



**TRABAJO DE FIN DE GRADO**

**Grado en Medicina**

**Facultad de Ciencias de la Salud**

**Universitat Jaume I**

**EFFECTO DEL ENVEJECIMIENTO SOBRE LA ORGANIZACIÓN Y PROLIFERACIÓN  
CELULAR DE LA ZONA VENTRICULAR-SUBVENTRICULAR (V-SVZ)  
DEL CEREBRO DE RATÓN**

Autor: Víctor Merino Murgui

Tutor: Vicente Herranz Pérez

Unidad Predepartamental de Medicina





## **TRABAJO DE FIN DE GRADO (TFG) - MEDICINA**

**EL/LA PROFESOR/A TUTOR/A** hace constar su **AUTORIZACIÓN** para la Defensa Pública del Trabajo de Fin de Grado y **CERTIFICA** que el/la estudiante lo ha desarrollado a lo largo de 6 créditos ECTS (150 horas)

**TÍTULO del TFG:** “Efecto del envejecimiento sobre la organización y proliferación celular de la zona ventricular-subventricular (V-SVZ) del cerebro de ratón”.

**ALUMNO/A:** Víctor Merino Murgui

**DNI:** 21004373Z

**PROFESOR/A TUTOR/A:** Vicente Herranz Pérez

Castelló de la Plana, 26 de mayo de 2018

Fdo (Tutor/a): Vicente Herranz Pérez



## **AGRADECIMIENTOS**

Indiscutiblemente quien debe encabezar los agradecimientos es mi tutor Vicente Herranz Pérez, por haberme dedicado tanto tiempo y paciencia. Por mostrarme que con humildad e ilusión se pueden llevar a cabo grandes proyectos. Y porque sin él este TFG no hubiese sido posible.

A su recién llegada hija por prestármelo más tiempo del que seguramente necesitaba.

A mis padres por apoyarme incondicionalmente y queriendo entender en qué consistía mi trabajo.

Quiero agradecer también a la Universitat Jaume I por prestarnos las instalaciones cuando las hemos necesitado sin problemas.

Y finalmente, a mi amigo, Alejandro Golfe por traerme tantos cafés cuando más lo he necesitado.



## ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b>	XIII
<b>RESUMEN</b>	XV
<b>EXTENDED SUMMARY</b>	XIX
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
1.1 Contextualización histórica	1
1.2 Nichos neurogénicos: la zona ventricular-subventricular	2
1.2.1 Desarrollo embrionario y perinatal	2
1.2.2 Organización celular de la V-SVZ	3
1.3 Nichos neurogénicos: el giro dentado del hipocampo	7
1.3.1 Desarrollo embrionario y perinatal	7
1.3.2 Organización celular del giro dentado y la zona subgranular	7
1.4 Regulación de la neurogénesis adulta	9
1.4.1 Factores intracelulares	11
1.4.2 Factores intercelulares (célula-célula)	12
1.4.3 Factores extracelulares	12
LCR	13
Microvascularización	13
Inflamación crónica y estrés oxidativo	13
Ejercicio físico y enriquecimiento ambiental	14
1.5 Efecto de la edad sobre la neurogénesis adulta	14
1.6 Función de la neurogénesis adulta	15
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	17
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	19
3.1 Animales de experimentación	19
3.2 Microscopía electrónica de transmisión	19
3.3 Microscopía electrónica de barrido	20
3.4 Estudios de proliferación	20

3.5 Detección inmunohistoquímica	20
3.6 Análisis estadístico	22
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>23</b>
4.1 Efecto del envejecimiento en la organización celular de la V-SVZ	23
4.2 Efecto del envejecimiento en la expresión de marcadores moleculares	29
4.3 Efecto del envejecimiento en la proliferación celular de la V-SVZ	30
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>33</b>
5.1 El envejecimiento afecta a la estructura y capacidad proliferativa de la V-SVZ	33
5.2 Implicaciones de la neurogénesis adulta en el cerebro humano	36
5.3 Conclusiones	38
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>39</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Desarrollo del sistema nervioso central y sus componentes celulares	3
<i>Figura 2.</i> Estructura de la V-SVZ y evolución de sus componentes celulares	3
<i>Figura 3.</i> Representación de las diferentes capas del giro dentado	8
<i>Figura 4.</i> Esquema sobre la organización celular de la zona subgranular	9
<i>Figura 5.</i> Esquema de las interacciones que participan en la regulación de la neurogénesis en la V-SVZ	10
<i>Figura 6.</i> Organización celular de la V-SVZ en ratones jóvenes y envejecidos	24
<i>Figura 7.</i> Cambios característicos del envejecimiento a nivel subcelular	25
<i>Figura 8.</i> El número y disposición de las células endimarias y neuroblastos es distinta en la V-SVZ de ratones de 2 y 24 meses de edad	27
<i>Figura 9.</i> Imágenes de microscopía electrónica de barrido mostrando la superficie de las paredes ventriculares de ratones de 2 y 24 meses de edad	28
<i>Figura 10.</i> Marcaje por inmunofluorescencia de la V-SVZ de ratones de 2 y 24 meses	30
<i>Figura 11.</i> Cuantificación de la proliferación de la V-SVZ en ratones de 2 y 24 meses mediante marcaje con BrdU	31



## ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1.</i> Marcadores moleculares expresados por distintos tipos celulares de la V-SVZ	6
<i>Tabla 2.</i> Mecanismos de regulación de la neurogénesis	11
<i>Tabla 3.</i> Listado de anticuerpos primarios empleados	21
<i>Tabla 4.</i> Listado de anticuerpos secundarios empleados	21



## ABREVIATURAS

<b>BHE</b>	Barrera hematoencefálica
<b>BMP</b>	Proteínas morfogénicas óseas
<b>BO</b>	Bulbo olfatorio
<b>BrdU</b>	Bromodesoxiuridina
<b>Bv</b>	Vasos sanguíneos
<b>CE</b>	Células endimarias
<b>CG</b>	Neuronas granulares
<b>CMN</b>	Células madre neurales
<b>CMR</b>	Corriente migratoria rostral
<b>DAB</b>	3,3'- Diaminobenzidina
<b>DAPI</b>	4',6-diamino-2-fenilindol
<b>DCX</b>	Doblecortina
<b>DLX-2</b>	<i>Distal-less Homebox 2</i>
<b>FI</b>	Filamentos intermedios
<b>GD</b>	Giro dentado
<b>GFAP</b>	Proteína ácida fibrilar glial
<b>GL</b>	Capa granular
<b>Hh</b>	Hedgehog
<b>HP</b>	Hipocampo
<b>IGF2</b>	Factor de crecimiento insulínico tipo 2
<b>LCR</b>	Líquido cefalorraquídeo
<b>MA</b>	Manto

<b>MEB</b>	Microscopía electrónica de barrido
<b>MET</b>	Microscopía electrónica de transmisión
<b>ML</b>	Capa molecular
<b>MZ</b>	Zona marginal
<b>NE</b>	Neuroepitelio
<b>nIPC</b>	Célula intermediaria progenitora de neuronas
<b>oIPC</b>	Célula intermediaria progenitora de oligodendrocitos
<b>PB</b>	Tampón fosfato
<b>PC</b>	Plexo coroideo
<b>PSA-NCAM</b>	Molécula de adhesión celular polisializada
<b>RG</b>	Glía radial
<b>SEM</b>	Error estándar de la media
<b>SHH</b>	<i>Sonic hedgehog</i>
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>Str</b>	Estriado
<b>SV</b>	Superficie ventricular
<b>TAC</b>	Células de amplificación transitorias
<b>TGF</b>	Factor de crecimiento transformante
<b>TUJ-1</b>	Beta tubulina de clase III
<b>VI</b>	Ventrículo lateral
<b>V-SVZ</b>	Zona ventricular-subventricular
<b>VZ</b>	Zona ventricular
<b>ZSG</b>	Zona subgranular

## RESUMEN

**Introducción:** La neurogénesis adulta consiste en la generación de nuevas neuronas a partir de células madre neurales que, tras madurar, se integran en circuitos preexistentes. En el cerebro de mamíferos se han identificado, principalmente, dos nichos neurogénicos: la zona ventricular-subventricular (V-SVZ) y la zona subgranular del giro dentado del hipocampo. La actividad de estas regiones está finamente regulada y se ve afectada por diversos factores, como el envejecimiento, que afectan a su capacidad neurogénica.

**Objetivo:** Intentamos comprobar si el envejecimiento afecta a la estructura y capacidad proliferativa de la V-SVZ.

**Material y métodos:** Estudiamos la V-SVZ de ratones de 2 y 24 meses de edad. Se comparó la organización celular de esta región mediante microscopía electrónica. Asimismo, se estudió la presencia de distintos tipos celulares mediante la detección inmunohistoquímica de marcadores moleculares específicos. Por otra parte, se cuantificó la capacidad proliferativa de la V-SVZ en ambos grupos experimentales.

**Resultados:** Hemos observado que con el envejecimiento la V-SVZ sufre una reducción en su espesor y otros cambios a nivel subcelular, que van acompañados de una disminución en la capacidad proliferativa de la región.

**Conclusión:** El envejecimiento afecta a la capacidad proliferativa de la V-SVZ. Se requieren nuevos trabajos que estudien las implicaciones fisiopatológicas de estos cambios en el cerebro.

## PALABRAS CLAVE

Neurogénesis adulta, zona ventricular-subventricular, envejecimiento, células madre neurales.





## ABSTRACT

**Introduction:** Adult neurogenesis is the generation of new neurons from neural stem cells that, after maturing, integrate into pre-existing neural circuits. In the brain of mammals, two neurogenic niches have been identified: the ventricular-subventricular zone (V-SVZ) and the subgranular zone of the hippocampal dentate gyrus. The activity of these regions is finely regulated and is affected by various factors, such as aging, which affects their neurogenic capacity.

**Objective:** Our aim was to prove if aging affects the structure and proliferative capacity of the V-SVZ.

**Material and methods:** We studied the V-SVZ of 2- and 24-month-old mice. The cellular organization of this region was compared by electron microscopy. Likewise, the presence of different cell types was studied by immunohistochemical detection of specific molecular markers. Finally, the proliferative capacity of the V-SVZ was quantified in both experimental groups.

**Results:** We observed that aging causes a slimming of the V-SVZ and other changes at the subcellular level, which are accompanied by a decrease in the proliferative capacity of the region.

**Conclusion:** Aging affects the proliferative capacity of V-SVZ. Further studies are required in order to ascertain the physiopathological implications of these changes in the brain.

## KEYWORDS

Adult neurogenesis, ventricular-subventricular zone, aging, neural stem cells.



## EXTENDED SUMMARY

### Background

Adult neurogenesis is the process by which new neurons are generated from neural stem cells. After maturing, these new cells are able to integrate into pre-existing neural circuits. For many years, neuroscientists believed that the central nervous system was unable to generate new neurons, thus limiting our view about neuron replacement and brain repair. In the 1960's, Joseph Altman started paving the way for changing this conception by providing evidence for the incorporation of new neurons to the olfactory bulb and the hippocampal dentate gyrus. Decades later, with the development of new techniques, independent research groups were able to demonstrate, in rodents, that the source of these new neurons were neural stem cells located in the ventricular-subventricular area (V-SVZ) of the lateral ventricles and the subgranular zone of the dentate gyrus, respectively.

The V-SVZ, an extensive region lining the lateral wall of the lateral ventricles, is the largest germinal niche in the adult mammalian brain. In the V-SVZ, neural stem cells (NSCs) correspond to a subpopulation of specialized astrocytes derived from radial glia. NSCs divide generating transit amplifying cells, which in turn, give rise to migrating neuroblasts. In rodents, neuroblasts migrate tangentially through the rostral migratory stream to the olfactory bulb, where they differentiate and integrate into neural circuits participating in olfactory processing. In contrast to rodents, adult neurogenesis in the human V-SVZ is relatively scarce. Only during the first 18 months after birth many young neuroblasts can be found adjacent to the human V-SVZ, migrating to the olfactory bulb, but also to extensive areas of the prefrontal cortex.

In the hippocampal dentate gyrus, NSCs are located in the subgranular zone, the interface between the granule cell layer and the *hilus*. In this region, radial astrocytes function as NSCs and, similar to the V-SVZ, generate intermediate precursors which divide and progressively mature giving rise to young neurons. These new neurons integrate in the granule cell layer, participating in learning and memory processes.

There is great interest in understanding how the production of new neurons is regulated. Many known chemical signals affect the generation, migration and integration of new neurons, most of them linked to the special vasculature present in the neurogenic niches. However, there are other complex factors, such as mental activity, physical exercise and aging, that also have an effect on adult neurogenesis.

Several studies have reported a decline in neurogenesis associated with age, yet the causes of this phenomenon remain unknown. In this work, we focused on how aging affects the organization and proliferative activity of the mouse V-SVZ.

### **Material and methods**

We studied the V-SVZ of young adult (2-month-old) and aged (24-month-old) mice. We first compared the cellular organization of this region by electron microscopy. We also determined, by fluorescent immunohistochemistry, the abundance of two of the main cell types in the V-SVZ using the specific molecular markers DCX (for neuroblasts) and GFAP (for astrocytes). On the other hand, we assessed the proliferative capacity of the niche by quantifying the incorporation of BrdU (BrdU is a synthetic nucleoside analog of thymidine, which is incorporated into the DNA of cells in the S phase of the cell cycle).

### **Results**

Our main finding was that aged mice showed an extraordinarily thin V-SVZ, with decreased cell density in this brain region. We also observed subcellular changes in different cell types of the aged mice. For example, we detected an accumulation of dense bodies in the cytoplasm of different cell types; higher intermediate filament density in astrocytes; and a general stretching of ependymal cells which resulted in a lower density of cilia in the ventricular surface. Furthermore, immunohistochemical analyses revealed a lower number of DCX-labeled neuroblasts in the aged V-SVZ, consistent with a significant decrease in the number of BrdU label-retaining cells in this experimental group.

### **Discussion and conclusion**

We confirm previous studies reporting a significant reduction in the neurogenic potential of the V-SVZ in aged mice. Our results suggest that aging leads to structural and functional changes in the V-SVZ. These changes involve remarkable differences in the cell organization and proliferative activity of this neurogenic niche. While the underlying causes for these events remain elusive, we speculate about the existence of physical and chemical signals that might be altered by the normal process of aging, leading to a reduction in the number of neural progenitor cells and/or their entrance in a quiescent state with decreased proliferative activity. On the other hand, the existing literature about the effect of aging in the human neurogenic niches is controversial. Therefore, future studies still have much to teach us about when and how adult neurogenesis starts to decline during life. This new information may help us to better understand age-related neurological diseases and how to prevent them.

## 1. INTRODUCCIÓN

La neurogénesis adulta es el proceso por el que se generan nuevas neuronas que migran, maduran y se integran en un circuito neural preexistente. Fisiológicamente, este fenómeno parece contribuir a mecanismos de plasticidad neural más que en la reparación del cerebro. Sin embargo, llegar a entenderla y modularla supondría una potente herramienta para su uso con fines terapéuticos.

### 1.1 Contextualización histórica

Hasta finales del siglo XX imperaba la idea de que una vez completado el desarrollo, el sistema nervioso central (SNC) era incapaz de generar nuevas neuronas. Fue entonces cuando Joseph Altman, gracias al uso de la timidina tritiada (un nucleósido radiactivo que se incorpora al ADN de las células durante la fase S del ciclo celular) pudo identificar nuevas células con morfología neuronal en el bulbo olfatorio (BO) y en el giro dentado (GD) del hipocampo (1–3). No se consiguió localizar con exactitud la procedencia de esas células hasta que años después, con los avances técnicos, pudo establecerse que estas nuevas neuronas derivan de células madre neurales (CMN) localizadas, en el caso de los mamíferos, en la zona ventricular-subventricular (V-SVZ) de los ventrículos laterales (4–7) y en la zona subgranular (ZSG) del giro dentado del hipocampo (8–11). Aunque se ha observado proliferación celular en otras zonas del SNC como las paredes del tercer ventrículo (12) o el canal central de la médula espinal (13,14), no se tienen evidencias suficientes que confirmen la capacidad neurogénica de estas regiones.

Una vez se aceptó que el cerebro adulto podía ser capaz de generar nuevas neuronas, el interés se centró en establecer la naturaleza de las células madre neurales y su completa caracterización. Algunos autores apuntaron que las CMN tenían características astrocitarias (15), mientras que otros propusieron que correspondían a células ependimarias (16). No obstante, estudios como el de Spassky *et al.* (17) determinaron que las células ependimarias son células postmitóticas, diferenciadas, y sin capacidad proliferativa. Por otra parte, ante la pregunta de si la neurogénesis adulta era un fenómeno común en otras especies, se llevaron a cabo múltiples estudios que encontraron neurogénesis en diversas regiones del cerebro en todos los grupos vertebrados estudiados, desde peces hasta primates (18–20).

## **1.2 Nichos neurogénicos: la zona ventricular-subventricular**

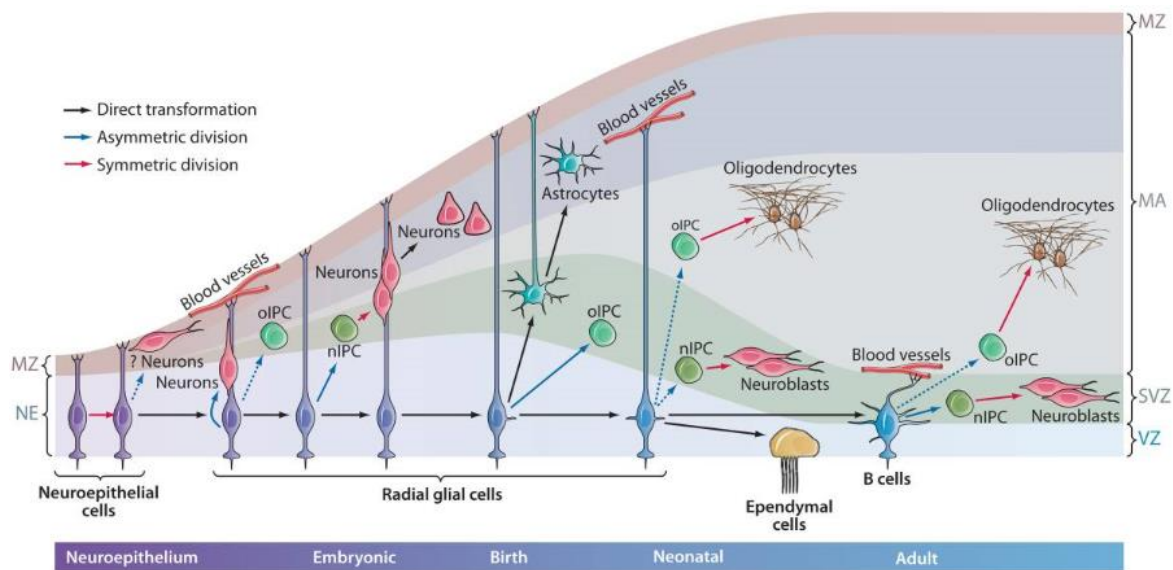
### **1.2.1 Desarrollo embrionario y perinatal**

El sistema nervioso central deriva de una lámina formada por células progenitoras (células neuroepiteliales) que se pliega formando el tubo neural. La luz de dicho tubo neural dará lugar, posteriormente, al sistema ventricular cerebral y al canal central de la médula espinal. Como se ilustra en la Figura 1, durante el desarrollo embrionario las células neuroepiteliales tienen morfología radial y contactan tanto con la superficie ventricular como con la superficie pial. Al principio del desarrollo del SNC, estas células neuroepiteliales se dividen simétricamente aumentando el número de células progenitoras, mientras que, más adelante, se transforman en células de glía radial que comienzan a dividirse de forma asimétrica, dando lugar a una célula madre que se mantiene adyacente a la cavidad ventricular y a una célula hija que migra tangencialmente alejándose del ventrículo (21–23). Además, las fibras radiales de las células de glía radial facilitan, junto a los vasos sanguíneos, la migración de nuevas neuronas hacia la corteza cerebral (24).

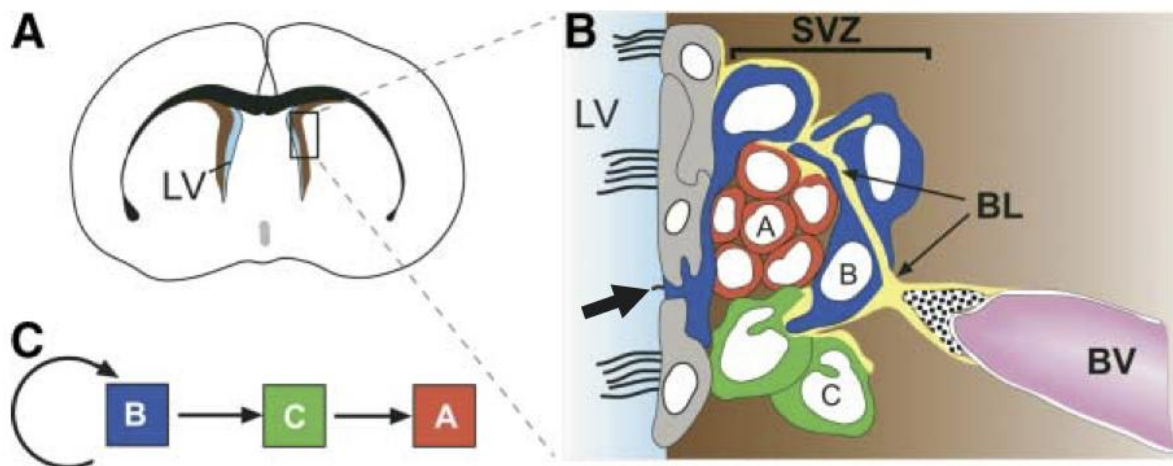
Al aproximarse el nacimiento, se ha observado que en ratones la mayoría de células de glía radial pierden su contacto con la cavidad ventricular y migran hacia la corteza cerebral. Tan solo un pequeño porcentaje de células mantiene su contacto apical con el ventrículo y, con ello, su capacidad de actuar como células madre multipotentes, pudiendo dar lugar a los diferentes tipos celulares de la línea neural. Durante el desarrollo postnatal y en el adulto, las CMN se mantienen en la V-SVZ estableciendo un nicho celular con una organización muy característica (25).

### **1.2.2 Organización celular de la V-SVZ**

En la edad adulta, la V-SVZ corresponde a la región que tapiza la pared lateral de los ventrículos laterales. Está compuesta por cuatro tipos celulares: las células E o ependimarias, células B o astrocitos, células C o células de amplificación transitoria (TAC) y Células A o neuroblastos (Figura 2) (15). En varias especies de mamíferos, estos neuroblastos o neuronas inmaduras migran rostralmente hacia el bulbo olfatorio a lo largo de la corriente migratoria rostral (CMR), a través de la cual los neuroblastos se desplazan rodeados por astrocitos que forman gliotubos, que facilitan dicho proceso (4). Una vez alcanzan el BO, gracias a factores tróficos no bien conocidos, los neuroblastos se dispersan y terminan de diferenciarse formando neuronas maduras que se integran en circuitos preexistentes (5).



**Figura 1. Desarrollo del sistema nervioso central y sus componentes celulares.** Se muestra un diagrama que describe la secuencia de formación del SNC a partir de las células neuroepiteliales y de glía radial a lo largo del desarrollo. (MA) manto; (MZ), zona marginal; (NE), neuroepitelio; (nIPC) célula intermediaria progenitora de neuronas; (oIPC) célula intermediaria progenitora de neuronas; (RG) glía radial; (SVZ) zona subventricular; (VZ) zona ventricular. Extraído de Kriegstein y Álvarez-Buylla (25).



**Figura 2. Estructura de la V-SVZ y evolución de sus componentes celulares.** (A) Localización, a nivel macroscópico, de la V-SVZ en la pared lateral de los ventrículos laterales (LV). (B) Organización de la V-SVZ: las células endimarias (gris) tapizan la pared del ventrículo y tienen su superficie apical cubierta por cilios. Por debajo de éstas

encontramos células tipo B (astrocitos, azul), algunas de ellas en contacto con la cavidad ventricular por medio de un cilio primario (flecha). Esta subpoblación (células B1) corresponde a las CMN, y se divide dando lugar a precursores intermedios (células tipo C, verde), que a su vez se multiplican dando lugar a neuronas inmaduras o neuroblastos (células A, rojo). Los neuroblastos se agrupan formando cadenas de migración rodeadas por astrocitos (B). Más profundamente podemos encontrar vasos sanguíneos (BV) a los que suelen estar asociadas las expansiones basales de las células B. **(C)** Evolución del proceso neurogénico. Los astrocitos (B) tienen capacidad autorregenerativa, y además pueden dar lugar a precursores intermedios (C) y éstos a su vez a neuroblastos (A). Imagen modificada de Álvarez-Buylla y Lim (26).

Las células endimarias (tipo E) son células de gran tamaño y morfología cuboidal, y forman un epitelio monoestratificado que tapiza la pared ventricular. En su superficie apical presentan microvellosidades y un penacho de cilios que, mediante un movimiento de batido, impulsan el líquido ceforraquídeo (LCR) a través del sistema ventricular del cerebro. Tienen una cromatina poco densa y están fuertemente unidas unas a otras mediante interdigitaciones y complejos de unión (15). Aunque existen estudios que inicialmente describieron estas células como las *bona fide* CMN (16), o que al menos podían actuar como tales ante determinadas condiciones patológicas (27,28), posteriormente se ha concluido que son células derivadas de la glía radial y que no tienen actividad proliferativa (17,29). No obstante, ante un daño en esta capa, se ha observado que las células B1 son capaces de modificar la secuencia  $B \rightarrow C \rightarrow A$ , formando células con un fenotipo intermedio entre endimario y astrocitario (*ependymary-like cells*). Estas células tienen rasgos de células E pero también otros, como los filamentos intermedios (FI), más típicos de las B (30).

Los astrocitos de la V-SVZ (células B) son células con citoplasma claro y abundante. Poseen una morfología muy irregular debido a que se sitúan entre los diferentes componentes celulares. Tradicionalmente se ha considerado a los astrocitos como un grupo celular bastante homogéneo. Sin embargo, posteriormente se ha observado que existen diversas subpoblaciones especializadas y con distintas funciones (31,32). En la V-SVZ encontramos dos subpoblaciones, las células B1 y las células B2 (15); todas ellas expresan el marcador GFAP (*glial fibrillary acidic protein*).

A día de hoy, está ampliamente aceptado que las células B1 son las *bona fide* CMN (33). Son células también derivadas de la glía radial (34) que mantienen un contacto con la



superficie ventricular mediante proyecciones citoplasmáticas que se intercalan entre las células endoteliales (CE) y que terminan con un cilio primario en la luz del ventrículo lateral (VI) (15). Se sugiere que dicho cilio primario puede estar implicado en la transducción de señales sistémicas mediadas por morfógenos o factores de crecimiento. Se sabe, por ejemplo, que el cilio primario es esencial para la señalización por Hedgehog (Hh) (35). Las células B1 son capaces de autorrenovarse, pero también de dar lugar a nuevos astrocitos, neuronas y oligodendrocitos, no sólo en condiciones fisiológicas, sino también en respuesta a daños cerebrales como traumatismos o ictus (36–39).

Las células B2, como decíamos, también tienen características astrocitarias, si bien en este caso no contactan con la cavidad ventricular, por lo que inicialmente fueron consideradas como astrocitos quiescentes con función estructural (15). A pesar de ello, estudios recientes usando técnicas de marcaje clonal indican que con el paso del tiempo, algunas células B1 pierden su contacto apical con la cavidad ventricular dando lugar a células B2, y que éstas también podrían tener cierta capacidad neurogénica (40). Por otra parte, es también bien conocido que tanto las células B1 y B2 tienen expansiones basales que contactan con la red vascular asociada a la V-SVZ, la cual interviene en la transmisión de señales sistémicas que regulan la actividad del nicho (41).

Las células de amplificación transitoria (células C) poseen un núcleo irregular con profundas invaginaciones y cromatina laxa (15). Son las células con mayor tasa proliferativa de la V-SVZ y dan lugar a múltiples neuroblastos (células A) tras varias divisiones mitóticas. Por ello se pueden localizar frecuentemente cercanas a cadenas de neuroblastos. Esto pudo ser demostrado gracias a una serie de experimentos con antimitóticos que eliminaban por completo la población de células C de la V-SVZ, que posteriormente eran restauradas gracias a la presencia de células B quiescentes capaces de regenerar el nicho neurogénico (42). Con el envejecimiento, las células C se encuentran de forma más aislada y con una capacidad proliferativa menor (43). Algunos estudios llevaron a cabo una caracterización más profunda, observando que al menos durante los primeros 12 meses de vida (en ratones) la población de células C se mantenía constante, y que a partir de ahí se veía reducida (44).

Las células tipo A, células migradoras o neuroblastos, tienen un soma fusiforme, con un citoplasma denso y escaso, y expresan Doblecortina (DCX), una proteína asociada a microtúbulos. Su núcleo es regular, con 2 o más nucleolos y con cromatina laxa. Como diferencia ante las células B, no presentan filamentos intermedios en el citoplasma y su

retículo endoplasmático rugoso está poco desarrollado (15). Se agrupan formando cadenas rodeadas de astrocitos, quedando unidas entre ellas por complejos de unión, aunque a su vez, ciertas partes de su membrana están libres facilitando su migración hacia el BO por medio de la CMR en el caso del ratón (4) y hacia regiones corticales en el caso del cerebro humano (20,45,46), aportando una gran cantidad de neuroblastos que terminarán madurando y dando lugar a nuevas neuronas. De forma interesante, en el cerebro humano postnatal se encuentra una CMR hacia el bulbo olfatorio, que desaparece a medida que el cerebro va madurando, sin conocerse las causas ni consecuencias fisiológicas de dicho fenómeno (45).

Existe una amplia lista de marcadores inmunohistoquímicos expresados de forma diferencial por los tipos celulares que componen la V-SVZ (Tabla 1). Sin embargo, algunos de estos marcadores son expresados por más de un tipo celular, o están restringidos a una etapa de maduración concreta, por lo que en la mayoría de ocasiones deben emplearse combinaciones de varios de estos marcadores para identificar un tipo celular concreto (30).

**Tabla 1.** Marcadores moleculares expresados por distintos tipos celulares de la V-SVZ.

	<i>Neuroblastos (A)</i>	<i>Astrocitos (B)</i>	<i>Células de amplificación transitoria (C)</i>	<i>Células ependimarias (E)</i>
Vimentina	-	++	-	++
Nestina	+	++	+	+++
S100	-	-	-	++
GFAP	-	++	-	+
PSA-NCAM	+++	-	-	-
TUJ-1	+++	-	-	-
DCX	+++	-	-	-
DLX-2	++	-	+++	-

Cabe mencionar también que en la V-SVZ, como en cualquier otro tejido, la matriz extracelular y sus componentes (proteoglicanos de condroitín sulfato, principalmente) tienen una gran importancia. Esta matriz extracelular aparece durante el desarrollo postnatal del SNC y recientemente se ha descrito que juega un papel fundamental en la regulación de la

actividad de la V-SVZ, ya que tiene la capacidad de incorporar moléculas involucradas en la activación de la proliferación celular (47).

### **1.3 Nichos neurogénicos: el giro dentado del hipocampo**

Como ya hemos comentado, la otra gran región donde se producen nuevas neuronas en el cerebro de mamíferos es la zona subgranular del giro dentado del hipocampo (1–3,10,48,49). La adición de nuevas neuronas al GD ha sido relacionada con procesos de memoria y aprendizaje (50), mientras que déficits en la neurogénesis de esta región han sido relacionados con neuroinflamación (51), depresión (52), y epilepsia (53).

#### **1.3.1 Desarrollo embrionario y perinatal**

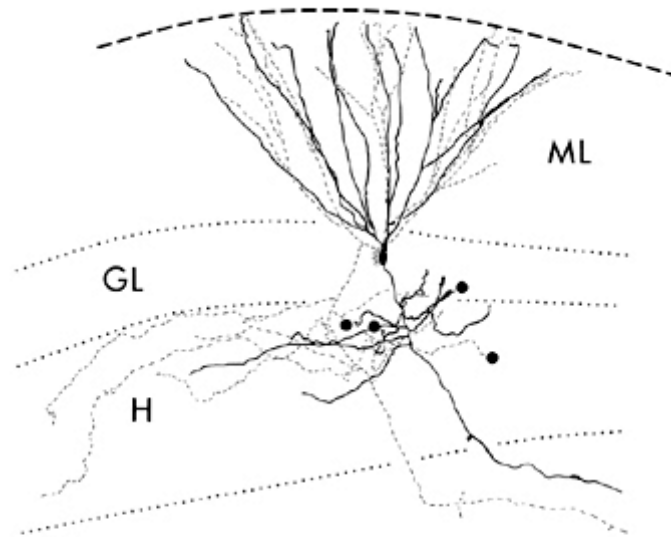
Desde el punto de vista embrionario, el GD tiene una serie de características diferentes a la V-SVZ. Quizás la más importante de ellas sea que, pese a ser un área neurogénica, las CMN que residen en la ZSG (la capa más interna del giro dentado) pierden el contacto con cualquier cavidad ventricular durante la formación del SNC. En las primeras etapas embrionarias, las células de glía radial mantienen su contacto con la pared ventricular y se dividen simétricamente para ir aportando nuevas células a la SGZ. Posteriormente, terminan perdiendo su contacto ventricular y se van retrayendo, dando lugar a astrocitos radiales (25).

Los astrocitos radiales (también llamados progenitores tipo 1) migran a la SGZ donde residirán en el cerebro adulto. Estas células emiten proyecciones que atraviesan la capa granular (GL) y llegan hasta la capa molecular (ML). Los astrocitos radiales actúan como precursores de nuevas neuronas en la ZSG y por tanto se consideran las CMN de este nicho neurogénico (10,54,55). Sin embargo, no producen neuronas directamente, sino que generan precursores intermedios (nIPC, células tipo D, o progenitores tipo 2) que serán los que darán lugar a nuevas neuronas (11,56).

#### **1.3.2 Organización celular del giro dentado y la zona subgranular**

El GD corresponde a una estructura interna en el hipocampo en la que se distinguen tres capas (de más superficial a interna): molecular, granular y polimórfica (Figura 3) (57). La ML está compuesta por las dendritas de las neuronas granulares (CG) e interneuronas. Adyacente se encuentra la GL donde se encuentran los somas de las CG. Éstas se agrupan en columnas de 4-8 células confiriendo una gran densidad celular a esta capa. Más internamente encontramos la capa polimorfa o *hilus*, donde encontramos axones de las CG y otras células como neuronas gabaérgicas y los astrocitos radiales anteriormente mencionados. Las CG son neuronas con un soma esférico y un gran árbol dendrítico que se extiende a través de la ML. Dichas dendritas reciben aferencias de distintas áreas del

cerebro, como puede ser el propio *hilus* o la corteza entorrinal. Los axones de estas células, por su parte, también emiten proyecciones a la ML y a la capa CA3 del hipocampo (58). Ha sido sugerido que el deterioro cognitivo asociado a la edad, especialmente aquél vinculado a la memoria, podría deberse a una disminución en el número de CG (59).



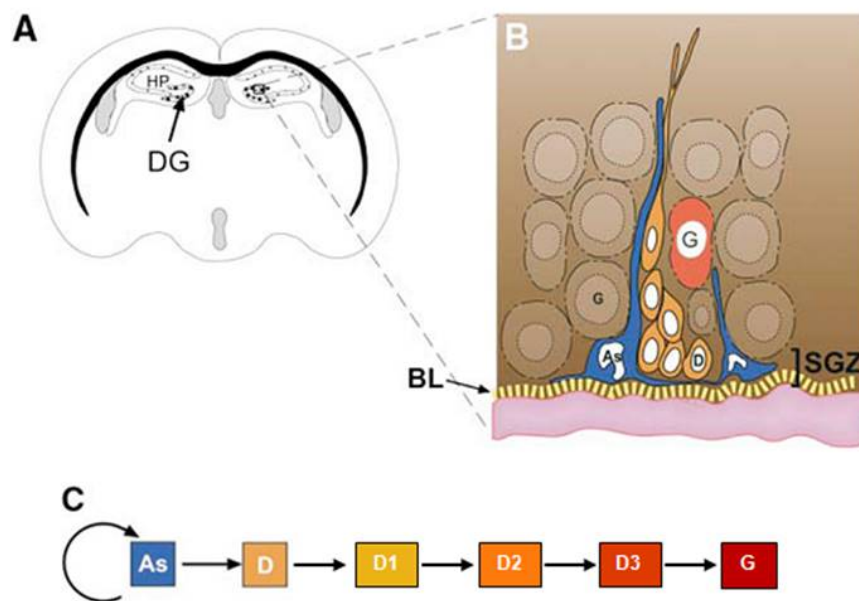
**Figura 3. Representación de las diferentes capas del giro dentado.** Diagrama ilustrando el GD del ratón. Se muestran la capa molecular (ML), la capa granular (GL), y el *hilus* (H). Se representa el árbol dendrítico de una CG en la ML con su soma en la GL y su axón orientado hacia el *hilus*. En línea discontinua se representan las proyecciones que emite y recibe de distintas áreas cerebrales. Imagen modificada de Claiborne *et al.* (57).

Internamente al GD encontramos la zona subgranular, donde están localizadas las CMN de esta región (astrocitos radiales) y los nIPC (Figura 4A-B).

Las células tipo B (astrocitos radiales o precursores tipo 1) tienen características morfológicas astrocitarias, e inmunohistoquímicamente son semejantes a las descritas en la V-SVZ, ya que expresan el marcador GFAP. Sin embargo, a diferencia de otros astrocitos de la ZSG, los astrocitos radiales también expresan Nestina como marcador diferencial. Tienen expansiones radiales que cruzan la GL, pero también se encuentran ocasionalmente expansiones dispuestas de forma horizontal (10,11). De forma similar a lo que ocurre en la V-SVZ, los astrocitos radiales de la ZSG también están fuertemente asociados a la red

vascular de esta región, sugiriendo que los factores derivados de los vasos sanguíneos influyen en el comportamiento de las CMN de la ZSG (60).

Las células tipo D (precursoras tipo 2) corresponden a los precursores intermedios que terminan diferenciándose dando lugar a neuronas granulares. Forman grupo de 2 a 4 células con espacios intercelulares que facilitan su migración hacia el estrato granular. Las células tipo D se subdividen en D1, D2 y D3 según su grado de diferenciación (Figura 4C), siendo D3 el estado más diferenciado y el que se incorpora a la capa granular (11).

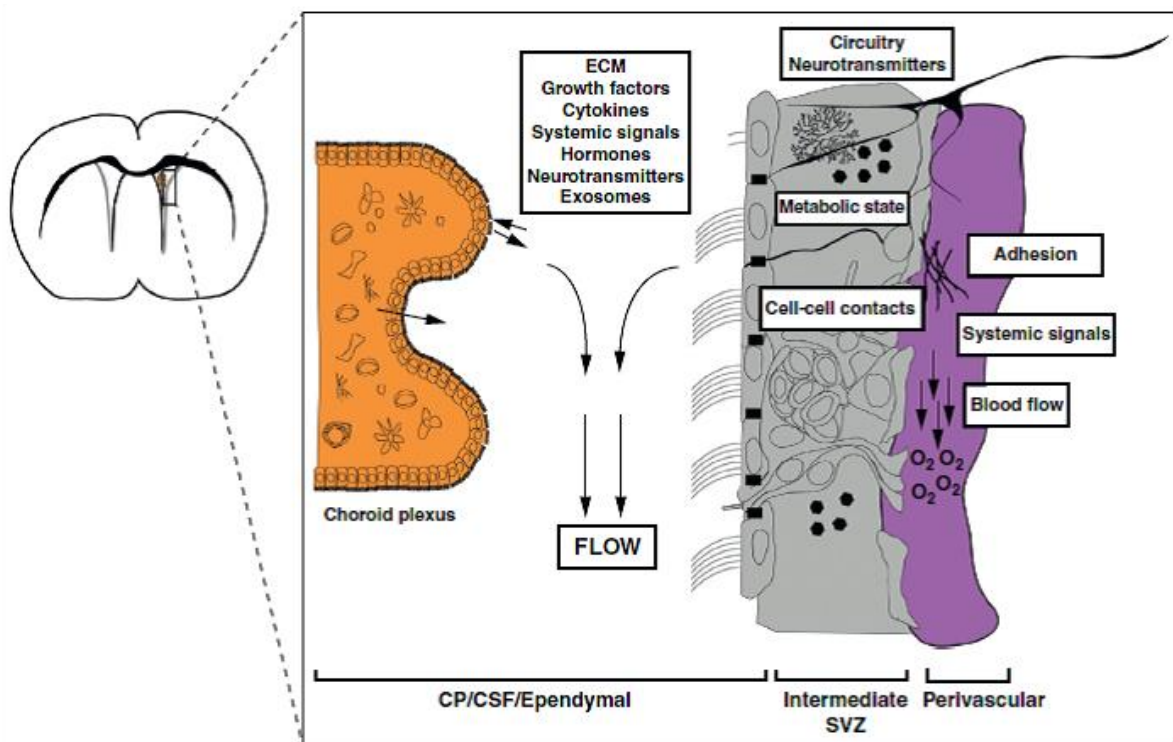


**Figura 4. Esquema sobre la organización celular de la zona subgranular. (A)** Sección coronal a nivel del hipocampo (HP), la flecha señala el giro dentado (DG). **(B)** Esquema sobre la disposición de las células en la ZSG compuesta por: astrocitos radiales (As), precursores intermedios (D) y nuevas neuronas granulares (G). Las expansiones horizontales de los astrocitos radiales del nicho están frecuentemente asociadas a la lámina basal (BL) de vasos sanguíneos (rosa). **(C)** Proceso de diferenciación de las células madre de la ZSG. Imagen modificada de Álvarez-Buylla y Lim (26).

#### 1.4 Regulación de la neurogénesis adulta

El cerebro adulto alberga células madre neurales que residen y participan en la fisiología de nichos celulares muy concretos (la V-SVZ y la ZSG del giro dentado). Entender y controlar los elementos que regulan el funcionamiento y activación de estas peculiares células resulta muy interesante, tanto desde el punto de vista científico como médico. Por

ello, se han desarrollado numerosas investigaciones que tratan de identificar los factores que determinan el comportamiento de las CMN, muchos de ellos comunes en la V-SVZ y la ZSG. Sin embargo, se añaden constantemente nuevas rutas de regulación que podríamos clasificar como: intracelulares (factores genéticos y epigenéticos), intercelulares (factores de tróficos, interacciones célula-célula...) y extracelulares (vascularización, presión y flujo intraventricular, factores en el líquido cefalorraquídeo, etc.) (Figura 5; Tabla 2) (47). Además, existen factores más generales y complejos de entender como el estilo de vida, la exposición a tóxicos, o el envejecimiento, en el último de los cuales nos centraremos en este trabajo.



**Figura 5. Esquema de las interacciones que participan en la regulación de la neurogénesis en la V-SVZ.** En el diagrama se observa cómo los plexos coroides (CP) emiten y reciben señales moleculares del líquido cefalorraquídeo. Imagen extraída de Silva-Vergas *et al.* (47).

**Tabla 2.** Mecanismos de regulación de la neurogénesis.

<b>MECANISMOS DE REGULACIÓN</b>		
<i>Intracelulares</i>	<i>Intercelulares</i>	<i>Extracelulares</i>
Cilcina kinasas Extensión fase G1 (TGF-B) Metilación de genes Telómeros	BMP Contacto con el endotelio Dopamina GABA N-Cadherina NMDA Serotonina TGFB	<b>Vascularización</b> - Ach - B-Celulina, - EGF - IL-1, IL-6 - PDGF - SDF-1  <b>LCR</b> - BMP - FGF - IGF - Nogging - PDGF - SHH - TGF - TNFa - VCAM1 - VEGF - Wnts
<b>E N V E J E C I M I E N T O</b>		

#### 1.4.1 Factores intracelulares

Numerosos autores han observado que con el envejecimiento se producen cambios celulares que modifican el ciclo celular y que influyen directamente en la capacidad proliferativa de las CMN. Así pues, se sabe que durante las primeras etapas del desarrollo, los factores genéticos y epigenéticos tienen mayor relevancia y que, con el paso del tiempo, éstos van perdiendo fuerza siendo desplazados por otros. Por ejemplo, Capilla-González *et al.* (44) observaron que las células de amplificación transitoria (tipo C) de la V-SVZ no alargaban su ciclo celular en ratones de dos años respecto a las de ratones de seis meses edad. Sin embargo, a diferencia de éstas, las CMN sí que lo hacían. Esto parece deberse a los cambios que se producen en la metilación de los genes involucrados en el control del ciclo celular. Gracias a estos y otros estudios, se pudo determinar que a pesar de que había una reducción de las CMN con el envejecimiento, estas células no perdían su capacidad proliferativa (29,44,61).

Otro aspecto implicado en la capacidad proliferativa de las CMN viene determinado por el mantenimiento de su integridad cromosómica por medio de la actividad telomerasa. En relación a esto ha sido descrito que CMN obtenidas a partir de la V-SVZ de ratones transgénicos deficientes en actividad enzimática telomerasa tienen una drástica disminución en su actividad proliferativa *in vitro* debido al acortamiento de telómeros (62). Por el contrario, la restauración de la telomerasa en ratones transgénicos deficientes en dicha actividad produce la reactivación de las CMN y de la neurogénesis en la V-SVZ (63).

#### **1.4.2 Factores intercelulares (célula-célula)**

Otra serie de factores implicados en la regulación de la actividad neurogénica consiste en las interacciones intercelulares entre células de los nichos donde residen las CMN, estableciendo una regulación de tipo paracrino con un *feedback* continuo. En la V-SVZ existe una multitud de vías de señalización que regulan finalmente la actividad de los distintos tipos celulares del nicho (64).

Los factores intercelulares comprenden incluso las interacciones de células de los nichos neurogénicos con células relativamente alejadas de éstos. Tanto la V-SVZ como la ZSG poseen aferencias de axones procedentes de distintas áreas cerebrales. Por ejemplo, ha sido descrito que neuronas serotoninérgicas del núcleo del rafe proyectan axones supraependimarios que entran en contacto con las células de la V-SVZ regulando la actividad de las células B1 (65). Por otra parte, también ha sido descrita la existencia de axones de neuronas dopaminérgicas procedentes de la sustancia negra que contactan con células de la V-SVZ liberando dopamina en dicha región (66).

Finalmente, hay que señalar que no sólo los factores químicos regulan la neurogénesis, sino que los complejos unión entre las células también lo hacen. Ha sido observado que los vasos sanguíneos adyacentes a la V-SVZ forman un plexo especial con el que contactan las células B1 y C, pero no con las de tipo A. Esta interacción neurovascular es una especialización que contribuye a la regulación de la actividad de la V-SVZ (67).

#### **1.4.3 Factores extracelulares**

Probablemente éste sea el grupo de factores sobre el que más información se dispone. Sin embargo, supone un gran reto encajar toda esta información para poder comprender los mecanismos globales de la regulación neurogénica. A continuación, se desarrollan algunos de los principales factores que intervienen en la fisiología de la V-SVZ con especial énfasis en su potencial implicación en los cambios que se producen en el proceso de envejecimiento.



### **LCR**

El LCR es un medio acuoso incoloro que baña el SNC por medio del espacio subaracnoideo, el sistema ventricular y el canal ependimario de la médula espinal. Tiene diversas funciones y se forma principalmente en los plexos coroideos (PC). En su composición han sido identificadas multitud de moléculas implicadas en la actividad de las CMN de la V-SVZ (47). Esta composición cambia con el envejecimiento; en el estado embrionario, por ejemplo, predomina el factor de crecimiento insulínico tipo 2 (IGF2) y con el tiempo se añade el factor de crecimiento transformante (TGF), Sonic Hedgehog (SHH), Wnts y BMP, entre otras. Muchas de estas moléculas son segregadas por los propios PC, que a su vez poseen receptores para regular su producción. A pesar de que estas moléculas se han visto implicadas en procesos de diferenciación y migración, no se ha podido determinar con exactitud su función exacta (6,30,67).

### **Microvascularización**

La interacción LCR-vascularización es un sistema complejo con gran cantidad de vías de regulación que confluyen en la V-SVZ, por lo que lograr entenderlo y poder controlarlo es un reto interesante para proponer diferentes abordajes a problemas derivados del neuroenvejecimiento. La vascularización de la V-SVZ y la ZSG tiene una serie de características concretas que difieren de otras áreas del SNC. Al contrario de lo que cabría esperar, ha sido descrito que la V-SVZ tiene una menor vascularización que otras áreas cerebrales y que, por lo tanto, es un poco más hipóxica. En cambio, la barrera hematoencefálica (BHE) de los vasos sanguíneos de esta región es más permeable, permitiendo la difusión de moléculas que influyen en la regulación neurogénica (68). En el GD también se ha visto cómo con el envejecimiento la microvascularización se va tornando más permeable, abriendo el paso a sustancias proinflamatorias (69). Además, con la edad se produce una reducción en la angiogénesis y la plasticidad (70) paralela a la observada en la capacidad neurogénica.

### **Inflamación crónica y estrés oxidativo**

Una de las hipótesis que se barajan para explicar el declive neurogénico asociado a la edad es que éste podría responder a procesos neuroinflamatorios. Diversos estudios han advertido que la inflamación crónica y/o el estrés oxidativo excesivo produce un aumento de la microglía reactiva, y que ésta contribuye a la liberación de diferentes citoquinas que influyen en la neurogénesis, tanto en la V-SVZ (29,71,72) como en el GD (59). Así pues, al inhibir la microglía se ha observado que hay un aumento de la neurogénesis (73).

Otro parámetro relacionado y que está ampliamente estudiado es el cortisol. Una exposición prolongada a altos niveles de cortisol (no fisiológicos) acelera el neuroenvejecimiento (74). También se ha visto que los glucocorticoides aumentan con la edad en el ratón (75). Por otra parte, se ha descrito que la presencia de receptores de corticoides es mayor en etapas adultas, y que bloqueando los mismos se mejora la neurogénesis, la plasticidad y la cognición de ratas envejecidas (76), dando idea de la importancia del estrés en el SNC y, en particular, sobre la actividad neurogénica.

### ***Ejercicio físico y enriquecimiento ambiental***

Se ha demostrado que el estímulo que produce la actividad tanto física como mental frena el declive de la neurogénesis (74,77–80), aunque se desconoce cuál es la vía que produce dicho efecto o si existen diferencias entre distintos tipos de ejercicio físico o mental. Algunos estudios han intentado averiguar cuál es el momento más eficiente para estimular a los ratones con un ambiente favorable para incrementar la neurogénesis, que parece ser más efectivo durante las 2-3 primeras semanas de vida, aunque la integración completa de las nuevas neuronas generadas en los circuitos neuronales existentes lleva más tiempo (50). Por otra parte, la exposición de ratas a un ambiente enriquecido durante las primeras etapas de su vida podría tener efectos a largo plazo (81). Por tanto, parece claro que tener un estilo de vida activo sería beneficioso también desde el punto de vista de la neurogénesis adulta.

### **1.5 Efecto de la edad sobre la neurogénesis adulta**

En general, existe bastante consenso en cuanto a que hay un declive de la neurogénesis asociado al envejecimiento, sin embargo, no se conocen con exactitud las causas de este fenómeno. La mayor tasa proliferativa en la V-SVZ se alcanza en las primeras etapas postnatales. Progresivamente, se observa una reducción de esta capacidad y en la senectud, la cantidad de precursores ya ha disminuido drásticamente (29,82).

Desde el punto de vista de la edad, varios trabajos han demostrado que existe una disminución en el número de nuevas células que se producen tanto en la V-SVZ como en el GD a lo largo de la vida (29,30,43,61). Dicha reducción parece tener relación con la aparición de algunas enfermedades degenerativas como la enfermedad de Alzheimer o el Parkinson (83). Las diferencias con la edad no sólo son cuantitativas, también se producen cambios a nivel estructural característicos del envejecimiento, como puede ser la reducción del número de células tipo C y A de la V-SVZ, mientras que la población astrocítica y endotelial se mantiene (84,85). Por su parte, el GD del ratón experimenta una reducción

similar en su capacidad proliferativa, si bien ésta es menor y no tan lineal a lo largo de los años (86). En el caso del GD humano, existe una gran controversia sobre el periodo durante el cual esta estructura es capaz de generar nuevas neuronas. Mientras algunos trabajos sostienen que la actividad neurogénica se mantiene en niveles relativamente altos a lo largo de toda la vida (70,87), otros indican que la incorporación de nuevas neuronas disminuye drásticamente durante los primeros años de vida, siendo prácticamente nula en el adulto (88,89).

### **1.6 Función de la neurogénesis adulta**

La función de la neurogénesis adulta es una cuestión que sigue sin una respuesta clara. En cualquier caso, está claro que ésta difiere entre la V-SVZ y el GD, y también entre distintas especies, pero parece un proceso clave para el mantenimiento de la homeostasis en el SNC y su déficit está asociado a diferentes patologías (90). Se tiene constancia, por ejemplo, de que la pérdida de la neurogénesis causa déficits cognitivos importantes (91). También se ha visto cómo la neurogénesis tiene un efecto antidepresivo y que el bloqueo de la misma anula los efectos de los antidepresivos (92,93). Siguiendo con esta línea, por medio de resonancia magnética nuclear se ha visto como los humanos con depresión crónica tienen una reducción del tamaño de su hipocampo (94). No hay que olvidar que el hipocampo forma parte del sistema límbico que regula el comportamiento anímico.



## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En vista de la bibliografía publicada y tras establecer un marco conceptual sobre el problema que suscita el envejecimiento en el SNC y más concretamente en los nichos neurogénicos, planteamos la hipótesis de que el envejecimiento provoca cambios estructurales en la V-SVZ del ratón, en su organización celular y, en consecuencia, en su capacidad proliferativa.

Para comprobar dicha hipótesis definimos los siguientes objetivos generales:

- 1) Evaluar los cambios morfológicos que ocurren en la V-SVZ con el envejecimiento y su potencial implicación en la capacidad neurogénica.
- 2) Evaluar las posibles diferencias en la composición y organización celular de la V-SVZ de ratones envejecidos.
- 3) Determinar el efecto del envejecimiento en la capacidad proliferativa de la V-SVZ.

Para abordar los anteriores objetivos utilizaremos técnicas morfológicas basadas en el uso de microscopía electrónica de transmisión (MET) y de barrido (MEB). Por otra parte, determinaremos si existen diferencias en cuanto a la composición celular de la V-SVZ de ratones envejecidos mediante marcaje inmunohistoquímico de neuroblastos (DCX) y células tipo B (GFAP). Finalmente, evaluaremos si existe una reducción en la proliferación celular de la V-SVZ en ratones envejecidos. Para ello usaremos el marcador de proliferación 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) y posteriormente cuantificaremos las células marcadas al microscopio óptico.



### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los reactivos utilizados fueron adquiridos en la compañía Sigma-Aldrich salvo que se especifique lo contrario.

#### 3.1 Animales de experimentación

Para el estudio presentado en este trabajo de fin de grado se utilizó material biológico previamente obtenido en proyectos de investigación anteriores. El procesamiento llevado a cabo comenzó a partir de secciones de cerebro fijadas, que habían sido conservadas en tampón fosfato 0.1 M (PB) con azida sódica 0.05% a 4 °C hasta el momento de su utilización. Los animales a partir de los cuales se obtuvo dicho material, se estabularon bajo ciclos de 12 h de luz/oscuridad, con disponibilidad de comida y agua *ad libitum* y a una temperatura de 20-24 °C. Se utilizaron 12 ratones (machos y hembras) de la cepa C57BL/6, distribuidos en dos grupos de edad (2 y 24 meses). Todos los procedimientos se llevaron a cabo en cumplimiento de la normativa de la Comisión Europea 2010/63/UE y fueron aprobados por el Comité Ético de Bienestar Animal de la Universitat de València.

#### 3.2 Microscopía electrónica de transmisión

Para el procesamiento de muestras para su estudio por medio de MET se anestesió profundamente a los animales (n=3 ratones por grupo experimental) con pentobarbital sódico (100 mg/Kg; Eutanax, Fatro) y a continuación se perfundieron de forma intracardiaca con solución salina (0.9%) seguido de una solución fijadora consistente en paraformaldehído 2%, glutaraldehído 2.5% en PB (0.1 M, pH 7.4). Una vez finalizada la perfusión, se extrajo el cerebro de los animales y se postfijó en la misma solución fijadora durante toda la noche. Al día siguiente, los cerebros fueron lavados con tampón PB 0.1 M y uno de los hemisferios de cada animal fue reservado para procesarlo para MEB, mientras que el otro fue cortado en secciones de 200 µm con un vibratomo Leica VT1000 S para, una vez seleccionados niveles correspondientes a la V-SVZ, procesarlos para MET. Para ello, las secciones fueron postfijadas con tetraóxido de osmio 2% en PB 0.1 M durante 1 h 30 min, lavadas con agua, deshidratadas en soluciones de concentración creciente de etanol y contrastadas con acetato de uranilo 2% en etanol 70% durante 2 h 30 min. Posteriormente, las secciones fueron infiltradas en resina epoxy Durcupan (Fluka), dejándose durante 72 h en una estufa a 70 °C. Una vez endurecida esta resina, se procedió a obtener cortes ultrafinos (60-70 nm) mediante una cuchilla de diamante en un ultramicrotomo Leica Ultracut UC6. Posteriormente, los cortes ultrafinos fueron contrastados con citrato de plomo (solución de

Reynolds) y analizados con un microscopio electrónico de transmisión FEI Tecnai G<sup>2</sup>Spirit equipado con una cámara digital Morada (Olympus).

### **3.3 Microscopía electrónica de barrido**

A partir del hemisferio reservado en el apartado anterior, se diseccionó la V-SVZ tratando de no dañar la superficie de la pared ventricular. El proceso llevado a cabo para la preparación de muestras para MEB fue similar al descrito para MET hasta el momento en que el tejido fue deshidratado en etanol 100%. Una vez en este paso, las muestras fueron sometidas a un secado por punto crítico de CO<sub>2</sub>. A continuación, las V-SVZ fueron montadas en portas metálicos mediante cinta adhesiva de doble cara y se llevó a cabo un sombreado metálico de oro-paladio justo antes de su observación. Por último, se examinó la superficie de las paredes ventriculares mediante un microscopio electrónico de barrido Hitachi S-4800 equipado con un sistema de captación digital de imágenes Quantax 400 (Bruker).

### **3.4 Estudios de proliferación**

Para detectar la proliferación celular en la V-SVZ se inyectó BrdU. La BrdU es un nucleósido sintético análogo de la timidina que se incorpora al ADN de las células en la fase S del ciclo celular. La BrdU fue preparada a una concentración de 5 mg/mL en solución salina 0.9% y administrada por vía intraperitoneal (50 mg/Kg de peso). Los animales se sacrificaron 2 h después de la inyección, pudiendo detectar posteriormente la incorporación de BrdU mediante el uso de un anticuerpo específico.

### **3.5 Detección inmunohistoquímica**

Los animales fueron fijados con paraformaldehído 4% en PB (0.1 M, pH 7.4) mediante perfusión intracardiaca, del mismo modo al anteriormente descrito. Una vez fijados, los cerebros fueron lavados con PB 0.1 M y crioprottegidos con sacarosa 30% durante 24 h a 4 °C antes de ser cortados. A continuación, se obtuvieron cortes de 25 µm con un criostato Leica CM 1860 UV. Se usaron cortes en flotación en los que se detectaron los marcadores moleculares de interés.

Para la detección de DCX y GFAP por inmunofluorescencia (n=3 ratones por grupo experimental), los cortes fueron lavados con PB 0.1 M y se bloquearon las peroxidasas endógenas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% y metanol 10%. A continuación, las muestras fueron bloqueadas con caseína 1% y suero de cabra 5%. Las incubaciones con los anticuerpos primarios (Tabla 3) se realizaron durante toda la noche a 4 °C. Tras varios lavados y un nuevo bloqueo con suero y caseína, se incubó con anticuerpos secundarios conjugados a fluoróforos (Tabla 4) durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se hicieron lavados con PB 0.1 M y



agua destilada, y se incubaron los cortes con DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) durante 10 minutos. Por último, se realizó el montaje de los cortes con FluorSave™ (Millipore).

**Tabla 3.** Listado de anticuerpos primarios empleados.

<i>Anticuerpo</i>	<i>Especie y dilución</i>	<i>Casa comercial (referencia)</i>	<i>Especificidad</i>
GFAP	Ratón, 1:500	Millipore (MAB360)	Astrocitos
DCX	Conejo, 1:200	Cell Signalling (AV41333)	Neuroblastos
BrdU	Ratón, 1:150	Dako (MO744)	Células en fase S

**Tabla 4.** Listado de anticuerpos secundarios empleados.

<i>Anticuerpo</i>	<i>Especie y dilución</i>	<i>Casa comercial (referencia)</i>	<i>Marcaje</i>
Anti-ratón, IgG	Cabra, 1:500	Invitrogen (A11001)	Alexa 488
Anti-conejo, IgG	Cabra, 1:500	Invitrogen (A21428)	Alexa 555
Anti-ratón, IgG	Cabra, 1:400	Vector Labs (BA-9200)	Biotinilado

Para la detección inmunohistoquímica de BrdU, las secciones se incubaron en HCl 2 N durante 30 minutos a 37 °C, seguido de tampón borato (pH 8.5) e incubación en tampón bloqueo consistente en: Tritón X-100 0.2%, caseína 1% y NGS 5% en tampón fosfato salino 0.1 M (PBS, pH 7.4). Posteriormente, fueron incubadas durante toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 3) y al día siguiente se realizó la incubación (de 1 h) con el anticuerpo secundario biotilado (Tabla 4). A continuación, se llevó a cabo una amplificación de la señal mediante el complejo avidina/biotina (ABC, Vector) y se reveló con 3,3'-diaminobenzidina (0.05%, DAB). Por último, los cortes fueron deshidratados con concentraciones crecientes de alcohol etílico y aclarados en xileno, para finalmente ser montados con Eukitt.

Una vez montadas, las muestras fueron examinadas usando un microscopio Nikon Eclipse 80i equipado con una fuente de fluorescencia, y se obtuvieron fotomicrografías usando una cámara Nikon CCD DS-Qi1Mc.

### 3.6 Análisis estadístico

Para la cuantificación de la proliferación celular en la V-SVZ se contabilizó el número de células marcadas con DAB (BrdU<sup>+</sup>) en al menos 4 niveles por animal (n=3 ratones por grupo experimental). Los datos resultantes se expresaron como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM) y se realizó un análisis estadístico mediante Microsoft Excel y GraphPad Prism. En primer lugar, se comprobó la normalidad de la muestra usando el test de Kolgomorov-Smirnov. A continuación, se utilizó una prueba *t* de Student bilateral para muestras no apareadas para comparar si existían diferencias en la proliferación celular entre los dos grupos experimentales analizados. Se consideraron estadísticamente significativas las diferencias con *p*-valores < 0.05.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Efecto del envejecimiento en la organización celular de la V-SVZ

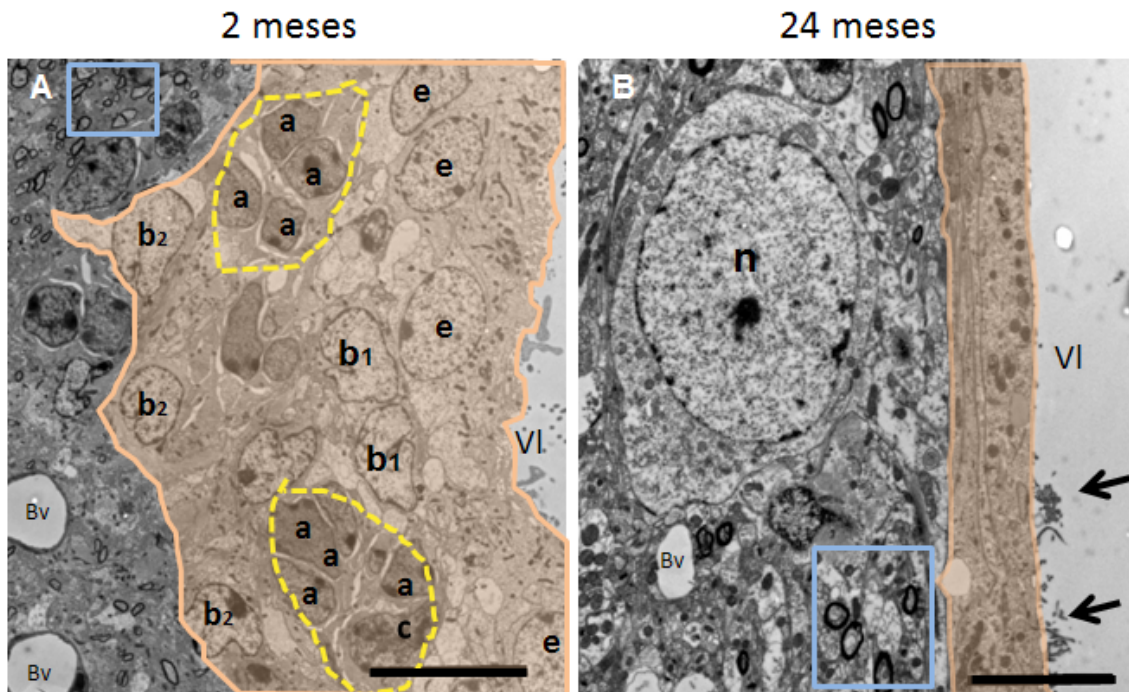
En primer lugar, realizamos un estudio morfológico analizando la estructura y organización celular de la V-SVZ. Para ello, estudiamos dicha región mediante microscopía electrónica de transmisión y de barrido. En general, aunque observamos cierta variabilidad entre individuos de la misma edad, pudimos detectar cambios evidentes entre los individuos de 2 y 24 meses de edad.

La primera característica que llamó nuestra atención respecto a la V-SVZ de animales envejecidos cuando los estudiamos mediante MET fue un importante estrechamiento del nicho neurogénico que, además, presentaba una menor celularidad (Figura 6A, B). Este hecho resultó muy evidente, ya que en este grupo experimental llamaba atención que las neuronas y axones mielínicos del estriado presentaban una disposición más cercana a la cavidad ventricular que en individuos adultos jóvenes (Figura 6B).

Cuando estudiamos los distintos tipos celulares que constituyen la V-SVZ, también encontramos diferencias tanto en composición, como a nivel subcelular entre ambos grupos experimentales:

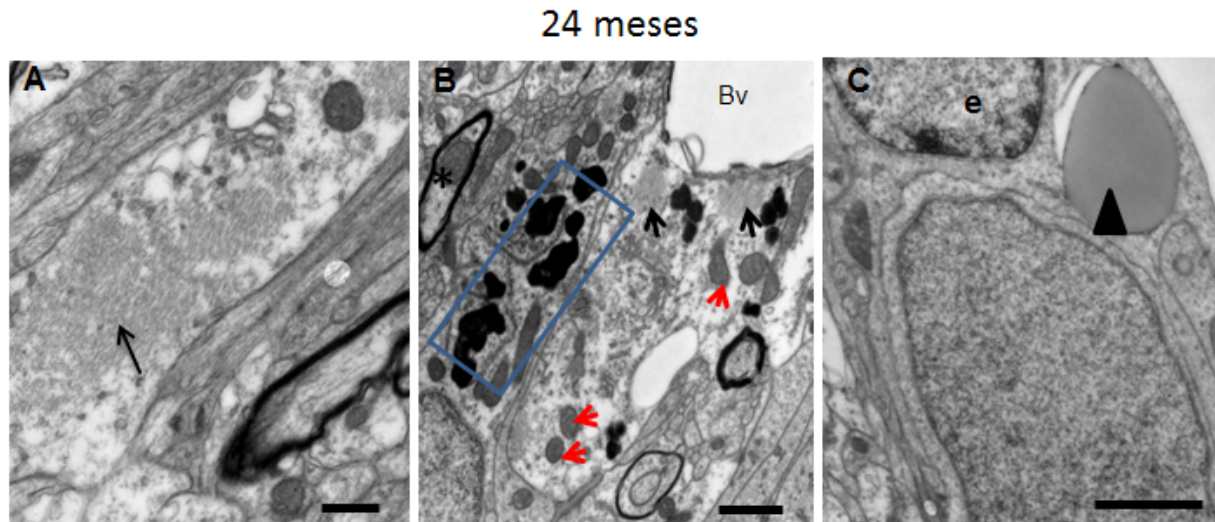
Los astrocitos, en general, son células relativamente grandes e irregulares debido a que se intercalan entre células contiguas a las que dan soporte. Tienen un citoplasma abundante, electrolúcido, y su retículo endoplásmico rugoso está bien desarrollado. Dentro de la población de astrocitos, pudimos distinguir células B1, en contacto con la cavidad ventricular, y que presentaban, aparentemente, un citoplasma más abundante que las células B2, así como una cromatina menos compacta (Figura 6A). En general, encontramos escasas células B1 en los ratones de 24 meses, si bien, la reducción en el número de células afectaba, en mayor o menor medida, a todos los tipos celulares estudiados. Otra de las características de este tipo celular es la presencia de filamentos intermedios, la cual resultaba evidente al examinar el grupo de ratones de 2 meses de edad. Sin embargo, con el envejecimiento observamos que los astrocitos de esta región presentaban una mayor densidad de filamentos intermedios, haciéndolos más fibrosos (Figura 7A). A su vez, como se ve en la Figura 7B, en los ratones de 24 meses también observamos una acumulación de gránulos de lipofusina, material que corresponde a residuos de contenido lipídico resultado de la digestión lisosomal. Estos acúmulos, contrastaban con las grandes gotas lipídicas, mayores y menos electrodensas, que encontrábamos en las células ependimarias (Figura

7C). Estas gotas lipídicas también estaban presentes en ratones de 2 meses, pero su tamaño era inferior.



**Figura 6. Organización celular de la V-SVZ en ratones jóvenes y envejecidos.** Se muestra el espesor de la V-SVZ pseudocoloreada en color marrón. **(A)** En el ratón de 2 meses se observa un espesor de 5-6 capas de células con una organización muy concreta. Las células endimarias (e) tapizan la luz del ventrículo lateral (VI). Subyacente a la capa endimaria, podemos encontrar células B1, correspondientes a células madre neurales, con características de astrocitos, y con expansiones apicales que contactan con el VI por medio de un cilio primario y expansiones basales que suelen contactar con vasos sanguíneos (Bv). También se observan numerosas cadenas de neuroblastos (línea amarilla discontinua) compuestas por jóvenes neuronas inmaduras (células tipo A) y algunas células de amplificación transitorias (células tipo C). Los neuroblastos poseen un citoplasma escaso y varios nucleolos. Por el contrario, las células tipo C poseen una cromatina más laxa y tienen más invaginaciones nucleares. Además, en la V-SVZ encontramos astrocitos que no contactan con la cavidad ventricular (células B2). Adyacente a la V-SVZ encontramos el estriado, donde podemos observar neuronas adultas (N) y axones mielínicos (recuadro azul). **(B)** En el ratón de 24 meses de edad, encontramos una drástica disminución en el espesor de la V-SVZ, que sólo cuenta con 1-2 capas de células en la mayor parte de su extensión. Los citoplasmas que se observan en la imagen corresponden a células

ependimarias con profundas interdigitaciones. En la luz del VI pueden observarse escasos cilios y microvellosidades (flecha). Barras de escala: (A) 10  $\mu\text{m}$ , (B) 5  $\mu\text{m}$ .



**Figura 7. Cambios característicos del envejecimiento a nivel subcelular.** (A) Se observa el citoplasma de un astrocito con una gran cantidad de filamentos intermedios (flecha negra). (B) Alrededor de los vasos sanguíneos (Bv) se encuentran expansiones de astrocitos. Con el paso del tiempo, estas células acumulan los denominados cuerpos de lipofuscina (caja azul). También observamos haces de filamentos intermedios (flecha negra). Las flechas rojas indican la presencia de mitocondrias. (C) Se muestra una célula ependimaria (e) con una gran gota lipídica en su citoplasma (cabeza de flecha). Barras de escala: (A) 500 nm, (B) y (C) 1  $\mu\text{m}$ .

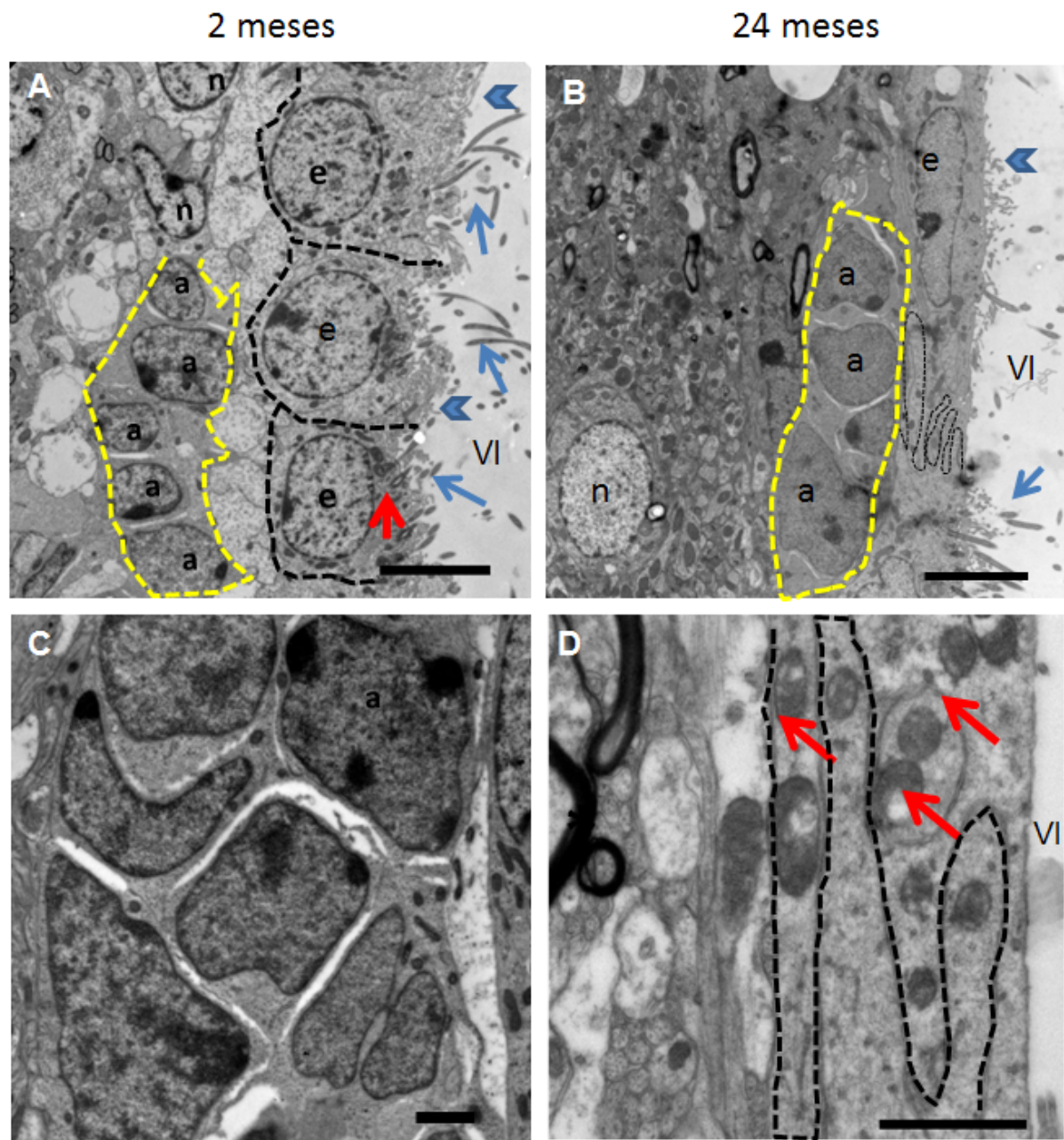
Las células ependimarias también presentaban interesantes diferencias entre ambos grupos experimentales. En el caso de los ratones de 2 meses de edad, encontramos un mayor número de células, con citoplasma voluminoso, morfología cúbica y núcleo redondeado (Figura 8A). Cada una de estas células presenta un penacho de cilios en su superficie apical que impulsa el LCR de la cavidad ventricular con un movimiento de batido. También era característica la presencia de una alta densidad de mitocondrias en la parte apical de la célula, próximas a los corpúsculos basales que sirven de anclaje a los cilios. En el caso de los animales envejecidos del grupo de 24 meses, el número de células ependimarias era mucho inferior, estando los núcleos de éstas mucho más separados que en los individuos jóvenes. Como consecuencia de esto, la morfología de estas células era totalmente distinta, con citoplasmas elongados y aplanados para compensar espacialmente

la pérdida de células (Figura 8B). Además, las células presentaban profundas interdigitaciones para mantener la cohesión de esta capa ependimaria (Figura 8D). Los penachos de cilios, en el caso del grupo de animales de 24 meses aparecen más separados unos de otros, y las mitocondrias asociadas a éstos, más dispersas a lo largo de todo el citoplasma (Figura 8B).

Los neuroblastos (células tipo A) aparecían en el grupo de ratones de 2 meses de edad formando agrupaciones o cadenas que, según la bibliografía, migran hacia el bulbo olfatorio siguiendo la corriente migratoria rostral. Según nuestro estudio, son células con morfología fusiforme y muy electrodensas al MET por la alta densidad de ribosomas libres presentes en su citoplasma, aunque en general contienen pocos orgánulos. Presentaban núcleos poco invaginados, con varios nucleolos. Otra característica importante de este tipo celular es la presencia de espacios libres entre células adyacentes, facilitando la migración de éstas (Figura 8C). Estas cadenas de neuroblastos, solían estar rodeadas por expansiones celulares de astrocitos tipo B2, y eran mucho más abundantes y más pobladas (con mayor número de células) en ratones jóvenes que en ratones envejecidos (Figura 6A, 8A-C).

Las células de amplificación transitorias (células tipo C) suelen tener núcleo profundamente invaginado, se localizan en la proximidad de cadenas de neuroblastos y tienen un tamaño mayor que éstos. No encontramos grandes diferencias en este tipo celular al comparar animales de 2 y 24 meses. Sin embargo, al igual que otros tipos celulares, también las encontramos con menor frecuencia en la V-SVZ de animales envejecidos.

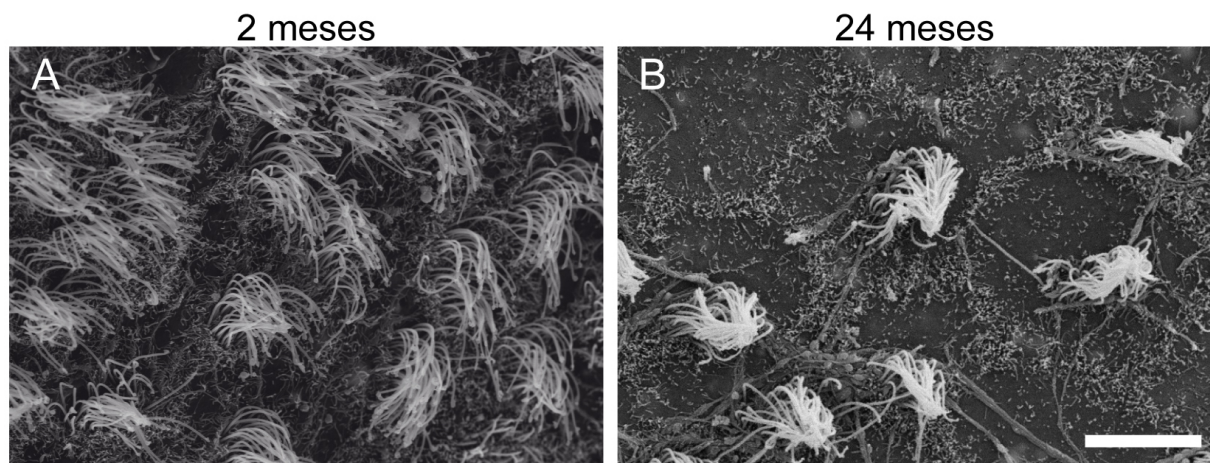
Una de las principales diferencias que observamos al comparar la V-SVZ entre ambos grupos experimentales, fue la organización de las células ependimarias, que en el caso de los animales de 24 meses aparecían en menor número y con una morfología muy elongada. Por ello, intentamos obtener más información sobre este tipo celular realizando un estudio *en face* de paredes ventriculares mediante microscopía electrónica de barrido, lo que nos permitió examinar la superficie de la pared ventricular.



**Figura 8.** El número y disposición de células endimarias y neuroblastos es distinta en la V-SVZ de ratones de 2 y 24 meses de edad. **(A)** Tapizando el ventrículo lateral (VI) se encuentran las células endimarias (e) de un ratón joven. En su extremo apical tienen un penacho con numerosos cilios (flechas azules) y microvellosidades (cabezas de flecha). Se observan grupos de mitocondrias (flecha roja) en la superficie apical de la célula, cerca de los corpúsculos basales de los cilios. **(B)** En animales envejecidos, las células endimarias (e) son más escasas y se mantienen unidas formando profundas interdigitaciones (línea negra discontinua). Se observan microvellosidades (cabeza de

flecha) y los cilios son también más escasos que en animales jóvenes (flecha azul). **(C)** Se muestra una cadena con abundantes neuroblastos (células tipo A) de un ratón joven, con los característicos espacios libres a su alrededor. **(D)** Detalle de las interdigitaciones (línea negra discontinua) formadas por las células endimarias en animales envejecidos. Se observan también mitocondrias (flechas rojas) más dispersas que animales jóvenes. Barras de escala: (A) y (B) 5  $\mu\text{m}$ , (C) 2  $\mu\text{m}$ , (D) 1  $\mu\text{m}$ .

Como se puede observar en la Figura 9A, en el ratón joven de 2 meses de edad, las células endimarias que forman la pared ventricular tenían la superficie apical prácticamente cubierta por penachos de cilios, más o menos equidistantes unos con otros. Entre estos penachos de cilios, podrían observarse pequeñas microvellosidades. Sin embargo, en ratones de 24 meses observamos que los penachos de cilios estaban mucho más distantes unos de otros, quedando la superficie celular mucho más expuesta que en el caso del otro grupo experimental (Figura 9B). Incluso encontramos células que carecían de cilios, y daba la impresión de que la superficie que abarca cada célula es mayor en este caso, pudiendo delimitar cada célula por un ribete de microvellosidades en la periferia de éstas. Por otra parte, los penachos de cilios de las células endimarias de ratones envejecidos, parecen estar adheridos unos con otros, a diferencia de lo que observamos en los animales jóvenes, si bien no descartamos que este aspecto podría responder a un artefacto de la técnica empleada.



**Figura 9. Imágenes de microscopía electrónica de barrido mostrando la superficie de las paredes ventriculares de ratones de 2 y 24 meses de edad.** En estas dos imágenes se visualiza la superficie de las paredes laterales del ventrículo lateral, por lo que estamos



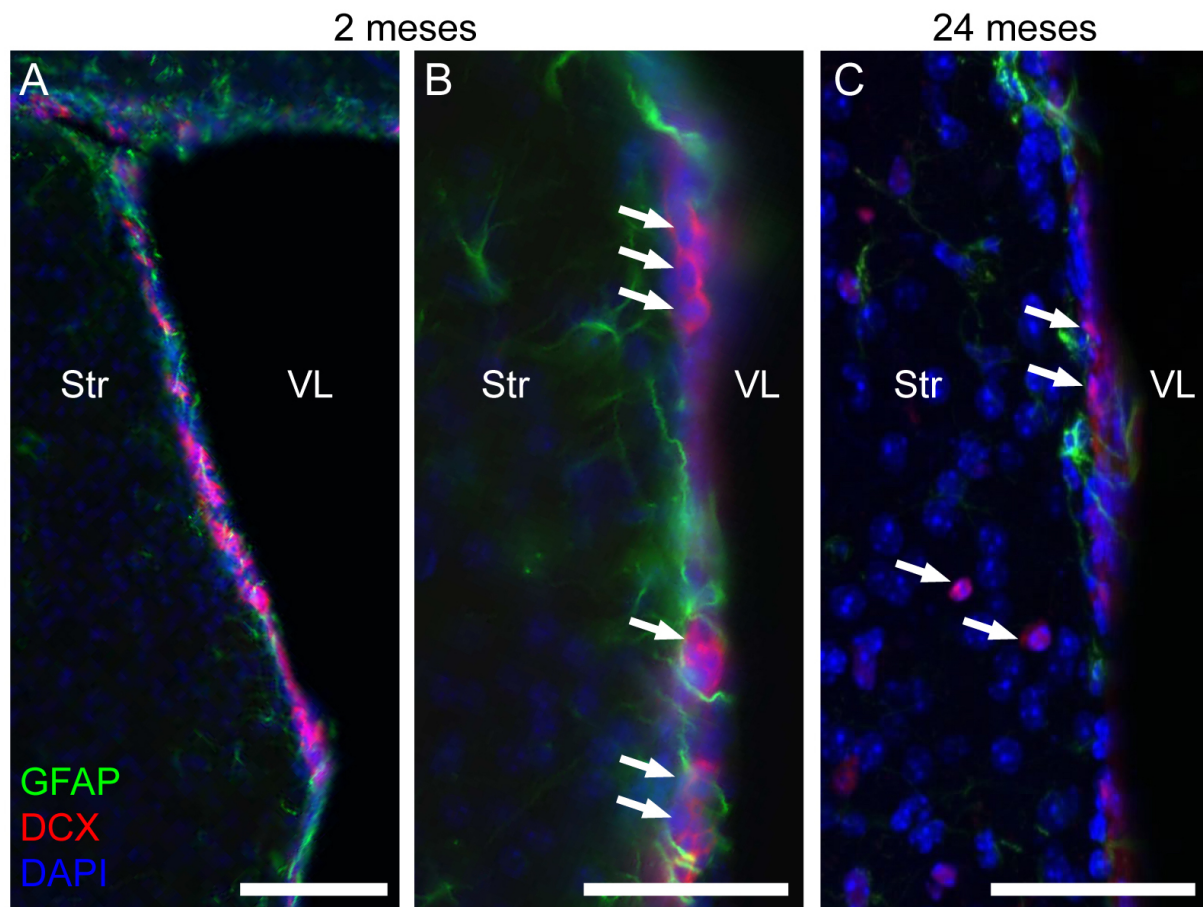
observando células endimarias y sus cilios y microvellosidades. **(A)** En el ratón de 2 meses de edad, se observa una gran densidad de penachos de cilios; teóricamente cada penacho corresponde a una célula endimaria. **(B)** En el ratón de 24 meses se observa una reducción en el número de penachos debido a la pérdida de células endimarias. Además, los cilios parecen apelmazados unos con otros. En la superficie de las células observamos también ribetes de pequeñas microvellosidades que delimitan el contorno de las células, y largas fibras que corresponden a axones supraendimarios. Barra de escala: 10  $\mu\text{m}$ .

#### **4.2 Efecto del envejecimiento en la expresión de marcadores moleculares**

Para investigar de forma más profunda los cambios observados en la organización celular de la V-SVZ de animales envejecidos, nos propusimos llevar a cabo un estudio de la expresión de marcadores moleculares específicos de algunos de los tipos celulares de esta región neurogénica. Para ello, realizamos un marcaje por inmunofluorescencia mediante el marcador de neuronas inmaduras DCX, y el marcador de astrocitos GFAP. Además, incluimos un marcaje nuclear con DAPI para poder identificar el núcleo del resto de células en la V-SVZ.

Así pues, en la Figura 10A se puede observar en una imagen panorámica la amplia distribución de neuroblastos a lo largo de toda la V-SVZ en los animales de 2 meses de edad. En mayor detalle, en este mismo grupo experimental, observamos que los neuroblastos se encuentran mayoritariamente agrupados y confinados a la V-SVZ (Figura 10B). Intercalados entre éstos, podemos encontrar células positivas para GFAP, correspondientes a astrocitos. Por último, encontramos algunas células cuyo núcleo está marcado con DAPI, pero negativas para DCX y GFAP, que corresponden a otros tipos celulares.

Cuando comparamos con el ratón de 24 meses de edad, observamos que los neuroblastos son mucho menos frecuentes en los animales más viejos, existiendo grandes distancias entre unas agrupaciones y otras (Figura 10C). Curiosamente, en este último panel se pueden observar dos células marcadas con DCX localizadas en el estriado adyacente, hecho que contrasta con la localización de estas células en animales jóvenes.

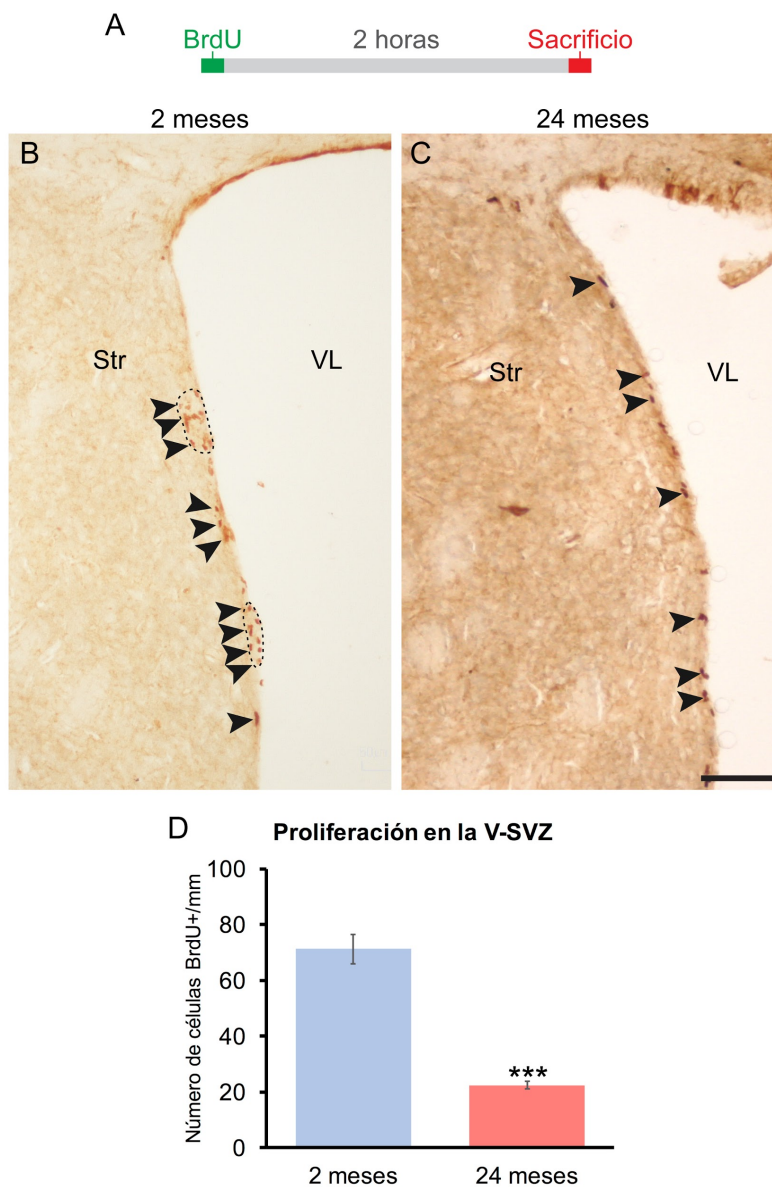


**Figura 10. Marcaje por inmunofluorescencia de la V-SVZ de ratones de 2 y 24 meses.** Los tres paneles corresponden a un marcaje doble con un marcador de neuroblastos (DCX, rojo) y astrocitos (GFAP, verde). En azul se tiñeron los núcleos con DAPI. **(A)** Imagen panorámica de la V-SVZ de ratón de dos meses. A la derecha de ésta se encuentra el ventrículo lateral (VL) y a la izquierda el estriado (Str). A lo largo de la S-SVZ se pueden identificar numerosas células positivas para DCX correspondientes a neuroblastos. **(B)** Detalle de cadenas de neuroblastos (flechas) y astrocitos intercalados con numerosas expansiones citoplasmáticas en un ratón de 2 meses de edad. **(C)** En el ratón de 24 meses de edad, las cadenas de neuroblastos son mucho menos numerosas y pobladas (flechas). Barras de escala: 100 µm.

#### 4.3 Efecto del envejecimiento en la proliferación celular de la V-SVZ

Finalmente, con la intención de llevar a cabo un análisis cuantitativo de la proliferación celular en la V-SVZ, inyectamos BrdU a ratones de 2 y 24 meses de edad, sacrificándolos a las 2 horas de la inyección (Figura 11A).

La incorporación de BrdU a las células de la V-SVZ en división fue detectada inmunohistoquímicamente con DAB. Como resultado, el núcleo de las células que durante esas 2 horas tras la inyección entraron en fase de síntesis incorporando BrdU en su ADN se marcaron con un color marrón oscuro (Figura 11B y 11C). A continuación, realizamos una cuantificación del número de células positivas para BrdU, observando un número significativamente menor en el grupo de ratones de 24 meses de edad (Figura 11D; *t*-student,  $p=0.0009$ ). Estos resultados sugieren que en ratones el envejecimiento está acompañado de una disminución en la capacidad proliferativa de la V-SVZ.



**Figura 11. Cuantificación de la proliferación en la V-SVZ en ratones de 2 y 24 meses mediante marcaje con BrdU. (A)** Diagrama indicando el protocolo de administración de

BrdU. **(B y C)** Se pueden identificar en marrón oscuro los núcleos de las células que han incorporado BrdU (cabeza de flecha). En el caso del animal joven destaca el hecho de que encontramos grandes agrupaciones de células positivas para BrdU (rodeadas con línea discontinua). **(D)** La cuantificación del número de células positivas para BrdU en animales de 2 y 24 meses de edad indica una disminución de la proliferación con el envejecimiento (grupo 2 meses, n=3 ratones, media  $\pm$  SEM  $71.18 \pm 5.31$ ; grupo 24 meses, n=3 ratones, media  $\pm$  SEM  $22.42 \pm 1.28$ ). \*\*\* indica  $p < 0.001$ . Barra de escala: 100  $\mu$ m.

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1 El envejecimiento afecta a la estructura y capacidad proliferativa de la V-SVZ

El envejecimiento es un concepto no bien definido desde el punto de vista biológico, y hay que diferenciar el proceso que ocurre de forma fisiológica, de los procesos neurodegenerativos que, a pesar de tener fisiopatología bien estudiada, no responden al proceso “normal” de senescencia. Dicho proceso ocurre de forma continua, sin embargo, la mayoría de estudios en el campo de la neurogénesis adulta analizan edades extremas para la obtención de datos, perdiendo información importante que se recogería mediante un seguimiento continuo a lo largo de la vida. No obstante, este tipo de estudios implican una dificultad intrínseca que muchas veces los hace inviables. En este sentido, nuestro estudio analiza ratones de 2 y 24 meses, edades que vienen a reflejar la madurez del ratón, y estadios senescentes.

En nuestros experimentos hemos encontrado resultados que concuerdan con la literatura existente en cuanto al efecto del envejecimiento sobre la neurogénesis adulta. En primer lugar, hemos observado mediante MET un adelgazamiento de la V-SVZ que puede tener un doble motivo: por un lado, la disminución en el número de células progenitoras y, por lo tanto, una menor incorporación de nuevas células; y por otro lado, la muerte de las células preexistentes. Existen varios trabajos publicados indicando disminuciones similares en la densidad celular de los nichos neurogénicos (29,84,85).

A nivel celular y subcelular hemos encontrado interesantes diferencias entre los grupos de 2 y 24 meses de edad. En los astrocitos de ratones envejecidos resultó llamativa la abundante presencia de filamentos intermedios en su citoplasma, así como de cuerpos densos, hecho que concuerda con la bibliografía, y que sugiere la pérdida de algunas de las características propias de las CMN (29,30). Según nuestro análisis, estas células parecen corresponder a astrocitos de tipo reactivo (31). Por otra parte, la gran cantidad de cuerpos densos o de lipofuscina encontrados en los astrocitos de estos ratones podría ser producto de procesos de degradación celular que no se han podido eliminar y que han ido acumulándose en el citoplasma a lo largo de la vida de la célula.

La pérdida de astrocitos B1 en la V-SVZ del cerebro envejecido podría indicar una capacidad regenerativa disminuida, la cual contribuiría al adelgazamiento e hipocelularidad observados en la V-SVZ. Es posible también que dicha alteración en la estructura u organización celular del nicho neurogénico pudiera dar lugar a la alteración de los mecanismos de regulación que controlan la proliferación de las células B1 y C en

condiciones fisiológicas en el adulto joven. Por ejemplo, cabe señalar que las células B1 tienen contacto con el VI por medio de un cilio primario que actúa como receptor de diferentes señales provenientes del LCR (35,95), por lo que la alteración estructural del nicho podría afectar a dicho mecanismo de regulación. De modo parecido, tanto las expansiones basales de las células B1, como las células B2 localizadas en las zonas más internas de la V-SVZ, están en contacto con los vasos sanguíneos que irrigan el nicho (15,67), por lo que la alteración de la organización celular podría afectar también a la regulación mediada por señales a través de la BHE.

Otra alteración característica del envejecimiento que hemos observado afecta a las células endimarias. Por un lado, el cambio de su morfología cúbica a aplanada puede ser explicada debido a que al ser células sin capacidad de autorregeneración (17,29), la pérdida progresiva de las mismas podría generar un problema espacial. Como la superficie ventricular deber seguir estando tapizada con un menor número de células, puede que las CE se “estiren” para ocupar el espacio de las células perdidas. Estas células también albergan cambios interesantes en su parte apical. En nuestro estudio de la superficie de la pared ventricular mediante MEB apreciamos una reducción en la densidad de penachos de cilios, lo cual puede responder al mismo motivo que acabamos de señalar. Sin embargo, no sólo se ve una reducción en la densidad de cilios, sino que también se aprecia que los cilios están más compactados entre sí, lo que se podría traducir en una disfuncionalidad de los mismos y, por lo tanto, peor eficiencia para batir el LCR. Bien es sabido que un flujo de LCR deficiente está relacionado con patologías inflamatorias, vasculares y degenerativas del SNC (96). Una explicación alternativa para la reducción de la densidad ciliar, y posiblemente la alteración de su función, podría responder a las diferencias en la distribución de las mitocondrias asociadas a los corpúsculos basales de los cilios. En el ratón joven las encontramos cercanas a la membrana apical de las CE, frecuentemente asociadas a dichos corpúsculos basales (15), probablemente para aportarles la energía necesaria para su batido. En cambio, en animales envejecidos las mitocondrias son menos numerosas y adquieren una distribución más aleatoria, lo que sugiere que el batido ciliar podría estar también afectado.

La morfología que hemos observado en los neuroblastos y las cadenas que éstos forman desde la V-SVZ hasta el BO a lo largo de la corriente migratoria rostral también concuerda con la literatura. Su aspecto fusiforme y los abundantes espacios intercelulares libres son característicos de células en migración (15). En ratones envejecidos, observamos una drástica disminución en el número de estas neuronas jóvenes marcadas con DCX. Este

hecho parece lógico en base a nuestros datos sobre la proliferación celular en la V-SVZ de ratones de 24 meses, que indican una significativa reducción en la producción de nuevas células. No obstante, este último experimento tiene a su vez ciertas limitaciones. Por un lado, nosotros cuantificamos células que han entrado en división mediante el uso del marcador BrdU, el cual mantiene sus niveles en sangre durante unas 2 horas en el ratón (97), tras las cuales sacrificamos al animal. Ese tiempo es sustancialmente más corto que la duración del ciclo celular de las células de la V-SVZ (98), por lo que no estaríamos marcando todas las células activas con esa única dosis de BrdU. Por otra parte, para establecer qué fracción de las células marcadas corresponden a la población de neuroblastos deberíamos haber hecho un doble marcaje con BrdU y DCX. No obstante, la intención de nuestro estudio consistía en comparar la capacidad proliferativa entre ratones adultos jóvenes y envejecidos, por lo que una cuantificación más precisa se escapaba al propósito de nuestro estudio. Por último, varios autores apuntan que existe un *pool* de células precursoras quiescentes (99–101), a la espera de recibir una señal de activación, por lo que en cualquier caso estaríamos subestimando el potencial proliferativo de la V-SVZ incluso utilizando protocolos de marcaje más prolongados. Por qué se produce este bloqueo en la neurogénesis sigue siendo una pregunta sin una respuesta clara, si bien la explicación más sencilla sería la de mantener un reservorio de CMN ante una futura demanda. En cualquier caso, parece necesario un mayor conocimiento de los mecanismos que controlan la transición entre CMN quiescentes y activas, y viceversa.

La neurogénesis adulta tiene una compleja regulación basada en una gran red de interacciones, por lo que estudiar y entender unos pocos factores aislados fuera de un contexto fisiológico, puede dar lugar a resultados dispares. Por ejemplo, algo que bibliográficamente está bien demostrado es el efecto inductor del ejercicio físico y la actividad mental sobre la neurogénesis adulta (78–80). Sin embargo, la mayoría de experimentos en este sentido, se realizan con ratones estabulados con ruedas para correr de forma voluntaria, y juguetes para estimular la exploración y la resolución de problemas, comparado con un grupo control de animales estabulados en prácticamente ausencia de estímulos. Ambos grupos viven en condiciones muy artificiales respecto a las de ratones en libertad. Cabría preguntarse si este tipo de experimentos serían extrapolables a la especie humana, mucho más heterogénea en sus hábitos y estilos de vida. Es más, incluso aceptando el hecho de que el ejercicio y el enriquecimiento ambiental puedan tener un efecto inductor en la neurogénesis adulta, seguimos sin responder cuestiones como qué tipo

de deporte es más favorable, qué cantidad sería necesaria, y si es igualmente favorable en cualquier etapa de la vida.

De la reflexión anterior surge también la pregunta sobre cuánto de lo aprendido a partir de los experimentos realizados con modelos animales como el ratón (el organismo en el que se ha realizado la mayoría de estudios sobre neurogénesis adulta) son extrapolables a la especie humana. Si bien es cierto que ambas especies comparten una gran parte de su genoma, existen diferencias importantes tanto a nivel neuroanatómico como funcional. Por ello, aunque totalmente necesarios, la interpretación de datos obtenidos a partir de organismos modelo siempre conlleva ciertas limitaciones, especialmente en el campo de la medicina regenerativa (102,103).

## **5.2 Implicaciones de la neurogénesis adulta en el cerebro humano**

El estudio de la neurogénesis adulta en humanos representa un problema con muchas aristas, principalmente por la dificultad que entraña la obtención de muestras de un órgano poco accesible como el cerebro, que en el caso de la especie humana implica una serie de limitaciones. La más importante de ellas es, probablemente, la dificultad de recolectar muestras *post mortem* en condiciones óptimas, ya que existe un deterioro tanto a nivel morfológico como molecular inherente al tiempo legal necesario para procesar este tipo de tejido (106,107). Además de estos problemas técnicos, nos encontramos también con el de la variabilidad interpersonal. Puesto que la neurogénesis es un proceso regulado por una serie de factores altamente intrincados (47), es difícil encontrar cohortes de muestras humanas con unas características homogéneas. Factores como la dieta, el estilo de vida, el ejercicio físico, el estrés, o la exposición a tóxicos o fármacos pueden resultar en una variabilidad interindividual que dificulte la interpretación de los resultados obtenidos. Por todo ello, se hacen necesarios estudios que obtengan y analicen muestras obtenidas de un modo sistemático y reproducible.

La primera evidencia de la incorporación de nuevas neuronas a la capa granular del GD del hipocampo fue aportada en 1998 por el grupo de Fred H. Gage estudiando pacientes oncológicos que habían recibido una pequeña dosis de BrdU con fines diagnósticos. El GD de cinco de estos pacientes fue analizado *post mortem*, encontrando abundantes células marcadas con BrdU, que además expresaban el marcador neuronal NeuN y que presentaban morfología de neuronas granulares (48). Más recientemente, el grupo dirigido por Jonas Frisén utilizó un ingenioso sistema para datar la edad de las neuronas hipocampales de 55 cerebros humanos de distintas edades. El método que utilizaron está



basado en la incorporación de  $^{14}\text{C}$  al DNA de células que entran en división a lo largo de la vida. Comparando los niveles de dicho isótopo en el DNA de neuronas hipocampales, con los valores de concentración atmosférica de  $^{14}\text{C}$  a lo largo del siglo XX, pudieron estimar mediante un modelo matemático el recambio neuronal que habría en el hipocampo humano (87). No obstante, ambos estudios han sido cuestionados con posterioridad por la dificultad para ser replicados por otros grupos independientes (88). En cualquier caso, estos dos trabajos defienden la capacidad neurogénica del cerebro humano incluso en edades avanzadas (superiores a los 80 años), lo que implicaría que el envejecimiento podría no afectar de forma drástica a la producción de nuevas neuronas en los humanos. Nuestros resultados, con sus limitaciones, sugieren que existe una disminución significativa en la proliferación de las células de la V-SVZ, sin embargo, en ratones de 24 meses de edad todavía fue posible encontrar células que habían incorporado BrdU, lo cual concuerda con estos dos estudios en humanos. Otros estudios realizados en ratones (29,30) coinciden con la idea de una disminución en la capacidad neurogénica de la V-SVZ, la cual conlleva una importante reducción en la densidad celular de la CMR (44).

Curiosamente, estudios recientes utilizando 59 y 44 muestras humanas respectivamente (88,89), han observado una disminución drástica en el número de neuronas jóvenes presentes en el GD durante los primeros años de vida, concluyendo que la neurogénesis era muy escasa o incluso nula en la edad adulta. Estos trabajos han abierto de nuevo un gran debate en el campo, especialmente por la publicación casi simultánea de otro estudio que analizaba el mismo aspecto en el hipocampo de 28 donantes de entre 14 y 79 años de edad. Dicho trabajo concluye que la neurogénesis persiste en el hipocampo humano incluso con el envejecimiento, indicando que el número de progenitores neurales, neuronas inmaduras, neuronas granulares, y el volumen del DG se mantienen estables a lo largo de toda la vida (70). Los autores de dicho trabajo, y otros, argumentan que sus resultados concuerdan con los obtenidos mediante técnicas indirectas mediante datación con  $^{14}\text{C}$  (70,87,108). Sin embargo, otros autores observan disminuciones en la neurogénesis similares a las descritas por Sorrells *et al.*, tanto en el GD (109-111) como en la V-SVZ (45,111,112).

La explicación a estas llamativas discrepancias todavía no está clara. Algunos de estos trabajos ponen en cuestión aspectos como la fiabilidad de determinados marcadores moleculares, la buena preservación del tejido, o los antecedentes personales de los donantes (108). Por ejemplo, se ha observado que el marcador DCX podría no ser específico únicamente de precursores neuronales en el hipocampo humano adulto, siendo

necesario combinarlo con otros marcadores como PSA-NCAM para identificar estas células de forma fehaciente (88). Lo mismo puede ocurrir al medir la proliferación con el marcador de proliferación Ki-67, ya que la microglía sigue dividiéndose a lo largo de toda la vida. Por tanto, nos encontramos en un campo que deberá revisarse en el futuro para esclarecer si existe un aporte de nuevas neuronas en el cerebro humano adulto. En lo que respecta al envejecimiento, de confirmarse la ausencia de una neurogénesis adulta activa en el humano, deberemos cuestionarnos qué diferencias fisiológicas y funcionales existen entre los humanos y organismos modelo como el ratón. Otros animales con cerebros y longevidades mayores que los roedores (como los delfines, ballenas o marsopas) también carecen de neurogénesis en etapas adultas (105,112-114). Por tanto, parece razonable cuestionarse desde el punto de vista del envejecimiento si existen en estas especies mecanismos compensatorios, como la plasticidad neuronal, que tengan un papel más importante del que pensábamos.

Las implicaciones de este debate son de gran interés desde el punto de vista médico, ya que afectan al entendimiento y a las perspectivas terapéuticas sobre diversas enfermedades neurológicas. Quizás una de las ideas más interesantes en este sentido sea la de investigar si existe algún tipo de señal que sea capaz de reactivar la actividad neurogénica. Apoyando esta idea se han publicado estudios interesantes basados en modelos de parabiosis heterocrónica, en los que se consigue restaurar la neurogénesis en el cerebro de ratones viejos, y de forma similar, acelerar la senescencia en el cerebro de ratones jóvenes (84), lo que sugiere que los nichos neurogénicos podrían tener la capacidad de responder ante determinados estímulos sistémicos.

### **5.3 Conclusiones**

Nuestros resultados confirman que el envejecimiento produce cambios estructurales y funcionales en la V-SVZ de ratón. La principal diferencia que encontramos, respecto a ratones adultos jóvenes, fue el adelgazamiento del nicho neurogénico, con una importante reducción en la densidad celular. También encontramos cambios a nivel subcelular, como la acumulación de cuerpos densos, el estrechamiento de las células endoteliales, y el aumento de astrocitos fibróticos. Por último, también observamos una reducción estadísticamente significativa en la proliferación celular de la V-SVZ de animales envejecidos. Desconocemos con exactitud las causas subyacentes a estas alteraciones y cuándo se manifiestan a lo largo de la vida, por lo que consideramos necesario llevar a cabo nuevos estudios más profundos que respondan a estas preguntas.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Altman J, Das GD. Autoradiographic examination of the effects of enriched environment on the rate of glial multiplication in the adult rat brain. *Nature*. 1964 Dec 19;204:1161–3.
2. Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol*. 1965;124(3):319–35.
3. Altman J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol*. 1969;137(4):433–57.
4. Lois C, Alvarez-Buylla A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*. 1994 May 20;264(5162):1145–8.
5. Carleton A, Petreanu LT, Lansford R, Alvarez-Buylla A, Lledo P-M. Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nat Neurosci*. 2003 May;6(5):507–18.
6. Ihrie RA, Alvarez-Buylla A. Lake-front property: a unique germinal niche by the lateral ventricles of the adult brain. *Neuron*. 2011 May 26;70(4):674–86.
7. Nottebohm F. Neuronal Replacement in Adulthood. *Ann NY Acad Sci*. 1985 Dec;457(1 Hope for a Ne):143–61.
8. Gage FH, Ray J, Fisher LJ. Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS. *Annu Rev Neurosci*. 1995;18:159–92.
9. Suhonen JO, Peterson DA, Ray J, Gage FH. Differentiation of adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons in vivo. *Nature*. 1996 Oct 17;383(6601):624–7.
10. Seri B, Garcia-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci*. 2001;21(18):7153–60.
11. Seri B, Garcia-Verdugo JM, Collado-Morente L, McEwen BS, Álvarez-Buylla A. Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *J Comp Neurol*. 2004;478(4):359–78.
12. Migaud M, Batailler M, Segura S, Duittoz A, Franceschini I, Pilon D. Emerging new sites for adult neurogenesis in the mammalian brain: a comparative study between the hypothalamus and the classical neurogenic zones. *Eur J Neurosci*. 2010;32(12):2042–52.

13. Alfaro-Cervello C, Soriano-Navarro M, Mirzadeh Z, Álvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM. Biciliated ependymal cell proliferation contributes to spinal cord growth. *J Comp Neurol*. 2012;520(15):3528–52.
14. Alfaro-Cervello C, Cebrián-Silla A, Soriano-Navarro M, Garcia-Tarraga P, Matías-Guiu J, Gomez-Pinedo U, et al. The adult macaque spinal cord central canal zone contains proliferative cells and closely resembles the human. *J Comp Neurol*. 2014;522(8):1800–17.
15. Doetsch F, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci*. 1997 Jul 1;17(13):5046–61.
16. Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisén J. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell*. 1999 Jan 8;96(1):25–34.
17. Spassky N, Merkle FT, Flames N, Tramontin AD, Garcia-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A. Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *J Neurosci*. 2005;25(1):10–8.
18. Garcia-Verdugo JM, Ferrón S, Flames N, Collado L, Desfilis E, Font E. The proliferative ventricular zone in adult vertebrates: a comparative study using reptiles, birds, and mammals. *Brain Res Bull*. 2002;57(6):765–75.
19. Kaslin J, Ganz J, Brand M. Proliferation, neurogenesis and regeneration in the non-mammalian vertebrate brain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2008;363(1489):101–22.
20. Paredes MF, Sorrells SF, García-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A. Brain size and limits to adult neurogenesis. *J Comp Neurol*. 2016;524(3):646–64.
21. Tramontin AD, García-Verdugo JM, Lim DA, Alvarez-Buylla A. Postnatal development of radial glia and the ventricular zone (VZ): a continuum of the neural stem cell compartment. *Cereb Cortex*. 2003 Jun;13(6):580–7.
22. Haubensak W, Attardo A, Denk W, Huttner WB. Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 2;101(9):3196–201.
23. Merkle FT, Álvarez-Buylla A. Neural stem cells in mammalian development. *Curr Opin Cell Biol*. 2006;18(6):704–9.

24. Rakic P. Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J Comp Neurol.* 1972 May;145(1):61–83.
25. Kriegstein A, Álvarez-Buylla A. The Glial Nature of Embryonic and Adult Neural Stem Cells. *Annu Rev Neurosci.* 2009;32(1):149–84.
26. Alvarez-Buylla A, Lim DA. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron.* 2004 Mar 4;41(5):683–6.
27. Carlén M, Meletis K, Göritz C, Darsalia V, Evergren E, Tanigaki K, et al. Forebrain ependymal cells are Notch-dependent and generate neuroblasts and astrocytes after stroke. *Nat Neurosci.* 2009 Mar;12(3):259–67.
28. Bátiz LF, Jiménez AJ, Guerra M, Rodríguez-Pérez LM, Toledo CD, Vio K, et al. New ependymal cells are born postnatally in two discrete regions of the mouse brain and support ventricular enlargement in hydrocephalus. *Acta Neuropathol.* 2011 Jun;121(6):721–35.
29. Capilla-Gonzalez V, Cebrián-Silla A, Guerrero-Cazares H, Garcia-Verdugo JM, Quiñones-Hinojosa A. Age-related changes in astrocytic and ependymal cells of the subventricular zone. *Glia.* 2014;62(5):790–803.
30. Capilla-Gonzalez V, Herranz-Pérez V, Garcia-Verdugo JM. The aged brain: genesis and fate of residual progenitor cells in the subventricular zone. *Front Cell Neurosci.* 2015;9:365.
31. Miller RH, Raff MC. Fibrous and protoplasmic astrocytes are biochemically and developmentally distinct. *J Neurosci.* 1984 Feb;4(2):585–92.
32. John Lin C-C, Yu K, Hatcher A, Huang T-W, Lee HK, Carlson J, et al. Identification of diverse astrocyte populations and their malignant analogs. *Nat Neurosci.* 2017 Mar;20(3):396–405.
33. Doetsch F, Caillé I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell.* 1999;97(6):703–16.
34. Merkle FT, Tramontin AD, Garcia-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A. Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(50):17528–32.
35. Tong CK, Han Y-G, Shah JK, Obernier K, Guinto CD, Álvarez-Buylla A. Primary cilia are required in a unique subpopulation of neural progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.*

- 2014;111(34):12438–43.
36. Saha B, Peron S, Murray K, Jaber M, Gaillard A. Cortical lesion stimulates adult subventricular zone neural progenitor cell proliferation and migration to the site of injury. *Stem Cell Res.* 2013 Nov;11(3):965–77.
  37. Obernier K, Tong CK, Alvarez-Buylla A. Restricted nature of adult neural stem cells: Re-evaluation of their potential for brain repair. *Front Neurosci.* 2014;8(8 JUN):1–6.
  38. Abeysinghe HCS, Bokhari L, Dusting GJ, Roulston CL. Brain remodelling following endothelin-1 induced stroke in conscious rats. *PLoS One.* 2014 May 8;9(5):e97007.
  39. Kaneko N, Sawada M, Sawamoto K. Mechanisms of neuronal migration in the adult brain. *J Neurochem.* 2017;1–13.
  40. Obernier K, Cebrian-Silla A, Thomson M, Parraguez JI, Anderson R, Guinto C, et al. Adult Neurogenesis Is Sustained by Symmetric Self-Renewal and Differentiation. *Cell Stem Cell.* 2018 Feb 1;22(2):221–34.e8.
  41. Mirzadeh Z, Merkle FT, Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell.* 2008 Sep 11;3(3):265–78.
  42. Doetsch F, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Sep 28;96(20):11619–24.
  43. Maslov AY, Barone TA, Plunkett RJ, Pruitt SC. Neural stem cell detection, characterization, and age-related changes in the subventricular zone of mice. *J Neurosci.* 2004 Feb 18;24(7):1726–33.
  44. Capilla-Gonzalez V, Cebrián-Silla A, Guerrero-Cazares H, García-Verdugo JM, Quiñones-Hinojosa A. The generation of oligodendroglial cells is preserved in the rostral migratory stream during aging. *Front Cell Neurosci.* 2013;7:147.
  45. Sanai N, Nguyen T, Ihrie RA, Mirzadeh Z, Tsai H-H, Wong M, et al. Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy. *Nature.* 2011;478(7369):382–6.
  46. Paredes MF, James D, Gil-Perotin S, Kim H, Cotter JA, Ng C, et al. Extensive migration of young neurons into the infant human frontal lobe. *Science.* 2016;354(6308):aaf7073–aaf7073.
  47. Silva-Vargas V, Crouch EE, Doetsch F. Adult neural stem cells and their niche: A

- dynamic duo during homeostasis, regeneration, and aging. *Curr Opin Neurobiol.* 2013;23(6):935–42.
48. Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med.* 1998;4(11):1313–7.
  49. Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci.* 2004 Aug;27(8):447–52.
  50. Zhao C, Deng W, Gage FH. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell.* 2008 Feb 22;132(4):645–60.
  51. Monje ML, Toda H, Palmer TD. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science.* 2003 Dec 5;302(5651):1760–5.
  52. Dranovsky A, Hen R. Hippocampal neurogenesis: regulation by stress and antidepressants. *Biol Psychiatry.* 2006 Jun 15;59(12):1136–43.
  53. Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J Neurosci.* 1997 May 15;17(10):3727–38.
  54. Fukuda S, Kato F, Tozuka Y, Yamaguchi M, Miyamoto Y, Hisatsune T. Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. *J Neurosci.* 2003 Oct 15;23(28):9357–66.
  55. Garcia ADR, Doan NB, Imura T, Bush TG, Sofroniew MV. GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat Neurosci.* 2004 Nov;7(11):1233–41.
  56. Filippov V, Kronenberg G, Pivneva T, Reuter K, Steiner B, Wang LP, et al. Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Mol Cell Neurosci.* 2003 Jul;23(3):373–82.
  57. Claiborne BJ, Amaral DG, Cowan WM. A light and electron microscopic analysis of the mossy fibers of the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol.* 1986 Apr 22;246(4):435–58.
  58. Toni N, Laplagne DA, Zhao C, Lombardi G, Ribak CE, Gage FH, et al. Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nat Neurosci.* 2008 Aug;11(8):901–7.
  59. Gemma C, Bachstetter AD, Bickford PC. Neuron-Microglia Dialogue and Hippocampal

- Neurogenesis in the Aged Brain. *Aging Dis.* 2010 Dec 1;1(3):232–44.
60. Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol.* 2000 Oct 2;425(4):479–94.
61. Bouab M, Paliouras GN, Aumont A, Forest-Bérard K, Fernandes KJL. Aging of the subventricular zone neural stem cell niche: evidence for quiescence-associated changes between early and mid-adulthood. *Neuroscience.* 2011 Jan 26;173:135–49.
62. Ferrón S, Mira H, Franco S, Cano-Jaimez M, Bellmunt E, Ramírez C, et al. Telomere shortening and chromosomal instability abrogates proliferation of adult but not embryonic neural stem cells. *Development.* 2004 Aug;131(16):4059–70.
63. Jaskelioff M, Muller FL, Paik J-H, Thomas E, Jiang S, Adams AC, et al. Telomerase reactivation reverses tissue degeneration in aged telomerase-deficient mice. *Nature.* 2011 Jan 6;469(7328):102–6.
64. Lim DA, Alvarez-Buylla A. Adult neural stem cells stake their ground. *Trends Neurosci.* 2014 Oct;37(10):563–71.
65. Tong CK, Chen J, Cebrián-Silla A, Mirzadeh Z, Obernier K, Guinto CD, et al. Axonal control of the adult neural stem cell niche. *Cell Stem Cell.* 2014;14(4):500–11.
66. Lenington JB, Pope S, Goodheart AE, Drozdowicz L, Daniels SB, Salamone JD, et al. Midbrain dopamine neurons associated with reward processing innervate the neurogenic subventricular zone. *J Neurosci.* 2011 Sep 14;31(37):13078–87.
67. Tavazoie M, Van der Veken L, Silva-Vargas V, Louissaint M, Colonna L, Zaidi B, et al. A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell Stem Cell.* 2008 Sep 11;3(3):279–88.
68. Culver JC, Vadakkan TJ, Dickinson ME. A Specialized Microvascular Domain in the Mouse Neural Stem Cell Niche. *PLoS One.* 2013;8(1):e53546.
69. Lee SW, Clemenson GD, Gage FH. New neurons in an aged brain. *Behav Brain Res.* 2012 Feb 14;227(2):497–507.
70. Boldrini M, Fulmore CA, Tartt AN, Simeon LR, Pavlova I, Poposka V, et al. Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. *Cell Stem Cell.* 2018 Apr 5;22(4):589–99.e5.
71. Pluchino S, Muzio L, Imitola J, Deleidi M, Alfaro-Cervello C, Salani G, et al. Persistent inflammation alters the function of the endogenous brain stem cell compartment. *Brain.*



- 2008 Oct;131(Pt 10):2564–78.
72. Gonzalez-Perez O, Gutierrez-Fernandez F, Lopez-Virgen V, Collas-Aguilar J, Quinones-Hinojosa A, Garcia-Verdugo JM. Immunological regulation of neurogenic niches in the adult brain. *Neuroscience*. 2012 Dec 13;226:270–81.
  73. Kohman RA, Rhodes JS. Neurogenesis, inflammation and behavior. *Brain Behav Immun*. 2013 Jan;27(1):22–32.
  74. Kempermann G. Activity dependency and aging in the regulation of adult neurogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7(11):1–18.
  75. Veena J, Rao BSS, Srikumar BN. Regulation of adult neurogenesis in the hippocampus by stress, acetylcholine and dopamine. *J Nat Sci Biol Med*. 2011 Jan;2(1):26–37.
  76. Mayer JL, Klumpers L, Maslam S, de Kloet ER, Joëls M, Lucassen PJ. Brief treatment with the glucocorticoid receptor antagonist mifepristone normalises the corticosterone-induced reduction of adult hippocampal neurogenesis. *J Neuroendocrinol*. 2006 Aug;18(8):629–31.
  77. Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*. 1997 Apr 3;386(6624):493–5.
  78. Beauquis J, Roig P, De Nicola AF, Saravia F. Short-term environmental enrichment enhances adult neurogenesis, vascular network and dendritic complexity in the hippocampus of type 1 diabetic mice. *PLoS One*. 2010 Nov 15;5(11):e13993.
  79. Komitova M, Mattsson B, Johansson BB, Eriksson PS. Enriched environment increases neural stem/progenitor cell proliferation and neurogenesis in the subventricular zone of stroke-lesioned adult rats. *Stroke*. 2005 Jun;36(6):1278–82.
  80. van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci*. 1999 Mar;2(3):266–70.
  81. Kempermann G, Gast D, Gage FH. Neuroplasticity in old age: sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. *Ann Neurol*. 2002 Aug;52(2):135–43.
  82. Enwere E, Shingo T, Gregg C, Fujikawa H, Ohta S, Weiss S. Aging results in reduced epidermal growth factor receptor signaling, diminished olfactory neurogenesis, and deficits in fine olfactory discrimination. *J Neurosci*. 2004 Sep 22;24(38):8354–65.
  83. Vivar C. Adult Hippocampal Neurogenesis, Aging and Neurodegenerative Diseases:

- Possible Strategies to Prevent Cognitive Impairment. *Curr Top Med Chem.* 2015;15(21):2175–92.
84. Villeda SA, Luo J, Mosher KI, Zou B, Britschgi M, Bieri G, et al. The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature.* 2011;477(7362):90–4.
85. Luo J, Daniels SB, Lenington JB, Notti RQ, Conover JC. The aging neurogenic subventricular zone. *Aging Cell.* 2006 Apr;5(2):139–52.
86. Ben Abdallah NM-B, Slomianka L, Vyssotski AL, Lipp H-P. Early age-related changes in adult hippocampal neurogenesis in C57 mice. *Neurobiol Aging.* 2010 Jan;31(1):151–61.
87. Spalding KL, Bergmann O, Alkass K, Bernard S, Salehpour M, Huttner HB, et al. Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell.* 2013 Jun 6;153(6):1219–27.
88. Sorrells SF, Paredes MF, Cebrian-Silla A, Sandoval K, Qi D, Kelley KW, et al. Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature [Internet].* 2018 Mar 7; Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature25975>
89. Cipriani S, Ferrer I, Aronica E, Kovacs GG, Verney C, Nardelli J, et al. Hippocampal Radial Glial Subtypes and Their Neurogenic Potential in Human Fetuses and Healthy and Alzheimer's Disease Adults. *Cereb Cortex [Internet].* 2018 May 2; Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/cercor/bhy096>
90. Braun SMG, Jessberger S. Adult neurogenesis: mechanisms and functional significance. *Development.* 2014 May;141(10):1983–6.
91. Gil-Mohapel J, Brocardo PS, Choquette W, Gothard R, Simpson JM, Christie BR. Hippocampal neurogenesis levels predict WATERMAZE search strategies in the aging brain. *PLoS One.* 2013 Sep 23;8(9):e75125.
92. Snyder JS, Soumier A, Brewer M, Pickel J, Cameron HA. Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. *Nature.* 2011 Aug 3;476(7361):458–61.
93. Castrén E, Hen R. Neuronal plasticity and antidepressant actions. *Trends Neurosci.* 2013 May;36(5):259–67.
94. Seib DRM, Martin-Villalba A. Neurogenesis in the Normal Ageing Hippocampus: A Mini-Review. *Gerontology.* 2015;61(4):327–35.

95. Breunig JJ, Sarkisian MR, Arellano JI, Morozov YM, Ayoub AE, Sojitra S, et al. Primary cilia regulate hippocampal neurogenesis by mediating sonic hedgehog signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(35):13127–32.
96. Simon MJ, Iliff JJ. Regulation of cerebrospinal fluid (CSF) flow in neurodegenerative, neurovascular and neuroinflammatory disease. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Mar;1862(3):442–51.
97. Hancock A, Priester C, Kidder E, Keith JR. Does 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) disrupt cell proliferation and neuronal maturation in the adult rat hippocampus in vivo? *Behav Brain Res*. 2009 May 16;199(2):218–21.
98. Ponti G, Obernier K, Guinto C, Jose L, Bonfanti L, Alvarez-Buylla A. Cell cycle and lineage progression of neural progenitors in the ventricular-subventricular zones of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Mar 12;110(11):E1045–54.
99. Codega P, Silva-Vargas V, Paul A, Maldonado-Soto AR, DeLeo AM, Pastrana E, et al. Prospective Identification and Purification of Quiescent Adult Neural Stem Cells from Their In Vivo Niche. *Neuron*. 2014;82(3):545–59.
100. Furutachi S, Miya H, Watanabe T, Kawai H, Yamasaki N, Harada Y, et al. Slowly dividing neural progenitors are an embryonic origin of adult neural stem cells. *Nat Neurosci*. 2015;18(5):657–65.
101. Cebrián-Silla A, Alfaro-Cervelló C, Herranz-Pérez V, Kaneko N, Park DH, Sawamoto K, et al. Unique Organization of the Nuclear Envelope in the Post-natal Quiescent Neural Stem Cells. *Stem Cell Reports*. 2017 Jul 11;9(1):203–16.
102. Jessberger S. Neural repair in the adult brain. *F1000Res* [Internet]. 2016 Feb 12;5. Available from: <http://dx.doi.org/10.12688/f1000research.7459.1>
103. Steinbeck JA, Studer L. Moving stem cells to the clinic: potential and limitations for brain repair. *Neuron*. 2015 Apr 8;86(1):187–206.
104. Bergmann O, Liebl J, Bernard S, Alkass K, Yeung MSY, Steier P, et al. The age of olfactory bulb neurons in humans. *Neuron*. 2012;74(4):634–9.
105. Patzke N, Spocter MA, Karlsson KÆ, Bertelsen MF, Haagensen M, Chawana R, et al. In contrast to many other mammals, cetaceans have relatively small hippocampi that appear to lack adult neurogenesis. *Brain Struct Funct*. 2015 Jan;220(1):361–83.
106. Gonzalez-Riano C, Tapia-González S, García A, Muñoz A, DeFelipe J, Barbas C.

- Metabolomics and neuroanatomical evaluation of post-mortem changes in the hippocampus. *Brain Struct Funct.* 2017 Aug;222(6):2831–53.
107. Bao A-M, Swaab DF. The art of matching brain tissue from patients and controls for postmortem research. *Handb Clin Neurol.* 2018;150:197–217.
108. Kempermann G, Gage FH, Aigner L, Song H, Curtis MA, Thuret S, et al. Human Adult Neurogenesis: Evidence and Remaining Questions. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2018 Apr 18; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2018.04.004>.
109. Knoth R, Singec I, Ditter M, Pantazis G, Capetian P, Meyer RP, et al. Murine features of neurogenesis in the human hippocampus across the lifespan from 0 to 100 years. *PLoS One.* 2010 Jan 29;5(1):e8809.
110. Dennis CV, Suh LS, Rodriguez ML, Kril JJ, Sutherland GT. Human adult neurogenesis across the ages: An immunohistochemical study. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2016 Dec;42(7):621–38.
111. Mathews KJ, Allen KM, Boerrigter D, Ball H, Shannon Weickert C, Double KL. Evidence for reduced neurogenesis in the aging human hippocampus despite stable stem cell markers. *Aging Cell.* 2017 Oct;16(5):1195–9.
112. Lipp H-P, Bonfanti L. Adult Neurogenesis in Mammals: Variations and Confusions. *Brain Behav Evol.* 2016 Aug 24;87(3):205–21.
113. Parolisi R, Cozzi B, Bonfanti L. Non-neurogenic SVZ-like niche in dolphins, mammals devoid of olfaction. *Brain Struct Funct.* 2017 Aug;222(6):2625–39.
114. Parolisi R, Peruffo A, Messina S, Panin M, Montelli S, Giurisato M, et al. Forebrain neuroanatomy of the neonatal and juvenile dolphin (*T. truncatus* and *S. coeruleoalba*). *Front Neuroanat.* 2015 Nov 6;9:140.