



VNIVERSITAT  
E VALÈNCIA

Facultat de Medicina i Odontologia

Departamento de Fisiología

Programa de Doctorado en  
Fisiología

# Estudio de la migración neuronal de las células nerviosas de la SVZ en la enfermedad de Alzheimer

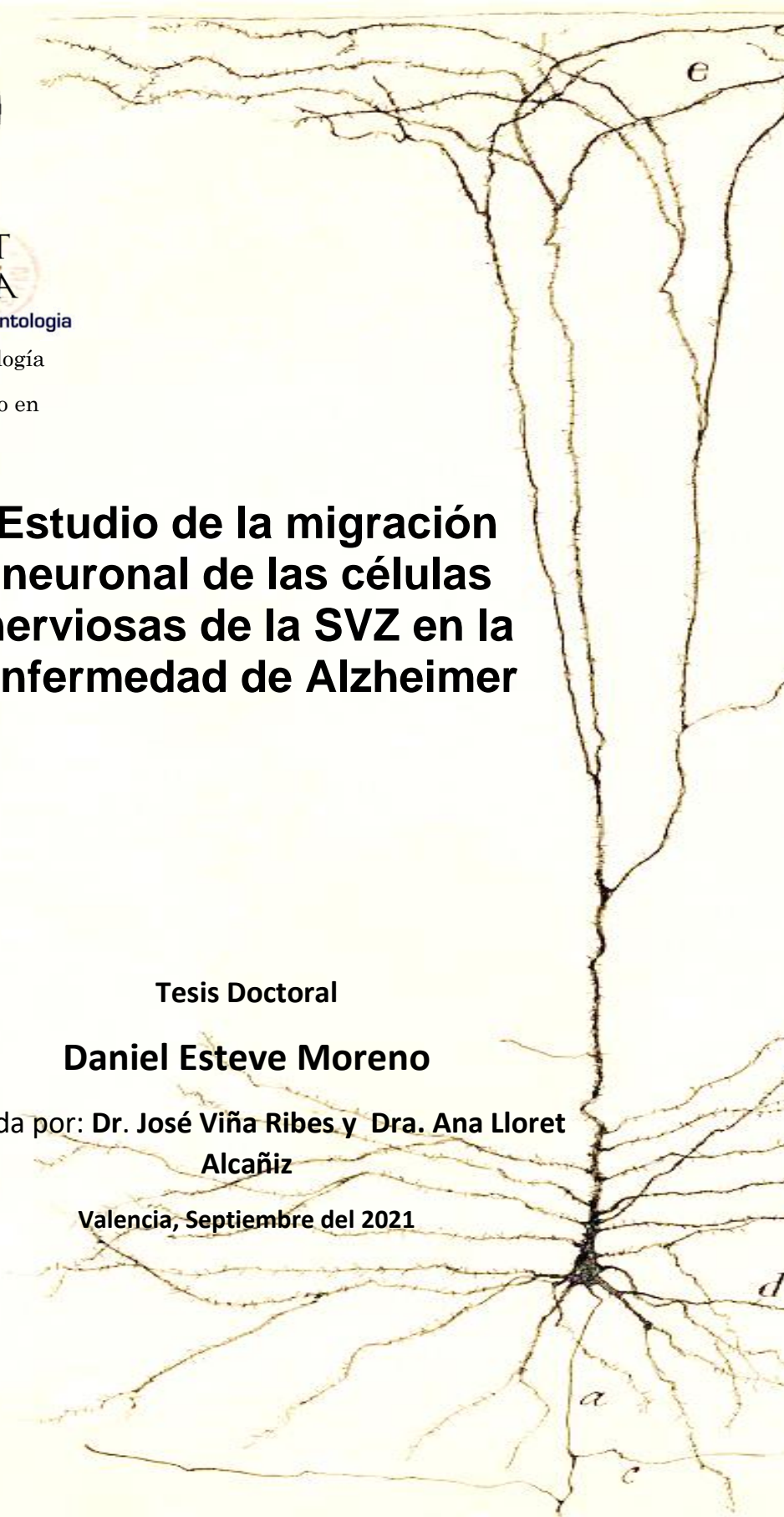
*quætere  
un feruiv*

Tesis Doctoral

**Daniel Esteve Moreno**

Dirigida por: **Dr. José Viña Ribes y Dra. Ana Lloret  
Alcañiz**

Valencia, Septiembre del 2021







VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

Departamento de Fisiología

Programa de Doctorado en Fisiología

# **Estudio de la migración neuronal de las células nerviosas de la SVZ en la enfermedad de Alzheimer**

Tesis doctoral presentada por:

**Daniel Esteve Moreno**

Dirigida por:

**Dr. José Viña Ribes**

**Dra. Ana Lloret Alcañiz**

Valencia, Septiembre del 2021



D. **José Viña Ribes**, Catedrático del Dpto. de Fisiología de la Universitat de València

Dña **Ana Lloret Alcañiz**, Profesora Titular del Dpto. de Fisiología de la Universitat de València

**CERTIFICAN:**

Que la presente memoria, titulada “Estudio de la migración neuronal de las células nerviosas de la SVZ en la enfermedad de Alzheimer”, corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por D. **Daniel Esteve Moreno**, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado en Fisiología de la Universitat de València.

Y para que conste firma/n el presente certificado en Valencia, a. *20/09/2021*



Fdo. José Viña Ribes



Fdo. Ana Lloret Alcañiz



# Agradecimientos

En primer lugar y especialmente, debo dar las gracias a los que realmente han hecho posible esta tesis y que en parte también se podrían considerar como co-autores del trabajo: ellos son mis padres. Gracias por apoyarme y confiar en mí en todo momento, aun sin entender muy bien qué estaba haciendo lejos de casa a lo largo de estos cuatro años. Gracias a mi padre por inculcarme esa cultura del esfuerzo y de auto superación. Gracias a mi madre por escucharme y aconsejarme siempre. En definitiva, gracias por todo; sin vosotros no lo podría haber conseguido.

Por otro lado, quería darle las gracias a mis directores: Pepe y Ana; por haberme permitido formar parte del laboratorio y por guiarme a lo largo de estos años. Ana, gracias por depositar tanta confianza en mí y por darme la libertad necesaria para sentir este proyecto como propio.

También quiero dar las gracias a todos mis compañeros del laboratorio, tanto a los que siguen desde que llegué como a aquellos que han seguido su camino en otros destinos. Todos y cada uno de ellos me han enseñado algo a lo largo de estos años. Gracias por todos los momentos compartidos y, sobre todo, por las inolvidables picaetas y los largos cafés en becarios. A Cris, Luci, Fercho, Andrea, Marta, Kristine... Sería imposible nombraros a todos pero permitidme que destaque a algunos.

Gracias Mar por tus “broncas” que permiten mantener cierto orden en el caos que puede llegar a ser un laboratorio tan grande. Por ayudarme a encontrar cualquier cosa, sin ti hubiera sido imposible.

Especialmente, gracias a “mis jefas” (Paloma y Rachel). Desde un principio, me enseñasteis todo lo necesario para sobrevivir estos años. Rachel Blot, gracias por instruirme desde que llegué, por dejarme ser tu sombra durante los primeros días y sobre todo, gracias por ayudarme siempre. Paloma, gracias resolver todas mis dudas estadísticas y clínicas en cualquier momento y por enseñarme a hacer frente al día a día del laboratorio. Gracias a las dos por aguantarme en el laboratorio y por esas cervezas terapéuticas imprescindibles para poder superar el doctorado.

A Aitoret, el más veneno de todos. Gracias por ser mi químico particular y resolverme las múltiples dudas tontas que me surgían; pero sobre todo gracias por tu entusiasmo de los viernes de alegría, y por ser todo un duende de luz en el fondo y proveedor de chuches. Por supuesto, gracias a mi colombiano favorito, a Wachiboy; gracias por tu incombustible energía, tus temazos diarios que animaban el día a día; y lo más importante, tu gran ejemplo de superación. Sabes que tienes las puertas de Torrellano abiertas siempre que lo necesites. Tampoco puedo olvidarme de dar las gracias a las hermanicas Garcia, por su optimismo y alegría diario que me han ayudado a seguir adelante los días en los que la ciencia no acompañaba. Y sobre todo, gracias a mi compi Biotec, Angelica, gracias por la charlas científicas y sobre todo por aguantar mis desahogos.

No me puedo olvidar de mis queridas brasileñas Carlinha, Helen y Mariana; ha sido todo un placer conoceros y compartir risas y diversión con vosotras. Y tampoco de mi francesita favorita Coco; gracias por tu compañía compartiendo bancada, tus *merde* alegraban



las mañanas, y por supuesto, gracias por compartir el amor por los dulces. Gracias a vosotras ha sido mucho más fácil seguir adelante estos años.

Gracias también a las últimas incorporaciones del grupo, a David y a Artemis; gracias por tener paciencia conmigo cuando la tesis me sobrepasaba y no daba una.

También quiero darle las gracias a la gente que me ha ayudado fuera del laboratorio. En general a todo el Departamento de Fisiología por aceptarme desde un principio. Empezando por los técnicos de Fisiología, gracias Javier por ayudarnos siempre con los pedidos; y también a Vicky, un gran fichaje. Gracias a las secretarias de Fisiología, en especial, quiero darle las gracias a Mari. *Moltes gràcies per resoldre tots els meus dubtes administratius, inclús fora d'horari de treball i sempre amb un somriure; i a més gràcies per les teues visites pel labo; sempre alegren els matins.* Además, gracias a todo el laboratorio de Circuitos Neuronales al igual que al grupo GESADA, gracias por haberme aceptado como uno más a pesar de venir de Fisiología. Espero compartir más SENCs con vosotros.

Asimismo quiero destacar al profesor Verdugo, gracias por su imprescindible colaboración en este trabajo. Muchas gracias por darme la oportunidad de aprender de usted; y sobre todo, gracias por ser todo un ejemplo de mantener viva la curiosidad y de amor a la ciencia.

Muchas gracias a toda mi familia, ya no solo a mis padres; sino también a todos y cada uno de ellos (mi querida tía Aeza, mi prima "mini yo"

Claudia...), en especial a mis hermanos. A mi hermano Juanjo por ayudarme a hacerle comprender al resto a qué nos dedicamos; y a mi hermana por apoyarme y no ocultar su orgullo de hermana mayor. Y gracias a mi cuñi por ser mi suministradora oficial de dulces todos estos años, han servido para suavizar los momentos de estrés.

Y por supuesto, muchas gracias a los que han estado día tras día aguantándome, escuchando mis lamentos y mis dramas; y sobre todo ayudándome a olvidarlos. Gracias a “los de siempre”, “los del pueblo”, gracias por haber estado ahí, por dejaros liar siempre que lo necesitaba, por vuestras visitas. Sin esos momentos de desconexión con vosotros en los que podía recargar las pilas habría sido imposible seguir con todo esto. Al igual que gracias a “mis colegas”, gracias por todos nuestros momentos juntos, por liarme siempre que lo necesitaba, por subirme la moral y sobre todo, gracias por nuestros viajes; han sido imprescindibles para conseguir terminar este trabajo.

# Índice

Lista de Abreviaturas .....	17
Resumen .....	19
INTRODUCCIÓN .....	21
1. Introducción.....	23
1.1. Neurogénesis .....	23
1.1.1. Nichos neurogénicos .....	27
1.1.2. La zona ventricular subventricular (V-SVZ).....	32
1.1.3. Migración neural: V-SVZ/OB .....	40
1.1.3.1. Migración tangencial y rostral.....	40
1.1.3.2. Regulación migración neural.....	44
1.1.3.3. Migración neural en el cerebro humano .....	48
1.2. Enfermedad de Alzheimer .....	49
1.2.1. Epidemiología de la enfermedad de Alzheimer .....	51
1.2.2. Etiología y Fisiopatología de la EA .....	53
1.2.2.1. Teorías sobre la etiología de la EA .....	54
1.2.2.2. Agregación péptido A $\beta$ : placas amiloides.....	55
1.2.2.3. Hiperfosforilación de la proteína Tau: ovillos neurofibrilares .....	63
1.2.3. Neurogénesis y la EA .....	67
1.3. Ciclo celular.....	73
1.3.1. Fases del ciclo celular .....	73
1.3.2. Regulación del ciclo celular .....	76
1.3.2.1. APC/C y el ciclo celular .....	79
1.3.3. Parada del ciclo celular.....	80
1.3.3.1. Apoptosis .....	80
1.3.3.2. Senescencia.....	82

1.3.4.	Ciclo celular y neurogénesis .....	85
1.3.5.	Ciclo celular y EA.....	87
<b>OBJETIVOS.....</b>		<b>89</b>
<b>2. Objetivos.....</b>		<b>91</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>		<b>93</b>
<b>3. Materiales y métodos.....</b>		<b>95</b>
3.1.	Animales de experimentación .....	95
3.2.	Reactivos, medios y kits .....	96
3.3.	Tampones y soluciones .....	97
3.4.	Anticuerpos.....	99
3.4.1.	Anticuerpos primarios .....	99
3.4.2.	Anticuerpos secundarios .....	100
3.5.	Equipamiento.....	101
3.6.	Métodos de comportamiento .....	102
3.6.1.	Test de habituación olfativa .....	102
3.7.	Métodos de toma de muestra .....	104
3.7.1.	Sacrificio de animales, extracción de tejido y preparación de homogeneizados.....	104
3.7.2.	Fijación y preparación de tejido para inmunofluorescencia .....	105
3.7.3.	Preparación del tejido para inmunohistoquímica ..	106
3.7.4.	Aislamiento de células de la V-SVZ para citometría de flujo .....	107
3.8.	Métodos analíticos .....	107
3.8.1.	Determinación de proteínas: método de Lowry ....	107
3.8.2.	Western Blotting.....	110
3.8.3.	Inmunofluorescencia .....	116
3.8.4.	Citometría de flujo.....	119

3.8.5.	<b>Microscopia Óptica y Electrónica</b> .....	122
3.8.6.	<b>Análisis estadístico</b> .....	124
	<b>RESULTADOS</b> .....	127
<b>4.</b>	<b>Resultados</b> .....	129
<b>4.1.</b>	<b>Estudio de la morfología y estructura de la V-SVZ</b> .....	129
4.1.1.	<b>Caracterización de las células acumuladas en la V-SVZ de los ratones APP/PS1</b> .....	133
4.1.2.	<b>Determinación de la capacidad proliferativa de la V-SVZ</b> .....	136
<b>4.2.</b>	<b>Estudio de la migración neural</b> .....	137
4.2.1.	<b>Número neuronas migradoras en la RMS</b> .....	137
4.2.2.	<b>Análisis de los bulbos olfatorios</b> .....	139
4.2.3.	<b>Niveles de Netrina en la V-SVZ</b> .....	140
4.2.4.	<b>Estudio de la cantidad de astrocitos</b> .....	141
4.2.5.	<b>Análisis de la olfacción</b> .....	143
<b>4.3.</b>	<b>Estudio del ciclo celular y daño en las células tipo A</b> .....	144
4.3.1.	<b>Producción de radicales libres en la V-SVZ</b> .....	144
4.3.2.	<b>Estudio del daño al ADN en la V-SVZ</b> .....	145
4.3.3.	<b>Caracterización del ciclo celular por citometría de flujo</b> .....	148
<b>4.4.</b>	<b>Análisis de la senescencia y la apoptosis en la V-SVZ de los ratones APP/PS1</b> .....	154
4.4.1.	<b>Presencia de células senescentes en la V-SVZ</b> .....	154
4.4.2.	<b>Apoptosis en las células de la V-SVZ</b> .....	159
	<b>DISCUSIÓN</b> .....	163
<b>5.</b>	<b>Discusión</b> .....	165
	<b>CONCLUSIONES</b> .....	175
<b>6.</b>	<b>Conclusiones</b> .....	177

<b>SUMMARY</b> .....	179
<b>Abbreviations List</b> .....	181
<b>Abstract</b> .....	183
<b>Introduction</b> .....	185
<b>Neurogenesis</b> .....	185
<b>Neural migration</b> .....	191
<b>Regulation of neural migration</b> .....	194
<b>Alzheimer’s disease</b> .....	197
<b>Amyloid plaques</b> .....	199
<b>Neurofibrillary tangles</b> .....	203
<b>AD and neurogenesis</b> .....	205
<b>Cell cycle</b> .....	210
<b>Regulation of cell cycle</b> .....	211
<b>Cell cycle arrest</b> .....	214
<b>Apoptosis</b> .....	214
<b>Senescence</b> .....	215
<b>Cell cycle and neurogenesis</b> .....	217
<b>Cell cycle and AD</b> .....	219
<b>Objectives</b> .....	221
<b>Materials and methods</b> .....	223
<b>Experimental animals</b> .....	223
<b>Odor habituation test</b> .....	224
<b>Western Blotting</b> .....	224
<b>Immunofluorescence</b> .....	227
<b>Flow cytometry</b> .....	229
<b>Optical and Electron Microscopy</b> .....	230
<b>Statistical analysis</b> .....	231

<b>Results</b> .....	233
<b>Morphological and structural studies of the V-SVZ</b> .....	233
<b>Neural migration study</b> .....	234
<b>Cell cycle study in type A cells</b> .....	235
<b>Senescence and apoptosis in the V-SVZ from APP/PS1 mice</b> ....	236
<b>Discussion</b> .....	237
<b>Conclusions</b> .....	246
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	247
<b>7. Bibliografía</b> .....	249





# Lista de Abreviaturas

4-HNE: 4-hidroxinonenal

A $\beta$ :  $\beta$  amiloide

APC/C: Complejo promotor de la anafase/ciclosoma

APP: Proteína Precursora de Amiloide

ATM: Ataxia Telangiectasia Mutada

BrdU: Bromodesoxiuridina

CDKs: Ciclinas dependientes de quinasa

CKIs: Inhibidores de ciclinas dependientes de quinasa

DCX: Doblecortina

DDR: Respuesta daño ADN

EA: Enfermedad de Alzheimer

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico

GFAP: Proteína ácida fibrilar glial

GSK3 $\beta$ : Glucógeno sintasa quinasa 3 beta

LTD: Depresión a largo plazo

LTP: Potenciación a largo plazo

MAP: Proteína Asociada a Microtúbulos

MDA: malondialdehído

NeuN: Proteína nuclear neural

NFTs: Ovillos neurofibrilares

NPCs: Células Progenitoras Neurales

NSCs: Células Madre Neurales

OB: Bulbo Olfatorio

OMS: Organización Mundial de la Salud

PSA-NCAM: Molécula de Adhesión Celular Polisialilada-Neural

PSEN1: Presenilina 1

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RMS: Vía Migratoria Rostral

SASP: Proteínas secretoras asociadas a la senescencia

SA $\beta$ Gal:  $\beta$ -Galactosidasa asociada a la senescencia

SGZ: Zona Subgranular

V-SVZ: Zona Ventricular-Subventricular

WT: Tipo Salvaje

## Resumen

En el cerebro adulto de la mayoría de los mamíferos el nicho neurogénico con mayor capacidad neurogénica es la zona ventricular-subventricular (V-SVZ). Esta región se encuentra distribuida a lo largo de las paredes de los ventrículos laterales. La capacidad neurogénica que presenta esta región se debe a la presencia de las denominadas células B. Además nos encontramos con otros tipos celulares como son las células tipo C o progenitores intermedios, las tipo A o migradoras y las tipo E o células endimarias. Las células tipo B son capaces de dar lugar a las células tipo C que finalmente generan las células tipo A. En condiciones fisiológicas, las células tipo A migran principalmente hasta los bulbos olfatorios y una vez allí dan lugar a distintos tipos de interneuronas. Este proceso de migración se produce de manera tangencial a través de la vía migratoria rostral (RMS). Sin embargo, estas células también son capaces de migrar a otras zonas como el cuerpo caloso y generar otros tipos neurales como oligodendrocitos y astrocitos. Este proceso de neurogenesis se ha observado que se encuentra disminuido en pacientes de enfermedad de Alzheimer (EA) y en distintos modelos, pero se desconoce el motivo. Esta enfermedad se ha convertido en una gran preocupación en los últimos años debido al gran aumento de su incidencia como consecuencia del envejecimiento de la población. Los principales rasgos fisiopatológicos de la enfermedad de Alzheimer son la formación de placas amiloides, generadas por la agregación del péptido A $\beta$ , y la de los ovillos neurofibrilares como consecuencia de la hiperfosforilación de la proteína Tau. En ambos casos provocan una serie de procesos

patológicos que van a desembocar en neurodegeneración. Además, existe una íntima relación entre el ciclo celular tanto con la neurogénesis, como con la EA.

En este trabajo se pretende abordar la relación entre la EA y el proceso de neurogénesis que se produce en la V-SVZ. Para ello se utilizó un modelo murino de EA, el doble transgénico APP/PS1. Los resultados obtenidos demostraron que las células tipo A se encuentran acumuladas en la V-SVZ. De tal manera que esta acumulación se relaciona con una disminución de este tipo de células a lo largo de la RMS y de neuronas maduras en los bulbos olfatorios. Además, se traduce en una pérdida de capacidad olfativa. Para profundizar analizamos el ciclo celular de las células de la V-SVZ y vimos que una parte significativa se encuentran paradas en la fase G1. Esto podría deberse a un aumento de los niveles de Cdh1. Cdh1 se sobreexpresa como consecuencia de la respuesta al daño del ADN. Esta parada provoca que las células tipo A entren en senescencia.

En conclusión, en ratones APP/PS1 las células tipo A entran en senescencia y pierden su capacidad de migrar a lo largo de la RMS. Esto contribuye a cambios morfológicos en la V-SVZ y a un fallo en la regeneración de los bulbos olfatorio y por tanto, de la capacidad de olfacción.

# INTRODUCCIÓN

*El hombre no debe doblegar la naturaleza ante una idea, sino  
doblegar la idea ante la naturaleza*

-Santiago Ramón y Cajal



# 1. Introducción

## 1.1. Neurogénesis

Desde principios del siglo XX se sabe que el sistema nervioso está formado por neuronas, células individuales, que establecen relaciones entre ellas por contigüidad y no por continuidad. Todo ello se logró gracias al trabajo realizado por Ramón y Cajal en pro de la doctrina neuronal frente al reticularismo reinante en la época. El trabajo de Cajal fue mucho más allá y llegó a postular la incapacidad de estas células de regenerarse debido a su alto grado de complejidad (Ramon y Cajal, 1928). Durante décadas, los neurocientíficos interpretaron erróneamente estos hallazgos defendiendo la incapacidad del cerebro adulto para generar nuevas neuronas. Sin embargo, a mediados del siglo XX, con el desarrollo de nuevas tecnologías y métodos, la comunidad científica comenzó a replantearse este último postulado y a desarrollar nuevas técnicas, para dilucidar si se generaban o no nuevas neuronas en el cerebro adulto.

En los años 60, Altman y colaboradores lograron un primer avance en la demostración de la existencia de neurogénesis adulta en el cerebro adulto de mamíferos, concretamente ratas, tras lesiones cerebrales (Altman, 1962). Este hito fue posible gracias al marcaje en el cerebro de animales vivos de la replicación del ADN mediante la incorporación de timidina-H3 en las hebras de nueva formación. Esta novedosa técnica, le permitió posteriormente demostrar la existencia de neurogénesis adulta en el giro dentado del hipocampo y en la

paredes de los ventrículos laterales en cerebros adultos de ratas y gatos en condiciones fisiológicas (Altman, 1963; Altman & Das, 1966). Gracias al desarrollo de esta técnica también se pudo demostrar la existencia de neurogénesis adulta en aves (Alvarez-Buylla & Nottebohm, 1988). En la década siguiente, el desarrollo de una nueva técnica de marcaje basada en el uso de la bromodesoxiuridina (BrdU), un análogo sintético de la timidina, permitió la demostración de la neurogénesis en el cerebro adulto de diferentes modelos animales, como peces y reptiles (Font, García-Verdugo, Alcántara, & López-García, 1991; Paredes, Sorrells, Garcia-Verdugo, & Alvarez-Buylla, 2016; Zupanc & Horschke, 1995).

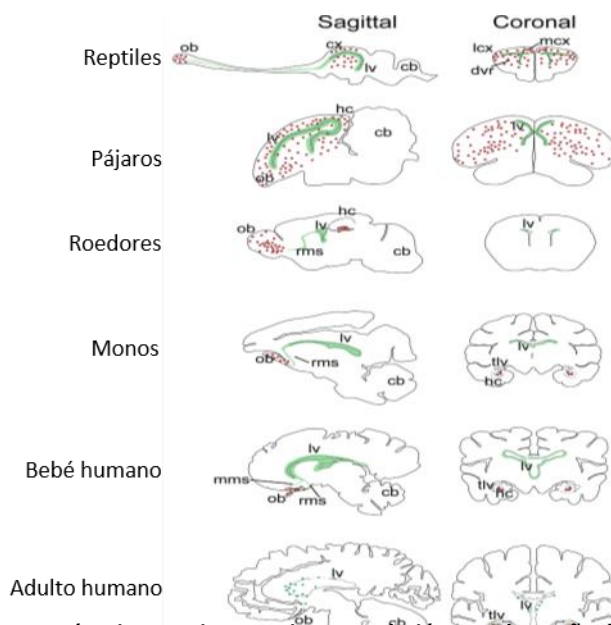
Sin embargo, en el caso de los primates no humanos el estudio de la neurogénesis adulta siempre ha suscitado cierta polémica, debido seguramente a su clara cercanía con los humanos. En un primer momento, utilizando la técnica de la timidina H3 se describió la inexistencia de neurogénesis en el cerebro adulto de estos mamíferos (Eckenhoff & Rakic, 1988; Rakic, 1985). Debido a las limitaciones que suponía el uso de esta técnica, más tarde, mediante el marcaje con BrdU, se volvió a comprobar la presencia de neurogénesis adulta en primates no humanos. Estos nuevos ensayos refutaron la hipótesis anterior y definieron la presencia de neurogénesis en el giro dentado del hipocampo del cerebro de monos (Gould et al., 1999; Gould, Tanapat, McEwen, Flügge, & Fuchs, 1998; Kornack & Rakic, 1999). Estudios siguientes demostraron la presencia de neurogénesis también en los ventrículos laterales del cerebro adulto de primates no-



humanos (Gil-Perotin, Duran-Moreno, Belzunegui, Luquin, & Garcia-Verdugo, 2009; Pencea, Bingaman, Freedman, & Luskin, 2001).

A la vista de los resultados obtenidos se puso el foco en el cerebro adulto humano. Hasta el momento se han realizado un sinnúmero de ensayos al respecto pero después de décadas aún no se ha logrado alcanzar un consenso general entre la comunidad científica. A finales del siglo XX se postuló el primer trabajo en el que se demostraba la existencia de neurogénesis en el hipocampo del cerebro adulto humano mediante marcaje con BrdU (Eriksson et al., 1998). Sin embargo, estudios posteriores mucho más avanzados gracias al uso de nuevas técnicas de marcaje, determinaron que pese a que sí existía neurogénesis en el giro dentado del hipocampo (Knoth et al., 2010) y en los ventrículos laterales (N. Sanai et al., 2011; Wang et al., 2011) del cerebro humano postnatal, ésta comenzaba a disminuir abruptamente en los primeros meses de vida, de tal manera que acababa desapareciendo y no se mantenía a lo largo de la vida (Bergmann et al., 2012; Göritz & Frisén, 2012; Sorrells et al., 2018) como sí sucedía en los mamíferos estudiados hasta el momento. De tal manera, que algunos autores defienden que existe una correlación inversamente proporcional entre capacidad de neurogénesis y, el tamaño y complejidad del cerebro, es decir, cuanto más complejo y extenso es el cerebro de una especie menor es su capacidad neurogénica; debido a que la extensión del cerebro puede suponer una gran limitación para la migración de las nuevas neuronas (Paredes et al., 2016). Esto explicaría la disminución o ausencia de la neurogénesis adulta en los primates. Sin embargo, a día de hoy el debate sigue sin estar

completamente zanjado; puesto que conforme avanzan y surgen nuevas técnicas, aparecen nuevos trabajos a favor y en contra de su presencia en el cerebro humano adulto (Moreno-Jiménez et al., 2019; Sorrells et al., 2018). Las discrepancias surgidas se deben principalmente a la sensibilidad de los distintos marcajes tisulares utilizadas, y puede dar lugar a albergar conclusiones muy dispares. En cualquier caso, los autores sí parecen coincidir en la existencia de neurogénesis en los ventrículos laterales del cerebro adulto humano, correspondiente a la zona ventricular-subventricular (*ventricular subventricular zone, V-SVZ*) y cuya información ampliaremos a continuación, por su importancia en la presente tesis doctoral (Curtis, Kam, & Faull, 2011; Sorrells et al., 2018; C. Wang et al., 2011a).



**Figura 1. Neurogénesis en varias especies y su relación con el tamaño del cerebro.** En verde se muestran las zonas germinales y en rojo el destino de las nuevas células. Imagen modificada de Paredes et al., 2016.

### 1.1.1. Nichos neurogénicos

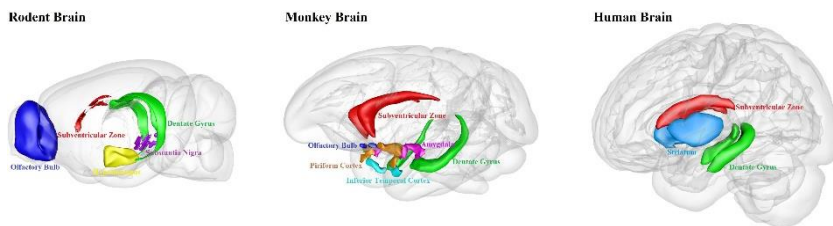
En todos animales, incluyendo el humano, en los que se ha estudiado la presencia de neurogénesis adulta, ésta se limita principalmente a dos zonas que presentan células con capacidad proliferativa. Estas dos zonas se conocen como nichos neurogénicos y son la V-SVZ y la zona subgranular (*subgranular zone*, SGZ) (Alvarez-Buylla & Lim, 2004). En ambos casos las células proliferativas o células madre neurales (*neural stem cells*, NSCs) presentes tienen tanto capacidad neurogénica como características de los astrocitos. Por esto último, expresa la proteína ácida fibrilar glial (*glial fibrillary acidic protein*, GFAP) (F. Doetsch, Caille, Lim, Garcia-Verdugo, & Alvarez-Buylla, 1999; Imura, Kornblum, & Sofroniew, 2003; Laywell, Rakic, Kukekov, Holland, & Steindler, 2000; Seri, García-Verdugo, McEwen, & Alvarez-Buylla, 2001). Por un lado, tal y como indica su nombre, la V-SVZ se encuentra limitada a los ventrículos laterales, concretamente entre una línea de células endimarias y el estriado. Por otro lado, la SGZ se encuentra en el giro dentado del hipocampo.

Durante mucho tiempo se había postulado que estas NSCs además de tener capacidad de auto-replicación eran tripotenciales, es decir, capaces de generar células de los tres linajes del sistema nervioso central (Palmer, Takahashi, & Gage, 1997; Reynolds & Weiss, 1992). Sin embargo, estudios recientes basados en *fate-mapping* han demostrado que las NSCs presentes en la SGZ únicamente son capaces de generar neuronas y astrocitos (Bonaguidi et al., 2011; Bond, Ming, & Song, 2015), mientras que las de la V-SVZ dan lugar tanto a oligodendrocitos como a neuronas (Calzolari et al., 2015; Ortega et al.,

2013). Sin embargo, también parece que las células de la V-SVZ serían capaces de generar astrocitos destinados al cuerpo calloso (Sohn et al., 2015). En cualquier caso, este proceso se produce en ambos nichos tanto en situaciones fisiológicas debido a la erosión celular normal y el mantenimiento de la homeostasis; como en situaciones patológicas como daños físicos, exposición a toxinas o la neurodegeneración (Maki, Liang, Miyamoto, Lo, & Arai, 2013; Martino, Pluchino, Bonfanti, & Schwartz, 2011; Nakatomi et al., 2002; Okano & Sawamoto, 2008).

Además de estas dos regiones, diversos estudios han demostrado la existencia de neurogénesis adulta en otras regiones del cerebro de los mamíferos, como: el estriado, la amígdala, el hipotálamo, y el neocórtex. Sin embargo, nos encontramos de nuevo con una gran disparidad entre especies. En el caso del estriado, la existencia de neurogénesis independiente de la V-SVZ se ha demostrado tanto en el cerebro de ratones (Luzzati, De Marchis, Fasolo, & Peretto, 2006) como en el de primates no humanos adultos (Bédard, Cossette, Lévesque, & Parent, 2002). Además ciertos autores también reportan la existencia de este tipo de neurogénesis en el cerebro adulto humano (Ernst et al., 2014), aunque no está del todo claro, ya que se empleó la técnica del  $C^{14}$  la cual no está considerada del todo válida por diversos autores (Kumar, Pareek, Faiq, Ghosh, & Kumari, 2019). Mientras que la neurogénesis en el neocórtex se encuentra limitada a la etapa embrionaria en el caso del cerebro humano (Bhardwaj et al., 2006), sí se ha demostrado tanto en el cerebro adulto de rata como en el de primates no humanos (Dayer, Cleaver, Abouantoun, & Cameron, 2005; Fung et al., 2011). Algo similar sucede con la amígdala, cuya capacidad

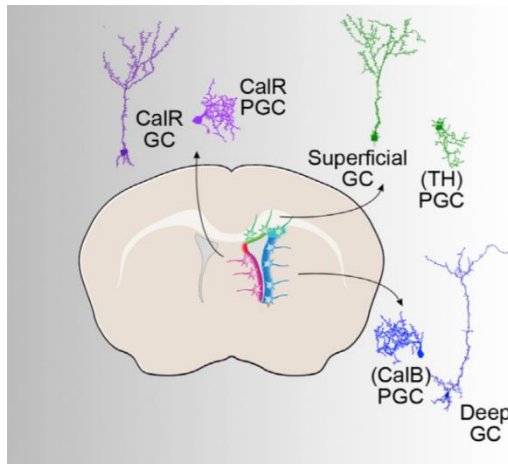
neurogénica parece estar restringida a los topillos y a los primates no humanos (Fowler, Liu, Ouimet, & Wang, 2002; X. M. Zhang et al., 2009). Por último, la neurogénesis en el hipotálamo se ha observado en diversas especies salvo en humanos y primates no humanos hasta el momento (Migaud et al., 2010). En cualquier caso, todas estas regiones parecen carecer de cierta relevancia frente a la V-SVZ y SGZ; ya que comparativamente todas ellas presentan una capacidad neurogénica menor, lo cual junto con la sensibilidad de las técnicas empleadas, puede provocar una mayor distorsión en los resultados obtenidos.



**Figura 2. Representación de los distintos nichos neurogénicos presentes en roedores, primates no humanos y humanos.** (Lei, Li, Ge, & Chen, 2019)

Otro punto a tener en cuenta es el destino de los nuevos progenitores neurales generados en cada nicho. En condiciones fisiológicas y en líneas generales; los progenitores de la SGZ tienen como destino el hipocampo; mientras que los de la V-SVZ, es el bulbo olfatorio. Sin embargo, estudios recientes han ido más allá y han demostrado que los progenitores que parten de la V-SVZ van a dar lugar a uno u otro tipo de linaje celular en función de la posición que ocupen en la V-SVZ; dando lugar a la gran diversidad que encontramos en el bulbo olfatorio. De tal manera que la V-SVZ está dividida en territorios morfogenéticos especializados en generar tipos celulares específicos.

Esta regionalización de la V-SVZ se produce durante las etapas más tempranas del desarrollo (Fuentealba et al., 2015) y da lugar a la expresión gradual de factores de transcripción en las NSCs, los cuales son necesarios para esta especificación regional (Sequera, 2014). Estos mecanismos moleculares implicados siguen sin conocerse bien, aunque se ha observado el papel de distintos factores de transcripción como: Pax6 que es expresado por las células de la V-SVZ dorsal y está implicado en la generación de células granulares superficiales y neuronas dopaminérgicas periglomerulares (De Chevigny et al., 2012; Kohwi, Osumi, Rubenstein, & Alvarez-Buylla, 2005). Además, sobre este proceso también influyen distintos factores externos, de tal manera que puede provocar la redirección de los nuevos progenitores generados ya sean neuroblastos o células precursoras de oligodendrocitos (Chaker, Codega, & Doetsch, 2016). En condiciones fisiológicas; por un lado, la zona dorsal da lugar principalmente a interneuronas gabaérgicas periglomerulares que expresan tirosina hidrolasa y células granulares superficiales las cuales también son generadas por la zona medial de la V-SVZ, de donde también proceden las células granulares que expresan calretinina. Por otro lado, de la zona ventral proceden las células granulares profundas y las interneuronas gabaérgicas que expresan calbindina (Merkle, Mirzadeh, & Alvarez-Buylla, 2007).



**Figura 3. Imagen representativa de la regionalización de la V-SVZ en el cerebro adulto de ratones.** (Fuentealba et al., 2015)

Tal y como se puede observar esta especificidad regional está muy bien definida en el caso de la V-SVZ. Sin embargo en el caso de la SGZ, esta organización sigue en estudio; aunque parece estar regulada de la misma manera que en la V-SVZ, es decir, a través de la expresión de distintos factores de transcripción en las NSCs (Bekiari et al., 2015; Li, Fang, Fernández, & Pleasure, 2013; Sugiyama, Osumi, & Katsuyama, 2013). Por último, en lo que se refiere al cerebro humano; esta organización en dominios transcripcionales es claramente visible durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, al llegar a la edad adulta los territorios exactos de estos dominios y los subtipos de células que producen se amplían, aumentando la complejidad de esta regionalización (Hansen et al., 2013; Ma et al., 2013; Reinchisi, Ijichi, Glidden, Jakovcevski, & Zecevic, 2012).

### **1.1.2. La zona ventricular subventricular (V-SVZ)**

Tal y como se ha mencionado previamente, uno de los principales nichos de neurogénesis en el cerebro adulto de los mamíferos es la V-SVZ. Además, este nicho neurogénico es considerado por diferentes autores como el que presenta una mayor capacidad proliferativa debido en gran parte a su vasta extensión respecto al otro nicho caracterizado: la SGZ (Alvarez-Buylla & Garcia-Verdugo, 2002).

En primer lugar, la V-SVZ se localiza a lo largo de las paredes de los ventrículos laterales; es una fina capa de células entre el estriado y el ventrículo del cual la separa una interfaz de células endimarias (Ponti, Obernier, Guintoa, et al., 2013), que se explicará con mayor detalle más adelante. A lo largo de los años, el uso tanto de microscopía electrónica como de marcadores moleculares específicos; ha permitido llevar a cabo una precisa caracterización de la estructura y organización de la V-SVZ, la cual destaca por su complejidad. La V-SVZ está formada por diferentes tipos celulares, de los cuales destacan cuatro tipos: las células madre neurales (NSCs) también conocidas como células tipo B, los progenitores intermedios o células tipo C, los progenitores migradores neurales o células tipo A y las células endimarias o tipo E (Fiona Doetsch, Garcia-Verdugo, & Alvarez-Buylla, 1997). Además de estos tipos celulares destacados, en la V-SVZ también hay presentes otras estructuras celulares como los astrocitos y los vasos sanguíneos; cuya importancia en el proceso de neurogénesis adulta se desarrollará en los apartados siguientes.



A continuación, se procederá a desglosar de manera detallada las características morfológicas y funcionales de cada una de las cuatro células más importantes de la V-SVZ.

- **Células tipo B.** En primer lugar, hay que destacar que existen dos tipos de células B: B1 y B2 (Fiona Doetsch, Garcia-Verdugo, et al., 1997). Ambos tipos presentan características astrocitarias, pero difieren en ciertos aspectos como su localización, morfología y función. Por un lado, las células tipo B1 se encuentran principalmente adyacentes a la capa de células endimarias; mientras que las de tipo B2 se encuentran en la periferia de la V-SVZ, concretamente en la interfaz con el parénquima del estriado (Platel & Bordey, 2016). A nivel estructural, las células B1 se caracterizan por estar formadas por tres dominios: I, II, III (Lim & Alvarez-buylla, 2016). El dominio I consiste en una extensión apical que contacta directamente con el ventrículo y que se encuentra en contacto con dos células endimarias formando lo que se conoce como *pinwheel* (Mirzadeh, Merkle, Soriano-Navarro, Garcia-Verdugo, & Alvarez-Buylla, 2008). El dominio II contiene el soma de la célula B1 que está en contacto con las células tipo C y tipo A; y por último el dominio III está formado por la parte basal de la célula cuyo extremo entra en contacto con los vasos sanguíneos, principalmente capilares. A nivel funcional, las células B1 pueden encontrarse en estado quiescente o activo según la expresión de distintos marcadores como la nestina (marcador de células madre neurales en el cerebro adulto) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (*epidermal growth factor receptors*, EGFR)

(Platel & Bordey, 2016), esta expresión depende de distintas vías de señalización que aún están por determinar como la expresión de *Jagged1* por parte de las células epiteliales o la señal *eph/ephrinB2* (Ottone et al., 2014). En su forma activa las células B1 actúan como NSCs de tal manera que presentan capacidad proliferativa, dando lugar tanto a nuevas células tipo B1 como a las células C (F. Doetsch et al., 1999). Además, este tipo celular también participa a través de su extremo basal en el proceso de migración de las nuevas células, separando las cadenas de células tipo A de la capa endimaria (Fiona Doetsch, García-Verdugo, et al., 1997). Por otro lado, las células B2 tienen una estructura mucho menos compleja, presentan un aspecto fusiforme intermedio; y a nivel funcional no presentan capacidad neurogénica, pero sí participan en la migración neural a través de expansiones que separan cadenas de células tipo A aisladas del parénquima estriado circundante (Fiona Doetsch, García-Verdugo, et al., 1997).

- **Células tipo C.** Las células tipo C, son también conocidas como progenitores intermedios. A nivel morfológico, estas células no presentan ningún tipo de extensiones ni invaginaciones en el citoplasma; son mucho más esféricas que el resto de células de la V-SVZ y de mayor tamaño que las de tipo A. En el núcleo de las células tipo C se encontraron profundas invaginaciones, mientras que su citoplasma se caracteriza por un aparato de Golgi de gran tamaño, menor número de ribosomas que las células tipo A (Fiona Doetsch, García-Verdugo, et al., 1997). En lo que se refiere a la localización, se encuentran a lo largo de toda la V-SVZ constituyendo el 10% de las células presentes en esta zona y

pueden distribuirse o bien formando grupos o bien de manera individual, yuxtapuestas a las cadenas de células tipo A y en ocasiones formando uniones específicas con este tipo celular. Además, cabe destacar que están completamente ausentes a lo largo de la vía migratoria rostral (*rostral migratory stream*, RMS) que conecta la V-SVZ con el bulbo olfatorio (*olfactory bulb*, OB) (Fiona Doetsch, García-Verdugo, et al., 1997). Finalmente, a nivel funcional, las células tipo C se caracterizan por proceder de las células tipo B, tener una mayor capacidad de proliferación en la V-SVZ, incorporar H3-timidina, expresar nestina, Mash1 (gene proneural), Dlx2 y EGFR. Además, actúan como precursores intermedios entre las células tipo B y los neuroblastos y los oligodendroblastos, también conocidos como células tipo A (F. Doetsch et al., 1999; Fiona Doetsch, García-Verdugo, et al., 1997; Parras et al., 2004). En lo que se refiere a su actuación como progenitores intermedios, se debe a la interacción entre Dlx2 y la presencia del EGF, el cual es reconocido por EGFR; de tal manera que ambos componentes permiten la transición de células tipo C a células tipo A (Fiona Doetsch, Petreanu, Caille, Garcia-Verdugo, & Alvarez-Buylla, 2002; Gonzalez-Perez & Alvarez-Buylla, 2011; Suh et al., 2009). Además, como era de esperar, este tipo de células tiene capacidad de auto-renovación, aunque limitada, ya que solo son capaces de dividirse hasta en tres ocasiones antes de la transición a neuroblastos (Ponti, Obernier, Guinto, et al., 2013).

- **Células tipo E.** Las células tipo E o endimarias establecen una separación entre la V-SVZ y la cavidad de los ventrículos laterales. Se distribuyen formando una monocapa a lo largo de todo el

ventrículo y son el segundo tipo celular más abundante de la V-SVZ por detrás de las células tipo A. En lo que se refiere a su estructura, estas células se caracterizan por presentar una forma cúbica, fuertes interdigitaciones con complejos de unión lateral y, en la superficie en contacto con el ventrículo, nos encontramos con microvellosidades y cilios expuestos al líquido cefalorraquídeo (Fiona Doetsch, García-Verdugo, & Alvarez-Buylla, 1997). En función de la cantidad de cilios, las células E se puede dividir en E1 y E2, de tal manera que las de tipo E1 son aquellas que presentan múltiples cilios, mientras que las de tipo E2 únicamente presentan dos cilios y cuerpos basales extraordinariamente complejos (Mirzadeh et al., 2008). Además, presentan una gran cantidad de mitocondrias en el citoplasma apical (Fiona Doetsch, García-Verdugo, et al., 1997). Molecularmente, las células E expresan marcadores de proliferación como Sox9, Sox2 y Nestina, debido a que proceden de las células radiales gliales embrionarias al igual que las células B (Ortiz-A ´ lvarez, Daclin, Shihavuddin, & Meunier, 2019). Sin embargo, se ha demostrado que este tipo de células no actúan como células madre, es decir, no presentan capacidad de generar nuevas células ni de auto-renovación (Abrous, Koehl, & Le Moal, 2005; Capela & Temple, 2002; Chiasson, Tropepe, Morshead, & Van Der Kooy, 1999; Shah et al., 2018). Por otro lado, también son capaces de expresar otros marcadores más específicos como es el caso de CD24, CD133 y S100 $\beta$  (Calaora, Chazal, Nielsen, Rougon, & Moreau, 1996; Mirzadeh et al., 2008). Funcionalmente, las células endoteliales de la V-SVZ participan del proceso de neurogénesis mediante la liberación de Noggin, la cual actúa como

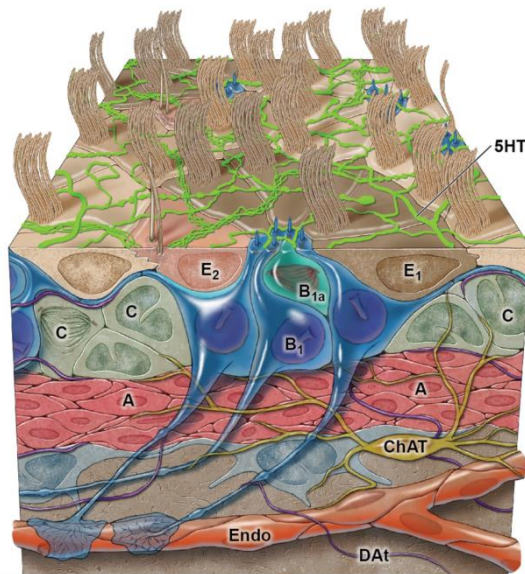
antagonista de las proteínas morfogenéticas óseas (*bone morphogenetic protein*, BMP), las cuales inhiben el proceso de neurogénesis (Lim et al., 2000). Este antagonista es reconocido por parte de las células tipo B gracias a la estructura *pinwheel* mencionada anteriormente y formada por una células tipo B1, una célula E1 y otra E2 (Mirzadeh et al., 2008). Además las células endimarias también contribuyen en la regulación de la neurogénesis a través del movimiento coordinador de sus cilios el cual contribuye a la dinámica del líquido cefalorraquídeo que es esencial para la exposición de las células tipo E1 a los distintos compuestos quimioatrayentes y tróficos necesarios para una correcta neurogénesis (Ortiz-A ´ lvarez et al., 2019; Spassky & Meunier, 2017).

- **Células tipo A.** Las células tipo A también se conocen como progenitores neurales migradores, células migradoras o neuronas migradoras debido a su rol central en el proceso de migración. Se trata de la última etapa del proceso de neurogénesis en la V-SVZ y es el tipo celular más abundante en esta zona. La estructura de estas células se caracteriza por presentar un cuerpo alargado con un o dos elongaciones, de dos a cuatro nucléolos, un aparato de Golgi y un retículo endoplasmático rugoso de pequeño tamaño, y una gran cantidad de microtúbulos orientados a lo largo del eje de las células. La disposición en la cual se suelen encontrar estas células es formando cadenas tangenciales y estableciendo complejos de unión entre ellas en los cuales aparecen vesículas endocíticas. A estas cadenas se asocian las células de tipo B a lo largo de todos los niveles de la V-SVZ, y en ocasiones se ha

encontrado la presencia de células tipo C que actúan conectando estas cadenas a nivel de la V-SVZ (Fiona Doetsch, García-Verdugo, et al., 1997). Estas cadenas de células migradoras se extienden desde la V-SVZ hasta los bulbos olfatorios de manera tangencial y formando lo que se conoce como RMS. El proceso mediante el cual estas cadenas celulares permiten el desplazamiento de las células tipo A se denomina migración neural y será analizada en detalle en el siguiente apartado.

Volviendo a las células tipo A cabe mencionar que a nivel molecular expresan distintos y característicos marcadores asociados al proceso de migración, como es el caso de la proteína asociada a microtúbulos, Doblecortina (DCX), la molécula de adhesión celular neural polisialilada (*Polysialylated-neural cell adhesion molecule*, PSA-NCAM) y Tuj1 (Fiona Doetsch, García-Verdugo, et al., 1997; Francis et al., 1999; Gleeson, Peter T, Flanagan, & Walsh, 1999; Yang et al., 2004). Por último, a nivel funcional son capaces de dividirse para generar nuevas células migradoras hasta un máximo de dos ocasiones, aunque generalmente se restringe a una única división (Ponti, Obernier, Guintoa, et al., 2013). También se ha demostrado su posible capacidad en la regulación de la proliferación y la actividad de las células B1 mediante la liberación de GABA de manera tónica, que es capaz de reducir la proliferación en este tipo de células (Fernando et al., 2011; X. Liu, Wang, Haydar, & Bordey, 2005). Además su mayor característica es la capacidad que presentan para migrar desde la V-SVZ hasta el bulbo olfatorio y una vez se encuentran en la capas glomerular, granular y plexiforme externa son capaces de diferenciarse en interneuronas

maduras (Alvarez-Buylla & García-Verdugo, 2002). Sin embargo, este tipo de células también son capaces de migrar hacia otras zonas del cerebro como el cuerpo caloso o el estriado, en las que previamente se ha producido una lesión (Lu et al., 2016); y no solo eso, sino que se ha observado que durante el proceso de migración puede re-especificarse y generar nuevos oligodendrocitos lo cual favorecería el proceso de remielinización (Cayre, Bancila, Virard, Borges, & Durbec, 2006). Esto demuestra la versatilidad funcional que presenta este tipo de células.



**Figura 4.** Esquema de la V-SVZ con los tipos celulares que la componen. (Lim & Alvarez-Buylla, 2014)

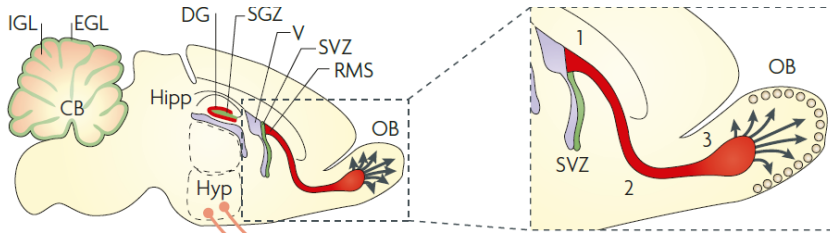
### **1.1.3. Migración neural: V-SVZ/OB**

Tal y como se ha mencionado anteriormente, todo lo observado hasta el momento indica que por regla general las nuevas células tipo A generadas en la V-SVZ se desplazan a lo largo de la RMS hasta alcanzar el bulbo olfatorio del cerebro adulto. Este proceso es conocido como migración neural y consta de distintas partes; las cuales se abordaran en subapartados diferentes. Por un lado, nos encontramos con el proceso de migración el cual a su vez está formado por dos procesos: la migración tangencial a lo largo de la RMS y la migración radial entre las distintas capas del bulbo olfatorio. Por otro lado, también es preciso mencionar los distintos mecanismos mediante los cuales se regulan estos procesos de migración y se basan en componentes de quimioatracción y quimiorrepulsión. Por último, también se destinará un pequeño subapartado sobre este proceso y los distintos avances en el caso del cerebro adulto humano, al igual que se ha hecho anteriormente con otros conceptos teóricos.

#### **1.1.3.1. Migración tangencial y rostral**

Hasta el momento se han descrito dos tipos de migración neural según la orientación que presenten: la migración tangencial y la migración radial. La primera es aquella que se produce de manera ortogonal y que encontramos a lo largo de la RMS; mientras que, la migración radial es aquella en la que la dirección es hacia la superficie cerebral y se corresponde con la que se produce una vez las células tipo A han alcanzado el bulbo olfatorio (Marín & Rubenstein, 2003) .



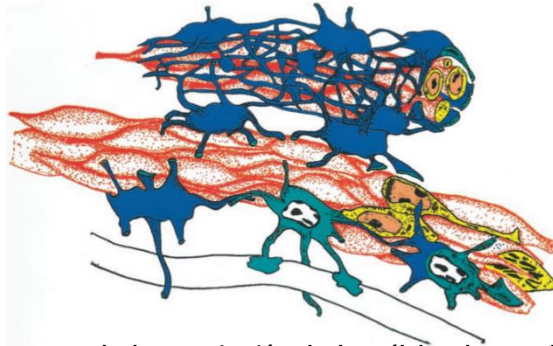


**Figura 5. Esquema de la migración neural desde la V-SVZ hasta el OB.** Las células migradoras inician su migración desde la V-SVZ (1) en forma de cadenas (2) y se dirigen hacia el bulbo olfativo (OB), donde terminan su migración (3). Imagen modificada de Ghashghaei, Lai, & Anton, 2007.

En la migración tangencial de la RMS, el proceso gira en torno a una serie de cadenas de células sin necesidad de una fibra glial o axón que actúe como guía (Wichterle, García-Verdugo, & Alvarez-Buylla, 1997). Estas estructuras celulares se extienden desde V-SVZ hasta el bulbo olfatorio a lo largo de toda la RMS; y están formadas por células tipo A que se disponen en forma de cadena y que se encuentran rodeadas por células tipo B (Fiona Doetsch, García-Verdugo, et al., 1997). Por tanto, la migración a lo largo de la RMS se produce a través de estos agregados celulares y gracias a la existencia de distintos tipos de uniones celulares que permiten el movimiento de las células tipo A. En concreto, este movimiento se produce gracias a interacciones entre microtúbulos, miosina II, moléculas de adhesión celular como es el caso de PSA-NCAM, integrinas, las tenascinas y distintos componentes de la matriz extracelular. Todos ellos, y en consonancia con las señales de orientación extracelular, permiten que las células tipo A sean capaces de moverse de forma escalonada y compleja de la siguiente manera: (1) las células extienden una neurita líder precedida por un cono de crecimiento que se extiende y contrae a media que explora el microambiente, (2) translocación del núcleo (nucleocinesis) hacia la

neurítica líder, y (3) translocación somal hacia el cono de crecimiento. Este proceso se repite continuamente permitiendo que se produzca un movimiento de tipo saltatorio de las células tipo A los largo de toda la RMS (Ayala, Shu, & Tsai, 2007; Lim & Alvarez-buylla, 2016).

En todo este proceso tan complejo de migración los principales componentes que participan son el citoesqueleto de actina y de microtúbulos; y sus respectivas proteínas asociadas. Por un lado, se ha demostrado que la proteína asociada a la actina, miosina II, presenta un importante papel en el proceso de nucleocinesis. De tal manera que la contracción de la red actina-miosina detrás del núcleo permite un "empuje" hacia delante que hace posible el movimiento nuclear, y la separación de la célula de su entorno extracelular participando en la retracción del proceso de arrastre (Bellion, Baudoin, Alvarez, Bornens, & Métin, 2005; Schaar & McConnell, 2005). Por otro lado, la principal proteína asociada a microtúbulos (*microtubule associated protein*, MAP) que participa en el proceso de migración tangencial es la DCX. Estudios recientes, han demostrado la relación entre la quinasa Cdk5 y DCX durante la migración neural. Cdk5 es capaz de fosforilar DCX en Ser297, impidiendo que DCX se una a los microtúbulos. La disminución de la unión de DCX a los microtúbulos, desemboca en la despolimerización de estos; mientras que la unión favorece su polimerización. De esta manera, DCX participa en la regulación de la dinámica de los microtúbulos y por tanto en el proceso de migración (Ayala et al., 2007; Lasser, Tiber, & Lowery, 2018; Nishimura et al., 2014).



**Figura 6. Esquema de la organización de las células durante la migración tangencial a lo largo de la RMS.** Las células tipo B se muestran en azul, las tipo A en rojo y amarillo; y los astrocitos en azul claro. (Alvarez-Buylla & Garcia-Verdugo, 2002)

Tras este proceso de migración tangencial, las células tipo A llegan al bulbo olfatorio y una vez ahí migran radialmente entre las distintas capas de esta estructura. Al contrario que en la migración tangencial, en este caso sí que se precisa de una fibra glial que actúe como guía para el movimiento de las células tipo A (Wichterle et al., 1997). Se ha observado que este movimiento se puede producir de dos formas distintas: translocación somal o locomoción. En el caso de la translocación somal, las neuronas extienden un largo proceso principal con extremos ramificados unidos a la superficie pial y seguidamente se produce una nucleocinesis y el acortamiento del proceso principal, provocando que el cuerpo celular sea arrastrado progresivamente. En el modo de locomoción, las neuronas extienden un proceso principal más corto y no ramificado que no termina en la superficie pial y cuya longitud permanece relativamente estable durante la migración, produciéndose así un movimiento saltatorio (Ghashghaei, Lai, & Anton, 2007; Nadarajah, Brunstrom, Grutzendler, Wong, & Pearlman, 2001). Al igual que en la migración tangencial, este movimiento viene

regulado por la dinámica del citoesqueleto; tanto de actinas como de microtúbulos.

Por último, también es importante destacar el papel de los vasos sanguíneos en ambos tipos de migración neural. Distintos estudios han demostrado la implicación de los vasos sanguíneos en los distintos tipos de armazones que contribuyen y permiten la migración tanto a lo largo de la RMS como en el bulbo olfatorio. Este papel parece ser evidente cuando la migración se produce como consecuencia de un daño que requiere de regeneración por parte de la V-SVZ (Cayre et al., 2013; Kojima et al., 2010). Sin embargo, también parece estar presente de manera fisiológica en el cerebro adulto (Fujioka, Kaneko, & Sawamoto, 2019; Kaneko, Sawada, & Sawamoto, 2017; Snapyan et al., 2009; Whitman, Fan, Relat, Rodríguez-Gil, & Greer, 2009).

### **1.1.3.2. Regulación migración neural**

Para conseguir una migración neural lo más eficiente y precisa posible es necesario señales de orientación extracelular que se interpretan a través de receptores, los cuales a su vez transmiten señales a una red de vías de señalización intracelular, que finalmente convergen en el citoesqueleto. Por lo tanto, cuando hablamos de migración neural debemos tener en cuenta que es un proceso complejo llevado a cabo gracias a una gran red de señalización interactiva formada por distintas vías. Entre las vías de señalización nos encontramos con moléculas de orientación a larga distancia, moléculas instructivas de corta distancia y complejos de adhesión celular.

En la señalización de la orientación a larga distancia destacan la Netrina-1 y el sistema Slit/Robo. Por un lado, la Netrina-1 es una molécula quimioatrayente que actúa estimulando la dinámica de microtúbulos y actina a través de GSK3 $\beta$  y Cdk5, al unirse al receptor DCC (Ayala et al., 2007). Algunos estudios han demostrado que es liberada por parte del bulbo olfatorio, lo cual corroboraría su acción como quimioatrayente y molécula de orientación a larga distancia (Astic, Pellier-Monnin, Saucier, Charrier, & Mehlen, 2002; Murase & Horwitz, 2002). Sin embargo, previamente otros grupos ya habían demostrado que el bulbo olfatorio no parece ser esencial para la migración direccional (Jankovski, Garcia, Soriano, & Sotelo, 1998; Kirschenbaum, Doetsch, Lois, & Alvarez-Buylla, 1999). Por lo tanto, la Netrina-1 parecería carecer de funcionalidad, pero estudios recientes han identificado la Netrina-1 en la V-SVZ como un factor clave en la angiogénesis local y la migración de células progenitoras tras un proceso de desmielinización (Cayre et al., 2013).

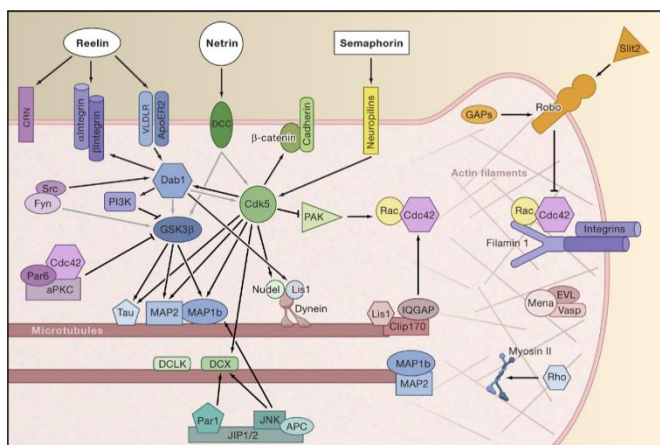
Por otro lado, el sistema Slit/Robo consiste en una vía de quimiorrepulsión formada por las proteínas Slits y sus correspondientes receptores Robo. Actúa como guía tanto en la migración radial como en la tangencial. Los receptores Robo son expresados tanto en la V-SVZ como a lo largo de la RMS (Marillat et al., 2002; Nguyen-Ba-Charvet et al., 2004). Mientras que la proteína Slit se ha observado que es secretada por las zonas circundantes a la V-SVZ como el estriado, el septum y plexos coroideos (Hu, 1999; Wu et al., 1999); pero estudios más recientes también han comprobado que tanto las células tipo A como las tipo C son capaces de secretar esta proteína y por tanto

podría actuar de forma autónoma (Nguyen-Ba-Charvet et al., 2004). Respecto a su regulación, se ha observado que el flujo del líquido cefalorraquídeo regulado por los cilios de las células E es el responsable del mantenimiento de un gradiente de concentración de Slit, manteniendo la mayor concentración en la V-SVZ posterior (Sawamoto et al., 2006). Por último, el mecanismo de acción propuesto hasta el momento consiste en que la unión de Slit al receptor Robo provoca una serie de eventos morfológicos en los que se incluye la reorientación del centrosoma a través de la acción de GSK3 $\beta$  (Higginbotham, Tanaka, Brinkman, & Gleeson, 2006).

Respecto a la señalización a corta distancia nos encontramos con los neurotransmisores GABA y NMDA y sus correspondientes receptores. Las células tipo A son capaces de expresar ambos tipos de receptores (Métin, Denizot, & Ropert, 2000; Moya & Valdeolmillos, 2004; Poluch & König, 2002). En ambos casos, la señal de estos neurotransmisores se encuentra mediada por cambios en la concentración de Ca<sup>2+</sup> provocando una disminución en la velocidad de migración en el caso de GABA y un aumento de la migración en el caso del NMDA (Bolteus & Bordey, 2004; Komuro & Rakic, 1993; Snapyan et al., 2009).

Por último, nos encontramos con la regulación de la migración a través de proceso de adhesión celular. Es el caso de la glicoproteína de la matriz extracelular; Reelina. Esta proteína es secretada por las células mitrales del bulbo olfatorio, las cuales son las principales dianas de las células tipo A (Hack, Bancila, Loulier, Carroll, & Cremer, 2002). A nivel molecular, esta proteína es reconocida por los receptores ApoER2 y VLDLR, cuya unión provoca la fosforilación de Dab1 que dará lugar a la

activación de una serie de vías de señalización entre las cuales se encuentran la vía de Cdk5, la de GSK3 $\beta$  y la de PI3K (Beffert et al., 2004; Bock et al., 2003; Gonzalez-Billault, Uren, Jime, Barallobre, & Pascual, 2005; Graham et al., 2004). A pesar de ser secreta desde el bulbo olfatorio, no parece que actúe como una molécula de dirección de la migración como es el caso de la proteína Slit. Sin embargo, sí se ha demostrado su capacidad como señal de separación para las cadenas de células tipo A. Concretamente, la señal de reelina es capaz de romper las interacciones de adherencia establecidas entre las células tipo A provenientes de la RMS, permitiendo de esta manera el paso de la migración tangencial/colectiva a la migración radial/individual (Cayre, Canoll, & Goldman, 2010; Hack et al., 2002; Sawada, Huang, Hirota, Kaneko, & Sawamoto, 2011). Además al ser secretadas por las células mitrales del bulbo olfatorio, también actúan como señal de reclutamiento de nuevas neuronas que tenga por destino el bulbo olfatorio a través de la vía de PI3K (Hack et al., 2002; Simó et al., 2007).



**Figura 7. Esquema de la regulación necesaria para la migración neural.** (Ayala et al., 2007)

### 1.1.3.3. Migración neural en el cerebro humano

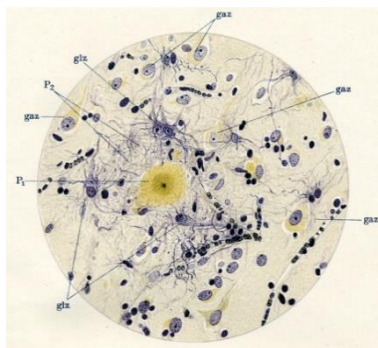
Al igual que sucede con la neurogénesis, también existe cierta controversia respecto a la existencia o no de la migración neural en el cerebro adulto humano, sobre todo en lo que respecta a la estructura de la RMS. En un primer momento se llegó a afirmar que debido a la distancia entre los bulbos olfatorios y la V-SVZ en el cerebro humano, no existían neuronas migradoras, pese a la presencia de neurogénesis en la V-SVZ (H. Sanai et al., 2004). Sin embargo, estudios posteriores que incluyeron el uso de resonancia magnética, de marcaje con BrdU y de cerebros humanos enteros, sí que observaron la existencia de neuronas migradoras en el cerebro humano y no solo eso sino también su similitud con lo descrito en el cerebro adulto de roedores (Curtis et al., 2007). Wang y cols. también observaron la existencia de RMS tanto en el cerebro humano fetal (22-24 semanas de gestación) como en el adulto (entre 35 y 70 años); aunque en el caso de este último el número de neuronas migradoras era mucho menor provocando que no se distribuyeran formando cadenas (Wang et al., 2011). Paralelamente Sanai y cols. demostraron que existe una clara y robusta RMS y migración neural hasta los 18 meses; y a partir de entonces disminuye en los niños mayores (2 a 17 años) y prácticamente es inexistente en los adultos (30 a 84 años). Sin embargo en este mismo trabajo se observó en muestras de entre 4 y 6 meses, la existencia de neuronas migradoras que escapan medialmente de la RMS formando una vía migratoria medial (*medial migratory stream*, MMS) que se dirige a una subregión de la corteza prefrontal humana (N. Sanai et al., 2011). Por lo tanto se podría



concluir que pese a estar demostrada la existencia de neurogénesis en la V-SVZ del cerebro adulto humano sus funciones fisiológicas parecen estar muy limitadas y disminuidas con la edad.

## 1.2. Enfermedad de Alzheimer

A principios del siglo pasado el doctor alemán Alois Alzheimer describió por primera vez, tanto a nivel clínico como histológico, la enfermedad neurodegenerativa que actualmente lleva su nombre. El doctor Alzheimer describió en la paciente de 51 años, Auguste Deter, una serie de síntomas cognitivos propios de las demencias seniles (Maurer, Volk, & Gerbaldo, 1997). Tras el fallecimiento de Deter, el estudio histológico de su cerebro permitió el descubrimiento de dos tipos de lesiones nunca vistas hasta ese momento: unas placas de una sustancia no definida que se denominaron *miliary foci* que actualmente se conocen como placas amiloides; y la presencia de pequeñas fibrillas en forma de ovillos (Alzheimer, 1907).



**Figura 8. Ilustración de Alzheimer de las placas amiloides y los ovillos neurofibrilares. (Alzheimer, 1911)**

En la actualidad, la enfermedad de Alzheimer (EA) se define como una enfermedad neurodegenerativa que causa demencia y asociada a la edad. A nivel clínico se caracteriza por la pérdida progresiva de las funciones mentales superiores; empezando por la pérdida de la memoria episódica que será el principal criterio diagnóstico. Este deterioro cognitivo evoluciona hasta el punto en el que el paciente ve totalmente limitadas sus Actividades de la Vida Diaria, convirtiéndose en una persona completamente dependiente (Marshall, Amariglio, Sperling, & Rentz, 2012). Esta situación provoca que la EA se haya convertido en los últimos años en una de las enfermedades más preocupantes entre la sociedad por su gran carga social y económica.

A nivel molecular, tal y como describió Alzheimer; esta enfermedad se caracteriza principalmente por la presencia de placas amiloides (depósitos de péptido, beta-amiloide, A $\beta$ ) y ovillos neurofibrilares (acumulación de proteína tau hiperfosforilada, p-tau) que provocan una serie cambios citológicos, histológicos y bioquímicos que derivan en un proceso de neurodegeneración (Jeong, 2017). Esta muerte neuronal tiene lugar en distintas zonas del cerebro como el neocórtex, la corteza entorrinal y el hipocampo; siendo estas últimas las que neurodegeneran en las primeras fase de la EA (Duyckaerts, Delatour, & Potier, 2009; Morgan, Colombres, Nuñez, & Inestrosa, 2004).

Desgraciadamente, pese a haber sido descrita hace más de cien años, actualmente no existe ningún tratamiento lo suficientemente efectivo como para hacer frente a la EA y detener su avance de manera definitiva. De hecho, este último año ha sido aprobado un nuevo tratamiento por parte de la Agencia Estadounidense del Medicamento

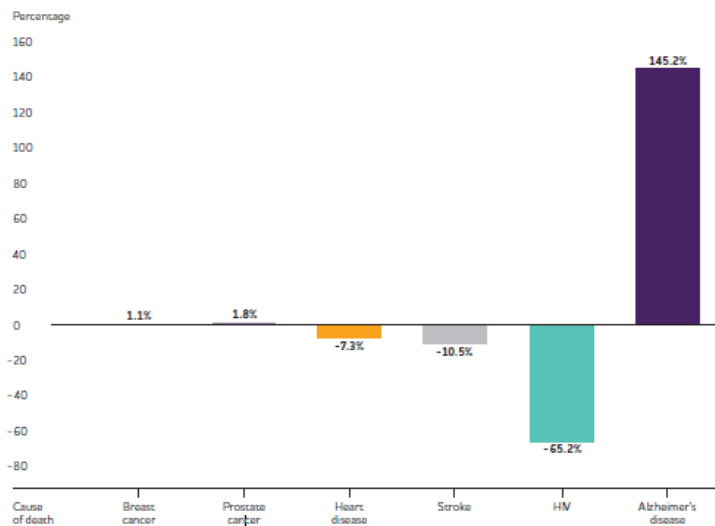
(*Food and Drug Administration, FDA*) por la vía de la aprobación acelerada y después de 18 años desde que se aprobara el último tratamiento (FDA, 2021). Sin embargo, los resultados en cuanto a mejora en la cognición son controvertidos y por ello, resulta obvio la necesidad imperante de seguir ampliando el conocimiento sobre la EA. En los siguientes apartados se abordarán los puntos más importantes relativos a la EA, entre los que se encuentran: la epidemiología, la fisiopatología y etiología; y su relación con el proceso de neurogénesis.

### 1.2.1. Epidemiología de la enfermedad de Alzheimer

Tal y como se ha mencionado anteriormente la EA es una enfermedad asociada al envejecimiento. Por lo tanto, el aumento de la esperanza de vida y envejecimiento general de la población, sobre todo, en los denominados países desarrollados; ha provocado que la EA junto con otras demencias aumente su incidencia en los últimos años. De hecho según los últimos datos recogidos por Naciones Unidas, en 2019 el 13.2% de la población mundial tenía más de 60 años y se pronostica que esta situación siga al alza hasta alcanzar más del 20% en el 2050 (Nations, 2019). Sin embargo, hay que tener en cuenta que según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las demencias no pueden considerarse dentro de un proceso de envejecimiento normal (Organización Mundial de la Salud & Organización Panamericana de la Salud, 2012).

Entre las demencias nos encontramos con la EA, la demencia frontotemporal, la demencia de los cuerpos de Lewy y la demencia vascular.

Según la OMS y la *Alzheimer's Disease International* (ADI) se calcula que, a día de hoy, hay aproximadamente 50 millones de personas en todo el mundo que sufren cualquier tipo de demencia, de las cuales alrededor de dos tercios padecen EA, siendo así la demencia más común (Patterson C., 2018). Además, estas cifras podrían verse triplicadas en 2050, hasta alcanzar los 152 millones de personas con una demencia; lo cual nos indica el avance cada vez mayor de esta enfermedad. De hecho según la *Alzheimer's Association* (AA) entre 2000 y 2019 las muerte por EA han aumentado un 145% (Alzheimer's Association, 2021).



**Figura 9. Cambios en el porcentaje en causas de muerte seleccionadas.**  
(Alzheimer's Association, 2021)

Sin embargo, debemos tener en cuenta que la incidencia de la EA no es igual en todos los rangos de edad. De tal manera, que aumenta significativamente a partir de rangos de edad superiores a 65 años. El

aumento es tal que en la población de entre 60 y 64 años la incidencia es de 6,24 casos por cada 1000 personas, mientras que en los mayores de 80 años, alcanza un 39,31 (Cornutiu, 2015). Por último, cabe destacar el efecto que ha tenido el Covid19 sobre la incidencia en la EA. Según el último informe de la AA, en Estados Unidos a lo largo del año 2020 se ha producido un exceso de fallecimientos por Alzheimer y otras demencias, del 16% respecto a la media observada en los cinco años anteriores (2015-2019) (Alzheimer's Association, 2021).

### **1.2.2. Etiología y Fisiopatología de la EA**

Hay dos tipos de EA: la forma familiar y la forma esporádica. La EA familiar, es de origen genético y se caracteriza principalmente porque se desarrolla a edades muy tempranas, alrededor de los 50 años y se ocasiona debido a mutaciones dominantes en los genes que codifican: la proteína precursora de amiloide (APP), la presenilina 1 (PS1) o la presenilina 2 (PS2) (Bateman et al., 2011; Rogaev et al., 1995). Estas proteínas serán abordadas con un mayor detalle más adelante. Sin embargo, se considera que únicamente entre el 1 y el 10% de los casos de EA tienen un origen genético (Carrillo-Mora, Luna, & Colín-Barenque, 2014; van der Flier, Pijnenburg, Fox, & Scheltens, 2011). El resto de los casos será esporádicos. La EA esporádica, tiene un origen desconocido aunque se ha demostrado que intervienen tanto factores genéticos, como el polimorfismo  $\epsilon 4$  de la apolipoproteína E; como factores ambientales, como la ansiedad, el sueño o la nutrición (Fuchsberger et al., 2019; M. A. Lloret et al., 2020; Mendez, 2021; Uddin et al., 2019). Es la forma más frecuente de la enfermedad suponiendo entre un 90 y un 99% de los casos. Además, su incidencia

comienza a aumentar significativamente a partir de los 65 años, más tarde que la familiar.

### 1.2.2.1. Teorías sobre la etiología de la EA

En lo que se refiere a la etiología de la forma esporádica de la EA se desconoce cuál puede llegar a ser; aunque existen diversas teorías que apuntan a distintas causas. Algunas de ellas son las siguientes:

- La teoría de la cascada amiloide: se basa en las mutaciones observadas en la proteína APP en la EA familiar. Según esta hipótesis la acumulación de depósitos del péptido A $\beta$  sería el desencadenante de los ovillos, la neurodegeneración y el déficit cognitivo (P. P. Liu, Xie, Meng, & Kang, 2019; Walsh et al., 2002).
- La hipótesis de la propagación de Tau: Esta teoría se centra en la proteína Tau, cuya hiperfosforilación provoca la formación de los ovillos neurofibrilares. Además según esta hipótesis, Tau es esencial para la neurotoxicidad inducida por A $\beta$  y afecta la señal de transmisión entre las neuronas (P. P. Liu et al., 2019; Rapoport, Dawson, Binder, Vitek, & Ferreira, 2002).
- Hipótesis neurovascular: Según esta hipótesis el daño en la vasculatura cerebral debido a diversas causas como la hiperlipidemia y la hiperglicemia, sería el responsable del desarrollo de la EA. Algunos de los ítems que apuntan los autores defensores de esta teoría, es la importancia de la neurovasculatura en la eliminación del péptido A $\beta$  y que esta disfunción es previa a la neurodegeneración (Knopman & Roberts, 2010; Sagare, Bell, & Zlokovic, 2013).

En los siguientes apartados se abordarán de una manera más detallada la fisiopatología de la EA en lo que se refiere a los dos puntos que consideramos más importantes: las placas amiloides y los ovillos neurofibrilares.

#### 1.2.2.2. Agregación péptido A $\beta$ : placas amiloides

Las placas amiloides están formadas principalmente por la agregación del péptido A $\beta$ . Este péptido procede de la APP que se encuentra en la bicapa lipídica de las neuronas y presenta tres dominios: un dominio transmembrana, uno citoplasmático que se corresponde con el extremo C-terminal y otro extracelular donde se encuentra el extremo N-terminal (Morgan et al., 2004). Esta proteína se ha preservado a lo largo de la evolución; de tal manera que podemos encontrar proteínas homologas en la mayoría de las especies, desde *Drosophila* a humanos (Selkoe, 2001). Por tanto, es obvio pensar que esta proteína debe tener un importante papel fisiológico. De hecho, diversos autores han demostrado la participación de esta proteína en diversos procesos de carácter fisiológico entre los que se encuentra la plasticidad sináptica y la neurogénesis (Sosa et al., 2017; Young-Pearse et al., 2007; Zhou et al., 2011). En el caso de la neurogénesis, el papel de la proteína APP será explicado con mayor detalle en un apartado más adelante.

Una vez en la membrana, la proteína APP puede ser procesada siguiendo dos vías distintas que van a dar lugar a péptidos diferentes. Dichas vías son: la vía amiloidogénica y la vía no amiloidogénica.

- Vía no amiloidogénica: la proteína APP es procesada por la  $\alpha$ -secretasa dando lugar a dos fragmentos: el ectodominio

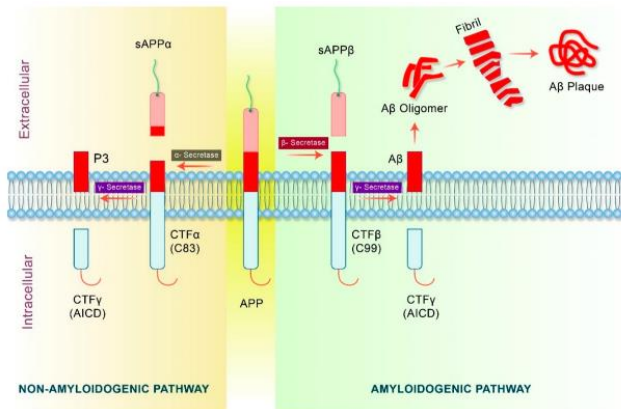
sAPP $\alpha$  y el fragmento con el extremo C-terminal, C83. No existe una única  $\alpha$ -secretasa encargada de este corte, sino que es realizado por distintas proteínas de la familia ADAM.

Por un lado, el fragmento sAPP $\alpha$  es liberado al espacio extracelular. Por otro lado, el fragmento C83 se mantiene anclado a la membrana y es procesado por la  $\gamma$ -secretasa dando lugar a un pequeño péptido p3, de sólo 3 kDa, que es liberado al exterior; y el péptido AICD (APP *intracellular domain*) que pasa a formar parte del citoplasma (Nhan, Chiang, & Koo, 2015). Esta  $\gamma$ -secretasa se trata de un complejo proteico formado por las proteínas: presenilina 1 y 2 (PS), nicastrina, potenciador de presenilina 2 (PEN-2) y APH-1 (X. Zhang, Li, Xu, & Zhang, 2014). En lo que refiere a la función de estos péptidos según parece tanto sAPP $\alpha$  como AICD juegan un importante papel en el proceso de neurogénesis mientras que los fragmentos C83 y p3 no parecen tener un papel relevante a nivel fisiológico (Zhou et al., 2011). Aunque se ha observado que en el caso de p3 podría actuar de manera tóxica; procediendo a una agregación de manera similar al péptido A $\beta$  (Kuhn, Abrams, Knowlton, & Raskatov, 2020).

- Vía amiloidogénica: en esta vía la proteína APP es procesada en primer lugar por una  $\beta$ -secretasa, concretamente por BACE1. Esta secretasa presenta dos sitios de corte en la proteína APP: en E682 y en D672. Por un lado, el primer sitio se encuentra dentro del péptido A $\beta$  y da lugar a un fragmento sAPP $\beta$ <sup>606</sup> que es liberado al espacio extracelular y a un



producto C-terminal C89, el cual a su vez es procesado por la  $\gamma$ -secretasa generando un péptido A $\beta$  truncado (Deng et al., 2013). Por otro lado, el corte de BACE en el sitio D672 da como resultado la generación del fragmento sAPP $\beta^{596}$  que pasa al espacio extracelular, y el fragmento C99 anclado en la membrana. Este fragmento es procesado, de nuevo, por el complejo de la  $\gamma$ -secretasa que, ahora sí, da como resultado el péptido A $\beta$  de entre 40 a 42 aminoácidos y liberado al espacio extracelular; y un fragmento AICD que presenta la misma naturaleza que el generado en la vía no-amiloidogénica y se traslada al citoplasma (Nhan et al., 2015).



**Figura 10. Procesamiento de la proteína APP.** (Rahman et al., 2020)

Una vez el péptido A $\beta$  es liberado al espacio extracelular comienza un proceso de agregación que desemboca en la formación de las placas amiloides, también conocidas como placas seniles. El péptido A $\beta$  presenta una estructura secundaria en forma de hoja  $\beta$  plegada (Walsh et al., 1999) que da lugar a un proceso de agregación. Este proceso comienza con la formación de pequeños oligómeros de A $\beta$  los cuales se unen formando protofibrillas que se reorganizan formando fibrillas

de un tamaño entre 6 y 10 nm y que siguen agregándose hasta formar placas insolubles amiloides de 10 a 120  $\mu\text{m}$  de diámetro con una forma esférica (Finder & Glockshuber, 2007; Morgan et al., 2004). Hasta el momento se desconoce con claridad el mecanismo molecular que da lugar a este tipo de agregación.

Estas placas amiloides están formadas por un núcleo central constituido principalmente por el péptido  $\text{A}\beta$  y restos de neuritas distróficas alrededor de dicho núcleo (Duyckaerts et al., 2009). Además del péptido  $\text{A}\beta$ , en este núcleo podemos encontrar otros componentes como: proteoglicanos (heparán, queratina...); moléculas inflamatorias como citoquinas e inmunoglobulinas; moléculas del suero como el componente P amiloide; iones metálicos (Fe, Cu...); moléculas relacionadas con la amiloidogénesis como la apolipoproteína E; proteasas (ubiquitina,  $\alpha$ -tripsina...); componentes antioxidantes (ferritina, catalasa...), colinesterasas y otras proteínas como la clusterina (Atwood, Martins, Smith, & Perry, 2002).

La localización de estas placas depende de la fase de la enfermedad en el que nos encontremos. De tal manera que, en las primeras etapas de la EA comienzan a aparecer en la corteza entorrinal y poco a poco se van extendiendo hasta alcanzar todo el encéfalo, sobre todo, el hipocampo y el neocórtex (Morgan et al., 2004). De hecho, cabe mencionar que el péptido  $\text{A}\beta$  comienza a acumularse ya en las fases preclínicas de la EA siendo este uno de los mayores hándicaps en la diagnóstico temprano (Dubois et al., 2016).

La presencia de las placas amiloides va a provocar la disfunción de distintos procesos celulares como el metabolismo energético, la homeostasis del calcio, la actividad sináptica y el balance entre agentes oxidantes y antioxidantes.

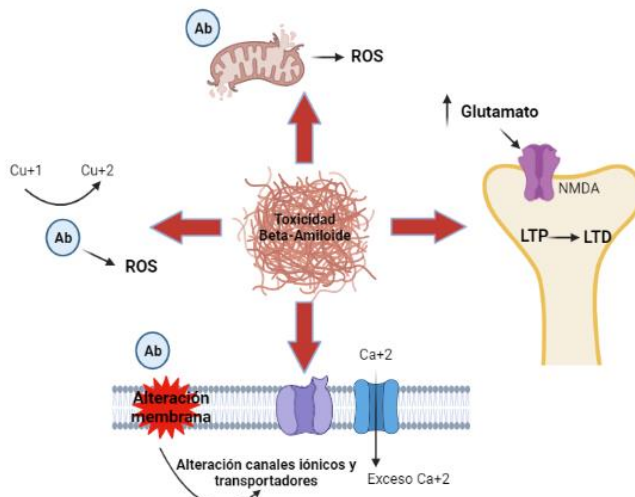
Por otro lado, el péptido A $\beta$  soluble, en forma de oligómeros, es capaz de internalizarse en la célula y producir un desequilibrio en el balance entre especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS) y agentes celulares antioxidantes, lo que se conoce como estrés oxidativo. Este desequilibrio se produce debido a que el péptido A $\beta$  en el interior celular es capaz de desacoplar la cadena transportadora de electrones reduciendo así la generación de ATP y aumentando el contenido de radicales libres (A. Lloret et al., 2008). Por otro lado, la presencia de las placas amiloides en el exterior celular genera la presencia de distintos iones metálicos como el cobre, hierro y zinc; los cuales son capaces de catalizar la producción de ROS en presencia de agentes reductores como el glutatión y ascorbato (Cheignon et al., 2018). Este estrés oxidativo presente alrededor de las células va a desencadenar la peroxidación de los lípidos que forman la membrana plasmática generándose tanto malondialdehído (MDA) como 4-hidroxinonenal (4-HNE) principalmente (X. Wang et al., 2014).

Estos daños en la membrana van a dar lugar a la disfunción de los transportadores tanto de lípidos como de glucosa. Al fallar los transportadores se va a producir una alteración del metabolismo energético de las neuronas, tanto de la glucosa como de los lípidos (Butterfield & Halliwell, 2019; Chew, Solomon, & Fonteh, 2020). Además el péptido A $\beta$  no va actuar únicamente sobre los

transportadores de glucosa y lípidos; sino también sobre las bombas de  $\text{Ca}^{2+}$ , de tal manera que, los inactiva y provoca una desregulación de los niveles de este ion en el interior de la célula, ya que, podrá entrar a través de los canales dependientes de voltaje pero no salir (X. Wang et al., 2014). Esta elevación en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  supone un fallo tanto en el retículo endoplasmático como en la mitocondria, contribuyendo así a la disfunción energética de la célula. Además, en la EA se ha observado un exceso de glutamato extracelular que va a provocar la sobreestimulación de los receptores NMDA de las neuronas contribuyendo a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en el interior celular, lo cual desemboca finalmente en la apoptosis celular, y por lo tanto, produciéndose un proceso de excitotoxicidad (Fuchsberger et al., 2016).

Paralelamente, la presencia de glutamato extracelular provoca que los receptores AMPA estén estimulados y permitan la entrada de  $\text{Na}^+$  al interior de la célula y consecuentemente, los receptores NMDA aumentan la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en la neurona postsináptica induciendo la potenciación a largo plazo (LTP, *Long Term Potentiation*); la cual es imprescindible para la actividad sináptica y la formación de la memoria (Lynch, 2004). Sin embargo, en la EA el exceso de glutamato inducido por la presencia de  $\text{A}\beta$  va a provocar el bloqueo de los receptores NMDA provocando que se desplace la activación de las cascadas de señalización inducidas por estos receptores hacia las vías implicadas en la inducción de la depresión a largo plazo (LTD, *Long Term Depression*) y la pérdida sináptica (Palop & Mucke, 2010). Conjuntamente  $\text{A}\beta$  induce la endocitosis de los receptores GABA

contribuyendo así aún más al exceso de glutamato y comprometiendo la generación del LTP (Ulrich, 2015). Además cabe destacar, que esta actividad LTP se ve comprometida principalmente en las regiones CA1, CA3 y giro dentado del hipocampo; que se corresponden con las zonas de mayor actividad sináptica para la formación de memoria (Frisoni, Fox, Jack, Scheltens, & Thompson, 2010).



**Figura 11. Esquema de la toxicidad del péptido Aβ y las placas amiloides.** Creado mediante BioRender.com

Otro punto importante a tener en cuenta sobre el péptido Aβ es su proceso de aclaramiento, el cual es casi igual de importante que su formación para el desarrollo de la EA. De tal manera que, la patología por Aβ se producirá cuando existe un desequilibrio entre el proceso de generación y el de degradación; y consecuentemente, los niveles de este péptido pasan a ser excesivos. Existen distintas proteínas implicadas en este proceso de eliminación del péptido Aβ entre las que se encuentran la neprilisina, la enzima degradadora de insulina y la enzima convertidora de angiotensina que actúan sobre el péptido libre

(Leissring et al., 2003; Zou et al., 2007); mientras que los activadores de plasminógeno son capaces de degradar los agregados de A $\beta$  (Tucker et al., 2000).

Además se ha observado, que A $\beta$  en lugar de ser degradado puede ser directamente aclarado al líquido intersticial (Bero et al., 2011) o bien hacia la sangre atravesando la barrera hematoencefálica (BHE). Para llevar a cabo este aclaramiento a través de la BHE es necesario la presencia de transportadores como el LRP-1 y la P-glicoproteína (Pflanzner et al., 2011; W. Wang, M. Bodles-Brakhop, & W. Barger, 2016). Por último, cabe añadir que existe un proceso en el sentido contrario en el que A $\beta$  pasa de la sangre al líquido cefalorraquídeo atravesando la BHE. Este paso es mediado por, entre otros, el transportador RAGE, lo cual además va a provocar la generación de estrés oxidativo (Kong et al., 2020).

Por último, según la teoría amiloide la formación de las placas amiloides es el origen de la EA y es causante del resto de cambios patológicos que se producen en esta enfermedad. Esta hipótesis se basa principalmente en las mutaciones que nos encontramos en la EA familiar, las cuales giran en torno a la formación de las placas amiloides (Bateman et al., 2011). Además, se ha observado que el principal riesgo conocido de sufrir EA es el polimorfismo E4 de la apolipoproteína E, la cual como ya hemos comentado previamente, se encuentra íntimamente relacionada con el péptido A $\beta$  (Hirsch-Reinshagen, Burgess, & Wellington, 2009). Paralelamente se ha observado que en ratones transgénicos de APP, el péptido A $\beta$  es capaz de inducir la hiperfosforilación de Tau (Götz et al., 2004). Sin embargo,

existen otras teorías para dar explicación a la relación entre A $\beta$  y Tau: que tengan un efecto sinérgico o bien que la toxicidad de A $\beta$  sea mediada por Tau (Ittner & Götz, 2011). También debemos tener en cuenta que diferentes aproximaciones farmacológicas basadas en A $\beta$  dieron como resultado mejoras en el déficit cognitivo, en los modelos murinos de EA utilizados; aunque, asimismo muchas otras terapias han fallado. Finalmente, es necesario añadir que muchos autores han demostrado que la cascada amiloide no se correlaciona con la pérdida neuronal y el deterioro cognitivo (Ricciarelli & Fedele, 2017). Por lo tanto, se puede concluir que esta hipótesis tiene sus pros y sus contras.

### 1.2.2.3. Hiperfosforilación de la proteína Tau: ovillos neurofibrilares

La proteína Tau pertenece a la familia de proteínas asociadas a microtúbulos (*microtubule associated proteins*, MAPs) y se encuentra principalmente en los axones neuronales de los mamíferos. Esta proteína juega un papel fundamental en la estabilidad de los microtúbulos que constituyen el citoesqueleto de las neuronas; mediante la formación de puentes entre las fibras de Tubulina (Alberts et al., 2008). La actividad de Tau regulada mediante un balance de fosforilación/desfosforilación en el sitio de unión a los microtúbulos, se consigue gracias a la acción de diferentes quinasas entre las que se encuentran Cdk5 y GSK3 $\beta$  (Gong & Iqbal, 2008).

La proteína Cdk5 es una quinasa que está implicada en diferentes procesos neuronales como la neurogénesis (Jessberger, Gage, Eisch, &

Lagace, 2009); y necesita asociarse a una proteína que actúe como coactivador para llevar a cabo su actividad enzimática, entre las cuales se encuentra p35 (Nikolic, Dudek, Kwon, Ramos, & Tsai, 1996). Mientras que, la quinasa GSK3 $\beta$  también se encuentra implicada en la neurogénesis, así como en la generación de LTP y la apoptosis (Beurel, Grieco, & Jope, 2015). Otro punto a tener, es que la actividad de esta quinasa se encuentra regulada por diferentes proteínas entre las cuales se encuentra RCAN1, pero también el péptido A $\beta$  (DaRocha-Souto et al., 2012; Ermak, Harris, Battocchio, & Davies, 2006).

En cuanto a la vía de toxicidad en la que están implicadas estas quinasas nos encontramos con que el exceso de Ca<sup>2+</sup> intracelular, ya descrito previamente, provoca que el coactivador p35 sea escindido por la calpaína y pase a ser p25. Esto hace que Cdk5 sea mucho más estable y presente una mayor actividad lo cual provoca la hiperfosforilación de Tau (Sato et al., 2011). Por otro lado, en la EA se ha observado un aumento en la expresión de RCAN1 provocando de esta manera el incremento de la actividad de GSK3 $\beta$  que finalmente desemboca en la hiperfosforilación de Tau.

Este desequilibrio en la fosforilación y desfosforilación de Tau provocado, entre otros factores, por el aumento de la actividad de las quinasas Cdk5 y GSK3 $\beta$  da lugar a la formación de los ovillos neurofibrilares (*neurofibrillary tangles*, NFTs). La hiperfosforilación de Tau provoca su disociación de los microtúbulos quedándose la proteína libre y comienza a agregarse; estos agregados forman oligómeros que una vez alcanzan los 20 nm comienzan a formar las neurofibrillas, las cuales a su vez se agregan y forman los NFTs (Maeda



& Takashima, 2007; Binder, Guillozet-Bongaarts, Garcia-Sierra, & Berry, 2005).

Los NFTs son estructuras insolubles formadas por fibrillas retorcidas únicas con una periodicidad de unos 80 nm que aparecen como filamentos helicoidales emparejados (PHF) o filamentos rectos relacionados (SF) (V. M. Y. Lee, Balin, Otvos, & Trojanowski, 1991). Además estas estructuras también presentan otras moléculas como la apolipoproteína E, sinaptofisina y la ubiquitina (Armstrong, 2009). La formación de estas estructuras va a provocar la disrupción del transporte de orgánulos y proteínas a través del citoesqueleto de las neuronas lo cual provoca su disfunción y degeneración (Ballatore, Lee, & Trojanowski, 2007).

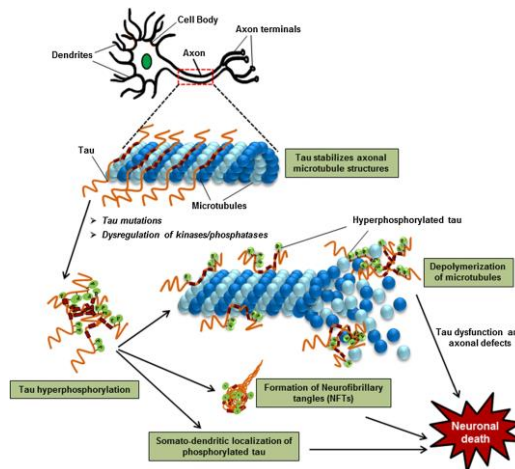


Figura 12. Esquema de los ovillos neurofibrilares. (Sarkar, 2018)

Al igual que en el caso de la placas amiloides, la distribución de los NFTs progresa en función del avance de la enfermedad. De tal manera que, incluso en función de la localización de estos ovillos se puede clasificar la EA en seis etapas, las conocidas como etapas de Braak. En las

primeras etapas (I y II), se encuentran en la región transentorrinal; en las dos siguientes, los ovillos se expanden hasta alcanzar la corteza entorrinal, la región CA1 del hipocampo y la amígdala; y finalmente, en las dos últimas etapas los NFTs se encuentran ya distribuidos por prácticamente todo el cerebro, afectando a distintas zonas como las áreas sensoriales primarias y los campos motores primarios (Braak & Braak, 1995).

La teoría tauísta defiende que es todo este proceso de hiperfosforilación de Tau y de formación de los NFTs el responsable del inicio de la EA. Para ello, se apoyan en la correlación observada entre el patrón de distribución de la patología de Tau, el avance de los síntomas clínicos y la neurodegeneración en los pacientes de EA (Bejanin et al., 2017). Además mediante imagen PET, se ha observado que las lesiones ocasionadas por Tau suceden antes que las provocadas por el péptido A $\beta$  (Okamura & Yanai, 2017). Sin embargo, cabe mencionar que la patología de Tau no es exclusiva de EA, sino que se produce en otros tipos de demencias conocidas como taupatías; siendo las demencias frontotemporales las más destacables. De hecho, se han descrito distintas mutaciones de la proteína Tau en la demencia frontotemporal con parkinsonismo-17, mientras que en el Alzheimer familiar no encontramos ninguna mutación directamente relacionada con la patología de Tau (Goedert & Spillantini, 2000). Lo que sí se ha observado es que el aumento de APP es capaz de promover la agregación de Tau y por tanto, la formación de los NFTs; lo cual apoyaría la teoría de que Tau es el inicio de la EA (M. Takahashi et al., 2015). Sin embargo, también existen evidencias de la activación

de la quinasa de Tau, GSK3 $\beta$ , por parte del péptido A $\beta$  (DaRocha-Souto et al., 2012). En cualquier caso, es un debate que sigue sin estar completamente cerrado.

### 1.2.3. Neurogénesis y la EA

Debido, entre otras cosas, a la íntima relación entre el nicho neurogénico SGZ y el hipocampo, siendo ésta una de las regiones más afectadas en la EA, se han desarrollado muchos trabajos para poder determinar la relación existente entre la EA y la neurogénesis. En el siguiente apartado intentaremos resumir toda la información actual acerca de la relación entre estos dos conceptos.

Los primeros estudios al respecto fueron llevados a cabo por Haughey y cols., los cuales demostraron tanto *in vivo* como *in vitro*, con un modelo animal y con muestras humanas, que la presencia del péptido A $\beta$  provoca una disminución de la neurogénesis de la V-SVZ y de la SGZ. Para ello utilizaron como marcador de neurogénesis el BrdU. Además, determinaron que esta disminución parecería estar mediada por la disrupción en la homeostasis del Ca<sup>2+</sup> intracelular que provoca el péptido A $\beta$ , tal y como hemos mencionado anteriormente (Haughey, Liu, Nath, Borchard, & Mattson, 2002; Haughey, Nath, et al., 2002). Tras estos hallazgos, han proseguido los estudios para caracterizar la neurogénesis en la EA, utilizando tanto muestras de pacientes como distintos modelos animales y siguiendo diferentes técnicas. Sin embargo, al igual que en el caso del estudio de la neurogénesis adulta *per se*, existen posturas diferentes. Algunos autores defienden un aumento de neurogénesis en pacientes con EA (Boekhoorn, Joels, &

Lucassen, 2006; Jin et al., 2004; Taupin, 2010), mientras que otros autores demuestran una disminución. Dicha reducción se ha observado en pacientes de EA con los marcadores de neurogénesis *Musashi* (Ziabreva et al., 2006) y DCX (He & Shen, 2009). Así mismo, en distintos modelos animales de EA también se ha demostrado una disminución de la neurogénesis: en el triple transgénico (3xTg) utilizando el marcador HH3 (*phosphorylated Histone H3*) (Rodríguez, Jones, & Verkhratsky, 2009); en el doble transgénico APP/PS1 y en el transgénico simple hAPP, mediante el BrdU (Pan et al., 2016; Tang et al., 2009) y en el transgénico 5xFAD con el marcador DCX (Moon, Cha, & Mook-Jung, 2014).

De hecho, los estudios más recientes realizados al respecto demuestran una disminución de neurogénesis en pacientes con EA (Tobin et al., 2019) (Moreno-Jiménez et al., 2019), así como en modelos animales y cultivos celulares, inducida por la presencia de los oligómeros del péptido A $\beta$  (Scopa et al., 2020). De cualquier forma, se ha observado que incluso en los casos en los que se ha demostrado un aumento de la neurogénesis, las nuevas neuronas generadas suelen presentar tasas de supervivencia reducidas debido probablemente a defectos intrínsecos y/o a la falta de inervación correcta (Chuang, 2010).

Paralelamente, se han llevado a cabo diversos estudios para determinar la causa a nivel molecular de esta disminución en la neurogénesis. Para ello, se han estudiado las relaciones que establecen las diversas proteínas implicadas en la EA con el proceso de neurogénesis. En primer lugar, nos centramos en la proteína APP, la

cual parece ser de gran importancia en los procesos fisiológicos de diferenciación, migración y crecimiento neuronal.

Por un lado, la proteína APP no procesada parece actuar como una molécula de adhesión celular imprescindible en el proceso de migración neuronal. Esta proteína presenta tanto un dominio extracelular como uno citoplasmático con características propias de las moléculas de adhesión celular (Sosa et al., 2017). El dominio extracelular es capaz de unirse a distintas moléculas de la matriz extracelular entre las que se encuentra la Reelina (Hoe et al., 2009), la cual como hemos mencionado anteriormente juega un importante papel en la regulación de la migración neural. Incluso también se ha observado que es capaz de unirse a los agregados del péptido A $\beta$  dando lugar a degeneración neuronal (Sola Vigo et al., 2009). Por otro lado, el dominio citoplasmático de la proteína APP es capaz de unirse a proteínas asociadas al citoesqueleto, entre las que se encuentra Dab1 (Young-Pearse et al., 2007), de gran importancia en la regulación de la migración. De esta manera, la proteína APP actúa como una molécula de adhesión celular; conectando el entorno extracelular con el citoesqueleto celular, lo cual le permite regular el proceso de migración neural; estableciendo una conexión entre proteínas como Reelina y Dab1 (Sosa et al., 2017). Asimismo cabe mencionar que esta regulación se encuentra mediada a través del receptor acoplado a la proteína G (Ramaker & Copenhaver, 2017).

Por otro lado, diversos estudios han demostrado la participación en la neurogénesis de los fragmentos derivados del procesamiento de APP, con diversas funciones. El fragmento sAPP $\alpha$ , que se encuentra

reducido en la EA (Lannfelt, Basun, Wahlund, Rowe, & Wagner, 1995), se une principalmente a las células de la V-SVZ, tanto las de tipo A como las de tipo C. Al unirse a estas células actúa como un factor de crecimiento actuando de manera autocrina o paracrina mediando el efecto del EGF (Caillé et al., 2004). Además esta propiedad de sAPP $\alpha$  para promover la neurogénesis podría estar mediada por su capacidad en disminuir la actividad de Cdk5 e inhibir la hiperfosforilación de Tau (Han et al., 2005). Este efecto pro-neurogénico también fue observado, más tarde, en las células de la SGZ, pero en este caso no se evaluó el papel del EGF (Baratchi, Evans, Tate, Abraham, & Connor, 2012).

El fragmento AICD juega un papel completamente inverso al de la forma sAPP $\alpha$ . En este caso, actúa inhibiendo el proceso de neurogénesis. El proceso exacto a través del cual AICD provoca esta inhibición no está completamente claro. Aunque según parece esta supresión se produce vía la proteína adaptadora Fe65 la cual provoca la translocación de AICD al núcleo donde actuaría como factor transcripcional regulando la expresión de genes y miRNA relacionados con la neurogénesis, promoviendo así su inhibición (Zhou et al., 2011). Asimismo, esta inhibición de la neurogénesis por parte de AICD también parece ser mediada a través de un proceso de neuroinflamación (Ghosal, Stathopoulos, & Pimplikar, 2010). Además se ha demostrado que este fragmento puede contribuir a la fisiopatología de la EA a través de la activación de la quinasa GSK3 $\beta$  induciendo la hiperfosforilación de Tau (Multhaup, Huber, Buée, & Galas, 2015; Ryan & Pimplikar, 2005).

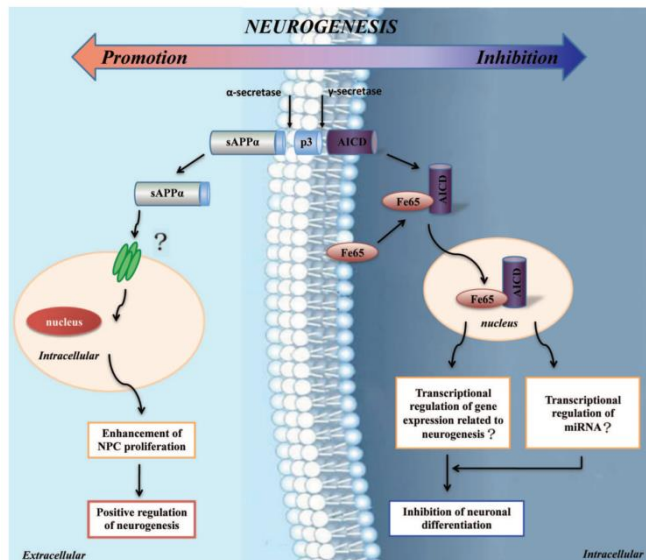


Figura 13. Implicación de los fragmentos derivados del procesamiento de la proteína APP en la neurogénesis. (Zhou et al., 2011)

En el caso del péptido A $\beta$ , tal y como se ha mencionado anteriormente, la sola presencia de los oligómeros intracelulares que forma este péptido en la EA, es suficiente para provocar la inhibición de la neurogénesis en la V-SVZ (Scopa et al., 2020). Sin embargo, hasta el momento se desconoce el mecanismo mediante el cual se produce este efecto.

Por otro lado, nos encontramos con diversas proteínas que participan en la fisiopatología de la EA y que tienen algún tipo de efecto sobre el proceso de neurogénesis. Es el caso, de la quinasa GSK3 $\beta$  que se encuentra aumentada en los pacientes de EA y provoca la degradación de la  $\beta$ -catenina, dando lugar a la disminución de los genes pro-neuronales regulados por esta proteína y por tanto a una disminución en la neurogénesis (P. He & Shen, 2009). Además, tal y como se ha

mencionado anteriormente, GSK3 $\beta$  participa en la cascada de señalización necesaria para el proceso de migración neuronal, vía Netrina y Reelina (Ayala et al., 2007). Asimismo la quinasa Cdk5, implicada en la hiperfosforilación de Tau, entre las proteínas que es capaz de fosforilar se encuentra la proteína DCX, cuyo balance entre la forma fosforilada y no fosforilada es clave para el proceso de migración, como hemos visto anteriormente (Kawauchi, Shikanai, & Kosodo, 2013). También la proteína BACE, necesaria para el procesamiento de APP, parece ser imprescindible para un desarrollo normal de las neuronas del giro dentado durante el desarrollo temprano postnatal (Hou et al., 2017). Por último, en modelos murinos de AD se ha observado una disminución de Noggin y un aumento de su agonista BMP4, lo cual contribuye a una disminución de la neurogénesis (Tang et al., 2009), por su papel como señal pro-neurogénica.

El efecto de la EA sobre la neurogénesis se ha observado que también puede ser debido a la inducción de un metabolismo de lípidos aberrante en las células endoteliales de la V-SVZ provocando una disminución en la actividad neurogénica y contribuye directamente con el declive cognitivo observado (Hamilton et al., 2015).

Por último, cabe destacar que Gatt y cols. llevaron a cabo un metaanálisis recogiendo los niveles de expresión de marcadores neurogénicos en pacientes de EA. De esta revisión sistemática se puede concluir que, en general, la proliferación de nuevas neuronas plenamente funcionales se reduce en la EA tardía (Gatt, Lee, Williams, Thuret, & Ballard, 2019).



## 1.3. Ciclo celular

El ciclo celular puede ser definido como el conjunto de procesos que se producen en una célula y que permiten que crezca y finalmente alcance una división fructífera. Este proceso se puede dividir en dos partes: interfase y mitosis; y la interfase a su vez puede dividirse en tres fases: G1, S y G2. Durante la interfase la célula se dedica principalmente a su crecimiento y a la preparación de todos los componentes para llevar a cabo una división exitosa durante la fase de mitosis. En cada una de estas fases se producen diferentes eventos, que serán descritos a continuación, al igual que el proceso de regulación necesario para la progresión de la célula a lo largo de este ciclo. Asimismo, también se abordarán las consecuencias que supone la parada del ciclo celular; tanto la apoptosis como la senescencia. Finalmente, se mencionarán los aspectos más relevantes del ciclo celular relacionados con la neurogénesis adulta y con la fisiopatología de la EA.

### 1.3.1. Fases del ciclo celular

Tal y como se mencionado, el ciclo celular está compuesto principalmente por cuatro fases que describen a continuación:

- Fase G1: esta fase también se conoce como fase Gap 1, ya que, es un periodo que se encuentra entre el final de la mitosis, de la cual se ha originado esta célula, y el principio de la fase S. A lo largo de esta fase la célula se dedica principalmente al proceso de crecimiento y a disponer todo lo necesario para la replicación del ADN que se producirá en la siguiente fase: la

fase S. De tal manera que lleva a cabo tanto la replicación de ciertos orgánulos como de los centrosomas. Además, supone el primer punto de chequeo en el que se comprueba que la célula presenta todo lo necesario para su progresión a lo largo del ciclo (Barnum & O'Connell, 2014). En el caso de que la célula no reúna las características necesarias para proseguir el ciclo celular o bien tenga que diferenciarse, la célula pasa a un estado de quiescencia conocido como G0 en el que la capacidad proliferativa se mantiene inactiva; el cual puede ser revertido en cualquier momento y entrará de nuevo en el ciclo celular (Coller, Sang, & Roberts, 2006).

- Fase S: también denominada como fase de síntesis, ya que, durante esta etapa se produce principalmente la síntesis de ADN. De esta manera se consigue replicar el ADN presente en la célula, para que así cada una de las células resultantes de la mitosis presente la misma composición genética. Por lo tanto, es un proceso crucial del ciclo celular, ya que se debe asegurar una replicación completa para que el material genético de las células hijas sea totalmente idéntico. Paralelamente, también se llevan a cabo otros procesos de síntesis de proteínas y enzimas, pero gran parte de ellos están relacionados con la replicación de ADN y con el proceso de mitosis. De esta manera la célula resultante de esta fase es cuadruploide (4N) (Cooper & Hausman, 2013). Además se forman las denominadas cromátidas hermanas gracias a la unión mediante cohesina de las moléculas de ADN replicadas (Johnson, Pollard, Earnshaw, & Lippincott-Schwartz, 2017).

- Fase G2: conocida como fase Gap 2, es la última fase de la interfase antes del proceso de división celular. Esta fase sirve principalmente como control, para comprobar que presenta todo el contenido necesario para llevar a cabo una mitosis fructífera. Entre otras cosas se forman los centrosomas necesarios para la división; y se comprueba si hay daños en el ADN y si es así se activa la respuesta a daño en el ADN (Johnson et al., 2017). Además durante esta fase, la célula sufre un proceso de crecimiento previo a la formación de las dos células hijas que se generarán durante la fase M.
- Fase M: es la fase de división celular. Tras la duplicación de su material genético durante la fase S y su material proteico y enzimático en la fase G2, la célula esta lista para dividirse y dar lugar a dos células hijas. Concretamente, está compuesta por la división del núcleo o mitosis; y la división del citoplasma o citocinesis. La mitosis consiste en un total de cinco partes: profase, prometafase, metafase, anafase y telofase. A lo largo de estas fases, las cromátidas hermanas son separadas gracias a la acción de los centrosomas y finaliza con la división en del núcleo en dos, mediante la formación de un anillo contráctil formado por actina y miosina (Johnson et al., 2017). Por otro lado, durante la citocinesis se produce la división del citoplasma gracias a la regulación por parte de diferentes

moléculas y mecanismos que dependerán del tipo de célula que se trate (Guertin, Trautmann, & Mccollum, 2002).

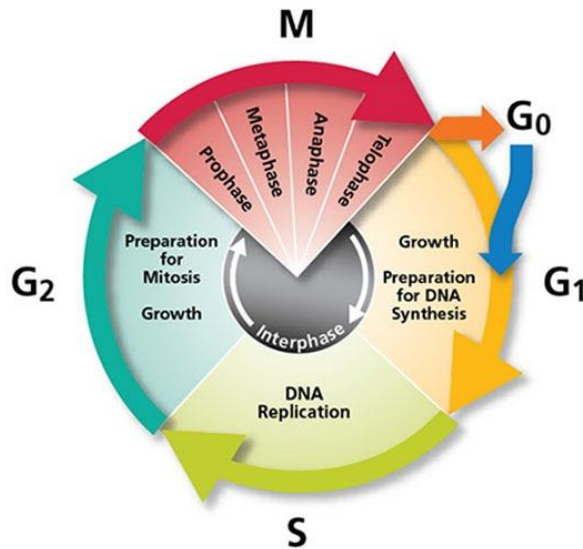


Figura 14. Esquema del ciclo celular y las fases que lo componen.

### 1.3.2. Regulación del ciclo celular

La progresión del ciclo celular se encuentra altamente regulada mediante una serie de puntos denominados *Cell cycle checkpoints*. Estos puntos se encuentran entre cada una de las fases regulando que la célula entre o no a la siguiente fase (Barnum & O'Connell, 2014). Estos puntos se encuentran regulados principalmente por unas proteínas llamadas ciclinas, por quinasas dependientes de ciclinas (CDKs, *cyclin-dependent kinases*) y por los inhibidores de las quinasas dependientes de ciclinas (CKIs, *cyclin-dependent kinases inhibitors*) que son clave para regular la proliferación y diferenciación tanto en la neurogénesis embrionaria como en el adulta (Cheffer, Tárnok, & Ulrich, 2013).

Los *checkpoints* se encuentran en las transiciones entre las fases del ciclo y hay un total de tres que coinciden con las transiciones más importantes del ciclo: G1/S, G2/M y el *checkpoint* de la mitosis.

- Checkpoint G1/S: la principal función de este punto de control es comprobar la integridad del ADN, ya que una vez superado la célula estará destinada a la división y cualquier daño será transmitido a su progenie. Además, se evalúa el tamaño, la disponibilidad de nutrientes y el tipo de señales que provienen de su entorno. Este punto se encuentra regulado por las ciclinas D y las CDKs 4 y 6; que son inhibidas por las CKIs INK4 como p16<sup>INK4a</sup> y p19<sup>Arf</sup>. Las ciclinas D se asocian a CDK4 y CDK6 generando la fosforilación de la proteína Rb, la cual pasa a su forma inactiva y se disocia del factor de transcripción E2F, generando que éste pase a ser activo. La activación de E2F permite la transcripción de genes necesarios para la progresión del ciclo, como la ciclina E (Ohtani, DeGregori, & Nevins, 1995; Y et al., 1996). Esta ciclina a su vez se une a la CDK2 y fomenta la inactivación de Rb lo cual permite la transcripción de los genes necesarios para el pase a la fase S.

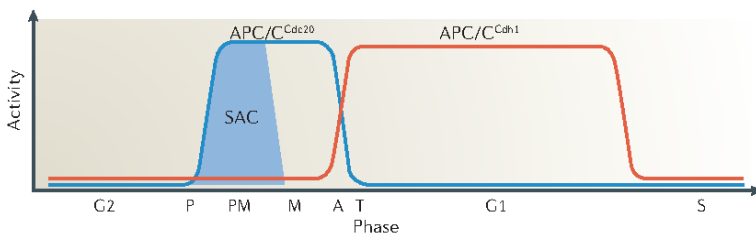
Asimismo, también cabe mencionar el *checkpoint* intra fase S que se encarga directamente de regular la elongación de la replicación para preservar la integridad del material replicado. En esta labor, para evitar el daño en el ADN durante su replicación, intervienen dos quinasas de control: ATM y ATR. ATR se activa en respuesta a diversas lesiones como los rayos UV; mientras que ATM responde principalmente a roturas de doble cadena (Iyer & Rhind, 2017).

Además, a lo largo de esta fase se produce la unión entre ciclina A y CDK2 cuya actividad permite la continuidad de la fase hasta que la ciclina A pasa a unirse a CDK1 dando paso a la fase G2.

- Checkpoint G2/M: Se trata del último punto de regulación directamente previo al proceso de división celular. Por lo tanto, es imprescindible comprobar, ya no solo la integridad del ADN, sino que se ha duplicado de manera exitosa y sin ningún error. En este caso la regulación se lleva a cabo por la unión de la ciclina B a CDK1, lo cual permite la transición a la fase M (Le Breton, Cormier, Bellé, Mulner-Lorillon, & Morales, 2005). Este complejo puede ser inhibido tanto por p27<sup>Kip1</sup>, como por p21<sup>Cip1</sup> (Besson, Dowdy, & Roberts, 2008).
- Checkpoint de la mitosis: Este punto de control se produce al principio de la mitosis antes de que se lleve a cabo la división celular de manera completa. Concretamente, se comprueba que todas las cromátidas hermanas se encuentren en el lugar correcto para que su separación durante la anafase se lleve a cabo correctamente. De esta comprobación se encarga el complejo MCC (*mitotic checkpoint complex*) que impide el inicio de la anafase hasta que todos los cromosomas estén correctamente unidos a los microtúbulos del huso para su posterior segregación. El MCC es capaz de inhibir a la E3 ubiquitín ligasa, APC/C (*anaphase-promoting complex*) cuando se encuentra unida a la proteína activadora Cdc20, y así logra retrasar la anafase (S. Liu & Zhang, 2017).

### 1.3.2.1. APC/C y el ciclo celular

La E3 ubiquitín ligasa APC/C, presenta una gran importancia, ya que, a pesar de no ser una ciclina ni una CDK, participa activamente de su regulación. Esto se debe a la necesidad de un mecanismo rápido de destrucción de proteínas específicas del ciclo celular que asegure su continuidad (Sajman et al., 2015). La actividad de APC/C a lo largo del ciclo celular va a estar mediada por la coordinación temporal de sus dos coactivadores: Cdc20 y Cdh1 (Pines, 2011). Por un lado APC/C-Cdc20, se encuentra activa principalmente al inicio de la mitosis y al final. Por otro lado, APC/C-Cdh1 lleva a cabo su función, sobre todo, al final de la salida mitótica y al principio de la fase G1. Además, se ha observado que APC/C-Cdh1, cuando la célula se encuentra en la fase G1, es capaz de regular la decisión de salida del ciclo celular o diferenciación (Wasch, Robbins, & Cross, 2010) mediante la degradación de ciertas CDKs como Cdk5 (J. Zhang, Li, Zhou, Zhou, & Herrup, 2012) y de ciclinas como la ciclina B1 (Müllers, Silva Cascales, Jaiswal, Saurin, & Lindqvist, 2014). En la siguiente imagen se ejemplifica la regulación de cada una de las fases del ciclo celular por parte de APC/C.



**Figura 15. Distribución de los activadores de APC/C a lo largo del ciclo celular.**

Imagen modificada de Peters, 2006.

### 1.3.3. Parada del ciclo celular

En el momento en el que se produce un fallo en cualquier de estos puntos de regulación, se produce la parada del ciclo celular. En condiciones fisiológicas, esta detención sirve principalmente para facilitar la reparación en el daño al ADN que se haya podido producir, antes de la proliferación celular. Sin embargo, si el daño es demasiado severo la célula activa una serie de mecanismos que desembocarán o bien en apoptosis o en senescencia para evitar la malignidad del daño sufrido.

Esta parada en el ciclo celular suele producirse o bien en la fase G1 o bien en la fase G2; y viene definida por la activación la respuesta al daño en el ADN (DDR, *DNA damage response*) la cual es regulada por las proteínas ATM y ATR (Maréchal & Zou, 2013).

En los siguientes apartados se explicará de manera detallada, los distintos procesos en los que puede desembocar la parada del ciclo celular: apoptosis y senescencia.

#### 1.3.3.1. Apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada, es el tipo de muerte celular más conocida y se caracteriza principalmente en que el resultado final es la formación de los llamados cuerpos apoptóticos que acaban siendo fagocitados por la acción de los macrófagos.

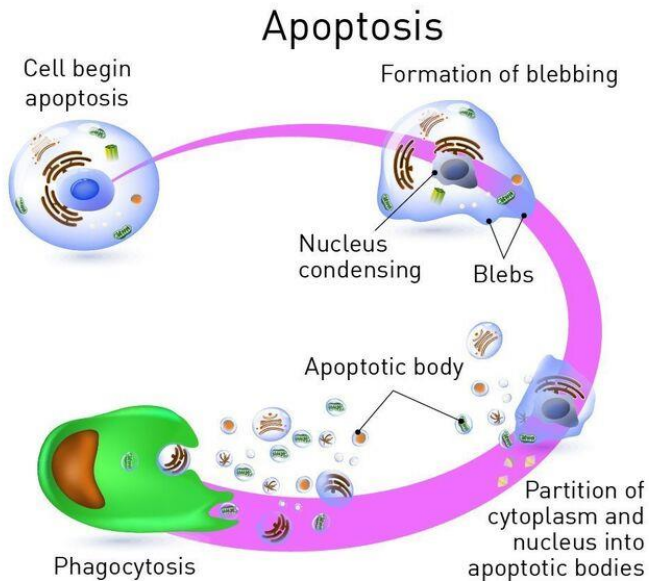
El mecanismo de apoptosis se encuentra altamente regulado y su inicio se puede clasificar principalmente en dos vías: la intrínseca y la extrínseca. Aunque se ha observado la interacción entre moléculas de ambas vías (Igney & Krammer, 2002). Ambas vías desembocan en la



activación de la vía de ejecución a través de la caspasa 3. A lo largo de esta vía se producen todos los procesos de degradación (activación proteasas, fragmentación nuclear...) hasta que finalmente se forman los cuerpos apoptóticos (Elmore, 2007).

Por un lado, en la vía intrínseca, toda una serie de estímulos van a provocar que finalmente se produzca una pérdida del potencial transmembrana mitocondrial induciéndose así la liberación de moléculas como el citocromo C y Smac/DIABLO. Estas moléculas van a inducir la activación de la vía mitocondrial dependiente de la caspasa. El citocromo C provoca la activación de la caspasa 9 a través de la formación de apoptosomas (Hill, Adrain, Duriez, Creagh, & Martin, 2004), mientras que Smac/DIABLO actúa como inhibidor de las proteínas IAPs (*inhibitors of apoptosis proteins*) (Schimmer, 2004). Finalmente, la caspasa 9 induce la activación de la caspasa 3, comenzando así lo que se conoce como vía de ejecución.

Por otro lado, la vía extrínseca da comienzo a través de la activación de los receptores TNF (Locksley, Killeen, & Lenardo, 2001). Esta activación provoca el reclutamiento de las proteínas FADD y RIP. A su vez FADD se asocia con la procaspasa-8 y se forma un complejo de señalización inductor de la muerte (DISC), que da lugar a la activación autocatalítica de la procaspasa-8 (Wajant, 2002). Seguidamente la activación de la caspasa 8 genera la activación de la caspasa 3, induciéndose la vía de ejecución.



**Figura 16. Esquema del proceso de apoptosis.**

#### 1.3.3.2. Senescencia

La senescencia es un mecanismo cuyo objetivo principal parece ser la eliminación de células dañadas para su posterior renovación, al igual que sucede con la apoptosis. Sin embargo, nos podemos encontrar con la senescencia resistente en cuya situación no se produce la eliminación de estas células dañadas y acaban acumulándose y generando un grave daño en el tejido; es lo que sucede en procesos patológicos como el cáncer (Muñoz-Espín & Serrano, 2014). Este proceso supone que las células pasen a ser quiescentes y por lo tanto, pierdan su capacidad proliferativa, pero sus actividades vitales sigan activas.

Los primeros en definir este proceso en situaciones fisiológicas fueron Leonard Hayflick y Paul Moorhead, los cuales lo definieron como causa posible del envejecimiento. A partir de sus trabajos se determinó el

conocido como límite de Hayflick, el cual establece el número máximo de divisiones que puede presentar una célula en función de la longitud de sus telómeros (Hayflick & Moorhead, 1961).

Además de la longitud de los telómeros existen otros procesos que pueden ocasionar senescencia: daño en el ADN, disfunción mitocondrial y factores epigenéticos. Estos estímulos activan una gran cantidad de vías y muchas de ellas son reguladas por p53 y convergen en los CKIs p16, p21, p15 y p27. La inhibición de los complejos CDKs-ciclina va a provocar finalmente la detención del ciclo celular y la hiperfosforilación de Rb que es crucial para la ejecución de la senescencia (Chicas et al., 2010). Además es muy posible que, al igual que sucede con la apoptosis, existan distintos subtipos de senescencia en función del tipo de célula y de las condiciones en las que se encuentre.

Un ejemplo de mecanismo molecular que conduce a la senescencia, es el activado por el estrés oxidativo. La sola presencia de ROS provoca la activación de un bucle necesario para la estabilidad de la senescencia en el que participa la CKI p21 y la proteína p38 MAPK (Ito et al., 2006; Passos et al., 2010). Además, ROS también contribuye a la senescencia mediante la inducción de daño en el ADN, disfunción mitocondrial, daño en el ADN mitocondrial y cambio epigenéticos (Davalli, Mitic, Caporali, Lauriola, & D'Arca, 2016; A. Takahashi et al., 2012; Wiley et al., 2016).

Este estado senescente se caracteriza por liberar una serie de señales que influyen sobre las células de alrededor. En principio, estas señales

tienen como objetivo principal el aclaramiento de las células senescentes por parte de los macrófagos. Sin embargo, puede llegar a provocar un deterioro funcional y estructural del tejido y el órgano donde se encuentren estas células. Este compendio de factores liberados se conoce como fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP, *senescence-associated secretory phenotype*). El SASP está compuesto principalmente por señales pro-inflamatorias como las interleuquinas IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-8; las quimioquinas CXCL y CCL; y el factor IFN- $\gamma$ , entre otros. Aunque también nos encontramos con otros componentes como factores de crecimiento (EGF, VEGF), proteasas (metaloproteasas de matriz), óxido nítrico y demás (Coppé, Desprez, Krtolica, & Campisi, 2010). Asimismo, un importante marcador de las células senescentes es la  $\beta$ -Galactosidasa; es lo que se conoce como SA $\beta$ GAL (*senescence-associated  $\beta$ -galactosidase*). La actividad de esta enzima se encuentra incrementada en los lisosomas de las células senescentes, lo cual indica un aumento de la autofagia y se ha demostrado como consecuencia y no causa del proceso de senescencia (B. Y. Lee et al., 2006).

Por último, las células senescentes también presentan cambios a nivel morfológico. Estos cambios son principalmente: un aumento en su tamaño y granularidad, un aplanamiento y una vacuolización. El aumento en tamaño y granularidad parecen estar relacionados con la relación que existe entre la autofagia y la senescencia (Sikora, Mosieniak, & Alicja Sliwinska, 2016).

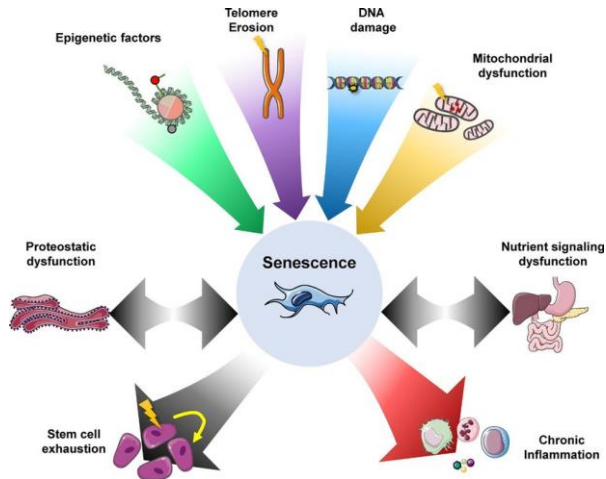


Figura 17. Esquema de las causas y consecuencias de la senescencia. (McHugh & Gil, 2018)

### 1.3.4. Ciclo celular y neurogénesis

Al igual que en el resto de células, tanto el ciclo celular como su correspondiente regulación son de suma importancia en las células implicadas en el proceso de neurogénesis. De hecho la neurogénesis consiste en la diferenciación y proliferación de las células, lo cual se puede traducir como salida y re-entrada del ciclo celular. Además, la localización tan precisa de las células madre sugiere que el entorno puede ser responsable en parte de mantenerlas en el ciclo celular y, por tanto, mantener su capacidad neurogénica.

Cada una de las fases del ciclo celular presenta un papel diferente en el proceso de neurogénesis. De tal manera que la fase M y su maquinaria es imprescindible para el proceso de división asimétrica necesario para la proliferación celular (Ohnuma & Harris, 2003). A partir de esta división asimétrica inicial de las células B, las células tipo

C generadas son capaces de dividirse hasta en tres ocasiones antes de diferenciarse en células tipo A, las cuales se dividen antes de salir de la V-SVZ entre una o dos veces y siguen haciéndolo mientras migran a través de la RMS (Ponti, Obernier, Guintoa, et al., 2013).

En el caso de la fase G1 nos encontramos, tal y como se ha mencionado, un punto clave de control en la progresión o no del ciclo celular. Al extrapolarlo a la neurogénesis, la salida del ciclo celular y entrada en la fase G0, da lugar a la diferenciación. Por lo tanto, aquellos reguladores que participan en el bloqueo de la fase G1 pueden ser considerados como proneurales. Mientras que aquellos componentes que permiten la progresión en el ciclo celular potenciarán el proceso de proliferación.

Por último, a lo largo de la fase S al producirse la duplicación del ADN también tiene lugar la remodelación de la cromatina, al igual que cambio epigenéticos. Ambos procesos pueden provocar cambios en la neurogénesis (Ohnuma & Harris, 2003).

En la regulación del ciclo celular de las células que participan en la neurogénesis también intervienen los mecanismos que se han mencionado, pero con ligeras diferencias, y que dependerán tanto de si se trata de la V-SVZ o de la SGZ como del tipo celular. En las células tipo B; las ciclinas D1 y D2, las CDKs 2 y 6, y E2f1 son capaces de promover su proliferación, es decir, que prosigan el ciclo celular. Mientras que p16<sup>INK4a</sup> y p21<sup>Cip1</sup> inhiben la proliferación y por lo tanto, inducen la diferenciación en células tipo C. En estas células es p27<sup>Kip1</sup> el que provoca la inhibición de la proliferación y promueve la

diferenciación en células tipo A. Finalmente, ciclina D1 y ciclina D2 promueven la diferenciación a astrocitos y neuronas, respectivamente; mientras que Cdk2 inhibe la diferenciación a oligodendrocitos (Cheffer et al., 2013).

### **1.3.5. Ciclo celular y EA**

Como era de esperar y al igual que sucede con la neurogénesis; la EA tiene un efecto sobre el ciclo celular de las células. Tales efectos se detallarán a continuación.

Los efectos provocados por la EA en el ciclo celular dependen en gran medida del tipo celular del que se trate. De tal manera que, por un lado, nos encontramos con las neuronas post-mitóticas que son terminalmente diferenciadas, y por lo tanto, se encuentran quiescentes en la fase G0 del ciclo celular debido a la degradación activa de las proteínas relacionadas con la progresión del ciclo celular. De esta degradación activa se encarga la ubiquitín ligasa E3 APC/C-Cdh1, que permite que la célula se mantenga en G0 (Gieffers, Peters, Kramer, Dotti, & Peters, 1999). Se ha observado que la presencia del péptido A $\beta$  provoca la reactivación del ciclo celular en estas células debido al aumento de las ciclinas y las CDKs, a través de una disminución de APC/C-Cdh1 (Fuchsberger et al., 2016). Esta re-entrada en un ciclo celular ectópico provoca que las neuronas prosigan a lo largo de la fase G1 y S, pero tras la replicación del ADN, en lugar de dividirse entran en apoptosis, contribuyendo así a la neurodegeneración que encontramos en la EA (Copani et al., 2007).

Por otro lado, en el caso de las células implicadas en la neurogénesis, el efecto que pueda tener la EA sobre su ciclo celular será bien distinto. Debemos tener en cuenta que la naturaleza del ciclo celular de estas células es totalmente diferente a la de las neuronas diferenciadas, ya que, en estas células debe existir un equilibrio entre la proliferación, la migración y la diferenciación.

Por todo lo expuesto anteriormente durante esta sección introductoria que claro que existe evidencias de un fallo en la neurogénesis asociada a la EA, aun quedando lagunas en los procesos implicados. En la presente tesis hemos querido ahondar más en el estado de la V-SVZ en un modelo murino de EA, desde un punto de vista tanto histológico como molecular. De esta manera, podremos establecer nuevos puntos que contribuyan a la fisiopatología de esta enfermedad; y que permitan desarrollar nuevas técnicas tanto de diagnóstico temprano como de tratamiento.



# OBJETIVOS



## 2. Objetivos

El objetivo principal de esta tesis es caracterizar la capacidad de migración de las células madre nerviosas de la V-SVZ en un modelo murino de EA. A partir de este objetivo principal se derivan los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar si existen diferencias a nivel morfológico en la V-SVZ de los ratones APP/PS1 respecto a la de los ratones WT. Analizar concretamente el número de células migradoras presentes en cada modelo.
2. Determinar el número de células migradoras a lo largo de la RMS y los niveles de Netrina tanto en los ratones wild type como en los APP/PS1.
3. Cuantificar el número de neuronas maduras en los bulbos olfatorios, así como comparar pruebas de discriminación olfativa en ratones APP/PS1 y WT.
4. Analizar si existen diferencias en la integridad del ADN y en los niveles de estrés oxidativo en la V-SVZ del modelo APP/PS1 respecto a la de los controles.
5. Caracterizar el ciclo celular y los niveles de proteínas relacionadas (Cdh1, ciclina B1, Cdk5/p35) en los animales transgénicos y compararlos con los WT.
6. Determinar la presencia de senescencia y apoptosis tanto en las células migradoras como en los astrocitos presentes en la V-SVZ del modelo de EA, APP/PS1.



# MATERIALES Y MÉTODOS



### 3. Materiales y métodos

#### 3.1. Animales de experimentación

A lo largo de este proyecto se utilizaron los ratones dobles transgénicos APP<sup>swe</sup>/ PSEN1<sup>dE9</sup> (APP/PS1) caracterizados como modelo de enfermedad de Alzheimer (EA) por diversos grupos (García-Alloza et al., 2006; Jankowsky et al., 2004; Kilgore et al., 2010). Esta cepa se caracteriza a nivel genético en que presenta dos vectores que codifican respectivamente, un gen mutado de APP y uno de presenilina 1 (PSEN1) modificado. Por un lado, la secuencia insertada de APP codifica una proteína APP quimérica ratón/humano (Mo/HuAPP695<sup>swe</sup>) que ha sido humanizada mediante la modificación de tres aminoácidos, además de presentar las correspondientes mutaciones suecas necesarias para la alteración. Por otro lado, la secuencia de PSEN1 codifica la presenilina humana sin el exón 9 lo cual se asocia con el desarrollo de EA. En ambos casos, su expresión se limita al sistema nervioso central mediante el uso de un promotor específico. A nivel fenotípico, estos ratones se caracterizan por la aparición de depósitos de A $\beta$  a los seis meses de edad que desembocan en abundantes placas amiloides en el hipocampo y la corteza cerebral a los nueve meses.

Paralelamente se utilizó como grupo control o *wild type* la cepa C57BL/6J que se corresponde con el mismo fondo genético que presenta la cepa transgénica utilizada. Ambas cepas proceden de los laboratorios Jackson (Estados Unidos) y se encuentran estabuladas en

la *Unitat Central d'Investigació de la Facultat de Medicina de la Universitat de València*. En este servicio se procura una descendencia doble transgénica hemizigota mediante cruces entre las dos cepas y se mantienen en unas condiciones de  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$  de temperatura, una humedad relativa del 60%, ciclos de luz-oscuridad de 12-12 horas y una alimentación y agua *ad libitum*.

A lo largo de todo el proyecto se utilizaron un total de 76 ratones de los cuales 38 fueron utilizados en análisis histológicos y 38 para la realización de análisis bioquímicos. Cabe mencionar que todos los procedimientos en los que fue necesario el uso de ratones se realizaron tras su aprobación por parte de la Comisión de Ética en la Investigación Experimental del Vicerrectorado de Investigación de la Universidad de Valencia y siguiendo la normativa establecida en el Real Decreto 53/2013 por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

### 3.2. Reactivos, medios y kits

- **Reactivo de Lowry:** se disolvió *Lowry Reagent Powder* (L3540-1VL, *Sigma*) en 40 mL de agua bidestilada.
- **Folin:** *Folin & Ciocalteu's Phenol Regaent F9252-500ML* se diluye al 22.5% en agua bidestilada
- **Luminol:** *Luminata Classico Western HRP Substrate*. Lot 140935. *Millipore*



- **Restore Western blot Stripping Buffer**, 21059, *Thermo Scientific*
- **Pentobarbital sódico (Eutanax)** (100 mg/kg), *Dolethal Vetoquinol*, Madrid, España
- **Tampón Fosfato Salino (PBS)**. pH 7.4, 10010-056, *Gibco, Thermofisher*
- **Earl's balanced salt solution (EBSS)**, 24010-043, *Gibco, Thermofisher*
- **Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12)**, 11320-074, *Gibco, Thermofisher*
- **Kit Ciclo Celular: PI/RNASE Solution**, *Immunostep*
- **Kit Peróxido de Hidrogeno: MitoPY1**, 4428, *TOCRIS*
- **Kit Actividad  $\beta$ -Galactosidasa: FluoReporter lacZ Flow Cytometry Kit**, F-1930, *Molecular Probes*

### 3.3. Tampones y soluciones

- **TBS 10X:** En un volumen de 1 litro de agua bidestilada se añaden 80g de NaCl y 24.2g de Trizma. Una vez disueltos ambos compuestos se ajusta la solución a pH 7.6.
- **TBS-t:** A partir de la disolución de TBS 10X se obtiene TBS 1X a la cual se le añade 1 mL de Tween 20 por cada litro de la dilución obtenida.
- **PBS-t:** Se añade Tritón al 0.5% en PBS y se agita hasta que esté completamente disuelto.

- **Tampón de electroforesis 10X [25 mM Trizma, 190 mM Glicina, 0,1% (w/v) SDS]:** En un litro de agua destilada se disuelven 3 g de Trizma, 14.37 g de Glicina y 1 g de SDS.
- **Tampón de transferencia [25 mM Trizma, 192 mM Glicina, 20% (v/v) metanol]:** primeramente se deben disolver 14.4 g de Glicina y 3.03 g de Trizma en 800 mL de agua destilada. Tras disolver los componentes sólidos se debe refrigerar a 4°C y sólo justo antes de su uso añadir a la disolución 200 mL de metanol y agitar para homogenizar todo los componentes.
- **Tris HCl [1M], pH 6.8:** se disuelven 60.55 g de Trizma en 500 mL de agua destilada y se debe ajusta hasta pH 6.8 con una solución de HCl.
- **Tris HCl [1.5M], pH 8.8:** se disuelven 90.83 g de Trizma en 500 mL de agua destilada y se debe ajusta hasta pH 8.8 con una solución de HCl.
- **Tampón de lisis:** en 100 mL de agua destilada se diluyen 0.927 g de Trizma y se ajusta la disolución a un pH de 6.7. En 87 mL de esta solución se añade 10 mL de glicerol y 2 g de SDS. Justo antes de utilizar este tampón, se añaden 40 µL de ortovanadato de sodio [200mM] (inhibidor de fosfatasas) y 40 µL del cocktail de inhibidor de proteasas ( ) a 3.766 mL de la solución obtenida.
- **Tampón de carga 2X [50 mM Tris HCl pH 6.8, 3% SDS, 10% glicerol, 0,005% azul de bromofenol, 5% 2-mercaptoetanol]:** A 0.6 mL de Tris HCl pH 6.8 se añaden 1.5 mL SDS al 20%, 1 mL de glicerol y 50 µL de azul de bromofenol al 1%. Seguidamente

se añaden 9.6 mL de agua destilada y 500 µL de mercaptoetanol.

- **Solución de bloqueo (5% leche o 5% BSA).** Se disuelven 5 g de BSA o bien leche desnatada en polvo en 100 mL de TBS-t.
- **Solución de Eutanax (15%):** A 1.5 mL de Eutanax se añaden 0.5 mL de etanol absoluto que servirá como adyuvante. Finalmente, a esta dilución se añade suero salino hasta alcanzar 10 mL.

## 3.4. Anticuerpos

### 3.4.1. Anticuerpos primarios

- **Cdh1**, DCS-266 NBP1-54465, *Novus Biologicals*, 1:1000
- **Cdk5**, 2506, *Cell Signaling Technology*, 1:1000
- **Cyclin B1**, 4138S, *Cell Signaling Technology*, 1:1000
- **Phospho-Histone H2A.X (Ser139) (20E3) Rabbit mAb**, 9718, *Cell Signaling Technology*, 1:1000
- **p16**, MA1-16664, *ThermoFisher*, 1:500
- **p35/25 (C64B10) Rabbit mAb**, 2680, *Cell Signaling Technology*, 1:200
- **beta Galactosidase Monoclonal Antibody**, S.394.9, *ThermoFisher*, 1:3200
- **DIABLO Monoclonal Antibody**, SMAC 17 1-87, *ThermoFisher*, 1:200
- **Anti-Doublecortin antibody**, ab18723, *Abcam*, 1:1000

- **GFAP Polyclonal Antibody**, OPA1-06100, *ThermoFisher*, 1:200
- **mouse anti-polysialic acid-NCAM(PSA-NCAM) monoclonal antibody**, MAB5324, *Chemicon*, 1:400
- **p-ATM**, sc-47739, *Santa Cruz Biotechnology*, 1:500
- **Anti-Netrin 1 antibody [EPR5428]**, ab126729, *Abcam*, 1:500
- **NeuN (D4G4O) XP® Rabbit mAb**, 24307, *Cell Signaling Technology*, 1:50
- **α-Tubulin**, sc-8035, *Santa Cruz Biotechnology*, 1:8000
- **GAPDH**, G9545, *Sigma*, 1:20000

### 3.4.2. Anticuerpos secundarios

- **Anti-mouse IgG H&L Chain Specific Peroxidase Conjugate**, 401215, *Calbiochem*, 1:6000
- **Anti-rabbit IgG HRP-linked**, 7074S, *Cell Signalling*, 1:3000
- **Mouse monoclonal [KT98] Anti-Rat IgG2b H&L (HRP)**, ab106750, *Abcam*, 1:1000
- **Anti-rabbit IgG (H+L), F(ab')<sub>2</sub> Fragment Alexa Fluor® 488 Conjugate**, 4412, *CellSignaling Tech*, 1:800
- **Anti-mouse IgG (H+L), F(ab')<sub>2</sub> Fragment Alexa Fluor® 647 Conjugate**, 4410, *CellSignaling Tech*, 1:800
- **Goat anti-Mouse IgG (H+L), Superclonal™ Recombinant Secondary Antibody Alexa Fluor 488**, A28175, *Invitrogen*, 1:800
- **Goat pAb to Rb IgG Alexa Fluor 647**, ab150079, *Abcam*, 1:800

### 3.5. Equipamiento

La infraestructura y los equipos de laboratorio necesarios para la realización de todo el trabajo que se presenta en la siguiente tesis forman parte del grupo de investigación codirigido por el Dr. José Viña Ribes y la Dra. Ana Lloret Alcañiz. Dicho grupo se encuentra ubicado en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia. Además, también fue necesario la utilización de equipos y distintos servicios ofrecidos por parte de la Unidad Central de Investigación de Medicina (UCIM) en la Facultad de Medicina y del Servicio Central de Apoyo a la Investigación Experimental (SCSIE) ubicado en el campus de Burjassot de la Universidad de Valencia. A continuación se detallan los equipos utilizados.

- Microcentrífuga modelo 1-14, 90616, *Sigma*.
- Campana cultivos celulares: BC100, 245, *Cultair*
- Balanza serie AHZ, *Gram*. Sensibilidad  $\pm 0.01$  g.
- Balanza de precisión Acculab, *Sartorius*. Sensibilidad  $\pm 0,0001$ g.
- Espectrofotómetro 7315, *Jenway*
- Homogeneizador Potter-Glass-Teflon, Rw20 DZM Homogenizer, *Janke & Kunkel*
- Mini-PROTEAN Tetra Handcast Systems, *Bio-Rad*
- Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell, *Bio-Rad*
- PowerPac™ Basic Power Supply, *Bio-Rad*
- Amersham™ Protran™ 0.45  $\mu$ m Nitrocellulose Blotting Membrane, 10600002, *GE Healthcare Life Science*

- Sistema análisis quimioluminiscencia: ImageQuant™ LAS 4000, *GE Healthcare Bio-Sciences*
- pHmetro pH 50, *Instruments XS*
- Thermomixer compact, *Eppendof*
- Plataforma de agitación: Duomax, 1030, *Heidolph*.
- Cabina de gases 1100-G A, 61397, *Crumair*
- Centrifuga refrigera MPW-352R, 10352R, *MPW MED INSTRUMENTS*
- Microscopio Confocal FLUOVIEW™ 1000, *OLYMPUS®*
- Citómetro de flujo: FACSVerse™ flow cytometer, *BD Biosciences*.
- Bomba y cánula de perfusión
- Ultramicrotomo: Leica EM UC-6, Heidelberg, Germany
- Microscopio electrónico de transmisión: FEI Tecnai G2 Spirit BioTwin, Hillsboro, OR, USA
- Cámara digital: Morada, Soft Imaging System, Olympus, Tokyo, Japan
- Vibratomo: Leica VT-1000, Heidelberg, Germany

## 3.6. Métodos de comportamiento

### 3.6.1. Test de habituación olfativa

Los déficits olfativos se examinaron siguiendo el procedimiento de Wesson et al. (Wesson, Levy, Nixon, & Wilson, 2010) mediante la prueba de habituación a los olores 201 (Sundberg, Døving, Novikov, &

Ursin, 1982). Los olores ( $n = 7$ ; heptanona, acetato de isoamilo, limoneno, valerato de etilo, pentanol, butirato de propilo y nonano; Sigma Aldrich, St. Louis, MO) se diluyeron  $1 \times 10^{-3}$  en aceite mineral y se aplicaron a un bastón aplicador de algodón. Para evitar el contacto del olor líquido con el animal, el palillo se encerró en un tubo de plástico inodoro. Este método de control de la presentación del olor permite minimizar las influencias visuales y somato-sensoriales. Los animales se probaron en su propia jaula doméstica para minimizar las posibles influencias del estrés o la ansiedad en las medidas de comportamiento. Las pruebas se realizaron durante la fase oscura del día de los animales. Los olores se suministraron durante 4 ensayos sucesivos (1 bloque), de 20 s cada uno, separados por intervalos de 30 s entre ensayos, introduciendo la varilla de olor en un puerto de la parte superior de la jaula doméstica del animal. Se registró el número de aproximaciones, definidas como el olfateo orientado al hocico dentro de 1 cm del puerto de presentación del olor. La presentación de los olores y los ratones se probaron en un orden contrabalanceado. Para el análisis de los datos del comportamiento olfativo, las duraciones de la investigación de los olores dentro de los ensayos individuales se agruparon para todos los olores. Para calcular el índice de habituación, los valores de investigación normalizados de todas las presentaciones de olores del cuarto ensayo se restaron de las correspondientes presentaciones de olores del primer ensayo.

### 3.7. Métodos de toma de muestra

#### 3.7.1. Sacrificio de animales, extracción de tejido y preparación de homogeneizados

Para la realización de los análisis proteicos se utilizaron un total de 30 ratones: 15 de la cepa *wild type* y 15 de la cepa APP/ PS1. Cada uno de ellos fue sacrificado a una edad de entre cinco y seis meses de edad mediante dislocación cervical. Seguidamente se extrajo el cerebro y con la ayuda del material quirúrgico fue diseccionado para obtener las distintas estructuras a analizar posteriormente: la V-SVZ, el hipocampo, el cerebelo y la corteza cerebral. Todas ellas fueron sometidas a Freeze-clamping y conservadas a -80°C.

Una vez obtenido el tejido es necesario su homogeneización para de esta manera poder lograr la liberación de todas las proteínas que se encuentran en su interior para su posterior estudio. Para llevar a cabo este proceso, se emplearon tanto medios mecánicos como químicos. Por un lado, se obtuvo un trozo de tejido, se pesó y se añadió 1 mL de tampón de lisis por cada 100 mg de tejido. Y por otro lado, se sometió a este mismo tejido con el tampón de lisis a 5 segundos de homogeneización mecánica con el homogeneizador. Una vez, el tejido se encuentra totalmente homogeneizado se volvió a conservar a -80°C para su análisis proteico posterior.



### 3.7.2. Fijación y preparación de tejido para inmunofluorescencia

En el caso de los análisis de inmunofluorescencia, al igual que para el análisis de proteínas, se necesitaron un total de 30 ratones: 15 *wild type* y 15 APP/PS1. Para la obtención de la muestra de estos animales, fueron sacrificados mediante método anestésico a una edad de entre cinco y seis meses. Concretamente se les realizó una inyección a nivel intraperitoneal de una dosis de 0.5 mL de la solución de Eutanax descrita anteriormente. Una vez comprobada la falta de reflejo podal y ocular se llevó a cabo una perfusión transcárdica. Primero, se utilizaron unos 100 mL de suero salino heparinizado (0,1%, pH 7.4) hasta conseguir un desangrado del animal lo más completo posible y seguidamente se añadieron unos 100 mL de paraformaldehído (4%) en tampón fosfato salino (PBS) (0,1M, pH 7.4) para conseguir la fijación de los tejidos. A continuación, se procedió a la extracción del cerebro que se mantuvo en la misma solución de paraformaldehído durante 24 horas a 4°C para su post-fijación y así conseguir la máxima fijación del tejido posible. Tras las 24 horas, se cambió el cerebro a una solución de PBS y sacarosa al 30% a 4°C. El tejido permaneció en esta solución hasta que consiguió precipitar lo cual es aproximadamente a las 48 horas y es indicativo de que se encuentra crioprotectado y por lo tanto está listo para ser cortado.

Una vez que el tejido cerebral se encuentra completamente fijado se procedió al corte en el criotomo (*Leica*). Se realizaron cortes de 40  $\mu\text{m}$  de manera seriada para así obtener un total de cinco tubos Eppendorf y en cada uno de ellos poder encontrar prácticamente todos los niveles

del cerebro. En función del área a analizar se obtuvieron tanto cortes coronales como sagitales. Una vez obtenidos los cortes fueron conservados en la solución de sacarosa al 30% a -20°C para su posterior uso en los análisis de inmunofluorescencia.

### 3.7.3. Preparación del tejido para inmunohistoquímica

Para los estudios de microscopía tanto óptica como electrónica se utilizaron un total de 8 animales: 4 *wild type* y otros 4 dobles transgénicos. Estos animales fueron sacrificados mediante método anestésico. A continuación, fueron perfundidos de manera transcardiaca, primero con 100 mL de suero salino heparinizado (0,1%, pH 7.4) para así obtener un desangrado completo y seguidamente con unos 100 mL de paraformaldehído (2%) y glutaraldehído (2.5%) en tampón fosfato salino (PBS) (0,1M, pH 7.4) para conseguir la fijación de los tejidos. A continuación, se extrajo el cerebro y se post-fijó en la misma solución durante 48 horas. Tras haber conseguido una primera fijación del tejido, se llevaron a cabo cortes coronales de 200  $\mu\text{m}$  con el vibratomo. Estos cortes se incubaron en osmio al 2% para una segunda fijación y seguidamente se enjuagaron, rehidrataron y se incrustaron en resina Durcupan (*Sigma*) para su posterior uso.

### 3.7.4. Aislamiento de células de la V-SVZ para citometría de flujo

En los análisis de citometría de flujo se utilizaron un total de ocho ratones: 4 *wild type* y 4 APP/PS1. Cabe destacar que para llevar a cabo este tipo de análisis es necesario partir de una muestra formada por una suspensión celular. Por lo tanto, tras el sacrificio de los animales a una edad de entre cinco y seis meses mediante dislocación cervical, se obtuvo la V-SVZ y se procedió a la obtención de la correspondiente suspensión celular. Para ello, este tejido fue incubado a 37°C durante 35 minutos en el denominado medio de disgregación formado por EBSS (*ThermoFisher*), 0.04 mM de papaína (*Worthington*), 0.615 mM de EDTA (*Sigma-Aldrich*) y 1.485 mM de L-cisteína (*Sigma-Aldrich*).

Tras la incubación se llevó a cabo una centrifugación durante 5 minutos, a 600G y a temperatura ambiente. El sobrenadante obtenido se descartó y el pellet se resuspendió en el medio 1XDMEM/F12. Finalmente, la suspensión celular obtenida se filtró para así descartar posibles impurezas y se llevó a cabo el conteo de las células con la cámara de Neubauer para su análisis en el citómetro de flujo.

## 3.8. Métodos analíticos

### 3.8.1. Determinación de proteínas: método de Lowry

Con el objetivo de determinar la concentración total de proteínas presente en nuestras muestras de tejido homogeneizado se siguió el método Lowry (Lowry, Rosebrough, Farr, & Randall, 1951).

## **Fundamento**

El método Lowry se basa en dos puntos clave: reacciones de óxido-reducción y la ley de Lambert-Beer. Por un lado, la presencia de iones de cobre en el reactivo de Lowry va a provocar que se generen complejos de unión entre los iones y los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos de las proteínas dando lugar a que pierdan su estructura tridimensional y queden expuestos los grupos aromáticos de la tirosina y el triptófano, a esta reacción se le conoce como reacción de Biuret. Seguidamente, estos grupos aromáticos que han quedado expuestos provocan la reducción del reactivo Folin-Ciocalteu obteniéndose así complejos de color azul intenso cuya absorbancia, a una determinada longitud de onda (660 nm), variará en función de la concentración proteica que contenga la muestra. Por otro lado, según la Ley de Lambert-Beer la absorbancia de una sustancia (A) es directamente proporcional a la concentración de dicha sustancia (c), la longitud del paso de luz (l) y una constante que es específica de cada sustancia a una determinada longitud de onda y que se denomina coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ). De tal manera que se puede expresar según la siguiente fórmula:

$$A = c \cdot l \cdot \epsilon$$

Por lo tanto, a partir de un estándar a distintas concentraciones se puede llegar a determinar los valores de la fórmula para unas condiciones determinadas, en el caso de la determinación de proteínas se utiliza como estándar el suero de albumina bovina (BSA). De tal manera que una vez conocidos los valores de la ley de Lambert

Beer podemos determinar la concentración proteica de muestras que hayan sido sometidas al mismo método (método de Lowry) y en las mismas condiciones mediante una simple extrapolación de los valores de absorbancia en la ecuación obtenida gracias al estándar.

### **Procedimiento**

Para poder determinar la concentración de proteínas mediante el método Lowry, es necesario establecer el estándar o recta patrón. En nuestro caso, esta recta patrón consistió en diluciones seriadas de BSA a las siguientes concentraciones: 12.5 mg/mL; 6.25 mg/mL; 3.12 mg/mL; 1.56 mg/mL; 0.78 mg/mL; 0.39 mg/mL; 0.195 mg/mL.

Paralelamente se preparó 990  $\mu$ L de agua bidestilada en los que se diluyeron 10  $\mu$ L de todas y cada una de las muestras, tanto de cada punto de la recta patrón como de las muestras de tejido homogeneizado. Además es necesario preparar una muestra con solo 1 mL de agua bidestilada que sirvió como blanco a la hora de medir las absorbancias con el espectrofotómetro.

A continuación, se añadió 1 mL del reactivo de Lowry en todas las muestras, incluido el blanco, y se incubaron durante 20 minutos en oscuridad. Seguidamente se añadieron 500  $\mu$ L del reactivo de Folin y se incubaron 30 minutos en oscuridad. De esta manera se consigue que se produzca la reacción de Lowry y se obtienen complejos proteicos capaces de absorber luz a una longitud de onda de 660 nm.

Una vez obtenida la reacción, se midió la absorbancia de cada una de las muestras a una longitud de onda de 660 nm, empezando por las

diluciones de la recta patrón y estableciendo como 0 la muestra que hemos preparado como blanco en la que no hay proteína alguna. Una vez obtenidas las medidas de absorbancia, con las concentraciones conocidas de la recta patrón y sus correspondientes absorbancias se obtuvo la ecuación de la recta que establece la relación absorbancia-concentración según la ley de Lambert-Beer. A partir de esta ecuación de la recta se interpolaron los valores de absorbancia de las muestras de los tejidos homogeneizados y se obtuvo su concentración proteica correspondiente.

### **3.8.2. Western Blotting**

Para poder determinar los niveles de distintas proteínas de interés en el tejido homogeneizado obtenido se llevó a cabo la técnica del Western Blotting.

#### **Fundamento**

La técnica de Western Blotting tiene como objetivo detectar niveles de proteínas en muestras biológicas y se basa en la capacidad de reconocimiento de proteínas de interés por parte de anticuerpos específicos. Para conseguir este objetivo, esta técnica consta de distintas partes: electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE, electrotransferencia e *immunoblot*.

En el caso de la electroforesis en gel de poliacrilamida se busca la separación en función del tamaño de las proteínas que se encuentran en la muestra. El uso de la poliacrilamida y de otras sustancias como el SDS permite que dicha separación se lleve a cabo únicamente en función del peso molecular de las proteínas, ya que, provocan su

desnaturalización, es decir, la pérdida de su estructura nativa y que tenga una carga neta negativa. De tal manera, que se separaran a lo largo del gel en función de su tamaño gracias al paso de una corriente eléctrica a través del gel de manera vertical. Estos geles están formados por dos partes: el “stacking” o concentrador, de pequeño tamaño con un porcentaje de poliacrilamida pequeño y constante, y que sirve para que todas las proteínas de la muestra comiencen a separarse por tamaño desde una misma posición; y el “resolving” o resolutor que es de mayor tamaño, con un porcentaje de poliacrilamida mayor y variable; y a lo largo del cual se produce la separación por tamaño de las proteínas de cada muestra. El porcentaje de poliacrilamida de estos geles dará lugar a geles con mayor o menor espacio en su entramado, por lo tanto vendrá determinado en función del tamaño de la proteína de interés. De tal manera que para proteínas de gran peso molecular se recomienda el uso de geles con porcentajes pequeños mientras que para proteínas pequeñas es recomendable usar geles con alto porcentaje de poliacrilamida.

Con la electrotransferencia se pretende transferir las proteínas separadas previamente en el gel de poliacrilamida a una membrana o bien de nitrocelulosa o de PVDF. Tal y como indica el nombre, esta transferencia se produce debido al paso de corriente eléctrica horizontalmente. La transferencia a este tipo de membranas permite dejar expuestas las proteínas para su posterior detección con anticuerpos específicos.

Por último, mediante el *immunoblot* se consigue la detección de proteínas específicas presentes en las membranas y separadas en

función de su peso molecular. En esta parte es preciso bloquear la membrana con la solución de bloqueo para impedir uniones no específicas de nuestro anticuerpo. De esta manera, cuando incubemos la membrana con el anticuerpo deseado, este se unirá únicamente a nuestra proteína de interés. Para poder llevar a cabo la detección de esta unión es necesario un anticuerpo secundario que sea capaz de reconocer la región constante del anticuerpo primario y que además se encuentre conjugado con una peroxidasa (*Horseradish Peroxidase, HRP*) que permite generar una reacción quimioluminiscente cuando reacciona con un sustrato: el luminol. De esta manera, se puede establecer una relación directamente proporcional entre los niveles de nuestra proteína de interés y la intensidad de la señal emitida por la reacción de la peroxidasa en contacto con el luminol.

### **Procedimiento**

Tal y como se ha mencionado anteriormente, la primera parte del Western Blot es la electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE. Por ello, el primer paso será la preparación de dichos geles. Los geles resolutivos utilizados en este trabajo fueron de 15%, 12.5%, 10% y 7% de poliacrilamida. Los volúmenes necesarios de cada reactivo para cada tipo de gel se recogen en la siguiente tabla:



	Gel resolutivo				Gel concentrador
	15%	12.5%	10%	7%	
Agua destilada (mL)	3.65	4.27	4.9	5.65	3.075
Tris HCl [1.5M] pH 8.8 (mL)	2.5	2.5	2.5	2.5	-
Tris HCl [1M] pH 6.8 (mL)	-	-	-	-	1.25
Acrilamida (mL)	3.75	3.13	2.5	1.75	0.625
SDS 10% ( $\mu$ L)	100	100	100	100	50
APS 10% ( $\mu$ L)	30	30	30	30	15
TEMED ( $\mu$ L)	15	15	15	15	7.5

Paralelamente se prepararon las muestras que se cargarán en los geles. De cada muestra de tejido homogeneizado se prepararon 20  $\mu$ g de proteínas con la cantidad correspondiente del Tampón de carga 2X. Una vez preparadas las muestras con el tampón de carga, se incubaron a 95°C durante 5 minutos. Seguidamente, se cargó cada muestra en cada uno de los pocillos del gel de poliacrilamida; el cual se coloca en la cubeta de electroforesis con el Tampón de electroforesis y se sometió a un voltaje continuo de 100 voltios durante aproximadamente 90 minutos, hasta que el frente de las muestras llega prácticamente al final del gel.

A continuación, se recogió el gel de poliacrilamida con mucho cuidado y se preparó la electrotransferencia con la ayuda del material de Mini

Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell. En este kit nos encontramos con el “sándwich” el cual se preparó en el siguiente orden, empezando por la cara negra del “sándwich”: esponja, papel de filtro, gel de poliacrilamida, membrana de nitrocelulosa, papel de filtro, esponja. Una vez preparado el “sándwich” se colocó en la cubeta de transferencia junto con el Tampón de transferencia y se programó la fuente de alimentación con un amperaje constante de 240 mA (120 mA por cada gel), durante 90 minutos y se vigiló el voltaje para que no superara los 100 voltios; para lo cual se mantuvo la cubeta en frío en todo momento.

Una vez terminada la transferencia debemos llevar a cabo una serie de tratamientos para poder detectar nuestra proteína de interés con un anticuerpo específico. En primer lugar se incubó la membrana con la correspondiente solución de bloqueo, en agitación, a temperatura ambiente y durante 1 hora. Tras el bloqueo de la membrana se añadió el anticuerpo primario específico diluido en la solución de bloqueo y a la dilución recomendada por la casa comercial en el *datasheet*. La membrana se incubó con anticuerpo primario, a 4°C, en agitación y durante toda la noche. Al día siguiente, se retiró el anticuerpo primario y se hicieron tres lavados con TBS-t de 5,5 y 10 minutos, en agitación y a temperatura ambiente. Tras los lavados, se incubó la membrana con el correspondiente anticuerpo secundario el cual dependerá en función de la parte constante del anticuerpo primario, es decir, del huésped en el cual se haya obtenido dicho anticuerpo. Esta incubación se llevó a cabo durante 1 hora, a temperatura ambiente y con agitación. Seguidamente, se realizaron otros tres lavados con TBS-t

igual que los anteriores y se reveló la membrana. Para revelar las membranas se utilizó el ImageQuant™ LAS 4000, GE Healthcare BioSciences y 1 mL de Luminol por cada membrana que se añadió en su superficie asegurándonos una distribución lo más uniforme posible.

También se determinaron los niveles de Tubulina o bien GAPDH en todas las membranas, como control de carga y para la normalización de los niveles de nuestra proteína de interés. Para ello, una vez revelada la membrana con la proteína de interés, es sometida a una incubación con la solución de Stripping durante 10 minutos, con agitación y a temperatura ambiente. Esta incubación va a permitir que la membrana quedé completamente limpia para que vuelva a ser bloqueada e incubada con otro anticuerpo. Tras la incubación se sometió a la membrana a tres lavados con TBS-t y se repitió el proceso mencionado anteriormente; salvo en el caso de la Tubulina cuya incubación con el anticuerpo primario fue solo de 2 horas.

Finalmente, las imágenes obtenidas de las membranas fueron analizadas con el software *ImageGauge V4.0* que permite llevar a cabo la densitometría de las bandas correspondientes de las proteínas a analizar en cada membrana. Una vez obtenido el valor de densitometría de cada muestra se determinó el promedio para cada grupo y su correspondiente desviación estándar.

### 3.8.3. Inmunofluorescencia

#### **Fundamento**

La técnica de inmunofluorescencia se basa, al igual que el Western Blot, en la detección de proteínas de interés mediante el uso de anticuerpos específicos. Sin embargo, en este caso la detección se realiza directamente sobre el tejido fijado y no sobre la muestra homogeneizada. De esta manera también nos permite determinar la distribución de la proteína de interés en el tejido directamente, y así conocer si hay una mayor o menor acumulación de dicha proteína en sitios concretos del tejido.

En este caso al igual que en el Western Blot es necesario llevar a cabo un proceso de bloqueo para impedir uniones inespecíficas, con la salvedad de que dicho bloqueo se realiza directamente sobre la muestra a analizar: el tejido fijado. Además en este caso la solución de bloqueo está formado por suero de cabra en PBS-t, en lugar de albumina bovina o leche.

Otra de las mayores diferencias con el Western Blot es el método de detección. En este caso, tal y como indica el nombre de la técnica, la detección se produce mediante fluorescencia. Concretamente se utiliza un anticuerpo secundario que se unirá a la parte constante del anticuerpo primario pero en un lugar de estar conjugado con la HRP, esta conjugado con un fluorocromo. Esta molécula es capaz de absorber energía a una determinada longitud de onda y emitirla a una longitud de onda diferente; esta característica permite analizar más una proteína de interés a la vez. Lo cual se hace posible, siempre y

cuando, los anticuerpos primarios sean reconocidos por secundarios diferentes que presenten un fluorocromo capaz de excitarse y emitir a una longitud de onda diferente. De tal manera que la intensidad de la fluorescencia emitida se relaciona directamente con los niveles de la proteína de interés. Además, el poder analizar más de una proteína a la vez permite determinar la existencia o no de co-localización entre ambas proteínas.

### **Procedimiento**

A lo largo de esta tesis se utilizaron dos técnicas distintas para llevar a cabo la inmunofluorescencia: *Free-Floating* y *Slide-Mounted Sections*. En ambos casos, el fundamento y los pasos a seguir son los mismos; la principal diferencia es el medio en el cual se encuentra el tejido a analizar. Por un lado, en el *Free-Floating* las secciones del tejido fijado se encuentran libres en la solución de incubación o lavado que se detallarán más adelante; y finalmente se montan las secciones en los portaobjetos. Por otro lado, en el caso del *Slide-Mounted Sections* el primer paso a llevar a cabo es montar las secciones en el portaobjetos y ya entonces se trata el tejido con los distintos compuestos con la ayuda de un rotulador indeleble que permite que las disoluciones utilizadas no se expandan por todo el portaobjetos. Este último método permite el poder seleccionar las secciones de interés del tejido desde un primer momento. En todo caso, en ambas técnicas los pasos a seguir son los que se describen a continuación.

En primer lugar, el tejido se sometió a tres lavados de 5, 5 y 10 minutos con PBS-t para conseguir eliminar cualquier resto de sacarosa que

pueda interferir en la técnica. Seguidamente, se incubó con la solución de bloqueo que consistió en una dilución 1:10 de suero de cabra en PBS-t durante 1 hora y a temperatura ambiente. Tras bloquear el tejido se incubó con los anticuerpos primarios de interés durante toda la noche a 4°C y con agitación en el caso del *Free-Floating*. Una vez se ha incubado el tejido con el anticuerpo primario, de nuevo, se hicieron tres lavados con PBS-t. A continuación, se incubó el tejido con los anticuerpos secundarios correspondientes. Este proceso al igual que los sucesivos debe realizarse en la mayor oscuridad posible, ya que, estos anticuerpos se encuentran conjugados con fluoróforos y por tanto, son sensibles a la luz. Esta incubación se realizó durante 2 horas, a temperatura ambiente y en agitación en el caso del *Free-Floating*. Posteriormente, se realizaron otros tres lavados de 5, 5 y 10 minutos con PBS-t para eliminar cualquier resto de los anticuerpos secundarios; y se incubó el tejido con la dilución 1:1000 de Hoechst (33342 *Thermo Fisher*) en PBS durante 30 minutos, a temperatura ambiente y con agitación en el caso del *Free-Floating*. El compuesto Hoechst es fluorescente y se utiliza debido a su capacidad de unión al ADN y por lo tanto nos permite observar los núcleos celulares para así guiarnos en el tejido. Consecutivamente, se realizaron otros tres lavados con PBS, y finalmente, con la ayuda del medio montaje se cubrieron los portaobjetos con los cubres y se conservaron a 4°C y en oscuridad para su posterior visualización en el microscopio.

Por último, tras la preparación de las secciones del tejido se visualizaron y se tomaron imágenes de las regiones de interés utilizando el microscopio de fluorescencia confocal FV1000. Las

imágenes obtenidas fueron analizadas utilizando el software *ImageJ* el cual permitió la cuantificación de la intensidad de la fluorescencia emitida y por lo tanto, los niveles de las proteínas de interés. Para ello, se analizaron como mínimo 3 imágenes por cada ratón, en las que se determinó la fluorescencia del área de interés y se calculó el incremento respecto al ruido de fondo. Seguidamente, se calculó el promedio para cada animal a partir del cual se estableció la media de cada grupo y su correspondiente desviación estándar. Además mediante el uso del *plug-in Fiji* de *ImageJ* se pudo determinar distintos parámetros de colocalización como el coeficiente de correlación de Pearson y los porcentajes de colocalización. En el caso del coeficiente de correlación de Pearson se utilizó el *script* descrito por Moser y colaboradores (Moser, Hochreiter, Herbst, & Schmid, 2017), mientras que para determinar el porcentaje de colocalización se utilizó la función *Colocalization Threshold* del *plug-in* mencionado. En el caso de estos parámetros también se utilizaron, como mínimo, tres imágenes por cada ratón; a partir de las cuales se obtuvo el promedio de cada ratón con los que se calculó la media de cada grupo y la respectiva desviación estándar.

### **3.8.4. Citometría de flujo**

#### **Fundamento**

La citometría de flujo es una técnica que se utiliza para el análisis morfológico, y bioquímico de las células. Esta técnica se basa en la dispersión de luz láser por parte de las células en función de las características que presenten. De tal manera que se hace pasar un

flujo de células en suspensión sobre las que incide una luz láser la cual será dispersada; dicha dispersión se recoge en dispositivos de detección y es procesada mediante un software específico que nos permite determinar las propiedades analizadas de cada una de las células sobre las que ha incidido el láser. De primeras, esta dispersión nos dará información sobre la morfología de las células y el número presente en la suspensión. Sin embargo, el uso de distintos biomarcadores de carácter fluorescente cuya presencia provoca una dispersión a una determinada longitud de onda permite obtener información sobre otras propiedades de las células, como: la presencia de senescencia, la existencia de células apoptóticas o en qué estado del ciclo celular se encuentran.

En este trabajo se utilizó el citómetro de flujo para determinar en qué etapa del ciclo celular se encuentran dichas células mediante el uso de PI/RNASE Solution (*Immunostep*) que se basa en el uso de yoduro de propidio el cual es capaz de unirse al ADN de doble banda de las células, por lo tanto su uso nos permite diferenciar entre una etapa u otra del ciclo celular. Asimismo se recurrió al kit MitoPY1 (4428, *TOCRIS*) para determinar los niveles de peróxido de hidrógeno mitocondrial y por lo tanto la presencia o ausencia de estrés oxidativo en las células a analizar.

Ambos procedimientos fueron llevados a cabo mediante el uso del servicio de citometría de flujo de la UCIM.



### **Procedimiento: caracterización Ciclo Celular**

Para poder determinar en qué fase del ciclo celular se encuentran las células de la V-SVZ se llevó a cabo un ensayo de citometría de flujo utilizando el kit PI/RNASE Solution (*Immunostep*) y el siguiente procedimiento. Partiendo de la suspensión de células de V-SVZ en 1XDMEM/F12 se centrifugaron a 300G durante 5 minutos y a temperatura ambiente. El sobrenadante obtenido se descartó y el pellet se resuspendió en 200  $\mu$ L de etanol al 70% y se incubó a 4°C durante 30 minutos. Tras la incubación se volvió a centrifugar a 300G durante 5 minutos para así eliminar el etanol y se resuspendió el pellet obtenido en PBS con BSA al 2%. Seguidamente se centrifugó de nuevo, en las mismas condiciones, se eliminó el PBS, se añadió 0.5 mL de PI/RNASE Solution (*Immunostep*) y se dejó en incubación a 4°C, durante toda la noche y en oscuridad. Tras la incubación se llevaron las muestras al citómetro de flujo donde se analizaron utilizando los láseres FSC, SSC y PE. Seguidamente los datos se procesaron con el software ModFit LT.

### **Procedimiento: determinación niveles peróxido de hidrógeno**

En el caso de la determinación del estrés oxidativo se optó por la determinación de los niveles mitocondriales de peróxido de hidrógeno en nuestra suspensión de células aisladas de la V-SVZ mediante el kit de MitoPY1 (4428, *TOCRIS*) para citometría de flujo. Para ello se añadió el reactivo suministrado por el kit a una concentración de 4  $\mu$ M y se incubó con la suspensión celular durante 20 minutos a 37°C. Tras la

incubación se pasó la suspensión celular marcada por el citómetro de flujo utilizando el láser de excitación azul con una longitud de onda de 488 nm. Además de las muestras de las dos cepas de ratones que se han utilizado a lo largo de todo el trabajo (WT y APP/PS1), se utilizó un control positivo. Este control positivo consistió en células aisladas de la V-SVZ de la cepa *wild type* y tratadas previamente con hidropéroxido terbutílico (tBuOOH), un peróxido orgánico capaz de generar estrés oxidativo en las células. Por lo tanto, nos sirve para calibrar si la señal que estamos observando es correcta y se corresponde con la realidad.

### **3.8.5. Microscopia Óptica y Electrónica**

#### **Fundamento**

Por un lado, la microscopia óptica se basa en el uso de lentes convexas que permiten obtener imágenes aumentadas de un objeto. De tal manera que cuando la luz pasa a través de estas lentes se produce la desviación de dicha luz, lo cual se conoce como refracción. Cuanto mayor sea el índice de refracción mayor será la resolución, es decir, menor será la distancia a la que podemos diferenciar dos objetos que están próximos. Esta resolución también depende de la longitud de onda que se utilice, ya que, para poder discernir entre un objeto u otro la distancia entre ellos debe ser mayor que la longitud de onda de la luz que los atraviesa.

Por otro lado, la microscopia electrónica se basa en el uso de un haz de electrones en lugar de fotones de luz visible para observar muestras de pequeño tamaño. Esto permite que la resolución del microscopio electrónico sea mucho mayor, ya que, la longitud de onda de los

electrones es aproximadamente 100 000 veces menor que la de la luz visible. Existen dos tipos de microscopía electrónica en función de la forma en la que los electrones incidan sobre la muestra a analizar: de transmisión y de barrido. En este trabajo se utilizó la microscopía electrónica de transmisión ya que se adecuaba más a los fines establecidos. En este caso, el haz de electrones se dirige hacia la muestra guiado por unas lentes magnéticas y la muestra dispersa los electrones que pasan a su través. Dichos electrones son recogidos por lentes magnéticas para generar una imagen aumentada de la muestra. De tal manera que aquellas zonas de la muestra con mayor densidad, denominadas electrodensas, darán lugar a una imagen más oscura; mientras que las menos densas o electrotransparentes reflejarán una imagen más clara.

Debido a que los electrones se dispersan y absorben con gran facilidad sobre la materia sólida es necesario el uso de muestras con un grosor de entre 20 a 100 nm para así facilitar una resolución óptima. Además al igual que en el caso del microscopio óptico, las muestras también se tiñen para su observación. En este caso, se deben utilizar compuestos con alta capacidad de dispersar los electrones, es decir, electrodensos. De tal manera, que las muestras se suelen teñir con soluciones con plomo o uranio que son capaces de unirse a las estructuras celular y hacerlas más electrodensas; y por tanto, aumentar el contraste de la imagen.

## Procedimiento

Para el análisis con microscopía óptica de la V-SVZ se utilizaron los cortes de 200  $\mu\text{m}$  mencionados anteriormente. A partir de estos cortes se obtuvieron secciones semifinos con un grosor de solo 1.5  $\mu\text{m}$ . Para ello se utilizó un ultramicrotomo con cuchilla de diamante (Histo, *Diatome*). Estos semifinos fueron tratados con azul de toluidina al 1% para su posterior visualización en el microscopio óptico. Dichas muestras se observaron en el microscopio con el objetivo de 40X y se obtuvieron imágenes que fueron analizadas con el software ImageJ para así determinar el área de la V-SVZ en las cepas a estudio.

Tras su análisis; se utilizaron esos mismos semifinos para obtener ultrafinos con un grosor de 0.08  $\mu\text{m}$  utilizando el ultramicrotomo con cuchilla de diamante (Ultra 45°, *Diatome*). Estos ultrafinos fueron marcados con citrato de plomo y posteriormente se examinaron utilizando el microscopio electrónico de transmisión y una cámara digital para la obtención de las imágenes. A partir de las imágenes obtenidas en el microscopio electrónico se analizó la V-SVZ de cada animal y los tipos celulares presentes con el software ImageJ siguiendo la clasificación establecida por Doetsch y cols. (Fiona Doetsch & Alvarez-Buylla, 1996).

### 3.8.6. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en todos y cada uno de los métodos analíticos utilizados se expresaron en forma del promedio obtenido en cada uno de los grupos junto con la correspondiente desviación estándar. Para determinar el valor estadístico se utilizó la prueba T-

Student para comparar dos valores de muestras paramétricas y la prueba de ANOVA para la comparación de más de dos resultados de muestras también paramétricas. El valor que se estableció para rechazar de la hipótesis nula fue de  $p \leq 0.05$ . De tal manera que la significación o no significación de los resultados obtenidos fue establecida en función de este valor estadístico.



# RESULTADOS



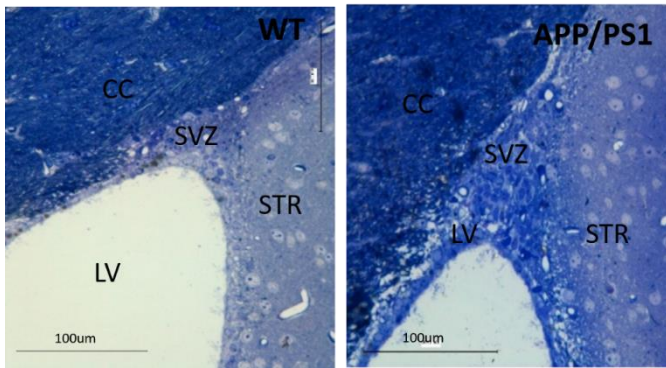
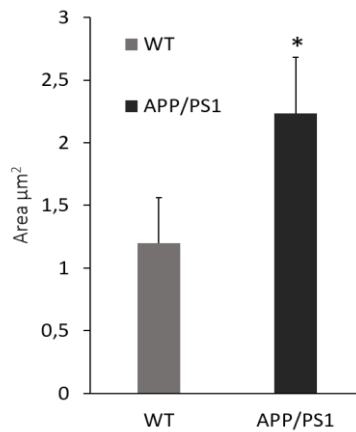


## 4. Resultados

### 4.1. Estudio de la morfología y estructura de la V-SVZ

En primer lugar, se quiso determinar si existían diferencias estructurales entre la V-SVZ de los ratones WT y la de los ratones transgénicos APP/PS1. Para ello, se utilizaron cortes coronales de ratones de ambas cepas y se marcaron con azul de toluidina. Estos cortes fueron llevados al microscopio óptico y se obtuvieron distintas imágenes en las que se focalizó en la V-SVZ, tal y como se puede observar en las siguientes imágenes representativas de todas las que se realizaron a cada ratón (Figura 18A). Como podemos ver en las imágenes, el marcaje con azul de toluidina nos permite diferenciar las distintas partes del área enfocada gracias a la distribución diferenciada de las células en cada una de ellas y a la diferencia en la intensidad del azul. Dichas partes son: la V-SVZ, el ventrículo lateral, el cuerpo caloso y el estriado.

A partir de estas imágenes se delimitó el área de la V-SVZ con la ayuda del software ImageJ. Como resultado de esta determinación se observó que la V-SVZ de los ratones APP/PS1 presentan un área significativamente mayor que la de los ratones WT (Figura 18B).

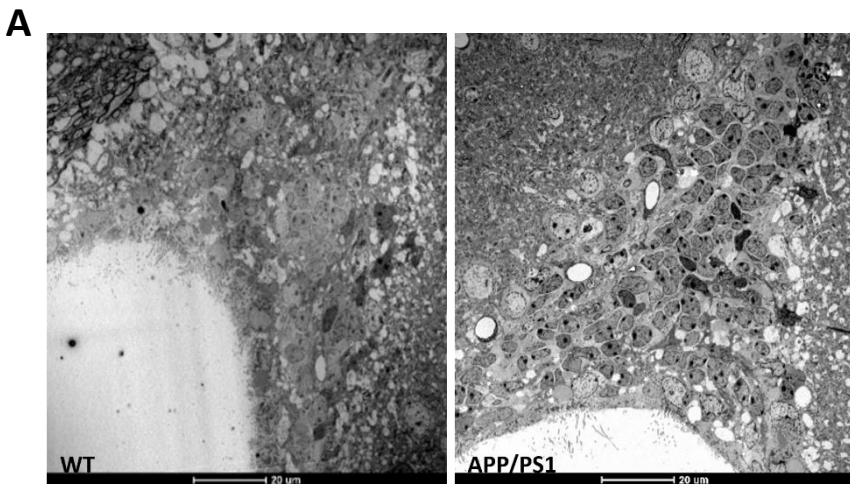
**A****B**

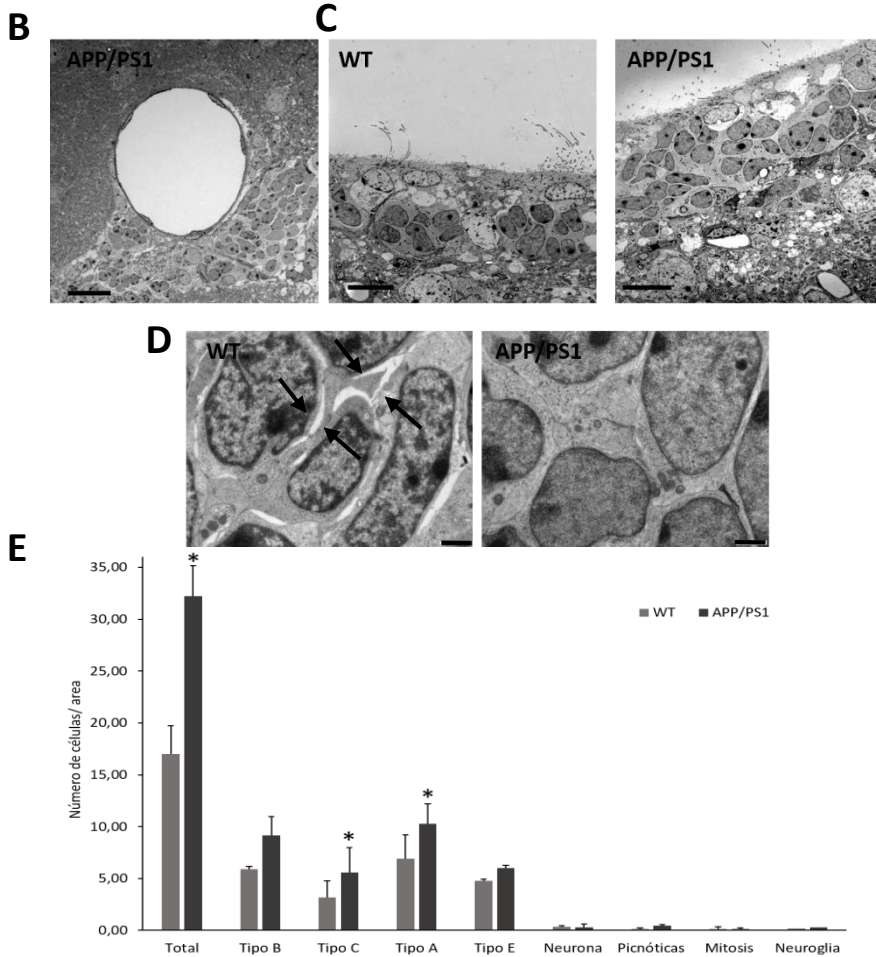
**Figura 18. Determinación del área de la V-SVZ del ratón.** **A.** Imágenes representativas de la V-SVZ marcada con azul de toluidina en ratones WT y APP/PS1. Escala= 100 µm. **B.** Cuantificación del área de la V-SVZ de ratones WT y APP/PS1. N=3. \* $p < 0.05$  vs WT. CC: cuerpo calloso; STR: estriado; V-SVZ: zona ventricular-subventricular; VL: ventrículo lateral.

Seguidamente, se utilizaron cortes de los mismos ratones para observar la V-SVZ con el microscopio electrónico de transmisión y así profundizar en su estudio. Las imágenes adquiridas con este método permitieron corroborar el aumento de volumen en la V-SVZ de ratones APP/PS1 comparado con los WT (Figura 19). Además, la mayor definición que nos aporta esta técnica permitió diferenciar los distintos tipos celulares presentes en la V-SVZ según su ultraestructura

y llevar a cabo el recuento de los tipos celulares en cada uno de los ratones. El resultado obtenido mostró que el computo celular total normalizado por área es mayor en los ratones transgénicos. Asimismo, se pudo comprobar que dicho incremento se debe principalmente a un aumento significativo de células de tipo A o células migradoras y células tipo C en la V-SVZ de estos ratones respecto a los controles (Figura 19E). Por lo tanto, el resultado obtenido nos indicaba que en la V-SVZ de los ratones transgénicos existe una acumulación de neuronas migradoras.

Por otro lado, dichas células tipo A se encuentran rodeadas por grandes vasos sanguíneos y aparecen más desorganizadas que en los WT y sin los espacios de la matriz extracelular necesarios para llevar a cabo el proceso de migración (Figura 19B-D).

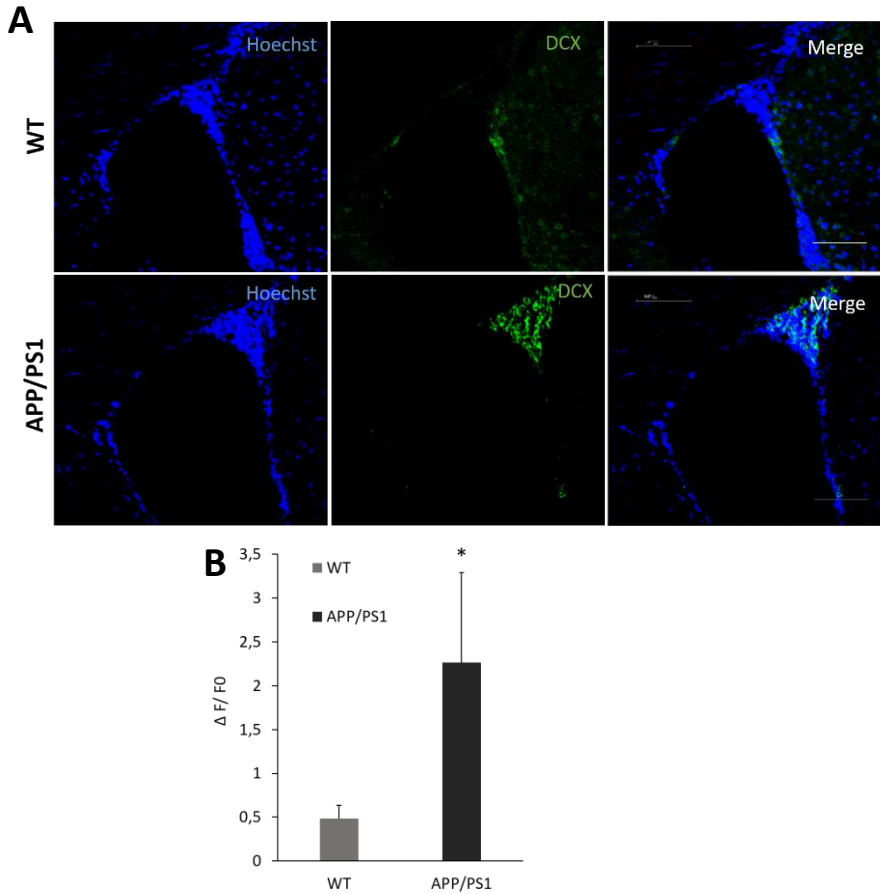




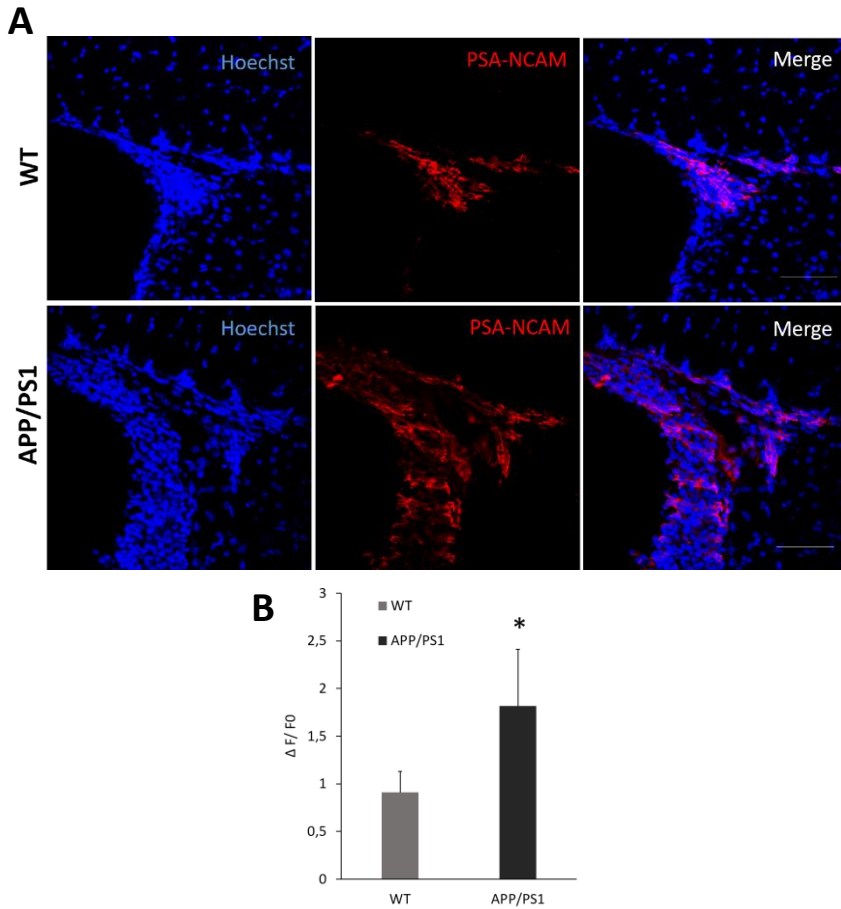
**Figura 19. Estudio de la ultraestructura de la V-SVZ de ratones WT y APP/PS1.** **A.** Imágenes representativas de la V-SVZ de ratones WT y APP/PS1 en el microscopio electrónico de transmisión. Escala=20µm. **B.** Imagen representativa de los vasos sanguíneos de gran tamaño que rodean las células tipo A en el APP/PS1. **C.** Organización de las células tipo A de la V-SVZ. Escala = 20 µm. **D.** Espacios de la matriz extracelular en los grupos de células tipo A. Escala = 1 µm. **E.** Cuantificación del número de los distintos tipos celulares en función del área. N=4. \*p < 0.05 vs WT.

#### 4.1.1. Caracterización de las células acumuladas en la V-SVZ de los ratones APP/PS1

Paralelamente, para ratificar la existencia de la acumulación de neuronas migradoras se realizó un ensayo de inmunofluorescencia con marcadores de este tipo celular. Concretamente, se utilizaron la proteína DCX, que es característica de las NPCs como es el caso de las neuronas migradoras, y la PSA-NCAM que es propia de la migración neuronal. Por un lado, se utilizaron cortes coronales en los que se observó que existía un aumento significativo de DCX en la V-SVZ de los ratones APP/PS1 respecto a los WT (Figura 20). Por otro lado, a partir de cortes sagitales se determinó el incremento significativo de la expresión de PSA-NCAM en los transgénicos en comparación con los controles (Figura 21). En este caso, se utilizaron cortes sagitales en lugar de coronales debido a que la distribución de PSA-NCAM en el tejido provoca que su visualización sea mucho más clara y definida en este tipo de cortes. Este aumento significativo de DCX y PSA-NCAM en la V-SVZ de los ratones APP/PS1 confirmó la acumulación de neuronas migradoras.



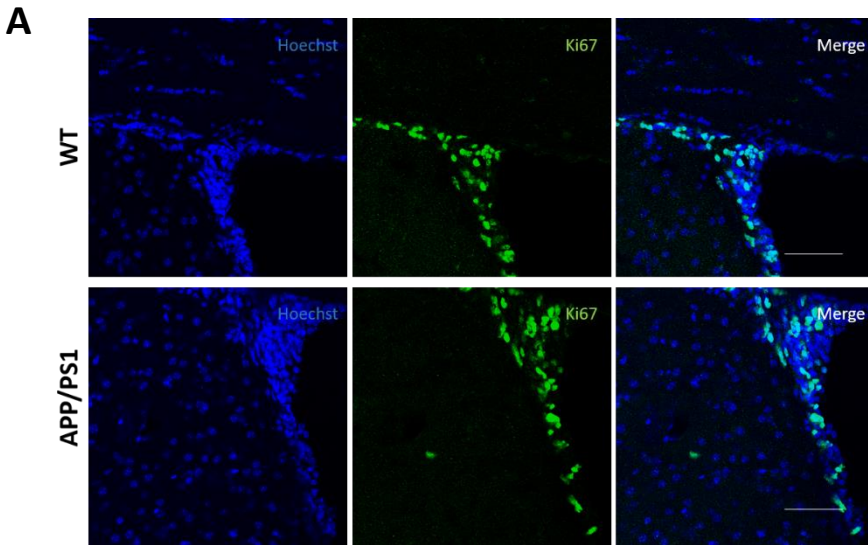
**Figura 20. Detección por inmunofluorescencia de la proteína DCX en la V-SVZ. A.** Imágenes representativas de inmunofluorescencia de la V-SVZ marcando con azul los núcleos (Hoechst) y con verde DCX en ratones WT y APP/PS1. Escala=0.75 $\mu$ m  
**B.** Cuantificación del incremento de la fluorescencia verde correspondiente a DCX respecto al fondo. N=3. \* $p < 0.05$  vs WT.



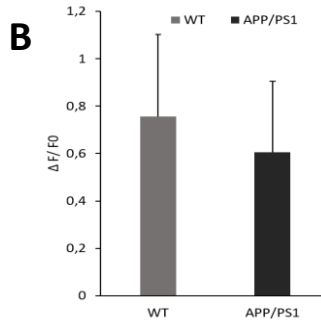
**Figura 21. Determinación por inmunofluorescencia de los niveles de PSA-NCAM en la V-SVZ. A.** Imágenes representativas de inmunofluorescencia de la V-SVZ marcando con azul los núcleos (Hoechst) y con rojo PSA-NCAM en ratones WT y APP/PS1. Escala=0.75 $\mu$ m **B.** Cuantificación del incremento respecto al fondo de la fluorescencia roja correspondiente a los niveles de PSA-NCAM. N=3. \*p < 0.05 vs WT.

#### 4.1.2. Determinación de la capacidad proliferativa de la V-SVZ

A continuación, nos preguntamos si el motivo de la acumulación de estas células en la V-SVZ podría deberse a un aumento en la capacidad proliferativa de las NPCs. Por lo que, llevamos a cabo la determinación de los niveles del marcador de proliferación, Ki67, mediante un ensayo de inmunofluorescencia (Figura 22). Tal y como se puede ver tanto en las imágenes representativas obtenidas, como en la gráfica correspondiente a la cuantificación de los niveles de Ki67; no existe ninguna diferencia entre V-SVZ de los ratones WT y APP/PS1. Por lo tanto, no existen cambios en la proliferación de la V-SVZ.







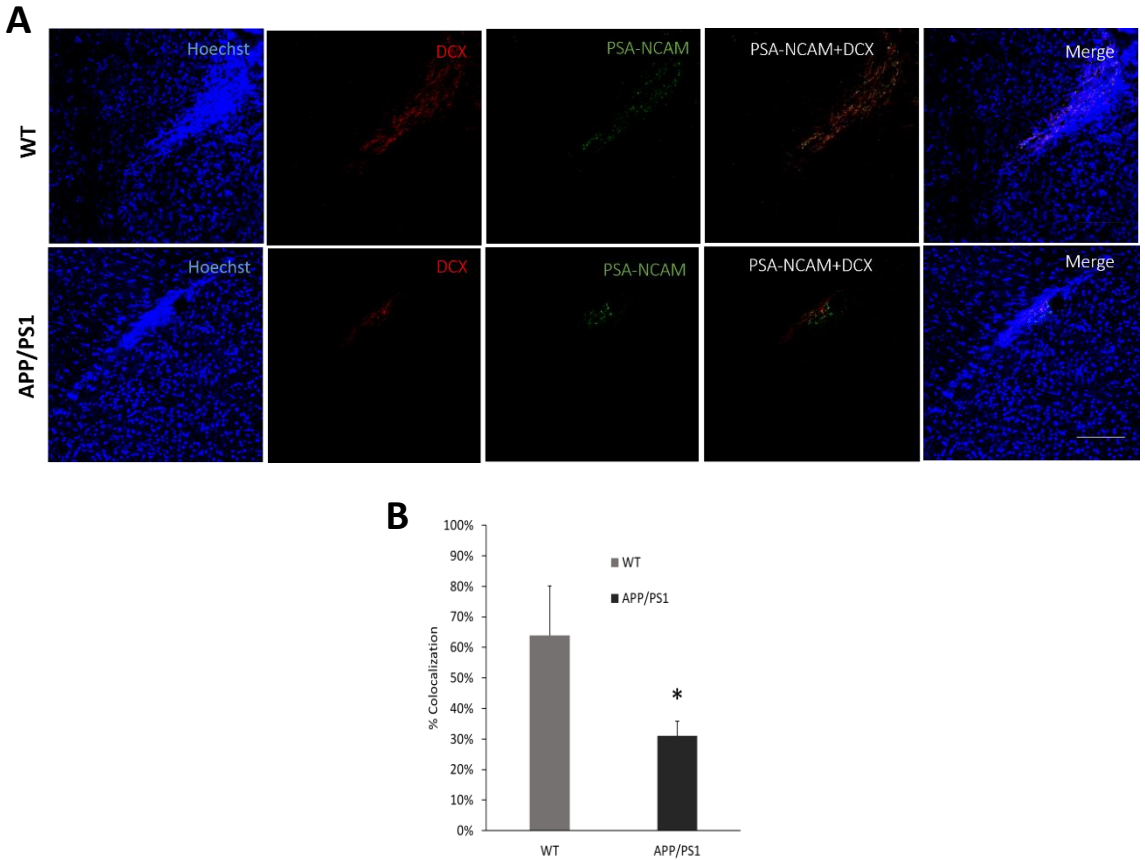
**Figura 22. Cuantificación mediante inmunofluorescencia de los niveles de Ki67 en la V-SVZ. A.** Imágenes representativas de inmunofluorescencia de la V-SVZ marcando con azul los núcleos (Hoechst) y con verde Ki67 en ratones WT y APP/PS1. Escala=0.75 $\mu$ m **B.** Cuantificación del incremento respecto al fondo de la fluorescencia verde correspondiente a los niveles de Ki67. N=3.

## 4.2. Estudio de la migración neural

### 4.2.1. Número neuronas migradoras en la RMS

A la vista del resultado anterior nos planteamos si el incremento en el número de células tipo A en la V-SVZ se debía a un fallo en el proceso de migración y no a la capacidad proliferativa. Por lo tanto, decidimos llevar a cabo el estudio de las principales zonas implicadas en la migración de las células de la V-SVZ. En concreto nos centramos en los bulbos olfatorios, destino al cual se dirigen las células provenientes de la V-SVZ, y la RMS que es la vía a través de la cual estas células llegan a su destino. En primer lugar, mediante el uso de cortes sagitales observamos la RMS de los ratones controles y transgénicos utilizando el mismo marcaje empleado anteriormente en la V-SVZ: DCX y PSA-NCAM, para así poder observar las neuronas migradoras a lo largo de este camino. El resultado obtenido, y que se presenta a continuación, refleja que existe una menor cantidad de células DCX<sup>+</sup> PSA-NCAM<sup>+</sup> en

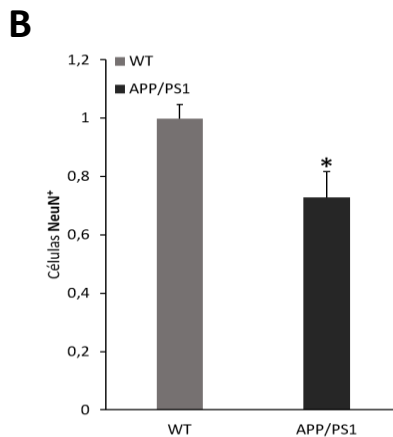
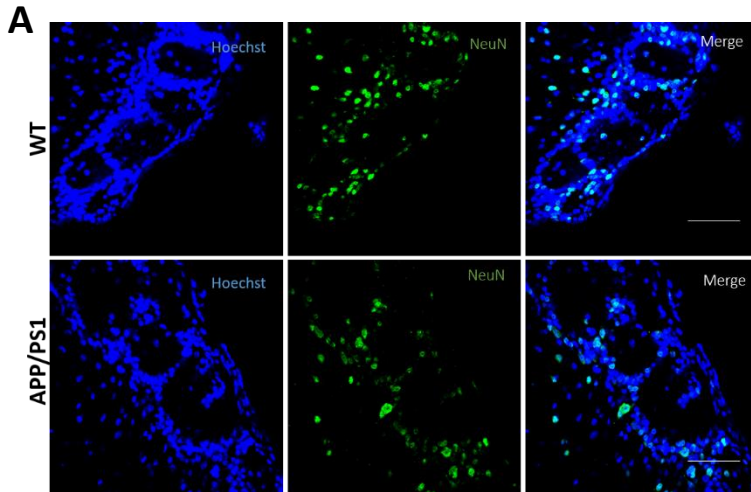
la RMS de los ratones APP/PS1 respecto a los WT, en función del grado de co-localización que existe entre ambos marcadores (Figura 23).



**Figura 23. Análisis de las células tipo A a lo largo de la RMS de ratones WT y APP/PS1. A.** Imágenes representativas de inmunofluorescencia de la RMS marcando con azul los núcleos (Hoechst), con verde PSA-NCAM y con rojo DCX en ratones WT y APP/PS1. Escala=0.75 $\mu$ m **B.** Cuantificación del porcentaje de co-localización entre la fluorescencia roja y verde, correspondiente al número de células DCX<sup>+</sup>PSA-NCAM<sup>+</sup>. N=3. \* $p < 0.05$  vs WT.

### 4.2.2. Análisis de los bulbos olfatorios

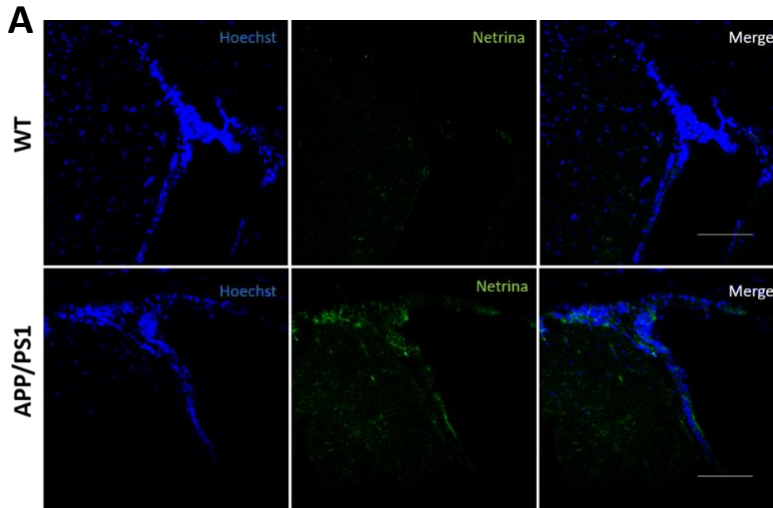
Posteriormente, pasamos a estudiar los bulbos olfatorios, concretamente los glomerulos. Para ello, se llevó a cabo el marcaje con NeuN para la neuronas maduras. De esta manera se pudo observar si los cambios en el proceso de migración, tanto en la V-SVZ como en la RMS; afectan a la cantidad de neuronas maduras de los bulbos olfatorios. Tal y como se observa a continuación, se determinó una disminución de neuronas maduras en el bulbo olfatorio de los ratones APP/PS1 respecto a los controles (Figura 24).

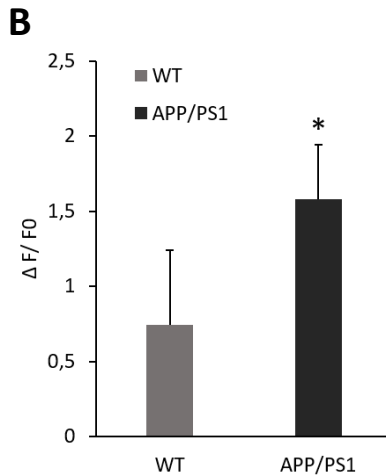


**Figura 24. Determinación de neuronas maduras en el bulbo olfatorio de ratones WT y APP/PS1. A.** Imágenes representativas de inmunofluorescencia del bulbo olfatorio marcando con azul los núcleos (Hoechst) y verde NeuN en ratones WT y APP/PS1. Escala=0.75µm **B.** Cuantificación del número de células NeuN<sup>+</sup> que corresponden a las neuronas maduras. N=3. \*p < 0.05 vs WT.

### 4.2.3. Niveles de Netrina en la V-SVZ

Paralelamente se quiso comprobar si esta disminución en la migración neural en la V-SVZ de los ratones transgénicos se debía a una descenso en el mecanismo de señalización encargado de promover este proceso de migración. Para ello, se cuantificaron los niveles de netrina, molécula de guía neuronal bien caracterizada en el desarrollo y que cada vez presenta una mayor importancia en el cerebro adulto. Los niveles de netrina obtenidos mediante inmunofluorescencia en la V-SVZ muestran, en contra de lo esperado, un incremento en los ratones APP/PS1 respecto a los WT (Figura 25).

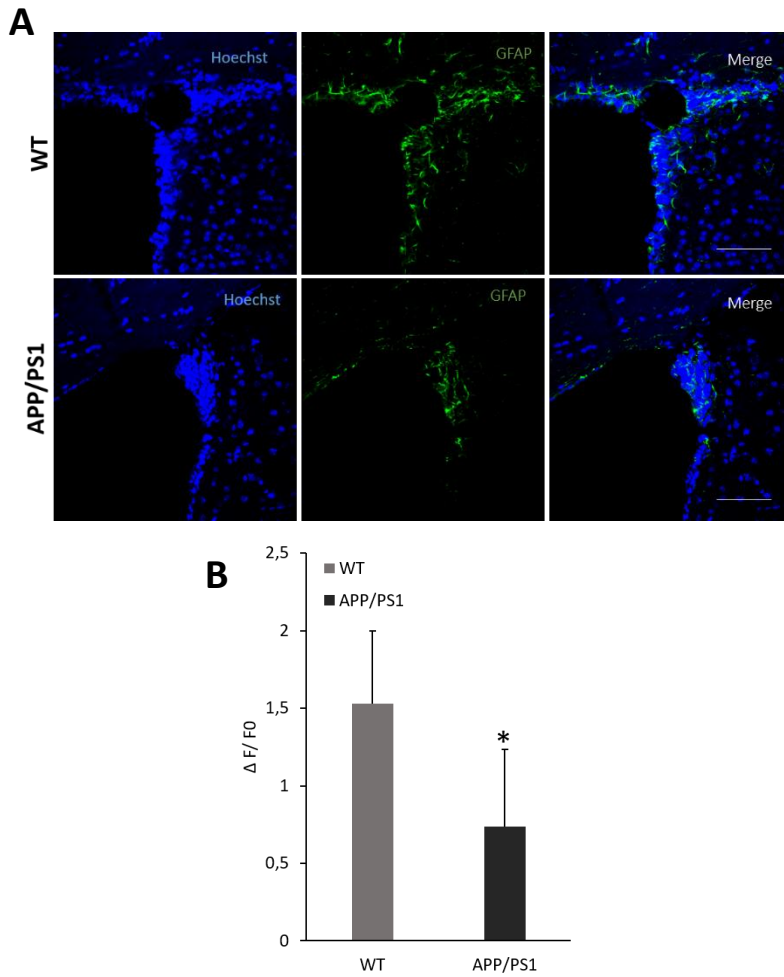




**Figura 25. Determinación por inmunofluorescencia de los niveles de Netrina en la V-SVZ de ratones WT y APP/PS1.** A. Imágenes representativas de inmunofluorescencia de la V-SVZ marcando con azul los núcleos (Hoechst) y con verde la Netrina en ratones WT y APP/PS1. Escala=0.75 $\mu$ m B. Cuantificación de fluorescencia verde respecto al fondo correspondiente a los niveles de Netrina. N=3. \*p < 0.05 vs WT.

#### 4.2.4. Estudio de la cantidad de astrocitos

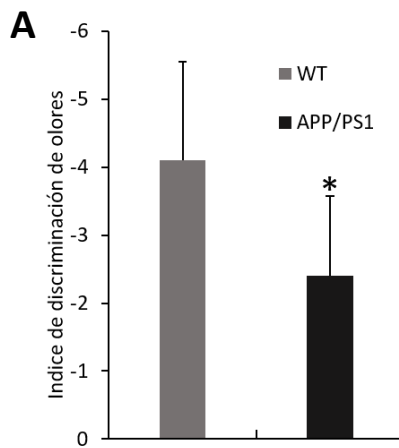
Otra célula importante para que se produzca una correcta migración, son los astrocitos. Por ello, quisimos ver si existían diferencias en cuanto al número de este tipo celular entre la V-SVZ de los ratones WT y la de los transgénicos APP/PS1. Por lo tanto, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia con GFAP y se cuantificaron los niveles de dicha proteína astrocítica en la V-SVZ de cada grupo. El resultado obtenido demostró una disminución estadísticamente significativa de astrocitos en la V-SVZ de nuestro modelo de AD (Figura 26).



**Figura 26. Determinación de los niveles de GFAP en la V-SVZ. A.** Imágenes características de la inmunofluorescencia de GFAP (verde) y los núcleos celulares (azul, Hoechst) en la V-SVZ de ratones APP/PS1 y WT. Escala=0.75 $\mu$ m. **B.** Cuantificación del incremento de las fluorescencia verde (GFAP) respecto al fondo. N=3 vs WT.

#### 4.2.5. Análisis de la olfacción

Finalmente, y a la vista del fallo en el proceso de migración V-SVZ/OB en nuestro modelo, se quiso determinar si tiene una traslación a la capacidad de olfacción. Para ello, se calculó el índice de discriminación de olores y se observó un aumento de dicho índice en los animales APP/PS1 (Figura 27). Esto se traduce en una disminución en su capacidad olfativa.



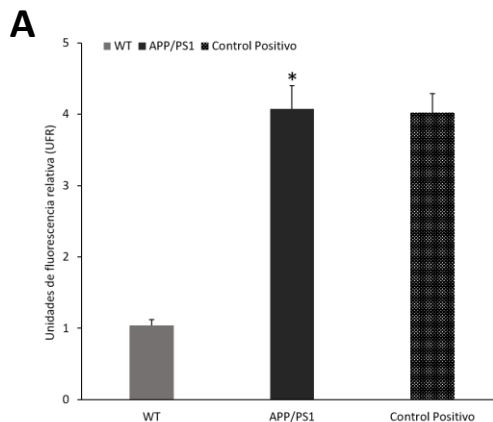
**Figura 27. Cuantificación del índice de discriminación de olores en ratones WT y APP/PS1.** El test aplicado consta de 7 olores (heptanona, acetato de isoamilo, limoneno, valerato de etilo, pentanol, butirato de propilo y nonano) siguiendo el procedimiento de Wesson y cols. (Wesson et al., 2010) N=10. \*p < 0.05 vs WT.

### 4.3. Estudio del ciclo celular y daño en las células tipo A

Una vez comprobado un fallo en el proceso de migración en las células de tipo A, se quiso analizar cambios intrínsecos en las mismas. Para ello, se llevó a cabo un análisis de la presencia de estrés oxidativo y del daño en el ADN.

#### 4.3.1. Producción de radicales libres en la V-SVZ

Seguidamente se quiso llevar a cabo una caracterización del estado de las células de la V-SVZ respecto al estrés oxidativo. Para alcanzar dicho objetivo se realizó la determinación de los niveles de peróxido de hidrogeno mediante el kit MitoPY de citometría de flujo. El resultado de esta determinación muestra un aumento significativo de los niveles de este parámetro de oxidación en las células de las V-SVZ de los ratones APP/PS1 (Figura 28).



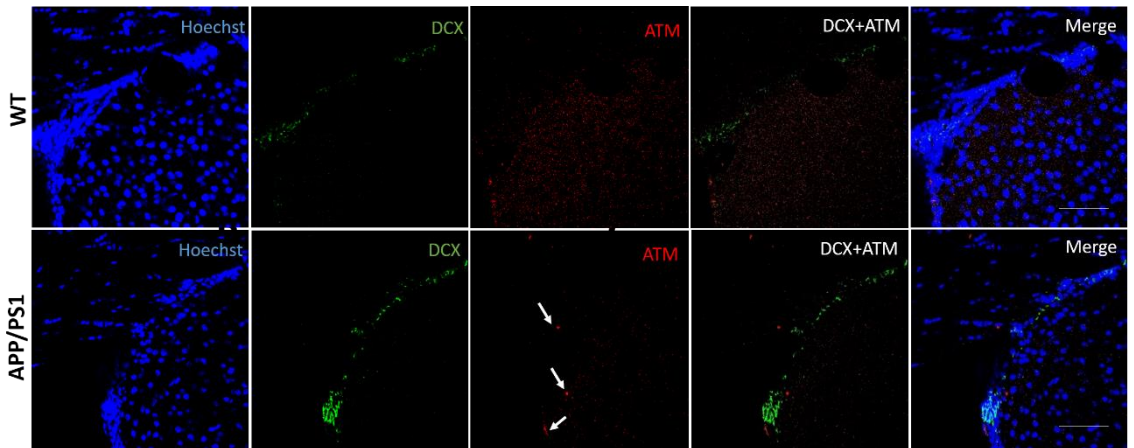
**Figura 28. Niveles de peróxido de hidrogeno en la V-SVZ.** Cuantificación de los niveles de peróxido de hidrogeno de las células de la V-SVZ de ratones WT, APP/PS1 y un control positivo que se corresponde con células de los ratones APP/PS1 tratadas con hidroperóxido terbutílico (tBuOOH). N=3. \*p < 0.05 vs WT.



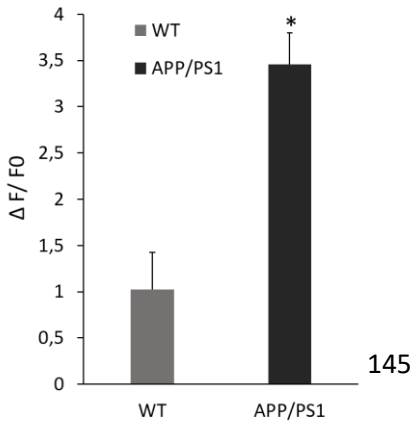
### 4.3.2. Estudio del daño al ADN en la V-SVZ

Uno de los principales marcadores de daño del ADN es la fosforilación de la proteína ATM. Dicha fosforilación se determinó mediante un ensayo de inmunofluorescencia en el cual se marcaron ATM fosforilada (*phospho-ATM*, p-ATM), DCX y Hoechst. De esta manera, se pudo cuantificar los niveles de daño en el ADN y además, determinar si dicho daño se correspondía con las células precursoras neurales. Tal y como se observa en la siguiente figura existe un aumento estadísticamente significativo tanto en los niveles de p-ATM como en el porcentaje de co-localización de p-ATM con DCX en la V-SVZ de los ratones APP/PS1 (Figura 29).

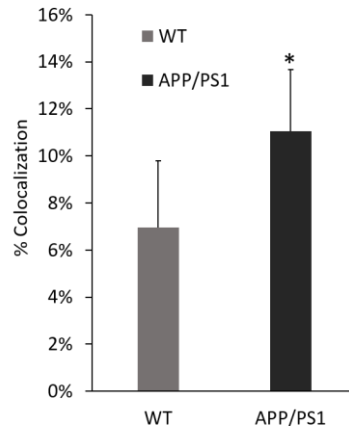
**A**



**B**

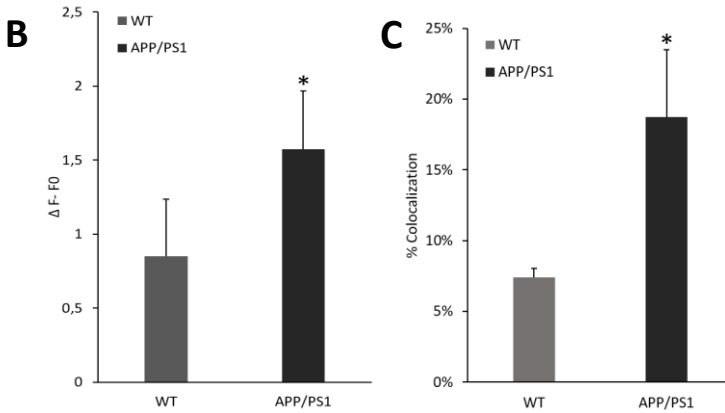
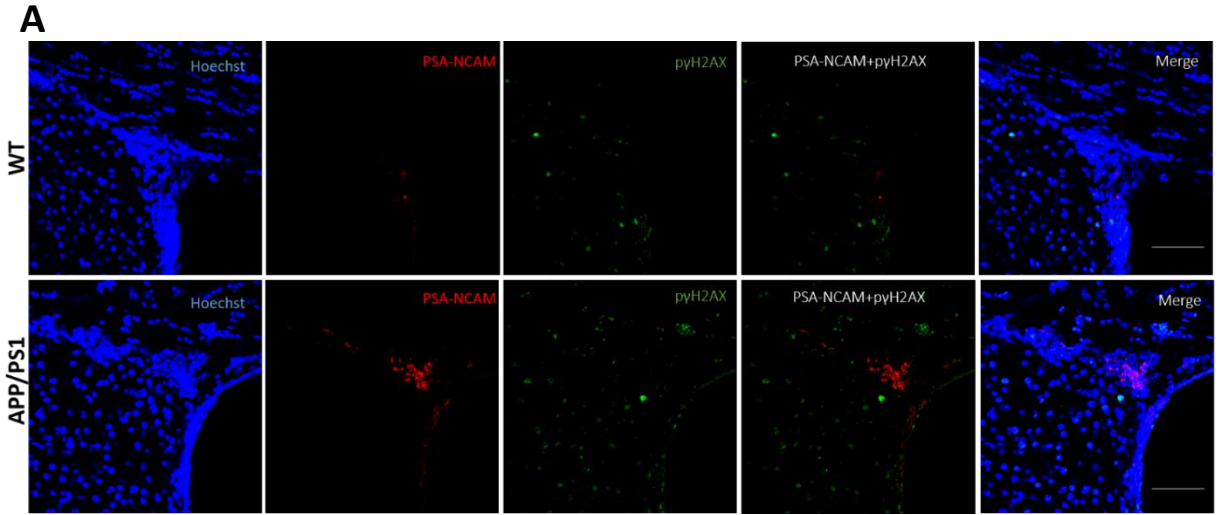


**C**



**Figura 29. Caracterización de la presencia de p-ATM en la V-SVZ.** **A.** Imágenes representativas de la co-localización de DCX (verde), p-ATM (rojo) y los núcleos celulares (azul, Hoechst) en la V-SVZ de ratones APP/PS1 y WT. Escala=0.75µm. **B.** Cuantificación de la fluorescencia roja (p-ATM) respecto al fondo. N=3. **C.** Determinación del porcentaje de co-localización de p-ATM y DCX. N=3. \*p < 0.05 vs. WT.

La fosforilación de la proteína ATM provoca a su vez la fosforilación de la histona  $\gamma$ H2AX (*phospho- $\gamma$ H2AX*, p $\gamma$ H2AX) que, por lo tanto, también es un marcador del daño en la doble cadena de ADN. Por consiguiente, se llevó a cabo la determinación de los niveles de esta histona mediante un ensayo de inmunofluorescencia. Además, se realizó un ensayo de co-localización con PSA-NCAM para comprobar si los posibles cambios observados eran en las neuronas migradoras. El resultado obtenido fue un aumento de los niveles de p $\gamma$ H2AX y de la co-localización PSA-NCAM/ p $\gamma$ H2AX en la V-SVZ de los ratones transgénicos APP/PS1 respecto a los WT (Figura 30). Este resultado coincide con lo observado anteriormente respecto a la proteína ATM en su forma fosforilada.

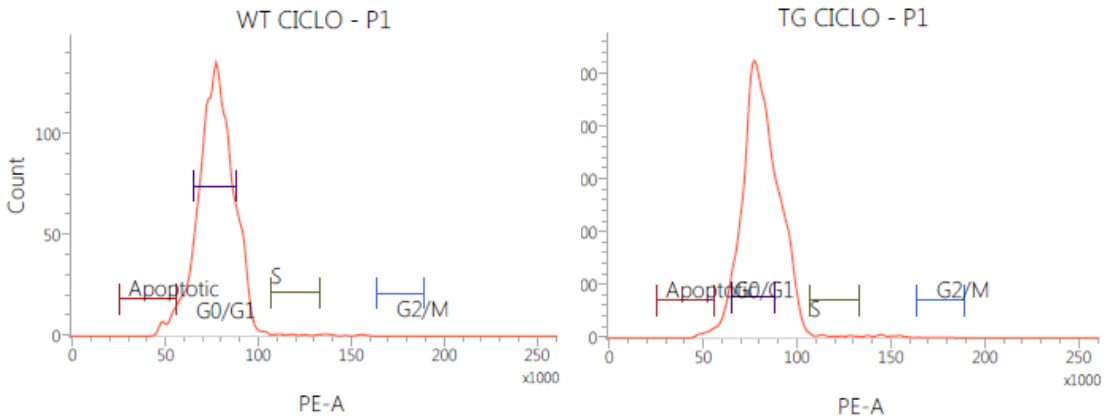


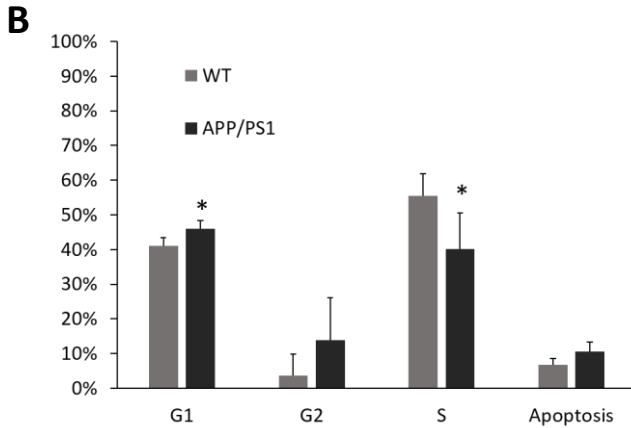
**Figura 30. Caracterización de la presencia de p $\gamma$ H2AX en la V-SVZ. A.** Imágenes representativas de la co-localización de DCX (verde), p $\gamma$ H2AX (rojo) y los núcleos celulares (Hoechst, azul) en la V-SVZ de ratones APP/PS1 y WT. Escala=0.75 $\mu$ m. **B.** Cuantificación de la fluorescencia roja (p-ATM) respecto al fondo. N=3. **C.** Determinación del porcentaje de co-localización de p $\gamma$ H2AX y DCX. N=3. \*p < 0.05 vs. WT.

### 4.3.3. Caracterización del ciclo celular por citometría de flujo

Después de observar la presencia de daño en el ADN de las células migradoras, nos preguntábamos si dicha alteración tendría una repercusión sobre el ciclo celular de las células presentes en la V-SVZ de los ratones APP/PS1. Para ello, en primer lugar se realizó una caracterización del ciclo celular mediante citometría de flujo. Tras calcular el porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo celular se observó que había una disminución significativa de células en la fase S en los transgénicos respecto a los controles; y un aumento en el caso de la fase G1 (Figura 31).

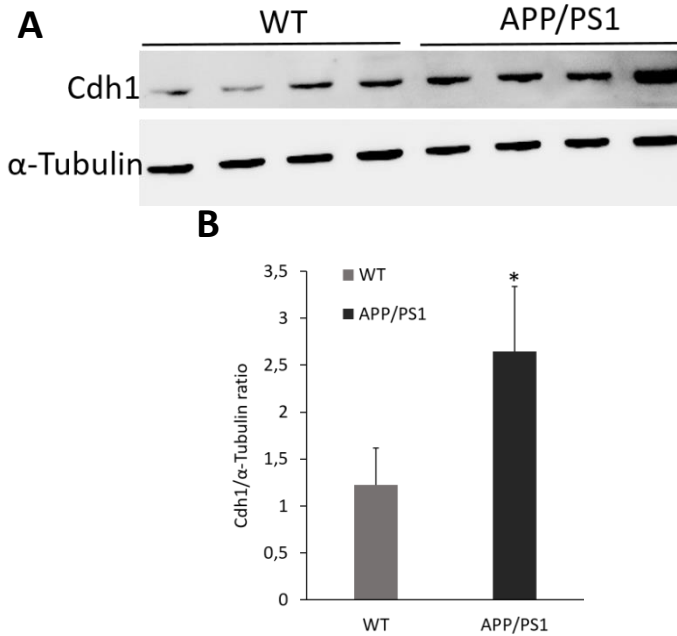
**A**





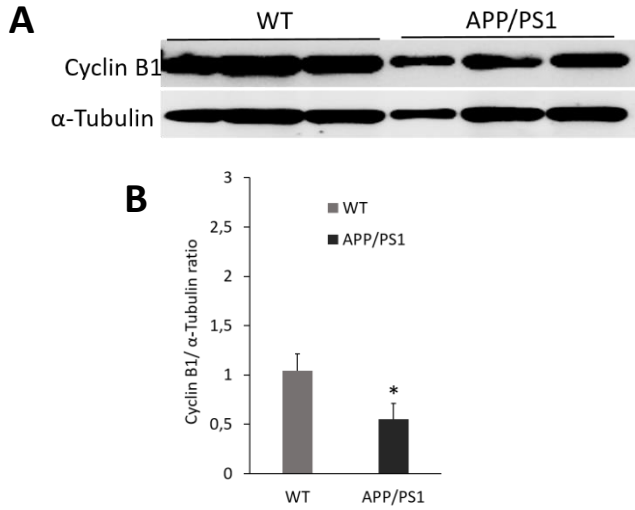
**Figura 31. Caracterización del ciclo celular de las células de la V-SVZ de ratones WT y APP/PS1. A.** Gráficas representativas del número de células de la V-SVZ en las distintas fases del ciclo celular establecido mediante citometría de flujo en función de la presencia de yoduro de propidio. **B.** Cuantificación del porcentaje de células de la V-SVZ de controles y transgénicos presentes en cada fase del ciclo celular. N=3. \* $p < 0.05$  vs. WT.

Tras determinar que las células presentes en la V-SVZ de los ratones APP/PS1 presentan diferencias en su ciclo celular respecto a los controles se decidió llevar a cabo un estudio más profundo mediante el análisis de distintas proteínas implicadas en este proceso. Debido a que el número de células en la fase S era significativamente menor, quisimos estudiar la función del regulador principal de la transición  $G1 \rightarrow S$ , la E3 ubiquitín ligasa APC/C-Cdh1. Para ello, en primer lugar se cuantificaron los niveles de la proteína Cdh1 mediante Western Blot. Se observó que los niveles de Cdh1 son significativamente mayores en la V-SVZ de los ratones transgénicos respecto a los controles, tal y como se muestra a continuación (Figura 32).



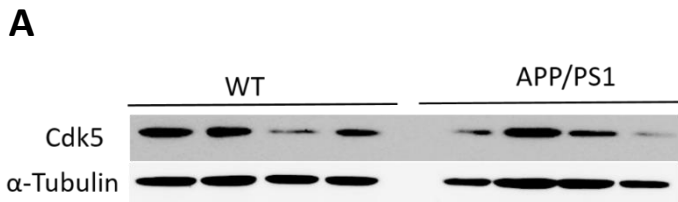
**Figura 32. Cuantificación de los niveles de la proteína Cdh1 en la V-SVZ mediante Western Blot. A.** Imágenes representativas del Western Blot de la proteína Cdh1 y de  $\alpha$ -Tubulina (control de carga) en la V-SVZ de ratones WT y APP/PS1. **B.** Cuantificación de los niveles de Cdh1 por densitometría y normalizados por los niveles de  $\alpha$ -Tubulina. N=4. \* $p < 0.05$  vs. WT.

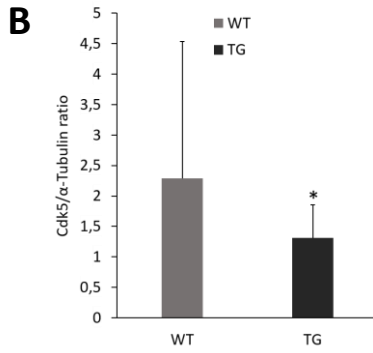
Al observar diferencias significativas en la proteína Cdh1 nos centramos en algunas de sus dianas que participan en la regulación de la progresión del ciclo celular, como es el caso de la Ciclina B1. Esta proteína es degradada por parte de la E3 ubiquitín ligasa APC/C-Cdh1. Al igual que Cdh1, se determinaron los niveles de Ciclina B1 mediante Western Blot. El resultado obtenido muestra una disminución significativa de la Ciclina B1 en la V-SVZ de los ratones APP/PS1 respecto a los controles, tal y como se puede observar a continuación (Figura 33).



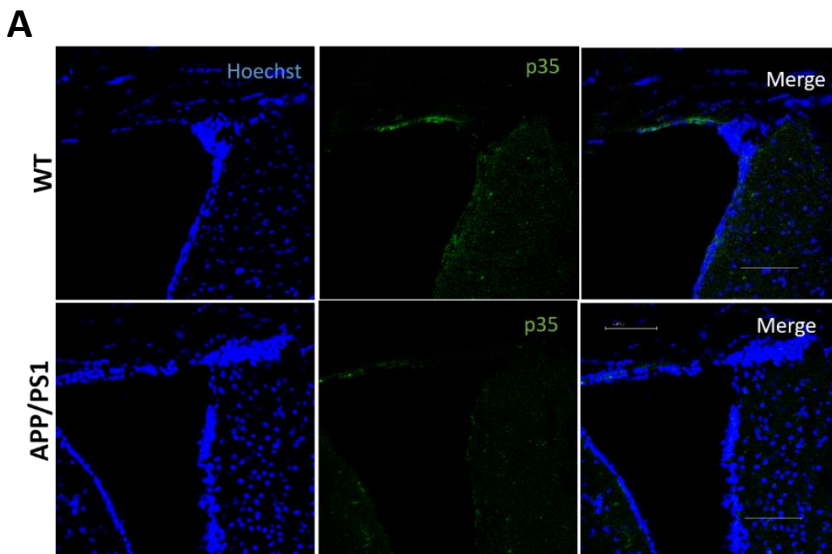
**Figura 33. Determinación mediante Western Blot de los niveles de Ciclina B1 en la V-SVZ. A.** Imágenes representativas del Western Blot de la proteína Ciclina B1 y de  $\alpha$ -Tubulina (control de carga) en la V-SVZ de ratones WT y APP/PS1. **B.** Cuantificación mediante densitometría de los niveles de Ciclina B1 normalizados por los niveles de  $\alpha$ -Tubulina. N=3. \*p < 0.05 vs. WT.

La siguiente diana de Cdh1 que se analizó fue la proteína Cdk5 y su correspondiente co-activador, p35. Tal y como se puede observar en la siguiente Figura existe una disminución significativa de los niveles del complejo Cdk5/p35 en la V-SVZ de los ratones transgénicos en comparación con los controles (Figura 34 y 35).

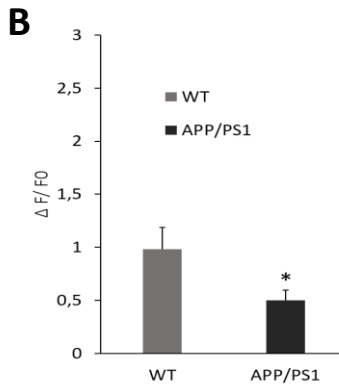




**Figura 34. Medición por Western Blot de los niveles de Cdk5 en la V-SVZ. A.** Imágenes representativas del Western Blot de la proteína Cdk5 y de  $\alpha$ -Tubulina (control de carga) en la V-SVZ de ratones WT y APP/PS1. **B.** Cuantificación mediante densitometría de los niveles de Cdk5 normalizados por los niveles de  $\alpha$ -Tubulina. N=4. \* $p < 0.05$  vs. WT.







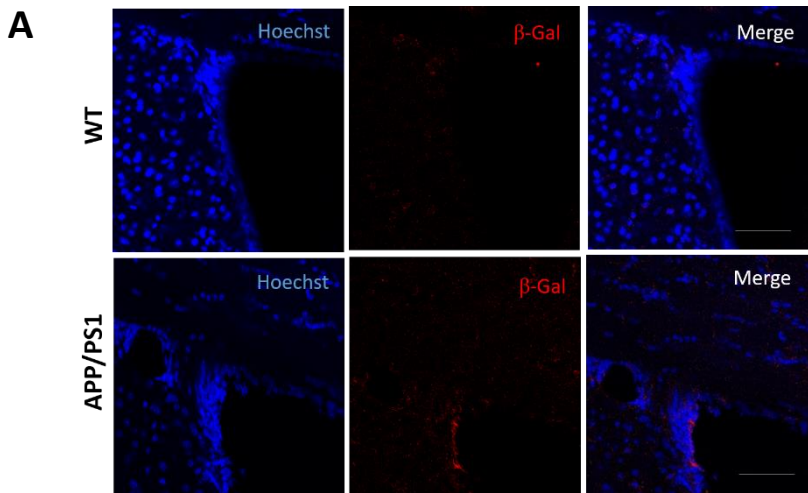
**Figura 35. Cuantificación de la cantidad de p35 en la V-SVZ mediante inmunofluorescencia. A.** Imágenes características de la inmunofluorescencia de la proteína p35 (verde) y los núcleos celulares (azul) en la V-SVZ de ratones WT y APP/PS1. Escala=0.75 $\mu$ m **B.** Cuantificación del incremento de fluorescencia verde respecto al fondo correspondiente a los niveles de proteína p35. N=3. \* $p < 0.05$  vs. WT.

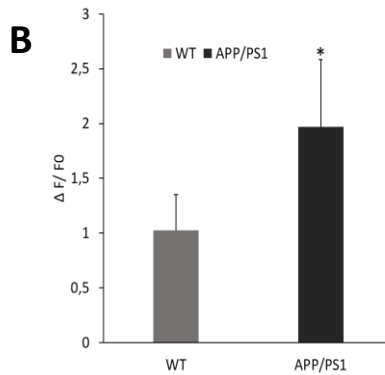
## 4.4. Análisis de la senescencia y la apoptosis en la V-SVZ de los ratones APP/PS1

Los resultados descritos anteriormente demuestran que en los ratones APP/PS1 hay una mayor proporción de células en la V-SVZ que no entran en fase S en relación a las de ratones WT, lo cual indica que una parte de estas NPCs presentan una parada del ciclo celular. Por lo tanto, se quiso ir más allá y estudiar si estos resultados eran indicativos de algún tipo de senescencia o apoptosis en esta región.

### 4.4.1. Presencia de células senescentes en la V-SVZ

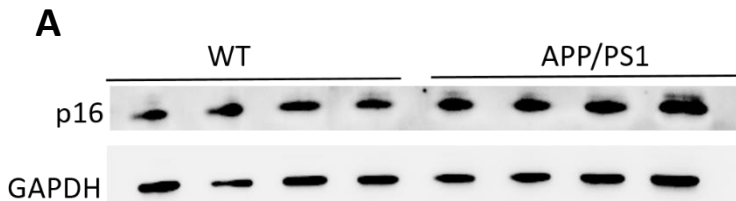
En primer lugar se quiso comprobar si había diferencias en los niveles de la enzima de  $\beta$ -Galactosidasa en la V-SVZ del grupo control y del grupo transgénico. La sobreexpresión de esta enzima es indicativa de senescencia. Los niveles calculados muestran un incremento significativo de los niveles de  $\beta$ -Galactosidasa en la V-SVZ de los ratones APP/PS1 respecto a los WT (Figura 36).

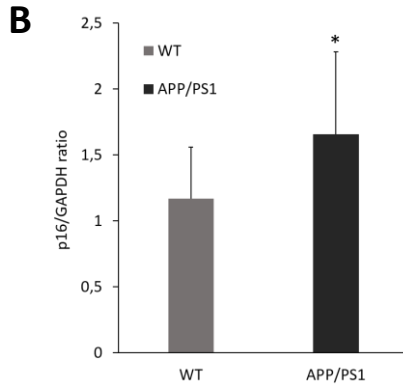




**Figura 36. Cuantificación de los niveles de  $\beta$ -Galactosidasa de las células de la V-SVZ mediante inmunofluorescencia. A.** Imágenes representativas del ensayo de inmunofluorescencia  $\beta$ -Galactosidasa (rojo) y los núcleos celulares marcados con Hoechst (azul) de la V-SVZ de controles y transgénicos. Escala=0.75 $\mu$ m. **B.** Incremento de la fluorescencia roja correspondiente a los niveles de  $\beta$ -Galactosidasa respecto al fondo. N=4. \*p < 0.05 vs. WT.

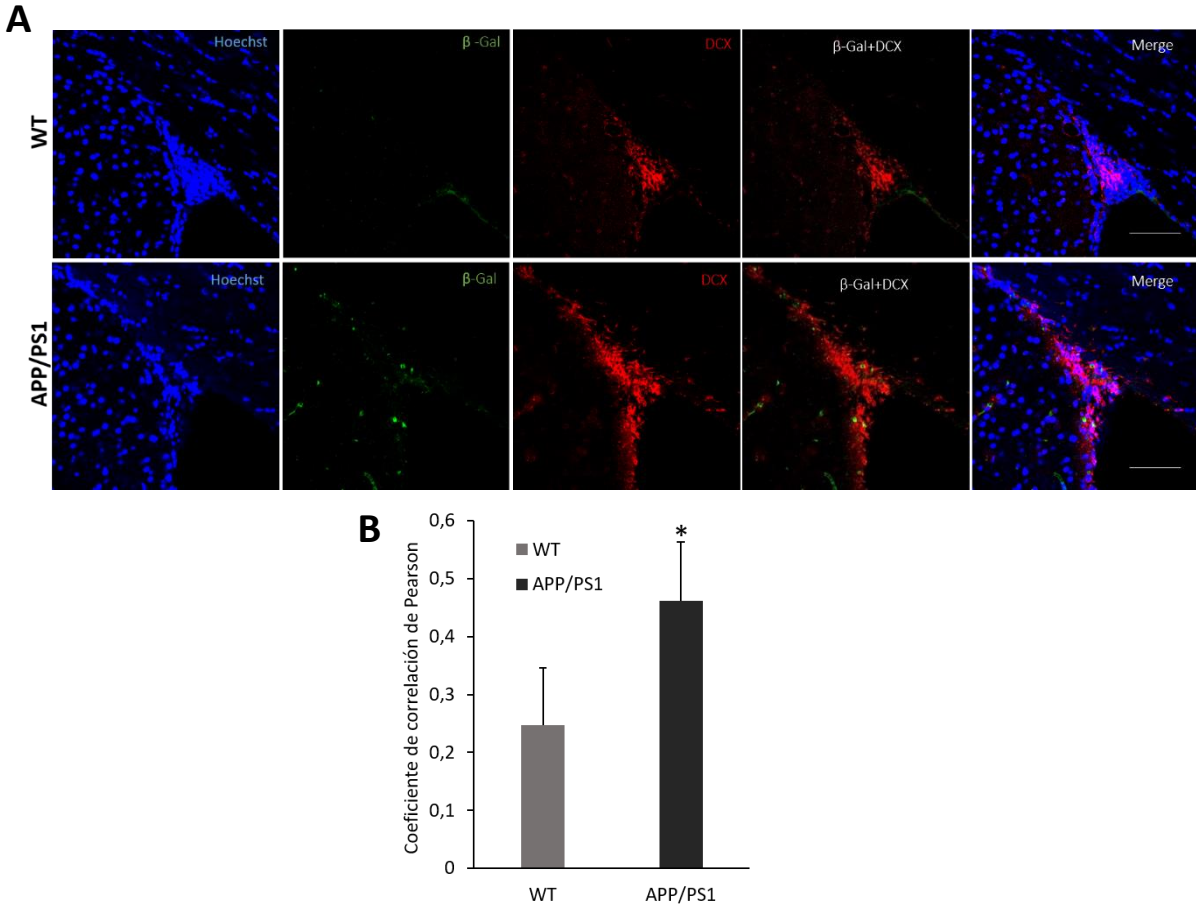
A continuación se midieron los niveles de la proteína p16, la cual también se encuentra caracterizada como un marcador de senescencia. Esta cuantificación se llevó a cabo mediante Western Blot y el resultado obtenido muestra que existen un aumento significativo en los niveles de esta proteína en la V-SVZ de los animales transgénicos respecto a los controles, tal y como se puede observar en la siguiente Figura.





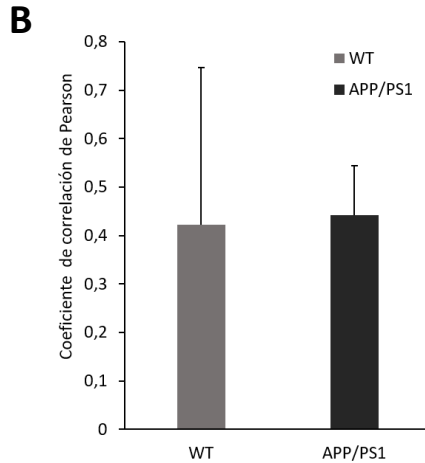
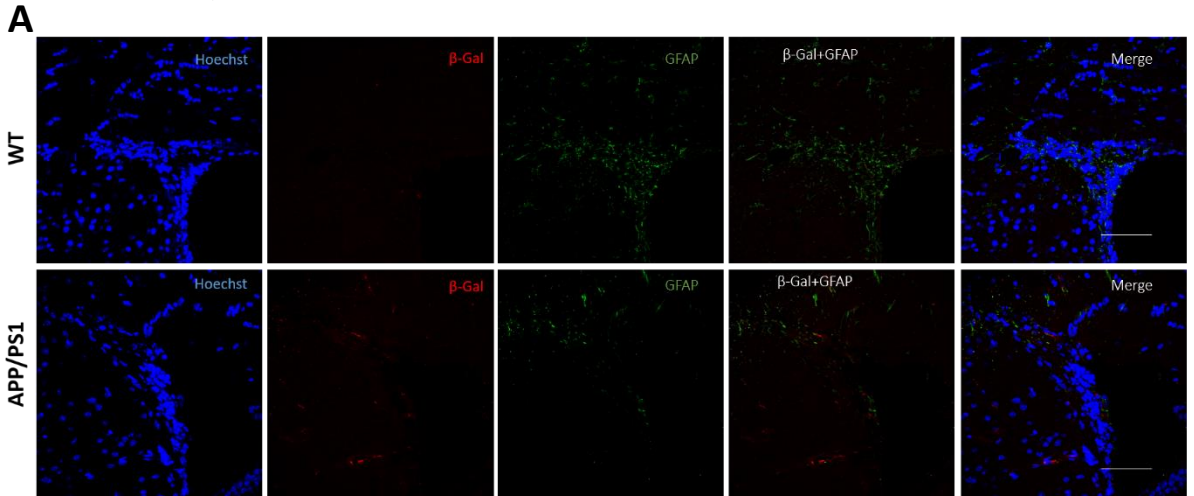
**Figura 37. Niveles de la proteína p16 por Western en la V-SVZ. A.** *Inmunoblot* de la proteína p16 y el correspondiente control de carga, GAPDH; de la V-SVZ de ratones WT y APP/PS1. **B.** Cuantificación mediante densitometría de los niveles de p16 respecto a GAPDH. N=4. \* $p < 0.05$  vs. WT.

Una vez comprobada la presencia de senescencia en la V-SVZ de los ratones transgénicos APP/PS1, pasamos a comprobar si dicha senescencia se correspondía con las neuronas migradoras acumuladas que observamos en los resultados anteriores. Para ello, se llevó a cabo una co-localización del marcador DCX y de  $\beta$ -galactosidasa. A partir de esta co-localización se pudo observar que en la V-SVZ de los ratones APP/PS1 existe un incremento significativo de células precursoras neurales que expresan  $\beta$ -galactosidasa respecto a los controles (Figura 38).



**Figura 38. Co-localización de DCX y  $\beta$ -Galactosidasa en la V-SVZ. A.** Imágenes características de la co-localización de  $\beta$ -Galactosidasa (verde), DCX (rojo) y los núcleos celulares (Hoechst, azul) en la V-SVZ de ratones APP/PS1 y WT. Escala=0.75 $\mu$ m. **B.** Determinación del coeficiente de correlación de Pearson entre DCX y  $\beta$ -Galactosidasa. N=3. \* $p < 0.05$  vs. WT.

Paralelamente también se estudió la presencia de senescencia en los astrocitos presentes en la V-SVZ. Para ello, se realizó un ensayo de co-localización por inmunofluorescencia de la proteína GFAP y la proteína  $\beta$ -Galactosidasa. El resultado obtenido que se observa a continuación demuestra que no existen diferencias entre los niveles  $\beta$ -Galactosidasa en los astrocitos de la V-SVZ de los ratones WT y los APP/PS1 (Figura 39).

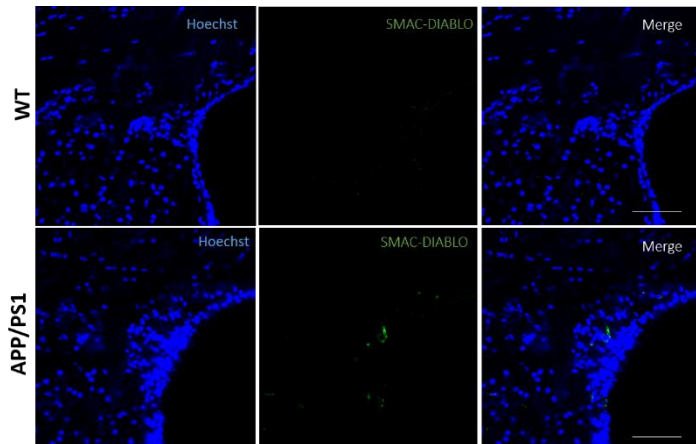


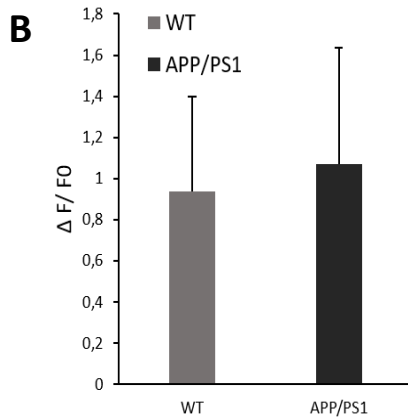
**Figura 39. Caracterización de los niveles de  $\beta$ -Galactosidasa en los astrocitos de la V-SVZ. A.** Imágenes representativas de la co-localización de GFAP (verde),  $\beta$ -Galactosidasa (rojo) y los núcleos celulares (Hoechst, azul) en la V-SVZ de ratones APP/PS1 y WT. Escala=0.75 $\mu$ m. **B.** Cuantificación del coeficiente de correlación de Pearson entre GFAP y  $\beta$ -Galactosidasa. N=3.

#### 4.4.2. Apoptosis en las células de la V-SVZ

Paralelamente quisimos determinar si además de senescencia era posible la presencia de apoptosis en la V-SVZ de los ratones transgénicos. Para ello, se determinaron los niveles de la proteína Smac/DIABLO, que se encarga de inhibir las IAPs. Esta determinación se realizó por inmunofluorescencia y se observó que no existen cambios significativos entre los animales controles y los transgénicos (Figura 40).

**A**



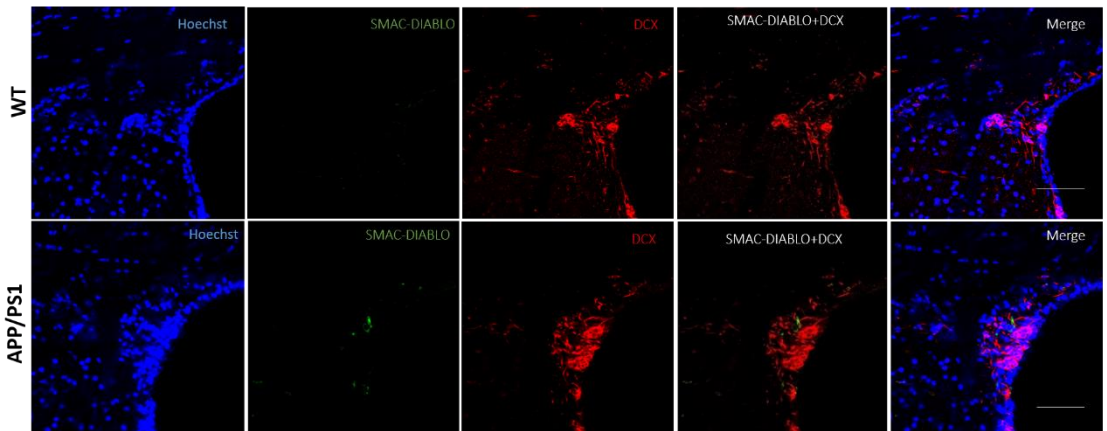


**Figura 40. Determinación y Smac/DIABLO en la V-SVZ. A.** Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de Smac/DIABLO (verde) y los núcleos de las células (azul, Hoechst) en la V-SVZ de ratones APP/PS1 y WT. Escala=0.75 $\mu$ m. **B.** Cuantificación de los niveles de Smac/DIABLO correspondientes al incremento de la fluorescencia verde respecto al fondo. N=3.

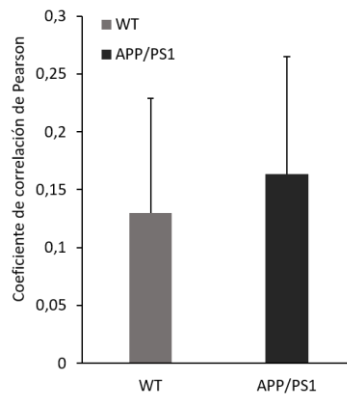
Seguidamente, quisimos estudiar en concreto la apoptosis en las células acumuladas de tipo A. Para ello, se llevó a cabo una co-localización mediante inmunofluorescencia de la proteína DCX y la proteína de apoptosis Smac/DIABLO. El resultado obtenido muestra que no existen cambios en la cantidad de células DCX<sup>+</sup>/SmacDIABLO<sup>+</sup> entre controles y transgénicos, tal y como se puede apreciar en la siguiente figura.



A



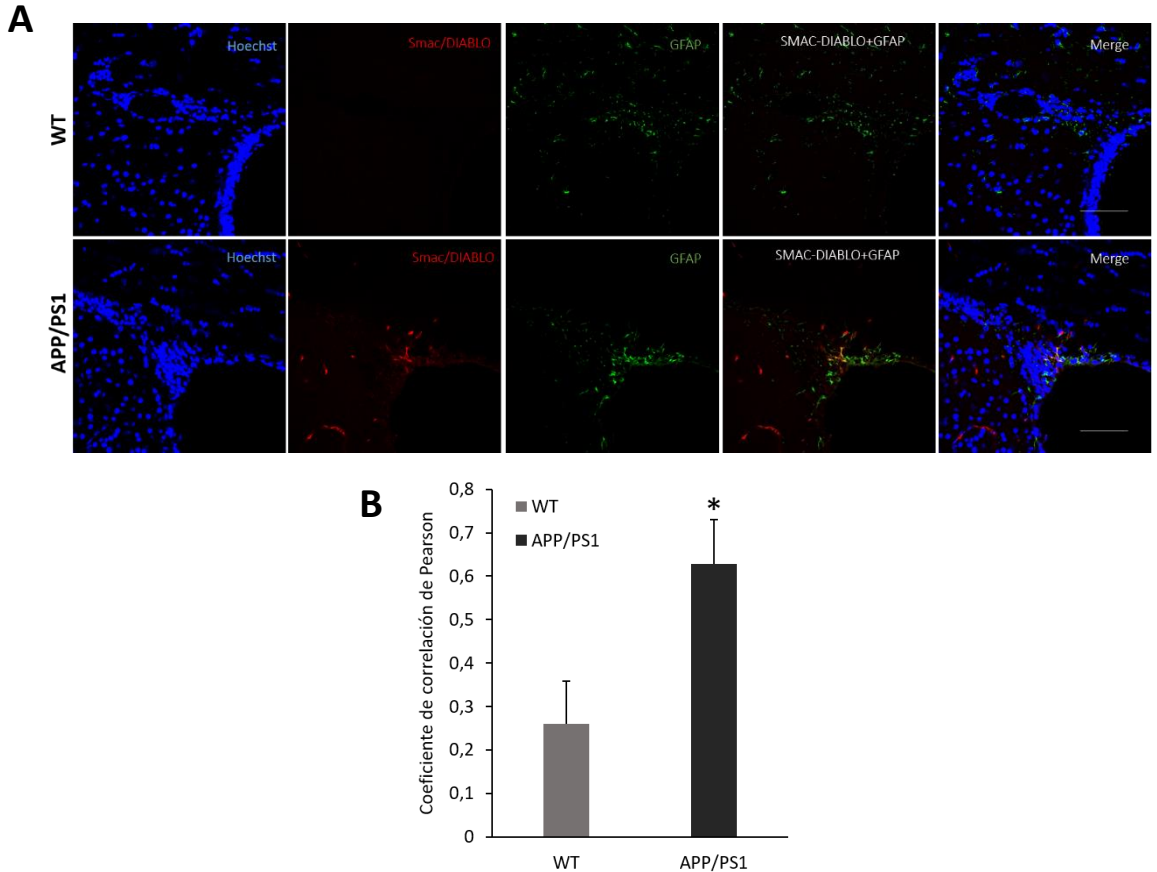
B



**Figura 41. Correlación entre Smac/DIABLO y DCX en la V-SVZ. A.** Imágenes características de la co-localización de Smac/DIABLO (verde), DCX (rojo) y los núcleos de las células (azul, Hoechst) en la V-SVZ de ratones APP/PS1 y WT. Escala=0.75 $\mu$ m. **B.** Cuantificación del coeficiente de correlación de Pearson existente entre la fluorescencia de la proteína Smac/DIABLO y la de la proteína DCX. N=3.

Finalmente, tras observar una disminución en el número de astrocitos en la V-SVZ de los ratones APP/PS1 se quiso determinar si la causante era la presencia de apoptosis en este tipo celular. Por consiguiente, se realizó un ensayo de co-localización mediante inmunofluorescencia del marcador GFAP (astrocitos) y la proteína Smac/DIABLO (apoptosis).

Tal y como se puede observar en la siguiente Figura en la V-SVZ de los ratones APP/PS1 existe un aumento significativo de la cantidad de astrocitos apoptóticos (Figura 42).



**Figura 42. Determinación de astrocitos en apoptosis en la V-SVZ. A.** Imágenes representativas de la co-localización por inmunofluorescencia de GFAP (verde), Smac/DIABLO (rojo) y los núcleos celulares (azul, Hoechst) en la V-SVZ de ratones APP/PS1 y WT. Escala=0.75µm. **B.** Cuantificación coeficiente de correlación de Pearson entre la fluorescencia roja y la verde correspondiente a los niveles de astrocitos en apoptosis N=3. \*p < 0.05 vs. WT.

# DISCUSIÓN



## 5. Discusión

La V-SVZ es el nicho con mayor capacidad neurogénica del cerebro adulto de mamíferos. A partir de este nicho se generan tanto neuronas como oligodendrocitos. En los modelos animales estudiados y en condiciones fisiológicas, el destino de las nuevas neuronas es principalmente el bulbo olfatorio. Para poder alcanzar esta región, los neuroblastos migran a través de la RMS mediante un proceso altamente regulado (Lim & Alvarez-buylla, 2016). Asimismo se ha determinado la capacidad de la V-SVZ de socorrer mediante la generación de nuevas neuronas y oligodendrocitos, como respuesta a un daño cerebral (Cayre et al., 2013).

En la EA, se van produciendo una serie de cascadas de toxicidad que comienzan muy pronto, incluso antes de generarse los síntomas cognitivos (Jack et al., 2010). Ante estos daños es importante estudiar la capacidad de regeneración de los nichos neurogénicos. En este sentido, son muchos los trabajos centrados en el estudio de la SGZ por su relación con el hipocampo y la pérdida de memoria (Babcock, Page, Fallon, & Webb, 2021; Berger, Lee, Young, Aarsland, & Thuret, 2020; Moreno-Jiménez et al., 2019; Tobin et al., 2019). Sin embargo, aun teniendo la V-SVZ una capacidad proliferativa mayor, los trabajos al respecto son escasos y poco conclusivos. Además, uno de los primeros síntomas en aparecer en los pacientes es la pérdida olfativa (Devanand et al., 2000; Wesson et al., 2010) y el papel de la V-SVZ en ésta puede resultar clave.

Por tanto, en la presente tesis doctoral se ha querido determinar si la V-SVZ mantiene su capacidad neurogénica o no en la EA. Para ello se ha utilizado como modelo de la EA, el ratón doble transgénico APP/PS1; el cual se caracteriza principalmente por la sobreexpresión y excesivo procesamiento de la proteína APP y la consecuente formación del péptido A $\beta$  y las placas amiloides (Jankowsky et al., 2004; Shen et al., 2018).

Estudios previos han determinado que la sola presencia del péptido A $\beta$  provoca una disminución de la neurogénesis tanto en la V-SVZ como en la SGZ del cerebro adulto en ratones (Haughey, Liu, et al., 2002; Haughey, Nath, et al., 2002). Además esta misma disminución se ha determinado también en modelos transgénicos como el 3xTg, el 5xFAD o este mismo; al igual que en pacientes con EA (Moon et al., 2014; Pan et al., 2016; Rodríguez et al., 2009; Tang et al., 2009). Sin embargo, hasta el momento no se ha determinado de manera clara cuál es la causa de esta disminución. Uno de los motivos de la falta de claridad es que esta reducción, al igual que sucede con la misma EA, podría ser multifactorial, ya que, muchas de las moléculas implicadas en el proceso de la neurogénesis también juegan un papel fundamental en la fisiopatología de la EA, entre ellas la proteína APP. Además el ambiente adverso que provoca la EA es capaz de provocar daños en los nichos neurogénicos y por tanto afectar al proceso de proliferación y diferenciación (Fainstein, Dan-Goor, & Ben-Hur, 2018).

En primer lugar, nuestros resultados muestran un aumento de volumen en la V-SVZ en los ratones APP/PS1. Este resultado podría indicar una mayor proliferación (Boekhoorn et al., 2006; Jin et al.,

2004; Taupin, 2010). Sin embargo, tras determinar los niveles del marcador de proliferación Ki67, se observó que no existían diferencias en los niveles de esta proteína respecto al control. Aunque por nuestros resultados podríamos concluir que no hay cambios en la proliferación, otros autores han establecido en este mismo modelo (Tang et al., 2009). De cualquier forma, quisimos ahondar en el estudio de estas células acumuladas en la V-SVZ.

De este modo, mediante microscopía electrónica e inmunofluorescencia se pudo determinar que estas células que aumentaban en número en la V-SVZ de los ratones APP/PS1 eran migradoras, es decir, de tipo A. Además, la disminución de estas células tipo A a lo largo de la RMS, la disminución de neuronas maduras en el OB y la pérdida de discriminación olfativa, ya apuntan hacia un fallo en la capacidad migratoria de estas células. Estos resultados coinciden con los resultados observados recientemente por Scopa y cols., los cuales también determinaron un fallo en la neurogénesis del OB y un aumento de neuroblastos en la V-SVZ inducidos por la presencia de oligómeros del péptido A $\beta$  (Scopa et al., 2020). Asimismo, la disminución de la capacidad olfativa en los transgénicos, ya había observado otros grupos, así como también en pacientes de EA en las primeras etapas de la enfermedad (Devanand et al., 2000; Velayudhan, Pritchard, Powell, Proitsi, & Lovestone, 2013; Yu et al., 2018). Por lo tanto, este fallo en la neurogénesis V-SVZ/OB podría contribuir a la anosmia observada en la EA.

Por otro lado, una de las señales más importantes en la migración neural V-SVZ/OB es la Netrina. Esta molécula parece actuar

principalmente en situaciones de daño como señal de reclutamiento para la reparación de las zonas dañadas (Cayre et al., 2013). Sin embargo, en nuestro modelo murino de EA, la Netrina-1 se encuentra significativamente aumentada. Esto puede interpretarse de varias maneras: bien como un mecanismo de compensación ante la falta de migración, o bien por un fallo en la función de la Netrina-1. Diversos estudios han demostrado que el mecanismo de acción de la Netrina-1 es a través de la unión a la proteína APP y al receptor DCC; dicha unión provoca la activación de la vía GSK3 $\beta$ /Cdk5 implicada en la migración (Ayala et al., 2007; Borel et al., 2017; Lourenço et al., 2009). Por lo tanto, se podría deducir que en un modelo en el que la proteína APP se encuentra procesada activamente para la generación del péptido A $\beta$ , la Netrina-1 no puede llevar a cabo su función de activación de la migración debido a la disminución del receptor APP íntegro. Estos mismos estudios de caracterización de la unión Netrina-1/APP proponen que dicha unión pueda actuar inhibiendo la generación del péptido A $\beta$  (Borel et al., 2017; Lourenço et al., 2009). Por lo tanto, podría explicarse su exceso al no llevar a cabo su función correctamente.

Pero a pesar de un aumento en la señal migratoria estas células no son capaces de migrar. Esta disfunción puede explicarse por el daño encontrado en el ADN. Este daño genera la activación de un mecanismo cuyo objetivo es solventar dicho daño: la DDR; la cual es una de los mayores indicadores de la integridad del ADN. Este mecanismo, en el caso de las células implicadas en la neurogénesis, está compuesto principalmente por las proteínas ATM (Kieroń,



Żekanowski, Falk, & Wężyk, 2019). Cuando se produce la rotura de la doble hebra de ADN se produce la fosforilación de ATM, lo cual supone su activación, dando lugar a la fosforilación de la histona  $\gamma$ H2AX (Burma, Chen, Murphy, Kurimasa, & Chen, 2001; Sedelnikova, Pilch, Redon, & Bonner, 2003). En la V-SVZ de nuestro modelo observamos un aumento tanto de ATM como de  $\gamma$ H2AX en su forma fosforilada. De hecho, la expresión de ambas tiene lugar en las células tipo A (DCX<sup>+</sup>/PSA-NCAM<sup>+</sup>). Por lo tanto, se puede concluir que estas células presentan un daño en su ADN.

Existen distintos factores que pueden provocar el daño en el ADN de una célula, uno de los más estudiados es el estrés oxidativo generado por ROS (Cooke, Evans, Dizdaroglu, & Lunec, 2003). Esta situación ha sido altamente descrita como consecuencia de la presencia tanto del péptido de A $\beta$ , como de placas amiloides (A. Lloret et al., 2008). Paralelamente, A $\beta$  también puede provocar el daño en el ADN de manera directa (Suberbielle et al., 2013). Por consiguiente, el daño en el ADN observado en las células progenitoras neurales puede haber sido inducido tanto por ROS como por A $\beta$ , o bien por una acción sinérgica de ambos factores.

Asimismo, cabe destacar el importante papel que presenta el estrés oxidativo tanto en la EA (Huang, Zhang, & Chem, 2016) como en la neurogénesis (Yuan, Gu, Shan, Marchado, & Arias-Carrión, 2015). Tal y como sugieren Kieron y cols., en su revisión, muchos autores defienden el efecto que provoca el daño del ADN inducido por estrés oxidativo en la neurogénesis adulta de pacientes de EA (Kieroń et al., 2019). La activación de DDR da lugar, a que ciertas funciones

fisiológicas de las células madre neurales puedan encontrarse sobrerrepresentadas dando lugar a un fallo en la neurogénesis. Asimismo, se ha observado que en estas células la DDR presenta una gran eficacia, lo cual puede dar lugar a que sus descendientes sean extremadamente sensibles al efecto del estrés oxidativo (L Schneider, Fumagalli, & Fagagna, 2012; Leonid Schneider, 2014). De hecho, algunos estudios han observado una diferenciación neuronal dependiente del tiempo a través de la regulación de ATM. Por lo tanto, se sugiere que se precisa una DDR específica para que se pueda producir una proliferación y diferenciación de manera correcta (Kieroń et al., 2019). De hecho, este daño en el ADN y la correspondiente DDR provoca la parada del ciclo celular, para evitar que el daño producido en el ADN pase a la descendencia. Esta parada se produce tanto en la fase G1 como en la G2 del ciclo celular (Dasika et al., 2000).

Uno de los principales reguladores del ciclo celular es la E3 ubiquitin ligasa APC/C, la actividad de este complejo se encuentra regulada por los coactivadores Cdh1 y Cdc20 (Visintin, Prinz, & Amon, 1997). APC/C se mantiene inactivo antes de la mitosis, lo que permite la acumulación de distintas proteínas necesarias para la progresión del ciclo celular. Una vez, APC/C es activada debido a su unión o bien a Cdh1 o a Cdc20, lleva a cabo la ubiquitinación de distintos reguladores que promueven la progresión del ciclo celular, para su posterior eliminación por el proteosoma (King, Glotzer, & Kirschner, 1996).

En condiciones fisiológicas, la activación de APC/C por parte de Cdh1 y Cdc20 se produce de manera secuencial en función del momento del ciclo en el que se encuentre la célula. Por un lado, APC/C-Cdc20 es

activado por Cdk1-ciclina B1, y a su vez APC/C-Cdc20 es capaz de inhibir el complejo Cdk1-ciclina B1 cuando alcanza un umbral crítico; provocando así un mecanismo de retroalimentación. Esta activación se produce justo cuando la células entra en la fase de mitosis y se mantiene durante la transición metafase-anafase y en la salida de la mitosis, de esta manera se consigue que la mitosis y la división del genoma se produzcan de manera eficiente (Alfieri, Zhang, & Barford, 2017; Lara-Gonzalez, Kim, & Desai, 2017). Por otro lado, la activación de APC/C por parte de Cdh1 se lleva a cabo justo cuando la célula sale de la mitosis y se mantiene a lo largo de la fase G1 (Peters, 1999). Este complejo se encarga principalmente de inhibir las ciclina mitóticas y la progresión a la fase S hasta que se haya tomado la decisión de si la célula prosigue hacia la división en el caso de que no haya habido ningún fallo (Pines, 2011).

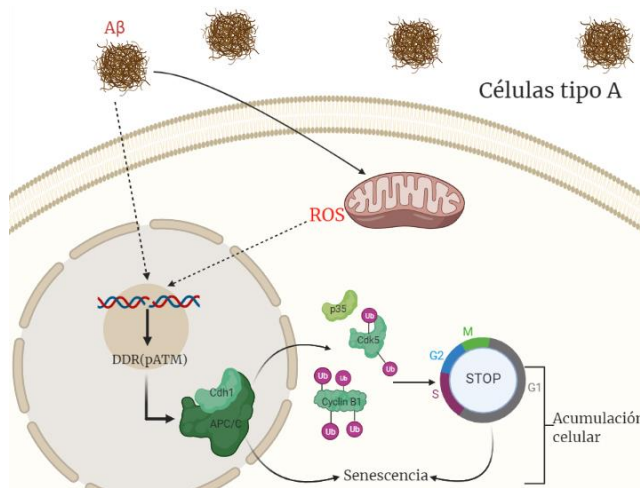
Además, se ha observado que APC/C-Cdh1 también participa en la DDR, con el objetivo de impedir que prosiga el ciclo celular y que dicho daño se trasmita a las células hijas (de Boer, Guerrero Llobet, & van Vugt, 2016). De hecho, nosotros en la V-SVZ de los animales transgénicos observamos tanto un aumento de Cdh1 como una disminución de sus dianas: ciclina B1 y el complejo Cdk5/p35. Por lo tanto, se puede llegar a deducir que las células migradoras neurales presentes en la V-SVZ de los ratones APP/PS1 sufren un daño en el ADN que tendría como consecuencia la parada del ciclo celular a través de APC/C-Cdh1. Asimismo, esta deducción se encuentra reforzada con la caracterización del ciclo celular de las células de la V-SVZ que

muestra una disminución significativa de las células en fase S y un aumento de las células en fase G1 en el modelo transgénico APP/PS1.

La parada del ciclo celular ocasionada como consecuencia de un daño en el ADN tiene como objetivo la activación del mecanismo de reparación del ADN; para así, una vez reparado proseguir con el ciclo celular. Sin embargo, cuando este daño se produce de manera crónica y la célula no ha sido capaz de solventarlo; existen principalmente dos opciones: la muerte celular por apoptosis o mantenerse en un estado de quiescencia, es decir, la senescencia. De hecho, se ha observado que la DDR provoca la degradación de las principales dimetiltransferasas de la histona H3K9 (G9a y GLP), a través de la activación de APC/C-Cdh1. Esta disminución global de la dimetilación de H3K9 provoca la inducción de factores que forman parte del SASP como la IL-6. Por lo tanto, se demuestra la capacidad de DDR de inducir senescencia a través de los cambios epigenéticos (A. Takahashi et al., 2012). De tal manera, que marcadores del daño del ADN, como la fosforilación de la histona  $\gamma$ H2AX también se consideran marcadores de senescencia (Z. Y. He et al., 2016).

Además las células senescentes presentan características específicas como la sobreexpresión de SA $\beta$ Gal y de proteínas supresoras de tumores como p16; entre otras peculiaridades (Muñoz-Espín & Serrano, 2014). En nuestro trabajo observamos un aumento tanto de SA $\beta$ Gal como de p16 en las células migradoras neurales de la V-SVZ de nuestro modelo. Por lo tanto, en este caso, resulta clara la relación entre el DDR y la senescencia, mencionada previamente. Este estado senescente en las células tipo A de la V-SVZ provocaría que sean

incapaces de migrar y proliferar; y por tanto, se quedan acumuladas en esta región cerebral, ya que, se mantendrían en un estado quiescente pero con sus actividades vitales activas (Muñoz-Espín & Serrano, 2014). En la siguiente imagen se representa el mecanismo que se produciría en este tipo de células en el modelo murino de EA, APP/PS1.



**Figura 43. Esquema del mecanismo propuesto del efecto del péptido Aβ y las sobre la V-SVZ. Creado mediante BioRender.com**

Paralelamente, observamos que los astrocitos presentes en la V-SVZ de los ratones transgénicos entran preferentemente en un proceso de muerte celular por apoptosis. Dicho proceso fue determinado mediante los niveles del inhibidor de las IAPs, Smac/DIABLO. Esta proteína es liberada de manera paralela al citocromo C por parte de la mitocondria al citoplasma durante la vía intrínseca de la apoptosis (Fulda & Debatin, 2006). Por lo tanto, nos encontramos con que en la V-SVZ de los ratones APP/PS1 se produce tanto senescencia como apoptosis según el tipo celular. De tal manera que, por un lado, las

células tipo A se encuentran en senescencia mientras que los astrocitos están apoptóticos. Esta diferencia en el tras la parada del ciclo celular fue observada también por Schneider y cols. los cuales obtuvieron resultados similares. Sus resultados obtenidos muestran que un daño en el ADN de las NPCs conduce a senescencia celular y se promueve la diferenciación a astrocitos a través de ATM (Leonid Schneider et al., 2013). Además estos astrocitos diferenciados parecen ser más sensibles y pueden llegar a entrar en apoptosis (Leonid Schneider, 2014). Asimismo, cabe mencionar la importancia de los astrocitos en el proceso de migración neural actuando como soporte de las células migradoras (Zhan et al., 2017).

Finalmente, a partir de todos los resultados obtenidos se puede concluir que la presencia de factores agresivos como  $A\beta$  y ROS en la V-SVZ del modelo murino de EA, APP/PS1, provocan que las células tipo A entren en senescencia y pierdan su capacidad de migrar a lo largo de la RMS hasta alcanzar los bulbos olfatorios. Esta pérdida de la migración contribuye por un lado a cambios en la propia V-SVZ y además, parece contribuir a un fallo en la regeneración de los bulbos olfatorio y por tanto de la capacidad de olfacción.

# CONCLUSIONES





## 6. Conclusiones

1. En la V-SVZ de los ratones APP/PS1 hay una acumulación de células migradoras tipo A y un aumento de células tipo C.
2. En el modelo de enfermedad de Alzheimer hay menos células migradoras a lo largo de la RMS, pero aumentan los niveles de la señal de migración: Netrina-1 en la V-SVZ.
3. La cantidad de neuronas maduras en los bulbos olfatorios de los ratones APP/PS1 disminuye, al igual que su capacidad de discriminación olfativa.
4. Los ratones APP/PS1 generan más radicales libres en su V-SVZ y las células migradoras acumuladas presentan un daño en su ADN mediado por ATM y  $\gamma$ H2AX.
5. Las células migradoras acumuladas en la V-SVZ presentan un aumento de Cdh1, una disminución de ciclina B1 y de Cdk5/p35. Así mismo, hay menos células en fase S del ciclo celular en los ratones APP/PS1.
6. Las células migradoras acumuladas se encuentran, principalmente, en un estado senescente. Además, los astrocitos de esta misma zona están apoptóticos.



# SUMMARY



# Abbreviations List

A $\beta$ : Amyloid  $\beta$

AD: Alzheimer's disease

APC/C: Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome

APP: Amyloid Protein Precursor

ATM: Ataxia Telangiectasia Mutated

Cdk5: Cyclin dependent kinase 5

DCX: Doublecortin

DDR: DNA damage response

GFAP: Glial Fibrillary Acidic Protein

NeuN: Neural Nuclear protein

NPCs: Neural Progenitor Cells

OB: Olfactory Bulb

PSA-NCAM: Polysialylated-Neural Cell Adhesion Molecule

PSEN1: Presenilin 1

ROS: Reactive Oxygen Species

RMS: Rostral Migratory Stream

SASP: Senesce Associated Secretory Proteins

SA $\beta$ Gal: Senescence Associated  $\beta$ -Galactosidase

SGZ: Subgranular Zone

V-SVZ: Ventricular-Subventricular Zone

WT: Wild Type

## Abstract

In the adult mammalian brain, the ventricular-subventricular zone (V-SVZ) is the area with the greatest neurogenic capacity. This region is distributed along the walls of the lateral ventricles. The neurogenic capacity of this region is due to the presence of so-called neural stem cells (NSCs) or type B cells. In addition, there are other cell types such as C cells or intermediate progenitors, A cells or migrating cells, and E cells or ependymal cells. Type B cells are capable of giving rise to type C cells, which ultimately generate type A cells. Under physiological conditions, type A cells migrate mainly to the olfactory bulbs, where they give rise to different types of interneurons. This migration process occurs tangentially via the rostral migratory pathway (RMS). However, these cells are also able to migrate to other areas such as the corpus callosum and give rise to other neural types such as oligodendrocytes and astrocytes. This process of neurogenesis is decreased in Alzheimer's disease (AD) patients and in different models, but the cause is unknown. AD has become a major concern in recent years due to the large increase in its incidence as a consequence of the aging of the population. The main pathophysiological features of AD are the formation of amyloid plaques, generated by the aggregation of A $\beta$  peptide, and the formation of neurofibrillary tangles as a consequence of the hyperphosphorylation of Tau protein. In both cases, they cause a series of pathological processes that lead to neurodegeneration. Moreover, there is also a close link between the cell cycle and both neurogenesis and AD.

The principal aim of this doctoral thesis is to provide some insight into the link between AD and the process of neurogenesis that occurs in the V-SVZ. We show, in a murine model of AD (the APP/PS1), that type A cells accumulate in the V-SVZ. Moreover, the accumulation is related to a decrease of type A cells in the RMS and to the amount of mature neurons in the olfactory bulbs. These changes translate into an increase in the index of odor discrimination. The cell cycle analysis revealed that a significant amount of V-SVZ cells are arrested in the G1 phase which could be due to an increase in Cdh1 levels. Cdh1 overexpression may be a consequence of the DNA damage response induced by the presence of A $\beta$  and/or oxidative stress. We also observe an increase of type A cells in a senescence state. Finally, we find an increase in apoptotic astrocytes which also could contribute to the failure in the neural migration.

In conclusion, in the murine model of AD, APP/PS1, type A cells enter in a senescence state and lose their ability to migrate along the RMS. This contributes to morphological and functional changes in the V-SVZ and to a failure of olfactory bulb regeneration and thus olfactory capacity.



# Introduction

## Neurogenesis

Since the beginning of the 20th century, it has been known that the nervous system is made up of neurons, individual cells, which establish relationships between them by contiguity and not by continuity. All this was achieved thanks to the work carried out by Ramón y Cajal in favour of the neuronal doctrine as opposed to the reticular theory reigning at that time. Cajal's work went much further and postulate the inability of these cells to regenerate due to their high degree of complexity (Ramon y Cajal, 1928). For decades neuroscientists misinterpreted these findings by advocating the inability of the adult brain to generate new neurons. However, in the mid-20th century, with the development of new technologies and methods, the scientific community began to rethink this last postulate and to develop new techniques, to elucidate whether or not new neurons were generated in the adult brain.

In the 1960s, Altman and colleagues made the first breakthrough in demonstrating the existence of adult neurogenesis in the mammalian adult brain, specifically rats, after brain injury (Altman, 1962). This milestone was possible using thymidine-H3 which is incorporated into DNA during cell replication. This novel technique subsequently allowed them to demonstrate the existence of two adult neurogenesis niches under physiological conditions: the dentate gyrus of the hippocampus and the walls of the lateral ventricles (Altman, 1963; Altman & Das, 1966). Thanks to the development of this technique, it

was also possible to demonstrate the existence of adult neurogenesis in birds (Alvarez-Buylla & Nottebohm, 1988). In the following decade, the development of a new labelling technique based on the use of bromodeoxyuridine (BrdU), a synthetic analogue of thymidine, allowed the demonstration of neurogenesis in the adult brain of different animal models, such as fish, reptiles, and even mammals (Font, García-Verdugo, Alcántara, & López-García, 1991; Paredes, Sorrells, Garcia-Verdugo, & Alvarez-Buylla, 2016; Zupanc & Horschke, 1995).

However, in the case of non-human primates, the study of adult neurogenesis has been controversial, probably due to its clear proximity to humans. At first, using the thymidine H3 technique, the non-existence of neurogenesis in the adult brain of these mammals was described (Eckenhoff & Rakic, 1988; Rakic, 1985). Due to the limitations of this technique, the presence of adult neurogenesis in non-human primates was later re-assayed using BrdU labelling. These new assays refuted the previous hypothesis and defined the presence of neurogenesis in the dentate gyrus of the hippocampus of the monkey brain (Gould et al., 1999; Gould, Tanapat, McEwen, Flügge, & Fuchs, 1998; Kornack & Rakic, 1999). Subsequent studies demonstrated the presence of neurogenesis also in the lateral ventricles of the adult non-human primate brain (Gil-Perotin, Duran-Moreno, Belzunegui, Luquin, & Garcia-Verdugo, 2009; Pencea, Bingaman, Freedman, & Luskin, 2001).

Because of the results obtained, the focus was placed on the adult human brain. So far, countless trials have been carried out on this

subject, but after decades, no consensus has yet been reached among the scientific community. At the end of the 20th century, the first work demonstrating the existence of neurogenesis in the hippocampus of the human adult brain by BrdU labelling was postulated (Eriksson et al., 1998). However, later, much more advanced studies using new labelling techniques determined that although neurogenesis exists in the hippocampal dentate gyrus (Knoth et al., 2010) and lateral ventricles (N. Sanai et al., 2011; Wang et al., 2011) in the postnatal human brain, it began to decrease abruptly in the first months of life. Therefore, neurogenesis eventually would disappear and not be maintained throughout life (Bergmann et al., 2012; Göritz & Frisé, 2012; Sorrells et al., 2018). Thus, some authors argue that an inverse proportional correlation between neurogenesis capacity and brain size and complexity takes place. The more complex and extensive an animal's brain is, the less neurogenic capacity it has; the extension of the brain could be a major limitation for the migration of new neurons (Paredes et al., 2016). This would explain the decrease or absence of adult neurogenesis in primates. However, to this day the debate is still not completely settled; as new techniques advance and emerge, new studies appear in favour and against its presence in the adult human brain (Moreno-Jiménez et al., 2019; Sorrells et al., 2018). The discrepancies that have arisen are mainly due to the sensitivity of the different tissue markers used and may lead to very different conclusions. In any case, the authors do seem to agree on the existence of neurogenesis in the lateral ventricles of the human adult brain, corresponding to the ventricular-subventricular zone (V-SVZ),

and whose information will be expanded below, due to its importance in this Ph.D. thesis.

Therefore, the adult neurogenesis is mainly compromised to two neurogenic regions: the ventricular-subventricular area of the lateral ventricles (V-SVZ) and the subgranular layer (SGZ) of the dentate gyrus of the hippocampus (Alvarez-Buylla & Lim, 2004). In these regions, the neurogenic ability comes from the presence of the neural stem cells (NSCs) which have both proliferative and astrocytic ability, due to the expression of the glial fibrillary acidic protein (GFAP) and proliferative markers such as nestin (F. Doetsch, Caille, Lim, Garcia-Verdugo, & Alvarez-Buylla, 1999; Imura, Kornblum, & Sofroniew, 2003; Laywell, Rakic, Kukekov, Holland, & Steindler, 2000; Platel & Bordey, 2016; Seri, García-Verdugo, McEwen, & Alvarez-Buylla, 2001).

Using fate-mapping studies have been possible to determine that the NSCs from the SGZ are able just to generate new neurons and astrocytes (Bonaguidi et al., 2011; Bond, Ming, & Song, 2015) meanwhile the NSCs from the V-SVZ generate both oligodendrocytes and neurons (Calzolari et al., 2015; Ortega et al., 2013) even they can generate astrocytes whose destination was the *corpus callosum* (Sohn et al., 2015). This generation of new neurons, astrocytes, and oligodendrocytes can occur as in physiological for the maintenance of the homeostasis as in pathological situations caused by physical damage, toxins, or neurodegeneration (Maki, Liang, Miyamoto, Lo, & Arai, 2013; Martino, Pluchino, Bonfanti, & Schwartz, 2011; Nakatomi et al., 2002; Okano & Sawamoto, 2008).

The new neural progenitors generated in the neurogenic niches have different destinations. In physiological conditions, the progenitors from the SGZ have as destination the hippocampus while the cells from the V-SVZ are addressed to the olfactory bulbs. Furthermore, in the case of the V-SVZ has been observed a regionalization that takes place during the early stages of the development (Fuentealba et al., 2015). This regionalization cause that each neural progenitor leads to a different cell type according to its positions in the V-SVZ, a regional specification due to the gradual expression of different transcription factors (Sequerria, 2014). However, in the SGZ this regionalization is still unclear, but it could be similar to the process observed in the V-SVZ (Bekiari et al., 2015; Li, Fang, Fernández, & Pleasure, 2013; Sugiyama, Osumi, & Katsuyama, 2013).

The V-SVZ is the neurogenic niche with the greatest proliferative ability due to its huge extension compared with the SGZ (Alvarez-Buylla & Garcia-Verdugo, 2002). The cellular organization of the V-SVZ is very well described both in mice and humans. In adult mice four principal cell types have been described: the NSCs or type B cells, the proliferating intermediate cells or type C cells, the migrating neural progenitors or type A cells, and the ependymal cells or type E cells (Fiona Doetsch, Garcia-Verdugo, & Alvarez-Buylla, 1997). Furthermore, in the V-SVZ we can find other cell types that contribute to neurogenesis like mature astrocytes and blood vessels.

- **Type B cells:** There are two types of type B cells: B1 and B2. Both have astrocytic characteristics but type B1 is the most important due to having proliferative capacity. This type of cell

can be in a quiescent state or active state according to the expression of different markers like nestin and ependymal growth factor receptors (EGFR) (Platel & Bordey, 2016). When it is active, this cell can generate new type B1 cells and type C cells (F. Doetsch et al., 1999). Moreover, these cells have three domains through which it brings together the lateral ventricle, the type A cells, and the blood vessels (Lim & Alvarez-Buylla, 2016; Mirzadeh, Merkle, Soriano-Navarro, Garcia-Verdugo, & Alvarez-Buylla, 2008). This link is very important for neurogenesis signalling.

- **Type C cells:** These cells act as an intermediate between the type B cells and the type A cells due to the interaction among Dlx2 and EGF, recognized by EGFR (Fiona Doetsch, Petreanu, Caille, Garcia-Verdugo, & Alvarez-Buylla, 2002; Gonzalez-Perez & Alvarez-Buylla, 2011; Suh et al., 2009). Moreover, they have a limited self-renewal ability: until three times before the transition to the type A cell (Ponti et al., 2013).
- **Type E cells or ependymal cells.** These cells are located by lining the ventricular cavity of the lumen of ventricles and display numerous cilia that are responsible for the flow of the cerebrospinal fluid (CSF) (Fiona Doetsch et al., 1997). There are two types of E cells: E1 with multiple cilia and E2 with just two cilia (Mirzadeh et al., 2008). They don't present proliferative either self-renewal ability (Abrous, Koehl, & Le Moal, 2005; Capela & Temple, 2002; Chiasson, Tropepe, Morshead, & Van Der Kooy, 1999; Shah et al., 2018). However, they have an important role in the signalling of neurogenesis

by releasing pro-neurogenic factors like Noggin (Lim et al., 2000) and regulating the flow of the CSF which is essential for the exposition to different trophic and chemoattractant compounds (Ortiz-A ´ lvarez, Daclin, Shihavuddin, & Meunier, 2019; Spassky & Meunier, 2017).

- **Type A cells.** Also known as neural migrating progenitors. These cells are the last step in the process of neurogenesis in the V-SVZ and are the most abundant cell type in this area. They are usually forming tangential chains where are associated with type B and type C cells (Fiona Doetsch et al., 1997). These chains extend tangentially from V-SVZ to the olfactory bulbs forming the rostral migratory stream (RMS). After migrating to the olfactory bulb these cells are able to migrate radially along with the different layers of this structure and when they are in the correct position differentiate into mature interneurons (Alvarez-Buylla & Garcia-Verdugo, 2002). Furthermore, they can migrate to different regions of the brain like the corpus callosum or the striatum following brain damage (Lu et al., 2016). Even during the migration they can re-specify and generate new oligodendrocytes (Cayre, Bancila, Virard, Borges, & Durbec, 2006).

## Neural migration

As mentioned above, all that has been observed so far indicates that, as a general rule, new type A cells generated in the V-SVZ move along

the RMS until they reach the olfactory bulb of the adult brain. This process is known as neural migration and consists of different parts, which will be dealt with in different subsections. On the one hand, we find the migration process which in turn consists of two processes: the tangential migration along the RMS and the radial migration between the different layers of the olfactory bulb. On the other hand, it is also necessary to mention the different mechanisms by which these migration processes are regulated and are based on chemoattraction and chemorepulsion components.

During the tangential migration throughout the RMS the type A cells are distributed in chains and surrounded by type B cells. The movement of type A cells is possible due to complex interactions between intrinsic molecular programs and extrinsic determinants. Some of the determinants that participate in this type of migration are microtubules, myosin II, cellular adhesion molecules like PSA-NCAM, integrins, tenascins, and different components of the extracellular matrix. This migration consists of three steps: (1) the cell extends a leading neurite, led by a growth cone that extends and contracts; (2) translocation of the nucleus into the leading neurite (nucleokinesis); (3) somal translocation to the growth cone. These steps are repeated continuously allowing a “jumping movement” of the type A cells throughout the RMS (Ayala, Shu, & Tsai, 2007; Lim & Alvarez-Buylla, 2016).

The main microtubule-associated protein (MAP) that allows this type of migration is the doublecortin (DCX) which is highly expressed in type A cells. The union of DCX to the microtubules induces the



polymerisation of them, and the decrease of this union leads to the depolymerisation of microtubules. Therefore, DCX regulates the microtubule dynamics via the balance between polymerisation/depolymerisation, and thus DCX is able to regulate the neural migration. Moreover, recent studies have reported that the kinase Cdk5 is able to phosphorylate DCX in the union site to microtubules, preventing the polymerisation of microtubules (Ayala et al., 2007; Lasser, Tiber, & Lowery, 2018; Nishimura et al., 2014).

Once type A cells arrived at the olfactory bulb migrate radially among the different layers of this structure. During this type of migration is necessary the presence of a glial fiber that acts as a guide for the movement of the type A cells (Wichterle, Garcia-Verdugo, & Alvarez-Buylla, 1997). In this type of migration, we can find two modes: somal translocation and locomotion mode. In both participate the glial fiber and are regulated by the dynamic of the cytoskeleton (Ghashghaei, Lai, & Anton, 2007; Nadarajah, Brunstrom, Grutzendler, Wong, & Pearlman, 2001). During both types of neural migration, it should take into account the role of the blood vessels. They are present throughout the RMS as in the olfactory bulbs allowing and contributing to the migration. This role is present during the physiological conditions but also when the migration occurs as a consequence of brain damage (Cayre et al., 2013; Fujioka, Kaneko, & Sawamoto, 2019; Kaneko, Sawada, & Sawamoto, 2017; Kojima et al., 2010; Snapyan et al., 2009; Whitman, Fan, Rela, Rodriguez-Gil, & Greer, 2009).

## Regulation of neural migration

In order to achieve the most efficient and accurate neural migration possible, extracellular guidance signals are required that are interpreted by receptors, which in turn transmit signals to a network of intracellular signalling pathways, which ultimately converge in the cytoskeleton. Therefore, when we talk about neural migration, we must bear in mind that it is a complex process carried out thanks to a large interactive signalling network made up of different pathways. Among the signalling pathways, we find long-distance guidance molecules, short-distance instructional molecules, and cell adhesion complexes.

In long-distance guidance signalling, Netrin-1 and the Slit/Robo system stand out. On the one hand, Netrin-1 is a chemoattractant molecule that acts by stimulating microtubule and actin dynamics through GSK3 $\beta$  and Cdk5 by binding to the DCC receptor (Ayala et al., 2007). Some studies have shown that it is released from the olfactory bulb, which would corroborate its action as a chemoattractant and long-distance targeting molecule (Astic, Pellier-Monnin, Saucier, Charrier, & Mehlen, 2002; Murase & Horwitz, 2002). However, other groups have previously shown that the olfactory bulb does not appear to be essential for directional migration (Jankovski, Garcia, Soriano, & Sotelo, 1998; Kirschenbaum, Doetsch, Lois, & Alvarez-Buylla, 1999). Therefore, Netrin-1 would appear to lack functionality, but recent studies have identified Netrin-1 in the V-SVZ as a key factor in local angiogenesis and progenitor cell migration following demyelination (Cayre et al., 2013).

On the other hand, the Slit/Robo system consists of a chemorepulsion pathway formed by Slit proteins and their corresponding Robo receptors. It acts as a guide in both radial and tangential migration. Robo receptors are expressed both in the V-SVZ and along the RMS (Marillat et al., 2002; Nguyen-Ba-Charvet et al., 2004). Whereas the Slit protein has been observed to be secreted by areas surrounding the V-SVZ such as the striatum, septum, and choroid plexus (Hu, 1999; Wu et al., 1999); but more recent studies have also shown that both type A and type C cells are able to secrete this protein and therefore could act autonomously (Nguyen-Ba-Charvet et al., 2004). Regarding its regulation, it has been observed that the flow of cerebrospinal fluid regulated by E-cell cilia is responsible for the maintenance of a Slit concentration gradient, maintaining the highest concentration in the posterior V-SVZ (Sawamoto et al., 2006). Finally, the mechanism of action proposed so far is that Slit binding to the Robo receptor triggers a series of morphological events including centrosome reorientation through the action of GSK3 $\beta$  (Higginbotham, Tanaka, Brinkman, & Gleason, 2006).

With respect to short-distance signalling we encounter the neurotransmitters GABA and NMDA and their corresponding receptors. Type A cells are capable of expressing both types of receptors (Métin, Denizot, & Ropert, 2000; Moya & Valdeolmillos, 2004; Poluch & König, 2002). In both cases, the signalling of these neurotransmitters is mediated by changes in Ca<sup>2+</sup> concentration leading to a decrease in migration speed in the case of GABA and an

increase in migration in the case of NMDA (Bolteus & Bordey, 2004; Komuro & Rakic, 1993; Snapyan et al., 2009).

Finally, there is the regulation of migration through cell adhesion processes. This is the case of the extracellular matrix glycoprotein Reelin. This protein is secreted by the mitral cells of the olfactory bulb, which are the main targets of type A cells (Hack, Bancila, Loulier, Carroll, & Cremer, 2002). At the molecular level, this protein is recognised by ApoER2 and VLDLR receptors, the binding of which causes phosphorylation of Dab1 leading to the activation of a number of signalling pathways including the Cdk5, GSK3 $\beta$ , and PI3K pathways (Beffert et al., 2004; Bock et al., 2003; Gonzalez-Billault, Uren, Jime, Barallobre, & Pascual, 2005; Graham et al., 2004). Although it is secreted from the olfactory bulb, it does not appear to act as a migration directing molecule as is the case for the Slit protein. However, it has been shown to act as a separate signal for A-cell chains. Specifically, the Reelin signal is able to break established adhesion interactions between type A cells originating from the RMS, thus allowing the switch from tangential/collective to radial/individual migration (Cayre, Canoll, & Goldman, 2010; Hack et al., 2002; Sawada, Huang, Hirota, Kaneko, & Sawamoto, 2011). Furthermore, when secreted by the mitral cells of the olfactory bulb, they also act as a signal for the recruitment of new neurons to the olfactory bulb via the PI3K pathway (Hack et al., 2002; Simó et al., 2007).

## Alzheimer's disease

Alzheimer's disease (AD) was described for the first time at the beginning of the last century by Alois Alzheimer. He described in the patient of 51 years old, Auguste Deter, different cognitive symptoms (Maurer, Volk, & Gerbaldo, 1997) and histological injuries in the post-mortem brain: *miliary foci* (amyloids plaques) and fibrillary tangles (Alzheimer, 1907).

AD is defined as a neurodegenerative disease associated with age and characterised by the progressive damage of the superior mental functions (dementia) beginning with starting with episodic memory loss, which is the main diagnostic criterion. This cognitive impairment results in the patient end up being a totally dependent person (Marshall, Amariglio, Sperling, & Rentz, 2012). In the last years, the general aging of the population from the Western countries has triggered an increase in the incidence of dementias like AD. According to the World Health Organization (WHO) and Alzheimer's Disease International (ADI), it is estimated that, as of today, there are approximately 50 million people worldwide suffering from any type of dementia, of which around two-thirds suffer from AD, being the most common dementia (Patterson C., 2018). Furthermore, by 2050, these numbers are expected to triple to 152 million people with some form of dementia. Therefore, it exists a clear concern about this disease in all the society even more so when there is still no treatment.

In parallel, at the molecular level, the amyloid plaques consist of deposits of the beta-amyloid peptide ( $A\beta$ ) and neurofibrillary tangles formed by the accumulation of the hyperphosphorylated tau protein

(p-tau); both provoke cytological, histological, and biochemical changes that drive the neurodegeneration (Jeong, 2017). On one hand, many studies have reported that different types of mutations related to the first injury, A $\beta$  plaques, are responsible for the development of the familiar form of AD. This form is characterised by very early onset (around 50 years old), is genetic, and accounts for only 1-10% of cases of AD (Bateman et al., 2011; Carrillo-Mora, Luna, & Colín-Barenque, 2014; Rogaev et al., 1995; van der Flier, Pijnenburg, Fox, & Scheltens, 2011). On the other hand, both injuries are the basis of the main hypothesis to explain the aetiology of the sporadic form of AD. This form is the most frequent, its onset increase compared with the familiar form (around 65 years old) and the origin is unknown. However, there is a different hypothesis which tries to explain the origin of this disease; two of them are:

- The amyloid cascade theory: based on mutations observed in the APP protein in familial AD. According to this hypothesis, the accumulation of A $\beta$  peptide deposits would be the trigger for tangles, neurodegeneration, and cognitive deficit (Liu, Xie, Meng, & Kang, 2019; Walsh et al., 2002).

- The Tau propagation hypothesis. This theory focuses on the Tau protein, whose hyperphosphorylation causes the formation of neurofibrillary tangles. Furthermore, according to this hypothesis, Tau is essential for A $\gamma$ -induced neurotoxicity and affects the transmission signal between neurons (Liu et al., 2019; Rapoport, Dawson, Binder, Vitek, & Ferreira, 2002).

## Amyloid plaques

The amyloid plaques comprise the aggregation of A $\beta$  peptide. This peptide is the result of the amyloidogenic processing of the amyloid precursor protein (APP). This protein is located in the lipid bilayer of neurons and is involved in different physiological processes like synaptic plasticity and neurogenesis (Sosa et al., 2017; Young-Pearse et al., 2007; Zhou et al., 2011). During the amyloidogenic processing, APP is cut by the b-secretase in the D672 site generating the fragment sAPPb596 that is released to the extracellular space and the fragment that C99 remains in the membrane. After that the fragment C99 is processed by the g-secretase protein complex which consists of the proteins: presenilin 1 and 2 (PS), nicastrin, presenilin enhancer 2 (PEN-2), and the protein APH-1 (X. Zhang, Li, Xu, & Zhang, 2014). The result of this cleavage is the A $\beta$  peptide with a length between 40 and 42 amino acids that release to the extracellular space and the fragment AICD (APP intracellular domain) which is incorporated into the cytoplasm (Nhan, Chiang, & Koo, 2015).

In the extracellular space, the A $\beta$  peptide begins an aggregation process since the formation of little oligomers which organized themselves forming fibrils of 6-10 nm until the arising of the insoluble amyloid plaques with a diameter between 10 and 120  $\mu$ m (FINDER & GLOCKSHUBER, 2007; MORGAN, COLOMBRES, NUÑEZ, & INESTROSA, 2004). These plaques have a central core mainly compounded by the A $\beta$  peptide but also we can find other components like proteoglycans, cytokines, metal ions... (Atwood, Martins, Smith, & Perry, 2002).

Moreover, this core is surrounded by dystrophic neurite remains (Duyckaerts, Delatour, & Potier, 2009).

During the preclinical phase of the disease, the A $\beta$  peptide begins to accumulate until the formation of the plaques (Dubois et al., 2016). Firstly, these plaques appear in the entorhinal cortex and gradually spread to reach the entire brain, especially the hippocampus and neocortex (Morgan et al., 2004).

Both the A $\beta$  peptide itself and the amyloid plaques are able to induce a different types of damages in the cells. Through different mechanisms, one and the other produce an imbalance between the reactive oxygen species (ROS) amount and the antioxidants cellular agents which leads to oxidative stress. On one side, the A $\beta$  peptide disengages the electron transport chain that increases the ROS amount (Lloret et al., 2008) and on the other side, the amyloid plaques catalyse the production of ROS in the presence of metal ions (Cheignon et al., 2018). The oxidative stress generated induces membrane alterations (X. Wang et al., 2014) that trigger a dysfunction in the different glucose and lipid transporters and thus an alteration in the energetic metabolism (Butterfield & Halliwell, 2019; Chew, Solomon, & Fonteh, 2020). As well as a dysfunction in the Ca<sup>2+</sup> pump which generates a dysregulation of the intracellular Ca<sup>2+</sup> levels (X. Wang et al., 2014).

Furthermore, in AD, an excess of extracellular glutamate has been observed, which will lead to overstimulation of NMDA receptors in neurons, contributing to the entry of Ca<sup>2+</sup> into the cell interior, which



ultimately leads to cell apoptosis and, therefore, to a process of excitotoxicity (Fuchsberger et al., 2016).

In parallel, the presence of extracellular glutamate causes AMPA receptors to be stimulated and allow  $\text{Na}^+$  to enter the cell, and consequently, NMDA receptors increase  $\text{Ca}^{2+}$  entry into the postsynaptic neuron inducing Long Term Potentiation (LTP); which is essential for synaptic activity and memory formation (Lynch, 2004). However, in AD, the excess glutamate induced by the presence of A will lead to blockade of NMDA receptors causing the activation of signalling cascades induced by these receptors to be shifted towards pathways involved in the induction of Long Term Depression (LTD) and synaptic loss (Palop & Mucke, 2010). Together A induces endocytosis of GABA receptors thus further contributing to glutamate excess and compromising LTP generation (Ulrich, 2015). Furthermore, it should be noted that this LTP activity is mainly compromised in the CA1, CA3, and dentate gyrus regions of the hippocampus, which correspond to the areas of highest synaptic activity for memory formation (Frisoni, Fox, Jack, Scheltens, & Thompson, 2010).

Another point to take into account in the formation of the amyloid plaques is the clearance of the  $\text{A}\beta$  peptide which is also compromised in the EA. Some of the proteins that contribute to this clearance are the neprilysin, the insulin-degrading enzyme, and the angiotensin-converting enzyme (Leissring et al., 2003; Zou et al., 2007). Furthermore, the  $\text{A}\beta$  peptide can be cleared to the blood through the transporters LRP-1 and P-glycoprotein present in the blood-brain

barrier (Pflanzner et al., 2011; W. Wang, M. Bodles-Brakhop, & W. Barger, 2016).

Finally, according to the amyloid theory, the formation of amyloid plaques is the origin of AD and is responsible for the other pathological changes that occur in this disease. This hypothesis is mainly based on the mutations found in familial AD, which revolve around the formation of amyloid plaques (Bateman et al., 2011). Furthermore, it has been observed that the main known risk for AD is the  $\epsilon 4$  polymorphism of apolipoprotein E, which, as previously mentioned, is closely related to the  $A\beta$  peptide (Hirsch-Reinshagen, Burgess, & Wellington, 2009). In parallel, it has been observed that in APP transgenic mice,  $A\beta$  peptide is able to induce Tau hyperphosphorylation (Götz et al., 2004). However, there are other theories to explain the relationship between A and Tau: that they have a synergistic effect or that the toxicity of A is mediated by Tau (Ittner & Götz, 2011). It should also be noted that different pharmacological approaches based on A have resulted in improvements in cognitive deficits in the murine models of AD used, although many other therapies have also failed. Finally, it is necessary to add that many authors have shown that the amyloid cascade does not correlate with neuronal loss and cognitive impairment (Ricciarelli & Fedele, 2017). Therefore, it can be concluded that this hypothesis has its pros and cons.

## **Neurofibrillary tangles**

Protein Tau belongs to the family of microtubule-associated proteins. The main function of this protein is the formation of bridges between the fibers of Tubulina for the stability of the cytoskeleton (Alberts et al., 2008). This activity is regulated by the balance between phosphorylation and dephosphorylation involving different types of kinases like Cdk5 and GSK3 $\beta$  (Gong & Iqbal, 2008). On one hand, Cdk5 needs the coactivator p35 to perform its enzymatic activity (Nikolic, Dudek, Kwon, Ramos, & Tsai, 1996) and participate in diverse neuronal processes like neurogenesis (Jessberger, Gage, Eisch, & Lagace, 2009). On the other hand, GSK3 $\beta$  is also involved in neurogenesis as well as in other processes such as LTP activity and apoptosis (Beurel, Grieco, & Jope, 2015).

In the EA both kinases are overstimulated which provokes the hyperphosphorylation of Tau. In the case of Cdk5, its activity increases due to the coactivator p35 are cleaved and become p25 because of the excess of intracellular Ca<sup>2+</sup> (Sato et al., 2011). Parallel, the activity of GSK3 $\beta$  increase due to the levels of RCAN1 also increase.

The imbalance in the phosphorylation/dephosphorylation triggers the formation of the neurofibrillary tangles (NFTs). These NFTs are the consequence of the aggregation of the protein Tau when it is not joined to the microtubules (Binder, Guillozet-Bongaarts, Garcia-Sierra, & Berry, 2005; Maeda & Takashima, 2007). The formation of these structures produces the destabilisation of the cytoskeleton which

leads to cell dysfunction and degeneration (Ballatore, Lee, & Trojanowski, 2007).

The distribution of the NFTs clearly correlates with the progression of the EA. In such a way that we can classify the disease in six stages, the Braak stages, according to the NFTs position in the brain. During the first two, the NFTs are in the transentorhinal region; in the next two, reach the entorhinal cortex, CA1, and the amygdala. Finally, the NFTs spread throughout all the brain (Braak & Braak, 1995).

Finally, the Tauist theory argues that it is this whole process of Tau hyperphosphorylation and formation of NFTs that is responsible for the onset of AD. This is supported by the correlation observed between the distribution pattern of Tau pathology, the progression of clinical symptoms, and neurodegeneration in AD patients (Bejanin et al., 2017). Furthermore, PET imaging has shown that Tau-induced lesions occur earlier than those caused by A $\beta$  peptide (Okamura & Yanai, 2017). However, it is worth mentioning that Tau pathology is not exclusive to AD, but occurs in other types of dementias known as tauopathies; frontotemporal dementias being the most prominent. In fact, different mutations of the Tau protein have been described in frontotemporal dementia with parkinsonism-17, while in familial Alzheimer's we did not find any mutation directly related to Tau pathology (Goedert & Spillantini, 2000). What has been observed is that increased APP is able to promote Tau aggregation and thus the formation of NFTs; which would support the theory that Tau is the initiator of AD (M. Takahashi et al., 2015). However, there is also evidence for activation of the Tau kinase, GSK3 $\beta$ , by A $\beta$  peptide

(DaRocha-Souto et al., 2012). In any case, it is a debate that is still not completely closed.

## **AD and neurogenesis**

Due, among other things, to the close relationship between the SGZ neurogenic niche and the hippocampus, which is one of the most affected regions in AD, many studies have been carried out to determine the relationship between AD and neurogenesis. In the following section, we will try to summarise all the current information about the relationship between these two concepts.

The first studies on this subject were carried out by Haughey et al. who demonstrated both *in vivo* and *in vitro*, using an animal model and human samples, that the presence of A $\beta$  peptide causes a decrease in V-SVZ and SGZ neurogenesis. They used BrdU as a marker of neurogenesis. Furthermore, they determined that this decrease appears to be mediated by the disruption in intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis caused by A $\beta$  peptide, as mentioned above (Haughey, Liu, Nath, Borchard, & Mattson, 2002; Haughey, Nath, et al., 2002). Following these findings, studies have continued to characterise neurogenesis in AD, using both patient samples and different animal models and following different techniques. However, as in the case of the study of adult neurogenesis *per se*, there are different positions. Some authors argue for an increase in neurogenesis in AD patients (Boekhoorn, Joels, & Lucassen, 2006; Jin et al., 2004; Taupin, 2010), while others show a decrease. Such a reduction has been observed in AD patients with the neurogenesis markers Musashi (Ziabreva et al.,

2006) and DCX (He & Shen, 2009). Likewise, a decrease in neurogenesis has also been demonstrated in different animal models of AD: in the triple transgenic (3xTg) using the HH3 (phosphorylated Histone H3) marker (Rodriguez, Jones, & Verkhatsky, 2009); in the double transgenic APP/PS1 and the single transgenic hAPP, using BrdU (Pan et al., 2016; Tang et al., 2009) and in the 5xFAD transgene with the DCX marker (Moon, Cha, & Mook-Jung, 2014).

Indeed, the most recent studies in this regard demonstrate a decrease in neurogenesis in AD patients (Tobin et al., 2019) (Moreno-Jiménez et al., 2019), as well as in animal models and cell cultures, induced by the presence of A $\beta$  peptide oligomers (Scopa et al., 2020). However, it has been observed that even in cases where increased neurogenesis has been demonstrated, the newly generated neurons often have reduced survival rates, probably due to intrinsic defects and/or lack of proper innervation (Chuang, 2010).

In parallel, several studies have been carried out to determine the molecular cause of this decrease in neurogenesis. To this end, we have studied the relationship between the various proteins involved in AD and the process of neurogenesis. Firstly, we focused on the APP protein, which appears to be of great importance in the physiological processes of neuronal differentiation, migration, and growth.

On the one hand, the unprocessed APP protein appears to act as an essential cell adhesion molecule in the neuronal migration process. This protein has both an extracellular and a cytoplasmic domain with characteristics typical of cell adhesion molecules (Sosa et al., 2017).

The extracellular domain is able to bind to different molecules of the extracellular matrix, including Reelin (Hoe et al., 2009), which, as mentioned above, plays an important role in the regulation of neural migration. It has even been observed that it is able to bind to A $\beta$  peptide aggregates leading to neuronal degeneration (Sola Vigo et al., 2009). On the other hand, the cytoplasmic domain of the APP protein is able to bind to cytoskeleton-associated proteins, including Dab1 (Young-Pearse et al., 2007), which is of great importance in the regulation of migration. In this way, the APP protein acts as a cell adhesion molecule, connecting the extracellular environment with the cell cytoskeleton, which allows it to regulate the neural migration process, establishing a connection between proteins such as Reelin and Dab1 (Sosa et al., 2017). It is also worth mentioning that this regulation is mediated through the G protein-coupled receptor (Ramaker & Copenhaver, 2017).

On the other hand, several studies have demonstrated the involvement in the neurogenesis of fragments derived from APP processing, with diverse functions. The sAPP fragment, which is reduced in AD (Lannfelt, Basun, Wahlund, Rowe, & Wagner, 1995), binds mainly to both A- and C-type V-SVZ cells. Upon binding to these cells it acts as a growth factor acting in an autocrine or paracrine manner mediating the effect of EGF (Caillé et al., 2004). Furthermore, this property of sAPP to promote neurogenesis could be mediated by its ability to decrease Cdk5 activity and inhibit Tau hyperphosphorylation (Han et al., 2005). This pro-neurogenic effect

was also observed later in SGZ cells, but in this case, the role of EGF was not assessed (Baratchi, Evans, Tate, Abraham, & Connor, 2012).

The AICD fragment plays a completely opposite role to the sAPP form. In this case, it acts by inhibiting the process of neurogenesis. The exact process by which AICD causes this inhibition is not completely clear. However, it seems that this suppression occurs via the adaptor protein Fe65 which causes the translocation of AICD to the nucleus where it acts as a transcriptional factor regulating the expression of genes and miRNAs related to neurogenesis, thus promoting its inhibition (Zhou et al., 2011). Furthermore, this inhibition of neurogenesis by AICD also appears to be mediated through a process of neuroinflammation (Ghosal, Stathopoulos, & Pimplikar, 2010). Furthermore, it has been shown that this fragment may contribute to the pathophysiology of AD through activation of GSK3 $\beta$  kinase by inducing Tau hyperphosphorylation (Multhaup, Huber, Buée, & Galas, 2015; Ryan & Pimplikar, 2005).

In the case of A $\beta$  peptide, as mentioned above, the mere presence of the intracellular oligomers formed by this peptide in AD is sufficient to cause inhibition of neurogenesis in the V-SVZ (Scopa et al., 2020). However, the mechanism by which this effect occurs is so far unknown.

On the other hand, there are several proteins involved in the pathophysiology of AD that have some kind of effect on the process of neurogenesis. This is the case of GSK3 $\beta$  kinase, which is increased in AD patients and causes the degradation of catenin, leading to a



decrease in the pro-neuronal genes regulated by this protein and therefore to a decrease in neurogenesis (P. He & Shen, 2009). Furthermore, as mentioned above, GSK3 $\beta$  participates in the signalling cascade necessary for the neuronal migration process, via Netrin and Reelin (Ayala et al., 2007). Likewise, the kinase Cdk5, involved in the hyperphosphorylation of Tau, among the proteins it is capable of phosphorylating is the DCX protein, whose balance between the phosphorylated and non-phosphorylated form is key to the migration process, as we have seen previously (Kawauchi, Shikanai, & Kosodo, 2013). Also, the BACE protein, required for APP processing, appears to be indispensable for the normal development of dentate gyrus neurons during early postnatal development (Hou et al., 2017). Finally, in murine models of AD, a decrease in Noggin and an increase in its agonist BMP4 have been observed, contributing to a decrease in neurogenesis (Tang et al., 2009), through its role as a pro-neurogenic signal.

The effect of AD on neurogenesis has been observed that may also be due to the induction of aberrant lipid metabolism in V-SVZ ependymal cells leading to a decrease in neurogenic activity and contributes directly to the observed cognitive decline (Hamilton et al., 2015).

Finally, it is worth noting that Gatt et al. conducted a meta-analysis of the expression levels of neurogenic markers in AD patients. From this systematic review it can be concluded that, in general, the proliferation of new fully functional neurons is reduced in late AD (Gatt, Lee, Williams, Thuret, & Ballard, 2019).

## Cell cycle

The cell cycle is a set of processes that occurs in the cell with the objective of growth and finally divides adequately. It can be divided into two parts: interphase and mitosis (phase M). During the interphase, the cell grows and prepares for division during mitosis. The interphase is compound by three phases:

- Phase G1: During this phase, the cell grows and gets ready all necessary for the DNA replication which will occur over the next phase (phase S). Moreover, it is the first checkpoint to verify if everything is correct for the cell progression through the cycle (Barnum & O'Connell, 2014). If the cell cannot overcome this checkpoint or it is intended to differentiate, enters in a quiescence state known as G0 in which the proliferative capacity is inactive (Coller, Sang, & Roberts, 2006).
- Phase S: This phase is characterised by DNA replication which is a crucial point cell cycle since the genetic material that is generated in his phase has to be identical. The result will be a tetraploid cell (4N) (Cooper & Hausman, 2013). Moreover, it forms the sister chromatids thanks to the junction between the replicated DNA molecules through cohesin (Johnson, Pollard, Earnshaw, & Lippincott-Schwartz, 2017).
- Phase G2: This is the last phase before the mitosis so it is mainly a checkpoint to verify that all the components are correct and prepared for a correct cell division. One of the

tasks during this phase is checking the presence of DNA damage (Johnson et al., 2017).

- Phase M: This phase presents two stages; the nuclear division or mitosis and the cytoplasm division or cytokinesis. During mitosis, the sister chromatids are separated and finally, the nucleus is divided into two identical parts with the same amount of genetic material (Johnson et al., 2017). Finally, it produces cytokinesis triggering the formation of two identical daughter cells.

## Regulation of cell cycle

Because of the great importance of the cell cycle is highly regulated. This regulation participates mainly in cyclins, cyclin-dependent kinases (CDKs), and cyclin-dependent kinases inhibitor (CKIs) which also participate in the regulation of proliferation and differentiation in both embryonic and adult neurogenesis (Cheffer, Tárnok, & Ulrich, 2013). These proteins act during the so-called cell cycle checkpoints that are located between each of the phases to regulate progression throughout the cell cycle (Barnum & O'Connell, 2014). These cell cycle checkpoints are checkpoint G1/S, in charge of check the DNA integrity; checkpoint intra-phase S, avoid any damage during DNA replication; checkpoint G2/M, verify the DNA integrity and the result from the DNA replication; and mitosis checkpoint, check the correct position of the sister chromatids.

- Checkpoint G1/S: the main function of this checkpoint is to check the integrity of the DNA since once passed the cell is destined to divide

and any damage will be passed on to its progeny. In addition, it assesses the size, the availability of nutrients, and the type of signals coming from its environment. This is regulated by cyclins D and CDKs 4 and 6, which are inhibited by INK4 CKIs such as p16INK4a and p19Arf. Cyclin D associates with CDK4 and CDK6 leading to phosphorylation of the Rb protein, which becomes inactive and dissociates from the transcription factor E2F, causing it to become active. Activation of E2F allows transcription of genes necessary for cycle progression, such as cyclin E (Ohtani, DeGregori, & Nevins, 1995; Y et al., 1996). This cyclin, in turn, binds to CDK2 and promotes the inactivation of Rb which allows the transcription of genes necessary for S-phase progression.

Also of note is the intra S-phase checkpoint that is directly responsible for regulating replication elongation to preserve the integrity of the replicated material. Two checkpoint kinases, ATM and ATR, are involved in this task to prevent DNA damage during replication. ATR is activated in response to various lesions such as UV; while ATM responds mainly to double-strand breaks (Iyer & Rhind, 2017). In addition, throughout this phase, there is binding between cyclin A and CDK2 whose activity allows for the continuation of the phase until cyclin A binds to CDK1 leading to the G2 phase.

- Checkpoint G2/M: This is the last point of regulation directly prior to the cell division process. It is therefore essential to check not only the integrity of the DNA but also that it has been duplicated successfully and without error. In this case, the regulation is carried out by the binding of cyclin B to CDK1, which allows the transition to M-phase (Le Breton, Cormier, Bellé, Mulner-Lorillon, & Morales, 2005). This

complex can be inhibited by both p27Kip1 and p21Cip1 (Besson, Dowdy, & Roberts, 2008).

- Mitosis checkpoint: This checkpoint occurs at the beginning of mitosis before complete cell division takes place. Specifically, it checks that all sister chromatids are in the right place so that their separation during anaphase takes place correctly. This check is carried out by the mitotic checkpoint complex (MCC), which prevents the start of anaphase until all the chromosomes are correctly attached to the spindle microtubules for subsequent segregation. The MCC is able to inhibit the E3 ubiquitin ligase, APC/C (anaphase-promoting complex) when bound to the activator protein Cdc20, thus delaying anaphase (S. Liu & Zhang, 2017).

One of the major cell cycle regulators is the E3 ubiquitin ligase APC/C. The main function of this protein is the quick ubiquitination of specific cell cycle proteins for its later degradation and thus ensures continuity of the cell cycle (Sajman et al., 2015). This activity is regulated by the coactivators Cdc20 and Cdh1 that are going to join to APC/C at different points of the cell cycle (Pines, 2011). APC/C-Cdc20 acts in the beginning and the end of mitosis; and APC/C-Cdh1, at the end of mitotic exit and at the beginning of the G1 phase. Furthermore, APC/C-Cdh1 can regulate the cell cycle exit or the differentiation during phase G1 (Wasch, Robbins, & Cross, 2010) through the ubiquitination for degradation of some CDKs like Cdk5 (J. Zhang, Li, Zhou, Zhou, & Herrup, 2012) and cyclins like cyclin B1 (Müllers, Silva Cascales, Jaiswal, Saurin, & Lindqvist, 2014).

## Cell cycle arrest

The moment a failure occurs at any of these regulatory points, the cell cycle comes to a halt. Under physiological conditions, this arrest serves mainly to facilitate the repair of any DNA damage that may have occurred, prior to cell proliferation. However, if the damage is too severe, the cell activates a series of mechanisms that will lead either to apoptosis or senescence to avoid the malignancy of the damage suffered.

This cell cycle arrest usually occurs either in the G1 or G2 phase and is defined by the activation of the DNA damage response (DDR), which is regulated by the ATM and ATR proteins (Maréchal & Zou, 2013).

## Apoptosis

Apoptosis, or programmed cell death, is the best-known type of cell death and is mainly characterised by the formation of so-called apoptotic bodies that are eventually phagocytosed by macrophages.

The mechanism of apoptosis is highly regulated and its initiation can be classified into two main pathways: intrinsic and extrinsic. Although the interaction between molecules of both pathways has been observed (Igney & Krammer, 2002). Both pathways lead to the activation of the execution pathway via caspase 3. All degradation processes (protease activation, nuclear fragmentation...) occur along this pathway until finally apoptotic bodies are formed (Elmore, 2007).

On the one hand, in the intrinsic pathway, a series of stimuli will finally cause a loss of the mitochondrial transmembrane potential, thus

inducing the release of molecules such as cytochrome C and Smac/DIABLO. These molecules will induce activation of the caspase-dependent mitochondrial pathway. Cytochrome C triggers the activation of caspase 9 through the formation of apoptosomes (Hill, Adrain, Duriez, Creagh, & Martin, 2004), while Smac/DIABLO acts as an inhibitor of IAPs (inhibitors of apoptosis proteins) (Schimmer, 2004). Finally, caspase 9 induces the activation of caspase 3, thus starting what is known as the execution pathway.

On the other hand, the extrinsic pathway is initiated through the activation of TNF receptors (Locksley, Killeen, & Lenardo, 2001). This activation triggers the recruitment of FADD and RIP proteins. FADD in turn associates with procaspase-8 and a death-inducing signalling complex (DISC) is formed, resulting in autocatalytic activation of procaspase-8 (Wajant, 2002). Activation of caspase-8 then leads to activation of caspase-3, inducing the execution pathway.

## **Senescence**

Senescence is a mechanism whose main objective seems to be the elimination of damaged cells for their subsequent renewal, as happens with apoptosis. However, we can find resistant senescence in which the elimination of these damaged cells does not occur and they end up accumulating and generating serious tissue damage; this is what happens in pathological processes such as cancer (Muñoz-Espín & Serrano, 2014). This process means that cells become quiescent and therefore lose their proliferative capacity, but their vital activities remain active.

The first to define this process in physiological situations were Leonard Hayflick and Paul Moorhead, who defined it as a possible cause of aging. From their work, the so-called Hayflick limit was determined, which establishes the maximum number of divisions that a cell can undergo as a function of the length of its telomeres (Hayflick & Moorhead, 1961).

In addition to telomere length, other processes can cause senescence: DNA damage, mitochondrial dysfunction, and epigenetic factors. These stimuli activate a large number of pathways and many of them are regulated by p53 and converge on the CKIs p16, p21, p15, and p27. Inhibition of CDKs-cyclin complexes will ultimately lead to cell cycle arrest and Rb hyperphosphorylation which is crucial for the execution of senescence (Chicas et al., 2010). It is also quite possible that, as with apoptosis, there are different subtypes of senescence depending on the cell type and the conditions in which it is found.

One example of a molecular mechanism leading to senescence is that triggered by oxidative stress. The presence of ROS alone triggers the activation of a loop necessary for the stability of senescence involving the p21 CKI and the p38 MAPK protein (Ito et al., 2006; Passos et al., 2010). In addition, ROS also contributes to senescence by inducing DNA damage, mitochondrial dysfunction, mitochondrial DNA damage, and epigenetic change (Davalli, Mitic, Caporali, Lauriola, & D'Arca, 2016; A. Takahashi et al., 2012; Wiley et al., 2016).

This senescent state is characterised by the release of a series of signals that influence the surrounding cells. In principle, these signals



are primarily aimed at the clearance of senescent cells by macrophages. However, this can lead to functional and structural deterioration of the tissue and organ in which these cells are located. This collection of released factors is known as the senescence-associated secretory phenotype (SASP). The SASP is mainly composed of pro-inflammatory signals such as the interleukins IL-6, IL-1, and IL-8; the chemokines CXCL and CCL; and IFN-, among others. But we also encounter other components such as growth factors (EGF, VEGF), proteases (matrix metalloproteases), nitric oxide, and others (Coppé, Desprez, Krtolica, & Campisi, 2010). Also, an important marker of senescent cells is  $\beta$ -Galactosidase; this is known as SAGAL (senescence-associated  $\beta$ -galactosidase). The activity of this enzyme is increased in the lysosomes of senescent cells, indicating increased autophagy, and is a consequence rather than a cause of the senescence process (B. Y. Lee et al., 2006).

Finally, senescent cells also show changes at the morphological level. These changes are mainly: an increase in size and granularity, flattening, and vacuolisation. The increase in size and granularity seems to be related to the relationship between autophagy and senescence (Sikora, Mosieniak, & Alicja Sliwinska, 2016).

## **Cell cycle and neurogenesis**

For correct neurogenesis is essential a proper cell cycle progression and its corresponding regulation. The processes that occur during neurogenesis: cell differentiation and proliferation; can be translated as cell cycle exit and re-entry. The cell cycle exit and the entry into the G0 phase lead to differentiation, so the regulators that participate to

block the G1 phase can be considered as pro-neurogenic. Meanwhile, the proteins that contribute to the cell cycle progression will promote proliferation. These proteins will be different according to the neurogenic niche and the cell type (Cheffer et al., 2013).

Each of the phases of the cell cycle plays a different role in the process of neurogenesis. Thus, the M-phase and its machinery are essential for the asymmetric division process necessary for cell proliferation (Ohnuma & Harris, 2003). From this initial asymmetric division of B-cells, the generated C-type cells are able to divide up to three times before differentiating into A-type cells, which divide before V-SVZ exist between one or two times and continue to do so while migrating through the RMS (Ponti, Obernier, Guintoa, et al., 2013).

In the case of the G1 phase we find, as mentioned, a key control point in cell cycle progression or not. When extrapolated to neurogenesis, the exit from the cell cycle and entry into the G0 phase leads to differentiation. Therefore, those regulators involved in blocking the G1 phase can be considered as proneural. Whereas those components that allow cell cycle progression will enhance the proliferation process.

Finally, throughout the S-phase DNA duplication and chromatin remodelling also take place, as well as epigenetic changes. Both processes can lead to changes in neurogenesis (Ohnuma & Harris, 2003).

Cell cycle regulation in cells involved in neurogenesis also involves the mechanisms mentioned above, but with slight differences, depending on whether it is the V-SVZ or the SGZ and the cell type. In B cells, cyclins

D1 and D2, CDKs 2 and 6, and E2f1 are able to promote proliferation, i.e. cell cycle progression. Whereas p16INK4a and p21Cip1 inhibit proliferation and thus induce differentiation in C-type cells. In these cells, it is p27Kip1 that inhibits proliferation and promotes differentiation into type A cells. Finally, cyclin D1 and cyclin D2 promote differentiation into astrocytes and neurons, respectively, while Cdk2 inhibits differentiation into oligodendrocytes (Cheffer et al., 2013).

## Cell cycle and AD

As expected and as with neurogenesis, AD has an effect on the cell cycle of cells. These effects will be detailed below.

The effects of EA on the cell cycle depend to a large extent on the cell type. Thus, on the one hand, post-mitotic neurons are quiescent in the G0 phase of the cell cycle due to the active degradation of proteins related to cell cycle progression performed by the E3 ubiquitin ligase APC/C-Cdh1 (Gieffers, Peters, Kramer, Dotti, & Peters, 1999). The presence of A $\beta$  peptide causes cell cycle reactivation in these cells due to the upregulation of cyclins and CDKs, through downregulation of APC/C-Cdh1 (Fuchsberger et al., 2016). This re-entry into an ectopic cell cycle causes that neurons enter apoptosis, thus contributing to the neurodegeneration found in AD (Copani et al., 2007).

On the other hand, in the case of cells involved in neurogenesis, the effect that AD may have on their cell cycle will be quite different. We must bear in mind that the nature of the cell cycle of these cells is totally different from that of differentiated neurons, since, in these

cells, there must be a balance between proliferation, migration, and differentiation.

From all that has been explained in this introductory section, it is clear that there is evidence of a failure in the neurogenesis associated with AD, although there are still gaps in the processes involved. In the present thesis, we have sought to further investigate the status of the V-SVZ in a murine model of AD, from both a histological and molecular point of view. In this way, we will be able to establish new points that contribute to the physiopathology of this disease; and that will allow us to develop new techniques for both early diagnosis and treatment.

## Objectives

The main objective of this thesis is to characterise the migration capacity of V-SVZ stem cells in a murine model of Alzheimer's disease (AD). From this main objective, the following specific objectives are derived:

1. To study morphological differences in the V-SVZ of APP/PS1 mice compared to WT mice. Specifically, to analyse the number of migratory cells present in each model.
2. To determine the number of migrating cells along the rostral migratory stream and the levels of Netrin in both WT and APP/PS1 mice.
3. To quantify the number of mature neurons in the olfactory bulbs, and to compare it with the odorant discrimination capacity in APP/PS1 and WT mice.
4. To analyse differences in DNA integrity and oxidative stress levels in the V-SVZ of the APP/PS1 model compared to controls.
5. To characterise the cell cycle and related protein levels (Cdh1, cyclin B1, and Cdk5/p35) in both models.
6. To determine the presence of senescence and apoptosis in both migrating cells and astrocytes in the V-SVZ of the AD and WT mice.



## Materials and methods

### Experimental animals

In this thesis, it used the double transgenic mice APP<sup>swe</sup>/PSEN1<sup>dE9</sup> (APP/PS1) characterised as AD model by many groups (Garcia-Alloza et al., 2006; Jankowsky et al., 2004; Kilgore et al., 2010). This model presents in its genetic code mutated APP gene and one modified of presenilin 1 (PSEN1). The APP gene codifies a chimerical mouse/human APP protein and the PSEN1 gene codifies a protein without the exon 9 which is associated with the AD. The expression of both genes is limited to the central nervous system. Phenotypically, these mice develop A $\beta$  deposits at six months of age leading to abundant amyloid plaques in the hippocampus and cerebral cortex by nine months of age. Moreover, we used as a control model or wild type the strain C57BL/6J with the same genetic background.

Mice were housed in groups (2–6 mice per cage) and maintained in a 12:12-h light-dark cycle at  $23 \pm 1$  °C and 60% relative humidity with access to food and water ad libitum in *Unitat Central d'Investigació de la Facultat de Medicina de la Universitat de València*.

All procedures in which the use of mice was necessary were carried out after approval by the *Comisión de Ética en la Investigación Experimental, Vicerectorado de Investigación* of the University of Valencia and following the regulations established in Royal Decree 53/2013, which establishes the basic rules applicable to the protection of animals used in experimentation and other scientific purposes,

including teaching. For all the procedures the mice were sacrificed between five and six months of age.

## **Odor habituation test**

Olfactory deficits were screened following the procedure of Wesson et al. (Wesson, Levy, Nixon, & Wilson, 2010) using the odor-habituation 201 test (Sundberg, Døving, Novikov, & Ursin, 1982). Odors were diluted  $1 \times 10^{-3}$  in mineral oil and applied to cotton- applicator stick. Animals were tested in their own home cage to minimize potential influences of stress or anxiety on the behavioural measures. Testing took place during the dark phase of the animals' day. Odors were delivered for 4 successive trials (1 block), the 20s each, separated by 30s inter-trial intervals, by inserting the odor stick into a port on the top of the animal's home cage. The number of approaches, defined as snout-oriented sniffing within 1cm of the odor presentation port was registered. Odor presentation and mice were tested in a counter-balanced order. For analysis of olfactory behaviour data, odor investigation durations within individual trials were collapsed across all odors. To calculate the habituation index, the normalized investigatory values from all fourth trial odor presentations were subtracted from the corresponding first trial odor presentations.

## **Western Blotting**

To determine the levels of proteins of interest from homogenate tissue it used the technic Western Blotting. This technic can detect levels of proteins from biological samples using specific antibodies.



To obtain the corresponding samples, the animals were sacrificed by cervical dislocation, removed the brain, and isolated the different structures: V-SVZ, hippocampus, cerebellum, and cortex. All of them were freeze-clamped and preserved at -80°C. It homogenised the tissue to obtain the release of the proteins using chemical and mechanical methods. The chemical method consisted of the use of a lysis buffer with Tris, glycerol, and SDS; and the mechanic method involved the utilisation of a homogenizer. After the homogenization, it determined the content of total protein from each sample using the Lowry method in which were used BSA dilutions as a standard curve.

Once the protein content of the samples had been determined, 20 µg of protein was used to make the Western Blotting. This method consists of three parts: the SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), the electrotransfer, and the immunoblot. During the electrophoresis, the proteins from each sample were separated according to their molecular weight. The percentage of polyacrylamide from the gel depends on the weight of the protein of interest. The electrophoresis was performed at a continuous voltage of 100 volts for approximately 90 minutes in a running buffer of Tris and Glycine. After that, the separated proteins were transferred to a membrane of nitrocellulose using the Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell at a continuous amperage of 240 mA (120 mA per each gel) for 90 minutes and observing that the voltage don't overcome the 100 volts. Finally, the membrane with the separated proteins was incubated for 1 hour with blocking solution (5% BSA or milk in TBS-Tween 20, TBS-T) and then with the corresponding primary antibody diluted in the

blocking solution and at the dilution indicated by the trading house and overnight at 4°C. The next day, the membrane was washed three times with TBS-T and incubated for 1 hour with the corresponding secondary antibody. Then the membrane was washed three times with TBS-T and signal detection was performed using “Luminata Classico Western HRP Substrate” and a biomolecular imager (ImageQuant™ LAS 4000, GE Healthcare Bio-Sciences).

Lastly, the densitometry of each protein from each sample was accomplished using ImageGauge4.0 software. In all the cases, the protein of interest was normalized with its corresponding housekeeping proteins (GAPDH or Tubulin) whose levels were determined by following the same steps explained above. Once the value of the protein of interest was obtained for each sample, the average for each group and its corresponding standard deviation were determined.

The different primary antibodies used in Western Blotting were: Cdh1 (DCS-266 NBP1-54465, Novus Biologicals, 1:1000), Cdk5 (2506, Cell Signaling Technology, 1:1000), Cyclin B1 (4138S, Cell Signaling Technology, 1:1000), p16 (MA1-16664, ThermoFisher, 1:500) and the housekeeping proteins  $\alpha$ -Tubulin (sc-8035, Santa Cruz Biotechnology, 1:8000) and GAPDH (G9545, Sigma, 1:20000). And the secondary antibodies are Anti-mouse IgG H&L Chain Specific Peroxidase Conjugate (401215, Calbiochem, 1:6000), Anti-rabbit IgG HRP-linked (7074S, Cell Signalling, 1:3000) and Mouse monoclonal [KT98] Anti-Rat IgG2b H&L (HRP) (ab106750, Abcam, 1:1000).

## Immunofluorescence

This technic as well as Western Blotting is used for the detection of proteins of interest using specific antibodies. However, in this case, the detection is performed over the fixed tissue which allows determining the distribution of the protein in specific regions of the tissue and using secondary antibodies conjugated with fluorochrome. Moreover, with this method, it is possible to analyse different proteins at the same time if primary antibodies are used that are recognised by different secondaries presenting a fluorochrome capable of being excited and emitted at a different wavelength.

In order to obtain the fixation of the tissue, the mice were sacrificed by an intraperitoneal injection of 0.5 mL of Eutanax and then, were perfused. For the perfusion was used about 100 mL of heparinised saline to achieve exsanguination of the animal (0.1%, pH 7.4) and about 100 mL of 4% paraformaldehyde in PBS (0.1M, pH 7.4) for the fixation of the tissue. Then, brains were removed and were post-fixed 24 hours in 4% paraformaldehyde in PBS at 4°C followed by approximately 2 days in PBS with 30% sucrose at 4°C for cryoprotection. After that, the tissue was cut with the freezing microtome (Leica) and stored in PBS with 30% sucrose at -20°C until used. It obtained coronal or sagittal serial slices according to the area of interest.

Throughout this thesis, the immunofluorescence was performed using two different techniques: Free-Floating and Slide-Mounted Sections. The main difference between these techniques is the part of

assembling the tissue. On one hand, in the Free-Floating the slices were assembling after all the process of treatment with the antibodies, the blocking solution... So this process is performed with the slices floating in the corresponding solution. On the other hand, in the Slide-Mounted Sections the slices were assembled and the treatment is added onto the slide with the slices.

Treatment of brain sections was the following: first, slices were washed three times in PBS containing 0.5% Triton X-100 solution (PBS-t), at room temperature. Sections were blocked for 1 hour with PBS-t containing 10% of normal goat serum (NGS). After that, the tissue was incubated with the different primary antibodies overnight at 4°C in the blocking solution. Afterward, sections were rinsed three times in PBS-t and then incubated for 2 hours in a solution of 10% NGS in PBS-t with the secondary antibody. Then, the slices were washed three times with PBS-t and incubated for 30 minutes with Hoechst (1:1000 in PBS) which is able to mark the DNA present in the cellular nuclei. Sequentially, the slices were washed three times with PBS and then, slides were covered with coverslips and stored at 4°C and in the dark for later viewing under the microscope. Finally, fluorescence detection was performed using the confocal fluorescence microscope FV1000 in the Central Service of Experimental Research (SCSIE) from the University of Valencia. Images obtained were analysed with the software ImageJ and its plug-in Fiji which allowed the quantification of the fluorescence intensity and different parameters of colocalization. These parameters were the percentage of colocalization that was calculated using the function Colocalization Threshold and the Pearson's correlation

coefficient was obtained with the scrip from Moser et al. (Moser, Hochreiter, Herbst, & Schmid, 2017).

The primary antibodies used in the immunofluorescence assays were: Phospho-Histone H2A.X (Ser139) (20E3) Rabbit mAb (9718, Cell Signaling Technology, 1:1000), p35/25 (C64B10) Rabbit mAb (2680, Cell Signaling Technology, 1:200), beta Galactosidase Monoclonal Antibody (S.394.9, ThermoFisher, 1:3200), DIABLO Monoclonal Antibody (SMAC 17 1-87, ThermoFisher, 1:200), Anti-Doublecortin antibody (ab18723, Abcam, 1:1000), GFAP Polyclonal Antibody (OPA1-06100, ThermoFisher, 1:200), mouse anti-polysialic acid-NCAM(PSA-NCAM) monoclonal antibody (MAB5324, Chemicon, 1:400), p-ATM (sc-47739, Santa Cruz Biotechnology, 1:500), Anti-Netrin 1 antibody [EPR5428] (ab126729, Abcam, 1:500), NeuN (D4G4O) XP® Rabbit mAb (24307, Cell Signaling Technology, 1:50). Meanwhile, the secondary antibodies were Anti-rabbit IgG (H+L), F(ab')<sub>2</sub> Fragment Alexa Fluor® 488 Conjugate (4412, CellSignaling Tech, 1:800), Anti-mouse IgG (H+L), F(ab')<sub>2</sub> Fragment Alexa Fluor® 647 Conjugate (4410, CellSignaling Tech, 1:800), Goat anti-Mouse IgG (H+L), Superclonal™ Recombinant Secondary Antibody Alexa Fluor 488 (A28175, Invitrogen, 1:800) and Goat pAb to Rb IgG Alexa Fluor 647 (ab150079, Abcam, 1:800).

## **Flow cytometry**

In order to obtain a specific and conscientious analysis of the cells from the V-SVZ was performed flow cytometry. This technique allows the

morphological and biochemical analysis of isolated cells using different fluorescence markers.

For cell, isolation mice were sacrificed by cervical dislocation and the V-SVZ was obtained. The tissue was disaggregated and incubated at 37°C for 35 minutes with EBSS medium enriched with papain, L-cysteine, and EDTA. After centrifugation for 5 minutes at 600G, the pellet was resuspended in DMEM/F12. Then, this cell suspension was filtered, the cells were counted with the Neubauer chamber and were used for determining mitochondrial hydrogen peroxide levels and cell cycle characterisation. For the mitochondrial hydrogen peroxide, the determination procedure was used the kit MitoPY1 (4428, TOCRIS), and for the cell cycle characterisation, was used the PI/RNASE Solution (Immunostep). Both were performed following the manufacturer's recommended protocol and in the service of flow cytometry provided by the Central Unit for Research in Medicine (UCIM) from the University of Valencia.

## **Optical and Electron Microscopy**

For the morphological and structural analysis of the V-SVZ was used optical and electron microscopy allows the study of the tissue without the use of a specific marker. As well as the immunofluorescence it is necessary the fixation the tissue, but in this case, the procedure is a little bit different.

In this case, mice also were sacrificed by Eutanax and perfused. However, in the perfusion were used 2% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde for the fixation, instead of 4% paraformaldehyde.

Brains were dissected out and postfixed in the same fix solution. Coronal 200  $\mu\text{m}$  sections were cut on a vibratome (Leica) and were incubated with 2% osmium for a second post-fixation, rinsed, dehydrated, and embedded in Durcupan resin (Sigma). From these slices were obtained semi-thin sections (1.5  $\mu\text{m}$ ) which were cut using an ultramicrotome (Leica) with a diamond knife (Histo, Diatome), and stained lightly with 1% toluidine blue to select the regions of interest. These stained slices were observed in the optical microscope at 40X and it was obtained images that were analysed with the software ImageJ to determine the area of the V-SVZ.

After this analysis, these semi-thin slices were used to obtain ultra-thin sections (0.08  $\mu\text{m}$ ) were cut using an ultramicrotome (Leica) with a diamond knife and stained with lead citrate (Reynolds solution). Images were obtained and examined under a transmission electron microscope using a digital camera. From these images, the V-SVZ of each animal were analysed and the cell types present were quantified with ImageJ software according to the classification established by Doetsch et al. (F Doetsch & Alvarez-Buylla, 1996).

## **Statistical analysis**

Results are expressed as mean values  $\pm$  SD, of at least three independent experiments. Generally, experiments were performed as duplicates, within each independent experiment. We used the Student's T-Test to compare two means in parametric samples. When we compared more than two means, we used the ANOVA test for

parametric samples. The null hypothesis was accepted at the level of  $p \leq 0.05$ .



## Results

### Morphological and structural studies of the V-SVZ

In order to study the structure of the V-SVZ we used coronal slices stained with toluidine blue from both WT and APP/PS1 mice. The slices were observed with the optical microscope focusing on the V-SVZ (Figure 18A). Using ImageJ software, we quantified the area of the interest region. We observed a significant increase of the V-SVZ area from APP/PS1 compared to WT mice (Figure 18B).

After that, we performed a study by electron microscopy which allowed us to analyse the ultrastructure level. On the basis of the V-SVZ cells classification described by Doetsch et al., we determined the percentage of each cellular type (F Doetsch & Alvarez-Buylla, 1996). Figure 19E, shows that the total number of cells was significantly higher in the transgenic mice compared to WT. The most significant increase was found in type A and C cells. Furthermore, APP/PS1 type A cells were disorganized, without extracellular matrix spaces needed for cell migration, and usually surrounded by big blood vessels (Figure 19B-D). In parallel, to confirm the accumulation of type A cells in V-SVZ from APP/PS1 mice we performed an immunolabelling with specific antibodies: DCX to label immaturity cells, and PSA-NCAM to label migrating neural progenitor cells. As expected, we obtained a significant increase of type A cells in the V-SVZ from APP/PS1 mice (Figure 20 and 21).

In order to determine the cause of the cell accumulation we studied the proliferative marker Ki67. However, we did not find any difference in the rate of proliferation between WT and APP/PS1 mice (Figure 22).

## Neural migration study

Then, we wondered if the cause of the cell accumulation could be a failure in the neural migration. For this propose, we studied the presence of migrating cells in the RMS and the levels of mature neurons in the olfactory bulbs in both animal models. We observed a reduction of 33 % in type A cells (DCX<sup>+</sup>/PSA-NCAM<sup>+</sup>) in the RMS from APP/PS1 compared with WT mice (Figure 23). We also observed that the number of mature neurons (NeuN<sup>+</sup>) in the olfactory bulbs decrease in the AD transgenic mouse model (Figure 24). This suggests that, the neural migration from V-SVZ to the olfactory bulb in the APP/PS1 mice decreased significantly.

Next, we measured the levels of Netrin-1, a neural guide important in the neural migration signalling mechanism. As we can see in figure 25, the levels of Netrin-1 were significantly higher in the APP/PS1 mice than in WT mice. Even though the neural migration signal was higher, the cells could not migrate, so we decided to study the number of astrocytes present in the V-SVZ. For this purpose, the astrocytic marker, GFAP, was quantified. We observed a significant decrease in the number of astrocytes in the V-SVZ from APP/PS1 mice compared to WT (Figure 26).

Finally, we wanted to know whether the impaired migration had consequences in behaviour. Using the odour discriminatory index we

showed that APP/PS1 mice present a serious olfactory deficiency compared with WT animals (Figure 27).

## Cell cycle study in type A cells

After demonstrating a failure of neural migration, we decided to analyse the possibility of intrinsic changes in the migrating cells. In isolated V-SVZ cells and by flow cytometry, we detected a significant increase in the levels of hydrogen peroxide produced in APP/PS1 mice (Figure 28). Then, we analysed the presence of DNA damage in these cells quantifying the levels of ATM and  $\gamma$ HA2X, two important DDR proteins. We observed an increase in the levels of both proteins in the V-SVZ from the transgenic model, specifically in type A cells (Figure 29 and 30).

Subsequently, we characterized the cell cycle in isolated V-SVZ cells from APP/PS1 and WT mice. We showed a decrease in the number of cells in S phase in APP/PS1 compared to controls, and an increase in the number of cells in G1 phase (Figure 31). We then set out to analyse the major regulator in the transition G1 $\rightarrow$ S; the E3 ubiquitin ligase APC/C-Cdh1 and some of its targets. The levels of the coactivator Cdh1 in the V-SVZ from transgenic mice increased significantly compared to WT mice (Figure 32). Meanwhile, the levels of its target's cyclin B1 and complex Cdk5/p35 were lower in APP/PS1 mice than in controls (Figure 33, 34 and 35).

## Senescence and apoptosis in the V-SVZ from APP/PS1 mice

The above mentioned results indicate that type A cells could suffer a cell cycle arrest due to DNA damage. So that, we decided to study as senescence as apoptosis in the V-SVZ from APP/PS1 mice.

Firstly, senescence was analysed determining the levels of two important markers of this process:  $\beta$ -galactosidase and p16. In both cases their levels increased in the V-SVZ from APP/PS1 compared to WT, indicating the presence of senescence in this region (Figure 36 and 37). Then, we wanted to clarify which type of cell present in the V-SVZ is in a senescent state. For this purpose, we performed two double immunofluorescence labelling:  $\beta$ -galactosidase-DCX (type A cells labelling) and  $\beta$ -galactosidase-GFAP (astrocyte labelling). We showed a statically significant increase of DCX<sup>+</sup>- $\beta$ -galactosidase<sup>+</sup> in APP/PS1 mice (Figure 38); there was no differences in the expression of this senescence marker in astrocytes (Figure 39).

To study apoptosis, we quantified the levels of Smac/DIABLO protein and no significant differences were found among experimental groups (Figure 40). Next, we analysed possible differences in apoptosis specifically in type A cells and astrocytes. We did not find significant changes in the number of apoptotic type A cells in APP/PS1 mice compared to WT (Figure 41). However, the number of apoptotic astrocytes was higher in the V-SVZ from APP/PS1 mice than in WT mice (Figure 42).

## Discussion

The V-SVZ is the niche with the highest neurogenic capacity in the adult mammalian brain. Both neurons and oligodendrocytes are generated from this niche. In the animal models studied and under physiological conditions, the destination of the new neurons is mainly the olfactory bulb. In order to reach this region, neuroblasts migrate through the RMS in a highly regulated process (Lim & Alvarez-Buylla, 2016). The ability of the V-SVZ to provide relief by generating new neurons and oligodendrocytes in response to brain damage has also been established (Cayre et al., 2013).

In AD, a serie of cascades of toxicity occur early on, even before cognitive symptoms develop (Jack et al., 2010). In the face of this damage, it is important to study the regenerative capacity of neurogenic niches. In this regard, many studies have focused on the study of the SGZ because of its relationship with the hippocampus and memory loss (Babcock, Page, Fallon, & Webb, 2021; Berger, Lee, Young, Aarsland, & Thuret, 2020; Moreno-Jiménez et al., 2019; Tobin et al., 2019). However, even though V-SVZ has a higher proliferative capacity, the literature is scarce and inconclusive. Moreover, one of the first symptoms to appear in patients is olfactory loss (Devanand et al., 2000; Wesson et al., 2010) and the role of V-SVZ in this may be key.

Therefore, the aim of this doctoral thesis was to determine whether or not V-SVZ maintains its neurogenic capacity in AD. For this purpose, the APP/PS1 double transgenic mouse has been used as a model of AD, which is mainly characterised by the overexpression and excessive

processing of the APP protein and the consequent formation of A $\beta$  peptide and amyloid plaques (Jankowsky et al., 2004; Shen et al., 2018).

Previous studies have determined that the presence of A $\beta$  peptide alone causes a decrease in neurogenesis in both the V-SVZ and SGZ of the brain of adult mice (Haughey, Liu, et al., 2002; Haughey, Nath, et al., 2002). Furthermore, this same decrease has also been determined in transgenic models such as 3xTg, 5xFAD or this one; as well as in AD patients (Moon et al., 2014; Pan et al., 2016; Rodriguez et al., 2009; Tang et al., 2009). However, the cause of this decline has so far not been clearly determined. One of the reasons is that it is multifactorial, because many of the molecules involved in the process of neurogenesis also play a key role in the pathophysiology of AD, including the APP protein. Furthermore, the adverse environment caused by AD is capable of causing damage to neurogenic niches, thus affecting the process of proliferation and differentiation (Fainstein, Dan-Goor, & Ben-Hur, 2018).

First, our results show an increase in V-SVZ volume in APP/PS1 mice, which could indicate increased proliferation (Boekhoorn et al., 2006; Jin et al., 2004; Taupin, 2010). However, after determining the levels of the proliferation marker Ki67, we observed that there were no differences in the levels of this protein compared to the control. This contrasts with reports from other authors who have established a decrease in proliferation in this same model (Tang et al., 2009). Thus, we decided to study the reason for this cellular accumulation in the V-SVZ in more depth.

We used electron microscopy and immunofluorescence and we were able to determine that the cells that increased in number in the V-SVZ of APP/PS1 mice were migratory, i.e. type A cells. Furthermore, the decrease of these type A cells along the RMS, the decrease of mature neurons in the OB and the loss of olfactory discrimination already point to a failure in the migratory capacity of these cells. These results are in line with recent findings by Scopa et al. who also found a failure of OB neurogenesis and an increase of neuroblasts in the V-SVZ induced by the presence of A $\beta$  peptide oligomers (Scopa et al., 2020). Likewise, decreased olfactory ability in transgenic had already been observed in other groups, as well as in AD patients in the early stages of the disease (Devanand et al., 2000; Velayudhan, Pritchard, Powell, Proitsi, & Lovestone, 2013; Yu et al., 2018). This failure in V-SVZ/OB neurogenesis could contribute to the anosmia observed in AD.

One of the most important signals for V-SVZ/OB neural migration is Netrin. This chemotropic protein seems to act mainly in situations of damage as a recruitment signal for the repair of damaged areas (Cayre et al., 2013). However, in our murine model of AD, Netrin-1 is significantly upregulated. This can be interpreted in two ways: either as a compensatory mechanism for the lack of migration, or as a failure of Netrin-1 function. Several studies have shown that the mechanism of action of Netrin-1 is through binding to the APP protein and the DCC receptor; this binding leads to activation of the GSK3 $\beta$ /Cdk5 pathway involved in migration (Ayala et al., 2007; Borel et al., 2017; Lourenço et al., 2009). Therefore, it could be deduced that in a model where the APP protein is actively degraded for A $\beta$  peptide generation, Netrin-1

cannot perform its migration activation function due to the depletion of the intact APP receptor. These same Netrin-1/APP binding characterisation studies propose that Netrin-1/APP binding may act to inhibit A $\beta$  peptide generation (Borel et al., 2017; Lourenço et al., 2009). Therefore, its excess could be explained by its failure to perform its function properly.

But despite an increase in the migratory signal these cells are not able to migrate. This dysfunction can be explained by DNA damage. This damage triggers the activation of a mechanism aimed at repairing the damage: the DDR, which is one of the most important indicators of DNA integrity. This mechanism, in the case of cells involved in neurogenesis, is mainly composed of ATM proteins (Kieroń, Żekanowski, Falk, & Wężyk, 2019). Upon DNA double-strand breakage, ATM phosphorylation occurs, which involves its activation, leading to phosphorylation of histone  $\gamma$ H2AX (Burma, Chen, Murphy, Kurimasa, & Chen, 2001; Sedelnikova, Pilch, Redon, & Bonner, 2003). In the V-SVZ of our model we observed an increase of both ATM and  $\gamma$ H2AX in its phosphorylated form. Indeed, the expression of both occurs in type A cells (DCX<sup>+</sup>/PSA-NCAM<sup>+</sup>). Therefore, it can be concluded that these cells show DNA damage.

There are different factors that can cause DNA damage, one of the most studied is oxidative stress generated by ROS (Cooke, Evans, Dizdaroglu, & Lunec, 2003). This situation has been highly described as a consequence of the presence of both A $\beta$  peptide and amyloid plaques (Lloret et al., 2008). In parallel, A $\beta$  peptide can also cause DNA damage directly (Suberbielle et al., 2013). Therefore, the DNA damage



observed in neural progenitor cells may have been induced by both ROS and A $\beta$  or by a synergistic action of both factors.

Furthermore, the important role of oxidative stress in both AD (Huang, Zhang, & Chen, 2016) and neurogenesis (Yuan, Gu, Shan, Machado, & Arias-Carrión, 2015) is noteworthy. As suggested by Kieron et al. 2019, many authors advocate the effect of oxidative stress-induced DNA damage on adult neurogenesis in AD patients (Kieroń et al., 2019). DDR is highly efficient in these cells, which may result in their progeny being extremely sensitive to the effect of oxidative stress (L Schneider, Fumagalli, & Fagagna, 2012; Leonid Schneider, 2014). Indeed, some studies have shown a time-dependent neuronal differentiation mediated by ATM regulation. Therefore, it is suggested that a specific DDR is required for proper proliferation and differentiation to occur (Kieroń et al., 2019). In fact, this DNA damage and the corresponding DDR triggers cell cycle arrest, to prevent the DNA damage from being passed on to the offspring. This arrest occurs in both the G1 and G2 phases of the cell cycle (Dasika et al., 2000).

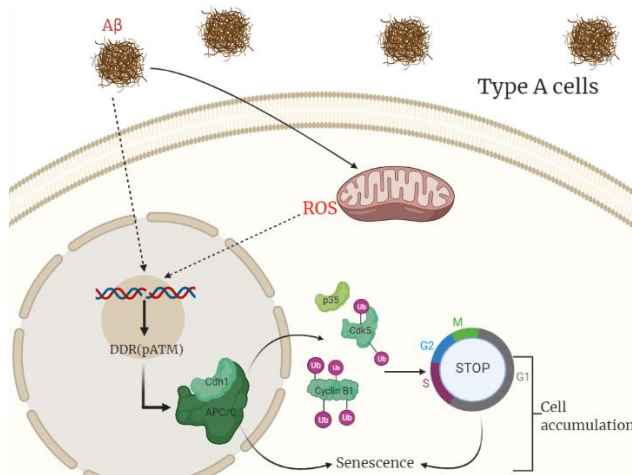
One of the main regulators of the cell cycle is the E3 ubiquitin ligase APC/C. The activity of this complex is regulated by the coactivators Cdh1 and Cdc20 (Visintin, Prinz, & Amon, 1997). APC/C is kept inactive prior to mitosis, allowing the accumulation of various proteins necessary for cell cycle progression. Once APC/C is activated by binding to either Cdh1 or Cdc20, it carries out ubiquitination of various regulators that promote cell cycle progression, for subsequent removal by the proteasome (King, Glotzer, & Kirschner, 1996).

Under physiological conditions, the activation of APC/C by Cdh1 and Cdc20 occurs sequentially depending on the cell cycle stage. On the one hand, APC/C-Cdc20 is activated by Cdk1-cyclin B1, and in turn APC/C-Cdc20 is able to inhibit the Cdk1-cyclin B1 complex when it reaches a critical threshold, thus triggering a feedback mechanism. This activation occurs just as the cell enters the mitosis phase and is maintained during the metaphase-anaphase transition and at the exit from mitosis, thus allowing mitosis and genome division to occur efficiently (Alfieri, Zhang, & Barford, 2017; Lara-Gonzalez, Kim, & Desai, 2017). On the other hand, the activation of APC/C by Cdh1 takes place just as the cell exits mitosis and is maintained throughout the G1 phase (Peters, 1999). This complex is primarily responsible for inhibiting mitotic cyclins and progression to S-phase until a decision has been made as to whether the cell proceeds to division in the absence of failure (Pines, 2011).

In addition, APC/C-Cdh1 has also been found to be involved in DDR, with the aim of preventing cell cycle progression and the transmission of this damage to daughter cells (de Boer, Guerrero Llobet, & van Vugt, 2016). Indeed, in the V-SVZ of transgenic animals, we observed both an increase in Cdh1 and a decrease in its targets: cyclin B1 and the Cdk5/p35 complex. Therefore, it can be deduced that the neural migratory cells present in the V-SVZ of APP/PS1 mice suffer DNA damage that would result in cell cycle arrest via APC/C-Cdh1. Furthermore, this deduction is reinforced by cell cycle characterisation of V-SVZ cells showing a significant decrease in S-phase cells and an increase in G1-phase cells in the APP/PS1 transgenic model.

The cell cycle arrest caused by DNA damage is aimed at activating the DNA repair mechanism so that, once repaired, the cell cycle can continue. However, when this damage occurs chronically and the cell has not been able to repair it, there are two main options: cell death by apoptosis or remaining in a state of quiescence, i.e. senescence. In fact, it has been observed that DDR causes the degradation of the main histone H3K9 dimethyltransferases (G9a and GLP), through the activation of APC/C-Cdh1. This global decrease in H3K9 dimethylation leads to the induction of senescence associated secretory proteins (SASP) factors such as IL-6. Therefore, the ability of DDR to induce senescence through epigenetic changes is demonstrated (A. Takahashi et al., 2012). Thus, markers of DNA damage such as phosphorylation of histone  $\gamma$ H2AX are also considered markers of senescence (Z. Y. He et al., 2016).

In addition, senescent cells present specific characteristics such as overexpression of SA $\beta$ Gal and tumour suppressor proteins such as p16, among other peculiarities (Muñoz-Espín & Serrano, 2014). In our work, we observed an increase of both SA $\beta$ Gal and p16 in the V-SVZ neural migratory cells of our model. Therefore, the relationship between DDR and senescence, mentioned previously, seems clear. This senescent state in the type A cells of the V-SVZ would cause them to be unable to migrate and proliferate; and therefore, they would accumulate in this brain region, as they would remain in a quiescent state but with their vital activities maintained (Muñoz-Espín & Serrano, 2014). The following image shows the mechanism that would occur in this type of cells in the murine model of AD, APP/PS1.



**Figure. Schematic of the proposed mechanism of the effect of Aβ peptide on V-SVZ.** Created by BioRender.com

In parallel, we observed that astrocytes present in the V-SVZ of transgenic mice preferentially enter a process of cell death by apoptosis. This process was determined by the levels of the IAP inhibitor Smac/DIABLO. This protein is released in parallel to cytochrome C from the mitochondria into the cytoplasm during the intrinsic pathway of apoptosis (Fulda & Debatin, 2006). Therefore, we find that both senescence and apoptosis occur in the V-SVZ of APP/PS1 mice depending on the cell type. Thus, on the one hand, type A cells are in senescence while astrocytes are apoptotic. This difference in the type of cell death was also observed by Schneider et al. who obtained similar results. Their results show that DNA damage in NPCs leads to cell senescence and differentiation to astrocytes is promoted through ATM (Leonid Schneider et al., 2013). Furthermore, these differentiated astrocytes appear to be more sensitive and may enter apoptosis (Leonid Schneider, 2014). It is also worth mentioning the importance

of astrocytes in the neural migration process by acting as a support for migrating cells (Zhan et al., 2017).

Finally, from all the results obtained, it can be concluded that the presence of aggressive factors such as A $\beta$  and ROS in the V-SVZ of the murine APP/PS1 model of AD , cause A-type cells to enter senescence and lose their ability to migrate along the RMS until they reach the olfactory bulbs. This loss of migration contributes to changes in the V-SVZ itself and also appears to contribute to a failure of olfactory bulb regeneration and thus olfactory capacity.

## Conclusions

1. There is an accumulation of type A migrating cells and an increase in type C cells in the V-SVZ of APP/PS1 mice
2. In the Alzheimer's disease model, there are fewer migrating cells along the RMS, but increased levels of the migration signal Netrin-1 in the V-SVZ.
3. The number of mature neurons in the olfactory bulbs of APP/PS1 mice decreases, as does their capacity for olfactory discrimination.
4. APP/PS1 mice generate more free radicals in their V-SVZ and the accumulated migrating cells show ATM- and  $\gamma$ H2AX-mediated DNA damage.
5. The accumulated migrating cells in the V-SVZ show an increase in Cdh1, a decrease in cyclin B1 and Cdk5/p35. Also, there are fewer cells in S phase of the cell cycle in APP/PS1 mice.
6. The accumulated migrating cells are mainly in a senescent state. In addition, there is an increased rate of apoptosis astrocytes in the V-SVZ area

# BIBLIOGRAFÍA





## 7. Bibliografía

- Abrous, D. N., Koehl, M., & Le Moal, M. (2005, April). Adult neurogenesis: From precursors to network and physiology. *Physiological Reviews*, Vol. 85, pp. 523–569.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.00055.2003>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2008). Molecular biology of the cell, 5th edition. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 36(4), 317–318.  
<https://doi.org/10.1002/BMB.20192>
- Alfieri, C., Zhang, S., & Barford, D. (2017). Visualizing the complex functions and mechanisms of the anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C). *Open Biology*, 7, 170204.  
<https://doi.org/10.1098/rsob.170204>
- Altman, J. (1962). Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science*, 135(3509), 1127–1128.  
<https://doi.org/10.1126/science.135.3509.1127>
- Altman, J. (1963). Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. *The Anatomical Record*, 145(4), 573–591. <https://doi.org/10.1002/ar.1091450409>
- Altman, J., & Das, G. D. (1966). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special

reference to postnatal neurogenesis in some brain regions.

*Journal of Comparative Neurology*, 126(3), 337–389.

<https://doi.org/10.1002/cne.901260302>

Alvarez-Buylla, A., & Garcia-Verdugo, J. M. (2002). Neurogenesis in adult subventricular zone. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(3), 629–634.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-03-00629.2002>

Alvarez-Buylla, A., & García-Verdugo, J. M. (2002, February 1).

Neurogenesis in adult subventricular zone. *Journal of Neuroscience*, Vol. 22, pp. 629–634.

<https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-03-00629.2002>

Alvarez-Buylla, A., & Lim, D. A. (2004, March 4). For the long run: Maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron*, Vol. 41, pp. 683–686. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(04\)00111-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(04)00111-4)

Alvarez-Buylla, A., & Nottebohm, F. (1988). Migration of young neurons in adult avian brain. *Nature*, 335(6188), 353–354.

<https://doi.org/10.1038/335353a0>

Alzheimer's Association. (2021). 2021 Alzheimer's disease facts and figures special report Race, Ethnicity and Alzheimer's in America. *Alzheimer's & Dementia : The Journal of the Alzheimer's Association*, 17(3), 327–406.

Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Undefined*.

Alzheimer, A. (1911). über eigenartige Krankheitsfälle des späteren

- Alters. *Zeitschrift Für Die Gesamte Neurologie Und Psychiatrie*, 4(1), 356–385. <https://doi.org/10.1007/BF02866241>
- Armstrong, R. A. (2009). The molecular biology of senile plaques and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Folia Neuropathologica*, 47(4), 289–299.
- Astic, L., Pellier-Monnin, V., Saucier, D., Charrier, C., & Mehlen, P. (2002). Expression of netrin-1 and netrin-1 receptor, DCC, in the rat olfactory nerve pathway during development and axonal regeneration. *Neuroscience*, 109(4), 643–656. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(01\)00535-8](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(01)00535-8)
- Atwood, C. S., Martins, R. N., Smith, M. A., & Perry, G. (2002, July 1). Senile plaque composition and posttranslational modification of amyloid- $\beta$  peptide and associated proteins. *Peptides*, Vol. 23, pp. 1343–1350. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(02\)00070-0](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(02)00070-0)
- Ayala, R., Shu, T., & Tsai, L.-H. (2007). Trekking across the brain: the journey of neuronal migration. *Cell*, 128(1), 29–43. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.12.021>
- Babcock, K. R., Page, J. S., Fallon, J. R., & Webb, A. E. (2021). Adult Hippocampal Neurogenesis in Aging and Alzheimer's Disease. *Stem Cell Reports*, 16(4), 681–693. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.01.019>
- Ballatore, C., Lee, V. M. Y., & Trojanowski, J. Q. (2007). Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related

disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(9), 663–672.

<https://doi.org/10.1038/nrn2194>

Baratchi, S., Evans, J., Tate, W. P., Abraham, W. C., & Connor, B.

(2012). Secreted amyloid precursor proteins promote proliferation and glial differentiation of adult hippocampal neural progenitor cells. *Hippocampus*, 22(7), 1517–1527.

<https://doi.org/10.1002/hipo.20988>

Barnum, K. J., & O’Connell, M. J. (2014). Cell Cycle Regulation by

Checkpoints. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1170,

29. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0888-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0888-2_2)

Bateman, R. J., Aisen, P. S., De Strooper, B., Fox, N. C., Lemere, C. A.,

Ringman, J. M., ... Xiong, C. (2011). Autosomal-dominant Alzheimer’s disease: A review and proposal for the prevention of Alzheimer’s disease. *Alzheimer’s Research and Therapy*, Vol. 2, p. 1.

<https://doi.org/10.1186/alzrt59>

Bédard, A., Cossette, M., Lévesque, M., & Parent, A. (2002).

Proliferating cells can differentiate into neurons in the striatum of normal adult monkey. *Neuroscience Letters*, 328(3), 213–216.

[https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(02\)00530-X](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(02)00530-X)

Beffert, U., Weeber, E. J., Morfini, G., Ko, J., Brady, S. T., Tsai, L., ...

Herz, J. (2004). *Reelin and Cyclin-Dependent Kinase 5-Dependent Signals Cooperate in Regulating Neuronal Migration and Synaptic Transmission*. 24(8), 1897–1906.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4084-03.2004>

- Bejanin, A., Schonhaut, D. R., La Joie, R., Kramer, J. H., Baker, S. L., Sosa, N., ... Rabinovici, G. D. (2017). Tau pathology and neurodegeneration contribute to cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Brain*, *140*(12), 3286–3300.  
<https://doi.org/10.1093/brain/awx243>
- Bekiari, C., Giannakopoulou, A., Siskos, N., Grivas, I., Tsingotjidou, A., Michaloudi, H., & Papadopoulos, G. C. (2015). Neurogenesis in the septal and temporal part of the adult rat dentate gyrus. *Hippocampus*, *25*(4), 511–523.  
<https://doi.org/10.1002/hipo.22388>
- Bellion, A., Baudoin, J. P., Alvarez, C., Bornens, M., & Métin, C. (2005). Nucleokinesis in tangentially migrating neurons comprises two alternating phases: Forward migration of the Golgi/centrosome associated with centrosome splitting and myosin contraction at the rear. *Journal of Neuroscience*, *25*(24), 5691–5699.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1030-05.2005>
- Berger, T., Lee, H., Young, A. H., Aarsland, D., & Thuret, S. (2020). Adult Hippocampal Neurogenesis in Major Depressive Disorder and Alzheimer's Disease. *Trends in Molecular Medicine*, *26*(9), 803–818. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2020.03.010>
- Bergmann, O., Liebl, J., Bernard, S., Alkass, K., Yeung, M. S. Y., Steier, P., ... Frisé, J. (2012). The Age of Olfactory Bulb Neurons in Humans. *Neuron*, *74*, 634–639.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.030>
- Bero, A., Yan, P., Hoon Roh, J., Cirrito, J. R., Stewart, F. R., Raichle, M.

- E., ... Holtzman, D. M. (2011). Neuronal activity regulates the regional vulnerability to amyloid- $\beta$  deposition. *Nature Neuroscience*, 14(6), 750–756.  
<https://doi.org/10.1038/nn.2801>. Neuronal
- Besson, A., Dowdy, S. F., & Roberts, J. M. (2008). CDK Inhibitors: Cell Cycle Regulators and Beyond. *Developmental Cell*, 14(2), 159–169. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.01.013>
- Beurel, E., Grieco, S. F., & Jope, R. S. (2015). Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): Regulation, actions, and diseases. *Pharmacology and Therapeutics*, Vol. 148, pp. 114–131.  
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.11.016>
- Bhardwaj, R. D., Curtis, M. A., Spalding, K. L., Buchholz, B. A., Fink, D., Björk-Eriksson, T., ... Frisén, J. (2006). Neocortical neurogenesis in humans is restricted to development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(33), 12564–12568.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0605177103>
- Binder, L. I., Guillozet-Bongaarts, A. L., Garcia-Sierra, F., & Berry, R. W. (2005). Tau, tangles, and Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1739(2), 216–223.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2004.08.014>
- Bock, H. H., Jossin, Y., Liu, P., Förster, E., May, P., Goffinet, A. M., ... May, P. (2003). *Mechanisms of Signal Transduction : Phosphatidylinositol 3-Kinase Interacts with the Adaptor Protein Dab1 in Response to Reelin Signaling and Is Required for Normal*

*Cortical Lamination Phosphatidylinositol 3-Kinase Interacts with the Adaptor Protein Dab1* .

<https://doi.org/10.1074/jbc.M306416200>

Boekhoorn, K., Joels, M., & Lucassen, P. J. (2006). Increased proliferation reflects glial and vascular-associated changes, but not neurogenesis in the presenile Alzheimer hippocampus.

*Neurobiology of Disease*, 24(1), 1–14.

<https://doi.org/10.1016/J.NBD.2006.04.017>

Bolteus, A. J., & Bordey, A. (2004). GABA release and uptake regulate neuronal precursor migration in the postnatal subventricular zone. *Journal of Neuroscience*, 24(35), 7623–7631.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1999-04.2004>

Bonaguidi, M. A., Wheeler, M. A., Shapiro, J. S., Stadel, R. P., Sun, G. J., Ming, G. L., & Song, H. (2011). In vivo clonal analysis reveals self-renewing and multipotent adult neural stem cell characteristics. *Cell*, 145(7), 1142–1155.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.05.024>

Bond, A. M., Ming, G. L., & Song, H. (2015). Adult Mammalian Neural Stem Cells and Neurogenesis: Five Decades Later. *Cell Stem Cell*, Vol. 17, pp. 385–395.

<https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.09.003>

Borel, F., Marzocca, F., Delcros, J. G., Rama, N., Mehlen, P., & Ferrer, J. L. (2017). Molecular characterization of Netrin-1 and APP receptor binding: New leads to block the progression of senile plaques in Alzheimer's disease. *Biochemical and Biophysical*

- Research Communications*, 488(3), 466–470.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.05.056>
- Braak, H., & Braak, E. (1995). Staging of Alzheimer's Disease-Related Neurofibrillary Changes. *Neurobiology of Aging*, 16(3), 271–284.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-030-29676-6\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-030-29676-6_8)
- Burma, S., Chen, B. P., Murphy, M., Kurimasa, A., & Chen, D. J. (2001). ATM Phosphorylates Histone H2AX in Response to DNA Double-strand Breaks. *Journal of Biological Chemistry*, 276(45), 42462–42467. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100466200>
- Butterfield, D. A., & Halliwell, B. (2019, March 1). Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease. *Nature Reviews Neuroscience*, Vol. 20, pp. 148–160.  
<https://doi.org/10.1038/s41583-019-0132-6>
- Caillé, I., Allinquant, B., Dupont, E., Bouillot, C., Langer, A., Müller, U., & Prochiantz, A. (2004). Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone. *Development (Cambridge, England)*, 131(9), 2173–2181. <https://doi.org/10.1242/dev.01103>
- Calaora, V., Chazal, G., Nielsen, P. J., Rougon, G., & Moreau, H. (1996). mCD24 expression in the developing mouse brain and in zones of secondary neurogenesis in the adult. *Neuroscience*, 73(2), 581–594. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(96\)00042-5](https://doi.org/10.1016/0306-4522(96)00042-5)
- Calzolari, F., Michel, J., Baumgart, E. V., Theis, F., Götz, M., & Ninkovic, J. (2015). Fast clonal expansion and limited neural



- stem cell self-renewal in the adult subependymal zone. *Nature Publishing Group*, 18(4). <https://doi.org/10.1038/nn.3963>
- Capela, A., & Temple, S. (2002). LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal. *Neuron*, 35(5), 865–875. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00835-8](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00835-8)
- Carrillo-Mora, P., Luna, R., & Colín-Barenque, L. (2014). Amyloid beta: Multiple mechanisms of toxicity and only some protective effects? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/795375>
- Cayre, M., Bancila, M., Virard, I., Borges, A., & Durbec, P. (2006). *Migrating and myelinating potential of subventricular zone neural progenitor cells in white matter tracts of the adult rodent brain*. 31, 748–758. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2006.01.004>
- Cayre, M., Canoll, P., & Goldman, J. E. (2010). *Cell migration in the normal and pathological postnatal mammalian brain*. 88(1), 41–63. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2009.02.001>.Cell
- Cayre, M., Courtès, S., Martineau, F., Giordano, M., Arnaud, K., Zamaron, A., & Durbec, P. (2013). Netrin 1 contributes to vascular remodeling in the subventricular zone and promotes progenitor emigration after demyelination. *Development (Cambridge, England)*, 140, 3107–3117. <https://doi.org/10.1242/dev.013623>
- Chaker, Z., Codega, P., & Doetsch, F. (2016, November 1). A mosaic

world: puzzles revealed by adult neural stem cell heterogeneity. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, Vol. 5, pp. 640–658. <https://doi.org/10.1002/wdev.248>

Cheffer, A., Tárnok, A., & Ulrich, H. (2013). Cell Cycle Regulation During Neurogenesis in the Embryonic and Adult Brain. *Stem Cell Reviews and Reports*, 9(6), 794–805. <https://doi.org/10.1007/S12015-013-9460-5>

Cheignon, C., Tomas, M., Bonnefont-Rousselot, D., Faller, P., Hureau, C., & Collin, F. (2018, April 1). Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer’s disease. *Redox Biology*, Vol. 14, pp. 450–464. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.10.014>

Chew, H., Solomon, V. A., & Fonteh, A. N. (2020, June 9). Involvement of Lipids in Alzheimer’s Disease Pathology and Potential Therapies. *Frontiers in Physiology*, Vol. 11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00598>

Chiasson, B. J., Tropepe, V., Morshead, C. M., & Van Der Kooy, D. (1999). Adult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics. *Journal of Neuroscience*, 19(11), 4462–4471. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-11-04462.1999>

Chicas, A., Wang, X., Zhang, C., McCurrach, M., Zhao, Z., Mert, O., ... Lowe, S. W. (2010). Dissecting the unique role of the retinoblastoma tumor suppressor during cellular senescence. *Cancer Cell*, 17(4), 376.

<https://doi.org/10.1016/J.CCR.2010.01.023>

Chuang, T. T. (2010, October 1). Neurogenesis in mouse models of Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, Vol. 1802, pp. 872–880.

<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.12.008>

Coller, H. A., Sang, L., & Roberts, J. M. (2006). *A New Description of Cellular Quiescence*. 4(3).

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040083>

Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., & Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*, 17(10), 1195–1214.

<https://doi.org/10.1096/FJ.02-0752REV>

Cooper, G. M., & Hausman, R. E. (2013). *THE CELL*.

Copani, A., Caraci, F., Hoozemans, J. J. M., Calafiore, M., Angela Sortino, M., & Nicoletti, F. (2007). The nature of the cell cycle in neurons: Focus on a “non-canonical” pathway of DNA replication causally related to death. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1772(4), 409–412.

<https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2006.10.016>

Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A., & Campisi, J. (2010). The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annual Review of Pathology*, 5, 99.

<https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PATHOL-121808-102144>

Cornutiu, G. (2015). The Epidemiological Scale of Alzheimer's Disease.

*Journal of Clinical Medicine Research*, 7(9), 657–666.

<https://doi.org/10.14740/jocmr2106w>

Curtis, M. A., Kam, M., & Faull, R. L. M. (2011). Neurogenesis in humans. *European Journal of Neuroscience*, 33(6), 1170–1174.

<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07616.x>

Curtis, M. A., Kam, M., Nannmark, U., Anderson, M. F., Axell, M. Z., Wikkelsø, C., ... Eriksson, P. S. (2007). Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension. *Science*, 315(5816), 1243–1249.

<https://doi.org/10.1126/science.1136281>

DaRocha-Souto, B., Coma, M., Pérez-Nievas, B. G., Scotton, T. C., Siao, M., Sánchez-Ferrer, P., ... Gómez-Isla, T. (2012). Activation of glycogen synthase kinase-3 beta mediates  $\beta$ -amyloid induced neuritic damage in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, 45(1), 425. <https://doi.org/10.1016/J.NBD.2011.09.002>

Dasika, G. K., Lin, S.-C. J., Zhao, S., Sung, P., Tomkinson, A., & Lee, E. Y.-H. P. (2000). DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis.

*Oncogene* 1999 18:55, 18(55), 7883–7899.

<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203283>

Davalli, P., Mitic, T., Caporali, A., Lauriola, A., & D'Arca, D. (2016). ROS, Cell Senescence, and Novel Molecular Mechanisms in Aging and Age-Related Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016.

<https://doi.org/10.1155/2016/3565127>

- Dayar, A. G., Cleaver, K. M., Abouantoun, T., & Cameron, H. A. (2005). New GABAergic interneurons in the adult neocortex and striatum are generated from different precursors. *Journal of Cell Biology*, 168(3), 415–427. <https://doi.org/10.1083/jcb.200407053>
- de Boer, H. R., Guerrero Llobet, S., & van Vugt, M. A. T. M. (2016). Controlling the response to DNA damage by the APC/C-Cdh1. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 73(5), 949–960. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2096-7>
- De Chevigny, A., Coré, N., Follert, P., Gaudin, M., Barbry, P., Béclin, C., & Cremer, H. (2012). MiR-7a regulation of Pax6 controls spatial origin of forebrain dopaminergic neurons. *Nature Neuroscience*, 15(8), 1120–1126. <https://doi.org/10.1038/nn.3142>
- Deng, Y., Wang, Z., Wang, R., Zhang, X., Zhang, S., Wu, Y., ... Song, W. (2013). Amyloid- $\beta$  protein (A $\beta$ ) Glu11 is the major  $\beta$ -secretase site of  $\beta$ -site amyloid- $\beta$  precursor protein-cleaving enzyme 1 (BACE1), and shifting the cleavage site to A $\beta$  Asp1 contributes to Alzheimer pathogenesis. *European Journal of Neuroscience*, 37(12), 1962–1969. <https://doi.org/10.1111/ejn.12235>
- Devanand, D. P., Michaels-Marston, K. S., Liu, X., Pelton, G. H., Padilla, M., Marder, K., ... Mayeux, R. (2000). Olfactory deficits in patients with mild cognitive impairment predict Alzheimer's disease at follow-up. *American Journal of Psychiatry*, 157(9), 1399–1405. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.157.9.1399>
- Doetsch, F., Caille, I., Lim, D. A., Garcia-Verdugo, J. M., & Alvarez-

- Buylla, A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*, 97(6), 703–716.  
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80783-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80783-7)
- Doetsch, Fiona, & 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(25), 14895–14900.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.93.25.14895>
- Doetsch, Fiona, García-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, A. (1997). Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *Journal of Neuroscience*, 17(13), 5046–5061.  
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.17-13-05046.1997>
- Doetsch, Fiona, García-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, A. (1997). *Cellular Composition and Three-Dimensional Organization of the Subventricular Germinal Zone in the Adult Mammalian Brain*. 17(13), 5046–5061. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-13-05046.1997>
- Doetsch, Fiona, Petreanu, L., Caille, I., García-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, A. (2002). EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron*, 36(6), 1021–1034.  
[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)01133-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)01133-9)
- Dubois, B., Hampel, H., Feldman, H. H., Scheltens, P., Aisen, P., Andrieu, S., ... Jack, C. R. (2016, March 1). Preclinical Alzheimer's

- disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria. *Alzheimer's and Dementia*, Vol. 12, pp. 292–323.  
<https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.02.002>
- Duyckaerts, C., Delatour, B., & Potier, M. C. (2009, April 21). Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathologica*, Vol. 118, pp. 5–36.  
<https://doi.org/10.1007/s00401-009-0532-1>
- Eckenhoff, M. F., & Rakic, P. (1988). Nature and Fate of Proliferative Cells in the Hippocampal Dentate Gyrus During the Life Span of the Rhesus Monkey. In *The Journal of Neuroscience* (Vol. 8).
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495.  
<https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A. M., Nordborg, C., Peterson, D. A., & Gage, F. H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Medicine*, 4(11), 1313–1317. <https://doi.org/10.1038/3305>
- Ermak, G., Harris, C. D., Battocchio, D., & Davies, K. J. A. (2006). RCAN1 (DSCR1 or Adapt78) stimulates expression of GSK-3 $\beta$ . *FEBS Journal*, 273(10), 2100–2109.  
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05217.x>
- Ernst, A., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Perl, S., Tisdale, J., ... Frisén, J. (2014). Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell*, 156(5), 1072–1083.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.044>

Fainstein, N., Dan-Goor, N., & Ben-Hur, T. (2018). Resident brain neural precursor cells develop age-dependent loss of therapeutic functions in Alzheimer's mice. *Neurobiology of Aging*, 72, 40–52.

<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2018.07.020>

FDA. (2021). FDA Grants Accelerated Approval for Alzheimer's Drug | FDA. Retrieved June 19, 2021, from <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-grants-accelerated-approval-alzheimers-drug>

Fernando, R. N., Eleuteri, B., Abdelhady, S., Nussenzweig, A., Andäng, M., & Ernfors, P. (2011). Cell cycle restriction by histone H2AX limits proliferation of adult neural stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(14), 5837–5842. <https://doi.org/10.1073/pnas.1014993108>

Finder, V. H., & Glockshuber, R. (2007, April). Amyloid- $\beta$  aggregation. *Neurodegenerative Diseases*, Vol. 4, pp. 13–27.

<https://doi.org/10.1159/000100355>

Font, E., García-Verdugo, J. M., Alcántara, S., & López-García, C. (1991). Neuron regeneration reverses 3-acetylpyridine-induced cell loss in the cerebral cortex of adult lizards. *Brain Research*, 551(1–2), 230–235. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)90937-Q](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)90937-Q)

Fowler, C. D., Liu, Y., Ouimet, C., & Wang, Z. (2002). The effects of



social environment on adult neurogenesis in the female prairie vole. *Journal of Neurobiology*, 51(2), 115–128.

<https://doi.org/10.1002/neu.10042>

Francis, F., Koulakoff, A., Boucher, D., Chafey, P., Schaar, B., Vinet, M. C., ... Chelly, J. (1999). Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron*, 23(2), 247–256. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80777-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80777-1)

Frisoni, G. B., Fox, N. C., Jack, C. R., Scheltens, P., & Thompson, P. M. (2010, February). The clinical use of structural MRI in Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*, Vol. 6, pp. 67–77. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2009.215>

Fuchsberger, T., Martínez-Bellver, S., Giraldo, E., Teruel-Martí, V., Lloret, A., & Viña, J. (2016). A $\beta$  Induces Excitotoxicity Mediated by APC/C-Cdh1 Depletion That Can Be Prevented by Glutaminase Inhibition Promoting Neuronal Survival. *Scientific Reports*, 6(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/srep31158>

Fuchsberger, T., Yuste, R., Martinez-Bellver, S., Blanco-Gandia, M. C., Torres-Cuevas, I., Blasco-Serra, A., ... Viña, J. (2019). Oral Monosodium Glutamate Administration Causes Early Onset of Alzheimer's Disease-Like Pathophysiology in APP/PS1 Mice. *Journal of Alzheimer's Disease*, 72(3), 957–975. <https://doi.org/10.3233/JAD-190274>

Fuentealba, L. C., Rompani, S. B., Parraguez, J. I., Obernier, K., Romero, R., Cepko, C. L., & Alvarez-Buylla, A. (2015). Embryonic

- Origin of Postnatal Neural Stem Cells. *Cell*, 161(7), 1644–1655.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.041>
- Fujioka, T., Kaneko, N., & Sawamoto, K. (2019, June 1). Blood vessels as a scaffold for neuronal migration. *Neurochemistry International*, Vol. 126, pp. 69–73.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.03.001>
- Fulda, S., & Debatin, K.-M. (2006). Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 25:34, 25(34), 4798–4811. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209608>
- Fung, S. J., Joshi, D., Allen, K. M., Sivagnanasundaram, S., Rothmond, D. A., Saunders, R., ... Weickert, C. S. (2011). Developmental patterns of doublecortin expression and white matter neuron density in the postnatal primate prefrontal cortex and schizophrenia. *PLoS ONE*, 6(9).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025194>
- Garcia-Alloza, M., Robbins, E. M., Zhang-Nunes, S. X., Purcell, S. M., Betensky, R. A., Raju, S., ... Frosch, M. P. (2006). Characterization of amyloid deposition in the APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiology of Disease*, 24(3), 516–524.  
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.08.017>
- Gatt, A., Lee, H., Williams, G., Thuret, S., & Ballard, C. (2019). Expression of neurogenic markers in Alzheimer's disease: a systematic review and metatranscriptional analysis. *Neurobiology of Aging*, 76, 166–180.  
<https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2018.12.016>

- Ghashghaei, H. T., Lai, C., & Anton, E. S. (2007, February). Neuronal migration in the adult brain: Are we there yet? *Nature Reviews Neuroscience*, Vol. 8, pp. 141–151.  
<https://doi.org/10.1038/nrn2074>
- Ghosal, K., Stathopoulos, A., & Pimplikar, S. W. (2010). APP Intracellular Domain Impairs Adult Neurogenesis in Transgenic Mice by Inducing Neuroinflammation. *PLOS ONE*, 5(7), e11866.  
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0011866>
- Gieffers, C., Peters, B. H., Kramer, E. R., Dotti, C. G., & Peters, J.-M. (1999). Expression of the CDH1-associated form of the anaphase-promoting complex in postmitotic neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(20), 11317–11322.  
<https://doi.org/10.1073/PNAS.96.20.11317>
- Gil-Perotin, S., Duran-Moreno, M., Belzunegui, S., Luquin, M. R., & Garcia-Verdugo, J. M. (2009). Ultrastructure of the subventricular zone in *Macaca fascicularis* and evidence of a mouse-like migratory stream. *Journal of Comparative Neurology*, 514(5), 533–554. <https://doi.org/10.1002/cne.22026>
- Gleeson, J. G., Peter T, L., Flanagan, L. A., & Walsh, C. A. (1999). Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron*, 23(2), 257–271. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80778-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80778-3)
- Goedert, M., & Spillantini, M. G. (2000). Tau mutations in frontotemporal dementia FTDP-17 and their relevance for

Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1502(1), 110–121.

[https://doi.org/10.1016/S0925-4439\(00\)00037-5](https://doi.org/10.1016/S0925-4439(00)00037-5)

Gong, C.-X., & Iqbal, K. (2008). Hyperphosphorylation of Microtubule-Associated Protein Tau: A Promising Therapeutic Target for Alzheimer Disease. *Current Medicinal Chemistry*, 15(23), 2321. Retrieved from /pmc/articles/PMC2656563/

Gonzalez-Billault, C., Uren, M., Jime, E. M., Barallobre, M. J., & Pascual, M. (2005). *A role of MAP1B in Reelin-dependent Neuronal Migration*. (August).

<https://doi.org/10.1093/cercor/bhh213>

Gonzalez-Perez, O., & Alvarez-Buylla, A. (2011, June 24).

Oligodendrogenesis in the subventricular zone and the role of epidermal growth factor. *Brain Research Reviews*, Vol. 67, pp. 147–156. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2011.01.001>

Göritz, C., & Frisé, J. (2012, June 14). Neural stem cells and neurogenesis in the adult. *Cell Stem Cell*, Vol. 10, pp. 657–659. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.04.005>

Götz, J., Streffer, J. R., David, D., Schild, A., Hoerndli, F., Pennanen, L., ... Chen, F. (2004). Transgenic animal models of Alzheimer's disease and related disorders: Histopathology, behavior and therapy. *Molecular Psychiatry*, 9(7), 664–683.

<https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001508>

Gould, E., Reeves, A. J., Fallah, M., Tanapat, P., Gross, C. G., & Fuchs,

- E. (1999). Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(9), 5263–5267.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.9.5263>
- Gould, E., Tanapat, P., McEwen, B. S., Flügge, G., & Fuchs, E. (1998). Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(6), 3168–3171. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.3168>
- Graham, M. E., Ruma-Haynes, P., Capes-Davis, A. G., Dunn, J. M., Tan, T. C., Valova, V. A., ... Jeffrey, P. L. (2004). Multisite phosphorylation of doublecortin by cyclin-dependent kinase 5. *The Biochemical Journal*, 381(Pt 2), 471–481.  
<https://doi.org/10.1042/BJ20040324>
- Guertin, D. A., Trautmann, S., & Mccollum, D. (2002). *Cytokinesis in Eukaryotes*. 66(2), 155–178.  
<https://doi.org/10.1128/MMBR.66.2.155>
- Hack, I., Bancila, M., Loulier, K., Carroll, P., & Cremer, H. (2002). Reelin is a detachment signal in tangential chain-migration during postnatal neurogenesis. *Nature Neuroscience*, 5(10), 939–945. <https://doi.org/10.1038/nn923>
- Hamilton, L. K., Dufresne, M., Joppé, S. E., Petryszyn, S., Aumont, A., Calon, F., ... Fernandes, K. J. L. (2015). Aberrant Lipid Metabolism in the Forebrain Niche Suppresses Adult Neural Stem Cell Proliferation in an Animal Model of Alzheimer's

- Disease. *Cell Stem Cell*, 17(4), 397–411.  
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.08.001>
- Han, P., Dou, F., Li, F., Zhang, X., Zhang, Y.-W., Zheng, H., ... Liao, F.-F. (2005). Suppression of Cyclin-Dependent Kinase 5 Activation by Amyloid Precursor Protein: A Novel Excitoprotective Mechanism Involving Modulation of Tau Phosphorylation. *The Journal of Neuroscience*, 25(50), 11542.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3831-05.2005>
- Hansen, D. V., Lui, J. H., Flandin, P., Yoshikawa, K., Rubenstein, J. L., Alvarez-Buylla, A., & Kriegstein, A. R. (2013). Non-epithelial stem cells and cortical interneuron production in the human ganglionic eminences. *Nature Neuroscience*, 16(11), 1576–1587.  
<https://doi.org/10.1038/nn.3541>
- Haughey, N. J., Liu, D., Nath, A., Borchard, A. C., & Mattson, M. P. (2002). *Disruption of Neurogenesis in the Subventricular Zone of Adult Mice , and in Human Cortical Neuronal Precursor Cells in Culture , by Amyloid ` -Peptide. 1*, 125–135.
- Haughey, N. J., Nath, A., Chan, S. L., Borchard, A. C., Rao, M. S., & Mattson, M. P. (2002). Disruption of neurogenesis by amyloid  $\beta$ -peptide, and perturbed neural progenitor cell homeostasis, in models of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 83(6), 1509–1524. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.01267.x>
- Hayflick, L., & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25(3), 585–621.

[https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90192-6)

He, P., & Shen, Y. (2009). Interruption of  $\beta$ -catenin signaling reduces neurogenesis in alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, 29(20), 6545–6557. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0421-09.2009>

He, Z. Y., Wang, W. Y., Hu, W. Y., Yang, L., Li, Y., Zhang, W. Y., ... Zhang, M. (2016). Gamma-H2AX upregulation caused by Wip1 deficiency increases depression-related cellular senescence in hippocampus. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep34558>

Higginbotham, H., Tanaka, T., Brinkman, B. C., & Gleeson, J. G. (2006). GSK3 $\beta$  and PKC $\zeta$  function in centrosome localization and process stabilization during Slit-mediated neuronal repolarization. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 32(1–2), 118–132. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2006.03.003>

Hill, M. M., Adrain, C., Duriez, P. J., Creagh, E. M., & Martin, S. J. (2004). Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *The EMBO Journal*, 23(10), 2134. <https://doi.org/10.1038/SJ.EMBOJ.7600210>

Hirsch-Reinshagen, V., Burgess, B. L., & Wellington, C. L. (2009). Why lipids are important for Alzheimer disease? *Molecular and Cellular Biochemistry*, 326(1–2), 121–129. <https://doi.org/10.1007/s11010-008-0012-2>

Hoe, H.-S., Lee, K. J., Carney, R. S. E., Lee, J., Markova, A., Lee, J.-Y., ...

- Rebeck, G. W. (2009). Interaction of Reelin with Amyloid Precursor Protein Promotes Neurite Outgrowth. *The Journal of Neuroscience*, 29(23), 7459.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4872-08.2009>
- Hou, H., Fan, Q., He, W., Suh, H., Hu, X., & Yan, R. (2017). BACE1 Deficiency Causes Abnormal Neuronal Clustering in the Dentate Gyrus. *Stem Cell Reports*, 9(1), 217–230.  
<https://doi.org/10.1016/J.STEMCR.2017.05.030>
- Hu, H. (1999). Chemorepulsion of neuronal migration by Slit2 in the developing mammalian forebrain. *Neuron*, 23(4), 703–711.  
[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)80029-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)80029-5)
- Huang, W.-J., Zhang, X., & Chen, W.-W. (2016). Role of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biomedical Reports*, 4(5), 519.  
<https://doi.org/10.3892/BR.2016.630>
- Igney, F. H., & Krammer, P. H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews. Cancer*, 2(4), 277–288.  
<https://doi.org/10.1038/NRC776>
- Imura, T., Kornblum, H. I., & Sofroniew, M. V. (2003). The predominant neural stem cell isolated from postnatal and adult forebrain but not early embryonic forebrain expresses GFAP. *Journal of Neuroscience*, 23(7), 2824–2832.  
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-07-02824.2003>
- Ito, K., Hirao, A., Arai, F., Takubo, K., Matsuoka, S., Miyamoto, K., ... Suda, T. (2006). Reactive oxygen species act through p38 MAPK



- to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nature Medicine* 2006 12:4, 12(4), 446–451.  
<https://doi.org/10.1038/nm1388>
- Ittner, L. M., & Götz, J. (2011). Amyloid- $\beta$  and tau - A toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 12(2), 67–72. <https://doi.org/10.1038/nrn2967>
- Iyer, D. R., & Rhind, N. (2017). *The Intra-S Checkpoint Responses to DNA Damage*. <https://doi.org/10.3390/genes8020074>
- Jack, C. R., Knopman, D. S., Jagust, W. J., Shaw, L. M., Aisen, P. S., Weiner, M. W., ... Trojanowski, J. Q. (2010). Hypothetical Pathological Cascade in Alzheimer's Disease. *Lancet Neurology*, 9(1), 1–20. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70299-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70299-6).Hypothetical
- Jankovski, A., Garcia, C., Soriano, E., & Sotelo, C. (1998). Proliferation, migration and differentiation of neuronal progenitor cells in the adult mouse subventricular zone surgically separated from its olfactory bulb. *European Journal of Neuroscience*, 10(12), 3853–3868. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1998.00397.x>
- Jankowsky, J. L., Fadale, D. J., Anderson, J., Xu, G. M., Gonzales, V., Jenkins, N. A., ... Borchelt, D. R. (2004, January 15). Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue  $\beta$ -amyloid peptide in vivo: Evidence for augmentation of a 42-specific  $\gamma$  secretase. *Human Molecular Genetics*, Vol. 13, pp. 159–170. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh019>

- Jeong, S. (2017, January 1). Molecular and cellular basis of neurodegeneration in alzheimer's disease. *Molecules and Cells*, Vol. 40, pp. 613–620.  
<https://doi.org/10.14348/molcells.2017.0096>
- Jessberger, S., Gage, F. H., Eisch, A. J., & Lagace, D. C. (2009). Making a neuron: Cdk5 in embryonic and adult neurogenesis. *Trends in Neurosciences*, 32(11), 575–582.  
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.07.002>
- Jin, K., Peel, A. L., Mao, X. O., Xie, L., Cottrell, B. A., Henshall, D. C., & Greenberg, D. A. (2004). Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(1), 343.  
<https://doi.org/10.1073/PNAS.2634794100>
- Johnson, G. T., Pollard, T. D., Earnshaw, W. C., & Lippincott-Schwartz, J. (2017). Introduction to the Cell Cycle. In *Cell Biology 3rd Edition* (pp. 697–711). <https://doi.org/10.1016/C2014-0-00272-9>
- Kaneko, N., Sawada, M., & Sawamoto, K. (2017, June 1). Mechanisms of neuronal migration in the adult brain. *Journal of Neurochemistry*, Vol. 141, pp. 835–847.  
<https://doi.org/10.1111/jnc.14002>
- Kawauchi, T., Shikanai, M., & Kosodo, Y. (2013). Extra-cell cycle regulatory functions of cyclin-dependent kinases (CDK) and CDK inhibitor proteins contribute to brain development and neurological disorders. *Genes to Cells : Devoted to Molecular &*

*Cellular Mechanisms*, 18(3), 176–194.

<https://doi.org/10.1111/gtc.12029>

Kieroń, M., Żekanowski, C., Falk, A., & Wężyk, M. (2019). Oxidative DNA Damage Signalling in Neural Stem Cells in Alzheimer's Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019.

<https://doi.org/10.1155/2019/2149812>

Kilgore, M., Miller, C. A., Fass, D. M., Hennig, K. M., Haggarty, S. J., Sweatt, J. D., & Rumbaugh, G. (2010). Inhibitors of class 1 histone deacetylases reverse contextual memory deficits in a mouse model of alzheimer's disease.

*Neuropsychopharmacology*, 35(4), 870–880.

<https://doi.org/10.1038/npp.2009.197>

King, R. W., Glotzer, M., & Kirschner, M. W. (1996). Mutagenic analysis of the destruction signal of mitotic cyclins and structural characterization of ubiquitinated intermediates.

*Molecular Biology of the Cell*, 7(9), 1343–1357.

<https://doi.org/10.1091/MBC.7.9.1343>

Kirschenbaum, B., Doetsch, F., Lois, C., & Alvarez-Buylla, A. (1999). Adult subventricular zone neuronal precursors continue to proliferate and migrate in the absence of the olfactory bulb.

*Journal of Neuroscience*, 19(6), 2171–2180.

<https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-06-02171.1999>

Knopman, D. S., & Roberts, R. (2010). Vascular risk factors: Imaging and neuropathologic correlates. *Journal of Alzheimer's Disease*, Vol. 20, pp. 699–709. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-091555>

- Knoth, R., Singec, I., Ditter, M., Pantazis, G., Capetian, P., Meyer, R. P., ... Kempermann, G. (2010). Murine features of neurogenesis in the human hippocampus across the lifespan from 0 to 100 years. *PLoS ONE*, 5(1).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008809>
- Kohwi, M., Osumi, N., Rubenstein, J. L. R., & Alvarez-Buylla, A. (2005). Pax6 is required for making specific subpopulations of granule and periglomerular neurons in the olfactory bulb. *Journal of Neuroscience*, 25(30), 6997–7003.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1435-05.2005>
- Kojima, T., Hirota, Y., Ema, M., Takahashi, S., Miyoshi, I., Okano, H., & Sawamoto, K. (2010). Subventricular Zone-Derived Neural Progenitor Cells Migrate Along a Blood Vessel Scaffold Toward the Post-Stroke Striatum. *STEM CELLS*, 28(3), N/A-N/A.  
<https://doi.org/10.1002/stem.306>
- Komuro, H., & Rakic, P. (1993). Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science*, 260(5104), 95–97.  
<https://doi.org/10.1126/science.8096653>
- Kong, Y., Liu, C., Zhou, Y., Qi, J., Zhang, C., Sun, B., ... Guan, Y. (2020). Progress of RAGE Molecular Imaging in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 12(August), 1–9.  
<https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.00227>
- Kornack, D. R., & Rakic, P. (1999). Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,

- 96(10), 5768–5773. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.10.5768>
- Kuhn, A. J., Abrams, B. S., Knowlton, S., & Raskatov, J. A. (2020). Alzheimer's Disease "non-amyloidogenic" p3 Peptide Revisited: A Case for Amyloid- $\alpha$ . *ACS Chemical Neuroscience*, 11(11), 1539–1544. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.0c00160>
- Kumar, A., Pareek, V., Faiq, M. A., Ghosh, S. K., & Kumari, C. (2019, May 1). Adult neurogenesis in humans: A review of basic concepts, history, current research, and clinical implications. *Innovations in Clinical Neuroscience*, Vol. 16, pp. 30–37. Retrieved from [/pmc/articles/PMC6659986/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31111111/)
- Lannfelt, L., Basun, H., Wahlund, L.-O., Rowe, B. A., & Wagner, S. L. (1995). Decreased  $\alpha$ -secretase-cleaved amyloid precursor protein as a diagnostic marker for Alzheimer's disease. *Nature Medicine* 1995 1:8, 1(8), 829–832. <https://doi.org/10.1038/nm0895-829>
- Lara-Gonzalez, P., Kim, T., & Desai, A. (2017). Taming the Beast: Control of APC/CCdc20-Dependent Destruction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 82, 111–121. <https://doi.org/10.1101/sqb.2017.82.033712>
- Lasser, M., Tiber, J., & Lowery, L. A. (2018, June 14). The role of the microtubule cytoskeleton in neurodevelopmental disorders. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, Vol. 12, p. 165. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00165>
- Laywell, E. D., Rakic, P., Kukekov, V. G., Holland, E. C., & Steindler, D.

- A. (2000). Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(25), 13883–13888. <https://doi.org/10.1073/pnas.250471697>
- Le Breton, M., Cormier, P., Bellé, R., Mulner-Lorillon, O., & Morales, J. (2005). Translational control during mitosis. *Biochimie*, 87(9–10), 805–811. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2005.04.014>
- Lee, B. Y., Han, J. A., Im, J. S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E. C., ... Hwang, E. S. (2006). Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase is lysosomal  $\beta$ -galactosidase. *Aging Cell*, 5(2), 187–195. <https://doi.org/10.1111/J.1474-9726.2006.00199.X>
- Lee, V. M. Y., Balin, B. J., Otvos, L., & Trojanowski, J. Q. (1991). A68: A major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal tau. *Science*, 251(4994), 675–678. <https://doi.org/10.1126/science.1899488>
- Lei, W., Li, W., Ge, L., & Chen, G. (2019). Non-engineered and engineered adult neurogenesis in mammalian brains. *Frontiers in Neuroscience*, 13(FEB). <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00131>
- Leissring, M. A., Farris, W., Chang, A. Y., Walsh, D. M., Wu, X., Sun, X., ... Selkoe, D. J. (2003). Enhanced proteolysis of  $\beta$ -amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death. *Neuron*, 40(6), 1087–1093. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00787-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00787-6)

- Li, G., Fang, L., Fernández, G., & Pleasure, S. J. (2013). The ventral hippocampus is the embryonic origin for adult neural stem cells in the dentate gyrus. *Neuron*, 78(4), 658–672.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.03.019>
- Lim, D. A., & Alvarez-buylla, A. (2016). The Adult Ventricular – Subventricular Zone. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1–34.
- Lim, D. A., & Alvarez-Buylla, A. (2014). Adult neural stem cells stake their ground. *Trends in Neurosciences*, 37(10), 563–571.  
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.08.006>.Adult
- Lim, D. A., Tramontin, A. D., Trevejo, J. M., Herrera, D. G., García-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, A. (2000). Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron*, 28(3), 713–726. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)00148-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)00148-3)
- Liu, P. P., Xie, Y., Meng, X. Y., & Kang, J. S. (2019, August 23). History and progress of hypotheses and clinical trials for alzheimer’s disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, Vol. 4, pp. 1–22. <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0063-8>
- Liu, S., & Zhang, H. (2017). The mitotic checkpoint complex (MCC): looking back and forth after 15 years. *AIMS Mol Sci.*, 3(4), 597–634. <https://doi.org/10.3934/molsci.2016.4.597>.The
- Liu, X., Wang, Q., Haydar, T. F., & Bordey, A. (2005). Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls

proliferation of GFAP-expressing progenitors. *Nature Neuroscience*, 8(9), 1179–1187.  
<https://doi.org/10.1038/nn1522>

Lloret, A., Badía, M. C., Mora, N. J., Ortega, A., Pallardó, F. V., Alonso, M. D., ... Viña, J. (2008). Gender and age-dependent differences in the mitochondrial apoptogenic pathway in Alzheimer's disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(12), 2019–2025.  
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.02.017>

Lloret, M. A., Cervera-Ferri, A., Nepomuceno, M., Monllor, P., Esteve, D., & Lloret, A. (2020, February 1). Is sleep disruption a cause or consequence of alzheimer's disease? Reviewing its possible role as a biomarker. *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21031168>

Locksley, R. M., Killeen, N., & Lenardo, M. J. (2001). The TNF and TNF Receptor Superfamilies: Integrating Mammalian Biology. *Cell*, 104(4), 487–501. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00237-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00237-9)

Lourenço, F. C., Galvan, V., Fombonne, J., Corset, V., Llambi, F., & Müller, U. (2009). Netrin-1 interacts with amyloid precursor protein and regulates amyloid- $\beta$  production. *October*, 16(5), 655–663. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.191>.Netrin-1

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT\*. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 193).  
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)



- Lu, H., Song, X., Wang, F., Wang, G., Wu, Y., Wang, Q., ... Zhang, Z. (2016). Hyperexpressed Netrin-1 Promoted Neural Stem Cells Migration in Mice after Focal Cerebral Ischemia. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 10, 223.  
<https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00223>
- Luzzati, F., De Marchis, S., Fasolo, A., & Peretto, P. (2006). Neurogenesis in the caudate nucleus of the adult rabbit. *Journal of Neuroscience*, 26(2), 609–621.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4371-05.2006>
- Lynch, M. A. (2004, January). Long-Term Potentiation and Memory. *Physiological Reviews*, Vol. 84, pp. 87–136.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.00014.2003>
- Ma, T., Wang, C., Wang, L., Zhou, X., Tian, M., Zhang, Q., ... Yang, Z. (2013). Subcortical origins of human and monkey neocortical interneurons. *Nature Neuroscience*, 16(11), 1588–1597.  
<https://doi.org/10.1038/nn.3536>
- Maeda, S., & Takashima, A. (2007). *Granular Tau Oligomers as Intermediates of Tau Filaments Supporting information*. 000023, 2–5.
- Maki, T., Liang, A. C., Miyamoto, N., Lo, E. H., & Arai, K. (2013). Mechanisms of oligodendrocyte regeneration from ventricular-subventricular zone-derived progenitor cells in white matter diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7, 275.  
<https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00275>

- Maréchal, A., & Zou, L. (2013). DNA Damage Sensing by the ATM and ATR Kinases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(9).  
<https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A012716>
- Marillat, V., Cases, O., Nguyenf-Ba-Charvet, K. T., Tessier-Lavigne, M., Sotelo, C., & Chédotal, A. (2002). Spatiotemporal expression patterns of slit and robo genes in the rat brain. *Journal of Comparative Neurology*, 442(2), 130–155.  
<https://doi.org/10.1002/cne.10068>
- Marín, O., & Rubenstein, J. L. R. (2003). Cell migration in the forebrain. *Annual Review of Neuroscience*, Vol. 26, pp. 441–483.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.26.041002.131058>
- Marshall, G. A., Amariglio, R. E., Sperling, R. A., & Rentz, D. M. (2012). Activities of daily living: where do they fit in the diagnosis of Alzheimer’s disease? *Neurodegenerative Disease Management*, 2(5), 483–491. <https://doi.org/10.2217/nmt.12.55>
- Martino, G., Pluchino, S., Bonfanti, L., & Schwartz, M. (2011, October). Brain regeneration in physiology and pathology: The immune signature driving therapeutic plasticity of neural stem cells. *Physiological Reviews*, Vol. 91, pp. 1281–1304.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.00032.2010>
- Maurer, K., Volk, S., & Gerbaldo, H. (1997, May 24). Auguste D and Alzheimer’s disease. *Lancet*, Vol. 349, pp. 1546–1549.  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(96\)10203-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)10203-8)
- McHugh, D., & Gil, J. (2018). Senescence and aging: Causes,

- consequences, and therapeutic avenues. *Journal of Cell Biology*, 217(1), 65–77. <https://doi.org/10.1083/JCB.201708092>
- Mendez, M. F. (2021). The Relationship between Anxiety and Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease Reports*, Vol. 5, pp. 171–177. <https://doi.org/10.3233/ADR-210294>
- Merkle, F. T., Mirzadeh, Z., & Alvarez-Buylla, A. (2007). Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. *Science*, 317(5836), 381–384. <https://doi.org/10.1126/science.1144914>
- Métin, C., Denizot, J. P., & Ropert, N. (2000). Intermediate zone cells express calcium-permeable AMPA receptors and establish close contact with growing axons. *Journal of Neuroscience*, 20(2), 696–708. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-02-00696.2000>
- Migaud, M., Batailler, M., Segura, S., Duittoz, A., Franceschini, I., & Pilon, D. (2010). Emerging new sites for adult neurogenesis in the mammalian brain: A comparative study between the hypothalamus and the classical neurogenic zones. *European Journal of Neuroscience*, 32(12), 2042–2052. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07521.x>
- Mirzadeh, Z., Merkle, F. T., Soriano-Navarro, M., Garcia-Verdugo, J. M., & 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(3), 265–278. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.07.004>
- Moon, M., Cha, M. Y., & Mook-Jung, I. (2014). Impaired hippocampal

neurogenesis and its enhancement with ghrelin in 5XFADL.

*Journal of Alzheimer's Disease*, 41(1), 233–241.

<https://doi.org/10.3233/JAD-132417>

Moreno-Jiménez, E. P., Flor-García, M., Terreros-Roncal, J., Rábano, A., Cafini, F., Pallas-Bazarra, N., ... Llorens-Martín, M. (2019). Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease. *Nature Medicine*, 25(4), 554–560.  
<https://doi.org/10.1038/s41591-019-0375-9>

Morgan, C., Colombres, M., Nuñez, M. T., & Inestrosa, N. C. (2004, December). Structure and function of amyloid in Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology*, Vol. 74, pp. 323–349.  
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2004.10.004>

Moser, B., Hochreiter, B., Herbst, R., & Schmid, J. A. (2017). Fluorescence colocalization microscopy analysis can be improved by combining object-recognition with pixel-intensity-correlation. *Biotechnology Journal*, 12(1).  
<https://doi.org/10.1002/biot.201600332>

Moya, F., & Valdeolmillos, M. (2004). Polarized Increase of Calcium and Nucleokinesis in Tangentially Migrating Neurons. *Cerebral Cortex*, 14(6), 610–618. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhh022>

Müllers, E., Silva Cascales, H., Jaiswal, H., Saurin, A. T., & Lindqvist, A. (2014). Nuclear translocation of Cyclin B1 marks the restriction point for terminal cell cycle exit in G2 phase. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 13(17), 2733–2743.

<https://doi.org/10.4161/15384101.2015.945831>

Multhaup, G., Huber, O., Buée, L., & Galas, M.-C. (2015). Amyloid Precursor Protein (APP) Metabolites APP Intracellular Fragment (AICD), A $\beta$ 42, and Tau in Nuclear Roles \*. *Journal of Biological Chemistry*, 290(39), 23515–23522.

<https://doi.org/10.1074/JBC.R115.677211>

Muñoz-Espín, D., & Serrano, M. (2014). Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 15(7), 482–496. <https://doi.org/10.1038/NRM3823>

Murase, S. I., & Horwitz, A. F. (2002). Deleted in Colorectal Carcinoma and Differentially Expressed Integrins Mediate the Directional Migration of Neural Precursors in the Rostral Migratory Stream. *Journal of Neuroscience*, 22(9), 3568–3579.

<https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-09-03568.2002>

Nadarajah, B., Brunstrom, J. E., Grutzendler, J., Wong, R. O. L., & Pearlman, A. L. (2001). Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. *Nature Neuroscience*, 4(2), 143–150. <https://doi.org/10.1038/83967>

Nakatomi, H., Kuriu, T., Okabe, S., Yamamoto, S. ichi, Hatano, O., Kawahara, N., ... Nakafuku, M. (2002). Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell*, 110(4), 429–441. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00862-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00862-0)

Nations, U. (2019). World Population Ageing 2019. In *World*

*Population Ageing 2019*. Retrieved from  
[http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-5204-7\\_6](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-5204-7_6)

- Nguyen-Ba-Charvet, K. T., Picard-Riera, N., Tessier-Lavigne, M., Baron-Van Evercooren, A., Sotelo, C., & Chédotal, A. (2004). Multiple Roles for Slits in the Control of Cell Migration in the Rostral Migratory Stream. *Journal of Neuroscience*, *24*(6), 1497–1506. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4729-03.2004>
- Nhan, H. S., Chiang, K., & Koo, E. H. (2015, January 1). The multifaceted nature of amyloid precursor protein and its proteolytic fragments: friends and foes. *Acta Neuropathologica*, Vol. 129, pp. 1–19. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1347-2>
- Nikolic, M., Dudek, H., Kwon, Y. T., Ramos, Y. F. M., & Tsai, L. H. (1996). The cdk5/p35 kinase is essential for neurite outgrowth during neuronal differentiation. *Genes and Development*, *10*(7), 816–825. <https://doi.org/10.1101/gad.10.7.816>
- Nishimura, Y. V, Shikanai, M., Hoshino, M., Ohshima, T., Nabeshima, Y., Mizutani, K.-I., ... Kawauchi, T. (2014). Cdk5 and its substrates, Dcx and p27kip1, regulate cytoplasmic dilation formation and nuclear elongation in migrating neurons. *Development (Cambridge, England)*, *141*(18), 3540–3550. <https://doi.org/10.1242/dev.111294>
- Ohnuma, S., & Harris, W. A. (2003). Neurogenesis and the Cell Cycle. *Neuron*, *40*, 199–208.

- Ohtani, K., DeGregori, J., & Nevins, J. R. (1995). Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(26), 12146. <https://doi.org/10.1073/PNAS.92.26.12146>
- Okamura, N., & Yanai, K. (2017). Brain imaging: Applications of tau PET imaging. *Nature Reviews. Neurology*, 13(4), 197–198. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.38>
- Okano, H., & Sawamoto, K. (2008, June 27). Neural stem cells: Involvement in adult neurogenesis and CNS repair. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, Vol. 363, pp. 2111–2122. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.2264>
- Organización Mundial de la Salud & Organización Panamericana de la Salud. (2012). *Dementia: a public health priority*.
- Ortega, F., Gascón, S., Masserdotti, G., Deshpande, A., Simon, C., Fischer, J., ... Berninger, B. (2013). Oligodendroglial and neurogenic adult subependymal zone neural stem cells constitute distinct lineages and exhibit differential responsiveness to Wnt signalling. *Nature Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/ncb2736>
- Ortiz-A ´lvarez, G., Daclin, M., Shihavuddin, A., & Meunier, A. (2019). *Adult Neural Stem Cells and Multiciliated Ependymal Cells Share a Common Lineage Regulated by the Geminin Family Members*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.01.051>
- Ottone, C., Krusche, B., Whitby, A., Clements, M., Quadrato, G.,

- Pitulescu, M. E., ... Parrinello, S. (2014). Direct cell-cell contact with the vascular niche maintains quiescent neural stem cells. *Nature Cell Biology*, 16(11), 1045–1056.  
<https://doi.org/10.1038/ncb3045>
- Palmer, T. D., Takahashi, J., & Gage, F. H. (1997). The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 8(6), 389–404.  
<https://doi.org/10.1006/mcne.1996.0595>
- Palop, J. J., & Mucke, L. (2010, July). Amyloid- $\beta$ -induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: From synapses toward neural networks. *Nature Neuroscience*, Vol. 13, pp. 812–818.  
<https://doi.org/10.1038/nn.2583>
- Pan, H., Wang, D., Zhang, X., Zhou, D., Zhang, H., Qian, Q., ... Sun, B. (2016). Amyloid  $\beta$  Is Not the Major Factor Accounting for Impaired Adult Hippocampal Neurogenesis in Mice Overexpressing Amyloid Precursor Protein. *Stem Cell Reports*, 7(4), 707–718. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.08.019>
- Paredes, M. F., Sorrells, S. F., Garcia-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, A. (2016). Brain size and limits to adult neurogenesis. *Journal of Comparative Neurology*, 524(3), 646–664.  
<https://doi.org/10.1002/cne.23896>
- Parras, C. M., Galli, R., Britz, O., Soares, S., Galichet, C., Battiste, J., ... Guillemot, F. (2004). Mash1 specifies neurons and oligodendrocytes in the postnatal brain. *EMBO Journal*, 23(22), 4495–4505. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600447>



- Passos, J. F., Nelson, G., Wang, C., Richter, T., Simillion, C., Proctor, C. J., ... Zglinicki, T. von. (2010). Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Molecular Systems Biology*, 6, 347. <https://doi.org/10.1038/MSB.2010.5>
- Patterson C. (2018). Informe mundial sobre el Alzheimer 2018. La investigación de vanguardia Nuevas sobre la demencia: fronteras. *Alzheimer's Disease International*, 1–48. Retrieved from <https://www.alz.co.uk/research/worldalzheimerreport2018-spanish.pdf>
- Pencea, V., Bingaman, K. D., Freedman, L. J., & Luskin, M. B. (2001). Neurogenesis in the subventricular zone and rostral migratory stream of the neonatal and adult primate forebrain. *Experimental Neurology*, 172(1), 1–16. <https://doi.org/10.1006/exnr.2001.7768>
- Peters, J. M. (1999). Subunits and substrates of the anaphase-promoting complex. *Experimental Cell Research*, 248(2), 339–349. <https://doi.org/10.1006/excr.1999.4443>
- Peters, J. M. (2006). The anaphase promoting complex/cyclosome: A machine designed to destroy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(9), 644–656. <https://doi.org/10.1038/nrm1988>
- Pflanzner, T., Janko, M. C., André-Dohmen, B., Reuss, S., Weggen, S., Roebroek, A. J. M., ... Pietrzik, C. U. (2011). LRP1 mediates bidirectional transcytosis of amyloid- $\beta$  across the blood-brain

barrier. *Neurobiology of Aging*, 32(12), 2323.e1-2323.e11.

<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.05.025>

Pines, J. (2011). Cubism and the cell cycle : the many faces of the APC

/ *C. Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12, 427–438.

<https://doi.org/10.1038/nrm3132>

Platel, J. C., & Bordey, A. (2016, May 26). The multifaceted

subventricular zone astrocyte: From a metabolic and pro-

neurogenic role to acting as a neural stem cell. *Neuroscience*,

Vol. 323, pp. 20–28.

<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.10.053>

Poluch, S., & König, N. (2002). AMPA receptor activation induces

GABA release from neurons migrating tangentially in the

intermediate zone of embryonic rat neocortex. *European*

*Journal of Neuroscience*, 16(2), 350–354.

<https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02068.x>

Ponti, G., Obernier, K., Guinto, C., Jose, L., Bonfanti, L., & Alvarez-

Buylla, A. (2013). Cell cycle and lineage progression of neural

progenitors in the ventricular-subventricular zones of adult

mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

*United States of America*, 110(11), E1045–E1054.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1219563110>

Ponti, G., Obernier, K., Guintoa, C., Jose, L., Bonfanti, L., & Arturo, A.-

B. (2013). Cell cycle and lineage progression of neural

progenitors in the ventricular-subventricular zones of adult

mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, E1045–

E1054. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.25.14895>

Rahman, M. A., Rahman, M. S., Rahman, M. H., Rasheduzzaman, M., Mamun-Or-Rashid, A., Uddin, M. J., ... Rhim, H. (2020). Modulatory Effects of Autophagy on APP Processing as a Potential Treatment Target for Alzheimer's Disease. *Biomedicines* 2021, Vol. 9, Page 5, 9(1), 5. <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES9010005>

Rakic, P. (1985). Limits of neurogenesis in primates. *Science*, 227(4690), 1054–1056. <https://doi.org/10.1126/science.3975601>

Ramaker, J. M., & Copenhaver, P. F. (2017). Amyloid Precursor Protein family as unconventional G<sub>o</sub>-coupled receptors and the control of neuronal motility. *Neurogenesis*, 4(1), e1288510. <https://doi.org/10.1080/23262133.2017.1288510>

Ramon y Cajal, S. (1928). Degeneration and Regeneration of the Nervous System. In *New* (Vol. 1). Retrieved from <https://wellcomecollection.org/works/qk2wnpxj>

Rapoport, M., Dawson, H. N., Binder, L. I., Vitek, M. P., & Ferreira, A. (2002). Tau is essential to  $\beta$ -amyloid-induced neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(9), 6364–6369. <https://doi.org/10.1073/pnas.092136199>

Reinchisi, G., Ijichi, K., Glidden, N., Jakovcevski, I., & Zecevic, N. (2012). COUP-TFII expressing interneurons in human fetal

forebrain. *Cerebral Cortex*, 22(12), 2820–2830.

<https://doi.org/10.1093/cercor/bhr359>

Reynolds, B. A., & Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, 255(5052), 1707–1710.

<https://doi.org/10.1126/science.1553558>

Ricciarelli, R., & Fedele, E. (2017). The Amyloid Cascade Hypothesis in Alzheimer's Disease: It's Time to Change Our Mind. *Current Neuropharmacology*, 15(6), 926–935.

<https://doi.org/10.2174/1570159x15666170116143743>

Rodríguez, J. J., Jones, V. C., & Verkhratsky, A. (2009). Impaired cell proliferation in the subventricular zone in an Alzheimer's disease model. *NeuroReport*, 20(10), 907–912.

<https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e32832be77d>

Rogaev, E. I., Sherrington, R., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., Liang, Y., ... George-Hyslop, P. H. S. (1995). Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene.

*Nature*, 376(6543), 775–778. <https://doi.org/10.1038/376775a0>

Ryan, K. A., & Pimplikar, S. W. (2005). Activation of GSK-3 and phosphorylation of CRMP2 in transgenic mice expressing APP intracellular domain. *The Journal of Cell Biology*, 171(2), 327.

<https://doi.org/10.1083/JCB.200505078>

Sagare, A. P., Bell, R. D., & Zlokovic, B. V. (2013). Neurovascular

defects and faulty amyloid- $\beta$  vascular clearance in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, Vol. 33, p. S87.  
<https://doi.org/10.3233/JAD-2012-129037>

Sajman, J., Zenvirth, D., Nitzan, M., Margalit, H., Simpson-lavy, K. J., Reiss, Y., ... Brandeis, M. (2015). Degradation of Ndd1 by APC/CCdh1 generates a feed forward loop that times mitotic protein accumulation. *Nature Communications*, (May).  
<https://doi.org/10.1038/ncomms8075>

Sanai, H., Tramontin, A. D., Quiñones-Hinojosa, A., Barbaro, N. M., Gupta, H., Kunwar, S., ... Alvarez-Buylla, A. (2004). Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature*, 427(6976), 740–744.  
<https://doi.org/10.1038/nature02301>

Sanai, N., Nguyen, T., Ihrie, R. A., Mirzadeh, Z., Tsai, H. H., Wong, M., ... Alvarez-Buylla, A. (2011a). Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy. *Nature*, 478(7369), 382–386. <https://doi.org/10.1038/nature10487>

Sanai, N., Nguyen, T., Ihrie, R. A., Mirzadeh, Z., Tsai, H. H., Wong, M., ... Alvarez-Buylla, A. (2011b). Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy. *Nature*, 478(7369), 382–386. <https://doi.org/10.1038/nature10487>

Sarkar, S. (2018). Neurofibrillary tangles mediated human neuronal tauopathies: insights from fly models. *Journal of Genetics 2018* 97:3, 97(3), 783–793. <https://doi.org/10.1007/S12041-018-0962-4>

- Sato, K., Minegishi, S., Takano, J., Plattner, F., Saito, T., Asada, A., ... Hisanaga, S. I. (2011). Calpastatin, an endogenous calpain-inhibitor protein, regulates the cleavage of the Cdk5 activator p35 to p25. *Journal of Neurochemistry*, 117(3), 504–515. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07222.x>
- Sawada, M., Huang, S., Hirota, Y., Kaneko, N., & Sawamoto, K. (2011). Neuronal Migration in the Adult Brain. In *Neurogenesis in the Adult Brain I* (pp. 337–355). [https://doi.org/10.1007/978-4-431-53933-9\\_14](https://doi.org/10.1007/978-4-431-53933-9_14)
- Sawamoto, K., Wichterle, H., Gonzalez-Perez, O., Cholfin, J. A., Yamada, M., Spassky, N., ... Alvarez-Buylla, A. (2006). New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science*, 311(5761), 629–632. <https://doi.org/10.1126/science.1119133>
- Schaar, B. T., & McConnell, S. K. (2005). Cytoskeletal coordination during neuronal migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(38), 13652–13657. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506008102>
- Schimmer, A. D. (2004). Inhibitor of Apoptosis Proteins: Translating Basic Knowledge into Clinical Practice. *Cancer Research*, 64(20), 7183–7190. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1918>
- Schneider, L, Fumagalli, M., & Fagagna, F. d'Adda di. (2012). Terminally differentiated astrocytes lack DNA damage response signaling and are radioresistant but retain DNA repair proficiency. *Cell Death and Differentiation*, 19(4), 582.

<https://doi.org/10.1038/CDD.2011.129>

Schneider, Leonid. (2014). Survival of Neural Stem Cells Undergoing DNA Damage-Induced Astrocytic Differentiation in Self-Renewal-Promoting Conditions In Vitro. *PLoS ONE*, 9(1), e87228. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087228>

Schneider, Leonid, Pellegatta, S., Favaro, R., Pisati, F., Roncaglia, P., Testa, G., ... D'Adda Di Fagagna, F. (2013). DNA damage in mammalian neural stem cells leads to astrocytic differentiation mediated by BMP2 signaling through JAK-STAT. *Stem Cell Reports*, 1(2), 123–138. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2013.06.004>

Scopa, C., Marrocco, F., Latina, V., Ruggeri, F., Corvaglia, V., La Regina, F., ... Cattaneo, A. (2020). Impaired adult neurogenesis is an early event in Alzheimer's disease neurodegeneration, mediated by intracellular A $\beta$  oligomers. *Cell Death & Differentiation*, 27(3), 934–948. <https://doi.org/10.1038/s41418-019-0409-3>

Sedelnikova, O. A., Pilch, D. R., Redon, C., & Bonner, W. M. (2003, May). Histone H2AX in DNA damage and repair. *Cancer Biology and Therapy*, Vol. 2, pp. 233–235. <https://doi.org/10.4161/cbt.2.3.373>

Selkoe, D. J. (2001). Alzheimer's disease: Genes, proteins, and therapy. *Physiological Reviews*, Vol. 81, pp. 741–766. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.2.741>

- Sequerra, E. B. (2014). Subventricular zone progenitors in time and space: generating neuronal diversity. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *8*, 434. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00434>
- Seri, B., García-Verdugo, J. M., McEwen, B. S., & Alvarez-Buylla, A. (2001). Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *Journal of Neuroscience*, *21*(18), 7153–7160. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-18-07153.2001>
- Shah, P. T., Stratton, J. A., Gail, M., Koblinger, K., Whelan, P. J., Correspondence, J. B., ... Biernaskie, J. (2018). Single-Cell Transcriptomics and Fate Mapping of Ependymal Cells Reveals an Absence of Neural Stem Cell Function Matters Arising Single-Cell Transcriptomics and Fate Mapping of Ependymal Cells Reveals an Absence of Neural Stem Cell Function. *Cell*, *173*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.063>
- Shen, Z., Lei, J., Li, X., Wang, Z., Bao, X., & Wang, R. (2018). Multifaceted assessment of the APP/PS1 mouse model for Alzheimer's disease: Applying MRS, DTI, and ASL. *Brain Research*, *1698*, 114–120. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.08.001>
- Sikora, E., Mosieniak, G., & Alicja Sliwinska, M. (2016). Morphological and Functional Characteristic of Senescent Cancer Cells. *Current Drug Targets*, *17*(4), 377–387. <https://doi.org/10.2174/1389450116666151019094724>
- Simó, S., Lluís, P., Miguel, S., Anna, L. T., Jose, D. R., Jesus, U., ...



- Eduardo, S. (2007). *Reelin Induces the Detachment of Postnatal Subventricular Zone Cells and the Expression of the Egr-1 through*. (February), 294–303.  
<https://doi.org/10.1093/cercor/bhj147>
- Snappyan, M., Lemasson, M., Brill, M. S., Blais, M., Massouh, M., Ninkovic, J., ... Saghatelyan, A. (2009). Vasculature guides migrating neuronal precursors in the adult mammalian forebrain via brain-derived neurotrophic factor signaling. *Journal of Neuroscience*.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4956-08.2009>
- Sohn, J., Orosco, L., Guo, F., Chung, S. H., Bannerman, P., Ko, E. M., ... Pleasure, D. (2015). The subventricular zone continues to generate corpus callosum and rostral migratory stream astroglia in normal adult mice. *Journal of Neuroscience*, 35(9), 3756–3763. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3454-14.2015>
- Sola Vigo, F., Kedikian, G., Heredia, L., Heredia, F., Añel, A. D., Rosa, A. L., & Lorenzo, A. (2009). Amyloid- $\beta$  precursor protein mediates neuronal toxicity of amyloid  $\beta$  through Go protein activation. *Neurobiology of Aging*, 30(9), 1379–1392.  
<https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2007.11.017>
- Sorrells, S. F., Paredes, M. F., Cebrian-Silla, A., Sandoval, K., Qi, D., Kelley, K. W., ... Alvarez-Buylla, A. (2018). Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature25975>
- Sosa, L. J., Cáceres, A., Dupraz, S., Oksdath, M., Quiroga, S., &

- Lorenzo, A. (2017, October 1). The physiological role of the amyloid precursor protein as an adhesion molecule in the developing nervous system. *Journal of Neurochemistry*, Vol. 143, pp. 11–29. <https://doi.org/10.1111/jnc.14122>
- Spassky, N., & Meunier, A. (2017, July 1). The development and functions of multiciliated epithelia. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol. 18, pp. 423–436. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.21>
- Suberbielle, E., Sanchez, P. E., Kravitz, A. V., Wang, X., Ho, K., Eilertson, K., ... Mucke, L. (2013). Physiologic brain activity causes DNA double-strand breaks in neurons, with exacerbation by amyloid- $\beta$ . *Nature Neuroscience*, 16(5), 613–621. <https://doi.org/10.1038/nn.3356>
- Sugiyama, T., Osumi, N., & Katsuyama, Y. (2013). The germinal matrices in the developing dentate gyrus are composed of neuronal progenitors at distinct differentiation stages. *Developmental Dynamics*, 242(12), 1442–1453. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24035>
- Suh, Y., Obernier, K., Hölzl-Wenig, G., Mandl, C., Herrmann, A., Wörner, K., ... Ciccolini, F. (2009). Interaction between DLX2 and EGFR regulates proliferation and neurogenesis of SVZ precursors. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 42(4), 308–314. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2009.08.003>
- Sundberg, H., Døving, K., Novikov, S., & Ursin, H. (1982). A method for studying responses and habituation to odors in rats.

*Behavioral and Neural Biology*, 34(1), 113–119.

[https://doi.org/10.1016/S0163-1047\(82\)91501-1](https://doi.org/10.1016/S0163-1047(82)91501-1)

Takahashi, A., Imai, Y., Yamakoshi, K., Kuninaka, S., Ohtani, N., Yoshimoto, S., ... Hara, E. (2012). DNA damage signaling triggers degradation of histone methyltransferases through APC/C Cdh1 in senescent cells. *Molecular Cell*, 45(1), 123–131.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.10.018>

Takahashi, M., Miyata, H., Kametani, F., Nonaka, T., Akiyama, H., Hisanaga, S. ichi, & Hasegawa, M. (2015). Extracellular association of APP and tau fibrils induces intracellular aggregate formation of tau. *Acta Neuropathologica*, 129(6), 895–907.  
<https://doi.org/10.1007/s00401-015-1415-2>

Tang, J., Song, M., Wang, Y., Fan, X., Xu, H., & Bai, Y. (2009). Noggin and BMP4 co-modulate adult hippocampal neurogenesis in the APP<sup>swe</sup>/PS1 $\Delta$ E9 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 385(3), 341–345. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.05.067>

Taupin, P. (2010). Aging and neurogenesis, a lesion from Alzheimer's disease. *Aging and Disease*, 1(2), 158–168.

Tobin, M. K., Musaraca, K., Disouky, A., Shetti, A., Bheri, A., Honer, W. G., ... Lazarov, O. (2019). Human Hippocampal Neurogenesis Persists in Aged Adults and Alzheimer's Disease Patients. *Cell Stem Cell*, 24(6), 974-982.e3.  
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.05.003>

- Tucker, H. M., Kihiko, M., Caldwell, J. N., Wright, S., Kawarabayashi, T., Price, D., ... Estus, S. (2000). The plasmin system is induced by and degrades amyloid- $\beta$  aggregates. *Journal of Neuroscience*, 20(11), 3937–3946. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-11-03937.2000>
- Uddin, M. S., Kabir, M. T., Al Mamun, A., Abdel-Daim, M. M., Barreto, G. E., & Ashraf, G. M. (2019, April 1). APOE and Alzheimer's Disease: Evidence Mounts that Targeting APOE4 may Combat Alzheimer's Pathogenesis. *Molecular Neurobiology*, Vol. 56, pp. 2450–2465. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1237-z>
- Ulrich, D. (2015). Amyloid- $\beta$  impairs synaptic inhibition via GABAA receptor endocytosis. *Journal of Neuroscience*, 35(24), 9205–9210. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0950-15.2015>
- van der Flier, W. M., Pijnenburg, Y. A. L., Fox, N. C., & Scheltens, P. (2011, March). Early-onset versus late-onset Alzheimer's disease: The case of the missing APOE  $\epsilon$ 4 allele. *The Lancet Neurology*, Vol. 10, pp. 280–288. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70306-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70306-9)
- Velayudhan, L., Pritchard, M., Powell, J. F., Proitsi, P., & Lovestone, S. (2013). Smell identification function as a severity and progression marker in Alzheimer's disease. *International Psychogeriatrics*, 25(7), 1157–1166. <https://doi.org/10.1017/S1041610213000446>
- Visintin, R., Prinz, S., & Amon, A. (1997). CDC20 and CDH1: a family of substrate-specific activators of APC-dependent proteolysis.

*Science (New York, N.Y.)*, 278(5337), 460–463.

<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.278.5337.460>

Wajant, H. (2002). The Fas signaling pathway: More than a paradigm.

*Science*, 296(5573), 1635–1636.

<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1071553>

Walsh, D. M., Hartley, D. M., Kusumoto, Y., Fezoui, Y., Condron, M. M., Lomakin, A., ... Teplow, D. B. (1999). Amyloid  $\beta$ -protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates. *Journal of Biological Chemistry*, 274(36), 25945–25952. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.36.25945>

Walsh, D. M., Klyubin, I., Fadeeva, J. V., Cullen, W. K., Anwyl, R., Wolfe, M. S., ... Selkoe, D. J. (2002). Naturally secreted oligomers of amyloid  $\beta$  protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*, 416(6880), 535–539. <https://doi.org/10.1038/416535a>

Wang, C., Liu, F., Liu, Y.-Y., Zhao, C.-H., You, Y., Wang, L., ... Yang, Z. (2011a). Identification and characterization of neuroblasts in the subventricular zone and rostral migratory stream of the adult human brain. *Cell Research*, 21(11), 1534–1550. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.83>

Wang, C., Liu, F., Liu, Y. Y., Zhao, C. H., You, Y., Wang, L., ... Yang, Z. (2011b). Identification and characterization of neuroblasts in the subventricular zone and rostral migratory stream of the adult human brain. *Cell Research*, 21(11), 1534–1550. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.83>

- Wang, W., M. Bodles-Brakhop, A., & W. Barger, S. (2016). A Role for P-Glycoprotein in Clearance of Alzheimer Amyloid  $\beta$ -Peptide from the Brain. *Current Alzheimer Research*, 13(6), 615–620. <https://doi.org/10.2174/1567205013666160314151012>
- Wang, X., Wang, W., Li, L., Perry, G., Lee, H. gon, & Zhu, X. (2014, August 1). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, Vol. 1842, pp. 1240–1247. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.10.015>
- Wasch, R., Robbins, J. A., & Cross, F. R. (2010). The emerging role of APC/CCdh1 in controlling differentiation, genomic stability and tumor suppression. *Oncogene*, 29(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.325>.The
- Wesson, D. W., Levy, E., Nixon, R. A., & Wilson, D. A. (2010). Olfactory dysfunction correlates with amyloid-beta burden in an Alzheimer's disease mouse model. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(2), 505–514. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4622-09.2010>
- Whitman, M. C., Fan, W., Rela, L., Rodriguez-Gil, D. J., & Greer, C. A. (2009). Blood vessels form a migratory scaffold in the rostral migratory stream. *Journal of Comparative Neurology*, 516(2), 94–104. <https://doi.org/10.1002/cne.22093>
- Wichterle, H., García-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, A. (1997). Direct evidence for homotypic, glia-independent neuronal migration. *Neuron*, 18(5), 779–791.

[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80317-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80317-7)

Wiley, C. D., Velarde, M. C., Lecot, P., Liu, S., Sarnoski, E. A., Freund, A., ... Campisi, J. (2016). Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype. *Cell Metabolism*, 23(2), 303–314.

<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.11.011>

Wu, W., Wong, K., Chen, J. H., Jiang, Z. H., Dupuls, S., Wu, J. Y., & Rao, Y. (1999). Directional guidance of neuronal migration in the olfactory system by the protein Slit. *Nature*, 400(6742), 331–336. <https://doi.org/10.1038/22477>

Y, G., EN, E., M, P., JM, R., AS, L., A, G., ... RA, W. (1996). Regulation of cyclin E transcription by E2Fs and retinoblastoma protein. *Oncogene*, 12(6), 1173–1180. Retrieved from <https://europepmc.org/article/med/8649818>

Yang, H. K. C., Sundholm-Peters, N. L., Goings, G. E., Walker, A. S., Hyland, K., & Szele, F. G. (2004). Distribution of Doublecortin Expressing Cells Near the Lateral Ventricles in the Adult Mouse Brain. *Journal of Neuroscience Research*, 76(3), 282–295. <https://doi.org/10.1002/jnr.20071>

Young-Pearse, T. L., Bai, J., Chang, R., Zheng, J. B., Loturco, J. J., & Selkoe, D. J. (2007). A critical function for  $\beta$ -amyloid precursor protein in neuronal migration revealed by in utero RNA interference. *Journal of Neuroscience*, 27(52), 14459–14469. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4701-07.2007>

- Yu, Q., Guo, P., Li, D., Zuo, L., Lian, T., Yu, S., ... Zhang, W. (2018). Olfactory dysfunction and its relationship with clinical symptoms of Alzheimer disease. *Aging and Disease*, 9(6), 1084–1095. <https://doi.org/10.14336/AD.2018.0819>
- Yuan, T.-F., Gu, S., Shan, C., Marchado, S., & Arias-Carrión, O. (2015). Oxidative Stress and Adult Neurogenesis. *Stem Cell Reviews and Reports* 2015 11:5, 11(5), 706–709. <https://doi.org/10.1007/S12015-015-9603-Y>
- Zhan, J. S., Gao, K., Chai, R. C., Jia, X. H., Luo, D. P., Ge, G., ... Yu, A. C. H. (2017). Astrocytes in Migration. *Neurochemical Research*, 42(1), 272–282. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-2089-4>
- Zhang, J., Li, H., Zhou, T., Zhou, J., & Herrup, K. (2012). Cdk5 levels oscillate during the neuronal cell cycle: Cdh1 ubiquitination triggers proteasome-dependent degradation during S-phase. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(31), 25985–25994. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.343152>
- Zhang, X., Li, Y., Xu, H., & Zhang, Y. W. (2014, December 11). The  $\gamma$ -secretase complex: From structure to function. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, Vol. 8. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00427>
- Zhang, X. M., Cai, Y., Chu, Y., Chen, E. Y., Feng, J. C., Luo, X. G., ... Yan, X. X. (2009). Hdoublecortin-expressing cells persist in the associative cerebral cortex and amygdala in aged nonhuman primates. *Frontiers in Neuroanatomy*, 3(OCT), 17. <https://doi.org/10.3389/neuro.05.017.2009>



Zhou, Z., Chan, C. H., Ma, Q., Xu, X., Xiao, Z., & Tan, E.-K. (2011). The roles of amyloid precursor protein (APP) in neurogenesis. *Cell Adhesion & Migration*, 5(4), 280–292.

<https://doi.org/10.4161/cam.5.4.16986>

Ziabreva, I., Perry, E., Perry, R., Minger, S. L., Ekonomou, A., Przyborski, S., & Ballard, C. (2006). Altered neurogenesis in Alzheimer's disease. *Journal of Psychosomatic Research*, 61(3), 311–316. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychores.2006.07.017>

Zou, K., Yamaguchi, H., Akatsu, H., Sakamoto, T., Ko, M., Mizoguchi, K., ... Michikawa, M. (2007). Angiotensin-converting enzyme converts amyloid  $\beta$ -protein 1-42 (A $\beta$ 1-42) to A $\beta$ 1-40, and its inhibition enhances brain A $\beta$  deposition. *Journal of Neuroscience*, 27(32), 8628–8635.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1549-07.2007>

Zupanc, G. K. H., & Horschke, I. (1995). Proliferation zones in the brain of adult gymnotiform fish: A quantitative mapping study. *Journal of Comparative Neurology*, 353(2), 213–233.

<https://doi.org/10.1002/cne.903530205>

1753

quere  
um ferio

