

REGULACIÓN DE LA QUIESCENCIA EN CÉLULAS MADRE NEURALES ADULTAS A TRAVÉS DE LA VÍA AUTOFAGIA-LISOSOMA

Tesis doctoral

Isabel Calatayud Baselga

Enero 2022

Programa de doctorado en Neurociencias. Universidad de Valencia.

Directora: Dra. Helena Mira Aparicio

Tutor: Dr. Enrique Lanuza Navarro



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

A mis padres

y a Jorge

ÍNDICE

Clave de abreviaturas.....	V
Índice de figuras.....	VI
Resumen.....	1
Introducción.....	5
<i>Neurogénesis.....</i>	<i>7</i>
1. Neurogénesis embrionaria.....	7
2. Historia de la neurogénesis adulta.....	8
3. Formación de los nichos neurogénicos y establecimiento de la quiescencia.....	9
4. Neurogénesis adulta en los nichos.....	13
5. Mantenimiento de las NSCs en los nichos adultos.....	15
6. Regulación de la neurogénesis hipocampal adulta.....	17
<i>Autofagia.....</i>	<i>20</i>
1. Tipos de autofagia.....	20
2. Fases de la autofagia.....	21
3. Activadores e inhibidores de autofagia.....	25
<i>Autofagia y células madre neurales adultas.....</i>	<i>26</i>
1. Autofagia en los nichos neurogénicos.....	27
2. Autofagia en las NSCs quiescentes.....	28
3. Muerte autofágica de las NSCs adultas.....	29
Objetivos.....	31
Materiales y métodos.....	35
<i>Materiales.....</i>	<i>37</i>
1. Animales.....	37
2. Líneas celulares.....	37

3. Reactivos.....	38
<i>Métodos</i>	43
Métodos <i>in vivo</i>	43
Métodos <i>in vitro</i>	50
Resultados	61
<i>Capítulo I. Regulación de la síntesis proteica en cultivos de células madre neurales adultas quiescentes</i>	63
1. Las NSCs quiescentes reprimen la expresión de genes relacionados con la traducción	65
2. Las NSCs quiescentes inhiben la etapa de inicio de la traducción	66
3. La regulación de la traducción en las NSCs quiescentes.....	68
4. Las NSCs quiescentes presentan menor síntesis proteica	71
<i>Capítulo II. Regulación de la autofagia en cultivos de células madre neurales adultas quiescentes</i>	75
1. El contenido proteico en forma de agregados está incrementado en las NSCs quiescentes	77
2. La maquinaria autofágica se encuentra incrementada en las NSCs quiescentes.....	78
3. Las NSCs quiescentes muestran un incremento en autofagosomas.....	80
4. Las NSCs quiescentes tienen un incremento en la expresión de genes relacionados con la vía de la autofagia-lisosoma	82
5. AMPK activa la vía de la autofagia en las NSCs quiescentes	84
6. La autofagia juega un papel en la regulación de la entrada y salida de la quiescencia	87
7. Papel de EGFR en la regulación de la entrada y salida de quiescencia	88
8. Las células GLAST+ obtenidas del hipocampo de animales posnatales de 21 días muestran un incremento de agregados proteicos	90
9. Las células GLAST+ acumulan agregados proteicos con el envejecimiento	92
<i>Capítulo III. Estudio de la función del gen Atg7 y de la vía autofagia-lisosoma en el giro dentado posnatal y adulto</i>	95
1. El modelo transgénico NesCreERT2 nos permite estudiar el papel de la autofagia en las RGLs neurales de la SGZ del hipocampo de ratón durante la etapa adulta.....	97
2. Las NSCs de la SGZ del hipocampo de ratón continúan entrando en quiescencia durante la tercera semana posnatal.....	98

3. La delección del gen <i>Atg7</i> regula la quiescencia de las RGLs de la SGZ del hipocampo de ratón durante la etapa posnatal	99
4. La vía autofágica parece no ser esencial para el mantenimiento de la quiescencia de las RGLs de la SGZ en condiciones basales en la etapa adulta	101
5. En condiciones proneurogénicas la autofagia parece ser esencial para el mantenimiento de la población de RGLs hipocampales adultas	102
6. La administración de Metformina no produce efectos en las RGLs de la SGZ.....	103
Discusión.....	105
Conclusiones.....	121
Bibliografía.....	125

CLAVE DE ABREVIATURAS

-P: fosforilado	eIFs: Factores de inicio de la traducción eucariotas
A: células madre neurales activas	ER: receptor de estrógenos
A1: células madre activas no mitóticas	FBS: Suero fetal bobino
A2: células madre activas mitóticas	FGF2: Factor de crecimiento fibroblástico 2
Ac: Aceite	Fen: Fenformina
ACC: Acetil-CoA carboxilasa	GCL: Capa granular del hipocampo
ADN: Ácido desoxirribonucleico	GFAP: Proteína ácida fibrilar glial
ARN: Ácido ribonucleico	GFP: Proteína verde fluorescente
Array: microarray de expresión	GLAST: Transportador de glutamato 1
ATG: Genes relacionados con Autofagia	GO: <i>Gene Ontology</i>
BafA1: Bafilomicina A1	HBSS: Solución salina equilibrada de Hanks
BMP: Proteína morfogénica osea	HSP90: Proteína <i>heat shock</i> 90
BMPR: Receptor de proteína morfogénica osea	LC3: Proteína asociada a microtúbulos 1A/1B-cadena ligera 3
BSA: Suero albúmina bovina	MACs: Separación magnética
BrdU: 5-Bromo-2'-deoxiuridina	Met: Metformina
CA: Cuerno de Amón	MG: MG132
CHX: Cicloheximida	ML: capa molecular del hipocampo
ChIP: estudios de inmunoprecipitación de la cromatina	Nes: Nestina
cKO: <i>knockout</i> condicional	NSCs: células madre neurales
CldU: 5-cloro-2'-deoxiuridina	NaF: Fluoruro de sodio
CPT1: carnitina palmitoil transferasa 1 mitocondrial	O/L: Ornitina/laminina
Cre: Proteína Cre recombinasa	OPP: O-propagil-puromicina
DABCO: 1,4-diazabicyclo- (2,2,2)-octano	P: Posnatal
DCX: Doblecortina	P24: Placa 24 pocillos
DG: Giro dentado	PB: Tampón fosfato
DMSO: Dimetil Sulfóxido	PBS: Tanpón fosfato salino
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético	PD: PD168393
EGF: Factor de crecimiento epidérmico	PE: Grupo fosfatidiletanolamina
EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico	PFA: Paraformaldehído
	PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

Prom1: Prominina 1

Q: células madre neurales quiescentes

Q1: células madre quiescentes *dormant*

Q2: células madre quiescentes *resting*

RFP: Proteína roja fluorescente

RGLs: células madre con morfología radial

RMS: canal migratorio rostral

RNAseq: Secuenciación masiva de RNAseq

Rpkm: Lecturas por millón de kilobases

Rps/Rpl: Proteínas de las subunidades ribosomales 40S y 60S

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RT-qPCR: Retrotranscripción y PCR cuantitativa

sc-RNAseq: Secuenciación masiva de ARN de célula única

SDS: Dodecilsulfato sódico

SEM: Error estándar de la media

Ser: Serina

SGZ: Zona subgranular del hipocampo

SVZ: Zona subventricular

TBS: Tampón Tris Salino

TF: Factores de transcripción

TGF β : Factor de crecimiento transformante

Thr: Treonina

TM: Temperatura anillamiento

TTBS: Tampón Tris salido con Tween20

TX: Tamoxifeno

ÍNDICE DE FIGURAS

Introducción
<i>Figura I1: Nichos neurogénicos</i>	<i>.....8</i>
<i>Figura I2: Formación y estructura del giro dentado del hipocampo.....</i>	<i>..... 12</i>
<i>Figura I3: Nichos neurogénicos adultos.....</i>	<i>..... 14</i>
<i>Figura I4: Circuito trisináptico del hipocampo.</i>	<i>..... 16</i>
<i>Figura I5: Tipos de autofagia en células de mamífero: macroautofagia, autofagia mediada por chaperonas y microautofagia.....</i>	<i>..... 21</i>
<i>Figura I6: Mecanismo general de autofagia.....</i>	<i>..... 22</i>
<i>Figura I7: Inducción y nucleación de la autofagia.....</i>	<i>..... 23</i>
<i>Figura I8: Sistemas ATG12 y LC3</i>	<i>..... 24</i>
Materiales y métodos
<i>Figura M1: Protocolos de PCR de genotipado de los animales utilizados.....</i>	<i>..... 44</i>
<i>Figura M2: Sistema Cre-LoxP</i>	<i>..... 45</i>
<i>Figura M3: Protocolo de PCR convencional para validar la recombinación en muestras de giro dentado de hipocampo de animales NesCreER^{T2}:Atg7^{F/F}.....</i>	<i>..... 46</i>
<i>Figura M4: Aislamiento de células GLAST⁺ a partir de tejido de hipocampo con tecnología Miltenyi.....</i>	<i>..... 50</i>
<i>Figura M5: Inducción de la quiescencia en cultivos in vitro y su reversión.....</i>	<i>..... 53</i>
<i>Figura M6: Protocolo de RT-qPCR para la expresión génica</i>	<i>..... 57</i>
Resultados61
<i>Figura R1: La señalización de BMP4 a través de los receptores de BMP de tipo I induce la entrada en quiescencia de las NSCs en cultivo.....</i>	<i>..... 65</i>
<i>Figura R2: Las NSCs quiescentes muestran una reducción de la expresión de genes relacionados con la traducción.....</i>	<i>..... 67</i>
<i>Figura R3: La eficiencia del inicio de la traducción se encuentra reducida en las NSCs quiescentes a nivel de formación del complejo ternario eIF2-GTP-Met-tARN.....</i>	<i>..... 69</i>
<i>Figura R4: La eficiencia del inicio de la traducción se encuentra reducida en las NSCs quiescentes a nivel de formación de la caperuza 5'.....</i>	<i>..... 70</i>

<i>Figura R5: La síntesis proteica está reducida en las NSCs quiescentes.</i>	71
<i>Figura R6: Las células GLAST+ aisladas del hipocampo de animales de 21 días muestran una reducción en la proliferación y en la síntesis proteica en comparación con las aisladas de animales de 3 días.</i>	72
<i>Figura R7: Las Q NSCs muestran un incremento en el contenido proteico en forma de agregados .</i>	77
<i>Figura R8: Las NSCs quiescentes presentan un incremento de proteínas que forman parte de las vesículas autofágicas y lisosomas.</i>	79
<i>Figura R9: El flujo autofágico no se encuentra afectado en las NSCs quiescentes.</i>	81
<i>Figura R10: Las células quiescentes presentan un incremento en el número de autofagosoma.</i>	82
<i>Figura R11: Las células quiescentes presentan un enriquecimiento en la expresión de genes de la vía autofagia-lisosoma.</i>	84
<i>Figura R12: Las células NSCs quiescentes muestran una mayor activación de AMPK.</i>	85
<i>Figura R13: El aumento de la maquinaria autofágica podría estar regulado por la activación de AMPK.</i>	85
<i>Figura R14: El aumento de β-oxidación descrito en las células quiescentes correlaciona con una disminución en ACC.</i>	86
<i>Figura R15: El bloqueo de la autofagia promueve una mayor activación de las células NSCs quiescentes.</i>	87
<i>Figura R16: La activación de AMPK reduce la activación de las NSCs quiescentes.</i>	89
<i>Figura R17: La modulación de EGFR afecta a la activación de las NSCs quiescentes.</i>	91
<i>Figura R18: Los agregados proteicos se acumulan en células GLAST+ aisladas del hipocampo de animales de 21 días y con el envejecimiento.</i>	93
<i>Figura R19: Las células GLAST+ acumulan agregados proteicos con el envejecimiento.</i>	94
<i>Figura R20: Los ratones NesCreERT2:Atg7F/F son un buen modelo para estudiar el papel de la autofagia en las NSCs de la SGZ en la etapa posnatal y adulta.</i>	98
<i>Figura R21: Durante la tercera semana posnatal una parte de las NSCs continúa entrando en quiescencia.</i>	99
<i>Figura R22: La autofagia es necesaria para el establecimiento de la quiescencia en la SGZ durante la etapa posnatal.</i>	100
<i>Figura R23: La vía autofágica parece no ser esencial para el mantenimiento de la población de células madre de la SGZ en condiciones basales durante la etapa adulta</i>	101
<i>Figura R24: La autofagia parece ser importante para el mantenimiento de la población de células madre neurales de la SGZ en condiciones pro-neurogénicas .</i>	102
<i>Figura R25: El tratamiento con Metformina no afecta a la población de células madre en condiciones basales.</i> ..	104

Discusión.....	105
<i>Figura D1: Caracterización de los modelos de entrada y salida de quiescencia.....</i>	<i>111</i>
<i>Figura D2: Efecto de la manipulación de la vía autofagia-lisosoma en la quiescencia y activación de las NSCs</i>	<i>114</i>
<i>Figura D3: Gráfico resumen del modelo propuesto</i>	<i>120</i>

RESUMEN

Resumen

El cerebro adulto de los mamíferos se caracteriza por la persistencia de dos nichos neurogénicos, la zona subventricular y la zona subgranular del giro dentado del hipocampo, donde se producen durante toda la vida nuevas neuronas que se integran en los circuitos cerebrales. La formación del nicho neurogénico hipocampal comienza en la etapa embrionaria tardía y finaliza en la etapa posnatal. Durante este periodo, las células madre neurales van a generar progenitores y estos a su vez neuronas granulares. Además, las células madre embrionarias se transforman en células madre neurales adultas, las cuales entran en un estado de arresto del ciclo celular denominado quiescencia. En la edad adulta, las células madre quiescentes son capaces de activarse para generar nuevas neuronas granulares funcionales. Las vías de degradación de proteínas son esenciales para mantener la homeostasis celular y tisular. En concreto, la vía autofagia-lisosoma está implicada en la regulación de la neurogénesis y en el control de la calidad del proteoma de las células madre.

En este trabajo, hemos tratado de elucidar el papel de la vía autofagia-lisosoma en el establecimiento y mantenimiento de la quiescencia y en la regulación de la proteostasis de las células madre neurales de la zona subgranular del hipocampo. Para ello, se realizaron experimentos *in vitro* utilizando cultivos celulares de células madre quiescentes y activas, y experimentos *in vivo* con ratones en los que se bloqueó la autofagia mediante una aproximación genética. Los resultados *in vitro* mostraron que las células madre quiescentes poseen un mayor contenido proteico acumulado en forma de agregados, a pesar de tener disminuida la traducción y tener incrementada la maquinaria autofágica. Los resultados funcionales *in vitro* sugieren que la autofagia puede tener un papel relevante en la regulación del estado de quiescencia. Por otro lado, los experimentos *in vivo* con ratones *knockout* condicionales (cKO) para el gen *Atg7*, necesario para la vía autofágica, mostraron un efecto sobre la población de células madre. La delección de *Atg7* en la etapa posnatal redujo la capacidad de entrada en quiescencia de las células madre y promovió su agotamiento. Además, la delección de *Atg7* en ratones adultos antes de la exposición a ejercicio voluntario, redujo la población de células madre en el nicho hipocampal.

En conjunto, estos resultados indican que en la etapa posnatal la autofagia es una vía esencial para la correcta formación del nicho neurogénico hipocampal, siendo necesaria para el establecimiento de la quiescencia de las células madre neurales. Un defecto en esta vía produce una sobreactivación de las células madre que puede conducir a su agotamiento. Por el contrario, en la edad adulta, la vía autofágica parece no ser esencial para el mantenimiento de la quiescencia en condiciones basales. Sin embargo, en condiciones pro-neurogénicas, como es el ejercicio físico voluntario, parece ser fundamental para el mantenimiento de la población de células madre. Estos resultados sugieren que la función de la vía autofagia-lisosoma en la regulación de las células madre neurales del hipocampo depende de la edad, siendo esta vía necesaria para el correcto establecimiento de la quiescencia durante el desarrollo posnatal.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, los avances en la investigación en Neurociencias han permitido conocer en mayor medida el funcionamiento del sistema nervioso y sus enfermedades asociadas. El proceso de división y diferenciación de las células madre neurales es esencial para la formación de nuevas neuronas y el mantenimiento de las propias células madre. El entendimiento de este proceso sienta las bases para comprender cómo se pueden generar nuevas neuronas funcionales en el contexto de un cerebro maduro, y nos da herramientas que pueden servir para el desarrollo de estrategias terapéuticas en envejecimiento y en enfermedades neurodegenerativas.

Neurogénesis

1. Neurogénesis embrionaria

La neurogénesis se define como el proceso de formación de nuevas neuronas funcionales a partir de células madre neurales (NSCs, del inglés *Neural Stem Cells*) y progenitores. Durante el proceso de gastrulación del embrión se distinguen tres capas germinales que darán lugar a los tejidos y órganos: ectodermo, mesodermo y endodermo. El ectodermo es la capa germinal más externa y está formada por progenitores neuroepiteliales, los cuales darán lugar al sistema nervioso. Durante el proceso de embriogénesis, los progenitores neuroepiteliales proliferan, el ectodermo se engrosa y aplanan, y se forma la placa neural. Ésta a su vez se transforma en una estructura tubular denominada tubo neural, en la que se distinguen las vesículas prosencéfalo, mesencéfalo y romboencéfalo (Purves *et al.*, 2001). Las células neuroepiteliales son NSCs altamente proliferativas y se dividen simétricamente para expandir el tejido. Los núcleos de estas células migran durante el ciclo celular, situándose en el lado apical más cercano al lumen del tubo neural durante la mitosis, y en la parte basal durante la fase S. Tras varias rondas de división, las células neuroepiteliales pasan a denominarse células de glía radial. Los somas y los procesos apicales de estas células se localizan en la zona ventricular, mientras que los procesos basales se extienden hacia la superficie externa. Estos procesos son utilizados por las neuronas recién nacidas como guías de migración hasta la superficie pial, donde se diferencian y forman las conexiones. (Bjornsson *et al.*, 2015). Las NSCs radiales embrionarias realizan divisiones asimétricas para renovarse y generar nuevas neuronas, ya sea de manera directa o a través de progenitores intermedios que proliferan y se diferencian. Este proceso de proliferación y diferenciación resulta en la expansión del prosencéfalo, que dará lugar al telencéfalo y, posteriormente, se convertirá en el cerebro y los bulbos olfatorios. Tras la etapa neurogénica, las NSCs también dan lugar a las células gliales del cerebro. Las NSCs de la mayoría de las regiones del sistema nervioso central desaparecen durante el desarrollo después de haber dado progenie. Sin embargo, en el cerebro adulto de diferentes especies, una población de NSCs prevalece restringida a dos áreas: la zona subventricular (SVZ) y la zona subgranular del giro dentado del hipocampo (SGZ) (Mira y Morante, 2020) (Figura I1).

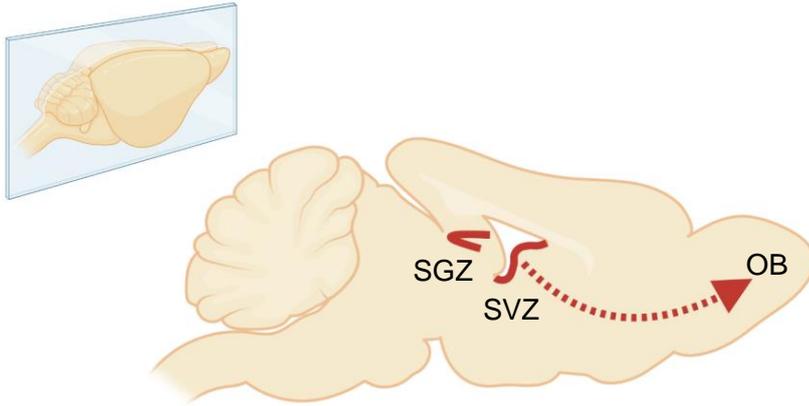


Figura I1: Nichos neurogénicos.

Ilustración de un corte sagital del cerebro adulto de ratón donde se representan dos principales nichos neurogénicos adultos, la zona subventricular adyacente a los ventrículos laterales (SVZ) y la zona subgranular del giro dentado del hipocampo (SGZ) (líneas rojas). La flecha representa el canal migratorio rostral (RMS) que conecta la SVZ con el bulbo olfatorio (OB).

2. Historia de la neurogénesis adulta

Durante gran parte del siglo XX, el dogma central de la neurobiología se basaba en los estudios de Ramón y Cajal, considerando la neurogénesis como un proceso embrionario que cesaba después del nacimiento (Colucci-D'Amato *et al.*, 2006). De hecho, no fue hasta los años 60 cuando aparecieron los primeros estudios que evidenciaban la posibilidad de que existiera neurogénesis en individuos adultos. Estos trabajos mostraban como, después de la administración de timidina tritiada a ratas, para marcar la replicación del ADN, se encontraban neuronas granulares marcadas en la zona granular del hipocampo, lo que hacía suponer que células indiferenciadas adquirirían la marca al dividirse y migraban a la capa granular (GCL) del hipocampo (Altman y Das, 1965, 1966, 1967). Sin embargo, estos trabajos fueron ignorados durante años y no fue hasta la década de los 80 cuando se volvió a plantear la existencia de la neurogénesis adulta.

El primer trabajo publicado mostraba cómo se generaban nuevas neuronas granulares en el hipocampo de ratas adultas que se incorporaban a las ya existentes en la GCL (Bayer *et al.*, 1982). Estas neuronas granulares marcadas con timidina tritiada eran capaces de prolongar sus axones a través del hipocampo (Stanfield y Trice, 1988). En 1983, se demostró la formación de células madre en la capa subependimaria de cerebro adulto de primates (Kaplan, 1983). Ese mismo año, otro trabajo, mostró la existencia de precursores neuronales en el núcleo de control de la voz cercano a la zona ventricular de las aves, al estudiar como los canarios hembra aumentan el tamaño este núcleo como respuesta a la administración sistémica de testosterona. La administración de timidina tritiada permitió observar que se generaban, entre otros tipos celulares, nuevas neuronas marcadas alrededor de este núcleo (Goldman y Nottebohm, 1983). Durante los años siguientes, se sucedieron distintos trabajos donde se detallaba la existencia de neurogénesis en dos zonas del cerebro de roedores adultos, la SVZ o subependimaria adyacente a los ventrículos laterales y la SGZ del giro dentado del hipocampo. Por un lado, se observó que células aisladas del estriado eran capaces de dividirse y diferenciarse a neuronas y astrocitos *in vitro*, (Reynolds y Weiss, 1992) lo que permitió identificar células de la SVZ como precursores neuronales (Lois y Alvarez-Buylla, 1993). Además, mediante estudios *in vivo*, se determinó que las células de la SVZ de ratones adultos migraban grandes distancias a través del canal migratorio rostral y se diferenciaban a neuronas en el bulbo olfatorio (Lois y Alvarez-Buylla, 1994). Por otro lado, se encontró que la mayoría de las células nacidas en la SGZ del hipocampo se diferenciaban a neuronas y migraban a la GCL (Cameron *et al.*, 1993). Este proceso de neurogénesis, aunque está presente en el cerebro adulto de roedores se ve drásticamente reducido con la edad (Kuhn *et al.*, 1996). A finales del siglo XX, se publicaron los trabajos que desencadenaron un cambio de paradigma (Sierra *et al.*, 2011). En 1997, se logró identificar el proceso de neurogénesis

adulta en el hipocampo de tres especies de primates distintas (Gould *et al.*, 1997) y al año siguiente en humanos (Eriksson *et al.*, 1998).

Actualmente, la existencia de neurogénesis adulta está ampliamente aceptada en una gran variedad de especies que incluyen peces, reptiles, aves y mamíferos (Ghosh, 2019). Sin embargo, existe una gran controversia entre los investigadores sobre la extensión de la neurogénesis en el cerebro humano adulto. Sanai y colaboradores (2011) demostraron que la SVZ y el canal migratorio rostral contienen gran cantidad de neuronas inmaduras durante los 18 primeros meses de edad que no están destinadas únicamente al bulbo olfatorio, sino que existe una corriente migratoria hacia la corteza prefrontal. A partir de ese momento, la actividad neurogénica de la SVZ disminuye hasta ser prácticamente inexistente en el cerebro adulto (Sanai *et al.*, 2011). Por su parte, en el hipocampo, se generan nuevas neuronas granulares en la edad adulta que renuevan a las existentes (Spalding *et al.*, 2013).

En el año 2018 se publicaron dos trabajos con resultados contradictorios sobre la actividad neurogénica del hipocampo en el cerebro adulto. El primer trabajo indicaba que, aunque el proceso de neurogénesis se reduce con la edad, persiste en humanos de edad avanzada a pesar de la disminución en el número de NSCs, la angiogénesis y la neuroplasticidad (Boldrini *et al.*, 2018). Unas semanas más tarde, se publicó otro trabajo que ponía en entredicho la existencia de neurogénesis hipocampal adulta. El análisis de progenitores neurales mostraba una reducción exacerbada de los progenitores proliferantes y neuronas jóvenes durante los primeros años de vida, siendo aparentemente inexistentes en la edad adulta (Sorrells *et al.*, 2018). Este estudio apoyaba otro trabajo anterior en el que se observaba una disminución generalizada de la neurogénesis en los dos nichos durante los primeros años de vida. Este fenómeno desaparecía en el cerebro adulto, siendo las células de la microglía las únicas que proliferaban en ambos nichos neurogénicos (Dennis *et al.*, 2016).

A pesar de la drástica reducción de la neurogénesis con la edad, numerosos estudios han identificado neuronas inmaduras en cerebros humanos a lo largo de la vida (Knoth *et al.*, 2010; Mathews *et al.*, 2017; Moreno-Jiménez *et al.*, 2019). Moreno-Jiménez y colaboradores (Moreno-Jiménez *et al.*, 2019) encontraron neuronas en diferentes estados de maduración en muestras obtenidas en condiciones altamente controladas. Este fenómeno también era detectable en muestras de pacientes de Alzheimer que, aunque presentaban neurogénesis en menor medida (Tobin *et al.*, 2019), las neuronas mostraban un desarrollo morfológico aberrante y cambios en la expresión de marcadores de diferenciación (Terreros-Roncal *et al.*, 2021). Un análisis bioinformático de expresión de ARN, analizando la expresión diferencial de marcadores neurogénicos, también apoyó la existencia de neurogénesis hipocampal mínima pero persistente en humanos adultos (Kumar *et al.*, 2020).

A pesar de que en los últimos años se ha propuesto que tal vez pueda existir neurogénesis adulta en otras regiones del cerebro, todavía es un campo de estudio muy controvertido. Por lo que continua en debate si en el hipotálamo, el tronco del encéfalo, el estriado, la amígdala y la sustancia negra se mantiene el proceso de neurogénesis en individuos adultos (Jurkowski *et al.*, 2020).

3. Formación de los nichos neurogénicos y establecimiento de la quiescencia

Como se ha comentado, las NSCs adultas en mamíferos se localizan en dos regiones concretas del cerebro: la SVZ y la SGZ del hipocampo. Las NSCs adultas de la SVZ se encuentran a lo largo de la pared de los ventrículos, en contacto con el lumen del ventrículo y el líquido cefalorraquídeo mediante un

proceso apical que atraviesa la monocapa de células endoteliales. Dan lugar principalmente a interneuronas del bulbo olfatorio y oligodendrocitos. Por otro lado, las NSCs de la SGZ del hipocampo generan neuronas granulares y en menor medida astrocitos. Las nuevas neuronas generadas en ambos nichos pueden integrarse en la red neuronal y procesar información con relevancia funcional.

Las NSCs de ambos nichos se pueden encontrar en un estado activo, cuando son capaces de proliferar y dar progenie, y en un estado inactivo de arresto del ciclo celular conocido como quiescencia (Morales y Mira, 2019; Urbán *et al.*, 2019). Además, trabajos recientes han descrito dos subpoblaciones de NSCs quiescentes. En la SVZ, Llorens-Bobadilla y colaboradores describen, en base al perfil molecular de un análisis de ARN de célula única, dos estados de quiescencia. Por un lado el estado *dormant* o de quiescencia profunda (*deep quiescence*) y el estado de *primed-quiescence* o preactivación (Llorens-Bobadilla *et al.*, 2015). Por otro lado, Harris y colaboradores encontraron que en la SGZ adulta las NSCs que se dividieron volvieron a un estado de quiescencia más superficial que las que nunca se habían dividido. Identificaron una población de NSCs que nunca había proliferado en la etapa adulta, denominadas de nuevo células quiescentes *dormant* o de quiescencia profunda (*deep quiescence*) y por otro lado, células que después de haberse activado vuelven a un estado de quiescencia, aparentemente menos profunda (*shallow quiescence*) denominadas quiescentes *resting*. Las células *resting* pueden activarse más rápidamente que las *dormant* y mantener la proliferación y la neurogénesis a largo plazo (Harris *et al.*, 2021).

Las NSCs quiescentes se distinguen de las activas, además de por encontrarse fuera del ciclo celular, por su transcriptoma y estado metabólico. Mientras que las activas están enriquecidas en ARN mensajeros de genes implicados en transcripción, traducción, y reparación del ADN, las quiescentes lo están en genes relacionados con la adhesión celular, la matriz extracelular, la comunicación célula-célula y el lisosoma (Morales y Mira, 2019). En relación al estado metabólico, las células quiescentes muestran, en general, una menor actividad metabólica, una baja tasa de transcripción de ARN y de síntesis de proteínas, y altos niveles de β -oxidación de ácidos grasos (Knobloch *et al.*, 2017). Por otro lado, tienen suprimida la diferenciación terminal y previenen la senescencia, mantienen la capacidad de reentrada en el ciclo celular y son capaces de activarse como respuesta a distintos estímulos (Urbán *et al.*, 2019).

La formación de los nichos neurogénicos adultos y el establecimiento de la quiescencia de las NSCs ocurren de manera distinta en cada uno de los nichos. La formación del nicho y el establecimiento de la quiescencia en la zona ventricular suceden en la etapa embrionaria. En el modelo de ratón, alrededor del día embrionario (E) E13,5-E15, una parte de la población de NSCs radiales embrionarias de la zona ventricular se divide y diferencia, mientras que la mayoría de las células se dividen lentamente y entran en un estado quiescente hasta su posterior reactivación principalmente en la etapa posnatal (Bond *et al.*, 2021; Fuentealba *et al.*, 2015; Furutachi *et al.*, 2015).

Las células radiales embrionarias que dan lugar a las NSCs adultas, también forman las células endoteliales diferenciadas que recubren los ventrículos y que son esenciales para la estructura del nicho y el contacto con el líquido cefalorraquídeo. Las NSCs radiales embrionarias sufren divisiones simétricas y asimétricas para formar el nicho neurogénico adulto (Ortiz-Álvarez *et al.*, 2019; Redmond *et al.*, 2019). Durante el desarrollo, las células endoteliales se forman por división asimétrica célula endotelial-célula madre adulta y por división simétrica célula endotelial-célula endotelial. Sin embargo, la población de NSCs adulta se forma principalmente por división asimétrica célula

ependimaria-célula madre adulta y un porcentaje muy pequeño por división simétrica célula madre adulta-célula madre adulta (Bond *et al.*, 2021; Ortiz-Álvarez *et al.*, 2019).

En cambio, la formación del nicho neurogénico hipocampal adulto es un proceso que se inicia en el desarrollo embrionario y continúa durante la etapa posnatal (Berg *et al.*, 2019). Alrededor del día E10,5 aparecen los primeros precursores en el neuroepitelio dentado, también denominada matriz primaria. Se trata de una pequeña región del palio medial flanqueada por el neuroepitelio amónico en la parte dorsal y el *cortical hem* en la zona ventral. Los neuroepitelios dentado y amónico generan neuronas del giro dentado y el cuerno de Amón (CA), respectivamente (Bond *et al.*, 2021).

El *cortical hem* se ha propuesto como un centro de señalización esencial para la correcta organización del hipocampo. A través de producción de las señales Wnt y BMP (proteína morfogénica osea), promueve la proliferación de los progenitores neurales y su especificación (Caronia-Brown *et al.*, 2014; Caronia *et al.*, 2010). Además, el *cortical hem* es el origen de las neuronas de Cajal-Retzius, células que, posteriormente, migran tangencialmente hacia la zona marginal de la corteza (Meyer, 2010). Las neuronas de Cajal-Retzius constituyen la fuente principal de la proteína reelina en la corteza y el hipocampo de mamíferos (D'Arcangelo *et al.*, 1995). En ratón, en los estadios embrionarios entre E12 y E14, el hipocampo muestra una intensa expresión de reelina en estas células (Choi *et al.*, 2006). En el hipocampo, la reelina tiene un papel fundamental en la correcta orientación de la glía radial, en la migración de los progenitores y la estabilización de las células granulares del giro dentado en su posición definitiva (Haas *et al.*, 2002; Weiss *et al.*, 2003). Por lo tanto, el *cortical hem* se considera una estructura clave para el correcto desarrollo del hipocampo y la reorganización cortical.

Tras la formación de la matriz primaria, todavía durante el desarrollo temprano del cerebro embrionario, los precursores del giro dentado proliferan y se extienden formando la matriz secundaria adyacente a la fimbria. Sobre día embrionario E15,5 se produce la primera ola de migración tangencial desde la pared del ventrículo donde se localiza la matriz secundaria hasta el giro dentado primitivo. En esta migración, los neuroblastos avanzan por el canal migratorio dentado hasta establecerse en el giro dentado primitivo donde se alinean para formar la capa externa de la futura GCL del giro dentado. Después del nacimiento, se produce la segunda ola de migración tangencial que da lugar a la capa interna de la GCL del hipocampo y a la matriz terciaria. Los neuroblastos de la matriz terciaria migran radialmente para formar la zona más interna de la GCL (Bond *et al.*, 2021) (Figura I2A). Por tanto, el hipocampo se forma de manera invertida siguiendo un patrón *outside-in*, donde se establecen primero las capas externas de giro dentado y posteriormente las internas (Mathews *et al.*, 2010). Este proceso es contrario a estratificación de las neuronas en la corteza, donde las neuronas más antiguas se localizan en capas internas y las nuevas neuronas migran hasta situarse en las capas más externas siguiendo un patrón *inside-out* (Angevine y Sidman, 1961).

Posteriormente, durante la primera semana posnatal los progenitores de la matriz terciaria sufren una transición a NSCs neurales adultas, las cuales adquieren su morfología característica dotada de un proceso radial, con su soma localizado en la SGZ. El pico máximo de proliferación sucede a día 3 posnatal (P3) y a partir de ese momento comienza una disminución de la proliferación asociada a la entrada en quiescencia (Berg *et al.*, 2019; Morales y Mira, 2019). Alrededor de P7, las NSCs muestran la orientación radial pero no es hasta después de P14 cuando se considera que la formación del giro dentado se ha completado (Nicola *et al.*, 2015).

Se ha descrito que tanto las quimiocinas reelina y SDF-1 como sus receptores están implicadas en la migración de los progenitores (Frotscher *et al.*, 2003; Mimura-Yamamoto *et al.*, 2017). Durante las

oleadas de migración, además de las células de Cajal-Rezius, existe un andamiaje glial que facilita la migración de los progenitores neurales. Parte de este andamiaje conecta el neuroepitelio dentado con el giro dentado en formación a través de la fimbria y sirve para la migración de la matriz primaria, secundaria y terciaria (Barry *et al.*, 2008; Caramello *et al.*, 2021). Por otro lado, el andamiaje glial supragranular se origina en el neuroepitelio dentado y facilita la migración de las células de la matriz terciaria y la distribución de las neuronas granulares en el brazo superior e inferior del giro dentado (Heng *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013; Noguchi *et al.*, 2019). Además, también se ha visto un aporte de progenitores que depende de Sonic Hedgehog y que se relocalizan a partir de E17,5 desde el hipocampo ventral hacia el dorsal, contribuyendo a la población final de NSCs de la SGZ adulta.

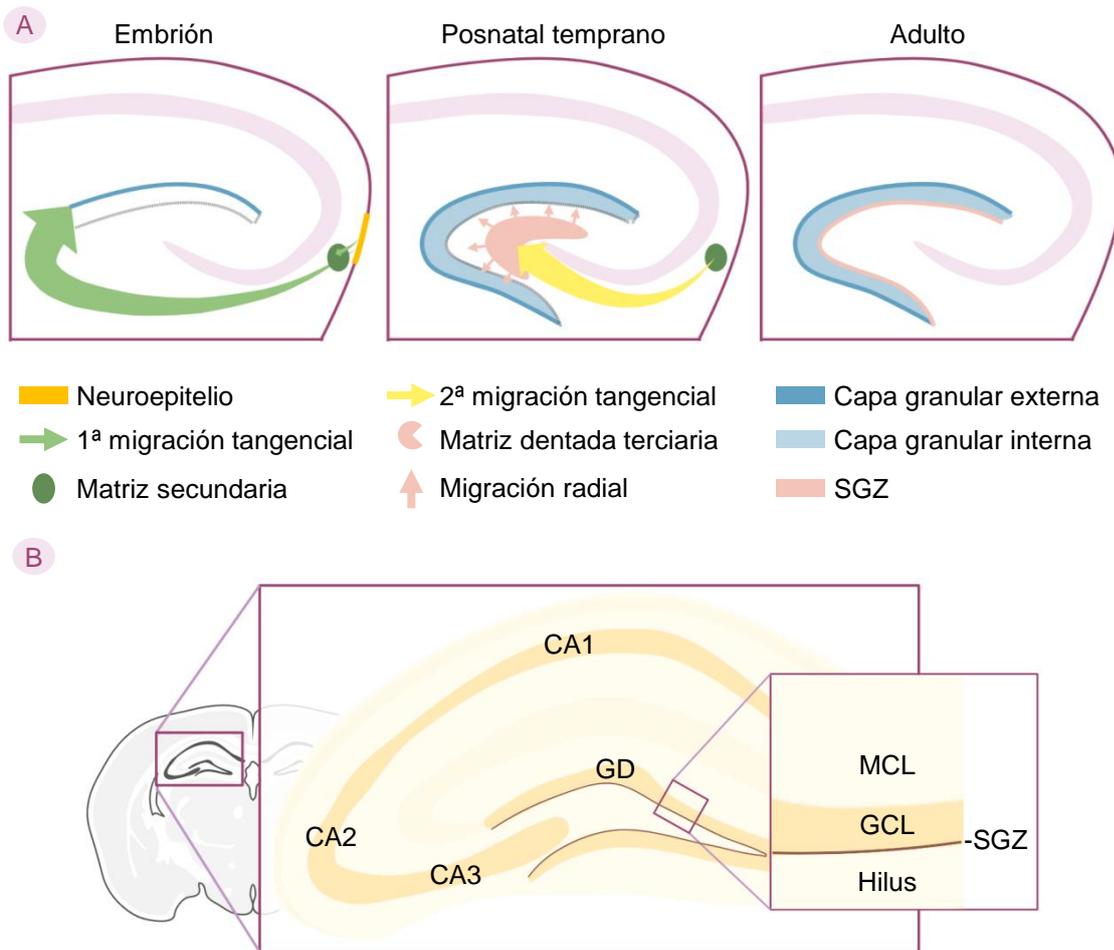


Figura I2: Formación y estructura del giro dentado del hipocampo.

(A) Esquema de la formación del giro dentado del hipocampo. Se representan las tres olas de migración. En primer lugar se forma la capa externa de la capa granular del giro dentado y finalmente la capa interna siguiendo el patrón *outside-in*. Figura adaptada de Piatti *et al.*, 2006. **(B)** Estructura del hipocampo y ampliación del giro dentado. GD, giro dentado; CA1, CA2, CA3, cuerno de Amón 1, 2, 3; MCL, capa molecular del hipocampo; GCL, capa granular del hipocampo; SGZ, zona subgranular del hipocampo.

Finalmente, una vez concluido el desarrollo posnatal, en el hipocampo adulto se distinguen tres estructuras: el subículo (área de transición entre el hipocampo y la corteza entorrinal), el cuerno de Amón (con tres regiones denominadas CA1, CA2, CA3) y el giro dentado, en el que distinguimos a su vez la GCL (donde se localizan las neuronas granulares), la capa molecular (a la que llegan las dendritas de las neuronas granulares) y el hilus. Es en la SGZ, limítrofe con la GCL y el hilus, donde se localizan el soma o cuerpo celular de las NSCs neurales adultas, que extienden su proceso radial a

través de la GCL hasta llegar a la capa molecular (Figura I2B). Por su morfología característica, similar a la de la glía radial embrionaria, se denominan también NSCs *radial glia-like* (RGLs).

4. Neurogénesis adulta en los nichos

Las NSCs neurales adultas pueden dar lugar a nuevas neuronas funcionales. Cuando las NSCs, que se encuentran en un estado quiescente, se activan, producen progenitores intermedios con capacidad de amplificarse y diferenciarse a neuroblastos durante el proceso de neurogénesis adulta. A su vez, los neuroblastos pueden dividirse y diferenciarse a neuronas, generando neuronas granulares en el hipocampo o interneuronas en el bulbo olfatorio (Morrens *et al.*, 2012). Las NSCs adultas se regulan principalmente por su microambiente o nicho. Los nichos neurogénicos adultos poseen una citoarquitectura característica donde la comunicación celular se realiza a través de contactos intercelulares y de moléculas secretadas como pueden ser factores de crecimiento, citoquinas y hormonas, entre otras (Bátiz *et al.*, 2015).

La nomenclatura que hace referencia a los estados de diferenciación de las NSCs y su progenie celular es específica para cada uno de los nichos neurogénicos (Martínez-Cerdeño y Noctor, 2018). En la SVZ, las NSCs son denominadas células tipo B1 y se localizan en la pared de los ventrículos laterales. La morfología característica que poseen les permite estar en contacto con el líquido cefalorraquídeo y los vasos sanguíneos a través de su proceso apical y basal, respectivamente. Estas células dan lugar a progenitores intermedios, también conocidas como células C, que tras tres-cuatro divisiones van a generar, principalmente, neuroblastos o células A. Los neuroblastos se localizan en el canal migratorio rostral donde se dividen alrededor de dos veces y migran desde la SVZ hacia el bulbo olfatorio (Ponti *et al.*, 2013). Una vez en el bulbo olfatorio, se diferencian a interneuronas inhibitorias de tipo granular o periglomerular (Lim y Alvarez-Buylla, 2014) (Figura I3A). Estas interneuronas, resultantes de la neurogénesis adulta de la SVZ, están relacionadas con el procesamiento de la información olfativa (Sakamoto *et al.*, 2014).

Por otro lado, las NSCs de la SGZ del hipocampo se denominan células de tipo glía radial (RGLs) o células tipo 1. Estas células son heterogéneas distinguiendo, en base a criterios morfológicos, una población mayoritaria de células de tipo 1α (76%) y una población de células de tipo 1β (24%). Las células tipo 1α poseen un proceso radial que atraviesa la GCL y se ramifica en la capa molecular. Estas células proliferan y dan lugar a neuronas, astrocitos y células tipo 1β . Sin embargo, las células tipo 1β no proliferan y pueden representar un estado intermedio entre las α y astrocitos (Gebara *et al.*, 2016).

Estudios de trazado de linaje, empleando lentivirus y retrovirus, han demostrado que las NSCs que expresan el factor de transcripción Sox2 son multipotentes, tanto a nivel de población como de célula única, de forma que pueden dar lugar no solamente a neuronas sino también a astrocitos (Suh *et al.*, 2007). Además, las NSCs expresan el gen proneural *Ascl1* que regula múltiples genes diana para promover la salida del ciclo celular y la diferenciación neuronal y es necesaria su degradación a nivel de proteína para que las NSCs vuelvan a quiescencia (Castro *et al.*, 2011; Urbán *et al.*, 2016). En la cascada neurogénica, las células tipo 1α generan progenitores neurales (NPCs) intermedios, que se denominan primero células de tipo 2a y después, células tipo 2b cuando el linaje neuronal está determinado. A partir de éstas últimas surgen los neuroblastos migratorios o células tipo 3, que migran una distancia muy corta hacia la GCL, donde salen de ciclo y se diferencian a neuronas granulares (Hastings y Gould, 1999; Kempermann *et al.*, 2015; Markakis y Gage, 1999) (Figura I3B).

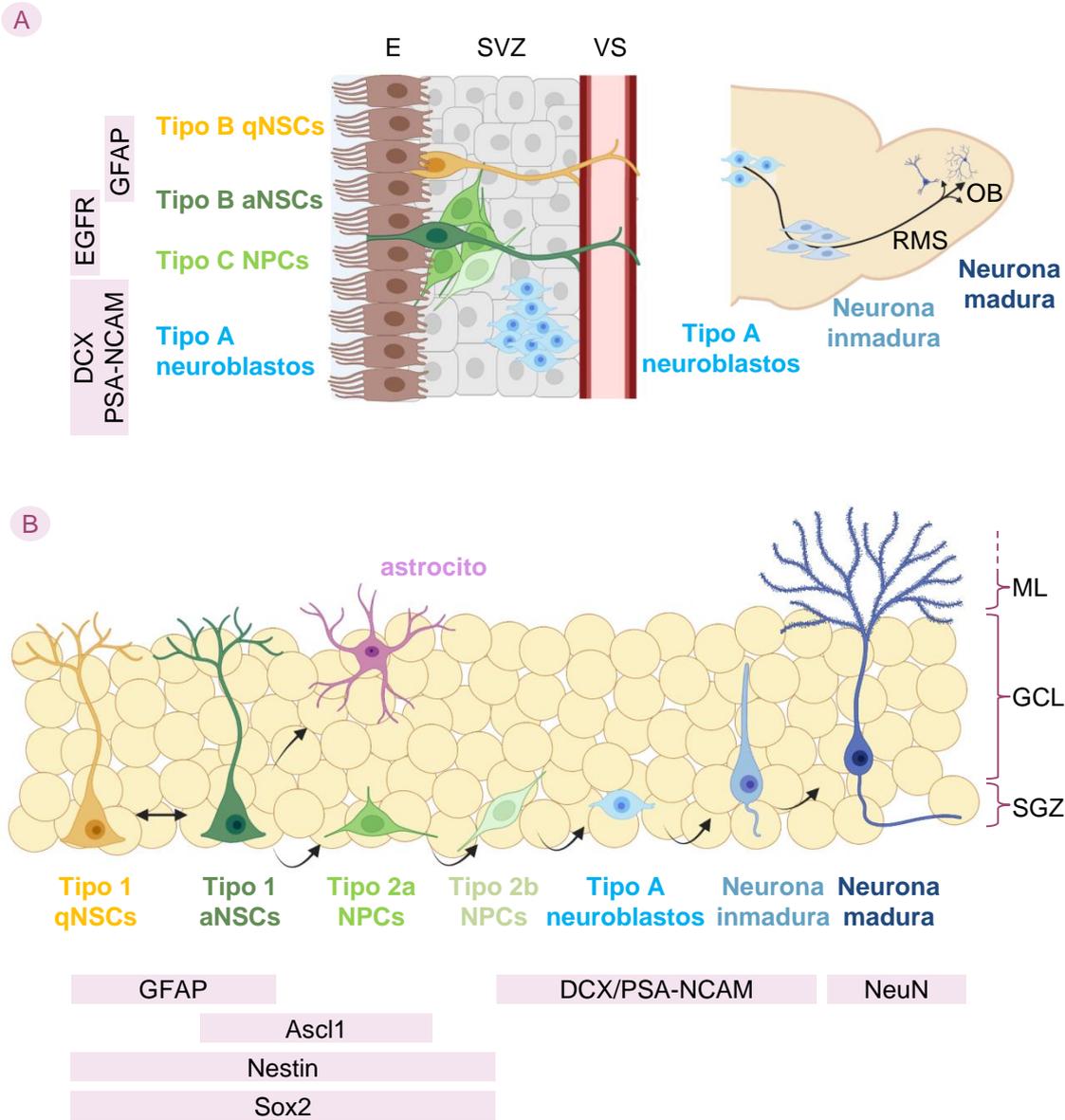


Figura I3: Nichos neurogénicos adultos.

(A) A la izquierda, se representa esquemáticamente del nicho neurogénico de la zona subventricular (SVZ). La SVZ se localiza debajo de una capa de células multiciliadas (E) que recubre los ventrículos. Las NSCs tipo B contactan con el lumen del ventrículo, el líquido cefalorraquídeo y los vasos sanguíneos (VS). También se representan otros tipos de células de la cascada neurogénica (células tipo C y tipo A). Los cuadros de color lila indican marcadores específicos para cada tipo de célula de la cascada neurogénica. A la derecha, se representa la migración tangencial de los neuroblastos a través del canal migratorio rostral (RMS) hacia el bulbo olfatorio (OB). En el OB las células migran radialmente y se diferencian en distintos subtipos de interneuronas maduras. **(B)** Ilustración del nicho neurogénico de la zona subgranular (SGZ). El soma de las NSCs (células tipo 1) se localiza en SGZ, región inferior de la capa granular (GCL). Su proceso radial cruza la GCL y se ramifica en la capa molecular (ML). Se representan otros tipos celulares de la cascada neurogénica. En los cuadros de color lila se indican marcadores de cada tipo celular.

Durante la transición de progenitor intermedio a neuroblasto, la mayoría de células mueren por apoptosis durante los cuatro primeros días y son eliminadas rápidamente mediante fagocitosis por la microglía del nicho neurogénica. Por tanto, únicamente una pequeña proporción de neuroblastos será capaz de dar neuronas funcionales que se integren en el circuito hipocampal (Sierra *et al.*, 2010). Las neuronas granulares extienden las dendritas a la capa molecular y el axón a la capa CA3 del

hipocampo. Tienen un crecimiento dendrítico y axonal rápido durante los 21 días posteriores al nacimiento, y después, sigue un crecimiento más lento durante los siguientes dos meses (Sun *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2006). Las nuevas neuronas finalmente forman sinapsis funcionales con sus neuronas diana, quedando completamente integradas en los circuitos hipocampales (Toni *et al.*, 2008).

El hipocampo está asociado a funciones de aprendizaje, memoria, procesamiento espacial, y comportamiento emocional. Está descrito que tareas de aprendizaje potencian la neurogénesis hipocampal adulta (Gould *et al.*, 1999). Algunas de estas funciones se han asociado a una localización espacial en el hipocampo. De hecho, las regiones dorsal y ventral del hipocampo muestran diferencias en la expresión génica de genes asociados a distintas funciones hipocampales (Lee *et al.*, 2017). A grandes rasgos, el hipocampo dorsal es responsable del procesamiento cognitivo mientras que el ventral está implicado en el procesamiento emocional. Sin embargo, existen funciones como el procesamiento espacial en las que el hipocampo funciona como una única estructura (Lee *et al.*, 2019). El giro dentado se ha descrito como estructura esencial para la discriminación de patrones, lo que permite diferenciar representaciones o recuerdos similares (Bakker *et al.*, 2008). Sin embargo, trabajos más recientes sugieren que el giro dentado aunaría distintos tipos de información sensorial que lleguen al hipocampo (Lee y Jung, 2017).

El giro dentado es el componente principal del circuito trisináptico hipocampal y recibe información de la corteza entorrinal a través de la proyección principal de la corteza entorrinal denominada vía perforante. Las neuronas de la corteza entorrinal envían sus proyecciones a las neuronas granulares del giro dentado, las cuales a su vez proyectan los axones hacia las neuronas piramidales de la CA3 formando la denominada vía de las fibras musgosas. Los axones de las células piramidales de la CA3 proyectan a las neuronas piramidales de la CA1 mediante las colaterales de Schaffer. Por último la información pasa al subículo y de nuevo a la corteza entorrinal. Además, la corteza entorrinal a través de la vía perforante también proyecta al giro dentado y a la CA1 a través de la vía temporoammonica o de la vía perforante (Basu y Siegelbaum, 2015) (Figura I4)

Durante el proceso de neurogénesis, las NSCs pueden activarse y autorrenovarse o dar progenie destinada a diferenciarse. En cada una de las etapas, las células poseen unas características propias del estado en el que se encuentran, que se refleja en la expresión de distintos marcadores. Sin embargo, identificar un linaje celular con único marcador es complicado ya que la expresión de los marcadores es un proceso gradual que abarca más de un estadio de diferenciación. En este sentido, las células tipo 1 se distinguen por la expresión entre otros marcadores de GFAP, Sox2, Nestina y GLAST. Las células tipo 2 expresan Tbr2, pero las células tipo 2a expresan además SOX2 y Nestina, y las células tipo 2b, Nestina, NeuroD1 y doblecortina (DCX). Las células tipo 3 expresan DCX, NeuroD1 y calretinina. Las neuronas inmaduras expresan DCX, NeuroD1, calretinina y Prox1, y las neuronas granulares maduras expresan NeuN, Tuj1 y Calbindina. Por ello, es necesario basarse en combinaciones de marcadores y cambios morfológicos para identificar las distintas etapas del proceso neurogénico (Zhang y Jiao, 2015) (Figura I3A, B)

5. Mantenimiento de las NSCs en los nichos adultos

Cómo se dividen las NSCs radiales, cómo se diferencian y dan progenie, y cómo se mantienen son puntos de interés que se han abordado empleando distintas estrategias experimentales (Denoth-Lippuner y Jessberger, 2021). Sin embargo, uno de los aspectos controvertidos que continúa en debate es la dinámica de las NSCs en el cerebro adulto y la contribución de su capacidad de autorrenovación al

mantenimiento de un reservorio de estas células, a pesar de la reducción en número asociada al envejecimiento.

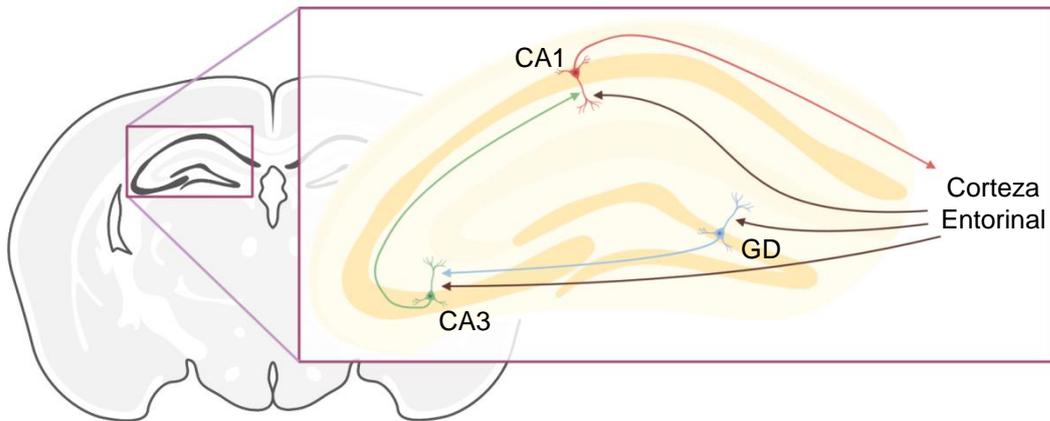


Figura I4: Circuito trisináptico del hipocampo.

Esquema simplificado del circuito que conectan la corteza entorrinal con el hipocampo. La corteza entorrinal proyecta al giro dentado (GD) a través de la vía perforante. El giro dentado proyecta a la CA3 a través de las fibras muscosas y la CA3 a la CA1 mediante las fibras colaterales de Schaffer. A su vez, la CA3 y la CA1 reciben señales directamente de las neuronas piramidales de la corteza entorrinal a través de la vía perforante. negro-vía perforante, azul-fibras muscosas, verde-fibras colaterales de Schaffer, rojo-señalización subíctulo-corteza entorrinal.

En el caso de la SGZ, en el año 2011, se propusieron dos modelos contrarios que explicaban el mantenimiento de una parte de la población de NSCs y el agotamiento de la mayoría de estas células con el paso del tiempo en el hipocampo del cerebro adulto, utilizando las técnicas de rastreo de linaje. Por un lado, se describió el *modelo de células madre desechables* (“*disposable stem cell model*”), según el cual una célula madre que sale del estado de quiescencia produce una serie limitada de divisiones asimétricas. Estas divisiones generan progenie destinada a convertirse en neuronas y, tras un número reducido de divisiones, se desencadena el agotamiento de la célula madre activa que posiblemente se diferencia terminalmente a astrocito o da lugar a un tipo de célula madre presuntamente senescente (Encinas *et al.*, 2011; Martín-Suárez *et al.*, 2019). Por otro lado, se publicó el *modelo de autorrenovación a largo plazo* (“*long-term self-renewal model*”) según el cual las NSCs pueden dividirse de manera simétrica y asimétrica. Mediante estos dos tipos de divisiones se generan clones de células destinadas a dar progenie diferenciada y clones de NSCs que se autorrenuevan, dando dos NSCs. Éstas células serían capaces de volver al estado de quiescencia y compensar la pérdida de NSCs. De esta manera, el balance entre los dos tipos de división impide el agotamiento total de las NSCs (Bonaguidi *et al.*, 2011).

Por otra parte, un trabajo más reciente sugiere que las NSCs de la SVZ utilizan dos tipos de divisiones para mantener el conjunto de NSCs. Mediante técnicas de marcaje clonal, observaron que entre un 20-30% de las células tipo B se autorrenuevan mediante división simétrica antes de diferenciarse. Sin embargo, el 70-80% de las células se dividen simétricamente para generar progenitores tipo C, lo que produce un agotamiento de las NSCs a largo plazo (Obernier *et al.*, 2018).

Por último, cabe destacar que la utilización de la microscopía de dos fotones ha permitido obtener imágenes longitudinales de cerebro de un ratón vivo a lo largo del tiempo. Con esta técnica se ha demostrado que durante la etapa adulta en la SGZ existe una población de NSCs residual con gran heterogeneidad, que se dividen tanto simétrica como asimétricamente (Pilz *et al.*, 2018). La

combinación de este tipo de microscopía con el marcaje genético de las NSCs a través de la recombinación condicional dirigida por los elementos reguladores de distintos factores de transcripción (animales *Gli1-Cre^{ERT2}* y *Ascl1-Cre^{ERT2}*), identificó dos poblaciones de NSCs con un perfil transcripcional muy similar, analizado mediante RNAseq de célula única, pero con un comportamiento diferente. Por un lado, una población de NSCs radiales marcadas con *Ascl1-Cre^{ERT2}* la cual una vez activada genera principalmente células no radiales, las cuales a su vez amplifican mediante divisiones simétricas y diferencian terminalmente a los tres meses de su activación. Y, por otro lado, una población de NSCs marcadas con *Gli1-Cre^{ERT2}* con capacidad de autorrenovación a largo plazo (Bottes *et al.*, 2021; Pilz *et al.*, 2018). El rastreo clonal ha permitido proponer un nuevo *modelo secuencial* para explicar la rápida caída del número de NSCs en la etapa posnatal y la reducción ralentizada con el envejecimiento. Este modelo sugiere un cambio en el comportamiento de las NSCs con la edad (Harris *et al.*, 2021). Se ha descrito que con la edad las NSCs quiescentes se comportan de distinta manera. Por un lado, en animales jóvenes hay poco retorno a quiescencia por lo que las NSCs que se activan se agotan más rápido. En cambio, a partir de los 6 meses de edad, las NSCs que se activan son más propensas a volver al estado *resting* y se ralentiza su agotamiento, pero aun así eventualmente terminan agotándose. Por otro lado, las *dormant* NSCs cada vez se vuelven más quiescentes, resultando mucho más difícil su activación. Este fenómeno resulta en una alteración de la homeostasis del nicho hipocampal durante el envejecimiento (Ibrayeva *et al.*, 2021).

6. Regulación de la neurogénesis hipocampal adulta

La neurogénesis en el hipocampo adulto se regula tanto por señales intrínsecas de las propias NSCs, como por señales procedentes de otros tipos celulares del nicho, por señales circulantes que alcanzan el cerebro a través de la vasculatura, por la actividad neuronal y por estímulos externos (Choe *et al.*, 2015; Urbán *et al.*, 2019). En relación a estos últimos, el ejercicio físico voluntario es uno de los métodos más efectivos para promover la neurogénesis hipocampal adulta. En ratones, el ejercicio mediante una rueda de correr produce un aumento de la neurogénesis en el hipocampo, favoreciendo la proliferación, supervivencia y diferenciación. Además, mejora el aprendizaje y la memoria en tareas dependientes del hipocampo (van Praag *et al.*, 1999). En un estudio realizado empleando animales transgénicos Sox2-GFP para visualizar la población de NSCs, se ha visto que este ejercicio produce una activación de las NSCs radiales, que a su vez provoca un aumento de precursores neuronales DCX⁺. Sin embargo, el número de células SOX2⁺ se mantiene constante. Por tanto, se produce un incremento de la división celular asimétrica de las NSCs, de manera que se logra mantener el reservorio de NSCs (al menos durante el tiempo de duración del ejercicio) a la vez que se forman nuevas neuronas (Suh *et al.*, 2007).

Correr también tiene un efecto en la supervivencia y maduración de las nuevas neuronas (Snyder *et al.*, 2009). Por un lado, aumenta la longitud dendrítica y la complejidad en el giro dentado así como la densidad de espinas dendríticas (Eadie *et al.*, 2005). Por otro lado, combinando el marcaje retroviral con el marcaje retrógrado trans-sináptico facilitado por el virus de la rabia se ha visto que se reorganizan nuevos circuitos neuronales con el objetivo de facilitar la codificación de información contextual, espacial y temporal. Además, se ha descrito que correr incrementa la neurogénesis solamente en la parte dorsal del hipocampo (Vivar *et al.*, 2016). A pesar de que con la edad la neurogénesis adulta se ve drásticamente reducida, el ejercicio físico aún es capaz de aumentar la proliferación y generar un mayor número de neuronas maduras (Kronenberg *et al.*, 2006).

Existen otros condicionantes ambientales que regulan positiva y negativamente la neurogénesis. Un entorno enriquecido, con mayor interacción social y ambiental, favorece la formación de nuevas neuronas, aumenta el tamaño del giro dentado y mejora las tareas de aprendizaje espacial. Sin embargo, el estrés disminuye el número de neuronas en el giro dentado a través de la señalización por corticoesteroides (Toda y Gage, 2017). Además, el deterioro cognitivo asociado a la edad, la enfermedad de Alzheimer, los trastornos depresivos y de ansiedad, y la epilepsia pueden afectar a la neurogénesis pudiéndose explicar algunos de los síntomas de estas enfermedades por este motivo (Toda *et al.*, 2019). Trabajos en los que utilizan modelos de estas enfermedades indican que el enriquecimiento ambiental podría ser beneficioso (Laviola *et al.*, 2008).

A nivel de señalización celular, la regulación de la neurogénesis hipocampal adulta está mediada por numerosas moléculas como son BMPs, Wnt, Notch o Sonic Hedgehog a través de múltiples receptores. Las BMPs son un subgrupo de la familia de citoquinas del factor de crecimiento transformante β (TGF β) altamente expresadas en el cerebro adulto que ejercen acciones principalmente de manera local y cuyo efecto depende del momento del desarrollo, del tipo celular diana y del equilibrio entre las BMPs y sus antagonistas. Las BMPs pueden actuar a través de las proteínas Smad (vía canónica) o de manera independiente a ellas (vía no canónica) (Choe *et al.*, 2015).

Las BMPs son esenciales en la regulación de la proliferación/quiescencia de las NSCs (Bonaguidi *et al.*, 2008; Bond *et al.*, 2014; Mira *et al.*, 2010). Experimentos *in vitro* establecieron que la adición de BMP4 al medio inducía la quiescencia en cultivos de NSCs al activar la vía canónica de las BMPs a través del receptor BMPR1A (Mira *et al.*, 2010). La señalización endógena de BMPs limita la proliferación y autorrenovación en cultivos de NSCs (Bonaguidi *et al.*, 2008). *In vivo*, se demostró que las NSCs radiales expresan BMPR1A y que las NSCs quiescentes tienen activa la vía canónica de BMPs, sugiriendo que la activación de esta vía promueve la quiescencia. De hecho, la infusión del antagonista de BMPs Noggin durante 7 días, la delección de *Bmpr1a* en las NSCs que expresan Sox2 mediante lentivirus y la delección condicional de *Smad4* en las células madre que expresan GLAST incrementó la proliferación de las NSCs. La infusión con Noggin no incrementó el número total de NSCs pero si el de las proliferantes que habían adquirido la marca de 5-bromo-2'desoxiuridina (BrdU) (un análogo de la timidina que se incorpora en las células que se encuentran en fase S del ciclo celular cuando se administra) sugiriendo que Noggin promueve la división asimétrica de las NSCs. El efecto a largo plazo de la infusión de Noggin durante 7 días, se evaluó con un doble marcaje con los análogos de timidina CldU e IdU. Este análisis permitió detectar el destino de las células marcadas con CldU tras la infusión con Noggin y el estado proliferativo de las células marcadas con IdU a los 21 días de la infusión. Los resultados mostraron que la infusión de Noggin, en primera instancia, produce un incremento de la proliferación y de la diferenciación. Sin embargo, a largo plazo resulta en un agotamiento de las NSCs y en la reducción de la neurogénesis (Mira *et al.*, 2010). Por el contrario la sobreexpresión de BMP4 con un lentivirus no solo redujo el número de progenitores Sox2 activos sino que previno que la población de neuroblastos DCX⁺ se activara, sugiriendo que la señalización por BMPs activa la quiescencia en progenitores tempranos y saca de ciclo a los progenitores tardíos (Bond *et al.*, 2014), tal vez para favorecer su diferenciación terminal.

Se cree que las BMPs son generadas de manera local por las NSCs mientras que las células de la GCL secretan Noggin. Se ha propuesto que las señales ambientales regulan la neurogénesis mediante el incremento o disminución de Noggin y BMPs, que produce cambios en el balance entre las dos moléculas. (Bonaguidi *et al.*, 2008). Por ejemplo, se ha descrito que el ejercicio voluntario que activa la neurogénesis lo hace a través de la regulación de la vía de BMPs. Después de cuatro días de exposición

a ejercicio voluntario, se reduce la expresión de BMP4 en el hipocampo y se incrementa la expresión de Noggin, lo que resulta en una potenciación de la proliferación y de la neurogénesis. Además, experimentos de comportamiento en ratones transgénicos que sobreexpresan Noggin o a los que se les infundía Noggin en el cerebro mostraban mejoras en los test cognitivos en comparación con los ratones en los que se sobreexpresaba BMP4 (Gobeske *et al.*, 2009).

La vía de las BMPs también tiene un papel en el envejecimiento. Con la edad, se produce una desregulación de la vía de las BMPs, aumentando la expresión de BMPs y de las proteínas Smad en el hipocampo, lo que explica, al menos en parte, la disminución de la neurogénesis asociada a la edad (Meyers *et al.*, 2016; Yousef *et al.*, 2015). De hecho, tanto el silenciamiento de Smad1 con un vector lentiviral como la delección de *Bmpr1a* mediante un lentivirus de Cre recombinasa potenció la activación de las NSCs, y por tanto la neurogénesis (Yousef *et al.*, 2015), y la inhibición de la señalización por BMPs mejoró las tareas cognitivas dependientes de hipocampo (Meyers *et al.*, 2016).

A nivel de receptores, las células quiescentes se caracterizan por un incremento en la expresión de múltiples receptores de membrana al menos a nivel de ARN mensajero (Shin *et al.*, 2015), que ha sido interpretada como un mecanismo que permitiría una rápida respuesta por parte de las NSCs ante cambios que requieran, por ejemplo, una activación de las células. Sin embargo, uno de los marcadores clásicos de activación de las NSCs, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), se acumula en las NSCs activas y progenitores tempranos. Mediante distintas cascadas de señalización, este receptor promueve la proliferación y la supervivencia de las NSCs y reprime la diferenciación, regulando así a las NSCs y los progenitores (Urbán *et al.*, 2019).

La utilización de los ligandos EGF y FGF2 ha permitido el aislamiento y expansión de las NSCs *in vitro*, tanto en cultivos en monocapa en sistemas adheridos como en suspensión en forma de neuroesferas. En estos cultivos, la quiescencia puede ser inducida eliminando EGF del medio y suplementándolo con BMP4. La presencia de BMP4 activa al receptor BMPR1A, que fosforila a la proteína SMAD1 la cual interacciona con SMAD4 y se transloca al núcleo para activar genes diana que provocan la entrada en quiescencia. Este efecto se puede revertir eliminando la BMP4 del medio, lo que desencadena la reactivación de las células quiescentes (Mira *et al.*, 2010). Los sistemas *in vitro* en los que se puede inducir la entrada quiescencia o promover la salida de este estado mediante el tratamiento con BMP4 son una herramienta ampliamente utilizada para el estudio de este proceso en las NSCs (Blomfield *et al.*, 2019; Knobloch *et al.*, 2017; Leeman *et al.*, 2018; Martynoga *et al.*, 2013; Mukherjee *et al.*, 2016).

En los últimos años se ha descubierto que el mantenimiento de las células madre de diferentes tejidos, su activación y supervivencia está regulado, en parte, por una correcta proteostasis (Navarro Negredo *et al.*, 2020). La proteostasis u homeostasis proteica es el proceso de regulación del contenido proteico dentro de la célula. Es un proceso que interconecta múltiples vías relacionadas con la síntesis de proteínas, el plegamiento y la degradación proteica. A nivel de las NSCs del hipocampo adulto, se ha visto que la activación de genes relacionados con la síntesis de proteínas precede a la activación de las células quiescentes, mostrando las NSCs *resting* una mayor expresión de genes ribosomales, de procesamiento de ARN y de traducción en comparación con las NSC *dormant* (Harris *et al.*, 2021; Shin *et al.*, 2015).

Por otro lado, la vía de degradación proteica de la autofagia-lisosoma también está implicada en el mantenimiento de las células madre adultas. Además, esta vía regula la maduración de las nuevas neuronas y la muerte autofágica. A pesar de los avances, los estudios en los que se evalúa el papel de la autofagia específicamente en las NSCs en la etapa posnatal y adulta son escasos y en ocasiones

contradictorios (Casares-Crespo *et al.*, 2018). El papel de la autofagia se va a tratar en profundidad en los siguientes apartados.

Autofagia

Las principales vías de degradación de proteínas en células eucariotas son el sistema ubiquitina-proteasoma y la autofagia. Estos sistemas eliminan proteínas desplegadas o mal plegadas con el objetivo de mantener la homeostasis celular y tisular. En general, las proteínas de vida media corta y las proteínas solubles son degradadas por el proteasoma, mientras que las de vida media larga y agregados insolubles son eliminadas por autofagia (Hershko y Ciechanover, 1998; Pratt *et al.*, 2002).

La autofagia es un proceso de degradación y reciclaje intracelular mediado en última instancia por los lisosomas. Los lisosomas son orgánulos rodeados por una membrana que contienen gran variedad de enzimas hidrolíticas capaces de degradar macromoléculas como ácidos nucleicos, proteínas y polisacáridos (Parzych y Klionsky, 2014). La activación de esta vía suele estar asociada a distintas formas de estrés como son la ayuno, la hipoxia, el tratamiento con ciertos fármacos, infecciones, la restricción a factores de crecimiento o la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Casares-Crespo *et al.*, 2018).

A mitad de los años 50, De Duve y colaboradores encontraron fosfatasa ácida contenidas dentro un orgánulo en hígado de rata, lo que permitió descubrir la existencia de los lisosomas (De Duve *et al.*, 1955). Años más tarde, se describieron vesículas que, al contrario que los lisosomas, eran de doble membrana y no contenían enzimas hidrolíticas. Estas vesículas, que podían contener una porción de citoplasma y diferentes orgánulos, se denominarían más adelante autofagosomas (Arstila y Trump, 1968). Basándose en los estudios publicados hasta la fecha, en 1963, Christian de Duve acuñó el término “autofagia” (De Duve *et al.*, 1963). Desde entonces se ha descubierto que es un proceso altamente conservado en eucariotas basado en movimientos dinámicos de vesículas de membrana y cuyo objetivo es obtener los nutrientes necesarios para realizar funciones vitales y eliminar material citosólico dañino, como mitocondrias disfuncionales y agregados de proteínas (Casares-Crespo *et al.*, 2018; Ohsumi, 2014). Gran parte del conocimiento actual sobre la base molecular de la autofagia se debe a Yoshinori Ohsumi. Su minucioso trabajo dedicado al estudio de la autofagia en levaduras ha permitido la identificación de múltiples genes (*Autophagy related genes*, ATG) implicados a lo largo de todo el proceso (Tooze y Dikic, 2016).

1. Tipos de autofagia

En células de mamífero se han descrito tres formas distintas de autofagia: microautofagia, autofagia mediada por chaperonas y macroautofagia (Ohsumi, 2014; Parzych y Klionsky, 2014) (Figura 15). La microautofagia captura el material a degradar, que se localiza libre en el citoplasma o contenido en endosomas, mediante protusión o invaginación de la membrana lisosomal al interactuar este con receptores de la membrana lisosomal (Oku y Sakai, 2018). La autofagia mediada por chaperonas es la forma más selectiva de proteólisis lisosomal. Las proteínas no funcionales o dañadas que van a ser degradadas por esta vía contienen una secuencia consenso que es reconocida por la chaperona

citoplasmática HSC70. Las proteínas a degradar se despliegan y se traslocan al lumen del lisosoma (Kaushik y Cuervo, 2018). Por último, la macroautofagia implica el secuestro de los cargos de manera independiente al lisosoma. Mediante diversas proteínas, los cargos son englobados en autofagosomas sintetizados *de novo* (Parzych y Klionsky, 2014) antes de la fusión con los lisosomas. En esta tesis doctoral se va a utilizar el término autofagia para hacer referencia a la macroautofagia.

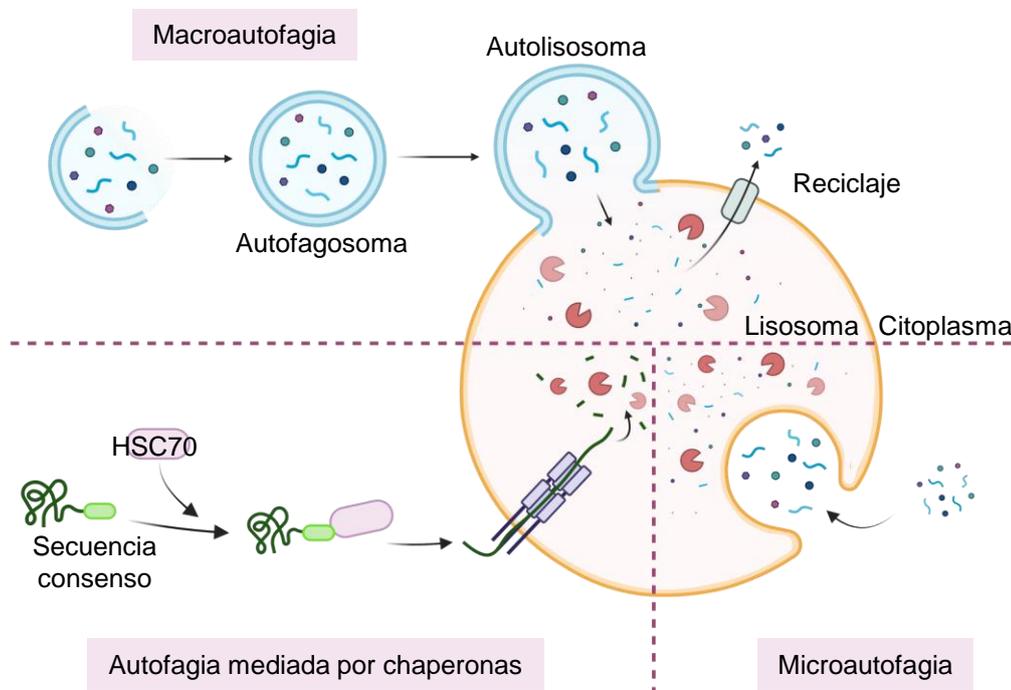


Figura I5: Tipos de autofagia en células de mamífero: macroautofagia, autofagia mediada por chaperonas y microautofagia.

Esquema ilustrativo de los tipos de autofagia descritos en células de mamífero. Durante la macroautofagia el material a degradar es englobado dentro de una vesícula denominada autofagosoma, la cual se fusiona con el lisosoma para formar los autolisosomas. En el proceso de autofagia mediada por chaperonas, la chaperona HSC70 reconoce la secuencia consenso de las proteínas a degradar y facilita el despliegue de la proteína y su translocación al interior del lisosoma. La microautofagia engloba directamente el material a degradar al interior del lisosoma. Dibujo adaptado de la plantilla de Biorender "Three main types of autophagy".

2. Fases de la autofagia

La autofagia es un proceso altamente regulado por diferentes complejos a lo largo de cada uno de los pasos de la vía. A partir de una fuente de membrana se va a formar el fagoforo, el cual será ampliado, reclutará a los cargos a degradar y una vez cerrado se denominará autofagosoma. Esta estructura se fusionará con el lisosoma dando lugar al autolisosoma, que degradará el contenido y la membrana interna gracias a las enzimas lisosomales. El autolisosoma se convertirá en un cuerpo residual y los productos degradados se transportarán de nuevo al citoplasma para ser reciclados o utilizados como fuente de energía (Figura I6).

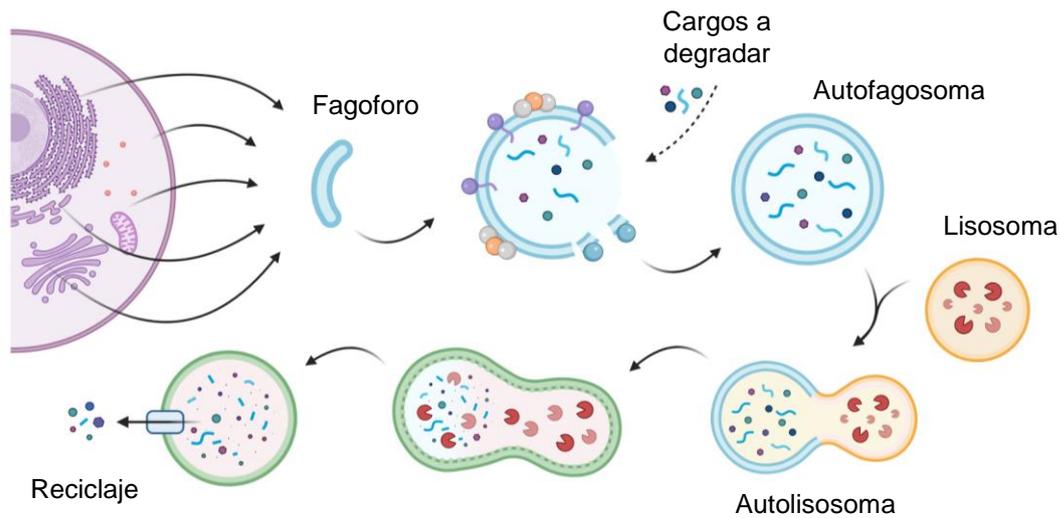


Figura I6: Mecanismo general de autofagia.

Esquema simplificado del proceso de autofagia. La activación de la vía resulta en la formación de un fagoforo a partir de diversas fuentes de membrana. El fagoforo se elonga, se reclutan los cargos a degradar y una vez cerrado se denomina autofagosoma. El autofagosoma se fusiona con el lisosoma dando lugar al autolisosoma. El contenido del autolisosoma es degradado por enzimas lisosomales y los productos degradados se transportarán de nuevo al citoplasma. Dibujo adaptado de la plantilla de Biorender "Autophagy process".

Inducción

En situaciones en las que no es necesaria la autofagia, como en condiciones de suficiencia de nutrientes, el complejo mTORC1 (formado por mTOR, Raptor, Deptor, PRAS40 y mLSt8) se encuentra inhibiendo al complejo ULK1 (formado por ULK1, Atg13, FIP200, Atg101) responsable de la iniciación de la autofagia. El complejo mTORC1 es capaz de fosforilar los residuos Ser757 y Ser637 de ULK1 y Ser258 de Atg13, bloqueando la actividad quinasa promotora de la autofagia del complejo ULK1. Además, mTOR regula transcripcionalmente la autofagia a través de la familia de factores de transcripción (TF) básicos asociados con la microftalmia como son TFEB, TFE3 y MITF. En suficiencia de nutrientes, mTOR fosforila a TFEB reteniéndolo en el citoplasma e impidiendo su translocación al núcleo y por tanto impidiendo la expresión de genes relacionados con la autofagia (Dossou y Basu, 2019) (Figura I7).

En condiciones de insuficiencia de nutrientes se produce un desbalance en los niveles de ADP:ATP que resulta en la activación de AMPK (proteína quinasa activada por AMP) la cual va a promover la inducción de la autofagia. AMPK, mediante una fosforilación activadora en la Ser555 de ULK1, produce la activación del complejo ULK1 y, mediante una fosforilación inhibitoria en la Ser792 de Raptor, inhibe al complejo mTORC1 que a su vez desinhibe al complejo ULK1. Además, ULK1 se autofosforila en la Thr180 y se activan las demás proteínas del complejo mediante fosforilaciones con el objetivo de inducir la autofagia. A su vez, la inhibición de mTORC1 impide la fosforilación de TFEB el cual se transloca al núcleo y potencia la expresión genes autofágicos (Dossou y Basu, 2019). Todo ello resulta en una activación de la autofagia y la formación del fagoforo a partir de lípidos del retículo endoplasmático, mitocondrias, aparato de Golgi o membrana plasmática (Wei *et al.*, 2018) (Figura I7).

Nucleación

El complejo ULK1 se va a anclar a la fuente de membrana y va a servir de andamio para que el resto de complejos y proteínas ATG se unan a esta estructura. El complejo PI3K (formado por VPS34, Ambra1, Beclin1, ATG14, VPS15) va a unirse al complejo ULK1 mediante la interacción de ATG14 con ATG13. Por otro lado, vesículas de membrana positivas para ATG9 se van a unir al complejo ATG2-WIPI y después a FIP200. Una vez que las primeras vesículas de membrana se han unido se forma el fagoforo (Li *et al.*, 2020) (Figura I7).

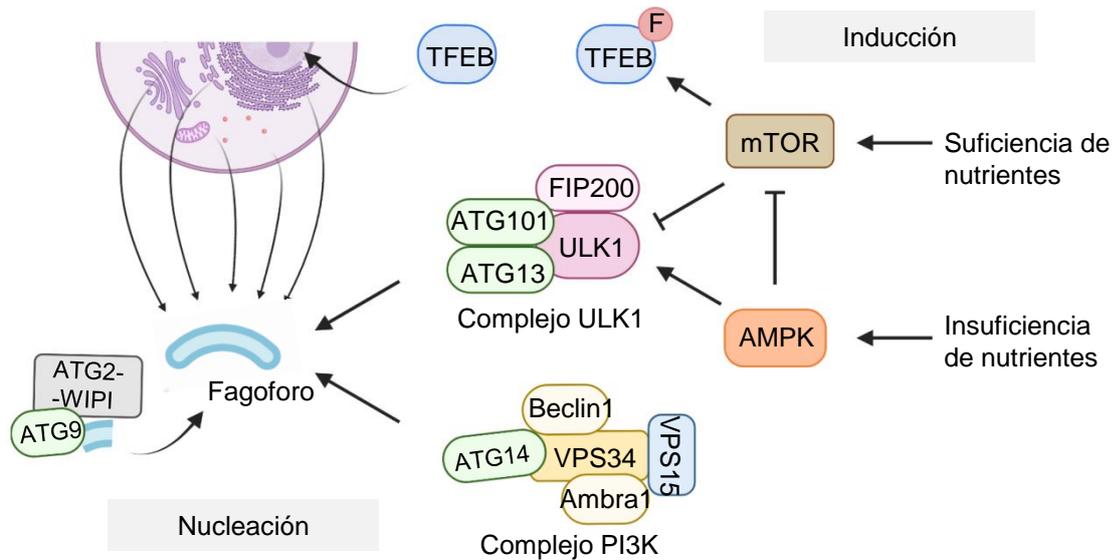


Figura I7: Inducción y nucleación de la autofagia.

La insuficiencia de nutrientes resulta en la activación del complejo ULK1 y la formación del fagoforo al que se unen distintas proteínas y lípidos. Ilustración adaptada de (Casares-Crespo *et al.*, 2018).

Formación de autofagosoma

El complejo WIPI-ATG2 se encuentra en los extremos de la membrana y su papel es elongar y cerrar el fagoforo. Durante la fase de elongación y cierre se necesitan además dos sistemas de conjugación tipo ubiquitina que son importantes para la formación del autofagosoma y para el reconocimiento selectivo de sustratos (Pang *et al.*, 2019): el sistema ATG12 y el sistema LC3/GABARAP (LC3) (Li *et al.*, 2020). En ambos procesos están implicadas múltiples proteínas ATG que contribuyen a la expansión de la membrana del autofagosoma siendo ATG7 crítico para la formación de los dos complejos. El sistema de conjugación ubiquitina tiene como objetivo realizar modificaciones postraduccionales utilizando para ello tres enzimas E1, E2, E3 (E1 de activación, E2 de conjugación y E3 de ligación) que van a ser las responsables de interactuar con los sustratos específicos y conjugar los sustratos con otras moléculas o proteínas (Dumit y Dengjel, 2012). ATG7 funciona como enzima E1 activando de manera dependiente de ATP a ATG12 y LC3, que se transfieren a las proteínas que actúan como E2 ATG10 y ATG3, respectivamente, y por último, se conjugan covalentemente con ATG5 y a un grupo fosfatidiletanolamina (PE) respectivamente. Los dos sistemas se relacionan, ya que el complejo ATG12-ATG5 junto con ATG16L actúa como enzima E3 para facilitar la conjugación de LC3-PE a la membrana autofágica (Pang *et al.*, 2019) (Figura I8).

LC3 (proteína asociada a microtúbulos 1A/1B-cadena ligera 3) es considerada como el marcador de autofagosomas por excelencia. Es sintetizada como precursor (preLC3) y el C terminal es cortado por ATG4 y se combina con una glicina para dar lugar a LC3I citosólica. LC3I es catalizada primero por ATG7, después por ATG3 y finalmente, mediante conjugación con el grupo amino PE y con el complejo Atg12-Atg5-Atg16, se modifica a una proteína unida a la membrana conocida como LC3II (Li *et al.*, 2020)(Figura I8). Los autofagosomas se irán elongando y englobarán parte del citoplasma y orgánulos de manera selectiva o no selectiva.

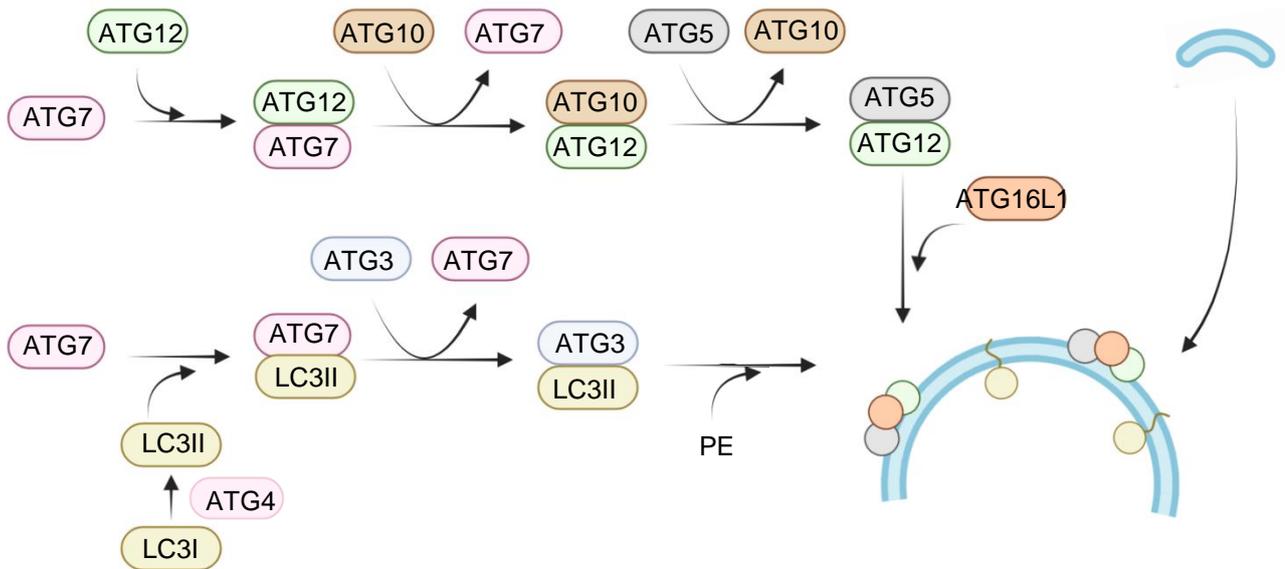


Figura I8: Sistemas ATG12 y LC3

Representación esquemática del sistema de conjugación de ubiquitina en la vía autofágica para la elongación de un autofagosoma. Ilustración adaptada de (Dumit y Dengjel, 2012)

Reclutamiento cargos

La autofagia no selectiva implica englobar parte del citoplasma en el fagoforo. Sin embargo, la autofagia selectiva tiene como objetivo eliminar determinados componentes celulares como proteínas agregadas o dañadas u orgánulos innecesarios. Por tanto, es necesario un receptor que se una al cargo etiquetado para degradar y que a su vez se una a la maquinaria autofágica (Gatica *et al.*, 2018).

La degradación de proteínas ubiquitinadas mediante autofagia se denomina agrefagia y se realiza mediante receptores que contienen un dominio de unión a LC3. Los receptores de cargos SQSTM1/p62 (p62), NBR1 y TOLLIP van a unirse por un lado a las proteínas ubiquitinadas y por otro a la familia de LC3/GABARAP que está formando parte del fagoforo. Se ha descrito que WDFY3 sirve como andamio en la degradación de proteínas dependiente de p62. La degradación de orgánulos también recibe nombres específicos. La pexofagia consiste en la degradación de los peroxisomas. En este caso no se ha descrito un receptor específico, sino que la ubiquitinación de las proteínas peroxisomales hace que los peroxisomas sean reconocidos por p62 y NBR1. Durante la mitofagia, las mitocondrias dañadas se van a secuestrar dentro del fagoforo en expansión. La despolarización de las mitocondrias produce la activación de PINK1 y la fosforilación de ubiquitina. Los receptores de cargos p62 y OPTN van a reconocer mitocondrias poliubiquitinadas y las unirán a LC3. En el caso del retículo, los receptores RETREG1/FAM134B van a ser los que controlen el tamaño del retículo a través de su interacción con

LC3. De manera similar a lo que sucede durante la mitofagia o pexofagia, los lisosomas dañados son degradados selectivamente de una manera dependiente de ubiquitina, p62 y LC3 (Gatica *et al.*, 2018).

Fusión y degradación

Finalmente, se forma una estructura de doble bicapa lipídica denominada autofagosoma en cuyo interior se localiza el material a degradar y que será degradado tras la fusión con el lisosoma. Por tanto, es necesario que los autofagosomas completos migren a la ubicación de los lisosomas. El principal mecanismo de migración se realiza a través de los microtúbulos gracias a la proteína Rab7. Por otro lado, la migración del autofagosoma puede suceder de manera independiente a los microtúbulos, mediante la remodelación de Actina a través de la proteína HDAC6. Este último mecanismo se ha descrito que sucede en la degradación selectiva de proteínas agregadas (Hikita *et al.*, 2018).

Durante el proceso de fusión van a participar múltiples proteínas como proteínas SNARE específicas, GTPasas (proteínas de la familia Rab), el complejo PI3K y Rubicon. Además, también están implicados factores de anclaje que van a mantener unidas las dos vesículas y otros complejos que interaccionan simultáneamente con las proteínas tanto de la membrana del lisosoma como del autofagosoma. Lamp2A posee un papel fundamental para la formación de los complejos SNARE (complejo STX17-SNAP29-VAMP7/VAMP8 o STX7-SNAP29-YKT6) que van a ejecutar la fusión, pasando a denominarse autolisosoma (Hubert *et al.*, 2016; Lőrincz y Juhász, 2020; Yim y Mizushima, 2020).

La degradación dentro de los autolisosomas se produce gracias a las más de 60 hidrolasas lisosomales que se localizan en el lumen de los lisosomas. La actividad de estas enzimas es óptima a un pH ácido de alrededor de 4,7 por lo que su correcto funcionamiento depende de la acidificación del lisosoma. Comienza entonces la disrupción de la membrana interna del autofagosoma que no resiste la acción de las hidrolasas, y después de los sustratos autofágicos. La degradación del contenido del autofagosoma va a dar lugar a catabolitos que a través de transportadores de membrana se exportan de los lisosomas al citoplasma y serán reutilizados por la célula (Yim y Mizushima, 2020)(Figura 16).

3. Activadores e inhibidores de autofagia

La autofagia es considerada un mecanismo regulador fundamental de destino celular, envejecimiento, neurodegeneración y la carcinogenicidad. El interés en esta vía ha potenciado la búsqueda de fármacos que permitan su modulación (Pasquier, 2016).

La autofagia se puede promover de manera independiente a mTOR o a través de su regulación, y mediante la modulación de las vías PI3K/Akt/TSC/mTOR y AMPK/TSC/mTOR. Niveles bajos de inositol potencian la autofagia de manera independiente a mTOR. El inositol se forma mediante hidrólisis de dos grupos fosfatos, para pasar de IP3 a IP2 e IP. Por último, la enzima IMPasa es la encargada de hidrolizar el último grupo fosfato para formar el inositol. Fármacos como Carbamazepina y Valproato, que inhiben la síntesis de inositol, o el litio que inactiva la IMPasa, reducen los niveles de inositol y activan la autofagia. La Rapamicina, Tacrolimus y análogos a Rapamicina (Everolimus y Temsirolimus) potencian la autofagia al reducir la actividad quinasa de mTORC1. Se unen al receptor intracelular FBP12 que a su vez reconoce un sitio de unión a mTOR. El complejo FBP12-mTOR impide la actividad de RAPTOR evitando la dimerización y activación de mTOR y como consecuencia la activación de la autofagia.

La activación de la autofagia también puede producirse con análogos de ATP, como son Dactolisib o Torin 1, que bloquean el sitio unión a ATP presente en mTOR (C1 y C2) inhibiéndolo. La trealosa activa la transcripción de genes relacionados con la autofagia e inhibe al transportador de glucosa lo que genera un estado similar a insuficiencia de nutrientes. Esta situación conduce a la activación de la vía AMPK/TSC/mTOR y, como consecuencia, de la autofagia. La activación de la autofagia mediada por Reversatrol se debe a que simula la insuficiencia de nutrientes que lleva a la activación de AMPK. La Metformina y la Fenformina son biguanidas obtenidas a partir de productos naturales. La Metformina es el fármaco de primera línea para la diabetes tipo 2. Sin embargo, la Fenformina, que fue desarrollada con la misma finalidad, se retiró del mercado porque con frecuencia se asociaba con casos de acidosis láctica. La actividad pro-autofágica de ambos fármacos está mediada por la activación de AMPK. La Metformina, a través de la fosforilación directa mediada por LKB1 (enzima aguas arriba de AMPK) o indirectamente a través de la reducción de la producción mitocondrial de ATP, activa AMPK que a su vez activará al complejo ULK1 e inhibirá a mTORC1. (Thellung *et al.*, 2019) La Fenformina, mediante el incremento de AMP citosólico, incrementa la actividad de AMPK (Zhang *et al.*, 2007). En este trabajo se han utilizado Fenformina y Metformina como fármacos inductores de autofagia en experimentos *in vitro* e *in vivo* respectivamente.

Al igual que sucede con los activadores de la autofagia, existen múltiples fármacos capaces de inhibir la autofagia regulando distintos puntos de la vía. Los inhibidores se clasifican en tempranos y tardíos, en función de si afectan a los complejos implicados en la inducción y formación de autofagosomas, o si, por el contrario, alteran el correcto funcionamiento de los lisosomas. Los inhibidores tempranos tienen como principal diana PI3Ks, Vps34 y ULK1. Sin embargo, los inhibidores tardíos pueden inhibir catepsinas (proteasas del lisosoma) y V-ATPasas (proteínas encargadas del transporte de protones que mantienen el pH ácido de la vacuola), impedir la fusión entre autofagosoma y lisosoma, e inhibir la acidificación de los lisosomas (Pasquier, 2016).

En esta tesis doctoral se han utilizado los inhibidores Bafilomicina A1 y Cloroquina en ensayos *in vitro* e *in vivo*, respectivamente. La Bafilomicina A1, inhibe las V-ATPasas lo cual bloquea el transporte de protones lisosomales, y resulta en la inhibición de las hidrolasas lisosomales, que solo se activan a pH bajo. De esta manera, se bloquea la degradación lisosomal y el flujo autofágico impidiendo la fusión del autofagosoma con el lisosoma. Por otro lado, la Cloroquina inhibe la acidificación lisosomal. A pH neutro este fármaco permanece sin carga y se difunde libremente a través de la membrana plasmática. En ambientes ácidos, como es el interior de los lisosomas, se protona y queda atrapado, aumentando el pH del lisosoma e impidiendo la actividad de las enzimas degradativas (Pasquier, 2016).

Autofagia y células madre neurales adultas

La evidencia experimental apunta a un papel imprescindible de la vía de la autofagia-lisosoma en la regulación del mantenimiento de las NSCs en la edad adulta, controlando su activación y supervivencia, así como en la maduración de las neuronas recién generadas. Sin embargo, a pesar de los trabajos publicados hasta la fecha, los estudios en los que se evalúa el papel de la autofagia después del desarrollo son aún escasos. En muchos estudios, aunque se analiza el papel de la autofagia en la etapa posnatal o en adultos, los genes autofágicos son eliminados en la línea germinal o de manera condicional en etapas embrionarias. En otros trabajos, se emplea la inyección de retrovirus para

delecionar los genes de interés en las células proliferantes de los nichos, de modo que no se afecta a la autofagia de las células quiescentes. Aun así, los trabajos disponibles hasta el momento, algunos de ellos publicados en el transcurso de esta Tesis, exponen el papel que posee la vía autofagia-lisosoma tanto a nivel del mantenimiento de la quiescencia en los nichos neurogénicos como de la muerte autofágica de las NSCs.

1. Autofagia en los nichos neurogénicos

Se ha demostrado que los genes de la autofagia juegan un papel fundamental en el mantenimiento de las NSCs tanto adultas como posnatales al regular su proliferación y supervivencia. Las células madre y neuroblastos de SVZ y el canal migratorio rostral poseen altos niveles de LC3, sugiriendo que tienen un alto nivel de autofagia basal (Yazdankhah *et al.*, 2014). Trabajos en los que se eliminan los genes autofágicos Ambra1, Beclin 1 y FIP200 en células madre y neuroblastos mostraron una reducción de la proliferación y diferenciación y un aumento de la apoptosis (Wang *et al.*, 2013; Yazdankhah *et al.*, 2014).

Rb1cc1/FIP200 mantiene el correcto funcionamiento de las células madre a través de la regulación del estado oxidativo (Wang *et al.*, 2013). La eliminación de FIP200 en la glía radial y progenitores neurales durante el desarrollo embrionario bloquea la autofagia y afecta a la formación de los nichos y a la neurogénesis. A pesar de que en el nacimiento los nichos neurogénicos parecen normales, durante la etapa posnatal se observan distintos defectos. Por un lado, en el hipocampo se reduce el tamaño del giro dentado, disminuye el número de células madre radiales y neuroblastos, y aumentan los astrocitos en la SGZ, los cuales forman una banda gruesa a día P28. Por otro lado, la SVZ se vuelve más delgada, las células madre y neuroblastos tanto de la SVZ como del canal migratorio rostral desaparecen, y el bulbo olfatorio se vuelve más pequeño.

Los efectos que sufren estos animales se deben a un aumento en los niveles de ROS y de agregados de p62. Por un lado, las mitocondrias son la principal fuente de generación de ROS y es necesaria la autofagia para eliminar las mitocondrias dañadas. La delección de FIP200 produce un aumento del número, tamaño y heterogeneidad de las mitocondrias, así como de los niveles de ROS que activarán a p53 como respuesta a estrés (Wang *et al.*, 2013). Por otro lado, la delección de FIP200 genera una acumulación de agregados de p62 los cuales limitan la actividad de la superóxido dismutasa 1 produciendo un incremento de los niveles de superóxido que aumenta el estrés oxidativo (Wang *et al.*, 2016). Los dobles mutantes de FIP200 y p53 rescatan los defectos en proliferación y apoptosis, sin embargo los defectos en diferenciación se rescatan tras el tratamiento con el antioxidante acetilcisteína que reduce los niveles de ROS (Wang *et al.*, 2013). Los defectos en diferenciación se deben a que los agregados de p62 acumulados en las NSCs activan NFκB y promueven la producción de quimiocinas CCL5 y CXCL10. Como resultado, la microglía M1 (microglía que inhibe la diferenciación de las NSCs) se activa y se infiltra en el nicho, interfiriendo así en la diferenciación de los progenitores neurales. El bloqueo farmacológico de la infiltración de la microglía o de su activación rescata el fenotipo de diferenciación (Wang *et al.*, 2017).

La autofagia también es necesaria para la correcta migración de las neuronas recién nacidas desde la SVZ al bulbo olfatorio. Las nuevas neuronas tienen un incremento de la expresión de la familia de microRNAs let-7, la cual regula la autofagia a través de la modulación de los genes de las vías sensibles a aminoácidos (Dubinsky *et al.*, 2014). La reducción de este microRNA con lentivirus redujo los niveles de autofagia e impidió la migración de las nuevas neuronas y retrasó su maduración. Los defectos

migratorios se rescataron con la sobreexpresión simultánea de Beclin 1 y TFEB, mientras que probablemente los cambios morfológicos sucedían de manera independiente a la autofagia (Petri *et al.*, 2017).

Otro factor de transcripción que regula directamente la autofagia es FOXO3 (Audesse *et al.*, 2019). Los genes *FoxO* son necesarios para el mantenimiento a largo plazo de las NSCs adultas y su delección produce un agotamiento de las células madre y progenitores en los nichos neurogénicos (Paik *et al.*, 2009; Renault *et al.*, 2009). La delección de *FoxO* en las NSCs adultas *in vivo* produjo en primer lugar la activación de las células madre radiales en la SGZ, lo cual condujo a una disminución en el número de células madre radiales y una reducción en la neurogénesis hipocampal. Además, la delección de *FoxO* producía una mayor proliferación en cultivos *in vitro* que mostraban altos niveles de LC3II, p62 y vesículas autofágicas (Audesse *et al.*, 2019).

La autofagia también juega un papel en la maduración de las nuevas neuronas generadas en el giro dentado en la etapa adulta. Empleando vectores retrovirales que codifican para sensores de autofagia se ha observado que durante el proceso de diferenciación neuronal, la autofagia se incrementa (Xi *et al.*, 2016). El flujo autofágico es mayor en los procesos de las neuronas jóvenes que todavía están madurando para posteriormente reducirse. La delección de *Atg5* en progenitores en división en la etapa adulta mediante retrovirus, produjo una disminución en el flujo autofágico, en el número de autolisosomas y la supervivencia de la progenie. Sin embargo, no se observaron ni cambios en proliferación ni defectos en el destino neuronal. En cambio, las neuronas carentes de *Atg5* mostraban un retraso en la maduración, una reducción transitoria de la densidad dendrítica y una expresión prolongada del marcador de neurona inmadura DCX. Este fenotipo se rescató con el doble mutante para *Atg5* y *Bax* pro-apoptótico, lo que sugiere que *Atg5* funciona corriente arriba de la vía apoptótica *Bax* en neuronas inmaduras (Xi *et al.*, 2016).

El retraso madurativo de las nuevas neuronas que carecen de *Atg5* recuerda al de las nuevas neuronas generadas en ratones viejos. Estas neuronas necesitan más tiempo para completar la maduración en comparación con las de los ratones jóvenes (Trincheri *et al.*, 2017). Estos datos sugieren que los defectos de la autofagia pueden ser la base, al menos en parte, de las alteraciones en la maduración neuronal que se encuentran en el nicho hipocampal envejecido. Por otro lado, al igual que neuronas deficientes en *ATG5*, las neuronas deficientes en *FOXO* también mostraron defectos en maduración. Se observó una reducción transitoria de la longitud dendrítica, un acortamiento de su dendrita apical y un desarrollo de las espinas dendríticas aberrante que comprometió su integración en el circuito del hipocampo. El flujo de autofagia de las neuronas deficientes en *FOXO* estaba notablemente afectado y el tratamiento farmacológico para incrementar la autofagia con Rapamicina y Trealosa revertía el fenotipo (Schäffner *et al.*, 2018).

La autofagia, también participa en la diferenciación a astrocitos de las NSCs hipocampales al menos *in vitro*. Durante los primeros días de diferenciación glial, las células incrementan de manera transitoria los niveles de autofagia. El bloqueo de esta vía resulta en una diferenciación aberrante (Ha *et al.*, 2019).

2. Autofagia en NSCs quiescentes

Recientemente, mientras se desarrollaba el trabajo experimental esta tesis doctoral, se han publicado dos trabajos que indican una relación directa entre los lisosomas y la regulación de las células madre

adultas. Ambos trabajos describen un aumento de la vía de la autofagia-lisosoma en las células quiescentes, sin embargo las conclusiones obtenidas de sus trabajos son contradictorias.

Un primer estudio aisló NSCs de la SVZ de ratones adultos mediante citometría de flujo y separación por fluorescencia en base a marcadores. Para ello, se utilizaron ratones que expresaban GFP bajo el promotor de GFAP combinado con los marcadores de superficie Prolinina 1 (Prom1) y EGFR, de forma que las NSCs son GFAP-GFP⁺, Prom1⁺ además EGFR positivas o negativas en función de si se trata de NSCs activas o quiescentes, respectivamente. El análisis de su transcriptoma por RNAseq y enriquecimiento funcional de los datos mostró que, mientras que las NSCs activas utilizan principalmente la vía del proteasoma para la proteostasis, las NSCs quiescentes utilizan la vía lisosomal. Las células quiescentes, tanto aisladas de la SVZ como en quiescencia inducida por BMP4 *in vitro*, mostraban una acumulación de agregados proteicos en el interior de grandes lisosomas, los cuales eran más numerosos y aparentemente degradaban su contenido más lentamente. Los experimentos funcionales indicaron que la vía autofagia-lisosoma tiene un papel en la activación y en la movilización de los agregados proteicos. Las células quiescentes se trataron dos horas con Bafilomicina A1 a 50nM con el objetivo de bloquear la acidificación de los lisosomas antes de inducir la reversión de la quiescencia en el cultivo con EGF y FGF2. Los resultados indicaron que el bloqueo del lisosoma reduce la activación de las células y aumenta el contenido en agregados proteicos al contrario que los experimentos funcionales en los que se activó la vía autofagia-lisosoma. La activación de la vía se realizó con una incubación con medio mínimo HBSS durante una hora antes de inducir la reversión o con la sobreexpresión de TFEB durante 6 horas antes de inducir la reversión. En ambos casos, la activación de la vía disminuía el contenido en agregados y promovía la activación de estas células. Leeman y colaboradores propusieron que quizá la movilización de agregados a través de la vía lisosomal constituye una fuente de energía para salir del estado inactivo (Leeman *et al.*, 2018).

Otro trabajo publicado un año después, también mostró que las NSCs quiescentes inducidas con BMP4 *in vitro* poseen un alto contenido lisosomal y una mayor actividad de la catepsina L y niveles más altos de Lamp1 (Kobayashi *et al.*, 2019), pero contradice la idea de que la función lisosomal mejora la activación de las NSC quiescentes propuesta por Leeman y colaboradores (Leeman *et al.*, 2018). Los ensayos funcionales de inhibición de la vía autofagia-lisosoma con Bafilomicina A1 les permitió observar una acumulación del receptor de EGF activo (P-EGFR) que produciría un aumento en la activación de las células quiescentes. Sin embargo el inhibidor específico de autofagia Sar405 no mostró esta acumulación, sugiriendo que se trataría de un fenómeno lisosomal y no autofágico. Los primeros experimentos de activación lisosomal *in vivo* se realizaron mediante la inyección de Bafilomicina A1 en el giro dentado. El análisis se efectuó en cultivo organotípico de rodajas de cerebro y mostró un incremento de la activación de las NSCs de los cortes tratados con Bafilomicina A1. La activación lisosomal *in vivo* se llevó a cabo mediante la inyección de vectores lentivirales que expresaban TFEB constitutivamente activo bajo los promotores de Hes5 o GFAP en el giro dentado. Los resultados mostraron una reducción de la proliferación de las NSCs en la SGZ. En conjunto este trabajo sugiere que la función lisosomal sería necesaria para degradar este receptor EGFR activado y mantener a las células quiescentes en este estado (Kobayashi *et al.*, 2019).

3. Muerte autofágica de las NSCs adultas

De manera habitual, la autofagia actúa como mecanismo citoprotector. Sin embargo, bajo ciertas condiciones una autofagia prolongada o excesiva puede conducir a la muerte celular por autofagia, la

cual ocurre sin los signos característicos de apoptosis como son la activación de caspasa o la fragmentación del ADN.

La insuficiencia de insulina provoca este tipo de muerte celular en cultivos de NSCs del hipocampo de ratas adultas. La ausencia de insulina produce un incremento de la activación de la vía (Beclin1, LC3II), una acumulación de autofagosomas y finalmente la muerte autofágica (Yu *et al.*, 2008). La carencia de insulina también activa a AMPK la cual va a fosforilar de manera directa a p62 en un residuo esencial para que se produzca este tipo de muerte. p62 fosforilado se traslada a las mitocondrias causando fragmentación mitocondrial y posteriormente muerte celular autofágica (Ha *et al.*, 2017). Estos efectos son rescatados al inhibir la vía autofágica mediante el silenciamiento de *Atg7* o con 3-metiladenina (un compuesto que bloquea la autofagia al inhibir PI3K) y por el contrario, se acentúan al promover la autofagia con Rapamicina (Yu *et al.*, 2008).

A pesar de que la ausencia de insulina en cultivos de NSCs adultas de hipocampo provoca muerte autofágica, la variación de los niveles de calpaína puede cambiar el tipo de muerte celular. Las calpaínas son proteasas cuya actividad es dependiente de calcio y son degradadas por el proteasoma. El bloqueo de su degradación o su sobreexpresión aumenta los niveles de calpaína, permitiendo el cambio en el tipo de muerte, pasando de muerte autofágica a apoptosis (Chung *et al.*, 2015).

Otros modelos experimentales utilizados para estudiar la muerte autofágica *in vitro* son la privación de oxígeno y glucosa (que simula la isquemia) (Chung *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019), el tratamiento con corticosterona (que simula la exposición a glucocorticoides durante el estrés) (Jung *et al.*, 2020) y la exposición a homocisteína (metabolito neurotóxico que se considera un factor de riesgo de los accidentes cerebrovasculares) (Wang *et al.*, 2019). Estos tratamientos producen un aumento de marcadores autofágicos y de autofagosomas que conducen a la muerte celular por autofagia, siendo reversible con inhibidores de la autofagia. *In vivo* la exposición a corticoesterona o estrés psicológico produce un estrés crónico que genera una acumulación de autofagosomas e induce la muerte celular autofágica en NSCs hipocampales adultas. Como consecuencia se reduce el número de células madre y progenitores neurales (Jung *et al.*, 2020). La delección del gen *Atg7* únicamente en las células madre rescata los defectos causados por la exposición a estrés crónico, sin embargo en condiciones basales no encontraron diferencias ni en el número de NSCs ni en su proliferación en los animales con la vía autofágica bloqueada (Jung *et al.*, 2020).

En resumen, en los últimos años ha ganado importancia el papel que juega la autofagia en la neurogénesis y en el mantenimiento y la homeostasis de los reservorios de las NSCs. Las NSCs quiescentes probablemente utilizan la vía autofagia-lisosoma como principal vía de proteostasis, sin embargo, no está claro el motivo por el cual sucede este fenómeno. Podría tratarse de un mecanismo de compensación para eliminar acúmulos de proteínas o, por el contrario, su funcionamiento tiene que ver con otros mecanismos relacionados con el mantenimiento del estado de quiescencia.

OBJETIVOS

Objetivos

El objetivo general de esta tesis doctoral ha sido profundizar en la caracterización de la vía autofagia-lisosoma, como vía metabólica que regula la proteostasis, en la población de NSCs localizada en la SGZ del giro dentado del hipocampo. Para la realización de este estudio se llevaron a cabo los siguientes objetivos concretos:

1. Caracterizar el estado traduccional y la acumulación de agregados proteicos *in vitro* en cultivos de NSCs activas y quiescentes, y como una aproximación al *in vivo*, en células recién aisladas del hipocampo.
2. Analizar las vías principales de degradación proteica y caracterizar en profundidad la vía autofágica en cultivos de NSCs activas y quiescentes.
3. Estudiar el posible papel de la autofagia en el mantenimiento de la quiescencia en cultivos de NSCs mediante ensayos funcionales.
4. Determinar si la autofagia es necesaria para el correcto establecimiento de la quiescencia de las NSCs radiales de la SGZ *in vivo* en la etapa posnatal.
5. Explorar si la autofagia es importante para el mantenimiento de la población de NSCs radiales quiescentes de la SGZ en la etapa adulta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

1. Animales

Para el presente estudio se utilizaron ratones C57BL/6-Tg(Nes-cre/ERT2)⁴Imayo;Atg7^{flox/flox} (NesCre^{ERT2};Atg7^{F/F}) con fondo genético C57BL/6. Estos animales se obtuvieron tras el cruce de ratones B6.Cg-Atg7^{tm1Tchi} con ratones C57BL/6-Tg(Nes-cre/ERT2)⁴Imayo. Los ratones cKO para el gen *Atg7* (B6.Cg-Atg7^{tm1Tchi}) fueron generados en el laboratorio del Dr. Masaaki Komatsu (Komatsu *et al.*, 2005) y nos fueron cedidos a través de la Dra. Pura Muñoz del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares previa obtención de un acuerdo de transferencia de materiales (MTA). Los ratones NesCre^{ERT2} se corresponden a la línea 4 de los ratones generados por Dr. Imayoshi (Imayoshi *et al.*, 2006) y nos fueron donados por la Dra. M^a Ángeles Moro de la Universidad Complutense de Madrid. Algunos ensayos se realizaron en ratones C57BL/6 silvestres y en ratones NesCre^{ERT2};RCE^{F/F}. Estos últimos ratones se generaron mediante el cruce de ratones C57BL/6-Tg(Nes-cre/ERT2)⁴Imayo y Gt(ROSA)26Sortm1.1(CAG-EGFP)^{Fsh} que fueron cedidos por la Dra. Nuria Flames del Instituto de Biomedicina de Valencia. Todos los animales fueron estabulados en condiciones libres de patógenos específicos y manipulados según lo establecido por la normativa vigente. Asimismo, el trabajo se llevó a cabo bajo la supervisión del responsable científico del animalario del Instituto de Biomedicina de Valencia.

Los ensayos *in vivo* se realizaron en ratones posnatales de 3, 14 y 21 días, y en ratones adultos de 2, 3, 12 y 18 meses. Los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical o sobredosis de anestésico en función del ensayo experimental. Los protocolos de experimentación animal fueron aprobados por el Comité Ético de la Investigación y del Bienestar Animal del Instituto de Biomedicina de Valencia.

2. Líneas celulares

Para el trabajo se utilizaron cultivos de células madre neurales (NSCs) y progenitores aislados a partir de hipocampo de ratas Fisher 344 adultas. Estas células fueron cedidas por el laboratorio del Dr. Gage del *Salk Institute for biological studies* en California. Se trata de una línea ampliamente utilizada gracias a sus características de multipotencialidad y autorrenovación. En este trabajo las NSCs se utilizaron por debajo de pase 30.

Condiciones y medios de cultivo

- i. Medio de cultivo N2 (N2): DMEM/F-12(1:1), 1X N2, 0,6% glucosa, 0,1% NaHCO₃, 5mM HEPES y 100u/ml de penicilina/estreptomomicina. Este medio fue utilizado para el mantenimiento celular y los procedimientos experimentales.
- ii. Medio SIP 30%: 27% percoll, 13% HBSS 10X, 6.66mM HEPES pH7,5, empleado para eliminar la mielina de los aislamientos de células GLAST⁺.

Recubrimiento de cristales

El tratamiento de los cristales para placas de 24 pocillos (P24) permite la adherencia de las células a los cubreobjetos con el objetivo de manipularlas sin perderlas. Se realizaron dos tipos de tratamientos.

- i. Ornitina/Laminina (O/L): Este recubrimiento se utilizó cuando las células se crecieron en sistema adherido. El tratamiento de las placas de cultivo consistió en dos incubaciones a temperatura ambiente durante toda la noche, primero con $1\mu\text{M}$ de ornitina diluida en agua y seguido de $0,5\mu\text{M}$ de laminina en PBS.
- ii. Matrigel: El tratamiento de cristales con matrigel tenía como objetivo adherir las células que se habían cultivado en suspensión en forma de neuroesferas a un cubreobjetos. El tratamiento con matrigel consistió en una incubación de dos horas a 37°C con $100\mu\text{g/ml}$ de matrigel en medio N2.

3. Reactivos.

Cultivos celulares

Producto	Casa comercial
Accumax	Millipore, SRC006
Antibiótico penicilina - estreptomina	HyClone, SV30010
Azul tripan	Sigma, T6146
Bafilomicina A1 (BafA1)	Sigma-Aldrich, B179
Bicarbonato de sodio	Invitrogen, 25080-060
BMP4	Peptotech, 120-05ET
Curva patrón BSA	Thermoscientific, 23209
D (+)- Glucosa Anhidra	Sigma, G7528
Dimetil Sulfoxido (DMSO)	Sigma, D2650
DMEM/F-12 (1x) + glutamax (1:1)	Gibco, 31331-028
Fenformina (Fen)	Sigma, 349887
FGF2, factor de crecimiento fibroblástico 2	Peptotech, 100-18B
solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) (con Ca^{+2} y Mg^{+2})	Sigma, 55037C
solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) w/o (sin Ca^{+2} y Mg^{+2})	Sigma, SLCC9784
Hepes 1M	Gibco, 15630-080
Laminina	Sigma, L2020
Matrigel	Cultek, 45354230
MG132 (MG)	Sigma, C2211
Ornitina	Sigma, P4957
PD168393 (PD)	MedChemExpress, HY-13896
Percoll	HealthCare, 17-0891-02
Suero albumina bovina (BSA)	Sigma, A1470
Suplemento N2	Invitrogen, 17502-001
Tampón fosfato salino (PBS)	Corning, 20-031-CV
Tripsina 2,5%	HyClone, SV30037.01

Tabla 1: Listado de productos de cultivos celulares

Biología molecular

Producto	Casa comercial
Curva patrón albúmina de suero bobino	Thermo Scientific, 23209
N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED)	Roth, 23267.3
2-propanol	VWR Chemicals, 20922.32
Ácido acético glacial	VWR, 20104.312
Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)	Merk, 108418.0250
Acrilamida-Bis-acrilamida	Sigma, A605
Agarosa	Condalab, 8010.00
Albúmina de suero bobino	Apolo scientific, BIA3981
Azul de bromofenol	Sigma, B8026
Cloroformo	Roth, 3313.4
Cloruro sódico	Panreac, 131659.1211
Cóctel de inhibidores de proteasas	Roche, 11873580001
CTAB	Sigma, H9151
dNTPs	Nzytech, MB08701
Dodecilsulfato sódico (SDS)	Panreac, A1112.1000
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)	Merk, 10837091001
Fluoruro de sodio (NaF)	Sigma, S1504
Glicerol	Sigma, G9012
Glicina	Scharlau, AC04021000
Isoamilalcohol	Scharlau, ME0376
Marcador ADN 100pb	Biotoools, 31.006
Marcador ADN 1kb	Thermoscientific, SM0313
Marcador de proteínas preteñido	Nzytech, MB090
Master Mix green	NYZtech, NYZtaqII
Metanol	VWR Chemicals, 20903.368
Na ₄ P ₂ O ₇ Pirofosfato sódico	Sigma, S-6422
NP-40	Fluka, 74385
Persulfato amónico (APS)	Sigma, A3678
Red safe	INtRON biotechnology, 21141
Sacarosa	Sigma, 84097
SyBr Green	Takara, RR420A
TriReagent	Sigma, T9424
Tris HCl	Panreac, A1086.1000
Tween 20	VWR Chemicals, 437082Q
β-mercaptoetanol	Aldrich, M6250

Tabla 2: Listado de productos de biología molecular

Histología

Producto	Casa comercial
1,4-diazabicyclo- (2,2,2)-octano (DABCO)	Roth, 0718.2
4'-6-Diamindino-2-fenilindol dihidroclorídrico hidratado (DAPI)	Sigma, D9542
5'-Bromo-2'-deoxiuridina (BrdU)	SAFC, B5002
Aceite de maíz (Ac)	Sigma, C8267
Ácido clorhídrico	Panreac, 131020.1211
Azida sódica	Panreac, 122712
Cloroquina	Sigma, PHR1258

Cloruro sódico	Panreac, 131659.1211
Fosfato disódico hidratado NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	Panreac, 131965.1211
Fosfato monosódico Na ₂ HPO ₄	Panreac, 131965.1211
Metformina	PHR1084
Mowiol	Roth, 0713.2
Paraformaldehído	Panreac, 141451
Suero fetal bobino (FBS)	Corning, D9542
Tamoxifeno (TX)	Sigma, T5648
Triton X-100	Sigma, T8787

Tabla 3: Listado de productos de histología

Cebadores RT-qPCR

Gen	Secuencia (5'→3')	T _m
<i>Atg7</i>	FW: CTTGACCTTCGCGGACCTAAAGAA RV: AGGGCCTGGATCTGTTTTGGTGA	57°C
<i>eIF3c</i>	FW: GCGTACCACTTGTTAAGGAGAAACC RV: GTCTGTTCCCTTCTTGCCTCTGA	58°C
<i>eIF4e</i>	FW: ATAAAAGCAAACCTGGCAAGCA CTCATCTTCCACATAGGCTCAA	60°C
<i>Hdac6</i>	FW: AGCCCAATCTAGCGGAGGTAAAG AGG GAA GCT GTC ATC CCA AAG GCA	62°C
<i>Idua</i>	FW: TGCCTCACGACCAGGCTGACCA RV: CGTGAAGTACCCAGAAGGACTGCC	60°C
<i>Lamp1</i>	FW: CCA CAA CTG ACA TCA AGG CAG ACA TC RV: GTGGGCACAAGTGGTGGTGAGG	60°C
<i>Lamp2</i>	FW: CTG TCT GCT GGC TAC CAT GGG RV: TGACAGCTGCCGGTGAAGTTGG	60°C
<i>Lars</i>	FW: CTGCACCCCTGACATGCTAT RV: TCCGGGGAATCAGAAGGAAC	62°C
<i>Naga</i>	FW: TCCACGGACCTGCGTACCATCTC RV: GCATGTCTGTCTGCGGCTGAAGA	60°C
<i>Rpl35A</i>	FW: CTGCTGGAGGTGTAATGGACGT RV: TTGACATACATGGGCTCATCACA	60°C
<i>Rps12</i>	FW: CACACGGCTCTTCTTAAATTTGAAG RV: TACTTTTCCCCAGATCACTCTGGT	60°C
<i>Sqstm1</i>	FW: TTTTCAGGCGCACTACCGGATGA RV: CGCCGGCACTCCTTCTTCTTT	58°C
<i>Sdha</i>	FW: AGAGGACAACCTGGAGATGGCATT RV: AACTTGAGGCTCTGTCCACCAA	62°C
<i>TSC1</i>	FW: CATGGTGCCTGAAGAAACCA RV: TGAATTCGCACATGCTCCAT	62°C
<i>Ulk1</i>	FW: CCTTGCCAAGTCCCAGACACTGC RV: CATAGTGTGCAGGTAGTCAGCCAG	60°C
<i>Yars</i>	FW: CCAGTTTGGCGGTATTGATCAG RV: GGACCCGTTTTGAGTAGCCA	62°C

Tabla 5: listado de cebadores

Anticuerpos primarios

Anticuerpo	Dilución	Referencia
4EBP1-P	WB-1:200	Cell Signaling, 2855
4EBP1-total	WB-1:200	Cell Signaling, 9644
ACC-P (ser79)	WB-1:1000	Cell signaling, 3661
ACC-total	WB-1:1000	Cell Signaling, 3662
Actina	WB-1:5000	Sigma-Aldrich, A5441
AKT-P	WB-1:1000	Cell Signaling, 4060
AKT-total	WB-1:1000	Cell Signaling, 4691
AMPK-P (Thr 172)	WB-1:1000	Cell signaling, 2535
AMPK-total	WB-1:1000	Cell Signaling, 2793
BrdU	IHQ-1:100	Abcam, ab6326
eIF2 α -P	WB-1:200	Cell Signaling, 9722
eIF2 α -total	WB-1:200	Cell Signaling, 9721
GFAP	IHQ-1:300	Sigma, G3893
GFP	IHQ-1:200	Aves Lab, GFP-1010
GLAST biotin	ICQ-1:50	Miltenyi, 130-119-161
Ki67	IHQ/ICQ-1:150	Abcam, ab15580
Lamp2	ICQ-1:50	Biologend, 108511
LC3 β	WB-1:1000	Santa Cruz, sc-376404
P62	WB-1:500 ICQ-1:250	Abcam, ab56416
PERK-P(Thr980)	WB-1:100	Cell Signaling
Raptor-P (Ser 729)	WB-1:1000	Cell signaling, 2083
Raptor-total	WB-1:1000	Cell Signaling, 2280
S6K1-P (Thr 389)	WB-1:1000	Cell signaling, 9205
S6K1-total	WB-1:1000	Cell Signaling, 9202
Sox2	IHQ-1:200	R&D, AF2018
Sox2	IHQ/ICC-1:500	Gene Tex, GTX101507
ULK1-P (Ser 555)	WB-1:1000	Cell signaling, 5869
ULK1-P (Ser 757)	WB-1:1000	Cell Signaling, 14202
ULK1-total	WB-1:1000	Cell Signaling, 8054

Tabla 5: Anticuerpos primarios

Anticuerpos secundarios

Anticuerpo	Dilución	Referencia
IRDye 680LT anti-ratón (rojo)	1:1000	Licor, 925-68020
IRDye 800CW anti conejo-verde	1:1000	Licor, 925-32211
Alexa 555 anti-ratón	1:500	Invitrogen, A31570
Alexa 633 anti ratón	1:500	Invitrogen, A21052
Alexa 488 anti-ratón	1:500	Invitrogen, A21202
Alexa 488 anti conejo	1:500	Invitrogen, A21206
Alexa 647 anti-conejo	1:500	Invitrogen, A31573
Cy3 anti-conejo	1:500	Jackson
Alexa 555 anti-rata	1:500	Invitrogen, A21434
Alexa 488 anti-ave	1:500	Jackson, 703-546-155
Streptavidin Cy2	1:500	Invitrogen, 016-220-084

Tabla 6: Anticuerpos secundarios

Métodos

Métodos in vivo

1. Genotipado

i. Obtención de muestra para genotipado.

Los animales fueron marcados realizando una pequeña perforación en la oreja que se utilizó para su posterior identificación. A partir de la muestra obtenida de oreja se extrajo el ADN y se realizó el análisis por PCR.

ii. Extracción ADN.

Las muestras obtenidas de los animales se incubaron con 100µl de solución A (25mM NaOH, 0,2mM EDTA) durante una hora a 95°C. Después, se añadió 100µl de solución B (40mM Tris-HCl pH7,5) y se centrifugaron 10 minutos a 2000rpm. Finalmente, 100µl del sobrenadante que contenía el ADN se pasaron a un tubo limpio.

iii. PCR de genotipado.

Con el objetivo de identificar a los animales como *Atg7* +/+, +/Flox, Flox/Flox; *NesCreER*^{T2} + o -; *RCE* +/+, +/Flox, Flox/Flox; se realizaron PCRs a partir del ADN genómico extraído a partir de muestra de la oreja de los ratones. Para la detección de los alelos Flox y *wild type* de *RCE* fue necesario realizar dos PCRs, para la forma Flox y *wild type*. El producto de la PCR se resolvió en un gel de agarosa en TAE 1X (40mM TrisHCl, 1mM EDTA pH 8, 0,00114% (v/v) ácido acético glaciado) y se visualizó en un transiluminador. Los protocolos de las PCRs, los cebadores y el porcentaje de agarosa de cada gel se describen a continuación (Figura M1).

Atg7Flox-FW: 5'-TGGCTGCTACTTCTGCAATGATGT-3'
Atg7Flox-RV: 5'-CAGGACAGAGACCATCAGCTCCAC-3'
NesCre-FW: 5'-TTCCGCTGGGTCAGTGTGCGCCGCTAC-3'
NesCre-RV: 5'-TAATCGCGAACATCTTCAGGTTCTGC-3'
RCE-WT-FW: 5'-AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT-3'
RCE-WT-RV: 5'-GGAGCGGGAGAAATGGATATG-3'
RCE-KO-FW: 5'-CCCAAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT-3'
RCE-KO-RV: 5'-CCAGGCGGGCCATTTACCGTAAG-3'

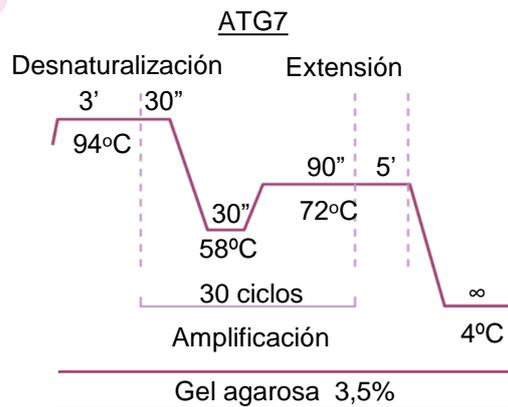
A

	1X (ul)
Master Mix	12,5
P.Fw 10 μ M	1,5
P.Rv 10 μ M	1,5
H ₂ O	9
ADN	2

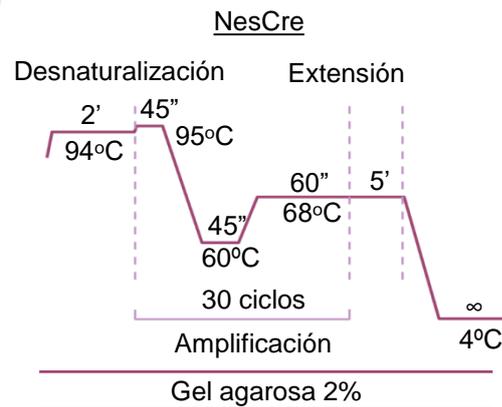
Figura M1: Protocolos de PCR de genotipado de los animales utilizados.

(A) Reactivos de PCR utilizados para el genotipado de los animales. (B) Protocolo de PCR utilizado para el genotipado de los animales *Atg7^{F/F}*. (C) Protocolo de PCR utilizado para el genotipado de los ratones *NesCreER^{T2}*. (D,E) Protocolo de PCR utilizado para el genotipado de los animales *RCE^{F/F}*. (D) Protocolo de PCR utilizado para el genotipado del alelo *wild type* de los animales RCE. (E) Protocolo de PCR utilizado para el genotipado del alelo *Flox* de los animales RCE.

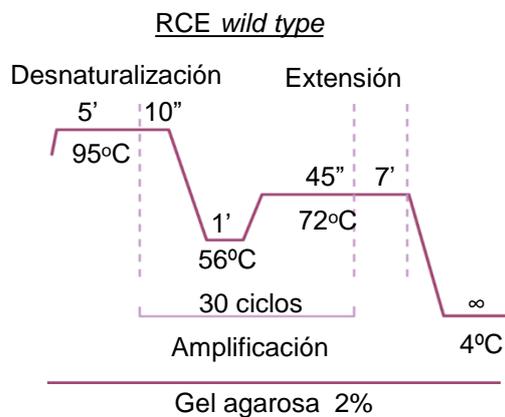
B



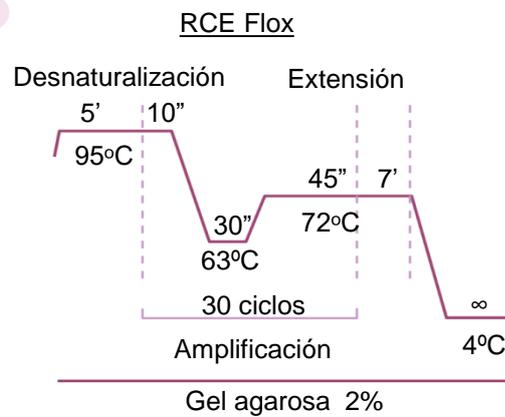
C



D



E



2. Tratamiento con Tamoxifeno

La administración de Tamoxifeno intraperitonealmente se realizó con el objetivo de deletar el gen *Atg7* en las células madre neurales adultas de manera condicional en animales *NesCreER^{T2};Atg7^{F/F}*. Por un lado, el ratón *Atg7^{F/F}* se había diseñado basándose en la tecnología Cre-LoxP. Se sustituyó el exón 14 que contiene el centro activo por un vector que contenía dos secuencias Cre-LoxP, la región codificante de la proteína (del aa 1786 al 2097), además de un fragmento del exón 14 (aa 1669–1698) con un codón STOP (Figura M2A). Por otro lado, los ratones *NesCreER^{T2}* expresaban bajo el promotor de Nestina la proteína Cre recombinasa fusionada al receptor de estrógenos humano mutante (ER), el cual es incapaz de unir su ligando natural (17 β -estradiol). En ausencia de Tamoxifeno, la proteína CreER interactúa con la proteína *heat shock* 90 (HSP90) y se localiza en el citoplasma. La administración de Tamoxifeno (ligando sintético) activa ER, interrumpe la interacción con HSP90 y produce la translocación de la proteína Cre al núcleo. En el núcleo, CreER reconoce los sitios LoxP,

produciendo la recombinación del gen que genera una proteína truncada de ATG7 (Kim *et al.*, 2018) (Figura M2B). La administración de Tamoxifeno en animales NesCreERT2; RCE^{F/F}, resulta en la expresión de la proteína GFP en las células que expresan Nestina. El régimen de administración de Tamoxifeno varió en función de la edad de los animales. Mientras que a ratones posnatales se les administró una dosis/día de 0,25mg de Tamoxifeno durante 4 días consecutivos (de P10 a P13) (Zhang *et al.*, 2019), a los ratones adultos se les administraron 5 dosis de 2mg/día. En ambos casos, el Tamoxifeno se preparó a una concentración de 10mg/ml en una solución de 90% aceite de maíz 10% etanol absoluto.

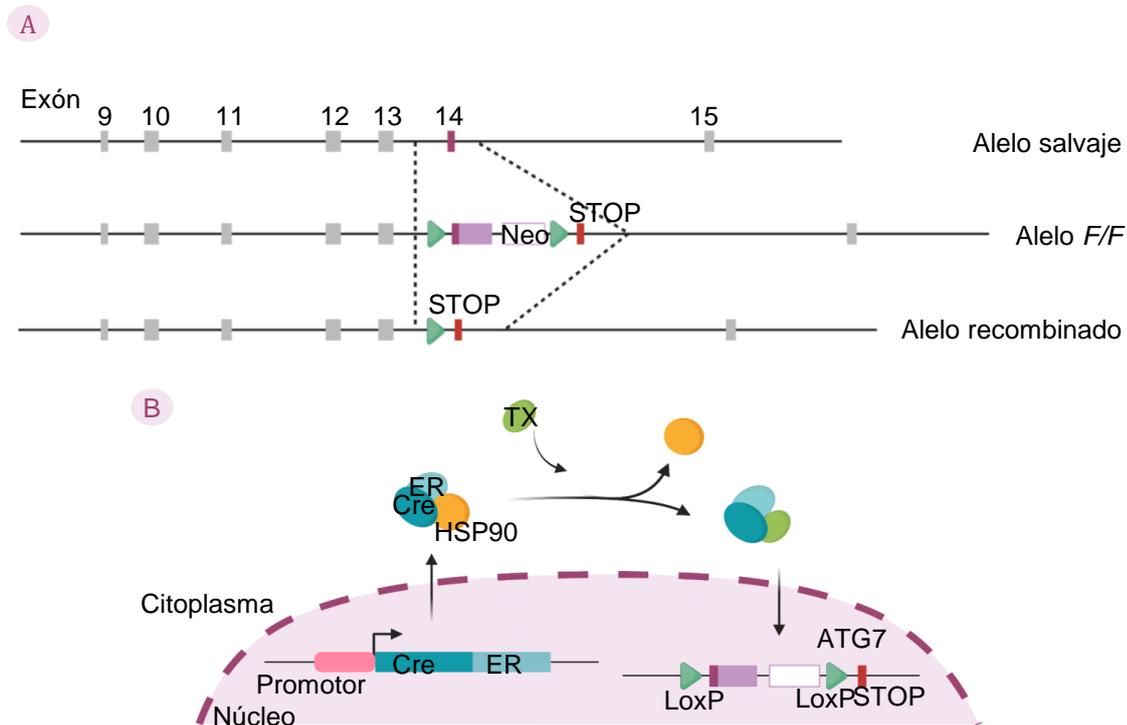


Figura M2: Sistema Cre-LoxP.

(A) Esquema de la construcción de *Atg7*. La construcción consta de las secuencias LoxP (representado en forma de triángulos verdes), la región codificante de la proteína desde el aa1786 hasta el aa2097 (rectángulo morado) y un fragmento del exón 14 que contiene un codón STOP (rectángulo rojo). La administración de TX resulta en la recombinación del alelo. **(B)** Sistema de recombinación induble Cre-LoxP. La administración de TX permite la traslocación al núcleo de la proteína CreER que se expresa bajo el promotor de Nestina, produciendo la recombinación en las células Nestina positivas. ER: receptor de estrógenos; Cre: Cre recombinasa; TX: Tamoxifeno

3. Validación de la recombinación mediante PCR

i. Obtención de muestra

La muestra de giro dentado se obtuvo por disección de animales de 2 meses a las 24 horas de la última dosis de Tamoxifeno.

ii. Extracción de ADN genómico con el método CTAB

La muestra de giro dentado se incubó con 100µl de tampón I (10mM pH7 Tris-HCl, 10mM MgCl₂, Triton X-100 0,5% (v/v)) y RNasa durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente se añadió el tampón de

lisis (2% CTAB (p/v), 100mM Tris-HCl pH8, EDTA 20mM, 2% βmercaptoetanol) y se incubó durante 30 minutos a 65°C. Se añadieron 400μl cloroformo isoamílico (24 cloroformo, 1 isoamialcohol (v/v)), se vortió y se centrifugó a 1200rpm durante 10 minutos. La fase superior que contiene el ADN se transfirió a un tubo con 400μl de isopropanol y se vortió. La muestra se mantuvo a -20°C durante toda la noche. Al día siguiente se centrifugó a 1200rpm durante 25 minutos a 4°C. El pellet se lavó con etanol 75% y se dejó secar antes de resuspender en agua.

iii. PCR de validación

El protocolo de la PCR se describe a continuación. Los primers utilizados fueron los siguientes: Atg7Flox-FW: 5'-TGGCTGCTACTTCTGCAATGATGT-3'; Atg7recombinación-RV: 5'-TGGACCAAGCCTGGACGTGGACTTT-3'. El producto de PCR se corrió en un gel de agarosa al 2% en TAE 1X (40mM TrisHCl, 1mM EDTA pH 8, 0,00114% (v/v) ácido acético glaciar) y se visualizó en un transiluminador. (Figura M3)

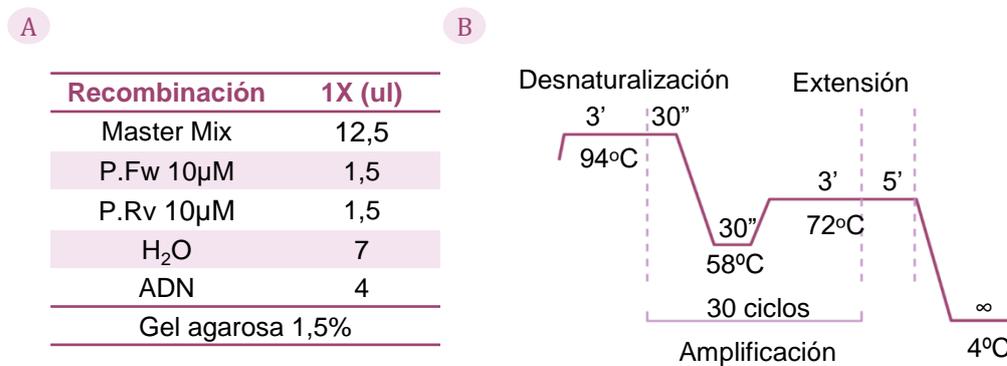


Figura M3: Protocolo de PCR convencional para validar la recombinación en muestras de giro dentado de hipocampo de animales NesCreER^{T2}:Atg7^{F/F}.

(A) Protocolo de PCR utilizado para el genotipado de los animales. (B) Programa de PCR utilizado para analizar la recombinación de *Atg7* tras la administración de tamoxifeno en los animales NesCreER^{T2}:Atg7^{F/F}.

iv. Secuenciación para corroborar la recombinación

El producto de la PCR se purificó a partir de la banda del gel de agarosa utilizando el kit comercial de purificación NZYGelpure (NZYtech, MB01101). Tras la cuantificación, la secuenciación fue llevada a cabo por la empresa Macrogen a partir de 100μg de ADN purificado.

4. Validación de la recombinación mediante inmunohistoquímica

Animales NesCreER^{T2}; GFP^{F/F} de 2 meses fueron tratados con Tamoxifeno/aceite y 12 días después del último pinchazo se sacrificaron. Se realizó un ensayo de inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo anti-GFP para visualizar las células en las que se había producido recombinación.

5. Marcaje con análogo de timidina

La 5-bromo-2'desoxiuridina (BrdU) es un análogo estructural del nucleótido timidina que se incorpora al ADN de las células que se encuentran en fase S en el momento de la administración y que nos permite detectar las células que han quedado marcadas utilizando un anticuerpo anti-BrdU. Se

preparó una solución de 10mg/ml de BrdU en solución salina estéril (NaCl 0,9%) y se inyectó intraperitonealmente el volumen necesario para administrar una dosis de 50mg/kg de animal. En los animales posnatales se realizó una única administración de BrdU a día 13.

6. Experimentos *in vivo* para evaluar el papel de la autofagia en el mantenimiento y activación de las células madre neurales del hipocampo.

i. Deleción de *Atg7* en animales posnatales NesCreER^{T2};Atg7^{F/F}.

Con el objetivo de evaluar el papel de la autofagia en el establecimiento de la quiescencia en el hipocampo durante la etapa posnatal, se delecionó el gen *Atg7* en animales NesCreER^{T2};Atg7^{F/F} y se realizó el marcaje de las células en fase S. Para ello, se siguieron los regímenes de Tamoxifeno y BrdU previamente descritos. Los animales se sacrificaron y perfundieron con PFA 4% a día 14 y 21 posnatal. (Figura R22A)

ii. Deleción de *Atg7* en animales adultos jóvenes NesCreER^{T2};Atg7^{F/F}.

Para evaluar el papel de la autofagia en el mantenimiento de las células madre del hipocampo adulto se siguió el régimen de Tamoxifeno descrito anteriormente en ratones de 2 meses NesCreER^{T2};Atg7^{F/F}. Tras la administración de Tamoxifeno, los ratones tuvieron 12 días de descanso antes del sacrificio y perfusión PFA 4%. (Figura R23A)

iii. Inhibición de la autofagia mediante la administración de Cloroquina a ratones NesCreER^{T2};Atg7^{F/F}.

Durante los días 10, 11 y 12 de descanso tras la administración del régimen de Tamoxifeno a ratones NesCreER^{T2};Atg7^{F/F} de 2 meses, los ratones fueron inyectados intraperitonealmente con 50mg/Kg ratón/día de Cloroquina (Vodicka *et al.*, 2014) preparada en NaCl 0.9%. Tras el periodo de descanso, los animales fueron sacrificados y perfundidos PFA 4%. (Figura R23A)

iv. Deleción de *Atg7* y potenciación de la neurogénesis mediante ejercicio en animales adultos jóvenes NesCreER^{T2};Atg7^{F/F}.

Tras la administración de Tamoxifeno a animales de 2 meses NesCreER^{T2};Atg7^{F/F}, y transcurrido los 12 días de descanso, los animales se expusieron a enriquecimiento ambiental con una rueda de correr durante 14 días. Tras este periodo, los animales fueron sacrificados y perfundidos PFA 4%. (Figura R24A)

v. Activación de la autofagia mediante la administración de Metformina a animales C57BL/6.

La activación de la autofagia en animales silvestres de 3 meses de edad C57BL/6, se llevó a cabo mediante la administración de Metformina en el agua de bebida a una concentración de 0.012M durante 8 semanas (Berthier *et al.*, 2016) realizando los cambios de biberones una vez a la semana. Inmediatamente después del sacrificio, y antes de la perfusión con PFA 4%, se recogió una pequeña muestra de hígado que se congeló en nitrógeno líquido para extraer proteína y de esta manera evaluar la actividad de AMPK tras el tratamiento de Metformina mediante Western blot. (Figura R25A).

7. Técnicas histológicas

i. Sacrificio, fijación y posfijación del tejido.

Los animales utilizados para el análisis *in vivo* fueron sacrificados mediante sobredosis de pentobarbital al administrarles intraperitonealmente una dosis de 80mg/kg de animal en NaCl 0.9%. Se fijaron mediante perfusión intracardiaca con paraformaldehído (PFA) al 4% (p/v) en tampón fosfato (PB 0,1M) realizando para ello una toracotomía seguida de un pequeño corte en la aurícula derecha. De esta manera, al inyectar primero solución salina y posteriormente PFA por el ventrículo izquierdo primero se desplazó la sangre de los vasos y tejidos y posteriormente se fijaron. Tras la fijación, se extrajo el cerebro de los animales y se mantuvieron en PFA 4% para realizar las posfijación. Las cantidades de solución salina y de PFA que se inyectó, así como el tiempo de posfijación varió en función de la edad de los animales (tabla M1). Tras la posfijación, se realizaron tres lavados de al menos 10 minutos con PB 0,1M y se guardaron con PB 0,1M 1x con azida al 0.05% hasta su posterior procesamiento.

Edad animales	Volumen NaCl 0.9%	PFA 4%	Tiempo de Posfijación
P14	5ml	10ml	2h 4°C
P21	10ml	20ml	2h 4°C
Adultos	20ml	40ml	16h 4°C

Tabla M1: fijación tejido

Tiempos de fijación y volumen empleado para cada una de las edades de los ratones.

ii. Procesamiento del tejido.

Los cerebros se procesaron con un vibratomo Leica VT 1200. Se realizaron cortes seriados de 40µm recogiendo 48 cortes en forma de 2 series de 6 grupos por serie con 4 cortes por grupo. De esta manera se consigue realizar un muestreo de todo el hipocampo. En el caso de los cerebros de animales posnatales de 14 (P14) y 21 (P21) días de edad fue necesario embeber el tejido en una solución 5% agarosa y 10% sacarosa preparada en agua para poder realizar los cortes.

iii. Técnicas inmunohistoquímicas.

Los cortes de cerebro se analizaron por inmunohistoquímica, realizando la tinción en al menos 3 cortes seriados por animal y en un mínimo de 3 animales por condición. El desmascaramiento de la BrdU se realizó previamente a la inmunotinción mediante una incubación del tejido durante 20 minutos a 37°C con HCl 2N para desnaturalizar el ADN, seguido de la neutralización con tampón borato 0,1M pH 8,5 durante 10 minutos a RT. Para realizar las inmunotinciones, el tejido se incubó una hora a temperatura ambiente con tampón bloqueo que contenía PB 0,1M con FBS al 10% y una concentración variable de Triton X100 en función del anticuerpo primario que se fuese a utilizar (para anticuerpos que detectan proteínas nucleares se utilizó 0,5% de Triton X100, mientras que para proteínas citoplasmáticas fue de 0,2%). Después, el tejido se incubó en flotación con los anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo a 4°C durante toda la noche y en agitación. Al día siguiente, se realizaron tres lavados de al menos 10 minutos con PB 0,1M y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente diluido en PB 0,1M durante una hora a temperatura ambiente en oscuridad y agitación. Tras la incubación, se repitieron los tres lavados con PB 0,1M y se utilizó el marcador nuclear DAPI durante 10 minutos. Se hicieron tres lavados de al menos 10 minutos con PB 0,1M y se montó la inmunohistoquímica con Mowiol más Dabco al 2,5% (p/v).

iv. Análisis inmunohistoquímica.

Las imágenes de las inmunotinciones se tomaron con un microscopio confocal (microscopio confocal Leica SP8) a una resolución de 512x512 o 1024x1024 y 40 aumentos realizando mapas que contuvieran el hipocampo. El conteo de células positivas para los distintos marcadores se llevó a cabo utilizando el programa de procesamiento de imágenes diseñado para imágenes científicas ImageJ Fiji.

8. Análisis estadístico

En todos los experimentos se utilizó al menos 3 cortes por animal de la zona dorsal del hipocampo, y al menos 3 animales por condición. El análisis estadístico se realizó empleando el programa GraphPad Prims 8. Se analizó la normalidad de las muestras con el test de Saphiro Wilks y la homogeneidad de las varianzas con el test F. Para comparar dos condiciones experimentales se utilizó el test de la T de Student. Para comparar dos grupos experimentales y dos variables se utilizó ANOVA de dos vías con el posttest de Tukey para comparar todos los grupos experimentales entre sí o posttest de Sidak para comparar una variable experimental. En todos los análisis se ha considerado como significativo una probabilidad $p < 0.05$. Las probabilidades se han representado como * cuando $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$. Los datos se han representado como el promedio \pm error estándar de la media (SEM).

Métodos *in vitro*

1. Aislamiento de células madre y astrocitos

El aislamiento de las células GLAST+ (NSCs y astrocitos) se realizó a partir de hipocampos de ratones posnatales de 3 y 21 días, así como de adultos de 2, 12 y 18 meses (Figura M4).

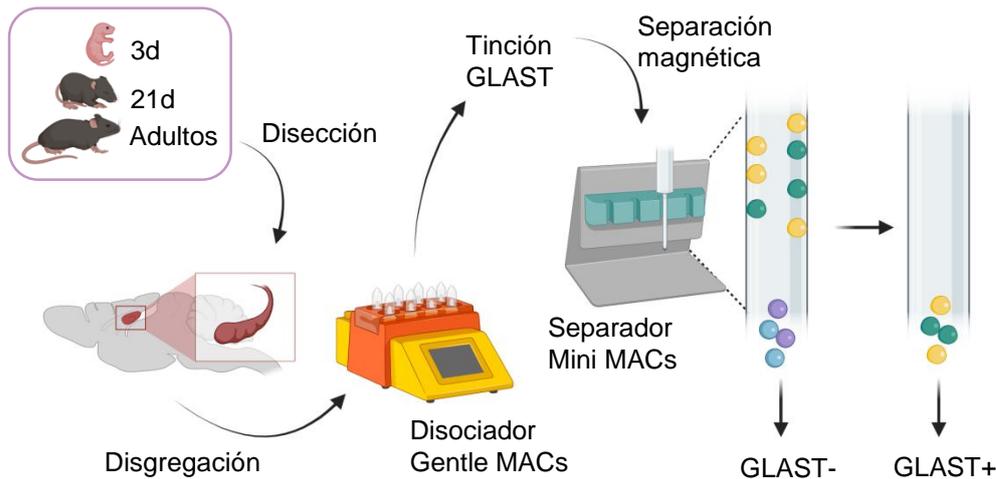


Figura M4: Aislamiento de células GLAST+ a partir de tejido de hipocampo con tecnología Miltenyi.

Esquema detallado del proceso de aislamiento de células GLAST a partir de hipocampo. Tras la disección de los hipocampos, se realiza una disgregación enzimática y mecánica del tejido. El tejido disgregado se somete a una separación magnética mediante la tecnología MACs de Miltenyi que permite obtener una fracción enriquecida en células GLAST+.

i. Disección y disociación de hipocampo.

La disección de los hipocampos se llevó a cabo en HBSS w/o. La disociación del tejido se realizó mediante una combinación de disgregación enzimática con el kit comercial *Neural Tissue Dissociation Kit (T)* (Miltenyi, 130-092-628) y disgregación mecánica suave con temperatura utilizando el programa 37C_NTDK_1 del disociador gentleMACS Octo Dissociator (Miltenyi, 130-095-937). Una vez diseccionado el tejido, los hipocampos se transfirieron a los tubos gentleMACs C, se cortaron con el bisturí y se resuspendieron con la mezcla enzimática 1 (1750ul buffer X+200ul Enzima T). Después, se les añadió la mezcla enzimática 2 (20ul buffer Y+10ul Enzima A) y se realizó la disgregación del tejido en el disociador de tejidos. Finalizado el tiempo se añadieron 10ml de HBSS, se pasó la suspensión celular a través del filtro MACS SmartStrainer (70ul) (Miltenyi, 130-110-916), se centrifugó a 300g durante 10 minutos y se eliminó el sobrenadante.

ii. Eliminación de mielina en tejido de animales adultos.

En tejidos de animales adultos (2, 12 y 18 meses) fue necesario realizar un gradiente de percoll para eliminar la mielina antes de realizar el aislamiento en base al marcador GLAST. Para ello, se eliminó el sobrenadante tras la centrifugación, se resuspendió con 6ml de SIP 30% y se generó el gradiente añadiendo lentamente 1,5ml de HBSS. Se realizó una centrifugación a 300g 20 minutos con aceleración 2 y desaceleración desactivada. Tras la centrifugación, se eliminó el sobrenadante que contenía los restos de mielina.

iii. Aislamiento de células en base al marcador GLAST.

El precipitado resultante después de la última centrifugación se resuspendió con tampón fosfato salino y suero de albumina bovina (PBS 1X, 0,5% BSA (PBS-BSA)) y se volvió a centrifugar a 300g 10 minutos para realizar un lavado de las células. El aislamiento magnético en base al marcador GLAST se realizó empleando el kit comercial *Anti-GLAST (ACSA-1) MicroBead Kit* (Miltenyi, 130-095-826). Para ello, se retiró el sobrenadante, se resuspendió con 80µl de PBS-BSA y 20µl de Anti-GLAST (ACSA-1)-Biotin y se incubó 10 minutos a 4°C antes de realizar otra centrifugación de 10 minutos a 300g. Después, se eliminó el sobrenadante y se incubó la muestra con 80µl de PBS-BSA y 20µl de Anti-Biotin MicroBeads a 4°C durante 15 minutos. Se realizó otro lavado con PBS-BSA y se procedió a realizar la separación magnética empleando una columna MS (MS column, Miltenyi, 130-042-201) y el separador magnético (MiniMACS Separator, Miltenyi, 130-042-102). La muestra resuspendida en 500µl de PBS-BSA se pasó a través de la columna realizando seguidamente 3 lavados con 500µl de PBS-BSA para eliminar la fracción negativa. Después, se retiró la columna del imán, se añadió 1ml de PBS-BSA y con ayuda del embolo se recogió la fracción de células marcadas para GLAST. Se determinó el número de células de cada fracción realizando una dilución 1:1 con Azul Tripan 0,1% en PBS y midiendo el número de células vivas (no marcadas) en una cámara de Neubauer. Las células se centrifugaron para obtener un pellet y extraer ARN o bien se sembraron en una placa P24 con cristales tratados con matrigel y con medio N2 para proceder a un análisis inmunocitoquímico.

2. Cultivo de células madre y progenitores de hipocampo de rata

i. Expansión y mantenimiento de cultivos de NSCs crecidos en suspensión y adheridos.

Las células se cultivaron en suspensión, en forma de neuroesferas siendo crecidas en un frasco contenedor de 25cm² o 75 cm², o en adherido, sobre en placas de cultivo de 100mm previamente tratadas con O/L. Para ambas formas de cultivo, las células se mantuvieron en un incubador a 37°C y 5% CO₂ y el medio de cultivo N2 fue suplementado con 10ng/ml de FGF2 en el caso de cultivos en suspensión o 20ng/ml de FGF2 en el caso de cultivos en adherido. Las células se mantuvieron en cultivo durante cuatro días, de forma que el cultivo prolifera y se expande. En ese punto, era necesario realizar un pase de las células y sembrarlas de nuevo en forma de célula única para continuar con la expansión del cultivo.

ii. Pase de células cultivadas en suspensión en esferas.

Las esferas se recogieron del frasco contenedor, se lavaron con PBS y se centrifugaron a 800rpm 4,5 minutos. Después, se aspiró el sobrenadante, se añadió Accumax (15µl por mililitro que de células crecidas en el frasco contenedor) y se disgregaron mecánicamente con una pipeta 15 veces. Seguidamente, se introdujeron en un baño a 37°C durante aproximadamente 30 segundos y se volvieron a disgregar mecánicamente otras 15 veces. Para la neutralización del Accumax se añadió 1ml de medio N2 y se centrifugó a 800 rpm 4,5 minutos. Se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en medio N2 antes de contar el número de células viables en una cámara de Neubauer. Para realizar el contaje, se realizó una dilución 1:1 con Azul Tripan 0,1% en PBS de forma que las células no viables quedaran marcadas. Para la expansión se sembraron 10000 células por cm² de frasco contenedor en medio N2 suplementado con 10ng/ml de FGF2.

iii. Pase de células cultivadas en monocapa.

Se retiró el medio antes de lavar las células con PBS. Se incubaron durante un minuto con Tripsina atemperada a 37°C y tras este paso, las células se levantaron. El efecto de la tripsina se neutralizó añadiendo 5ml de medio N2. A continuación, se recogió la suspensión celular, se centrifugó a 800rpm durante 4,5 minutos y se resuspendió en un mililitro de medio N2. Se realizó una dilución 1:1 de las células con Azul Tripan 0,1% en PB, se midió el número de células viables en una cámara de Neubauer y se sembró un millón de células por placa P100 O/L para continuar con la expansión del cultivo.

iv. Criopreservación y descongelación de cultivos de NSCs.

Para criopreservar los cultivos, se realizó un pase a las células crecidas en suspensión o en adherido y se recolectaron por centrifugación 1,5 millones de células. Las células se resuspendieron en medio N2 con 10% DMSO y se traspasaron a un criotubo. Los criotubos se mantuvieron durante 24h en un recipiente con 2-propanol a -80°C para permitir un descenso lento de la temperatura (aproximadamente 1°C por minuto). Tras ese periodo, se transfirieron a un tanque de nitrógeno líquido hasta su posterior descongelación.

En el proceso de descongelación, el criovial se incubó durante aproximadamente 2 minutos en un baño a 37°C. Las células se traspasaron a un tubo con 4ml de medio N2 y se centrifugaron a 800rpm 4,5 minutos. Se eliminó el sobrenadante, se resuspendieron en medio N2 suplementado con 10ng/ml o 20ng/ml de FGF2 y se sembraron en un frasco contenedor de 25cm² o en una placa de cultivo de 100mm O/L con un volumen final de 4 u 8ml respectivamente.

v. Inducción del estado de quiescencia en cultivos crecidos en suspensión y en monocapa

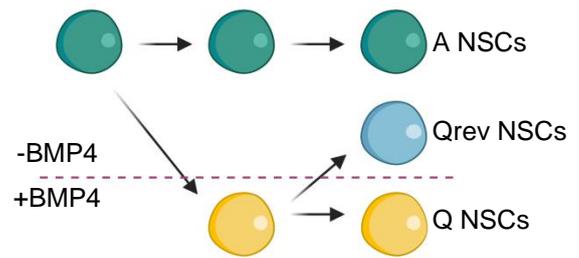
Para inducir el estado de quiescencia en el modelo *in vitro* fue necesario cultivar las células en medio N2 suplementado con 10ng/ml de FGF2 y 50ng/ml de proteína morfogénica osea 4 (BMP4) durante 4 días. Para ello, se partió de un cultivo de NSCs en mantenimiento que se disgregó como en un pase y se sembró, en el caso de células cultivadas en suspensión, a una concentración de 10000 células por cm² de frasco contenedor y en el caso de un cultivo en adherido se sembraron 50000 células por pocillo de P24 que contenían un cristal O/L. Como control de la quiescencia, se sembraron células en medio N2 suplementado únicamente con 10ng/ml de FGF2 (Figura M5).

vi. Reversión del estado de quiescencia de cultivos en suspensión y en monocapa

Para realizar la reversión del estado de quiescencia fue necesario retirar la BMP4 del medio de cultivo. Para ello se realizó un cambio de medio cuatro días después de haber inducido la quiescencia y las células se incubaron durante 3 o 4 días con medio N2 fresco suplementado únicamente con 10ng/ml de FGF2. Las células crecidas en esferas o en monocapa se lavaron con PBS antes de cambiar el medio. La reversión del estado de quiescencia de cultivos en esferas también se pudo realizar pasando el cultivo a monocapa. Se realizó un pase de las esferas para obtener las células de forma individualizada y se sembraron 50000 células sobre cristales tratados con matrigel en placas de P24 suplementado con 10ng/ml FGF2 (Figura M5).

Figura M5: Inducción de la quiescencia en cultivos *in vitro* y su reversión.

Esquema del protocolo seguido para inducir quiescencia en cultivo de NSCs. La proteína BMP4 (50ng/ml) se añade en presencia del mitógeno FGF2 (10 ng/ml) para inducir la quiescencia. A los 4 días se considera que las NSCs están quiescentes. La reversión de la quiescencia se realiza retirando la BMP4 del medio lo que permite que las NSCs se activen.



3. Ensayos de actividad del proteasoma

Para medir la actividad quimiotripsina asociada al proteasoma, se utilizó el kit comercial *Proteasome 20S Assay Kit* (Sigma-Aldrich, MAK172). Este kit utiliza el sustrato fluorogénico LLVY-R110 como sustrato de la actividad del proteasoma ya que su degradación genera una fuerte señal fluorescente R110. Para ello, se partió de células cultivadas en adherido en condición de proliferación o quiescencia durante cuatro días. Se levantaron, se contaron y se sembraron 80000 células por pocillo en placas multipocillo de 96. Las células se incubaron con la solución *Proteasome Assay Loading solution* durante 5 horas a 37°C antes de hacer la lectura a λ_{ex} 485nm y λ_{em} 535nm. Las condiciones control de inhibición del proteasoma se incubaron previamente con el inhibidor de la actividad quimiotripsina MG132 10 μ M durante 90 minutos. La actividad del proteasoma se normalizó respecto al número de células de cada pocillo. Para ello, las células se fijaron y tiñeron con 200 μ l de cristal violeta durante 20 minutos, se retiró la solución y se dejaron secar toda la noche a RT. Al día siguiente, se incubaron con 200 μ l de metanol durante 20 minutos en agitación y se procedió a la lectura de la absorbancia a 590nm. El valor se extrapoló a una curva patrón de número de células conocido que había sido fijada y teñida de la misma manera.

4. Análisis de la ruta de la autofagia-lisosoma.

Se cultivaron esferas en proliferación o quiescencia durante 4 días. Tras ese periodo, las células se recolectaron mediante centrifugación y se almacenaron a -80°C a la espera de realizar la extracción de ARN o proteínas. La ruta autofagia-lisosoma se analizó mediante RT-qPCR y Western blot.

5. Ensayos de inhibición de la autofagia y el efecto en marcadores autofágicos LC3 y p62.

Células cultivadas durante cuatro días en forma de neuroesferas proliferantes o quiescentes, se incubaron durante 6 horas con Bafilomicina A1 100nM. Bafilomicina A1 es un inhibidor de autofagia impide la fusión de las vesículas autofágicas con los lisosomas al inhibir las hidrolasas lisosomales. De esta manera, es posible medir el flujo autofágico analizando los marcadores autofágicos p62 y LC3II (Loos *et al.*, 2014). Los niveles de LC3II se analizaron por Western blot y los de p62 tanto por inmunocitoquímica como por Western blot.

6. Electroporación del sensor pRFP-GFP-LC3 para la detección de autofagosomas y autolisosomas.

Células cultivadas durante tres días en forma de neuroesferas proliferantes o quiescentes se electroporaron con el plásmido del sensor en tándem pRFP-GFP-LC3 (Kaizuka *et al.*, 2016), el cual

expresa una proteína roja fluorescente (RFP) y una proteína verde fluorescente (GFP) sensible a pH fusionadas a LC3. La electroporación se llevó a cabo con el electroporador *NEPA21 Super Electroporator* empleando los parámetros indicados en la tabla M2 y siguiendo el protocolo establecido por la casa comercial. Se electroporó 10µg de plásmido a un millón de células. Una vez electroporadas, las células se mantuvieron con medio de proliferación y quiescencia durante 24 horas antes de fijarlas con PFA 2%. 6 horas antes de la fijación fueron tratadas con 100nM de Bafilomicina A1.

Ajustes	Voltaje	Tiempo (ms)	Intervalo (ms)	Nº	Velocidad	Polaridad
Pulso de perforación	150	2,5	50	2	10	+
Transferencia	20	50	50	5	40	+/-

Tabla M2: Parámetros utilizados para la electroporación del plásmido pRFP-GFP-LC3.

7. Extracción ADN plasmídico

La extracción del ADN plasmídico se realizó siguiendo el protocolo indicado en el kit comercial *Plasmid Midi Kit* (Quiagen, 12143). La cuantificación de la muestra se determinó mediante la medición de la absorbancia a 260nm en un espectrofotómetro (Thermo scientific, NanoDrop 2000).

8. Ensayos funcionales

i. Inhibición de la autofagia y el efecto en la activación de NSCs quiescentes.

Neuroesferas quiescentes de cuatro días se incubaron durante 2 horas con 50nM de Bafilomicina A1. Tras ese periodo, las esferas se centrifugaron y se reemplazó el medio por medio N2 suplementado únicamente con 10ng/ml de FGF2 induciendo así la reversión del estado de quiescencia. 48 horas después del cambio de medio, las esferas se disgregaron como en un pase, se realizó un conteo del número de células para cada condición y se analizó la viabilidad celular realizando una dilución 1:1 con azul de Tripano. Además, 16 horas después del cambio de medio, las esferas se disgregaron como en un pase y se sembraron entre 50000 y 80000 células por pocillo de P24 tratado con matrigel para analizar la proliferación celular mediante inmunofluorescencia para el marcador Ki67.

ii. Activación de la autofagia y su efecto sobre AMPK en NSCs activas.

Neuroesferas activas cultivadas durante cuatro días se trataron con Fenformina 5mM durante 1 y 3 horas. La Fenformina actúa sobre la cadena respiratoria produciendo un aumento de los niveles de AMP y ADP y generando un desbalance del ratio AMP:ATP que lleva a la activación de AMPK (Zhang *et al.*, 2007). La activación de AMPK se analizó mediante Western blot.

iii. Activación de la autofagia y su efecto en viabilidad y activación de NSCs quiescentes.

Esferas quiescentes de 4 días se incubaron durante 2 horas con 1 y 2,5mM de Fenformina, y con HBSS. Tras ese periodo, las esferas se centrifugaron y se cambió el medio por medio N2 suplementado con 10ng/ml de FGF2 induciendo así la reversión de las células quiescentes y eliminando la Fenformina del medio. A las 48 horas del cambio de medio, se disgregaron las esferas como en un pase y analizó la viabilidad y el número de células para cada condición realizando una dilución 1:1 con azul Tripan. Además, se sembraron entre 50000 y 80000 células por pocillo de P24 tratado con matrigel para

analizar la proliferación celular mediante inmunofluorescencia para el marcador Ki67 a las 48 horas del tratamiento.

9. Detección de marcadores mediante inmunocitoquímica

Para proceder al análisis de muestras mediante ensayos de inmunocitoquímica fue necesario que las células estuvieran adheridas a cristales cubreobjetos de 12mm de diámetro colocados en el fondo de los pocillos de placas de P24. En el caso de cultivos en adherido, la inducción de la quiescencia se realizó directamente sobre cristales tratados con O/L. Sin embargo, en los casos de cultivos cultivados en esferas, fue necesario disgregarlas antes de sembrarlas sobre en cristales en P24 tratados previamente con matrigel. En el caso de las células aisladas en base al marcador GLAST a partir de hipocampo de ratón, las células se sembraron sobre cristales tratados con matrigel. En todos los casos, las células se fijaron con PFA al 2% durante 10 minutos, se retiró el PFA y se hicieron 3 lavados de 5 minutos con PB 0,1M.

Las células fijadas sobre un cristal se incubaron una hora a temperatura ambiente con tampón bloqueo que contenía PB 0,1M con FBS al 10% y una concentración variable de Triton X100 en función del anticuerpo primario que se fuese a utilizar (para anticuerpos que detectan proteínas nucleares se utilizó 0,5% de Triton X100 mientras que para proteínas citoplasmáticas 0,2%). Después, las células se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, se realizaron tres lavados de 5 minutos con PB 0,1M y se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes diluidos en PB 0,1M durante una hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras la incubación se repitieron los tres lavados con PB 0,1M y se utilizó el marcador nuclear DAPI durante 5 minutos. Se hicieron tres lavados de 5 minutos con PB 0,1M y se montó la inmunocitoquímica con Mowiol más Dabco al 2,5% (p/v).

i. Detección de agregados proteicos y autofagosomas.

Los agregados proteicos se analizaron en células proliferantes y quiescentes cultivadas durante 4 y 8 días en suspensión, así como los agregados en las células GLAST+ aisladas de hipocampos de ratón. Además, se analizó la evolución de los agregados a los 4 días de la reversión del estado de quiescencia en esferas revertidas en sistema adherido. Para ello, se utilizó el kit comercial *Proteostat Aggresome Detection* (Enzo, ENZ-51035) que contiene una molécula fluorescente que detecta específicamente los cargos formados por proteínas desnaturalizadas y los cuerpos de inclusión tipo agrosomas. Una vez fijadas las células con PFA 2%, se lavaron tres veces durante 5 minutos y se incubó con la solución de permeabilización (0,5% Triton X-100, 3mm EDTA pH8 en 1X de Assay Buffer) 30 minutos en hielo. Después, las células se lavaron con PB 0,1M y se incubaron con Dual Detection Reagent durante 30 minutos en hielo y protegido de la luz. Por último, se lavaron las muestras tres veces con PB 0,1M y se incubaron con DAPI durante 5 minutos para marcar los núcleos. Se realizaron tres lavados de 5 minutos con PB 0,1M y se montó la inmunocitoquímica con Mowiol más Dabco al 2,5% (p/v).

La detección de autofagosomas y autolisosomas se realizó en células electroporadas con el plásmido del sensor en tándem pRFP-GFP-LC3 (Kaizuka *et al.*, 2016). Tras la fijación con PFA 2%, las células se incubaron con DAPI durante 5 minutos para marcar los núcleos. Posteriormente se realizaron tres lavados de 5 minutos con PB 0,1M y se montó la inmunocitoquímica con Mowiol más Dabco al 2,5% (p/v).

ii. Análisis de fluorescencia

Las imágenes de las inmunotinciones se tomaron con un microscopio confocal (microscopio confocal Leica SP8) a una resolución de 1024x1024 y 40 aumentos y las imágenes se tomaron realizando un rastreo horizontal de al menos cinco campos aleatorios por condición. Para el análisis de del marcador de proliferación celular Ki67 y del marcador de célula madre Sox2 y GLAST, se contaron el número de células positivas respecto el total de células presentes en la preparación. Para el análisis de los agregados proteicos (*Proteostat*) así como del marcador de la vía autofágica p62, se analizó la intensidad integrada de la señal por célula. En los experimentos de electroporación del sensor pRFP-GFP-LC3, los autofagosomas se identificaron como puncta RFP⁺/GFP⁺ mientras que los autolisosomas se identificaron como puncta RFP⁺. Además, la señal de los puncta fue analizada mediante un histograma de intensidad de fluorescencia. El análisis se llevó a cabo utilizando el programa Fiji.

10. Análisis de datos de microarray y RNAseq

Se realizó un análisis de expresión génica de las NSCs activas y quiescentes a partir de datos previos disponibles en el laboratorio de un microarray de expresión y de una secuenciación masiva de RNAseq. En ambos casos, se utilizaron 3 cultivos independientes de NSCs activas y quiescentes de cuatro días *in vitro*. En el caso del microarray, el cADN fue sintetizado, fragmentado, marcado e hibridado con *GeneChip Rat Gene 1.1 ST microarrays* (Affymetrix) por la empresa Progenika Biopharma S.A. El RNAseq se realizó en la Unidad de Análisis Multigénico de UCIM-INCLIVA (Universidad de Valencia). Las librerías se secuenciaron utilizando *Illumina® NSQ 500/550 Hi Output KT v2.5 (150 CYS)* (Illumina, San Diego, CA), que generaron 2x75pb lecturas por ambos extremos con una profundidad de lectura de 25 millones de lecturas por librería.

A partir de los datos crudos del microarray y de las lecturas por millón de kilobases (rpkm) del RNAseq se elaboraron mapas de calor. La identificación de genes comunes entre nuestro análisis de RNAseq y el de Berg y colaboradores se realizó con los datos publicados en el que comparaban el transcriptoma de animales de 4 días (P4) y 2 meses de edad (Berg *et al.*, 2019). Los datos de (Llorens-Bobadilla *et al.*, 2015) se exploraron con Shiny App (<https://martin-villalba-lab.github.io/shinyapps.html>).

El análisis de las redes de asociación se realizó con la base de datos STRING utilizando el algoritmo Markov (von Mering *et al.*, 2003) a partir del listado de 65 genes identificados en a la categoría *GO Ontology* (GO): *Translation* (0006412) obtenida de los datos del microarray.

11. Estudios de expresión génica

i. Extracción de ARN

Para la extracción del ARN total de las muestras celulares se utilizó un protocolo de extracción basado en el disolvente orgánico Trizol. Para ello, se partió de pellets de cultivos de esferas en proliferación y quiescencia de mínimo 250000 células. Las muestras se agitaron con 1ml de TriReagent y 200µl de cloroformo y posteriormente se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente. Después, se centrifugaron a 4°C y 13200rpm durante 15 minutos. Se distinguieron tres fases, la superior acuosa donde se encontraba el ARN, una intermedia donde se localizó el ADN y una inferior donde se hallaban las proteínas. La fase acuosa superior se transfirió a un nuevo tubo, se mezcló por inversión con 0,5ml

de 2-propanol y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente resultando en la precipitación del ARN. Posteriormente, se volvió a centrifugar 15 minutos a 4°C y 13200rpm, se retiró el sobrenadante y se dejó secar el pellet de ARN durante 5 o 10 minutos a 4°C. Por último, se resuspendió el ARN en 50 µl de agua libre de RNAsas y se disolvió bien. La cantidad de ARN total presente en las muestras se determinó mediante la medición de la absorbancia a 260nm en un espectrofotómetro (Thermo scientific, NanoDrop 2000). El ARN se almacenó a -80°C para evitar su degradación.

ii. Retrotranscripción

El ARN extraído se retrotranscribió a cDNA utilizando el kit comercial PrimeScript RT reagent kit (Takara, RR037A). Se retrotranscribieron 500ng de ARN mediante una RT-PCR con un ciclo de 37°C durante 15 minutos seguido de otro ciclo de 85°C y 5 segundos.

iii. qPCR y análisis

El análisis de expresión de genes implicados en las distintas vías, se realizó a partir de cDNA mediante PCR cuantitativa (qPCR) empleando SyBR Green como marcaje fluorescente y un termociclador para qPCR (Applied Biosystems, QuantStudio 5). Las secuencias de los cebadores se obtuvieron mediante el análisis de la secuencia empleando la herramienta “*OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator (2007)*” para obtener temperaturas de anillamiento en torno a 58°C. En todos los casos, los cebadores se diseñaron entre exones para evitar una posible amplificación de ADN genómico contaminante en las muestras y generaban un amplicón de aproximadamente 150pb. Para todas la RT-qPCR se utilizaron las mismas condiciones experimentales excepto la temperatura de anillamiento (TM) que varió en función de los cebadores utilizados. Finalmente, los resultados de los niveles de expresión de ARN mensajero se determinaron utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001) (Figura M6).

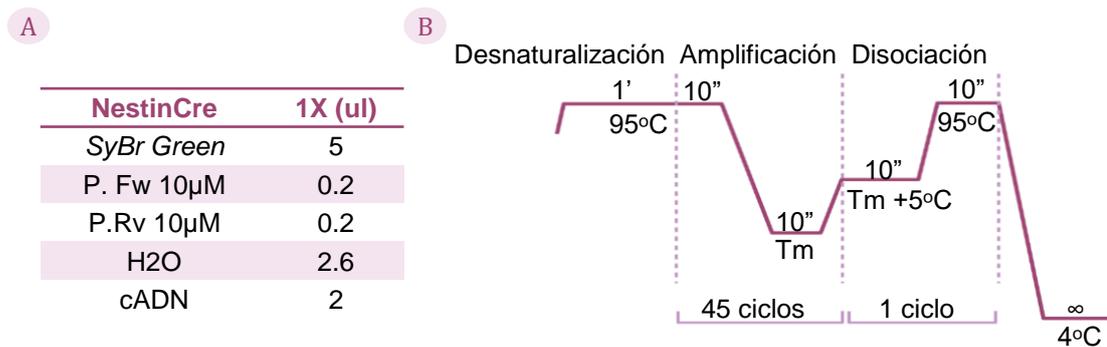


Figura M6: Protocolo de RT-qPCR para la expresión génica

(A,B) Especificaciones del protocolo para realizar una qPCR sobre muestras de cADN

12. Inmunodetección de proteínas por Western blot

i. Extracción proteína total

Para la extracción de la proteína total de cultivos de NSCs, se partió de pellets de NSCs activas y quiescentes de al menos 125000 células. Estos pellets se lisaron con tampón de lisis suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa (50mM Tris HCl, 10mM NaCl, 10% NP-40, 0.6M Sacarosa, 2X mezcla comercial de inhibidores de proteasas, 0.08% PMSF, 50mM EDTA, 50mM NaF, 5mM Na₄P₂O₇ en

agua). Se incubaron durante 5 minutos en hielo y se centrifugaron a 13200rpm durante 20 minutos a 4°C. Tras la centrifugación, el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se procedió a su cuantificación. En el caso de la extracción de proteínas en muestras de tejido se realizó el mismo procedimiento, añadiendo disgregación mecánica manual con el tampón de lisis e incubando 30 minutos en hielo.

ii. Cuantificación proteína total

Para la cuantificación de proteína total se utilizó el método colorimétrico BCA (ácido bicinonínico). Este método está basado en la reacción Biuret, que consiste en la reducción del Cu^{2+} a Cu^{1+} en un medio alcalino para dar lugar a un compuesto hidrosoluble de color púrpura. El complejo absorbe a una longitud de onda máxima de 562nm de manera lineal, permitiendo la detección de proteínas totales con una gran sensibilidad. Para utilizar este método, se empleó el kit comercial de detección de proteínas *BCA protein assay kit* (Thermoscientific, 23227) que consiste en dos soluciones A y B, siendo A la que contiene el ácido bicinonínico y B el sulfato de cobre. En una placa multipocillo de 96 se incubaron tanto duplicados de las muestras a cuantificar como de la curva patrón (obtenida a partir de diluciones seriadas de BSA) con el reactivo del kit durante 30 minutos a 37°C. La lectura de las muestras se realizó en un lector de placas a 544nm.

iii. Preparación muestras para Western blot

Una vez cuantificadas las muestras, se prepararon 80µg para ser resueltas mediante electroforesis. Se mezclaron con tampón de carga 5X (50% glicerol, 0.08M Tris HCl pH 6.8, 2% SDS, 0.05% azul de bromofenol, 0.05% v/v β-mercaptoetanol en agua) y se desnaturalizaron por ebullición durante 5 minutos a 95°C. Seguidamente, las muestras se introdujeron en hielo durante 2 minutos, se centrifugaron a máxima potencia unos segundos y se almacenaron a -20°C hasta la electroforesis.

iv. Preparación geles. Electroforesis. Transferencia a membrana.

La separación de las proteínas se realizó en geles desnaturalizantes de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) de manera que las proteínas adquieren una relación carga/masa idéntica y su movilidad en el gel corresponde únicamente a su tamaño. El gel concentrador se preparó al 4% de acrilamida y el gel separador a un porcentaje de acrilamida-bisacrilamida suficiente para permitir la separación de las proteínas en función de su peso molecular.

La electroforesis se realizó a 150mA en tampón de electroforesis (0,25M Tris HCl, 0,2M glicina, 3mM SDS) y se utilizó un marcador preteñido con un rango de peso molecular de 11 a 245 kDa. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare, 10600001) con una corriente de 110V durante 1h 45min a 4°C en tampón de transferencia (120mM Tris-HCl, 40mM glicina, 20% (v/v) metanol).

v. Incubación de las membranas con los anticuerpos

Antes de la incubación de la membrana con los anticuerpos, se realizó el bloqueo de los sitios inespecíficos con BSA al 5% (p/v) en tampón Tris Salino (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.6) con 0,1% Tween20 (TTBS)) durante una hora a temperatura ambiente y en agitación. Tras el bloqueo de la membrana, se incubó con el anticuerpo primario correspondiente diluido en TTBS durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se realizaron tres lavados de 10 minutos con TTBS y se incubó la

membrana con el anticuerpo secundario-IRDye correspondiente durante una hora a temperatura ambiente, en oscuridad y agitación. Después, se hicieron otros tres lavados de 10 minutos con TTBS y se procedió al escaneo de las membranas con el sistema de imagen LI-COR Odyssey.

vi. Análisis de las membranas

Los resultados del escaneo se analizaron en el programa Image Studio™ Lite.

13. Análisis estadístico

El análisis estadístico se efectuó con el programa GraphPad Prims 8. Todos los ensayos se realizaron con al menos tres cultivos celulares distintos. La normalidad de los datos se evaluó con el test de normalidad Saphiro-Wilks y la homogeneidad de las varianzas con el test F. Para comparar dos grupos experimentales se utilizaron los siguientes test estadísticos: muestras normales - varianzas homogéneas-no pareado: T Test; muestras normales-varianzas no homogéneas-no pareado: T Test con corrección de Welch; muestras normales-pareado: Ratio paired T test; muestras no normales - no pareado: Test Mann-Whitney; muestras no normales - pareado: Wilcoxon test; muestras normalizadas: se utilizó One simple T-Test en caso de muestras normales y One sample -Wilcoxon test en el caso de muestras no normales.

Para comparar más de dos grupos experimentales se utilizó ANOVA de una vía. Para muestras normales-varianzas iguales-no pareado: ANOVA de 1 vía posttest Tukey para comparar todas las condiciones con todas; posttest Dunnet para comparar los grupos con el control; muestras normales-varianzas iguales-pareado: RM ANOVA 1 vía con corrección Geisser-Greenhouse posttest Tukey. En el caso de tener más de una variable se utilizó ANOVA de dos vías con el posttest de Tukey para comparar todas las condiciones entre sí o con posttest de Sidak para comparar cada variable entre sí. Los datos se representaron como promedio \pm error estándar de la media (SEM) o como el promedio \pm rango intercuartílico en el caso de que las muestras no fueran normales. En todos los análisis se ha considerado como significativo un valor $p < 0.05$. Las probabilidades se han representado como * cuando $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

RESULTADOS

Capítulo I. Regulación de la síntesis proteica en cultivos de células madre neurales adultas quiescentes

1. Las NSCs quiescentes reprimen la expresión de genes relacionados con la traducción

El sistema *in vitro* utilizado en este trabajo se basa en la inducción de la quiescencia en cultivos de células madre neurales hipocámpicas (NSCs) con la proteína morfogenética de hueso BMP4, que se añade al medio de cultivo durante cuatro días (Figura R1A). La adición de BMP4 activa a los receptores de BMPs tipo I. Estos receptores desencadenan una cascada de señalización que resulta en la fosforilación y traslocación de las proteínas SMAD1/5/8 al núcleo, las cuales activan el programa de entrada en quiescencia (Mira *et al.*, 2010).

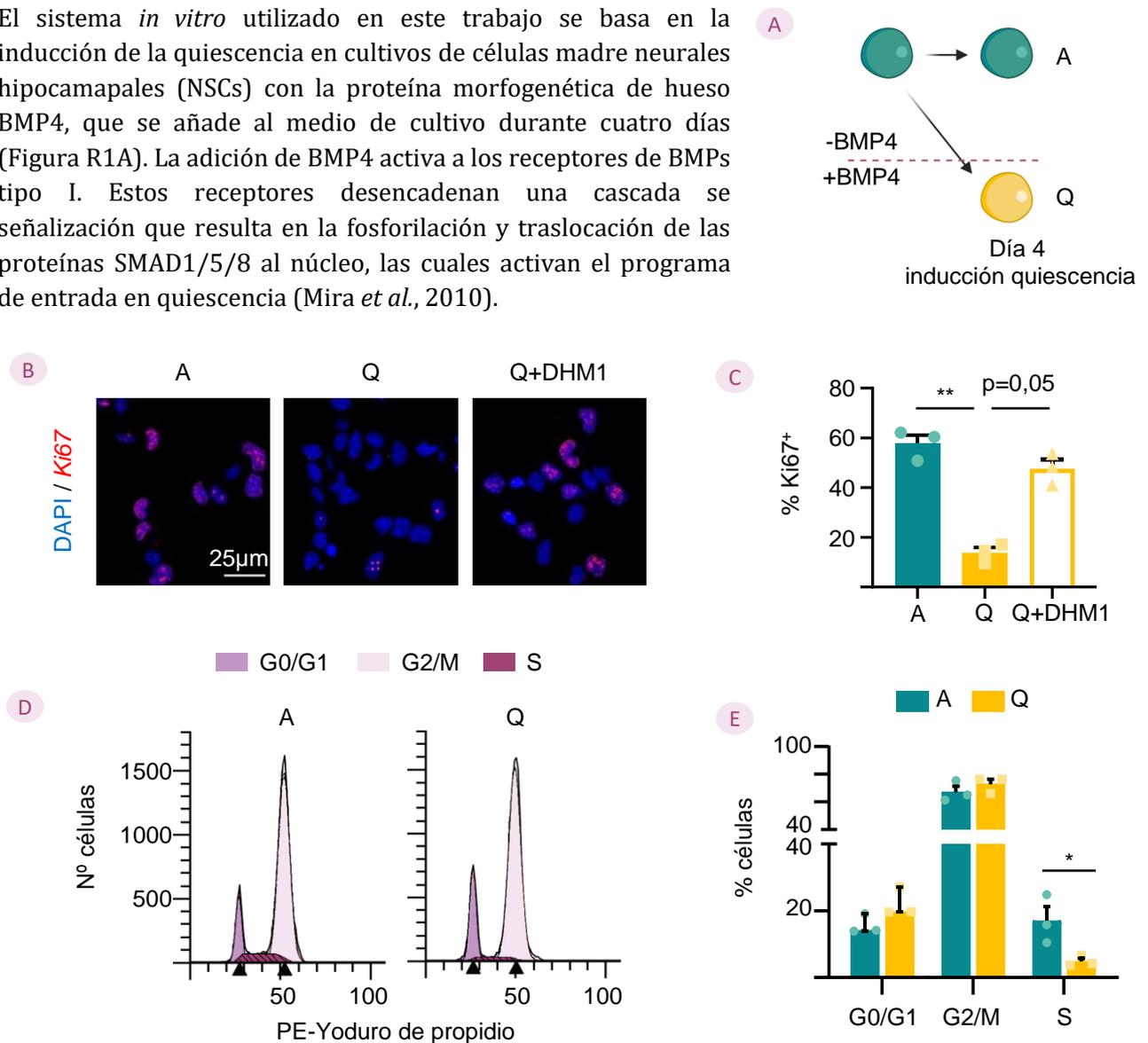


Figura R1: La señalización de BMP4 a través de los receptores de BMP de tipo I induce la entrada en quiescencia de las NSCs en cultivo.

(A) Esquema del protocolo seguido para inducir quiescencia en NSCs en cultivo. La proteína BMP4 (50ng/ml) se añade en presencia del mitógeno FGF2 (10 ng/ml). (B) Imagen confocal de cultivos de NSCs crecidos en monocapa donde se observan en rojo células en proliferación (Ki67⁺). Los núcleos se muestran teñidos con DAPI. (C) Cuantificación de la proliferación de los cultivos en monocapa medida como % células Ki67⁺. (D) Ejemplo de histograma de ADN de cultivos en neuroesferas de NSCs activas y quiescentes medido por tinción con yoduro de propidio y citometría de flujo. (E) Cuantificación de las fases del ciclo celular en función del contenido de ADN. Los datos de n≥3 de cultivos de NSCs activas y quiescentes independientes, se representan como el promedio ± SEM excepto los datos correspondientes a G0/G1 del panel E que se representan como como la mediana ± rango intercuartílico. Test estadísticos utilizados: R1C RM ANOVA 1 vía-corección de Geisser Greenhouse, postest Tukey; R1E G0/G1 Wilconxon test; R1E G2/M y S Ratio Paired T test. *<0,05, **<0,01, ***<0,001. A, NSCs activas; Q, NSCs quiescentes; DHM1, inhibidor del receptor de BMP tipo I.

En cultivos de NSCs crecidos en monocapa, las células a las que se les había inducido la quiescencia mostraron una disminución de los niveles de proliferación medidos por inmunofluorescencia para el marcador de proliferación Ki67 (Figura R1B, C). Además, el bloqueo del receptor de BMPs tipo I con el inhibidor DMH1 (Hao *et al.*, 2010) impidió la entrada en quiescencia (Figura R1B, C).

Por otro lado, en cultivos crecidos en neuroesferas, se corroboró la disminución de la proliferación mediante citometría de flujo utilizando yoduro de propidio como marcador del contenido de ADN. Se observó que los cultivos de células quiescentes mostraban una menor cantidad de células en fase S del ciclo celular (Figura R1D, E). En conjunto, los resultados validan estudios previos y demuestran que BMP4 induce la entrada en quiescencia tanto a cultivos de NSCs hipocampales crecidos en monocapa como en neuroesferas, reduciendo de forma significativa la proliferación celular.

2. Las NSCs quiescentes inhiben la etapa de inicio de la traducción

Se realizó un estudio transcriptómico de todo el genoma mediante chips (microarrays de Affymetrix) para comparar el perfil de expresión génica de NSCs activas y quiescentes. Se emplearon cultivos de neuroesferas de NSCs hipocampales tras cuatro días de tratamiento con o sin BMP4 (Figura R1A). Los resultados mostraron 1023 genes regulados positivamente en las células activas en comparación con 1314 regulados también al alza en las quiescentes (Figura R2A). Los análisis de enriquecimiento funcional por *Gene Ontology* (GO) y de vías KEGG de los genes diferencialmente expresados identificaron la traducción y el ribosoma como procesos biológicos altamente regulados en la transición de proliferación a quiescencia (Figura R2A). Los genes de estas categorías se encuentran ampliamente expresados en las células activas y, por el contrario, inhibidos en las células quiescentes. Estos datos apuntan a una reducción de la síntesis proteica en las NSCs quiescentes.

Un análisis más detallado de las redes de asociación de proteínas con la base de datos STRING (von Mering *et al.*, 2003) identificó tres grupos principales de genes reprimidos en las NSCs quiescentes (Figura R2B). Por un lado, los genes que codifican para las subunidades ribosómicas 40S/60S (genes *Rps/Rpl*), por otro lado, las sintetasas de aminoacil-tARNs (genes *Yars, Lars*, etc) y por último los factores de inicio de la traducción eucariotas (genes *eIFs*) (Figura R2B). Mediante RT-qPCR se validó la bajada en la expresión de una selección de genes de las tres categorías en muestras independientes de cultivos de NSCs quiescentes en comparación con los cultivos proliferantes (Figura R2C, E, G).

Además, estos genes representativos de cada categoría se analizaron en los datos de una secuenciación masiva de ARN de célula única (sc-RNAseq) de NSCs activas y quiescentes aisladas de la SVZ de ratones adultos (Llorens-Bobadilla *et al.*, 2015). Esta base de datos distingue entre NSCs activas no mitóticas (A1), activas mitóticas (A2), quiescentes *dormant* (Q1) y quiescentes *resting* (Q2). Los genes representativos elegidos mostraban un patrón de expresión diferencial entre los estados activos (A1/A2) y quiescentes (Q1/Q2) (Figura R2D, F, H), respaldando la idea de que la síntesis de proteínas se encuentra disminuida en las NSCs quiescentes *in vivo* (Llorens-Bobadilla *et al.*, 2015; Shin *et al.*, 2015). Curiosamente, los genes relacionados con las subunidades ribosomales no solamente se expresaban diferencialmente entre las NSCs activas y quiescentes sino también entre las dos subpoblaciones de quiescentes (Q1 y Q2). Las células *resting* (Q2) mostraban un aumento en la expresión respecto a las *dormant* (Q1) (Figura R2D, F, H), lo que refuerza la idea de que el aumento en la síntesis de proteínas es uno de los primeros eventos que sucede durante la activación de las NSCs quiescentes (Llorens-Bobadilla *et al.*, 2015; Shin *et al.*, 2015).

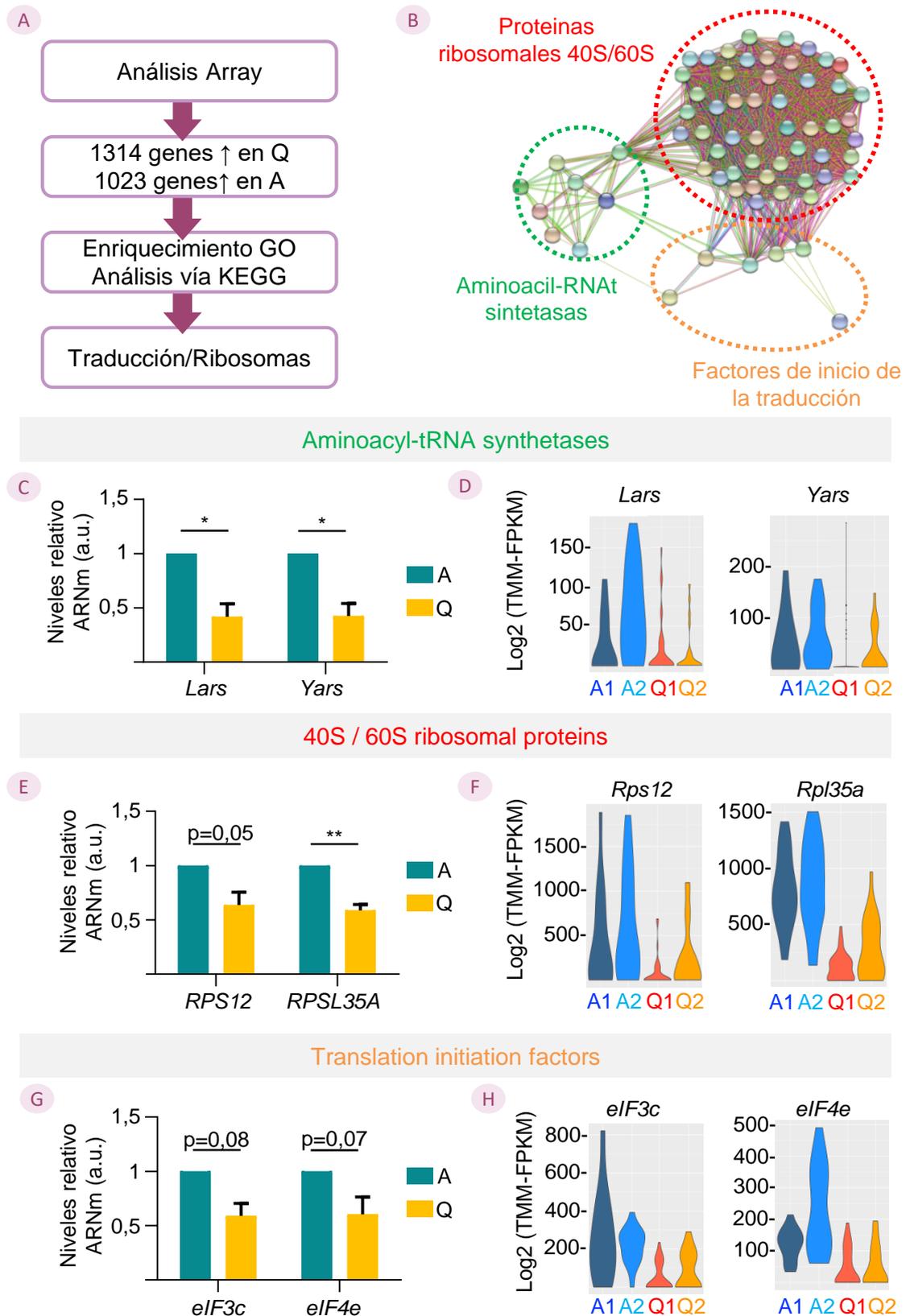


Figura R2: Las NSCs quiescentes muestran una reducción de la expresión de genes relacionados con la traducción.

(A) Esquema del análisis de expresión génica y enriquecimiento funcional llevado a cabo en cultivos de NSCs activas y quiescentes crecidos como neuroesferas. **(B)** Red de interacción de proteínas analizada mediante STRING. El agrupamiento se realizó en base al algoritmo de Markov. Los nodos o puntos representan las distintas proteínas. Los colores de las líneas que unen los distintos puntos simbolizan el tipo de evidencia de la interacción (azul: base de datos; rosa: experimental; verde:

vencindad génica; rojo: fusión génica; azul oscuro: co-ocurrencia ; amarillo: minería de textos ; negro: co-expresión; azul claro: homología proteica). Las líneas discontinuas agrupan genes con la misma función biológica. **(C, E, G)** Cuantificación de la validación de la expresión por RT-qPCR de genes representativos para cada una de las categorías identificadas en muestras de células activas y quiescentes. **(D, F, H)** Gráfico Violin plot de la expresión de genes representativos obtenidos de los datos de secuenciación masiva de célula única de NSCs en estado A1, A2, Q1 y Q2 de Llorens-Bobadilla et al., 2015. Los datos se representan como el promedio \pm SEM de $n \geq 3$ de cultivos de A NSCs y Q NSCs independientes. Test estadísticos utilizados: R2C, E, G T One Sample Test. P-valor: * $<0,05$, ** $<0,01$, *** $<0,001$. A, NSCs activas; Q, NSCs quiescentes.

3. La regulación de la traducción en las NSCs quiescentes

La síntesis proteica es un mecanismo con un alto consumo de energía que depende tanto de la *eficiencia de traducción*, entendida como el grado de activación de la maquinaria traduccional (que se regula principalmente a nivel de la etapa de inicio), como de la *capacidad de traducción*, o contenido de maquinaria traduccional que posee la célula. Durante la etapa de inicio del proceso de traducción, se forma un complejo alrededor de la caperuza 5' del ARN a traducir, que servirá de punto de reclutamiento del complejo 43S. Una vez unido, este complejo pre-traduccional escanea el ARN, hasta encontrar el codón de inicio de la traducción, donde se forma el complejo 48S. A este complejo 48S se une la subunidad 60S, dando lugar a los ribosomas 80S, los cuales se desplazan a lo largo del ARN elongando la proteína hasta que aparece el codón de parada o stop (Figura R3A) (Baser *et al.*, 2017).

La eficiencia de traducción se regula principalmente a nivel de la formación del complejo 43S y la formación de una caperuza en el extremo 5' del ARN. La formación del complejo de inicio de la traducción 43S implica a su vez al factor de inicio de la traducción eIF2, el cual regula la formación del complejo ternario (eIF2-GTP-Met-tARN) y recluta a la subunidad ribosomal 40S para formar el complejo 43S (Baser *et al.*, 2017). Por otro lado, la formación de la caperuza implica a numerosos eIFs que están regulados por la señalización AKT-mTOR, que estimula la síntesis proteica en respuesta a factores de crecimiento y nutrientes (Figura R3A) (Laplante y Sabatini, 2012).

mTOR, por un lado, inhibe a 4EBP1 (proteína inhibidora de eIF4E) de forma que esta proteína libera al factor de inicio de la traducción eIF4E (proteína de unión a la caperuza). eIF4E junto a los factores eIF4A (con actividad helicasa) y eIF4G (proteína andamio que une a la subunidad 40S) forman el complejo eIF4F. Este complejo recluta directamente al complejo 43S (Malka-Mahieu *et al.*, 2017). Por otro lado, mTOR regula la actividad de las quinasas S6K1/2 las cuales por un lado inhiben a la proteína PDCD4 (proteína inhibidora de eIF4A) y por otro lado activan a la proteína eIF4B (potencia la actividad helicasa de eIF4A). Además, la proteína S6K1/2 activa a la proteína ribosomal S6 (RPS6) que también favorece la traducción (Figura R3A) (Lutz *et al.*, 2015). La maquinaria comienza entonces el escaneo para encontrar el codón de inicio de la traducción. Tras el reconocimiento, se producen cambios estructurales que resultan en la hidrólisis del GTP asociado a eIF2 y su consiguiente disociación, formando el complejo 48S (Baser *et al.*, 2017).

En muestras de cultivos de NSCs activas y quiescentes se evaluó la eficiencia de la traducción mediante Western blot, analizando los niveles de fosforilación de diferentes factores y quinasas. En un trabajo colaborativo, realizado dentro de nuestro grupo, encontramos que las NSCs quiescentes tenían un incremento en la fosforilación del residuo de serina 51 (Ser51) de la subunidad α de eIF2, que impide el intercambio de GDP por GTP, necesario para reciclar los complejos ternarios y conduciendo a un arresto global de la traducción (Figura R3B, C) (Koromilas, 2015). El incremento de P-eIF2 α correlaciona con un aumento de la actividad de su quinasa PERK al analizar la fosforilación en el

residuo de treonina 980 (Thr980) (la normalización se realizó respecto a β Actina debido a que no se pudo detectar PERK total por Western blot) (Figura R3D, E).

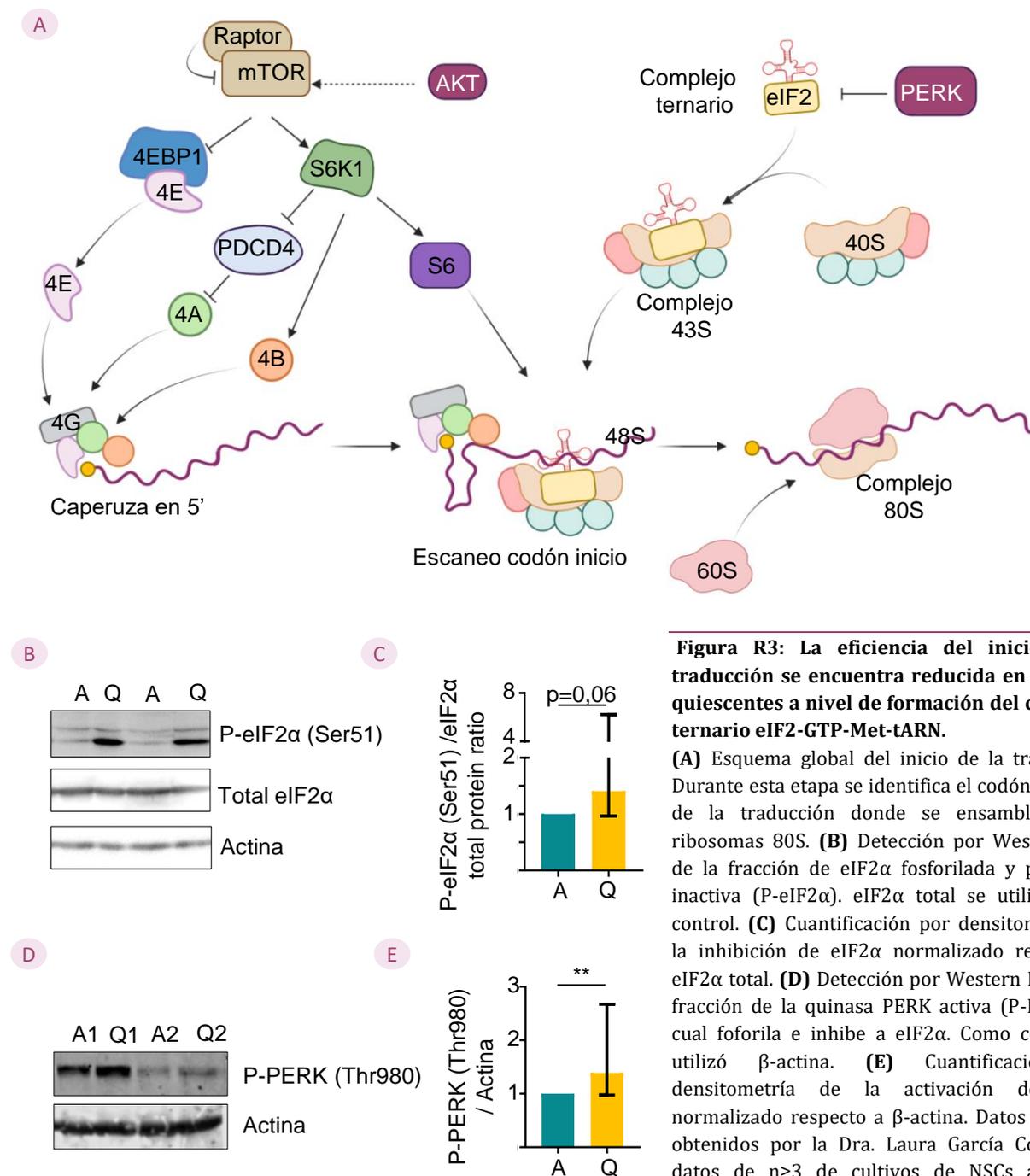


Figura R3: La eficiencia del inicio de la traducción se encuentra reducida en las NSCs quiescentes a nivel de formación del complejo ternario eIF2-GTP-Met-tARN.

(A) Esquema global del inicio de la traducción. Durante esta etapa se identifica el codón de la traducción donde se ensamblarán los ribosomas 80S. **(B)** Detección por Western Blot de la fracción de eIF2 α fosforilada y por tanto inactiva (P-eIF2 α). eIF2 α total se utilizó como control. **(C)** Cuantificación por densitometría de la inhibición de eIF2 α normalizado respecto a eIF2 α total. **(D)** Detección por Western Blot de la fracción de la quinasa PERK activa (P-PERK), la cual fosforila e inhibe a eIF2 α . Como control se utilizó β -actina. **(E)** Cuantificación por densitometría de la activación de PERK normalizado respecto a β -actina. Datos de B y C obtenidos por la Dra. Laura García Corzo. Los datos de $n \geq 3$ de cultivos de NSCs activas y quiescentes independientes, se representan como el promedio como la mediana \pm rango intercuartílico. Test estadístico utilizado One sample-Wilconxon test. P-valor: * $<0,05$, ** $<0,01$, *** $<0,001$. A, NSCs activas; Q, NSCs quiescentes.

Por otro lado, se analizó la actividad de AKT y mTOR. Se observó una disminución de la actividad de AKT al analizar la fosforilación en el residuo de serina 473 (Ser473) (Figura R4A, B, C) y un incremento de la fosforilación en la Serina 792 (Ser792) de Raptor, la cual reduce la actividad de mTORC1 (Figura R4D, E, F). Estos datos sugieren que la señalización AKT-mTOR está disminuida en las células quiescentes.

Además, se analizaron las dianas directas de mTOR, 4EBP1 y S6K1, implicadas en la regulación de la traducción. Encontramos un incremento de la fosforilación de la treonina 37 y 46 (Thr37 y 46) de 4EBP1 (Figura R4G, H) que correlaciona con un incremento de su actividad, inhibiendo por tanto a eIF4E mediante secuestro (Qin *et al.*, 2016). También se analizó la fosforilación activadora que realiza mTORC1 en la treonina 389 (Thr389) de S6K1 (Figura R4I). Se observó una tendencia al alza en el ratio P-S6K1/S6K1 total (Figura R4J) y una reducción de la expresión de S6K1 total ($p=0,02$). Sin embargo, no se encontraron diferencias en los niveles de P-S6K1 normalizados con respecto al contenido de Actina (Figura R4K). Esto sugeriría que, a pesar de que la cantidad de proteína S6K1 total presente en las NSCs quiescentes es menor, los niveles totales de proteína activa son similares y, por tanto, la traducción no se vería regulada diferencialmente por esta vía en NSCs quiescentes y activas.

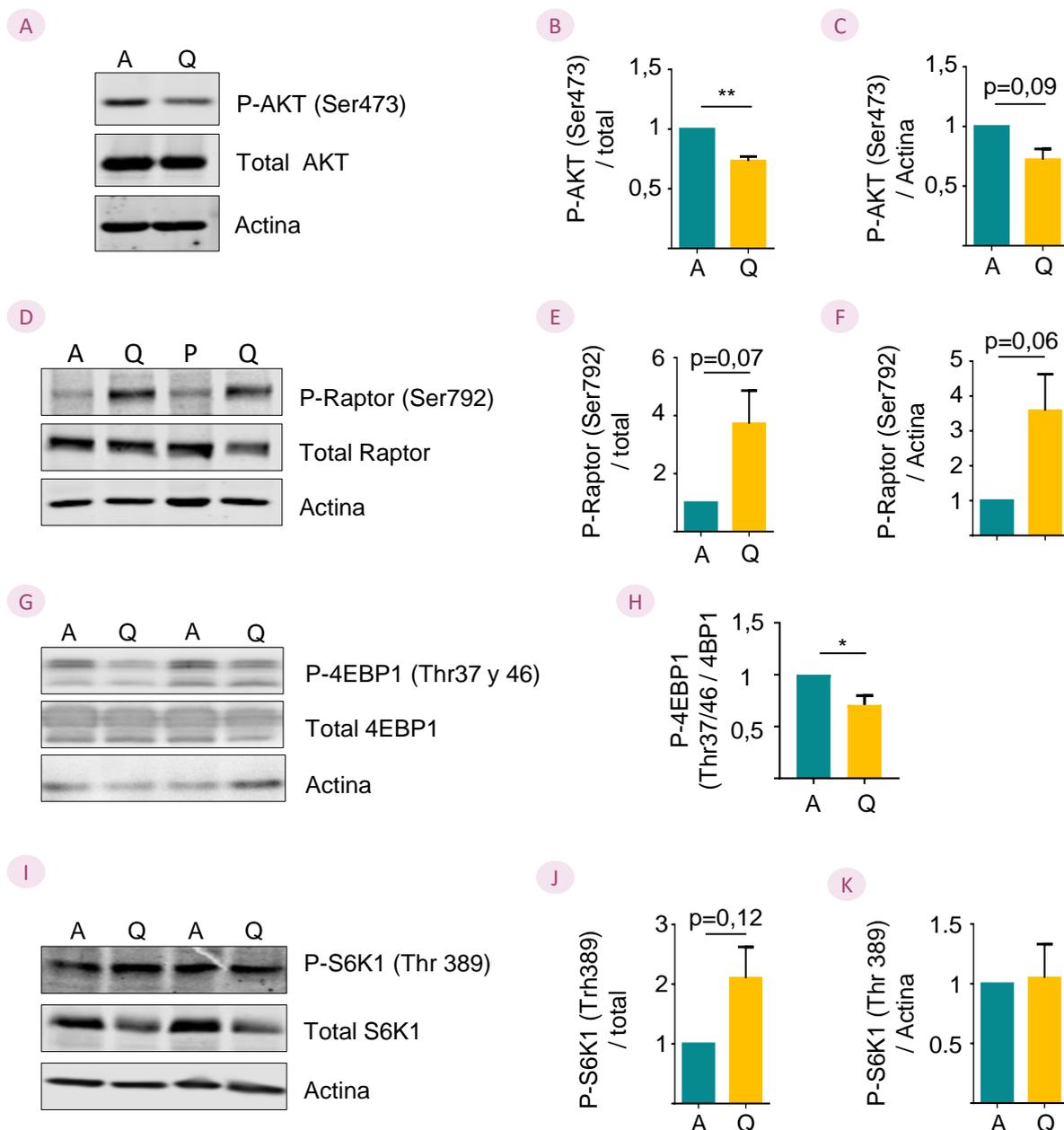


Figura R4: La eficiencia del inicio de la traducción se encuentra reducida en las NSCs quiescentes a nivel de formación de la caperuzas 5'.

(A) Detección por Western Blot de la fracción de AKT activa (P-AKT). AKT total y β -actina se utilizaron como control. (B, C) Cuantificación por densitometría de la activación de AKT normalizada respecto a AKT total y β -actina, respectivamente. (D)

Detección por Western Blot de la fracción del complejo mTOR inhibida al analizar la fosforilación inhibitoria en el residuo de Ser792 de Raptor (P-Raptor). Raptor total y β -actina se utilizaron como control. **(E, F)** Cuantificación por densitometría de la inhibición de Raptor normalizada respecto a Raptor total y β -actina, respectivamente. **(G)** Detección por Western Blot de la fracción fosforilada de la diana de mTOR 4EBP1 (P-4EBP1). Esta fosforilación conduce al secuestro e inhibición de eIF4E. Como control se utilizaron 4EBP1 total y β -actina. **(H)** Cuantificación por densitometría de la fosforilación de 4EBP1 normalizado respecto a 4EBP1 total. **(I)** Detección por Western Blot de la fracción activada de la diana de mTOR S6K1 (P-S6K1). S6K1 total y β -actina se utilizaron como control. **(J, K)** Cuantificación por densitometría de la fosforilación sobre S6K1 normalizado respecto a S6K1 total y β -actina, respectivamente. Datos de G y H obtenidos por la Dra. Laura García Corzo. Los datos se representan como el promedio \pm SEM de $n \geq 3$ de cultivos de A NSCs y Q NSCs independientes. Test estadístico utilizado: One sample T Test. P-valor: * $<0,05$, ** $<0,01$, *** $<0,001$. A, NSCs activas; Q, NSCs quiescentes

Así pues, la evaluación de los niveles proteicos de P-eIF2 α y P-4EBP1 indica una reducción en la eficiencia de inicio de la traducción a través de la formación del complejo ternario y de la formación de la caperuza en las células quiescentes. En conjunto, los datos muestran una reducción de la traducción tanto a nivel de la represión de la expresión de genes relacionados con este proceso (Figura R2) como también a nivel de actividad proteica (Figuras R3 y R4), evidenciando una disminución de la eficiencia de traducción cuando las NSCs entran en quiescencia.

4. Las NSCs quiescentes presentan menor síntesis proteica

Los datos de array y Western blot sugieren una disminución de la expresión y de la actividad de la maquinaria de traducción en las NSCs quiescentes *in vitro*. Se decidió comprobar, a nivel funcional, si la síntesis global de proteínas efectivamente estaba reprimida.

Para ello, se realizó un ensayo con O-propagil-puromicina (OPP), un análogo de la puromicina que se incorpora en las proteínas recién traducidas. Mediante una reacción de "clic" entre un fluoróforo y OPP, las proteínas modificadas se pueden visualizar por microscopía y cuantificar por análisis de imagen. Como control del ensayo, se utilizó cicloheximida (CHX) que inhibe la síntesis proteica. Los resultados mostraron una reducción de la incorporación de OPP en las células quiescentes *in vitro* (Figura R5A, B).

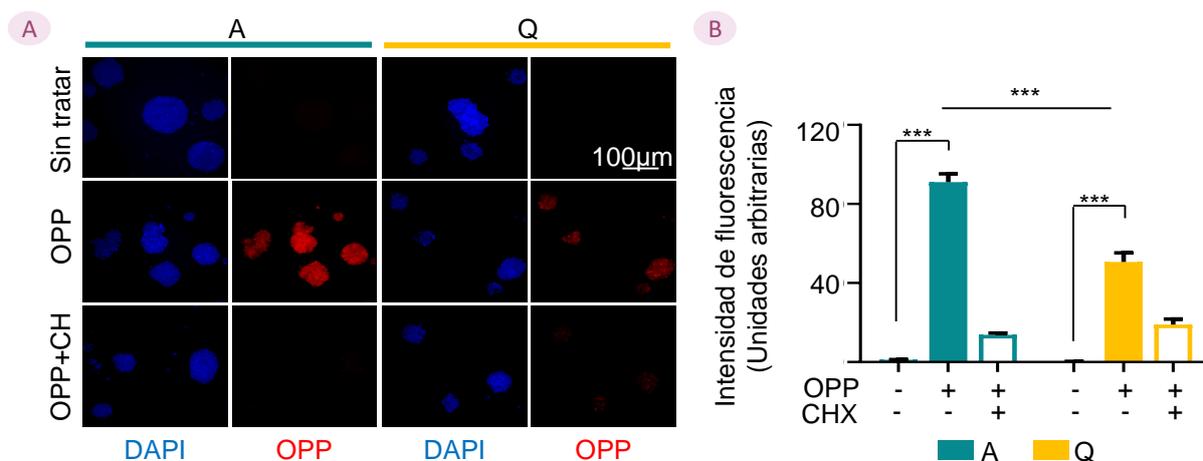


Figura R5: La síntesis proteica está reducida en las NSCs quiescentes.

(A) Imágenes de microscopía de fluorescencia representativas de los experimentos de OPPuro. Cultivos de A y Q NSCs se trataron con OPP que se incorpora a las proteínas de nueva síntesis (rojo). Como control, cultivos de A y Q NSCs se trataron con el inhibidor de la traducción cicloheximida (CHX). La tinción nuclear con DAPI se muestra en azul. **(B)** Cuantificación de la fluorescencia en los cultivos sin tratar y tratados con OPP \pm CHX. Los datos se representan como el promedio \pm SEM de $n \geq 3$

de cultivos de A NSCs y Q NSCs independientes. Test. estadístico utilizado: ANOVA de 2 vías , postest Tukey. P-valor: * $<0,05$, ** $<0,01$, *** $<0,001$. A, NSCs activas; Q, NSCs quiescentes

En una primera aproximación para trasladar los resultados *in vitro* a un modelo más cercano al *in vivo*, se decidió utilizar la tecnología MACs de Miltenyi para aislar mediante anticuerpos conjugados a bolas magnéticas las NSCs del hipocampo de ratones posnatales. Se aislaron células de animales *wild type* de 3 y 21 días de edad en base al marcador GLAST, que permite aislar conjuntamente células madre neurales de la SGZ del giro dentado (*NSCs radial glia-like*, RGLs) y astrocitos (Figura R6A). Basándonos en la literatura, a día posnatal 3 (P3) las células madre se encontrarían proliferando mientras que a día posnatal 21 (P21) ya habrían entrado en quiescencia (Berg *et al.*, 2019).

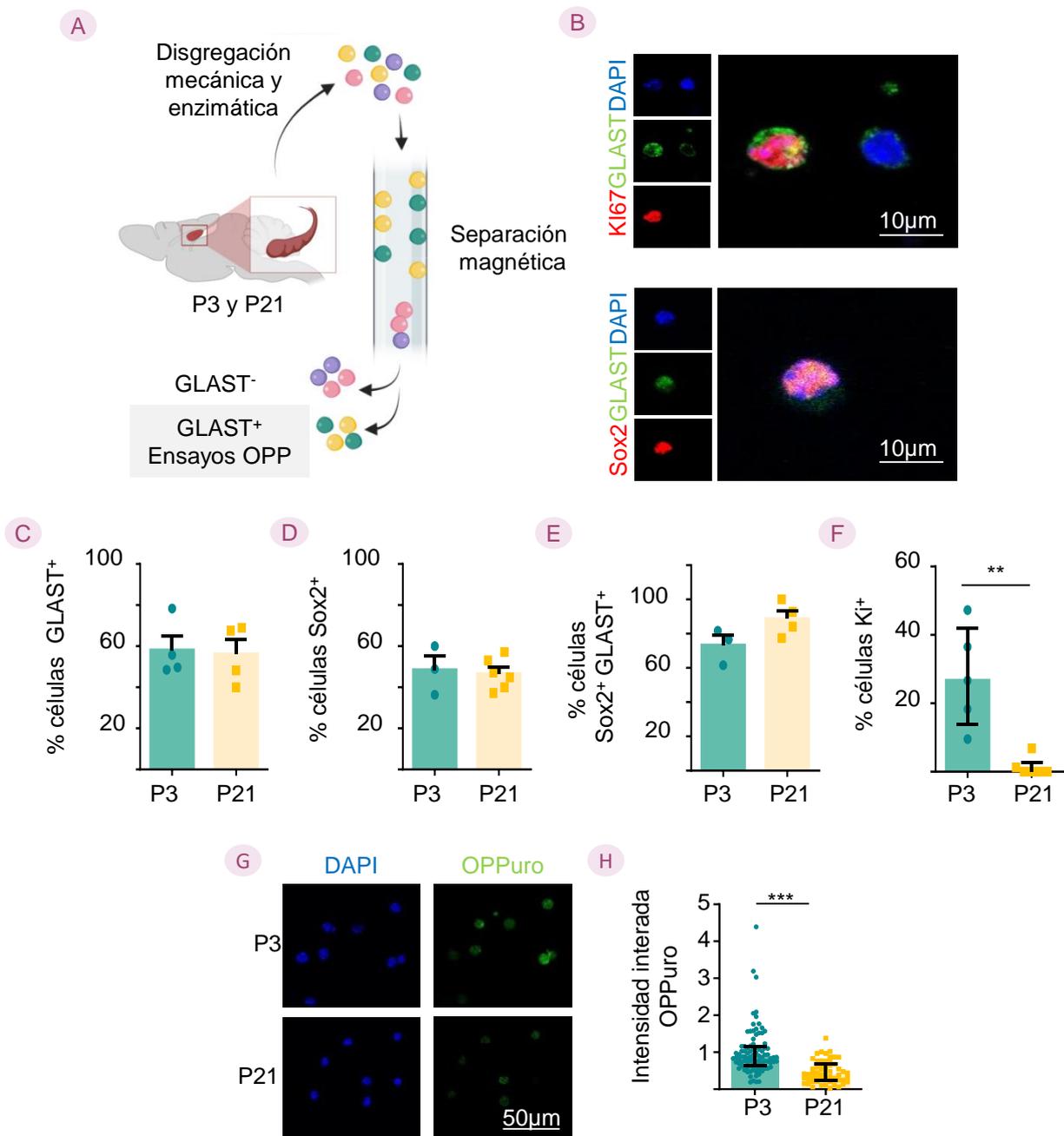


Figura R6: Las células GLAST+ aisladas del hipocampo de animales de 21 días muestran una reducción en la proliferación y en la síntesis proteica en comparación con las aisladas de animales de 3 días.

(A) Esquema del proceso de aislamiento de células GLAST a partir de hipocampo. Se realiza una separación magnética del tejido disgregado mediante la tecnología MACs de Miltenyi que permite obtener una fracción enriquecida en células GLAST⁺. **(B)** Imágenes representativas de inmunotinciones de células aisladas de animales de 21 días para los marcadores GLAST/Sox2 y GLAST/Ki67. **(C)** Cuantificación del porcentaje de células GLAST⁺ en la fracción GLAST⁺ obtenida mediante aislamiento magnético a partir de hipocampos de animales de 3 y 21 días. **(D)** Cuantificación del porcentaje de células Sox2⁺ en la fracción GLAST⁺ obtenida mediante aislamiento magnético a partir de hipocampos de animales de 3 y 21 días. **(E)** Cuantificación del porcentaje de células GLAST⁺/Sox2⁺ en la fracción GLAST⁺ obtenida mediante aislamiento magnético a partir de hipocampos de animales de 3 y 21 días. **(F)** Cuantificación del porcentaje de células Ki67⁺ en la fracción GLAST⁺ obtenida mediante aislamiento magnético a partir de hipocampos de animales de 3 y 21 días. **(G)** Imágenes representativas de confocal de los experimentos de OPP. Células aisladas mediante aislamiento magnético de hipocampos de animales de 3 y 21 días se trataron con OPP que se incorpora a las proteínas de nueva síntesis. **(H)** Cuantificación de la fluorescencia de OPP en la fracción GLAST⁺ obtenida mediante aislamiento magnético a partir de hipocampos de animales de 3 y 21 días. Los datos se representan como el promedio \pm SEM, excepto los datos correspondientes al panel F y H que se representan como la mediana \pm rango intercuartílico, de $n \geq 3$ de aislamientos magnéticos independientes de A NSCs y Q NSCs. En los ensayos de OPP se analizaron al menos 15 células por condición y experimento. Test estadísticos utilizados: T Test excepto para R6F y R6H que se utilizó Mann Whitney test. P-valor * $<0,05$, ** $<0,01$, *** $<0,001$. P3, células aisladas de animales de 3 días. P21, células aisladas de animales de 21 días.

La caracterización por inmunocitoquímica de las células GLAST⁺ aisladas con esta tecnología de animales de P3 y P21 (Figura R6B), no mostró diferencias en cuanto al porcentaje de células GLAST⁺ (Figura R6C), Sox2⁺ (Figura R6D), y GLAST⁺Sox2⁺ (Figura R6E) entre las dos edades. Sin embargo, se observó una diferencia en el estado proliferativo de estas células medido con Ki67. Las células aisladas de animales de 21 días mostraban una menor tasa de proliferación en comparación con las células aisladas de ratones de 3 días (Figura R6F). El ensayo de OPP en las células GLAST⁺ aisladas de animales de 3 y 21 días mostró una reducción significativa en la síntesis de proteínas en las células de 21 días, que se encontraban mayoritariamente fuera de ciclo (Figura R6G, H).

En conjunto, los datos de expresión génica y de OPP muestran una mayor síntesis de proteínas en las células activas en comparación con las células quiescentes tanto en el sistema *in vitro* como en las células aisladas del hipocampo de ratón en distintas edades de la etapa posnatal.

Capítulo II. Regulación de la autofagia en cultivos de células madre neurales adultas quiescentes.

1. El contenido proteico en forma de agregados está incrementado en las NSCs quiescentes.

Como se ha descrito en el capítulo I, las NSCs quiescentes tienen reducida la síntesis de proteínas. Sin embargo, y de forma inesperada, el análisis del contenido proteico total de las NSCs quiescentes mostró niveles más elevados en comparación con las NSCs activas, al medirlo en lisados celulares mediante el ensayo colorimétrico BCA (Figura R7A). Quisimos averiguar si el aumento en contenido proteico correlacionaba con un incremento en la acumulación de agregados proteicos. Para ello, empleamos el reactivo comercial *Proteostat*, un rotor molecular que permite detectar de forma cuantitativa la presencia de agregados de proteínas en las células. Cuando está en solución, el compuesto rota libremente alrededor de un enlace central y no emite fluorescencia. Por contra, en presencia de agregados proteicos el compuesto se intercala en las estructuras en hoja beta de tipo amiloide características de las proteínas agregadas, lo que inhibe la rotación de la molécula y conduce a un aumento en la fluorescencia (Figura R7B).

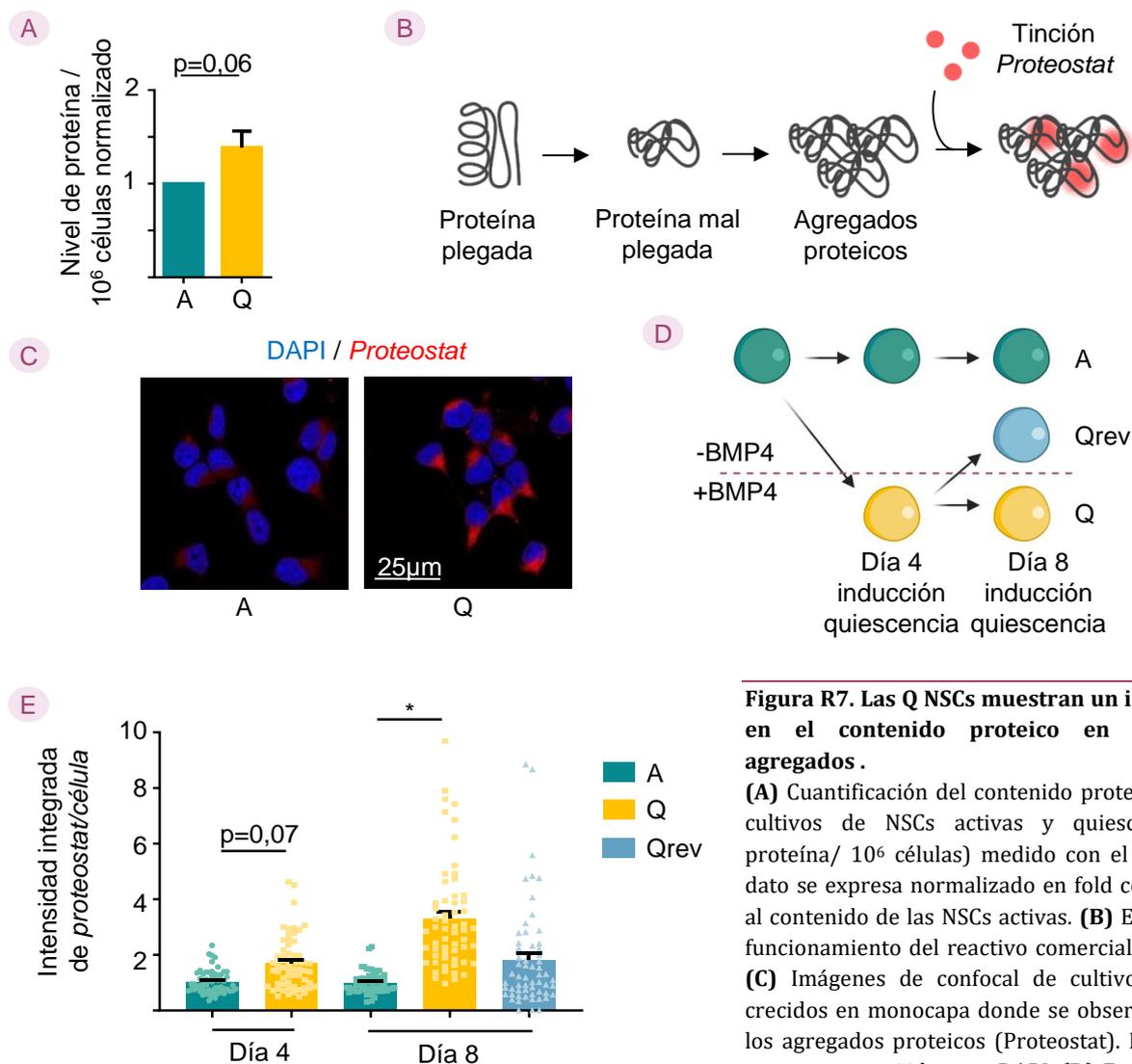


Figura R7. Las Q NSCs muestran un incremento en el contenido proteico en forma de agregados.

(A) Cuantificación del contenido proteico total en cultivos de NSCs activas y quiescentes (mg proteína/ 10^6 células) medido con el kit BCA. El dato se expresa normalizado en fold con respecto al contenido de las NSCs activas. (B) Esquema del funcionamiento del reactivo comercial *Proteostat*. (C) Imágenes de confocal de cultivos de NSCs crecidos en monocapa donde se observan en rojo los agregados proteicos (*Proteostat*). Los núcleos se muestran teñidos con DAPI. (D) Esquema de la

inducción y reversión del estado de quiescencia. La proteína BMP4 (50 ng/ml) se añade en presencia del mitógeno FGF2 (10 ng/ml) para inducir la quiescencia, y se retira para que las NSCs se activen. (F) Cuantificación de los agregados proteicos de los cultivos crecidos en esferas a 4 y 8 días de inducción de la quiescencia. Cuantificación de los agregados proteicos tras la

reversión de la quiescencia. Los datos se representan como el promedio \pm SEM de $n \geq 3$ de cultivos de A NSCs y Q NSCs independientes. En R7E se cuantificaron un mínimo de 15 células por experimento y condición. Test estadístico utilizado: R7A one sample T test. R7F día 4 Ratio Paired T test y R7F día 8 RM-ANOVA 1 vía-post test Tukey. P-valor: * $<0,05$, ** $<0,01$, *** $<0,001$. A, NSCs activas; Q, NSCs quiescentes.

Como se muestra en la Figura R7C, empleando la tinción con *Proteostat* pudimos demostrar que los niveles de agregados proteicos citoplasmáticos eran significativamente más altos en las NSCs quiescentes. Estos agregados se acumulaban en las NSCs la quiescencia tanto a cuatro días como a ocho días desde la inducción de la quiescencia (Figura R7E). Por otro lado, la reversión del estado de quiescencia en sistema de neuroesferas (Figura R7D) redujo los niveles de agregados proteicos (Figura R7E), sugiriendo que la activación de las NSCs quiescentes consigue movilizar dichos agregados. Por tanto, los resultados indican que la acumulación de proteínas en forma de agregados que muestran las células quiescentes es transitoria y dependiente del estado celular.

2. La maquinaria autofágica se encuentra incrementada en las NSCs quiescentes.

Los resultados anteriores sugieren que las células quiescentes pueden tener alguna vía de degradación de proteínas afectada, lo que explicaría la acumulación de agregados proteicos que poseen. Con el objetivo de evaluar si las principales vías de degradación de proteínas (proteasoma y autofagia-lisosoma) estaban alteradas en las NSCs quiescentes, se evaluó tanto la actividad quimiotripsina del proteasoma como los niveles de los marcadores autofágicos LC3 y p62/SQSTM1 y el marcador lisosomal Lamp2.

Actividad del proteasoma.

El proteasoma es un complejo proteico multicatalítico que degrada proteínas intracelulares principalmente poliubiquitinadas. Consta de una subunidad 20S catalítica con actividad quimiotripsina, tripsina y caspasa, y dos subunidades reguladores 19S que van a unir los sustratos a degradar (Thibaut y Smith, 2019). La actividad quimiotripsina asociada al complejo 20S del proteasoma se midió en células crecidas en monocapa con el kit *Proteasome 20S Activity Assay Kit*, el cual contiene un sustrato fluorogénico que emite una fuerte señal fluorescente cuando es degradado por el proteasoma. Como control, se utilizó el compuesto MG132 (MG) que inhibe la actividad quimiotripsina del proteasoma. Por ello, la actividad quimiotripsina del proteasoma se evaluó como la diferencia entre la actividad basal de las células y la actividad cuando las células son tratadas con el inhibidor MG. Los resultados no mostraron diferencias de actividad entre la NSCs activas y quiescentes (Figura R8A), lo que sugiere que las células poseen una actividad similar de esta ruta catabólica.

Marcadores autofágicos.

La maquinaria autofágica y lisosomal se evaluó con LC3II, p62 y Lamp2. LC3II es un excelente marcador de estructuras autofágicas que nos permite medir el flujo autofágico en combinación con inhibidores de la autofagia. Sin embargo, los niveles de p62 son dependientes del tipo celular y del contexto específico y por ello, se recomienda utilizar p62 en combinación con otros marcadores que monitoricen el flujo autofágico (Mizushima y Yoshimori, 2007).

Mediante Western blot de lisados proteicos de NSCs activas y quiescentes, se evaluaron de forma cuantitativa los niveles tanto de LC3II, que forma parte de las vesículas autofágicas, como de p62, que está implicado en el reclutamiento de los cargos a degradar. Los resultados indicaron que, de manera basal, las células quiescentes poseen una mayor cantidad de LC3II (Figura R8B, C) y p62 (Figura R8G). El marcador p62 también se analizó mediante inmunofluorescencia en cultivos de células fijadas (Figura R8D), midiendo la intensidad integrada de la señal de p62 (Figura R8E) y el número de *puncta* p62⁺ (Figura R8F). Los resultados obtenidos muestran una tendencia al alza que apoya los datos obtenidos previamente mediante Western blot.

Por otro lado, el análisis por inmunofluorescencia de los niveles de Lamp2, que se localiza en los lisosomas, mostró un cúmulo de contenido lisosomal en las células quiescentes en comparación con las activas, aunque el aumento no alcanzó a ser significativo (Figura R8H, I).

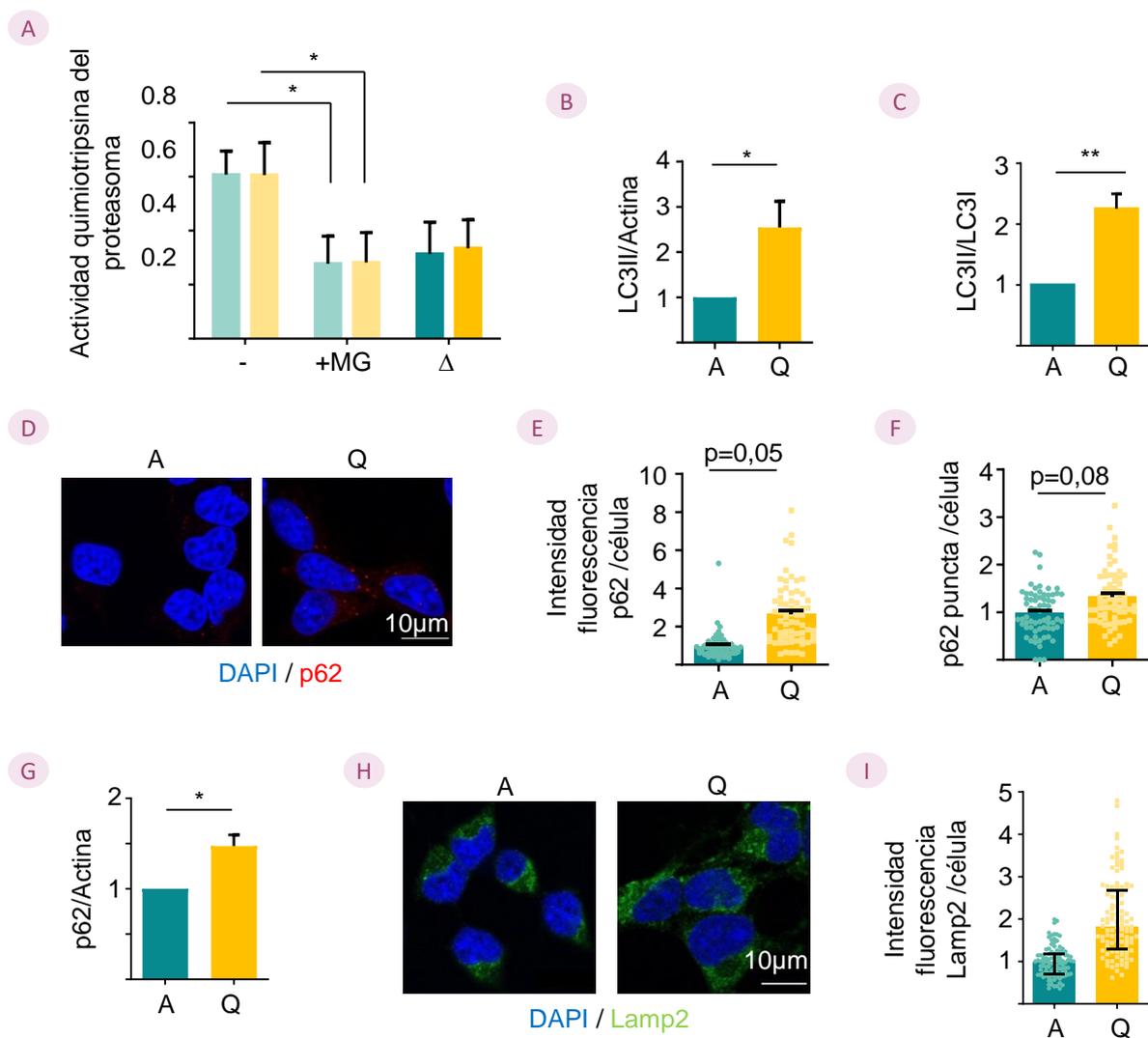


Figura R8. Las NSCs quiescentes presentan un incremento de proteínas que forman parte de las vesículas autofágicas y lisosomas.

(A) Cuantificación de la actividad quimiotripsina del proteasoma utilizando como control el inhibidor de dicha actividad MG132 (MG) a 10 μ M durante 90 minutos. (B, C) Cuantificación por densitometría de Western blot de LC3II normalizado respecto a β -actina y LC3I, respectivamente (Membrana en la figura R9). (D) Imagen confocal de cultivos de NSCs crecidos en esferas donde se observa en rojo p62. Los núcleos en azul se muestran teñidos con DAPI. (E, F) Cuantificación de la fluorescencia y los puncta de p62 por célula, respectivamente. (G) Cuantificación por densitometría de Western blot de p62

normalizado respecto a β -actina (membrana en la figura R9). **(H)** Imagen confocal de cultivos de NSCs crecidos en esferas donde se observa Lamp2 en verde. Los núcleos en azul se muestran teñidos con DAPI. **(I)** Cuantificación de la fluorescencia de Lamp2 por célula. Los datos de $n \geq 3$ experimentos con cultivos de A NSCs y Q NSCs independientes se representan como el promedio \pm SEM excepto R8I que se representa como la mediana \pm rango intercuartílico. En R8E, R8F, R8H y R8I se cuantificaron un mínimo de 15 células por experimento y condición. Test estadístico utilizado: R8A ANOVA de 2 vías-post test Tukey. One sample T para R8B,C,E,F,G utilizando como datos el promedio de cada experimento. One sample-Wilcoxon Test para R8I, utilizando como datos el promedio de cada experimento. P-valor: * $<0,05$, ** $<0,01$, *** $<0,001$. A, NSCs activas; Q, NSCs quiescentes.

El flujo autofágico se refiere al proceso que abarca desde la formación del autofagosoma, el reclutamiento de los cargos, la entrega al lisosoma y su posterior degradación (Klionsky *et al.*, 2016). El flujo autofágico se define como una medida de la actividad de degradación autofágica. Los niveles de los marcadores LC3II y p62 en un determinado momento no indican el flujo autofágico, sin embargo, la acumulación de estos marcadores en presencia de inhibidores lisosomales permite inferir el flujo autofágico (Loos *et al.*, 2014). La conversión del LC3I a LC3II también puede ser utilizado como medida para inferir el flujo aunque no siempre es la forma más correcta y se recomienda analizar la cantidad total de LC3II (Mizushima y Yoshimori, 2007).

En este trabajo se utilizó un inhibidor de la V-ATPasa, la Bafilomicina A1, que provoca un incremento del pH lisosomal/vacuolar e impide la fusión del lisosoma y el autofagosoma, y que resulta en una acumulación de autofagosomas (Klionsky *et al.*, 2016). El análisis estadístico del flujo autofágico mediante de ANOVA de dos vías de los niveles de LC3II y p62 obtenidos mediante Western blott en muestras de NSCs activas y quiescentes tratadas con Bafilomicina A1, mostró que el factor tratamiento (Baf) y el factor estado celular (NSCs activas/ NSCs quiescentes) poseen un efecto significativo. Sin embargo, la interacción entre tratamiento y estado celular no fue significativa (Figura R9A, B, D, E). La representación de los ratios de LC3II/actina y p62/actina normalizado a la condición celular no tratada con el inhibidor (Figura R9A, C y Figura R9D, F, respectivamente) mostró el efecto del tratamiento sin encontrar diferencias entre NSCs activas y quiescentes.

En conjunto, estos resultados indican que los componentes de la vía de la autofagia-lisosoma están, de manera basal, incrementados en las células quiescentes. Sin embargo, el flujo autofágico se mantiene constante.

3. Las NSCs quiescentes muestran un incremento en autofagosomas.

Para evaluar con más detalle la transición de autofagosomas a autolisosomas en las NSCs activas y quiescentes utilizamos el sensor en tándem pRFP-GFP-LC3 (Kaizuka *et al.*, 2016), el cual expresa una proteína roja fluorescente (RFP) y una proteína verde fluorescente (GFP) sensible a pH fusionadas a LC3. Este sensor permite identificar los autofagosomas como *puncta* verdes y rojos (amarillos), mientras que los autolisosomas se observan únicamente como *puncta* rojos al haber perdido la señal GFP (Figura R10A).

La electroporación del plásmido pRFP-GFP-LC3 en NSCs activas y quiescentes, y el análisis de los *puncta* RFP+GFP+, mostró que las células quiescentes tienen una mayor cantidad de *punctas* LC3. En algunas células electroporadas se observó una señal fluorescente aberrante en el núcleo celular, no obstante, los *puncta* se analizaron en el citoplasma celular. Por otro lado, se corroboró que el flujo autofágico es el mismo entre células activas y quiescentes, al no encontrar diferencias en la acumulación de autofagosomas tras el tratamiento con Bafilomicina A1 (Figura R10B).

Este experimento también permitió comprobar que los lisosomas eran aparentemente funcionales. Tanto en NSCs activas como quiescentes se localizaron *puncta* RFP+GFP⁻, en los que la señal GFP se habría perdido debido al pH ácido de los lisosomas. Sin embargo, después del tratamiento con Baf A1 que impide la fusión de los autofagosomas con los lisosomas, los *puncta* RFP⁺ expresaban también GFP⁺ (Figura R10C). Estos resultados apoyaron nuestra hipótesis de que los componentes y estructuras autofágicas están incrementados de manera basal en las células quiescentes y es funcional.

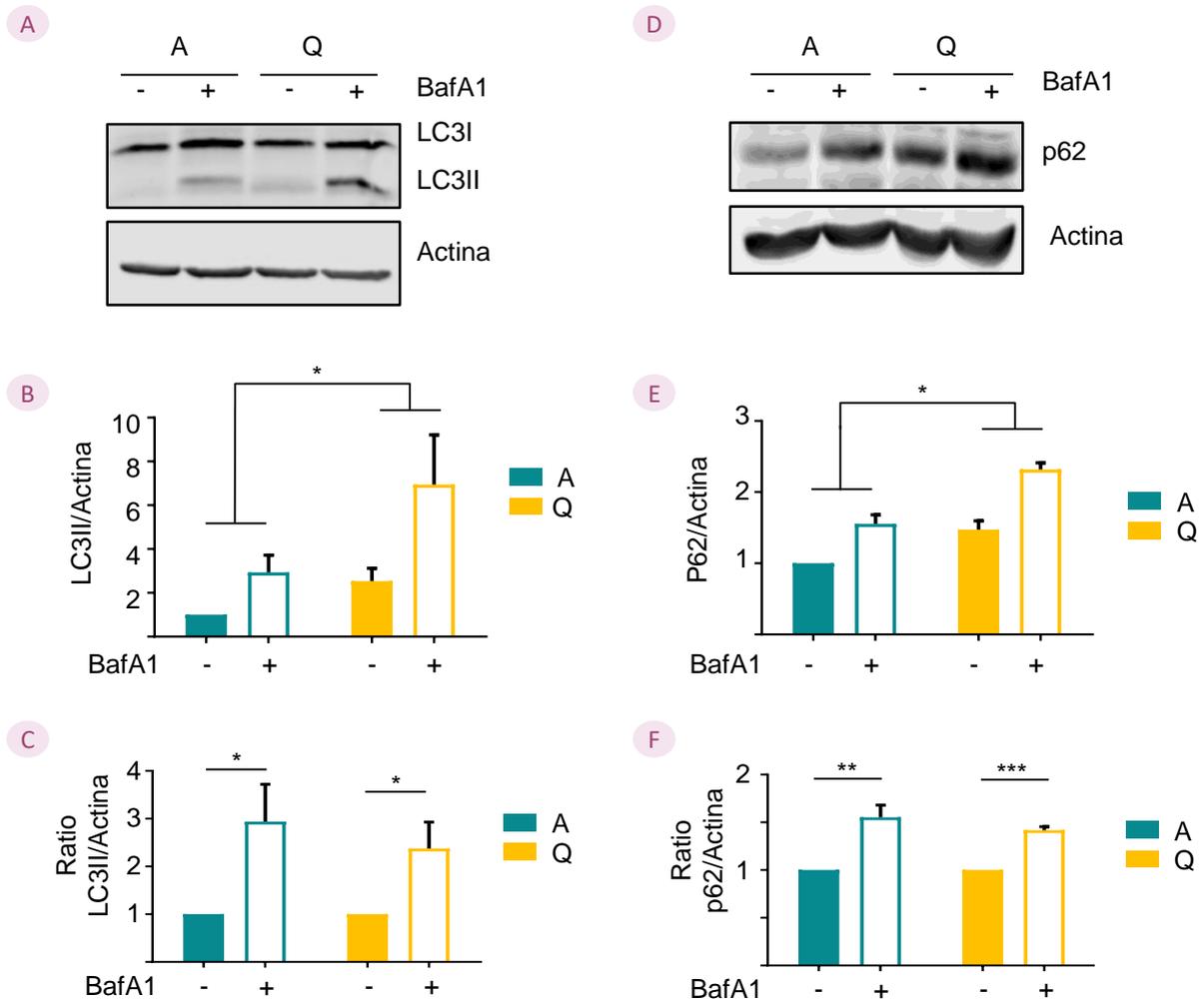


Figura R9. El flujo autofágico no se encuentra afectado en las NSCs quiescentes.

(A) Detección por Western Blot de LC3 en muestras de NSCs activas y quiescentes tratadas durante 6h con BafA1 100 μ M. β -actina se utilizó como control. **(B)** Cuantificación por densitometría de los niveles de LC3II normalizados respecto a β -actina. **(C)** Representación de los niveles de LC3II/actina normalizado a la condición celular no tratada con BafA1. **(D)** Detección por Western Blot de p62 en muestras de NSCs activas y quiescentes tratadas durante 6h con BafA1 100 μ M. β -actina se utilizó como control. **(E)** Cuantificación por densitometría de los niveles de p62 normalizados respecto a β -actina. **(F)** Representación de los niveles p62/actina normalizado a la condición celular no tratada con BafA1. Los datos de $n \geq 3$ de cultivos de A NSCs y Q NSCs independientes se representan como el promedio \pm SEM. Test estadístico utilizado: ANOVA 2 vías-postest Tuckey. P-valor: * $<0,05$, ** $<0,01$, *** $<0,001$. Baf A1, Bafilomicina A1; A, NSCs activas; Q, NSCs quiescentes.

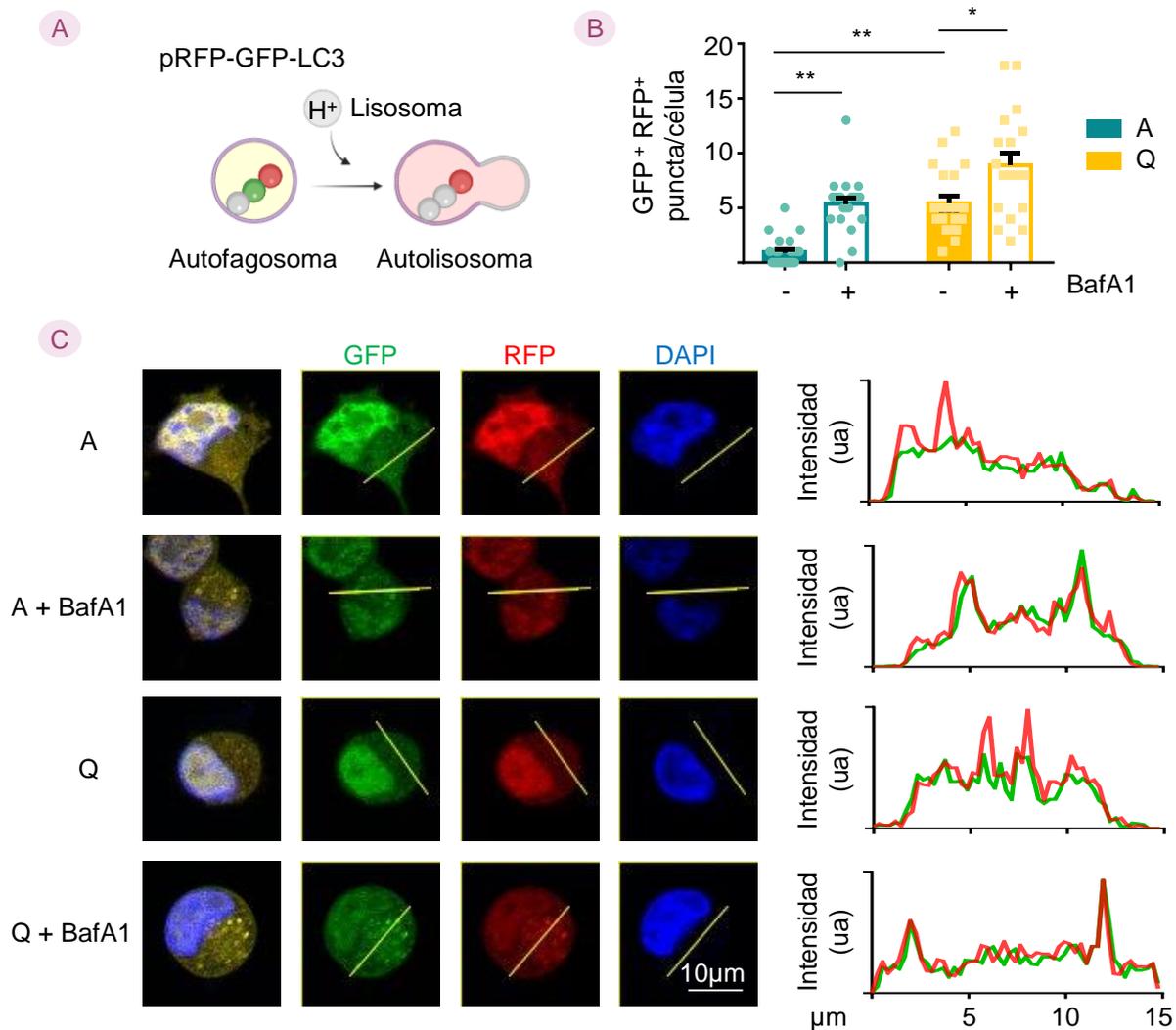


Figura R10. Las células quiescentes presentan un incremento en el número de autofagosoma.

(A) Esquema del funcionamiento del sensor pRFP-GFP-LC3 tras la electroporación del plásmido en NSCs activas y quiescentes. Tras la electroporación del plásmido, las células expresan la proteína roja y verde fluorescente fusionada a LC3II. Cuando los autofagosomas se fusionan con el lisosoma se acidifican y pierden la señal GFP. (B) Cuantificación de autofagosomas (puncta GFP⁺/RFP⁺) en células tratadas con BafA1 100µM durante 6h. (C) A la izquierda, imagen confocal de cultivos de NSCs activos y quiescentes electroporados con el plásmido y tratados con Bafilomicina A1 donde se observan puncta verdes y/o rojos. Los núcleos se muestran teñidos con DAPI (azul). A la derecha, histograma de intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias (ua) correspondiente a la línea trazada sobre las imágenes de confocal. Los picos rojos corresponden a la fluorescencia de los autolisosomas, mientras que los picos verdes y rojos corresponden a autofagosomas. Los datos de n=3 de cultivos de A NSCs y Q NSCs independientes se representan como el promedio ± SEM. Test estadístico utilizado: ANOVA 2 vías- posttest Tukey. P-valor: *<0,05, **<0,01, ***<0,001. BafA1, Bafilomicina A1; A, NSCs activas; Q, NSCs quiescentes

4. Las NSCs quiescentes tienen un incremento en la expresión de genes relacionados con la vía de la autofagia-lisosoma.

Tras validar a nivel de marcadores proteicos y celulares que la autofagia está incrementada en las NSCs quiescentes, se realizó un análisis de expresión de los genes implicados en esta vía de degradación proteica. Se utilizaron datos previos disponibles en el laboratorio de un microarray de

expresión (Array) y de una secuenciación masiva del ARN (RNAseq), ambos obtenidos a partir de cultivos celulares de NSCs activas y quiescentes.

Este estudio mostró genes diferencialmente expresados relacionados con la vía de la autofagia-lisosoma al utilizar los términos GO: macroautofagia (0016236) (Figura R11A) y lisosoma (0005764) (Figura R11B). Tanto los datos de Array como los del RNAseq, mostraron que las NSCs quiescentes tienen una mayor expresión de genes implicados en la vía autofagia-lisosoma. Parte de los genes identificados fueron comunes a ambos conjuntos de datos (Figura R11D). Mediante RT-qPCR se validaron algunos de los genes que mostraban una expresión diferencial, utilizando ARN de muestras independientes, corroborando así los resultados del Array y del RNAseq (Figura R11C). Los resultados en conjunto indicaron que las NSCs quiescentes muestran un enriquecimiento en la activación de la vía autofagia-lisosoma en comparación con las NSCs activas independientemente de la herramienta utilizada para analizar los cambios de expresión génica (Figura R11D).

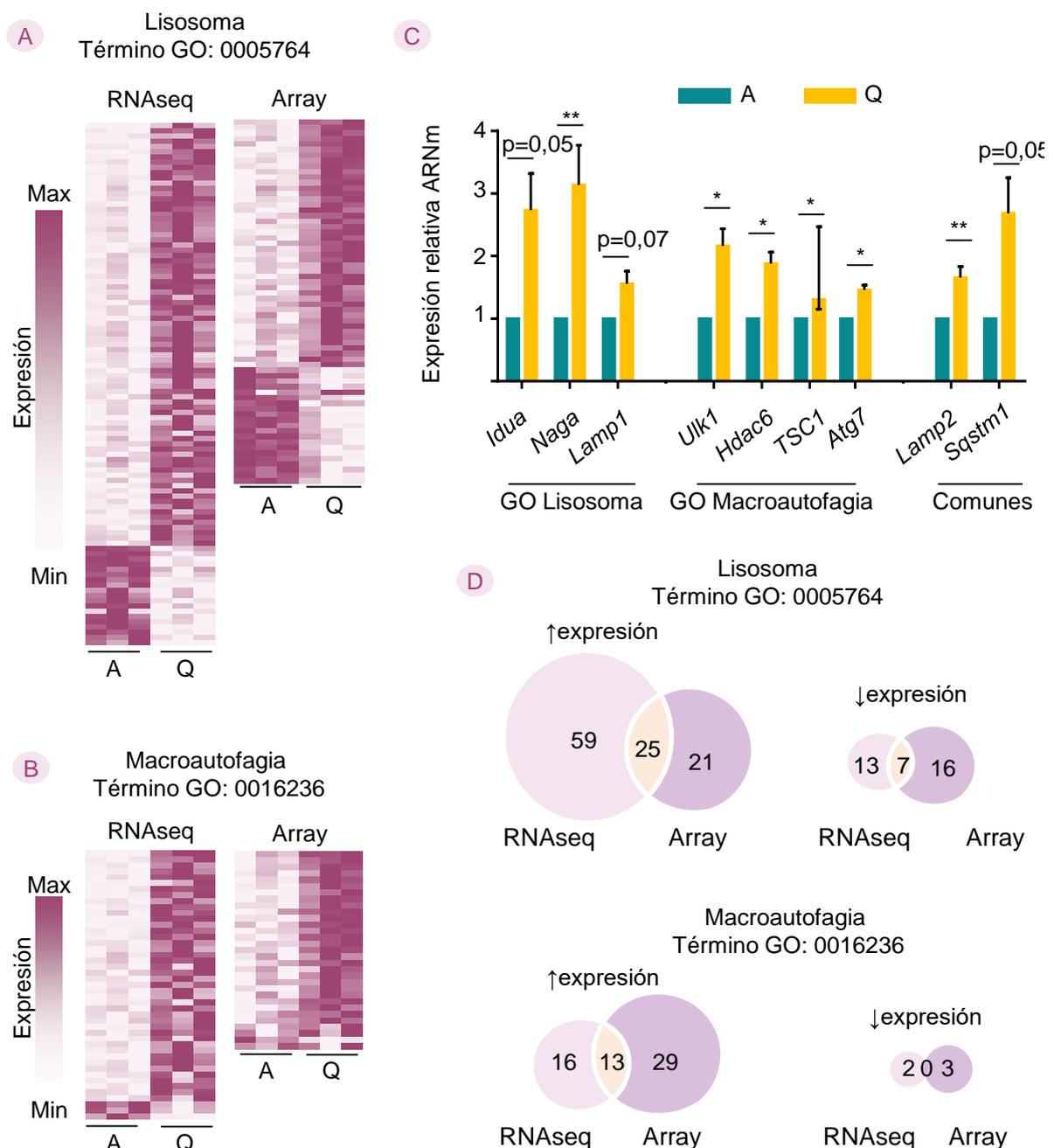


Figura R11: Las células quiescentes presentan un enriquecimiento en la expresión de genes de la vía autofagia-lisosoma.

(A,B) Mapas de calor correspondientes a los niveles de expresión en cultivos de NSCs de los genes englobados en los términos GO Lisosoma (GO: 0005764) y GO Macroautofagia (GO: 0016236), respectivamente. Los mapas de calor se elaboraron a partir de los datos obtenidos por el grupo de una secuenciación masiva (RNAseq) y un microarray de expresión génica (Array) de cultivos de NSCs activas y quiescentes. Los colores oscuro y claro representan la máxima y mínima expresión del gen respectivamente. (C) Validación por RT-qPCR de la expresión diferencial de genes comunes para los dos análisis en muestras independientes. (D) Diagramas de Venn que identifican genes comunes al análisis de RNAseq y Array que se encuentran regulados diferencialmente en NSCs activas y quiescentes. Los datos de $n \geq 3$ de cultivos de A NSCs y Q NSCs independientes se representan como el promedio \pm SEM excepto R11C TSC1 que se representa como la mediana \pm el rango intercuartílico. Test estadístico utilizado: One sample T test excepto para R11C TSC1 que se utilizó One sample T test-Wilcoxon test. P-valor: * $<0,05$, ** $<0,01$, *** $<0,001$. A, NSCs activas; Q, NSCs quiescentes

5. AMPK activa la vía de la autofagia en las NSCs quiescentes.

Tas validar que la vía autofágica está incrementada en las NSCs quiescentes tanto a nivel de expresión de génica como de proteínas, quisimos evaluar la regulación de las primeras etapas de la vía. La autofagia es un proceso secuencial, y su inducción está regulada por la activación del complejo ULK1-Atg13-FIP200-Atg101. El complejo ULK1 a su vez está controlado por la quinasa AMPK y por mTOR. AMPK es un complejo catalítico fundamental en la activación de la autofagia que actúa como sensor del nivel energético de la célula (Hardie y Carling, 1997). Está formado por las subunidades catalíticas $\alpha 1$ y $\alpha 2$ y las subunidades reguladoras $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$, y $\gamma 3$.

Tanto en los datos del Array como en los del RNAseq, se observó un incremento generalizado de la expresión de los genes que codifican para las distintas subunidades de AMPK (*Prka1*, *Prkaa2*, *Prkab1*, *Prkab2*, *Prkag1*, *Prkag2*, *Prkag3*) (Figura R12A). Estos resultados se validaron mediante RT-qPCR en ARN extraído de muestras independientes y se observó una mayor expresión a nivel de ARN mensajero de los genes que codifican para las subunidades $\alpha 1$, $\beta 1$, $\beta 2$ y $\gamma 2$ y una tendencia al alza para las demás subunidades (Figura R12B).

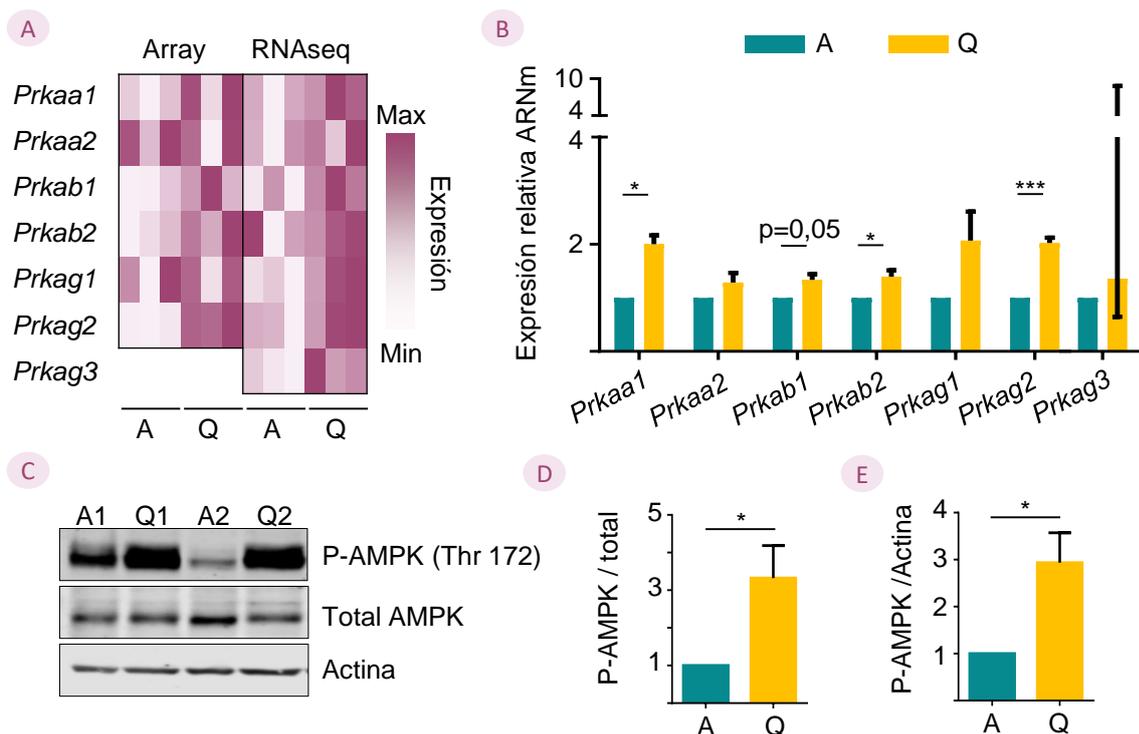
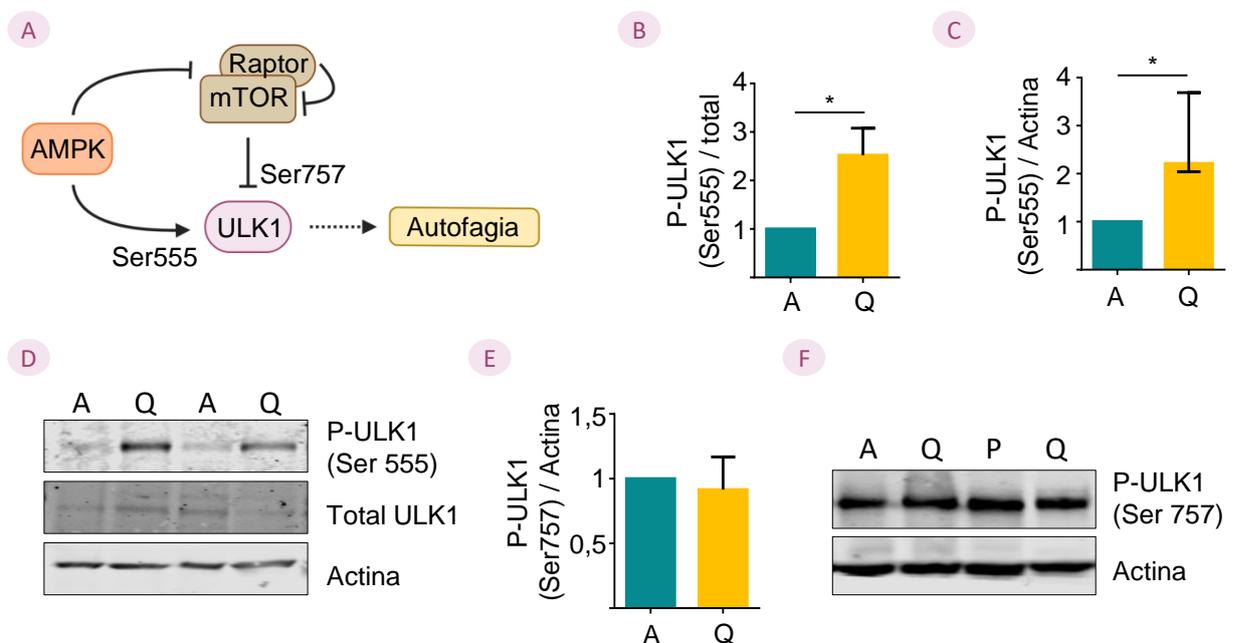


Figura R12: Las células NSCs quiescentes muestran una mayor activación de AMPK.

(A) Mapa de calor de la expresión de los genes que codifican para las distintas subunidades de AMPK. Los mapas de calor se elaboraron a partir de las rpkms de la secuenciación masiva (RNAseq) y de los datos obtenidos un microarray de expresión (Array) de cultivos de NSCs activas y quiescentes. Los colores oscuro y claro representan la máxima y mínima expresión del gen respectivamente. (B) Validación por RT-qPCR de la expresión de los genes que codifican para las distintas subunidades de AMPK. (C) Detección por Western Blot de la fracción de AMPK activa (P-AMPK). AMPK total y β -actina se utilizaron como control. (D, E) Cuantificación por densitometría de la activación de AMPK normalizada respecto a AMPK total y β actina, respectivamente. Los datos de $n \geq 3$ de cultivos de A NSCs y Q NSCs independientes se representan como el promedio \pm SEM excepto R12B *Prkag3* que se representa como la mediana \pm el rango intercuartílico. Test estadístico utilizado: One sample T test excepto para R12B *Prkag3* que se utilizó One sample T test-Wilconxon test. P-valor: * $<0,05$, ** $<0,01$, *** $<0,001$. A, NSCs activas; Q, NSCs quiescentes.

La actividad de AMPK se evaluó mediante Western blot en extractos proteicos de cultivos de NSCs activas y quiescentes, utilizando un anticuerpo que detectaba la forma activa de las subunidades $\alpha 1$ y $\alpha 2$ por fosforilación en la treonina 172 (Thr172). El análisis mostró niveles más elevados de P-AMPK (Thr172) tanto al normalizar frente a los niveles de AMPK total como de actina, indicando una mayor actividad de AMPK en las NSCs quiescentes (Figura R12C, D, E). Esto sugiere que el aumento de la autofagia podría estar regulado por la activación de AMPK.

La inducción de la autofagia implica la activación del complejo ULK1, que es regulado por AMPK de manera directa mediante la fosforilación en la Serina 555 (Ser555) (Figura R13A). En las NSCs quiescentes se observó un aumento de la fosforilación activadora en la Ser555 de ULK1, que activa al complejo ULK1 (Figura R13B, C, D). Por otro lado, AMPK también fosforila a RAPTOR en el residuo de Serina 792 (Ser792) para inhibir su función. En las células quiescentes encontramos un incremento en la fosforilación inhibitoria sobre la Ser792 de RAPTOR, la cual inhibe al complejo mTORC1 (Figura R4D, E, F).

**Figura R13: El aumento de la maquinaria autofágica podría estar regulado por la activación de AMPK.**

(A) Esquema de la inducción de la autofagia. AMPK activa a mTOR a la vez que inhibe a mTOR C1 para promover la activación de la autofagia. (B, C) Cuantificación por densitometría de la activación de ULK1 normalizada respecto a ULK1 total y β actina, respectivamente. (D) Detección por Western Blot de la fracción de ULK 1 activa (P-ULK1 Ser 555). ULK1 total y β -actina se utilizaron como control. (E) Cuantificación por densitometría de la inhibición P-ULK1 Ser 757 normalizada respecto a β actina. (F) Detección por Western Blot de la fracción de ULK1 inhibida por el complejo mTOR (P-ULK1 Ser 757). β -actina se

utilizaron como control. Los datos de $n \geq 3$ de cultivos de A NSCs y Q NSCs independientes se representan como el promedio \pm SEM excepto R13D que se representa como la mediana \pm el rango intercuartílico. Test estadístico utilizado: One sample T test excepto para R13D que se utilizó One sample T test-Wilcoxon test. P-valor: $* < 0,05$, $** < 0,01$, $*** < 0,001$. A, NSCs activas; Q, NSCs quiescentes.

Por último, se sabe que el complejo mTORC1 regula al ULK1 mediante una fosforilación inhibitoria en la Serina 757 (Ser757). Sin embargo, no encontramos cambios en la regulación de esta fosforilación en las NSCs quiescentes (Figura R13E, F). En conjunto, estos resultados sugieren que el incremento en la maquinaria autofágica en las NSCs quiescentes podría estar relacionado con una mayor actividad de AMPK.

Además, AMPK regula de manera directa diferentes rutas metabólicas como son la síntesis de proteínas, la síntesis de ácidos grasos y el metabolismo de la glucosa (Herzig y Shaw, 2018). En el caso del metabolismo de lípidos, AMPK regula sus dianas directas Acetil-CoA carboxilasa 1 y 2 (ACC1 y ACC2). La fosforilación de ACC por AMPK en el residuo de serina 79 (Ser79) inhibe su actividad y por tanto la producción de Malonil-CoA. Este compuesto es necesario para la síntesis de ácidos grasos, por lo que su reducción favorece la β -oxidación de los ácidos grasos por carnitina palmitoil transferasa 1 mitocondrial (CPT1) (Figura R14A). Se ha descrito que las células quiescentes poseen unos altos niveles de CPT1 activo resultando en un aumento de la β -oxidación de los ácidos grasos (Knobloch *et al.*, 2017).

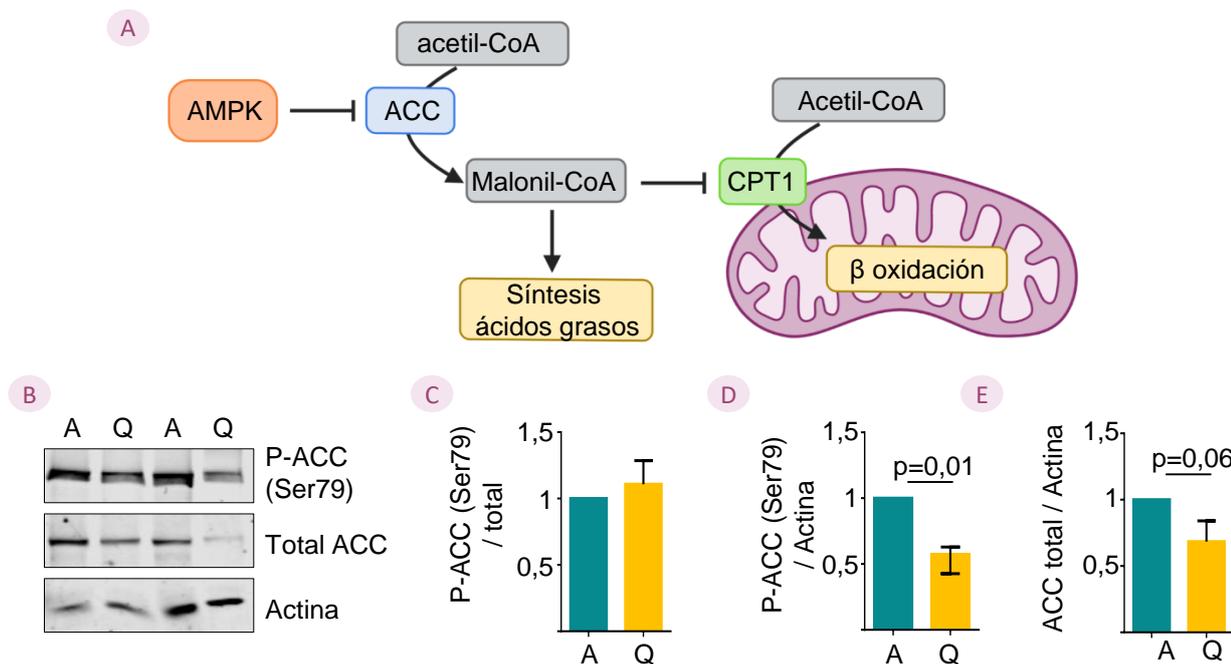


Figura R14: El aumento de β -oxidación descrito en las células quiescentes correlaciona con una disminución en ACC. (A) Esquema de regulación de la síntesis y β -oxidación de los ácidos grasos. Se ha descrito que la activación de AMPK produce la inhibición de ACC, que resulta en una disminución de los niveles de Malonil-CoA y a su vez en la activación de la β -oxidación. Figura adaptada de (Lipovka y Konhilas, 2015). (B) Detección por Western Blot de la fracción de ACC activa (P-ACC). ACC total y β -actina se utilizaron como control. (C, D) Cuantificación por densitometría de la activación de ACC normalizada respecto a ACC total y β -actina, respectivamente. (E) Cuantificación por densitometría de ACC total normalizado respecto a β -actina. Los datos de $n \geq 3$ de cultivos de A NSCs y Q NSCs independientes se representan como el promedio \pm SEM excepto R13D que se representa como la mediana \pm el rango intercuartílico. Test estadístico utilizado: One sample T test excepto para R14D que se utilizó One sample T test-Wilcoxon test. P-valor: $* < 0,05$, $** < 0,01$, $*** < 0,001$. A, NSCs activas; Q, NSCs quiescentes.

Por ello, se decidió evaluar la fosforilación inhibitoria de la Ser79 de ACC por Western blot (Figura R14B). La comparación entre NSCs activas y quiescentes, no mostró diferencias en el ratio proteína fosforilada/proteína total (Figura R14C), lo que sugiere que AMPK no estaría inhibiendo a ACC por esta vía de forma diferencial en las NSCs activas y quiescentes. Sin embargo, las células quiescentes, parece tener una menor cantidad de proteína ACC tanto fosforilada como total, al normalizada con respecto a Actina (Figura R14D y 4E), lo que podría reducir los niveles de Malonil-CoA. Una reducción de Malonil-CoA produciría un aumento de la oxidación de ácidos grasos, una característica de las NSCs quiescentes (Llorens-Bobadilla *et al.*, 2015; Shin *et al.*, 2015).

6. La autofagia juega un papel en la regulación de la entrada y salida de la quiescencia.

Con el objetivo de discernir si la autofagia tiene un papel directo en la activación de las NSCs, se diseñaron varios experimentos de inhibición o activación de la autofagia en cultivos de NSCs quiescentes. Las NSCs fueron cultivadas *in vitro* durante 4 días con BMP4 para inducir la quiescencia y tras ese periodo se retiró la BMP4. Las células se trataron con los fármacos de interés y se analizó su reentrada en ciclo. Por un lado, se determinó el porcentaje de núcleos Ki67⁺ mediante inmunofluorescencia a las 16h o 48h. Por otro lado, se analizó el número total de células del cultivo por recuento directo de las mismas y la viabilidad celular mediante una tinción con azul de tripano a las 48h.

La activación de las células quiescentes fue mayor cuando se bloqueó la autofagia dos horas antes de iniciar la reversión de la quiescencia con 50nM de Bafilomicina A1 (Figura R15A). A pesar de que a las 48h la viabilidad se veía reducida con el tratamiento (Figura R15E), se observó un aumento en el número de células medidas con azul de tripano (Figura R15D) que correlacionaba con el aumento en los niveles de Ki67 observados a las 16h del tratamiento (Figura R15B, C).

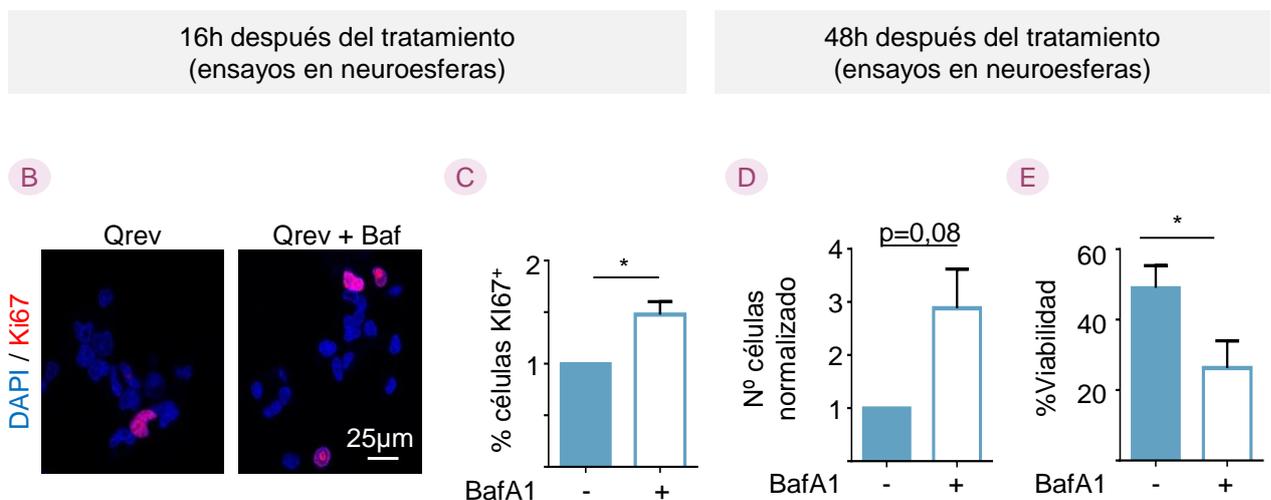


Figura R15: El bloqueo de la autofagia promueve una mayor activación de las células NSCs quiescentes.

(A) Esquema del experimento de reversión. Las células se trataron dos horas con Bafilomicina A1 50nM y se indujo la reversión del estado de quiescencia en sistema de cultivo adherido. **(B)** Imagen confocal de cultivos de NSCs 16 horas

después de haber revertido la quiescencia por eliminación de BMP4. En rojo se observan células en proliferación (Ki67⁺). Los núcleos se muestran teñidos con DAPI (azul). **(C)** Cuantificación de la proliferación de los cultivos en medida como % células Ki67⁺ a las 16 horas de la reversión. **(D)** Cuantificación del número de células total en los cultivos mediante recuento en campo claro a las 48 horas de reversión. **(E)** Análisis del porcentaje de células viables determinado mediante tinción con azul de tripano a las 48 horas de la reversión. Los datos de n≥3 de cultivos de A NSCs y Q NSCs independientes se representan como el promedio ± SEM. Test estadístico utilizado: One sample T test P-valor: *<0,05, **<0,01, ***<0,001. A, NSCs activas; Q, NSCs quiescentes.

Por otro lado, se realizaron experimentos de activación de la autofagia utilizando Fenformina. Este fármaco incrementa la actividad de AMPK mediante el aumento de AMP citosólico (Zhang *et al.*, 2007). Mediante Western blot de extractos proteicos de NSCs en proliferación, se evaluó que un tratamiento con 5mM de Fenformina activaba AMPK al analizar la fosforilación activadora en la Thr172 (Figura R16A, B, C). Al contrario de lo que sucedía con el tratamiento con Bafilomicina A1, un tratamiento previo a la reversión de las células quiescentes con 1mM de Fenformina (Figura R16D) redujo la activación de las células quiescentes, medida mediante inmunofluorescencia para Ki67 a las 48h (Figura R16E, F). También se observó una reducción en el número total de células (Figura R16G), sin embargo, la viabilidad medida con azul de tripano no se vio afectada.

Por último, se diseñó un segundo experimento para tratar de activar AMPK, incubando las células en un medio mínimo (HBSS) (Figura R16D). A pesar de observar una disminución en el número de células a las 48 horas del tratamiento (Figura R16K), con este protocolo no se confirmó la reducción de la entrada en ciclo medida mediante el análisis de células Ki67⁺ (Figura R16I, J), aunque se observó una ligera reducción en la viabilidad (Figura R16L).

Los resultados de experimentos funcionales muestran que la modulación de la autofagia con tratamientos activadores e inhibidores afecta a la activación de las NSCs, lo que sugiere que la autofagia tiene un papel en la regulación del ciclo celular, controlando la entrada y salida de quiescencia.

7. Papel de EGFR en la regulación de la entrada y salida de quiescencia.

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es un receptor tirosina quinasa que promueve el crecimiento y la proliferación celular y se considera una receptor clave en la activación de las NSCs *in vivo* (Aguirre *et al.*, 2010; Reinchisi *et al.*, 2013; Romano y Bucci, 2020; Walker *et al.*, 2016). Los niveles en membrana de este receptor se regulan por internalización y degradación del receptor dependiente de ligando. El receptor es endocitado y las vesículas endocíticas son transportadas a los cuerpos multivesiculares que finalmente se fusionan con los lisosomas para completar la degradación, lo que resulta en una reducción de la señalización mitogénica (Kirisits *et al.*, 2007; Peng *et al.*, 2016).

El aumento de la vía autofagia-lisosomal podría estar regulando la actividad de este receptor para, de esta manera, regular el ciclo celular (Kobayashi *et al.*, 2019). A pesar de que los cultivos de NSCs utilizados en nuestros ensayos no están suplementados con el ligando EGF, el análisis de RNaseq mostró que las células expresan los genes que codifican para el receptor EGFR y demás miembros de la familia (*ErbB2*, *ErbB3*, *ErbB4*). De hecho, su expresión está incrementada en las NSCs activas (Figura R17A). Al analizar los genes que codifican para los ligandos de EGFR, no se encontraron diferencias en el nivel de expresión cuando se compararon las NSCs activas y quiescentes (Figura R17B). Seguidamente, se realizaron experimentos de reversión de la quiescencia en presencia de EGF y de un inhibidor de EGFR, PD168393 (PD), con el objetivo de evaluar el papel que puede tener este receptor

en la reversión del estado de quiescencia en nuestro modelo celular *in vitro* (Figura R17C). La viabilidad con los distintos tratamientos, medida con azul de tripano a las 48h, no se vio afectada de forma llamativa (Figura R17G, K). Sin embargo, observamos cambios muy notorios en la activación de las células quiescentes. Por un lado, la reversión en sistema adherido con el ligando EGF añadido de forma exógena favoreció la reversión del estado de quiescencia, al aumentar significativamente el número total de células (Figura R17F), así como de forma casi significativa el número de células Ki67⁺ (Figura R17D, E).

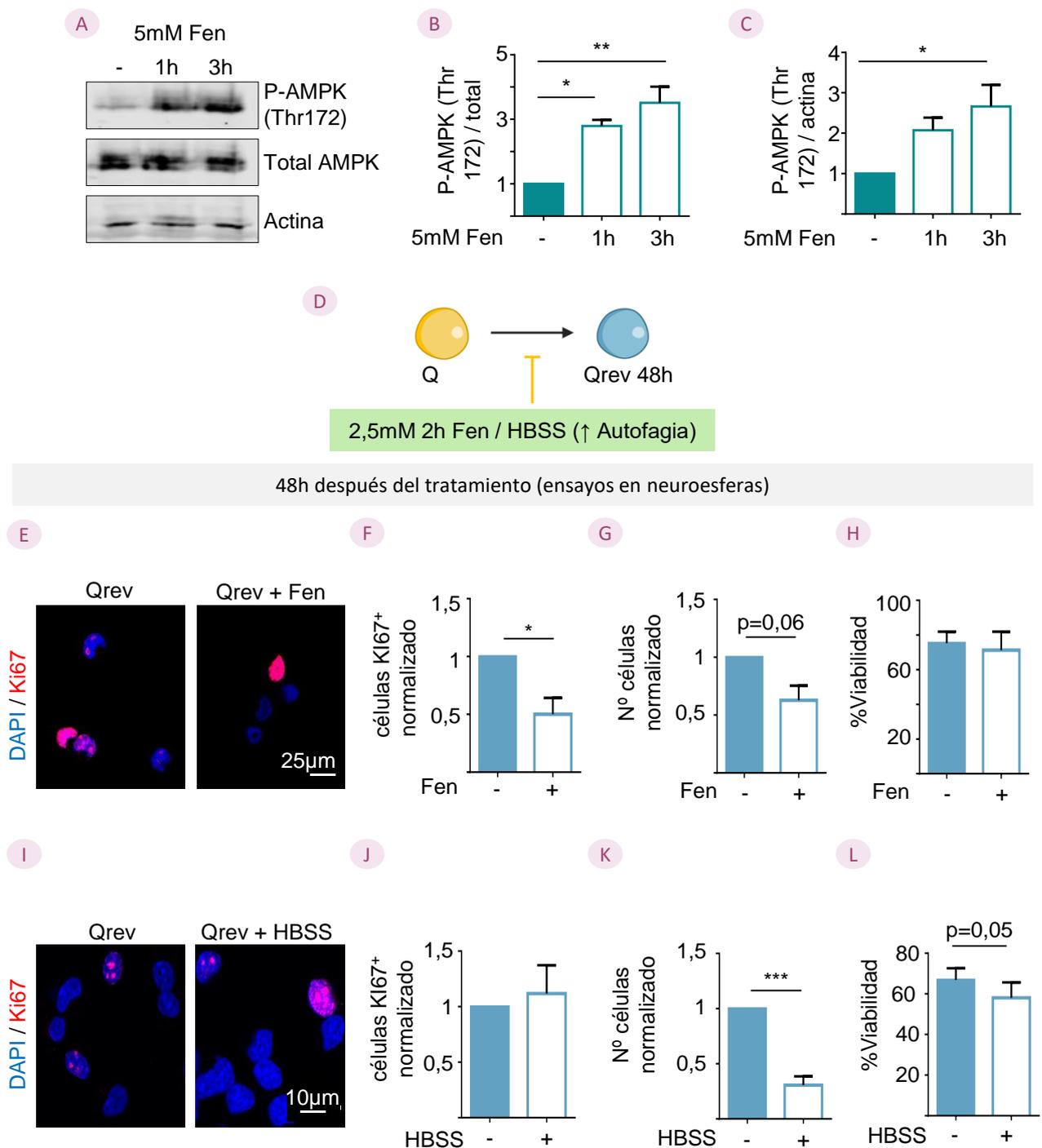


Figura R16: La activación de AMPK reduce la activación de las NSCs quiescentes.

(A) Detección por Western Blot de la fracción de AMPK activa (P-AMPK) en nuestras tratadas con 5mM de Fenformina durante 1 y 3 horas. AMPK total y β -actina se utilizaron como control. **(B, C)** Cuantificación por densitometría de la activación

de AMPK normalizada respecto a AMPK total y β actina, respectivamente. **(D)** Esquema del experimento de reversión. Las células se trataron dos horas con 2,5mM de Fenformina (Fen) o se incubaron con HBSS. Tras este periodo, se indujo la reversión de la quiescencia en sistema adherido. **(E)** Imagen confocal de cultivos de NSCs 48 horas después de haber sido tratados con Fenformina y revertir la quiescencia en sistema adherido. Se observan en rojo células en proliferación (Ki67⁺) y en azul los núcleos (DAPI). **(F)** Cuantificación de la proliferación de los cultivos tratados con Fenformina en medida como % células Ki67⁺ a las 48h de la reversión. **(G)** Cuantificación del número de células total en los cultivos tratados con Fenformina mediante Azul de tripano a las 48 horas de reversión. **(H)** Cuantificación de la viabilidad de los cultivos tratados con Fenformina medida con azul de tripano a las 48 horas de la reversión. **(I)** Imagen confocal de cultivos de NSCs 48 horas después de haber sido revertidos en sistema adherido tras un tratamiento de dos horas con HBSS. Se observan en rojo células en proliferación (Ki67⁺). Los núcleos en azul se muestran teñidos con DAPI. **(J)** Cuantificación de la proliferación de los cultivos tratados con HBSS medida como % células Ki67⁺ a las 48h de la reversión. **(K)** Cuantificación del número de células total en los cultivos tratados con HBSS mediante Azul de tripano a las 48 horas de reversión. **(L)** Cuantificación de la viabilidad de los cultivos tratados con HBSS medida con azul de tripano a las 48 horas de la reversión. Los datos de $n \geq 3$ de cultivos de A NSCs y Q NSCs independientes se representan como el promedio \pm SEM. Test estadístico utilizado: R16B y R16C ANOVA de 1 vía-Postnet Dunnet. Viabilidad R16H y R16L Ratio Paired T Test. Proliferación y n° células R16F, R16G, R16J, R16K One sample T test. P-valor: * $<0,05$, ** $<0,01$, *** $<0,001$. Fen, Fenformina; NSCs activas; Q, NSCs quiescentes.

Por el contrario, el tratamiento con PD168393 (PD) redujo la activación de las células quiescentes, en ausencia de EGF exógeno. Se observó un menor número total de células (Figura R17J) y una reducción del marcador Ki67 a pesar de que no llegó a ser estadísticamente significativa (Figura R17H, I). Los resultados de unos experimentos adicionales, en los que las células fueron tratadas con BafilomicinaA1 para bloquear la vía autofagia-lisosoma y con PD, para bloquear la señalización por EGFR (Figura R17L), sugieren que el incremento en la activación de las NSCs quiescentes observado a las 16h cuando se bloquea la autofagia podría depender de EGFR, puesto que el porcentaje de células Ki67⁺ tiende a ser menor en la condición Bafilomicina A1/PD con respecto a Bafilomicina A1 (Figura R17M). No obstante, debido a la variabilidad experimental, se necesitan ensayos adicionales para corroborar esta idea.

8. Las células GLAST⁺ obtenidas del hipocampo de animales posnatales de 21 días muestran un incremento de agregados proteicos.

Se quiso analizar el contenido en forma de agregados proteicos en las células GLAST⁺ aisladas del hipocampo animales de 3 y 21 días. Para ello, se aislaron las células mediante separación magnética (MACs) tal y como se indica en la Figura R6A y se utilizó el reactivo *Proteostat*. Los resultados mostraron que las células aisladas a 21 días (P21, que mayoritariamente se encuentran fuera de ciclo (Figura R6F)) poseen una mayor cantidad de agregados proteicos en comparación con las aisladas de animales de 3 días (P3, Figura R18A, B). Por tanto, los resultados obtenidos en células GLAST⁺ recién extraídas del hipocampo van en la línea de nuestros resultados *in vitro*, donde cultivos de NSCs quiescentes mostraban un incremento en agregados proteicos. Los resultados indican que las células aisladas a P3 y P21 también recapitulan la acumulación de agregados propia de las NSCs activas y quiescentes, respectivamente.

Para analizar si la acumulación de agregados proteicos que observábamos en las células GLAST⁺ aisladas se relaciona con un cambio de expresión de genes de la vía autofágica *in vivo*, recurrimos a datos de RNAseq ya publicados (Berg *et al.*, 2019). En este trabajo se analizó la expresión génica diferencial entre NSCs de la SGZ aisladas del hipocampo de animales de cuatro días (P4) y dos meses (2m) de edad. Los animales transgénicos utilizados para el aislamiento (Hoxp-CreER::H2B-GFP) expresan la proteína verde fluorescente bajo el promotor de Hoxp, lo que permitió aislar las NSCs al ser un marcador específico de esta población celular (Berg *et al.*, 2019).

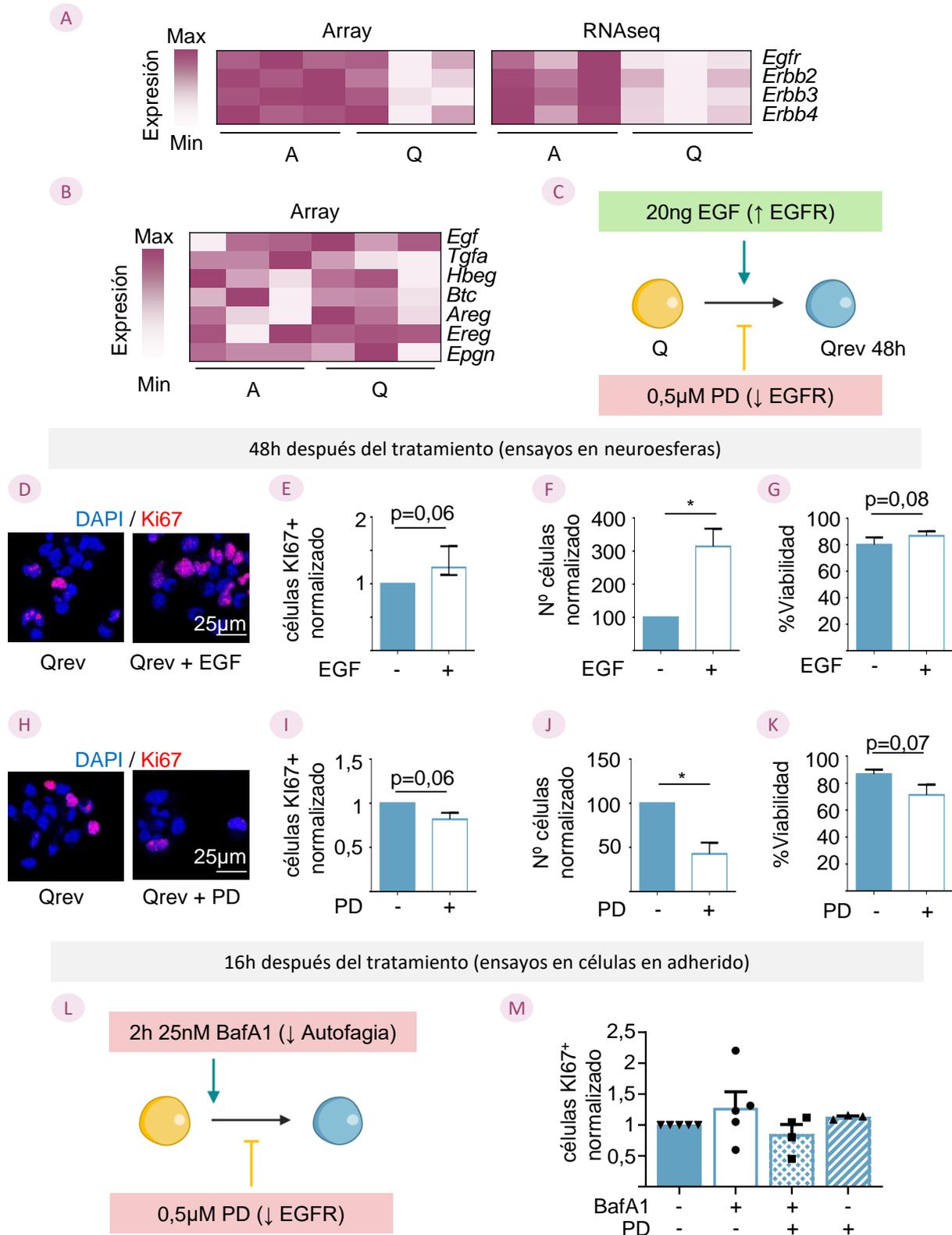


Figura R17: La modulación de EGFR afecta a la activación de las NSCs quiescentes.

(A) Mapa de calor de la expresión de los genes que codifican para los distintos receptores de EGF. Los mapas de calor se elaboraron a partir de los datos obtenidos de un microarray de expresión (Array) y de las rpkms de un RNAseq de cultivos de NSCs activos y quiescentes. Los colores oscuro y claro representan la máxima y mínima expresión del gen, respectivamente. (B) Mapa de calor de la expresión de los genes que codifican para los ligandos de EGFR. Los mapas de calor se elaboraron a partir de los datos obtenidos de un microarray de expresión (Array) de cultivos de NSCs activos y quiescentes. Los colores oscuro y claro representan la máxima y mínima expresión del gen, respectivamente. (C) Esquema del experimento de

reversión. Los cuadros verde y rojo indican los tratamientos para activar e inhibir EGFR respectivamente. **(D)** Imagen confocal de cultivos de NSCs 48 horas después de haber sido revertidos en sistema adherido en presencia de 20ng EGF. Se observan en rojo células en proliferación (Ki67⁺). Los núcleos se muestran teñidos con DAPI. **(E)** Cuantificación de la proliferación de los cultivos tratados con EGF medida como % células Ki67⁺ a las 48h de la reversión. **(F)** Cuantificación del número de células total en los cultivos tratados con EGF mediante microscopía en campo claro y tinción con azul de tripano a las 48 horas de reversión. **(G)** Cuantificación de la viabilidad de los cultivos incubados con EGF medida con azul de tripano a las 48 horas de la reversión. **(H)** Imagen confocal de cultivos de NSCs 48 horas después de haber sido revertidos en sistema adherido en presencia del inhibidor de EGFR, PD. Se observan en rojo células en proliferación (Ki67⁺). Los núcleos se muestran teñidos con DAPI. **(I)** Cuantificación de la proliferación de los cultivos tratados con PD medida como % células Ki67⁺ a las 48h de la reversión. **(J)** Cuantificación del número de células total en los cultivos tratados con PD mediante microscopía en campo claro y tinción con azul de tripano a las 48 horas de reversión. **(K)** Cuantificación de la viabilidad de los cultivos incubados con PD medida con azul de tripano a las 48 horas de la reversión. **(L)** Esquema del experimento de reversión. Las NSCs quiescentes crecidas en cultivo adherido se trataron dos horas con 25nM de Bafilomicina A1 (Baf) y tras ese periodo, se indujo la reversión de la quiescencia en sistema adherido y en presencia de 0,5μM PD. Como control se utilizaron cultivos sin tratar o tratados únicamente con BafA1 o con PD. **(M)** Cuantificación de la proliferación de los cultivos medida como % células Ki67⁺ a las 16 horas de la reversión. Los datos de n≥3 de cultivos de A NSCs y Q NSCs independientes se representan como el promedio ± SEM excepto R17E que se representa como la mediana ± el rango intercuartílico. Test estadístico utilizado: One sample T test excepto para R17E que se utilizó One sample T test-Wilcoxon test. P-valor y R17G y R17K que se utilizó Ratio paired T test. P-valor: *<0,05, **<0,01, ***<0,001. BafA1, Bafilomicina A1; PD168393; A, NSCs activas; Q, NSCs quiescentes.

Este análisis identificó genes diferencialmente expresados en las NSCs a 2m vs. P4 englobados dentro de los términos GO macroautofagia (0016236) (Figura R18C) y lisosoma (0005764) (Figura R18D). Lo que sugiere que la vía autofágica se encuentra incrementada en la NSCs adultas, las cuales mayoritariamente se encuentran en estado quiescente, al contrario de las NSCs posnatales a P4 que todavía mantienen una alta proliferación. La comparación con datos previos disponibles en el laboratorio de un RNAseq obtenido de cultivos de NSCs quiescentes y activas permitió identificar genes comunes a ambos conjuntos de datos (Figura R18C, D)

Los resultados por tanto sugieren que la acumulación de agregados proteicos que muestran las células GLAST⁺ quiescentes recién aisladas podría estar relacionada con el enriquecimiento en la sobreexpresión de genes de la vía autofágica, que muestran las NSCs hipocampales adultas (predominantemente quiescentes) con respecto a las posnatales (predominantemente activas).

9. Las células GLAST⁺ acumulan agregados proteicos con el envejecimiento.

Seguidamente se decidió valorar la evolución de los agregados en las células madre y astrocitos hipocampales durante el envejecimiento. Para ello se analizaron los agregados proteicos medidos con el Kit *Proteostat* en células GLAST⁺ aisladas del hipocampo de animales *wild type* de 2, 12 y 18 meses.

El tipo de señal citoplasmática observada al microscopio confocal se transforma con la edad, pasando de ser una señal difusa en animales jóvenes a una señal más intensa y concreta en animales viejos (Figura R19A). El análisis de la intensidad global de *Proteostat* por célula indicó que el envejecimiento produce una acumulación de agregados (Figura R19B) que es significativa a los 18 meses. Sin embargo, cuando medimos la intensidad en las regiones donde la señal es más concreta, la acumulación de agregados es evidente en células aisladas de animales de 12 meses, considerados como animales de mediana edad (Figura R19C).

Estos datos sugieren que con la edad se produce alguna alteración en las vías de degradación proteica que favorece la acumulación de agregados proteicos.

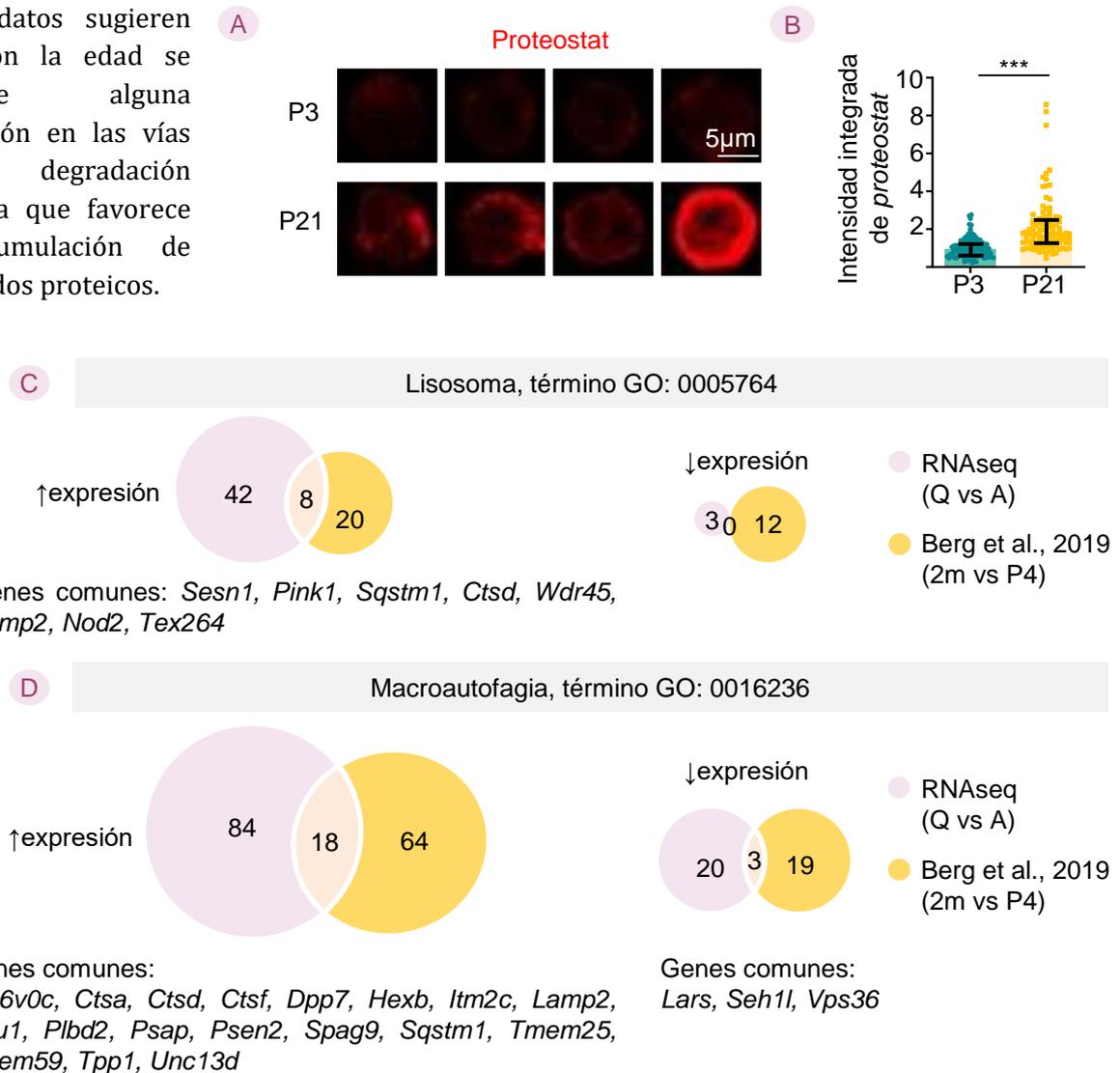


Figura R18: Los agregados proteicos se acumulan en células GLAST⁺ aisladas del hipocampo de animales de 21 días y con el envejecimiento.

(A) Imágenes representativas de microscopía confocal de los experimentos de *Proteostat* de células GLAST⁺ aisladas mediante aislamiento magnético de hipocampos de animales de 3 y 21 días. **(B)** Cuantificación de la fluorescencia de *Proteostat*. **(C,D)** Diagramas de Venn que identifican genes comunes entre nuestro análisis de RNAseq y el de Berg et al., 2019. Se muestran los genes regulados diferencialmente en NSCs activas y quiescentes para los términos GO lisosoma y macroautofagia respectivamente. Los datos de RNAseq se obtuvieron de n=3 de cultivos de Q NSCs vs. A NSCs independientes. Los datos de RNAseq de Berg et al., 2019 corresponden a NSCs aisladas de hipocampo de ratones *Hopx-CreER::H2B-GFP* de 4 días (P4) y 2 meses de edad. Las NSCs de la SGZ adulta (2 meses) se encuentran mayoritariamente en quiescencia mientras que a P4 todavía están proliferando. Los datos corresponden a al menos 15 células de 3 de cultivos independientes de animales de P3 y P21 y se representan como el promedio ± rango intercuartílico. El test estadístico utilizado fue Mann Whitney t test. P-valor *<0,05, **<0,01, ***<0,001. P3, P21 células aisladas de animales de 3 y 21 días respectivamente.

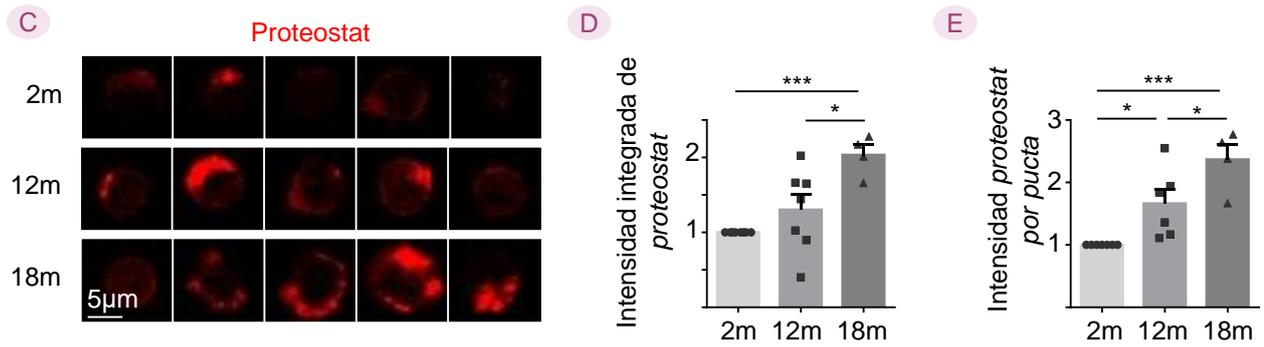


Figura R19: Las células GLAST⁺ acumulan agregados proteicos con el envejecimiento.

(A) Imágenes representativas de microscopía confocal de los experimentos de *Proteostat* de células aisladas mediante aislamiento magnético de hipocampos de animales de 2, 12 y 18 meses. **(B,C)** Cuantificación de la fluorescencia de *Proteostat* por célula y por puncta, respectivamente. Los datos de $n \geq 3$ de cultivos independientes, se representan como el promedio \pm SEM. En R19B se cuantificaron un mínimo de 15 células por experimento y condición. Test estadísticos utilizados: ANOVA de 1 vía- Postest Tukey. P-valor * $<0,05$, ** $<0,01$, *** $<0,001$. 2m, 12m, 18m células aisladas de animales de 2, 12, y 18m respectivamente.

Capítulo III. Estudio de la función del gen *Atg7* y de la vía autofagia-lisosoma en el giro dentado posnatal y adulto

1. El modelo transgénico NesCreERT2 nos permite estudiar el papel de la autofagia en las RGLs neurales de la SGZ del hipocampo de ratón durante la etapa adulta.

Para estudiar el papel de la autofagia en las NSCs *Radial glia-like* (RGLs) del giro dentado del hipocampo *in vivo*, se utilizó un ratón *knockout* condicional inducible, NesCreERT²;Atg7^{F/F}. Este ratón, permitió la delección del gen *Atg7* únicamente en las RGLs, ya que los progenitores neurales expresan el gen que codifica para el filamento intermedio Nestina. Nos centramos en el gen *Atg7* por ser un regulador central de la autofagia, que se encuentra sobreexpresado en las NSCs quiescentes *in vitro* (Figura R11C) y cuya delección se ha empleado para estudiar el papel de la autofagia en otras poblaciones de células madre de tejidos adultos (Collier *et al.*, 2021).

En primer lugar, se valoró la efectividad de la delección mediada por NesCreERT². Se ha descrito que los ratones NesCreERT², que expresan la recombinasa Cre inducible por Tamoxifeno bajo el promotor de Nestina, presentan cierto grado de “*leakage*” o escape, con niveles variables de recombinación basal incluso en ausencia de Tamoxifeno (Sun *et al.*, 2014).

Para valorar su especificidad, los animales NesCreERT² se cruzaron con un ratón que expresaba el gen que codifica para la proteína verde fluorescente GFP en el *locus* Rosa26, flanqueado por sitios LoxP (RCE^{fl}). Tras la administración de Tamoxifeno o aceite como control a ratones NesCreERT²;RCE^{fl} de 2 meses de edad, se evaluó la especificidad de la recombinación en las RGLs del hipocampo en la etapa adulta. Los resultados mostraron que había expresión del reportero GFP en células que poseían una clara morfología neuronal madura en el giro dentado, independientemente de que los animales se hubiesen tratado con Tamoxifeno o aceite (Figura R20A, B). Por tanto, dicha recombinación espontánea se habría producido durante el desarrollo. Sin embargo, la recombinación en las RGLs, identificadas como células GFAP⁺ con el soma en la SGZ y con un proceso GFAP⁺ escasamente ramificado que cruza la GCL otorgándoles una morfología radial, fue selectiva para el tratamiento con Tamoxifeno. No se detectó expresión basal de GFP en esta población celular en la condición control (Figura R20A, D).

Además, el número de células GFP⁺ localizadas en la SGZ que carecen de morfología radial, y que podrían ser progenitores intermedios neurales recombinados, aumentaba en los animales tratados con Tamoxifeno (Figura R20A, C). Por otro lado, no logramos generar la línea NesCreERT²; RCE^{fl}; Atg7^{F/F} debido a que tanto el *locus* Rosa26, donde se introdujo el gen que codifica para GFP, como el gen *Atg7* se localizan en el cromosoma 6 y a una distancia de 0.353cM, siendo prácticamente imposible el entrecruzamiento cromosómico. En los animales NesCreERT²;Atg7^{F/F}, la recombinación del gen *Atg7* se validó mediante PCR empleando cebadores que flanqueaban la región “*floxeada*” en muestras de hipocampo de animales tratados con aceite o Tamoxifeno (Figura R20E, F).

Por otro lado, la secuenciación de la banda recombinada *Atg7** confirmó la delección del gen (datos no mostrados). Los datos indicaron que, a pesar de que existe cierto grado de recombinación basal espontánea, la recombinación aumenta en respuesta al tratamiento con Tamoxifeno (Figura R20D, E). En conjunto, estos resultados indican que el procedimiento utilizado es válido para estudiar el papel de la autofagia *in vivo* en las RGLs en la etapa posnatal y adulta.

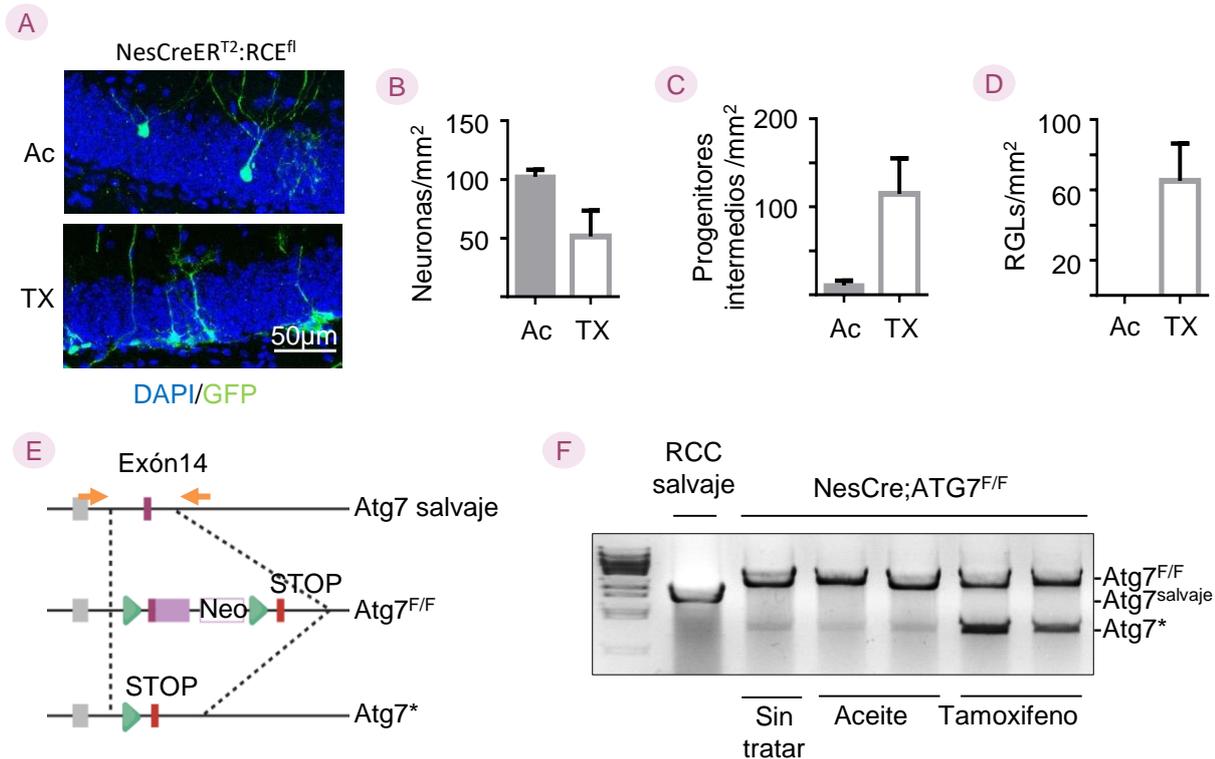


Figura R20: Los ratones NesCreERT2;Atg7F/F son un buen modelo para estudiar el papel de la autofagia en las NSCs de la SGZ en la etapa posnatal y adulta.

(A) Imágenes representativas de microscopía confocal de animales NesCreERT2;RCE^{fl} tratados con aceite y Tamoxifeno. En verde se muestran las células GFP⁺. Los núcleos se marcaron con DAPI (azul). (B, C, D) Cuantificación de células GFP⁺ con morfología de neurona, de progenitor intermedio o radial, respectivamente. (E) Esquema de la construcción donde se señalan en naranja la localización de los cebadores utilizados para comprobar la recombinación. (F) Validación por PCR de la recombinación utilizando los cebadores indicados en R20E. La cuantificación se realizó en 3 cortes de 2 animales por condición. Atg7* alelo recombinado. Ac, Aceite. TX, Tamoxifeno.

2. Las NSCs de la SGZ del hipocampo de ratón continúan entrando en quiescencia durante la tercera semana posnatal.

Antes de analizar el papel de la autofagia en el mantenimiento de las NSCs y en el establecimiento de la quiescencia, se caracterizó qué sucedía en el nicho de la SGZ hipocampal al final de la segunda (P14) y tercera (P21) semana posnatal. Se observó una disminución global de los niveles de Sox2 (Figura R21B) y Ki67 (Figura R21C) en la SGZ del giro dentado a P21 en comparación con P14. También se encontró una reducción en la población de RGLs (GFAP⁺ con morfología radial) (Figura R21A).

Además, se observó una disminución en el número de RGLs activas (GFAP radial/Ki67⁺) (Figura R21D, E). Estos resultados indicaron que a lo largo de la tercera semana posnatal, entre P14 y P21, una parte de las NSCs todavía entra en quiescencia, ya que se observa una disminución en el porcentaje de RGLs activas (Figura R21F).

3. La delección del gen *Atg7* regula la quiescencia de las RGLs de la SGZ del hipocampo de ratón durante la etapa posnatal.

Se quiso evaluar si la autofagia es necesaria para una correcta entrada en quiescencia de las NSCs durante el desarrollo posnatal del giro dentado, o para el mantenimiento de este estado. Para ello, se bloqueó la autofagia en las NSCs de ratones posnatales *NesCreERT²;Atg7^{F/F}* mediante un tratamiento con Tamoxifeno iniciado a día P10 (Figura R22A). Por un lado, este tratamiento no produjo cambios en el número total de RGLs (Figura R22B). Sin embargo, se encontraron cambios en el estado proliferativo de estas células (Figura R22D). El estado de activación de las RGLs se analizó con un doble marcaje de BrdU/Ki67. La BrdU se inyectó a ratones de 13 días de edad de forma que únicamente las células que en ese momento (P13) estuviesen proliferando incorporarían la marca.

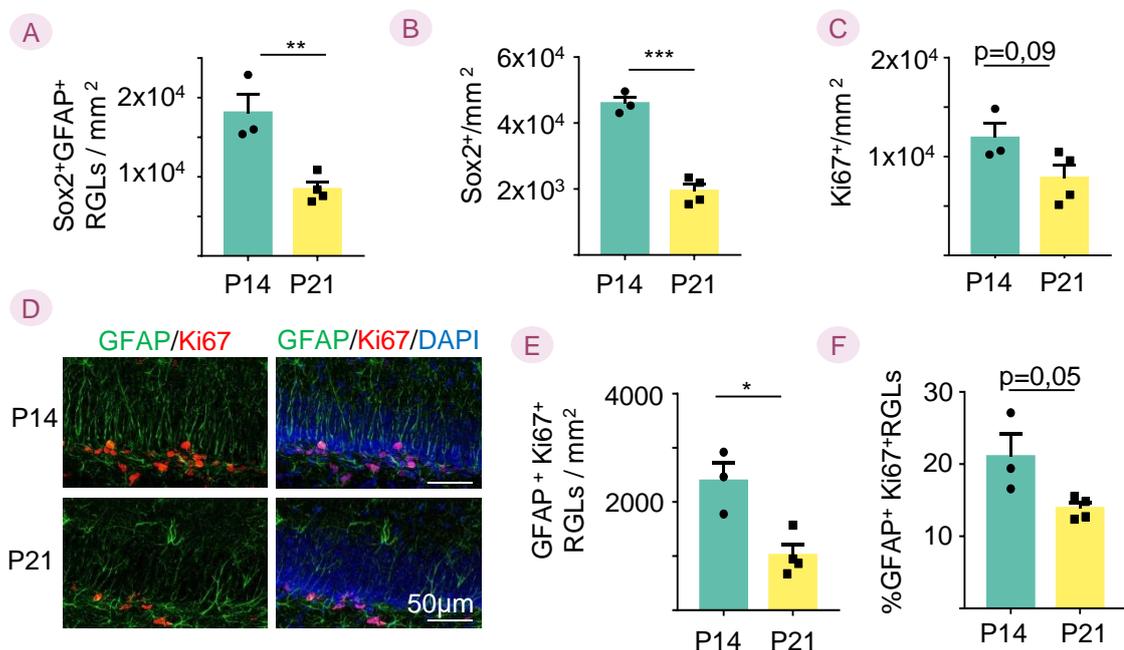


Figura R21: Durante la tercera semana posnatal una parte de las NSCs continúa entrando en quiescencia.

(A) Cuantificación de células GFAP+Sox2+ con morfología radial en la SGZ del hipocampo. (B) Cuantificación de células Sox2+ en la SGZ del hipocampo. (C) Cuantificación de células Ki67+ en la SGZ del hipocampo. (D) Imágenes representativas de microscopía confocal de inmunohistoquímica GFAP/Ki67 de animales de 14 (P14) y 21 (P21) días de edad. (E) Cuantificación de células GFAP+Ki67+ con morfología radial en la SGZ del hipocampo. (F) Representación del porcentaje de células GFAP+ radiales Ki67+. Los datos corresponden a $n \geq 3$ de ratones de 14 y 21 días de edad y se representan como el promedio \pm SEM. Se cuantificó un mínimo de 3 cortes por animal. Test estadísticos utilizados: T Test P-valor * $<0,05$, ** $<0,01$, *** $<0,001$.

Las tinciones GFAP/Sox2/Ki67/BrdU (Figura R22C) mostraron que el tratamiento con Tamoxifeno no producía cambios en la población de RGLs quiescentes (Ki67-/BrdU-) que ya se encontraba en este estado a día P13 (Figura R22E). En cambio, se encontró que el bloqueo de la autofagia redujo el número de RGLs Ki67-/BrdU+, es decir, células que a día P13 estaban proliferando (BrdU+), y que a día P21 habían dejado de hacerlo al entrar en quiescencia (Ki67-) (Figura R22F). Por tanto, este dato sugiere que el bloqueo de la autofagia podría estar impidiendo la entrada en quiescencia de las células que normalmente continúan entrando en este estado durante la tercera semana posnatal. Por otro lado, se observó un aumento de la población de RGLs activas (Ki67+/BrdU-) (Figura R22G). Este aumento podría deberse a la activación de la población de RGLs que ya estaba quiescente antes de día P13 (y por tanto no incorporó BrdU, siendo BrdU-). En conjunto, estos datos demuestran que el gen

Atg7, y por ende la autofagia, es importante para la correcta entrada en quiescencia de las RGLs del giro dentado durante el desarrollo posnatal y para el mantenimiento de dicha población en un estado quiescente, al menos durante la etapa posnatal tardía.

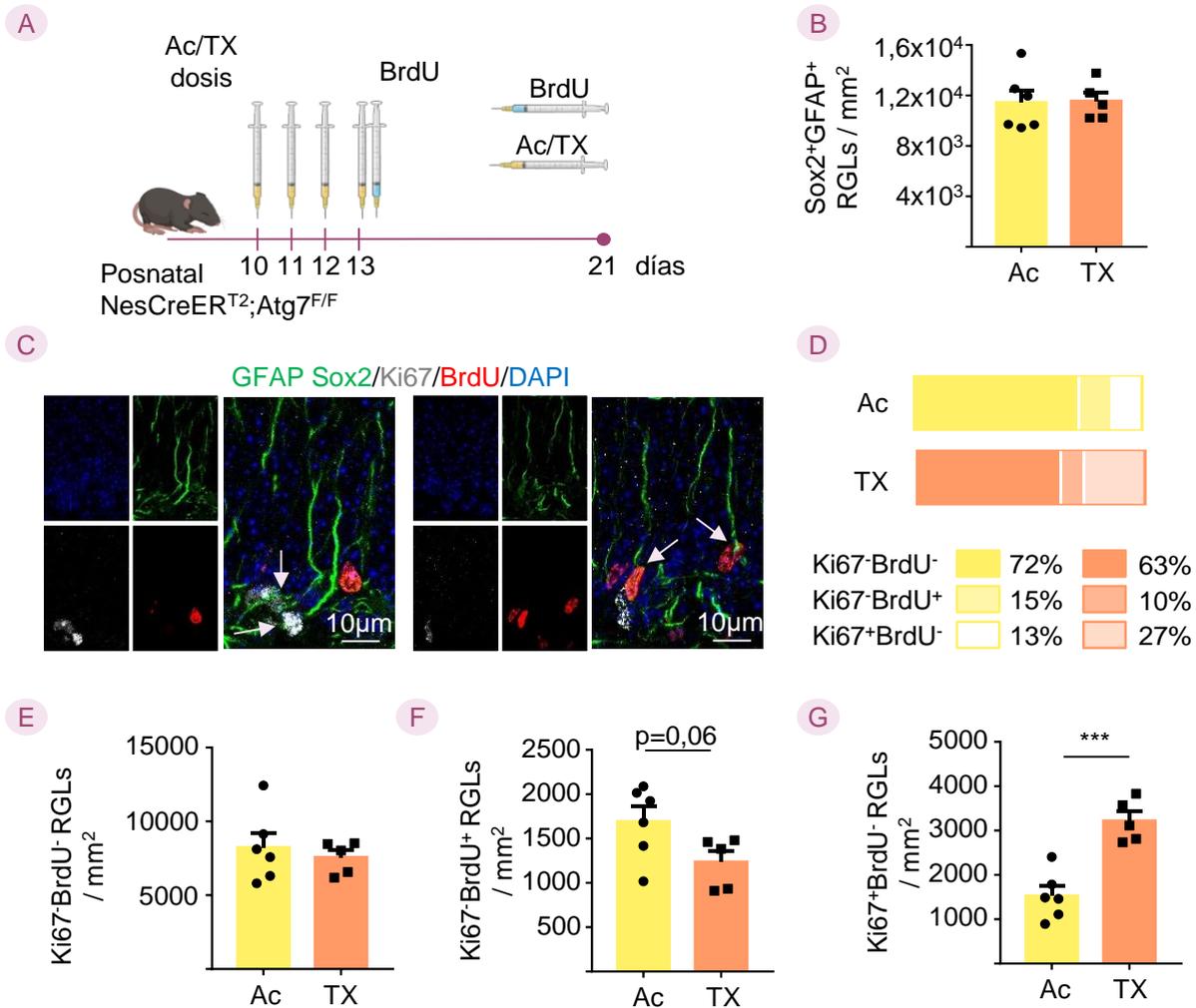


Figura R22: La autofagia es necesaria para el establecimiento de la quiescencia en la SGZ durante la etapa posnatal.

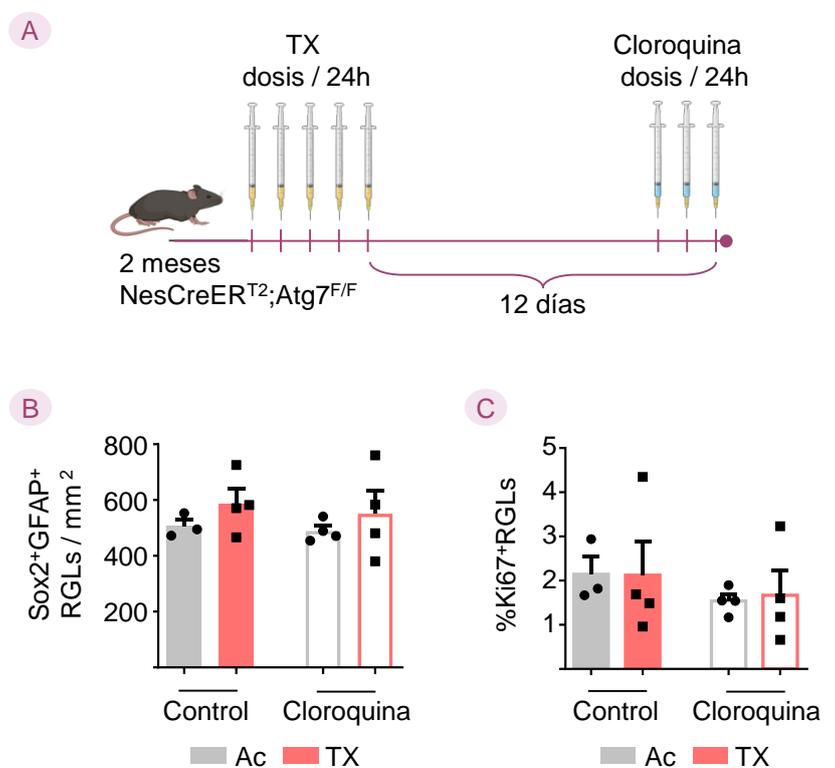
(A) Esquema del experimento, indicando el régimen de administración de Tamoxifeno (TX) llevado a cabo en animales posnatales. Se administraron 0,25mg de TX durante 4 días consecutivos, desde día posnatal 10 hasta día posnatal 13 (P13). A P13 se realizó una inyección con 50mg/kg de ratón de BrdU para poder realizar los dobles marcajes. Los animales se sacrificaron a 21 días de edad. **(B)** Cuantificación de células GFAP+Sox2⁺ radiales. **(C)** Imágenes representativas de microscopía confocal de la inmunohistoquímica. En verde GFAP/Sox2, en blanco Ki67 y en rojo BrdU. Los núcleos se marcaron con DAPI. **(D)** Representación de la proliferación para cada una de las poblaciones identificadas con el doble marcaje. **(E, F, G)** Cuantificación de las células GFAP/Sox2 radiales para los distintos marcadores de proliferación, Ki67-BrdU⁻, Ki67-BrdU⁺, Ki67⁺BrdU⁻, respectivamente. Los datos corresponden a $n \geq 3$ de ratones de 14 y 21 días de edad y se representan como el promedio \pm SEM. Se cuantificó un mínimo de 3 cortes por animal. Test estadísticos utilizados: T Test. P-valor * $<0,05$, ** $<0,01$, *** $<0,001$. Ac, aceite. TX, Tamoxifeno.

4. La vía autofágica parece no ser esencial para el mantenimiento de la quiescencia de las RGLs de la SGZ en condiciones basales en la etapa adulta

Quisimos evaluar si la autofagia también tenía un papel en la etapa adulta. Para ello, se bloqueó la autofagia mediante la administración de Tamoxifeno en ratones NesCreER^{T2};Atg7^{F/F} de dos meses de edad y se evaluó el efecto de la recombinación a los 12 días. Además, en un grupo de animales se bloqueó la degradación lisosomal durante los tres últimos días antes del sacrificio con Cloroquina, un fármaco antimalárico que incrementa el pH del lisosoma y bloquea la degradación lisosomal. La administración de Cloroquina se realizó a una dosis de 50mg/Kg día los tres días previos al sacrificio del animal (Vodicka *et al.*, 2014) (Figura R23A).

Figura R23: La vía autofágica parece no ser esencial para el mantenimiento de la población de células madre de la SGZ en condiciones basales durante la etapa adulta

(A) Esquema del régimen de administración de Tamoxifeno y Cloroquina llevado a cabo en animales de dos meses de edad. Se administraron 2mg de Tamoxifeno durante 5 días consecutivos. Posteriormente hubo un periodo de descanso de 12 días tras el que se sacrificaron los animales. El tratamiento con 50mg/ Kg día de Cloroquina se realizó durante los 3 últimos días de descanso. **(B)** Cuantificación de células madre en la SGZ identificadas como células Sox2⁺GFAP⁺ radiales. **(C)** Cuantificación de las células madre activas identificadas como células Sox2⁺GFAP⁺Ki67⁺ radiales. Los datos corresponden a n≥3 de ratones de 2 meses para cada condición y se representan como el promedio ± SEM. Se cuantificó un mínimo de 3 cortes por animal. Test estadísticos utilizados: ANOVA de 2 vías-Postest Tukey. P-valor *<0,05, **<0,01, ***<0,001. Ac, Aceite. Tx, Tamoxifeno.



El análisis de la población de RGLs y de su proliferación mediante inmunohistoquímica no mostró diferencias entre los ratones control y los ratones tratados con Tamoxifeno. No se encontraron cambios en el número de RGLs en la SGZ del hipocampo (Figura R23B, C) ni en la proliferación de estas células medida como células Ki67⁺ (Figura R23B, C). El tratamiento con Cloroquina tampoco mostró ningún efecto (figura R23B, C), ni solo ni en combinación con la delección de *Atg7*.

Los resultados, por tanto, sugieren que en condiciones basales la vía autofagia-lisosoma no juega un papel esencial en el mantenimiento de las RGLs del nicho de la SGZ hipocampal, ni tampoco en el mantenimiento de su quiescencia.

5. En condiciones proneurogénicas la autofagia parece ser esencial para el mantenimiento de la población de RGLs hipocampales adultas.

Al no encontrar un efecto del bloqueo de la autofagia en condiciones basales, nos propusimos evaluar el papel de la autofagia en condiciones proneurogénicas, en las que las RGLs se activan para dar progenie neuronal. Para ello seguimos el mismo régimen de administración de Tamoxifeno y, tras los 12 días de descanso, los ratones se expusieron a ejercicio voluntario mediante una rueda de correr durante 14 días (Figura 24A).

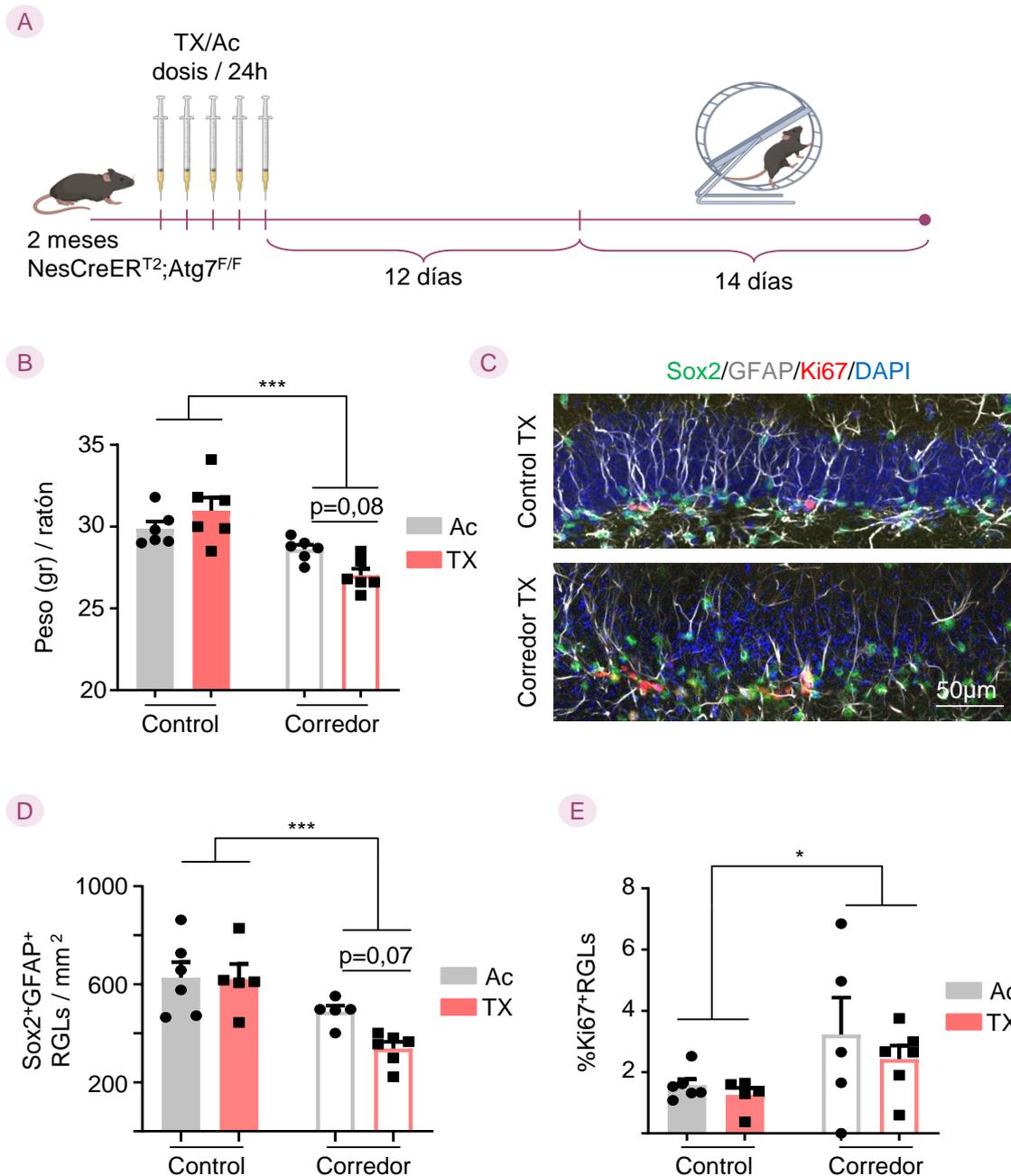


Figura R24: La autofagia parece ser importante para el mantenimiento de la población de células madre neurales de la SGZ en condiciones pro-neurogénicas.

(A) Esquema del régimen de Tamoxifeno y ejercicio llevado a cabo en animales de dos meses de edad. Se administraron 2mg de Tamoxifeno durante 5 días consecutivos. Posteriormente hubo un periodo de descanso de 12 días tras los que los animales

fueron expuestos a ejercicio voluntario. Después de 14 días los animales fueron sacrificados. **(B)** Cuantificación del peso de los ratones antes de ser sacrificados. **(C)** Imágenes representativas de microscopía confocal de inmunohistoquímica. En verde GFAP/Sox2, en rojo Ki67. Los núcleos se marcaron con DAPI. **(D)** Cuantificación de células madre en la SGZ identificadas como células Sox2+GFAP+ radiales. **(E)** Cuantificación de las células madre activas identificadas como células Sox2+GFAP+Ki67+ radiales. Los datos corresponden a $n \geq 5$ de ratones de 2 meses para cada condición y se representan como el promedio \pm SEM. Se cuantificó un mínimo de 3 cortes por animal. Test estadísticos utilizados: ANOVA de 2 vías-Sidak posttest. P-valor * $<0,05$, ** $<0,01$, *** $<0,001$. Ac, Aceite. TX, Tamoxifeno.

Los animales fueron pesados antes de su sacrificio y encontramos diferencias significativas al comparar el grupo de corredores respecto a los controles. Además, dentro del grupo de corredores, los animales a los que se les había bloqueado la autofagia mostraban una reducción de peso ligeramente mayor (Figura R24B). El análisis de la proliferación de la población de RGLs mediante inmunohistoquímica mostró un incremento en los niveles de Ki67 de los ratones que corrieron (Figura R24C, E), lo que corrobora estudios previos en los que se demuestra que correr es un evento proneurogénico que activa a las NSCs (van Praag *et al.*, 1999). Por otro lado, el análisis de las RGLs mostró una reducción en número de RGLs GFAP+Sox2+ en los animales corredores, siendo más acusada la reducción en los animales en los que se había delecionado el gen de autofagia con Tamoxifeno (Figura R24C, D). A nivel estadístico, el análisis únicamente de la condición corredor muestra una diferencia estadísticamente significativa entre los animales tratados con Tamoxifeno o con aceite ($p=0,002$). Por tanto, nuestros resultados sugieren que la autofagia juega un papel en el mantenimiento de la población de RGLs adultas de la SGZ del hipocampo en condiciones proneurogénicas.

6. La administración de Metformina no produce efectos en las RGLs de la SGZ.

Con el objetivo de evaluar si la potenciación de la autofagia producía algún efecto en la población de RGLs, los ratones silvestres (RCC) de dos meses fueron tratados con Metformina diluida en agua a 12mM durante 8 semanas. Transcurrido ese tiempo, los ratones fueron sacrificados (Figura R25A). El análisis del peso de los ratones antes del sacrificio mostró que los ratones tratados tenían un peso superior, sugiriendo que el tratamiento podría haber funcionado (Figura 25B).

La validación de la efectividad del tratamiento con Metformina se realizó mediante el análisis por Western blot de la activación de AMPK (Figura R25C). En el momento del sacrificio, se recogió muestra de hígado que se utilizó para evaluar los niveles de fosforilación y por tanto de activación de AMPK. Los resultados mostraron que los animales tratados con Metformina mostraban un incremento de la fosforilación Thr172, evidenciando que el tratamiento había funcionado (Figura R25D y E).

El análisis de la población de RGLs y su activación se llevó a cabo mediante inmunohistoquímica (Figura R25H). Los datos analizados hasta el momento no muestran un efecto de la Metformina en el número de RGLs analizadas como células GFAP+ con morfología radial (Figura R25F). Tampoco se observan diferencias significativas al analizar el marcador de proliferación Ki67+ en las RGLs (Figura R25G).

Nuestros datos indican, por tanto, que la activación de AMPK y posiblemente de la autofagia *in vivo*, no produce ningún efecto en condiciones basales sobre la población de RGLs de la SGZ en la etapa adulta.

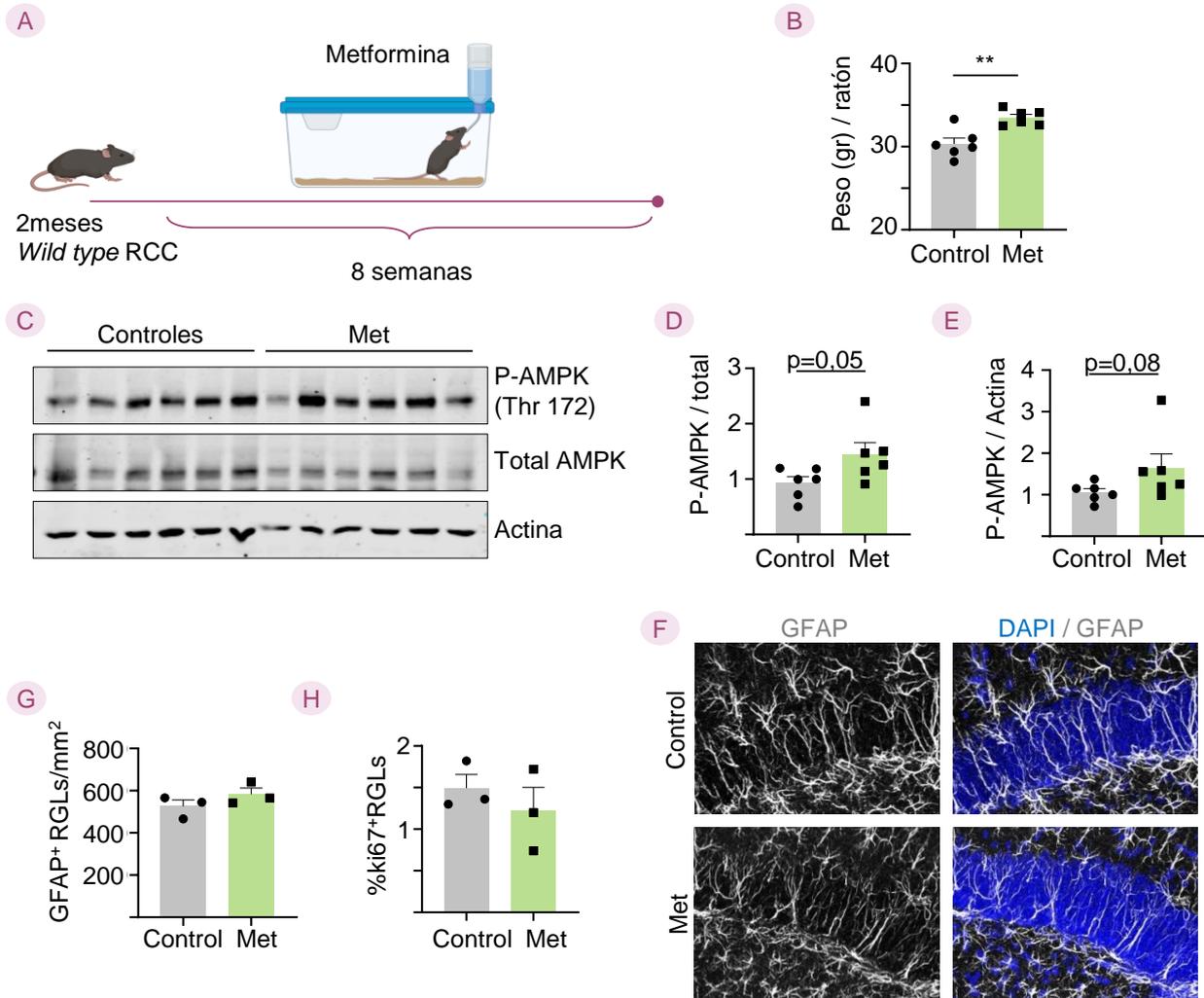


Figura R25: El tratamiento con Metformina no afecta a la población de células madre en condiciones basales.

(A) Esquema del tratamiento con Metformina. Los animales fueron tratados con 12mM de Metformina diluida en el agua de bebida durante 8 semanas. (B) Cuantificación del peso de los ratones antes de ser sacrificados. (C) Detección por Western Blot de la fracción de AMPK activa (P-AMPK). AMPK total y β -actina se utilizaron como control. (D, E) Cuantificación por densitometría de la activación de AMPK normalizada respecto a AMPK total y β -actina, respectivamente. (F) Cuantificación de células madre en la SGZ identificadas como células GFAP⁺ radiales. (G) Cuantificación de las células madre activas identificadas como células GFAP⁺ Ki67 + radiales. (H) Imágenes representativas de microscopía confocal de inmunohistoquímica. En blanco GFAP. Los núcleos se marcaron con DAPI. Los datos corresponden a $n \geq 3$ de ratones de 4 meses para cada condición y se representan como el promedio \pm SEM. Se cuantificó un mínimo de 3 cortes por animal. Test estadísticos utilizados: T test. P-valor * $<0,05$, ** $<0,01$, *** $<0,001$. Met, Metformina.

DISCUSIÓN

Las NSCs que se localizan en la SGZ del giro dentado del hipocampo posnatal y adulto son capaces de activarse para dar lugar a neuronas granulares. Estas nuevas neuronas se integran en los circuitos hipocampales, los cuales están implicados en el aprendizaje y la memoria. La particularidad de las NSCs de esta región es su estado quiescente, o de salida reversible del ciclo celular, que se establece posnatalmente. A pesar de su quiescencia, estas células mantienen la capacidad de proliferar y dar progenie durante toda la vida, en comparación con otras áreas del cerebro donde no se preservan reservas germinales (a excepción de la SVZ) y donde las células madre poseen esta habilidad únicamente durante la etapa embrionaria. La formación de nuevas neuronas hipocampales durante la edad adulta requiere, por tanto, de la formación y mantenimiento de un reservorio de NSCs en estado quiescente (Mira y Morante, 2020; Urbán *et al.*, 2019).

El trabajo experimental de esta tesis doctoral se ha centrado fundamentalmente en el estudio del papel de la vía autofagia-lisosoma en la regulación de las NSCs hipocampales, tanto *in vitro* como *in vivo*. La estandarización de cultivos de NSCs de hipocampo ha permitido estudiar *in vitro* los dos estados principales en los que se pueden encontrar las células madre: quiescencia y activación. En los capítulos I y II de resultados se ha caracterizado tanto la actividad traduccional como la actividad de las vías de degradación de proteínas en células quiescentes y activas *in vitro*. Al comparar los dos estados celulares, los resultados mostraron un cambio en la homeostasis proteica o proteostasis, que resulta en la reducción de la síntesis de proteínas, la acumulación de agregados proteicos y la activación de la autofagia. Por otro lado, el capítulo III de resultados muestra los distintos papeles que juega la autofagia sobre la población de NSCs hipocampales en la etapa posnatal y en la edad adulta. En conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la función de la vía autofagia-lisosoma en la regulación de las células madre neurales del hipocampo depende de la edad, siendo esta vía necesaria para el correcto establecimiento de la quiescencia durante el desarrollo posnatal así como para la preservación de la población de células madre en la etapa adulta, al menos en respuesta a estímulos activadores como el ejercicio físico voluntario. Seguidamente pasaré a discutir en detalle los resultados más relevantes del trabajo experimental.

1. Los cultivos de NSCs son un buen modelo para simular la entrada y salida de quiescencia

Las células madre del giro dentado del hipocampo expresan receptores de BMPs de tipo I y tipo II (BMPR1A y BMPR2), los cuales forman un heterotetrámero que se activa, entre otros, por el ligando BMP4. Estudios realizados con animales cKO han demostrado que la señalización a través de BMPR1A (Mira *et al.*, 2010) y BMPR2 (Bond *et al.*, 2014) participa en el mantenimiento de la quiescencia de las NSCs de la SGZ adulta. Por otro lado, se ha visto que la proteína BMP4 es expresada, y posiblemente secretada, en el nicho por las neuronas granulares del hipocampo y las células endoteliales de los vasos (Fan *et al.*, 2003; Mathieu *et al.*, 2008; Mikawa *et al.*, 2006) y que la sobreexpresión de BMP4 en el hipocampo mediante la inyección de vectores lentivirales promueve la quiescencia de las NSCs *in vivo* (Bond *et al.*, 2014). Por otro lado, está ampliamente descrito que la adición de BMP4 en cultivos de NSCs desencadena la iniciación del programa de quiescencia, simulando el papel de esta vía de señalización *in vivo* (Bonaguidi *et al.*, 2008; Martynoga *et al.*, 2013; Mira *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2011). En este trabajo se ha corroborado que la activación de la vía canónica de BMPs reduce la proliferación de las NSCs tanto en cultivos de células adheridas como crecidas en neuroesferas en presencia de FGF2. Por inmunofluorescencia, se observó una disminución en el porcentaje de células que expresan el marcador endógeno de proliferación Ki67 y mediante citometría de flujo, una reducción de las células que se encontraban en fase S del ciclo celular. Además, la exposición al inhibidor de BMPR1A, DMH1,

impidió la entrada en quiescencia. Por lo tanto, los cultivos de NSCs hipocampales expandidos con FGF2 son un buen modelo de trabajo para estudiar mecanismos moleculares y celulares implicados en la entrada y salida de quiescencia. A diferencia de los cultivos de NSCs de la SVZ, que comúnmente se expanden con una combinación de FGF2 y EGF como mitógenos, en este modelo celular no hemos empleado EGF añadido exógenamente.

Existen otras poblaciones de células madre adultas que se pueden encontrar en estado quiescente, como por ejemplo las células madre hematopoyéticas, musculares y de los folículos pilosos. En muchas de estas poblaciones, la quiescencia también se mantiene a través de la señalización por BMP1A (Friedrichs *et al.*, 2011; Kobiela *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2003), además de por otras vías. Todas estas poblaciones de células madre quiescentes, además de no proliferar, comparten otra serie de características comunes con las NSCs quiescentes, como son cambios en los requerimientos metabólicos, reducción de la síntesis proteica y reducción de los niveles de ARN (van Velthoven y Rando, 2019). En este trabajo, nos hemos centrado en el estudio de diferentes aspectos de la proteostasis en las NSCs quiescentes, un campo menos explorado en el caso de las NSCs hipocampales, en comparación por ejemplo con el estudio de la regulación del programa de quiescencia por factores de transcripción (Imayoshi *et al.*, 2010; Martynoga *et al.*, 2013; Sueda *et al.*, 2019; Urbán *et al.*, 2016) y por reguladores clásicos del ciclo celular (Andreu *et al.*, 2015; Boareto *et al.*, 2017; Porlan *et al.*, 2013).

La síntesis proteica es el proceso metabólico de mayor consumo de energía para la célula (Buttgereit y Brand, 1995). Se ha descrito que este proceso está reducido en las células madre quiescentes, tanto neurales como hematopoyéticas y musculares, y es esencial para el correcto mantenimiento de la quiescencia (Llorens-Bobadilla *et al.*, 2015; Signer *et al.*, 2014; Zismanov *et al.*, 2016). Estudios de transcriptoma de célula única en NSCs, sugieren que la salida de la quiescencia *in vivo* está asociada a un incremento de la síntesis proteica y de la biogénesis ribosomal, tanto en el caso de las NSCs de la SVZ (Llorens-Bobadilla *et al.*, 2015; Shin *et al.*, 2015) como de la SGZ (Llorens-Bobadilla *et al.*, 2015; Shin *et al.*, 2015). En la SVZ, se ha encontrado un estado pre-activado, en el que las células quiescentes expresan genes relacionados con la síntesis de proteínas antes de activarse completamente (Llorens-Bobadilla *et al.*, 2015). Estos resultados sugieren que el incremento de la síntesis proteica precede a la salida de la quiescencia (Bonaguidi *et al.*, 2011; Signer *et al.*, 2014; Zismanov *et al.*, 2016).

Los resultados obtenidos en este trabajo validaron y ampliaron los trabajos publicados hasta la fecha. Por un lado, los ensayos de OPPuro permitieron comprobar que los cultivos de NSCs hipocampales que entran en quiescencia tienen la síntesis proteica reducida. Por otro lado, los análisis de expresión génica y de Western blot mostraron una reducción de la expresión y actividad de la maquinaria de traducción, al igual que se había observado en los estudios de transcriptoma de célula única (Llorens-Bobadilla *et al.*, 2015; Shin *et al.*, 2015). En detalle, los datos obtenidos a partir del Array de expresión mostraron una reducción coordinada de la expresión de genes que codifican para múltiples proteínas de las subunidades ribosomales, las sintetasas de aminoacil-tRNA y los factores de inicio de la traducción. A nivel de proteína, el análisis de las fosforilaciones de 4EBP1 y eIF2 α fue indicativo de una reducción de la eficiencia de inicio de la traducción. Concretamente, encontramos un aumento en la fosforilación de eIF2 α en Ser51, que bloquea el inicio de la traducción al impedir la catálisis de GDP a GTP y el reciclaje del complejo ternario eIF2-GTP-Met-tRNA. En células madre de músculo, conocidas como células satélite, se ha demostrado también que eIF2 α está fosforilado en Ser51 en las células quiescentes y que se desfosforila rápidamente para entrar en el programa de activación y diferenciación (Zismanov *et al.*, 2016). Trabajos en los que cKO para *Perk* han demostrado que esta quinasa es la responsable de la fosforilación de eIF2 α en las células satélite quiescentes (Zismanov

et al., 2016). Nuestros datos también muestran una mayor activación de la quinasa PERK, la cual se relacionada con el estrés de retículo en las NSCs quiescentes, sugiriendo que, en el sistema *in vitro* empleado, PERK podría estar fosforilando eIF2 α . Sin embargo, no podemos excluir la participación de otras quinasas, como por ejemplo GCN2 que está implicada en la insuficiencia de nutrientes.

Además, en las células quiescentes de músculo se ha demostrado que la fosforilación de eIF2 también está asociada a la regulación selectiva de la traducción. A pesar de la disminución global de la traducción, ciertos ARN mensajeros se traducen selectivamente en las células satélite quiescentes, debido a la presencia de pautas abiertas de lectura *upstream* (uORFs) en la región 5' no traducida de dichos mensajeros, que retienen a los ribosomas (Zismanov *et al.*, 2016). No obstante, según datos recientemente publicados (Baser *et al.*, 2019), las NSCs adultas (al menos en la SVZ) transcriben los ARN que expresan de forma indiscriminada o poco selectiva, mientras que en el transcurso de la diferenciación neuronal la traducción selectiva va adquiriendo más peso. Por tanto, es posible que las NSCs adultas quiescentes no dependan tanto de este tipo de regulación de la expresión, en comparación con las células madre del músculo.

Otro de los factores descritos que parece estar implicado en la regulación de la capacidad traduccional de las NSCs del hipocampo adulto es REST (factor de transcripción silenciador del elemento represor 1), un represor transcripcional (Mukherjee *et al.*, 2016). La delección de REST mediante lentivirus en las NSCs quiescentes del hipocampo resulta en la activación de las células madre y su posterior agotamiento. La mayoría de genes regulados por REST corresponde a genes neuronales, como forma de prevenir la diferenciación. Sin embargo, estudios de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) en las NSCs quiescentes muestran que REST también controla directamente genes relacionados con la biogénesis ribosomal y el ciclo celular. En concreto inhibe los genes relacionados con la biogénesis ribosomal, como genes *Rpl/Rps* (que codifican para proteínas las subunidades ribosomales) y *Nmp1* (que codifica para una proteína nucleolar implicada en biogénesis ribosomal, procesamiento del ARN y otros procesos). Estos resultados sugieren que REST regula el mantenimiento del estado de quiescencia en las NSCs del hipocampo, garantizando la represión de genes de la maquinaria de traducción (Mukherjee *et al.*, 2016).

Por otro lado, para aproximarnos a la validación *in vivo* de la reducción de la traducción en las células quiescentes, se realizaron determinaciones de OPPuro en células aisladas a partir de hipocampos de ratón posnatales en base al marcador GLAST. Esta metodología no permite aislar células madre de forma totalmente específica, sino que se obtiene una mezcla de células madre y astrocitos, que expresan este mismo marcador de superficie.

Durante la etapa posnatal temprana, el hipocampo continúa su formación, produciéndose el fenómeno de neurogénesis y astrogénesis. Se trata de procesos que ocurren de manera secuencial en la CA1 y CA3 del hipocampo y que sin embargo, se solapan en el tiempo durante el desarrollo del giro dentado, a lo largo de la primera semana posnatal (Bond *et al.*, 2020). Según la bibliografía, las NSCs del giro dentado del hipocampo tienen el pico máximo de proliferación a día 3 posnatal. A partir de ese momento, comienza la entrada en quiescencia, que reduce rápidamente los niveles de proliferación entre día 3 y 14 posnatal (Berg *et al.*, 2019; Bond *et al.*, 2020). En nuestro estudio, caracterizamos inicialmente el estado proliferativo en células GLAST⁺ aisladas de ratones de 3 días, que correspondería con el pico máximo de proliferación, y de 21 días momento en el que la mayoría de células madre serán quiescentes y los astrocitos serán postmitóticos. Corroboramos la salida de ciclo al observar la disminución del porcentaje de células Ki67⁺ durante las primeras semanas de desarrollo

posnatal, al igual que una reducción de la síntesis proteica analizada mediante experimentos de OPPuro.

A pesar de las limitaciones que tiene esta metodología, el aislamiento de las células GLAST permite hacerse una idea general de los niveles de traducción en esta población celular del nicho neurogénico. No obstante, la disminución global de la proliferación y de la traducción podría corroborarse en otras aproximaciones que permitieran enriquecer el aislamiento en células madre, por ejemplo combinando el marcador GLAST con otro marcador de superficie como Prominin 1 (Walker *et al.*, 2013) o LPAR1 (Walker *et al.*, 2016).

2. Las NSCs quiescentes acumulan proteínas en forma de agregados e incrementan la autofagia

A pesar de la reducción global de la traducción observada tanto en cultivos de NSCs quiescentes como en las células GLAST aisladas a 21 días, que mayoritariamente estaban fuera de ciclo, encontramos una acumulación de agregados proteicos identificados con *Proteostat* en ambos casos. Este acúmulo nos resultó sorprendente en base a la reducción de los niveles de traducción medidos con OPPuro. En el caso de los cultivos, en el que las células acaban de salir de ciclo, pensamos que podría explicarse por un bloqueo en la dilución de su contenido citoplasmático al dejar de dividirse.

Se sabe que las células en división activa reducen su contenido proteico mediante dos mecanismos, por dilución durante la división celular al pasar las proteínas a las células hijas, o por degradación proteolítica al activar las vías principales de degradación de proteínas (ubiquitina-proteasoma y autofagia-lisosoma). En concreto, las proteínas de vida media larga son eliminadas mayoritariamente por dilución mientras que las proteínas de vida media corta lo son por degradación proteolítica (Hershko y Ciechanover, 1998; Pratt *et al.*, 2002). Por tanto, una célula en división que pasa a no dividirse acumularía proteínas de vida media larga en comparación con las proteínas de vida media corta que no se verían afectadas (Zhang *et al.*, 2017). De hecho, en líneas celulares cancerígenas con alta proliferación, se ha demostrado que el bloqueo farmacológico de la división celular provoca la acumulación de proteínas de vida media larga, lo que desencadena un desequilibrio proteómico (Eden *et al.*, 2011).

Se ha visto que, en otros modelos de células quiescentes que no eliminan proteínas por dilución, se produce un desbalance entre la síntesis, el plegamiento y la degradación de proteínas, que afecta a la homeostasis proteica. Nuestros datos con cultivos de NSCs no mostraron cambios en la actividad del proteasoma entre células activas y quiescentes. Sin embargo, sí que observamos un incremento generalizado de la vía autofagia-lisosoma en las células quiescentes, con un aumento de los niveles de ARN y proteínas de genes implicados en esta vía. Además, había una mayor activación de las quinasas inductoras de autofagia (AMPK, ULK1) y una inhibición de proteínas responsables de la represión de la vía (mTOR). Por otro lado, los experimentos de inhibición de la autofagia con Bafilomicina A1 no mostraron diferencias en el flujo autofágico de los cultivos de NSCs activas y quiescentes *in vitro*, entendiendo el flujo autofágico como el ratio entre autofagosomas formados y autofagosomas degradados. Nuestros datos sugieren por tanto que el incremento de la maquinaria autofágica podría ser un mecanismo compensatorio para tratar de eliminar los acúmulos de agregados proteicos (Figura D1C). Estos resultados irían en línea de lo publicado anteriormente en fibroblastos quiescentes. El arresto del ciclo celular de estas células por confluencia de los cultivos debería provocar la acumulación de proteínas de vida media larga (el 30% de las proteínas tienen una constante de

degradación mayor que la constante de división celular), sin embargo, se observaba un incremento de la biogénesis lisosomal y activación de la autofagia como mecanismo para compensar la acumulación de dichas proteínas de vida media larga (Zhang *et al.*, 2017).

Por otro lado, en general durante el envejecimiento, se produce una disminución de la expresión de proteínas relacionadas con la autofagia y una reducción en la entrega de carga a los lisosomas (Aman *et al.*, 2021), lo que explicaría la acumulación de agregados asociados a la edad que muestran las células GLAST aisladas de hipocampos de ratones viejos. En un trabajo *in vivo*, en el que analizaron las células madre quiescentes recién aisladas de la SVZ de animales viejos y se compararon con las de animales jóvenes, también observaron una acumulación de agregados proteicos, marcados con *Proteostat*, y de autofagosomas, marcados con GFP-LC3, mientras que se detectó una reducción en el contenido en lisosomas, marcados con LAMP1 (Leeman *et al.*, 2018). Estas observaciones se interpretaron como una reducción del flujo autofágico. En el mismo estudio, la expresión de una forma constitutiva activa del factor de transcripción TFEB, que controla la expresión de los genes de la vía autofagia-lisosoma (Sardiello *et al.*, 2009) logró movilizar los agregados en las NSCs de animales viejos y mejoró su activación en un ensayo de reversion de la quiescencia. En conjunto, los datos apuntarían a una posible disminución del flujo autofágico en las NSCs del cerebro adulto con la edad y a una acumulación exacerbada de los agregados proteicos.

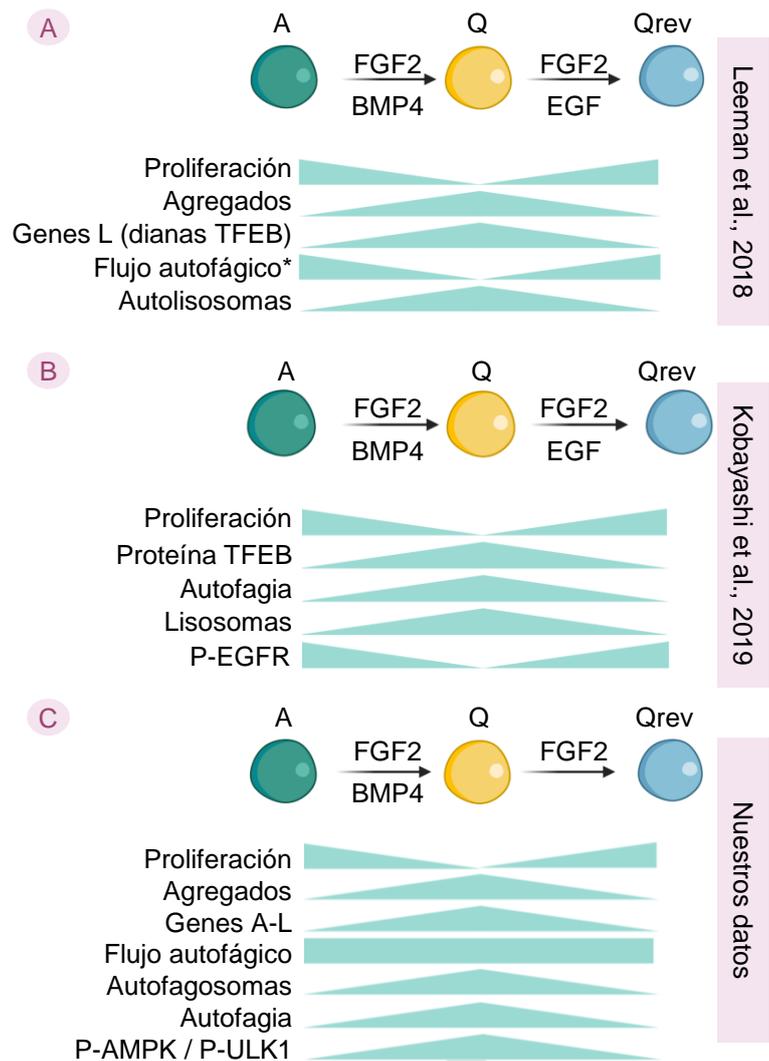


Figura D1: Caracterización de los modelos de entrada y salida de quiescencia.

(A, B) Representación esquemática de los resultados de los trabajos que han evaluado la función de la vía autofagia-lisosoma en las NSCs quiescentes (Kobayashi *et al.*, 2019; Leeman *et al.*, 2018). Los trabajos se llevaron a cabo con cultivos a partir de NSCs de SVZ o SGZ. La entrada en quiescencia se realizó en presencia del mitógeno FGF2 y de la señal inductora de quiescencia BMP4, y la reactivación en presencia de FGF2 y EGF. Ambos trabajos indican un incremento de la vía lisosomal en NSCs quiescentes. (C) Representación esquemática de los resultados mostrados en esta tesis doctoral. La inducción de la quiescencia se realizó en presencia del mitógeno FGF2 y BMP4 y la reactivación únicamente presencia de FGF2. Los datos apuntan a un incremento de la autofagia en las NSCs quiescentes. A, NSCs activas; Q, NSCs quiescentes; genes L, genes lisosoma; genes A-L, genes vía autofagia-lisosoma. * el flujo autofágico se evaluó en células recién aisladas de la SVZ.

En relación al envejecimiento, se ha descrito que las células madre quiescentes adultas de otros tejidos requieren de la autofagia para evitar entrar en un estado de senescencia irreversible. De hecho, en

músculo, la senescencia y el deterioro funcional de las células madre asociado al envejecimiento puede ser prevenido al potenciar la autofagia *in vivo* (García-Prat *et al.*, 2016). Al igual que en las células musculares, la disminución de la autofagia con la edad en las células madre hematopoyéticas produce una acumulación de mitocondrias activas y de OXPHOS, lo que potencia la diferenciación y reduce su capacidad de autorrenovación (Ho *et al.*, 2017). En el nicho neurogénico de la SVZ, la reducción de la capacidad de activación de las células madre quiescentes asociada a la edad puede prevenirse *in vivo* con un tratamiento sistémico de Rapamicina, un inhibidor de mTOR que activa la vía autofagia-lisosoma. Este tratamiento resulta en un incremento en el número de células madre y/o progenitores neurales activos, identificados por citometría en base a la expresión de EGFR en su membrana (Leeman *et al.*, 2018). Sería interesante a futuro ensayar estrategias similares de activación de la autofagia en animales viejos para determinar si en la SGZ del hipocampo se observa el mismo efecto de “rejuvenecimiento” o recuperación de la actividad proliferativa descrito en la SVZ.

Al margen de las implicaciones de la vía autofagia-lisosoma en envejecimiento, dos estudios publicados en el transcurso de esta tesis doctoral indican que esta vía, y más concretamente la función lisosomal, es esencial para el mantenimiento de la quiescencia de las NSCs adultas (Figura D1). Un primer trabajo de 2018 (Leeman *et al.*, 2018) analizó las NSCs quiescentes y activas de la SVZ, tanto de animales jóvenes (3-4 meses de edad) como viejos (19-22 meses de edad). Las NSCs se aislaron mediante FACS de animales transgénicos GFAP-GFP, en base a este marcador combinado con Prom1 para identificar a las NSCs, y empleando la expresión de EGFR en membrana para distinguir la población activa (GFP+Prom1+EGFR+) de la quiescente (GFP+Prom1+EGFR-). Se encontró un enriquecimiento en la expresión de genes lisosomales (dianas del factor de transcripción TFEB) en las NSCs quiescentes y de genes del proteasoma en las NSCs activas, aunque no se mostró la expresión de genes de autofagia. Ensayos con el sensor mCherry-GFP-LC3 en cultivos indicaron que las NSCs quiescentes tenían grandes lisosomas que se fusionaban con los autofagosomas pero que no habían degradado su contenido. Sus datos en las NSCs quiescentes de la SVZ mostraron que tenían un flujo autofágico ralentizado y un mayor contenido en lisosomas de gran tamaño, que contenían, en su interior, agregados marcados con *Proteostat* (Figura D1A).

En este mismo trabajo, efectuaron una batería de ensayos funcionales *in vitro* en cultivos de neuroesferas aislados de la SVZ y expandidos en presencia de EGF y FGF2 y observaron que el tratamiento con Bafilomicina A1 en las NSCs quiescentes inducidas con BMP4 impedía su activación. Por el contrario, la privación de nutrientes con HBSS, que moviliza los agregados proteicos, promovía la activación de las células cuando se exponían nuevamente al mitógeno EGF (Leeman *et al.*, 2018). Por tanto, su conclusión fue que la activación de la vía autofagia-lisosoma en las NSCs quiescentes moviliza y degrada los agregados proteicos y facilita la activación de las células en respuesta a factores de crecimiento. De hecho, los autores postularon que dicha movilización podría constituir una fuente de energía para la activación de las NSCs o ser un mecanismo de prevención de la distribución de agregados potencialmente tóxicos a la progenie celular. Sin embargo, nuestros resultados sugieren justamente lo contrario, que la activación de la vía autofagia-lisosoma en las NSCs quiescentes previene o retrasa su entrada en ciclo, mientras que el bloqueo la promueve (Figura D2A). Es decir, en nuestros ensayos las NSCs quiescentes necesitarían de la autofagia para mantener el estado de quiescencia.

Los métodos utilizados en esta tesis difieren en cierta medida del modelo celular y el planteamiento experimental empleado por Leeman y colaboradores. Para los experimentos de reversión, este grupo utilizó cultivos de NSCs aisladas de la SVZ en base a marcadores de superficie que se expandieron

como neuroesferas. Para el establecimiento de quiescencia, utilizaron 20ng/ml FGF2 y 50ng/ml BMP4 durante 7 días y la reversión la realizaron con 20ng/ml tanto de FGF2 como de EGF (Leeman *et al.*, 2018). Además, los experimentos funcionales de reversión de la quiescencia que llevaron a cabo se analizaron entre 72 y 96 horas después del tratamiento con 100nM Bafilomicina A1 o HBSS. Tras 3 horas de pulso de EdU (análogo de timidina) para marcar células en fase S, la proliferación se analizó por citometría de flujo intracelular (Leeman *et al.*, 2018).

Por el contrario, nuestros experimentos se realizaron con cultivos de NSCs originalmente aisladas de hipocampo adulto e inducidas a entrar en quiescencia tras cuatro días con BMP4. Los experimentos funcionales de reversión de la quiescencia se analizaron mediante inmunofluorescencia para el marcador de proliferación Ki67 y a tiempos más cortos, tras 16 horas en el caso de Bafilomicina A1 (puesto que tratamientos largos inducían la muerte de las células) y 48h en el caso de HBSS y Fenformina. Además, la Bafilomicina A1 se utilizó a 50nM debido a que la dosis utilizada por Leeman y colaboradores provocaba la muerte de nuestras células.

Nuestros resultados mostraron una mayor activación cuando las células habían sido tratadas previamente con Bafilomicina A1, además de observarse un incremento en el número total de células. Por el contrario, cuando los cultivos se trataron con Fenformina, un fármaco que promovería la autofagia al activar AMPK, encontramos una disminución en el número de células y una menor activación de las células quiescentes. Los experimentos en los que perseguíamos activar la autofagia con HBSS no mostraron ninguna diferencia en los niveles de proliferación, pero sí en el número de células. Probablemente este dato se pueda explicar si, como es de esperar, el tratamiento con el medio carente de nutrientes induce inicialmente una reducción de la proliferación, aunque los niveles se recuperen posteriormente al cambiar a un medio con nutrientes (Figura D2C).

En línea con nuestro trabajo, en 2019 Kobayashi y colaboradores (Kobayashi *et al.*, 2019) demostraron que la inducción de la quiescencia con BMP4 en cultivos de NSCs, tanto procedentes de la SVZ como de la SGZ adulta, incrementaba la actividad autofágica y lisosomal (Kobayashi *et al.*, 2019) (Figura D1B). La autofagia se analizó determinando la acumulación de LC3II y la función lisosomal midiendo la actividad de diversas catepsinas. No se hicieron determinaciones del flujo autofágico puesto que el foco del trabajo, al igual que en Leeman y colaboradores, fue el papel del lisosoma. En ensayos de reversión de la quiescencia, en los que se eliminaba BMP4 y se añadía EGF exógeno, el tratamiento con Bafilomicina A1 aumentaba la proliferación de las NSCs (medida con Ki67 y EdU) e incrementaba los niveles del receptor del factor de crecimiento epidérmico activo (P-EGFR), así como la expresión de genes relacionados con el ciclo celular. A través de una serie de ensayos bioquímicos los autores demuestran que P-EGFR se degrada rápidamente en las NSCs quiescentes por el lisosoma y que el bloqueo de la vía autofagia-lisosoma con Bafilomicina A1 impide la degradación de este receptor, que resulta en una mayor activación de las células quiescentes (Kobayashi *et al.*, 2019) (Figura D2B). Sin embargo, el compuesto SAR405 (inhibidor específico de autofagia), que inhibe a VPS34 y la formación de autofagosomas sin afectar directamente a la acidificación del lisosoma, no tuvo efecto sobre los niveles de P-EGFR, lo que apunta a un papel del lisosoma independiente de la autofagia. En este sentido, se sabe que EGFR se recicla por endocitosis al igual que muchos receptores de membrana. Los autores evaluaron también el papel de la endocitosis en la degradación de EGFR en las células quiescentes, pero vieron que el tratamiento con Dynasore (inhibidor de la endocitosis mediada por clatrina) o con Nocodazol (inhibidor de organizador de microtúbulos) tenían efectos suaves en la acumulación de EGFR. Esto sugiere que ni la autofagia ni la endocitosis son los responsables de la acumulación de EGFR tras el tratamiento con Bafilomicina A1.

En base a lo anterior, los autores (Kobayashi *et al.*, 2019) proponen que el aumento en el número de lisosomas que muestran las NSCs quiescentes incrementa la probabilidad de que los endosomas se fusionen con los lisosomas y se degrade el receptor. Si fuera así, se reduciría el tiempo necesario para la formación del endolisosoma e indicaría que la actividad lisosomal en las NSCs quiescentes es importante para reducir la señalización por EGF y mantener el estado inactivo. Una conclusión opuesta a la de Leeman y colaboradores (Leeman *et al.*, 2018), que proponen que la alta actividad lisosomal de las NSCs quiescentes facilita su activación en respuesta a factores de crecimiento. Por tanto, aunque las conclusiones difieren, el énfasis de los trabajos previos es en la vía lisosomal, y no en la autofagia. Es posible que el efecto que observamos en la regulación del ciclo celular pueda estar mediado en parte por la señalización por EGFR ya sea por la vía autofagia-lisosoma o por la vía endolisosomal. Sin embargo, el modelo celular *in vitro* utilizado en este trabajo no emplea EGF añadido de manera exógena por lo que es probable que los efectos sobre la activación puedan deberse a otros cargos que si se degraden por la vía autofágica. De todas las maneras, sería aclaratorio realizar experimentos en nuestro laboratorio utilizando el inhibidor SAR405 para validar si en nuestro modelo, la autofagia tiene un papel independiente de la señalización por EGFR.

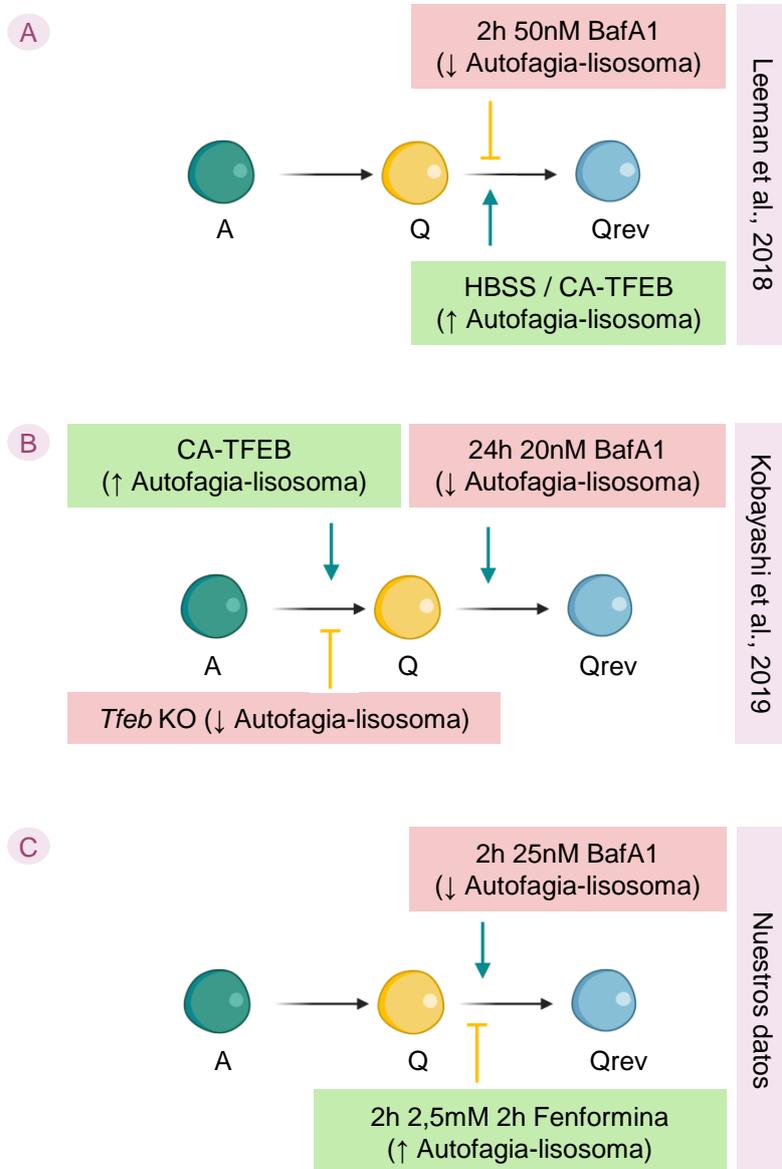


Figura D2: Efecto de la manipulación de la vía autofagia-lisosoma en la quiescencia y activación de las NSCs

(A, B) Representación esquemática de los resultados de los trabajos que han evaluado la función de la vía autofagia-lisosoma en cultivos NSCs quiescentes aisladas de SVZ o SGZ (Kobayashi *et al.*, 2019; Leeman *et al.*, 2018). La entrada en quiescencia se realizó en presencia del mitógeno FGF2 y BMP4 y la reactivación en presencia de FGF2 y EGF. Ambos trabajos muestran un incremento de la vía lisosomal, sin embargo difieren en los resultados de los experimentos funcionales. **(C)** Esquema de los resultados mostrados en esta tesis doctoral. La inducción de la quiescencia se realizó en presencia del mitógeno FGF2 y BMP4 y la reactivación únicamente presencia de FGF2 (sin EGF añadido de forma exógena). Nuestros datos sugieren que la modulación de la vía autofagia-lisosoma podría regular la activación de las NSCs quiescentes. Los cuadros verdes y rojos indican tratamientos que activan o inhiben la vía autofagia-lisosoma, respectivamente. BafA1, Bafilomicina A1; CA-TFEB, sobreexpresión de la forma constitutivamente activa de TFEB; *Tfeb* KO, *Tfeb* knockout NSCs; A, NSCs activas; Q, NSCs quiescentes.

Nuestros datos muestran, que a pesar de expandir las células solamente con FGF2 como mitógeno (es decir, en ausencia de EGF), las NSCs expresan al menos a nivel de ARN mensajero el receptor de EGFR. Estos resultados apoyan trabajos publicados anteriormente que muestran que EGFR es un receptor altamente expresado en las células activas y que mantiene cierta expresión en las células quiescentes (Codega *et al.*, 2014; Doetsch *et al.*, 2002; Martynoga *et al.*, 2013; Pastrana *et al.*, 2009). Este receptor posee un dominio extracelular de unión a ligando, un dominio transmembrana y un dominio tirosina quinasa intracelular que una vez activado regula diferentes rutas que controlan la supervivencia, proliferación y diferenciación de la población de células madre (Craig *et al.*, 1996; Reynolds y Weiss, 1992). El ligando EGF promueve la proliferación a través de la activación de mTOR tanto *in vitro* como *in vivo*. Además, se ha demostrado que la activación de EGFR promueve la activación de NSCs quiescentes tanto *in vitro* como *in vivo* en animales jóvenes (Cochard *et al.*, 2021). Sin embargo, la proliferación mediada por EGF es regulada por la vía de las BMPs a través de una vía independiente a mTOR (Joppé *et al.*, 2015).

Nuestros experimentos de inhibición de la autofagia con Bafilomicina A1 e inhibición de EGFR con PD168393 no son concluyentes, pero sugieren que el efecto activador de Bafilomicina A1 podría depender en parte de la señalización autocrina por EGFR de las propias NSCs (puesto que no se añade el ligando EGF al medio ni en los pases para la expansión celular ni en los ensayos propiamente dichos). Aunque el análisis estadístico no es significativo, se observa una reducción de la proliferación cuando las células se tratan con Bafilomicina A1 y PD168393, en comparación con las células tratadas únicamente con Bafilomicina A1, que aumenta la activación. El tratamiento con PD168393 no muestra el efecto esperado, probablemente debido a que en este experimento el análisis se realizó a las 16 horas del tratamiento, en vez de a las 48 horas que fue cuando se realizaron los experimentos de activación e inhibición de EGFR. Dado que Bafilomicina A1 inhibe tanto el flujo autofágico como la acidificación del lisosoma dependiente de la V-ATPasa, y por ende la actividad lisosomal es posible que el efecto de Bafilomicina A1 en los cultivos esté relacionado con la degradación de P-EGFR por el lisosoma para evitar la activación de las NSCs quiescentes, aunque otros mecanismos también podrían estar implicados. No obstante, los experimentos genéticos realizados *in vivo*, que se discutirán en el siguiente apartado, sí que sugieren un papel directo de un gen clave de la vía autofágica (*Atg7*) sobre la quiescencia de las NSCs de la SGZ, especialmente en la etapa posnatal.

3. La autofagia es importante para el mantenimiento de la población de células madre en condiciones pro-neurogénicas.

Nuestros resultados *in vitro* empleando tratamientos farmacológicos sugieren que la vía autofagia-lisosoma es necesaria en las NSCs quiescentes para mantener la calidad del proteoma e inhibir la activación de las células.

Los resultados de los ensayos *in vivo* demuestran que la autofagia regula la quiescencia de las NSCs de la SGZ murina, sin embargo, se observa un cambio en la función de la autofagia con la edad empleando como modelo de pérdida de función el ratón condicional NesCreERT2;*Atg7*^{F/F}. *Atg7* es un gen esencial para el sistema de conjugación de ATGs y la formación de autofagosomas. Estudios previos realizados *in vivo* indican que la delección embrionaria de *Atg7* produce la muerte de los animales tras el nacimiento, ya que ATG7 es esencial para el reciclaje de los aminoácidos en las células (Komatsu *et al.*, 2005). Por tanto, para el estudio de la autofagia en el sistema nervioso central se han utilizado modelos genéticos condicionales que delecionan *Atg7* en distintas poblaciones de células como

neuronas dopaminérgicas, neuronas del hipotálamo, neuronas excitatorias del prosencéfalo, células de Purkinje o microglía (Collier *et al.*, 2021).

El primer trabajo donde se utilizó un ratón condicional constitutivo que deletiona *Atg7* en las células madre que expresan Nestina, demostró que los ratones mostraban defectos neurológicos, muerte neuronal y acumulación de cuerpos de inclusión en las neuronas. Conduciendo, todo ello, a una muerte prematura de las células (Komatsu *et al.*, 2006).

En nuestro trabajo utilizamos un ratón cKO inducible que deletiona *Atg7* en las células madre que expresan Nestina tras la administración de Tamoxifeno a la edad de interés (NesCreER^{T2};Atg7^{F/F}). Ante la imposibilidad de validar la recombinación por inmunohistoquímica, analizamos la recombinación por PCR que mostró recombinación en extractos de giro dentado tras la administración de Tamoxifeno. Un trabajo anterior, que utilizó este mismo ratón con el objetivo de estudiar la importancia de la vía autofágica en relación al estrés crónico, validó la recombinación mediante inmunohistoquímica encontrando que la mayoría de las células Sox2⁺ de la SGZ no expresaban ATG7 tras la administración de Tamoxifeno (Jung *et al.*, 2020).

La caracterización de las células GFAP⁺Sox2⁺ con morfología radial de la SGZ en animales adultos y condiciones basales, no mostró diferencias en el número de células y en su proliferación (Ki67⁺) entre los animales tratados con Tamoxifeno o sin tratar. Nuestros resultados apoyan, por tanto, los resultados de Jung y colaboradores donde no encontraron diferencias en las distintas subpoblaciones neurogénicas (células tipo1, tipo 2a, tipo 2b y tipo 3) al comparar los cKO y con los animales control (Jung *et al.*, 2020).

En este mismo trabajo también analizaron las funciones neuronales dependientes de hipocampo sin encontrar diferencias entre los ratones cKO y los control al realizar los test de comportamiento de campo abierto, laberinto elevado, sacarosa, laberinto Y y laberinto de agua de Morris. Además, el análisis del número de autofagosomas y autolisosomas en NSCs y progenitores, tampoco mostró diferencias entre los animales medido con el lentivirus mRFP-EGFP-LC3 regulado bajo el promotor de Nestina, el cual expresa la proteína verde fluorescente sensible a pH fusionada a la proteína roja fluorescente y a LC3 (Jung *et al.*, 2020).

Por otro lado, se realizó una aproximación farmacológica para tratar de incrementar el bloqueo de la vía autofagia-lisosoma en los ratones NesCreER^{T2};Atg7^{F/F}. Se ha descrito que la Cloroquina impide la acidificación de los lisosomas y bloquea el flujo autofágico en músculo, hígado, pulmón y cerebro (Ju *et al.*, 2010; Vodicka *et al.*, 2014; Zois *et al.*, 2011). En concreto en cerebro, el tratamiento con 50mg/Kg intraperitoneal durante 3 días atraviesa la barrera hematoencefálica y es eficaz para incrementar los niveles de Cloroquina en el cerebro. Sin embargo, los niveles de Cloroquina eran variables en las distintas áreas del cerebro (corteza y estriado) y los niveles de LC3II y p62 también fueron variables entre tejidos y forma de preparación de las muestras (Vodicka *et al.*, 2014).

En nuestro trabajo seguimos el protocolo de administración de Cloroquina de Vodicka y colaboradores (Vodicka *et al.*, 2014) y no encontramos diferencias en el número de células madre ni en su estado de activación al comparar los animales tratados con los animales sin tratar. Al no tener una determinación bioquímica o celular que demuestre que el tratamiento con Cloroquina ha tenido efecto, no podemos asegurar que el tratamiento haya funcionado. Por tanto, sería necesario validar que

funciona en nuestras manos mediante el análisis de los niveles de p62 y LC3II presentes en el cerebro o de los metabolitos de Cloroquina presentes en el tejido.

Quisimos evaluar el papel de la autofagia en una condición pro-neurogénica como es el ejercicio voluntario en ratones cKO NesCreER^{T2};Atg7^{F/F}, para analizar si el bloqueo de la vía tiene algún efecto en condiciones más exigentes en las que se promueve la activación de las NSCs quiescentes de la SGZ adulta (Suh *et al.*, 2007). Se ha demostrado que practicar ejercicio de forma regular aumenta la masa muscular, reduce los niveles de grasa corporal y el peso (Takeshita *et al.*, 2012). Nuestros resultados mostraron que el ejercicio voluntario con una rueda durante dos semanas redujo el peso de los ratones. La reducción fue más acentuada en los ratones tratados con Tamoxifeno; sin embargo, la interacción que pueda haber entre la pérdida de peso y el bloqueo de la autofagia en las células madre no está clara y sería necesario profundizar para determinar si realmente hay tal interacción o si es debida a cierta toxicidad u otros efectos causados por el Tamoxifeno *per se*.

El análisis de la proliferación y número de células madre en los animales NesCreER^{T2};Atg7^{F/F} muestra un incremento de la proliferación medida con Ki67 de las células madre radiales GFAP+Sox2⁺ de la SGZ después de que los ratones tuvieran acceso a ejercicio voluntario durante dos semanas y una disminución en el número total de células madre radiales. Trabajos anteriores describen un incremento de la proliferación medido con BrdU a 12 días de comenzar con el ejercicio voluntario asociado a un incremento de la neurogénesis (van Praag *et al.*, 1999). En un primer trabajo se asoció ese incremento de la proliferación a las células tipo 2a y 2b (Kronenberg *et al.*, 2003) en vez de a las tipo 1 o radiales que son las que hemos analizado en este trabajo. La diferencia entre los dos trabajos reside en el tiempo que los ratones han estado corriendo y en el tipo de señal analizada. En nuestro trabajo los animales estuvieron corriendo durante dos semanas mientras que en el de Kronenberg y colaboradores lo hicieron durante cuatro semanas y analizaron la incorporación de una única dosis de BrdU 24 horas después de la administración. Una explicación podría ser que el bajo número de células marcadas no les permitiera ver una diferencia significativa en los niveles de proliferación de las células madre radiales. Que nosotros viéramos una diferencia podría ser debido a los distintos marcadores utilizados. Mientras que BrdU únicamente marca células que se encuentran en fase S en el momento de la administración de BrdU, Ki67 marca células en todas las fases del ciclo celular excepto G0 marcando por tanto mayor número de células (Kee *et al.*, 2002). En un trabajo posterior, sí que describieron una mayor proliferación de las células madre radiales al analizar la incorporación de BrdU administrada durante 7 días consecutivos a los animales (una dosis/día) y la expresión de Ki67 en animales que corrieron durante 8 días (Suh *et al.*, 2007). Sin embargo, en este trabajo no observaron cambios en el número total de células madre radiales, sugiriendo que el aumento de la proliferación de las células tipo 1 promueve las divisiones asimétricas que mantendrían la población de células madre a la vez que promueve la neurogénesis (Suh *et al.*, 2007).

Nuestros datos, al contrario de lo publicado hasta el momento, sugieren que hay un agotamiento de las células madre después del ejercicio voluntario, al menos al tiempo del análisis, siendo además un efecto notablemente más marcado en los animales carentes del gen *Atg7* en las células madre, aunque la diferencia no llega a ser estadísticamente significativa. Sería interesante completar el estudio y evaluar si la falta de *Atg7* impide el retorno de las NSCs activas a una quiescencia *shallow* y por este motivo causa un agotamiento más acusado. Está ampliamente descrito que correr aumenta la neurogénesis hipocampal, lo que se correlaciona con una mejora las funciones cognitivas dependientes de hipocampo (Creer *et al.*, 2010; Kohman *et al.*, 2012; O'Callaghan *et al.*, 2007). Por tanto, sería

interesante determinar el posible efecto de la delección de *Atg7* en la neurogénesis más tardía a nivel de formación de nuevas neuronas así como en las funciones cognitivas asociadas a hipocampo.

Por otro lado, el tratamiento con Metformina no parece causar ningún cambio en la activación y número de NSCs de la SGZ adulta. En muestras de cerebro, se había corroborado que el tratamiento durante 8 semanas con Metformina 12mM en agua de bebida produce una activación de AMPK (Berthier *et al.*, 2016). En nuestro trabajo comprobamos la funcionalidad del mismo tratamiento mediante el análisis de la fosforilación activadora de AMPK en la Thr172 en muestras de hígado corroborando que producía la activación de AMPK. Además, observamos un cambio en el peso de los animales, sugiriendo que el tratamiento había funcionado. Se ha descrito que el tratamiento con Metformina reduce la ganancia de peso en dietas ricas en grasa (Matsui *et al.*, 2010), sin embargo nuestros ratones fueron alimentados con una dieta estándar. En un trabajo publicado no encontraron diferencias en el peso de ratones tratados con Metformina con una dieta estándar (Algire *et al.*, 2008), pero la dosis de Metformina administrada era mucho menor que la que nosotros utilizamos en nuestro trabajo, por lo que podría ser una explicación para los resultados divergentes. A nivel de células madre, no observamos cambios en las RGLs de la SGZ de los animales tratados. Sin embargo, trabajos anteriores habían mostrado que la Metformina promueve la proliferación y la diferenciación neuronal de las células madre (Jiang y Liu, 2020). En concreto, el tratamiento intraperitoneal con 200mg/kg de Metformina durante 7 días incrementaba la proliferación tanto en SVZ como en la SGZ sugiriendo que promueve la proliferación, autorrenovación y diferenciación neuronal (Fatt *et al.*, 2015). Sería necesario, por tanto, analizar más animales para verificar que con nuestro tratamiento no produce efecto en las NSCs. Además, sería conveniente evaluar los niveles de LC3II o p62 en el hipocampo para corroborar que el tratamiento estaba activando la autofagia *in vivo*.

Nuestros resultados *in vivo* en la etapa posnatal, sugieren que la autofagia tiene un papel distinto al que tiene en la etapa adulta. Nuestros datos muestran que hay una disminución del número de RGLs durante la tercera semana posnatal y que una parte de esta población continúa entrando en quiescencia, pasando de un 20% de proliferación a P14 a un 10% a P21. Las células madre del nicho hipocampal presentan su pico máximo de proliferación medida con el marcador de proliferación MCM2 a P3. A partir de ese momento, comienza la entrada en quiescencia, y los niveles de proliferación se reducen, pasando de un 100% de proliferación entre E12,5 y P3, a 55% a P7, y a 30% a P14 (Berg *et al.*, 2019). Otros trabajos describen un 30% de proliferación a P7 en células en NSCs y progenitores de la SGZ (Noguchi *et al.*, 2019) y un 10% P15 utilizando el marcador de proliferación Ki67+ (Harris *et al.*, 2021). Nuestros datos se encontrarían en un término medio al indicar que a P14 el 20% de las células madre serían positivas para el marcador de proliferación Ki67. La diferencia con los datos de Berg y colaboradores puede ser explicada en base a los distintos marcadores de proliferación utilizados en los ensayos. Ki67 es un marcador de proliferación que permite identificar células que se encuentran en fase G1 tardía, G2, S y fase M. Por el contrario, MCM2 es un marcador que permite identificar células positivas para cualquier fase del ciclo celular y además es más estable y persiste durante 72h en células que ya han salido del ciclo celular, siendo, por tanto, más sensible (Harris *et al.*, 2021; Joshi *et al.*, 2015).

Berg y colaboradores (Berg *et al.*, 2019) describen que únicamente el 2,5% de las células madre que adquieren la marca de BrdU tras una administración intraperitoneal a P14 retienen la marca día 30. En cambio, Harris y colaboradores indican que el 100% de las células que proliferan a P14 continúan haciéndolo 48h, sugiriendo que esa población de células termina agotándose. Aunque también indican que esa dinámica va cambiando con la edad y conforme los animales envejecen aumenta el porcentaje

de células que se activan y después vuelven a quiescencia (Harris *et al.*, 2021). Por el contrario, nuestros datos con BrdU apoyan la idea de que durante la tercera semana posnatal todavía una parte de la población entra en quiescencia, ya que aproximadamente el 15% de las células madre marcadas con BrdU a P13 mantiene la marca de BrdU a día 21. Este porcentaje podría reducirse en caso de analizar los animales a día 30.

En cuanto a la reducción en número de RGLs, pasa aproximadamente a la mitad en una semana (de P14 a P21), una tasa de bajada bastante superior a la descrita para animales adultos jóvenes. Por ejemplo, según Harris y colaboradores el número de NSCs del giro dentado baja a algo menos de la mitad entre P15 y 2 meses. Posteriormente, el agotamiento se ralentiza y se desacopla de la proliferación, en parte porque aumenta el retorno a quiescencia de las NSCs que se activan (Harris *et al.*, 2021).

La administración de Tamoxifeno a ratones NesCreER^{T2};Atg7^{F/F} posnatales no nuestra efecto en el número total de RGLs analizado a día P21 en comparación con los animales tratados con aceite como control. Tampoco se observan cambios en el número de RGLs quiescentes entre ambos grupos. Sin embargo, observamos un cambio en el estado de activación de estas células y en su dinámica. Para analizarlo utilizamos la combinación de marcadores de BrdU (administrada a P13) y Ki67 (analizado a P21), lo que nos permite evaluar el estado de activación de las NSCs que estaban proliferando a día 13 (cuando se administró la BrdU) y la activación en el momento del sacrificio a P21. Por un lado, encontramos un incremento en el número de RGLs Ki67⁺ y, por otro lado, una disminución en el número de células madre que adquirieron la marca de BrdU. Curiosamente, a P21 las RGLs BrdU⁺ son todas negativas para Ki67, es decir, están fuera de ciclo. La disminución de las RGLs BrdU⁺ en los cKO podría explicarse por un agotamiento de las NSCs activas, que continuarían proliferando hasta deplecionarse por diferenciación a astrocito o neurona (Encinas *et al.*, 2011; Pilz *et al.*, 2018), sin entrar en quiescencia (Figura D3).

Por otro lado, a P21 todas las RGLs Ki67⁺ fueron negativas para BrdU. El aumento observado en los niveles de RGLs Ki67⁺ en los cKOs podría deberse a la activación de las células madre que ya estaban quiescentes antes de día P13 (y por tanto no incorporaron BrdU, siendo BrdU⁻) y/o también a un bloqueo en la entrada en quiescencia de las células madre que estaban activas a día 13 y que por sucesivas rondas de división habrían perdido la marca de BrdU (Figura D3). Sin embargo, esta última hipótesis es menos probable y no pudimos testarla debido a la imposibilidad de identificar células doble positivas para Ki67 y BrdU, probablemente debido a los tiempos utilizados para el análisis. Sin embargo, en animales adultos, se ha observado que la marca de CldU (análogo de la timidina que se incorpora en fase S) persiste en células Nestina⁺ 120 horas después de la administración y tras 4 rondas de división (Encinas *et al.*, 2011). Por lo que, de ser así en la etapa posnatal, sería esperable encontrar células que fueran positivas tanto para BrdU como para Ki67. Por ello, un nuevo experimento en el que se reduzca el tiempo entre la administración de BrdU y el análisis, podría servir para tratar de dilucidar si el incremento en células Ki67 también se debe a un bloqueo de la entrada en quiescencia.

Otros trabajos previos han analizado el fenotipo de animales deficientes en genes relacionados con la autofagia en el giro dentado posnatal. La delección de FIP200 (proteína esencial que forma parte del complejo de inducción de la autofagia ULK1) utilizando un ratón cKO que expresa Cre no inducible bajo el promotor de GFAP, reduce el número de NSCs y por el contrario se incrementan los astrocitos que se localizan en la SGZ a día P28. Estos defectos se deben a un incremento en los niveles de estrés

oxidativo, que son parcialmente reversibles con el antioxidante acetilcisteína o el doble mutante FIP200/p53. (Wang *et al.*, 2013).

Por tanto, sería interesante evaluar cómo afecta el incremento de la proliferación observado a 21 días en animales NesCreER^{T2}:Atg7^{F/F} al mantenimiento de las células madre a largo plazo y a los procesos de astrogliogénesis y de neurogénesis, comprobando si las neuronas se forman y se integran en los circuitos hipocampales correctamente. En los últimos años ha existido gran controversia sobre qué sucede cuando una NSC quiescente de la SGZ adulta se activa, si termina agotándose tras varias rondas de división o si por el contrario tiene capacidad de autorrenovación a largo plazo (Bonaguidi *et al.*, 2011; Encinas *et al.*, 2011; Pilz *et al.*, 2018; Urbán *et al.*, 2016). Además, recientemente se ha descrito que la heterogeneidad de la población de células madre permite que una población de células madre Gli1⁺ se autorrenueven a largo plazo, mientras que las Ascl1⁺ una vez activadas se diferencian terminalmente en unas semanas (Bottes *et al.*, 2021). Nuestros datos muestran que la autofagia está implicada en el establecimiento y mantenimiento de las RGLs, por lo que sería interesante investigar la heterogeneidad de la población de NSCs y si los efectos se deben al estrés oxidativo como sucede al deletar FIP200 (Wang *et al.*, 2013).

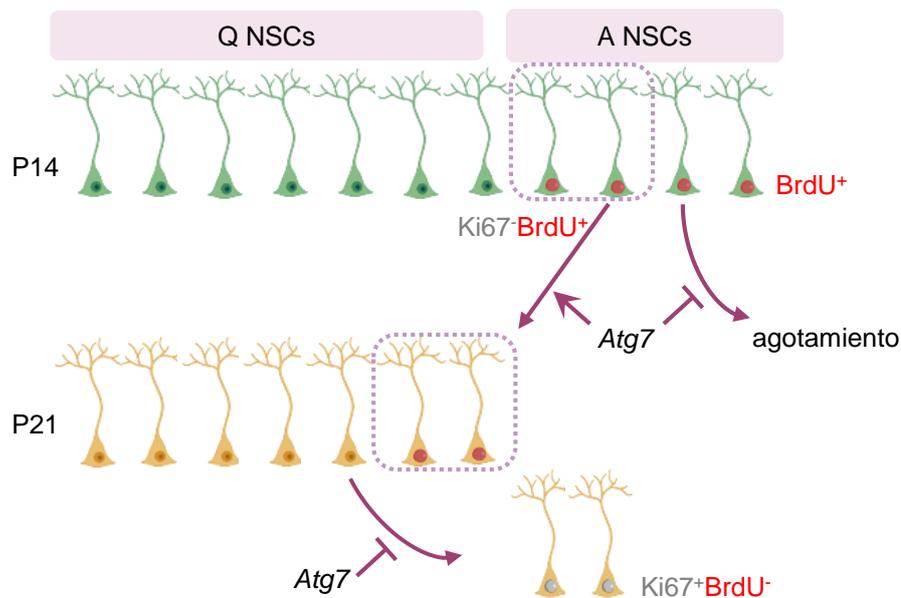


Figura D3: Gráfico resumen del modelo propuesto

El gen *Atg7*, y por ende la autofagia, regula la quiescencia de las NSCs durante la etapa posnatal. Por un lado promueve la entrada en quiescencia de las NSCs y por otro lado mantiene la población de células madre al impedir su agotamiento y reactivación.

CONCLUSIONES

Conclusiones

1. Las NSCs quiescentes *in vitro* muestran una reducción de la expresión de genes relacionados con la traducción en comparación con las NSCs activas. Además, a nivel de proteína se observa de una reducción en la eficiencia del inicio de la traducción. El análisis de la incorporación de OPPuro corroboró la reducción de la síntesis proteica de las NSCs quiescentes *in vitro*.
2. A pesar de la reducción en la síntesis proteica, las NSCs quiescentes mostraron un incremento en el contenido proteico y una acumulación de agregados proteicos transitorios, que desaparecían cuando se revertía el estado de quiescencia y las NSCs entraban nuevamente en el ciclo celular.
3. El análisis de las principales vías de degradación de proteínas en cultivos de NSCs indicó que las NSCs quiescentes tienen un enriquecimiento en la expresión de genes de la vía autofagia-lisosoma en comparación con las NSCs activas. Muestran de manera basal un incremento de la maquinaria autofágica determinada mediante la acumulación de los marcadores LC3II y p62.
4. La activación de AMPK y su diana ULK1 apuntan a un incremento en inducción de la autofagia en los cultivos de NSCs quiescentes. Sin embargo, el flujo autofágico es similar entre NSCs activas y quiescentes.
5. Experimentos funcionales en cultivos de NSCs de activación/inhibición farmacológica de la vía autofagia-lisosoma con Fenformina/Bafilomicina A1, respectivamente, indican que la autofagia podría controlar la entrada y salida de quiescencia.
6. La aproximación al *in vivo* mediante el aislamiento magnético de las NSCs y astrocitos del hipocampo en base al marcador GLAST corrobora la reducción de la traducción y la acumulación de agregados proteicos observada en las NSCs *in vitro*. La acumulación de agregados además se incrementó con el envejecimiento.

7. *In vivo* durante la tercera semana posnatal, las NSCs radiales de la SGZ continúan entrando en quiescencia. Los estudios con animales en los que se delecionó el gen de autofagia *Atg7* en las NSCs demuestran que la autofagia es esencial en este periodo para el correcto establecimiento de la quiescencia, probablemente favoreciendo la entrada en quiescencia e impidiendo que las NSCs que ya se encuentran quiescentes se activen.

8. En animales adultos la autofagia no parece ser esencial para el mantenimiento de la quiescencia de las NSCs del nicho neurogénico hipocampal, sin embargo, en condiciones pro-neurogénicas como es el ejercicio físico voluntario parece estar implicada en el mantenimiento de la población de NSCs.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, A., Rubio, Maria E., y Gallo, V. (2010). Notch and EGFR pathway interaction regulates neural stem cell number and self-renewal. *Nature*, 467(7313), 323-327. doi:10.1038/NATURE09347
- Algire, C., Zakikhani, M., Blouin, MJ., Shuai, JH. y Pollak, M. (2008). Metformin attenuates the stimulatory effect of a high-energy diet on in vivo LLC1 carcinoma growth. *Endocrine-Related Cancer*, 15(3), 833-839. doi:10.1677/ERC-08-0038
- Altman, J., y Das, GD. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *The Journal of Comparative Neurology*, 124(3), 319-335. doi:10.1002/cne.901240303
- Altman, J., y Das, GD. (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. *The Journal of Comparative Neurology*, 126(3), 337-389. doi:10.1002/cne.901260302
- Altman, J., y Das, GD. (1967). Postnatal Neurogenesis in the Guinea-pig. *Nature*, 214(5093), 1098-1101. doi:10.1038/2141098a0
- Aman, Y., Schmauck-Medina, T., Hansen, M., Morimoto, RI., Simon, AK., Bjedov, I., ... y Fang, E.F. (2021). Autophagy in healthy aging and disease. *Nature Aging*, 1(8), 634-650. doi:10.1038/s43587-021-00098-4
- Andreu, Z., Khan, MA., González-Gómez, P., Negueruela, S., Hortigüela, R., San Emeterio, J., ... Mira, H. (2015). The Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p27kip1 Regulates Radial Stem Cell Quiescence and Neurogenesis in the Adult Hippocampus. *Stem Cells*, 33(1), 219-229. doi:10.1002/STEM.1832
- Angevine, JB., y Sidman, RL. (1961). Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature*, 192(4804), 766-768. doi:10.1038/192766B0
- Arstila, AU., y Trump, BF. (1968). Studies on cellular autophagocytosis. The formation of autophagic vacuoles in the liver after glucagon administration. *The American Journal of Pathology*, 53(5), 687-733.
- Audesse, AJ., Dhakal, S., Hassell, L., Gardell, Z., Nemtsova, Y., y Webb, AE. (2019). FOXO3 directly regulates an autophagy network to functionally regulate proteostasis in adult neural stem cells. *PLoS Genetics*, 15(4), e1008097. doi:10.1371/journal.pgen.1008097
- Bakker, A., Kirwan, CB., Miller, M., y Stark, CE. (2008). Pattern separation in the human hippocampal CA3 and dentate gyrus. *Science (New York, N.Y.)*, 319(5870), 1640-1642. doi:10.1126/SCIENCE.1152882
- Barry, G., Piper, M., Lindwall, C., Moldrich, R., Mason, S., Little, E., ... y Richardse, LJ. (2008). Specific Glial Populations Regulate Hippocampal Morphogenesis. *Journal of Neuroscience*, 28(47), 12328-12340. doi:10.1523/JNEUROSCI.4000-08.2008
- Baser, A., Skabkin, M., Kleber, S., Dang, Y., Gülcüler Balta, GS., Kalamakis, G., ... y Martin-Villalba, A. (2019). Onset of differentiation is post-transcriptionally controlled in adult neural stem cells. *Nature*, 566(7742), 100-104. doi:10.1038/s41586-019-0888-x
- Baser, A., Skabkin, M., y Martin-Villalba, A. (2017). Neural Stem Cell Activation and the Role of Protein Synthesis. *Brain Plasticity (Amsterdam, Netherlands)*, 3(1), 27-41. doi:10.3233/BPL-160038

- Basu, J., y Siegelbaum, SA. (2015). The Corticohippocampal Circuit, Synaptic Plasticity, and Memory. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(11). doi:10.1101/CSHPERSPECT.A021733
- Bátiz, LF., Castro, MA., Burgos, PV., Velásquez, ZD., Muñoz, RI., Lafourcade, CA., ... y Wyneken, U. (2015). Exosomes as Novel Regulators of Adult Neurogenic Niches. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, 501. doi:10.3389/fncel.2015.00501
- Bayer, SA., Yackel, JW., y Puri, PS. (1982). Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life. *Science (New York, N.Y.)*, 216(4548), 890-892. doi:10.1126/science.7079742
- Berg, DA., Su, Y., Jimenez-Cyrus, D., Patel, A., Huang, N., Morizet, D., ... y Bond, AM. (2019). A Common Embryonic Origin of Stem Cells Drives Developmental and Adult Neurogenesis. *Cell*, 177(3), 654-668.e15. doi:10.1016/j.cell.2019.02.010
- Berthier, A., Payá, M., García-Cabrero, AM., Ballester, MI., Heredia, M., Serratosa, JM., ... y Sanz, P. (2016). Pharmacological interventions to ameliorate neuropathological symptoms in a mouse model of Lafora disease. *Molecular neurobiology*, 53(2), 1296. doi:10.1007/S12035-015-9091-8
- Bjornsson, CS., Apostolopoulou, M., Tian, Y., y Temple, S. (2015). It takes a village: constructing the neurogenic niche. *Developmental cell*, 32(4), 435-446. doi:10.1016/J.DEVCEL.2015.01.010
- Blomfield, IM., Rocamonde, B., del Mar Masdeu, M., Mulugeta, E., Vaga, S., van den Berg, DL., ... y Urbán, N. (2019). Id4 promotes the elimination of the pro-activation factor ascl1 to maintain quiescence of adult hippocampal stem cells. *eLife*, 8. doi:10.7554/ELIFE.48561
- Boareto, M., Iber, D., y Taylor, V. (2017). Differential interactions between Notch and ID factors control neurogenesis by modulating Hes factor autoregulation. *Development*, 144(19), 3465-3474. doi:10.1242/DEV.152520
- Boldrini, M., Fulmore, CA., Tartt, AN., Simeon, LR., Pavlova, I., Poposka, V., ... y Mann, JJ. (2018). Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. *Cell Stem Cell*, 22(4), 589-599.e5. doi:https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.03.015
- Bonaguidi, MA., Peng, CY., McGuire, T., Falciglia, G., Gobeske, KT., Czeisler, C., y Kessler, JA. (2008). Noggin Expands Neural Stem Cells in the Adult Hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 28(37), 9194-9204. doi:10.1523/JNEUROSCI.3314-07.2008
- Bonaguidi, MA., Wheeler, MA., Shapiro, JS., Stadel, RP., Sun, GJ., Ming, GL., y Song, H. (2011). In vivo clonal analysis reveals self-renewing and multipotent adult neural stem cell characteristics. *Cell*, 145(7), 1142-1155. doi:10.1016/j.cell.2011.05.024
- Bond, AM., Berg, DA., Lee, S., Garcia-Epelboim, AS., Adusumilli, VS., Ming, GL, y Song, H. (2020). Differential Timing and Coordination of Neurogenesis and Astrogenesis in Developing Mouse Hippocampal Subregions. *Brain Sciences*, 10(12), 1-14. doi:10.3390/BRAINSCI10120909
- Bond, AM., Ming, GL, y Song, H. (2021). Ontogeny of adult neural stem cells in the mammalian brain. *Current Topics in Developmental Biology*, 142, 67-98. doi:10.1016/BS.CTDB.2020.11.002
- Bond, AM., Peng, CY., Meyers, EA., McGuire, T., Ewaleifoh, O., y Kessler, JA. (2014). BMP signaling regulates the tempo of adult hippocampal progenitor maturation at multiple stages of the lineage. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 32(8), 2201-2214. doi:10.1002/STEM.1688

- Bottes, S., Jaeger, BN., Pilz, GA., Jörg, DJ., Cole, JD., Kruse, M., ... y Jessberger, S. (2021). Long-term self-renewing stem cells in the adult mouse hippocampus identified by intravital imaging. *Nature Neuroscience*, 24(2), 225-233. doi:10.1038/s41593-020-00759-4
- Buttgereit, F., y Brand, MD. (1995). A hierarchy of ATP-consuming processes in mammalian cells. *The Biochemical journal*, 312 (Pt 1)(Pt 1), 163-167. doi:10.1042/BJ3120163
- Cameron, HA., Woolley, CS., McEwen, BS., y Gould, E. (1993). Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience*, 56(2), 337-344. doi:10.1016/0306-4522(93)90335-d
- Caramello, A., Galichet, C., Rizzoti, K., y Lovell-Badge, R. (2021). Dentate gyrus development requires a cortical hem-derived astrocytic scaffold. *ELife*, 10. doi:10.7554/eLife.63904
- Caronia-Brown, G., Yoshida, M., Gulden, F., Assimacopoulos, S., y Grove, EA. (2014). The cortical hem regulates the size and patterning of neocortex. *Development*, 141(14), 2855-2865. doi:10.1242/DEV.106914
- Caronia, G., Wilcoxon, J., Feldman, P., y Grove, EA. (2010). Bone Morphogenetic Protein Signaling in the Developing Telencephalon Controls Formation of the Hippocampal Dentate Gyrus and Modifies Fear-Related Behavior. *Journal of Neuroscience*, 30(18), 6291-6301. doi:10.1523/JNEUROSCI.0550-10.2010
- Casares-Crespo, L., Calatayud-Baselga, I, García-Corzo, L., y Mira, H. (2018). On the Role of Basal Autophagy in Adult Neural Stem Cells and Neurogenesis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 339. doi:10.3389/fncel.2018.00339
- Castro, DS., Martynoga, B., Parras, C., Ramesh, V., Pacary, E., Johnston, C., ... y Guillemot, F. (2011). A novel function of the proneural factor *Ascl1* in progenitor proliferation identified by genome-wide characterization of its targets. *Genes & Development*, 25(9), 930. doi:10.1101/GAD.627811
- Choe, Y., Pleasure, SJ., y Mira, H. (2015). Control of Adult Neurogenesis by Short-Range Morphogenic-Signaling Molecules. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(3), a018887. doi:10.1101/cshperspect.a018887
- Choi, JS., Lee, JH., Kim, HY., Chun, MH., Chung, JW., y Lee, MY. (2006). Developmental expression of *Bis* protein in the cerebral cortex and hippocampus of rats. *Brain Research*, 1092(1), 69-78. doi:10.1016/J.BRAINRES.2006.02.137
- Chung, H., Choi, J., y Park, S. (2018). Ghrelin protects adult rat hippocampal neural stem cells from excessive autophagy during oxygen-glucose deprivation. *Endocrine Journal*, 65(1), 63-73. doi:10.1507/endocrj.EJ17-0281
- Chung, KM., Park, H., Jung, S., Ha, S., Yoo, SJ., Woo, H. ... y Yu, SW. (2015). Calpain Determines the Propensity of Adult Hippocampal Neural Stem Cells to Autophagic Cell Death Following Insulin Withdrawal. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 33(10), 3052-3064. doi:10.1002/stem.2082
- Cochard, LM., Levros, LC., Joppé, SE., Pratesi, F., Aumont, A., y Fernandes, KJ. (2021). Manipulation of EGFR-Induced Signaling for the Recruitment of Quiescent Neural Stem Cells in the Adult Mouse Forebrain. *Frontiers in Neuroscience*, 15, 621076. doi:10.3389/fnins.2021.621076
- Codega, P., Silva-Vargas, V., Paul, A., Maldonado-Soto, AR., DeLeo, AM., Pastrana, E., y Doetsch, F. (2014). Prospective identification and purification of quiescent adult neural stem cells from their

in vivo niche. *Neuron*, 82(3), 545-559. doi:10.1016/J.NEURON.2014.02.039

Collier, JJ., Suomi, F., Oláhová, M., McWilliams, TG., y Taylor, RW. (2021). Emerging roles of ATG7 in human health and disease. *EMBO Molecular Medicine*, 13(12), e14824. doi:10.15252/EMMM.202114824

Colucci-D'Amato, L., Bonavita, V., y di Porzio, U. (2006). The end of the central dogma of neurobiology: stem cells and neurogenesis in adult CNS. *Neurological Sciences: Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*, 27(4), 266-270. doi:10.1007/s10072-006-0682-z

Craig, CG., Tropepe, V., Morshead, CM., Reynolds, BA., Weiss, S., y Van Der Kooy, D. (1996). In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain. *The Journal of Neuroscience*, 16(8), 2649. doi:10.1523/JNEUROSCI.16-08-02649.1996

Creer, DJ., Romberg, C., Saksida, LM., Van Praag, H., y Bussey, TJ. (2010). Running enhances spatial pattern separation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(5), 2367-2372. doi:10.1073/PNAS.0911725107

D'Arcangelo, G., Miao, GG., Chen, SC., Scares, HD., Morgan, JL., y Curran, T. (1995). A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature* 1995 374:6524, 374(6524), 719-723. doi:10.1038/374719a0

De Duve, C., De Reuck, A., y Cameron, M. (1963). *Ciba Foundation Symposium: Lysosomes*. Boston, Mass.: Little, Brown.

De Duve, C., Pressman, BC., Gianetto, R., Wattiaux, R., y Appelmans, F. (1955). Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *The Biochemical Journal*, 60(4), 604-617. doi:10.1042/bj0600604

Dennis, CV., Suh, LS., Rodriguez, ML., Kril, JJ., y Sutherland, GT. (2016). Human adult neurogenesis across the ages: An immunohistochemical study. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 42(7), 621-638. doi:10.1111/nan.12337

Denoth-Lippuner, A., y Jessberger, S. (2021). Formation and integration of new neurons in the adult hippocampus. *Nature Reviews Neuroscience* 2021 22:4, 22(4), 223-236. doi:10.1038/s41583-021-00433-z

Doetsch, F., Petreanu, L., Caille, I., Garcia-Verdugo, JM., y Alvarez-Buylla, A. (2002). EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron*, 36(6), 1021-1034. doi:10.1016/S0896-6273(02)01133-9

Dossou, AS., y Basu, A. (2019). The Emerging Roles of mTORC1 in Macromanaging Autophagy. *Cancers*, 11(10). doi:10.3390/cancers11101422

Dubinsky, AN., Dastidar, SG., Hsu, CL., Zahra, R., Djakovic, SN., Duarte, S., ... y La Spada, AR. (2014). Let-7 coordinately suppresses components of the amino acid sensing pathway to repress mTORC1 and induce autophagy. *Cell Metabolism*, 20(4), 626-638. doi:10.1016/j.cmet.2014.09.001

Dumit, VI., y Dengiel, J. (2012). Autophagosomal protein dynamics and influenza virus infection. *Frontiers in Immunology*, 3, 43. doi:10.3389/fimmu.2012.00043

- Eadie, D., Redila, VA., y Christie, BR. (2005). Voluntary exercise alters the cytoarchitecture of the adult dentate gyrus by increasing cellular proliferation, dendritic complexity, and spine density. *The Journal of Comparative Neurology*, 486(1), 39-47. doi:10.1002/cne.20493
- Encinas, JM., Michurina, TV., Peunova, N., Park, JH., Tordo, J., Peterson, DA., ... y Enikolopov, G. (2011). Division-coupled astrocytic differentiation and age-related depletion of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell*, 8(5), 566-579. doi:10.1016/j.stem.2011.03.010
- Eden, E., Geva-Zatorsky, N., Issaeva, I., Cohen, A., Dekel E., Danon, T., ... y Alon, U. (2011). Proteome Half-Life Dynamics in Living Human Cells. *Science*, 331(6018), 764-768. doi:10.1126/science.1199784
- Eriksson, PS., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, AM., Nordborg, C., Peterson, DA., y Gage, FH. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Medicine*, 4(11), 1313-1317. doi:10.1038/3305
- Fan, X., Haiwei, X., Cai, W., Yang, Z., y Zhang, J. (2003). Spatial and temporal patterns of expression of Noggin and BMP4 in embryonic and postnatal rat hippocampus. *Developmental Brain Research*, 146(1-2), 51-58. doi:10.1016/J.DEVBRAINRES.2003.09.007
- Fatt, M., Hsu, K., He, L., Wondisford, F., Miller, FD., Kaplan, DR., y Wang, J. (2015). Metformin Acts on Two Different Molecular Pathways to Enhance Adult Neural Precursor Proliferation/Self-Renewal and Differentiation. *Stem Cell Reports*, 5(6), 988. doi:10.1016/J.STEMCR.2015.10.014
- Friedrichs, M., Wirsdörfer, F., Flohé, SB., Schneider, S., Wuelling, M., y Vortkamp, A. (2011). BMP signaling balances proliferation and differentiation of muscle satellite cell descendants. *BMC Cell Biology*, 12(1), 1-17. doi:10.1186/1471-2121-12-26/FIGURES/10
- Frotscher, M., Haas, CA., y Förster, E. (2003). Reelin Controls Granule Cell Migration in the Dentate Gyrus by Acting on the Radial Glial Scaffold. *Cerebral Cortex*, 13(6), 634-640. doi:10.1093/CERCOR/13.6.634
- Fuentealba, LC., Rompani, SB., Parraguez, JI., Obernier, K., Romero, R., Cepko, CL., y Alvarez-Buylla, A. (2015). Embryonic Origin of Postnatal Neural Stem Cells. *Cell*, 161(7), 1644-1655. doi:10.1016/j.cell.2015.05.041
- Furutachi, S., Miya, H., Watanabe, T., Kawai, H., Yamasaki, N., Harada, Y., ... y Gotoh, Y. (2015). Slowly dividing neural progenitors are an embryonic origin of adult neural stem cells. *Nature Neuroscience* 2015 18:5, 18(5), 657-665. doi:10.1038/nn.3989
- García-Prat, L., Martínez-Vicente, M., Perdiguero, E., Ortet, L., Rodríguez-Ubreva, J., Rebollo, E., ... Muñoz-Cánoves, P. (2016). Autophagy maintains stemness by preventing senescence. *Nature*, 529(7584), 37-42. doi:10.1038/nature16187
- Gatica, D., Lahiri, V., y Klionsky, DJ. (2018). Cargo recognition and degradation by selective autophagy. *Nature Cell Biology*, 20(3), 233-242. doi:10.1038/s41556-018-0037-z
- Gebara, E., Bonaguidi, MA., Beckervordersandforth, R., Sultan, S., Udry, F., Gijs, PJ., ... y Toni, N. (2016). Heterogeneity of Radial Glia-Like Cells in the Adult Hippocampus. *STEM CELLS*, 34(4), 997-1010. doi:10.1002/STEM.2266
- Ghosh, HS. (2019). Adult Neurogenesis and the Promise of Adult Neural Stem Cells. *Journal of Experimental Neuroscience*, 13, 1179069519856876. doi:10.1177/1179069519856876

- Gobeske, KT., Das, S., Bonaguidi, MA., Weiss, C., Radulovic, J., Disterhoft, JF., y Kessler, JA. (2009). BMP signaling mediates effects of exercise on hippocampal neurogenesis and cognition in mice. *PLoS one*, 4(10). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0007506
- Goldman, SA., y Nottebohm, F. (1983). Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(8), 2390 LP - 2394. doi:10.1073/pnas.80.8.2390
- Gould, E, McEwen, BS., Tanapat, P., Galea, LA., y Fuchs, E. (1997). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 17(7), 2492-2498. doi:10.1523/JNEUROSCI.17-07-02492.1997
- Gould, E., Beylin, A., Tanapat, P., Reeves, A., y Shors, TJ. (1999). Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nature Neuroscience*, 2(3), 260-265. doi:10.1038/6365
- Ha, S., Jeong, SH., Yi, K., Chu, JJ., Kim, S., Kim, EK., y Yu, SW. (2019). Autophagy Mediates Astrogenesis in Adult Hippocampal Neural Stem Cells. *Experimental Neurobiology*, 28(2), 229-246. doi:10.5607/en.2019.28.2.229
- Ha, S., Jeong, SH., Yi, K., Chung, KM., Hong, CJ., Kim, SW., ... y Yu, SW. (2017). Phosphorylation of p62 by AMP-activated protein kinase mediates autophagic cell death in adult hippocampal neural stem cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 292(33), 13795-13808. doi:10.1074/jbc.M117.780874
- Haas, CA., Dudeck, O., Kirsch, M., Huszka, C., Kann, G., Pollak, S., ... y Frotscher, M. (2002). Role for Reelin in the Development of Granule Cell Dispersion in Temporal Lobe Epilepsy. *Journal of Neuroscience*, 22(14), 5797-5802. doi:10.1523/JNEUROSCI.22-14-05797.2002
- Hao, J., Ho, JN., Lewis, JA., Karim, KA., Daniels, RN, Gentry, PR., ... y Hong, CC. (2010). In Vivo Structure Activity Relationship Study of Dorsomorphin Analogs Identifies Selective VEGF and BMP Inhibitors. *ACS chemical biology*, 5(2), 245. doi:10.1021/CB9002865
- Hardie, DG., y Carling, D. (1997). The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? *European Journal of Biochemistry*, 246(2), 259-273. doi:10.1111/j.1432-1033.1997.00259.x
- Harris, L., Rigo, P., Stiehl, T., Gaber, ZB., Austin, SH., del Mar Masdeu, M., ... Guillemot, F. (2021). Coordinated changes in cellular behavior ensure the lifelong maintenance of the hippocampal stem cell population. *Cell Stem Cell*, 28(5), 863-876.e6. doi:https://doi.org/10.1016/j.stem.2021.01.003
- Hastings, NB., y Gould, E. (1999). Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells. *The Journal of Comparative Neurology*, 413(1), 146-154. doi:10.1002/(sici)1096-9861(19991011)413:1<146::aid-cne10>3.0.co;2-b
- Heng, YH., Barry, G., Richards, LJ., y Piper, M. (2012). Nuclear Factor I Genes Regulate Neuronal Migration. *Neurosignals*, 20(3), 159-167. doi:10.1159/000330651
- Hershko, A., y Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annual review of biochemistry*, 67, 425-479. doi:10.1146/ANNUREV.BIOCHEM.67.1.425
- Herzig, S., y Shaw, RJ. (2018). AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(2), 121-135. doi:10.1038/nrm.2017.95

- Hikita, H., Sakane, S., y Takehara, T. (2018). Mechanisms of the autophagosome-lysosome fusion step and its relation to non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Research*, 2(3), 120-124. doi:10.1016/J.LIVRES.2018.09.003
- Ho, TT., Warr, MR., Adelman, ER., Lansinger, OM., Flach, J., Verovskaya, EV., ... Passequé, E. (2017). Autophagy maintains the metabolism and function of young and old stem cells. *Nature*, 543(7644), 205-210. doi:10.1038/nature21388
- Hubert, V., Peschel, A., Langer, B., Gröger, M., Rees, A., y Kain, R. (2016). LAMP-2 is required for incorporating syntaxin-17 into autophagosomes and for their fusion with lysosomes. *Biology Open*, 5(10), 1516. doi:10.1242/BIO.018648
- Ibrayeva, A., Bay, M., Pu, E., Jörg, DJ., Peng, L., Jun, H., ... Bonaguidi, MA. (2021). Early stem cell aging in the mature brain. *Cell Stem Cell*, 28(5), 955-966.e7. doi:10.1016/j.stem.2021.03.018
- Imayoshi, I., Ohtsuka, T., Metzger, D., Chambon, P., y Kageyama, R. (2006). Temporal regulation of Cre recombinase activity in neural stem cells. *Genesis (New York, N.Y.: 2000)*, 44(5), 233-238. doi:10.1002/dvg.20212
- Imayoshi, I., Sakamoto, M., Yamaguchi, M., Mori, K., y Kageyama, R. (2010). Essential roles of Notch signaling in maintenance of neural stem cells in developing and adult brains. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(9), 3489-3498. doi:10.1523/JNEUROSCI.4987-09.2010
- Jiang, LL., y Liu, L. (2020). Effect of metformin on stem cells: Molecular mechanism and clinical prospect. *World Journal of Stem Cells*, 12(12), 1455. doi:10.4252/WJSC.V12.I12.1455
- Joppé, SE., Hamilton, LK., Cochard, LM., Levros, LC., Aumont, A., Barnabé-Heider, F., y Fernandes, KJ. (2015). Bone morphogenetic protein dominantly suppresses epidermal growth factor-induced proliferative expansion of adult forebrain neural precursors. *Frontiers in Neuroscience*, 9(OCT), 407. doi:10.3389/FNINS.2015.00407
- Joshi, S., Watkins, J., Gazinska, P., Brown, JP., Gillett, CE., Grigoriadis, A., y Pinder, SE. (2015). Digital imaging in the immunohistochemical evaluation of the proliferation markers Ki67, MCM2 and Geminin, in early breast cancer, and their putative prognostic value. *BMC Cancer*, 15(1). doi:10.1186/S12885-015-1531-3
- Ju, JS., Varadhachary, AS., Miller, SE., y Wehl, CC. (2010). Quantitation of «autophagic flux» in mature skeletal muscle. *Autophagy*, 6(7), 929-935. doi:10.4161/AUTO.6.7.12785
- Jung, S., Choe, S., Woo, H., Jeong, H., An, HK., Moon, H., ... y Yu, SW. (2020). Autophagic death of neural stem cells mediates chronic stress-induced decline of adult hippocampal neurogenesis and cognitive deficits. *Autophagy*, 16(3), 512-530. doi:10.1080/15548627.2019.1630222
- Jurkowski, MP., Bettio, LK., Woo, E., Patten, A., Yau, SYu., y Gil-Mohapel, J. (2020). Beyond the Hippocampus and the SVZ: Adult Neurogenesis Throughout the Brain. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14, 293. doi:10.3389/FNCEL.2020.576444/BIBTEX
- Kaizuka, T., Morishita, H., Hama, Y., Tsukamoto, S., Matsui, T., Toyota, Y., ... y Mizushima, N. (2016). An Autophagic Flux Probe that Releases an Internal Control. *Molecular cell*, 64(4), 835-849. doi:10.1016/J.MOLCEL.2016.09.037
- Kaplan, MS. (1983). Proliferation of subependymal cells in the adult primate CNS: differential uptake of

- DNA labelled precursors. *Journal Fur Hirnforschung*, 24(1), 23-33.
- Kaushik, S., y Cuervo, AM. (2018). The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 19(6), 365-381. doi:10.1038/s41580-018-0001-6
- Kee, N., Sivalingam, S., Boonstra, R., y Wojtowicz, JM. (2002). The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *Journal of Neuroscience Methods*, 115(1), 97-105. doi:10.1016/S0165-0270(02)00007-9
- Kempermann, G., Song, H., y Gage, FH. (2015). Neurogenesis in the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(9), a018812. doi:10.1101/cshperspect.a018812
- Kim, H., Kim, M., Im, SK., y Fang, S. (2018). Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Laboratory Animal Research*, 34(4), 147-159. doi:10.5625/lar.2018.34.4.147
- Kirisits, A., Pils, D., y Krainer, M. (2007). Epidermal growth factor receptor degradation: An alternative view of oncogenic pathways. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(12), 2173-2182. doi:10.1016/J.BIOCEL.2007.07.012
- Klionsky, DJ., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, J., Abeliovich, H., Bartolom, A., ... y Bozhkov, PV. (2016). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition), 12(1), 1-222. doi:10.1080/15548627.2015.1100356
- Knobloch, M., Pilz, GA., Ghesquière, B., Kovacs, WJ., Wegleiter, T., Moore, DL., ... y Jessberger, S. (2017). A Fatty Acid Oxidation-Dependent Metabolic Shift Regulates Adult Neural Stem Cell Activity. *Cell Reports*, 20(9), 2144-2155. doi:10.1016/j.celrep.2017.08.029
- Knoth, Rolf, Singec, Ilyas, Ditter, Margarethe, Pantazis, Georgios, Capetian, Philipp, Meyer, Ralf P., ... Kempermann, Gerd. (2010). Murine features of neurogenesis in the human hippocampus across the lifespan from 0 to 100 years. *PloS one*, 5(1). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0008809
- Kobayashi, T., Piao, W., Takamura, T., Kori, H., Miyachi, H., Kitano, S., ... y Kageyama, R. (2019). Enhanced lysosomal degradation maintains the quiescent state of neural stem cells. *Nature Communications*, 10(1), 2-4. doi:10.1038/s41467-019-13203-4
- Kobielak, K., Stokes, N., De La Cruz, J., Polak, L., y Fuchs, E. (2007). Loss of a quiescent niche but not follicle stem cells in the absence of bone morphogenetic protein signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(24), 10063-10068. doi:10.1073/PNAS.0703004104
- Kohman, RA., Clark, PJ., DeYoung, EK., Bhattacharya, TK., Venghaus, CE., y Rhodes, JS. (2012). Voluntary wheel running enhances contextual but not trace fear conditioning. *Behavioural Brain Research*, 226(1), 1-7. doi:10.1016/J.BBR.2011.08.031
- Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., ... y Tanaka, K. (2006). Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 2006 441:7095, 441(7095), 880-884. doi:10.1038/nature04723
- Komatsu, M., Waguri, S., Ueno, T., Iwata, J., Murata, S., Tanida, I., ... y Chiba, T. (2005). Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *The Journal of Cell Biology*, 169(3), 425-434. doi:10.1083/jcb.200412022
- Koromilas, AE. (2015). Roles of the translation initiation factor eIF2 α serine 51 phosphorylation in

- cancer formation and treatment. *Biochimica et biophysica acta*, 1849(7), 871-880. doi:10.1016/J.BBAGRM.2014.12.007
- Kronenberg, G., Bick-Sander, A., Bunk, E., Wolf, C., Ehninger, D., y Kempermann, G. (2006). Physical exercise prevents age-related decline in precursor cell activity in the mouse dentate gyrus. *Neurobiology of Aging*, 27(10), 1505-1513. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2005.09.016
- Kronenberg, G., Reuter, K., Steiner, B., Brandt, MD., Jessberger, S., Yamaguchi, M., y Kempermann, G. (2003). Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. *Journal of Comparative Neurology*, 467(4), 455-463. doi:10.1002/CNE.10945
- Kuhn, HG., Dickinson-Anson, H., y Gage, FH. (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 16(6), 2027-2033. doi:10.1523/JNEUROSCI.16-06-02027.1996
- Kumar, A., Pareek, V., Faiq, MA., Kumar, P., Kumari, C., Singh, HN., y Ghosh, SK. (2020). Transcriptomic analysis of the signature of neurogenesis in human hippocampus suggests restricted progenitor cell progression post-childhood. *IBRO Reports*, 9, 224-232. doi:10.1016/j.ibror.2020.08.003
- Laplante, M., y Sabatini, DM. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 149(2), 274-293. doi:10.1016/J.CELL.2012.03.017
- Laviola, G., Hannan, AJ., Macrì, S., Solinas, M., y Jaber, M. (2008). Effects of enriched environment on animal models of neurodegenerative diseases and psychiatric disorders. *Neurobiology of Disease*, 31(2), 159-168. doi:10.1016/J.NBD.2008.05.001
- Lee, AR., Kim, JH., Cho, E., Kim, M., y Park, M. (2017). Dorsal and ventral hippocampus differentiate in functional pathways and differentially associate with neurological disease-related genes during postnatal development. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10, 331. doi:10.3389/FNMOL.2017.00331/BIBTEX
- Lee, JW., y Jung, MW. (2017). Separation or binding? Role of the dentate gyrus in hippocampal mnemonic processing. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 75, 183-194. doi:10.1016/J.NEUBIOREV.2017.01.049
- Lee, SL., Lew, D., Wickenheisser, V., y Markus, EJ. (2019). Interdependence between dorsal and ventral hippocampus during spatial navigation. *Brain and Behavior*, 9(10), e01410. doi:10.1002/BRB3.1410
- Leeman, DS., Hebestreit, K., Ruetz, T., Webb, AE., McKay, A., Pollina, EA., ... y Brunet, A. (2018). Lysosome activation clears aggregates and enhances quiescent neural stem cell activation during aging. *Science (New York, N.Y.)*, 359(6381), 1277-1283. doi:10.1126/science.aag3048
- Li, G., Fang, L., Fernández, G., y Pleasure, SJ. (2013). The ventral hippocampus is the embryonic origin for adult neural stem cells in the dentate gyrus. *Neuron*, 78(4), 658-672. doi:10.1016/j.neuron.2013.03.019
- Li, X., He, S., y Ma, B. (2020). Autophagy and autophagy-related proteins in cancer. *Molecular Cancer*, 19(1), 12. doi:10.1186/s12943-020-1138-4
- Lim, DA., y Alvarez-Buylla, A. (2014). Adult neural stem cells stake their ground. *Trends in*

- Neurosciences*, 37(10), 563-571. doi:10.1016/j.tins.2014.08.006
- Lipovka, Y., y Konhilas, JP. (2015). AMP-Activated Protein Kinase Signalling in Cancer and Cardiac Hypertrophy. *Cardiovascular pharmacology: open access*, 4(3). doi:10.4172/2329-6607.1000154
- Livak, KJ., y Schmittgen, TD. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25(4), 402-408. doi:10.1006/METH.2001.1262
- Llorens-Bobadilla, E., Zhao, S., Baser, A., Saiz-Castro, G., Zwadlo, K., y Martin-Villalba, A. (2015). Single-Cell Transcriptomics Reveals a Population of Dormant Neural Stem Cells that Become Activated upon Brain Injury. *Cell stem cell*, 17(3), 329-340. doi:10.1016/J.STEM.2015.07.002
- Lois, C., y Alvarez-Buylla, A. (1993). Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(5), 2074-2077. doi:10.1073/pnas.90.5.2074
- Lois, C., y Alvarez-Buylla, A. (1994). Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science (New York, N.Y.)*, 264(5162), 1145-1148. doi:10.1126/science.8178174
- Loos, B., Du Toit, A., y Hofmeyr, JH. (2014). Defining and measuring autophagosome flux—concept and reality. *Autophagy*, 10(11), 2087. doi:10.4161/15548627.2014.973338
- Lórinicz, P., y Juhász, G. (2020). Autophagosome-Lysosome Fusion. *Journal of Molecular Biology*, 432(8), 2462-2482. doi:10.1016/j.jmb.2019.10.028
- Lutz, BM., Nia, S., Xiong, M., Tao, YX., y Bekker, A. (2015). mTOR, a new potential target for chronic pain and opioid-induced tolerance and hyperalgesia. *Molecular Pain*, 11(1). doi:10.1186/S12990-015-0030-5
- Malka-Mahieu, H., Newman, M., Désaubry, L., Robert, C., y Vagner, S. (2017). Molecular Pathways: The eIF4F Translation Initiation Complex-New Opportunities for Cancer Treatment. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 23(1), 21-25. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2362
- Markakis, EA., y Gage, FH. (1999). Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles. *The Journal of Comparative Neurology*, 406(4), 449-460.
- Martín-Suárez, S., Valero, J., Muro-García, T., y Encinas, JM. (2019). Phenotypical and functional heterogeneity of neural stem cells in the aged hippocampus. *Aging cell*, 18(4). doi:10.1111/ACEL.12958
- Martínez-Cerdeño, V., y Noctor, SC. (2018). Neural Progenitor Cell Terminology. *Frontiers in Neuroanatomy*, 12, 104. doi:10.3389/fnana.2018.00104
- Martynoga, B., Mateo, JL., Zhou, B., Andersen, J., Achimastou, A., Urbán, N., ... y Guillemot, F. (2013). Epigenomic enhancer annotation reveals a key role for NFIX in neural stem cell quiescence. *Genes & Development*, 27(16), 1769. doi:10.1101/GAD.216804.113
- Mathews, EA., Morgenstern, NA., Piatti, VC., Zhao, C., Jessberger, S., Schinder, AF., y Gage, FH. (2010). A distinctive layering pattern of mouse dentate granule cells is generated by developmental and adult neurogenesis. *The Journal of comparative neurology*, 518(22), 4479.

doi:10.1002/CNE.22489

- Mathews, KJ., Allen, KM., Boerrigter, D., Ball, H., Shannon-Weickert, C., y Double, KL. (2017). Evidence for reduced neurogenesis in the aging human hippocampus despite stable stem cell markers. *Aging cell*, 16(5), 1195-1199. doi:10.1111/ACEL.12641
- Mathieu, C., Sii-Felice, K., Fouchet, P., Etienne, O., Haton, C., Mabondzo, A., ... y Mouthon, MA. (2008). Endothelial cell-derived bone morphogenetic proteins control proliferation of neural stem/progenitor cells. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 38(4), 569-577. doi:10.1016/J.MCN.2008.05.005
- Matsui, Y., Hirasawa, Y., Sugiura, T., Toyoshi, T., Kyuki, K., y Ito, M. (2010). Metformin Reduces Body Weight Gain and Improves Glucose Intolerance in High-Fat Diet-Fed C57BL/6J Mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 33(6), 963-970. doi:10.1248/BPB.33.963
- Meyer, G. (2010). Building a human cortex: the evolutionary differentiation of Cajal-Retzius cells and the cortical hem. *Journal of Anatomy*, 217(4), 334-343. doi:10.1111/J.1469-7580.2010.01266.X
- Meyers, EA., Gobeske, KT., Bond, AM., Jarrett, J C., Peng, CY., y Kessler, JA. (2016). Increased bone morphogenetic protein signaling contributes to age-related declines in neurogenesis and cognition. *Neurobiology of aging*, 38, 164. doi:10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2015.10.035
- Mikawa, S., Wang, C., y Sato, K. (2006). Bone morphogenetic protein-4 expression in the adult rat brain. *Journal of Comparative Neurology*, 499(4), 613-625. doi:10.1002/CNE.21125
- Mimura-Yamamoto, Y., Shinohara, H., Kashiwagi, T., Sato, T., Shioda, S., y Seki, T. (2017). Dynamics and function of CXCR4 in formation of the granule cell layer during hippocampal development. *Scientific Reports 2017 7:1*, 7(1), 1-14. doi:10.1038/s41598-017-05738-7
- Mira, H., Andreu, Z., Suh, H., Lie, DC., Jessberger, S., Consiglio, A., ... y Gage, FH. (2010). Signaling through BMPR-IA regulates quiescence and long-term activity of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell*, 7(1), 78-89. doi:10.1016/j.stem.2010.04.016
- Mira, H., y Morante, J. (2020). Neurogenesis From Embryo to Adult – Lessons From Flies and Mice. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 533. doi:10.3389/FCELL.2020.00533/BIBTEX
- Mizushima, N., y Yoshimori, T. (2007). How to Interpret LC3 Immunoblotting. <https://doi.org/10.4161/auto.4600>, 3(6), 542-545. doi:10.4161/AUTO.4600
- Morales, AV, y Mira, H. (2019). Adult Neural Stem Cells: Born to Last. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7, 96. doi:10.3389/fcell.2019.00096
- Moreno-Jiménez, EP., Flor-García, M., Terreros-Roncal, J., Rábano, A., Cafini, F., Pallas-Bazarra, N., ... y 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. doi:10.1038/s41591-019-0375-9
- Morrens, J., Van Den Broeck, W., y Kempermann, G. (2012). Glial cells in adult neurogenesis. *Glia*, 60(2), 159-174. doi:10.1002/glia.21247
- Mukherjee, S., Brulet, R., Zhang, L., y Hsieh, J. (2016). REST regulation of gene networks in adult neural stem cells. *Nature communications*, 7. doi:10.1038/NCOMMS13360

- Navarro-Negredo, P., Yeo, RW., y Brunet, A. (2020). Aging and rejuvenation of neural stem cells and their niches. *Cell stem cell*, 27(2), 202. doi:10.1016/J.STEM.2020.07.002
- Nicola, Z., Fabel, K., y Kempermann, G. (2015). Development of the adult neurogenic niche in the hippocampus of mice. *Frontiers in Neuroanatomy*, 9(MAY), 53. doi:10.3389/FNANA.2015.00053/BIBTEX
- Noguchi, H., Garcia-Castillo, J., Nakashima, K., y Pleasure, SJ. (2019). Suppressor of fused controls perinatal expansion and quiescence of future dentate adult neural stem cells. *eLife*, 8. doi:10.7554/ELIFE.42918
- O'Callaghan, RM., Ohle, R., y Kelly, ÁM. (2007). The effects of forced exercise on hippocampal plasticity in the rat: A comparison of LTP, spatial- and non-spatial learning. *Behavioural Brain Research*, 176(2), 362-366. doi:10.1016/J.BBR.2006.10.018
- Obernier, K., Cebrian-Silla, A., Thomson, M., Parraguez, JI., Anderson, R., Guinto, C., ... Alvarez-Buylla, A. (2018). Adult Neurogenesis Is Sustained by Symmetric Self-Renewal and Differentiation. *Cell Stem Cell*, 221-234.e8. doi:10.1016/j.stem.2018.01.003
- Ohsumi, Y. (2014). Historical landmarks of autophagy research. *Cell Research*, 24(1), 9-23. doi:10.1038/cr.2013.169
- Oku, M., y Sakai, Y. (2018). Three Distinct Types of Microautophagy Based on Membrane Dynamics and Molecular Machineries. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 40(6), e1800008. doi:10.1002/bies.201800008
- Ortiz-Álvarez, G., Daclin, M., Shihavuddin, A., Lansade, P., Fortoul, A., Faucourt, M., ... y Spassky, N. (2019). Adult Neural Stem Cells and Multiciliated Ependymal Cells Share a Common Lineage Regulated by the Geminin Family Members. *Neuron*, 102(1), 159-172.e7. doi:10.1016/J.NEURON.2019.01.051
- Paik, JH., Ding, Z., Narurkar, R., Ramkissoon, S., Muller, F., Kamoun, WS., ... y DePinho, RA. (2009). FoxOs cooperatively regulate diverse pathways governing neural stem cell homeostasis. *Cell Stem Cell*, 5(5), 540-553. doi:10.1016/j.stem.2009.09.013
- Pang, Y., Yamamoto, H., Sakamoto, H., Masahide, O., Mutungi, JK., Sahani, MH., ... y Mizushima, N. (2019). Evolution from covalent conjugation to non-covalent interaction in the ubiquitin-like ATG12 system. *Nature Structural & Molecular Biology*, 26(4), 289-296. doi:10.1038/s41594-019-0204-3
- Parzych, KR., y Klionsky, DJ. (2014). An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(3), 460-473. doi:10.1089/ars.2013.5371
- Pasquier, B. (2016). Autophagy inhibitors. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 73(5), 985-1001. doi:10.1007/s00018-015-2104-y
- Pastrana, E., Cheng, LC., y Doetsch, F. (2009). Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(15), 6387-6392. doi:10.1073/PNAS.0810407106
- Peng, K., Dai, Q., Wei, J., Shao, G., Sun, A., Yang, W., y Lin, Q. (2016). Stress-induced endocytosis and degradation of epidermal growth factor receptor are two independent processes. *Cancer Cell International*, 16, 25. doi:10.1186/s12935-016-0301-x

- Petri, R., Piracs, K., Jönsson, ME., Åkerblom, M., Brattås, PL., Klussendorf, T., y Jakobsson, J. (2017). let-7 regulates radial migration of new-born neurons through positive regulation of autophagy. *The EMBO Journal*, 36(10), 1379-1391. doi:10.15252/embj.201695235
- Pilz, GA., Bottes, S., Betizeau, M., Jörg, DJ., Carta, S., Simons, BD., ... y Jessberger, S. (2018). Live imaging of neurogenesis in the adult mouse hippocampus. *Science (New York, N.Y.)*, 359(6376), 658. doi:10.1126/SCIENCE.AAO5056
- Ponti, G., Obernier, K., Guinto, C., Jose, L., Bonfanti, L., y 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. doi:10.1073/PNAS.1219563110/-/DCSUPPLEMENTAL
- Porlan, E., Morante-Redolat, JM., Marqués-Torrejón, MÁ., Andreu-Agulló, C., Carneiro, C., Gómez-Ibarlucea, E., ... y Fariñas, I. (2013). Transcriptional repression of Bmp2 by p21Waf1/Cip1 links quiescence to neural stem cell maintenance. *Nature Neuroscience* 2013 16:11, 16(11), 1567-1575. doi:10.1038/nn.3545
- Pratt, JM., Petty, J., Riba-Garcia, I., Robertson, DH., Gaskell, SJ., Oliver, SG., y Beynon, RJ. (2002). Dynamics of Protein Turnover, a Missing Dimension in Proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*, 1(8), 579-591. doi:10.1074/MCP.M200046-MCP200
- Purves, D., Augustine, GJ., Fitzpatrick, D., Katz, LC., LaMantia, AS., McNamara, JO., y Williams, SM. (2001). Formation of the Major Brain Subdivisions. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10954/>
- Qin, X., Jiang, B., y Zhang, Y. (2016). 4E-BP1, a multifactor regulated multifunctional protein. *Cell Cycle*, 15(6), 781. doi:10.1080/15384101.2016.1151581
- Redmond, SA., Figueres-Oñate, M, Obernier, K., Nascimento, MA, Parraguez, JI., López-Mascaraque, L., ... y Alvarez-Buylla, A. (2019). Development of Ependymal and Postnatal Neural Stem Cells and Their Origin from a Common Embryonic Progenitor. *Cell Reports*, 27(2), 429-441.e3. doi:10.1016/J.CELREP.2019.01.088
- Reinchisi, G., Parada, M., Lois, P., Oyanadel, C., Shaughnessy, R., Gonzalez, A., y Palma, V. (2013). Sonic Hedgehog modulates EGFR dependent proliferation of neural stem cells during late mouse embryogenesis through EGFR transactivation. *Frontiers in cellular neuroscience*, 7(SEP). doi:10.3389/FNCEL.2013.00166
- Renault, VM., Rafalski, VA., Morgan, AA., Salih, DA., Brett, JO., Webb, AE., ... y Brunet, A. (2009). FoxO3 regulates neural stem cell homeostasis. *Cell Stem Cell*, 5(5), 527-539. doi:10.1016/j.stem.2009.09.014
- Reynolds, BA., y Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science (New York, N.Y.)*, 255(5052), 1707-1710. doi:10.1126/science.1553558
- Romano, Roberta, y Bucci, Cecilia. (2020). Role of EGFR in the Nervous System. *Cells*, 9(8). doi:10.3390/CELLS9081887
- Sakamoto, M., Ieki, N., Miyoshi, G., Mochimaru, D., Miyachi, H., Imura, T., ... y Imayoshi, I. (2014). Continuous postnatal neurogenesis contributes to formation of the olfactory bulb neural circuits and flexible olfactory associative learning. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the*

- Society for Neuroscience*, 34(17), 5788-5799. doi:10.1523/JNEUROSCI.0674-14.2014
- Sanai, N., Nguyen, T., Ihrie, RA., Mirzadeh, Z., Tsai, HH., Wong, M., ... y Alvarez-Buylla, A. (2011). Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy. *Nature*, 478(7369), 382-386. doi:10.1038/nature10487
- Sardiello, M., Palmieri, M., Ronza, AD., Medina, DL., Valenza, M., Gennarino, VA., ... y Ballabio, A. (2009). A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science*, 325(5939), 473-477. doi:10.1126/SCIENCE.1174447
- Schäffner, I., Minakaki, G., Khan, MA., Balta, EA., Schlötzer-Schrehardt, U., Schwarz, TJ., ... y Lie, DC. (2018). FoxO Function Is Essential for Maintenance of Autophagic Flux and Neuronal Morphogenesis in Adult Neurogenesis. *Neuron*, 99(6), 1188-1203.e6. doi:10.1016/j.neuron.2018.08.017
- Shin, J., Berg, DA., Zhu, Y., Shin, JY., Song, J., Bonaguidi, MA., ... y Song, H. (2015). Single-Cell RNA-Seq with Waterfall Reveals Molecular Cascades underlying Adult Neurogenesis. *Cell Stem Cell*, 17(3), 360-372. doi:10.1016/J.STEM.2015.07.013
- Sierra, A., Encinas, JM., Deudero, JJ, Chancey, JH., Enikolopov, G., Overstreet-Wadiche, LS., ... y Maletic-Savatic, M. (2010). Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell stem cell*, 7(4), 483. doi:10.1016/J.STEM.2010.08.014
- Sierra, A., Encinas, JM., y Maletic-Savatic, M. (2011). Adult human neurogenesis: from microscopy to magnetic resonance imaging. *Frontiers in Neuroscience*, 5, 47. doi:10.3389/fnins.2011.00047
- Signer, RA., Magee, JA., Salic, A., y Morrison, SJ. (2014). Haematopoietic stem cells require a highly regulated protein synthesis rate. *Nature*, 509(7498), 49-54. doi:10.1038/NATURE13035
- Snyder, JS., Glover, LR., Sanzone, KM., Kamhi, JF., y Cameron, HA. (2009). The effects of exercise and stress on the survival and maturation of adult-generated granule cells. *Hippocampus*, 19(10), 898-906. doi:10.1002/hipo.20552
- Sorrells, SF., Paredes, MF., Cebrian-Silla, A., Sandoval, K., Qi, D., Kelley, KW., ... y Alvarez-Buylla, A. (2018). Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature*, 555(7696), 377-381. doi:10.1038/nature25975
- Spalding, KL., Bergmann, O., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Huttner, HB., ... y Frisén, J. (2013). Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell*, 153(6), 1219-1227. doi:10.1016/j.cell.2013.05.002
- Stanfield, BB., y Trice, JE. (1988). Evidence that granule cells generated in the dentate gyrus of adult rats extend axonal projections. *Experimental Brain Research*, 72(2), 399-406. doi:10.1007/BF00250261
- Sueda, R., Imayoshi, I., Harima, Y., y Kageyama, R. (2019). High Hes1 expression and resultant Ascl1 suppression regulate quiescent vs. active neural stem cells in the adult mouse brain. *Genes & development*, 33(9-10), 511-523. doi:10.1101/GAD.323196.118
- Suh, H., Consiglio, A., Ray, J., Sawai, T., D'Amour, KA., y Gage, FH. (2007). In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2+ neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell*, 1(5), 515-528. doi:10.1016/j.stem.2007.09.002

- Sun, GJ., Sailor, KA., Mahmood, QA., Chavali, N., Christian, KM., Song, H., y Ming, GL. (2013). Seamless Reconstruction of Intact Adult-Born Neurons by Serial End-Block Imaging Reveals Complex Axonal Guidance and Development in the Adult Hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 33(28), 11400-11411. doi:10.1523/JNEUROSCI.1374-13.2013
- Sun, MY., Yetman, MJ., Lee, TC., Chen, Y., y Jankowsky, JL. (2014). Specificity and efficiency of reporter expression in adult neural progenitors vary substantially among nestin-CreER(T2) lines. *The Journal of Comparative Neurology*, 522(5), 1191-1208. doi:10.1002/cne.23497
- Sun, Y., Hu, J., Zhou, L., Pollard, SM., y Smith, A. (2011). Interplay between FGF2 and BMP controls the self-renewal, dormancy and differentiation of rat neural stem cells. *Journal of Cell Science*, 124(11), 1867-1877. doi:10.1242/JCS.085506
- Takeshita, H., Horiuchi, M., Izumo, K., Kawaguchi, H., Arimura, E., Aoyama, K., y Takeuchi, T. (2012). Long-term voluntary exercise, representing habitual exercise, lowers visceral fat and alters plasma amino acid levels in mice. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 17(4), 275-284. doi:10.1007/S12199-011-0249-3/FIGURES/3
- Terreros-Roncal, J., Moreno-Jiménez, EP., Flor-García, M., Rodríguez-Moreno, CB., Trincherro, MF., Cafini, F., ... y Llorens-Martín, M. (2021). Impact of neurodegenerative diseases on human adult hippocampal neurogenesis. *Science*, 374(6571), 1106-1113. doi:10.1126/SCIENCE.ABL5163/SUPPL_FILE/SCIENCE.ABL5163_DATA_S1_AND_S2.ZIP
- Thellung, S., Corsaro, A., Nizzari, M., Barbieri, F., y Florio, T. (2019). Autophagy Activator Drugs: A New Opportunity in Neuroprotection from Misfolded Protein Toxicity. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(4). doi:10.3390/ijms20040901
- Thibautaud, TA., y Smith, DM. (2019). A Practical Review of Proteasome Pharmacology. *Pharmacological Reviews*, 71(2), 170-197. doi:10.1124/pr.117.015370
- Tobin, MK., Musaraca, K., Disouky, A., Shetti, A., Bheri, A., Honer, WG., ... y Lazarov, O. (2019). Human Hippocampal Neurogenesis Persists in Aged Adults and Alzheimer's Disease Patients. *Cell Stem Cell*, 24(6), 974-982.e3. doi:10.1016/j.stem.2019.05.003
- Toda, T., y Gage, FH. (2017). Review: adult neurogenesis contributes to hippocampal plasticity. *Cell and Tissue Research* 2017 373:3, 373(3), 693-709. doi:10.1007/S00441-017-2735-4
- Toda, T., Parylak, SL., Linker, SB., y Gage, FH. (2019). The role of adult hippocampal neurogenesis in brain health and disease. *Molecular psychiatry*, 24(1), 67. doi:10.1038/S41380-018-0036-2
- Toni, Nicolas, Laplagne, Diego A., Zhao, Chunmei, Lombardi, Gabriela, Ribak, Charles E., Gage, Fred H., y Schinder, Alejandro F. (2008). Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nature neuroscience*, 11(8), 901-907. doi:10.1038/NN.2156
- Tooze, SA., y Dikic, I. (2016). Autophagy Captures the Nobel Prize. *Cell*, 167(6), 1433-1435. doi:10.1016/j.cell.2016.11.023
- Trincherro, MF., Buttner, KA., Sulkes-Cuevas, JN., Temprana, SG., Fontanet, PA., Monzón-Salinas, MC., ... y Schinder, AF. (2017). High Plasticity of New Granule Cells in the Aging Hippocampus. *Cell Reports*, 21(5), 1129-1139. doi:10.1016/j.celrep.2017.09.064
- Urbán, N., Blomfield, IM., y Guillemot, F. (2019). Quiescence of Adult Mammalian Neural Stem Cells: A Highly Regulated Rest. *Neuron*, 104(5), 834-848. doi:10.1016/j.neuron.2019.09.026

- Urbán, N., Van Den Berg, DL., Forget, A., Andersen, J., Demmers, JA., Hunt, C., ... y Guillemot, F. (2016). Return to quiescence of murine neural stem cells by degradation of a pro-activation protein. *Science (New York, N.Y.)*, 353(6296), 292. doi:10.1126/SCIENCE.AAF4802
- van Praag, H., Kempermann, G., y Gage, FH. (1999). Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature Neuroscience*, 2(3), 266-270. doi:10.1038/6368
- van Velthoven, CT., y Rando, TA. (2019). Stem Cell Quiescence: Dynamism, Restraint, and Cellular Idling. *Cell stem cell*, 24(2), 213. doi:10.1016/J.STEM.2019.01.001
- Vivar, C, Peterson, BD., y van Praag, H. (2016). Running rewires the neuronal network of adult-born dentate granule cells. *NeuroImage*, 131, 29-41. doi:10.1016/j.neuroimage.2015.11.031
- Vodicka, P., Lim, J., Williams, DT., Kegel, KB., Chase, K., Park, H., ... DiFiglia, M. (2014). Assessment of Chloroquine Treatment for Modulating Autophagy Flux in Brain of WT and HD Mice. *Journal of Huntington's Disease*, 3(2), 159-174. doi:10.3233/JHD-130081
- von Mering, C., Huynen, M., Jaeggi, D., Schmidt, S., Bork, P., y Snel, B. (2003). STRING: a database of predicted functional associations between proteins. *Nucleic acids research*, 31(1), 258-261. doi:10.1093/NAR/GKG034
- Walker, TL., Overall, RW., Vogler, S., Sykes, AM., Ruhwald, S., Lasse, D., ... y Kempermann, G. (2016). Lysophosphatidic Acid Receptor Is a Functional Marker of Adult Hippocampal Precursor Cells. *Stem Cell Reports*, 6(4), 552. doi:10.1016/J.STEMCR.2016.03.002
- Walker, TL., Wierick, A, Sykes, AM., Waldau, B., Corbeil, D., Carmeliet, P., y Kempermann, G. (2013). Prominin-1 Allows Prospective Isolation of Neural Stem Cells from the Adult Murine Hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 33(7), 3010. doi:10.1523/JNEUROSCI.3363-12.2013
- Wang, C., Chen, S., Yeo, S., Karsli-Uzunbas, G., White, E., Mizushima, N., ... y Guan, JL. (2016). Elevated p62/SQSTM1 determines the fate of autophagy-deficient neural stem cells by increasing superoxide. *The Journal of Cell Biology*, 212(5), 545-560. doi:10.1083/jcb.201507023
- Wang, C., Liang, CC., Bian, ZC., Zhu, Y., y Guan, JL. (2013). FIP200 is required for maintenance and differentiation of postnatal neural stem cells. *Nature Neuroscience*, 16(5), 532-542. doi:10.1038/nn.3365
- Wang, C., Yeo, S., Haas, MA., y Guan, JL. (2017). Autophagy gene FIP200 in neural progenitors non-cell autonomously controls differentiation by regulating microglia. *The Journal of Cell Biology*, 216(8), 2581-2596. doi:10.1083/jcb.201609093
- Wang, M., Liang, X., Cheng, M., Yang, L., Liu, H., Wang, X., ... y Zhang, X. (2019). Homocysteine enhances neural stem cell autophagy in in vivo and in vitro model of ischemic stroke. *Cell Death & Disease*, 10(8), 561. doi:10.1038/s41419-019-1798-4
- Wei, Y., Liu, ., Li, X., Liu, J., y Li, H. (2018). Origin of the Autophagosome Membrane in Mammals. *BioMed Research International*, 2018, 1012789. doi:10.1155/2018/1012789
- Weiss, KH., Johanssen, C., Tielsch, A., Herz, J., Deller, T., Frotscher, M., y Förster, E. (2003). Malformation of the radial glial scaffold in the dentate gyrus of reeler mice, scrambler mice, and ApoER2/VLDLR-deficient mice. *Journal of Comparative Neurology*, 460(1), 56-65. doi:10.1002/CNE.10644

- Xi, Y., Dhaliwal, JS., Ceizar, M., Vaculik, M., Kumar, KL., y Lagace, DC. (2016). Knockout of Atg5 delays the maturation and reduces the survival of adult-generated neurons in the hippocampus. *Cell Death & Disease*, 7(3), e2127. doi:10.1038/cddis.2015.406
- Yazdankhah, M., Farioli-Vecchioli, S., Tonchev, AB., Stoykova, A., y Cecconi, F. (2014). The autophagy regulators Ambra1 and Beclin 1 are required for adult neurogenesis in the brain subventricular zone. *Cell Death & Disease*, 5(9), e1403. doi:10.1038/cddis.2014.358
- Yim, WW., y Mizushima, N. (2020). Lysosome biology in autophagy. *Cell Discovery*, 6, 6. doi:10.1038/s41421-020-0141-7
- Yousef, H., Morgenthaler, A., Schlesinger, C., Bugaj, L., Conboy, IM., y Schaffer, DV. (2015). Age-Associated Increase in BMP Signaling inhibits Hippocampal Neurogenesis. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 33(5), 1577. doi:10.1002/STEM.1943
- Yu, SW., Baek, SH., Brennan, RT., Bradley, CJ., Park, SK., Lee, YS., ... y Kim, SW. (2008). Autophagic Death of Adult Hippocampal Neural Stem Cells Following Insulin Withdrawal. *Stem Cells*, 26(10), 2602-2610. doi:10.1634/stemcells.2008-0153
- Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Tong, WG., ... y Li, L. (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 2003 425:6960, 425(6960), 836-841. doi:10.1038/nature02041
- Zhang, J., y Jiao, J. (2015). Molecular Biomarkers for Embryonic and Adult Neural Stem Cell and Neurogenesis. *BioMed Research International*, 2015. doi:10.1155/2015/727542
- Zhang, L., He, H., y Balschi, JA. (2007). Metformin and phenformin activate AMP-activated protein kinase in the heart by increasing cytosolic AMP concentration. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 293(1). doi:10.1152/AJPHEART.00002.2007
- Zhang, T., Wolfe, C., Pierle, A., Welle, KA., Hryhorenko, JR., y Ghaemmaghmi, S. (2017). Proteome-wide modulation of degradation dynamics in response to growth arrest. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(48), E10329-E10338. doi:10.1073/pnas.1710238114
- Zhang, Z., Dawson, PA., Piper, M., y Simmons, DG. (2019). Postnatal N-acetylcysteine administration rescues impaired social behaviors and neurogenesis in Slc13a4 haploinsufficient mice. *EBioMedicine*, 43, 435-446. doi:10.1016/j.ebiom.2019.03.081
- Zhao, C., Teng, EM., Summers, RG., Ming, GL., y Gage, FH. (2006). Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(1), 3-11. doi:10.1523/JNEUROSCI.3648-05.2006
- Zismanov, V., Chichkov, V., Colangelo, V., Jamet, S., Wang, S., Syme, A., ... y Crist, C. (2016). Phosphorylation of eIF2 α Is a Translational Control Mechanism Regulating Muscle Stem Cell Quiescence and Self-Renewal. *Cell stem cell*, 18(1), 79-90. doi:10.1016/j.stem.2015.09.020
- Zois, CE., Giatromanolaki, A., Sivridis, E., Papaiakevou, M., Kainulainen, H., y Koukourakis, MI. (2011). «Autophagic flux» in normal mouse tissues: focus on endogenous LC3A processing. *Autophagy*, 7(11), 1371-1378. doi:10.4161/AUTO.7.11.16664

