, con señales y características físicas diferenciales, que influyen en la toma de decisiones de destino celular (Silva-Vargas y cols., 2013). El flujo sanguíneo en la SEZ se encuentra reducido respecto al resto de zonas del cerebro, indicando que este nicho podría ser hipóxico (Culver y cols., 2013). Las señales sistémicas que circulan por los vasos sanguíneos tienen acceso a la SEZ tanto a través del CSF como mediante extravasación local. Es por ello que señales que quedan excluidas del resto de zonas del cerebro tienen acceso directo a este nicho (Silva-Vargas y cols., 2013). Mientras que las señales difusibles generadas por las células endoteliales como FGF2, BDNF, VEGF, IGF1, PEDF, SDF-1 y beta-celulina promueven generalmente la proliferación, las señales mediadas por contacto, mediante adhesión con las células endoteliales, pueden promover la quiescencia (Biro y cols., 1994; Leventhal y cols., 1999; Jin y cols., 2002; Shen y cols., 2004; Ramirez-Castillejo y cols., 2006; Kokovay y cols., 2010; Gomez-Gavira y cols., 2012). La excepción la constituye la neurotrofina 3 (NT-3) producida por endotelios, que actúa como señal difusible de quiescencia (Delgado y cols., 2014). Además, en el compartimento de nicho perivascular se disponen macrófagos y fibroblastos. La contribución del conjunto de células perivasculares sobre el linaje de las NSC todavía requiere de mayor conocimiento (Silva-Vargas y cols., 2013).

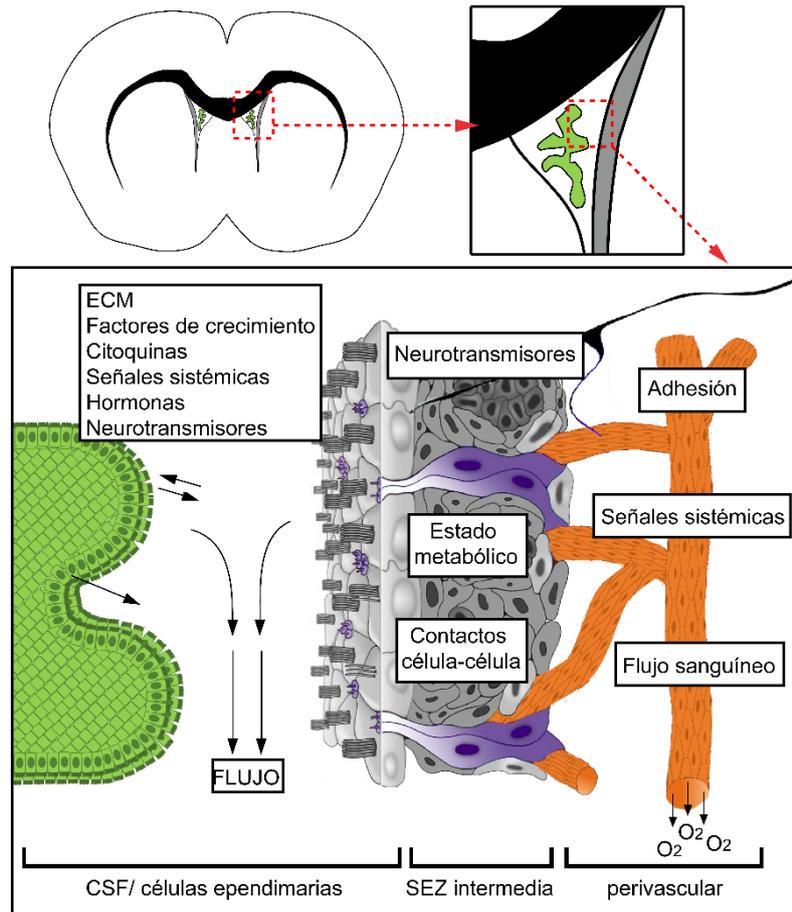


Figura 7. Señales de nicho en la zona subependimaria adulta. Representación coronal del cerebro mostrando la zona subependimaria (SEZ) (gris) y el plexo coroideo (CP) flotando en los ventrículos (verde). A la derecha, ampliación de uno de los ventrículos. En la parte inferior, detalle indicando los 3 compartimentos de nicho y las señales que influyen en las células madre neurales (NSC) y su progenie. Diversas señales están presentes en el líquido cefalorraquídeo (CSF); algunas de ellas producidas por los CP (verde), células endimarias y axones aferentes. ECM: señales de la matriz extracelular. En la SEZ intermedia (gris) las señales difusibles e interacciones célula-célula modulan el comportamiento de las células del nicho, entre las que se encuentran las NSC o células B1 (violeta). En el compartimento perivascular (naranja) se producen señales difusibles y de contacto de las células endoteliales. Además, a través de este llegan señales sistémicas dependientes del flujo sanguíneo. Modificado de Conover y Shook, 2011 y Silva-Vargas y cols., 2013.

2.3.2.- Regulación epigenética de las células madre neurales

Las modificaciones epigenéticas implican cambios heredables en patrones de expresión génica no codificados en la secuencia de DNA genómico. Diversos mecanismos epigenéticos juegan un papel relevante en el comportamiento de las NSC y su progenie, modulando y coordinando su expresión génica. Entre estos mecanismos se encuentra la metilación del DNA, modificación de histonas y expresión de RNA no codificantes (ncRNA, del inglés *non coding RNA*). En múltiples casos, dicha regulación comprende la interacción entre diferentes mecanismos epigenéticos. Cada regulador epigenético tiene varias dianas y afecta a múltiples procesos de la neurogénesis, en algunos casos exclusivamente en la etapa adulta (Sun y cols., 2011).

La metilación del DNA sucede principalmente en los residuos de citosina de las denominadas islas CpG. Aunque inicialmente se consideraba una marca epigenética estable, actualmente se ha confirmado el proceso de metilación/desmetilación en múltiples situaciones biológicas, tanto de forma pasiva (durante la replicación del DNA) como activa. Se ha demostrado la relevancia de la metilación del DNA en la regulación génica en el proceso de neurogénesis (ver revisiones: Ming y Song, 2011; Sun y cols., 2011; Faigle y Song, 2013; Lim y Alvarez-Buylla, 2014).

La cromatina se condensa mediante los denominados nucleosomas, que comprenden unos 147 pares de bases de DNA alrededor de dos copias de cuatro histonas distintas (H2A, H2B, H3 y H4). Los extremos N-terminales de estas histonas están sujetos al menos a seis modificaciones postraduccionales diferentes: acetilación, metilación, ubiquitinación, fosforilación, ribosilación y sumoilación. Estas modificaciones regulan la accesibilidad y capacidad de unión de diversos factores que controlan la activación o represión de los genes adyacentes (Sun y cols., 2011).

La acetilación de histonas tiene lugar en los residuos de lisina (Lys) mediante la acción de las histona acetil transferasas (HAT) y se asocia con la activación de la transcripción. Este proceso es reversible, siendo la desacetilación catalizada por acción de las histona desacetilasas (HDAC). Además las HDAC no solo actúan sobre histonas, sino que también lo hacen sobre las Lys acetiladas de otras proteínas. Diversos estudios han demostrado la influencia de las HAT y HDAC en la regulación de la neurogénesis adulta. Por ejemplo, el ratón *knock-out* para Querkopf, un activador transcripcional con actividad HAT de la familia MYST, muestra una disminución de la capacidad de automantenimiento de las NSC y una disminución en el número de neuroblastos y de neuronas diferenciadas. Los resultados indican que Querkopf es esencial para una neurogénesis adulta correcta (Merson y cols., 2006; Sun y cols., 2011). Otro ejemplo es la HDAC2, cuya eliminación en ratones conlleva a la maduración anormal y a un incremento en la muerte de las nuevas neuronas generadas en la SEZ. Se sugiere que esta juega un papel autónomo celular en la maduración y supervivencia neuronal, exclusivamente en la neurogénesis adulta, mediante el silenciamiento de SOX2 tras la diferenciación (Jawerka y cols., 2010; Sun y cols., 2011). También se ha descrito la influencia de la desacetilación de histonas asociada a la expresión de REST, en las células no neuronales. En su presencia, un complejo formado por las proteínas CoREST y HDAC1/2 se une a secuencias de genes esenciales para el fenotipo neural, como el canal de sodio tipo II, reprimiéndolos (Ballas y cols., 2001; Lunyak y cols., 2002). Otra muestra de este proceso es el factor de transcripción TLX. Este recluta HDAC5 en los promotores de los reguladores de ciclo p21 y Pten reprimiendo la expresión de estos genes y permitiendo la proliferación de las NSC (Shi y cols., 2004; Sun y cols., 2007; Lim y Alvarez-Buylla, 2014).

Dentro del proceso de modificación de histonas, la metilación se ha mostrado como otro de los eventos relevantes en la modulación de las NSC de la SEZ. Dicho proceso ocurre tanto en regiones promotoras como no promotoras. DNMT3A es una metiltransferasa que metila el DNA en regiones no promotoras facilitando la transcripción de genes asociados a la

neurogénesis como Dlx2. (Lim y Alvarez-Buylla, 2014). Las proteínas del grupo Polycomb o PcG son represores transcripcionales. Entre ellos EZH2, presente en las NSC adultas, forma el complejo PRC2 (*polycomb repressive complex 2*) que cataliza la trimetilación de la Lys 27 de la histona 3 (H3K27me3). A su vez, Bmi1 se une a RING1B formando el complejo PRC1 (*polycomb repressive complex 1*), que reconoce H3K27me3 y silencia el inhibidor de ciclo p16. Se ha demostrado que Bmi1 es requerido para la auto-renovación de los precursores neurales de la SEZ y EZH2, además de su implicación en esta vía, tiene un papel independiente en la neurogénesis (Molofsky y cols., 2003; Sun y cols., 2011; Lim y Alvarez-Buylla, 2014). Por otra parte, las proteínas del grupo TrxG son reguladores positivos de la expresión. Un ejemplo de ellos es Mll1 (*mixed lineage leukemia-1*) que transfiere grupos metilo a la Lys 4 de la histona 3 (H3K4), siendo requerido para la diferenciación neuronal, en la SEZ adulta, mediante su acción directa sobre Dlx2. Además Mll1 es necesario para la activación de las demetilinas específicas de H3K27 (UTX o JMJD3), de tal forma que antagoniza la acción de los PcG (Lim y cols., 2009; Sun y cols., 2011).

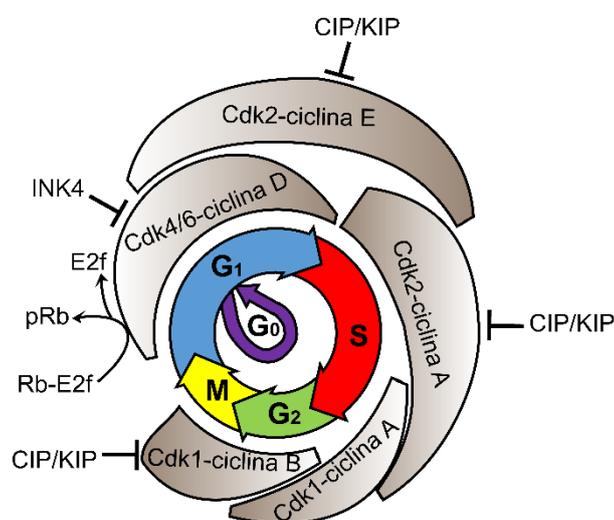
Los diversos tipos de ncRNA, controlan ampliamente la expresión génica interactuando con los modificadores de la cromatina, factores de transcripción del DNA, modificaciones del RNA y regulando los procesos de *splicing*, traducción de mRNA y la estabilidad de RNA (Taft y cols., 2010). Recientes evidencias indican que múltiples ncRNA regulan la neurogénesis adulta. Uno de los tipos más abundantes son los miRNA, que inhiben la expresión génica a nivel postranscripcional. Uno de ellos, específico de cerebro, es el miR-124 (Cheng y cols., 2009). Este no se detecta en las NSC de la SEZ adulta, pero va incrementando su expresión desde los TAP a los neuroblastos y alcanza sus mayores niveles de expresión en las neuronas inmaduras del RMS y el OB. Promueve la diferenciación a neuroblastos y regula la progresión del linaje neuronal en la SEZ. El miR-124 reduce o incluso suprime la expresión de tres dianas del linaje: Dlx2, Jag1 y Sox9. Dlx2 es un factor de transcripción implicado en la formación de interneuronas. Jag1 es un ligando de Notch, vía importante en la auto-renovación de las NSC. Sox9 promueve la generación de células GFAP⁺ y suprime la producción neuronal. Por otra parte un nuevo tipo de ncRNA de doble cadena (dsRNA, del inglés *double stranded RNA*), que contiene la secuencia NRSE, ha sido sugerido como un regulador clave de la neurogénesis. El NRSE dsRNA induce la transcripción de genes implicados en la diferenciación neuronal. En las células no neurales este es reprimido mediante el represor transcripcional NRSF/REST (*neuronal restricted silencing factor / RE-1 silencing transcription factor*) y la unión del complejo HDAC1/2 y CoREST (Sun y cols., 2011).

2.3.3.- Reguladores del ciclo celular

Además de las vías de señalización moduladas por señales extrínsecas (factores de crecimiento, neurotrofinas, morfógenos,...) presentes en el nicho, existen una variedad de mecanismos intracelulares implicados en la regulación de la neurogénesis adulta. Entre ellos se encuentran las modificaciones epigenéticas, mencionadas en el apartado anterior, y los reguladores de ciclo celular (Zhao y cols., 2008). El sistema de control del ciclo celular, común

en todos los eucariotas, dirige la progresión de este mediante la acción conjunta de las proteínas denominadas ciclinas y las quinasas dependientes de ciclinas (CDK, *cyclin-dependent kinases*) (ver revisiones: Satyanarayana y Kaldis, 2009; Cheffer y cols., 2013). Durante la fase G₁ del ciclo celular las ciclinas D se unen a las CDK4 y 6, estos complejos activan a las quinasas que fosforilan sustratos que permiten la transición de la fase G₁ a la S. Entre ellos está la proteína Rb (proteína asociada a retinoblastoma), que una vez fosforilada no interactúa con el factor de transcripción E2f y por lo tanto este es capaz de unirse a regiones promotoras de genes esenciales para la progresión del ciclo, como el codificante para la ciclina E, activando su transcripción (Geng y cols., 1996). Consecuentemente se forma el complejo ciclina E-CDK2 que fomenta la inactivación de Rb, generando una oleada de actividad transcripcional necesaria para la fase de duplicación del DNA (fase S). En dicha fase se forman los complejos ciclina A-CDK2, cuya actividad de fosforilación permite la continuidad del ciclo celular. Al final de la fase S la ciclina A se une a la CDK1 interviniendo, el complejo generado, en la finalización de la fase G₂. Finalmente, el incremento en los niveles de la ciclina B permite la formación del complejo ciclina B-CDK1, que facilita la transición de la fase G₂ a la mitosis (fase M) (Bashir y Pagano, 2005; Le Breton y cols., 2005). Aparte de la regulación por la unión de las distintas ciclinas, las actividades CDK también están reguladas por los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CKI, *cyclin-dependent kinase inhibitors*), que son denominados supresores de tumores. En función de su origen evolutivo, estructura y especificidad de las CDK, los CKI se han clasificado en dos familias. La familia de los CKI INK4, que codifica para p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} y p19^{INK4d} (también denominado p19^{Arf}), se une a las CDK4 y 6 interfiriendo su asociación con la ciclina D e inhibiendo así su actividad quinasa. Por otra parte, los miembros de la familia Cip/Kip (p21^{Cip1}, p27^{Kip1} y p57^{Kip2}) se unen tanto a las CDK como a las ciclinas D, E, A y B, modulando las actividades de los complejos. Además de la división celular, los miembros de esta familia están implicados en la regulación del ciclo mediante la modulación de la transcripción, supervivencia y migración (ver revisión Besson y cols., 2008) (figura 8).

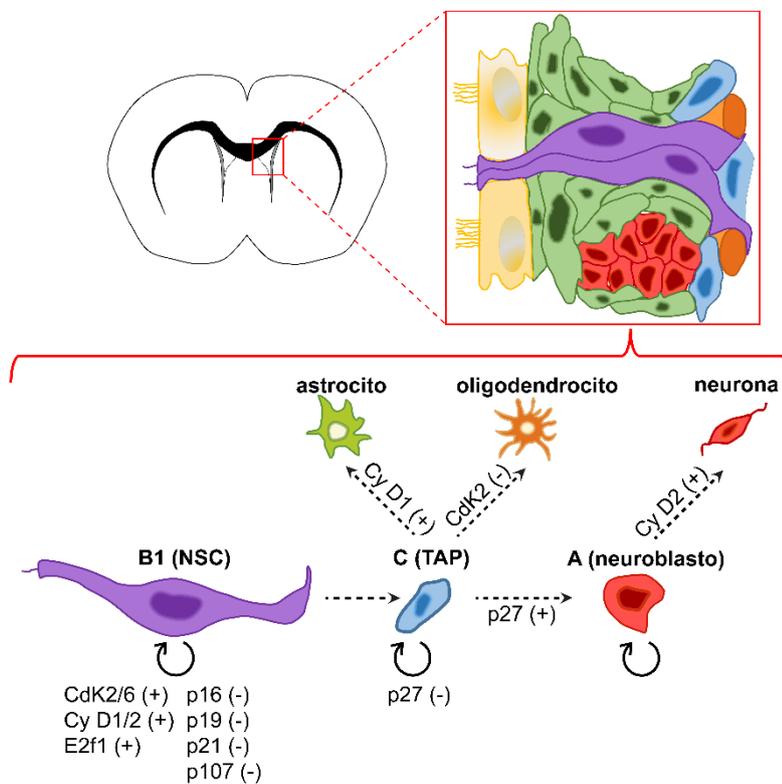
Figura 8. El ciclo celular y su regulación. Representación de los componentes del ciclo celular implicados en la regulación de la proliferación y diferenciación de las NSC. El avance del ciclo celular está regulado por los complejos ciclina/CDK y sus inhibidores (CKI) de las familias INK4 y CIP/KIP. G₀, estado de quiescencia o parada reversible del ciclo. G₁, fase 1 del ciclo celular que comprende desde el final de la citocinesis hasta el inicio de la síntesis del DNA. S, fase 2 del ciclo celular en la que se sintetiza el DNA. G₂, fase 3 del ciclo celular que comprende desde el final de la síntesis de DNA hasta el principio de la mitosis. M, fase 4 del ciclo celular en la que se generan las dos células hijas, incluye la división del núcleo o mitosis (profase, metafase, anafase y telofase) y la división del citoplasma o citocinesis. Modificado de Cheffer y cols., 2013.



Las distintas poblaciones de SC son controladas por distintos reguladores de ciclo celular y, a su vez, diferentes señales modulan la expresión de diferentes CKI. Es por ello que, pese a la existencia de un mecanismo común, existen particularidades tanto entre especies como entre las diferentes poblaciones celulares. Para determinar el papel o necesidad de cada uno de los elementos reguladores del ciclo celular en el proceso de neurogénesis en la SEZ adulta, se han realizado estudios de expresión génica y silenciamiento de actividades (Cheffer y cols., 2013). En la SEZ adulta, la deficiencia de CDK2 (Jablonska y cols., 2007), CDK6 (Beukelaers y cols., 2011), ciclina D1 (Ma y cols., 2010), ciclina D2 (Kowalczyk y cols., 2004) y E2f1 disminuye la proliferación de las NSC. Las ciclinas D1 y D2 y CDK2, además de mantener los niveles de proliferación/auto-renovación de las NSC, intervienen en la diferenciación de los precursores en astrocitos, neuronas y oligodendrocitos respectivamente (Cheffer y cols., 2013). CDK5 juega un papel relevante en la migración de los neuroblastos desde la SEZ hacia el OB (Hirota y cols., 2007). Por el contrario, los CKI desempeñan funciones transcendentales en el mantenimiento de la quiescencia en los precursores neurales en el adulto, que es necesaria para el mantenimiento a largo plazo de la capacidad de auto-renovación de las NSC. La delección de estos factores conlleva a la activación transitoria y la subsecuente depleción del reservorio de precursores. De ellos p21 (Kippin y cols., 2005; Marques-Torrejón y cols., 2013), p107 (proteína asociada a Rb), p16 (Zindy y cols., 1997; Janzen y cols., 2006; Krishnamurthy y cols., 2006; Molofsky y cols., 2006) y p19 (Krishnamurthy y cols., 2004) restringen la proliferación de las NSC. Por otra parte, p27 controla la proliferación de las células de tipo C (Doetsch y cols., 2002b) (figura 9).

Figura 9. Control del ciclo celular en la zona subependimaria adulta.

Representación esquemática de los componentes del ciclo celular implicados en la regulación de la proliferación y diferenciación de las poblaciones presentes en la zona subependimaria (SEZ). En la parte superior se indica la disposición de los tipos celulares que conforman el nicho de la SEZ, manteniendo el código de colores en el esquema inferior. Las flechas con línea continua indican el proceso de proliferación, mientras que las de línea discontinua indican diferenciación. El signo (+) representa un incremento en el proceso indicado por la flecha, causado por la molécula correspondiente; por el contrario, (-) indica una disminución del proceso. Abreviaturas: Cy, ciclina; NSC, Célula madre neural; TAP, progenitor transitorio. Extraído de Cheffer y cols., 2013 y Conover y Shook, 2011.



Otro inhibidor del ciclo celular es el supresor de tumores p53, se trata de un factor de transcripción que integra y responde ante multitud de estreses (daño en el DNA, estrés oxidativo, hipoxia, etc.) (Harris y Levine, 2005; Insinga y cols., 2014). Este juega un papel central en la modulación del ciclo celular y los procesos de arresto de ciclo celular, senescencia y apoptosis (Lowe y cols., 2004). p53 se expresa en las células de la SEZ (van Lookeren Campagne y Gill, 1998; Jori y cols., 2003) y, mediante estudios de eliminación de su expresión, se sabe que regula negativamente la proliferación, supervivencia y auto-renovación de las NSC (Gil-Perotin y cols., 2006; Meletis y cols., 2006; Ferron y cols., 2009). Además se ha demostrado su papel en la regulación de la diferenciación neuronal y la neuritogénesis (Ferron y cols., 2009). La red transcripcional de genes de respuesta a p53 produce proteínas que interactúan con múltiples vías de señalización y también vías de retroalimentación positiva y negativa sobre p53 (Harris y Levine, 2005). Estas vías de regulación de la actividad de p53 actúan a través de distintas moléculas, entre las que se encuentra la ubiquitina ligasa MDM2, que se considera el principal regulador de p53. MDM2 puede regular negativamente p53 mediante la inhibición de su transcripción o indirectamente, en el citoplasma, mediante su ubiquitinación para su posterior degradación (Harris y Levine, 2005).

2.4.- Ensayos *in vitro* de células madre neurales

Mediante el ensayo denominado de neuroesferas se consiguió aislar y cultivar por primera vez células con características de NSC procedentes del cerebro adulto (Reynolds y Weiss, 1992). Diseccionaron tejido estriatal, incluyendo la SEZ, posteriormente lo disociaron enzimáticamente hasta obtener células individuales. Estas las sembraron, en condiciones no adherentes, en medio libre de suero y en presencia de EGF. Observaron que una pequeña población de las células se dividía formando agregados clonales esféricos que denominaron neuroesferas. La mayoría de las células que formaban dichos agregados expresaban el filamento intermedio nestina, presente en las células neuroepiteliales, atribuyéndoles las características de SC a todas ellas. Pese a que inicialmente se consideró que las neuroesferas estaban compuestas por una población homogénea de SC, actualmente se sabe que su composición incluye SC, TAP y células diferenciadas (figura 10). Esto es debido a la existencia de divisiones simétricas diferenciadoras en las que se producen dos TAP o asimétricas dando lugar a una NSC y un TAP. Hoy en día se considera que solamente el 1 % de las células tienen capacidad formadora de esfera, mientras que el 99 % restante pertenece a progenitores más comprometidos y células diferenciadas (Gritti y cols., 2001; Morshead y cols., 2002; Ferron y cols., 2007). Mediante la disociación mecánica de estas y su siembra obtenían neuroesferas secundarias, demostrando así su capacidad de auto-renovación. Dicho subcultivo se basaba en la premisa de que las células diferenciadas mueren y por lo tanto se seleccionan positivamente las NSC (Gritti y cols., 2001; Ferron y cols., 2007). Cuando sembraban las células, procedentes de las neuroesferas, en sustrato adherente y ausencia de mitógenos, estas se diferenciaban en neuronas y células gliales. La diferenciación a los tres linajes neurales (neuronas, astrocitos y

oligodendrocitos) fue la evidencia de la capacidad multipotente de dichas células. El ensayo de neuroesferas confería un método para identificar las células con las propiedades funcionales de SC, auto-renovación y diferenciación, así como una lectura cuantitativa del número de SC *in vivo*.

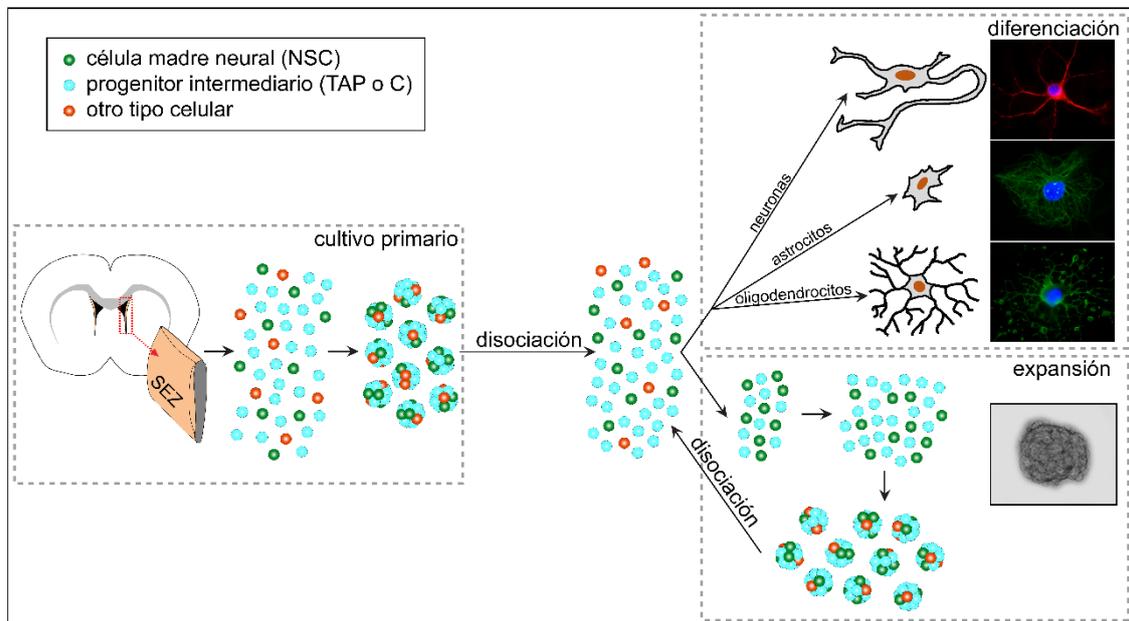


Figura 10. El ensayo de neuroesferas. Esquema del método de aislamiento *in vitro* de las células madre neurales (NSC) adultas. Tras la disección de la zona subependimaria (SEZ) y su posterior disgregación química y enzimática, las células se siembran en presencia de mitógenos (EGF y FGF2). Tras una semana en cultivo, se generan agregados clonales denominados neuroesferas, que contienen una mezcla de NSC y precursores. Las neuroesferas pueden disociarse y cultivarse de nuevo (pase celular) en presencia de mitógenos, generando más neuroesferas (denominadas secundarias) y por lo tanto demostrando su capacidad de auto-renovación (foto de contraste de fases). Estas también pueden diferenciarse (fotos de fluorescencia) en presencia de un sustrato adhesivo y en ausencia de mitógenos, generando neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, demostrando así su capacidad multipotente.

El desconocimiento de marcadores específicos para NSC de la SEZ y la carencia de un ensayo funcional que demuestre la capacidad de auto-renovación *in vivo* han conferido gran relevancia al estudio *in vitro*, a través del ensayo de formación de neuroesferas. No obstante, dicho ensayo está sujeto a ciertas consideraciones que limitan la interpretación de sus resultados (Pastrana y cols., 2011). Una de las características a tener en cuenta del ensayo de neuroesferas es el *origen diverso* de estas. Con el fin de aislar NSC adultas, mediante la técnica de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS, del inglés *fluorescence-activated cell sorting*), se han utilizado marcadores para células en diferentes estados, fases del ciclo celular y supuestos marcadores generales de SC, incluyendo sustratos metabólicos, marcadores de superficie, moléculas fluorescentes y ratones transgénicos con reporteros (Pastrana y cols., 2009; Pastrana y cols., 2011; Codega y cols., 2014). Algunas combinaciones de dichos marcadores han permitido el enriquecimiento en células formadoras de esferas a partir de la SEZ. A pesar de ello, se ha demostrado que tanto NSC como TAP, ambos en estado proliferativo (EGFR⁺), generan neuroesferas (Doetsch y cols., 2002a; Pastrana y cols., 2009). Frecuentemente se correlaciona, de forma directa, el número de NSC con el número de neuroesferas generadas, basado en la falsa premisa del origen único de las neuroesferas a partir de una única NSC. Además este

ensayo permite la expansión de las células predispuestas a la proliferación y por lo tanto es posible que las SC quiescentes no sean detectadas. Por otra parte la *diversidad de protocolos*, en el establecimiento y mantenimiento de los cultivos, ha favorecido el surgimiento de resultados diversos y en ocasiones contradictorios (Pastrana y cols., 2011). Por ejemplo, los niveles de densidad celular y la composición del medio de cultivo influyen directamente sobre el crecimiento celular. También la adición de factores de crecimiento puede alterar el potencial de diferenciación respecto a la situación *in vivo*. Factores como la densidad celular elevada, la agitación de los cultivos e incluso la locomoción espontánea de las células pueden incrementar los procesos de fusión entre las neuroesferas y conducir a una lectura errónea del ensayo. Es por ello que la *clonalidad* absoluta solamente está garantizada mediante los ensayos de célula única. Aunque todavía no se ha extendido su uso, recientemente se han descrito variaciones del ensayo de neuroesferas original que pueden evitar la agregación y por lo tanto asegurar la premisa de clonalidad. Dichas variaciones incluyen cultivos en condiciones semiadherentes (metilcelulosa o colágeno) (Louis y cols., 2008) o matrices tridimensionales de hidrogel (Cordey y cols., 2008). Estos ensayos definen retrospectivamente las SC en función del tamaño de la colonia formada. Para ello se basan en la premisa de que los TAP muestran una limitada capacidad proliferativa respecto a las NSC y por lo tanto el diámetro de la colonia puede ser utilizado para distinguir la célula fundadora de esta. No obstante, este ensayo sigue siendo susceptible a gran parte de las limitaciones anteriormente descritas: no detección de SC quiescentes y alteraciones del tamaño de las colonias o del potencial de diferenciación en función de las condiciones del cultivo (ver revisión Vunjak-Novakovic y Scadden, 2011). El tamaño de la neuroesfera se ha postulado como un indicador del origen de esta, siendo atribuidas las esferas de mayor tamaño a las NSC. Si bien, alteraciones en la capacidad de auto-renovación o en la respuesta a los factores de crecimiento pueden influir en el diámetro de estas (Kippin y cols., 2005). Por todo ello, el ensayo de formación de neuroesferas no confiere una lectura precisa del número de SC *in vivo* aunque sus resultados permiten estimar el potencial proliferativo de la población, con características de SC, a nivel global (Pastrana y cols., 2011). Además este ensayo se utiliza extensivamente con diversos fines que incluyen desde la disección de los mecanismos moleculares que regulan los procesos de auto-renovación y diferenciación hasta el estudio de las modificaciones que sufren las NSC y su progenie en los procesos patológicos (cáncer, lesión cerebral, etc.) y de envejecimiento (Pastrana y cols., 2011).

Para la obtención de un mayor conocimiento sobre la biología de las NSC de la SEZ, será necesario el desarrollo de nuevos ensayos *in vitro* que superen las limitaciones, anteriormente descritas, del ensayo de formación de esferas. Dichos ensayos deberán asegurar la clonalidad y eliminar las alteraciones del potencial de diferenciación o del tamaño en los procesos de auto-renovación y multipotencia. En combinación con métodos de purificación, que no alteren el patrón de expresión propio de las células, permitirá el estudio comparativo entre las NSC y su progenie de forma exhaustiva. El uso de modelos de trasplante y de trazado de linajes, de las poblaciones de la SEZ, podrá complementar el conocimiento del potencial *in vivo* de estas (Pastrana y cols., 2011).

3.- Envejecimiento y neurogénesis adulta

El envejecimiento de un sistema biológico puede definirse como un fenómeno complejo caracterizado por la pérdida progresiva de la homeostasis debido a la disminución de las capacidades que mantienen esta frente a los diversos estímulos, tanto intrínsecos como extrínsecos. En muchos tejidos, esta disminución en la homeostasis y capacidad regenerativa depende de cambios en la función de las SC tejido-específicas y otros progenitores. El proceso de envejecimiento se considera que comienza cuando se ha completado el proceso de desarrollo y se ha alcanzado un fenotipo estable que se mantendrá durante la edad adulta. Este proceso continúa progresando hasta la muerte, llegándose a considerar la etapa final del desarrollo del individuo. Sus consecuencias comprenden desde el nivel celular al sistémico y en función de estas, el proceso, puede considerarse exitoso o patológico. En mamíferos se asocia con la disminución en la regeneración tisular y en el caso patológico con el incremento en las enfermedades degenerativas y el cáncer (Sharpless y DePinho, 2007; Signer y Morrison, 2013; Boyette y Tuan, 2014).

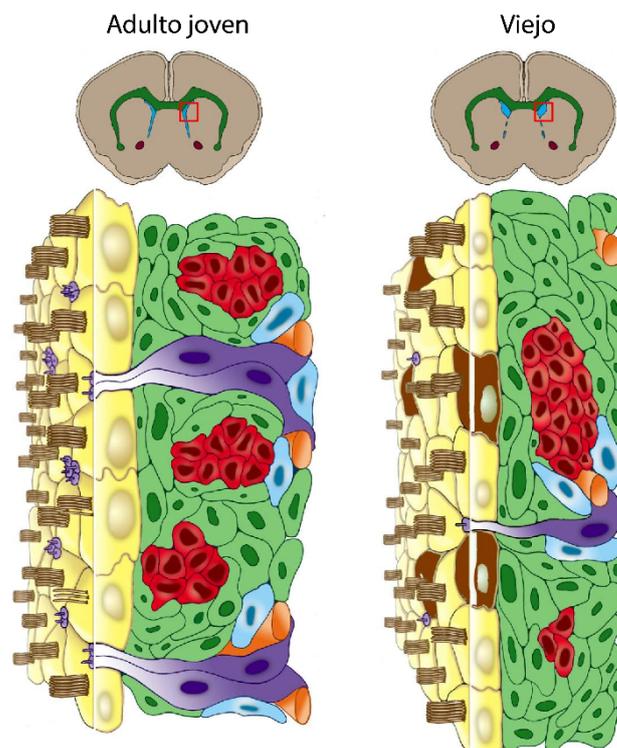
3.1.- Cambios en la zona subependimaria durante el envejecimiento

El cerebro envejecido posee un potencial de recuperación más limitado y una susceptibilidad mayor a las enfermedades degenerativas y lesiones (Conover y Shook, 2011). En consecuencia, se observa una disminución de la neurogénesis y un incremento de la neurodegeneración (Kuhn y cols., 1996; Tropepe y cols., 1997; Enwere y cols., 2004; Maslov y cols., 2004; Luo y cols., 2006; Molofsky y cols., 2006; Ahlenius y cols., 2009; Stoll y cols., 2011; Shook y cols., 2012). Con el aumento de edad, el nicho de la SEZ va deteriorándose y debido a ello disminuye su capacidad regenerativa. Entre las alteraciones citoarquitectónicas observadas en la SEZ durante el envejecimiento, destaca la fusión o *estenosis* ventral de las paredes de los LV, dando lugar a una reducción de la SEZ. Este fenómeno fue descrito en ratones de 19 a 22 meses, en cuya zona ventral se pierde el epéndimo y consecuentemente las células que componen la SEZ, quedando la zona neurogénica restringida principalmente a la región dorsolateral y por lo tanto disminuyendo el número de neuroblastos migradores y de TAP (Luo y cols., 2006). Por otra parte la cavidad ventricular se alarga, resultando en un *adelgazamiento de la monocapa endimaria* existente, con la necesidad de mantener la integridad de la barrera ventricular (Luo y cols., 2006).

En las zonas que permanecen activas se observan anormalidades, como el aumento del número de *astrocitos de la SEZ interpuestos en la capa endimaria* y contactando con el lumen del ventrículo (figura 11). Estos se originan a partir de astrocitos mitóticamente activos, sus núcleos se posicionan alineados con las células endimarias y mantienen la integridad del límite endimario mediante uniones adherentes con estas. Además, algunos de ellos tienen

características antigénicas y morfológicas de células endimarias, incluyendo múltiples cuerpos basales de cilios móviles (estructura 9+2), forma cúbica, expresión de S100 β y posicionamiento apical de mitocondrias (Luo y cols., 2006). En el mismo trabajo, también se observó la presencia de un único cilio en algunos de los astrocitos interpuestos, un indicador de precursor neuronal (Doetsch y cols., 1999a; Doetsch y cols., 1999b; Conover y cols., 2000; Luo y cols., 2006). Entre las células que conformaban la línea endimaria, en animales viejos, varias co-expresaban GFAP y S100 β . Todos estos resultados indicaban que los astrocitos de la SEZ incorporados al epéndimo podrían asumir características de células endimarias (Luo y cols., 2006). Se ha observado que tras un daño severo en el epéndimo, en lugar del reemplazamiento de las células endimarias, sucede una reparación inmediata que resulta en una cicatriz glial. Por el contrario, un daño moderado trae consigo un reemplazamiento similar al que sucede durante el envejecimiento (Conover y Shook, 2011). Estos hallazgos nos indican la relevancia del mantenimiento de la integridad de la capa endimaria. La inserción de astrocitos parece ser una forma de reparación regenerativa asociada con la edad.

Figura 11. Cambios citoarquitectónicos en la zona subependimaria durante el envejecimiento. En la parte superior, sección coronal del cerebro de un individuo adulto joven (izquierda) y de un individuo viejo (derecha). Debido al proceso de estenosis de las paredes de los ventrículos laterales, sólo la zona subependimaria (SEZ) dorsolateral permanece proliferativa y el ventrículo dorsal (azul) se expande. Los cuadros rojos indican la zona de la SEZ dorsolateral detallada en la parte inferior. En la parte inferior, citoarquitectura de la SEZ en ambos grupos de edad. En la SEZ envejecida, la monocapa de células endimarias (amarillo) disminuye su grosor. Se observa una disminución significativa en las NSC (violeta), neuroblastos (rojo) y células tipo C (azul). Los vasos sanguíneos (naranja) sufren una modificación de su disposición. Además, algunos astrocitos (verde) se incorporan en la capa endimaria (marrón). Modificado de Conover y Shook, 2011.



Otra alteración en la citoarquitectura del nicho de la SEZ es el *cambio en la disposición de los vasos sanguíneos*. En la zona anterior de los LV, de ratones viejos (19-22 meses), se observa una reorientación de 90°, cuyo origen se presupone consecuencia de la estenosis de la pared ventral (Luo y cols., 2006).

En la SEZ se ha demostrado la alteración, durante el envejecimiento, de diversos parámetros asociados con la neurogénesis (Tropepe y cols., 1997; Enwere y cols., 2004; Maslov y cols., 2004; Luo y cols., 2006; Ahlenius y cols., 2009; Stoll y cols., 2011; Shook y cols., 2012; ver revisión Hamilton y cols., 2013). Múltiples trabajos han descrito una disminución de entre un 50 y un 70 % en el número de células con capacidad proliferativa de la SEZ en ratones de mediana edad (10 a 14 meses) respecto a adultos jóvenes (2 meses) (Tropepe y cols., 1997; Luo y cols., 2006). Dicha caída en la proliferación incluye múltiples tipos celulares de la SEZ, las NSC en estado proliferativo disminuyen un 38 % mientras que los neuroblastos proliferantes lo hacen en un 58 % (Ahlenius y cols., 2009). Los estudios comparativos de la proliferación, entre grupos de distinta edad, indican que el descenso de esta sucede entre los 2 y los 10 meses de edad, manteniéndose constante entre los grupos de mediana edad (10 a 14 meses) y edad avanzada (15-26 meses) (Hamilton y cols., 2013). Estudios de IHQ y microscopía electrónica indican una *disminución* entre el 65 y 75 % en el número de TAP (Luo y cols., 2006; Bouab y cols., 2011). Con respecto a la población de NSC, diversos trabajos indican una caída drástica en su número. Entre los resultados que lo apoyan se encuentra la disminución en el número de LRC (del inglés *Label Retaining Cells*), *pinwheels* y astrocitos contactando con el ventrículo, observados mediante la técnica de WM, que se asume que son NSC (Bouab y cols., 2011; Conover y Shook, 2011; Shook y cols., 2012). Los ensayos de neuroesferas, en general, no muestran cambios en el número de células formadoras de esferas (Hamilton y cols., 2013). No obstante, como se ha mencionado anteriormente, las características del propio ensayo, así como los parámetros y cepas utilizadas, impiden hacer de esta una lectura precisa del número de SC. En general, los parámetros relacionados con la neurogénesis permanecen relativamente estables a partir de los 10 meses de edad (Hamilton 2013). No obstante, el proceso de muerte celular parece estar incrementado en las edades más avanzadas, respecto a la mediana edad (Luo y cols., 2006).

Varios trabajos describen alteraciones en el ciclo celular de las poblaciones de la SEZ durante el envejecimiento (Tropepe y cols., 1997; Luo y cols., 2006; Stoll y cols., 2011; Shook y cols., 2012). Estas son complejas y solamente se comprenden parcialmente. El tiempo promedio del ciclo celular de los TAP en la SEZ de ratones adultos jóvenes se estima en unas 12,5 h (Morshead y van der Kooy, 1992), mientras que la duración del ciclo celular de la población, relativamente quiescente, de las NSC se estimó en 28 días (Morshead y cols., 1994). Basándose en dichos estudios y mediante un doble marcaje para timidina tritiada (H3) y BrdU, Tropepe y colaboradores demostraron que esta población disminuye la duración de su ciclo celular *in vivo* en ratones de edad avanzada (23-25 meses) respecto a individuos adultos jóvenes (2 meses), asociándolo con la disminución del factor de crecimiento TGF- α (Tropepe y cols., 1997). Un trabajo posterior confirmó, mediante un pulso de BrdU e IHQ para Ki67 (marcador de células proliferantes), el alargamiento del ciclo celular en los TAP de los individuos de edad avanzada (22 meses) (Luo y cols., 2006). En cambio, el análisis de los ratones de mediana edad (10 meses) no mostró diferencias significativas en la duración del ciclo respecto a los ratones adultos jóvenes (2 meses). Otros recuentos indicaron un incremento en la salida de ciclo, de los TAP, entre ambos grupos de edad. Por el contrario, el estudio *in vitro* de las células formadoras de esferas,

mediante pulsos de IdU y CldU, indicó que pese a que un menor número de células se encuentran en proliferación en un mismo tiempo y presentan una viabilidad reducida, estas sufren un mayor número de divisiones celulares en los ratones de edad avanzada (18 meses) respecto a los adultos jóvenes (3 meses) (Stoll y cols., 2011). Se desconoce si disminuye selectivamente una población de células que se divide más lentamente o si, por el contrario, la progresión del ciclo celular se ve acelerada en las células que se mantienen. Los autores sugieren que la duración del ciclo celular no varía entre grupos. No obstante, es posible que el incremento en la entrada en ciclo se deba a un acortamiento de la fase G1, impidiendo distinguir experimentalmente entre la alteración en la longitud del ciclo y la reentrada en el ciclo celular. El conjunto de resultados anteriores sugieren que los TAP incrementan su resistencia a las señales proliferativas *in vivo* y/o que en el proceso de envejecimiento el nicho disminuye su capacidad de mantenimiento de las células (Hamilton y cols., 2013). Una reciente publicación indica que la disminución en la población de NSC no viene acompañada de una caída en el número de ellas en estado proliferativo en ratones de edad avanzada (24 meses) respecto a adultos jóvenes (3 meses) (Shook y cols., 2012). Por lo tanto, este trabajo demuestra un incremento en el porcentaje de NSC *in vivo* que se encuentran mitóticamente activas en la SEZ de individuos de edad avanzada.

La disminución de la neurogénesis en la SEZ, durante el envejecimiento no patológico, y el consecuente descenso en el reemplazamiento neuronal en el OB, viene vinculado a una alteración en las tareas de reconocimiento, discriminación e identificación olfativas (Enwere y cols., 2004; Rey y cols., 2012). Aunque los motivos de dicha disminución funcional no están claramente definidos, podrían deberse, al menos en parte, a las alteraciones en la neurogénesis (ver revisión Mobley y cols., 2014).

3.2.- Mecanismos asociados al envejecimiento en las células madre neurales

En numerosos trabajos, la tendencia a investigar el envejecimiento mediante el uso de individuos viejos ha permitido identificar las consecuencias del proceso. No obstante, el estudio de los remanentes neurogénicos, que se mantienen tras la decadencia, puede añadir fuentes de variabilidad que dificulten averiguar las causas que originan el envejecimiento (Hamilton y cols., 2013).

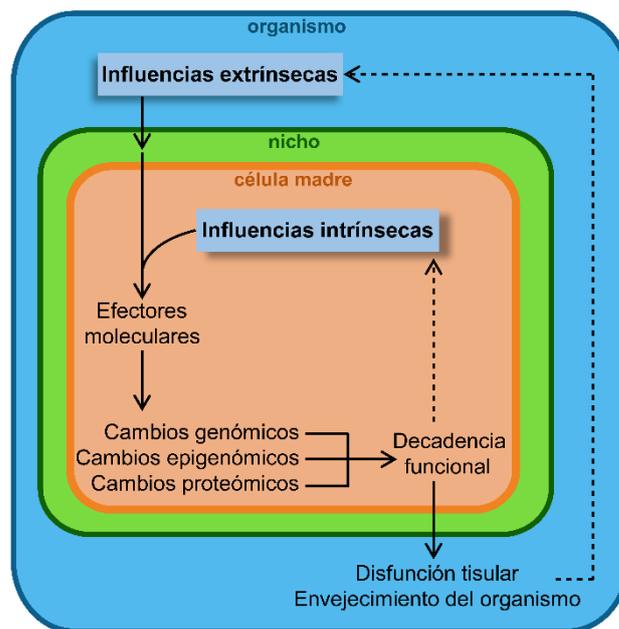
Se distinguen dos formas de envejecimiento celular que median el proceso de decadencia a nivel tisular. Uno de ellos es el *envejecimiento cronológico*, este afecta a todas las células y sucede como resultado del desgaste de la célula con el transcurso del tiempo. Entre otros factores, el envejecimiento cronológico, se debe a la acumulación de macromoléculas dañadas o agregados de ellas con el paso del tiempo. Estas macromoléculas (proteínas, lípidos y ácidos nucleicos) pueden agregarse de forma estable, perdurando y resultando tóxicas para la célula (Rajawat y cols., 2009; Koga y cols., 2011). Las células proliferantes, además, están sujetas al denominado *envejecimiento replicativo*. Este resulta en el deterioro de la capacidad proliferativa de las SC y TAP, debido al daño en el DNA y al acortamiento de los telómeros

acoplado al proceso de división. Este proceso de envejecimiento determina un número finito de divisiones celulares posibles (límite de Hayflick), a partir del cual la célula entra en senescencia (Hayflick, 1965; Rando, 2006).

Los daños asociados con el envejecimiento pueden ser el resultado de *influencias autónomo-celulares y/o no autónomo-celulares* (figura 12). Las primeras son las que suceden en las propias SC y su linaje. Las segundas, extrínsecas a la célula afectada, son tanto de procedencia local como sistémica (Morrison y Spradling, 2008). Ambas pueden afectar a cualquier nivel de la vía neurogénica: propiedades del ciclo celular de las NSC y TAP, capacidad de expansión de los TAP, muerte celular a cualquier nivel y especificación de linaje y destino celular; contribuyendo al envejecimiento del organismo (Hamilton y cols., 2013). Las alteraciones causadas de forma extrínseca pueden ser debidas, en último término, a influencias intrínsecas de otras células/tejidos durante el proceso global de envejecimiento o senectud, de tal forma que se trata de procesos interrelacionados (Sharpless y DePinho, 2007). Todo parece indicar que en el transcurso del envejecimiento muchas vías de señalización se encuentran afectadas (Conover y Shook, 2011).

Figura 12. Influencias extrínsecas e intrínsecas en el envejecimiento de las células madre.

Representación del espacio celular (naranja), el nicho (verde) y el resto del organismo (azul). Los cambios sistémicos asociados con la edad pueden desencadenar alteraciones en las cascadas de señalización de las células. Estas alteraciones extrínsecas también pueden ser transmitidas indirectamente, a través de cambios perjudiciales en el nicho. Mientras, durante el envejecimiento celular suceden cambios intrínsecos. Tanto las influencias extrínsecas como intrínsecas convergen en efectores moleculares que desencadenan cambios reversibles e irreversibles en las macromoléculas de la célula. La combinación de dichos cambios conlleva a la decadencia de la función celular, que al mismo tiempo contribuye a la disfunción tisular y al envejecimiento general del organismo. Modificado de Liu y Rando, 2011.



Se desconocen los motivos concretos por los que disminuye la neurogénesis con la edad. Una posibilidad es que la presión selectiva no haya sido suficiente para mantener los niveles de neurogénesis tras la edad reproductiva. Alternativamente es posible que los mecanismos celulares restrinjan la neurogénesis, con el avance de la edad, como mecanismo protector frente al desarrollo de tumores y/o el agotamiento de las SC, promoviendo así la homeostasis del tejido envejecido.

La *acumulación del daño en macromoléculas* se ha postulado como una de las causas del desgaste celular y de la disminución de la función de las SC en el envejecimiento (Kirkwood, 2005). El DNA sufre mutaciones como resultado de errores de replicación, exposición a agentes mutagénicos endógenos tales como las especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*) y exposición a agentes mutagénicos exógenos tales como la luz UV o la radiación ionizante. Ante esta situación se activan una variedad de mecanismos de reparación, incluyendo reparación por escisión de nucleótidos, reparación de desapareamiento de bases, recombinación no homóloga de extremos y recombinación homóloga (Ciccía y Elledge, 2010). Parte del daño en el DNA no llega a ser reparado o es reparado incorrectamente y se va acumulando durante toda la vida. Ante la acumulación de estas alteraciones, el ciclo celular puede enlentecerse para favorecer la reparación del DNA. Cuando el daño acumulado es tal que perturba el funcionamiento correcto de la SC, esta sufre uno de los siguientes destinos: transformación, senescencia, apoptosis o disfunción. Si el proceso afecta a suficiente proporción de la población, el compartimento de SC no puede suplir las necesidades regenerativas del órgano y en consecuencia falla su homeostasis (Sharpless y DePinho, 2007). La incidencia del cáncer aumenta dramáticamente con la edad debido a la acumulación de mutaciones sin reparar. El elevado tiempo cronológico de las poblaciones de ASC y su capacidad de proliferación les confieren capacidad para acumular mutaciones y expandir el reservorio de células mutadas, características críticas en la evolución de un cáncer. No obstante, no todos cánceres provienen de SC, incluso si las principales mutaciones carcinógenas se acumulan en las SC, la mutación final que causa la transformación puede tener lugar en los múltiples progenitores restringidos o en las células diferenciadas cuyo origen se encuentra en las SC (Signer y Morrison, 2013). Gran variedad de síndromes de envejecimiento prematuro son debidos a mutaciones en genes implicados en el mantenimiento de la integridad del DNA mediante el control de la respuesta de los *checkpoint* (puntos de control) del ciclo, reparación del DNA o estructura nuclear. Entre ellos se encuentran el síndrome de Werner, patología de herencia autosómica recesiva causada por la disfunción de la DNA helicasa RecQ12 (codificada por el gen WRN), y Ataxia Telangiectasia, enfermedad de herencia recesiva causada por la pérdida de función de la proteína de respuesta a daño en el DNA (DDR, del inglés *DNA damage response*) ATM (Martin, 2005). Esto sugiere que la integridad del DNA tiene un papel crucial en la prevención del envejecimiento prematuro.

El *acortamiento de los telómeros* representa una forma específica de daño en el DNA, que en ausencia de actividad telomerasa no puede ser reparado y tras alcanzar estos una longitud crítica, la célula muestra inestabilidad genómica y sufre el arresto de ciclo, senescencia o apoptosis. En conjunto este proceso conlleva a la disminución de la función de las SC y en último término al envejecimiento del organismo. La actividad telomerasa está generalmente ausente en el cerebro adulto, pero permanece detectable en el sistema SEZ-OB (Caporaso y cols., 2003). Su eliminación conlleva una extensa aceleración del envejecimiento, incluyendo la supresión de la neurogénesis de la SEZ y la olfacción (Wong y cols., 2003; Ferron y cols., 2004). Estas pueden ser restauradas mediante la recuperación de la expresión de la telomerasa (Jaskelioff y cols., 2011). Asociada al envejecimiento de la SEZ, decae la expresión de TERT

(subunidad de la telomerasa con actividad de transcriptasa reversa), acortándose los telómeros y en consecuencia disminuyendo los niveles de proliferación de las NSC y la neurogénesis (Caporaso y cols., 2003; Ferron y cols., 2004; Flores y cols., 2008; Allen y Baird, 2009; Ferron y cols., 2009). Por todo ello se sabe que la longitud de los telómeros puede limitar la longevidad en algunas especies. No obstante los telómeros de ratón son más largos que los de humano, por lo que la disfunción de estos no parece ser la causa principal del agotamiento de sus SC en condiciones normales (Lee y cols., 1998; Rudolph y cols., 1999).

Todos los mecanismos de DDR dan lugar a la activación de mecanismos de supresión de tumores, como senescencia y apoptosis, a través de la vía de p53, que a su vez es estabilizado por las quinasas ATM y ATR (Sharpless y DePinho, 2007). El aumento de la actividad de p53 puede tanto contribuir al envejecimiento como evitarlo. El efecto pro-envejecimiento de p53 se basa en la disminución de la capacidad de auto-renovación de las NSC del nicho e inducción de senescencia y por lo tanto en la reducción de la homeostasis, pudiendo incluso acortar la esperanza de vida. Además perjudica la biogénesis mitocondrial, actividad mitocondrial y función metabólica (Sahin y cols., 2011). No obstante, el aumento moderado de los supresores de tumores en la DDR puede proteger frente a la inestabilidad genómica, incrementando la longevidad. Este incremento no es explicado únicamente por la reducción de la incidencia del cáncer, sino que la disminución/supresión de procesos de proliferación patológica (displasias) y de diferenciación aberrante, también pueden contribuir al mantenimiento de la homeostasis del tejido durante el transcurso del envejecimiento (Garcia-Cao y cols., 2002; Matheu y cols., 2004; Matheu y cols., 2007).

La CR (*restricción calórica en la dieta*) consiste en la ingesta de alimentos por debajo de la libre alimentación, sin llegar a causar malnutrición (Ribaric, 2012). Diversos estudios indican que esta restricción puede incrementar la función de SC o ralentizar la caída en la función de las SC durante el envejecimiento en múltiples tejidos (Lee y cols., 2000; Chen y cols., 2003; Mair y cols., 2010). No obstante, el incremento en la longevidad, a causa de la CR, sucede o no en función de la cepa y del estudio. Este efecto no ha sido observado en ciertas cepas murinas (Harrison y Archer, 1987) y mientras que ha sido descrito en un estudio en monos (Colman y cols., 2009) no ha sido observado en otro (Mattison y cols., 2012). Se cree que los efectos de la CR suceden a través de la modulación de TOR (*target of rapamycin*). TOR es una serina/treonina quinasa que induce la síntesis de proteínas y el crecimiento celular y es activada mediante señales indicadoras de la disponibilidad de energía (Laplante y Sabatini, 2012). A su vez TOR también modula la función de las células madre, incrementando la proliferación de NSC y TAP. Dichos estudios predicen que la reducción de la señalización de TOR puede atenuar la caída de la función de las SC durante el envejecimiento (Signer y Morrison, 2013). Además, la CR disminuye las tasas de metabolismo y en consecuencia el nivel de daño oxidativo, cuya implicación en el proceso de envejecimiento detallamos en el siguiente apartado.

Durante el envejecimiento la capacidad de regular la homeostasis del proteoma, también denominada *proteostasis*, decae. Las proteínas mal plegadas o dañadas pueden alterar las

membranas, formar agregados tóxicos y causar muerte celular. Múltiples enfermedades neurodegenerativas y desordenes metabólicos relacionados con el envejecimiento se asocian con alteraciones en la proteostasis. Las denominadas chaperonas ayudan en el plegamiento de las nuevas proteínas, evitando su agregación y protegiéndolas de estrés oxidativo y térmico. El sistema ubiquitina-proteasoma y procesos de autofagia son los encargados de eliminar las proteínas innecesarias, mal plegadas, dañadas o agregadas. Dichos mecanismos intervienen en la proteostasis celular, activando en situaciones extremas respuestas globales, como parada de ciclo o apoptosis. Existen mecanismos comunes de regulación de la proteostasis y del comportamiento de las SC. Por ello es importante caracterizar los mecanismos que regulan la proteostasis en las SC y su influencia sobre estas durante el envejecimiento. Las hipótesis actuales plantean el estrés proteotóxico como un determinante de la esperanza de vida (Balch y cols., 2008; Signer y Morrison, 2013).

En el tejido de mamífero adulto-joven, en situación de homeostasis, el crecimiento se ralentiza y muchas SC presentan una reducida actividad metabólica o estado quiescente la mayor parte del tiempo (Zhang y Ju, 2010). Estas se dividen intermitentemente, de tal forma que evitan los peligros subyacentes a la replicación del DNA y mitosis continuadas, manteniendo la homeostasis. Otra ventaja de este comportamiento de las SC es la disminución de los niveles de productos metabólicos que inducen daño en el DNA como las ROS. En mamíferos viejos las SC restringen su potencial proliferativo incrementando la duración del ciclo celular, promoviendo la entrada en quiescencia y/o senescencia. Para ello incrementan la expresión de supresores de tumores, reduciendo tanto la incidencia de cáncer como la capacidad regenerativa. Dichos cambios reflejan la regulación por *genes heterocrónicos*, cuya expresión en las SC varía con el tiempo, de tal forma que causan cambios temporales en la función de las mismas. Entre los genes supresores de tumores cuya expresión se incrementa en la SEZ, de forma dependiente de la edad, se encuentran varias CKI pertenecientes a los *locus Ink4a/Arf* y *Cip/Kip* (ver apartado 2.3.3. de esta introducción). Es posible que este aumento intervenga parcialmente en la decadencia asociada con la edad, reduciendo la frecuencia de SC y su potencial de auto-renovación en múltiples tejidos (Krishnamurthy y cols., 2004; Molofsky y cols., 2006). Pese a su influencia en la proliferación y neurogénesis, no se sabe con certeza si los cambios con la edad en estos supresores de tumores están implicados en el proceso de envejecimiento (Hamilton y cols., 2013). p16 se une e inhibe a CDK4 y CDK6, lo que a su vez impide la actividad supresora de crecimiento de RB, activando en último término el proceso de senescencia y eliminando ciertos progenitores diferenciados (Janzen y cols., 2006; Krishnamurthy y cols., 2006; Molofsky y cols., 2006). p19 promueve la estabilidad de p53 mediante la inhibición por degradación de MDM2, desencadenando los procesos de apoptosis o senescencia (Harris y Levine, 2005). La regulación de la expresión de p16 y p19 se debe a múltiples mecanismos, entre los que se encuentran los factores de transcripción del complejo PcG, Bmi1 y Ezh2, que promueven la proliferación y auto-renovación mediante la inhibición del *locus Ink4a/Arf* (Molofsky y cols., 2003; Molofsky y cols., 2005; Molofsky y cols., 2006). En células β pancreáticas se ha observado la caída en la expresión de Ezh2, si bien no se ha comprobado su contribución en el resto de tejidos

(Signer y Morrison, 2013). El factor asociado a cromatina Hmga2 regula negativamente p16 y p19. Durante el envejecimiento aumenta la expresión del microRNA let-7, a su vez este reduce la expresión de Hmga2 y en consecuencia se incrementa la expresión de los supresores de tumores p16 y p19 (Nishino y cols., 2008; Hamilton y cols., 2013).

Los *mecanismos no autónomo-celulares* que afectan a la neurogénesis durante el envejecimiento se pueden dividir en dos fenómenos: la disminución de señales que promueven la neurogénesis y el aumento de las que la inhiben. La extensa variedad de factores secretados en el nicho de la SEZ e implicados en la regulación de las NSC (ver apartado 2.3. de esta introducción), hace previsible una desregulación de alguno de estos como causa subyacente al deterioro de la neurogénesis con la edad (Hamilton y cols., 2013). Mediante experimentos de parabiosis heterocrónica (comunidad del sistema circulatorio de dos individuos de distinta edad), se ha demostrado que algunos cambios asociados al envejecimiento son parcialmente reversibles e influenciados por factores circulantes, tanto células como factores solubles, que varían con la edad (Villeda y cols., 2011; Ruckh y cols., 2012). Entre las señales sistémicas que regulan las SC y el proceso de envejecimiento se encuentran las hormonas circulantes insulina e IGF1. Es por ello que ratones con niveles reducidos de insulina o IGF1 muestran un envejecimiento ralentizado y una esperanza de vida incrementada (Tatar y cols., 2003). Por otra parte la acumulación de células senescentes en los tejidos envejecidos puede afectar a otras células. Cuando una célula pasa a estado senescente, pierde irreversiblemente su capacidad para dividirse y comienza a secretar factores asociados con inflamación, reguladores de crecimiento, proteasas y otras moléculas de señalización (Coppe y cols., 2010). Dichos factores promueven senescencia e inflamación y promueven o inhiben el crecimiento de tumores. La eliminación de p16 reduce el número células senescentes y atenúa la progresión de patologías asociadas con la edad. Por otro lado, la eliminación de p16 conduce a la re-activación de células satélite del músculo esquelético en ratones envejecidos (Sousa-Victor y cols., 2014). Esto plantea la cuestión del alcance de p16, de forma autónomo-celular o no autónomo-celular, sobre las SC en el envejecimiento (Baker y cols., 2011). Además otros cambios en el nicho neurogénico envejecido han sido descritos, como alteraciones en la composición del CSF (Zhang y cols., 2005; Baird y cols., 2012), cambios citoarquitectónicos en la SEZ (ver apartado anterior) y acumulación de gotas lipídicas en el epéndimo (Bouab y cols., 2011).

La acumulación de daño oxidativo se ha postulado como otra de las causas de la pérdida de función de las SC en el envejecimiento (Kirkwood, 2005). Además de su efecto directo sobre las macromoléculas, el estado redox celular está implicado indirectamente en la modulación del ciclo celular y por lo tanto del estrés replicativo y guarda relación con los fenómenos observados en la CR. Es por ello que, pese a tratarse de otro mecanismo asociado al envejecimiento en las NSC, le dedicamos un apartado específico (3.3.- Estrés oxidativo en el envejecimiento) más adelante.

Uno de los objetivos de la medicina regenerativa, es la estimulación de la población de NSC endógenas, evitando comprometer sus capacidades (por ejemplo con el agotamiento de la

población de las NSC). Aunque se han descrito diversos mecanismos que subyacen a la disminución de la función de las ASC en el envejecimiento, todavía se desconocen con precisión las causas moleculares del envejecimiento no patológico de las ASC. Por ello, el estudio de los mecanismos por los que decae la capacidad regenerativa de las ASC, con la edad y con las enfermedades asociadas al envejecimiento, será esencial en futuras terapias de reemplazamiento neuronal a partir de las NSC endógenas (Liu y Rando, 2011).

3.3.- Estrés oxidativo en el envejecimiento

El estrés oxidativo se define como la ausencia de homeostasis entre la generación de especies reactivas de oxígeno/nitrógeno (ROS/RNS, del inglés *reactive oxygen/nitrogen species*) y la capacidad de los sistemas de protección antioxidante, en un organismo, que son incapaces de contrarrestarlas (Pisoschi y Pop, 2015). Este puede ser debido tanto a la disminución de la capacidad antioxidante como al incremento en la generación de ROS o RNS. El concepto de antioxidante biológico hace referencia a cualquier compuesto que, cuando se encuentra a baja concentración respecto a un sustrato susceptible de ser oxidado, es capaz de retrasar o prevenir su oxidación (Pisoschi y Pop, 2015). Estos compuestos, enzimáticos o no enzimáticos, previenen la aparición de especies reactivas o bloquean y capturan los radicales formados. También existen procesos de reparación o eliminación de las biomoléculas dañadas, por el estrés oxidativo o nitrosidativo, que alteran el metabolismo celular: reparación de ácidos nucleicos mediante enzimas específicas, eliminación de proteínas oxidadas mediante sistemas proteolíticos y reparación de lípidos oxidados mediante fosfolipasas, peroxidasas o acil-transferasas (Cheeseman y Slater, 1993).

El cerebro es un ambiente altamente oxidante y particularmente vulnerable al estrés oxidativo debido a la alta tasa de consumo de oxígeno (O_2), contenido lipídico abundante y relativa escasez de enzimas antioxidantes, comparado con otros tejidos (Halliwell, 2006). En el SNC, el balance entre la generación y degradación de especies reactivas se encuentra altamente controlado. Diversos trabajos han sugerido que la ruptura de este equilibrio contribuye a múltiples enfermedades y al envejecimiento (ver revisión Calabrese y cols., 2007). La homeostasis *redox* de las células, en mamíferos, está asegurada por un complejo *sistema de defensa antioxidante* endógeno (figura 13), que incluye enzimas antioxidantes endógenas (por ejemplo, superóxido dismutasa [SOD], catalasa [CAT], glutatión peroxidasa [GPx]) y componentes no enzimáticos como glutatión (GSH), algunas proteínas (ferritina, transferrina, ceruloplasmina y albúmina) y agentes neutralizadores (*scavengers*) de ROS de bajo peso molecular (por ejemplo, ácido úrico, coenzima Q y ácido lipoico). A su vez las enzimas antioxidantes pueden catalizar la síntesis de antioxidantes no enzimáticos. Además el organismo incorpora antioxidantes exógenos, procedentes de la dieta, como las vitaminas C y E, carotenoides y compuestos fenólicos. Los niveles de expresión de las distintas enzimas del sistema de defensa antioxidante varían según el organismo y tejido. Las SOD transforman el anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$) en peróxido de hidrógeno

(H₂O₂). En los tejidos de mamíferos existen tres tipos: la SOD1 o CuZn presente en el citosol, la SOD2 o Mn presente en la matriz mitocondrial y la SOD3 presente en el espacio extracelular. Otra enzima abundante del sistema de defensa antioxidante es la CAT, esta cataliza la descomposición del H₂O₂ en O₂ y agua (H₂O). La GPx reduce el H₂O₂ e hidroperóxidos orgánicos a H₂O o el correspondiente alcohol, utilizando GSH como dador de electrones, cuyos grupos tiol se oxidan formando puentes disulfuro y generando disulfuro de glutatión o glutatión oxidado (GSSG) (ver revisión Pisoschi y Pop, 2015).

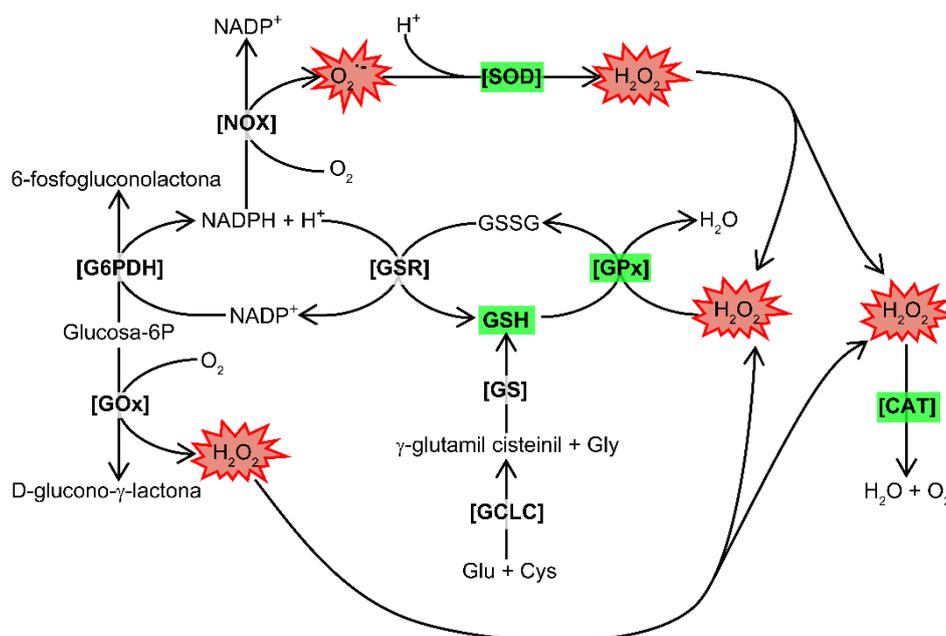


Figura 13. El sistema de defensa antioxidante de mamíferos. Reacciones implicadas en la regulación del balance *redox* de la célula. Con fondo verde se indican las enzimas antioxidantes endógenas glutatión peroxidasa (GPx), superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT), así como la posición del antioxidante glutatión (GSH) en el entramado de reacciones. El resto de enzimas representadas son: G6PDH (glucosa-6P-deshidrogenasa), GCLC (glutamato cisteína ligasa), GOx (glucosa oxidasa), GS (glutatión sintetasa), GSR (glutatión reductasa) y NOX (NADPH oxidasa).

En el entramado de reacciones del sistema de defensa antioxidante también actúan enzimas pro-oxidantes, que desencadenan la producción de especies oxidantes, compensando la generación de especies reducidas. Además de la implicación clásica de las ROS en la toxicidad celular, los recientes descubrimientos indicando su papel como segundos mensajeros en respuestas fisiológicas, han incrementado el interés en el estudio de la regulación de su producción (Poljsak y cols., 2013). Concretamente, algunos trabajos describen mecanismos reguladores de la función de las NSC, mediados por ROS (Le Belle y cols., 2011; Walton y cols., 2012). Entre las enzimas productoras de ROS en el SNC están las NADPH oxidasas (NOX), una familia de enzimas multiméricas que translocan electrones (del NADPH) a través de una membrana, de tal forma que generan ROS. Su subunidad catalítica, cuyas isoformas están codificadas por los genes *Nox* o *Duox*, posee la función oxidasa (Bedard y Krause, 2007; Nayernia y cols., 2014). El interés por el estudio de las NOX en el SNC radica, además del

conocimiento de la implicación en el estado *redox* en la célula, en la presencia de variaciones genéticas de la enzima, que pueden ser relevantes en la interpretación de estudios clínicos así como en la predicción de la disponibilidad a padecer enfermedades relacionadas. Otro motivo es la posibilidad de su modulación, con fines terapéuticos, mediante el tratamiento farmacológico, consiguiendo así el control del estado *redox* (Sorce y Krause, 2009).

La *teoría de los radicales libres* en el envejecimiento postula que la pérdida de función asociada al envejecimiento es debida a la acumulación progresiva e irreversible de daño oxidativo (Harman, 1956; Harman, 1972). Esta se basa en las siguientes tres premisas (Sohal y Weindruch, 1996): el grado de daño oxidativo a nivel molecular aumenta con el tiempo (Sohal y Brunk, 1992), una mayor esperanza de vida a nivel de especie o de individuo se correlaciona con menor acumulación de daño oxidativo (Sohal y Weindruch, 1996) y el incremento en la longevidad por regímenes tales como la CR se asocia con la disminución del daño oxidativo (Sohal y Forster, 2014). El origen del incremento de estrés oxidativo asociado con la edad puede deberse a tres factores diferentes: incremento en la tasa de generación de ROS (reducción de la integridad mitocondrial), disminución de las defensas antioxidantes y/o disminución en la eficiencia de reparación o eliminación de moléculas dañadas (Sohal y Weindruch, 1996). El incremento en el estrés conlleva daño en macromoléculas que a su vez generan mayor estrés oxidativo, generando un círculo vicioso (Harman, 1972; Stadtman, 2006). El aumento de la expresión de enzimas que transforman las ROS en otras especies no reactivas o menos reactivas, incrementa la longevidad y reduce la incidencia de ciertas enfermedades asociadas al envejecimiento, incluyendo el cáncer (Signer y Morrison, 2013). Un exceso de ROS en las NSC conlleva una proliferación anormal, malignidad y disminución de la capacidad de auto-renovación (Finkel, 2003; Rossi y cols., 2008; Sahin y Depinho, 2010; Oh y cols., 2014). Recientemente, se ha demostrado el papel esencial de las ROS en la señalización celular y homeostasis, sugiriendo para estas una actividad, dosis-dependiente, que puede explicar la compleja relación entre la producción de ROS, función de SC, longevidad y envejecimiento sano (Le Belle y cols., 2011; Ristow y Schmeisser, 2011). Múltiples mecanismos transcripcionales y metabólicos promueven el mantenimiento de las SC, al menos parcialmente, mediante la regulación de los niveles de estrés oxidativo, como por ejemplo los factores de transcripción FoxO y Prdm16 (Paik y cols., 2009; Chuikov y cols., 2010). El regulador de cromatina de la familia Policomb Bmi1 posee un papel en el mantenimiento de la función mitocondrial y de la homeostasis *redox* en las SC (Liu y cols., 2009). También la presencia de la molécula de DDR denominada ATM, cuya pérdida de función se asocia al desorden neurodegenerativo Ataxia Telangiectasia, se atribuye en parte al incremento en los niveles de estrés oxidativo (Carlessi y cols., 2013). Se ha demostrado la influencia de ATM sobre algunas poblaciones de ASC, mediante la regulación del estrés oxidativo (Ito y cols., 2004; Maryanovich y cols., 2012). PGC-1 promueve la expresión de enzimas detoxificantes de ROS, como GPx1 y SOD2, por lo que es probable que tenga un papel relevante en el envejecimiento y longevidad. Además, defectos en la función mitocondrial pueden acelerar fenotipos del envejecimiento y reducir la longevidad (Signer y Morrison, 2013).

4.- La cepa de ratones de senescencia acelerada (SAM)

En 1968, varias parejas de ratones de la cepa AKR fueron donadas por el Laboratorio Jackson (Bar Harbor, Maine, USA) al Departamento de Patología del Instituto de Investigación de Enfermedades Torácicas (actual Departamento de Embriología Médica y Neurobiología, Instituto para las Ciencias Médicas) de la Universidad de Kyoto, Japón (Takeda y cols., 1981). Mientras continuaba el cruce entre individuos emparentados (consanguinidad o endocría) AKR/J, para el mantenimiento de esta cepa consanguínea, observaron la presencia de ciertas camadas en las que la mayoría de los ratones mostraban un grado entre moderado y severo en la pérdida de actividad, caída de pelo y falta de brillo, lesiones perioftálmicas, aumento de lordocifosis y una esperanza de vida reducida (Takeda y cols., 1981). Se hizo evidente que estos fenotipos eran heredados por las siguientes generaciones. En 1975, de entre cinco camadas con severos signos de envejecimiento, fueron seleccionados los progenitores de las series “propensas a senescencia” (*senescence-prone* o series P). También fueron seleccionados individuos de tres camadas en las que el proceso de envejecimiento era normal, como progenitores de las series “resistentes a senescencia” (*senescence-resistant* o series R). A partir de estos progenitores, fue llevada a cabo la cría selectiva basada en datos del grado de senescencia (Hosokawa y cols., 1984), longevidad y fenotipos patológicos y la endocría, obteniendo las series denominadas P-1, P-2, P-3, P-4, P-5, R-1, R-2 y R-3 (Takeda y cols., 1981). Con el paso de las sucesivas generaciones, las series P-4, P-5 y R-3 no fueron exitosas. No obstante, fue posible establecer diversas variedades nuevas que cumplen el criterio de cepa pura. Para ello se efectuó la endocría durante más de 20 generaciones, obteniendo perfiles genéticos con homocigosidad estable y expresión estable de fenotipos. Actualmente existen 14 líneas SAMP (*senescence-accelerated mouse prone*) y 4 líneas SAMR (*senescence-accelerated mouse resistant*) (Takeda, 1999) (figura 14).

El promedio de la esperanza de vida en las series P es de 9,7 meses, un 40 % menos que las series R (16,3 meses) (Takeda y cols., 1994). El grado de senescencia a los 8 meses es aproximadamente del doble en las series P que en las R (7,97 frente a 3,94 respectivamente) (Takeda y cols., 1994). El coeficiente Gompertz, que indica la tasa de muerte a cada edad, es de 0,133 en las P y de 0,083 en las R (Takeda y cols., 1981). También fue observada la pérdida severa de peso corporal en las series P, respecto a las R (Takeda y cols., 1997). La incidencia común en ambas series (P y R) de otras alteraciones, sugieren una desviación genética de la cepa AKR/J original (Takeda y cols., 1981). Datos de marcadores inmunogenéticos y bioquímicos revelan al menos un genotipo en cada cepa SAM que difiere de la cepa original AKR/J. Dichos resultados, junto con un estudio genético para reconocer secuencias de retrovirus, sugieren un cruce accidental con otras cepas previamente a la selección de los progenitores de las series P y R en 1975 (Kitado y cols., 1994; Mori y Higuchi, 2004). Los estudios *post mortem* y estudios sistemáticos *in vivo* de los ratones SAM, mostraron como característica común de todas las cepas SAMP el inicio temprano y acelerado del envejecimiento y de las SAMR el envejecimiento

normal. No obstante, estas manifiestan varios fenotipos patológicos que a menudo son característicos de cada cepa. Entre ellos se encuentran alteraciones neurobiológicas como déficits en aprendizaje y memoria, desórdenes emocionales, ritmos circadianos anormales, déficits auditivos, etc. También muestran amiloidosis, osteoporosis, osteoartritis (enfermedad degenerativa de las articulaciones), cataratas, hiperinflación pulmonar, etc. La mayoría de los fenotipos patológicos observados en las cepas SAMP, son consecuencia directa de la senescencia fisiológica, cuya incidencia y severidad se incrementan con la edad (Takeda, 1999). Es por ello que los estudios del modelo SAM, con el fin de clarificar los mecanismos subyacentes al envejecimiento acelerado, pueden aportar información sobre los mecanismos fundamentales en el envejecimiento normal. Además diversos estudios de las cepas SAM intentan vislumbrar los mecanismos moleculares que originan las patologías asociadas con la edad. Entre ellos, cabe destacar un trabajo de secuenciación del exoma de 6 cepas SAMP y 3 cepas SAMR (Tanisawa y cols., 2013). Este proporciona una lista de genes, con mutaciones o polimorfismos característicos, que potencialmente pueden estar asociados a algunos fenotipos patogénicos comunes a estas cepas o propios de alguna de ellas.

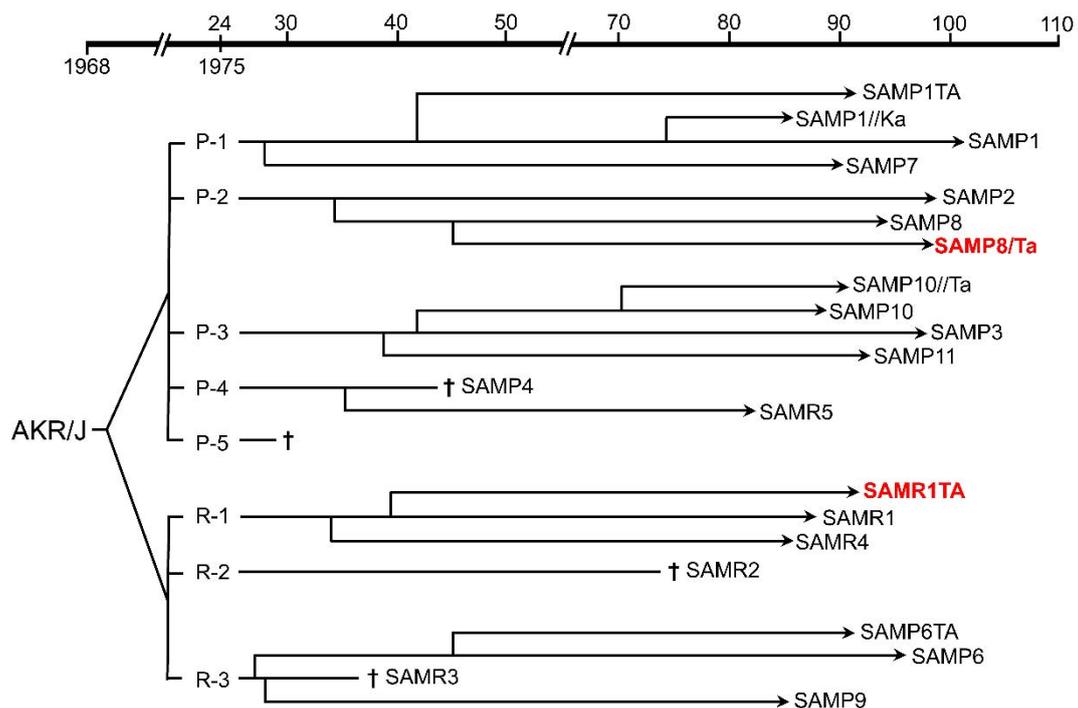


Figura 14. Linaje de las cepas SAM. Representación temporal de la generación de las distintas cepas SAM. El eje superior indica la generación y el año. † significa cría fallida o finalización del cruce. Las colonias de la zona libre de patógenos (SPF, del inglés *specific pathogens free*): SAMP1TA, SAMP8/Ta, SAMP10/Ta, SAMR1TA y SAMP6/Ta fueron generadas y mantenidas en las industrias químicas Takeda (Osaka, Japón) y la colonia SAMP11/Ka en el Instituto de Ciencias de Animales de Laboratorio de la Facultad de Medicina de la Universidad de Kagoshima en Japón. En letra roja se indican las dos cepas utilizadas en el presente trabajo (SAMP8/Ta y SAMR1TA). Modificado de Takeda, 1999.

El incremento en la esperanza de vida, en muchas poblaciones a lo largo de todo el mundo, ha traído consigo problemas médicos y sociales asociados al envejecimiento. Consecuentemente el campo de estudio del envejecimiento posee un gran interés económico y social. Las características del modelo SAM, descritas anteriormente, hacen estas cepas ventajosas en la investigación biogerontológica (Takeda, 1999).

4.1.- SAMP8, un modelo murino de desórdenes neurodegenerativos

Además del fenotipo de envejecimiento común a humanos de edad avanzada, propio de todas las cepas SAMP, las SAMP8 y SAMP10 han sido propuestas como modelos de neurodegeneración. Estas muestran alteraciones comportamentales asociadas con la edad como déficits en el aprendizaje y memoria, desórdenes emocionales y alteración de ritmos circadianos, asociados con determinados cambios patológicos, bioquímicos y farmacológicos (Takeda, 2009; Ito, 2013). En concreto, la cepa SAMP8 muestra degeneración esponjiforme en el tronco encefálico y médula espinal con la edad, y sobreexpresión de proteínas relacionadas con la enfermedad de Alzheimer (AD, del inglés *Alzheimer's disease*), indicando su validez como modelo de esta patología. Por el contrario, la cepa SAMP10 no muestra alteraciones asociadas a la AD. Sin embargo, esta presenta una atrofia severa, asociada con la edad, en el córtex frontal y entorrinal, amígdala y núcleo *accumbens*, indicando que es un modelo válido para el envejecimiento no patológico, pero inadecuado como modelo de la AD (Ito, 2013). Como cepa control respecto a las anteriores se ha utilizado la SAMR1, que posee un envejecimiento mayoritariamente normal. No obstante, los individuos viejos tienen predisposición al desarrollo de algún fenotipo patológico, como linfomas no tímicos, sarcomas histiocíticos y quistes en ovarios (Takeda y cols., 1997).

Los *estudios comportamentales* de la cepa SAMP8, respecto a la SAMR1, muestran discapacidades significativas en la adquisición y retención de la respuesta de evitación pasiva (Miyamoto y cols., 1986; Yagi y cols., 1988), tareas de evitación activa y tareas aprendizaje espacial (Takeda, 2009). También se ha observado una leve disminución, en los SAMP8, en la memoria de trabajo y memoria de referencia con el incremento de la edad. En conjunto, los resultados anteriores indican déficits en aprendizaje y memoria. Por otra parte, se han descrito desórdenes emocionales en los SAMP8. Estos incluyen un comportamiento de ansiedad reducida asociada a la edad. Estudios bioquímicos sugieren que el deterioro del sistema noradrenérgico puede estar implicado en dicho comportamiento, alterando en consecuencia las tareas de evitación pasiva, de tal forma que los déficits en aprendizaje y memoria pueden estar mediados, al menos en parte, por la reducida ansiedad o estrés, aunque la implicación de déficits cognitivos no puede ser excluida (Miyamoto, 1997). Los ratones SAMP8 también muestran modificaciones en la actividad motora espontánea y la conducta alimentaria respecto a la conducta característica de cualquier otra cepa control (incluido los SAMR1). Dichas observaciones indican alteraciones en los ritmos circadianos, cuya causa subyacente puede ser

el deterioro de sistemas de neurotransmisores o de núcleos encefálicos concretos (Miyamoto, 1997).

Los *cambios neuropatológicos* observados en los ratones SAMP8 se clasifican en los tipos A, B y C (Takeda, 2009). En las alteraciones tipo A se agrupan aquellas que se observan con frecuencia tanto en humanos como en roedores con el avance de la edad. Estas se consideran cambios fisiológicos más que patológicos. Entre ellos se encuentran agregados proteicos anormales en neuronas talámicas, reducción de la densidad de espinas en las porciones proximal y media de las dendritas basales de las neuronas piramidales del hipocampo, distrofia axonal esferoidal en el núcleo de la columna dorsal, astrogliosis y lipopigmentosis (Takeda, 2009). Las alteraciones de tipo B son similares, pero no idénticas, a las presentes en los cerebros de humanos con AD, como la acumulación de proteína β -amiloide ($A\beta$) en el cerebro de los ratones SAMP8 (Nomura y cols., 1996; Kumar y cols., 2000) formando estructuras granulares en el espacio similares a las placas amiloides extracelulares propias de la AD, cuyo aumento en número y densidad se encuentra asociado con la edad. Estos agregados han sido observados en diversas regiones de los ratones SAMP8, entre las que se encuentran el septum medial, córtex, hipocampo, cerebelo y algunos núcleos y raíces de los nervios craneales (Takemura y cols., 1993; Fukunari y cols., 1994; Morley y cols., 2000; Del Valle y cols., 2010; ver revisión Takeda, 2009). Los cambios de tipo C incluyen aquellos que son exclusivos de la cepa SAMP8. Entre ellos se encuentran las estructuras granulares positivas para ácido peryódico de Schiff (PGS, PAS [*periodic acid Schiff*]-positive granular structures). Se trata de estructuras redondas u ovoides de pequeño tamaño (unas 5 μm de diámetro), generalmente agrupadas y en estrecha relación con procesos astrocíticos. Estas estructuras se observan con frecuencia en hipocampo, corteza piriforme, tubérculo olfatorio, núcleo del cuerpo trapezoide y córtex cerebral. En el hipocampo de ratones SAMP8 aparecen a edad mucho más temprana que en los SAMR1, e incrementan su número conforme aumenta la edad (Akiyama y cols., 1986; Kuo y cols., 1996). No obstante se desconoce si están presentes en los procesos neuríticos o astrocíticos (Takeda, 2009). Otra alteración considerada de tipo C es la degeneración esponjiforme, consistente en la presencia de vacuolas en el neuropilo de la formación reticular del tronco cerebral y médula espinal, progresando con el avance de la edad hasta estar involucrado todo el cerebro. Al mismo tiempo tiene lugar la proliferación de astrocitos hipertróficos (astrogliosis) en el área esponjosa afectada (Yagi y cols., 1989), como ocurre en la formación reticular magnocelular, cuyo nivel de afectación se ha correlacionado inversamente con la habilidad en tareas de aprendizaje y memoria (Gabriel y cols., 1986).

Además de las anteriores, se han descrito otras alteraciones neuropatológicas en el cerebro de los ratones SAMP8, como la proliferación y acumulación de células de la microglía (Kitabayashi y cols., 1993; Amano y cols., 1995), la expresión de virus ecotrópicos y su correlación con la astrogliosis y vacuolización (Jeong y cols., 2002) o la degeneración cerebelar, en concreto la disminución del grosor de la capa molecular debida a la muerte de células de Purkinje, fenotipo propio de la AD (Nagasaki y cols., 1995; Fukutani y cols., 1996; Sjobeck y

Englund, 2001; Zhu y cols., 2007). Además, un estudio con técnicas IHQ mostró que las neuronas dopaminérgicas de la SN y noradrenérgicas del LC degeneraban más rápidamente durante el envejecimiento en los ratones SAMP8 que en los SAMR1 (Karasawa y cols., 1997). Otro trabajo sugiere la degeneración de oligodendrocitos en el hipocampo, en la cepa SAMP8, asociada a la edad (Tanaka y cols., 2005).

Los estudios *neuroquímicos* y *neurofarmacológicos* muestran una disminución con la edad de la actividad sináptica en el hipocampo de los SAMP8. En concreto se observa un aumento de los niveles de Glu y glutamina (Gln) y una disminución de aspartato y alanina, sugiriendo la predominancia de la vía del α -cetoglutarato a Glu (Kitamura y cols., 1992). La liberación de noradrenalina (NA) y acetilcolina (ACh) inducida por los canales NMDA disminuye en el cerebro de los ratones SAMP8 con la edad (Zhao y Nomura, 1990; Zhao y cols., 1992). Los receptores/canales NMDA y muscarínicos M1 (ACh) disminuyen con la edad en hipocampo y córtex (Sugiyama y cols., 1987). Además, la capacidad de unión de los receptores NMDA corticales es menor en los SAMP8 (respecto a los SAMR1) (Nomura y cols., 1997). La unión de Glu a los receptores NMDA permite la entrada de cationes, entre los que se encuentra el Ca^{++} . Este a su vez permite la activación de segundos mensajeros como PKC γ y CaMKII, esenciales en el proceso de potenciación a largo plazo (LTP, del inglés *long term potentiation*) en el hipocampo y por lo tanto en el aprendizaje. Los niveles de PKC γ en el hipocampo de SAMP8 decaen con la edad, mientras que los de CaMKII permanecen constantes (Sugiyama y cols., 1987; Armbrrecht y cols., 1999). Además los niveles de calbindina también se reducen en el hipocampo con la edad, disminuyendo los niveles de Ca^{++} y perturbando su homeostasis, teniendo lugar la alteración de la actividad PKC dependiente de Ca^{++} (Armbrrecht y cols., 1999). Como consecuencia de los cambios anteriores la fosforilación de CREB, esencial en el proceso de LTP, se encuentra alterada (Tomobe y cols., 2007). Todo ello indica una disminución en la actividad sináptica hipocámpal, explicando los déficits en memoria y aprendizaje y los desórdenes emocionales de los ratones SAMP8 (Nomura y Okuma, 1999).

En relación con la vía septohipocámpal, Flood y Morley propusieron que la disminución de la actividad del receptor serotoninérgico en el septum, resulta en un aumento de liberación de GABA y en consecuencia una reducción de liberación de ACh al hipocampo, planteando que la discapacidad, asociada con la edad, en el proceso de memoria en los SAMP8 podría ser debida al deterioro de las interacciones septohipocámpales (Flood y Morley, 1998). En un trabajo posterior se observó una disminución con la edad en la actividad de la colinacetiltransferasa (ChAT) exclusivamente en la vía colinérgica septohipocámpal de los SAMP8. Al mismo tiempo se observó un incremento en la actividad GAD (enzima implicada en la síntesis de GABA) en los núcleos septales, mientras que en los ratones SAMR1 no se encontró alterada en ninguna región examinada (Strong y cols., 2003). Dichas alteraciones indican la posibilidad de que las interneuronas GABAérgicas puedan ejercer un efecto inhibitorio en la actividad colinérgica, apoyando la hipótesis de Flood y cols.

El péptido neuroestimulante colinérgico (HCNP, del inglés *hippocampal cholinergic neurostimulating peptide*) es liberado en el hipocampo en respuesta a la estimulación de los receptores NMDA. A su vez, este estimula la síntesis de ACh, a través de la inducción de ChAT en el núcleo septal medial (Ojika y cols., 1992). La cepa SAMP8 muestra un incremento en la expresión del precursor de HCNP, del contenido en HCNP y de sus depósitos, en el neuropilo del CA1 hipocampal (Matsukawa y cols., 1999; Yamada y cols., 2007). No obstante, los datos indican una disminución en la actividad ChAT en el septum medial y el hipocampo en los SAMP8 respecto a los SAMR1, sugiriendo que el aumento en la expresión del mRNA del precursor del HCNP es consecuencia de la disminución de la actividad en las neuronas colinérgicas presinápticas. Dichos estudios indican que la acumulación de HCNP en el hipocampo coincide temporalmente con el comienzo del deterioro de la memoria y la disminución de los receptores NMDA, relacionando directamente la disfunción del sistema colinérgico septohipocampal, con los déficits de memoria en los SAMP8 (Matsukawa y cols., 1999).

Muchos estudios indican altos niveles de estrés oxidativo en el cerebro y otros tejidos de los SAMP respecto a los SAMR1 (Tomobe y Nomura, 2009). En concreto, el cerebro de los ratones SAMP8 está expuesto a niveles elevados de estrés oxidativo desde una edad temprana (Nishikawa y cols., 1998; Yasui y cols., 2003; Alvarez-Garcia y cols., 2006; Chiba y cols., 2009). Como consecuencia del elevado estrés oxidativo los niveles de lipoperoxidación (Nomura y cols., 1989; Liu y Mori, 1993; Okatani y cols., 2002; Farr y cols., 2003; Yasui y cols., 2003) y carbonilación proteínica (Butterfield y cols., 1997; Okatani y cols., 2002; Farr y cols., 2003) aumentan en el cerebro con la edad y son mayores en los SAMP8. Las actividades de enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx y glutatión reductasa (GSR) disminuyen con la edad en los SAMP8 y respecto a los SAMR1 (Sato y cols., 1996; Kurokawa y cols., 2001; Okatani y cols., 2002; Sureda y cols., 2006). Otra alteración propia de los SAMP8 es un estado *redox* tiol-disulfuro elevado. En concreto los niveles de GSH y de oxidación de grupos sulfhidrilo de proteínas y la ratio GSH/GSSG se encuentran disminuidos, mientras que los niveles de GSSG son mayores en los SAMP8 que en los SAMR1 (Liu y Mori, 1993; Rebrin y Sohal, 2004). Además la glutamina sintetasa (enzima sensitiva a ROS) se encuentra disminuida en algunas zonas de cerebro de los SAMP8 (Sato y cols., 1996). También se ha descrito una mayor tasa de respiración mitocondrial y una disminución del control respiratorio mitocondrial en los SAMP8, respecto a los SAMR1, con el consecuente incremento en la generación de ROS (Nishikawa y cols., 1998). Dicha disfunción mitocondrial parece ser debida a delecciones en el DNA mitocondrial (Fujibayashi y cols., 1998; Nishikawa y cols., 1998; Xu y cols., 2007; Tanisawa y cols., 2013). La reducción del sistema de defensa antioxidante y el aumento en la generación de ROS, son las causas que subyacen al incremento temprano de estrés oxidativo observado en los ratones SAMP8 (Sato y cols., 1996; Sasaki y cols., 2008). El uso de antioxidantes o la CR en los SAMP8 ha permitido reducir los niveles de peroxidación lipídica y carbonilación proteínica (Butterfield y cols., 1997; Okatani y cols., 2002) e incrementar la esperanza de vida (Edamatsu y cols., 1995; Choi y Kim, 2000), sugiriendo un papel importante de los radicales libres en el proceso de envejecimiento. Además ensayos de administración de antioxidantes han mostrado una mejora en el deterioro de la

memoria de los SAMP8, señalando al elevado estatus oxidativo como posible causa subyacente a los déficits en aprendizaje y memoria propios de la cepa (Choi y Kim, 2000; Farr y cols., 2003). A causa del elevado estrés oxidativo, los SAMP8 también muestran marcada astrogliosis y microgliosis (Takeda, 2009).

En diversas zonas del cerebro de los SAMP8 se ha observado un incremento en la expresión de la serina/treonina quinasa CDK5 y en la actividad calpaína, favoreciendo la actividad de CDK5/p25 en la fosforilación de *tau*. Además, en dichas zonas se ha observado un incremento en la fosforilación de TAU, respecto a la cepa SAMR1, marcador histopatológico de la AD (Canudas y cols., 2005). Además, varios trabajos han demostrado un incremento en la permeabilidad de la BBB asociado al deterioro de esta en los SAMP8 (Takeda, 2009). Un estudio electrofisiológico muestra una disminución con la edad en el potencial postsináptico excitatorio en el área CA1 del hipocampo de los SAMP8, respecto a los SAMR1, como posible causa subyacente a la deficiencia cognitiva de los SAMP8 (Yang y cols., 2005). Estudios de expresión genética y proteínica en el cerebro de los SAMP8 muestran una serie de alteraciones, asociadas con la edad, específicas de la cepa (ver revisión Butterfield y Poon, 2005). Estos genes y proteínas intervienen en funciones de neuroprotección, transducción de señal, plegamiento y degradación de proteínas, organización del citoesqueleto y transporte, respuesta inmune y producción de ROS; todos ellos implicados en las alteraciones anteriormente descritas y, en último término, en el proceso de aprendizaje y memoria (Tomobe y cols., 2005).

4.2.- La neurogénesis adulta en la cepa SAMP8

A pesar del interés que ha suscitado la cepa SAMP8 en el campo del envejecimiento, la mayor parte de los trabajos publicados se centran en el estudio de sus alteraciones en el aprendizaje y memoria y de los marcadores patogénicos relacionados con la AD. Solamente unos pocos trabajos, de reciente publicación, analizan el comportamiento de las NSC en los nichos del cerebro adulto de estos ratones. El primer trabajo en que se hace referencia a los nichos neurogénicos de los SAMP8, indica la inexistencia de diferencias significativas en el estado proliferativo de la SEZ y una disminución significativa en la proliferación del DG, en ratones de 4 meses (Cheng y cols., 2008). Para ello utilizan un paradigma de inyección de BrdU durante 15 días consecutivos y sacrificio a las dos horas de la última inyección. El régimen de inyecciones, la edad de los ratones utilizados y la zona muestreada (el recuento de la SEZ incluye tanto los ventrículos laterales como el tercer ventrículo), impiden la comparación con el resto de trabajos publicados en el campo de la neurogénesis adulta de la SEZ. Otra publicación estudia la neurogénesis hipocampal adulta de los ratones SAMP8, tratando de relacionarla con la AD (Gang y cols., 2011). En este trabajo describen, en individuos de 5 meses de edad, un incremento en la neurogénesis del DG. No obstante, observan una drástica disminución en la supervivencia de las nuevas células, que impide suplir la pérdida de neuronas que tiene lugar con la edad. Además muestran un aumento en los niveles de astrocitos en el hipocampo completo y una

disminución en el DG, si bien no utilizan la combinación de varios marcadores para discernir la población de astrocitos neurogénicos del resto. Un tercer trabajo, analiza la actividad proliferativa de la SEZ de los SAMP8 (Díaz-Moreno y cols., 2013). En este se describe un incremento en la proliferación de los ratones adultos jóvenes de dos meses, seguido de un descenso brusco durante el envejecimiento. Propone que el pico proliferativo observado en la SEZ precede a la aparición de signos asociados con la AD en áreas cerebrales como el hipocampo y lo correlaciona con un incremento en la secreción del péptido beta amiloide por las NSC. Además, en coherencia con el trabajo de Gang y colaboradores (Gang y cols., 2011), sugiere que el incremento en la actividad de las NSC no viene acompañado de un aumento paralelo en la supervivencia e integración de las nuevas células del OB. Por último, un reciente artículo analiza el potencial proliferativo de las NSC de la SEZ de ratones SAMP8 (Castro-García y cols., 2015). En él, se describe una disminución significativa en el número de células LRC y un incremento en la proliferación general en la SEZ y en los neuroblastos, en ratones de un mes de edad. Pese a confirmar su naturaleza como células B1, mediante su colocalización con GFAP y SOX2, los recuentos de LRC mostrados solo tienen en cuenta el marcaje de BrdU. También muestran, en contraposición con los resultados obtenidos por Díaz-Moreno y colaboradores (Díaz-Moreno y cols., 2013), una disminución en el número de esferas primarias y secundarias generadas. Las diferencias pueden ser debidas a la edad de los ratones o incluso a las condiciones del cultivo. No obstante, también concluyen la existencia de una disminución del potencial de las NSC en los SAMP8, que en este caso asocian a la alteración en la vía de PEDF. Pese a las evidentes diferencias entre los trabajos mostrados, el cómputo global de observaciones parece indicar la existencia de alteraciones en ambos nichos. La mayoría de conclusiones coinciden en la existencia de una hiperproliferación no productiva y de una disminución del potencial de las NSC de las zonas neurogénicas durante el envejecimiento.

OBJETIVOS

El estudio exhaustivo de los mecanismos moleculares subyacentes a la disminución de la función de las NSC durante el envejecimiento, será fundamental en su futura aplicación terapéutica. El incremento en los niveles de estrés oxidativo, propio del proceso de envejecimiento, se ha postulado como una de las causas de daño en la función celular durante la senectud. Por otra parte, la cepa murina de envejecimiento acelerado SAMP8, en la cual se han descrito niveles elevados de estrés oxidativo, se considera un modelo válido para la investigación biogerontológica en el SNC. Además, debido al incremento de la esperanza de vida, el estudio del envejecimiento con fines terapéuticos, suscita gran interés económico y social.

Por todo ello, el objetivo global de esta tesis doctoral es el estudio de los efectos del envejecimiento y el estrés oxidativo sobre las propiedades de las NSC de la SEZ, mediante el uso de la cepa de ratones SAMP8; así como de los mecanismos moleculares implicados. Para lograr dicho objetivo global, se pretende alcanzar los siguientes objetivos concretos:

1. Caracterización de las poblaciones celulares de la SEZ de la cepa SAMP8.
2. Caracterización del cultivo de neuroesferas de la cepa SAMP8.
3. Determinación del estatus oxidativo de las neuroesferas de la cepa SAMP8.
4. Análisis de los efectos del estrés oxidativo y replicativo en las neuroesferas de la cepa SAMP8.
5. Análisis de la modulación epigenética de las NSC de la cepa SAMP8.

MATERIAL Y MÉTODOS

1.- Animales

Los ratones (*Mus musculus*) utilizados en la presente tesis fueron estabulados por géneros y camadas, bajo condiciones de luz/oscuridad de 12 horas, a temperatura constante entre 20 y 22 °C, y dieta con acceso libre a pellets estándar y agua (*ad libitum*). El manejo de los animales y todos los procedimientos experimentales fueron llevados a cabo de acuerdo con la normativa vigente (86/609/EEC y RD1201/2005), siguiendo los protocolos aprobados por el comité ético y bajo la supervisión de la veterinaria jefe del *Servicio de Producción Animal del Campus de Burjassot* de la Universitat de València. Las crías fueron destetadas a los 21 días de nacer. En todos los casos los animales utilizados fueron machos adultos de 2 y 10 meses de edad.

1.1.- Cepas de ratones

Cepas SAMP8 y SAMR1: nuestras colonias de las cepas consanguíneas SAMR1 y SAMP8 (Takeda y cols., 1981) fueron generadas a partir de varias parejas cedidas por la Dra. Mercè Pallàs, procedentes de la colonia del Parc Científic (Barcelona, España), establecida con ejemplares de Harlan Interfauna Ibérica S.L. (Bicester, Reino Unido).

Cepa p53^{-/-}: la generación de la cepa de ratones deficientes para p53 fue llevada a cabo por el grupo del Dr. Allan Bradley en el Colegio de Medicina Baylor (Houston, Texas, EEUU) (Donehower y cols., 1992). Nuestra colonia de ratones p53^{-/-} fue mantenida en heterocigosis, cruzando los individuos heterocigotos para obtener homocigotos nulos para p53 y homocigotos silvestres que fueron utilizados como control de los anteriores. Los ratones fundadores de nuestra colonia, procedentes de Harlan Interfauna Ibérica S.L. (Bicester, Reino Unido), fueron cedidos por el Dr. Manuel Serrano del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (Madrid, España) (CNIO).

Cepa p19^{-/-}: los ratones mutantes nulos para p19 fueron generados en el laboratorio del Dr. Charles J. Sherr en el Instituto Médico Howard Hughes (Memphis, Tennessee, EEUU) (Kamijo y cols., 1997). La colonia, cuyos individuos fundadores fueron suministrados por el Dr. Manuel Serrano del CNIO (Madrid, España), fue mantenida en heterocigosis. Mediante el cruce de individuos heterocigotos se obtuvieron los ratones homocigotos, silvestres y mutantes nulos, utilizados en los experimentos.

1.2.- Genotipado de ratones

El genotipo de los ratones fue determinado mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction*), utilizando DNA genómico. Este fue extraído

a partir de un fragmento de cola de unos 0,5 cm mediante el uso del *Maxwell 16 Mouse Tail DNA Purification Kit* (Promega® AS1120). Para cada muestra se amplificó 1 µl del DNA genómico (aproximadamente 50 ng) en un volumen final de 25 µl, mediante desoxinucleótidos trifosfato (0,2 mM cada uno), cebador directo (48 nM), cebador inverso (48 nM) y Taq polimerasa de DNA (Promega® M830) (5 U/µl) en tampón de electroforesis/carga a pH 8,5 (*Green Go Taq Flexi Buffer*, Promega® M891) con MgCl₂ 2 mM. En cada caso se llevó a cabo la PCR utilizando los cebadores y condiciones concretas y obteniendo los productos indicados en la tabla 1.

Los productos de PCR (amplicones) fueron resueltos mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón TBE, (Tris-borato-EDTA; Tris [89 mM, pH 8,0], ácido bórico [89 mM], y ácido etilendiaminotetraacético [EDTA; 2 mM]) con *Realsafe Nucleic Acid Staining Solution* (Durviz® RBMSAFE) 0,05 µl/ml. Como marcador de pesos moleculares se utilizó el *Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder* (Fermentas® SM0321). Finalmente, los geles se fotografiaron en un transiluminador con luz UV acoplado a un sistema de captura de imagen (Gel Logic® 440 Imagen System) y se analizaron las bandas obtenidas.

2.- Estudios *in vivo*

2.1.- Tratamientos *in vivo*

2.1.1.- Administración de 5-bromo-2´desoxiuridina

Para el estudio de la proliferación celular se administró a ratones vivos BrdU (Sigma® B5002), un análogo sintético de la timidina. Del mismo modo que los nucleósidos naturales, esta se incorpora al nuevo DNA durante la fase S del ciclo celular y puede ser detectada, específicamente, mediante técnicas de inmunolocalización. En función de la población celular de interés, llevamos a cabo diferentes regímenes de inyección y captura del marcador. Para el análisis de la proliferación global de la SEZ y de las células de rápida división (TAP y neuroblastos) se inyectó un único pulso y se sacrificó a los animales una hora después. A este protocolo, así como a las células que marcaba, los denominamos BrdU1h. Con el fin de detectar las células con una tasa de división lenta, se aplicó un régimen de 7 dosis inyectadas a intervalos de 2 horas y sacrificio, mediante perfusión (ver apartado 2.2.1. de material y métodos), 30 días después (BrdU30d). Mediante este paradigma experimental, las células de división rápida diluyen la marca mientras que su progenie, que la incorporó directamente durante su administración o a partir del DNA de su progenitora, habrá migrado a sus lugares de destino. A estas células positivas para BrdU las denominamos BrdU30d⁺. Por lo tanto, en la SEZ solamente quedarán marcadas las células de división lenta, como son las NSC, y las que se hayan diferenciado terminalmente en la estructura. Estas células marcadas mediante el protocolo BrdU30d las denominamos LRC (del inglés *Label Retaining Cells*). En cualquiera de los casos la administración fue realizada mediante inyección intraperitoneal (i.p.) con aguja hipodérmica de

0,3 mm de diámetro y cada dosis fue de 50 mg de BrdU/Kg de peso del ratón, utilizando para ello una solución de 10 mg de BrdU/ml disuelta en suero fisiológico (NaCl 0,9 %) estéril.

2.1.2.- Administración de tricostatina A

Con el fin de inhibir la actividad HDAC en el cerebro de los ratones, les administramos tricostatina A (TSA, *Trichostatin A*) (Sigma® T8552) a una concentración, previamente descrita en el trabajo de Fontan-Lozano y cols., 2008, de 1 mg/Kg de peso corporal en cada dosis. Tanto el TSA, a partir de una solución de 0,2 mg/ml disuelta en DMSO estéril, como un volumen equivalente del vehículo en los animales del grupo control, fueron administrados mediante i.p. con aguja hipodérmica de 0,3 mm de diámetro. El tratamiento fue de 6 dosis administradas cada 12 horas a lo largo de 3 días y el sacrificio, mediante perfusión (ver apartado 2.2.1. de material y métodos), una hora después de la última inyección.

2.2.- Técnicas histológicas

2.2.1.- Anestesia y perfusión

Los ratones utilizados en el análisis histológico fueron anestesiados mediante i.p. de 3 mg de medetomidina por kg de ratón (stock 1 mg/ml, DOMTOR®) como analgésico y 225 mg de clorhidrato de ketamina por kg de ratón (stock 50 mg/ml, IMALGENE®) como anestésico. Tras comprobar que la anestesia era profunda, se procedió a la perfusión intracardiaca de 30 ml de suero salino (0,9 % NaCl), seguidos de 70 ml de paraformaldehído (PFA) al 4 % en tampón PB (tampón fosfato, *phosphate buffer*, 0,1 M y pH 7,4), ambos con un flujo de 5,5 ml/min. Los cerebros se extrajeron y, para completar la fijación, se sumergieron durante toda una noche (O/N, del inglés *overnight*) a 4 °C en el mismo fijador. Posteriormente, los cerebros se lavaron varias veces con PB y se mantuvieron en este a 4 °C, añadiendo, cuando fue necesario, azida sódica al 0,05 % para su conservación. En el caso de que uno de los hemisferios fuese utilizado para cultivos celulares o extracción de proteína, se extraía el cerebro fresco y el hemisferio destinado a histología se fijaba mediante inmersión O/N en el mismo fijador.

2.2.2.- Microtomía y seriado de cortes

Los cerebros perfundidos o fijados por inmersión fueron seccionados coronalmente con un vibratomo Leica® VT 1000S a un grosor de 25 µm. Los cortes obtenidos se recogieron de forma seriada para obtener muestras representativas de toda la extensión rostro-caudal y fueron depositados en placas multipocillo con PB y azida sódica al 0,05 % para evitar su contaminación. Los OB fueron previamente encastrados en agar al 4 % para facilitar su corte y las secciones se recogieron en 6 series paralelas. El resto del cerebro fue cortado sin encastrar y almacenado en 24 series paralelas, de las cuales 12 fueron destinadas al estudio de la SEZ (ver apartado 2.5. de material y métodos).

2.2.3.- Whole mount

Los cerebros destinados a la técnica de WM de la SEZ fueron diseccionados tal y como se describe en Mirzadeh y cols., 2008. Tras la dislocación cervical del ratón se procedió a la extracción del cerebro fresco y con ayuda de una lupa de disección Leica® MZ6 (25X) y mediante el uso de microescalpelos se aisló la SEZ. Seguidamente, esta fue fijada O/N con PFA al 4 % en PB con Triton X-100 al 0,5 % y finalmente lavada varias veces con PB y conservada añadiendo azida sódica al 0,05 % hasta la realización de la IHQ.

2.3.- Técnicas inmunohistoquímicas, histoquímicas y tinciones

2.3.1.- Inmunohistoquímica

La detección de los diferentes antígenos se realizó, mediante inmunofluorescencia indirecta, usando la combinación pertinente de anticuerpos primarios y secundarios (ver tablas 2 y 3). Para ello, los cortes obtenidos en vibratomo se lavaron varias veces con PB y posteriormente se incubaron con tampón bloqueo (FBS 10%, glicina 10% y Triton X-100 0,2% en PB) durante 1 hora a temperatura ambiente (RT, del inglés *room temperature*). Después se incubaron con los anticuerpos primarios, diluidos en su correspondiente tampón bloqueo, O/N a 4°C (ver tabla 2). Tras lavar varias veces el anticuerpo primario con PB, se incubaron durante 1 hora a RT los anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos, también diluidos en tampón bloqueo (ver tabla 3). Nuevamente se realizaron lavados en PB y se tiñeron los cortes con 4',6-diamino-2-fenolindol dihidrocloruro (DAPI, Sigma® D9542) a 1 µg/ml durante 5 min a RT. Finalmente, tras varios lavados más en PB, los cortes se montaron con FluorSave (Calbiochem® 345789). Para la detección de BrdU, los cortes fueron sometidos, previamente al bloqueo, a un tratamiento con HCl 2N (15 min a 37 °C) con el fin de desnaturalizar el DNA para facilitar el reconocimiento del antígeno por el anticuerpo. Posteriormente, se neutralizó el ácido con tampón borato 0,1M, pH 8,5, durante 10 min y varios lavados con PB y se continuó con el protocolo estándar.

En el caso de la IHQ para las preparaciones de WM, tanto el tampón PB, utilizado en los lavados, como el tampón bloqueo, utilizado en la eliminación de las uniones inespecíficas y en la disolución de los anticuerpos, contenía Triton X-100 al 0,5 %. El tiempo de bloqueo utilizado fue de 90 min, el anticuerpo primario se incubó durante 2 días a 4 °C y el anticuerpo secundario estuvo en contacto con la muestra durante 2 horas a RT. El medio de montaje, diferente al utilizado en las IHQ sobre cortes histológicos, fue Fluoromount-G (Electron Microscopy Sciences® 17984-25).

2.3.2.- Técnica de marcaje del extremo libre con dUTP mediante la DNA transferasa terminal (TUNEL)

Las células apoptóticas fueron detectadas mediante la técnica de marcaje del extremo libre con dUTP mediante la DNA transferasa terminal (TUNEL, del inglés *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling*), basada en la rotura del DNA característica del proceso de apoptosis. En este método se utilizan nucleótidos del tipo desoxiuridina (dUTP) marcados y la enzima DNA transferasa terminal (TdT, del inglés *terminal deoxynucleotidyl transferase*), que añade nucleótidos al extremo 3'OH libre de la hebra de DNA. En las células en proceso de apoptosis el DNA se fragmenta, siendo accesibles los extremos 3'OH y permitiendo a la enzima TdT incorporar los dUTPs marcados. En nuestro caso utilizamos el *kit* de detección de apoptosis *In Situ* ApopTag Red (Millipore® S7165). En concreto, este *kit* se basa en el uso de dUTPs marcados con digoxigenina y su detección mediante anticuerpos específicos anti-digoxigenina conjugados con el fluorocromo rodamina. Como control positivo de la técnica se utilizaron muestras similares, que previamente habían sido tratadas con DNasa I 1 µg/ml durante 10 min a RT. Una vez ejecutada la detección según las instrucciones del fabricante, se realizó la IHQ para el marcador que se combinaba en cada caso (GFAP o DCX) mediante el método estándar (ver apartado 2.3.1. de material y métodos).

2.3.3.- Técnica histoquímica para la detección de la actividad β galactosidasa asociada a senescencia

La actividad β galactosidasa asociada a senescencia (SA β-gal, del inglés *senescence associated β galactosidase*) fue detectada sobre secciones coronales del cerebro con el *Senescence Cells Histochemical Staining Kit* (Sigma® CS0030). El fijador utilizado fue en unos casos PFA 4 % y en otros una mezcla de PFA 4 % y glutaraldehído al 2 %. Tras el proceso de fijación se lavaron los cortes con PB y se incubaron con la solución de tinción O/N a 37 °C. Tras varios lavados, se montaron sobre portaobjetos con medio de montaje acuoso (FluorSave®). La captura de imágenes fue realizada con un microscopio Nikon® Eclipse E800.

2.3.4.- Tinción con violeta de cresilo

Para el estudio citoarquitectónico del cerebro se utilizó la tinción con violeta de cresilo al 0,2 % (Sigma® C1791) disuelto en una solución con ácido acético glacial al 0,5 % (Panreac® 141008), acetato sódico 6 mM (Panreac® 131632) e hidróxido sódico 12 mM (Panreac® 141687). Este colorante básico y artificial, tiñe los somas de las neuronas y glía, permitiendo ver el nivel de organización y grado de empaquetamiento celular en las distintas estructuras analizadas. El protocolo de tinción consistió en la incubación de las muestras con la solución de violeta de cresilo durante 5-10 min, seguido de un breve lavado con H₂O y diferenciación durante 15 seg con alcohol al 70°. Se deshidrataron las secciones con lavados en alcoholes de grado creciente (96° y 100°) hasta llegar a un baño de 5 min en xilol (Panreac® 141769). Las muestras se montaron con medio permanente Eukitt (Panreac® 253681).

2.4.- Microscopía electrónica de barrido

Para la microscopía electrónica de barrido, los WM fueron fijados por inmersión en PFA al 4 % y glutaraldehído al 2 % en tampón PB, postfijados con tetraóxido de osmio (OsO_4) al 2 %, deshidratados en alcoholes de concentración creciente y posteriormente secados mediante la técnica de punto crítico, con CO_2 líquido, con el aparato TOUSIMIS® Autosamdri 814. Luego se pegaron sobre soportes de aluminio con cinta adhesiva de doble cara con carbón (Tedpella®) y se sombrearon con partículas de oro-paladio (Au-Pd) en un revestidor de bombardeo iónico POLARON® SC7640 durante 120 seg, generando un recubrimiento metálico de unos 5 nm de espesor. Finalmente fueron examinados con un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo HITACHI® S4100. El voltaje utilizado fue 10 Kv y la distancia de trabajo 10 mm.

2.5.- Morfometría y recuentos celulares

El *volumen de la SEZ* se estimó mediante el método de Cavalieri ($\text{Volumen}_{\text{total}} = \text{área} \times \text{grosor} \times \text{número de cortes}$) (Russ y Dehoff, 1986). En primer lugar se establecieron las coordenadas morfológicas que delimitan la extensión rostro-caudal de la SEZ, desde el cruce del CC a nivel rostral hasta la aparición de la comisura hipocámpica ventral, coincidente con la unión de los dos LV con el tercer ventrículo (aproximadamente entre las distancias de bregma +1,10 y -0,22). Para reconocer con precisión las distintas estructuras cerebrales del ratón adulto nos ayudamos de un atlas (Paxinos y Franklin, 2004). Basándonos en los puntos anatómicos definidos y utilizando los cortes coronales obtenidos en el vibratomo, de grosor conocido, se determinó el número de secciones que conformaban la SEZ en cada individuo. Posteriormente, se seleccionaron aleatoriamente 2 de las 12 series paralelas de la SEZ de cada animal (*section sampling fraction*, $\text{ssf} = 1/6$), que contenían entre 5 y 8 secciones equidistantes y se contratiñeron con violeta de cresilo (ver apartado 2.3.4. de material y métodos). Con ayuda del software NEW C.A.S.T. (New Computer Assisted Stereological Toolbox; Olympus®) en un ordenador conectado a un microscopio Olympus® BX61 con platina motorizada y una cámara Olympus® DP70, se determinó el área (μm^2) de la SEZ en dichos cortes, obteniendo un valor promedio por corte. En último lugar, con los datos obtenidos, se estimó el volumen total de la estructura de cada animal.

Los *recuentos celulares en la SEZ*, para la estimación de porcentajes de los diferentes marcadores celulares o combinación de ellos, fueron llevados a cabo mediante un estricto método de selección y muestreo de cortes. Para cada animal se eligieron tres cortes representativos de todo el eje rostro-caudal: uno anterior, entre las primeras secciones en las que el CC cruza entre ambos hemisferios (aprox. bregma +0,98); otro medial, en el que la comisura hipocámpica ventral todavía tiene una sección circular y el CC posee un perfil menos grueso y apuntado (aprox. bregma +0,50) y finalmente un corte posterior, en el que se cruza la comisura hipocámpica ventral pero todavía permanecen separados ambos LV (aprox. bregma +0,14). En cada uno de los cortes se capturaron cuadrantes de muestreo (*counting frames*) de la totalidad de la SEZ, desde su zona más ventral hasta la más dorsal. En estos se obtuvieron

secciones ópticas cada 3 μm a lo largo del grosor de la muestra. El recuento pertinente en cada caso se realizó tomando una de cada tres imágenes (distanciadas 9 μm entre sí) a partir de una elegida aleatoriamente. Partiendo del mismo método de selección de muestras y de captura de imágenes, se estimó el *índice de celularidad*. Para ello se contabilizó el número de células totales (DAPI⁺) por sección óptica y siendo esta de área conocida y constante se logró determinar la densidad celular total. Para realizar los recuentos de células positivas para la *técnica TUNEL combinada con otro marcador*, tanto en la SEZ como en el RMS, se seleccionaron, una vez más, tres cortes representativos de la SEZ y tras la inmunodetección se contabilizó el total de células marcadas, para finalmente estimar su densidad. En el caso de los recuentos de las células *BrdU30d⁺ en la SEZ y en el CC*, debido al reducido número de células marcadas, se eligieron 2 series completas de la estructura ($\text{ssf} = 1/6$) y, tras la IHQ pertinente, se contabilizó el total de células marcadas. Una vez estimado el número promedio de células BrdU30d⁺ por corte y conociendo el volumen promedio por corte, de cada estructura para cada animal, se determinó la densidad celular (BrdU30d⁺/mm³). Las *células BrdU30d⁺ en el OB* se cuantificaron mediante la selección de una serie paralela de cortes ($\text{ssf} = 1/6$) sobre la que se llevó a cabo la IHQ. En cada corte se establecieron 4 campos aleatorios sobre la GCL, en los que se tomó una sección óptica al azar. En dichas imágenes se contabilizó tanto el número de células BrdU⁺ como DAPI⁺, permitiendo determinar el porcentaje de células BrdU30d⁺. Los *recuentos sobre las muestras de WM* fueron llevados a cabo a partir de las imágenes obtenidas a lo largo de toda la región dorsal de la SEZ.

La visualización de la fluorescencia y captura de imágenes, en todos los recuentos anteriores, fue realizada con un microscopio confocal multiespectral FluoView FV10i (Olympus®) equipado con objetivos de 10 y 60 aumentos. De igual forma que las medidas volumétricas de la SEZ, las medidas de áreas y volúmenes a partir de las cuales basamos los recuentos de densidad fueron llevados a cabo mediante el software NEW C.A.S.T. (Olympus®).

Para la estimación del porcentaje de células GFAP⁺ estriatales se eligieron tres cortes representativos de la SEZ y tras la IHQ se llevó a cabo un análisis estereológico mediante el método del fraccionador óptico. Para ello se utilizó el software NEW C.A.S.T. (Olympus®). El control del movimiento en el plano X-Y se realizó mediante un *joystick*. El movimiento en el eje Z se llevó a cabo manualmente con el macro/micrométrico y la distancia fue monitorizada mediante un microcator electrónico. Para el muestreo se utilizó un disector de 40 x 40 x 5 μm (ejes X, Y, Z respectivamente) y se realizó un muestreo de aproximadamente el 10 % del área de la capa analizada (*area sampling fraction*, $\text{asf} = 0,1$). El tamaño del disector y el porcentaje de muestreo se establecieron en función del tamaño y densidad del marcaje. En cada uno de los muestreos se registró tanto el número total de células (DAPI⁺) como de astrocitos (GFAP⁺) y se determinó su porcentaje. Como criterio de recuento se contabilizaron las células que no tocaban las líneas o el plano de exclusión, teniendo en cuenta para ello el límite de la marca (fluorescencia) del soma. El límite superior del disector óptico fue 5 μm por debajo del inicio del corte, de tal forma

que se asumió la inexistencia de compresión diferencial del tejido en el volumen muestreado (Gardella y cols., 2003).

3.- Estudio *in vitro* en cultivos de las células madre neurales

3.1.- Cultivos de las células madre neurales adultas de la zona subependimaria

El establecimiento, mantenimiento y análisis de los cultivos de neuroesferas a partir de la SEZ de ratones adultos se llevaron a cabo utilizando protocolos ya descritos por nuestro grupo (Ferron y cols., 2007). Los ratones se sacrificaron mediante dislocación cervical, seguidamente se decapitaron y se extrajo el cerebro, que se lavó en PBS (tampón fosfato salino, *phosphate buffer saline*; tampón fosfato 0,1 M a pH 7,4 y NaCl 0,9 %) estéril y frío. Con ayuda de una lupa de disección Leica MZ6 (25X) y mediante el uso de microescalpelos se aisló la SEZ. Durante todo el proceso se mantuvieron las máximas condiciones de esterilidad posibles y a partir de ese momento se trabajó en cabina de flujo laminar. Los fragmentos fueron digeridos enzimáticamente, eliminando el PBS, añadiendo 500 μ l/SEZ de una solución de papaína a 12 U/ml (Worthington® Ls003119) disuelta en EBSS (*Earle's Balanced Salt Solution*, Gibco® 24010-043) y suplementada con 0,17 mg/ml de L-cisteína (Sigma® C8277) y 0,17 mg/ml de EDTA (Sigma® E6511), e incubando 30 min a 37 °C en esta solución enzimática. Posteriormente se lavó el tejido con medio de cultivo de las NSC “control” (sin mitógenos) (DMEM/F12 [*Dulbecco's Modified Eagle Medium F12*, Gibco® 11320-074] suplementado con glucosa 30 %, NaHCO₃ 0,1 %, ácido N-2-hidroxietilpiperacina-N'-2'-etanesulfónico [HEPES] 5 mM, L-glutamina 2 mM, putrescina 0,2 μ g/ml, progesterona 16 nM, selenito sódico [Na₂SeO₃] 25 nM, insulina 500 nM y apo-transferrina 0,08 mg/ml) y se disgregó mecánicamente, haciéndolo pasar varias veces a través de una pipeta Pasteur con la punta previamente pulida a la llama. Una vez se obtuvo una suspensión homogénea se añadió más medio “control” y se centrifugaron las células 10 min a 200 g, se aspiró el medio, y se resuspendió en 800 μ l de medio “completo” (medio “control” suplementado con heparina 0,7 U/ml, fracción V de albúmina de suero bovino (BSA, *bovine serum albumin*) 2 mg/ml [Euroclone® EMR086025], EGF 20 ng/ml [Invitrogen® 53003-018] y FGF2 10 ng/ml [Sigma® F0291]). El homogenado se repartió en 4 pocillos de placas de 48 pocillos (P48) y se incubó a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5 % durante unos 7 días *in vitro* (DIV). Transcurridos 5 DIV, y utilizando un microscopio invertido (Nikon® Eclipse TE2000-S) dotado con contraste de fases, se contabilizó el número de neuroesferas generadas a partir de cada SEZ y se tomaron fotografías para medir sus diámetros.

3.2.- Expansión del cultivo de las células madre neurales

Aproximadamente cada 6 DIV, las neuroesferas formadas se subcultivaron (pase) mediante su disgregación y posterior resiembra en forma de células individuales. Para ello, se

transfirieron de los frascos/pocillos de cultivo a tubos cónicos de 15 ml, se lavaron con medio “control”, se centrifugaron y posteriormente se aspiró el medio y se resuspendieron las células en 200 µl de medio “completo”. La suspensión celular se aspiró con suavidad unas 70-80 veces con una punta con filtro de una micropipeta de 200 µl, evitando flujos bruscos y la consecuente formación de burbujas, hasta obtener una suspensión homogénea en la cual las neuroesferas fueron disgregadas hasta el estado de célula individual. La suspensión se llevó hasta 1 ml final con medio “completo”, se homogeneizó y se tomaron 10 µl. Este volumen se mezcló con el colorante no permeable azul tripano en una relación 1:1 y se realizó el recuento de células viables, no teñidas, usando una cámara Neubauer. Finalmente, las células se sembraron en medio “completo”, a la densidad adecuada para cada frasco/pocillo, y se mantuvieron en el incubador a 37 °C y CO₂ al 5 %.

3.3.- Criopreservación de las células madre neurales

Durante los sucesivos subcultivos, y con el fin de conservar células de distintos pases, se congeló una parte de las neuroesferas generadas. Para ello fue necesario sembrar frascos de tamaño considerable (placa de cultivo de 100 cm² [P100] o frasco de cultivo de 75 cm² [F75]) y, transcurridos unos 2 DIV, las neuroesferas fueron recogidas, centrifugadas, resuspendidas en dimetil sulfóxido (DMSO) al 10% en medio “completo”, transferidas a un criotubo y congeladas a -80 °C en un recipiente rodeado de isopropanol, de tal forma que la congelación fue gradual (Δ -1 °C/min). La descongelación fue rápida, situando los criotubos en un baño a 37 °C, lavando las neuroesferas y resuspendiendo estas en medio “completo”.

3.4.- Ensayo de formación de neuroesferas a baja densidad

A partir de la solución de neuroesferas disgregadas hasta estado de célula única (tal y como se describe en el apartado 3.2. de material y métodos) se generó una suspensión de 25.000 células/ml en medio “completo” y se sembraron a una densidad de 2,5 células/µl (500 células/pocillo de placa de 96 [P96]) para preservar su clonalidad. Transcurridos 5 DIV en el incubador, se contabilizó el número de neuroesferas generadas en cada pocillo, utilizando un microscopio invertido dotado con contraste de fases (Nikon® Eclipse TE2000-S), y se tomaron fotografías para medir sus diámetros.

3.5.- Ensayo de proliferación

De cada cultivo de neuroesferas, crecidas durante 2 DIV, se sembró 1 ml por pocillo de P24 conteniendo cubreobjetos previamente tratados con Matrigel (Becton Dickinson® 354230). Entre 2 y 48 horas antes de la siembra, los cubreobjetos circulares estériles fueron colocados en

los pocillos de P24 y cubiertos con Matrigel®. Tras 3 min en el incubador, para permitir la adhesión de las neuroesferas a los cubreobjetos, se añadió BrdU a una concentración final de 2 µM y se volvió a incubar durante 5 min. Seguidamente se fijaron las neuroesferas con PFA al 2 % durante 10 min a RT, se realizaron varios lavados con PB y se procedió a la detección de BrdU, previo tratamiento con HCl, del modo descrito en el apartado 3.7. de esta sección. Tras la captura de imágenes de la totalidad del cubreobjetos con un microscopio Nikon® Eclipse E800 y la generación de imágenes de co-localización con el programa Adobe® Photoshop CS5, se contabilizó en cada esfera tanto el número de células BrdU⁺ como totales (DAPI⁺), permitiendo determinar el porcentaje de células BrdU⁺ por esfera.

3.6.- Tratamientos *in vitro*

Algunos ensayos *in vitro* consistieron en el tratamiento, con distintas sustancias, de las células procedentes de las neuroesferas de pase 1, disgregadas y sembradas siguiendo el protocolo indicado en cada caso (ver apartados 3.2. y 3.4. de material y métodos). Las sustancias que fueron utilizadas en los distintos experimentos, así como las concentraciones empleadas de las mismas y el vehículo utilizado para su preparación (administrado en los cultivos control) se detallan en la tabla 4.

3.7.- Técnicas inmunocitoquímicas

Las células y neuroesferas fijadas se lavaron sucesivas veces con PB. Posteriormente, se incubaron durante 1 hora a RT en tampón bloqueo (FBS 10 %, glicina 10 % y Triton X-100 0,2 % en PB). Para la detección de BrdU, previa a la incubación con el tampón bloqueo, se realizó un tratamiento con HCl 2 N (10 min a 37 °C) y posteriormente se neutralizó el ácido durante 10 min con tampón borato 0,1 M a pH 8,5, seguido de varios lavados con PB, continuándose después con el protocolo estándar. Tras el bloqueo de las uniones inespecíficas, se incubaron las células con los anticuerpos primarios diluidos en tampón bloqueo (ver tabla 2) a 4 °C O/N. Al día siguiente, se lavaron las células varias veces con PB y se incubaron con los anticuerpos secundarios marcados con fluoróforos, también diluidos en tampón bloqueo, durante 1 hora a RT (ver tabla 3). Posteriormente, se lavaron con PB y se tiñeron con DAPI (Sigma®) a 1 µg/ml durante 1 min a RT y, tras varios lavados más en PB, las preparaciones se montaron con FluorSave®. Las células se analizaron en un microscopio (Nikon® Eclipse E800) dotado de fluorescencia. Para llevar a cabo los recuentos celulares se utilizó el programa Adobe® Photoshop CS5 con el fin de generar imágenes de co-localización, a partir de las imágenes originales.

3.8.- Técnica citoquímica para la detección de la actividad β galactosidasa asociada a senescencia

La detección de la actividad SA β -gal en esferas o células individualizadas se realizó mediante el uso del *Senescence Cells Histochemical Staining Kit* (Sigma®). Estas fueron adheridas previamente sobre cubreobjetos pretratados con Matrigel® (ver apartado 3.5. de material y métodos). Posteriormente se fijaron durante 7 min con una solución de fijación, proporcionada en el *kit*, consistente en una mezcla de formaldehído y glutaraldehído. Tras varios lavados con PBS, se incubaron las células con la solución de tinción O/N a 37 °C. Finalmente las muestras fueron lavadas de nuevo y montadas sobre portaobjetos con medio de montaje acuoso (FluorSave®). Tras la captura de imágenes con un microscopio Nikon® Eclipse E800, se procedió a su análisis para determinar los niveles promedio de intensidad (densidad óptica) de precipitado de X-gal (de tonalidad azul) por célula. Para ello se programó una serie de comandos automatizados (macro) en el programa de análisis de imagen, de acceso libre, ImageJ®.

3.9.- Medición de diámetros de las neuroesferas

La medida de diámetros de las neuroesferas se realizó mediante el programa de análisis de imagen ImageJ, de acceso libre, tras la captura digital al azar de, al menos, 200 neuroesferas por cultivo.

4.- Análisis de expresión de RNA mensajeros

4.1.- Extracción de RNA y retrotranscripción

Para analizar la expresión de RNA mensajeros (mRNA) de las NSC se utilizó la técnica de la transcripción reversa unida a la amplificación del DNA obtenido mediante la técnica de PCR (RT-PCR). Primero, se extrajo el RNA de las NSC utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen® 15596) según las indicaciones del fabricante. Posteriormente se trató el RNA obtenido con DNasa para eliminar los posibles restos de DNA genómico, para ello se utilizó el *DNA-free Kit* Ambion (Life technologies® AM1906) siguiendo las indicaciones del fabricante. En primer lugar se añadieron 2 Unidades de DNasa en un volumen de reacción de 50 μ l con más de 10 μ g de RNA y se incubó a 37 °C durante 20 min. Seguidamente se detuvo la reacción incubando el agente de inactivación durante 2 min a RT. El RNA se retrotranscribió a DNA de cadena simple (cDNA) utilizando el *kit* SuperscriptIII (Invitrogen® 11752) y siguiendo las instrucciones del fabricante. En un volumen de reacción de 20 μ l se añadió 1 μ g de RNA, 10 μ l de tampón de reacción 2X y 2 μ l de transcriptasa reversa o, en el caso del control negativo de la retrotranscripción, el mismo volumen de H₂O libre de RNasas. Luego se incubó a 25 °C durante 10 min, a 50 °C durante 30 min y finalmente 5 min a 85 °C. Por último se incubó 20 min a 37 °C con 2 U de RNasa H, para eliminar el RNA, evitando su interferencia en la PCR.

4.2.- Reacciones de PCR cuantitativas a tiempo real

Las PCR cuantitativas a tiempo real (Q-PCR) fueron llevadas a cabo con el equipo *StepOnePlus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems® 4376600) utilizando sondas TAQMAN (ver tabla 5). En un volumen de reacción de 20 µl se utilizó 1 µl de cDNA, 10 µl de *TaqMan Fast Advanced Master Mix* (Applied Biosystems® 4444557) y 1 µl de sonda TAQMAN. Como control endógeno se empleó *Gapdh*. En todos los casos se realizaron diluciones seriadas de cDNA para comprobar que las condiciones de PCR utilizadas permitían un rango lineal de amplificación. El número de ciclos utilizados para las amplificaciones fue de 20.

5.- Inmunodetección de proteínas por Western-Blot

5.1.- Extracción proteínica

Para llevar a cabo la extracción de proteínas de la SEZ, esta se extrajo del mismo modo que para la obtención de las NSC de la zona (ver apartado 3.1. de material y métodos). Al tejido fresco recién diseccionado se le añadió tampón de lisis RIPA Modificado para Tejido (Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, nonilfenoxi polietoxietanol [NP-40] 1 %, deoxicolato sódico [NaDoc] 1 %, dodecilsulfato sódico [SDS] 1 %, mezcla comercial de inhibidores de proteasas [Complete Mini, Roche® 11 836 153 001] 1X, fluoruro sódico [NaF] 20 mM y ortovanadato sódico [Na₃VO₄] 2,5 mM). Seguidamente se homogeneizó pasándolo varias veces a través de agujas hipodérmicas de 0,8 y 0,5 mm de diámetro.

En la extracción de proteínas de neuroesferas, estas se recogieron en PBS frío y se resuspendieron en tampón de lisis RIPA para las NSC (PB 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Triton X-100 1 %, mezcla comercial de inhibidores de proteasas [Complete Mini®] 1X, NaF 20 mM y Na₃VO₄ 2,5 mM).

Los homogenados, tanto procedentes de tejido como de neuroesferas, fueron depositados en hielo durante 20 min. Posteriormente se centrifugaron (15 min a 20000 *g* a 4 °C), obteniendo la proteína a partir de su sobrenadante. La concentración de proteína fue determinada mediante el método BCA (Pierce BCA *Protein Assay Kit*, Thermo Scientific® 23225), utilizando BSA para establecer la curva patrón. Posteriormente se generaron muestras con una cantidad de 50-70 µg de proteína total que, tras resuspenderlas en tampón de carga 4X (Glicerol 20%, SDS 10 %, Tris-HCl 400 mM a pH 6,8, β-mercaptoetanol 10 % y azul de bromofenol) fueron desnaturalizarlas a 99 °C durante 7 min. Las muestras fueron preservadas a -20 °C o directamente cargadas en geles de SDS-poliacrilamida.

5.2.- Electroforesis y transferencia de proteínas

Las muestras de proteína desnaturizada se cargaron en geles de SDS-poliacrilamida al 10 % y se separaron mediante electroforesis a un voltaje constante de 100 V, usando el equipo Mini-Protean II (Bio-Rad® 1660828EDU). El tampón de electroforesis contenía Trizma base 2,5 mM, glicina 19,2 mM y SDS al 0,1 %. Simultáneamente a las muestras se cargó, en un pocillo anexo, un marcador de pesos moleculares (*Precision Plus Protein Standard*, Bio-Rad® 161-0373). Tras la separación de las proteínas a lo largo del gel, estas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Sigma® Z670995-1EA) mediante un sistema de transferencia húmeda (*Mini Trans-blot*, Bio-Rad® 1703930), en tampón de transferencia (Trizma base 2,5 mM, glicina 19,2 mM y metanol al 20 %), durante 1 hora a 400 mA. Posteriormente se comprobó la eficacia de la transferencia tiñendo las membranas con una solución para tinción de proteínas (Rojo Ponceau S al 0,2 % [Sigma® P3504] disuelto en ácido acético glacial al 1 % [Panreac® 141008]). Tras eliminar el Rojo Ponceau con ácido acético al 1 %, se realizaron varios lavados con TBS-T (Tris-HCl a 20 mM pH 7,6, NaCl 0,8 % y Tween-20 al 0,1 %).

5.3.- Inmunodetección de proteínas

Las membranas se incubaron en tampón bloqueo (leche desnatada al 5 % en TBS-T), durante 1 hora a RT en agitación, seguido de la incubación con el correspondiente anticuerpo primario, O/N a 4 °C en agitación, disuelto en tampón bloqueo a la dilución indicada (ver tabla 2). Después de varios lavados de 5 min con TBS-T, se procedió a la incubación de estas con los respectivos anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (HRP, *horseradish peroxidase*) (ver tabla 3), disueltos en tampón bloqueo durante 1 hora a RT. Luego se lavaron con TBS-T varias veces y se detectó la proteína con un sistema de emisión de quimioluminiscencia basado en la reacción de la peroxidasa mediante el método ECL (*Western Lightning Plus reagents*, Perkin Elmer® NEL103001EA). La emisión de la membrana fue captada mediante película radiográfica y, posteriormente, revelada. Tras digitalizar la película, las bandas se densitometraron utilizando el programa de análisis de imagen ImageJ®. Para establecer un control interno de carga de las muestras los datos se expresaron como la ratio entre los valores densitométricos de las proteínas problema y GAPDH, considerando esta última constante en nuestro sistema. En los casos en los que necesitamos detectar proteínas de peso molecular similar, sobre la misma membrana, se necesitó eliminar los anticuerpos de la detección anterior mediante la técnica de *stripping*. Esta consistió en realizar 2 lavados de 5 min con una solución de NaOH 0,2 N y SDS al 1 %, para posteriormente lavar la membrana y proseguir el protocolo habitual.

6.- Transducción celular

6.1.- Construcciones

Las construcciones utilizadas fueron las siguientes:

- pMXIE-gfp: cedido por el Dr. S. Hitoshi (National Institute of Physiological Sciences, Japan) (Hitoshi y cols., 2002).
- shRNA-p53: codificado en el vector MLP (Thermofisher®) y resistente a puromicina (Marques-Torrejón y cols., 2013).

En el proceso de transformación se incubaron durante 30 min en hielo 30 µl de bacterias *Escherichia coli* competentes con 3 µg de DNA plasmídico, con la construcción pertinente. Seguidamente se les aplicó un choque térmico de 42 °C durante 45 seg permitiendo la entrada del DNA en la célula bacteriana. Paralelamente se realizaron controles negativos en presencia de bacterias y ausencia de plásmidos. Después del choque térmico, la suspensión bacteriana, se diluyó en 300 µl de medio LB (Luria-Bertani Broth, Gibco® 10855) y se incubó durante 1 hora a 37 °C en agitación. Posteriormente, mediante el método de triple estría, se inocularon unos 30 µl de la suspensión bacteriana transformada sobre placas con LB-agar y el antibiótico de resistencia del plásmido y se incubaron O/N a 37 °C. Al día siguiente se seleccionaron colonias aisladas con las que se inocularon matraces con 400 ml de medio LB y el correspondiente antibiótico a 100 µg/ml, estos se incubaron O/N a 37 °C en agitación. La suspensión bacteriana se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min y mediante el uso del *Plasmid Maxi Kit* (Qiagen® 12165) se extrajo el DNA plasmídico. Una vez precipitado el DNA y resuspendido en tampón Tris, se confirmó la identidad del plásmido mediante su digestión con enzimas de restricción y la electroforesis de los fragmentos generados.

6.2.- Transfección de construcciones sobre células productoras de retrovirus

En la producción de retrovirus se utilizó la línea celular empaquetadora Platinum-E (Plat-E). Esta posee gran estabilidad y asegura una elevada expresión de las proteínas estructurales de los retrovirus (GAG, POL y ENV), necesarias en la producción de estos. Para su expansión se descongelaron y sembraron en medio para Plat-E (D-MEM con 10 % de FBS inactivado por calor, L-glutamina 2 mM y penicilina/estreptomicina 1X) suplementado con antibióticos de selección (Puromicina a 1 µg/ml [Sigma® P8833] y Blastidina S a 10 µg/ml [Sigma® 15205]). Cuando estas se encontraban confluentes, aproximadamente a los 2 DIV, se lavaron con PBS y se incubaron con Tripsina/EDTA (0,25 % y 0,53 mM respectivamente) durante 5 min. Tras la tripsinización se recogieron, contaron y sembraron 7 x 10⁶ células Plat-E en cada placa de 100 mm de diámetro (P100) en medio para Plat-E sin suplementar con antibióticos de selección. A

las 24 horas, cuando las células se encontraban a un 70 % de confluencia, se les cambió el medio. Unas 6 horas más tarde se realizó la transfección utilizando el método de la polietilimina (PEI). Este polímero condensa el DNA entre cargas positivas, facilitando su entrada en la célula mediante endocitosis. En primer lugar se incubaron, durante 20 min a RT, 20 µg del vector correspondiente, diluido en 1 ml de D-MEM, junto con PEI (Polysciences® 23966) a una concentración final de 70 µg/ml. Seguidamente se añadieron los complejos DNA-PEI sobre las P100 de células Plat-E. Unas 18 horas más tarde se sustituyó el medio de cultivo por medio de NSC completo, lavando con PBS. Mediante su observación, con un microscopio invertido dotado de fluorescencia (Nikon® Eclipse TE2000-S), se comprobó la expresión en la mayoría de células del reportero GFP, presente en la construcción, corroborando el éxito de la transfección. Unas 24 horas después de la transfección se recogió el sobrenadante viral, se pasó a través de un filtro de 0,45 µm y se preservó a -80 °C o se utilizó directamente en la transducción de las NSC.

6.3.- Transducción retroviral de las células madre neurales

El proceso de transducción retroviral se llevó a cabo sobre cultivos de neuroesferas de pase 1 sembradas a una densidad de 100000 células por pocillo de P6 y crecidas durante 2 DIV. Estas neuroesferas se resembraron con sobrenadante viral a una dilución 1/5 en medio de NSC completo y se añadió polibreno (Sigma® H9268), a una concentración final de 4 µg/ml, para incrementar la eficiencia de infección. Tras 12 horas de infección se recogieron de nuevo las neuroesferas y se resembraron en medio de NSC completo (libre de sobrenadante viral). Al día siguiente se comprobó, del mismo modo que la transfección, el éxito en la infección de las NSC. Cinco días después de la infección, las neuroesferas se disociaron y sus células individualizadas se utilizaron en la detección de la actividad SA β-gal (ver apartado 3.8. de material y métodos) o en el análisis de la expresión de mRNA (ver apartado 4. de material y métodos).

7.- Ensayos de actividad del sistema de defensa antioxidante

7.1.- Actividad glutatión reductasa

Para determinar la actividad GSR se utilizó el protocolo descrito en Massey y Williams, 1965. Este se basa en la monitorización del NADPH consumido en la reacción catalizada por la enzima, en la cual reduce el GSSG a GSH oxidando el NADPH a NADP⁺. En primer lugar, se recogieron con PBS las neuroesferas de pase 1 crecidas 3 DIV, se resuspendieron en tampón fosfato monopotásico (Kpi) 50 mM a pH 7,0 con Triton X-100 a 0,1 % y se sonicaron, obteniendo así el homogenado celular. Luego se obtuvo una línea de base durante 2 min a 340 nm y 25 °C, para determinar la oxidación no enzimática del NADPH, en los sustratos de la reacción (GSSG 2 mM y NADPH 0,2 mM en Kpi 0,2 M a pH 7,0). Seguidamente se añadió el homogenado celular

y se realizó un seguimiento de 2 min de la disminución de absorbancia a 340 nm. La pendiente obtenida se relativizó a la cantidad de proteína total.

7.2.- Actividad catalasa

La actividad CAT fue determinada siguiendo el método descrito en Aebi, 1984, basado en la monitorización de la descomposición del H₂O₂, catalizada por la enzima, a 240 nm. Las neuroesferas (P1+3DIV) fueron recogidas con PBS, se resuspendieron en tampón (Kpi 50 mM y pH 7,0 con triton X-100 a 0,1 %) y finalmente fueron sonicadas. Tras hacer el autocero a 240 nm y 20 °C se añadió a la muestra H₂O₂ a una concentración final de 10 mM y se siguió la variación de la absorbancia durante 30 seg. Con los resultados obtenidos se calculó la constante de velocidad de descomposición del H₂O₂ y se relativizó a la cantidad de proteína total.

7.3.- Actividad glucosa-6P-deshidrogenasa

En la determinación de la actividad glucosa-6P-deshidrogenasa (G6PDH) se realizó el método descrito en Lohr y Waller, 1974. Este se basa en el seguimiento de la producción de NADPH, a 340 nm y 25 °C, procedente de la reducción del NADP⁺ acoplado a la deshidrogenación de la glucosa-6-fosfato. En primer lugar se recogieron las neuroesferas (P1+3DIV) y se homogeneizaron en tampón Kpi 100 mM y pH 7,4 con triton X-100 a 0,1 %. Los homogenizados se añadieron a cubetas con tampón trietanolamina 50 mM a pH 7,5 con glucosa-6-fosfato 0,67 mM y NADP⁺ 0,5 mM y se monitorizó la absorbancia a 340 nm durante 2 min. A partir de estos datos se obtuvo la pendiente, que se relativizó a la cantidad de proteína total para obtener el dato final.

7.4.- Actividad glutatión peroxidasa

Para la determinación de la actividad GPx se utilizó el *Glutathione Peroxidase Assay Kit* (Cayman Chemical® 703102) y se siguieron las indicaciones del fabricante. Esta consiste en la medida indirecta de la actividad GPx mediante el acoplamiento con la reacción que cataliza la GR. Para ello se añaden en exceso el sustrato de la GPx (GSH), la enzima GR y su sustrato NADPH, de tal forma que el producto de la actividad GPx (GSSG) será el factor limitante de la actividad GR. Bajo estas condiciones, en las que la actividad GPx es el limitante de la velocidad de reacción, la medida de la disminución de NADPH como indicador de la actividad GR (ver apartado 7.1. de material y métodos) es directamente proporcional a la actividad GPx de la muestra. Los cultivos de neuroesferas (P1+3DIV) se recogieron y homogeneizaron en tampón (Tris-HCl 50 mM a pH 7,5 con EDTA 5 mM y DTT 1 mM). Seguidamente se mezcló cada muestra con tampón de ensayo y con la mezcla de sustratos (NADPH, GSH y la enzima GSR), se

estableció la variación de absorbancia a 340 nm y finalmente se relativizó esta variación a la cantidad de proteína total.

7.5.- Determinación de los niveles de glutatión y disulfuro de glutatión

Los niveles de GSH y GSSG fueron determinados mediante cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas en tándem (*high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry* [HPLC-MS/MS]) siguiendo el protocolo descrito en Asensi y cols., 1994. El equipo utilizado fue un espectrómetro de masas Micromass Quatro triple-quadrupolo (Beverly[®]) equipado con una fuente de ionización electrospray Z-spray conectado a una bomba HPLC Shimadzu[®] LC-10ADVP y un sistema de control SCL-10AVP con un autoinyector SIL-10ADVP (Shimadzu[®]) acoplado al programa MassLynx 4.1 para la adquisición y procesado de datos. Las neuroesferas se recogieron y lavaron con PBS-NEM 5 mM (el NEM evita la oxidación de GSH). Seguidamente se añadió PCA 6 % en NEM 5 mM para precipitar las proteínas y se centrifugó la muestra. El pellet se utilizó para la cuantificación de proteína total y el sobrenadante se inyectó en HPLC-MS/MS.

8.- Capacidad antioxidante total (TROLOX)

El método utilizado para determinar la capacidad antioxidante total fue descrito por el grupo de investigación del Dr. Rice-Evans (Miller y cols., 1993; Rice-Evans y Miller, 1994). Este se basa en la reacción del H₂O₂ con la metamioglobina (MetaMB) para formar ferrilmioglobina (FerrilMB). A su vez la FerrilMB reacciona con el ABTS (2,2'-azinobis [3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato diamónico]) formando el radical ABTS^{•+} que presenta un pico de absorción a 734 nm. Los antioxidantes impiden estas reacciones y en consecuencia inhiben los valores de absorbancia a dicha longitud de onda, sirviendo dicha inhibición como indicador de la capacidad antioxidante. Como curva patrón se utilizan diferentes concentraciones del antioxidante TROLOX, expresando la capacidad antioxidante de la muestra problema en forma de equivalentes de TROLOX (concentración del antioxidante TROLOX que genera el mismo porcentaje de inhibición de la absorbancia a 734 nm). En primer lugar se recogieron las neuroesferas de pase 1 crecidas 3 DIV y se resuspendieron en Kpi 0,1 M y pH 7 con triton X-100 a 0,1 %. Tras la homogeneización, se incubaron a 30 °C todas las muestras problema y puntos de la curva patrón con los sustratos de la reacción (H₂O₂ 75 µM, MetaMB 2,5 µM y ABTS 150 µM) y se midió la absorbancia a tiempo 0 y 6 min. Con los resultados obtenidos se estimó el porcentaje de inhibición relativo a la cantidad de proteína total.

9.- Determinación de estrés oxidativo en proteínas

9.1.- Niveles de carbonilación proteínica

Para determinar los niveles de carbonilación proteínica se utilizó el *OxyBlot Protein Oxidation Detection Kit* (Millipore® S7150) siguiendo las indicaciones del fabricante. En primer lugar los grupos carbonilo fueron derivatizados en 2,4-dinitrofenilhidrazona por la reacción de 2,4-dinitrofenilhidrazina, dicha transformación de los grupos carbonilo facilitó su análisis. Seguidamente las muestras fueron separadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y analizadas siguiendo el protocolo de Western Blot (ver apartado 5. de material y métodos).

9.2.- Nitrosilación y fosforilación proteínica

Los niveles de nitrosilación y fosforilación proteínica fueron determinados mediante HPLC-MS/MS en un espectrómetro de masas Micromass Quatro triple-quadrupolo (Beverly®), equipado con una fuente de ionización electrospray Z-spray, conectado a una bomba HPLC Shimadzu® LC-10ADVP y un sistema de control SCL-10AVP con un autoinyector SIL-10ADVP (Shimadzu®) y acoplado al programa MassLynx 4.1 para la adquisición y procesado de datos. Tras el procesado de las neuroesferas (siguiendo un protocolo diseñado en el Departamento de Fisiología de la Universitat de València), se determinó la concentración de tirosinas fosforiladas (P-Tyr) y nitrosiladas (N-Tyr) y, en ambos casos, se relativizó a la concentración de fenilalanina (Phe).

10.- Niveles de malondialdehído

Los niveles de malondialdehído (MDA) fueron determinados de acuerdo con Wong y cols., 1987. Primero se hidrolizan los lipoperóxidos de las muestras y se derivatizan con ácido tiobarbitúrico (TBA, del inglés *thiobarbituric acid*) dando lugar a aductos (*Thiobarbituric acid reactive substances*, TBARS), que pueden ser analizados mediante HPLC-MS/MS. El ácido 2-tiobarbitúrico se une tanto con el MDA (TBA-MDA₂) como con los distintos grupos carbonilos. Por ello, se separa mediante HPLC el aducto TBA-MDA₂ y posteriormente se analiza la muestra mediante cromatografía de masas. Los cultivos de neuroesferas (P1+3DIV) se incubaron con acetonitrilo sódico 2 M a pH 3,5 con TBA 0,2 % durante 1 hora a 95 °C, hidrolizando los lipoperóxidos y conjugando estos con el TBA. Seguidamente se realizaron dos lavados con Kpi 50 mM, primero a pH 6,8 y luego a pH 3,5. Por último se inyectó el sobrenadante en el HPLC-MS/MS. El sistema cromatográfico consistió en un espectrómetro de masas triple-quadrupolo Micromass Quatro (Beverly®) equipado con un electrospray como fuente de ionización Z-spray con un LC-10A Shimadzu® acoplado al programa Trilution® para la adquisición y procesado de

datos. Las muestras fueron analizadas mediante HPLC de fase reversa con una columna Kromasil 100-5C8 (Teknocruma®) (15 x 0,46 cm). Las fases móviles consistieron en fosfato monopotásico 50 mM pH 6,8 con acetonitrilo (83/17) y acetonitrilo al 70 %. La velocidad de flujo fue de 1 ml/min y la lectura se realizó a 532 nm. El tiempo de retención del aducto TBA-MDA2 fue de aproximadamente 4,5 min y la duración del cromatograma de 50 min. La curva de calibración fue generada con 6 puntos (entre 0,391 y 25 µM) a partir de MDA-bis (Sigma® 108383) disuelto en H₂O.

11.- Niveles de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina

Los niveles de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) fueron cuantificados utilizando el *8-OHdG DNA Damage Quantification Direct Kit* (EpiQuik Epigetek® P-6003) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Esta determinación se basa en la detección de la 8-OHdG mediante anticuerpos y la cuantificación de su señal mediante la lectura de la absorbancia. Puesto que la cantidad de 8-OHdG es proporcional a la intensidad de densidad óptica medida, es posible estimar la cantidad de esta molécula a partir de una curva patrón. En primer lugar se recogieron las neuroesferas de pase 1 crecidas 3 DIV y se extrajo su DNA mediante el *Maxwell 16 Cell LEV DNA Purification Kit* (Promega® AS1140). Después se añadieron las muestras de DNA y puntos de la curva patrón en una placa multipocillo. Seguidamente, se incubaron los anticuerpos primarios, secundarios y la solución potenciadora de señal. Tras añadir una solución de revelado, se incubó la placa 10 min a RT y se paró la reacción con otra solución. Finalmente se leyó la absorbancia a 450 nm, estimando los niveles absolutos de 8-OHdG y relativizándolos a la cantidad de DNA.

12.- Análisis estadístico de los datos

Los resultados han sido presentados como la media \pm error estándar de la media (SEM, del inglés *standard error of the mean*) de un número (n) de cultivos/ratones independientes por condición experimental. La significatividad estadística fue determinada mediante una prueba t de Student de dos colas o un ANOVA de dos vías con el análisis *post hoc* mediante el test de Bonferroni, estableciendo una potencia de contraste de 0,05. Previamente se realizó la prueba F (test de homogeneidad de varianzas y de normalidad) para asegurar que las condiciones eran válidas para el análisis. Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa GraphPad Prism (GraphPad Software®).

Alelo	Secuencia	T^a anillamiento (°C)	Nº ciclos	Tamaño amplicón (pb)
Salvaje p53	F-5'-ATA GGT CGG CGG TTC AT-3' / R-5'-CCC GAG TAT CTG GAA GAC AG-3'	60	35	600
Mutante p53	F-5'-CTT GGG TGG AGA GGC TAT TC-3' / R-5'-AGG TGA GAT GAC AGG AGA TC-3'	60	35	300
Salvaje p19	F-5'-TCT CAC CTC GCT TGT CAC AG-3' / R-5'-GTC CTG CTT CTA CCT CGT GG-3'	65-55	19-9	330
Mutante p19	F-5'-CGG TGC CCT GAA TGA ACT GC-3' / R-5'-GAT ACT TTC TCG GCA GGA GCA A-3'	65-55	19-9	100

Anticuerpo	Especie¹	Casa comercial / referencia	Aplicación (dilución)			
			IHQ	WM	ICQ	WB
BrdU	Rat (m)	Abcam ab6326	1:600		1:600	
Caspasa 3 activa	Rb (p)	Abcam ab2302			1:200	
DCX	Gt (p)	Santa Cruz sc-8066	1:100			
GAPDH	Ms (m)	Millipore MAB374				1:1500
GFAP	Chk (p)	Millipore AB5541	1:400	1:400		
Histona 2AX fosforilada en la serina 139 (γH2AX)	Ms (m)	Millipore 05-636			1:100	
Histona 3 acetilada en la lisina 9 (ac-H3)	Rb (p)	Sigma H9286		1:10000		1:10000
Ki67	Rb (p)	Abcam ab15580	1:150			
Nestina	Ms (m)	Abcam ab6142	1:300			
p16	Rb (p)	Santa Cruz sc-1207				1:200
p19	Rat (m)	Abcam ab26696				1:1000
p53	Rb (p)	Novocastra NCL-p53-CM5p				1:500
p53 acetilado en lisina 379 (ac-p53)	Rb (p)	Cell Signalling 2570				1:1000
p53 fosforilado en la serina 18 (pp53)	Rb (p)	RyD AF2887				1:500
SOX2	Gt (p)	RyD AF2018	1:50			
S100β	Rb (p)	Dako N1573	1:150	1:150		
α-Tubulina acetilada en lisina 40	Ms (m)	Sigma T7451		1:500		
β-Catenina	Rb (p)	Cell Signaling 9587-S		1:100		
γ-Tubulina	Gt (p)	Santa Cruz sc-7396		1:600		

¹ Especie en la que ha sido generado: Rat: rata; Rbt: conejo; Gt: cabra; Ms: ratón; Chk: pollo.

¹ (m): monoclonal; (p): policlonal

Anticuerpo	Especie¹	Casa comercial / referencia	Dilución
HRP α -Ms	Gt	Dako P0447	1:2000
HRP α -Rb	Dk	GE Healthcare Amersham NA934	1:5000
HRP α -Rat	Gt	GE Healthcare Amersham NA935	1:1000
Dylight 549 α -Rat	Dk	Jackson 712-506-153	1:1000
Dylight 488 α -Gt	Dk	Jackson 705-547-147	1:600
Dylight 488 α -Chk	Dk	Jackson 703-546-155	1:600
Dylight 488 α -Rbt	Dk	Jackson 711-546-152	1:600
Dylight 649 α -Chk	Dk	Jackson 703-496-155	1:600
Dylight 549 α -Chk	Dk	Jackson 703-516-155	1:800
Cy3 α -Gt	Dk	Jackson 705-165-147	1:1500
Cy3 α -Ms	Dk	Jackson 715-165-151	1:1500

¹ Especie en la que ha sido generado: Rat: rata; Rbt: conejo; Gt: cabra; Ms: ratón; Chk: pollo; Dk: burro.

Factor/fármaco	Casa comercial / referencia	Concentración de stock	Concentración de uso
Apocinina (APO)	Sigma W508454	100 mM en DMSO	100 μ M
Epigallocatequina galato (EGCg)	Sigma E4143	100 mM en DMSO	50 μ M
Curcumina	Sigma C7727	100 mM en DMSO	1 μ M
Resveratrol	Sigma R5010	100 mM en DMSO	1 μ M
Pterostilbeno	Sigma P1499	100 mM en DMSO	0,1 μ M
Pifithrin-alpha (PFT α)	Sigma P4359	40 mM en DMSO	20 μ M
Doxorrubicina	Sigma D1515	20 μ g/ml en H ₂ O	0,5 μ g/ml
KU55933	Calbiochem 118500	10 mM en DMSO	10 μ M
Ácido anacárdico (AA)	Sigma A7236	50 mM en DMSO	50 μ M
Tricostatina A (TSA)	Sigma T8552	5 mM en DMSO	25 y 50 nM
Ácido valpróico (VPA)	Sigma P4543	300 mM en H ₂ O	2 y 4 mM

Tabla 5: Sondas TaqMan para Q-PCR	
Gen	Identificación
<i>Agt</i> (angiotensinógeno)	Mm00599662_m1
<i>Duox1</i>	Mm01328685_m1
<i>Duox2</i>	Mm01326247_m1
<i>Gapdh</i> (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa)	Mm99999915_g1
<i>Gclc</i> (subunidad catalítica de la glutamato-cisteína ligasa)	Mm00802655_m1
<i>Gclm</i> (subunidad reguladora de la glutamato-cisteína ligasa)	Mm00514996_m1
<i>G6pdh</i> (glucosa-6P-deshidrogenasa)	Mm00656735_g1
<i>Gpx1</i> (glutación peroxidasa 1)	Mm00656767_g1
<i>HO-1</i> (hemo oxigenasa)	Mm00516005_m1
<i>Nox1</i> (NADPH oxidasa 1)	Mm00549170_m1
<i>Nox2</i> (NADPH oxidasa 2)	Mm01287743_m1
<i>Nox3</i> (NADPH oxidasa 3)	Mm01339132_m1
<i>Nox4</i> (NADPH oxidasa 4)	Mm00479246_m1
<i>Nqo1</i> (NADPH quinona oxidoreductasa 1)	Mm01253561_m1
<i>Nrf2</i> (factor 2 asociado al factor nuclear eritroide 2)	Mm00477784_m1
<i>S100b</i>	Mm00485897_m1
<i>Sod1</i> (superóxido dismutasa 1 o Cu/Zn)	Mm01344233_g1
<i>Sod2</i> (superóxido dismutasa 1 o Mn)	Mm01313000_m1

RESULTADOS

1.- Caracterización de la zona subependimaria de la cepa SAMP8

Como ya se ha descrito en la introducción, la cepa de ratones SAMP8 es un prometedor modelo de envejecimiento y enfermedades asociadas a la edad. Multitud de trabajos asocian el envejecimiento a alteraciones en las poblaciones de células madre (Sharpless y DePinho, 2007). Por ello decidimos estudiar en profundidad el comportamiento de las NSC presentes en la SEZ de los ratones senescentes SAMP8 y de su cepa control SAMR1.

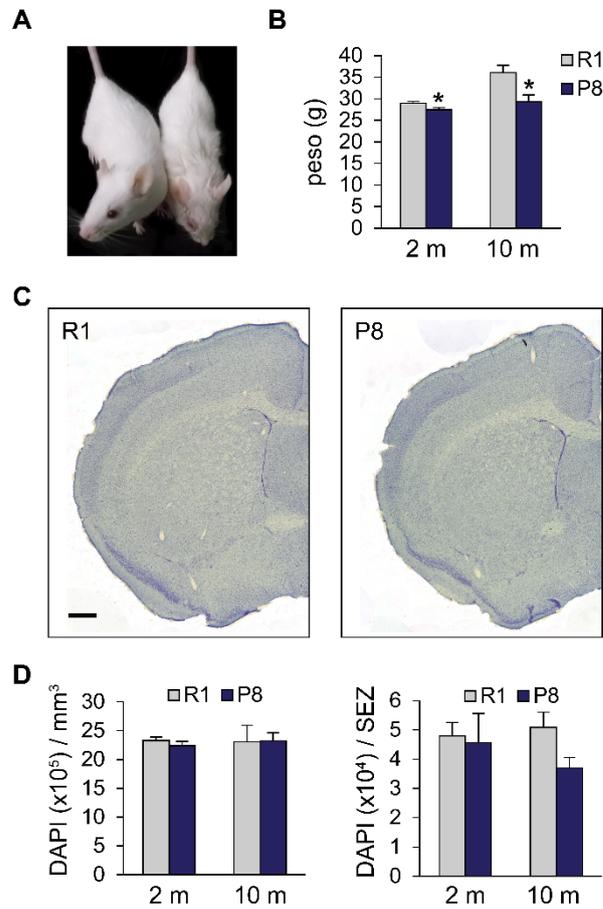
Para conocer tanto la situación de partida de la población adulta como su estado tras el proceso de envejecimiento, generamos dos grupos de edad en los que comparar ambas cepas entre sí. El primer grupo estaba constituido por ratones adultos jóvenes SAMP8 y SAMR1 de 2 meses de edad, con el fin de observar las posibles alteraciones propias del inicio del proceso de envejecimiento. Para estudiar la progresión de las alteraciones propias de los SAMP8 y compararlas con los SAMR1, establecimos un segundo grupo con ratones de 10 meses de edad. A esta edad, los SAMP8 ya han vivido un 60,2 % de su esperanza de vida y presentan muchas de las alteraciones asociadas a la edad que caracterizan esta cepa. No obstante, las tasas de muerte observadas hasta esta edad, en nuestras condiciones de estabulación, no diferían entre ambas cepas, razón por la que el uso de ratones de esta edad, frente a otra más avanzada, evitó sesgos por muerte diferencial entre ambas cepas.

En primer lugar y como punto de partida desde el que realizar cualquier estudio pormenorizado de la cepa, necesitábamos caracterizar de forma global la anatomía de las zonas susceptibles de análisis, cuyas alteraciones pudiesen influir en las interpretaciones posteriores. A simple vista observamos que los ratones SAMP8 de 10 meses de edad poseían las características ya descritas de pérdida de pelo, lesiones perioftálmicas y eran llamativamente inferiores en tamaño (figura 15 A) (Takeda y cols., 1997). El pesaje sistemático de varias camadas de ratones mostró una disminución significativa en la masa total de los ratones SAMP8, respecto a sus controles SAMR1, tanto de 2 como de 10 meses, siendo mayor la diferencia en el grupo de más edad (figura 15 B).

Dado que cabía la posibilidad de que la alteración en el tamaño de los ratones influyera en la anatomía de las estructuras cerebrales, decidimos examinar las áreas concretas objeto de estudio mediante un análisis histológico de la SEZ. El estudio de esta estructura en secciones coronales de cerebros teñidas con violeta de cresilo, no reveló diferencias citoarquitectónicas entre las cepas SAMR1 y SAMP8 (figura 15 C). Pese a que las mediciones del volumen de la SEZ revelaron una leve disminución de este en los SAMP8 respecto a los SAMR1 en ambos grupos de edad, estas diferencias no eran tan importantes como las obtenidas para la masa total de los ratones. Además, tanto la estimación de la densidad celular como del número de células totales de la SEZ, mostró valores similares en los diferentes grupos experimentales (figura 15 D). Los resultados anteriores nos permitieron normalizar nuestros recuentos respecto al área o al

número de células muestreadas, en función de la facilidad de muestreo de las células totales en la estructura estudiada.

Figura 15. Los ratones P8 muestran una disminución de su tamaño corporal que no afecta a la SEZ. (A) Fotografía de ratones R1 (*izquierda*) y P8 (*derecha*) de 10 meses de edad. (B) Peso corporal (expresado en gramos) de ratones R1 y P8 de 2 y 10 meses de edad (R1 2 m n = 16, P8 2 m n = 15, R1 10 m n = 4, P8 10 m n = 5). (C) Microfotografías de la tinción de violeta de cresilo en secciones coronales de la SEZ de ratones R1 y P8 de 2 meses de edad. (D) *Izquierda*: estimación del número total de células en la SEZ de ratones R1 y P8 de 2 y 10 meses de edad (R1 2 m n = 4, P8 2 m n = 4, R1 10 m n = 4, P8 10 m n = 5). *Derecha*: cuantificación de la densidad celular en la SEZ de ratones R1 y P8 de 2 y 10 meses de edad (R1 2 m n = 4, P8 2 m n = 4, R1 10 m n = 4, P8 10 m n = 5). Datos representados como media \pm SEM del número indicado de ratones (n) por grupo experimental. *p < 0,05. Barra de escala en C = 500 μ m.



1.1.- La zona subependimaria de los ratones SAMP8 posee un número elevado de células B1

Algunas de las características típicas del envejecimiento en el SNC, tanto sano como patológico, son la hipertrofia o hiperplasia (astrogliosis) y la hiperproliferación (astrocitosis) de los astrocitos (Goss y cols., 1991; Nichols y cols., 1993). La bibliografía muestra un claro proceso de gliosis en la mayoría de áreas cerebrales de los SAMP8: córtex, hipocampo, diversos núcleos del tronco encefálico, etc. (Takeda, 2009), si bien no se ha descrito el estado global de esta población en la SEZ. No obstante, un trabajo reciente describe un aumento en una subpoblación de astrocitos de la SEZ con la combinación de marcadores GFAP, SOX2 y BrdU que es utilizada como marcador de NSC (Diaz-Moreno y cols., 2013).

Nuestro objetivo principal consistió en el estudio de la población de NSC de la SEZ de los ratones SAMP8 desde el punto de vista del envejecimiento. Puesto que se ha descrito la relación entre los procesos de astrogliosis y envejecimiento y las NSC son una subpoblación de astrocitos; en primer lugar, decidimos analizar con detalle la población de astrocitos tanto en la SEZ como en las zonas anexas a esta. La observación del estriado en cortes coronales marcados inmunohistoquímicamente con anticuerpos para GFAP (marcador astrocitario general) nos permitió, mediante el análisis de esta zona de fácil muestreo, un punto de partida para los estudios posteriores. Contrariamente a lo descrito en otras áreas cerebrales de los SAMP8 (Takeda, 2009), en el estriado no observamos diferencias en la proporción ($0,63 \pm 0,11$ frente a $0,66 \pm 0,11$ % en los SAMR1; $n = 4$ animales por cepa) ni en la morfología e intensidad aparente de células GFAP⁺ entre las cepas SAMP8 y SAMR1 (figura 16 A,B). Sin embargo, el estudio detallado de la población astrocitaria de la SEZ reveló un incremento tanto en la proporción ($11,59 \pm 1,26$ en los SAMP8 frente a $7,42 \pm 0,91$ % en los SAMR1; $n = 4$ animales por cepa; p -valor $< 0,05$) como en intensidad de las células positivas para el marcador astrocitario GFAP (figura 16 B,C). La ausencia de alteraciones en la población astrocitaria estriatal, lejos de dificultar el entendimiento del fenotipo, nos indicó que los cambios observados en la SEZ no son causados por la influencia global del fondo genético. Es decir, el fenotipo característico de los astrocitos de la SEZ de los SAMP8 parecía deberse a influencias locales o alteraciones autónomo-celulares.

El siguiente paso fue analizar pormenorizadamente la población de NSC, una subpoblación de astrocitos, basándonos en las combinaciones de diferentes marcadores que actualmente son aceptados como indicadores de las NSC. La proporción de células doblemente marcadas para GFAP y el factor de transcripción SOX2 fue significativamente superior en los SAMP8 ($16,44 \pm 1,06$, $n = 4$, frente a $10,18 \pm 0,27$ %, $n = 3$, en los SAMR1; p -valor $< 0,01$; figura 16 D). Lo mismo sucedió con la proporción de astrocitos que a su vez eran doblemente positivos para nestina (marcador de célula indiferenciada) y SOX2 ($23,05 \pm 1,27$ en los SAMP8 frente a $16,11 \pm 1,21$ % en los SAMR1; $n = 3$; p -valor $< 0,05$; figura 16 D). Por el contrario, el porcentaje de astrocitos que eran positivos para S100 β era significativamente inferior en los SAMP8 ($3,26$

$\pm 0,92$ frente a $15,88 \pm 2,76$ % en los SAMR1; $n = 4$; p -valor $< 0,01$; figura 16 E). Este es un marcador de células ependimarias y de astrocitos diferenciados terminalmente y por lo tanto no neurogénicos (Raponi y cols., 2007). El conjunto de resultados anteriormente descritos, indicaron que los ratones SAMP8 jóvenes poseían un número de células B1 de la SEZ significativamente superior a los SAMR1.

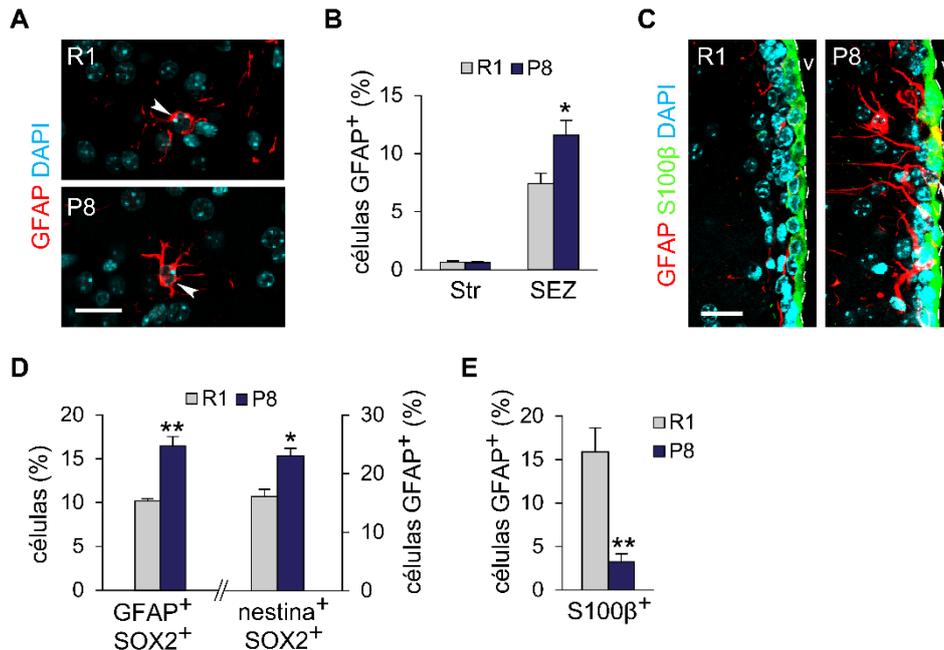


Figura 16. La SEZ de los ratones P8 presenta un número elevado de astrocitos con características de células madre. Recuentos de poblaciones astrocitarias, mediante el uso de IHQ de fluorescencia para diversos marcadores, en secciones coronales del cerebro de ratones R1 y P8. **(A)** IHQ para la detección de GFAP (rojo) y contratinción nuclear con DAPI (azul claro) en el estriado. **(B)** Porcentaje de células GFAP⁺/DAPI en el estriado (*izquierda*) y en la SEZ (*derecha*) (R1 $n = 4$, P8 $n = 4$). **(C)** IHQ para la detección de GFAP (rojo) y S100 β (verde) en la SEZ, contratinción nuclear con DAPI (azul claro). Las líneas discontinuas blancas indican el límite del ventrículo lateral (v). **(D)** Porcentaje de células GFAP⁺SOX2⁺/DAPI (*izquierda*) (R1 $n = 4$, P8 $n = 4$) y GFAP⁺nestina⁺SOX2⁺/GFAP⁺ (*derecha*) (R1 $n = 3$, P8 $n = 3$) en la SEZ. **(E)** Porcentaje de células GFAP⁺S100 β ⁺/GFAP⁺ en la SEZ (R1 $n = 4$, P8 $n = 4$). Datos representados como media \pm SEM del número indicado de ratones (n) por cepa. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Las puntas de flecha blancas indican células positivas para un único marcador. Barras de escala: (A), 20 μ m; (C), 10 μ m.

Otra de las características fundamentales a tener en cuenta en una población de SC es la tasa de proliferación de estas y de su progenie. Para determinar la posible existencia de alteraciones en la proliferación celular de la SEZ se inyectó un pulso de BrdU y se sacrificaron los animales una hora después. Este régimen de inyecciones (BrdU1h) marca principalmente las células de rápida división, entre las que se encuentran los TAP y los neuroblastos (Colak y cols., 2008). El porcentaje de células BrdU1h⁺, detectado mediante IHQ, fue similar entre ambas cepas ($8,57 \pm 0,57$ en los SAMP8 frente a $9,50 \pm 0,50$ % en los SAMR1; $n = 4$; figura 17 A,B). Este resultado sugirió que la proliferación de las células de rápida división no se encontraba alterada a nivel global. Sin embargo, la proporción de células marcadas para GFAP y que incorporaban BrdU fue significativamente superior en los SAMP8 ($0,38 \pm 0,06$ frente a $0,22 \pm 0,06$ % en los SAMR1; $n = 4$; p -valor $< 0,05$; figura 17 B,C). Por otra parte se realizó un triple marcaje para

GFAP, SOX2 y Ki67, identificando así aquellas NSC que estaban en ciclo (figura 17 D). Del mismo modo que en el recuento anterior, el porcentaje de células triplemente marcadas fue superior en los SAMP8 ($1,52 \pm 0,12$, $n = 4$, frente a $0,97 \pm 0,18$ %, $n = 3$, en los SAMR1; p -valor $< 0,05$; figura 17 E). Dichos resultados indicaron un incremento en la proliferación de los astrocitos con características de NSC presentes en la SEZ.

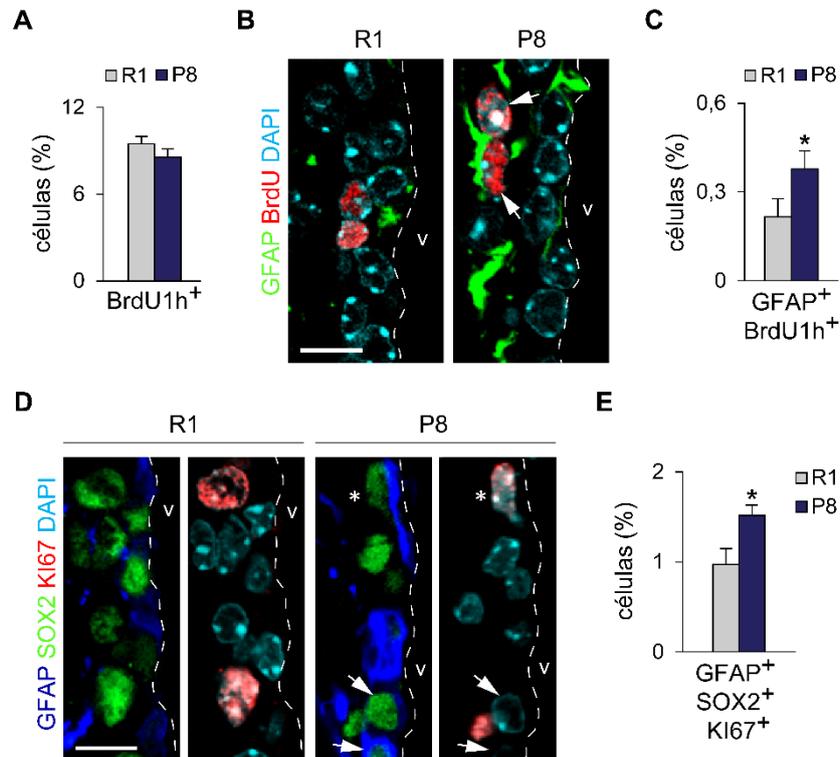


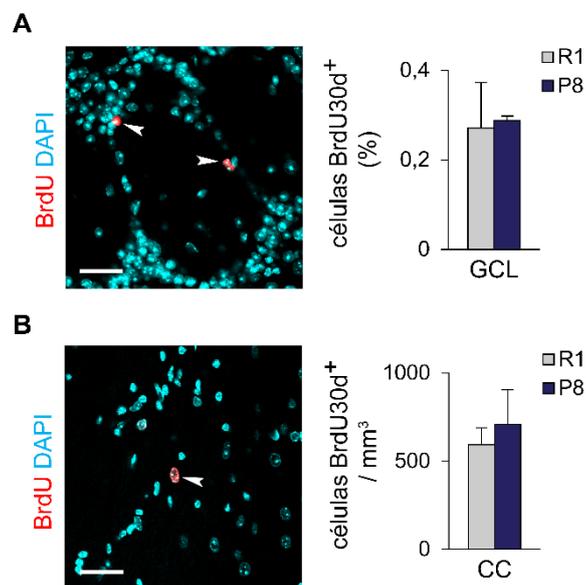
Figura 17. Los astrocitos con características de NSC de la SEZ de los ratones P8 muestran hiperproliferación. Caracterización de la proliferación de los astrocitos de la SEZ, mediante inmunofluorescencia de marcadores relacionados, en secciones coronales de ratones R1 y P8. **(A)** Porcentaje de células BrdU1h⁺/DAPI (R1 $n = 4$, P8 $n = 4$). **(B)** IHQ para la detección de GFAP (verde) y BrdU (rojo) en muestras procedentes de ratones inyectados con el protocolo de BrdU1h, contrateñida nuclear con DAPI (azul claro). **(C)** Porcentaje de células GFAP⁺BrdU1h⁺/DAPI (R1 $n = 4$, P8 $n = 4$). **(D)** IHQ para la detección de GFAP (azul oscuro), SOX2 (verde), Ki67 (rojo) en secciones de SEZ contrateñidas con DAPI (azul claro). **(E)** Porcentaje de células GFAP⁺SOX2⁺Ki67⁺/DAPI (R1 $n = 3$, P8 $n = 4$). Datos representados como media \pm SEM del número indicado de ratones (n) por cepa. * $p < 0,05$. Las líneas discontinuas blancas indican el límite del ventrículo lateral (v). Las flechas blancas indican células doblemente positivas y los asteriscos blancos indican células positivas para los tres marcadores. Barras de escala en B y D = 10 μ m.

1.2.- El aumento en la proliferación de las células madre neurales no conduce a una mayor neurogénesis

Como ya se ha comentado en la introducción, las NSC de la SEZ dan lugar tanto a neuronas olfativas como a oligodendrocitos y se puede cuantificar el número de estas nuevas células en un momento determinado, mediante la administración de BrdU. La BrdU incorporada durante la fase S de la división que precede a la salida de ciclo de un neuroblasto u oligodendroblasto queda retenida y puede ser identificada si, tras el pulso de BrdU y hasta el

sacrificio del animal inyectado, se deja pasar el tiempo suficiente como para que las células de todo el linaje que proliferan activamente diluyan el contenido de BrdU de su genoma en las sucesivas divisiones. Para ello, se utilizó un régimen de inyecciones de BrdU con sacrificio tras 30 días (ver apartado 2.1.1. de material y métodos) y se determinó el porcentaje de células BrdU30d⁺ en la GCL, una de las zonas de incorporación de los neuroblastos procedentes de la SEZ, mostrando valores similares entre ambas cepas (0,29 ± 0,01 en los SAMP8 frente a 0,27 ± 0,10 % en los SAMR1; n = 3; figura 18 A). Puesto que el destino de los oligodendrocitos es el CC (Menn y cols., 2006), también realizamos un recuento en dicha estructura. El número de células BrdU30d⁺ por unidad de volumen, en el CC, tampoco mostró diferencias (708 ± 197, n = 4, en los SAMP8 frente a 593 ± 97 BrdU30d⁺/mm³, n = 6, en los SAMR1; figura 18 B).

Figura 18. Las poblaciones de destino de la progenie de las NSC no muestran un incremento en la incorporación de nuevas células. Cuantificación de la incorporación de nuevas células en los lugares de destino de la progenie de las NSC de la SEZ, utilizando IHQ de fluorescencia para la detección de BrdU (rojo) y contratinción nuclear con DAPI (azul claro), en secciones coronales del cerebro de ratones inyectados con BrdU y sacrificados a los 30 días. **(A)** Incorporación de BrdU en la capa glomerular del bulbo olfatorio (GCL). *Izquierda:* IHQ representativa. *Derecha:* porcentaje de células LRC⁺/DAPI en la GCL (R1 n = 3, P8 n = 3). **(B)** Incorporación de BrdU en el cuerpo calloso (CC). *Izquierda:* IHQ representativa. *Derecha:* densidad de células LRC⁺ en el CC (R1 n = 6, P8 n = 4). Datos representados como media ± SEM del número indicado de ratones (n) por cepa. Las puntas de flecha blancas indican células positivas para BrdU. Barras de escala en A y B = 30 µm.



La ausencia de niveles significativamente superiores de nuevas células, en los lugares de destino de la progenie de las NSC, nos llevó al análisis de la progenie indiferenciada procedente de la SEZ. Para ello estimamos la proporción de células positivas para DCX en el RMS. A pesar del elevado número de células GFAP⁺ proliferantes en la SEZ de los SAMP8, el porcentaje de neuroblastos migradores (DCX⁺) en el RMS no se encontraba incrementado (16,83 ± 2,60 en los SAMP8 frente a 18,18 ± 3,00 % en los SAMR1; n = 4 animales por cepa). En un intento por reconciliar la elevada proliferación astrocitaria en la SEZ con la ausencia de efectos netos en la progenie, estudiamos posibles alteraciones en la migración de los neuroblastos. Para ello reanalizamos el recuento de células positivas para DCX en el RMS distinguiendo las proporciones según su nivel en el eje antero-posterior (figura 19 A,B). La presencia de porcentajes similares entre ambas cepas, en los distintos niveles analizados, indicó que la migración de estos no se encontraba afectada.

Entre las posibles causas que darían explicación al fenotipo observado en una situación de proliferación exacerbada, estaría una disminución en la tasa de proliferación de los

neuroblastos. Para evaluar esta posibilidad, se cuantificó la proporción de neuroblastos que a su vez habían incorporado BrdU1h. Dichos resultados fueron equivalentes entre ambas cepas (20,64 \pm 4,85 en los SAMP8 frente a 17,25 \pm 2,70 % en los SAMR1; n = 4 animales por cepa), manteniéndose los valores cuando se realizaba un análisis por niveles rostro-caudales (figura 19 B,C).

Otra alteración, que compensaría el incremento en la producción neta de la progenie procedente de la SEZ, sería una disminución en la supervivencia celular de los precursores que llegara a contrarrestar el resultado de la elevada activación de las células B1. Por ello investigamos, mediante la técnica TUNEL, las tasas de apoptosis en los astrocitos y neuroblastos de la zona. Los niveles de células doblemente marcadas para TUNEL y GFAP indicaron proporciones similares de astrocitos apoptóticos en la SEZ de los SAMP8 y los SAMR1 (803 \pm 464 frente a 839 \pm 499 células/mm³, respectivamente; n = 4; figura 19 D,E). Sin embargo, la proporción de células TUNEL⁺DCX⁺ fue significativamente superior en el RMS de los SAMP8 (3110 \pm 626 frente a 830 \pm 496 células/mm³ en los SAMR1; n = 4; p-valor < 0,05; figura 19 E,F). El conjunto de experimentos nos indicó que la ausencia de efectos netos en neurogénesis no era debida a alteraciones en migración o proliferación de los neuroblastos sino a un incremento en la muerte celular de estos por apoptosis.

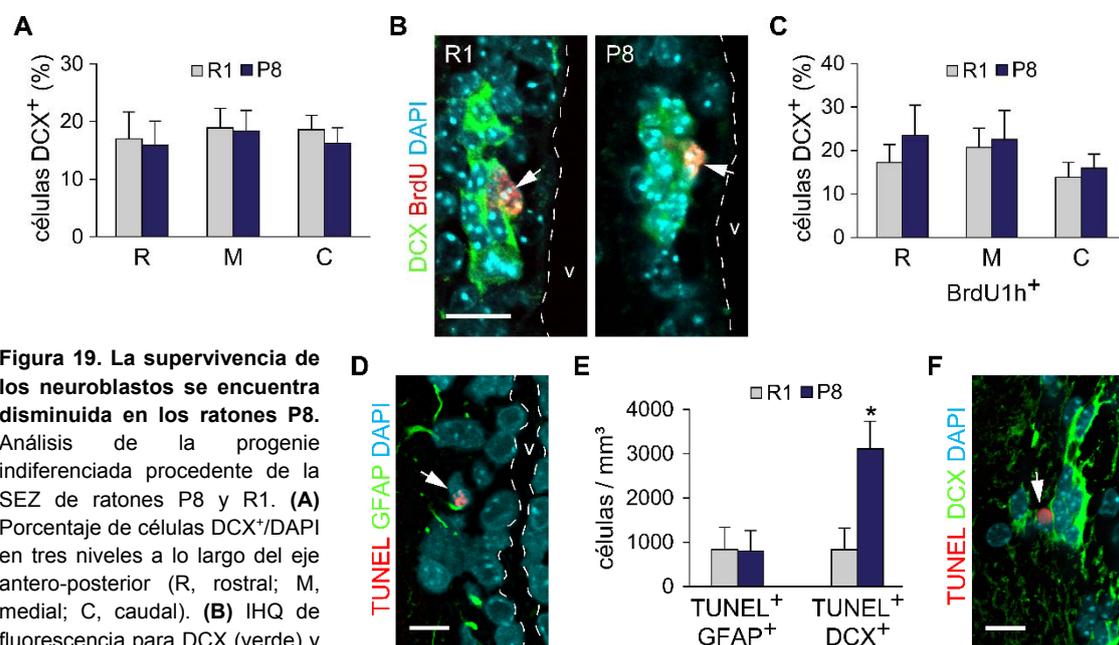


Figura 19. La supervivencia de los neuroblastos se encuentra disminuida en los ratones P8.

Análisis de la progenie indiferenciada procedente de la SEZ de ratones P8 y R1. **(A)** Porcentaje de células DCX⁺/DAPI en tres niveles a lo largo del eje antero-posterior (R, rostral; M, medial; C, caudal). **(B)** IHQ de fluorescencia para DCX (verde) y BrdU (rojo) sobre muestras

procedentes de ratones inyectados con el protocolo de BrdU1h, contratinción nuclear con DAPI (azul claro). **(C)** Porcentaje de células DCX⁺BrdU1h⁺/DCX⁺ en los niveles R, M y C. **(D)** Marcaje de células apoptóticas mediante la técnica TUNEL (rojo) combinado con la IHQ de fluorescencia para GFAP (verde) en la SEZ, contratinción con DAPI (azul claro). **(E)** Densidad de células TUNEL⁺GFAP⁺ en la SEZ (*izquierda*) y TUNEL⁺DCX⁺ en el RMS (*derecha*). **(F)** Marcaje de células apoptóticas mediante la técnica TUNEL (rojo) combinado con la IHQ de fluorescencia para DCX (verde) en el RMS, contratinción con DAPI (azul claro). Datos representados como media \pm SEM; n = 4 ratones por cepa. *p < 0,05. Las líneas discontinuas blancas indican el límite del ventrículo lateral (v). Las flechas blancas indican células doblemente positivas. Barras de escala en B, D y F = 10 μ m.

1.3.- La zona subependimaria presenta una citoarquitectura alterada

La observación detallada de la citoarquitectura de la SEZ mostró que las células GFAP⁺ no sólo eran más numerosas sino que presentaban una morfología más ramificada y el cuerpo celular de algunas de ellas parecía contactar directamente con el lumen ventricular. Mediante el uso de la doble IHQ para GFAP y S100 β , pudimos comprobar que esos astrocitos adentrados en el espacio ventricular interrumpían la capa de células endimarias, pero no expresaban S100 β (figura 20 A). Tras determinar la ausencia de productividad neta y sus causas (ver apartado 1.2. de resultados), reanudamos la investigación de este otro aspecto llamativo de la SEZ de los ratones SAMP8.

Para indagar más en estas alteraciones citoarquitectónicas, utilizamos la técnica de WM que, en comparación con los cortes histológicos, preserva íntegramente la morfología de la zona. Estas preparaciones de las paredes de los LV, se han convertido en una herramienta esencial para entender la organización y parcelación de este nicho de SC (Mirzadeh y cols., 2008). En las IHQ llevadas a cabo sobre estas muestras se utilizaron los marcadores GFAP, β -catenina que permite delinear las membranas celulares y también γ -tubulina como marcador de los cuerpos basales de los cilios o en su lugar α -tubulina acetilada como marcador del citoesqueleto ciliar. Mediante la aplicación de dicha técnica, observamos que la SEZ de los ratones SAMR1 presentaban la organización típica de *pinwheels* (figura 20 B,C), similar a la presente en las cepas de ratones CD1 y C57BL/6 (Luo y cols., 2006; Mirzadeh y cols., 2008; Shook y cols., 2012). Por el contrario, al examinar los SAMP8, se hacía patente una alteración en la organización de los componentes de sus *pinwheels*. Estos formaban numerosas agrupaciones de células GFAP⁺ uniciliadas y con extensas superficies apicales integradas en el plano de la capa endimaria (figura 20 B,C). El aspecto de los *pinwheels* también fue visualizado mediante microscopio electrónico de barrido (figura 20 D), constatando la presencia de *pinwheels* con la morfología alterada en los SAMP8. Mediante la inmunotinción de preparaciones de WM con el marcador S100 β comprobamos que, al igual que las células B1 clásicas, estas no lo expresaban, al menos en niveles detectables (figura 20 E). Puesto que estas células expresaban los marcadores y poseían las características morfológicas de las células B1 pero su disposición en el nicho era una característica distintiva, las denominamos “células tipo B1 interpuestas” (BIC, *B1-like interposed cells*).

La corroboración de alteraciones morfológicas en la SEZ, mediante su visualización desde el espacio ventricular, nos condujo a la realización de recuentos que plasmaran este fenotipo numéricamente. En primer lugar quisimos comparar cuantitativamente los elementos de la SEZ de los ratones SAMR1 con respecto a otras cepas utilizadas comúnmente en investigación. A pesar de la similitud en el aspecto de la SEZ de estas cepas, los SAMR1 presentaron una menor densidad de *pinwheels* (289 ± 30 , n=4, frente a 952 ± 45 *pinwheels*/mm², n = 3, en los C57BL/6; p-valor < 0,001; figura 20 F) y de células B1 con una disposición normal

(543 ± 34 , $n = 3$, frente a 1732 ± 53 células B1/mm², $n = 3$, en los C57BL/6; p -valor $< 0,001$; figura 20 F) en la SEZ dorsal, con respecto a los ratones de la cepa C57BL/6. Del mismo modo, se han descrito densidades superiores de *pinwheels* y células B1 en la SEZ de la cepa murina CD1 respecto a nuestros recuentos en los SAMP8 (Luo y cols., 2006; Mirzadeh y cols., 2008; Shook y cols., 2012). Estos resultados sugieren un posible efecto del fondo genético SAM sobre la población de células B1.

Tras revelar las características propias de la SEZ de la cepa SAM, nos dispusimos a cuantificar algunos de sus elementos en la cepa SAMP8. Tal y como describimos cualitativamente, la presencia de células que denominamos BIC era muy superior en los SAMP8 (960 ± 48 , $n=3$, frente a 119 ± 12 BIC/mm², $n = 4$, en los C57BL/6; p -valor $< 0,001$; figura 20 H). Otra característica propia de las BIC de los SAMP8 fue su agrupación en un número muy superior a las B1, dando lugar a grupos de entre 3 y 8 células muy frecuentemente (figura 20 G). Además, determinamos la existencia de una menor densidad de *pinwheels* en los SAMP8 (59 ± 7 *pinwheels*/mm³, $n = 3$; figura 20 F) respecto a los SAMR1 (indicado en el párrafo anterior). Este resultado, unido a una distribución similar de las células B1 en ambos grupos (figura 20 G), sugería la existencia de una reducida densidad de células B1 en la SEZ de la cepa SAMP8. En efecto, la densidad de células B1 posicionadas adecuadamente en los *pinwheels* (96 ± 18 B1/mm³, $n = 3$; figura 20 F) resultó ser significativamente menor respecto a los SAMR1 (indicado en el párrafo anterior).

Una vez analizada la citoarquitectura de la SEZ de los SAMP8 mediante WM, realizamos recuentos equivalentes utilizando las IHQ de cortes coronales para los marcadores S100 β y GFAP (figura 20 A). Con el fin de identificar las BIC, se contabilizaron las células positivas para GFAP pero que no expresaban S100 β , haciendo distinción entre las que sus núcleos se encontraban en la capa celular más próxima al ventrículo y el resto de las mismas. Además, la inmunotinción para S100 β nos ayudó a corroborar la integridad de la capa endimaria, ya que en algunas ocasiones esta resulta dañada durante el procesado histológico. El recuento reveló, del mismo modo que con los WM, un aumento en la proporción de células GFAP⁺ que consideramos BIC ($3,34 \pm 0,34$ en los SAMP8 frente a $1,37 \pm 0,07$ % en los SAMR1; $n = 3$ animales por cepa; p -valor $< 0,01$), mientras que el valor para el resto de las mismas (SE, subependimales), también negativas para S100 β ($6,12 \pm 0,34$ en los SAMP8 frente a $6,17 \pm 0,87$ % en los SAMR1; $n = 3$ animales por cepa), fue equivalente entre ambas cepas (figura 20 I). Este resultado demostró que el aumento de células GFAP⁺ observado previamente, era debido a un incremento en las células que están adentradas en la capa endimaria y que denominamos BIC.

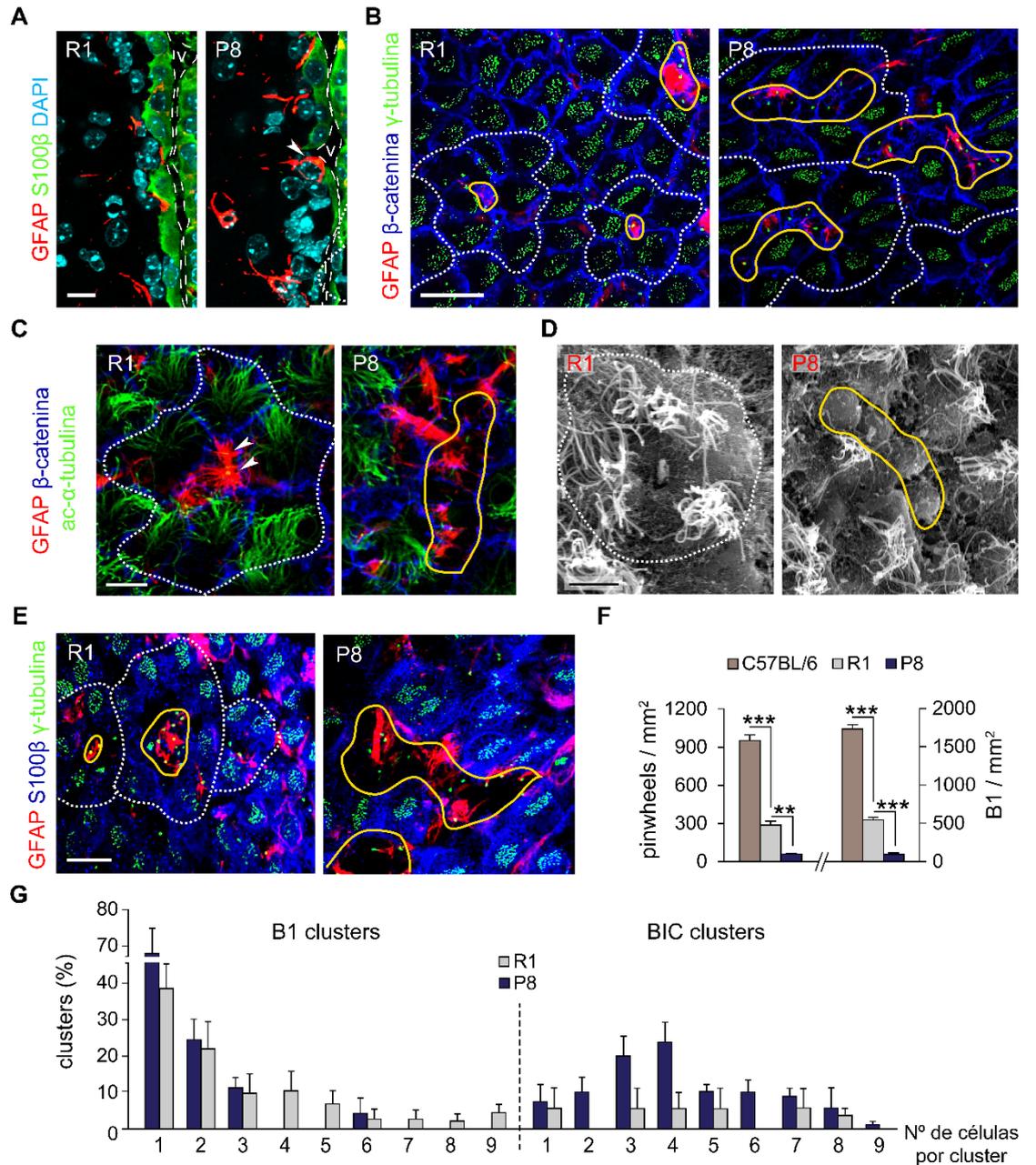


Figura 20. La citoarquitectura de la SEZ se encuentra alterada en los ratones P8. Análisis morfológico del nicho neurogénico de la SEZ y de la disposición de las NSC en ratones C57BL/6, R1 y P8. **(A)** IHQ para GFAP (rojo) y S100 β (verde) en secciones coronales de la SEZ, contratinción nuclear con DAPI (azul claro). Las líneas discontinuas blancas indican el límite del ventrículo lateral (v). La punta de flecha blanca indica una célula positiva para GFAP. **(B)** IHQ de fluorescencia para la detección de GFAP (rojo) β -catenina (azul oscuro) y γ -tubulina (verde) sobre preparaciones de WM de la SEZ. **(C)** IHQ de fluorescencia, en WM de la SEZ, para GFAP (rojo) β -catenina (azul oscuro) y α -tubulina acetilada en la lisina 40 (ac- α -tubulina) (verde). Las puntas de flecha blancas indican el cilio primario de las células B1. **(D)** Imágenes de WM de la SEZ, obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido. **(E)** Inmunofluorescencia para GFAP (rojo) S100 β (azul oscuro) y γ -tubulina (verde) en WM de la SEZ. **(F)** Densidad de pinwheels (izquierda) y células B1 (derecha) por unidad de superficie en la SEZ dorsal (C57BL/6 n = 3, R1 n = 4, P8 n = 3). **(G)** Distribución de las agrupaciones (clusters) de células B1 (izquierda) y BIC (derecha) en la SEZ dorsal (R1 n = 4, P8 n = 3). **(H)** Densidad de células BIC por unidad de superficie en la SEZ dorsal (R1 n = 4, P8 n = 3). **(I)** Porcentajes de células GFAP⁺S100 β ⁻/DAPI interpuestas en la capa endimaria (BIC) (izquierda) y presentes por debajo de esta o también denominadas subependimales (SE) (derecha), determinados a partir de secciones coronales de la SEZ (R1 n = 3, P8 n = 3). Datos representados como media \pm SEM del número indicado de ratones (n) por cepa. **p < 0,01, ***p < 0,001. En B, C, D y E: las líneas blancas discontinuas delimitan los pinwheels y las líneas amarillas continuas delimitan las células B1 y BIC. Barras de escala: (A) y (B), 10 μ m; (C) y (D), 5 μ m; (E), 20 μ m.

1.4.- La hiperproliferación de las células madre neurales está asociada a su posicionamiento anómalo

Tras describir un incremento en la proporción de astrocitos adentrados en la capa endodimaria (BIC) y una hiperproliferación de los astrocitos a nivel global, era necesario estudiar el nivel proliferativo de las células que denominamos BIC. Utilizando IHQ en cortes coronales, del mismo modo que en el recuento general de BIC (ver figura 20 I), observamos una mayor proporción de estas células que no expresaban S100 β pero si Ki67, indicando que eran metabólicamente activas. Por el contrario, la proporción de células SE proliferantes observada fue similar en ambas cepas (figura 21 A). Estos resultados sugerían una correlación entre el posicionamiento anormal anteriormente descrito y la hiperproliferación de los astrocitos de la SEZ.

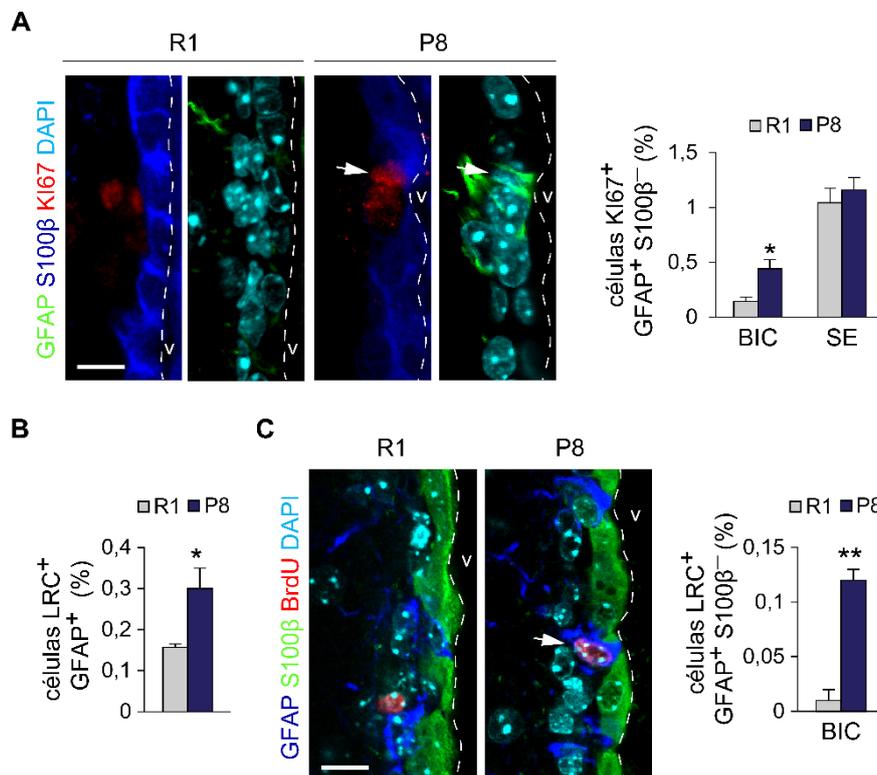


Figura 21. Los astrocitos hiperproliferantes corresponden a la población de células BIC.

Análisis del estado proliferativo de los astrocitos de la SEZ en función de su disposición en el nicho, mediante IHQ de secciones coronales de ratones R1 y P8. **(A)** *Izquierda*: IHQ para la detección de GFAP (verde), S100 β (azul oscuro) y Ki67 (rojo), contraindicación nuclear con DAPI (azul claro). *Derecha*: porcentajes de células Ki67⁺GFAP⁺S100 β ⁻/DAPI interpuestas en la capa endodimaria (BIC) (*izquierda*) y subependimales (SE) (*derecha*) (R1 n = 4, P8 n = 4). **(B)** Porcentaje de células LRC⁺GFAP⁺/DAPI (R1 n = 3, P8 n = 3). **(C)** *Izquierda*: IHQ para la detección de GFAP (azul oscuro), S100 β (verde) y BrdU (rojo) en muestras procedentes de ratones inyectados con BrdU y sacrificados a los 30 días, contraindicación nuclear con DAPI (azul claro). *Derecha*: porcentaje de células LRC⁺GFAP⁺S100 β ⁻/DAPI de tipo BIC (R1 n = 3, P8 n = 3). Datos representados como media \pm SEM del número indicado de ratones (n) por cepa. *p < 0,05, **p < 0,01. Las líneas discontinuas blancas indican el límite del ventrículo lateral (v). Las flechas blancas indican células doblemente positivas. Barras de escala en A y C = 10 μ m.

Una vez caracterizamos la población de células B1 así como su estado proliferativo, el siguiente paso consistió en discernir la población de astrocitos activados. Para ello utilizamos cortes histológicos de ratones a los que se les había administrado BrdU y sacrificado a los 30 días (BrdU30d⁺). Este régimen de inyecciones no sólo permite distinguir la progenie diferenciada de las NSC en las zonas de destino, sino que también permite distinguir en la SEZ las NSC que, por ser de división más lenta que los TAP y los neuroblastos, son capaces de retener la marca de la BrdU (LRC). Observamos un aumento significativo en la proporción de células GFAP⁺LRC⁺ en los SAMP8 ($0,30 \pm 0,05$ frente a $0,16 \pm 0,01$ % en los SAMR1; $n = 3$; p -valor $< 0,05$; figura 21 B) y mediante una triple IHQ para GFAP, S100 β y BrdU detectamos un incremento en las BIC activadas del orden de 12 veces superior en los SAMP8 respecto a los SAMR1 ($0,12 \pm 0,01$ frente a $0,01 \pm 0,01$ %, respectivamente; $n = 3$; p -valor $< 0,01$; figura 21 C). Este resultado nos indicó que la activación de las células B1 estaba asociada, al menos parcialmente, al posicionamiento anormal de estas como BIC.

En concierto con la presencia de mayor número de astrocitos proliferantes, obtuvimos a partir de la SEZ de ratones SAMP8 jóvenes un mayor número de neuroesferas primarias *in vitro* que en los SAMR1 ($946,56 \pm 17,30$ frente a $632,75 \pm 49,16$, respectivamente; $n = 8$; p -valor $< 0,001$; figura 22 A,B). Además el tamaño de estas fue significativamente superior en las esferas de los SAMP8 (figura 22 A,C). Puesto que los resultados *in vivo* mostraron que el incremento del número de células B1, así como de su proliferación, estaban asociados a su posicionamiento anormal en las cepas SAM, estos análisis *in vitro* sugieren que las BIC son células B1 modificadas, que mantienen las características propias de NSC y por lo tanto poseen capacidad formadora de esferas.

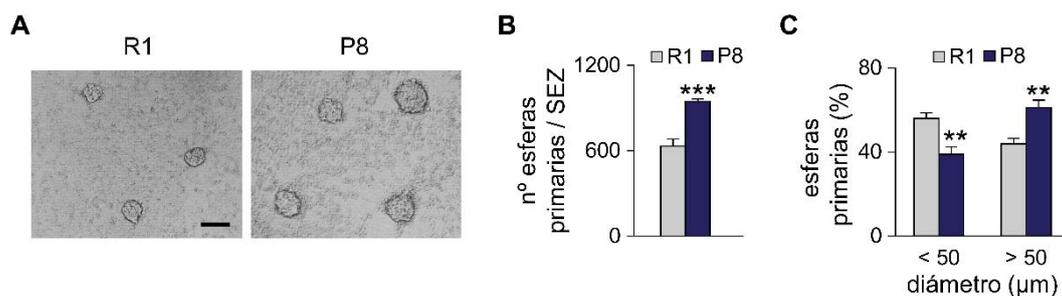


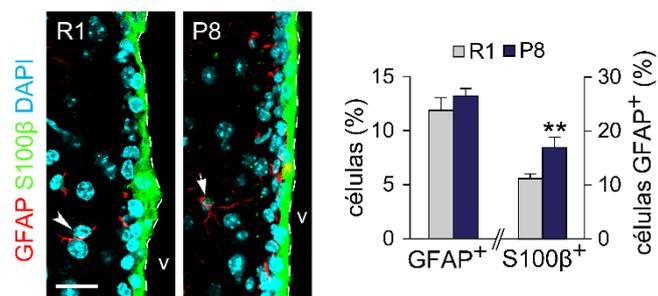
Figura 22. A partir de la SEZ de ratones P8 se obtienen más esferas y de mayor tamaño. Cultivos primarios de esferas crecidos durante 5 DIV, obtenidos a partir de ratones R1 y P8. **(A)** Imágenes de contraste de fases de esferas primarias. **(B)** Número de esferas formadas por SEZ. **(C)** Distribución de tamaños de las esferas formadas. Datos representados como media \pm SEM; $n = 8$ cultivos por cepa. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Barra de escala en A = 100 μ m.

1.5.- La hiperproliferación conduce a un agotamiento del *pool* de células madre neurales

Tras describir la proliferación exacerbada de las células B1 en los SAMP8, decidimos estudiar el comportamiento de dicha población con el paso del tiempo, utilizando para ello

individuos de edad avanzada. Mediante el uso de IHQ, sobre secciones coronales de ratones de 10 meses, encontramos niveles similares de células positivas para GFAP en ambas cepas ($13,23 \pm 0,68$, $n = 5$, en los SAMP8 frente a $11,88 \pm 1,18$ %, $n = 4$, en los SAMR1; figura 23). Sin embargo, en los ratones SAMP8 la proporción de células GFAP⁺ que a su vez expresaban S100 β fue significativamente mayor ($18,38 \pm 1,65$ frente a $11,19 \pm 0,87$ % en los SAMR1; $n = 4$; p -valor $< 0,01$; figura 23). Los resultados sugerían que las BIC se diferenciaban en astrocitos maduros, no multipotentes, durante el proceso de envejecimiento. Estos hallazgos corroboraron la existencia de un fenotipo típico de envejecimiento en la SEZ de los ratones SAMP8. A su vez, nos permitieron plantear la hipótesis de que las BIC son una forma transitoria de NSC, cuyo comportamiento es diferente al de una célula B1 clásica.

Figura 23. La SEZ de ratones P8 de edad avanzada presentan un mayor número de astrocitos terminalmente diferenciados. Caracterización de la población astrocitaria de la SEZ de ratones R1 y P8 de edad avanzada. *Izquierda:* inmunofluorescencia para la detección de GFAP (rojo) y S100 β (verde) en secciones coronales de la SEZ de ratones de 10 meses de edad, contratinción nuclear con DAPI (azul claro). Las líneas discontinuas delimitan el ventrículo lateral (v). La punta de flecha indica una célula positiva para GFAP y la flecha una célula doblemente positiva para GFAP y S100 β . *Derecha:* porcentaje de células GFAP⁺/DAPI y GFAP⁺S100 β ⁺/GFAP⁺ en la SEZ de ratones de 10 meses de edad. Datos representados como media \pm SEM; $n = 4$ y 5 ratones de las cepas R1 y P8 respectivamente. ****** $p < 0,01$. Barra de escala = 10 μ m.



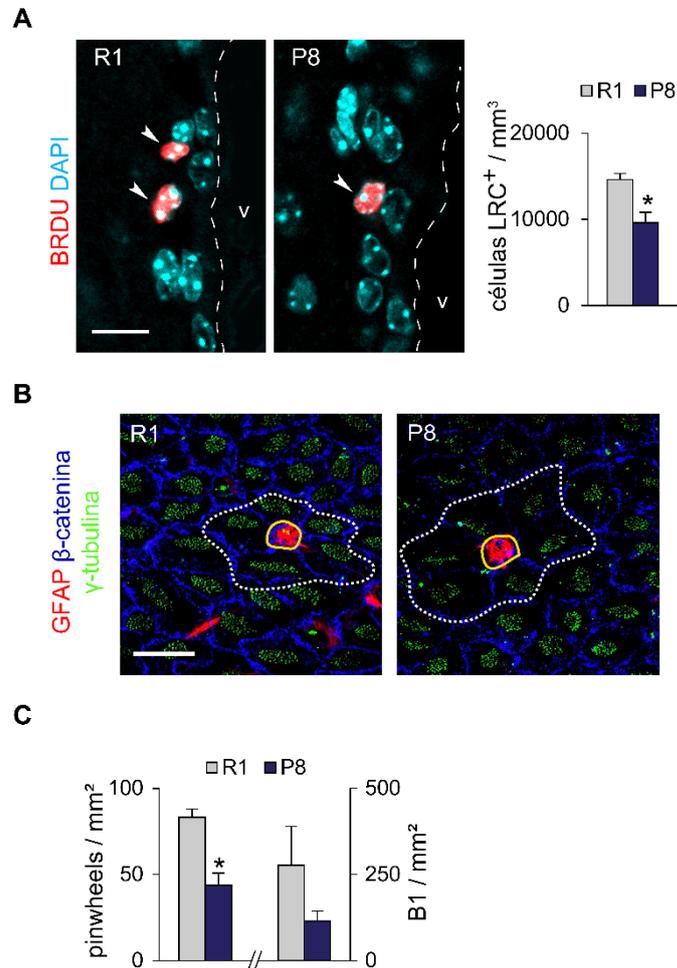
Tras conocer que la proporción de astrocitos terminalmente diferenciados era significativamente superior en los individuos SAMP8 de edad avanzada, dedujimos que la población de NSC en estos ratones se veía reducida prematuramente. Este agotamiento lo pudimos corroborar mediante el recuento de células LRC⁺ en la SEZ, obteniendo una disminución estadísticamente significativa con respecto a los SAMR1 (9607 ± 1206 , $n = 5$, frente a 14622 ± 708 LRC/mm³, $n = 3$, respectivamente; p -valor $< 0,05$; figura 24 A).

Puesto que asociamos la hiperproliferación de las NSC de los SAMP8 de edad temprana a su posicionamiento anómalo, decidimos caracterizar la disposición de estas y la citoarquitectura del nicho a los 10 meses de edad. Si nuestra hipótesis era cierta, el agotamiento prematuro de las NSC estaría relacionado con una disminución de las BIC. Utilizando preparaciones de WM inmunoteñidas frente a GFAP, β -catenina y γ -tubulina observamos que, a los 10 meses, la SEZ de los SAMP8 presentaba una organización normal y carecía de BIC (figura 24 B). Posteriormente realizamos recuentos, equivalentes a los llevados a cabo en muestras de 2 meses, sobre esos mismos WM. Cuando comparamos los resultados con los obtenidos a los 2 meses (ver figura 20 F), comprobamos que la densidad de *pinwheels* disminuía con la edad en los SAMR1. No obstante, la densidad de *pinwheels* a los 10 meses de edad también disminuía en los SAMP8 respecto a los SAMR1 (44 ± 7 frente a 83 ± 5 B1/mm² respectivamente; $n = 3$; p -

valor < 0,05; figura 24 B,C). Del mismo modo que a los 2 meses de edad (ver figura 20 F), la densidad de células B1 mostraba la misma tendencia que los *pinwheels* (114 ± 30 , $n = 4$, en los SAMP8 frente a 277 ± 111 B1/mm², $n = 3$, en los SAMR1; figura 24 B,C).

Figura 24. La población de NSC se encuentra disminuida en individuos de edad avanzada.

Caracterización de la población de NSC y su disposición en el nicho de la SEZ, en ratones R1 y P8 de edad avanzada. **(A)** *Izquierda*: IHQ para la detección de BrdU (rojo) y contratinción nuclear con DAPI (azul claro) en secciones coronales de la SEZ de ratones de 10 meses inyectados con BrdU y sacrificados a los 30 días. Las líneas discontinuas blancas indican el límite del ventrículo lateral (v). Las puntas de flecha blancas indican células positivas para BrdU. *Derecha*: densidad de células LRC⁺ en la SEZ de ratones de 10 meses (R1 $n = 4$, P8 $n = 5$). **(B)** IHQ de fluorescencia para la detección de GFAP (rojo) β -catenina (azul oscuro) y γ -tubulina (verde) sobre preparaciones de WM de la SEZ de ratones de 10 meses. Las líneas blancas discontinuas delimitan los *pinwheels* y las líneas amarillas continuas delimitan las células B1. **(C)** Densidad de *pinwheels* (*izquierda*) y células B1 (*derecha*), por unidad de superficie, en la SEZ dorsal de ratones de 10 meses (R1 $n = 3$, P8 $n = 4$). Datos representados como media \pm SEM del número indicado de ratones (n) por cepa. * $p < 0,05$. Barras de escala: (A), 10 μ m; (B), 20 μ m.



Es interesante observar que tanto la densidad de células B1 como de *pinwheels* disminuye en los SAMR1 entre los 2 y los 10 meses, mientras que en los SAMP8 ya es muy baja y no se reduce más. No obstante a los 10 meses los valores de densidad en los SAMR1 siguen siendo superiores a los SAMP8. Todos los resultados mantienen la concordancia, indicando una disminución prematura en la población de células B1 clásicas así como un incremento en la diferenciación terminal de astrocitos no neurogénicos en los ratones SAMP8 de 10 meses.

Diversos estímulos propios del envejecimiento desencadenan, entre otros procesos, la senescencia celular. Además, durante el mismo, las células senescentes se acumulan en los tejidos. Algunos trabajos relacionan directamente la senescencia celular con el proceso de envejecimiento (Collado y cols., 2007). Estos antecedentes nos llevaron al estudio de la actividad SA β -gal en el cerebro de los ratones SAMP8. Para ello realizamos el marcaje histoquímico de la actividad SA β -gal sobre diversas secciones coronales de ratones de 10 meses de edad. En

términos generales, detectamos abundantes células positivas en córtex, hipocampo y OB entre otras estructuras. En el hipocampo observamos un marcaje nítido en la capa piramidal, siendo más intenso en el CA2. Además, toda la SGZ del DG, la otra zona neurogénica en mamíferos adultos, también era positiva para SA β -gal (figura 25 A). Las capas del OB que se encontraban claramente marcadas eran la mitral y la GCL. Cuando comparamos las muestras de ambas cepas, los SAMP8 presentaban un marcaje más intenso a nivel global. Las mayores diferencias las observamos en la capa mitral y GCL del OB y en la corteza piriforme (figura 25 B). Sin embargo, cuando observamos la SEZ no pudimos identificar marcaje alguno en ninguna de las cepas. Cabía la posibilidad de que el umbral de detección de la actividad, en las condiciones experimentales utilizadas, estuviera por encima de la actividad propia de esta zona. Ante esta contingencia decidimos modificar el proceso de fijación del tejido, utilizando una mezcla de PFA y glutaraldehído (ver apartado 2.3.3. de material y métodos), para favorecer la detección de actividad SA β -gal. La observación de las nuevas histoquímicas nos permitió corroborar el aumento de la senescencia global en los SAMP8 (figura 25 C). Mediante un examen detallado de la SEZ, en distintos niveles a lo largo del eje rostro-caudal, comprobamos un incremento en la intensidad de precipitado de x-gal en una franja anexa al espacio ventricular (figura 25 D). No obstante, la ausencia de un precipitado nítido en los somas celulares nos impidió correlacionarlo, mediante la realización simultánea de una IHQ, con algún tipo celular.

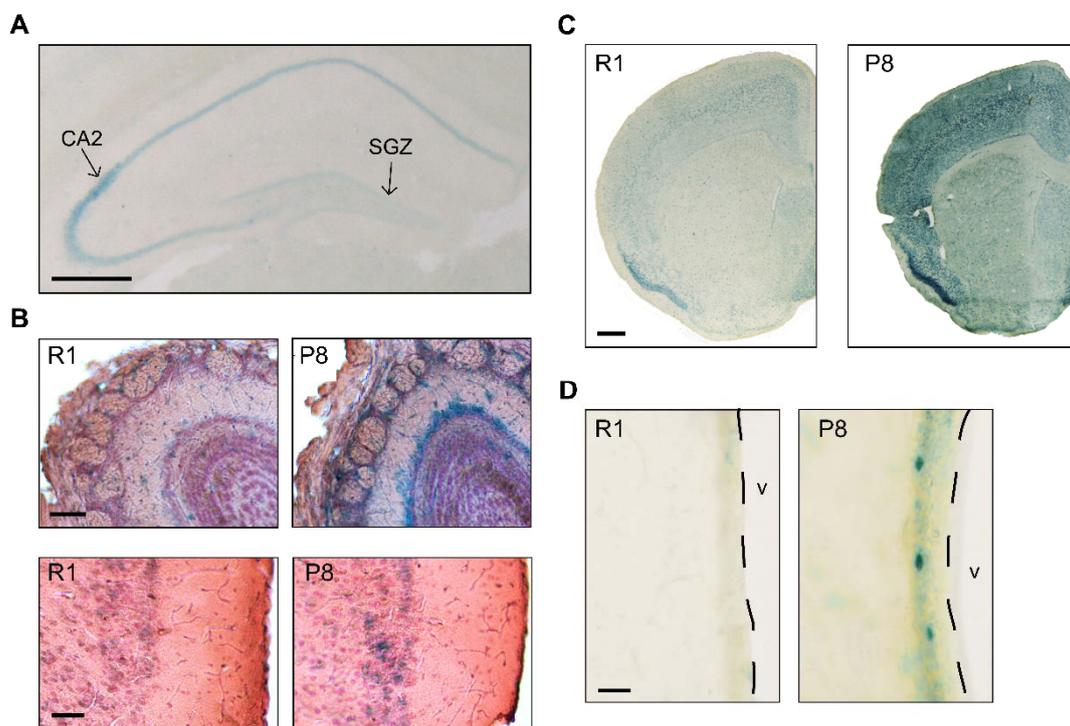


Figura 25. La actividad SA β -gal está incrementada en ratones P8 de edad avanzada. Histoquímicas para SA β -gal en secciones coronales de ratones R1 y P8 de 10 meses. **(A)** Hipocampo. (SGZ) Zona subgranular del giro dentado del hipocampo. (CA2) Región CA2 del hipocampo. **(B)** *Arriba:* detalle del bulbo olfatorio. *Abajo:* detalle de la corteza piriforme. **(C)** Hemisferios completos a nivel medial de la SEZ. **(D)** Detalle de la SEZ a nivel medial. Las líneas discontinuas negras indican el límite del ventrículo lateral (v). Barras de escala: (A) y (C), 500 μ m; (B, arriba), 100 μ m; (B, abajo), 50 μ m; (D), 20 μ m.

2.- Caracterización del cultivo de neuroesferas de la cepa SAMP8

2.1.- La hiperproliferación conduce al agotamiento de las células formadoras de esferas

Puesto que actualmente no se dispone de herramientas para conocer el potencial de las células observadas *in vivo*, el estudio de la progresión de los cultivos de neuroesferas en los sucesivos pases es utilizado como aproximación. Como ya hemos descrito anteriormente, los estudios *in vitro* de neuroesferas primarias eran acordes a la hiperproliferación observada *in vivo* (ver apartado 1.4. de resultados). Cuando sus células eran disociadas y resembradas (pase 1) a muy baja densidad (2,5 células/ μ l) para preservar la clonalidad, se volvía a obtener un mayor número de neuroesferas ($113,00 \pm 12,86$, $n = 8$, en los SAMP8 frente a $60,44 \pm 6,75$ esferas/p96, $n = 13$, en los SAMR1; p -valor $< 0,001$; figura 26 A,B). No obstante, su diámetro transcurridos 5 días así como el porcentaje de células que incorporaban BrdU ($14,67 \pm 1,82$, $n = 8$, en los SAMP8 frente a $22,18 \pm 1,53$ esferas/p96, $n = 7$, en los SAMR1; p -valor $< 0,01$) eran significativamente menores (figura 26 A,C,D). Estas células veían reducido su potencial hasta el punto de que cuando se intentaban subcultivar, en un nuevo pase, adoptaban una morfología característica (debida a su adhesión al plástico de la placa de cultivo) y cesaba su proliferación. No obstante, en pase 2 se podían observar algunas neuroesferas, pero eran visiblemente más pequeñas, anormalmente adheridas al plástico y con procesos extendidos (figura 26 E).

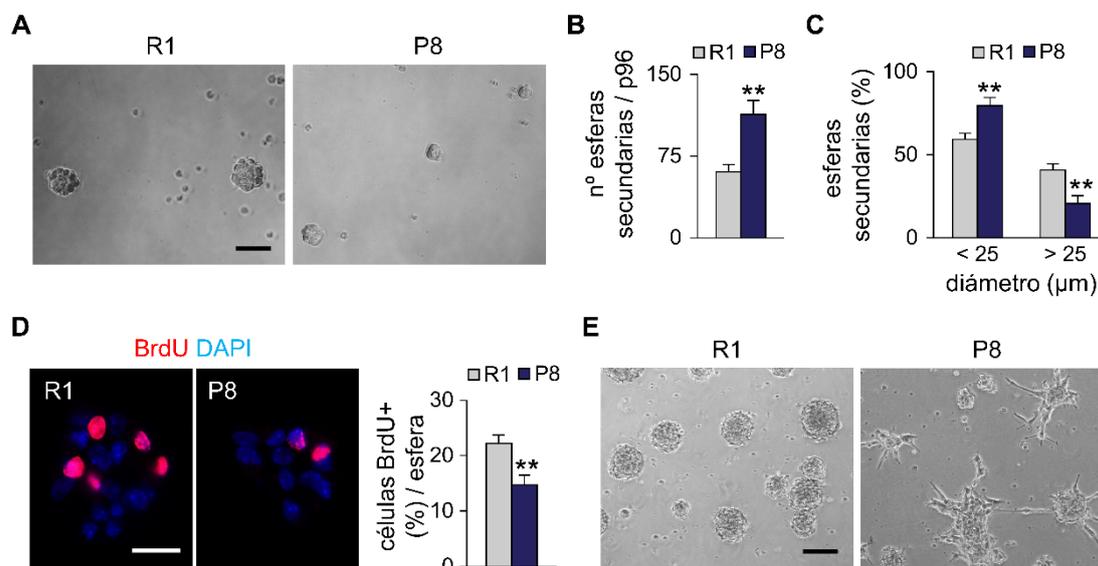


Figura 26. El potencial proliferativo de las esferas P8 se reduce drásticamente. (A-C) Ensayo de formación de esferas a densidad límite a partir de esferas secundarias de pase 1 (R1 $n = 13$, P8 $n = 8$). (A) Imágenes de contraste de fases. (B) Número de esferas formadas por pocillo de placa de 96 pocillos (p96). (C) Distribución de frecuencias de los tamaños de las esferas formadas tras 5 DIV. (D) Ensayo de incorporación de BrdU en esferas de pase 1 crecidas durante 2 DIV (R1 $n = 7$, P8 $n = 8$). Izquierda: ICQ de fluorescencia para la detección de BrdU (rojo) y contraincubación nuclear con DAPI (azul claro). Derecha: porcentaje de células positivas para BrdU por esfera. (E) Imágenes de contraste de fases de cultivos de esferas de pase 2. Datos representados como media \pm SEM del número indicado de cultivos independientes (n) por cepa. ** $p < 0,01$. Barras de escala: (A), 50 μ m; (D), 20 μ m; (E), 100 μ m.

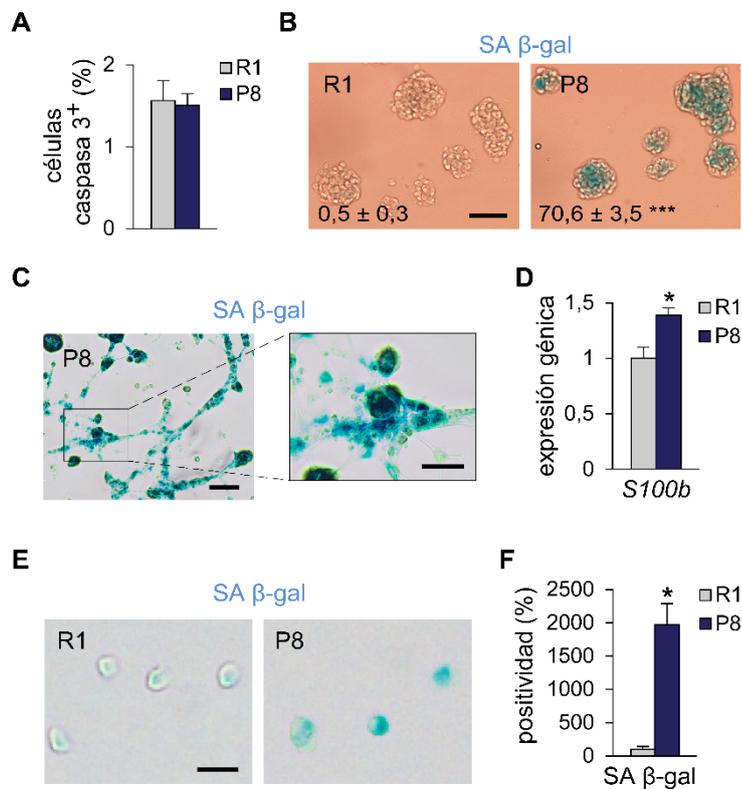
Una de las circunstancias que pueden subyacer al cese de proliferación de una población celular es el incremento en los niveles de apoptosis. Por ello decidimos estimar la proporción de células inmunoteñidas para caspasa3 activa en los cultivos SAMP8 y SAMR1 de pase 2, resultando similar para ambas cepas ($1,51 \pm 0,14$, $n = 4$, frente a $1,56 \pm 0,24$ %, $n = 3$, respectivamente; figura 27 A). Este resultado es coherente con la obtención de niveles similares de células TUNEL⁺GFAP⁺ en la SEZ, anteriormente obtenido (ver figura 19 D,E).

Puesto que el fenotipo morfológico observado se asocia a la senescencia celular y esta también puede conducir al cese de la proliferación de la población, realizamos la técnica citoquímica para detectar la actividad SA β -gal. Las esferas procedentes de los cultivos SAMP8 poseían la mayoría de sus células marcadas para dicha actividad, mientras que en los SAMR1 la positividad para SA β -gal era un suceso anecdótico de unas pocas células (figura 27 B). No obstante, para reflejar numéricamente las características propias del fenotipo SAMP8 realizamos el recuento del porcentaje de esferas que presentaban positividad ($70,63 \pm 3,49$ en los SAMP8 frente a $0,55 \pm 0,35$ % en los SAMR1; $n = 4$; p -valor $< 0,001$; figura 27 B). Para llevar a cabo la detección de la actividad SA β -gal se obtenían las esferas de la placa de cultivo y se depositaban sobre un cubreobjetos con una lámina de Matrigel[®] (ver material y métodos 3.8). Este procesado requería, en el caso de los cultivos SAMP8, desprender las células adheridas mediante pequeños golpes de la placa de cultivo. La separación mecánica de las células adheridas eliminaba al mismo tiempo su morfología característica. Para registrar imágenes que representaran simultáneamente el fenotipo morfológico y citoquímico, decidimos, tal y como indica el fabricante, cubrir con una fina capa de Matrigel[®] la placa de cultivo. Primero eliminamos cuidadosamente la mayor parte del medio de cultivo, para posteriormente cubrir la placa con Matrigel[®] y realizar la citoquímica. Mediante esta técnica obtuvimos, en los cultivos SAMP8, la imagen de los cultivos adheridos y positivos para la actividad SA β -gal (figura 27 C). Además de los motivos técnicos, ya comentados en el apartado 1.5. de esta sección, es posible que la senescencia en los cultivos de neuroesferas sea más pronunciada que en la SEZ *in situ*, siendo esta indetectable en los análisis *in vivo*. Cabe la posibilidad de que las condiciones estresantes propias del cultivo celular puedan desencadenar un agotamiento más rápido de la actividad proliferativa y una senescencia más pronunciada. Del mismo modo que en los estudios *in vivo* de 10 meses, mediante la técnica de RT-PCR observamos un incremento en los niveles de expresión de *S100b* asociado al proceso de agotamiento celular (figura 27 D). Tras la confirmación de la existencia de senescencia, en los cultivos SAMP8 de pase 2, decidimos retroceder en la progresión del cultivo y analizar la senescencia unos días después del pase 1, momento en el cual los cultivos ya presentaban diámetros e incorporación de BrdU menores. Para realizar un recuento más refinado disgregamos las neuroesferas crecidas 5 días tras el pase 1 y directamente las adherimos y realizamos la citoquímica para SA β -gal (figura 27 E). Mediante el análisis de las imágenes obtenidas de este modo pudimos establecer los niveles promedio de intensidad de precipitado X-gal por célula (ver material y métodos 3.8). Nuevamente las células SAMP8 presentaban niveles muy superiores de actividad SA β -gal (figura 27 F).

Figura 27. Los cultivos de esferas P8 muestran un incremento drástico de la senescencia celular. (A) Porcentaje de células positivas para caspasa 3 activa a partir de esferas de fase 2 (R1 n = 3, P8 n = 4).

(B,C) Citoquímicas para SA β -gal en esferas procedentes de cultivos de fase 2. (B) Se indica el porcentaje de esferas positivas para el marcaje de actividad SA β -gal (R1 n = 4, P8 n = 4). (C) Citoquímica sobre esferas P8 preservando su morfología de adhesión a la placa de cultivo. (D) expresión de mRNA de *S100b*, de esferas de fase 2, relativa al control endógeno *Gapdh* (R1 n = 5, P8 n = 5). (E,F) Actividad SA β -gal sobre células procedentes de cultivos de fase 1 crecidos durante 5 DIV. (E) Citoquímica para SA β -gal. (F) Cuantificación de la intensidad de precipitado de X-gal por célula, porcentaje relativo a la cepa R1 (R1 n = 4, P8 n = 4). Datos representados como media \pm SEM del número indicado de cultivos independientes (n) por cepa.

*p < 0,05, ***p < 0,001. Barras de escala: (B) y (C, inserto), 50 μ m; (C), 100 μ m; (E), 20 μ m.



La particularidad del fenotipo observado en las células SAMP8 consiste en que la senescencia celular prematura nunca había sido observada en cultivos celulares de cepas control como C57BL/6 o CD1 tras ser subcultivadas durante meses (Ferron y cols., 2007). Por todo ello y a pesar de que la SEZ de los SAMP8 contiene mayor número de células formadoras de esfera que su control SAMR1, sus células poseen una capacidad de auto-renovación drásticamente reducida. Por ello concluimos que el potencial de las BIC se encuentra reducido, siendo menor al de las células B1.

3.- Análisis del estatus oxidativo de las neuroesferas de la cepa SAMP8

La depleción del sistema de defensa antioxidante en las NSC y progenitores, mediante la delección de genes concretos, conlleva el incremento de sus niveles endógenos de ROS y de estrés oxidativo, desencadenando su hiperproliferación (Renault y cols., 2009; Yeo y cols., 2013). Por otra parte, las ROS se acumulan con el tiempo, alcanzando niveles tóxicos y dando lugar a la senescencia celular prematura (Bigarella y cols., 2014). Los hallazgos anteriores sugieren que el control de los niveles endógenos de ROS puede jugar un papel importante en la regulación de la auto-renovación y la proliferación en las NSC. El trabajo de Le Belle y cols. en 2011 demostró que las ROS, tanto exógenas como endógenas, tienen un impacto significativo en la proliferación, auto-renovación y diferenciación de las NSC, las cuales requieren niveles relativamente elevados de ROS para conservar su capacidad de automantenimiento (Le Belle y cols., 2011; ver revisión Bigarella y cols., 2014). La importancia del estatus oxidativo en el comportamiento de las NSC, junto con el conocimiento de la existencia de niveles elevados de ROS en el cerebro de los ratones SAMP8, nos condujo al estudio del estatus oxidativo en las NSC de la SEZ de esta cepa de ratones, un modelo de envejecimiento asociado al estrés oxidativo. Para ello, decidimos utilizar cultivos de neuroesferas obtenidos a partir de la SEZ.

3.1.- NRF2 y las enzimas de fase II están sobreexpresadas

Las ROS son compensadas por un sistema de defensa antioxidante, regulado por una red de rutas, que asegura una respuesta adecuada a las necesidades del organismo. NRF2 es un regulador de la resistencia celular a los agentes oxidantes. Este factor de transcripción controla la expresión de tres grupos de genes dependientes de secuencias ARE (elemento de respuesta a antioxidantes, *antioxidant response element*): enzimas/transportadores del metabolismo de fármacos, proteínas de señalización de oxidación y enzimas/proteínas antioxidantes o también denominados de fase II. En último término, NRF2 regula las consecuencias fisiológicas y patofisiológicas de la exposición a oxidantes. Existen algunos trabajos que relacionan alteraciones de NRF2 con el proceso de envejecimiento (Tomobe y cols., 2012). Además, un trabajo describe una disminución en la expresión y en los niveles nucleares de NRF2 en el tejido hepático de la cepa SAMP8 (Tomobe y cols., 2012).

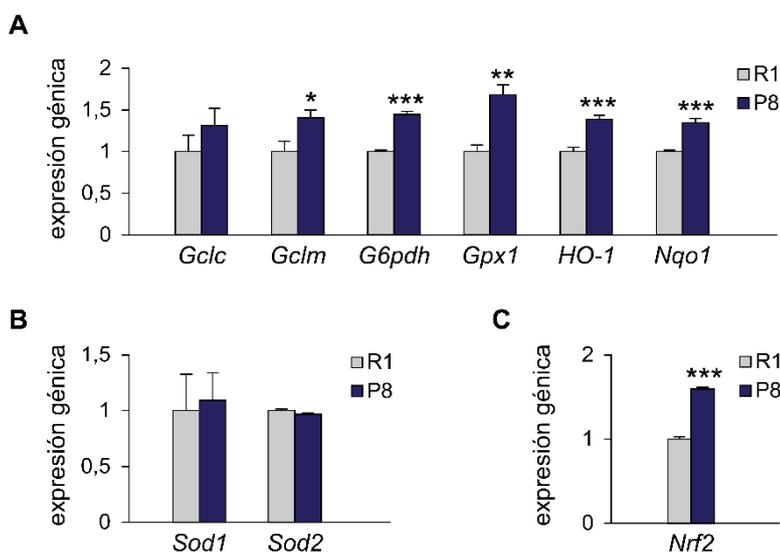
Con esos antecedentes cabía la posibilidad de que, en nuestro sistema, las células procedentes de los ratones SAMP8 tuviesen alteradas las rutas de defensa antioxidante. En primer lugar analizamos la expresión a nivel de mRNA de los genes que codifican para algunas enzimas de fase II, que podían estar alteradas por acción de NRF2 (Ma, 2013): *HO-1*, *Nqo1*, *Gclc*, *Gclm*, *Gpx* y *G6pdh*. Estas mostraron un incremento en la expresión de mRNA, en los cultivos SAMP8 respecto a los SAMR1, siendo estadísticamente significativo en todos los casos excepto en *Gclc* (figura 28 A). Como control, se analizó la expresión de *Sod1* y *Sod2*, los genes

codificantes para dos enzimas del sistema de defensa antioxidante en cuya regulación no está implicado NRF2. En ninguno de los dos casos obtuvimos diferencias entre ambos grupos (figura 28 B). Estos resultados apuntaron claramente a la participación del sistema NRF2 en las alteraciones observadas en el sistema de defensa antioxidante. Es por ello por lo que también analizamos la expresión del factor de transcripción (*nrf2*), resultando significativamente superior en los SAMP8 (figura 28 C). El conjunto de resultados de expresión indicó que las neuroesferas de los SAMP8 tienen activado NRF2 y en consecuencia las enzimas de fase II del sistema de defensa antioxidante, sugiriendo como causa subyacente la generación de niveles elevados de estrés oxidativo por parte de las neuroesferas.

Figura 28. La expresión de los enzimas de fase II está incrementada en esferas P8.

Expresión relativa de mRNA en esferas secundarias, cuantificado mediante Q-PCR. **(A)** Expresión de los genes codificantes para los enzimas de fase II: subunidad catalítica de la glutamato-cisteína ligasa (*Gclc*), subunidad reguladora de la glutamato-cisteína ligasa (*Gclm*), glucosa-6P-deshidrogenada (*G6pdh*), glutatión peroxidasa (*Gpx1*), hemo oxigenasa (*HO-1*) y NADPH quinona oxidoreductasa (*Nqo1*).

(B) Expresión de los genes codificantes para los enzimas del sistema de defensa antioxidante superóxido dismutasa 1 (*Sod1*) y 2 (*Sod2*), no pertenecientes al grupo de fase II. **(C)** Expresión del mRNA del factor 2 asociado al factor nuclear eritroide 2 (*Nrf2*), regulador de la expresión de los enzimas de fase II. Datos representados en forma de valores promedio relativos a la expresión como control endógeno de *Gapdh* \pm SEM; n = 5 cultivos independientes por cepa. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.



3.2.- Las actividades enzimáticas antioxidantes están alteradas

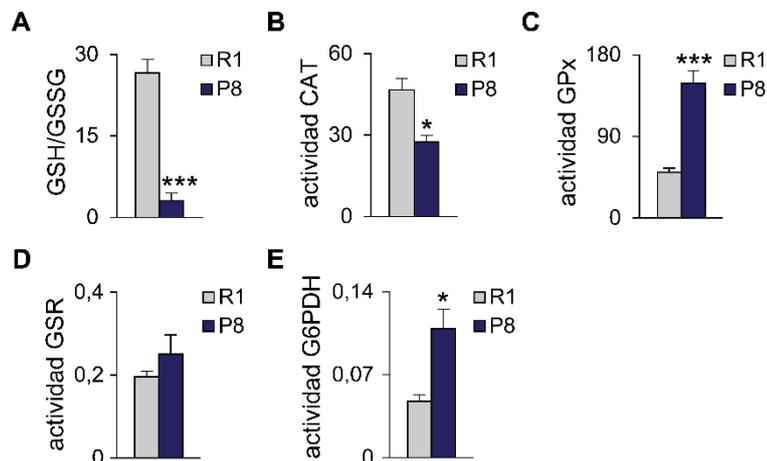
Tras el análisis de expresión de los genes codificantes para las enzimas de fase II y NRF2, realizamos el estudio de su actividad, así como la de otras enzimas del sistema de defensa antioxidante y de los niveles del antioxidante no enzimático GSH.

En primer lugar estimamos los niveles de GSH y GSSG para establecer la proporción GSH/GSSG. Esta ratio se utiliza habitualmente como medida inversa del nivel de estrés oxidativo en la célula (Owen y Butterfield, 2010). La ratio GSH/GSSG fue casi 9 veces inferior en los SAMP8 ($3,05 \pm 1,43$, n = 4, frente a $26,63 \pm 2,49$, n = 5, en los SAMR1; p-valor < 0,001; figura 29 A), indicando un estatus *redox* alterado en dichos cultivos. La molécula GSH posee una función antioxidante doble, por una parte reacciona directamente con los radicales libres y por otra actúa frente a los agentes pro-oxidantes con la intervención de la GPx. Por ello, la existencia

de una ratio GSH/GSSG disminuida, nos alertó sobre la posibilidad de una respuesta antioxidante reducida en los SAMP8.

Una de las enzimas del sistema antioxidante que tiene implicación en la eliminación del H_2O_2 es la CAT. Esta enzima, cuya expresión es independiente de NRF2, presentó una actividad disminuida ($27,40 \pm 2,49$ frente a $46,67 \pm 4,16$ K/mg de proteína en los SAMR1; $n = 3$; p -valor $< 0,05$; figura 29 B). La baja actividad CAT puede ser un inconveniente en la eliminación de los niveles globales de H_2O_2 . Otra enzima implicada en el proceso de descomposición del H_2O_2 es la GPx. Cuando estudiamos la actividad de la GPx observamos que era muy superior en las neuroesferas SAMP8 ($148,57 \pm 13,64$, $n = 7$, frente a $50,43 \pm 4,71$ pendiente / mg de proteína, $n = 5$, en los SAMR1; p -valor $< 0,001$; figura 29 C). Este resultado concordaba con el incremento en el nivel de expresión de la enzima, anteriormente descrito, por la acción de NRF2 (ver figura 28 A). Otra enzima que caracterizamos, sin encontrar alterada su actividad, fue la GSR (figura 29 D). Esta se encarga de reducir el GSSG a GSH y puesto que es una enzima alostérica o reguladora, cuya acción depende de los niveles de NADPH disponibles, era esperable que su actividad no se encontrara alterada si estos no cambiaban. La actividad G6PDH, al igual que el nivel de expresión del mRNA que codifica para esta enzima (ver figura 28 A), se encontraba incrementada en las neuroesferas SAMP8 ($0,109 \pm 0,017$, $n = 4$, frente a $0,048 \pm 0,005$ pendiente / mg de proteína, $n = 3$, en los SAMR1; p -valor $< 0,05$; figura 29 E). Este resultado nos indicó que la célula debería de disponer de suficientes niveles de NADPH para reducir el GSSG a GSH mediante la GSR y así mantener la ratio GSH/GSSG basal.

Figura 29. El sistema de defensa antioxidante está alterado en esferas P8. Niveles de moléculas y actividades de enzimas, con capacidad antioxidante, en esferas secundarias. **(A)** Ratio de los niveles de concentración de glutatión (GSH) respecto a los de glutatión oxidado (GSSG) (R1 $n = 5$, P8 $n = 4$). **(B)** Actividad de la enzima Catalasa (CAT) expresada como la constante de velocidad (K) de descomposición de su sustrato (H_2O_2) respecto a los mg de proteína total (R1 $n = 3$, P8 $n = 3$). **(C-E)** Actividades de los enzimas glutatión peroxidasa (GPx) (R1 $n = 5$, P8 $n = 7$), glutatión reductasa (GSR) (R1 $n = 4$, P8 $n = 4$) y glucosa-6P-deshidrogenasa (G6PDH) (R1 $n = 3$, P8 $n = 4$) expresadas como la pendiente de variación de absorbancia del sustrato NADPH respecto a los mg de proteína total. Datos representados en forma de valores promedio \pm SEM del número indicado de cultivos independientes (n) por cepa. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

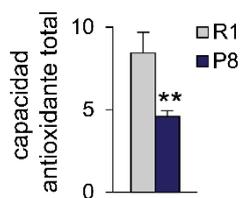


El conjunto de las alteraciones observadas en las defensas antioxidantes de las esferas SAMP8 es compatible con un incremento en la actividad NOX, posible fuente de unos niveles de ROS anormalmente elevados. Esto explicaría que pese al incremento de actividad de la G6PDH, los niveles de NADPH no permitiesen reducir el GSH por medio de la GSR y por lo tanto mantener el ratio GSH/GSSG. El incremento en la actividad NOX generaría $O_2^{\cdot -}$, el cual se transformaría rápidamente en H_2O_2 . La acción incrementada de la GPx eliminaría el H_2O_2 , oxidando a su vez el GSH y por lo tanto disminuyendo la relación GSH/GSSG.

3.3.- La capacidad antioxidante total está disminuida

Ante el hipotético incremento en la generación de especies oxidantes, debido a una mayor actividad NOX, nos preguntamos si el cómputo total de actividades antioxidantes sería suficiente para compensarlo. Cabía la posibilidad de que el incremento en la actividad GPx pudiese suplir la disminución de la actividad CAT y de los niveles de GSH. No obstante, la extensa variedad de rutas implicadas en el sistema antioxidante dificulta la labor de analizar cualquier molécula susceptible de estar alterada. Para conocer la capacidad de respuesta global de las células SAMP8 ante una situación de estrés oxidativo elevado, decidimos estimar la capacidad antioxidante total. El ensayo utilizado, consiste en determinar la capacidad del extracto celular para impedir la oxidación de un sustrato conocido, utilizando como estándar la concentración del antioxidante TROLOX, un derivado sintético de la vitamina E. Dicho ensayo mostró claramente que la capacidad antioxidante total del extracto (o capacidad antioxidante en equivalentes TROLOX) estaba disminuida en los cultivos procedentes de ratones SAMP8 ($4,59 \pm 0,35$, $n = 5$, frente a $8,44 \pm 1,26$ % de inhibición / mg de proteína, $n = 3$, en los SAMR1; p -valor $< 0,01$; figura 30).

Figura 30. La capacidad antioxidante total está reducida en esferas P8. Ensayo de determinación de la capacidad antioxidante equivalente al TROLOX en esferas secundarias. El resultado se encuentra expresado como el porcentaje de inhibición de absorbancia del radical ABTS^{•+} respecto a los mg de proteína total. Datos representados en forma de valores promedio \pm SEM; $n = 3$ y 5 cultivos independientes, de las cepas R1 y P8 respectivamente. ****** $p < 0,01$.



3.4.- La expresión NADPH oxidasa está incrementada

Tras corroborar la existencia de una disminución de la capacidad antioxidante de las células SAMP8 en nuestro sistema, cobraba especial relevancia el supuesto desequilibrio en la actividad NOX. Si confirmáramos el aumento de la actividad NOX en un ambiente con capacidad antioxidante reducida, estaríamos reforzando nuestra hipótesis sobre la generación de mayores niveles de estrés oxidativo en las esferas SAMP8. En primer lugar analizamos el nivel de expresión del mRNA que codificaba para las enzimas de la familia NOX (NOX1, NOX2 o CYBB, NOX3, NOX4, DUOX1 y DUOX2). Mediante RT-PCR comprobamos que los niveles de expresión para las isoformas NOX1, NOX2, NOX3, DUOX1 y DUOX2 eran despreciables en ambas cepas. Por el contrario, la expresión del mensajero que codificaba para la NOX4 era detectable en los cultivos de la cepa control (SAMR1) y se encontraba incrementada unas 2,5 veces en los SAMP8 (figura 31 A).

La respuesta de NOX mediada por el ligando angiotensina (ANG) es dependiente de al menos tres variables: el tipo celular, el tipo de estímulo y la abundancia relativa de cada isoforma de NOX. En concreto, en las NSC se ha descrito un incremento en la expresión y síntesis de NOX4 mediado por ANG-II (Topchiy y cols., 2013). De nuevo mediante la técnica de RT-PCR, determinamos el nivel de expresión del mRNA codificante para AGT. Este precursor de la ANG se encontraba sobreexpresado, con respecto a los SAMR1, del orden de 9 veces (figura 31 B). Este resultado nos permitió establecer el incremento del AGT, y previsiblemente de la ANG, como una de las posibles causas subyacentes a la sobreexpresión de NOX4 y, consiguientemente, responsables del estatus oxidativo alterado de las esferas SAMP8.

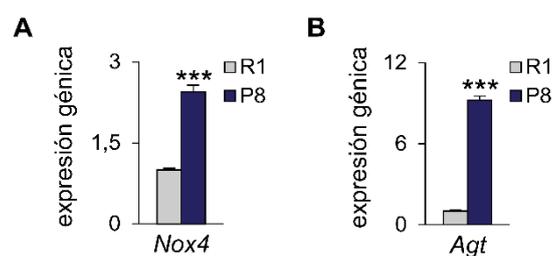
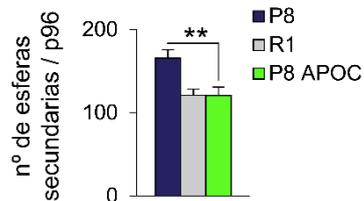


Figura 31. El gen codificante para la NOX4 y el precursor de su ligando AGT están sobreexpresados en esferas P8. Expresión relativa de mRNA en esferas secundarias, cuantificado mediante Q-PCR. **(A)** Expresión del gen codificante para la NADPH oxidasa 4 (*Nox4*). **(B)** Expresión del gen codificante para angiotensinógeno (*Agt*), precursor de la angiotensina. Datos representados en forma de valores promedio relativos a la expresión como control endógeno de *Gapdh* \pm SEM; n = 5 cultivos independientes por cepa. ***p < 0,001.

3.5.- La inhibición de la actividad NADPH oxidasa elimina la hiperproliferación

Todos los resultados hallados en el presente apartado (3.- Análisis del estatus oxidativo de las neuroesferas de los SAMP8) nos llevaron a plantear la hipótesis de que el incremento en la actividad NOX desencadenaba una elevada producción de especies oxidantes, que en última instancia daba lugar a la hiperproliferación observada en el inicio del cultivo de neuroesferas y en la SEZ de ratones jóvenes. El hecho de cuantificar fuera del nicho la sobreexpresión de NOX y del precursor de su ligando, indicó que las células de nuestros cultivos tenían un comportamiento autónomo en relación a la expresión de NOX. Esto nos permitió, mediante la inhibición de la actividad NOX, el estudio *in vitro* de la hipótesis planteada. Para ello tratamos nuestros cultivos SAMP8 sembrados a baja densidad con APOC, un inhibidor genérico de dicha actividad enzimática. Tras 5 DIV, los cultivos SAMP8 tratados con este fármaco disminuían el número de neuroesferas generado hasta niveles similares a los cultivos SAMR1 (figura 32). Este ensayo corroboró la hipótesis de la implicación de la actividad NOX en el fenotipo de hiperproliferación observado en los cultivos de neuroesferas procedentes de ratones SAMP8.

Figura 32. La inhibición de la actividad NOX bloquea la hiperproliferación de las esferas P8. Ensayo de formación de esferas a densidad límite a partir de esferas de pase 1 tratadas con apocinina (APOC) a una concentración de 100 μ M o su vehículo (DMSO). Datos representados como número promedio de esferas formadas por pocillo de placa de 96 pocillos (p96) \pm SEM; n = 5 y 3 cultivos independientes de los grupos experimentales R1 y P8 (DMSO y APOC) respectivamente. **p < 0,01.



4.- Efectos del nivel de estrés, oxidativo y replicativo, en las neuroesferas de la cepa SAMP8

En los ensayos anteriores, observamos que las NSC de la SEZ de los ratones SAMP8 muestran hiperproliferación que precede a su agotamiento. En los cultivos *in vitro* de neuroesferas también habíamos observado que, tras un fenómeno de hiperproliferación en las etapas iniciales, las células formadoras de esfera agotaban su potencial y entraban en senescencia. Analizando el estatus oxidativo de nuestros cultivos vimos que su capacidad antioxidante era menor y la formación de especies oxidantes estaba incrementada, dando lugar al fenómeno de hiperproliferación. Tanto el estrés oxidativo directo como el estrés replicativo, consecuencia entre otros motivos del primero, son causantes de daño en macromoléculas (lípidos, proteínas y ácidos nucleicos). Como resultado del daño oxidativo y/o replicativo, puede tener lugar desde la pérdida parcial de la homeostasis celular hasta la inducción de la muerte celular o la parada irreversible del ciclo (senescencia celular). Por estos motivos, decidimos estudiar el posible daño en macromoléculas como consecuencia de las situaciones de estrés descritas.

4.1.- El estrés oxidativo causa daño en macromoléculas

Las moléculas oxidantes procedentes del metabolismo celular aeróbico, presentes en el interior de la célula, causan daño en las macromoléculas con las que contactan (proteínas, lípidos y DNA). Como ya hemos descrito anteriormente, la tasa de generación de especies oxidantes está incrementada y el nivel de defensas antioxidantes disminuido en las esferas procedentes de la SEZ de ratones SAMP8. Es por ello que, en principio, esperaríamos un incremento en los marcadores de oxidación de macromoléculas.

En primer lugar comparamos, entre ambas cepas, los niveles de marcadores de estrés oxidativo en proteínas mediante técnicas de WB y HPLC-MS/MS. Los niveles de carbonilación, nitrosilación y fosforilación proteínica fueron similares en los SAMR1 y en los SAMP8 (figura 33 A). Cabe la posibilidad de que la tasa de renovación y la eficiencia de reparación y/o eliminación de estas macromoléculas sea demasiado elevada, impidiendo así la acumulación de proteínas dañadas en niveles suficientes para marcar diferencias con respecto a la cepa control.

La supuesta presencia de niveles elevados de H_2O_2 hacía más que probable un incremento en la incidencia de la reacción de Fenton. Este proceso de oxidación, catalizado por Fe^{++} , degrada el H_2O_2 produciendo el radical altamente reactivo $OH\cdot$. A su vez, el $OH\cdot$ oxida tanto lípidos de membrana como DNA (figura 33 B). En primer lugar analizamos los niveles de MDA, un producto de la peroxidación lipídica, que es utilizado como marcador del estrés oxidativo en lípidos. Los niveles de MDA se encontraban significativamente incrementados en los cultivos

SAMP8 (figura 33 C). Por otra parte medimos los niveles de 8-OHdG, utilizado como marcador de daño oxidativo en el DNA, sin encontrar diferencias entre ambos grupos (figura 33 D). Una de las razones que pueden subyacer a la presencia de alteraciones en el marcador de oxidación lipídica pero no en el de oxidación del DNA, son diferencias en el umbral de detección de las técnicas utilizadas. Una vez corroborada la existencia de al menos un tipo de daño oxidativo, quisimos determinar su influencia en el fenotipo senescente. Para ello tratamos los cultivos SAMP8 con antioxidantes de la familia de los polifenoles, observando una disminución del fenotipo de adhesión a la placa y por ende sugiriendo una protección parcial de estos frente al estrés oxidativo (figura 33 E).

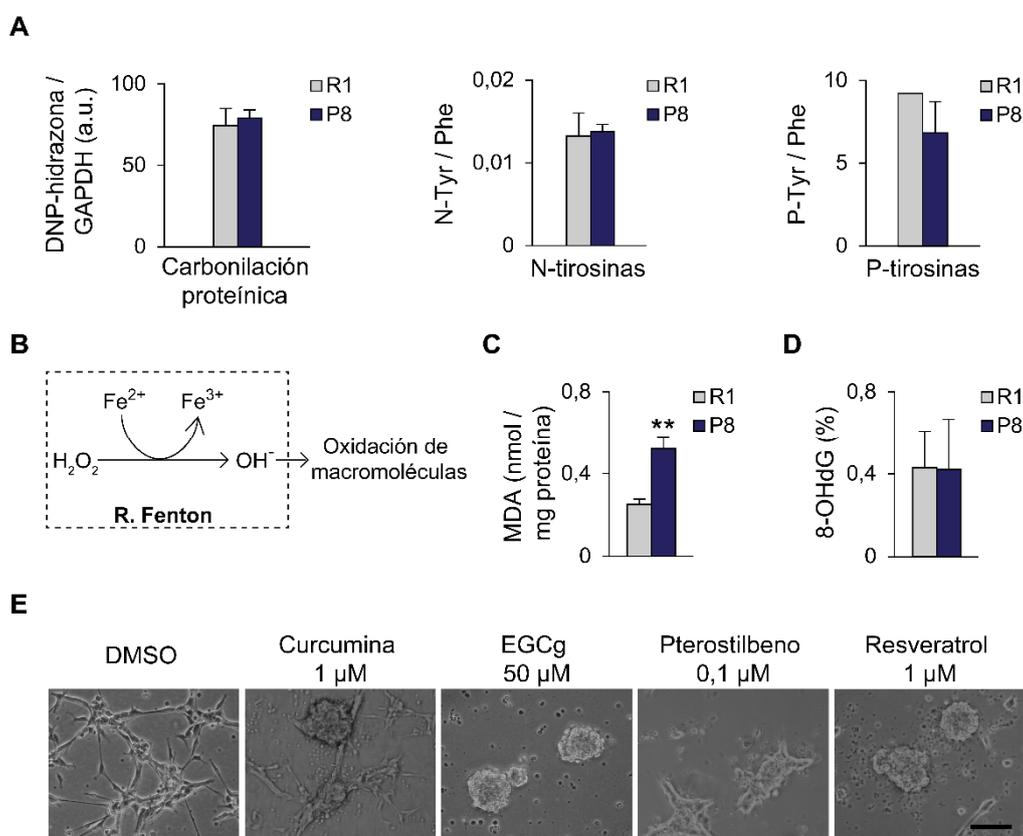


Figura 33. El estrés oxidativo genera daño en macromoléculas e influye en el fenotipo senescente de esferas P8. Determinaciones de indicadores de daño oxidativo en esferas secundarias y tratamiento de estas con antioxidantes. **(A) Izquierda:** niveles de proteína carbonilada, expresados como densidad óptica de 2,4-dinitrofenilhidrazona (DNP-Hidrazona) respecto a GAPDH (en unidades arbitrarias, a.u.) (R1 n = 3, P8 n = 3). **Centro y derecha:** niveles de proteínas nitrosiladas y fosforiladas, expresados como la ratio entre la concentración de tirosinas nitrosiladas (N-Tyr) y fosforiladas (P-Tyr), respectivamente, y la concentración de fenilalanina (Phe) (R1 n = 3 y P8 n = 3, en ambas determinaciones). **(B)** Esquema representativo de la reacción de Fenton, en la cual se produce el radical hidroxilo (OH^\bullet) a partir del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) catalizada por metales de transición como el hierro (Fe). **(C)** Cuantificación de la concentración de malondialdehído (MDA), como indicador de los niveles de peroxidación lipídica, expresado en nmol respecto a los mg de proteína total (R1 n = 6, P8 n = 5). **(D)** Estimación del porcentaje de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) en el DNA como indicador de los niveles de oxidación en el DNA (R1 n = 5, P8 n = 5). **(E)** Imágenes de contraste de fases, de neuroesferas secundarias P8, tratadas con antioxidantes (polifenoles) o su vehículo (DMSO) durante 5 DIV. Datos representados como media \pm SEM del número indicado de cultivos independientes (n) por cepa. **p < 0,01. Barra de escala en E = 100 μm .

4.2.- La senescencia celular está mediada por p53

Tras observar el agotamiento de las células formadoras de esfera a causa del arresto irreversible de ciclo (senescencia celular), decidimos estudiar las rutas moleculares potencialmente alteradas. Clásicamente se han relacionado las vías moleculares de los supresores de tumores p53 y p16 en el proceso de senescencia (ver revisión Salama y cols., 2014), motivo por el cual decidimos analizar sus niveles en los cultivos de neuroesferas. Mientras que los niveles de p53 se encontraban significativamente incrementados, los de p16 estaban reducidos en los SAMP8 (figura 34). Este resultado nos indicó que la senescencia podría estar mediada por el supresor de tumores p53.

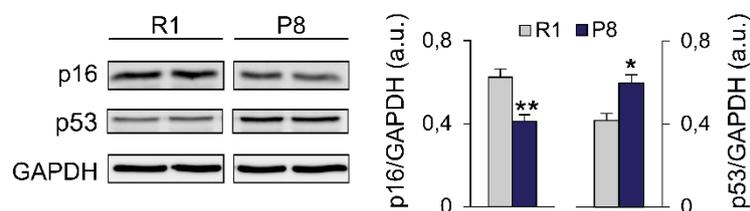
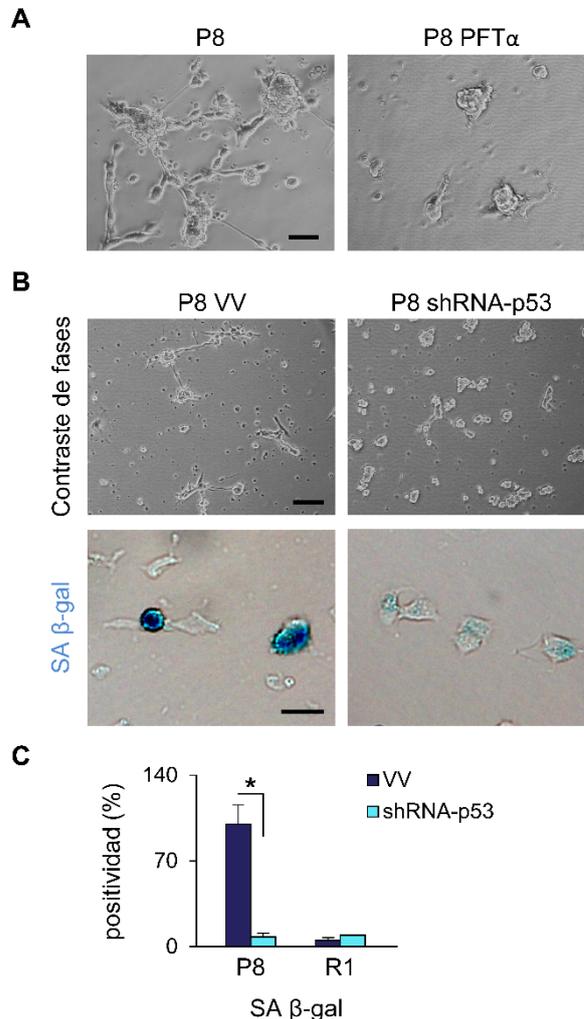


Figura 34. Los niveles de los supresores tumorales asociados a senescencia están alterados en esferas P8. Estimación de los niveles de proteínas p16 y p53, en esferas secundarias de fase 2. *Izquierda:* inmunoblots representativos para p16, p53 y GAPDH. *Derecha:* cuantificaciones densitométricas de los niveles de p16 y p53 relativos a GAPDH, expresadas en unidades arbitrarias (a.u.). Datos representados como media \pm SEM; n = 4 cultivos independientes por cepa. *p < 0,05, **p < 0,01.

Para corroborar la hipótesis de la implicación de p53 en la senescencia observada, decidimos bloquear su actividad. Con ese fin tratamos nuestros cultivos SAMP8 con un inhibidor sintético de actividad de p53, llamado pifithrin-alpha (PFT α) (Komarov y cols., 1999; Komarova y Gudkov, 2000). Las últimas investigaciones indican que PFT α actúa sobre p53 tras su translocación al núcleo y que podría ser un inhibidor específico de la señalización de dicha molécula (Murphy y cols., 2004). Conforme a nuestra hipótesis, la inhibición de la actividad de p53 con PFT α evitó en gran medida el fenotipo de adhesión de las neuroesferas a la placa de cultivo (figura 35 A). Como aproximación complementaria infectamos nuestras células con retrovirus que portaban un shRNA (RNA de interferencia de horquilla corta) específico para la interferencia de p53. Como resultado de la interferencia, logramos disminuir la expresión de p53 hasta valores de $0,68 \pm 0,01$ (n=3) en los SAMP8. Este experimento bloqueó parcialmente la senescencia, eliminando el fenotipo de adhesión y reduciendo el marcaje de actividad SA β -gal (figura 35 B). La cuantificación de la intensidad del marcaje de SA β -gal mostró una disminución drástica, tras la interferencia parcial de p53, llegando a los niveles de los cultivos SAMR1 (tanto interferidos como no interferidos) (figura 35 C). El conjunto de experimentos anteriores confirmó la implicación de p53 en el fenotipo senescente observado en los cultivos SAMP8.

Figura 35. La senescencia celular en esferas P8 está mediada por p53. (A) Imágenes de contraste de fases, de neuroesferas secundarias tratadas, durante 3 DIV, con el inhibidor de p53 Pifithrin-alfa (PFT α), a una concentración de 20 μ M. (B) Imágenes representativas de cultivos P8 infectados con el shRNA-p53 o con el vector vacío (VV). *Paneles superiores:* imágenes de contraste de fase. *Paneles inferiores:* citoquímica para SA β -gal. (C) Cuantificación de la intensidad de precipitado de X-gal por célula (porcentaje relativo al grupo P8 VV), en la citoquímica para SA β -gal, sobre cultivos infectados con el shRNA-p53 o su control. Datos representados como media \pm SEM; n = 4 cultivos independientes por condición. *p < 0,05. Barras de escala: (A), 50 μ m; (B, paneles superiores), 100 μ m; (B, paneles inferiores), 20 μ m.



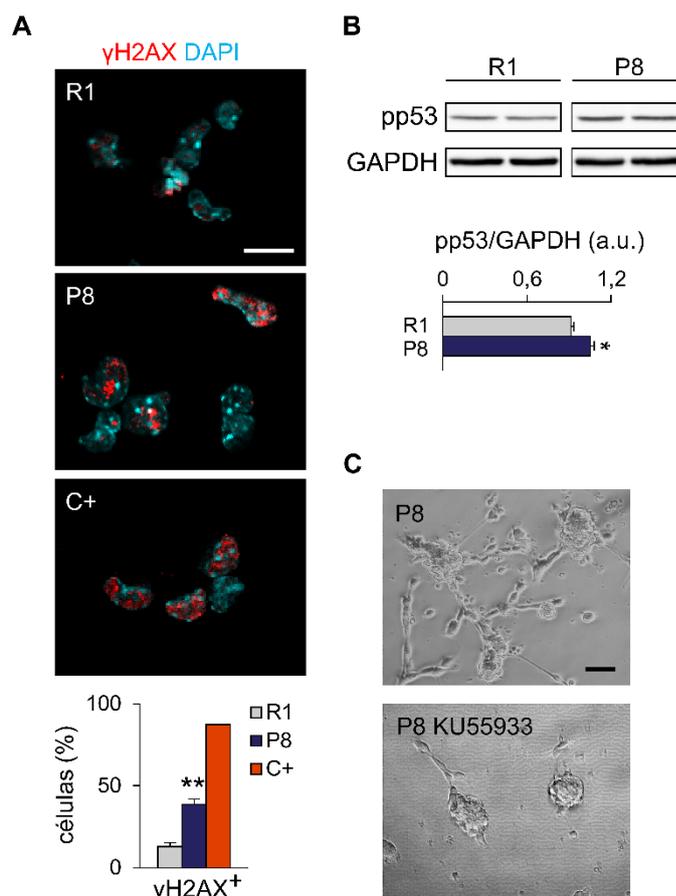
4.3.- La estabilización de p53 se debe a la activación de la respuesta a daño en el DNA

La senescencia celular puede ser desencadenada por una serie de estímulos negativos, como el estrés replicativo y el estrés oxidativo, que activan la DDR. En esta vía de señalización las quinasas ATM y ATR bloquean la progresión del ciclo celular mediante la estabilización de p53. Nuestros resultados indicaron un elevado estrés oxidativo así como una elevada actividad de ciclo celular que podrían ser causantes de estrés replicativo. Además, demostramos la implicación de p53 en el fenotipo senescente. Todo ello sostiene la hipótesis de la existencia de una DDR activada en las células SAMP8. Como marcador de daño en el DNA se utiliza la inmunodetección de la histona H2AX fosforilada en la serina 129 (γ H2AX), formando parte de los agregados o focos de heterocromatina (foci). La fosforilación de H2AX es llevada a cabo por la

quinasa ATR, esta además estabiliza p53 (Paull y cols., 2000). Mediante la realización de la ICQ para γ H2AX observamos una mayor proporción de células inmunopositivas (con presencia de foci) en los cultivos SAMP8, corroborando la presencia de daño en el DNA ($38,79 \pm 3,14$, $n = 5$, frente a $12,94 \pm 2,45$ %, $n = 3$, en los SAMR1; p -valor $< 0,01$; figura 36 A). Como control positivo de la IHQ, se trataron cultivos equivalentes con doxorubicina a $0,5 \mu\text{g/ml}$ durante 6 horas (ver apartado 3.6. de material y métodos).

Consistente con la activación de la DDR, observamos niveles mayores de p53 fosforilado en la serina 18 (pp53), siendo esta modificación específica de las quinasas ATM y ATR (figura 36 B). Posteriormente quisimos comprobar que influencia tenía la actividad de ATM sobre los cultivos, para lo cual tratamos estos con un inhibidor farmacológico específico (KU55933) (Hickson y cols., 2004). Como resultado observamos una reversión parcial del fenotipo de adhesión de los cultivos SAMP8 (figura 36 C). Una vez más, los experimentos corroboraron la activación del punto de control del ciclo celular dependiente de p53, en respuesta al daño en el DNA de las células SAMP8.

Figura 36. La respuesta a daño en el DNA subyace a la estabilización de p53 en esferas P8. (A) Arriba: ICQ para la histona H2AX fosforilada en la serina 129 (γ H2AX) (rojo), contratinción con DAPI (azul claro). Abajo: porcentaje de células con presencia de foci (R1 $n = 3$, P8 $n = 5$, C+ $n = 1$). (B) Estimación de los niveles de p53 fosforilado en la serina 18 (pp53), en esferas secundarias de pase 2. Arriba: inmunoblots representativos para pp53 y GAPDH. Abajo: cuantificación densitométrica del nivel de pp53 relativo a GAPDH, expresada en unidades arbitrarias (a.u.) (R1 $n = 3$, P8 $n = 3$). (C) Imágenes de contraste de fases, de neuroesferas secundarias tratadas, durante 3 DIV, con el inhibidor de ATM KU55933, a una concentración de $10 \mu\text{M}$. Datos representados como media \pm SEM del número indicado de cultivos independientes (n) por cepa. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. (C+) control positivo de daño en el DNA: doxorubicina $0,5 \mu\text{g/ml}$. Barras de escala: (A), $10 \mu\text{m}$; (C), $50 \mu\text{m}$.

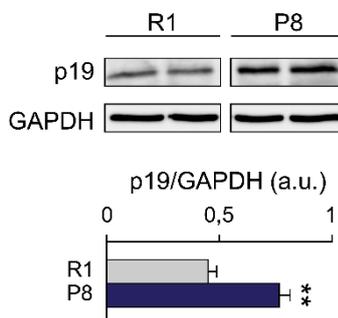


5.- Modulación epigenética de las células madre neurales de la zona subependimaria de la cepa SAMP8

5.1.- Los cultivos SAMP8 presentan niveles elevados de p19

Durante el envejecimiento se ha descrito un incremento de los niveles de p19 en la mayoría de los tejidos de mamíferos (Krishnamurthy y cols., 2004), asociado a los cambios involutivos y patológicos que ocurren en sus órganos a edades avanzadas. Este supresor de tumores es causante de la estabilización indirecta de p53 mediante el secuestro de MDM2, que a su vez regula negativamente p53 (Harris y Levine, 2005). En consecuencia, la sobreexpresión de p19 induce indirectamente el proceso de senescencia celular a través de p53. Puesto que en nuestro modelo de envejecimiento habíamos observado un fenómeno de senescencia exacerbada, decidimos cuantificar el nivel de proteína p19 mediante WB. Los cultivos SAMP8 presentaron niveles elevados de p19 (figura 37) indicándonos la existencia de una segunda vía implicada en la estabilización de p53 en nuestras células.

Figura 37. El nivel de proteína p19 está incrementado en esferas P8. Estimación de los niveles de p19, en esferas secundarias de pase 2. *Arriba:* inmunoblots representativos para p19 y GAPDH. *Abajo:* cuantificaciones densitométricas de los niveles de p19 relativos a GAPDH, expresadas en unidades arbitrarias (a.u.). Datos representados como media \pm SEM; n = 4 cultivos independientes por cepa. **p < 0,01.



5.2.- El incremento de los niveles de acetilación reproduce el fenotipo SAMP8 *in vitro*

Entre las alteraciones descritas durante el proceso de envejecimiento se encuentran las modificaciones epigenéticas en las poblaciones de células madre (Oh y cols., 2014), una de ellas es la de-represión epigenética del locus *Ink4a/Arf* (Zindy y cols., 1997; Krishnamurthy y cols., 2004). Un trabajo previo, en fibroblastos humanos y murinos, mostró que el tratamiento con TSA daba lugar al incremento de p19 y la reducción de p16, e inducía senescencia (Matheu y cols., 2005; Simboeck y cols., 2011). Este compuesto natural es un inhibidor de las HDAC de tipo I y II, pero no de tipo III (Willis-Martinez y cols., 2010). Dicho tratamiento también conducía al incremento en los niveles de acetilación de otras moléculas, entre las que se encontraba p53, que aumentaba su estabilidad y actividad (Luo y cols., 2000). Tanto las alteraciones en los

productos del locus *Ink4a/Arf* como el incremento en la senescencia coincidían con el fenotipo observado en nuestros cultivos SAMP8.

Para conocer si un exceso en los niveles de acetilación era una posible causa subyacente al fenotipo senescente, decidimos tratar las células SAMP8 con un inhibidor específico de las HAT. Estas enzimas ejercen la acción opuesta a las HDAC y por lo tanto su inhibición conlleva la disminución en los niveles globales de acetilación. El inhibidor de HAT utilizado fue AA a una dosis, determinada empíricamente, de 50 μ M. Como resultado observamos una reversión del fenotipo de adhesión en los cultivos SAMP8 tratados con AA (figura 38).

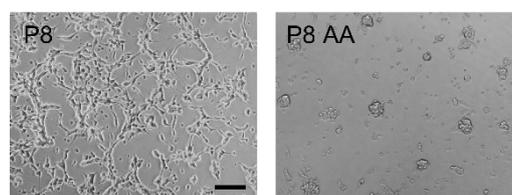


Figura 38. La inhibición de las HAT revierte el fenotipo de adhesión en esferas P8. Imágenes de contraste de fases, de neuroesferas secundarias tratadas, durante 3 DIV, con el inhibidor de HAT ácido anacárdico (AA), a una concentración de 50 μ M. Barra de escala 100 μ m.

Una vez corroborada la influencia de dicha modificación epigenética sobre los cultivos SAMP8, nuestro propósito fue reproducir el fenotipo de estos mediante la modificación de los niveles de acetilación en las células control (SAMR1). El tratamiento de células SAMR1 durante 3 días con TSA, a 25 y 50 nM, incrementó los niveles de p53 acetilado en la lisina 379 (ac-p53), así como también los de p19. Para corroborar el hallazgo descrito, utilizamos un método alternativo de inhibición de las HDAC, consistente en un tratamiento equivalente utilizando ácido valproico (VPA, del inglés *valproic acid*), que se une al centro catalítico de las HDAC inhibiendo su actividad (Gottlicher y cols., 2001). Mediante el uso de VPA a dos concentraciones diferentes (2 y 4 mM), obtuvimos un resultado similar al obtenido con el TSA (figura 39 A). En un nuevo experimento equivalente al de la figura 26 D y E, los cultivos tratados, tanto con TSA como con VPA, disminuyeron los niveles de incorporación de BrdU (figura 39 B). Es decir, que la inhibición de la actividad HDAC en los cultivos SAMR1 dio como resultado una disminución en el índice proliferativo, tal y como sucedía con los SAMP8 no tratados. Además, ambos tratamientos condujeron a las células a un estado senescente, con la morfología y actividad SA β -gal propias de las células SAMP8 en condiciones basales (figura 39 C). El conjunto de experimentos demostró que la inhibición de las HDAC, y por lo tanto el aumento de los niveles de acetilación, incrementaba la expresión/estabilidad de los supresores de tumores, recapitulando el fenotipo senescente característico de los cultivos SAMP8.

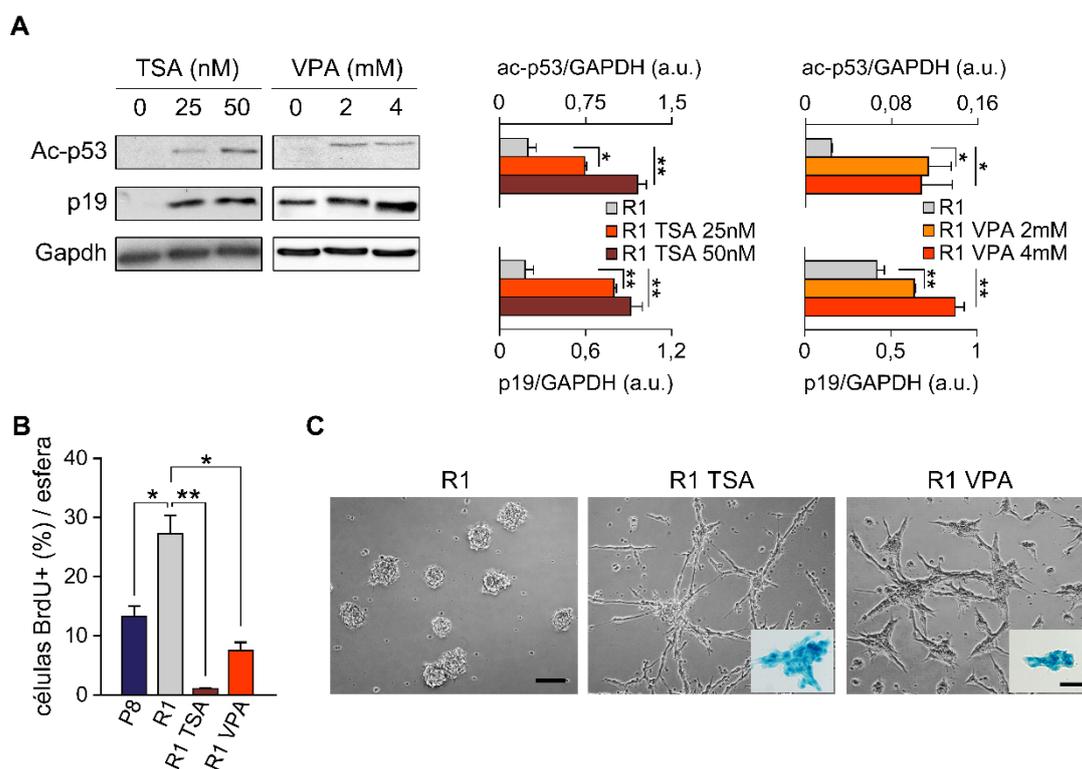


Figura 39. La inhibición de las HDAC induce el fenómeno de senescencia. Tratamientos con inhibidores de HDAC (tricotatina A [TSA] y ácido valpróico [VPA]), durante 3 DIV, en esferas secundarias y sus efectos. **(A,B)** Estimación de los niveles de p53 acetilado en la lisina 379 (ac-p53) y p19, en esferas tratadas con TSA y VPA a las concentraciones indicadas. **(A) Izquierda:** inmunoblots representativos para ac-p53, p19 y GAPDH. **Derecha:** cuantificaciones densitométricas de los niveles de ac-p53 y p19 relativos a GAPDH, expresados en unidades arbitrarias (a.u.) (n = 3). **(B)** Porcentaje de células positivas para BrdU en esferas P8, R1 y R1 tratadas con TSA (50 nM) o VPA (4 mM) o su vehículo (DMSO). **Insertos:** citoquímicas para SA β -gal. Datos representados como media \pm SEM del número indicado de cultivos independientes (n) por cepa. *p < 0,05, **p < 0,01. Barras de escala: (C), 100 μ m; (C, insertos), 40 μ m.

5.3.- El incremento de los niveles de acetilación induce el posicionamiento anómalo de las células madre neurales en la zona subependimaria de la cepa SAMP8

Tras la obtención de los resultados previos, nos preguntamos si la inhibición de la actividad HDAC también podía dar lugar a alteraciones similares en la SEZ *in vivo* de los ratones SAMR1 jóvenes (ver apartado 1.3. de resultados), remedando así el fenotipo característico de los ratones SAMP8. Para explorar dicha posibilidad, administramos TSA o su vehículo (DMSO) mediante i.p. en ratones SAMR1 de 2 meses de edad y posteriormente los sacrificamos para llevar a cabo su análisis. En primer lugar, con la finalidad de corroborar el correcto funcionamiento del tratamiento, estimamos el nivel de histona 3 acetilada en la lisina 9 (ac-H3) como lectura de los niveles globales de acetilación. Para ello realizamos un WB para ac-H3 a partir de homogenados de la SEZ de ratones de ambos grupos experimentales (SAMR1-TSA y SAMR1-DMSO). La cuantificación densitométrica de los niveles de ac-H3 relativos a GAPDH indicó un

incremento de $1,5 \pm 0,1$ del grupo tratado respecto al grupo control (figura 40 A). Además, mediante IHQ en preparaciones de WM, observamos una intensidad muy superior del marcador ac-H3 en los núcleos de la SEZ más cercanos al espacio ventricular de los ratones tratados con TSA (figura 40 B).

Cuando cuantificamos la densidad de *pinwheels*, a partir de los WM, ambos grupos mostraron niveles similares a los SAMR1 no inyectados con DMSO (ver figura 20 F; figura 40 C); es decir, no observamos alteraciones debidas al tratamiento con TSA o con su vehículo. No obstante, mientras que los SAMR1-DMSO mostraron una morfología equivalente a los no inyectados, el TSA produjo cambios morfológicos en la superficie endimaria, asemejándose su aspecto al de los SAMP8 (figura 40 D). Tras la observación anterior, decidimos realizar un recuento de densidad de las células B1 y BIC como indicador cuantitativo del grado de similitud de estos resultados en los ratones SAMR1-TSA con respecto a los SAMP8 (analizados en el apartado 1.3). Acorde con la cuantificación de *pinwheels*, la densidad de células B1 no difería entre ambos grupos experimentales, manteniendo valores similares a los no inyectados (ver figura 20 F, figura 40 E). Esto nos indicó que la densidad de células B1 por *pinwheel* tampoco se encontraba alterada. El aspecto global de los SAMR1-TSA nos condujo al recuento de las células uniciliadas positivas para GFAP, que se integraban en la capa endimaria y que habíamos denominado BIC. Una vez más, los SAMR1-DMSO presentaron densidades muy reducidas, con valores parecidos a los SAMR1 no inyectados (ver figura 20 H). Por el contrario, el tratamiento con el inhibidor de las HDAC generaba un incremento en la densidad de BIC hasta niveles cercanos a los observados en los SAMP8, si bien no alcanzaban los niveles propios de estos (figura 40 E). Por otra parte, complementamos la caracterización de los efectos del tratamiento *in vivo* con TSA mediante el análisis inmunohistoquímico de secciones de la SEZ. El recuento de las células GFAP⁺ adentradas en la capa endimaria y que no expresaban S100 β , indicó que el tratamiento con TSA incrementaba el porcentaje de estas, hasta valores idénticos a los SAMP8 (figura 40 F). De nuevo, los análisis realizados ratificaron que el posicionamiento anómalo de las NSC característico de la SEZ de la cepa SAMP8 podía ser inducido mediante la inhibición de las HDAC.

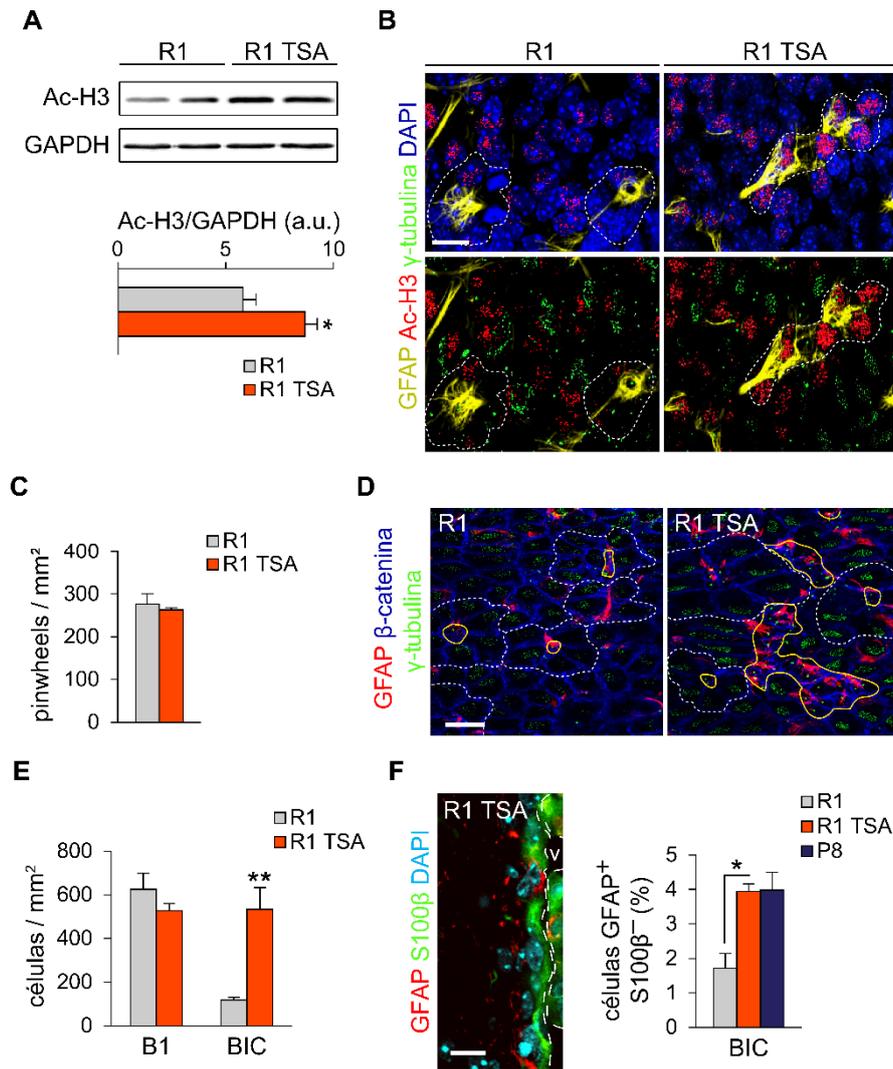
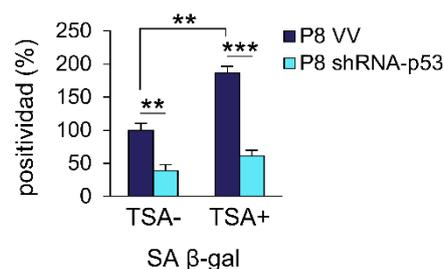


Figura 40. El tratamiento con TSA de los ratones R1 reproduce el fenotipo morfológico de la SEZ de los ratones P8. Análisis morfológico de la SEZ y de la disposición de las NSC tras la administración de TSA en ratones R1 y su comparación con ratones R1 y ratones P8 inyectados con su vehículo (DMSO). **(A)** Estimación de los niveles de Histona 3 acetilada en la lisina 9 (ac-H3) en la SEZ. Arriba: inmunoblots representativos para ac-H3 y GAPDH. Abajo: cuantificaciones densitométricas de los niveles de ac-H3 relativos a GAPDH, expresadas en unidades arbitrarias (a.u.). **(B)** IHQ de fluorescencia para la detección de GFAP (amarillo), ac-H3 (rojo) y γ -tubulina (verde) sobre preparaciones de WM de la SEZ, contratinción nuclear con DAPI (azul oscuro). **(C)** Densidad de *pinwheels* por unidad de superficie en la SEZ dorsal. **(D)** IHQ de fluorescencia para la detección de GFAP (rojo) β -catenina (azul oscuro) y γ -tubulina (verde) sobre preparaciones de WM de la SEZ. **(E)** Densidad de células B1 (izquierda) y BIC (derecha) por unidad de superficie en la SEZ dorsal. **(F) Izquierda:** IHQ para GFAP (rojo) y S100 β (verde) sobre una sección coronal de la SEZ de un ratón R1 inyectado con TSA, contratinción nuclear con DAPI (azul claro). La línea discontinua blanca indica el límite del ventrículo lateral (v). **Derecha:** porcentajes de células GFAP⁺S100 β ⁻/DAPI interpuestas en la capa endimaria (BIC), determinados a partir de secciones coronales de la SEZ. Datos representados como media \pm SEM de 3 ratones de cada grupo experimental. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. En B y D: las líneas blancas discontinuas delimitan los *pinwheels* y las líneas amarillas continuas delimitan las células B1 y BIC. Barras de escala: (B) y (F), 10 μ m; (D), 30 μ m.

5.4.- La inducción de senescencia mediante desregulación epigenética está mediada por la vía p19-p53

Una vez demostrado que el TSA incrementaba la expresión de p53 y p19 *in vitro*, tratamos de averiguar si la vía p19-p53 mediaba los efectos de este inhibidor de las HDAC sobre el comportamiento de las NSC. Con tal fin realizamos un experimento de inducción de la senescencia mediante TSA en células SAMP8 rescatadas mediante la transducción con vector control o con un shRNA específico para la interferencia de p53. Los niveles de SA β -gal en los cultivos SAMP8, que de por sí eran elevados, todavía podían incrementarse más en presencia de TSA. Por el contrario, como ya observamos en el apartado 4.2., la interferencia de p53 disminuía la senescencia (ver figura 35 B,C). Además, en los cultivos interferidos con el shRNA-p53, con una disminución del 40 % en los niveles de expresión de p53, incluso en presencia de TSA, la actividad SA β -gal mantenía los mismos niveles (figura 41). El experimento demostró que p53 es necesario para que las células entren en senescencia por acción del TSA.

Figura 41. p53 participa en la senescencia inducida por la inhibición de las HDAC. Porcentaje de la intensidad de precipitado de X-gal por célula (relativo al grupo P8 VV TSA-), en la citoquímica para SA β -gal sobre cultivos infectados con shRNA-p53 o su control (VV, vector vacío) y tratados con TSA (50 μ M) o su vehículo (DMSO). Datos representados como media \pm SEM; n = 5 cultivos independientes por condición. **p < 0,01, ***p < 0,001.



Llegado a este punto de la investigación, habíamos deducido la existencia de una vía, alternativa a la DDR, que subyacía al proceso de senescencia en nuestro modelo de envejecimiento. El incremento en la acetilación global aumentaba los niveles de p19 e inducía el proceso de senescencia a través de p53. No obstante, cabía la posibilidad de que la modificación epigenética global afectase también a la actividad de moléculas implicadas en la DDR, que en último término estabilizan p53, induciendo la senescencia con independencia de p19. A pesar de la observación de un incremento en p19, cuya estabilización indirecta de p53 es bien conocida (Harris y Levine, 2005), no teníamos evidencias de que la modulación epigenética a través de la vía p19-p53 fuese causante de senescencia en nuestras células. Para deducir si la inducción de senescencia por TSA estaba mediada por la vía p19-p53, realizamos un conjunto de ensayos en cultivos de neuroesferas procedentes de ratones mutantes nulos tanto para p53 como para p19, sobre un fondo genético C57BL/6. En primer lugar, observamos que el tratamiento con TSA también hacía entrar en senescencia a los cultivos primarios de ratones C57BL/6 adultos. Por motivos prácticos, de disponibilidad de células, los ensayos posteriores los llevamos a cabo entre los pases 4 y 7. En estos pases las células C57BL/6 no se adherían a la placa, tras el tratamiento

con TSA, demostrando una reducida capacidad de formación de neuroesferas y un incremento en la actividad SA β -gal. Por el contrario, en los cultivos deficientes para p53 y para p19 no observamos los efectos descritos del TSA (figura 42). Por otra parte, estudiamos el nivel de expresión del marcador *S100b*. Mientras que en los cultivos C57BL/6 el tratamiento con el inhibidor de las HDAC incrementaba en más de 2,5 veces su expresión, en las células deficientes para p19 y p53 la expresión no se veía alterada o incluso disminuía (figura 42). Estos últimos resultados nos permitieron asociar, una vez más, la disminución en el potencial de las células con un incremento en la expresión del marcador *S100b* (ver figura 27 D).

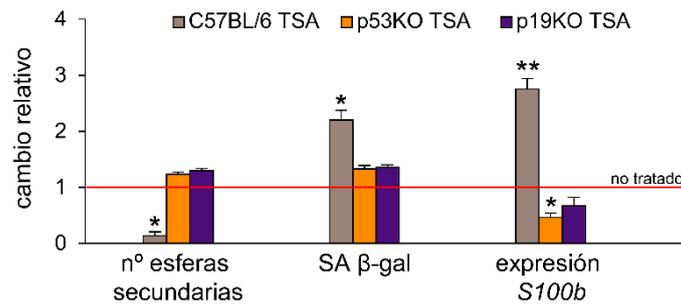


Figura 42. El fenotipo inducido por la inhibición de las HDAC está mediado por la vía p19-p53. Ensayos sobre esferas de pases 4 a 7 tratadas con TSA (50 μ M), procedentes de ratones C57BL/6 y ratones deficientes para p53 (p53KO) y p19 (p19KO). *Izquierda*: número de esferas generadas mediante el ensayo de formación de esferas a densidad límite. *Centro*: intensidad de precipitado de X-gal por célula en la citoquímica para SA β -gal. *Derecha*: expresión de mRNA de *S100b* relativa al control endógeno *Gapdh*, cuantificado mediante Q-PCR. Datos representados como media del cambio relativo al grupo tratado con vehículo (DMSO) \pm SEM; n = 3 cultivos independientes de cada genotipo. *p < 0,05, **p < 0,01.

El conjunto de ensayos nos indicó que tanto p53, ya demostrado en el ensayo anterior, como p19 eran necesarios en el proceso de senescencia inducido por la modificación epigenética mediante TSA. Además, estos cultivos fueron utilizados en pases cortos, en los que nuestro grupo tiene constancia de la ausencia de daño en el DNA (Porlan y cols., 2013). Por lo tanto, concluimos que el incremento en la activación de p19 y/o p53, mediante la modulación epigenética, puede conducir a un proceso senescente en ausencia de daño en el DNA.

DISCUSIÓN

Durante el proceso de envejecimiento disminuye la capacidad neurogénica y, consecuentemente, el potencial de recuperación del cerebro es más limitado y la predisposición a lesiones y enfermedades neurodegenerativas es mayor. Pese a la descripción de múltiples mecanismos asociados a la pérdida de función de las NSC en el envejecimiento no patológico, estos son vagamente entendidos y todavía se desconoce con precisión las causas moleculares responsables. Un conocimiento más profundo de las causas subyacentes al envejecimiento será imprescindible en futuras terapias de reemplazamiento neuronal, mediante la estimulación de la población de NSC endógenas. En el presente trabajo, analizamos el comportamiento de las NSC de la SEZ en la cepa murina SAMP8, con la intención de identificar los mecanismos moleculares que pueden subyacer al proceso de envejecimiento. Nuestros resultados apoyan un modelo en el que la desrepresión epigenética del supresor de tumores p19 conduce, en último término, a la senescencia acelerada y la pérdida de NSC en la SEZ de los SAMP8.

Cuando comenzamos el trabajo expuesto en esta tesis, solamente una publicación hacía referencia a la población de las NSC de la SEZ en los ratones SAMP8 (Cheng y cols., 2008). En ella se describía la ausencia de diferencias en el estado proliferativo de la SEZ de ratones de 4 meses, entre las cepas SAMP8 y SAMR1. No obstante, como ya hemos nombrado en la introducción, la zona muestreada y el régimen de inyecciones de BrdU hacía imposible su comparación con el resto de publicaciones del campo en otras cepas de ratones. La ausencia de estudios exhaustivos que abordaran la neurogénesis adulta en la SEZ de los ratones SAMP8 y su progresión durante el envejecimiento nos llevó a plantear una investigación minuciosa, incluyendo el análisis morfológico del nicho y las vías moleculares por las que resultan afectadas las NSC.

En el presente trabajo comparamos diversos aspectos de la neurogénesis adulta en la SEZ entre ratones de las cepas SAMP8 y SAMR1 de la misma edad. No obstante, tal y como describe Getchell y cols. en su trabajo, hay que tener en cuenta que una misma edad cronológica representa una fracción distinta de la esperanza de vida (Getchell y cols., 2004). Es decir, que con 2 meses de edad un ratón SAMP8 ha vivido un 12,0 % del tiempo de esperanza de vida para su cepa, mientras que un SAMR1 solamente un 8,7 %. Aun así, algunos procesos asociados al envejecimiento, como la acumulación de proteínas, se consideran dependientes del tiempo absoluto (envejecimiento cronológico), por lo que el estudio comparativo de individuos de la misma edad también puede aportar pistas de los procesos subyacentes. Además, nuestras observaciones se ven reforzadas por el estudio comparativo con individuos de mayor edad de la misma cepa.

Durante la última etapa de nuestra investigación han sido publicados dos trabajos que abordan, como estudio central, la caracterización de la SEZ de estos ratones (Díaz-Moreno y cols., 2013; Castro-García y cols., 2015). Ambos trabajos, descritos ampliamente en la introducción (ver apartado 4.2.), concluyen que el potencial de las NSC se encuentra disminuido

en la cepa de ratones senescentes SAMP8 respecto a la SAMR1 como consecuencia de un fenómeno de hiperproliferación que no conlleva un aumento de la neurogénesis. A pesar de la publicación de estos trabajos, nuestra investigación aporta aspectos morfológicos y moleculares de la SEZ de los SAMP8 que nunca antes habían sido descritos y contribuye a esclarecer aspectos básicos del comportamiento de las NSC de las cepas SAM. Entre ellos, cabe destacar el posicionamiento anómalo de los astrocitos con características de NSC, la posible alteración del sistema renina-angiotensina (RAS, del inglés *renin-angiotensin system*) local y el incremento de la senescencia celular, debido a la activación de la vía p19-p53, por alteraciones epigenéticas.

1.- Alteraciones de las poblaciones celulares de la zona subependimaria y su citoarquitectura

El análisis de las poblaciones de la SEZ, en los ratones SAMP8, nos indicó un incremento del número de NSC y de su estado proliferativo, así como su posicionamiento anómalo en el nicho. Pese a la hiperproliferación observada, describimos una viabilidad reducida de su progenie que impide la existencia de efectos netos en neurogénesis. Además observamos un agotamiento de la población de NSC.

La presencia de un elevado número de astrocitos se considera uno de los rasgos típicos del envejecimiento del SNC (Goss y cols., 1991; Nichols y cols., 1993). Pese a que esta característica había sido descrita en diversas áreas cerebrales de los SAMP8 (córtex, hipocampo, núcleos del tronco encefálico, etc.), todavía no se había publicado el estado de la población de astrocitos de la SEZ (Takeda, 2009). Por ello, decidimos analizar la población astrocitaria en la SEZ y zonas adyacentes. Mientras que en los astrocitos presentes en el estriado, región anexa a la SEZ, no observamos alteraciones, el estudio minucioso de la población astrocitaria de la SEZ reveló un incremento en su número e intensidad para el marcador GFAP. El conjunto de resultados nos indicó que el fenotipo observado en la SEZ parecía estar causado por influencias locales o alteraciones autónomo-celulares y no por la influencia global del fondo genético de la cepa SAMP8.

Los recuentos de la subpoblación de astrocitos considerada NSC, mediante la combinación de los marcadores GFAP, SOX y nestina, nos indicaron un aumento de esta respecto a los SAMR1 a los 2 meses de edad. Estos resultados son coherentes con los descritos por Diaz-Moreno y cols., 2013, quienes también describen una densidad de células GFAP⁺SOX2⁺ superior en la SEZ de ratones SAMP8 de 2 meses respecto a los SAMR1 de la misma edad. Además, demostramos una disminución significativa en la subpoblación astrocitaria que expresaba S100 β , que es considerada no neurogénica (Raponi y cols., 2007), reforzando la idea de la existencia de un mayor número de astrocitos con características de NSC. Opuestamente, un trabajo de caracterización de la SEZ *in vivo*, también realizado mediante recuentos sobre secciones coronales de ratones de la cepa C57BL/6, describe una disminución de la población de NSC en el envejecimiento (Ahlenius y cols., 2009). No obstante, esta publicación compara

individuos de edad avanzada (entre 22 y 26 meses) con respecto a adultos jóvenes (entre 3 y 5 meses), por lo que es posible que en etapas previas, durante el proceso de envejecimiento, la población de NSC se vea incrementada, tal y como observamos en los ratones SAMP8 respecto a los SAMR1.

Por otra parte, nuestros resultados mostraron que la tasa de proliferación de los astrocitos con características de NSC estaba incrementada. Concretamente, las proporciones de células GFAP⁺BrdU1h⁺ y GFAP⁺SOX2⁺Ki67⁺ eran mayores en los SAMP8 respecto a los SAMR1 a los 2 meses de edad. Estos hallazgos concuerdan con los incrementos en la incorporación de BrdU en la SGZ y la SEZ, descritos previamente en esta misma cepa de ratones (Gang y cols., 2011; Diaz-Moreno y cols., 2013). De nuevo, el trabajo de Ahlenius y cols. en 2009, anteriormente nombrado, había descrito un descenso en la tasa de proliferación de las NSC, indicando una disminución en el número de células pH3⁺ y BrdU⁺ *in vivo* (Ahlenius y cols., 2009). Una vez más, planteamos que las diferencias pueden ser debidas a la avanzada edad de los individuos que analizan, indicándonos que la cepa SAMP8 a los 2 meses de edad es un modelo adecuado para el estudio de los procesos iniciales del envejecimiento. No obstante, un estudio de los precursores de la SEZ de ratones C57BL/6 de 3 y 18 meses, indica que estos incrementan su tasa de proliferación *in vitro* acortando su ciclo celular (Stoll y cols., 2011). Además, otra publicación demuestra un incremento *in vivo* en el porcentaje de NSC mitóticamente activas en ratones de edad avanzada (Shook y cols., 2012). Estos trabajos nos podrían estar indicando que a nivel autónomo-celular los progenitores incrementan su tasa de proliferación, aunque las señales del nicho la restringen en las etapas más avanzadas del envejecimiento. De acuerdo con dicha explicación, cabe la posibilidad de que, a los 2 meses, las NSC de la SEZ de los ratones SAMP8 ya muestren una tasa de proliferación elevada que las señales del nicho todavía no restrinjan. Además, un incremento en la proporción de divisiones simétricas, que dieran lugar a dos NSC, unido al fenómeno de hiperproliferación descrito, nos permitiría explicar el aumento en la proporción de NSC descrito en el párrafo anterior. Por ello creemos crucial el estudio de los fenómenos de simetría/asimetría en los progenitores de la SEZ, vinculado al ámbito del envejecimiento y de la terapia celular con fines regenerativos.

En la caracterización de la SEZ, mediante preparaciones de WM y su visualización desde la superficie ventricular, observamos que los ratones SAMR1 de 2 meses de edad contenían menos células B1-NSC que otras cepas murinas de uso común. Además de los recuentos presentados en este trabajo en la cepa C57BL/6, existen una serie de publicaciones que analizan dicha población en ratones de la cepa CD1 de varios grupos de edad (Luo y cols., 2006; Mirzadeh y cols., 2008; Shook y cols., 2012). Nuestros resultados y su comparación con los ya publicados, sugieren la existencia de efectos propios del fondo genético SAM sobre la generación y/o supervivencia de las células B1. Por este motivo, en el estudio de las poblaciones de la SEZ de los ratones SAMP8, es imprescindible su comparación con la cepa SAMR1, que comparte un fondo genético común, de tal forma que podemos asignar las alteraciones observadas al fenómeno de envejecimiento acelerado, que distingue ambas cepas. Esta distinción, entre las

características propias compartidas por las cepas SAM de aquellas otras que son particulares de cada una de las cepas SAMR1 y SAMP8, resulta crucial para el uso adecuado de las mismas como un modelo de envejecimiento, tanto en el campo de las NSC y la neurogénesis postnatal, como en el de los procesos neurodegenerativos. En este sentido, nuestro estudio contribuye al reforzamiento de las cepas de ratones SAM como modelos para el estudio del envejecimiento.

Uno de los aspectos novedosos de nuestra investigación, es el hallazgo de alteraciones morfológicas en la SEZ de los ratones SAMP8 de 2 meses de edad. Los componentes de los *pinwheels* están desorganizados y se observan numerosas agrupaciones de células GFAP⁺, uniciliadas y con extensas superficies apicales, integradas en el plano de la capa endimaria. Estas células expresan los marcadores y poseen las características morfológicas de las células B1, pero su número y disposición en el nicho es singular, por lo que las denominamos células tipo B1 interpuestas o BIC. La presencia de astrocitos interpuestos en la capa endimaria ya había sido observada en la SEZ de ratones CD1 y C57BL/6 de edad avanzada (Luo y cols., 2006; Capilla-Gonzalez y cols., 2014). No obstante, estos habían sido descritos mayoritariamente como astrocitos que adquieren las características, morfológicas y antigénicas, de las células endimarias. Si bien, cabe destacar que, en uno de los trabajos, describen la presencia anecdótica de algunos astrocitos uniciliados intercalados en la capa endimaria (Luo y cols., 2006).

Para estimar la población global de astrocitos activados, realizamos el recuento de células LRC⁺GFAP⁺, observando un incremento en la SEZ de los ratones SAMP8. Una vez más, el trabajo de Castro-García muestra resultados aparentemente opuestos a los nuestros (Castro-García y cols., 2015). Este describe una disminución significativa en el número de células LRC⁺, utilizándolo a modo de lectura de la población de las NSC. Pese a confirmar la naturaleza de algunas de ellas como células B1, mediante la observación de su colocalización con GFAP y SOX2, los recuentos mostrados solo tienen en cuenta el marcaje de BrdU. Además, como ya se ha nombrado anteriormente, una de las causas que podrían subyacer a la obtención de diferentes conclusiones sería la diferencia de edad de los ratones empleados entre los trabajos.

Nuestros ensayos enfocados a la cuantificación de la población de células BIC indican que esta es la responsable tanto del aumento de la población astrocitaria de la SEZ, como de su estado hiperproliferativo. Los recuentos específicos de las células presentes en la línea endimaria que no expresan el marcador de endimocitos (S100 β), muestran proporciones superiores tanto de células GFAP⁺ como de células GFAP⁺Ki67⁺ y GFAP⁺LRC⁺. Además, la densidad de células B1 típicas, no intercaladas en la capa endimaria, es inferior en los SAMP8 respecto a los SAMR1. Este último resultado concuerda con los recuentos de densidad de células B1, mediante el análisis de WM, descritos en Shook y cols., 2012, en el que describen una disminución en la densidad de células B1 en ratones CD1 de 12 meses de edad. Junto con los resultados anteriores, la obtención *in vitro* de neuroesferas primarias más grandes y en mayor número nos sugirió que las BIC son células B1 modificadas, que mantienen las características de NSC y por lo tanto su capacidad formadora de esfera. Este resultado coincide con el

presentado en Diaz-Moreno y cols., 2013, en el que también observan un mayor número de neuroesferas y de mayor diámetro, en cultivos procedentes de ratones SAMP8 de 2 meses de edad. En contraposición, los resultados de Castro-Garcia y cols., 2015 muestran la obtención de menos neuroesferas y de menor tamaño a partir de ratones de 1 mes. Las discrepancias con este último podrían ser explicadas por la diferencia de edad o incluso por diferencias metodológicas en el establecimiento del cultivo.

El tratamiento de los datos obtenidos durante el análisis de las denominadas BIC nos permitió deducir nuevas asociaciones entre la disposición y el comportamiento de las NSC. El aumento de BIC activadas no es proporcional al incremento de BIC totales, a pesar de haber sido cuantificadas con el mismo método y sobre las mismas IHQ. Mientras que las BIC activadas representan el 0,73% en los SAMR1, en los SAMP8 este porcentaje ascendía al 3,59%. Este resultado puede ser indicador de que la mayor activación de las NSC puede estar asociada no solamente al posicionamiento anormal, sino también en cierta medida a factores de nicho o autónomo-celulares propios de la cepa SAMP8. Cabe la posibilidad de que la mayor activación sea la causante solamente de forma parcial del posicionamiento anómalo.

Cuando nos dispusimos a analizar la productividad de la población hiperproliferante, no observamos alteraciones en la incorporación de nuevas células en sus lugares de destino. En el trabajo de Diaz-Moreno y cols., 2013 indican que pese a un incremento en la incorporación de nuevas células en el OB de ratones SAMP8 de 2 meses, el volumen total de la estructura está disminuido respecto a los ratones SAMR1, sugiriendo que un supuesto estímulo en la producción neuronal no está mantenido por un incremento en las tasas de supervivencia e integración de los neuroblastos generados. Es posible que las discrepancias, en la observación de alteraciones de incorporación de nuevas células al OB, se deban a las diferencias en los protocolos de administración de BrdU. No obstante, en ambos casos se interpretan los resultados como indicadores de la ausencia de efectos netos en la neurogénesis. El porcentaje de neuroblastos migradores, su distribución zonal durante la migración y su tasa de proliferación tampoco se encuentran alterados en los ratones SAMP8 respecto a los SAMR1, según nuestro estudio. Finalmente, la observación de un incremento en la apoptosis de los neuroblastos, nos permitió reconciliar la hiperproliferación observada con la ausencia de efectos netos en las poblaciones de destino en el OB. Coincidente con este resultado, el trabajo de Luo y cols., 2006 describe un incremento en la proporción de neuroblastos apoptóticos en ratones CD1 de edad avanzada (16 meses) respecto a ratones de 2 meses. Del mismo modo, una elevada tasa de apoptosis entre las nuevas neuronas de la SGZ del DG ha sido descrita en esta cepa (Gang y cols., 2011), dando pie a la suposición de la existencia de alteraciones comunes a las NSC de ambos nichos neurogénicos. El conjunto de resultados descritos hasta el momento, sustenta la idea global de la existencia de una SEZ en la que las células B1 modifican su posición, incrementando su número y proliferación, pero cuya productividad se ve compensada por la disminución en la viabilidad de su progenie.

Para estudiar el destino de la población astrocitaria a lo largo del tiempo, utilizamos individuos de 10 meses de edad. En ellos, el porcentaje total de astrocitos no difiere entre ambas cepas y es similar al de los SAMP8 de 2 meses de edad. Por el contrario, el porcentaje de astrocitos terminalmente diferenciados es significativamente superior en los SAMP8 respecto a los SAMR1. En concordancia con los resultados anteriores, los recuentos de células LRC⁺ nos indicaron que la población de NSC se encuentra disminuida en los SAMP8 respecto a los SAMR1. Además, mientras que en los SAMP8 la densidad de células B1 no se ve afectada con la edad, los SAMR1 sufren una disminución de esta, pese a lo cual mantenían niveles superiores a los SAMP8 de edad avanzada. Estos resultados nos indican que posiblemente los ratones SAMP8 sufren una caída prematura y rápida de su población de células B1 típicas, que en los ratones SAMR1 ocurre de manera más lenta a lo largo del envejecimiento. El descenso, tanto en la densidad de *pinwheels* como en el número de células B1 durante el envejecimiento, ha sido exhaustivamente documentado en ratones CD1 (Shook y cols., 2012). Otra de las observaciones de nuestro estudio de ratones SAMP8 y SAMR1 es la carencia de células BIC en ambas cepas a los 10 meses de edad. Apoyando nuestra caracterización, un trabajo previo de nuestro grupo demuestra que un aumento del daño en el DNA, debido a un incremento de la replicación, desencadena una diferenciación terminal prematura de las NSC en astrocitos no neurogénicos (S100β⁺) y en consecuencia conlleva a un agotamiento más rápido de los astrocitos neurogénicos (Porlan y cols., 2013). Estos hallazgos sugieren que las BIC podrían ser una forma transitoria de NSC, que durante el envejecimiento se diferencia en astrocitos maduros, no multipotentes, desencadenando el agotamiento de la población de NSC de la SEZ.

Uno de los procesos celulares que han sido relacionados con el envejecimiento fisiológico es la inducción de la senescencia celular, habiéndose descrito un incremento moderado de las células senescentes en algunos sistemas (Dimri y cols., 1995; ver revisión Collado y cols., 2007). Se plantea que la senescencia puede contribuir al envejecimiento no solo por la acumulación de células senescentes en los tejidos, sino también por la limitación del potencial regenerativo de las poblaciones de células madre (Collado y cols., 2007). En nuestra caracterización de la cepa SAMP8, observamos claros indicios de un incremento de la senescencia global así como en determinadas regiones del cerebro. No obstante, todavía queda abierto el estudio *in vivo* en profundidad de la senescencia celular de la cepa SAMP8. La optimización de las condiciones de fijación del tejido, pH, etc. podría contribuir a un análisis más refinado de la senescencia celular, lo que permitiría conocer, de forma más profunda, la relación entre la senescencia celular y el proceso de envejecimiento en las poblaciones de SC. Algunos trabajos recientes han planteado la posible funcionalidad de células senescentes como fuentes moleculares de influencia en el nicho (Simboeck y cols., 2011; van Deursen, 2014). Desde un punto de vista funcional, cabe la posibilidad de que unas poblaciones senescentes induzcan la senescencia sobre células relacionadas que no lo son. Un indicio de ello pudiera ser la presencia de niveles incrementados de SA β-gal en la corteza piriforme, donde proyectan terminales procedentes de la capa mitral del OB, cuyo incremento en el marcador de senescencia también hemos observado en los SAMP8. Por todo ello creemos que un trabajo futurible, aunque alejado

del estudio de la neurogénesis adulta, sería el análisis de la posible inducción de senescencia a partir de otras poblaciones senescentes (van Deursen, 2014). La ausencia de alteraciones en el balance final del proceso de neurogénesis nos hizo descartar, en un primer momento, el planteamiento de un estudio comportamental de olfacción. Pese a ello, tras observar el incremento de actividad SA β -gal en la GCL, sería interesante la realización de este. No obstante, estos resultados podrían deberse a causas ajenas al proceso neurogénico a partir de la SEZ.

2.- Influencia del estatus oxidativo sobre la biología de las células madre neurales

Clásicamente, la acumulación de daño oxidativo se ha postulado como una de las causas subyacentes a la pérdida de homeostasis en el envejecimiento (Harman, 1956). Además, la cepa SAMP8, como ya se ha descrito en la introducción, posee niveles elevados de estrés oxidativo en diversos tejidos, incluido el cerebro (Tomobe y Nomura, 2009). Por otra parte, una emergente área de investigación estudia los aspectos reguladores del estatus oxidativo sobre el comportamiento de las SC. Entre los trabajos relacionados, cabe destacar dos publicaciones que indican la asociación entre el estrés oxidativo y el comportamiento de las NSC (Le Belle y cols., 2011; Walton y cols., 2012). En concreto, la publicación de Le Belle y cols. demuestra la necesidad de niveles elevados de ROS en la conservación de la capacidad de automantenimiento de estas células (Le Belle y cols., 2011). Estos antecedentes, junto con la alteración descrita en la población de NSC de los SAMP8 en la primera parte de la presente investigación, nos hicieron plantear un estudio exhaustivo del estatus oxidativo en nuestro sistema.

En nuestra caracterización del estatus oxidativo, en los cultivos de neuroesferas de los ratones SAMP8, observamos una disminución de la capacidad antioxidante total, a pesar del incremento de la expresión de la mayor parte de las enzimas antioxidantes de fase II y del incremento de su actividad enzimática, seguramente como parte de una respuesta compensatoria insuficiente al estrés oxidativo. Como posible fuente de ROS, causante de este desequilibrio, detectamos un incremento en la expresión del mensajero codificante para la enzima NOX4, así como del AGT (un precursor de la ANG). Pese a que clásicamente el sistema RAS ha sido descrito como propio del sistema circulatorio, nuevas evidencias indican su existencia a nivel local en distintos tejidos (ver revisión Labandeira-Garcia y cols., 2014). En concreto, múltiples trabajos describen la presencia de componentes del RAS en el sistema nigroestriatal (Garrido-Gil y cols., 2013; ver revisión Labandeira-Garcia y cols., 2014). Por otra parte, algunos estudios indican la existencia de un RAS intracelular en diversos tipos celulares, entre los que se encuentran neuronas dopaminérgicas y células gliales (Baker y cols., 2004; Kumar y cols., 2007; Garrido-Gil y cols., 2013). Además, el proceso de envejecimiento ha sido asociado con una sobreactivación del RAS en diversos tejidos (Thompson y cols., 2000; Min y cols., 2009; Cassis y cols., 2010). Estas evidencias sustentan nuestra hipótesis de la activación de un RAS propio de la SEZ en el modelo de envejecimiento SAMP8. El principal efector del RAS

es la ANGII, cuya sobreexpresión incrementa el estrés oxidativo y los procesos de inflamación, ambos asociados al envejecimiento normal y patológico (Labandeira-Garcia y cols., 2014). En relación con el incremento del estrés oxidativo, se ha descrito que la ANGII es uno de los principales reguladores positivos de las NOX (Zalba y cols., 2001; Touyz, 2004; Hoogwerf, 2010), que a su vez son una de las principales fuentes de ROS. Concretamente, un trabajo demuestra la mediación de la ANGII en la regulación positiva de la NOX4 en las NSC (Topchiy y cols., 2013). Además, un reciente estudio describe un incremento en los niveles de NOX4 y NOX2 en el tejido renal de los SAMP8, siendo el primero en demostrar que las NOX juegan un papel en el estado oxidativo de los SAMP8 (Baltanas y cols., 2013). Acorde con los trabajos descritos, en la presente investigación demostramos la sobreexpresión del gen codificante para la NOX4 en los cultivos de neuroesferas SAMP8. Las acciones de la ANGII están mediadas por los receptores AT1 y AT2, desencadenando estas últimas acciones opuestas al primero (Labandeira-Garcia y cols., 2014). Basándonos en nuestra observación de la sobreexpresión del *Agt* en los cultivos de neuroesferas de ratones SAMP8, sería interesante demostrar la presencia de los receptores AT1 y AT2 en las NSC y estudiar las posibles alteraciones en la distribución, densidad y actividad de estos. Su análisis *in vivo* mediante estudios de colocalización con marcadores de NSC, en la SEZ de ratones SAMP8, confirmaría la existencia de un RAS propio de esta zona y su influencia en el estado oxidativo de las NSC.

Apoyando nuestra hipótesis, las alteraciones que observamos en algunas actividades del sistema de defensa antioxidante, corresponden a las esperadas por un incremento en la actividad NOX. El supuesto aumento de la actividad NOX impediría, pese a la sobreactivación de la G6PDH, la presencia de niveles suficientes de NADPH para mantener la ratio GSH/GSSG mediante la actividad GSH reductasa. Además, el drástico incremento en la actividad GPx eliminaría el H₂O₂ generado al mismo tiempo que incrementaría los niveles de GSSG, reduciendo todavía más la ratio GSH/GSSG.

Por otra parte, ha sido descrita la modulación de la expresión de NRF2 por NOX en algunos sistemas (Papaiahgari y cols., 2004; Brewer y cols., 2011). Esta vía reguladora explicaría los incrementos que observamos en la expresión del factor de transcripción (*Nrf2*) y, en consecuencia, de los genes codificantes para las enzimas de fase II (*Gclm*, *G6pdh*, *Gpx1*, *HO-1* y *Nqo1*) regulados por él (ver revisión Ma, 2013). Pese a ello, un indicador más adecuado del incremento en la actividad de NRF2, ya que su actividad se da en contacto con el DNA durante el proceso de la transcripción, sería la cuantificación de los niveles nucleares de este factor. Dado que el fraccionamiento núcleo/citoplasma para la realización de un WB requiere elevadas cantidades de muestra y, en nuestro sistema, la entrada prematura en senescencia impide la expansión de los cultivos, un ensayo más viable y preciso podría consistir en la realización de una ICQ y la correspondiente cuantificación densitométrica entre las células SAMP8 y SAMR1. Es posible que el conjunto de alteraciones en la modulación del estatus oxidativo (generación de especies oxidantes y capacidades antioxidantes) impida, pese al incremento en la expresión de las enzimas de fase II, contrarrestar los efectos adversos del resto de alteraciones.

Nuestro ensayo de inhibición de la actividad NOX sugiere su influencia en el fenómeno de hiperproliferación observado *in vitro*. En él, mediante el tratamiento *in vitro* de los cultivos SAMP8 con APOC (inhibidor genérico de la actividad NOX), obtuvimos un número de neuroesferas similar al de los cultivos SAMR1. Este experimento concuerda con los resultados descritos en Le Belle y cols., 2011, según los cuales la disminución de los niveles de estrés oxidativo, mediante la inhibición de NOX, regula negativamente la auto-renovación de las NSC a través de la vía PI3K/AKT. Consecuentemente, nuestros resultados permiten plantear la hipótesis de la participación de la actividad NOX en el incremento de la proliferación de las NSC a través de la misma vía, en la cual además podría estar implicado el péptido beta amiloide (Diaz-Moreno y cols., 2013). Por extensión, la hiperproliferación que observamos en la SEZ podría estar influenciada por el incremento en la actividad de dicha enzima. Además, algunas evidencias sugieren la relación de las enzimas NOX con el proceso de envejecimiento (Krause, 2007). Futuros experimentos *in vivo*, de inhibición de la actividad NOX, serán necesarios para confirmar la hipótesis de la inducción del fenotipo SAMP8 a causa de la sobreactivación de NOX.

Tras deducir un incremento en la tasa de generación de especies oxidantes vía RAS/NOX4 y demostrar una disminución de la capacidad antioxidante total de las neuroesferas SAMP8, era previsible que las condiciones de estrés oxidativo elevado hubiesen generado daño oxidativo en las macromoléculas. Pese a que no observamos daño oxidativo en proteínas ni en DNA, la presencia de daño oxidativo en lípidos demostró la existencia de estrés oxidativo, que como ya hemos explicado en la introducción está implicado en los procesos de envejecimiento normal y patológico (Kirkwood, 2005). Diversos trabajos indican la presencia de daño oxidativo en diferentes macromoléculas del cerebro de los ratones SAMP8 (ver revisión Morley y cols., 2012). En el caso de la oxidación de proteínas, se ha descrito un incremento en los niveles globales de carbonilación proteínica en el cerebro de ratones SAMP8 de 5 meses respecto a ratones SAMR1 de la misma edad (Caballero y cols., 2008). Además, un trabajo sobre membranas sinaptosomales corticales describe un aumento de estas en ratones SAMP8 de 10 meses, respecto a los SAMR1 (Butterfield y cols., 1997). También ha sido descrito el incremento en los niveles de peroxidación lipídica en el cerebro de ratones SAMP8 de 5 meses, respecto a los SAMR1 (Alvarez-García y cols., 2006). Los trabajos comparativos entre ratones SAMP8 de distinta edad, también describen un incremento, con el envejecimiento, en los niveles de carbonilación proteínica y lipoperoxidación. Concretamente, el trabajo de Sato y cols., 1996 compara estos niveles en el tejido cortical entre ratones de 4 y 8 meses. Otra publicación describe un incremento de estos a nivel global, en el cerebro de ratones SAMP8 de 12 meses respecto a ratones de 4 meses de edad (Farr y cols., 2003). A pesar de estos antecedentes, en nuestro sistema no observamos diferencias en los marcadores de oxidación proteínica. Como ya hemos mencionado, cabe la posibilidad de que las tasas de renovación, reparación y/o eliminación de estas impidan una acumulación de las proteínas dañadas hasta alcanzar niveles detectables con las técnicas realizadas en el presente trabajo. La acumulación de daño por peroxidación lipídica, sin embargo, parece producirse a edades más tempranas como consecuencia de las tasas más bajas de recambio lipídico en las membranas en comparación con las proteínas totales celulares.

En el cerebro de ratones SAMP8 de tan solo 2 meses de edad, se detectan niveles anormalmente elevados de peroxidación lipídica en comparación con los de ratones SAMR1 (Yasui y cols., 2003).

Por otra parte, pese a que se ha descrito la acumulación de daño en el DNA con la edad en diversos tejidos (Nie y cols., 2013), no encontramos diferencias en nuestro análisis de los niveles de 8-OHdG en neuroesferas procedentes de ratones SAMP8 y SAMR1 de 2 meses de edad. Concretamente, un trabajo describe un incremento gradual del daño en el DNA dependiente de la edad en distintos tejidos de la cepa SAMP8 (Gan y cols., 2012). En este observan un aumento de 8-OHdG con la edad en el cerebro tanto de los SAMP8 como de los SAMR1, siendo más drástico en los primeros. No obstante, la ausencia de diferencias entre ambas cepas en individuos adultos jóvenes (1 mes), nos indica la posibilidad de que la edad de los ratones con los que obtuvimos las neuroesferas, sea demasiado temprana para observar un incremento del daño oxidativo acumulado en el DNA. Otra opción, que podría sumarse a la anterior, sería la existencia de daño oxidativo restringido principalmente al DNA mitocondrial, pudiendo este quedar fuera del rango de sensibilidad del *kit* utilizado para su detección. Avalando dicha hipótesis, un trabajo reciente describe un incremento en el daño oxidativo del DNA mitocondrial del cerebro de ratones SAMP8 de 11 meses respecto a ratones de 2 meses de edad (Torregrosa-Munumer y cols., 2015).

El tratamiento con antioxidantes de la familia de los polifenoles disminuyó el fenotipo de adhesión celular a la placa característico de nuestros cultivos SAMP8, sugiriendo la protección parcial de estos frente al estrés oxidativo. Además de su función como antioxidantes directos, mediante la interacción con las especies oxidantes produciendo su neutralización, es bien conocida la implicación de los polifenoles en la activación de la vía NRF2/ARE (Hu, 2011; Scapagnini y cols., 2011). Por ello, cabe la posibilidad de que los efectos observados se debieran a una mayor activación de las enzimas antioxidantes de fase II. Un amplio número de estudios experimentales y epidemiológicos respaldan los efectos beneficiosos de estos compuestos fenólicos, de origen vegetal, en la prevención de alteraciones asociadas al envejecimiento, como enfermedades neurodegenerativas y cáncer (Hu, 2011). Concretamente, en algunos de estos trabajos ha sido utilizada la cepa SAMP8, observando un incremento de la esperanza de vida y una disminución de las alteraciones cognitivas y de los marcadores histopatológicos de la AD (Porquet y cols., 2013; Porquet y cols., 2014). Estos efectos se asocian a la modulación de distintas vías, entre ellas la activación de la sirtuína SIRT1 (HDAC de tipo III), que interviene en procesos de desacetilación tanto de histonas como de otros sustratos (p53, NF- κ B, FOXO, etc.). La CR también incrementa la expresión de SIRT1, desencadenando efectos similares. Por ello, la modulación de las sirtuínas suscita un gran interés como diana en la lucha contra el envejecimiento (Pallas y cols., 2008; Chung y cols., 2010). Pese a que, en el presente trabajo, los ensayos de inhibición de la actividad desacetilasa fueron realizados sobre las HDAC de tipo I y II, mediante el tratamiento con TSA, es posible que la modulación de dianas comunes, como p53, desencadenen fenómenos equivalentes. Por ello, el rescate parcial del fenotipo morfológico

de los cultivos SAMP8 también podría deberse a una disminución de los niveles de acetilación, mediante la activación de SIRT1.

A pesar de la extensa bibliografía sobre la caracterización de las cepas SAM, los genes implicados en la senescencia acelerada y en las patologías asociadas a los SAMP, permanecen en gran medida sin identificar. No obstante, un estudio reciente de secuenciación del exoma de varias cepas SAM, describe la existencia de algunos polimorfismos de nucleótido simple comunes en los SAMP y otros característicos de la cepa SAMP8 (Tanisawa y cols., 2013). En él se describe una mutación, específica de la cepa SAMP8, en el gen *Aifm3* (*apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated, 3*). Este gen interviene en el mantenimiento de la cadena respiratoria mitocondrial, por lo que su disfunción incrementa los niveles de estrés oxidativo. Puesto que la actividad mitocondrial es, junto a la NOX, una de las principales fuentes de ROS, es posible que dicha mutación también esté implicada en las alteraciones descritas en el presente trabajo en el comportamiento de las NSC.

Las herramientas actuales impiden conocer el potencial real de las células observadas *in vivo*. Por ello, asociado a la caracterización de las NSC de la SEZ, estudiamos el comportamiento de los cultivos de neuroesferas en los sucesivos pases. El conjunto de resultados obtenidos *in vitro*, indica que las células con capacidad formadora de esfera ven disminuido abruptamente su potencial, mostrando senescencia celular en los primeros pases. Este fenómeno nunca había sido observado tan prematuramente en los cultivos de neuroesferas de las cepas murinas de uso común en investigación (Ferron y cols., 2007). Estos sorprendentes resultados, sugieren que el potencial de las NSC predominantes en la SEZ de los ratones SAMP8 de 2 meses de edad, identificadas en nuestro trabajo como BIC, está drásticamente reducido respecto al de las NSC descritas hasta el momento o células B1.

3.- Mecanismos moleculares implicados en el comportamiento de las células madre neurales

Tras la observación de alteraciones en el estatus oxidativo y la activación prematura de la senescencia celular de los cultivos de neuroesferas, decidimos estudiar los mecanismos implicados en el fenotipo descrito en la SEZ de los ratones SAMP8. Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que el estrés, tanto oxidativo como replicativo, activa la DDR en los SAMP8, que en último lugar desencadena la senescencia celular mediante la estabilización de p53 (Kastan y cols., 1991; Harris y Levine, 2005). Por otra parte, la observación de niveles significativamente superiores de p19 sugirió la existencia de una segunda vía de estabilización de p53, a través del secuestro de MDM2. Además, la sobreexpresión de p19 ha sido descrita durante el envejecimiento (Krishnamurthy y cols., 2004), haciendo razonable su implicación en el envejecimiento en nuestro modelo murino.

En el trabajo de Tanisawa y cols., 2013, anteriormente nombrado, se describen mutaciones deletéreas comunes a los SAMP en los genes *Ogg1* (8-oxoguanine DNA glycosylase) y *Mbd4* (methyl-CpG binding domain 4 DNA glycosylase), ambos implicados en la reparación del DNA. Los defectos en la reparación del DNA, consecuencia de dichas mutaciones, también podrían estar implicados en una mayor susceptibilidad al proceso de envejecimiento e indirectamente en la activación de la senescencia celular.

Pese a que p21, junto con p53, ha sido descrito como uno de los principales reguladores de la proliferación de las NSC (Marques-Torrejon y cols., 2013; Porlan y cols., 2013), en el presente trabajo, no logramos detectar la expresión alterada de p21 en la SEZ de los ratones SAMP8. No obstante, mediante el análisis de expresión de mRNA en los cultivos de neuroesferas, cuantificamos un incremento significativo de *Cdkn2a* (gen codificante para p21) en los SAMP8 respecto a los SAMR1. Este dato, junto con el incremento de p53 que hemos descrito, es coherente con la extensa bibliografía que indica la regulación transcripcional de p21 por p53 (ver revisión Harris y Levine, 2005). Aunque no hemos indagado más, la alteración indicada sienta las bases para futuras investigaciones que esclarezcan los mecanismos que actúan, en el proceso de envejecimiento de las NSC en los SAMP8, por debajo de p53.

Aunque varios trabajos relacionan la limitación del potencial de las NSC durante el envejecimiento con un incremento en p16 (ver apartado 2.3.3. de la introducción), nuestros resultados indican una disminución de estos en los cultivos SAMP8 respecto a los SAMR1. En el trabajo de Molofsky y cols., 2006 se analiza los niveles de p16 en la población de las NSC, no detectándose expresión de la proteína ni del mRNA en la SEZ, aunque obteniendo un incremento en la expresión de *p16^{Ink4a}* a partir de células primarias sin cultivar. En contraposición, un trabajo sobre cultivos celulares a partir de la SEZ (Ahlenius y cols., 2009), muestra resultados distintos a los del trabajo anterior y coherentes con los obtenidos en el presente trabajo, siendo indicativo de que los diferentes procedimientos experimentales pueden afectar ampliamente a los niveles de expresión de los productos del locus *Ink4a/Arf*. Los autores únicamente detectan la expresión de *p16^{Ink4a}* tras la expansión *in vitro*, cuantificando niveles levemente inferiores en los cultivos obtenidos de ratones viejos respecto a los de adultos jóvenes. Por el contrario, encuentran un incremento moderado de la expresión de *p19^{Arf}* entre ambos grupos (Ahlenius y cols., 2009). Como ya se ha descrito en la introducción, la literatura al respecto es heterogénea en sus resultados, indicando que los cambios en los niveles de los supresores de tumores, así como sus efectos, varían en función del contexto celular y de la especie. No obstante, un trabajo describe, además del incremento en p19 y la inducción de la senescencia celular, una disminución de p16 tras el tratamiento con inhibidores de HDAC (Matheu y cols., 2005). Además, en nuestro grupo hemos demostrado que la pérdida del control proliferativo y el consecuente incremento de estrés replicativo, como resultado de la delección de p21, conlleva un aumento en los niveles de p19, pero no de p16, y resulta en senescencia celular en los cultivos de neuroesferas (Marques-Torrejon y cols., 2013). Todo ello nos hace plantear que nuestro modelo de envejecimiento se basa en la pérdida de control del ciclo celular, mediante la modificación de

la expresión de algunos supresores de tumores a causa de alteraciones en el estado de acetilación, lo que en último término desencadena el proceso de senescencia celular.

Nuestros experimentos de inducción de los niveles de acetilación *in vitro* reproducen, en gran medida, el fenotipo morfológico y molecular observado en los cultivos procedentes de ratones SAMP8. Además de los resultados mostrados, los tratamientos, tanto con TSA como con VPA, incrementaron significativamente los niveles de p53. Todo ello indica una relación entre dicha alteración epigenética y el fenotipo SAMP8. Mediante la inhibición de las HDAC *in vivo*, en ratones SAMR1 de 2 meses de edad, conseguimos reproducir parcialmente la citoarquitectura característica de la SEZ de los SAMP8. En primer lugar, debemos revelar que en la cuantificación de ac-H3, como indicador de los niveles globales de acetilación, en el grupo SAMP8 tratado con DMSO obtuvimos valores mayores, pero estadísticamente no significativos, respecto al grupo SAMR1. Cabe la posibilidad de que la diferencia esperada entre ambos grupos, se encuentre por debajo del umbral de detección de la técnica de WB utilizada. Pese a que los valores de densidad de *pinwheels* y células B1 no se encuentran alterados, la concentración de células BIC se incrementa hasta niveles cercanos, aunque inferiores, a los obtenidos previamente en los SAMP8 (no inyectados con DMSO). No obstante, el recuento en cortes coronales de astrocitos interpuestos en la capa ependimaria, indica niveles idénticos entre los SAMR1 tratados con TSA y los SAMP8 inyectados con el vehículo (DMSO). La diferencia entre ambos recuentos puede deberse al tratamiento con DMSO, utilizado en el grupo SAMP8 del segundo ensayo y no en el primero. En general, tanto la presencia de niveles similares de células B1 como la posible presencia de una menor densidad de células BIC, podrían deberse al régimen agudo de inyecciones de TSA utilizado y al tiempo absoluto transcurrido hasta el sacrificio de los ratones. Futuros ensayos, con tratamientos a más largo plazo, podrían reproducir con mayor fidelidad el fenotipo de los SAMP8. En cualquier caso, dicho experimento nos indicó la existencia de una relación entre los niveles de acetilación y la disposición característica de los astrocitos de la SEZ de los SAMP8. Se ha descrito que el tratamiento *in vivo* del cerebro postnatal de ratón con inhibidores de HDAC, disminuye la producción y diferenciación de la progenie de las distintas poblaciones de NSC (Foti y cols., 2013). Este trabajo sugiere que las BIC generadas en nuestro tratamiento *in vivo* con TSA podrían, al igual que el incremento proliferativo descrito en los SAMP8, no ser productivas a largo plazo. Con este ensayo, hemos demostrado que el incremento en los niveles de acetilación conduce al cambio en la disposición de los astrocitos de la SEZ. Puesto que, en condiciones normales, las células B1 tienen el contacto con el CSF restringido al cilio, es posible que el aumento de la superficie de contacto con el ventrículo de las BIC, permita una mayor exposición de estas a moléculas pro-mitogénicas (Falcao y cols., 2012). Junto con el incremento en el estrés oxidativo, esta circunstancia, también explicaría el fenómeno de hiperproliferación observado.

Por último, la realización de tratamientos con TSA en cultivos carentes de daño en el DNA nos indicó que la inducción de senescencia causada por la inhibición de las HDAC está mediada por la vía p19-p53, independientemente de la DDR. A pesar de que se ha descrito la

capacidad de p19 para prevenir la división celular con independencia de MDM2 y p53 (Sherr, 2006), la ineficacia del TSA para inducir la senescencia sobre células deficientes para p53 nos indicó que, en este caso, p19 actúa a través de p53.

En concordancia con el análisis *in vivo* de individuos de edad avanzada, en los que observamos un incremento en los astrocitos terminalmente diferenciados (GFAP⁺S100β⁺), nuestros cultivos altamente senescentes, tanto los SAMP8 como los C57BL/6 tratados con TSA, expresan niveles superiores de *S100b*. Tal y como se ha demostrado en ensayos de aislamiento y cultivo de células positivas para S100β, la expresión de esta se asocia con la pérdida de potencial de la formación de neuroesferas (Raponi y cols., 2007). Esto nos lleva a plantear que la disminución del potencial de las NSC observada puede deberse, al menos parcialmente, a la diferenciación terminal de los astrocitos. Además de la auto-renovación y proliferación de las NSC, la vía p19-p53 también regula su capacidad de respuesta a señales gliogénicas (Nagao y cols., 2008). Por ello, la activación observada en la vía p19-p53 podría activar procesos de gliogénesis, siendo la causante del incremento en la diferenciación terminal de las NSC en astrocitos no neurogénicos (S100β⁺).

La actividad biológica de las proteínas del grupo PcG reside en el silenciamiento estable de conjuntos específicos de genes mediante modificaciones de la cromatina (Valk-Lingbeek y cols., 2004). El interés en su estudio radica en la heredabilidad de dichas modificaciones así como en la necesidad de su alteración en los programas de diferenciación, etc. Entre ellas, Bmi1 ha sido descrito como uno de los moduladores de la expresión del locus *Ink4a/Arf*. Varios estudios con el ratón mutante nulo para Bmi1, muestran la irrupción de senescencia prematura y la pérdida del potencial de las NSC, que puede ser rescatado en gran medida mediante la represión de la expresión de p16 y/o p19 (Bruggeman y cols., 2005; Molofsky y cols., 2005). No obstante, la intensidad del rescate, en estudios *in vivo*, dependía en cada zona de la deficiencia de uno o ambos CKI; indicando diferencias regionales en su influencia sobre las NSC. El análisis del nivel de expresión de *Bmi1* en los cultivos de neuroesferas, nos indicó una disminución significativa de este en los SAMP8 respecto a los SAMR1. Como hemos mencionado en la introducción, se han descrito múltiples mecanismos reguladores de la expresión de p16 y p19, que pueden estar implicados en la modulación del comportamiento de las SC. No obstante, la alteración observada en los niveles de expresión de *Bmi1* abre una nueva vía de estudio de los posibles mecanismos moleculares que actúan en las NSC de nuestro modelo y por extensión en el proceso de envejecimiento. El estudio de las NSC durante el proceso de envejecimiento en el mutante nulo para Bmi1 y su rescate mediante la delección de p16, p19 o ambos, permitiría confirmar la relevancia de esta PcG y demostrar el nivel de influencia de cada CKI. Además, en coherencia con los resultados hallados, se ha descrito la influencia del estrés oxidativo, a través de ERK1/2, en la represión de la expresión y actividad de Bmi1 (Kim y Wong, 2009).

El conjunto de resultados mostrados en el presente trabajo, indica que el comportamiento de las NSC de la SEZ de los ratones SAMP8 se debe a diversas causas. Estas células sufren inicialmente una proliferación exacerbada que, según creemos, es causada por el incremento del estrés oxidativo. A su vez, tanto la hiperproliferación como un aumento en los niveles de acetilación parecen ser la causa de su posicionamiento anómalo en el nicho. Nuestros resultados sugieren que el subsecuente agotamiento de las NSC se debe al incremento en la senescencia celular, que podría ser debido tanto a la activación de la DDR (como consecuencia del daño en macromoléculas) como de la vía p19-p53 (como consecuencia de una desrepresión epigenética del locus *Ink4a/Arf*). Además, planteamos que la activación de la vía p19-p53 podría estar detrás del proceso de diferenciación terminal de las NSC en astrocitos no neurogénicos.

Las similitudes entre las alteraciones observadas en este complejo modelo y las descritas en el envejecimiento fisiológico, hacen de esta cepa un sistema adecuado para el estudio de los mecanismos implicados en el agotamiento de las NSC *in vivo*. La implicación de moléculas concretas, como p19, en el proceso de envejecimiento en las NSC, sugiere la posibilidad de un tratamiento farmacológico, preventivo de la disfunción neurogénica asociada con la edad.

CONCLUSIONES

1. Los ratones SAMP8 muestran un incremento transitorio del número de células B1 con morfología y posicionamiento anómalos, que resulta en la alteración de la citoarquitectura de la SEZ. Estas células B1 modificadas, que denominamos células BIC, conservan las características propias de las NSC.
2. La elevada actividad proliferativa de las BIC no conlleva una mayor tasa de neurogénesis debido a un aumento de la muerte por apoptosis de los neuroblastos generados.
3. La población de células B1 sufre un agotamiento prematuro en ratones SAMP8 de edad avanzada, representando las BIC una forma transitoria de NSC en individuos jóvenes.
4. Las NSC de los ratones SAMP8 tienen activado el sistema antioxidante regulado por NRF2, aunque éste parece ser insuficiente para compensar los altos niveles de ROS generados por una actividad NOX elevada, responsables de daño oxidativo en lípidos y del fenotipo característico de las NSC en este modelo de senescencia acelerada.
5. La senescencia celular observada en los ratones SAMP8 está mediada por p53, en respuesta tanto al daño genómico como a la regulación epigenética de la expresión de p19.
6. La disminución de la actividad desacetilasa de las HDAC está implicada en el desarrollo del fenotipo senescente característico de los cultivos SAMP8, así como en el posicionamiento anómalo de las NSC de la SEZ.

BIBLIOGRAFÍA

- Aebi H (1984). Catalase in vitro. *Methods in enzymology*. 105, 121-126.
- Aguirre A, Rubio ME, Gallo V (2010). Notch and EGFR pathway interaction regulates neural stem cell number and self-renewal. *Nature*. 467, 323-327.
- Ahlenius H, Visan V, Kokaia M, Lindvall O, Kokaia Z (2009). Neural stem and progenitor cells retain their potential for proliferation and differentiation into functional neurons despite lower number in aged brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 29, 4408-4419.
- Aimone JB, Li Y, Lee SW, Clemenson GD, Deng W, Gage FH (2014). Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition. *Physiological reviews*. 94, 991-1026.
- Akiyama H, Kameyama M, Akiguchi I, Sugiyama H, Kawamata T, Fukuyama H, Kimura H, Matsushita M, Takeda T (1986). Periodic acid-Schiff (PAS)-positive, granular structures increase in the brain of senescence accelerated mouse (SAM). *Acta neuropathologica*. 72, 124-129.
- Alison MR, Islam S (2009). Attributes of adult stem cells. *The Journal of pathology*. 217, 144-160.
- Alison MR, Poulson R, Forbes S, Wright NA (2002). An introduction to stem cells. *The Journal of pathology*. 197, 419-423.
- Altman J (1962). Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science*. 135, 1127-1128.
- Altman J (1963). Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. *The Anatomical record*. 145, 573-591.
- Altman J (1969). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *The Journal of comparative neurology*. 137, 433-457.
- Altman J, Das GD (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *The Journal of comparative neurology*. 124, 319-335.
- Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM (2002). Neurogenesis in adult subventricular zone. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 22, 629-634.
- Alvarez-Buylla A, Seri B, Doetsch F (2002). Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. *Brain research bulletin*. 57, 751-758.
- Alvarez-Garcia O, Vega-Naredo I, Sierra V, Caballero B, Tomas-Zapico C, Camins A, Garcia JJ, Pallas M, Coto-Montes A (2006). Elevated oxidative stress in the brain of senescence-accelerated mice at 5 months of age. *Biogerontology*. 7, 43-52.
- Allen ND, Baird DM (2009). Telomere length maintenance in stem cell populations. *Biochimica et biophysica acta*. 1792, 324-328.
- Amano T, Nakanishi H, Oka M, Yamamoto K (1995). Increased expression of cathepsins E and D in reactive microglial cells associated with spongiform degeneration in the brain stem of senescence-accelerated mouse. *Experimental neurology*. 136, 171-182.
- Andreu-Agullo C, Morante-Redolat JM, Delgado AC, Farinas I (2009). Vascular niche factor PEDF modulates Notch-dependent stemness in the adult subependymal zone. *Nature neuroscience*. 12, 1514-1523.
- Armbrecht HJ, Boltz MA, Kumar VB, Flood JF, Morley JE (1999). Effect of age on calcium-dependent proteins in hippocampus of senescence-accelerated mice. *Brain research*. 842, 287-293.

- Asensi M, Sastre J, Pallardo FV, Garcia de la Asuncion J, Estrela JM, Vina J (1994). A high-performance liquid chromatography method for measurement of oxidized glutathione in biological samples. *Analytical biochemistry*. 217, 323-328.
- Baird GS, Nelson SK, Keeney TR, Stewart A, Williams S, Kraemer S, Peskind ER, Montine TJ (2012). Age-dependent changes in the cerebrospinal fluid proteome by slow off-rate modified aptamer array. *The American journal of pathology*. 180, 446-456.
- Baker DJ, Wijshake T, Tchkonja T, LeBrasseur NK, Childs BG, van de Sluis B, Kirkland JL, van Deursen JM (2011). Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*. 479, 232-236.
- Baker KM, Chernin MI, Schreiber T, Sanghi S, Haiderzaidi S, Booz GW, Dostal DE, Kumar R (2004). Evidence of a novel intracrine mechanism in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Regulatory peptides*. 120, 5-13.
- Balch WE, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW (2008). Adapting proteostasis for disease intervention. *Science*. 319, 916-919.
- Baltanas A, Solesio ME, Zalba G, Galindo MF, Fortuno A, Jordan J (2013). The senescence-accelerated mouse prone-8 (SAM-P8) oxidative stress is associated with upregulation of renal NADPH oxidase system. *Journal of physiology and biochemistry*. 69, 927-935.
- Ballas N, Battaglioli E, Atouf F, Andres ME, Chenoweth J, Anderson ME, Burger C, Moniwa M, Davie JR, Bowers WJ, Federoff HJ, Rose DW, Rosenfeld MG, Brehm P, Mandel G (2001). Regulation of neuronal traits by a novel transcriptional complex. *Neuron*. 31, 353-365.
- Bashir T, Pagano M (2005). Cdk1: the dominant sibling of Cdk2. *Nature cell biology*. 7, 779-781.
- Bedard K, Krause KH (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological reviews*. 87, 245-313.
- Bergmann O, Liebl J, Bernard S, Alkass K, Yeung MS, Steier P, Kutschera W, Johnson L, Landen M, Druid H, Spalding KL, Frisen J (2012). The age of olfactory bulb neurons in humans. *Neuron*. 74, 634-639.
- Besson A, Dowdy SF, Roberts JM (2008). CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Developmental cell*. 14, 159-169.
- Beukelaers P, Vandenbosch R, Caron N, Nguyen L, Belachew S, Moonen G, Kiyokawa H, Barbacid M, Santamaria D, Malgrange B (2011). Cdk6-dependent regulation of G(1) length controls adult neurogenesis. *Stem cells*. 29, 713-724.
- Bigarella CL, Liang R, Ghaffari S (2014). Stem cells and the impact of ROS signaling. *Development*. 141, 4206-4218.
- Bill BR, Korzh V (2014). Choroid plexus in developmental and evolutionary perspective. *Frontiers in neuroscience*. 8, 363.
- Biro S, Yu ZX, Fu YM, Smale G, Sasse J, Sanchez J, Ferrans VJ, Casscells W (1994). Expression and subcellular distribution of basic fibroblast growth factor are regulated during migration of endothelial cells. *Circulation research*. 74, 485-494.
- Bouab M, Paliouras GN, Aumont A, Forest-Berard K, Fernandes KJ (2011). Aging of the subventricular zone neural stem cell niche: evidence for quiescence-associated changes between early and mid-adulthood. *Neuroscience*. 173, 135-149.
- Boyette LB, Tuan RS (2014). Adult Stem Cells and Diseases of Aging. *Journal of clinical medicine*. 3, 88-134.
- Brecht M, Schneider M, Sakmann B, Margrie TW (2004). Whisker movements evoked by stimulation of single pyramidal cells in rat motor cortex. *Nature*. 427, 704-710.

- Brewer AC, Murray TV, Arno M, Zhang M, Anilkumar NP, Mann GE, Shah AM (2011). Nox4 regulates Nrf2 and glutathione redox in cardiomyocytes in vivo. *Free radical biology & medicine*. 51, 205-215.
- Brill MS, Ninkovic J, Winpenny E, Hodge RD, Ozen I, Yang R, Lepier A, Gascon S, Erdelyi F, Szabo G, Parras C, Guillemot F, Frotscher M, Berninger B, Hevner RF, Raineteau O, Gotz M (2009). Adult generation of glutamatergic olfactory bulb interneurons. *Nature neuroscience*. 12, 1524-1533.
- Bruggeman SW, Valk-Lingbeek ME, van der Stoop PP, Jacobs JJ, Kieboom K, Tanger E, Hulsman D, Leung C, Arsenijevic Y, Marino S, van Lohuizen M (2005). Ink4a and Arf differentially affect cell proliferation and neural stem cell self-renewal in Bmi1-deficient mice. *Genes & development*. 19, 1438-1443.
- Butterfield DA, Howard BJ, Yatin S, Allen KL, Carney JM (1997). Free radical oxidation of brain proteins in accelerated senescence and its modulation by N-tert-butyl-alpha-phenylnitron. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94, 674-678.
- Butterfield DA, Poon HF (2005). The senescence-accelerated prone mouse (SAMP8): a model of age-related cognitive decline with relevance to alterations of the gene expression and protein abnormalities in Alzheimer's disease. *Experimental gerontology*. 40, 774-783.
- Caballero B, Vega-Naredo I, Sierra V, Huidobro-Fernandez C, Soria-Valles C, De Gonzalo-Calvo D, Tolivia D, Gutierrez-Cuesta J, Pallas M, Camins A, Rodriguez-Colunga MJ, Coto-Montes A (2008). Favorable effects of a prolonged treatment with melatonin on the level of oxidative damage and neurodegeneration in senescence-accelerated mice. *Journal of pineal research*. 45, 302-311.
- Calabrese V, Guagliano E, Sapienza M, Panebianco M, Calafato S, Puleo E, Pennisi G, Mancuso C, Butterfield DA, Stella AG (2007). Redox regulation of cellular stress response in aging and neurodegenerative disorders: role of vitagenes. *Neurochemical research*. 32, 757-773.
- Cameron HA, Dayer AG (2008). New interneurons in the adult neocortex: small, sparse, but significant? *Biological psychiatry*. 63, 650-655.
- Campbell K, Gotz M (2002). Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends in neurosciences*. 25, 235-238.
- Canudas AM, Gutierrez-Cuesta J, Rodriguez MI, Acuna-Castroviejo D, Sureda FX, Camins A, Pallas M (2005). Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau in senescence-accelerated mouse (SAM). *Mechanisms of ageing and development*. 126, 1300-1304.
- Capilla-Gonzalez V, Cebrian-Silla A, Guerrero-Cazares H, Garcia-Verdugo JM, Quinones-Hinojosa A (2014). Age-related changes in astrocytic and ependymal cells of the subventricular zone. *Glia*. 62, 790-803.
- Caporaso GL, Lim DA, Alvarez-Buylla A, Chao MV (2003). Telomerase activity in the subventricular zone of adult mice. *Molecular and cellular neurosciences*. 23, 693-702.
- Carlessi L, Fusar Poli E, De Filippis L, Delia D (2013). ATM-deficient human neural stem cells as an in vitro model system to study neurodegeneration. *DNA repair*. 12, 605-611.
- Cassis P, Conti S, Remuzzi G, Benigni A (2010). Angiotensin receptors as determinants of life span. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*. 459, 325-332.

- Castro-Garcia P, Diaz-Moreno M, Gil-Gas C, Fernandez-Gomez FJ, Honrubia-Gomez P, Alvarez-Simon CB, Sanchez-Sanchez F, Cano JC, Almeida F, Blanco V, Jordan J, Mira H, Ramirez-Castillejo C (2015). Defects in subventricular zone pigmented epithelium-derived factor niche signaling in the senescence-accelerated mouse prone-8. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 29, 1480-1492.
- Ciccia A, Elledge SJ (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Molecular cell*. 40, 179-204.
- Codega P, Silva-Vargas V, Paul A, Maldonado-Soto AR, Deleo AM, Pastrana E, Doetsch F (2014). Prospective identification and purification of quiescent adult neural stem cells from their in vivo niche. *Neuron*. 82, 545-559.
- Colak D, Mori T, Brill MS, Pfeifer A, Falk S, Deng C, Monteiro R, Mummery C, Sommer L, Gotz M (2008). Adult neurogenesis requires Smad4-mediated bone morphogenic protein signaling in stem cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 28, 434-446.
- Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, Beasley TM, Allison DB, Cruzen C, Simmons HA, Kemnitz JW, Weindruch R (2009). Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science*. 325, 201-204.
- Collado M, Blasco MA, Serrano M (2007). Cellular senescence in cancer and aging. *Cell*. 130, 223-233.
- Conover JC, Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Gale NW, Yancopoulos GD, Alvarez-Buylla A (2000). Disruption of Eph/ephrin signaling affects migration and proliferation in the adult subventricular zone. *Nature neuroscience*. 3, 1091-1097.
- Conover JC, Shook BA (2011). Aging of the subventricular zone neural stem cell niche. *Aging and disease*. 2, 49-63.
- Coppe JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J (2010). The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annual review of pathology*. 5, 99-118.
- Cordey M, Limacher M, Kobel S, Taylor V, Lutolf MP (2008). Enhancing the reliability and throughput of neurosphere culture on hydrogel microwell arrays. *Stem cells*. 26, 2586-2594.
- Culver JC, Vadakkan TJ, Dickinson ME (2013). A specialized microvascular domain in the mouse neural stem cell niche. *PLoS one*. 8, e53546.
- Curtis MA, Kam M, Nannmark U, Anderson MF, Axell MZ, Wikkelso C, Holtas S, van Roon-Mom WM, Bjork-Eriksson T, Nordborg C, Frisen J, Dragunow M, Faull RL, Eriksson PS (2007). Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension. *Science*. 315, 1243-1249.
- Cheeseman KH, Slater TF (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British medical bulletin*. 49, 481-493.
- Cheffer A, Tarnok A, Ulrich H (2013). Cell cycle regulation during neurogenesis in the embryonic and adult brain. *Stem cell reviews*. 9, 794-805.
- Chen J, Astle CM, Harrison DE (2003). Hematopoietic senescence is postponed and hematopoietic stem cell function is enhanced by dietary restriction. *Experimental hematology*. 31, 1097-1103.
- Cheng H, Yu J, Jiang Z, Zhang X, Liu C, Peng Y, Chen F, Qu Y, Jia Y, Tian Q, Xiao C, Chu Q, Nie K, Kan B, Hu X, Han J (2008). Acupuncture improves cognitive deficits and regulates the brain cell proliferation of SAMP8 mice. *Neuroscience letters*. 432, 111-116.

- Cheng LC, Pastrana E, Tavazoie M, Doetsch F (2009). miR-124 regulates adult neurogenesis in the subventricular zone stem cell niche. *Nature neuroscience*. 12, 399-408.
- Chiba Y, Shimada A, Kumagai N, Yoshikawa K, Ishii S, Furukawa A, Takei S, Sakura M, Kawamura N, Hosokawa M (2009). The senescence-accelerated mouse (SAM): a higher oxidative stress and age-dependent degenerative diseases model. *Neurochemical research*. 34, 679-687.
- Choi JH, Kim D (2000). Effects of age and dietary restriction on lifespan and oxidative stress of SAMP8 mice with learning and memory impairments. *The journal of nutrition, health & aging*. 4, 182-186.
- Chojnacki AK, Mak GK, Weiss S (2009). Identity crisis for adult periventricular neural stem cells: subventricular zone astrocytes, ependymal cells or both? *Nature reviews. Neuroscience*. 10, 153-163.
- Chuikov S, Levi BP, Smith ML, Morrison SJ (2010). Prdm16 promotes stem cell maintenance in multiple tissues, partly by regulating oxidative stress. *Nature cell biology*. 12, 999-1006.
- Chung S, Yao H, Caito S, Hwang JW, Arunachalam G, Rahman I (2010). Regulation of SIRT1 in cellular functions: role of polyphenols. *Archives of biochemistry and biophysics*. 501, 79-90.
- Del Valle J, Duran-Vilaregut J, Manich G, Casadesus G, Smith MA, Camins A, Pallas M, Pelegri C, Vilaplana J (2010). Early amyloid accumulation in the hippocampus of SAMP8 mice. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 19, 1303-1315.
- Delgado AC, Ferron SR, Vicente D, Porlan E, Perez-Villalba A, Trujillo CM, D'Ocon P, Farinas I (2014). Endothelial NT-3 delivered by vasculature and CSF promotes quiescence of subependymal neural stem cells through nitric oxide induction. *Neuron*. 83, 572-585.
- Diaz-Flores L, Jr., Madrid JF, Gutierrez R, Varela H, Valladares F, Alvarez-Arguelles H, Diaz-Flores L (2006). Adult stem and transit-amplifying cell location. *Histology and histopathology*. 21, 995-1027.
- Diaz-Moreno M, Hortiguuela R, Goncalves A, Garcia-Carpio I, Manich G, Garcia-Bermudez E, Moreno-Estelles M, Eguiluz C, Vilaplana J, Pelegri C, Vilar M, Mira H (2013). Abeta increases neural stem cell activity in senescence-accelerated SAMP8 mice. *Neurobiology of aging*. 34, 2623-2638.
- Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, et al. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92, 9363-9367.
- Doetsch F (2003). A niche for adult neural stem cells. *Current opinion in genetics & development*. 13, 543-550.
- Doetsch F, Alvarez-Buylla A (1996). Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93, 14895-14900.
- Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1999a). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*. 97, 703-716.
- Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1997). Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 17, 5046-5061.

- Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1999b). Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96, 11619-11624.
- Doetsch F, Petreanu L, Caille I, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2002a). EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron*. 36, 1021-1034.
- Doetsch F, Verdugo JM, Caille I, Alvarez-Buylla A, Chao MV, Casaccia-Bonnel P (2002b). Lack of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 results in selective increase of transit-amplifying cells for adult neurogenesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 22, 2255-2264.
- Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA, Jr., Butel JS, Bradley A (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*. 356, 215-221.
- Dziembowska M, Tham TN, Lau P, Vitry S, Lazarini F, Dubois-Dalcq M (2005). A role for CXCR4 signaling in survival and migration of neural and oligodendrocyte precursors. *Glia*. 50, 258-269.
- Edamatsu R, Mori A, Packer L (1995). The spin-trap N-tert-alpha-phenyl-butyl nitron prolongs the life span of the senescence accelerated mouse. *Biochemical and biophysical research communications*. 211, 847-849.
- Enwere E, Shingo T, Gregg C, Fujikawa H, Ohta S, Weiss S (2004). Aging results in reduced epidermal growth factor receptor signaling, diminished olfactory neurogenesis, and deficits in fine olfactory discrimination. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 24, 8354-8365.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature medicine*. 4, 1313-1317.
- Ernst A, Alkass K, Bernard S, Salehpour M, Perl S, Tisdale J, Possnert G, Druid H, Frisen J (2014). Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell*. 156, 1072-1083.
- Faigle R, Song H (2013). Signaling mechanisms regulating adult neural stem cells and neurogenesis. *Biochimica et biophysica acta*. 1830, 2435-2448.
- Falcao AM, Marques F, Novais A, Sousa N, Palha JA, Sousa JC (2012). The path from the choroid plexus to the subventricular zone: go with the flow! *Frontiers in cellular neuroscience*. 6, 34.
- Farr SA, Poon HF, Dogrukol-Ak D, Drake J, Banks WA, Eyerman E, Butterfield DA, Morley JE (2003). The antioxidants alpha-lipoic acid and N-acetylcysteine reverse memory impairment and brain oxidative stress in aged SAMP8 mice. *Journal of neurochemistry*. 84, 1173-1183.
- Ferron S, Mira H, Franco S, Cano-Jaimez M, Bellmunt E, Ramirez C, Farinas I, Blasco MA (2004). Telomere shortening and chromosomal instability abrogates proliferation of adult but not embryonic neural stem cells. *Development*. 131, 4059-4070.
- Ferron SR, Andreu-Agullo C, Mira H, Sanchez P, Marques-Torrejon MA, Farinas I (2007). A combined ex/in vivo assay to detect effects of exogenously added factors in neural stem cells. *Nature protocols*. 2, 849-859.
- Ferron SR, Marques-Torrejon MA, Mira H, Flores I, Taylor K, Blasco MA, Farinas I (2009). Telomere shortening in neural stem cells disrupts neuronal differentiation and neurogenesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 29, 14394-14407.
- Finkel T (2003). Oxidant signals and oxidative stress. *Current opinion in cell biology*. 15, 247-254.

- Flood JF, Morley JE (1998). Learning and memory in the SAMP8 mouse. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 22, 1-20.
- Flores I, Canela A, Vera E, Tejera A, Cotsarelis G, Blasco MA (2008). The longest telomeres: a general signature of adult stem cell compartments. *Genes & development*. 22, 654-667.
- Fontan-Lozano A, Romero-Granados R, Troncoso J, Munera A, Delgado-Garcia JM, Carrion AM (2008). Histone deacetylase inhibitors improve learning consolidation in young and in KA-induced-neurodegeneration and SAMP-8-mutant mice. *Molecular and cellular neurosciences*. 39, 193-201.
- Foti SB, Chou A, Moll AD, Roskams AJ (2013). HDAC inhibitors dysregulate neural stem cell activity in the postnatal mouse brain. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*. 31, 434-447.
- Fuchs E, Tumber T, Guasch G (2004). Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell*. 116, 769-778.
- Fujibayashi Y, Yamamoto S, Waki A, Konishi J, Yonekura Y (1998). Increased mitochondrial DNA deletion in the brain of SAMP8, a mouse model for spontaneous oxidative stress brain. *Neuroscience letters*. 254, 109-112.
- Fukunari A, Kato A, Sakai Y, Yoshimoto T, Ishiura S, Suzuki K, Nakajima T (1994). Colocalization of prolyl endopeptidase and amyloid beta-peptide in brains of senescence-accelerated mouse. *Neuroscience letters*. 176, 201-204.
- Fukushima N, Yokouchi K, Kawagishi K, Moriizumi T (2002). Differential neurogenesis and gliogenesis by local and migrating neural stem cells in the olfactory bulb. *Neuroscience research*. 44, 467-473.
- Fukutani Y, Cairns NJ, Rossor MN, Lantos PL (1996). Purkinje cell loss and astrocytosis in the cerebellum in familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neuroscience letters*. 214, 33-36.
- Gabriel M, Gregg B, Clancy A, Kittrell M, Dailey W (1986). Brain stem reticular formation neuronal correlates of stimulus significance and behavior during discriminative avoidance conditioning in rabbits. *Behavioral neuroscience*. 100, 171-184.
- Gage FH (2002). Neurogenesis in the adult brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 22, 612-613.
- Gage FH, Coates PW, Palmer TD, Kuhn HG, Fisher LJ, Suhonen JO, Peterson DA, Suhr ST, Ray J (1995). Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92, 11879-11883.
- Gan W, Nie B, Shi F, Xu XM, Qian JC, Takagi Y, Hayakawa H, Sekiguchi M, Cai JP (2012). Age-dependent increases in the oxidative damage of DNA, RNA, and their metabolites in normal and senescence-accelerated mice analyzed by LC-MS/MS: urinary 8-oxoguanosine as a novel biomarker of aging. *Free radical biology & medicine*. 52, 1700-1707.
- Gang B, Yue C, Han N, Xue H, Li B, Sun L, Li X, Zhao Q (2011). Limited hippocampal neurogenesis in SAMP8 mouse model of Alzheimer's disease. *Brain research*. 1389, 183-193.
- Garcia-Cao I, Garcia-Cao M, Martin-Caballero J, Criado LM, Klatt P, Flores JM, Weill JC, Blasco MA, Serrano M (2002). "Super p53" mice exhibit enhanced DNA damage response, are tumor resistant and age normally. *The EMBO journal*. 21, 6225-6235.
- Garcia-Verdugo JM, Ferron S, Flames N, Collado L, Desfilis E, Font E (2002). The proliferative ventricular zone in adult vertebrates: a comparative study using reptiles, birds, and mammals. *Brain research bulletin*. 57, 765-775.

- Gardella D, Hatton WJ, Rind HB, Rosen GD, von Bartheld CS (2003). Differential tissue shrinkage and compression in the z-axis: implications for optical disector counting in vibratome-, plastic- and cryosections. *Journal of neuroscience methods*. 124, 45-59.
- Garrido-Gil P, Valenzuela R, Villar-Cheda B, Lanciego JL, Labandeira-Garcia JL (2013). Expression of angiotensinogen and receptors for angiotensin and prorenin in the monkey and human substantia nigra: an intracellular renin-angiotensin system in the nigra. *Brain structure & function*. 218, 373-388.
- Geng Y, Eaton EN, Picon M, Roberts JM, Lundberg AS, Gifford A, Sardet C, Weinberg RA (1996). Regulation of cyclin E transcription by E2Fs and retinoblastoma protein. *Oncogene*. 12, 1173-1180.
- Getchell TV, Peng X, Green CP, Stromberg AJ, Chen KC, Mattson MP, Getchell ML (2004). In silico analysis of gene expression profiles in the olfactory mucosae of aging senescence-accelerated mice. *Journal of neuroscience research*. 77, 430-452.
- Gil-Perotin S, Marin-Husstege M, Li J, Soriano-Navarro M, Zindy F, Roussel MF, Garcia-Verdugo JM, Casaccia-Bonnel P (2006). Loss of p53 induces changes in the behavior of subventricular zone cells: implication for the genesis of glial tumors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 26, 1107-1116.
- Goldman SA, Nottebohm F (1983). Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 80, 2390-2394.
- Gomez-Gavero MV, Scott CE, Sesay AK, Matheu A, Booth S, Galichet C, Lovell-Badge R (2012). Betacellulin promotes cell proliferation in the neural stem cell niche and stimulates neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109, 1317-1322.
- Goss JR, Finch CE, Morgan DG (1991). Age-related changes in glial fibrillary acidic protein mRNA in the mouse brain. *Neurobiology of aging*. 12, 165-170.
- Gottlicher M, Minucci S, Zhu P, Kramer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Lo Coco F, Nervi C, Pelicci PG, Heinzel T (2001). Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *The EMBO journal*. 20, 6969-6978.
- Gotz M, Huttner WB (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 6, 777-788.
- Gould E (2007). How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nature reviews. Neuroscience*. 8, 481-488.
- Gould E, Reeves AJ, Graziano MS, Gross CG (1999). Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science*. 286, 548-552.
- Gratzner HG (1982). Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science*. 218, 474-475.
- Gray WP, Cheung A (2014). Nitric oxide regulation of adult neurogenesis. *Vitamins and hormones*. 96, 59-77.
- Gritti A, Galli R, Vescovi AL (2001). Cultures of stem cells of the central nervous system. In *Protocols for neural cell culture*: Springer, pp. 173-197.
- Halliwell B (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of neurochemistry*. 97, 1634-1658.
- Hamilton LK, Joppe SE, L MC, Fernandes KJ (2013). Aging and neurogenesis in the adult forebrain: what we have learned and where we should go from here. *The European journal of neuroscience*. 37, 1978-1986.

- Harman D (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of gerontology*. 11, 298-300.
- Harman D (1972). Free radical theory of aging: dietary implications. *The American journal of clinical nutrition*. 25, 839-843.
- Harris SL, Levine AJ (2005). The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*. 24, 2899-2908.
- Harrison DE, Archer JR (1987). Genetic differences in effects of food restriction on aging in mice. *The Journal of nutrition*. 117, 376-382.
- Hayamizu TF, Chan PT, Johanson CE (2001). FGF-2 immunoreactivity in adult rat ependyma and choroid plexus: responses to global forebrain ischemia and intraventricular FGF-2. *Neurological research*. 23, 353-358.
- Hayflick L (1965). The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Experimental cell research*. 37, 614-636.
- Hebb DO (1949). *The Organization of Behavior*. New York: Wiley & Sons.
- Hickson I, Zhao Y, Richardson CJ, Green SJ, Martin NM, Orr AI, Reaper PM, Jackson SP, Curtin NJ, Smith GC (2004). Identification and characterization of a novel and specific inhibitor of the ataxia-telangiectasia mutated kinase ATM. *Cancer research*. 64, 9152-9159.
- Hirota Y, Ohshima T, Kaneko N, Ikeda M, Iwasato T, Kulkarni AB, Mikoshiba K, Okano H, Sawamoto K (2007). Cyclin-dependent kinase 5 is required for control of neuroblast migration in the postnatal subventricular zone. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 27, 12829-12838.
- Hitoshi S, Alexson T, Tropepe V, Donoviel D, Elia AJ, Nye JS, Conlon RA, Mak TW, Bernstein A, van der Kooy D (2002). Notch pathway molecules are essential for the maintenance, but not the generation, of mammalian neural stem cells. *Genes & development*. 16, 846-858.
- Hoogwerf BJ (2010). Renin-angiotensin system blockade and cardiovascular and renal protection. *The American journal of cardiology*. 105, 30A-35A.
- Hosokawa M, Kasai R, Higuchi K, Takeshita S, Shimizu K, Hamamoto H, Honma A, Irino M, Toda K, Matsumura A, et al. (1984). Grading score system: a method for evaluation of the degree of senescence in senescence accelerated mouse (SAM). *Mechanisms of ageing and development*. 26, 91-102.
- Hu ML (2011). Dietary polyphenols as antioxidants and anticancer agents: more questions than answers. *Chang Gung medical journal*. 34, 449-460.
- Insinga A, Cicalese A, Pelicci PG (2014). DNA damage response in adult stem cells. *Blood cells, molecules & diseases*. 52, 147-151.
- Ito K (2013). Frontiers of model animals for neuroscience: two prosperous aging model animals for promoting neuroscience research. *Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science*. 62, 275-280.
- Ito K, Hirao A, Arai F, Matsuoka S, Takubo K, Hamaguchi I, Nomiyama K, Hosokawa K, Sakurada K, Nakagata N, Ikeda Y, Mak TW, Suda T (2004). Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*. 431, 997-1002.
- Jablonska B, Aguirre A, Vandenbosch R, Belachew S, Berthet C, Kaldis P, Gallo V (2007). Cdk2 is critical for proliferation and self-renewal of neural progenitor cells in the adult subventricular zone. *The Journal of cell biology*. 179, 1231-1245.
- Janzen V, Forkert R, Fleming HE, Saito Y, Waring MT, Dombkowski DM, Cheng T, DePinho RA, Sharpless NE, Scadden DT (2006). Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a. *Nature*. 443, 421-426.

- Jaskelioff M, Muller FL, Paik JH, Thomas E, Jiang S, Adams AC, Sahin E, Kost-Alimova M, Protopopov A, Cadinanos J, Horner JW, Maratos-Flier E, Depinho RA (2011). Telomerase reactivation reverses tissue degeneration in aged telomerase-deficient mice. *Nature*. 469, 102-106.
- Jawerka M, Colak D, Dimou L, Spiller C, Lagger S, Montgomery RL, Olson EN, Wurst W, Gottlicher M, Gotz M (2010). The specific role of histone deacetylase 2 in adult neurogenesis. *Neuron glia biology*. 6, 93-107.
- Jeong BH, Jin JK, Choi EK, Lee EY, Meeker HC, Kozak CA, Carp RI, Kim YS (2002). Analysis of the expression of endogenous murine leukemia viruses in the brains of senescence-accelerated mice (SAMP8) and the relationship between expression and brain histopathology. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 61, 1001-1012.
- Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA (2002). Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99, 11946-11950.
- Jori FP, Galderisi U, Piegari E, Cipollaro M, Cascino A, Peluso G, Cotrufo R, Giordano A, Melone MA (2003). EGF-responsive rat neural stem cells: molecular follow-up of neuron and astrocyte differentiation in vitro. *Journal of cellular physiology*. 195, 220-233.
- Kamijo T, Zindy F, Roussel MF, Quelle DE, Downing JR, Ashmun RA, Grosveld G, Sherr CJ (1997). Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell*. 91, 649-659.
- Kaplan MS, Hinds JW (1977). Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science*. 197, 1092-1094.
- Karasawa N, Nagatsu I, Sakai K, Nagatsu T, Watanabe K, Onozuka M (1997). Immunocytochemical study of catecholaminergic neurons in the senescence-accelerated mouse (SAM-P8) brain. *Journal of neural transmission*. 104, 1267-1275.
- Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW (1991). Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer research*. 51, 6304-6311.
- Kelsch W, Mosley CP, Lin CW, Lois C (2007). Distinct mammalian precursors are committed to generate neurons with defined dendritic projection patterns. *PLoS biology*. 5, e300.
- Kempermann G (2013). Neuroscience. What the bomb said about the brain. *Science*. 340, 1180-1181.
- Kim J, Wong PK (2009). Oxidative stress is linked to ERK1/2-p16 signaling-mediated growth defect in ATM-deficient astrocytes. *The Journal of biological chemistry*. 284, 14396-14404.
- Kippin TE, Martens DJ, van der Kooy D (2005). p21 loss compromises the relative quiescence of forebrain stem cell proliferation leading to exhaustion of their proliferation capacity. *Genes & development*. 19, 756-767.
- Kirkwood TB (2005). Understanding the odd science of aging. *Cell*. 120, 437-447.
- Kitabayashi T, Tomimoto H, Akiyama H (1993). Reactive microglia in the brain of senescence-accelerated mouse (SAM): an histochemical study. *The Canadian journal of neurological sciences. Le journal canadien des sciences neurologiques*. 20, 146.
- Kitado H, Higuchi K, Takeda T (1994). Molecular genetic characterization of the senescence-accelerated mouse (SAM) strains. *Journal of gerontology*. 49, B247-254.
- Kitamura Y, Zhao XH, Ohnuki T, Takei M, Nomura Y (1992). Age-related changes in transmitter glutamate and NMDA receptor/channels in the brain of senescence-accelerated mouse. *Neuroscience letters*. 137, 169-172.

- Koga H, Kaushik S, Cuervo AM (2011). Protein homeostasis and aging: The importance of exquisite quality control. *Ageing research reviews*. 10, 205-215.
- Kokoeva MV, Yin H, Flier JS (2005). Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science*. 310, 679-683.
- Kokovay E, Goderie S, Wang Y, Lotz S, Lin G, Sun Y, Roysam B, Shen Q, Temple S (2010). Adult SVZ lineage cells home to and leave the vascular niche via differential responses to SDF1/CXCR4 signaling. *Cell stem cell*. 7, 163-173.
- Komarov PG, Komarova EA, Kondratov RV, Christov-Tselkov K, Coon JS, Chernov MV, Gudkov AV (1999). A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. *Science*. 285, 1733-1737.
- Komarova EA, Gudkov AV (2000). Suppression of p53: a new approach to overcome side effects of antitumor therapy. *Biochemistry. Biokhimiia*. 65, 41-48.
- Kowalczyk A, Filipkowski RK, Rylski M, Wilczynski GM, Konopacki FA, Jaworski J, Ciemerych MA, Sicinski P, Kaczmarek L (2004). The critical role of cyclin D2 in adult neurogenesis. *The Journal of cell biology*. 167, 209-213.
- Krause KH (2007). Aging: a revisited theory based on free radicals generated by NOX family NADPH oxidases. *Experimental gerontology*. 42, 256-262.
- Kriegstein A, Alvarez-Buylla A (2009). The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annual review of neuroscience*. 32, 149-184.
- Krishnamurthy J, Ramsey MR, Ligon KL, Torrice C, Koh A, Bonner-Weir S, Sharpless NE (2006). p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential. *Nature*. 443, 453-457.
- Krishnamurthy J, Torrice C, Ramsey MR, Kovalev GI, Al-Regaiey K, Su L, Sharpless NE (2004). Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *The Journal of clinical investigation*. 114, 1299-1307.
- Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 16, 2027-2033.
- Kumar R, Singh VP, Baker KM (2007). The intracellular renin-angiotensin system: a new paradigm. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 18, 208-214.
- Kumar VB, Farr SA, Flood JF, Kamlesh V, Franko M, Banks WA, Morley JE (2000). Site-directed antisense oligonucleotide decreases the expression of amyloid precursor protein and reverses deficits in learning and memory in aged SAMP8 mice. *Peptides*. 21, 1769-1775.
- Kuo H, Ingram DK, Walker LC, Tian M, Hengemihle JM, Jucker M (1996). Similarities in the age-related hippocampal deposition of periodic acid-schiff-positive granules in the senescence-accelerated mouse P8 and C57BL/6 mouse strains. *Neuroscience*. 74, 733-740.
- Kurokawa T, Asada S, Nishitani S, Hazeki O (2001). Age-related changes in manganese superoxide dismutase activity in the cerebral cortex of senescence-accelerated prone and resistant mouse. *Neuroscience letters*. 298, 135-138.
- Labandeira-Garcia JL, Garrido-Gil P, Rodriguez-Pallares J, Valenzuela R, Borrajo A, Rodriguez-Perez AI (2014). Brain renin-angiotensin system and dopaminergic cell vulnerability. *Frontiers in neuroanatomy*. 8, 67.
- Laplante M, Sabatini DM (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*. 149, 274-293.

- Le Belle JE, Orozco NM, Paucar AA, Saxe JP, Mottahedeh J, Pyle AD, Wu H, Kornblum HI (2011). Proliferative neural stem cells have high endogenous ROS levels that regulate self-renewal and neurogenesis in a PI3K/Akt-dependant manner. *Cell stem cell*. 8, 59-71.
- Le Breton M, Cormier P, Belle R, Mulner-Lorillon O, Morales J (2005). Translational control during mitosis. *Biochimie*. 87, 805-811.
- Lee HW, Blasco MA, Gottlieb GJ, Horner JW, 2nd, Greider CW, DePinho RA (1998). Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. *Nature*. 392, 569-574.
- Lee J, Duan W, Long JM, Ingram DK, Mattson MP (2000). Dietary restriction increases the number of newly generated neural cells, and induces BDNF expression, in the dentate gyrus of rats. *Journal of molecular neuroscience : MN*. 15, 99-108.
- Lehtinen MK, Zappaterra MW, Chen X, Yang YJ, Hill AD, Lun M, Maynard T, Gonzalez D, Kim S, Ye P, D'Ercole AJ, Wong ET, LaMantia AS, Walsh CA (2011). The cerebrospinal fluid provides a proliferative niche for neural progenitor cells. *Neuron*. 69, 893-905.
- Lenington JB, Pope S, Goodheart AE, Drozdowicz L, Daniels SB, Salamone JD, Conover JC (2011). Midbrain dopamine neurons associated with reward processing innervate the neurogenic subventricular zone. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 31, 13078-13087.
- Leventhal C, Rafii S, Rafii D, Shahar A, Goldman SA (1999). Endothelial trophic support of neuronal production and recruitment from the adult mammalian subependyma. *Molecular and cellular neurosciences*. 13, 450-464.
- Li L, Xie T (2005). Stem cell niche: structure and function. *Annual review of cell and developmental biology*. 21, 605-631.
- Lie DC, Colamarino SA, Song HJ, Desire L, Mira H, Consiglio A, Lein ES, Jessberger S, Lansford H, Dearie AR, Gage FH (2005). Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature*. 437, 1370-1375.
- Lim DA, Alvarez-Buylla A (2014). Adult neural stem cells stake their ground. *Trends in neurosciences*. 37, 563-571.
- Lim DA, Huang YC, Swigut T, Mirick AL, Garcia-Verdugo JM, Wysocka J, Ernst P, Alvarez-Buylla A (2009). Chromatin remodelling factor Mll1 is essential for neurogenesis from postnatal neural stem cells. *Nature*. 458, 529-533.
- Lim DA, Tramontin AD, Trevejo JM, Herrera DG, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2000). Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron*. 28, 713-726.
- Liu J, Cao L, Chen J, Song S, Lee IH, Quijano C, Liu H, Keyvanfar K, Chen H, Cao LY, Ahn BH, Kumar NG, Rovira I, Xu XL, van Lohuizen M, Motoyama N, Deng CX, Finkel T (2009). Bmi1 regulates mitochondrial function and the DNA damage response pathway. *Nature*. 459, 387-392.
- Liu J, Mori A (1993). Age-associated changes in superoxide dismutase activity, thiobarbituric acid reactivity and reduced glutathione level in the brain and liver in senescence accelerated mice (SAM): a comparison with ddY mice. *Mechanisms of ageing and development*. 71, 23-30.
- Liu L, Rando TA (2011). Manifestations and mechanisms of stem cell aging. *The Journal of cell biology*. 193, 257-266.
- Lobato RD (2008). Historical vignette of Cajal's work "Degeneration and regeneration of the nervous system" with a reflection of the author. *Neurocirugia*. 19, 456-468.
- Lohr G, Waller H (1974). *Methods in enzymatic analysis*. : New York, Academic Press.

- Louis SA, Rietze RL, Deleyrolle L, Wagey RE, Thomas TE, Eaves AC, Reynolds BA (2008). Enumeration of neural stem and progenitor cells in the neural colony-forming cell assay. *Stem cells*. 26, 988-996.
- Lowe SW, Cepero E, Evan G (2004). Intrinsic tumour suppression. *Nature*. 432, 307-315.
- Lunyak VV, Burgess R, Prefontaine GG, Nelson C, Sze SH, Chenoweth J, Schwartz P, Pevzner PA, Glass C, Mandel G, Rosenfeld MG (2002). Corepressor-dependent silencing of chromosomal regions encoding neuronal genes. *Science*. 298, 1747-1752.
- Luo J, Daniels SB, Lenington JB, Notti RQ, Conover JC (2006). The aging neurogenic subventricular zone. *Aging cell*. 5, 139-152.
- Luo J, Su F, Chen D, Shiloh A, Gu W (2000). Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis. *Nature*. 408, 377-381.
- Luskin MB (1993). Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron*. 11, 173-189.
- Lledo PM, Alonso M, Grubb MS (2006). Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nature reviews. Neuroscience*. 7, 179-193.
- Lledo PM, Merkle FT, Alvarez-Buylla A (2008). Origin and function of olfactory bulb interneuron diversity. *Trends in neurosciences*. 31, 392-400.
- Lledo PM, Saghatelian A (2005). Integrating new neurons into the adult olfactory bulb: joining the network, life-death decisions, and the effects of sensory experience. *Trends in neurosciences*. 28, 248-254.
- Ma J, Yu Z, Qu W, Tang Y, Zhan Y, Ding C, Wang W, Xie M (2010). Proliferation and differentiation of neural stem cells are selectively regulated by knockout of cyclin D1. *Journal of molecular neuroscience : MN*. 42, 35-43.
- Ma Q (2013). Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 53, 401-426.
- Mair W, McLeod CJ, Wang L, Jones DL (2010). Dietary restriction enhances germline stem cell maintenance. *Aging cell*. 9, 916-918.
- Marques-Torres MA, Porlan E, Banito A, Gomez-Ibarlucea E, Lopez-Contreras AJ, Fernandez-Capetillo O, Vidal A, Gil J, Torres J, Farinas I (2013). Cyclin-dependent kinase inhibitor p21 controls adult neural stem cell expansion by regulating Sox2 gene expression. *Cell stem cell*. 12, 88-100.
- Martin GM (2005). Genetic modulation of senescent phenotypes in Homo sapiens. *Cell*. 120, 523-532.
- Maryanovich M, Oberkovitz G, Niv H, Vorobiyov L, Zaltsman Y, Brenner O, Lapidot T, Jung S, Gross A (2012). The ATM-BID pathway regulates quiescence and survival of haematopoietic stem cells. *Nature cell biology*. 14, 535-541.
- Maslov AY, Barone TA, Plunkett RJ, Pruitt SC (2004). Neural stem cell detection, characterization, and age-related changes in the subventricular zone of mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 24, 1726-1733.
- Mason HA, Ito S, Corfas G (2001). Extracellular signals that regulate the tangential migration of olfactory bulb neuronal precursors: inducers, inhibitors, and repellents. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 21, 7654-7663.
- Massey V, Williams CH, Jr. (1965). On the reaction mechanism of yeast glutathione reductase. *The Journal of biological chemistry*. 240, 4470-4480.

- Matarredona ER, Murillo-Carretero M, Moreno-Lopez B, Estrada C (2005). Role of nitric oxide in subventricular zone neurogenesis. *Brain research. Brain research reviews.* 49, 355-366.
- Matheu A, Klatt P, Serrano M (2005). Regulation of the INK4a/ARF locus by histone deacetylase inhibitors. *The Journal of biological chemistry.* 280, 42433-42441.
- Matheu A, Maraver A, Klatt P, Flores I, Garcia-Cao I, Borrás C, Flores JM, Vina J, Blasco MA, Serrano M (2007). Delayed ageing through damage protection by the Arf/p53 pathway. *Nature.* 448, 375-379.
- Matheu A, Pantoja C, Efeyan A, Criado LM, Martín-Caballero J, Flores JM, Klatt P, Serrano M (2004). Increased gene dosage of Ink4a/Arf results in cancer resistance and normal aging. *Genes & development.* 18, 2736-2746.
- Matsukawa N, Tooyama I, Kimura H, Yamamoto T, Tsugu Y, Oomura Y, Ojika K (1999). Increased expression of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide-related components and their messenger RNAs in the hippocampus of aged senescence-accelerated mice. *Neuroscience.* 88, 79-92.
- Mattison JA, Roth GS, Beasley TM, Tilmont EM, Handy AM, Herbert RL, Longo DL, Allison DB, Young JE, Bryant M, Barnard D, Ward WF, Qi W, Ingram DK, de Cabo R (2012). Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study. *Nature.* 489, 318-321.
- Meletis K, Wirta V, Hede SM, Nister M, Lundeberg J, Frisen J (2006). p53 suppresses the self-renewal of adult neural stem cells. *Development.* 133, 363-369.
- Menn B, Garcia-Verdugo JM, Yaschine C, Gonzalez-Perez O, Rowitch D, Alvarez-Buylla A (2006). Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 26, 7907-7918.
- Merkle FT, Alvarez-Buylla A (2006). Neural stem cells in mammalian development. *Current opinion in cell biology.* 18, 704-709.
- Merkle FT, Mirzadeh Z, Alvarez-Buylla A (2007). Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. *Science.* 317, 381-384.
- Merson TD, Dixon MP, Collin C, Rietze RL, Bartlett PF, Thomas T, Voss AK (2006). The transcriptional coactivator Querkopf controls adult neurogenesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 26, 11359-11370.
- Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical science.* 84, 407-412.
- Min LJ, Mogi M, Iwai M, Horiuchi M (2009). Signaling mechanisms of angiotensin II in regulating vascular senescence. *Ageing research reviews.* 8, 113-121.
- Ming GL, Song H (2011). Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron.* 70, 687-702.
- Mirzadeh Z, Doetsch F, Sawamoto K, Wichterle H, Alvarez-Buylla A (2010). The subventricular zone en-face: wholemount staining and ependymal flow. *Journal of visualized experiments : JoVE.*
- Mirzadeh Z, Merkle FT, Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2008). Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell stem cell.* 3, 265-278.
- Miyamoto M (1997). Characteristics of age-related behavioral changes in senescence-accelerated mouse SAMP8 and SAMP10. *Experimental gerontology.* 32, 139-148.

- Miyamoto M, Kiyota Y, Yamazaki N, Nagaoka A, Matsuo T, Nagawa Y, Takeda T (1986). Age-related changes in learning and memory in the senescence-accelerated mouse (SAM). *Physiology & behavior*. 38, 399-406.
- Mobley AS, Rodriguez-Gil DJ, Imamura F, Greer CA (2014). Aging in the olfactory system. *Trends in neurosciences*. 37, 77-84.
- Molofsky AV, He S, Bydon M, Morrison SJ, Pardal R (2005). Bmi-1 promotes neural stem cell self-renewal and neural development but not mouse growth and survival by repressing the p16Ink4a and p19Arf senescence pathways. *Genes & development*. 19, 1432-1437.
- Molofsky AV, Pardal R, Iwashita T, Park IK, Clarke MF, Morrison SJ (2003). Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature*. 425, 962-967.
- Molofsky AV, Slutsky SG, Joseph NM, He S, Pardal R, Krishnamurthy J, Sharpless NE, Morrison SJ (2006). Increasing p16INK4a expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature*. 443, 448-452.
- Mori M, Higuchi K (2004). Genetic monitoring system for SAM strains utilizing DNA markers. *International Congress Series*. 1260, 187-190.
- Morley JE, Armbrrecht HJ, Farr SA, Kumar VB (2012). The senescence accelerated mouse (SAMP8) as a model for oxidative stress and Alzheimer's disease. *Biochimica et biophysica acta*. 1822, 650-656.
- Morley JE, Kumar VB, Bernardo AE, Farr SA, Uezu K, Tumosa N, Flood JF (2000). Beta-amyloid precursor polypeptide in SAMP8 mice affects learning and memory. *Peptides*. 21, 1761-1767.
- Morris RG (1999). D.O. Hebb: The Organization of Behavior, Wiley: New York; 1949. *Brain research bulletin*. 50, 437.
- Morrison SJ, Kimble J (2006). Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature*. 441, 1068-1074.
- Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ (1997). Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell*. 88, 287-298.
- Morrison SJ, Spradling AC (2008). Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell*. 132, 598-611.
- Morshead CM, Benveniste P, Iscove NN, van der Kooy D (2002). Hematopoietic competence is a rare property of neural stem cells that may depend on genetic and epigenetic alterations. *Nature medicine*. 8, 268-273.
- Morshead CM, Reynolds BA, Craig CG, McBurney MW, Staines WA, Morassutti D, Weiss S, van der Kooy D (1994). Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron*. 13, 1071-1082.
- Morshead CM, van der Kooy D (1992). Postmitotic death is the fate of constitutively proliferating cells in the subependymal layer of the adult mouse brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 12, 249-256.
- Murphy PJ, Galigniana MD, Morishima Y, Harrell JM, Kwok RP, Ljungman M, Pratt WB (2004). Pifithrin-alpha inhibits p53 signaling after interaction of the tumor suppressor protein with hsp90 and its nuclear translocation. *The Journal of biological chemistry*. 279, 30195-30201.
- Nagao M, Campbell K, Burns K, Kuan CY, Trumpp A, Nakafuku M (2008). Coordinated control of self-renewal and differentiation of neural stem cells by Myc and the p19ARF-p53 pathway. *The Journal of cell biology*. 183, 1243-1257.

- Nagasaki S, Ozono S, Kawamura S, Watanabe K, Yamamoto T, Onozuka M (1995). Regional differences in the age-related reduction of the cerebellar cortical thickness in senescence-accelerated mice. *Medical science research*. 23, 425-427.
- Nayernia Z, Jaquet V, Krause KH (2014). New insights on NOX enzymes in the central nervous system. *Antioxidants & redox signaling*. 20, 2815-2837.
- Nguyen L, Hippenmeyer S (2014). *Cellular and Molecular Control of Neuronal Migration*: Springer.
- Nichols NR, Day JR, Laping NJ, Johnson SA, Finch CE (1993). GFAP mRNA increases with age in rat and human brain. *Neurobiology of aging*. 14, 421-429.
- Nie B, Gan W, Shi F, Hu GX, Chen LG, Hayakawa H, Sekiguchi M, Cai JP (2013). Age-dependent accumulation of 8-oxoguanine in the DNA and RNA in various rat tissues. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2013, 303181.
- Nishikawa T, Takahashi JA, Fujibayashi Y, Fujisawa H, Zhu B, Nishimura Y, Ohnishi K, Higuchi K, Hashimoto N, Hosokawa M (1998). An early stage mechanism of the age-associated mitochondrial dysfunction in the brain of SAMP8 mice; an age-associated neurodegeneration animal model. *Neuroscience letters*. 254, 69-72.
- Nishino J, Kim I, Chada K, Morrison SJ (2008). Hmga2 promotes neural stem cell self-renewal in young but not old mice by reducing p16Ink4a and p19Arf Expression. *Cell*. 135, 227-239.
- Nomura Y, Kitamura Y, Ohnuki T, Arima T, Yamanaka Y, Sasaki K, Oomura Y (1997). Alterations in acetylcholine, NMDA, benzodiazepine receptors and protein kinase C in the brain of the senescence-accelerated mouse: an animal model useful for studies on cognitive enhancers. *Behavioural brain research*. 83, 51-55.
- Nomura Y, Okuma Y (1999). Age-related defects in lifespan and learning ability in SAMP8 mice. *Neurobiology of aging*. 20, 111-115.
- Nomura Y, Wang BX, Qi SB, Namba T, Kaneko S (1989). Biochemical changes related to aging in the senescence-accelerated mouse. *Experimental gerontology*. 24, 49-55.
- Nomura Y, Yamanaka Y, Kitamura Y, Arima T, Ohnuki T, Oomura Y, Sasaki K, Nagashima K, Ihara Y (1996). Senescence-accelerated mouse. Neurochemical studies on aging. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 786, 410-418.
- Nottebohm F (1985). Neuronal replacement in adulthood. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 457, 143-161.
- Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA (2001). Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem cells*. 19, 193-204.
- Oh J, Lee YD, Wagers AJ (2014). Stem cell aging: mechanisms, regulators and therapeutic opportunities. *Nature medicine*. 20, 870-880.
- Ojika K, Kojima S, Ueki Y, Fukushima N, Hayashi K, Yamamoto M (1992). Purification and structural analysis of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide. *Brain research*. 572, 164-171.
- Okatani Y, Wakatsuki A, Reiter RJ, Miyahara Y (2002). Melatonin reduces oxidative damage of neural lipids and proteins in senescence-accelerated mouse. *Neurobiology of aging*. 23, 639-644.
- Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*. 448, 313-317.
- Owen JB, Butterfield DA (2010). Measurement of oxidized/reduced glutathione ratio. *Methods in molecular biology*. 648, 269-277.

- Paik JH, Ding Z, Narurkar R, Ramkissoon S, Muller F, Kamoun WS, Chae SS, Zheng H, Ying H, Mahoney J, Hiller D, Jiang S, Protopopov A, Wong WH, Chin L, Ligon KL, DePinho RA (2009). FoxOs cooperatively regulate diverse pathways governing neural stem cell homeostasis. *Cell stem cell*. 5, 540-553.
- Palmer TD, Takahashi J, Gage FH (1997). The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Molecular and cellular neurosciences*. 8, 389-404.
- Pallas M, Verdaguer E, Tajés M, Gutierrez-Cuesta J, Camins A (2008). Modulation of sirtuins: new targets for antiageing. *Recent patents on CNS drug discovery*. 3, 61-69.
- Papiahgari S, Kleeberger SR, Cho HY, Kalvakolanu DV, Reddy SP (2004). NADPH oxidase and ERK signaling regulates hyperoxia-induced Nrf2-ARE transcriptional response in pulmonary epithelial cells. *The Journal of biological chemistry*. 279, 42302-42312.
- Parras CM, Galli R, Britz O, Soares S, Galichet C, Battiste J, Johnson JE, Nakafuku M, Vescovi A, Guillemot F (2004). Mash1 specifies neurons and oligodendrocytes in the postnatal brain. *The EMBO journal*. 23, 4495-4505.
- Pascual Garvi JM, Gonzalez Llanos F, Prieto Arribas R, Cerdan S, Roda JM (2004). [Blood brain barrier: development of a structure which supports the functional heterogeneity of the central nervous system]. *Revista de neurologia*. 38, 565-581.
- Pastrana E, Cheng LC, Doetsch F (2009). Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106, 6387-6392.
- Pastrana E, Silva-Vargas V, Doetsch F (2011). Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells. *Cell stem cell*. 8, 486-498.
- Paton JA, Nottebohm FN (1984). Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits. *Science*. 225, 1046-1048.
- Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V, Kirchgessner CU, Gellert M, Bonner WM (2000). A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Current biology : CB*. 10, 886-895.
- Paxinos G, Franklin KB (2004). *The mouse brain in stereotaxic coordinates*: Gulf Professional Publishing.
- Pisoschi AM, Pop A (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European journal of medicinal chemistry*. 97, 55-74.
- Poljsak B, Suput D, Milisav I (2013). Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2013, 956792.
- Porlan E, Morante-Redolat JM, Marques-Torrejon MA, Andreu-Agullo C, Carneiro C, Gomez-Ibarlucea E, Soto A, Vidal A, Ferron SR, Farinas I (2013). Transcriptional repression of Bmp2 by p21(Waf1/Cip1) links quiescence to neural stem cell maintenance. *Nature neuroscience*. 16, 1567-1575.
- Porquet D, Casadesus G, Bayod S, Vicente A, Canudas AM, Vilaplana J, Pelegri C, Sanfeliu C, Camins A, Pallas M, del Valle J (2013). Dietary resveratrol prevents Alzheimer's markers and increases life span in SAMP8. *Age*. 35, 1851-1865.
- Porquet D, Grinan-Ferre C, Ferrer I, Camins A, Sanfeliu C, Del Valle J, Pallas M (2014). Neuroprotective role of trans-resveratrol in a murine model of familial Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 42, 1209-1220.
- Potten CS, Loeffler M (1990). Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development*. 110, 1001-1020.

- Quinones-Hinojosa A, Sanai N, Soriano-Navarro M, Gonzalez-Perez O, Mirzadeh Z, Gil-Perotin S, Romero-Rodriguez R, Berger MS, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2006). Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells. *The Journal of comparative neurology*. 494, 415-434.
- Rajawat YS, Hilioti Z, Bossis I (2009). Aging: central role for autophagy and the lysosomal degradative system. *Ageing research reviews*. 8, 199-213.
- Rakic P (1974). Neurons in rhesus monkey visual cortex: systematic relation between time of origin and eventual disposition. *Science*. 183, 425-427.
- Rakic P (1985). Limits of neurogenesis in primates. *Science*. 227, 1054-1056.
- Ramirez-Castillejo C, Sanchez-Sanchez F, Andreu-Agullo C, Ferron SR, Aroca-Aguilar JD, Sanchez P, Mira H, Escribano J, Farinas I (2006). Pigment epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal. *Nature neuroscience*. 9, 331-339.
- Ramón y Cajal S (1928). Degeneration and Regeneration of the Nervous System. *Haffner Publishing Company*. 2, 750.
- Rando TA (2006). Stem cells, ageing and the quest for immortality. *Nature*. 441, 1080-1086.
- Raponi E, Agenes F, Delphin C, Assard N, Baudier J, Legraverend C, Deloulme JC (2007). S100B expression defines a state in which GFAP-expressing cells lose their neural stem cell potential and acquire a more mature developmental stage. *Glia*. 55, 165-177.
- Rebrin I, Sohal RS (2004). Comparison of thiol redox state of mitochondria and homogenates of various tissues between two strains of mice with different longevity. *Experimental gerontology*. 39, 1513-1519.
- Renault VM, Rafalski VA, Morgan AA, Salih DA, Brett JO, Webb AE, Villeda SA, Thekkat PU, Guillerey C, Denko NC, Palmer TD, Butte AJ, Brunet A (2009). FoxO3 regulates neural stem cell homeostasis. *Cell stem cell*. 5, 527-539.
- Rey NL, Sacquet J, Veyrac A, Jourdan F, Didier A (2012). Behavioral and cellular markers of olfactory aging and their response to enrichment. *Neurobiology of aging*. 33, 626 e629-626 e623.
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 414, 105-111.
- Reynolds BA, Weiss S (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*. 255, 1707-1710.
- Rezza A, Sennett R, Rendl M (2014). Adult stem cell niches: cellular and molecular components. *Current topics in developmental biology*. 107, 333-372.
- Ribaric S (2012). Diet and aging. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2012, 741468.
- Rice-Evans C, Miller NJ (1994). Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods in enzymology*. 234, 279-293.
- Richards LJ, Kilpatrick TJ, Bartlett PF (1992). De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89, 8591-8595.
- Ristow M, Schmeisser S (2011). Extending life span by increasing oxidative stress. *Free radical biology & medicine*. 51, 327-336.
- Rossi DJ, Jamieson CH, Weissman IL (2008). Stems cells and the pathways to aging and cancer. *Cell*. 132, 681-696.

- Ruckh JM, Zhao JW, Shadrach JL, van Wijngaarden P, Rao TN, Wagers AJ, Franklin RJ (2012). Rejuvenation of regeneration in the aging central nervous system. *Cell stem cell*. 10, 96-103.
- Rudolph KL, Chang S, Lee HW, Blasco M, Gottlieb GJ, Greider C, DePinho RA (1999). Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. *Cell*. 96, 701-712.
- Russ JC, Dehoff RT (1986). *Practical Stereology*. New York: Plenum Press.
- Sahin E, Colla S, Liesa M, Moslehi J, Muller FL, Guo M, Cooper M, Kotton D, Fabian AJ, Walkey C, Maser RS, Tonon G, Foerster F, Xiong R, Wang YA, Shukla SA, Jaskelioff M, Martin ES, Heffernan TP, Protopopov A, Ivanova E, Mahoney JE, Kost-Alimova M, Perry SR, Bronson R, Liao R, Mulligan R, Shirihai OS, Chin L, DePinho RA (2011). Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise. *Nature*. 470, 359-365.
- Sahin E, Depinho RA (2010). Linking functional decline of telomeres, mitochondria and stem cells during ageing. *Nature*. 464, 520-528.
- Salama R, Sadaie M, Hoare M, Narita M (2014). Cellular senescence and its effector programs. *Genes & development*. 28, 99-114.
- Sanai N, Nguyen T, Ihrie RA, Mirzadeh Z, Tsai HH, Wong M, Gupta N, Berger MS, Huang E, Garcia-Verdugo JM, Rowitch DH, Alvarez-Buylla A (2011). Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy. *Nature*. 478, 382-386.
- Sanai N, Tramontin AD, Quinones-Hinojosa A, Barbaro NM, Gupta N, Kunwar S, Lawton MT, McDermott MW, Parsa AT, Manuel-Garcia Verdugo J, Berger MS, Alvarez-Buylla A (2004). Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature*. 427, 740-744.
- Sasaki T, Unno K, Tahara S, Shimada A, Chiba Y, Hoshino M, Kaneko T (2008). Age-related increase of superoxide generation in the brains of mammals and birds. *Ageing cell*. 7, 459-469.
- Sato E, Oda N, Ozaki N, Hashimoto S, Kurokawa T, Ishibashi S (1996). Early and transient increase in oxidative stress in the cerebral cortex of senescence-accelerated mouse. *Mechanisms of ageing and development*. 86, 105-114.
- Satyanarayana A, Kaldis P (2009). Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene*. 28, 2925-2939.
- Sawamoto K, Wichterle H, Gonzalez-Perez O, Cholfin JA, Yamada M, Spassky N, Murcia NS, Garcia-Verdugo JM, Marin O, Rubenstein JL, Tessier-Lavigne M, Okano H, Alvarez-Buylla A (2006). New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science*. 311, 629-632.
- Scadden DT (2006). The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*. 441, 1075-1079.
- Scapagnini G, Vasto S, Abraham NG, Caruso C, Zella D, Fabio G (2011). Modulation of Nrf2/ARE pathway by food polyphenols: a nutritional neuroprotective strategy for cognitive and neurodegenerative disorders. *Molecular neurobiology*. 44, 192-201.
- Schofield R (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood cells*. 4, 7-25.
- Seress L (2007). Comparative anatomy of the hippocampal dentate gyrus in adult and developing rodents, non-human primates and humans. *Progress in brain research*. 163, 23-41.
- Seress L, Abraham H, Tornoczky T, Kosztolanyi G (2001). Cell formation in the human hippocampal formation from mid-gestation to the late postnatal period. *Neuroscience*. 105, 831-843.

- Seri B, Garcia-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A (2001). Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 21, 7153-7160.
- Seri B, Herrera DG, Gritti A, Ferron S, Collado L, Vescovi A, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2006). Composition and organization of the SCZ: a large germinal layer containing neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cerebral cortex*. 16 Suppl 1, i103-111.
- Shadlen MN, Britten KH, Newsome WT, Movshon JA (1996). A computational analysis of the relationship between neuronal and behavioral responses to visual motion. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 16, 1486-1510.
- Sharpless NE, DePinho RA (2007). How stem cells age and why this makes us grow old. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 8, 703-713.
- Shen Q, Goderie SK, Jin L, Karanth N, Sun Y, Abramova N, Vincent P, Pumiglia K, Temple S (2004). Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science*. 304, 1338-1340.
- Sherr CJ (2006). Divorcing ARF and p53: an unsettled case. *Nature reviews. Cancer*. 6, 663-673.
- Shi Y, Chichung Lie D, Taupin P, Nakashima K, Ray J, Yu RT, Gage FH, Evans RM (2004). Expression and function of orphan nuclear receptor TLX in adult neural stem cells. *Nature*. 427, 78-83.
- Shook BA, Manz DH, Peters JJ, Kang S, Conover JC (2012). Spatiotemporal changes to the subventricular zone stem cell pool through aging. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 32, 6947-6956.
- Signer RA, Morrison SJ (2013). Mechanisms that regulate stem cell aging and life span. *Cell stem cell*. 12, 152-165.
- Silva-Vargas V, Crouch EE, Doetsch F (2013). Adult neural stem cells and their niche: a dynamic duo during homeostasis, regeneration, and aging. *Current opinion in neurobiology*. 23, 935-942.
- Simboeck E, Ribeiro JD, Teichmann S, Di Croce L (2011). Epigenetics and senescence: learning from the INK4-ARF locus. *Biochemical pharmacology*. 82, 1361-1370.
- Simpson KL, Fisher TM, Waterhouse BD, Lin RC (1998). Projection patterns from the raphe nuclear complex to the ependymal wall of the ventricular system in the rat. *The Journal of comparative neurology*. 399, 61-72.
- Sjoberck M, Englund E (2001). Alzheimer's disease and the cerebellum: a morphologic study on neuronal and glial changes. *Dementia and geriatric cognitive disorders*. 12, 211-218.
- Smith A (2006). A glossary for stem-cell biology. *Nature*. 441, 1060-1060.
- Sohal RS, Brunk UT (1992). Mitochondrial production of pro-oxidants and cellular senescence. *Mutation research*. 275, 295-304.
- Sohal RS, Forster MJ (2014). Caloric restriction and the aging process: a critique. *Free radical biology & medicine*. 73, 366-382.
- Sohal RS, Weindruch R (1996). Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science*. 273, 59-63.
- Sorce S, Krause KH (2009). NOX enzymes in the central nervous system: from signaling to disease. *Antioxidants & redox signaling*. 11, 2481-2504.
- Sousa-Victor P, Gutarra S, Garcia-Prat L, Rodriguez-Ubueva J, Ortet L, Ruiz-Bonilla V, Jordi M, Ballestar E, Gonzalez S, Serrano AL, Perdiguero E, Munoz-Canoves P (2014). Geriatric muscle stem cells switch reversible quiescence into senescence. *Nature*. 506, 316-321.

- Spalding KL, Bergmann O, Alkass K, Bernard S, Salehpour M, Huttner HB, Bostrom E, Westerlund I, Vial C, Buchholz BA, Possnert G, Mash DC, Druid H, Frisen J (2013). Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell*. 153, 1219-1227.
- Spalding KL, Bhardwaj RD, Buchholz BA, Druid H, Frisen J (2005). Retrospective birth dating of cells in humans. *Cell*. 122, 133-143.
- Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T (2001). Stem cells find their niche. *Nature*. 414, 98-104.
- Stadtman ER (2006). Protein oxidation and aging. *Free radical research*. 40, 1250-1258.
- Stoll EA, Habibi BA, Mikheev AM, Lasiene J, Massey SC, Swanson KR, Rostomily RC, Horner PJ (2011). Increased re-entry into cell cycle mitigates age-related neurogenic decline in the murine subventricular zone. *Stem cells*. 29, 2005-2017.
- Strong R, Reddy V, Morley JE (2003). Cholinergic deficits in the septal-hippocampal pathway of the SAM-P/8 senescence accelerated mouse. *Brain research*. 966, 150-156.
- Sugiyama H, Akiyama H, Akiguchi I, Kameyama M, Takeda T (1987). [Loss of dendritic spines in hippocampal CA1 pyramidal cells in senescence accelerated mouse (SAM)--a quantitative Golgi study]. *Rinsho shinkeigaku = Clinical neurology*. 27, 841-845.
- Sun G, Yu RT, Evans RM, Shi Y (2007). Orphan nuclear receptor TLX recruits histone deacetylases to repress transcription and regulate neural stem cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104, 15282-15287.
- Sun J, Sun J, Ming GL, Song H (2011). Epigenetic regulation of neurogenesis in the adult mammalian brain. *The European journal of neuroscience*. 33, 1087-1093.
- Sureda FX, Gutierrez-Cuesta J, Romeu M, Mulero M, Canudas AM, Camins A, Mallol J, Pallas M (2006). Changes in oxidative stress parameters and neurodegeneration markers in the brain of the senescence-accelerated mice SAMP-8. *Experimental gerontology*. 41, 360-367.
- Taft RJ, Pang KC, Mercer TR, Dinger M, Mattick JS (2010). Non-coding RNAs: regulators of disease. *The Journal of pathology*. 220, 126-139.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 131, 861-872.
- Takahashi K, Yamanaka S (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 126, 663-676.
- Takeda T (1999). Senescence-accelerated mouse (SAM): a biogerontological resource in aging research. *Neurobiology of aging*. 20, 105-110.
- Takeda T (2009). Senescence-accelerated mouse (SAM) with special references to neurodegeneration models, SAMP8 and SAMP10 mice. *Neurochemical research*. 34, 639-659.
- Takeda T, Hosokawa M, Higuchi K (1994). Senescence-accelerated mouse (SAM): a novel murine model of aging. The SAM model of senescence. In *International congress series* (eds). Amsterdam ; New York: Excerpta Medica.
- Takeda T, Hosokawa M, Takeshita S, Irino M, Higuchi K, Matsushita T, Tomita Y, Yasuhira K, Hamamoto H, Shimizu K, Ishii M, Yamamuro T (1981). A new murine model of accelerated senescence. *Mechanisms of ageing and development*. 17, 183-194.
- Takeda T, Matsushita T, Kurozumi M, Takemura K, Higuchi K, Hosokawa M (1997). Pathobiology of the senescence-accelerated mouse (SAM). *Experimental gerontology*. 32, 117-127.

- Takemura M, Nakamura S, Akiguchi I, Ueno M, Oka N, Ishikawa S, Shimada A, Kimura J, Takeda T (1993). Beta/A4 proteinlike immunoreactive granular structures in the brain of senescence-accelerated mouse. *The American journal of pathology*. 142, 1887-1897.
- Tanaka J, Okuma Y, Tomobe K, Nomura Y (2005). The age-related degeneration of oligodendrocytes in the hippocampus of the senescence-accelerated mouse (SAM) P8: a quantitative immunohistochemical study. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 28, 615-618.
- Tanisawa K, Mikami E, Fuku N, Honda Y, Honda S, Ohsawa I, Ito M, Endo S, Ihara K, Ohno K, Kishimoto Y, Ishigami A, Maruyama N, Sawabe M, Iseki H, Okazaki Y, Hasegawa-Ishii S, Takei S, Shimada A, Hosokawa M, Mori M, Higuchi K, Takeda T, Higuchi M, Tanaka M (2013). Exome sequencing of senescence-accelerated mice (SAM) reveals deleterious mutations in degenerative disease-causing genes. *BMC genomics*. 14, 248.
- Tatar M, Bartke A, Antebi A (2003). The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science*. 299, 1346-1351.
- Taupin P, Ray J, Fischer WH, Suhr ST, Hakansson K, Grubb A, Gage FH (2000). FGF-2-responsive neural stem cell proliferation requires CCg, a novel autocrine/paracrine cofactor. *Neuron*. 28, 385-397.
- Tavazoie M, Van der Veken L, Silva-Vargas V, Louissaint M, Colonna L, Zaidi B, Garcia-Verdugo JM, Doetsch F (2008). A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell stem cell*. 3, 279-288.
- Thompson MM, Oyama TT, Kelly FJ, Kennefick TM, Anderson S (2000). Activity and responsiveness of the renin-angiotensin system in the aging rat. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*. 279, R1787-1794.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 282, 1145-1147.
- Tomobe K, Isobe M, Okuma Y, Kitamura K, Oketani Y, Nomura Y (2005). Genetic analysis of learning and memory deficits in senescence-accelerated mouse (SAM). *Physiology & behavior*. 84, 505-510.
- Tomobe K, Nomura Y (2009). Neurochemistry, neuropathology, and heredity in SAMP8: a mouse model of senescence. *Neurochemical research*. 34, 660-669.
- Tomobe K, Okuma Y, Nomura Y (2007). Impairment of CREB phosphorylation in the hippocampal CA1 region of the senescence-accelerated mouse (SAM) P8. *Brain research*. 1141, 214-217.
- Tomobe K, Shinozuka T, Kuroiwa M, Nomura Y (2012). Age-related changes of Nrf2 and phosphorylated GSK-3beta in a mouse model of accelerated aging (SAMP8). *Archives of gerontology and geriatrics*. 54, e1-7.
- Topchuy E, Panzhinskiy E, Griffin WS, Barger SW, Das M, Zawada WM (2013). Nox4-generated superoxide drives angiotensin II-induced neural stem cell proliferation. *Developmental neuroscience*. 35, 293-305.
- Torregrosa-Munumer R, Gomez A, Vara E, Kireev R, Barja G, Tresguerres JA, Gredilla R (2015). Reduced apurinic/aprimidinic endonuclease 1 activity and increased DNA damage in mitochondria are related to enhanced apoptosis and inflammation in the brain of senescence-accelerated P8 mice (SAMP8). *Biogerontology*.
- Touyz RM (2004). Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells -- implications in cardiovascular disease. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al.]*. 37, 1263-1273.

- Tropepe V, Craig CG, Morshead CM, van der Kooy D (1997). Transforming growth factor-alpha null and senescent mice show decreased neural progenitor cell proliferation in the forebrain subependyma. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 17, 7850-7859.
- Valk-Lingbeek ME, Bruggeman SW, van Lohuizen M (2004). Stem cells and cancer; the polycomb connection. *Cell*. 118, 409-418.
- van Deursen JM (2014). The role of senescent cells in ageing. *Nature*. 509, 439-446.
- van Lookeren Campagne M, Gill R (1998). Tumor-suppressor p53 is expressed in proliferating and newly formed neurons of the embryonic and postnatal rat brain: comparison with expression of the cell cycle regulators p21Waf1/Cip1, p27Kip1, p57Kip2, p16Ink4a, cyclin G1, and the proto-oncogene Bax. *The Journal of comparative neurology*. 397, 181-198.
- van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH (2002). Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*. 415, 1030-1034.
- Villeda SA, Luo J, Mosher KI, Zou B, Britschgi M, Bieri G, Stan TM, Fainberg N, Ding Z, Eggel A, Lucin KM, Czirr E, Park JS, Couillard-Despres S, Aigner L, Li G, Peskind ER, Kaye JA, Quinn JF, Galasko DR, Xie XS, Rando TA, Wyss-Coray T (2011). The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature*. 477, 90-94.
- Vunjak-Novakovic G, Scadden DT (2011). Biomimetic platforms for human stem cell research. *Cell stem cell*. 8, 252-261.
- Walker MR, Patel KK, Stappenbeck TS (2009). The stem cell niche. *The Journal of pathology*. 217, 169-180.
- Walsh C, Cepko CL (1988). Clonally related cortical cells show several migration patterns. *Science*. 241, 1342-1345.
- Walton NM, Shin R, Tajinda K, Heusner CL, Kogan JH, Miyake S, Chen Q, Tamura K, Matsumoto M (2012). Adult neurogenesis transiently generates oxidative stress. *PloS one*. 7, e35264.
- Wang C, Liu F, Liu YY, Zhao CH, You Y, Wang L, Zhang J, Wei B, Ma T, Zhang Q, Zhang Y, Chen R, Song H, Yang Z (2011). Identification and characterization of neuroblasts in the subventricular zone and rostral migratory stream of the adult human brain. *Cell research*. 21, 1534-1550.
- Wang C, You Y, Qi D, Zhou X, Wang L, Wei S, Zhang Z, Huang W, Liu Z, Liu F, Ma L, Yang Z (2014). Human and monkey striatal interneurons are derived from the medial ganglionic eminence but not from the adult subventricular zone. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 34, 10906-10923.
- Weissman IL (2000a). Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*. 100, 157-168.
- Weissman IL (2000b). Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science*. 287, 1442-1446.
- Whitman MC, Greer CA (2007). Adult-generated neurons exhibit diverse developmental fates. *Developmental neurobiology*. 67, 1079-1093.
- Wichterle H, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1997). Direct evidence for homotypic, glia-independent neuronal migration. *Neuron*. 18, 779-791.
- Willis-Martinez D, Richards HW, Timchenko NA, Medrano EE (2010). Role of HDAC1 in senescence, aging, and cancer. *Experimental gerontology*. 45, 279-285.
- Wong KK, Maser RS, Bachoo RM, Menon J, Carrasco DR, Gu Y, Alt FW, DePinho RA (2003). Telomere dysfunction and Atm deficiency compromises organ homeostasis and accelerates ageing. *Nature*. 421, 643-648.

- Wong SH, Knight JA, Hopfer SM, Zaharia O, Leach CN, Jr., Sunderman FW, Jr. (1987). Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clinical chemistry*. 33, 214-220.
- Xu J, Shi C, Li Q, Wu J, Forster EL, Yew DT (2007). Mitochondrial dysfunction in platelets and hippocampi of senescence-accelerated mice. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 39, 195-202.
- Yagi H, Irino M, Matsushita T, Katoh S, Umezawa M, Tsuboyama T, Hosokawa M, Akiguchi I, Tokunaga R, Takeda T (1989). Spontaneous spongy degeneration of the brain stem in SAM-P/8 mice, a newly developed memory-deficient strain. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 48, 577-590.
- Yagi H, Katoh S, Akiguchi I, Takeda T (1988). Age-related deterioration of ability of acquisition in memory and learning in senescence accelerated mouse: SAM-P/8 as an animal model of disturbances in recent memory. *Brain research*. 474, 86-93.
- Yamada K, Matsukawa N, Yuasa H, Hattori M, Nakazawa H, Borlongan CV, Ojika K (2007). Differential expression of HCNP-related antigens in hippocampus in senescence-accelerated mice. *Brain research*. 1158, 169-175.
- Yang S, Qiao H, Wen L, Zhou W, Zhang Y (2005). D-serine enhances impaired long-term potentiation in CA1 subfield of hippocampal slices from aged senescence-accelerated mouse prone/8. *Neuroscience letters*. 379, 7-12.
- Yang Z (2008). Postnatal subventricular zone progenitors give rise not only to granular and periglomerular interneurons but also to interneurons in the external plexiform layer of the rat olfactory bulb. *The Journal of comparative neurology*. 506, 347-358.
- Yasui F, Ishibashi M, Matsugo S, Kojo S, Oomura Y, Sasaki K (2003). Brain lipid hydroperoxide level increases in senescence-accelerated mice at an early age. *Neuroscience letters*. 350, 66-68.
- Yeo H, Lyssiotis CA, Zhang Y, Ying H, Asara JM, Cantley LC, Paik JH (2013). FoxO3 coordinates metabolic pathways to maintain redox balance in neural stem cells. *The EMBO journal*. 32, 2589-2602.
- Young KM, Fogarty M, Kessar N, Richardson WD (2007). Subventricular zone stem cells are heterogeneous with respect to their embryonic origins and neurogenic fates in the adult olfactory bulb. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 27, 8286-8296.
- Young SZ, Taylor MM, Bordey A (2011). Neurotransmitters couple brain activity to subventricular zone neurogenesis. *The European journal of neuroscience*. 33, 1123-1132.
- Zalba G, San Jose G, Moreno MU, Fortuno MA, Fortuno A, Beaumont FJ, Diez J (2001). Oxidative stress in arterial hypertension: role of NAD(P)H oxidase. *Hypertension*. 38, 1395-1399.
- Zhang J, Goodlett DR, Peskind ER, Quinn JF, Zhou Y, Wang Q, Pan C, Yi E, Eng J, Aebbersold RH, Montine TJ (2005). Quantitative proteomic analysis of age-related changes in human cerebrospinal fluid. *Neurobiology of aging*. 26, 207-227.
- Zhang J, Ju Z (2010). Telomere, DNA damage, and oxidative stress in stem cell aging. *Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews*. 90, 297-307.
- Zhao C, Deng W, Gage FH (2008). Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell*. 132, 645-660.

- Zhao M, Momma S, Delfani K, Carlen M, Cassidy RM, Johansson CB, Brismar H, Shupliakov O, Frisen J, Janson AM (2003). Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100, 7925-7930.
- Zhao XH, Kitamura Y, Nomura Y (1992). Age-related changes in NMDA-induced [3H]acetylcholine release from brain slices of senescence-accelerated mouse. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*. 10, 121-129.
- Zhao XH, Nomura Y (1990). Age-related changes in uptake and release on L-[3H]noradrenaline in brain slices of senescence accelerated mouse. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*. 8, 267-272.
- Zhu Y, Lee CC, Lam WP, Wai MS, Rudd JA, Yew DT (2007). Cell death in the Purkinje cells of the cerebellum of senescence accelerated mouse (SAMP(8)). *Biogerontology*. 8, 537-544.
- Zindy F, Quelle DE, Roussel MF, Sherr CJ (1997). Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging. *Oncogene*. 15, 203-211.
- Zupanc GK (2001). A comparative approach towards the understanding of adult neurogenesis. *Brain, behavior and evolution*. 58, 246-249.

ANEXO

Regulation of the p19^{Arf}/p53 pathway by histone acetylation underlies neural stem cell behavior in senescence-prone SAMP8 mice

Raúl Soriano-Cantón,^{1,2} Ana Perez-Villalba,^{1,2} José Manuel Morante-Redolat,^{1,2} María Ángeles Marqués-Torrejón,^{1,2} Mercé Pallás,^{1,3} Francisco Pérez-Sánchez^{1,2} and Isabel Fariñas^{1,2}

¹Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Universidad de Valencia, Burjassot 46100, Spain

²Departamento de Biología Celular, Universidad de Valencia, Burjassot 46100, Spain

³Departamento de Farmacología y Química Terapéutica, Instituto de Biomedicina de la Universidad de Barcelona, Barcelona 08028, Spain

Summary

Brain aging is associated with increased neurodegeneration and reduced neurogenesis. B1/neural stem cells (B1-NSCs) of the mouse subependymal zone (SEZ) support the ongoing production of olfactory bulb interneurons, but their neurogenic potential is progressively reduced as mice age. Although age-related changes in B1-NSCs may result from increased expression of tumor suppressor proteins, accumulation of DNA damage, metabolic alterations, and microenvironmental or systemic changes, the ultimate causes remain unclear. Senescence-accelerated-prone mice (SAMP8) relative to senescence-accelerated-resistant mice (SAMR1) exhibit signs of hastened senescence and can be used as a model for the study of aging. We have found that the B1-NSC compartment is transiently expanded in young SAMP8 relative to SAMR1 mice, resulting in disturbed cytoarchitecture of the SEZ, B1-NSC hyperproliferation, and higher yields of primary neurospheres. These unusual features are, however, accompanied by premature loss of B1-NSCs. Moreover, SAMP8 neurospheres lack self-renewal and enter p53-dependent senescence after only two passages. Interestingly, *in vitro* senescence of SAMP8 cells could be prevented by inhibition of histone acetyltransferases and mimicked in SAMR1 cells by inhibition of histone deacetylases (HDAC). Our data indicate that expression of the tumor suppressor p19, but not of p16, is increased in SAMP8 neurospheres, as well as in SAMR1 neurospheres upon HDAC inhibition, and suggest that the SAMP8 phenotype may, at least in part, be due to changes in chromatin status. Interestingly, acute HDAC inhibition *in vivo* resulted in changes in the SEZ of SAMR1 mice that resembled those found in young SAMP8 mice.

Key words: aging; adult neurogenesis; histone deacetylases; histone acetyltransferases; stem cell niche; SAMP8 mice.

Correspondence

Isabel Fariñas and Francisco Pérez-Sánchez, Departamento de Biología Celular, Universidad de Valencia, Doctor Moliner 50, E-46100 Burjassot, Spain.

Tel: +34-96354-3784 (office) 3246 (laboratory); fax: +34-96354-3404;

e-mails: isabel.farinass@uv.es (I.F.) and pacops@uv.es (F.P.-S.)

Accepted for publication 13 January 2015

Introduction

The 'stem cell aging' hypothesis suggests that loss of potential in somatic stem cell pools underlies the progressive decline in tissue renewal observed in multiple systems during aging (van Deursen, 2014). Lifelong generation of olfactory bulb (OB) interneurons takes place in the subependymal zone (SEZ; also known as ventricular/subventricular zone or V/SVZ) of the lateral ventricle wall and is supported by a population of neural stem cells (NSCs, also known as B1 cells). B1 cells divide slowly and can hence retain exogenously administered traceable nucleosides for several weeks, generating transit-amplifying progenitor (TAP) cells, which in turn give rise to neuroblasts that migrate anteriorly to the OB where they differentiate into granular and periglomerular interneurons (Silva-Vargas *et al.*, 2013).

Reduced levels of olfactory neurogenesis that are primarily due to decreased numbers of stem-like cells are found in elderly animals (Maslov *et al.*, 2004; Luo *et al.*, 2006; Molofsky *et al.*, 2006; Shook *et al.*, 2012). Many NSCs remaining in the aged SEZ are primarily quiescent; they are less likely to undergo cellular division or neuronal differentiation than NSCs in the young adult brain, with lower chances of survival (Ahlenius *et al.*, 2009). Those cells remaining in cell cycle, however, are more proliferative than young NSCs, due to increased rates of cell cycle reentry, which can lead to transient expansion of cells before terminal differentiation (Stoll *et al.*, 2011). NSC permanent cell cycle exit results in their differentiation into S100β⁺ astrocyte-like cells (Raponi *et al.*, 2007; Porlan *et al.*, 2013), although it has been reported that a fraction of B1 cells may also integrate within the aged ependymal cell layer and acquire ependymal features (Luo *et al.*, 2008).

Although age-related declines in stem cell function have been associated with altered expression of some growth factors (Tropépe *et al.*, 1997; Enwere *et al.*, 2004), tumor suppressors p16^{Ink4a} and p19^{Arf} (hereafter p16 and p19; encoded by the *Cdkn2a* or *Ink4a/Arf* locus by the use of two different promoters and alternative reading frames) also appear to play a role (Molofsky *et al.*, 2006; Ahlenius *et al.*, 2009; Mikheev *et al.*, 2009). Cell cycle inhibitor p16 binds to and inhibits CDK4 and CDK6 to retain the growth-suppressive activity of Rb family proteins, whereas p19 binds to and antagonizes the activity of the ubiquitin ligase Mdm2, thereby stabilizing and activating p53 (Gil & Peters, 2006). Histone acetylation controlled by the antagonistic actions of histone acetyltransferases (HATs) and histone deacetylases (HDACs) which either favor or repress transcription (Willis-Martinez *et al.*, 2010) has been involved in the regulation of this locus in other cells (Matheu *et al.*, 2005; Simboeck *et al.*, 2011).

Effects of aging in neural dysfunction have been analyzed in several strains of senescence-accelerated mice (SAM) originated from inbreeding and selection for the early appearance of aging features (Takeda, 2009). Relative to control senescence-resistant SAMR1 mice, young senescence-prone SAMP8 mice exhibit neuronal loss, gliosis, and progressive cognitive deficits (Takeda, 2009; Tomobe & Nomura, 2009). Proliferation in the SEZ and in the dentate gyrus subgranular zone (SGZ), another neurogenic niche, is increased in 2-month-old (2-m) but reduced in 10-m SAMP8 mice (Gang *et al.*, 2011; Díaz-Moreno



et al., 2013). Moreover, although more neuroblasts are produced in young SAMP8 mice, they are lost at a higher rate due to apoptosis (Gang *et al.*, 2011). These results have been interpreted as a reaction to the neuronal dysfunction/degeneration observed in these animals, but they also raise the possibility that the senescent-prone genetic background has a direct impact on intrinsic properties of NSCs. We have found that increased loss of NSCs in 10-m SAMP8 mice is preceded by their transient overactivation. Despite the higher proliferative activity of young SAMP8 NSCs, they expressed increased levels of p19 and p53 and entered senescence prematurely when cultured *in vitro*, a deficit that could be restored by abrogation of p53 activity and, interestingly, by inhibition of the activity of HATs. Moreover, we could induce a senescent phenotype, together with increases in p19 and p53, by *in vitro* treatment with inhibitors of HDACs, whereas *in vivo* treatment resulted in morphological changes of the SEZ resembling those of young SAMP8 mice.

Results

Increased proliferation and abnormal positioning of B1 NSCs in SAMP8 mice precedes their exhaustion

A previous analysis had indicated a transient increase in BrdU incorporation in the SEZ of young SAMP8 mice (Díaz-Moreno *et al.*, 2013). To focus specifically on B1 NSCs, we analyzed whole-mount preparations of the lateral ventricle wall by confocal microscopy. The ventricle wall surface is characterized by the repetition of 'pinwheel' units, arrangements in which the unciliated apical thin processes of one or several GFAP⁺ B1 NSCs are encircled by multiciliated ependymal cells (Mirzadeh *et al.*, 2008). Immunostaining for GFAP, β -catenin to delineate cell membranes, and either γ -tubulin as a marker of ciliary basal bodies or acetylated α -tubulin to label ciliary cytoskeleton, revealed a normal pinwheel organization in SAMR1 mice (Fig. 1A,B). Compared to other mouse strains, however, 2-m SAMR1 mice had fewer B1 apical surfaces (543 ± 34 per mm² of dorsal SEZ, $n = 3$, vs. $1,732 \pm 53$ in C57BL/6 mice, $n = 3$) and pinwheels (289 ± 30 per mm², $n = 4$, vs. 952 ± 45 in C57BL/6 mice, $n = 3$) (for CD1 mice, see also Mirzadeh *et al.*, 2008; Shook *et al.*, 2012), suggesting potential effects of the SAM genetic background in B1-cell population size.

Although all pinwheel components could also be recognized in 2-m SAMP8 mice, the organization was altered (Fig. 1A,B). The number of pinwheels with thin B1-cell processes at their core was remarkably low (59 ± 7 per mm², $n = 3$). In contrast, we could observe misshapen pinwheels formed by ependymocytes surrounding various GFAP⁺ cells with large apical areas in the ependymal layer plane, a feature that was also evident in analyses with scanning electron microscopy (Fig. 1A–C). Because cells in these groups were unciliated and GFAP⁺ but did not express the calcium-binding protein S100 β , a marker of ependymal cells and terminally differentiated astrocytes (Raponi *et al.*, 2007) (Fig. 1D), we named them 'B1-like interposed cells' (BICs). BICs were very frequent in SAMP8 mice compared to the normally looking B1 cells; in addition, most BICs were arranged in clusters of 3–8 cells (Fig. 1E, F), suggesting that GFAP⁺ cells were increased.

We also detected high numbers of cuboidal GFAP⁺ cells with multiple cilia integrated within the ependymal layer (Fig. 1G). This type of cell reportedly increases during aging but is rarely found in young C57BL/6 and CD1 mice (Luo *et al.*, 2008; Capilla-Gonzalez *et al.*, 2014). Indeed, we could find only 7 ± 3 cells per mm² ($n = 3$) in the dorsal SEZ of 2-m C57BL/6 mice, but 49 ± 21 cells per mm² at 12-m and 52 ± 6 at 24-m ($n = 2$ each). Young SAMR1 and SAMP8 mice had similarly elevated

proportions of these cells (Fig. 1G), suggesting that this feature could have been selected through inbreeding.

Notably, the appearance of the SEZ of 10-m SAMP8 mice was similar to that found in SAMR1 controls at 10-m and in normal mouse strains at 12-m. Quantification of pinwheel density revealed a significant reduction in SAMR1 mice between 2 and 10 months, a period at which most age-related dysfunctions develop in SAM strains (Tomobe & Nomura, 2009), similar to reductions observed in C57BL/6 mice. In 10-m SAMP8 mice, however, pinwheels were significantly less frequent (Fig. 1H,I), indicating that BICs were a transient feature and that loss of NSCs is accelerated in SAMP8 mice.

In SEZ sections, we also observed an overall increase in GFAP, both in the number and intensity of positive cells, in 2-m SAMP8 mice (Fig. 2A,B). Moreover, we detected more GFAP⁺Sox2⁺ cells (relative to DAPI: 16.4 ± 1.1 , $n = 4$, vs. $10.2 \pm 0.3\%$, $n = 3$, in SAMR1 mice; $P < 0.01$) and more GFAP⁺ cells were also Sox2⁺ and nestin⁺ (23.1 ± 1.3 vs. $16.1 \pm 1.2\%$ in SAMR1 mice; $n = 3$, $P < 0.05$), but fewer were S100 β ⁺ ($3.3 \pm 0.9\%$ vs. 15.9 ± 2.8 in SAMR1 controls; $n = 4$, $P < 0.01$; Fig. 2B). These observations indicated the presence of higher numbers of B1 cells in young SAMP8 mice. Similar to observations in whole-mounts, some GFAP⁺ cells appeared to be integrated within the ependymal layer (Fig. 2C). Indeed, the net increase in GFAP⁺ cells found in 2-m SAMP8 mice was due to a selective increase in the number of GFAP⁺S100 β ⁻BICs, but not subependymal cells (Fig. 2C,D). At 10-m, we found similar numbers of GFAP⁺ cells in both genotypes, but significantly more of them were S100 β ⁺ in SAMP8 mice (Fig. 2B), again suggesting that BICs eventually differentiate into S100 β ⁺ astrocytes and that NSC senescent features develop faster in SAMP8 mice.

Increased NSC proliferation in young SAMP8 mice is counteracted by cell death of migrating neuroblasts

We next investigated whether more B1 cells in 2-m SAMP8 mice resulted in increased neurogenesis. We did not detect changes in the overall proliferation in the SEZ of SAMP8 mice injected with a single pulse of 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) one hour before sacrifice (relative to total cells: 8.6 ± 0.6 BrdU⁺ cells vs. $9.5 \pm 0.5\%$ in SAMR1 mice; $n = 4$). However, the proportions of GFAP⁺BrdU⁺ cells ($0.38 \pm 0.06\%$ vs. a SAMR1 value of $0.22 \pm 0.06\%$; $n = 4$, $P < 0.05$) and of GFAP⁺Sox2⁺Ki67⁺ cells (1.5 ± 0.1 vs. $1.0 \pm 0.2\%$; $n = 4$, $P < 0.01$) were significantly increased (Fig. 2E,F). The increase in Ki67⁺-proliferative GFAP⁺S100 β ⁻ cells in SAMP8 mice was also specifically due to an increase in Ki67⁺ cells among BICs (relative to total cells: 0.44 ± 0.09 in SAMP8 vs. $0.14 \pm 0.04\%$ in SAMR1 mice; $n = 4$, $P < 0.05$; Fig. 2G,H), suggesting a correlation between abnormal positioning and proliferation.

Activated B1 cells can incorporate and retain BrdU for several weeks, and we could detect more GFAP⁺ BrdU label retaining cells (BrdU-LRC) in SAMP8 than in SAMR1 mice which had been repeatedly injected with the nucleoside (7 doses in a 12-h period) one month before euthanasia (relative to DAPI: 0.30 ± 0.05 vs. $0.16 \pm 0.01\%$, respectively; $n = 3$, $P < 0.05$). Again, GFAP⁺S100 β ⁻ LRCs in contact with the ventricle lumen were more frequent in SAMP8 mice (0.12 ± 0.01 vs. a SAMR1 value of 0.01 ± 0.01 ; $n = 3$, $P < 0.01$; Fig. 2I,J).

Activated B1 cells generate proliferating neuroblasts that can be detected with antibodies to doublecortin (DCX) in the rostral migratory stream (RMS). These neuroblasts differentiate in the OB into periglomerular and granular interneurons that can be identified as they permanently retain BrdU incorporated during the S-phase preceding their cell cycle exit. Despite a higher number of proliferative GFAP⁺ cells in the SEZ of SAMP8 mice, DCX⁺ neuroblasts in the RMS (relative to

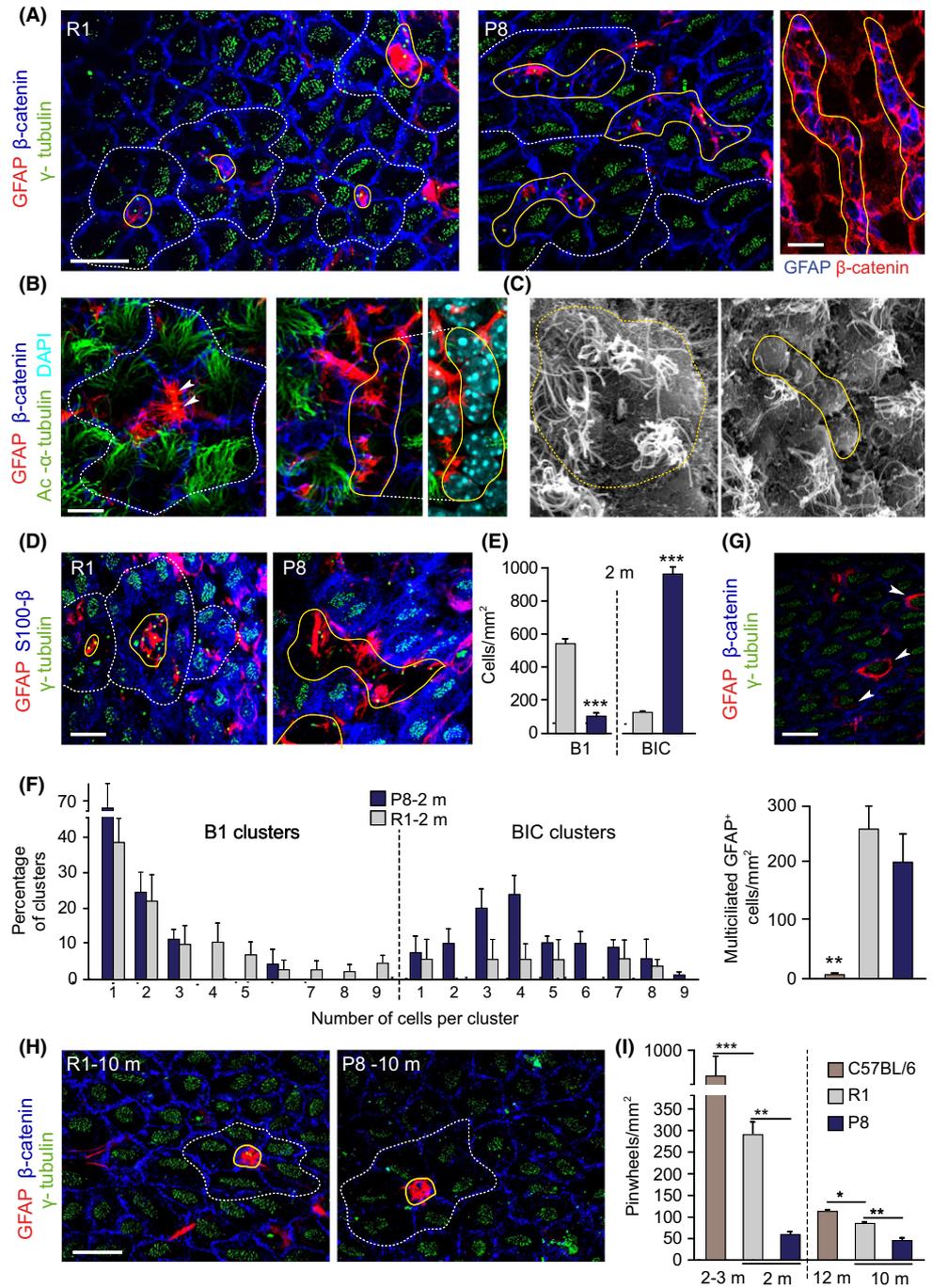


Fig. 1 The cytoarchitecture of the SEZ is altered in young P8 mice. (A) Whole-mounts from 2-m SAMR1 (R1) and SAMP8 (P8) mice immunostained for GFAP, β -catenin, and γ -tubulin. (B) GFAP, β -catenin, and acetylated α -tubulin. Arrowheads point to B1-cell primary cilium. (C) Whole-mounts in scanning electron microscopy. Note the presence of misshapen pinwheels with abutted GFAP cells in P8 mice. (D) GFAP, γ -tubulin, and S100 β in R1 (left) and P8 (right) whole-mounts. BICs are S100 β ⁻. (E) Number of B1 cells and BICs in SEZs at 2-m. (F) Distribution of GFAP⁺ B1 cells (left) or BICs (right) at 2-m. (G) GFAP, γ -tubulin, and S100 β in whole-mounts showing GFAP⁺ multiciliated cells (white arrowheads) in the plane of the ependyma (above) and quantification of these cells (below) in 2-m R1, P8, and C57BL/6 mice. (H) GFAP, γ -tubulin, and β -catenin in SEZ whole-mounts at 10-m. Only normally organized pinwheels are observed in both genotypes. (I) Pinwheel density in the dorsal SEZ of 2- and 10-m R1 and P8 mice, and in 3- and 12-m C57BL/6 mice. Pinwheels are delineated by dashed white lines, and B1 cells/BICs are delineated by solid yellow lines. Data are shown as mean \pm SEM of the indicated number of mice (n) from each strain (* P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001). Scale bars: (A, left) 10 μ m; (B) 5 μ m; in (A, right), (D), (G) and (H) 20 μ m.

DAPI-stained nuclei: 16.8 ± 2.6 vs. a SAMR1 value of $18.2 \pm 3.0\%$, $n = 3$) or BrdU⁺ newly generated neurons in the OB glomerular layer (relative to DAPI-stained nuclei: 0.28 ± 0.01 vs. a SAMR1 value of $0.27 \pm 0.10\%$, $n = 3$) were not increased.

To discern among the possible causes that could account for the lack of net effects in neurogenesis, alterations in migration, cell death, and/or proliferation of neuroblasts were investigated. Similar proportions of DCX⁺ cells were found at different anteroposterior levels of the RMS in SAMR1 and SAMP8 mice (data not shown), indicating that neuroblast migration is not affected. In addition, the proportion of DCX⁺ cells that incorporated BrdU injected as a one 1-h pulse was similar in SAMP8 and SAMR1 mice (20.6 ± 4.9 vs. $17.3 \pm 2.7\%$ respectively, $n = 4$). The

number of TUNEL⁺DCX⁺ neuroblasts in the RMS (3110 ± 626 vs. a SAMR1 value of 830 ± 496 cells/mm³, $n = 4$; $P < 0.05$) but not of TUNEL⁺GFAP⁺ cells in the SEZ (803 ± 464 vs. 839 ± 499 cells/mm³ in SAMR1 mice, $n = 4$) was increased in SAMP8 mice, indicating that limited survival of newborn cells counterbalances the increased cycling activity of B1 cells in young SAMP8 mice.

Increased cycling activity of young SAMP8 NSCs results in their premature senescence *in vitro*

In agreement with the presence of more proliferative GFAP⁺ cells, the SEZ of young SAMP8 mice yielded more primary neurospheres when

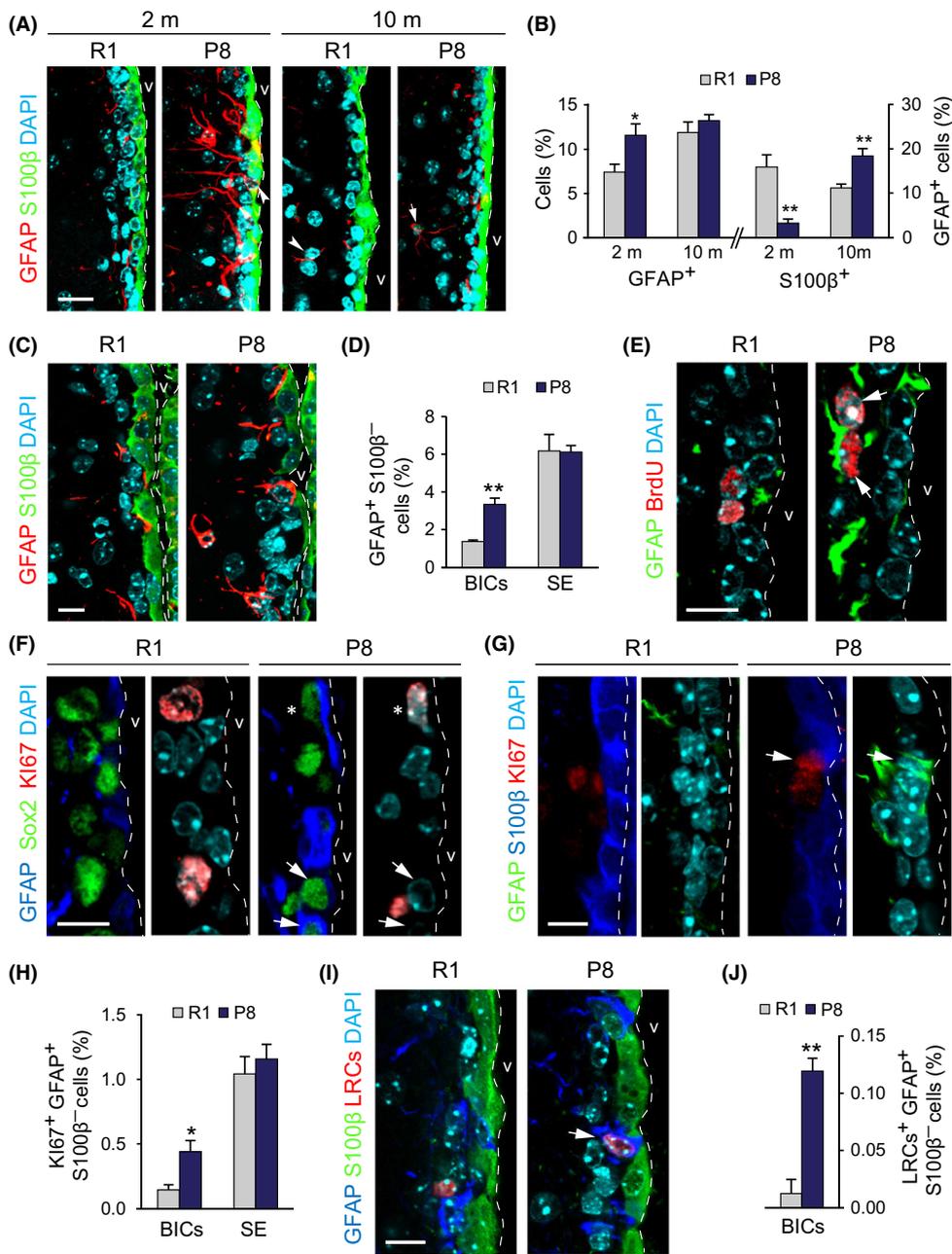


Fig. 2 Increased number of proliferating NSCs in the SEZ of young P8 mice. (A) GFAP and S100β detection in the SEZs of 2- and 10-m R1 and P8 mice. (B) Percentage of GFAP⁺/DAPI cells (left) and of GFAP⁺S100β⁺/GFAP⁺ cells (right) in the SEZs of 2- and 10-m R1 and P8 mice. (C) GFAP and S100β in the SEZ of 2-m R1 and P8 mice. (D) Percentage of GFAP⁺S100β⁻ BICs and subependymal (SE) cells relative to total cells. (E) GFAP and BrdU in the SEZ of 2-m R1 and P8 mice. (F) GFAP, Sox2, and Ki67 in the SEZ of 2-m R1 and P8 mice. (G) GFAP, S100β, and Ki67 in the SEZ of 2-m R1 and P8 mice. (H) Percentage of Ki67⁺GFAP⁺S100β⁻ BICs and subependymal (SE) cells relative to total cells. (I) GFAP, S100β, and LRCs in the SEZ of 2-m R1 and P8 mice. (J) Percentage of GFAP⁺S100β⁻ BrdU⁺ label retaining BICs. Data are shown as mean ± SEM of 3 independent mice from each strain (**P* < 0.05; ***P* < 0.01). Dashed white line indicates the lateral ventricle (v) limit. White arrowheads point at single-positive cells and white arrows at doubly positive cells. Asterisks indicate triple-positive cells. Scale bars: 10 μm.

individual cells were plated with EGF and FGF (Fig. 3A–C). Compared to SAMR1, SAMP8 primary neurospheres were also significantly larger in diameter (Fig. 3D), had reduced levels of TAP-associated transcription factor Mash1/Ascl mRNA (0.46 ± 0.01 relative to SAMR1 levels, $n = 3$; $P < 0.001$), and produced more secondary neurospheres when their cells were dissociated and reseeded (passage P1) at very low density (Fig. 3E, F). These data indicated that the SEZ of young SAMP8 harbors more NSCs capable of forming neurospheres at young ages and further suggested that BICs are B1 cells modified by the SAM genetic background.

SAMP8 secondary neurospheres were, however, smaller in size after 5 days (Fig. 3E,G), incorporated less BrdU (relative to DAPI: 14.7 ± 1.8 vs. $22.2 \pm 1.5\%$ in SAMR1 cultures; $n = 7$, $P < 0.01$), and could not be

subcultured for another passage. They did not appear to undergo apoptosis (percent caspase 3⁺ cells/DAPI: 1.51 ± 0.14 in SAMP8, $n = 4$, and 1.56 ± 0.24 in SAMR1 cultures, $n = 3$), but adopted a senescent phenotype, characterized by cell enlargement, adhesion to the plastic culture plate, cessation of proliferation, and positivity in the histoenzymatic reaction of the senescence-associated β-galactosidase (SA β-gal) (Fig. 3H,J). Some P2 neurospheres could still be observed, but were noticeably smaller and SA β-gal⁺, and had increased levels of S100β mRNA (Fig. 3H–K). The strikingly premature senescence of SAMP8 cells was never seen in C57BL/6 or CD1 cells subcultured for many months (Ferron *et al.*, 2007). Our data indicated that, although SAMP8 SEZs contain elevated numbers of neurosphere-forming cells, their self-renewal is remarkably reduced.

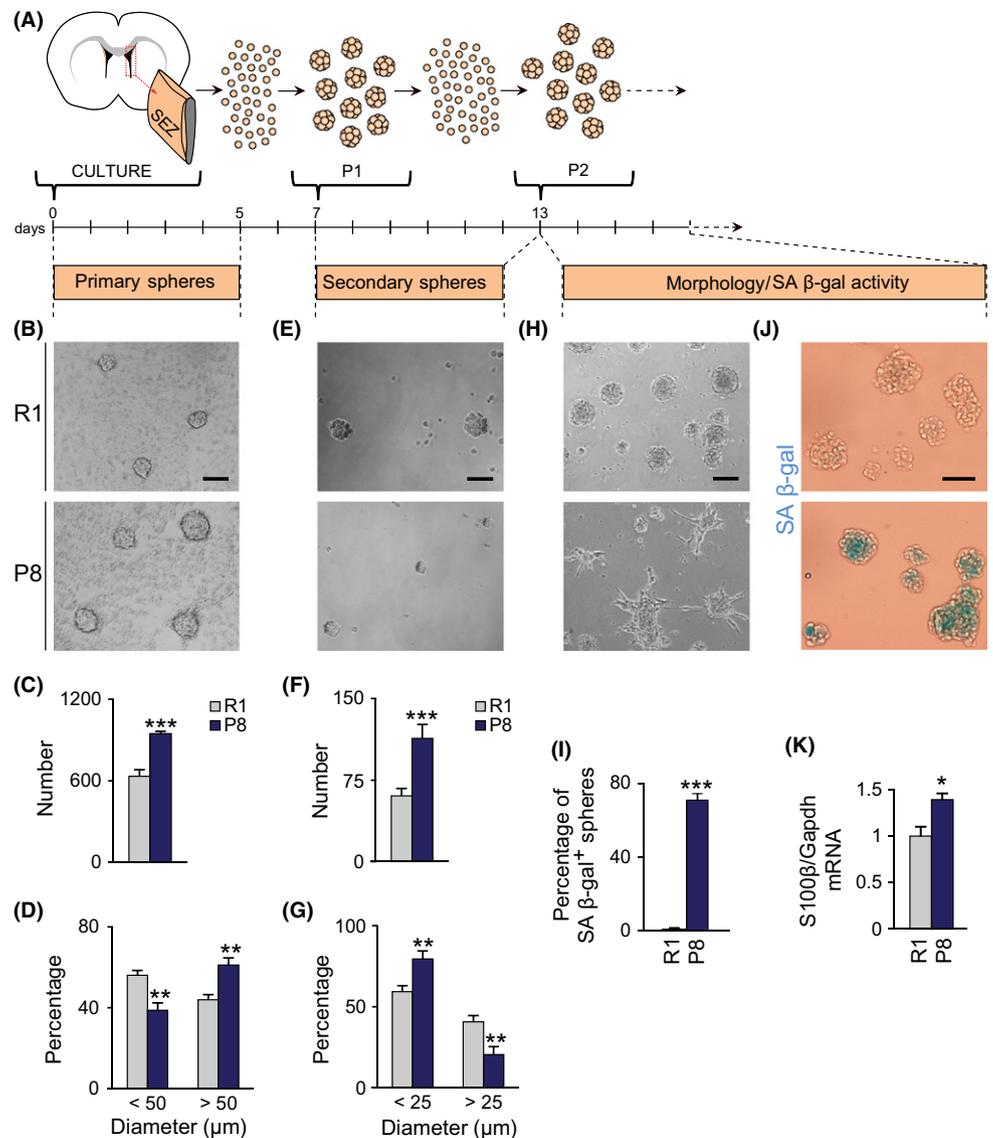


Fig. 3 Neurosphere-forming cells from P8 mice are senescent-prone. (A) Schematic diagram of the experimental design. (B) Primary spheres from 2-m R1 and P8 mice in phase contrast. (C) Number of primary spheres per SEZ (R1 $n = 8$, P8 $n = 8$). (D) Size of primary spheres after 5 days (R1 $n = 8$, P8 $n = 8$). (E) Secondary spheres from passage 1. (F) Number of secondary spheres (R1 $n = 13$, P8 $n = 8$). (G) Size of secondary spheres after 6 days (R1 $n = 13$, P8 $n = 8$). (H) R1 and P8 cultures after passage 2. (I) Percentage of spheres that exhibit SA β -gal-positive staining (R1 $n = 4$, P8 $n = 4$). (J) SA β -gal staining in spheres recovered from cultures of secondary neurospheres. (K) Relative expression of S100 β mRNA in spheres recovered from cultures of secondary neurospheres (R1 $n = 5$, P8 $n = 5$). Data are shown as mean \pm SEM of the indicated number of cultures (n) from each strain (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$). Scale bars: (B) and (H) 100 μ m; (E) and (J) 50 μ m.

Impaired self-renewal of SAMP8 neurosphere-forming cells associates with increased DNA damage and is mediated by p53 and p19

Cellular senescence can be triggered by a number of negative stimuli (telomere erosion, oxidative stress, replicative stress) which activate the DNA damage response (DDR), a signaling pathway in which ATM or ATR kinases block cell cycle progression through stabilization of p53. Activation of certain oncogenes results in derepression of the *Ink4a/Arf* locus in the absence of DNA damage and can also contribute, through increases in p19, in the stabilization of p53 (Gil & Peters, 2006; van Deursen, 2014). In adult neurosphere cultures, loss of proliferation control, that is, as a result of p21 deletion and/or Sox2 overexpression, leads to DNA damage and senescence mediated by increases in p53 and p19, but not p16 (Marqués-Torrejón *et al.*, 2013). Likewise, we detected increased levels of p19 and p53, but reduced levels of p16 in SAMP8 relative to SAMR1 cultures by immunoblot (Fig. 4A,B), a molecular profile consistent with a DDR.

In SAMP8 neurosphere cultures, we could indeed detect increased proportions of cells with DNA foci immunopositive for the form of

histone H2AX phosphorylated in Ser 139 (γ -H2AX), a widespread marker of DNA damage (Fig. 4C). Consistent with this, the levels of p53 phosphorylated in Ser18 (pp53) by ATM (Chao *et al.*, 2006) were also higher (Fig. 4D). Treatment of the cultures with the ATM inhibitor KU55933 or with pifithrin- α (PFT α), a water-soluble inhibitor of p53 activity (Komarov *et al.*, 1999), prevented the senescent phenotype (Fig. 4E). Senescence was also partly prevented by retroviral delivery of a specific shRNA (Marqués-Torrejón *et al.*, 2013) which lowered p53 to 0.68 ± 0.01 ($n = 3$) of the levels in control cultures (Fig. 4F,G). These data indicated potential activation of the p53 checkpoint in response to DNA damage in SAMP8 cells.

Changes in chromatin acetylation regulate neurosphere proliferation and senescence state through the Arf-p53 axis

Treatment of normal MEFs with trichostatin A (TSA), a natural compound that interferes with the activity of HDACs classes I and II, but not class III (Willis-Martinez *et al.*, 2010), leads to increases in p19, together with reductions in p16, and induces senescence (Matheu *et al.*, 2005; Simboeck *et al.*, 2011). Treatment with HDAC inhibitors also

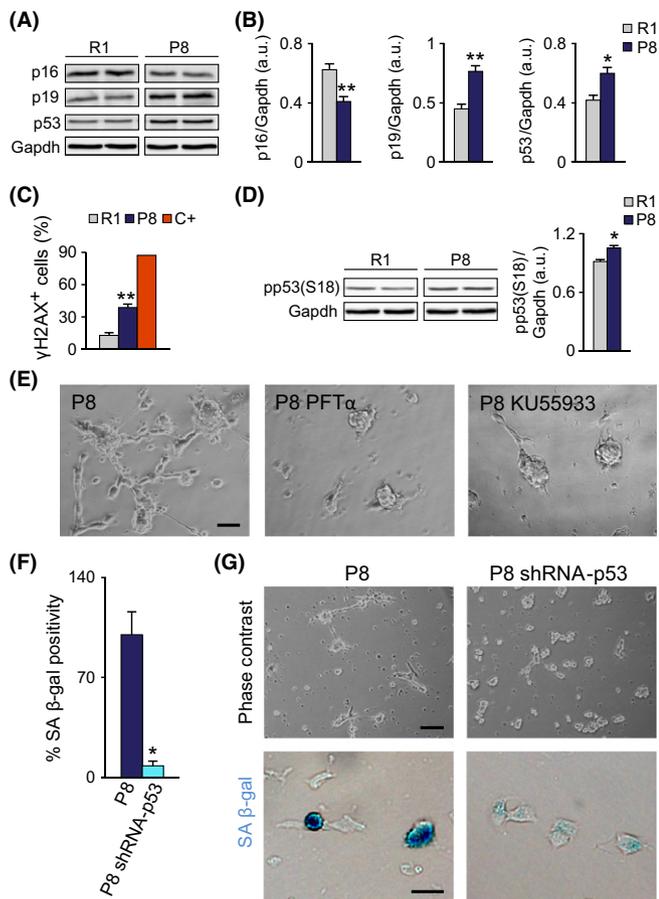


Fig. 4 Senescence of P8 cells requires p53. (A) Left: Representative immunoblots for p16, p19, and p53 in P2 neurospheres from 2-m R1 and P8 mice. (B) Densitometric quantification of p16, p19, and p53 relative to Gapdh levels (R1 $n = 7$, P8 $n = 7$). (C) Percentage of cells with γ -H2AX⁺ foci. Positive control (C+) is a doxorubicin-treated (0.5 μ g/ml, 6 h) neurosphere culture. (D) Left: Representative immunoblot for phospho-p53 in P2 neurospheres from 2-m R1 and P8 mice. Right: Densitometric quantification of pp53 relative to Gapdh levels (R1 $n = 3$, P8 $n = 3$). (E) Treatment with 20 μ M p53 inhibitor PFT α or 10 μ M ATM inhibitor KU5933 prevents the P8 senescent phenotype. (F) SA β -gal labeling of P8 cells infected with a control or with a p53 shRNA-carrying retrovirus (R1 $n = 4$, P8 $n = 4$). (G) Representative images of p53 shRNA and control-infected cultures. Upper panels: phase contrast. Lower panels: SA β -gal staining. Data are shown as mean \pm SEM of the indicated number of cultures (n) from each strain (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$). Scale bars: (E), 50 μ m; (G, upper panels), 100 μ m; (G, lower panels), 20 μ m.

increases acetylation of other substrates, including p53 which then becomes protected from degradation and increases its activity (Luo *et al.*, 2000). A 3-day treatment of SAMR1 cells with TSA at 25 or 50 nM raised the levels of acetylated p53 on Lys 379 (ac-p53) and induced the accumulation of p19 in a concentration-dependent manner (Fig. 5A). The same results were found with 2 or 4 mM valproic acid (VPA), which also inhibits HDACs by binding to their catalytic center (Göttlicher *et al.*, 2001) (Fig. 5A). Inhibition of the HDAC activity in SAMR1 primary cultures with either TSA or VPA resulted in reduced BrdU incorporation and drove the cells into a SA β -gal⁺ morphological state similar to that exhibited by SAMP8 cells in basal conditions (Fig. 5B,C).

Knockdown of p53 in SAMP8 cells reduced senescence even in the presence of TSA (Fig. 5D). Although this result could indicate that increases in p19 act in concert with p53 to trigger cell cycle arrest, we could not dissociate the effect from a DDR-dependent p53 action. We,

therefore, decided to explore the effect of HDAC inhibition in NSCs derived from normal mouse strains at passages when DNA damage is not observed (Porlan *et al.*, 2013). Cells in primary cultures of adult C57BL/6 mice also entered senescence upon TSA treatment (not shown) as also reported for cultures derived from postnatal day 8 SEZs (Foti *et al.*, 2013). At passages 4–7, the same treatment did not cause attachment of the cells to the dish, but resulted in reduced formation of neurospheres together with an increment in SA β -gal⁺ cells (Fig. 5E). TSA treatment also yielded neurospheres with elevated levels of S100 β mRNA in which more S100 β ⁺ cells could be found (Fig. 5E). TSA effects were not observed in p53- or p19-deficient cultures treated in the same way (Fig. 5E), indicating that upregulation of p19 and/or p53 can result in senescence in the absence of DNA damage.

Our results strongly suggested that HDAC activity is required for the maintenance of self-renewal. As HATs counteract the actions of HDACs, we treated SAMP8 neurosphere cultures with 50 μ M of the specific inhibitor anacardic acid (AA). The treatment rescued the senescent phenotype of DNA-damaged SAMP8 P2 neurosphere cells (Fig. 5F) without affecting SAMR1 cells (not shown), suggesting that the senescent state observed in SAMP8 cultures could be dependent on the epigenetic deregulation of the *Ink4a/Arf* locus.

HDAC inhibition *in vivo* reproduces the phenotype of young SAMP8 mice

We next wondered whether epigenetic alterations due to deficient HDAC activity could also result in alterations of the SEZ similar to those observed in young SAMP8 mice. To investigate this possibility, we injected young adult SAMR1 mice with either TSA at 1 mg/kg of body weight or with the DMSO vehicle twice every day during 3 days and analyzed the lateral ventricle wall. The treatment resulted in increased levels of histone 3 acetylated in Lys 9 (ac-H3), as determined by immunohistochemistry and immunoblot (1.5 \pm 0.1-fold increase with respect to vehicle injected mice; Fig. 6A,B).

Despite unchanged numbers of pinwheels, a raise in the occurrence of unciliated GFAP⁺ cells integrated within the ependyma, similar to that previously observed in SAMP8 mice, was induced in SAMR1 mice treated with TSA (Fig. 6C,D). Moreover, counts in SEZ sections indicated that the treatment resulted in a higher proportion of GFAP⁺S100 β ⁺ cells integrated in the ependymal layer (Fig. 6E). Together with the restoration of the phenotype of SAMP8 neurospheres *in vitro* by HAT inhibition, this observation suggests that epigenetic changes may, at least partly, underlie the changes observed in the SEZ of SAMP8 mice.

Discussion

Aging is a negative regulator of adult neurogenesis, and in turn, decreased neurogenesis is considered a contributor to age-associated cognitive and olfactory declines. Yet, the mechanisms underlying impaired neurogenesis in the aging brain are poorly understood. We have analyzed B1-NSC behavior in SAMP8 mice with the aim of identifying molecular mechanisms that may impinge in their aging process. Our data support a model in which epigenetic derepression of tumor suppressor p19 drives accelerated senescence and loss of subependymal NSCs with a SAMP8 genetic background. Interestingly, these NSCs exhibit a transient increase in proliferative activity before exhaustion *in vivo* that can be reproduced by HDAC inhibition.

We find that the SEZ of young SAMP8 and SAMR1 mice contains fewer B1-NSCs than other inbred strains, suggesting a significant effect of the SAM genetic background in B1-cell generation and/or survival.

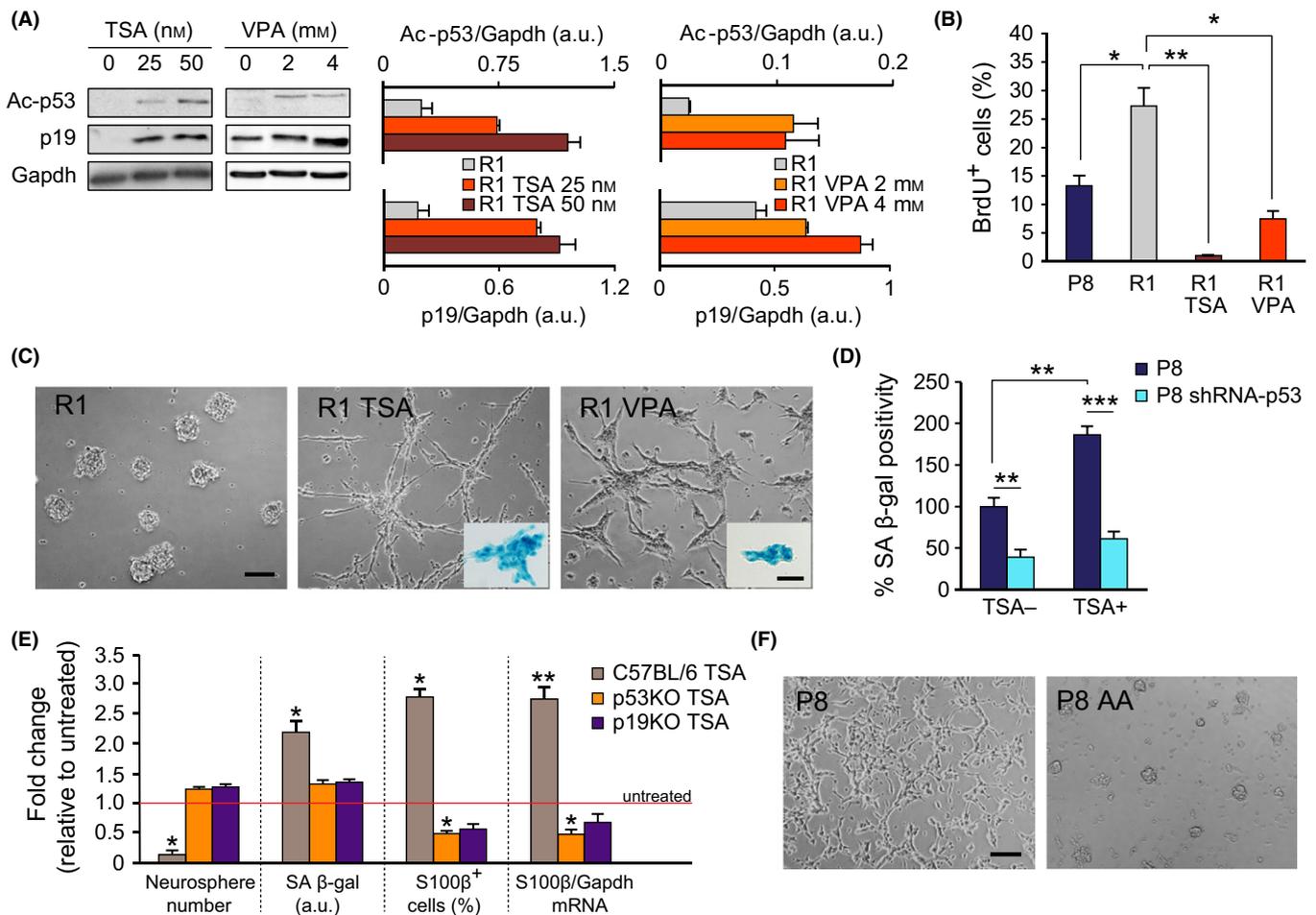


Fig. 5 Inhibition of HDACs in neurospheres induces senescence. (A) Left: Representative immunoblot for Ac-p53 and p19 in R1 neurospheres treated with TSA or VPA. Right: Densitometric quantification reveals a TSA and VPA dose-dependent increase in Ac-p53 and p19 protein levels, relative to Gapdh (in arbitrary units, a.u.). (B) Percentage of BrdU-positive cells in P8, R1, and R1 TSA- or VPA-treated neurospheres. (C) Secondary spheres from R1 mice treated with vehicle (DMSO), 50 nM TSA, or 4 mM VPA. Insets: TSA- and VPA-treated R1 neurospheres exhibit SA β-gal staining. (D) SA β-gal labeling of P8 cells infected with control or p53 shRNA-carrying retroviruses and treated with DMSO or 50 nM TSA (R1 $n = 5$, P8 $n = 5$). (E) Fold changes in the number of neurospheres, of SA β-gal⁺ labeling, in the number of S100β⁺ cells, and the level of S100β mRNA in TSA-treated relative to untreated cultures in C57BL/6 wild-type and p53 or p19 mutant mice. (F) Senescent phenotype of P8 cultures is rescued by treatment with 50 μM anacardic acid (AA). Data are shown as mean ± SEM of 3 independent cultures from each strain or treatment (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$). Scale bars: (C) and (F), 100 μm; (C, insets), 40 μm.

Increased numbers of multiciliated GFAP⁺ cells in SAMP8 and SAMR1 mice could indicate that B1 cells are not properly maintained in SAM strains, but are more prone to become ependymal cells, a fate that is associated with older ages in other inbred strains (Luo *et al.*, 2008). However, other reports using BrdU retention do not support B1-cell transformation into ependymocytes (Capilla-Gonzalez *et al.*, 2014). Exploring this possibility would require lineage tracing analysis as ependymal cells are no longer detectable by GFAP immunohistochemistry. Nevertheless, SAMP8 mice lose B1 cells more rapidly, resulting in significant differences in the number of pinwheels between SAMR1 and SAMP8 at 10-m.

Accelerated loss of B1 cells in SAMP8 mice is preceded by abnormally located B1-like cells (BICs) which are proliferative and most likely form neurospheres. This is in line with previously reported increases in BrdU incorporation in the SEZ and the SGZ of these mice (Gang *et al.*, 2011; Díaz-Moreno *et al.*, 2013). These reports together with data presented here also indicate that increased proliferation is not productive due to reduced viability of the generated neurons. Interestingly, HDAC inhibition reduces neurosphere formation and postnatal neurogenesis *in vivo*

(Zhou *et al.*, 2011; Foti *et al.*, 2013), further suggesting that the increase in BICs that we observe after TSA treatment and in SAMP8 mice is also likely to be nonproductive.

Expression of the *Ink4a/Arf* locus is silent during embryogenesis, but is gradually upregulated with aging (Zindy *et al.*, 1997; Krishnamurthy *et al.*, 2004). One or both proteins encoded by this locus are induced during senescence depending on triggers and cellular context, with notable species-specific differences, that is, murine cells being more dependent on p19 than human cells (Bruggeman *et al.*, 2005; van Deursen, 2014). Protein p16 appears to limit NSC potential during physiological aging (Molofsky *et al.*, 2006), but we find increased levels of p19 specifically in SAMP8 neurospheres. Thus, the net effect of bidirectional changes in tumor suppressor protein expression remains to be elucidated. The p19–p53 pathway not only regulates NSC self-renewal and proliferation in the postnatal and adult brains (Bruggeman *et al.*, 2005; Nagao *et al.*, 2008; Ahlenius *et al.*, 2009), but also their responsiveness to gliogenic signals (Nagao *et al.*, 2008). An increase in p19–p53 could couple senescence to a gliogenic program that might promote terminal differentiation of BICs into non-neurogenic S100β⁺

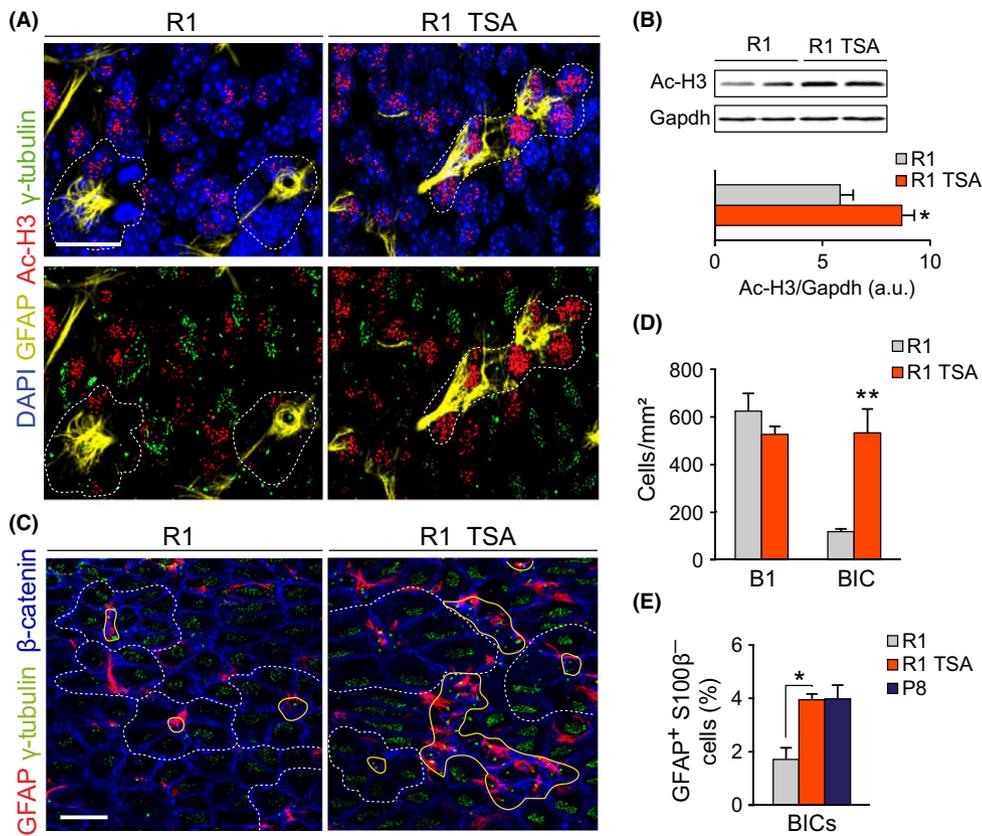


Fig. 6 Treatment of R1 mice with TSA mimics the altered SEZ features of young P8 mice. (A) Ac-H3, GFAP, and γ -tubulin in a whole-mount preparation of a 2-m R1 mouse treated with TSA (R1 TSA) or vehicle (R1). (B) *Up*: representative immunoblot for Ac-H3 in SEZ homogenates from TSA or vehicle-treated 2-m R1 mice. *Down*: densitometric quantification of Ac-H3 relative to Gapdh levels (R1 $n = 3$, P8 $n = 3$). (C) GFAP, γ -tubulin, and β -catenin in SEZ whole-mounts of TSA-treated and untreated R1 mice. Note the presence of clusters of BICs in the TSA-treated animal. (D) Numbers of B1 and BICs in R1 mice treated or not with TSA (R1 $n = 4$, R1 + TSA $n = 3$). (E) Percentage of GFAP⁺S100 β ⁻ BICs relative to total cells (R1 $n = 3$, P8 $n = 3$). Pinwheels are delineated by dashed white lines, and B1 cells are delineated by solid yellow lines. Data are shown as mean \pm SEM of the indicated number of independent mice (n) from each strain (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$). Scale bars: (A) 15 μ m, (C) 30 μ m.

cells. Furthermore, we have recently shown that loss of proliferation control and/or increased replicative stress leads to higher levels of p19, but not p16 and results in cell senescence in neurosphere cultures and higher proportions of S100 β ⁺ cells *in vivo* (Marqués-Torrejón *et al.*, 2013). Although p53 and p21 control at least in part the proliferation of NSCs (Medrano *et al.*, 2009; Marqués-Torrejón *et al.*, 2013; Porlan *et al.*, 2013), we have failed to detect altered expression of p21 in the SEZ from SAMP8 mice (data not shown).

Our results indicate a regulation of the *Ink4a/Arf* locus by acetylation. HDAC inhibition reduces proliferation of adult hippocampal progenitors and promotes their neuronal differentiation through the upregulation of the neurogenic basic helix-loop-helix transcription factor NeuroD (Hsieh *et al.*, 2004). In these progenitor cells, the orphan nuclear receptor TLX recruits HDACs to repress transcription of the cell cycle inhibitor p21 and of the tumor suppressor PTEN and deregulation of p21 has been shown to be important for the antiproliferative effect of HDAC inhibitors, although p19 was not tested (Sun *et al.*, 2007). The relationship of PcG complexes with *Ink4a/Arf* expression is also a provocative possibility given the ability of these complexes to create heritable epigenetic marks. PcG gene product Bmi1 deficiency in mice is associated with premature senescence and loss of NSC self-renewal, which can in large part be rescued by repressing the expression of p16 and p19 (Bruggeman *et al.*, 2005; Molofsky *et al.*, 2005; Nishino *et al.*, 2008).

The underlying genes responsible for accelerated senescence and pathological changes in SAM strains remain largely unidentified. A recent whole-exome sequencing of various SAM strains has revealed the existence of some SAMP-shared and SAMP8-specific single nucleotide variations (Tanisawa *et al.*, 2013). Two of these mutations are found in DNA repair genes *Ogg1* and *Mbd4* and thus may be directly involved in

the susceptibility to diseases via defects in the DDR. A third specific mutation is present in the *Aifm3* gene, encoding the apoptosis-inducing factor mitochondrion-associated protein 3, which may contribute to mitochondrial dysfunction in SAMP8 mice as it induces apoptosis *in vitro* and has an oxidoreductase domain that might play a role in the respiratory chain (Xie *et al.*, 2005).

Our data suggest that the NSC loss that takes place during physiological aging in mice is dramatically accelerated in a SAMP8 background and provides a system in which to analyze the mechanisms underlying exhaustion of stem cell pools *in vivo*. Moreover, the involvement of p19 in neurogenic senescence suggests the possibility that neurogenic dysfunction in the elderly could be prevented by pharmacological treatment.

Experimental procedures

Animals

Adult male mice of SAMP8 and SAMR1 (Jackson Laboratories, (Charles River, Barcelona, Spain)), p53 (Marqués-Torrejón *et al.*, 2013) and p19 knockout (Kamijo *et al.*, 1997), C57BL/6, and CD1 strains were handled in accordance with Spanish RD1201/2005 guidelines, following protocols approved by the institutional committees. BrdU (50 mg/kg body weight in saline solution; Sigma) was intraperitoneally injected, either seven times in a 12-h period (one injection every 2 h) 30 days before perfusion or as a single dose 1 h before perfusion. TSA (1 mg/kg body weight; Sigma) or DMSO was administered by intraperitoneal injection, at one dose every 12 h during 3 days, and the SEZs were dissected 1 h after the last injection.

Histological analyses

Mice were anesthetized (225 mg/kg of ketamine and 3 mg/kg of medetomidine) and transcardially perfused with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 (PB). The brains were dissected, postfixed by immersion in the same fixative overnight (o/n), and serially sectioned into 25- μ m coronal sections using a Leica VT 1000S vibratome. For whole-mounts, the SEZs were processed as described (Mirzadeh *et al.*, 2008). Sections and whole-mounts were blocked using 10% FBS and 0.2% Triton X-100 in PB. For BrdU immunodetection, sections were first treated with 2N HCl for 15 min at 37 °C. Samples were incubated in rabbit anti-Ki67 (1:150, Abcam, Cambridge, England), S100 β (1:150, Dako), β -catenin (1:100, Cell Signaling), or ac-H3 (1:10 000, Sigma); rat anti-BrdU (1:600, Abcam); chicken anti-GFAP (1:400, Millipore, Madrid, Spain); goat anti-Sox2 (1:50, RyD), DCX (1:100, Santa Cruz); mouse anti- γ -tubulin (1:600, Santa Cruz, Heidelberg, Germany); or acetylated α -tubulin (1:500, Sigma) antibodies in blocking buffer, o/n at 4 °C. After several PB washes, the sections were incubated for 1 h at room temperature (RT) with DyLight 549, DyLight 488, or Cy3-conjugated appropriate secondary antibodies (1:600 to 1:1500; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Suffolk, England). Samples were stained with DAPI (Sigma) at 1 μ g/mL and mounted with Fluorsave (Calbiochem, Madrid, Spain). Confocal planes along the rostro-caudal axis or z images of the entire dorsal aspect of SEZ whole-mounts were captured using a Fluoview FV10i (Olympus) confocal microscope and analyzed. Apoptotic cells were detected by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) using ApopTag *In Situ* Apoptosis Detection Kit (Millipore) according to the manufacturer protocol. For scanning electron microscopy, whole-mounts fixed as before were dried with the critical point method and shadowed with gold-palladium and examined with a Hitachi scanning electron microscope.

NSC culture, transduction, immunocytochemistry, and SA β -gal staining

Methods for adult NSC culture and self-renewal assessment have been described (Ferron *et al.*, 2007). TSA, AA, VPA, KU55933, and PFT α were from Sigma. Vectors containing p53 shRNAs, methods used for retrovirus production, and NSC transduction have been described (Marqués-Torrejón *et al.*, 2013). In brief, single cells obtained from passage 1 (P1) neurospheres were infected o/n by incubation with diluted (1:5) supernatants of shRNA retroviruses produced in Plat-E cells; after 5 days, the clones were dissociated and single cells were adhered for 10 min to a Matrigel substrate and stained. The Senescence Cells Histochemical Staining Kit (Sigma) was used following manufacturer's instructions. Representative images were obtained in a Nikon Eclipse E800 microscope and positivity was quantified using IMAGEJ 1.49i software (NIH, USA). Briefly, cyan pixels were segmented by color threshold and their total intensity was divided by the number of cells in each image. For immunocytochemistry, incubation with antibodies for mouse anti- γ H2AX (1:100, Millipore), rat anti-BrdU (1:600, Abcam), and rabbit anti-S100 β (1:1200, Dako) was performed on Matrigel-attached freshly dissociated NSCs as described (Ferron *et al.*, 2007). Secondary antibodies and DAPI counterstaining were as for histological analyses. Pictures of random fields in each condition were taken on the InCell Analyzer 2000 (GE Healthcare, Valencia, Spain), and positive cells were scored using the InCell INVESTIGATOR 1.6 software.

Protein isolation/Western blotting

Neurospheres were homogenized in lysis buffer (20 mM PBS, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 2.5 mM sodium orthovanadate,

20 mM sodium fluoride, 2 mM phenyl-methane-sulfonyl fluoride and 1X Complete Mini tablet (Roche) for 20 min and centrifuged at 20 000 *g* for 15 min at 4 °C. Protein concentration was determined by Pierce BCA Protein assay kit (Thermo Scientific, Madrid, Spain). Protein extracts (50–70 μ g) were denatured in Laemmli's sample buffer containing β -mercaptoethanol, sodium dodecyl sulfate (SDS), and bromophenol blue, separated by 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a nitrocellulose membrane (Sigma). The membranes were blocked 1 h at room temperature with 5% nonfat dry milk in Tris-buffered saline supplied with 0.1% Tween 20 (TBS-T) and incubated with rabbit anti-p53 (1:500, Novocastra), ac-p53 (1:1000, Cell Signaling), ac-H3 (1:10 000, Sigma), p16 (1:200, Santa Cruz) or pp53 (S18) (1:500, RyD), rat anti-p19 (1:1000, Abcam), or mouse anti-Gapdh (1:1500, Millipore) antibodies in blocking buffer, o/n at 4 °C. After extensive washing with TBS-T, membranes were incubated for 1 h at RT with horseradish peroxidase-conjugated goat antibodies to mouse (1:2000, Dako), rabbit (1:5000, Amersham), or rat (1:1000, Amersham) IgGs in blocking buffer. Peroxidase activity was detected with Western Lightning Plus reagents (Perkin Elmer) according to supplier recommendations.

RNA Isolation and qRT-PCR analysis

Total RNA was extracted using TRIzol and cDNA synthesized using PrimeScript RT reagent kit (Takara). cDNA products were amplified on a StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) using Premix Ex Taq (Probe qPCR) (Takara). Taqman probes for mouse S100 β (Mm00485897_m1) and Gapdh (Mm99999915_g1) were purchased from Applied Biosystems.

Statistics

Data are presented as the mean \pm SEM of a number (*n*) of cultures or independent mice *per* experimental condition. Statistical significance was determined by two-tailed Student's *t*-tests or two-way ANOVA with *post hoc* analysis by Bonferroni's test. Significance was set at **P* < 0.05, ***P* < 0.01, or ****P* < 0.001. Statistical analyses were carried out using SPSS V. 17 (2008 SPSS Inc., Chicago, IL, USA) or GraphPad Prism (2007 GraphPad Software Inc.).

Acknowledgments

We thank M. J. Palop for help with the mouse colonies and J. F. Pertusa for his invaluable advice on image analysis. We also appreciate the support of the Servicios Centrales de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE; Universidad de Valencia).

Author contributions

R. S.-C. performed most of the experiments; A. P.-V. performed the analyses in whole-mount preparations; J. M. M.-R. performed the analyses with p53 and p19 mutant cultures; M. A. M.-T. contributed to the analysis of the mouse phenotypes; M. P. contributed to the design of the experiments; I.F. and F. P.-S. designed and supervised the study, secured funding, analyzed the data, and wrote the manuscript. All authors contributed to experimental design, data analysis, discussion, and writing of the manuscript.

Funding

This work was funded by grants from Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF and FIS Program, CIBERNED, and RETIC Terce) and from Generalitat

Valenciana (Programa Prometeo and ISIC) to I.F. R. S.-C. was a recipient of a predoctoral fellowship of the Ministerio de Educacion y Cultura (Formacion del Personal Universitario, FPU Program). Work in the laboratory of I.F. is supported by the Fundación Botín-Banco Santander.

Conflict of interest

None declared.

References

- Ahlenius H, Visan V, Kokaia M, Lindvall O, Kokaia Z (2009) Neural stem and progenitor cells retain their potential for proliferation and differentiation into functional neurons despite lower number in aged brain. *J. Neurosci.* **29**, 4408–4419.
- Bruggeman SW, Valk-Lingbeek ME, van der Stoop PP, Jacobs JJ, Kieboom K, Tanger E, Hulsman D, Leung C, Arsenijevic Y, Marino S, van Lohuizen M (2005) Ink4a and Arf differentially affect cell proliferation and neural stem cell self-renewal in Bmi1-deficient mice. *Genes Dev.* **19**, 1438–1443.
- Capilla-Gonzalez V, Cebrian-Silla A, Guerrero-Cazares H, Garcia-Verdugo JM, Quiñones-Hinojosa A (2014) Age-related changes in astrocytic and ependymal cells of the subventricular zone. *Glia* **62**, 790–803.
- Chao C, Herr D, Chun J, Xu Y (2006) Ser18 and 23 phosphorylation is required for p53-dependent apoptosis and tumor suppression. *EMBO J.* **25**, 2615–2622.
- van Deursen JM (2014) The role of senescent cells in ageing. *Nature* **509**, 439–446.
- Díaz-Moreno M, Hortiguera R, Goncalves A, Garcia-Carpio I, Manich G, Garcia-Bermudez E, Moreno-Estelles M, Eguiluz C, Vilaplana J, Pelegri C, Vilar M, Mira H (2013) Abeta increases neural stem cell activity in senescence-accelerated SAMP8 mice. *Neurobiol. Aging* **34**, 2623–2638.
- Enwere E, Shingo T, Gregg C, Fujikawa H, Ohta S, Weiss S (2004) Aging results in reduced epidermal growth factor receptor signaling, diminished olfactory neurogenesis, and deficits in fine olfactory discrimination. *J. Neurosci.* **24**, 8354–8365.
- Ferron SR, Andreu-Agullo C, Mira H, Sanchez P, Marques-Torrejón MA, Fariñas I (2007) A combined *ex/in vivo* assay to detect effects of exogenously added factors in neural stem cells. *Nat. Protoc.* **2**, 849–859.
- Foti SB, Chou A, Moll AD, Roskams AJ (2013) HDAC inhibitors dysregulate neural stem cell activity in the postnatal mouse brain. *Int. J. Dev. Neurosci.* **31**, 434–447.
- Gang B, Yue C, Han N, Xue H, Li B, Sun L, Li X, Zhao Q (2011) Limited hippocampal neurogenesis in SAMP8 mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Res.* **1389**, 183–193.
- Gil J, Peters G (2006) Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 667–677.
- Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, Krämer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Lo CF, Nervi C, Pellici PG, Heinzl T (2001) Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J.* **20**, 6969–6978.
- Hsieh J, Nakashima K, Kuwabara T, Mejia E, Gage FH (2004) Histone deacetylase inhibition-mediated neuronal differentiation of multipotent adult neural progenitor cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **101**, 16659–16664.
- Kamijo T, Zindy F, Roussel MF, Quelle DE, Downing JR, Ashmun RA, Grosveld G, Sherr CJ (1997) Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell* **91**, 649–659.
- Komarov PG, Komarova EA, Kondratov RV, Christov-Tselkov K, Coon JS, Chernov MV, Gudkov AV (1999) A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. *Science* **285**, 1733–1737.
- Krishnamurthy J, Torrice C, Ramsey MR, Kovalev GI, Al-Regaiey K, Su L, Sharpless NE (2004) Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J. Clin. Invest.* **114**, 1299–1307.
- Luo J, Su F, Chen D, Shiloh A, Gu W (2000) Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis. *Nature* **408**, 377–381.
- Luo J, Daniels SB, Lenington JB, Notti RQ, Conover JC (2006) The aging neurogenic subventricular zone. *Aging Cell* **5**, 139–152.
- Luo J, Shook BA, Daniels SB, Conover JC (2008) Subventricular zone-mediated ependyma repair in the adult mammalian brain. *J. Neurosci.* **28**, 3804–3813.
- Marqués-Torrejón MA, Porlan E, Banito A, Gomez-Ibarlucea E, Lopez-Contreras AJ, Fernandez-Capetillo O, Vidal A, Gil J, Torres J, Fariñas I (2013) Cyclin-dependent kinase inhibitor p21 controls adult neural stem cell expansion by regulating Sox2 gene expression. *Cell Stem Cell* **12**, 88–100.
- Maslov AY, Barone TA, Plunkett RJ, Pruitt SC (2004) Neural stem cell detection, characterization, and age-related changes in the subventricular zone of mice. *J. Neurosci.* **24**, 1726–1733.
- Matheu A, Klatt P, Serrano M (2005) Regulation of the INK4a/ARF locus by histone deacetylase inhibitors. *J. Biol. Chem.* **280**, 42433–42441.
- Medrano S, Burns-Cusato M, Atienza MB, Rahimi D, Scrabble H (2009) Regenerative capacity of neural precursors in the adult mammalian brain is under the control of p53. *Neurobiol. Aging* **30**, 483–497.
- Mikheev AM, Stoll EA, Mikheeva SA, Maxwell JP, Jankowski PP, Ray S, Uo T, Morrison RS, Horner PJ, Rostomily RC (2009) A syngeneic glioma model to assess the impact of neural progenitor target cell age on tumor malignancy. *Aging Cell* **8**, 499–501.
- Mirzadeh Z, Merkle FT, Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2008) Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell* **3**, 265–278.
- Molofsky AV, He S, Bydon M, Morrison SJ, Pardal R (2005) Bmi-1 promotes neural stem cell self-renewal and neural development but not mouse growth and survival by repressing the p16Ink4a and p19Arf senescence pathways. *Genes Dev.* **19**, 1432–1437.
- Molofsky AV, Slutsky SG, Joseph NM, He S, Pardal R, Krishnamurthy J, Sharpless NE, Morrison SJ (2006) Increasing p16INK4a expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature* **44**, 448–452.
- Nagao M, Campbell K, Burns K, Kuan CY, Trumpp A, Nakafuku M (2008) Coordinated control of self-renewal and differentiation of neural stem cells by Myc and the p19ARF-p53 pathway. *J. Cell Biol.* **183**, 1243–1257.
- Nishino J, Kim I, Chada K, Morrison SJ (2008) Hmga2 promotes neural stem cell self-renewal in young but not old mice by reducing p16Ink4a and p19Arf Expression. *Cell* **135**, 227–239.
- Porlan E, Morante-Redolat JM, Marqués-Torrejón MÁ, Andreu-Agulló C, Carneiro C, Gómez-Ibarlucea E, Soto A, Vidal A, Ferrón SR, Fariñas I (2013) Transcriptional repression of Bmp2 by p21(Waf1/Cip1) links quiescence to neural stem cell maintenance. *Nat. Neurosci.* **16**, 1567–1575.
- Raponi E, Agenes F, Delphin C, Assard N, Baudier J, Legraverend C, Deloulme JC (2007) S100B expression defines a state in which GFAP-expressing cells lose their neural stem cell potential and acquire a more mature developmental stage. *Glia* **55**, 165–177.
- Shook BA, Manz DH, Peters JJ, Kang S, Conover JC (2012) Spatiotemporal changes to the subventricular zone stem cell pool through aging. *J. Neurosci.* **32**, 6947–6956.
- Silva-Vargas V, Crouch EE, Doetsch F (2013) Adult neural stem cells and their niche: a dynamic duo during homeostasis, regeneration, and aging. *Curr. Opin. Neurobiol.* **23**, 935–942.
- Simboeck E, Ribeiro JD, Teichmann S, Di Croce L (2011) Epigenetics and senescence: learning from the INK4-ARF locus. *Biochem. Pharmacol.* **15**, 1361–1370.
- Stoll EA, Habibi BA, Mikheev AM, Lasiene J, Massey SC, Swanson KR, Rostomily RC, Horner PJ (2011) Increased re-entry into cell cycle mitigates age-related neurogenic decline in the murine subventricular zone. *Stem Cells* **29**, 2005–2017.
- Sun G, Yu RT, Evans RM, Shi Y (2007) Orphan nuclear receptor TLX recruits histone deacetylases to repress transcription and regulate neural stem cell proliferation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **104**, 15282–15287.
- Takeda T (2009) Senescence-accelerated mouse (SAM) with special references to neurodegeneration models, SAMP8 and SAMP10 mice. *Neurochem. Res.* **34**, 639–659.
- Tanisawa K, Mikami E, Fuku N, Honda Y, Honda S, Ohsawa I, Ito M, Endo S, Ihara K, Ohno K, Kishimoto Y, Ishigami A, Maruyama N, Sawabe M, Iseki H, Okazaki Y, Hasegawa-Ishii S, Takei S, Shimada A, Hosokawa M, Mori M, Higuchi K, Takeda T, Higuchi M, Tanaka M (2013) Exome sequencing of senescence-accelerated mice (SAM) reveals deleterious mutations in degenerative disease-causing genes. *BMC Genom.* **14**, 248.
- Tomobe K, Nomura Y (2009) Neurochemistry, neuropathology, and heredity in SAMP8: a mouse model of senescence. *Neurochem. Res.* **34**, 660–669.
- Tropepe V, Craig CG, Morshead CM, van der Kooy D (1997) Transforming growth factor- α null and senescent mice show decreased neural progenitor cell proliferation in the forebrain subependyma. *J. Neurosci.* **17**, 7850–7859.
- Willis-Martinez D, Richards HW, Timchenko NA, Medrano EE (2010) Role of HDAC1 in senescence, aging, and cancer. *Exp. Gerontol.* **45**, 279–285.
- Xie Q, Lin T, Zhang Y, Zheng J, Bonanno JA (2005) Molecular cloning and characterization of a human AIF-like gene with ability to induce apoptosis. *J. Biol. Chem.* **280**, 19673–19681.
- Zhou Q, Dalgard CL, Wynder C, Doughty ML (2011) Histone deacetylase inhibitors SAHA and sodium butyrate block G1-to-S cell cycle progression in neurosphere formation by adult subventricular cells. *BMC Neurosci.* **12**, 50.
- Zindy F, Quelle DE, Roussel MF, Sherr CJ (1997) Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging. *Oncogene* **15**, 203–211.



Valencia, 2015