



Doctorado en Neurociencias de la
Universidad de Valencia
Instituto de Biomedicina de Valencia-CSIC
2021

**Papel de las proteínas morfogenéticas
de hueso en la regulación de la
neurogénesis hipocámpal adulta.**

Tomás Armenteros Barrón
Licenciado en Biotecnología

Directora: Dra. Helena Mira
Tutora: Dra. Martina Kirstein



Helena Mira, PhD
Unidad de Células Madre y Envejecimiento
Instituto de Biomedicina de Valencia
e-mail: hmira@ibv.csic.es

Helena Mira Aparicio, Doctora en Ciencias Biológicas, Científico Titular y Directora de la Unidad de Células Madre y Envejecimiento del Instituto de Biomedicina de Valencia del CSIC y Martina Kirstein, Doctora en Biología Molecular y Celular, Profesora Titular de la Universidad de Valencia, CERTIFICAN: Que Tomás Armenteros Barrón, graduado en Biotecnología por la Universidad Francisco de Vitoria ha realizado bajo nuestra supervisión la Tesis doctoral titulada “Papel de las proteínas morfogenéticas de hueso en la regulación de la neurogénesis hipocampal adulta”.

En Valencia, 21 de octubre de 2021

Firmado por MIRA
APARICIO HELENA - DNI
18991008T el día 21/10/2021
con un certificado emitido por
AC Administración Pública

Directora de la tesis
Dra. Helena Mira

MARTINA
|KIRSTEIN

Firmado digitalmente por
MARTINA|KIRSTEIN
Fecha: 2021.10.24
19:27:43 +02'00'

Tutora académica
Dra. Martina Kirstein

*A mis padres y
a mi abuelo Antonio.*

AGRADECIMIENTOS

En este espacio me gustaría dedicar unas palabras a todos aquellos que han hecho posible esta tesis, seguramente las palabras más fáciles y, a la vez, difíciles de escribir después de tantos años de trabajo.

En primer lugar, a mi directora de tesis y jefa Helena, por haber confiado en mí y darme una oportunidad cuando nadie más lo hizo. Gracias por darme la oportunidad de formar parte del mejor laboratorio y de enseñarme como ser mejor científico y persona. Ha sido un auténtico honor tenerte como jefa, profesora, guía y apoyo durante estos años. A mis queridos compañeros de laboratorio, por tantos momentos que hemos vivido juntos, momentos que nunca olvidaré. A Juani, siempre serás la primera profesora que tuve en el laboratorio. Gracias por tener tanta paciencia y enseñarme a dar mis primeros pasos. A Pilar, por enseñarme la importancia de la rigurosidad y el orden en el laboratorio, y como se echa de menos cuando se pierde. A Rafa, por tantos momentos compartidos, por tantos desayunos y cafés. Por tantas veces que me has escuchado quejarme y me has ofrecido tu consejo, porque me has enseñado a ser mejor persona dentro y fuera del laboratorio, muchas gracias. A María, muchas gracias por tener siempre una sonrisa, tu alegría y positivismo hicieron del laboratorio un lugar mejor. Muchas gracias por contestar mil y una preguntas, por dedicar tanto tiempo a tus compañeros y estar siempre para los demás. Vosotros dos habéis sido mis grandes referentes en el laboratorio, y espero algún día dar tanto como vosotros me habéis dado a mí, esta tesis es más vuestra que mía. Y a todos los compañeros con los que he compartido esta experiencia, a Santi, a Diana, a Laura, a Lucía, a Zoraida y a Pablo muchas gracias por caminar a mi lado. Todos vosotros sois el labo del “Charly” al que recordaré y llevaré conmigo siempre.

También tengo que dar las gracias a todos los compañeros de laboratorios vecinos por compartir tanto buenos como malos momentos. A Marçal, por tu profesionalidad y por enseñarme que siempre hay otro punto de vista. A Cris y a Vero, por alguna que otra noche de fiesta y por ayudarme a sacar y aceptar todo aquello que

me daba vergüenza. A Irmina, por todas las horas y horas invertidas. A Pilar y a Esther por tanto apoyo, por tantas conversaciones y tantos cotilleos compartidos. Y a Antonio y Pili, por ofrecerme un lugar en el que seguir avanzando, aunque fuese por poco tiempo.

A mi segundo laboratorio, a Isabel, a Malú y a Laura, por tantas situaciones difíciles a las que nos hemos tenido que enfrentar. Muchas gracias Lucía, por demostrar una gran madurez en un mar de inmadurez. A Jose, por tener siempre una sonrisa y por tu gran paciencia con tus compañeras. Y muchas gracias a Joanvi, Alicia, Luis, Raquel, Elia, Sonia, Edu, Esther, Marcos, Ana y Andrea, por ser los mejores estudiantes y compañeros que podría desear. Muchas gracias porque vosotros habéis sido la única razón para seguir adelante, y espero haberos ayudado un poco en vuestro primer contacto con la ciencia.

Y a mis grandes vecinos y compañeros, muchas gracias porque sin vosotros este proyecto se habría quedado a medias. Muchas gracias Mireia, por tu honestidad y tu saber estar. A Rosa, por confiar en mí, por entenderme y apoyarme. A Ada, por tender siempre tu mano a todos los estudiantes que pasan por allí. Y a mi querido equipo de natación, por tantos largos y tardes de entrenamiento para despejar la cabeza y pensar en otra cosa. A Isabel, por compartir mi camino. Muchas gracias Miguel, por ser nuestro entrenador, por escucharme y aguantarme, y ofrecerme un sitio a tu lado. Y a Belén, muchas gracias por tantas tardes de piscina y tantas charlas planeando el futuro, nos volveremos a ver en Islandia.

Por último, pero no menos importante, a mis padres. Por haber sacrificado tanto por todos nosotros, por haber dado alas a todos y cada uno de mis proyectos y decisiones, por tantos quebraderos de cabeza y noches sin dormir. Por enseñarme a ser mejor persona y a lidiar, con la cabeza bien alta y una sonrisa, con todos los problemas que la vida nos presenta. Muchas gracias porque sin vuestro apoyo incondicional y vuestro ejemplo nunca habría llegado hasta aquí. A mi abuelo Antonio, por apoyar a cada uno de tus hijos y nietos a formarnos y prepararnos para día de mañana. Y a mi

abuela Tere, por ser el mejor ejemplo a seguir, la torre que nunca cae, aunque todo el viento sople en contra.

A todos vosotros, muchas gracias.

RESUMEN

En determinadas regiones del cerebro de los mamíferos, nuevas neuronas nacen a lo largo de la vida del individuo debido a la existencia de células madre neurales (NSCs). La neurogénesis en el cerebro adulto ocurre en dos zonas determinadas: la zona subventricular (ZSV) de los ventrículos laterales y la zona subgranular (ZSG) del giro dentado del hipocampo. Señales locales, como los ligandos de la familia de las Wnt, regulan la proliferación y diferenciación de las NSCs. Otras señales, como las Proteínas Morfogenéticas de Hueso (BMPs), están implicadas en el mantenimiento de la quiescencia de las NSCs. Sin embargo, los mecanismos moleculares que subyacen a este proceso no están totalmente caracterizados. En esta tesis mostramos que las células madre y progenitores hipocampales adultos (AH-NSPCs) expresan receptores de la familia de las BMPs, y señalizan a través de estos receptores para regular la diferenciación de las NSCs. En nuestro trabajo se muestra como la señalización de BMP2/4 a través del receptor de tipo I BMPR1A es suficiente para aumentar la neurogénesis a partir de células madre hipocampales *in vitro*, y que esta señalización determina el linaje neuronal en las primeras 24 horas del proceso. También hemos observado que la señalización de BMPs incrementa la expresión del gen *Lef1*, miembro de la ruta canónica de las Wnt, sugiriendo un efecto sinérgico entre ambas rutas. Estos resultados muestran un posible “crosstalk” entre la señalización de las proteínas BMPs y las Wnt durante la neurogénesis hipocampal adulta.

De la misma forma, en este trabajo barajamos la posibilidad de que las proteínas BMPs pudieran participar en el proceso de maduración neuronal. Nuestros resultados muestran que BMP2/4/6, pero no BMP7, aumentan la complejidad morfológica de las nuevas neuronas generadas a partir de AH-NSPCs *in vitro*, afectando a la longitud tanto de las neuritas primarias como secundarias. También mostramos como el silenciamiento y la inhibición del receptor de tipo II BMPR2 y de tipo I ACVR1 disminuyen la respuesta de las neuronas a BMP6 y, por tanto, reducen la complejidad neuronal y la maduración. Por otro lado, la expresión de las formas constitutivamente activas de los receptores de tipo I ACVR1 y BMPR1B utilizando lenti y retrovirus recapitulan el efecto

madurativo de BMP6 *in vitro*. Pero el efecto generado depende en cualquier caso del gradiente de concentración de las BMPs, ya que tanto la exposición a concentraciones altas de BMP6 *in vitro*, como la expresión de las formas activas de los receptores tipo I bajo un promotor fuerte (CAG) *in vivo*, generan un efecto negativo y una disminución de la maduración neuronal.

En nuestro estudio también quisimos caracterizar el efecto de BMP6 sobre las células madre y progenitores neurales del hipocampo, ya que se ha descrito un aumento de BMP6 en esta zona durante el envejecimiento y en la enfermedad de Alzheimer, tanto en modelos animales como en humanos. En primer lugar, hemos podido observar que la exposición a BMP6 promueve la salida de ciclo celular de las AH-NSPCs, efecto que puede ser atribuido a un incremento de la diferenciación astrogliar, ya que no encontramos indicios de muerte celular o senescencia. Hemos explorado la posible fuente celular del aumento de esta proteína durante el envejecimiento, concluyendo que no se trata de un efecto autónomo celular debido a la sobreexpresión de BMP6 por parte de las AH-NSPCs. Tampoco parece deberse a una sobreexpresión por parte de las células microgliales, como se había sugerido anteriormente. Nuestro estudio apunta a las células de las meninges como posible fuente celular de la BMP6 en el cerebro. Además, el aumento de BMP6 en el hipocampo durante el envejecimiento parece coincidir con el aumento de esta misma proteína en el suero de ratones Crl:CD1 de edad avanzada, así como en ratones del modelo de senescencia acelerada SAMP8 de forma temprana, lo que abre la posibilidad a que el acúmulo de BMP6 con la edad no sea exclusivo del hipocampo.

1. Introducción.**16**

1.1. La neurogénesis en el cerebro de los mamíferos adultos.	17
1.1.1. El hipocampo.	18
1.1.1.1. El giro dentado (GD) del hipocampo.	18
1.1.1.2. La zona subgranular (ZSG) del giro dentado del hipocampo.	19
1.1.1.2.1. Células madre de la ZSG adulta.	19
1.1.1.3. Cornu ammonis (CA).	22
1.1.1.4. El circuito trisináptico.	23
1.1.1. Neurogénesis en la ZSG.	24
1.1.1.1. Etapa de Proliferación.	24
1.1.1.2. Etapa de Diferenciación.	25
1.1.1.3. Etapa de Migración.	26
1.1.1.4. Etapa de formación de Contactos	26
1.1.1.5. Etapa de integración de la Sinapsis	27
1.1.2. Función de la neurogénesis hipocampal adulta.	27
1.1.3. Regulación de la neurogénesis hipocampal adulta.	29
1.2. Las Proteínas Morfógenas de Hueso (BMPs).	35
1.2.1. Origen de las BMPs.	35
1.2.2. Nomenclatura y clasificación de las BMPs.	36
1.2.3. Estructura y Procesamiento de las BMPs.	39
1.2.4. Tipos y estructura de los Receptores de las BMPs.	42
1.2.5. Rutas de señalización de las BMPs:	43
1.2.5.1. Ruta de señalización canónica (mediada por proteínas Smads).	44
1.2.5.2. Rutas de señalización no canónica (independiente de Smads).	47
1.2.5.3. Regulación de la señalización de las BMPs.	49
1.2.5.3.1. Regulación extracelular de la señalización de BMPs.	49
1.2.5.3.2. Regulación intracelular de la señalización de BMPs.	50
1.2.5.3.3. Regulación a nivel de membrana.	51
1.2.6. La función de las BMPs en el sistema nervioso.	52
1.2.6.1. Función de las BMPs durante el desarrollo del sistema nervioso.	52
1.2.6.2. Función de las BMPs durante estadios adultos.	56

1.3.	<i>La familia de proteínas WNT.</i>	60
1.3.1.	Origen y descubrimiento de las proteínas de la familia Wnt.	60
1.3.2.	Caracterización de los ligandos de la familia Wnt.	60
1.3.3.	Receptores de las Wnts.	61
1.3.4.	Rutas de señalización de las proteínas Wnt:	62
1.3.4.1.	<i>Ruta de señalización canónica, medida por B-catenina.</i>	62
1.3.4.2.	<i>Rutas de señalización no canónica: Wnt/PCP, Wnt/Ca²⁺.</i>	65
1.3.5.	Proteínas Wnt en el sistema nervioso.	67
1.3.5.1.	<i>Proteínas Wnt en el desarrollo del sistema nervioso.</i>	67
1.3.5.2.	<i>Proteínas Wnt en el sistema nerviosos adulto.</i>	68

1.4.	<i>La neurogénesis durante el envejecimiento.</i>	70
1.4.1.	Alteraciones de la neurogénesis y nichos durante el envejecimiento.	70
1.4.2.	SAMP como modelo de envejecimiento acelerado.	74

2. Objetivos. **77**

3. Materiales y Métodos. **79**

3.1.	<i>Experimentos in vitro.</i>	80
3.1.1.	Cultivos celulares.	80
3.1.1.1.	<i>Mantenimiento y pase de los cultivos celulares.</i>	80
3.1.1.2.	<i>Ensayos de proliferación, apoptosis y senescencia.</i>	81
3.1.1.3.	<i>Experimentos de diferenciación.</i>	82
3.1.1.4.	<i>Experimentos de maduración.</i>	83
3.1.1.5.	<i>Experimentos de inhibición química.</i>	84
3.1.2.	Inmunocitoquímica.	84
3.1.3.	Ensayos para valorar la senescencia celular.	85
3.1.4.	Análisis de la expresión génica.	86
3.1.5.	Electroforesis de proteínas y Western blot.	86
3.1.6.	Análisis filogenético y caracterización de la secuencia del promotor de <i>Lef1</i> .	87
3.1.7.	Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).	88

3.1.8.	Análisis de las características morfológicas de las neuronas.	90
3.1.8.1.	<i>Análisis de Sholl.</i>	90
3.1.8.2.	<i>Número de puntos finales (End Points).</i>	90
3.1.8.3.	<i>Longitud de neuritas primarias y secundarias.</i>	91
3.1.8.4.	<i>Perímetro y Área del soma.</i>	91
3.1.9.	Ensayos de siRNA frente a los receptores de las BMPs.	91
3.1.10.	Generación de las construcciones virales.	93
3.1.10.1.	<i>Construcciones Retrovirales.</i>	93
3.1.10.2.	<i>Construcciones Lentivirales.</i>	94
3.1.11.	Generación de partículas virales.	95
3.1.11.1.	<i>Retrovirus.</i>	95
3.1.11.2.	<i>Lentivirus.</i>	97
3.1.12.	Transducciones retrovirales y lentivirales.	97
3.2.	<i>Experimentos in vivo.</i>	99
3.2.1.	Animales.	99
3.2.2.	Cultivos primarios AH-NSCs (Cr1:CD1, SAMR1, SAMP8).	99
3.2.3.	Generación de los plásmidos IRES GFP.	100
3.2.4.	Electroporaciones <i>in vivo</i> .	102
3.2.5.	Inmunohistoquímica.	102
3.2.6.	Análisis de las características morfológicas de las neuronas generadas <i>in vivo</i> .	104
3.2.6.1.	<i>Distancia dendrítica apical.</i>	104
3.2.6.2.	<i>Conformación en “Y” o “V”.</i>	106
3.2.6.3.	<i>Densidad y tipo de las espinas dendríticas.</i>	106
3.3.	<i>Análisis estadístico.</i>	106
3.4.	<i>Ilustraciones gráficas.</i>	108
4.	<u>Resultados (Capítulo 1).</u>	113
4.1.	Los ligandos y receptores de la familia de las BMPs se expresan en el giro dentado del hipocampo.	114
4.2.	Los ligandos BMP2 y BMP4 son pro-neurogénicos en AH-NSPCs <i>in vitro</i> .	117

4.3.	BMP2 y BMP4 inducen el proceso de neurogénesis a través de la ruta canónica de las BMPs.	121
4.4.	La señalización de BMP2 y BMP4 produce un efecto sinérgico con la señalización canónica de las proteínas WNT y ambas incrementan la neurogénesis.	124
4.5.	El efecto pro-neurogénico generado por las proteínas BMP2/4 requiere de la señalización canónica de WNT y está ligado a la expresión de <i>Lef1</i> .	127

5. Resultados (Capítulo 2). **132**

5.1.	Las proteínas BMPs participan en la maduración neuronal <i>in vitro</i> .	133
5.2.	Efecto madurativo de las proteínas BMPs.	135
5.3.	BMP6 tiene un efecto negativo a concentraciones altas.	136
5.4.	Ensayos de inhibición mediante siRNA de los receptores de BMP de tipo I y II que desencadenan la respuesta madurativa.	138
5.5.	Ensayos de inhibición química de los receptores de tipo I que desencadenan la respuesta madurativa.	141
5.6.	Ensayos de activación de los receptores de BMP de tipo I mediante sobreexpresión con vectores virales.	143
5.7.	Señalización celular durante la maduración neuronal <i>in vitro</i> mediada por la ruta no canónica de las BMPs.	147
5.8.	Función de receptores de BMPs tipo I en la neurogénesis hipocampal <i>in vivo</i> .	151

6. Resultados (Capítulo 3). **157**

6.1.	El efecto de las proteínas BMP6 durante el envejecimiento.	158
6.2.	Las AH-NSPCs no expresan más BMP6 en animales SAMP8.	168
6.3.	La microglía no expresa más BMP6 en animales SAMP8.	168
6.4.	Aumento de la proteína BMP6 sistémica en animales adultos.	169
6.5.	Incremento de BMP6 sistémica en animales SAMP8.	173
6.6.	Los animales transgénicos FAD no presentan un aumento de BMP6.	173

7. Discusión. **174**

7.1.	Efecto de las BMPs sobre la diferenciación de las AH-NSPCs.	175
7.2.	Efecto de las BMPs en el proceso de maduración de las AH-NSPCs.	179
7.3.	Efecto de la proteína BMP6 en el hipocampo adulto.	189

8. Conclusiones. **194**

9. Bibliografía. **198**

10. Anexo. **235**

CLAVE DE ABREVIATURAS

ACVR1, Activin A Receptor Type 1	I-SMAD, inhibitory SMAD
ACVR2A, Activin A Receptor Type 2A	KO, Knockout
ACVR2B, Activin A Receptor Type 2B	mRNA, Ácido Ribonucleico mensajero
ASCL1, Achaete Scute homolog 1	MWM, Morris Water Maze
BDNF, Brain Derived Neurotrophic Factor	Nes, Nestina
BMP, Bone Morphogenetic Protein	NeuroD1, Neurogenic Differentiation 1
BMPR1A, Bone Morphogenetic Protein Receptor 1A	Ngn2, Neurogenina 2
BMPR1B, Bone Morphogenetic Protein Receptor 1B	NSC, Neural Stem Cell
BMPR2, Bone Morphogenetic Protein Receptor 2	NSPC, Neural Stem Progenitor Cell
BrdU, Bromo Deoxiuridin	NT3, Neurotrofina 3
CA1, Cornu Ammonis 1	BO, Bulbo Olfactorio
CA2, Cornu Ammonis 2	OP, Osteogenic Protein
CA3, Cornu Ammonis 3	Prox1, Prospero-related homeobox gene 1
CE, Corteza Entorrinal	PSA-NCAM, Polysialylated-Neural Cell Adhesion Molecule
CG, Capa Granular	qRT-PCR, quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction
CM, Capa Molecular	RNA, Ácido Ribonucleico
CMR, Camino Migratorio Rostral	ROS, Reactive Oxygen Species
Co-SMAD, Common mediator SMAD	R-SMAD, Receptor regulated SMAD
DCX, Doublecortin	SAMP8, Senescence-Accelerate Mouse Prone
DNA, Ácido Deoxyribonucleico	SAMR1, Senescence-Accelerate Mouse Resistant
EA, Enfermedad de Alzheimer	SA- β -Gal, Senescence associated Beta-galactosidase
EGFR, Epidermal Growth Factor Receptor	Shh, Sonic Hedgehog
FGF2, Fibroblast Growth Factor 2	SOX2, Sex determining región Y-bOX2
GABA, Gamma-Aminobutiric Acid	TAP, Transient Amplifying Progenitors
GD, Giro Dentado	Tbr2, T-box Brain protein 2
GDF, Growth Differentiation Factor	TGF- β , Transforming Growth Factor Beta
GDNF, Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor	VEGF, Vascular Endotelial Growth Factor
GFAP, Glial Fibrillary Acidic Protein	WB, Western Blot
GLAST, Glutamate Aspartate Transporter	Wnt, Wingless-type MMTV integration type site
HC, Hipocampo	ZSG, Zona Subgranular
Id1, Inhibitor of Differentiation 1	ZSV, Zona Subventricular
IGF, Insulin-like Growth Factor	

1

Introducción

1.1. La neurogénesis en el cerebro de los mamíferos adultos.

El sistema nervioso de los mamíferos es uno de los sistemas más complejos y ha sido objeto de estudio desde hace muchos años. De la misma forma, la generación de nuevas neuronas, o neurogénesis, ha sido estudiada desde hace décadas con el fin de comprender los mecanismos que dan lugar a este proceso. Al principio se pensaba que la neurogénesis era un proceso exclusivo de estadios del desarrollo, y, por tanto, que la generación de nuevas neuronas en edades adultas era algo completamente inexistente. Esta afirmación encajaba con la idea de que los mamíferos no eran capaces de reponer aquellas neuronas que se perdían a lo largo de la vida del individuo o tras una lesión, dando lugar a un decaimiento progresivo de la funcionalidad del sistema nervioso. Sin embargo, numerosos estudios realizados en el campo han demostrado la presencia de células madre en el sistema nervioso de los mamíferos que tienen la capacidad de generar nuevas neuronas en edades adultas, al menos en localizaciones concretas del cerebro (Gage FH., 2000; Temple S., 2001; Ming GL. & Song H., 2011; Boldrini M. *et al.*, 2018; Kempermann G. *et al.*, 2018).

En el cerebro adulto la neurogénesis ha sido descrita principalmente en dos zonas concretas, conocidas como zonas o nichos neurogénicos. Esto es debido a que en estas zonas podemos encontrar una población de células madre neurales (NSCs) capaces de proliferar y diferenciarse dando lugar fundamentalmente a nuevas neuronas. Dichas células madre provienen de los precursores que formaron el sistema nervioso durante las etapas del desarrollo y que son mantenidos en estas dos localizaciones concretas del cerebro adulto. Estas zonas son, por un lado, la zona subventricular o subependimaria (ZSV o ZSE) adyacente a los ventrículos laterales (Alvarez-Buylla A. & García-Verdugo JM., 2002; Quiñones-hinojosa A. *et al.*, 2006), y, por otro lado, la zona subgranular (ZSG) del giro dentado del hipocampo (Eriksson PS. *et al.* 1998; Spalding K.L. *et al.*, 2013; Toda T. y Gage FH., 2017) (Figura 1). Así pues, estas células madre son las encargadas de mantener la actividad de dichos nichos neurogénicos a lo largo de la vida del individuo, generando nuevas neuronas. Cabe destacar que, aunque las células madre que encontramos en estas zonas intervienen en el proceso de neurogénesis, también pueden dar lugar a nuevos oligodendrocitos en la ZSV (Menn B. *et al.* 2006) o nuevos

astrocitos en la ZSG (Suh H. *et al.* 2007). Sin embargo, aunque tanto la ZSV como la ZSG son consideradas nichos neurogénicos, podemos encontrar grandes diferencias entre ambas zonas. Por un lado, las neuronas generadas en las paredes de los ventrículos de la ZSV migran una gran distancia a lo largo del camino rostral migratorio hasta llegar al bulbo olfatorio, donde maduran principalmente a distintos tipos de interneuronas inhibitorias y se integran en los circuitos preexistentes, pasando a tener funciones relacionadas con el olfato (Lledo P. y Valley M., 2016). Por otro lado, las neuronas generadas en la ZSG del hipocampo migran una distancia muy corta a través de la capa granular adyacente, estas neuronas son de un único tipo (glutamatérgicas excitatorias) y también maduran según se produce el proceso de migración, llegando a proyectar sus neuritas y a integrarse en el circuito trisináptico hipocampal, donde adquieren funciones relacionadas con el aprendizaje y la memoria (Braun S.M. y Jessberger S., 2014).

1.1.1. El hipocampo.

El hipocampo es una estructura celular que se sitúa en el cerebro y que presenta una anatomía diferenciada morfológicamente del resto de éste. Está compuesto por dos regiones diferenciadas las cuales son: el giro del hipocampo (GD) y el cornu ammonis (CA), que a su vez se encuentra subdividido en tres zonas conocidas como CA1, CA2 y CA3.

1.1.1.1. El giro dentado (GD) del hipocampo.

El giro dentado hace referencia a una de las dos zonas que forman parte del hipocampo. Se trata de un conjunto de células que se disponen en forma de “u” y que se estructuran en tres capas diferenciadas. La capa más externa es la conocida como capa molecular (CM), se trata de la capa con menor densidad celular ya que está constituida principalmente por las dendritas de las neuronas granulares de las capas inferiores, así como por los axones que provienen de la corteza. La capa siguiente, situada justo debajo de la capa molecular, es la conocida como capa granular (CG). Se trata de la capa principal del giro dentado del hipocampo, es la capa con mayor densidad celular y mayor extensión, y está constituida principalmente por los somas de las

neuronas granulares, que extienden sus axones hacia la zona CA3 y sus dendritas hacia la capa molecular, y por interneuronas, encargadas de modular la neurotransmisión entre el resto de neuronas (Houser CR., 2007). La capa más interna adyacente a la capa granular del giro dentado es conocida como zona subgranular (ZSG). Está constituida en su mayoría por una población de células madre y progenitores neurales que son los responsables de que esta zona sea conocida como nicho neurogénico.

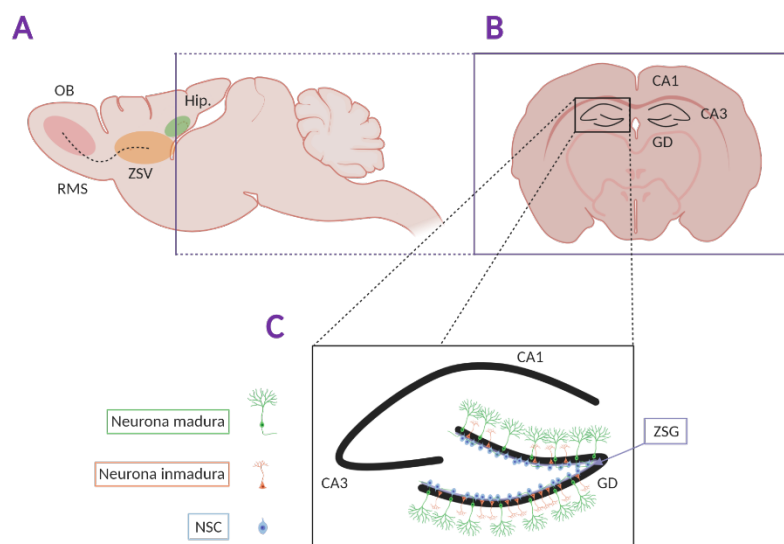


Figura 1. Representación de los nichos neurogénicos adultos y detalle del giro dentado del hipocampo. La figura muestra una representación del cerebro de ratón en la que se muestran las zonas neurogénicas. (A) Esquema de un corte sagital del cerebro de ratón mostrando la zona subventricular (ZSV), el camino rostral migratorio (RMS) y el bulbo olfatorio (BO), así como el hipocampo. (B) Esquema de un corte coronal del cerebro de un ratón ilustrando la posición del hipocampo. Se muestran las zonas CA1 y CA3 del cornu, así como el giro dentado (GD). (C) Representación gráfica ampliada del giro dentado del hipocampo. Se representa la zona subgranular del giro dentado (morado) y la población de células madre neurales (NSC) y progenitores (azul) presentes en esta zona, así como las neuronas inmaduras (naranja) y maduras (verde) y su posición en la capa granular del giro.

1.1.1.2. Zona subgranular (ZSG) del giro dentado del hipocampo.

Aunque comúnmente se habla del hipocampo como nicho neurogénico, solo la zona subgranular del giro dentado dentro de la estructura del hipocampo posee la habilidad de generar nuevas neuronas. Esto es debido a que podemos encontrar una población de células madre en estado de quiescencia en la ZSG que son capaces eventualmente de activarse en respuesta a señales, proliferar y generar progenitores que se diferencian, migran y maduran hasta dar lugar a nuevas neuronas granulares glutamatérgicas completamente funcionales. Se trata de neuronas muy polarizadas, capaces de proyectar sus neuritas y establecer contactos sinápticos activos tanto inhibitorios como excitatorios, y que, una vez integradas en el circuito neuronal existente en el GD, adquieren funciones relacionadas con el aprendizaje, la memoria y la relación con nuestro entorno (Zhao C. *et al.*, 2008; Braun S.M. y Jessberger S., 2014).

1.1.1.2.1. Las células madre de la ZSG adulta.

Conocer y establecer la citoarquitectura de la ZSG, así como la caracterización de las células madre y tipos celulares que se encuentran en este nicho, ha sido objeto de numerosos estudios en los últimos años. Una de las clasificaciones celulares más aceptada en el campo corresponde a la establecida por el Prof. Gerd Kempermann y su grupo, que distingue tres tipos celulares principales a lo largo del proceso de neurogénesis hipocampal (células Tipo 1, Tipo 2 y Tipo 3) (Kempermann G. *et al.*, 2004; Kempermann G. *et al.*, 2006) y que las clasifica en función de su grado de maduración, capacidad proliferativa y expresión de marcadores, o una combinación ellos, como el filamento intermedio Nestina, típico de progenitores neurales inmaduros, la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP), el factor de transcripción Sox2 o Doblecortina (DCX) (Figura 2).

De entre todos los tipos celulares encontrados en la ZSG, las células Tipo 1 corresponden a las células madre neurales o NSCs (del inglés: Neural Stem Cells). Se trata de células inmunorreactivas para los marcajes de Nestina, GFAP, Sox2 y el transportador de glutamato (GLAST). Se caracterizan por ser células relacionadas con las

astrocíticas con la peculiaridad de tener una morfología radial. Se encuentran mayoritariamente fuera del ciclo celular, en estado de quiescencia en la ZSG, y son capaces de activarse (adquiriendo la expresión de *Ascl1*) (Urbán N. *et al.*, 2016) y dividirse de manera tanto simétrica como asimétrica para autorrenovarse o dar lugar a una progenie de progenitores de rápida amplificación (células Tipo 2) (Kempermann *et al.*, 2015). En la actualidad, diversos estudios apuntan a la coexistencia de subpoblaciones diferentes de células Tipo 1, que se pueden clasificar en función de su morfología. En concreto, el estudio llevado a cabo por Gebara y colaboradores apunta a que las células Tipo 1 son en realidad una población de células madre heterogéneas formada por dos morfotipos celulares, con características diferentes. Este estudio denomina Tipo 1 α y Tipo 1 β a dichas poblaciones celulares, ambas presentan los marcadores de células madre (*Nestina*, *GFAP*, *Sox2*), sin embargo, las células Tipo 1 β pierden la capacidad proliferativa y presentan marcadores de astrocito maduro como *S100 β* (Gebara E. *et al.*, 2016), por lo que posiblemente corresponden a un estado intermedio en la transformación de las Tipo 1 α a astrocitos.

Por otro lado, en base al análisis de ratones transgénicos como *Sox2::GFP*, por un lado, encontramos las células *Sox2* de morfología radial, correspondientes a las NSCs quiescentes; y, por otro lado, encontramos las células *Sox2* de morfología no radial, con la capacidad de dividirse tanto simétrica como asimétricamente y que podrían también constituir una población de progenitores más restringidos (Suh *et al.*, 2007). Existen estudios más recientes que sugieren que la capacidad proliferativa de las NSCs tiene un carácter dinámico, es decir, que las estas células una vez activadas pueden entrar y salir del ciclo celular (Urbán N. *et al.*, 2016; Blomfield IM. *et al.*, 2019).

Cabe destacar que el potencial auto-renovador de estas células ha sido objeto de estudio en los últimos años, llegando a la conclusión de que se trata posiblemente de un potencial finito de varios ciclos de división, y que, una vez alcanzado su límite, entran en un proceso de diferenciación irreversible hacia células astrocíticas, perdiendo por completo sus características de células madre (Encinas JM. *et al.*, 2011; Martín-Suárez S. *et al.*, 2019).

El siguiente tipo celular que encontramos en el proceso de neurogénesis hipocampal son a las células de Tipo 2, y corresponden a las células progenitoras de rápida amplificación. Estas células ya no expresan el marcador GFAP, sin embargo, siguen manteniendo la expresión de Nestina (Figura 2). Cabe destacar que existe una subdivisión dentro de las células de Tipo 2, en función de la expresión diferencial de SOX2: por un lado, las células Tipo 2a, que aún expresan Sox2, correspondientes a progenitores con una capacidad alta de proliferación, estas células adquieren la expresión de Tbr2, NeuroD1 y Neurogenina2 (Ngn2) a la vez que pierden la expresión de Nestina y Ascl1; y, por otro lado, las células Tipo 2b, que pierden la expresión de Sox2, pero adquieren la expresión de Doblecortina (DCX), PSA-NCAM, Prox1, y aún mantienen la expresión transitoria de Tbr2, NeuroD y Neurogenina2 (Ngn2). Corresponden a progenitores más maduros, con una capacidad proliferativa menor y más comprometidos con el linaje neuronal (Couillard-Després S. *et al.*, 2005; Roybon L. *et al.*, 2009; Hodge RD. *et al.*, 2012; Kempermann G. *et al.*, 2015).

Las células Tipo 3, sin embargo, son células con un grado de maduración mayor. Se trata de células más avanzadas en la diferenciación neuronal, y, en consecuencia, con una capacidad proliferativa mucho más reducida. Al salir del ciclo celular pierden gran parte de los marcadores de indiferenciación y empiezan a expresar marcadores relacionados con el linaje neuronal, mantienen la expresión de DCX, PSA-NCAM o NeuroD1, y adquieren la de Tubulina β III (Tuj1), Calretinina y, en los casos más maduros, Calbindina y NeuN (Kempermann G. *et al.*, 2004) (Figura 2).

1.1.1.3. El Cornu ammonis (CA).

Se trata de la segunda estructura diferenciada que podemos encontrar en el hipocampo además del GD. Esta estructura a su vez está subdividida en tres zonas: CA1, CA2 y CA3; y está constituida en su mayoría por neuronas piramidales. Estas neuronas excitatorias se caracterizan por presentar un soma en forma piramidal, tener un árbol dendrítico muy ramificado y una longitud dendrítica muy variable a lo largo de toda la estructura del CA.

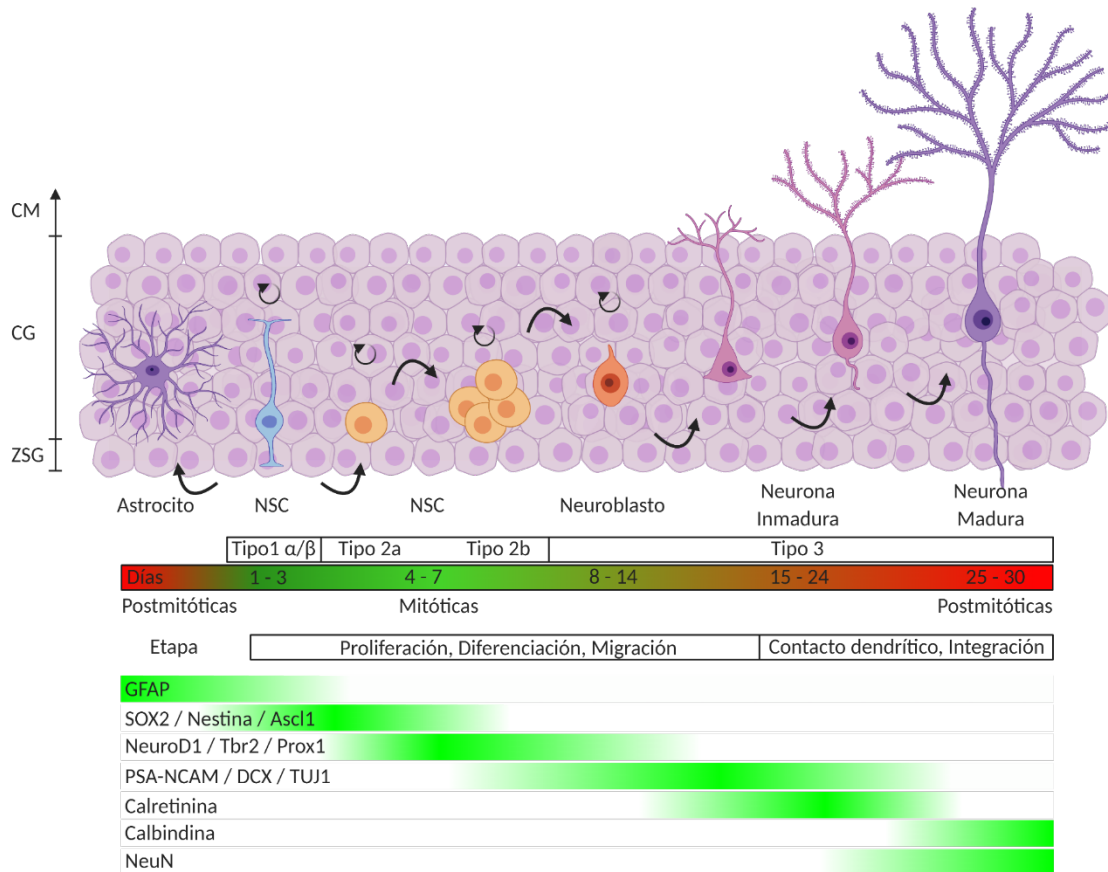


Figura 2. Esquema temporal de la diferenciación neuronal en el GD del cerebro adulto.

Tipos celulares presentes en el proceso de proliferación y maduración neuronal en el GD del hipocampo. La figura muestra cada tipo celular (células madre neurales (NSC), progenitores neurales de rápida amplificación (NPC), neuroblastos, neuronas inmaduras y neuronas maduras) en su posición dentro de la estructura del GD y junto con su patrón de expresión temporal de marcadores celulares. ZSG, zona subgranular; CG, capa granular; CM, capa molecular.

1.1.1.4. El circuito trisináptico.

Las neuronas de las zonas del hipocampo descritas anteriormente (GD, CA3, CA1) están interconectadas entre si formando lo que se conoce como circuito hipocampal o circuito trisináptico. La principal función del hipocampo es la de integrar señales y estímulos que nos llegan desde el entorno. Dichos estímulos llegan hasta el hipocampo desde la corteza entorrinal (CE). Las neuronas de la corteza entorrinal proyectan sus

axones a través de la vía perforante hasta la capa granular (CG) del giro dentado donde establecen una sinapsis con las dendritas de las neuronas granulares. Éstas a su vez, proyectan sus axones, conocidos como fibras musgosas, hacia la zona CA3, estableciendo nuevas sinapsis con las dendritas de varias neuronas piramidales de esta zona. Y, de la misma forma, las neuronas piramidales de la zona CA3 proyectan sus axones (colaterales de Schaffer) para establecer sinapsis con varias neuronas piramidales de la zona CA1 a la vez. Por último, las neuronas de la zona CA1 proyectan sus neuritas hacia la corteza entorrinal (CE), cerrando así el circuito trisináptico. Este circuito es conocido como trisináptico porque conecta la corteza entorrinal con, al menos, tres tipos de neuronas a través de tres sinapsis: una neurona granular de la CG, una neurona piramidal de la zona CA3 y una segunda neurona piramidal de la zona CA1 (Nafstad PH., 1967; Contreras A. *et al.*, 2019).

1.1.2. Neurogénesis en la ZSG.

Con el fin de facilitar su estudio, el proceso de la neurogénesis ha sido dividido en varias fases o etapas en función de los distintos tipos celulares que participan en ellas y los procesos que realizan. Cada una de estas fases puede ser definida gracias a los distintos marcadores que reconocen a cada uno de los tipos celulares (von Bohlen Und Halbach O., 2007). Estas etapas corresponden a los procesos de proliferación, diferenciación, migración, formación de contacto dendrítico y axonal y, por último, integración de la sinapsis. Se ha estimado que todo el proceso de neurogénesis, desde que nace una nueva célula hasta que esta se diferencia a una neurona madura y se integra, dura entorno a los 21 días (aproximadamente 3 semanas).

1.1.2.1. Etapa de proliferación.

El proceso de neurogénesis hipocampal ocurre gracias a que existe una población de células madre (Tipo 1) en la ZSG capaces de dividirse de manera asimétrica dando lugar a los precursores de rápida amplificación (Tipo 2a). Estas células Tipo 1 se encuentran en estado quiescente en la ZSG del giro dentado. La quiescencia se mantiene por la liberación tónica no sináptica de GABA (ácido γ -aminobutílico) liberado por las

interneuronas parvalbúmina locales (Catavero C. *et al.*, 2018), por la señalización mediada por el receptor de BMPs Bmpr1a (Mira H. *et al.*, 2010) y por la señalización mediada por la vía de Notch (Ables JL. *et al.*, 2010; Ehm O. *et al.*, 2010). Las células Tipo 1 quiescentes expresan los genes *Id1-4* (del inglés, inhibitor of differentiation) que se encargan de inhibir factores de transcripción como *Ascl1* (marcador de célula madre activada). Cuando las NSCs salen de la quiescencia y se activan, desciende la expresión de los genes *Id* lo que impide la inhibición de *Ascl1*, cuya expresión aumenta dando lugar a una célula madre activada y capaz de entrar en ciclo celular para dividirse dando lugar a precursores (Blomfield IM. *et al.*, 2019; Zhang R. *et al.*, 2019). Estos precursores se caracterizan por presentar la expresión del marcador de glía, GFAP, y de células indiferenciadas, Nestina. La función de este tipo celular es la de dividirse de manera simétrica para aumentar el pool de progenitores de rápida amplificación. Sin embargo, esta proliferación produce una sobrepoblación de progenitores y neuroblastos, de los cuales solo una pequeña parte sobrevive para poder integrarse en los circuitos hipocampales como neuronas maduras. Este proceso de muerte celular es el primero de las dos oleadas de muerte que se suceden a lo largo del proceso de neurogénesis adulta y ocurre entre 1-4 días tras el nacimiento de las nuevas células (Kempermann G. *et al.*, 2003; Pilz G. *et al.*, 2018). Las células entran en un proceso de muerte celular por apoptosis para, posteriormente, ser fagocitadas por la microglía presente en la ZSG (Sierra A. *et al.*, 2010). Algunos autores han teorizado que puede tratarse de un excedente neurogénico para asegurar el proceso de la neurogénesis y, por tanto, el correcto funcionamiento de los circuitos del hipocampo, sin embargo, las razones por las que esta oleada de muerte ocurre no son del todo conocido (Kempermann G. *et al.*, 2003; Pilz G. *et al.*, 2018).

1.1.2.2. Etapa de diferenciación.

En esta etapa, entre 8 y 14 días tras el nacimiento de la célula, los precursores de rápida amplificación dan lugar a neuroblastos (célula Tipo 2a/b → Tipo 3). Este tipo celular cuenta con capacidades proliferativas mucho más reducidas, pierden la expresión de *Sox2*, aunque continúan expresando nestina. Estas células progresan a lo largo del proceso madurativo perdiendo la expresión de nestina y adquiriendo la

expresión transitoria de Tbr2, Ngn2 y NeuroD1, así como marcadores relacionados con el linaje neuronal como doblecortina (DCX) y la forma modificada postraduccionalmente con ácido polisialílico de la molécula de adhesión neural (PSA-NCAM) (Aguilar-Arredondo A. *et al.*, 2015; Hodge RD. *et al.*, 2012; Roybon L. *et al.*, 2009).

1.1.2.3. *Etapa de migración.*

La migración ocurre a la vez que los neuroblastos (células de Tipo 3) progresan en el proceso de maduración y abandonan progresivamente el ciclo celular. Estas células migran una corta distancia a lo largo de la capa subgranular y hacia la capa granular del giro dentado, donde prosigue su maduración. Pierden la expresión de Tbr2, Ngn2 y NeuroD1, aunque siguen expresando marcadores de neurona inmadura como DCX y PSA-NCAM, y, en los casos más maduros, Tubulina β III.

1.1.2.4. *Etapa de formación de contactos.*

En esta etapa las nuevas neuronas pierden por completo la capacidad proliferativa, convirtiéndose así en células postmitóticas. Estas nuevas neuronas empiezan a polarizar sus procesos y extienden sus dendritas hacia la capa molecular (CM), donde contactarán con los axones de las neuronas provenientes de la corteza entorrinal (CE), y sus axones hacia la zona CA3, donde formarán contactos con las neuronas piramidales de esta región. Estas neuronas mantienen los marcadores de neurona inmadura (DCX, PSA-NCAM, Tubulina β III) y comienzan a expresar de forma transitoria calretinina, proteína de unión a calcio, y NeuN, marcador neuronal propio de neuronas maduras. Estas neuronas, que aún mantienen cierto grado de inmadurez, no son capaces de generar estímulos glutamatérgicos, debido a que aún no presentan espinas dendríticas en su superficie. Sin embargo, si son capaces de recibir estímulos GABAérgicos por medio de los neurotransmisores (ácido γ -aminobutírico) liberados por las interneuronas de la capa granular (Gonçalves JT. *et al.*, 2016). Inicialmente la activación por GABA es tónica, y seguidamente emergen inputs sinápticos GABAérgicos despolarizantes (Catavero C. *et al.*, 2018).

1.1.2.5. Etapa de integración de la sinapsis.

En la etapa de integración de las sinapsis, las nuevas neuronas se vuelven funcionales. Esta etapa sigue una secuencia estereotipada que comienza con la formación de inputs dendríticos GABAérgicos y continúa con la sinaptogénesis glutamatérgica varios días después, que va acompañada de la formación de espinas. Las neuronas de la capa granular, ya completamente maduras, empiezan a presentar espinas dendríticas (aprox. 16 días tras su nacimiento) (Zhao C. *et al.*, 2006) y son capaces de recibir estímulos aferentes de la corteza entorrinal a través de sus dendritas localizadas en la capa molecular, y de enviarlos, a través de sus axones, a las neuronas piramidales de la zona CA3 (Sultan S. *et al.*, 2015; Gonçalves JT. *et al.*, 2016). Las respuestas GABAérgicas se vuelven hiperpolarizantes al tiempo que se reciben los inputs sinápticos glutamatérgicos (Catavero C. *et al.*, 2018). Estas neuronas maduras pierden la expresión de calretinina y adquieren la expresión de calbindina, además de mantener la expresión de NeuN. Es en este punto, a los 13-18 días (2-3 semanas) tras el nacimiento de la célula, en el que se produce la segunda oleada de muerte. Esta oleada selecciona las neuronas que sobrevivirán en función de su actividad y funcionalidad, de esta forma solo un número muy reducido de neuronas maduras llegan a integrarse y formar parte de los circuitos del hipocampo (Ma DK. *et al.*, 2010; Pilz G. *et al.*, 2018).

1.1.3. Función de la neurogénesis hipocampal adulta.

Las funciones que pueda tener la generación de nuevas neuronas y el reemplazamiento de neuronas deterioradas en el conjunto del hipocampo, así como las implicaciones que estas puedan tener para la vida del individuo no están totalmente establecidas. Existen muchas teorías al respecto que proponen que la neurogénesis hipocampal adulta interviene en el mantenimiento de la memoria y el aprendizaje (Wiskott L. *et al.*, 2006; Garthe A. *et al.*, 2009). Una de las teorías defiende que las nuevas neuronas son reclutadas en estadios inmaduros, ya que en esta etapa las neuronas presentan una mayor plasticidad y capacidad para responder a los estímulos externos procedentes de la corteza entorrinal (Aimone JB. *et al.*, 2011). Sin embargo, también existe la teoría opuesta, que postula que las neuronas son reclutadas en estadios más

maduros de su desarrollo con el fin de adaptar la red neuronal hipocampal a cambios en su complejidad y a la pérdida de neuronas con la edad (Kempermann G. *et al.*, 2006). También se ha demostrado la implicación de la neurogénesis hipocampal en la respuesta a la depresión y la ansiedad, ya que muchos antidepresivos son capaces de favorecer la generación de nuevas neuronas en rata (Malberg JE. *et al.*, 2000; Jacobs BL. *et al.*, 2000). Sin embargo, se trata de un campo con cierta controversia debido a los datos contradictorios que han observado varios autores (Holick KA. *et al.*, 2008; Kirby ED. *et al.*, 2013). Actualmente, la teoría más aceptada es la que defiende que las neuronas de nueva generación participan en múltiples procesos del hipocampo, aunque no en todas las tareas dependientes de esta estructura. En cuanto al papel que juega la neurogénesis hipocampal en la regulación de la memoria y el aprendizaje, cabe destacar que toda la información que llega al circuito a través de la corteza entorrinal tiene que pasar por el giro dentado del hipocampo, donde se lleva a cabo el proceso de neurogénesis. En este sentido, el hipocampo actúa como un codificador automático, mientras que la corteza constituye el repositorio final donde se almacena una fracción de la información que se consolida (Frankland PW. y Josselyn SA., 2016). Por ello se piensa que se trata de un proceso importante en el que las neuronas granulares ayudan al procesamiento de la información (Richards BA. y Frankland PW., 2017). Entre las principales implicaciones que aporta este proceso para la vida del individuo podemos encontrar la de participar en el aprendizaje espacial, tanto en la navegación como en la retención de memoria espacial a largo plazo, la discriminación de patrones procedentes del entorno, el condicionamiento contextual al miedo y la reorganización de la memoria hipocampal (Deng W. *et al.*, 2010). Dentro de esta última implicación podemos destacar la de olvidar información preestablecida, debido a la reorganización, remodelado y remplazo de antiguas neuronas por otras de nueva generación (Josselyn SA. y Frankland PW., 2012; Frankland PW. *et al.*, 2013; Richards BA. y Frankland PW., 2017). Estos autores sugieren la hipótesis de que, ante la respuesta a un estímulo proveniente del entorno, y debido al remplazo neuronal, la probabilidad de que se active una neurona que se encargase de codificar esa misma información con anterioridad se reduce, lo que explica la dificultad para acceder a dicha información y, por tanto, su olvido. Las memorias ya establecidas interfieren con la codificación de nuevas memorias. Al borrar de forma continua la

memoria hipocampal, la neurogénesis adulta minimiza las interferencias (Frankland PW. y Josselyn SA., 2016).

1.1.4. Regulación de la neurogénesis hipocampal adulta.

Como hemos comentado anteriormente, el proceso de neurogénesis hipocampal hace referencia a un proceso de plasticidad estructural del cerebro. Un proceso en el que una zona del cerebro, en este caso, el hipocampo, se adapta a una situación determinada cambiando su estructura neuronal para poder desarrollar su papel en la memoria y el aprendizaje del individuo. Es por ello que este proceso se encuentra regulado por numerosos factores tanto ambientales como propios del individuo.

Los primeros, los factores ambientales externos al individuo, hacen referencia a experiencias que pueden aumentar o disminuir la tasa de neurogénesis. Entre los más estudiados, podemos destacar los que se mencionan seguidamente.

Uno de los factores más estudiados y que se conoce que tiene un mayor impacto sobre la neurogénesis hipocampal es el aprendizaje dependiente del hipocampo. Las tareas relacionadas con este tipo de aprendizaje aumentan de forma directa el número de nuevas neuronas granulares (Gould E. *et al.*, 1999; Leuner B. *et al.*, 2006). De la misma manera, se ha comprobado que el aprendizaje relacionado con la navegación espacial (como el laberinto de agua de Morris, MWM, del inglés, Morris Water Maze) tiene un efecto positivo sobre la neurogénesis, en este caso, aumentando la supervivencia de las neuronas granulares (Dupret D. *et al.*, 2008).

Otro de los factores reguladores de la neurogénesis hipocampal mejor conocido es el enriquecimiento ambiental. Los estímulos que un individuo recibe del entorno proporcionan nuevas oportunidades para el aprendizaje y, por tanto, el desarrollo del hipocampo. Vivir en un ambiente enriquecido puede promover la neurogénesis hipocampal favoreciendo la supervivencia de las neuronas de nueva generación. Cabe destacar que no tiene el mismo efecto en las neuronas de mayor edad (Kempermann G. *et al.*, 1997; Van Praag H. *et al.*, 2002; Tashiro A. *et al.*, 2007).

Finalmente, otro factor destacable es el ejercicio físico voluntario. Los estudios más recientes muestran que correr de manera frecuente aumenta los niveles de proliferación de las NSCs en ratones, así como la supervivencia de las neuronas de nueva generación nacidas durante este periodo de tiempo. Además, se ha observado que este aumento de la neurogénesis tiene un efecto sobre el cerebro, ya que los animales que realizan ejercicio voluntario presentan mejores resultados en los test de comportamiento de MWM, demostrando así una mayor capacidad cognitiva (van Praag H. *et al.*, 2005; van Praag H., 2009; Deng W. *et al.*, 2010; Gao Y. *et al.*, 2020). También se ha observado que acelera la maduración morfológica neuronal y que mejora la integración de las nuevas neuronas. Por todo esto, el ejercicio voluntario es considerado uno de los métodos más efectivos para paliar los efectos negativos que acarrea el envejecimiento y la neurodegeneración (Gao Y. *et al.*, 2020).

Sin embargo, no todos los factores ambientales reguladores de la neurogénesis son positivos. Existen factores que disminuyen los niveles de proliferación de las NSCs o que influyen de manera negativa en la supervivencia de las nuevas neuronas. Entre estos factores podemos encontrar un alto nivel de estrés, la falta de sueño y el abuso de sustancias adictivas (opiáceos, nicotina, alcohol) (Eisch AJ. *et al.*, 2000; Abrous DN. *et al.*, 2002; Herrera DG. *et al.*, 2003). El propio envejecimiento del individuo también reduce la neurogénesis (Klempin F. y Kempermann G., 2007; Díaz-Moreno M. *et al.*, 2018). En contraposición a estos, se ha observado que algunos tratamientos antidepresivos pueden actuar como factores reguladores positivos incrementando la proliferación de las células de la ZSG y previniendo el efecto de alguno de los factores negativos, como en el caso del estrés (Warner-Schmidt JL. y Duman RS., 2006). Otros factores externos, como la dieta, pueden regular la neurogénesis tanto positiva como negativamente. En este aspecto se ha observado, por ejemplo, un aumento de la neurogénesis en el giro dentado en ratones que han sido sometidos a dietas con restricciones calóricas, y el caso contrario, como una dieta con alta tasa de grasas puede afectar de forma negativa al proceso de neurogénesis (Lee J. *et al.*, 2002; Tozuka Y. *et al.*, 2009).

También existen muchos factores internos, tanto del microambiente o nicho neurogénico como intrínsecos a las propias células, que regulan el proceso de

neurogénesis hipocampal. Por lo general, se trata de factores cuyos efectos son complejos debido al gran número de vías de señalización que operan en el nicho de manera simultánea.

El primero de los factores del microambiente a los que haremos referencia serán los niveles hormonales. Las hormonas con mayor relevancia en el proceso de neurogénesis son los corticoesteroides. Estas moléculas están implicadas en la disminución de la neurogénesis en respuesta a otros factores como el estrés o durante el propio envejecimiento (Cameron HA. y Gould E., 1994; Cameron HA. y McKay RD., 1999). Sin embargo, su efecto puede variar, ya que se han observado estados fisiológicos con altos niveles de corticoesteroides relacionados con un incremento en neurogénesis (Kempermann G., 2011). Por otro lado, se ha observado que los estrógenos o los esteroides ováricos aumentan los niveles de proliferación en el GD, mientras que la ovariectomía los reduce y aumenta la muerte celular (Tanapat P. *et al.*, 1999). También se ha observado recientemente que tanto las células madre de Tipo 1 como los progenitores de Tipo 2 expresan receptores de glucocorticoides y que las oscilaciones de éstos en el cerebro adulto son capaces de mantener en estado quiescente a las NSPCs, preservando un pool neurogénico de NSPCs en el adulto. Esto supone un nuevo mecanismo por el cual los glucocorticoides son capaces de regular la proliferación de las NSPCs (Schouten M. *et al.*, 2020). Cabe destacar que el efecto generado por las hormonas puede variar dependiendo de la región del cerebro en la que ejerzan su efecto. Por ejemplo, la prolactina aumenta la generación de nuevos progenitores neurales en los ventrículos, pero no tiene ningún efecto asociado en el giro dentado (Shingo T. *et al.*, 2003).

Los factores de crecimiento también están implicados en la regulación de la neurogénesis. Factores de crecimiento como EGF, del inglés 'Epidermal Growth Factor', o FGF2, del inglés 'Fibroblast Growth Factor-2', ejercen un efecto mitogénico en las zonas neurogénicas del cerebro, promoviendo la proliferación de los progenitores y los neuroblastos (Reynolds BA. *et al.*, 1992; Kuhn HG. *et al.*, 1997; Haïk S. *et al.*, 2000). Ambos factores de crecimiento son empleados para el mantenimiento de progenitores y neuroesferas *in vitro* (Arsenijevic Y. *et al.*, 2001). Además, la expresión del receptor de

EGF se considera una marca de activación de las células madre en los nichos del cerebro adulto (Codega P. *et al.*, 2014; Walker TL. *et al.*, 2016). IGF-1, del inglés 'Insulin-like Growth Factor 1', induce proliferación celular y media los efectos positivos del ejercicio físico voluntario (Carro E. *et al.*, 2001; Trejo JL. *et al.*, 2001), además de regular el proceso de diferenciación y maduración de las NSPCs en el adulto (Nieto-Estévez V. *et al.*, 2016). De la misma manera, se ha observado que IGF2, del inglés 'Insulin-like Growth Factor 2' tiene un papel regulador sobre la proliferación de las NSCs del DG, siendo dependiente de la señalización a través de AKT (Bracko O. *et al.*, 2012). Por último, VEGF, del inglés 'Vascular Endothelial Growth Factor', también está implicado en la regulación de la proliferación y el destino celular (Pérez-Domper P. *et al.*, 2013).

Las neurotrofinas también regulan la neurogénesis adulta (Vilar M. y Mira H., 2016). Se ha observado que BDNF, del inglés 'Brain Derived Neurotrophic Factor', es necesario para el proceso de neurogénesis en el giro dentado del hipocampo (Lee J. *et al.*, 2002). In vitro, este factor incrementa la neurogénesis favoreciendo e induciendo la diferenciación neuronal y disminuyendo la proliferación de los precursores (Pencea V. *et al.*, 2001; Cheng A. *et al.*, 2003). Estudios más recientes sugieren que el efecto pro-neurogénico provocado por la actividad física voluntaria puede deberse a un efecto conjunto de neurotrofinas, entre ellas, de BDNF y GDNF (del inglés, Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor) (Trincherio MF. *et al.*, 2017). Otra neurotrofina conocida por su papel en la neurogénesis hipocampal es la Neurotrofina 3 (NT3). En el giro dentado, esta neurotrófica juega un papel en la supervivencia y maduración de las nuevas neuronas (Bothwell M., 2014; Vilar M. y Mira H., 2016). Por otro lado, se ha observado que la actividad física también aumenta los niveles de GDNF, del inglés 'glial cell line-derived neurotrophic factor', en el GD del hipocampo, y, que éste está implicado en la maduración dendrítica, así como en la plasticidad e integración de las nuevas neuronas en los circuitos adultos (Bonafina A. *et al.*, 2019).

Otro de los factores de nicho que intervienen en la regulación de la neurogénesis son los niveles de neurotransmisores. El neurotransmisor excitatorio más conocido es el glutamato, y ejerce su función a través de los receptores de tipo iónico y metabotrópicos, como son los receptores de NMDA (n-metil-D-aspartato), AMPA (ácido

alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico) o kainato. La neurotransmisión glutamatérgica puede tener efectos muy diferentes en función de los receptores que intervengan. Por un lado, la activación de los receptores de tipo NMDA reduce la neurogénesis en el giro (Cameron HA. *et al.*, 1995), por el contrario, se ha observado que la inhibición farmacológica de los estos o una lesión en la corteza entorrinal pueden aumentarla (Cameron HA. *et al.*, 1995; Nacher J. *et al.*, 2001; Yoshimizu T. y Chaki S., 2004). En contraposición, la activación de los receptores de tipo AMPA o los de kainato promueven la proliferación de las células del giro (Bai F. *et al.*, 2003). Todo esto nos muestra la importancia de la neurotransmisión glutamatérgica y como regula la neurogénesis adulta de una manera muy precisa. Otro de los neurotransmisores más conocidos por su papel regulador de la neurogénesis en el cerebro adulto es el neurotransmisor inhibitorio GABA, ya mencionado anteriormente. En el hipocampo, este neurotransmisor y sus receptores (GABA_AR, GABA_BR) están implicados en la proliferación, migración y maduración dendrítica de los progenitores y nuevas neuronas, así como en la arborización dendrítica en etapas más avanzadas (Sibbe M. y Kulik A., 2016). Deleciones de alguna de las subunidades de los receptores GABA_AR han mostrado un posicionamiento incorrecto de las neuronas en la CG, así como un retraso en la maduración dendrítica (Duveau V. *et al.*, 2011). Por otro lado, los receptores GABA_BR han sido relacionados con la respuesta a la depresión y el estrés, llegando a observar un aumento de la proliferación de las células Tipo 2a (Sox2⁺ DCX⁻) y una aceleración de la diferenciación en ratones Knockout (KO) para estos receptores (Giachino C. *et al.*, 2014). Otros neurotransmisores, como la serotonina, aumenta la neurogénesis tanto en el GD como en la ZSV (Brezun JM. y Daszuta A., 1999); la norepinefrina, sin embargo, aumenta la proliferación en el giro dentado sin tener un efecto ni en la diferenciación ni en la supervivencia celular, pero no actúa sobre la proliferación en la ZSV (Kulkarni VA. *et al.*, 2002).

Por último, haremos referencia a los factores de nicho relacionados con las señales clásicas del desarrollo embrionario, que continúan teniendo un papel importante en los nichos neurogénicos adultos (Ma DK. *Et al.*, 2010; Faigle R. y Song H., 2013). En este aspecto podemos destacar entre otras, las vías de señalización de Notch (Engler A. *et al.*, 2018), Eph/ephrins (efrinas) (Laussu J. *et al.*, 2014), Shh (del inglés 'Sonic

Hedgehog) (Álvarez-Buylla A. y Ihrie RA., 2014) como reguladores de la neurogénesis adulta, aunque nos centraremos en las familias de Wnt y BMP (del inglés 'Bone Morphogenetic Protein') que serán objeto de estudio en esta tesis. Otros reguladores de la neurogénesis considerados intrínsecos de las propias células, como los factores de transcripción, los reguladores epigenéticos o el metabolismo celular, que también controlan la neurogénesis adulta en sus diferentes etapas, no se incluyen en esta introducción, pues escapan al tema central del trabajo de tesis.

1.2. Las proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs).

Las proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs) son un grupo de proteínas muy conservado que actúan como factores de crecimiento secretados y que forman parte de la superfamilia de proteínas de factor de crecimiento transformante beta (TGF- β , del inglés Transforming Growth Factor Beta).

1.2.1. Origen de las BMPs.

Las proteínas BMPs fueron inicialmente descubiertas por Marshall Urist en 1965 como proteínas pertenecientes a los tejidos óseos. En este año, Urist se encontraba trabajando en la calcificación ósea, más concretamente intentando demostrar la capacidad regenerativa que, durante décadas, se le atribuía a la matriz ósea. Para ello, implantó extractos provenientes de la matriz ósea en tejidos de conejo y ratón. Unas semanas tras la implantación de los extractos, Urist observó la formación de hueso en dichas muestras. Gracias a esta observación se pudo demostrar que la capacidad de generar tejido óseo se debía a una sustancia proveniente de la matriz del hueso que, en aquella época, Urist describió como 'proteína morfogenética ósea' y que hoy conocemos como proteínas BMPs (Urist MR., 1965; Urist MR. y Strates BS., 1971). Desde este momento las BMPs fueron objeto de diversos estudios para analizar sus características y funciones. Aunque inicialmente fueron conocidas por su capacidad para inducir la regeneración ósea, en la actualidad son conocidas por participar y regular numerosos procesos celulares, como la proliferación, diferenciación o, incluso, la apoptosis. Se sabe que juegan un papel importante en los procesos de crecimiento, desarrollo y homeostasis de muchos órganos y tejidos, no solamente del hueso, tanto en etapas adultas como en estadios embrionarios (Reddi AH., 1998; Mabie PC. *et al.*, 1999; Sieber C. *et al.*, 2009).

Cabe destacar que el aislamiento y la purificación de las proteínas BMPs a partir de hueso siempre ha sido un reto difícil de superar. Esto es debido a la poca cantidad de BMPs, en relación a otras proteínas, presente en el hueso, junto a su relativa

insolubilidad e inestabilidad. Inicialmente solo se caracterizaron tres proteínas BMPs: BMP1, BMP2A/BMP2B y BMP3. De estos ligandos, BMP2A, BMP2B y BMP3 eran miembros de la familia del TGF- β , mientras que BMP1 era un contaminante, una proteinasa responsable del procesamiento del colágeno y otras proteínas pertenecientes como TGF- β s y GDFs (del inglés, Growth Differentiation Factor). Años después, se mejoró el proceso de purificación, se renombró a BMP2A como BMP2, a BMP2B como BMP4 y se consiguió aislar y caracterizar un mayor número de proteínas, desde BMP4 hasta BMP8A/BMP8B (Wozney JM. y Rosen V., 1998). En la actualidad, esta familia cuenta con hasta más de veinte miembros perfectamente caracterizados (Chen D. *et al.*, 2004).

1.2.2. Nomenclatura y clasificación de las BMPs.

Como hemos comentando previamente, las proteínas BMPs son un miembro más dentro de la superfamilia del TGF- β , esta familia incluye las propias proteínas TGF- β , las BMPs, los factores de crecimiento y diferenciación, GDFs, las activinas/inhibinas y nodal. La principal diferencia entre estas subfamilias de proteínas es el número y la posición de cisteínas en la estructura de la proteína madura. Por ejemplo, los TGF- β s y las activinas/inhibinas- β cuentan con nueve cisteínas en su estructura, mientras que las BMPs, los GDFs y las inhibinas- α cuentan con siete. Para ambos grupos, una de estas cisteínas es empleada en la dimerización del ligando por medio de la formación de un puente disulfuro. También podemos encontrar algún ligando como GDF3, GDF9 o BMP15 que no forma parte de estos dos grupos, cuentan con tan solo seis cisteínas en su estructura y no forman dímeros (Feng XH. y Derynck R., 2005).

Cada uno de los ligandos que forman parte de estas subfamilias cuenta con más de un nombre, esto es debido a que fueron descubiertas en investigaciones paralelas siguiendo, en muchos casos, métodos diferentes. Así pues, a modo de ejemplo, BMP6 también es conocida como Vrg1, BMP7 como OP-1 (del inglés Osteogenic Protein 1), BMP12 como GDF7 o como CDMP3 (del inglés, Cartilage Derived Morphogenetic Protein).

Las proteínas BMPs conocidas hasta la fecha también son clasificadas en función de su estructura, homología y función (Tabla 3). En primer lugar, encontramos el grupo formado por BMP2 y BMP4, presentando un 90% de homología en sus secuencias. En segundo lugar, encontramos el grupo BMP3, formado por BMP3a y BMP3b. El tercer grupo también es conocido como proteínas osteogénicas (OPs), y está formado por BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a y BMP8b, presentando un 75% en la homología de secuencia. El grupo GDF7/6/5 está formado por BMP12, BMP13 y BMP14 respectivamente. Y, por último, encontramos el grupo formado por BMP9 y BMP10. BMP11 y BMP15 son miembros más alejados dentro de la familia, presentando cierta homología con GDF8 y GDF9.

Tabla 3. Principales proteínas BMPs y su función conocida.

BMP	Función	Referencia
BMP1	Metaloproteasa, papel en la embriogénesis temprana.	Xiao YT. <i>et al.</i> , 2007
BMP2 (BMP2a)	Formación de hueso y cartílago; Formación del corazón.	Nakase T. <i>et al.</i> , 2006 Xiao YT. <i>et al.</i> , 2007
BMP3a (Osteogenina)	Regulador negativo en la formación del hueso y cartílago.	Hino J. <i>et al.</i> , 2004 Bragdon B. <i>et al.</i> , 2011
BMP3b (GDF10)	Inhibidor de la diferenciación de los osteoblastos.	Hino J. <i>et al.</i> , 2011 Matsumoto Y. <i>et al.</i> , 2012
BMP4 (BMP2b)	Regulador en la formación embrionaria de extremidades, dientes y huesos	Oxburgh L. <i>et al.</i> , 2005 Xiao YT. <i>et al.</i> , 2007
BMP5	Morfogénesis del cartílago	King JA. <i>et al.</i> , 1994 Xiao YT. <i>et al.</i> , 2007

BMP	Función	Referencia
BMP6 (Vrg1)	Desarrollo del sistema nervioso, morfogénesis de hueso y cartílago.	Kang Q. <i>et al.</i> , 2004 Nakase T. <i>et al.</i> , 2006
BMP7 (OP1)	Desarrollo y reparación de cartílago, formación del riñón, formación del ojo.	Xiao YT. <i>et al.</i> , 2007 Kowtharapu BS. <i>et al.</i> , 2018
BMP8a (OP2)	Homeostasis de cartílago y hueso.	Ozkaynak E. <i>et al.</i> , 1992 Xiao YT. <i>et al.</i> , 2007
BMP8b (OP3)	Espermatogénesis.	Ozkaynak E. <i>et al.</i> , 1992 Xiao YT. <i>et al.</i> , 2007
BMP9 (GDF2)	Diferenciación celular, desarrollo del sistema nervioso.	Kang Q. <i>et al.</i> , 2004 David L. <i>et al.</i> , 2008
BMP10	Desarrollo embrionario del corazón.	Chen D. <i>et al.</i> , 2004 Xiao YT. <i>et al.</i> , 2007
BMP11 (GDF11)	Desarrollo embrionario del sistema nervioso, formación del riñón.	Nakashima M. <i>et al.</i> , 2003 Nakase T. <i>et al.</i> , 2006
BMP12 (GDF7, CDMP3)	Desarrollo de tendones y ligamentos.	Reddi AH., 2003 Nakase T. <i>et al.</i> , 2006
BMP13 (GDF6, CDMP2)	Desarrollo de cartílago y hueso.	Reddi AH., 2003 Nakase T. <i>et al.</i> , 2006
BMP14 (GDF5, CDMP1)	Regeneración y reparación ósea.	Reddi AH., 2003 Nakase T. <i>et al.</i> , 2006
BMP15 (GDF9)	Formación y regulación ovárica.	Knight PG. y Glister C., 2006
BMP16	Regulación formación ósea.	Feiner N. <i>et al.</i> , 2009 Feiner N. <i>et al.</i> , 2011

De la misma manera, BMP16, BMP17 y BMP18 no forman parte de ningún grupo dentro de la familia, en la actualidad se las considera una subfamilia aparte dentro de la superfamilia del TGF- β (Miyazono K. *et al.*, 2005; Miyazono K. *et al.*, 2010).

Se han encontrados análogos de las proteínas BMPs en invertebrados. Es el caso de las proteínas de *Drosophila* Dpp, codificada en el gen “decapentaplégico”, y la proteína 60A, del gen ‘glassbottom boat’. Estas proteínas son de interés ya que se ha observado que Dpp tiene una homología del 75% con BMP2 o BMP4, mientras que 60A tiene una homología del 70% con BMP6 y BMP7 (Sampath TK. *et al.*, 1992). Estas similitudes han hecho que varios estudios demuestren que Dpp y 60A pueden inducir la formación de hueso y cartílago en animales mamíferos (Sampath TK. *et al.*, 1993).

1.2.3. Estructura y procesamiento de las BMPs.

Como miembros de la superfamilia del TGF- β , las proteínas BMPs son sintetizadas como precursores de gran tamaño (entre 400 y 500 aminoácidos de longitud) que, posteriormente, serán procesados dando lugar a un homodímero maduro unido entre sí por un puente disulfuro.

Estas proteínas son sintetizadas en el interior celular como precursores inmaduros monoméricos (pre-pro-péptido). Estos péptidos constan de: un péptido señal en la región N-terminal, encargado de dirigir a la proteína hacia la vía secretora; un prodominio, que ayuda en el correcto plegamiento de la forma madura; y el péptido maduro en sí, que se extiende hasta la región C-terminal (Miyazono K. *et al.*, 1988; Gámez B. *et al.*, 2013), como se muestra en la [Figura 3](#) para el caso de BMP6. En la secuencia peptídica de estas proteínas podemos encontrar siete cisteínas localizadas en el extremo C-terminal, seis de estas siete cisteínas son empleadas en la formación de tres puentes disulfuro intramoleculares que ayudan al correcto plegamiento y a la estabilidad de la forma madura de la proteína, esta estructura es conocida como “nudo de cisteínas” (del inglés, “Cysteine Knots”) (Scheufler C. *et al.*, 1999; Gámez B. *et al.*, 2013). Aunque son sintetizados como monómeros, estos péptidos se asocian entre sí

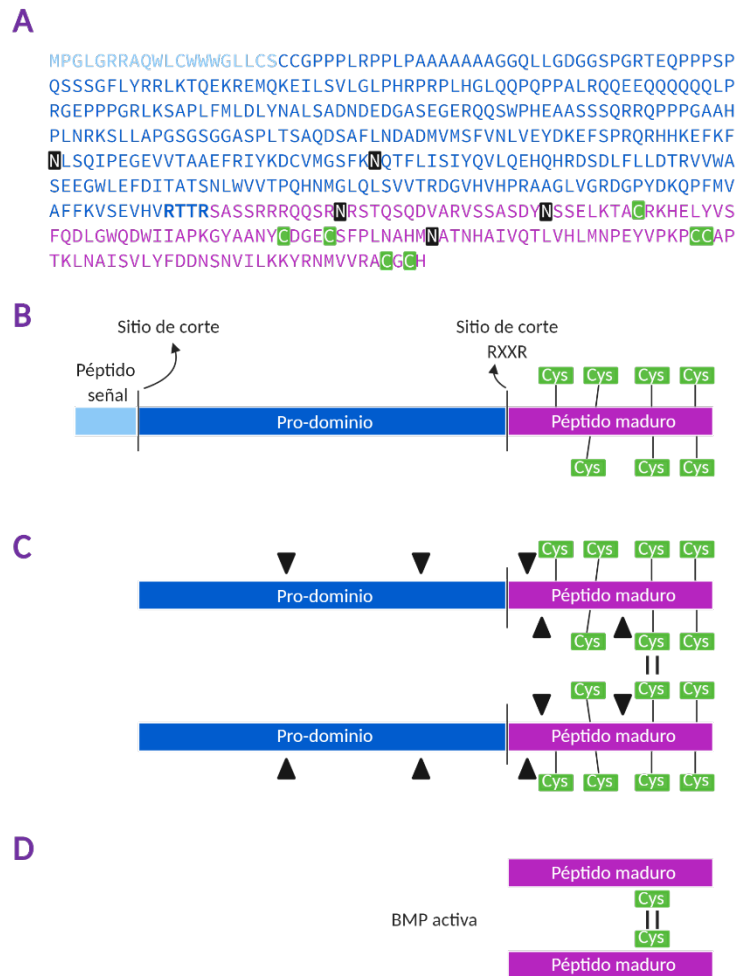


Figura 3. Secuencia, modificaciones postraduccionales y procesamiento de la proteína BMP6. (A) Secuencia peptídica de la proteína BMP6. Se muestra la secuencia del péptido señal (Azul), la secuencia del pro-péptido (Azul) y la secuencia de la forma madura (Morado). Además, se muestra la posición de las glicosilaciones (N) y las cisteínas del péptido maduro que forman parte de puentes disulfuro y estabilizan la proteína (C). (B) Representación de los dominios que forman el pre-propéptido de la proteína BMP6 monomérica e inmadura antes de su secreción y procesamiento. (C) Representación de un homodímero inmaduro de BMP6. La proteína pierde el péptido señal y es procesada adquiriendo glicosilaciones y dimerizando, las glicosilaciones se representan mediante triángulos negros. (D) Representación de la forma madura de la proteína BMP6. Se pierde el pro-dominio que forma parte de la forma madura por medio de un corte en el sitio de maduración RXXR por una furina.

para dar lugar a homodímeros formando un puente disulfuro entre la séptima cisteína localizada en el extremo C-terminal de cada secuencia. Posteriormente son procesadas en el aparato de Golgi, en primer lugar, se someten a un proceso de glicosilación, para

después ser cortadas por enzimas furinas en el sitio de maduración RXXR antes de ser secretadas al medio como homodímeros maduros. Para que una proteína BMP sea activa, la dimerización, mediante un puente disulfuro, de su forma madura es indispensable. Tras la secreción de la proteína al exterior celular, el dominio inmaduro, que ha sido escindido de la forma madura, se mantiene unido a ésta de forma no covalente y ambos son biológicamente activos tanto *in vivo* como *in vitro*. El dominio inmaduro no es biológicamente activo por sí solo, pero puede facilitar el plegamiento, la solubilidad, el transporte y el reconocimiento específico de la proteína madura, uniéndose a componentes de la matriz extracelular, como por ejemplo la fibrilina (Bragdon B. *et al.*, 2011; Sieber C. *et al.*, 2009). Este tipo de unión evita la difusión del ligando, aumentando su concentración local cerca de la célula que lo sintetiza. Por otro lado, las BMPs también pueden ser secretadas en microvesículas presentes en los fluidos corporales, incluido el suero. Se sabe que BMP2 y BMP4 por ejemplo están presentes en el suero, y en general se asume que lo están en su forma soluble activa (Bragdon B. *et al.*, 2011). Cabe destacar que, aunque en condiciones normales estas proteínas forman homodímeros, se ha observado y estudiado por varios grupos la existencia de ciertos heterodímeros, principalmente formados por BMP2 y BMP6 o BMP7, que parecen presentar un mayor potencial para desencadenar la cascada de señalización de las BMPs (Sampath TK. *et al.*, 1990; Valera E. *et al.*, 2010; Guo J. y Wu G., 2012).

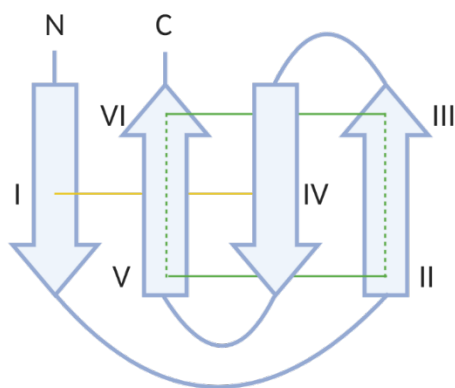


Figura 4. Estructura de una proteína BMP. Nudo de cisteína. Representación del nudo de cisteína formado en la estructura de una BMP. En la figura se pueden observar: cuatro láminas β (representadas con flechas), las seis cisteínas presentes en el dominio maduro de la proteína (numeradas de la I a la VI desde el extremo N-terminal al C-terminal), los tres puentes disulfuro que se forman para ayudar a la estabilización de la proteína (representados con líneas verdes y amarilla). Los puentes disulfuro formados por las cisteínas II/V y III/VI (líneas verdes) forman un anillo a través del cual es formado el tercer puente disulfuro entre las cisteínas I/IV.

Además, se ha encontrado una fuerte homología entre las secuencias de los distintos miembros de la subfamilia de las proteínas BMPs. Esto se atribuye a que la mayoría de las proteínas comparten procesos como la secreción al exterior celular, el plegamiento o la estabilidad.

1.2.4. Tipos y estructura de los receptores de las BMPs.

Las proteínas BMPs se unen a un complejo de receptores transmembrana. Este complejo de receptores corresponde a un heterotetrámero, formado por dos homodímeros. Se trata de receptores con actividad serina/treonina quinasa que pueden ser divididos en receptores de tipo I y receptores de tipo II. Ambos tipos de receptores comparten la conformación en la membrana. El extremo N-terminal se localiza en el exterior celular, corresponde al dominio de unión con el ligando y contiene entre 10 y 12 residuos de cisteína. Ambos poseen una única región transmembrana, y ambos presentan un dominio serina/treonina quinasa intracelular que será el encargado de iniciar la cascada de señalización (Feng XH. y Derynck R., 2005; Miyazono K. *et al.*, 2010) (Figura 5). Cuando el ligando se une al dominio extracelular de los receptores, el receptor de tipo II es el encargado de transducir la señal al interior celular fosforilando el dominio rico en glicina y serina (dominio GS) del receptor tipo I, que queda activado. El receptor tipo I a su vez es el encargado de fosforilar al siguiente intermediario, iniciando así la cascada de señalización. Los ligandos pueden unirse al dominio extracelular de los receptores tipo I en ausencia de los receptores tipo II, sin embargo, la presencia de ambos tipos de receptores, trabajando de manera simultánea, hace que aumente la afinidad de unión por el ligando de manera considerable (Hinck AP., 2012; Gámez B. *et al.*, 2013). Los receptores de tipo I pueden ser clasificados atendiendo a su función y estructura en dos grupos: en el primero podemos encontrar a Acvrl1 (Alk1) y Acvr1 (Alk2); al segundo pertenecen Bmpr1a (Alk3) y Bmpr1b (Alk6) (Bragdon B. *et al.*, 2011). Los receptores tipo I también son conocidos por presentar una mayor afinidad específica por los ligandos, de esta manera podemos destacar como el receptor Bmpr1a (Alk3) presenta más afinidad por el grupo de BMPs formado por BMP2

y BMP4, mientras que Acvr1 (Alk2) presenta más afinidad por el grupo de BMPs formado por BMP5, BMP6 y BMP7 (OPs) (Liu F. *et al.*, 1995; Gámez B. *et al.*, 2013).

Al igual que los receptores de tipo I, los receptores de tipo II pueden clasificarse en función de su estructura y su función. En este caso encontramos solo tres tipos de receptores tipo II, que son: Bmpr2, Acvr2a y Acvr2b. De entre estos tres receptores destaca Bmpr2, esto es debido a que este receptor posee una cola peptídica en el C-terminal que no poseen el resto de receptores tipo II. Esta prolongación en el extremo C-terminal permite la unión y el reclutamiento de intermediarios en la cascada de señalización (como la quinasa LIM, LIMK), favoreciendo así su fosforilación por el complejo de receptores y promoviendo respuestas que otros receptores no son capaces de inducir (Figura 6). Gracias a la combinación de los diferentes receptores tipo I y tipo II y a las diferencias que existen entre ellos, el sistema es capaz de unir una gran variedad de ligandos de manera selectiva e inducir diferentes respuestas de forma específica. Esto lleva a que estemos hablando de una ruta de señalización altamente compleja que puede desencadenar un gran número de respuestas diferentes en el organismo, ya que proteínas BMPs que tienen una estructura similar llegan a presentar funciones diferentes según el contexto celular (Meynard D. *et al.*, 2009; Perron JC. y Dodd J., 2012; Gámez B. *et al.*, 2013). Cabe destacar que los receptores tipo I y tipo II muestran cierta afinidad entre ellos, y en ausencia de ligando se pueden encontrar tanto homo- como hetero- complejos de receptores preformados en la membrana celular. Sin embargo, la unión de ligando incrementa de forma notable la oligomerización de complejos de receptores. (Ehrlich M. *et al.*, 2011).

1.2.5. Rutas de señalización de las BMPs.

Las proteínas BMPs son capaces de inducir la señalización a través de dos rutas diferentes. Estas son: la ruta canónica de las BMPs (mediada por las proteínas Smads, Figura 5) y la ruta no canónica (Figura 6). Existen algunos estudios que demuestran como la proteína BMP2 es capaz de inducir una vía de señalización u otra en función de a qué tipo de receptor se una. Por un lado, si BMP2 se une a un heterotetrámero de receptores tipo I y tipo II previamente formado, se inducirá la vía de señalización canónica, mediada

por las proteínas Smad. Si por el contrario BMP2 se une de forma específica a un dímero de receptores tipo I, esta unión provocará la formación del heterotetrámero mediante el reclutamiento de un dímero de receptores tipo II y se inducirá la vía de señalización no canónica (Nohe A. *et al.*, 2004; Wan M. y Cao X., 2005). Esta característica añade otra capa de complejidad a esta familia de ligandos y receptores, ya que en función de la disponibilidad de los receptores se activará una ruta u otra.

1.2.5.1. Ruta de señalización canónica (mediada por las proteínas Smad).

La señalización a través de las proteínas Smads es el mecanismo principal, así como el más estudiado para el caso de la familia de las BMPs (Figura 5). Cabe destacar que las proteínas Smad actúan como mediadores en la ruta de señalización de la subfamilia de proteínas BMPs, pero no son exclusivos de esta, puesto que proteínas de esta misma familia actúan como mediadores comunes para toda la superfamilia del TGF- β . Se han caracterizado ocho tipos de proteínas Smads en mamíferos, las cuales se pueden clasificar en tres tipos atendiendo a su estructura y función. En primer lugar, encontramos el grupo de las R-Smad, llamadas así por ser proteínas Smad que son reguladas por los receptores (del inglés, Receptor regulated-Smad). A este grupo de proteínas pertenecen Smad1, Smad5 y Smad8, siendo también denominadas BR-Smad, ya que son reguladas por los receptores de las proteínas BMPs (del inglés, BMP receptor Regulated-Smad). A este grupo de proteínas R-Smad hay que sumarles Smad2 y Smad3, que son reguladas por los receptores de las Activinas y del TGF- β , aunque no por los receptores de las proteínas BMPs, por lo que son denominadas AR-Smads (del inglés, Activin receptor Regulated-Smad). El siguiente grupo de proteínas Smads es el denominado Co-Smad. A este grupo solo pertenece Smad4, y es denominado de esta manera ya que Smad4 actúa como mediador común para el resto de proteínas Smads (del inglés, Common mediator Smad). El tercer y último grupo es de las proteínas Smad inhibitorias o I-Smad (del inglés, Inhibitory Smad), y está formado por Smad6 y Smad7 (Sieber C. *et al.*, 2009; Miyazono K. *et al.*, 2010; Gámez B. *et al.*, 2013).

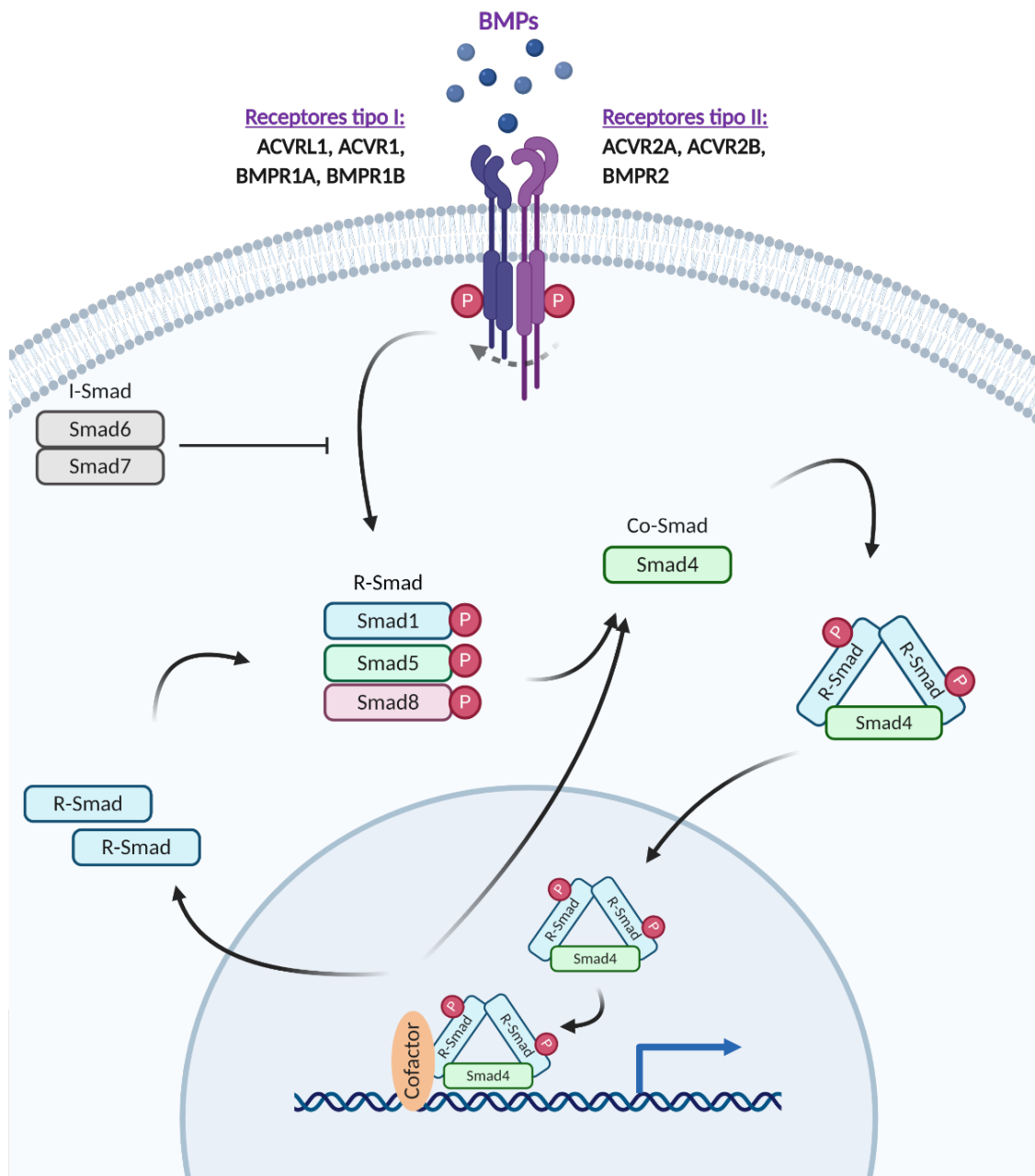


Figura 5. Ruta de señalización canónica (dependiente de proteínas Smad).

La figura representa la vía de señalización canónica, dependiente de proteínas Smads, inducida por las proteínas BMPs. En la membrana celular encontramos el complejo de receptores formado por dos subunidades de receptores tipo I y dos subunidades de receptores tipo II. Cuando el ligando se une al complejo de receptores, el receptor tipo II transfosforila al receptor tipo I, y este a su vez es el encargado de fosforilar a las R-Smad (Smad1,5,8). La fosforilación de R-Smad permite la unión de Co-Smad (Smad4) y la formación de un complejo multimérico entre dos moléculas de R-Smad y una de Co-Smad. Dicho trímero se translocará al interior del núcleo para actuar como factor de transcripción de diversos genes, muchos de ellos relacionados con la neurogénesis. Tras este proceso se pierden las fosforilaciones, el complejo se desensambla y las moléculas de R-Smad y Co-Smad, como monómeros, son translocadas de vuelta al citoplasma para iniciar el proceso de nuevo.

Las proteínas R-Smad constan de dos dominios diferenciados entre sí y altamente conservados, son los denominados MH1 y MH2 (del inglés, MAD Homology 1 y 2). MH1 corresponde al dominio N-terminal y es el responsable de la unión de la R-Smad al DNA. MH2 por otro lado, corresponde al dominio C-terminal y es el responsable de la especificidad de la proteína, la unión con el receptor tipo I y, además, contiene la secuencia de aminoácidos SXSS, que recibirá la fosforilación (Shi Y. *et al.*, 1997). En condiciones normales, si el receptor de tipo I está inactivo, las R-Smad adquieren una conformación auto-inhibitoria. Los dominios MH1 y MH2 de la proteína R-Smad se pliegan sobre si mismos adquiriendo una conformación 'cerrada' que impide que estas moléculas actúen como intermediarios en la señalización. Si por el contrario el receptor de tipo I se encuentra activo (fosforilado), la proteína R-Smad será fosforilada por el receptor en el sitio SXSS del dominio MH2, impidiendo así que la proteína se pliegue y adquiera dicha conformación auto-inhibitoria, quedando así 'activada' (Wrana JL., 2000). En estas condiciones, las proteínas R-Smad son reclutadas por Co-Smad (Smad4), la cual formara un complejo multimérico (trímero) con dos moléculas de R-Smad activas interactuando a través de sus dominios MH2. Es este complejo de proteínas Smads (R-Smad/Smad4/R-Smad) el que será translocado al interior nuclear para actuar de factor de transcripción ayudado por diferentes cofactores (Itoh S. *et al.*, 2000; Hill CS., 2009; Gámez B. *et al.*, 2013) (Figura 5).

Este proceso está regulado en numerosos puntos. De entre todos ellos podemos destacar el papel que juegan las proteínas Smad inhibitorias o I-Smad (Smad6 y Smad7). Estas proteínas se unen a los receptores de tipo I compitiendo de forma dominante con las R-Smad e impidiendo así que estas sean fosforiladas y activadas (Derynck R. y Zhang YE., 2003). Además de las Smad inhibitorias, esta ruta de señalización también puede ser regulada mediante la ubiquitinación y consecuente degradación de los intermediarios por el proteasoma, o por la interacción con otras proteínas con actividad quinasa, como Gsk3 y MAP quinasa (Wicks SJ. *et al.*, 2006; Fuentealba LC. *et al.*, 2007).

1.2.5.2. Ruta de señalización no canónica (independiente de Smad).

Existe otra vía de señalización inducida por las BMPs, pero, en este caso, independiente de las proteínas Smads. Como hemos comentado anteriormente, si se induce la oligomerización del heterotetrámero de receptores debido a la unión del ligando con un monómero o dímero de receptores tipo I y posteriormente se recluta al receptor de tipo II, se activará la ruta de señalización no canónica. Como en el caso de la ruta canónica, los receptores de tipo II trans-fosforilarán a los receptores de tipo I, y estos a su vez serán los encargados de reclutar a proteínas de unión al complejo receptor como BRAM1 y XIAP. Una vez unidas al complejo de receptores, estas proteínas son las encargadas de atraer a TAB1. TAB1, a su vez, induce la activación y fosforilación de TAK1, proteína perteneciente a la familia de las MAPKKK, que será la encargada de iniciar diferentes mecanismos de señalización como pueden ser los de p38 MAPK, JNK o ERK (Kurozumi K. *et al.*, 1998; Yamaguchi K. *et al.*, 1999; Lu M. *et al.*, 2007). TAK1 también fosforila a Smad1 en múltiples sitios, uno de los cuales es el sitio SXSS C-terminal que también fosforilan los receptores de BMP de tipo I. Por lo tanto, existen puntos de “crosstalk” entre las rutas canónica y no canónica de las BMPs (Greenblatt MB. *et al.*, 2010). De la misma forma existen estudios que muestran que las BMPs también pueden inducir la señalización a través de GTPasas de la familia Rho, de fosfatidilinositol 3-quinasa/Akt (PI3K/Akt) o incluso otros tipos de MAP quinasas (Derynck R. y Zhang YE., 2003; Zhang YE., 2009; Gámez B. *et al.*, 2013).

También se ha podido observar que las proteínas BMPs participan en el proceso de migración y crecimiento de las dendritas y del axón de neuronas, y que estos efectos no dependen de la activación de las proteínas Smads, pero sí de la función de LIMK (Lee-Hoeflich ST. *et al.*, 2004; Eaton BA. y Davis GW., 2005). Esta quinasa es reclutada por el complejo de receptores uniéndose a un dominio específico en la cola citoplasmática de los receptores de tipo II, siendo Bmpr2 el único receptor tipo II que posee dicho dominio de unión (Foletta VC. *et al.*, 2003; Lee-Hoeflich ST. *et al.*, 2004). Además del reclutamiento por Bmpr2, la actividad de LIMK también depende de la activación de la GTPasa Cdc42 (que a su vez activa a la quinasa PAK, la cual fosforila a LIMK), de PI3K y de la MAP quinasa p38 al menos en células

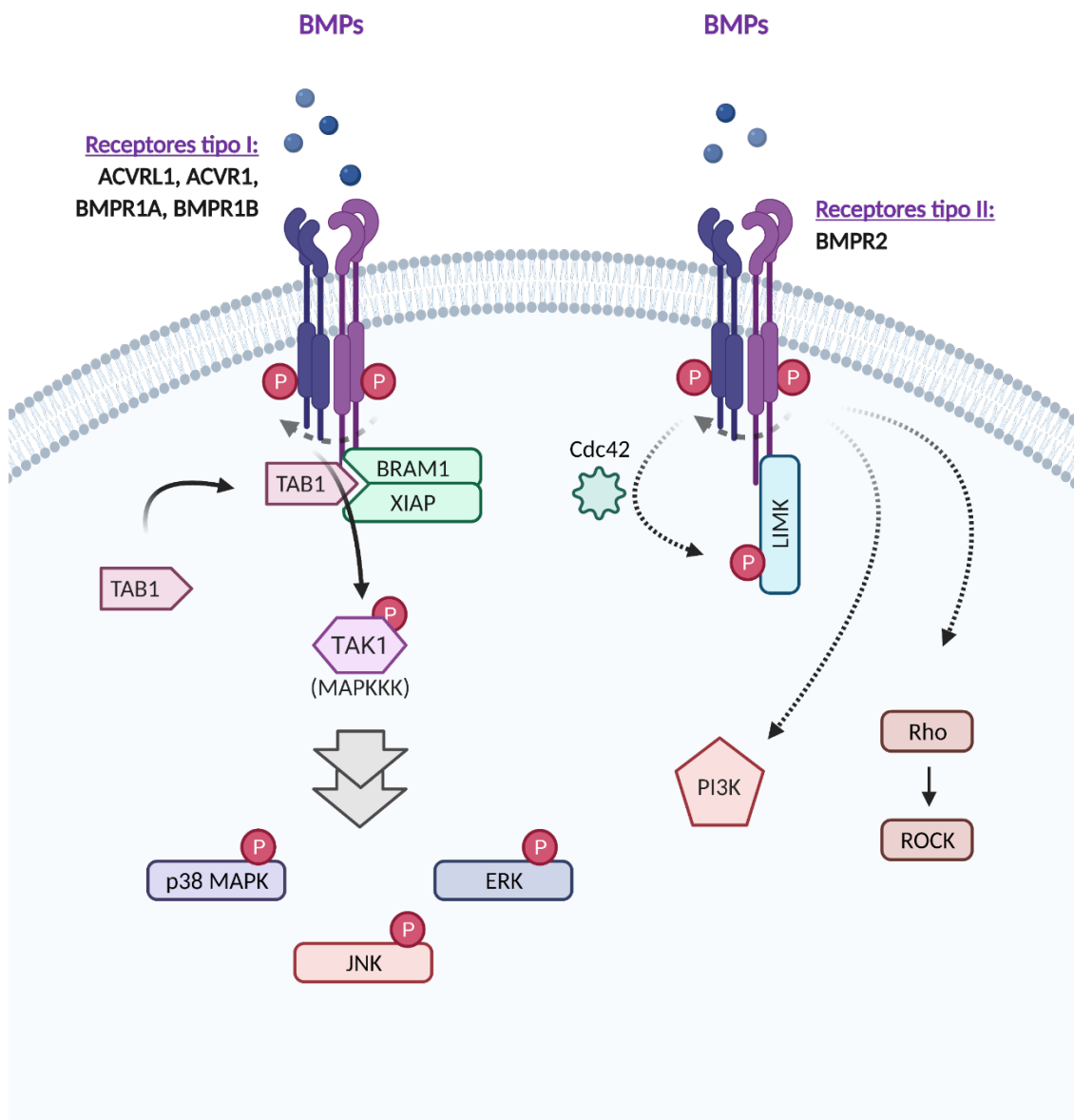


Figura 6. Ruta de señalización no canónica (Smad independiente).

Figura que representa los posibles intermediarios descritos de la ruta no canónica de señalización de las BMPs. Si la oligomerización del complejo de receptores en la membrana celular es inducida por la unión de ligando al receptor tipo I, las proteínas BRAM1 y XIAP serán reclutadas por el complejo una vez formado. Estas a su vez reclutarán a TAB1 y éste a su vez fosforilará a la MAPKKK TAK1. TAK1 es el encargado de continuar con la cascada de señalización hasta llegar a activar p38 MAPK, JNK o ERK. Por otro lado, esta ruta de señalización interviene en los procesos de migración celular y desarrollo de neuritas a través del reclutamiento de LIMK por el receptor de tipo II Bmpr2. Este receptor es el único que tiene un dominio de unión para LIMK en su extremo C-terminal. Una vez unido al receptor, LIMK es activado por la GTPasa Cdc42. Sin embargo, no se conoce el mecanismo por el cual Cdc42 ayuda a la activación de LIMK o si participan otros intermediarios. De la misma forma, se ha observado que esta ruta de señalización también puede activar una respuesta a través de PI3K o Rho, aunque el mecanismo no está bien caracterizado.

mesenquimales, que reorganizan su citoesqueleto en respuesta a BMPR2 (Gamell C. *et al.*, 2008; Gamell C. *et al.*, 2011; Gámez B. *et al.*, 2013).

Sin embargo, son necesarios nuevos estudios relacionados con esta ruta de señalización ya que aspectos como la habilidad de los receptores, o combinaciones de ellos, para inducir esta ruta de señalización o la completa relación de los intermediarios que participan en ella aún son desconocidos.

1.2.5.3. Regulación de la señalización de las BMPs.

Esta familia de proteínas constituye una de las más importantes del organismo. Es por eso que se encuentra altamente regulada a muchos niveles. Podemos hablar de regulación extracelular de los ligando y regulación intracelular de los intermediarios de la cascada.

1.2.5.3.1. Regulación extracelular de la señalización de BMPs.

Se han caracterizado muchas moléculas antagonistas de las proteínas BMPs que regulan esta ruta de señalización extracelularmente, a nivel del ligando. Entre ellos podemos destacar: la familia de Chordin/Noggin, la familia del Tsg (del inglés, Twisted Gastrulation) o Follistatin.

El principal antagonista de las BMPs, y el más estudiado, es Noggin. Noggin es una glicoproteína perteneciente a la familia de Chordin que es secretada como un homodímero y que juega un papel importante en la inhibición de BMP en la formación del eje dorso-ventral durante el desarrollo. Esta molécula se une a BMP2 y BMP4 con mucha afinidad, aunque puede unir también al resto de BMPs, forma un complejo con el ligando y de esta forma impide el reconocimiento y unión de la BMP por el complejo de receptores en la membrana (Krause C. *et al.*, 2011). Muchos de los componentes de la familia de Chordin actúan de la misma manera que Noggin, se unen de forma directa a la proteína BMP, la secuestran y regulan muchos eventos en las etapas de desarrollo (García-Fernández J. *et al.*, 2007).

Otra molécula que regula la señalización de las BMPs a nivel extracelular es Follistatin. Esta glicoproteína puede unir a BMP2, BMP4 y BMP7 y forma un complejo no funcional junto con el receptor de membrana. Al igual que Noggin, Follistatin es un regulador importante de la señalización de las BMPs en etapas de desarrollo. Por ejemplo, puede modular la actividad de BMP7 durante el crecimiento del músculo en etapas embrionarias (Amthor H. *et al.*, 2002).

Otro factor importante que influye en la regulación de la señalización es el transporte y la difusibilidad de los ligandos. Se ha observado que una vez sintetizadas, procesadas y secretadas al medio extracelular las BMPs pueden interaccionar con distintas matrices extracelulares, quedando retenidas. Esto puede favorecer que aumente la concentración local, como se ha descrito anteriormente pero también puede impedir que realicen su función (Osses N. *et al.*, 2006). Es el caso de BMP4, que una vez secretada puede interaccionar con matrices de colágeno IV o tenascina C impidiendo que la proteína llegue a los receptores de membrana específicos (Xiaomeng W. *et al.*, 2008; Garcion E. *et al.*, 2004). Las proteínas de la familia del Tsg (Twisted Gastrulation), actuando como inductores de la ruta de señalización, liberan a las BMPs de las matrices extracelulares permitiendo su difusión y favoreciendo su actividad (Sawala A. *et al.*, 2012; Gámez B. *et al.*, 2013). Sin embargo, la familia del Tsg juega un doble papel en la regulación de las BMPs. Estas proteínas también pueden actuar como un antagonista de la señalización de BMPs, ya que se ha observado que aumenta la estabilidad de los complejos formados por Chordin/BMP, favoreciendo que los ligandos permanezcan secuestrados (Chang C. *et al.*, 2001; Ross JJ. *et al.*, 2001).

1.2.5.3.2. Regulación intracelular de la señalización de BMPs.

El principal punto de regulación intracelular, aunque no el único, es a través de las Smad inhibitorias (I-Smad), Smad6 y Smad7. Ambas proteínas actúan como inhibidores de la señalización canónica de las BMPs, aunque se ha observado que Smad7 también puede inhibir la señalización a través del TFG- β . De hecho, la fosforilación de Smad1 o Smad5 (señalización canónica de BMPs) incrementa los niveles de expresión de Smad6, mientras que la fosforilación de Smad2 o Smad3 (señalización de TFG- β)

incrementa los niveles de expresión de *Smad7* (Stopa M. *et al.*, 2000; Ishida W. *et al.*, 2000).

Existen varios mecanismos por los que las I-Smad pueden inhibir la señalización inducida por las proteínas BMPs. En primer lugar, a nivel de receptor, las I-Smad compiten de forma dominante con las R-Smads por la unión con el receptor tipo I. De esta forma, las I-Smad impiden la fosforilación de las R-Smads y su activación, inhibiendo la ruta de señalización (Goto K. *et al.*, 2007). En segundo lugar, a nivel de Co-Smads, compitiendo con las Co-Smads (*Smad4*) para formar un oligómero con las R-Smads activadas. Se ha observado que *Smad6* puede unirse con *Smad1* activas para formar un trímero que no podrá ser translocado al interior nuclear y por tanto no será funcional (Murakami G. *et al.*, 2003). Por último, las I-Smad también pueden actuar a nivel nuclear. Estas proteínas son capaces de unirse al DNA e impedir la formación de complejos DNA-R-Smad/Co-Smad funcionales impidiendo que estos actúen como factores de transcripción (Zhang S. *et al.*, 2007). Además de a estos tres niveles, las I-Smads también son capaces de reclutar a la ubiquitin ligasa Smurf1 (del inglés, Smad Ubiquitin Regulatory Factor 1). Esta ligasa puede unirse al complejo de receptores de membrana y ubiquitinar tanto a los receptores de tipo I como a las R-Smads (*Smad1*, *Smad5*, *Smad8*), que serán degradadas a través del proteasoma (Murakami G. *et al.*, 2003).

1.2.5.3.3. Regulación a nivel de membrana.

Además de la regulación extra- e intracelular existe otro tipo de regulación de la señalización de las proteínas BMPs a nivel de membrana. Se trata de proteínas transmembrana que regulan de forma negativa la actividad de la ruta. La proteína de esta familia más estudiada es Bambi, un receptor truncado muy similar estructuralmente a los receptores de tipo I pero que carece de dominio tirosín quinasa intracelular y que por tanto no es capaz de transducir la señal al interior celular. Bambi compite con los receptores de tipo I por la unión con los receptores de tipo II, de esta manera se forman complejos no funcionales y se regula la señalización (Onichtchouk D., *et al.*, 1999). Otro ejemplo de proteínas capaces de interaccionar con los receptores de las BMPs de tipo II lo podemos encontrar en TrkC, proteína perteneciente a la familia de

receptores de las neurotrofinas Trk. Este receptor se une a Bmpr2 e impide que éste se una a los receptores de tipo I, inhibiendo la señalización de las BMPs (Jin W. *et al.*, 2007).

1.2.6. La función de las BMPs en el sistema nervioso.

1.2.6.1. Función de las BMPs durante el desarrollo del sistema nervioso.

Las etapas de desarrollo del sistema nervioso en un organismo constan de numerosos procesos que se suceden de manera progresiva y continua, en los que intervienen múltiples proteínas y rutas de señalización, entre ellas las BMPs. La inducción y morfogénesis del tejido, la expansión o muerte de poblaciones celulares o la diferenciación terminal de poblaciones de progenitores son algunos de estos procesos en cuya regulación intervienen las proteínas BMPs. La regulación que presentan las BMPs se caracteriza en primer lugar, por la expresión diferencial y temporal de los receptores y, en segundo lugar, por el gradiente que presentan los ligandos en los diferentes tejidos, ya que estamos hablando de morfógenos. Se ha descrito que las BMPs influyen en el desarrollo de numerosas regiones del sistema nervioso. Las BMPs inhiben la proliferación e inducen la diferenciación neuronal en la zona ventricular cortical a día embrionario (E) en ratón E12-E14, donde se expresan de forma notoria (Li W. *et al.*, 1998), inducen la diferenciación a astrocitos de los precursores encontrados en la ZSV embrionaria en etapas más tardías del desarrollo (E17) (Gross RE. *et al.*, 1996; Gomes WA. *et al.*, 2003), inhiben la diferenciación oligodendroglial (Mabie PC. *et al.*, 1999; Gomes WA. *et al.*, 2003) y mantienen indiferenciados a los progenitores del epitelio olfatorio a E15 (Shou J. *et al.*, 1999) o inducen muerte celular programada (Furuta Y. *et al.*, 1997), entre muchas otras funciones (Hegarty SV. *et al.*, 2013). Los efectos sobre el mantenimiento de la indiferenciación se deben a la inducción de los genes de la familia *Hes* e *Id*, que secuestran a las proteínas E, impidiendo la acción de los factores de transcripción pro-neurales de la familia bHLH, como los pro-neurogénicos *Ngn1/2*, *Ascl1* y *NeuroD*, o pro-oligodendrogiales *Olig1/2*. En cuanto a la diferenciación a astrocitos, las BMP sinergizan con LIF, activando promotores específicos de la astrogliá como GFAP a través de un complejo Smad1-p300/CBP-Stat3 (Nakashima K. *et al.*, 1999). Curiosamente, en células progenitoras que expresan *Ngn1*, el complejo Smad1-

p300/CBP queda secuestrado por Ngn1-proteína E de forma que no pueden activarse los promotores específicos de genes gliales mientras que se activan los de los genes de diferenciación neuronal. De este modo, Ngn1 convierte la señalización pro-gliogénica de las BMPs en pro-neurogénica (Sun Y. *et al.*, 2001).

En etapas anteriores, las proteínas BMPs son bien conocidas por ser reguladores importantes en el desarrollo y formación del tubo neural dorsal (Liu A. y Niswander LA., 2005). Muchos estudios muestran que tanto los ligandos como los receptores de esta familia de proteínas se expresan en las células que forman parte del tubo neural en distintos dominios, incluso a E8.5, antes del cierre de esta estructura (Furuta Y. *et al.*, 1997). Destaca la co-expresión de diversas Bmps en la línea media dorsal del tubo del cerebro anterior en ratón. De la misma forma, estudios dirigidos hacia las proteínas Smads, y sus formas fosforiladas, han demostrado que la ruta de señalización canónica se encuentra activa en dichas poblaciones celulares en el modelo de pollo (Faure S. *et al.*, 2002). También se ha observado la expresión del antagonista de las BMPs, *Noggin*, durante el proceso de cierre del tubo neural dorsal, sugiriendo que se trata de un proceso de regulación muy precisa (Mine N. *et al.*, 2008). De hecho, gradientes muy altos o muy bajos de BMPs, o errores en la expresión de *Noggin*, pueden generar defectos importantes en la formación del tubo neural y sus estructuras (Stottmann RW. *et al.*, 2006). Otro ejemplo clásico es la función del gradiente de BMP en la especificación de la identidad posicional de los progenitores a lo largo del eje dorso-ventral del tubo neural. Esta identidad queda definida por los gradientes antiparalelos de BMP (dorsal) y Shh (ventral) (Zagorski M. *et al.*, 2017).

Toda esta actividad reguladora presentada por las BMPs en el desarrollo del sistema nervioso en distintos modelos de vertebrados sugiere que la transducción de señales por los receptores juega un papel muy importante y conservado. Los complejos de receptores en estas etapas del desarrollo están formados por el receptor de tipo II BMPR2 y los tres receptores de tipo I (BMPR1A, BMPR1B y ACVR1). Sin embargo, se sabe que el receptor de tipo I BMPR1A juega un papel muy importante en estos procesos y que se encuentra más expresado que los otros dos receptores (BMPR1B y ACVR1) en los precursores neurales en las primeras etapas del desarrollo (Panchision DM. *et al.*, 2001;

Dudas M. *et al.*, 2004). Además, este receptor tiene mayor afinidad por los ligandos BMP2 y BMP4, ligandos muy expresados y activos en el desarrollo del tubo neural (Liem KF Jr. *et al.*, 1997; Ybot-Gonzalez P. *et al.*, 2007); además se ha observado que la sobreexpresión de este receptor produce un incremento de neuronas a lo largo del tubo neural (Yamauchi K. *et al.*, 2008). La expresión temprana y ubicua del receptor *Bmpr1a* promueve la proliferación en células precursoras del sistema nervioso central. Por el contrario, *Bmpr1b* se expresa de forma más tardía (aprox. a E8.75) y está restringido a la zona dorsal, estando relacionado con la apoptosis en etapas tempranas y con la diferenciación de los precursores en etapas intermedias del desarrollo. Se ha podido observar que la señalización a través de BMPR1A induce la expresión de *Bmpr1b* en las células precursoras, lo que explica que los receptores actúen de forma secuencial durante el desarrollo y que la acción del receptor BMPR1B sea más tardía y restringida (Panchision DM. *et al.*, 2001). Otro ejemplo interesante de acción diferencial entre los receptores se ha descrito durante las etapas iniciales de la hipertrofia de los astrocitos tras una lesión, proceso en el que BMPR1A y BMPR1B tienen efectos opuestos (Sahni V. *et al.*, 2010).

Las proteínas BMPs también están implicadas en el desarrollo del hipocampo y del GD. El desarrollo del hipocampo depende en gran medida de las proteínas BMPs y WNT producidas por el “cortical hem” o limbo cortical (Meyer G. *et al.*, 2002). Esta estructura, que se encuentra en el punto donde convergen el plexo coroideo y el primordio del hipocampo, es considerada como un centro de señalización que secreta varios morfógenos (BMPs y WNTs) a las áreas cercanas, entre ellas, al hipocampo (Grave EA. *et al.*, 1998). Estudios más recientes han observado que esta estructura se encarga también de regular la proliferación e identidad celular de gran parte de las células pertenecientes al cortex. De igual manera, se ha observado que la doble ablación de los receptores de las BMPs de tipo I, *Bmpr1a* y *Bmpr1b*, provocan defectos en la formación del giro dentado del hipocampo. La diferencia más notoria entre los animales control y los Knockout dobles se observa en la primera semana posnatal, cuando la proliferación de los progenitores de la denominada matriz germinal terciaria, que dará lugar a la mayor parte de las neuronas granulares, alcanza su máximo. Esto es debido, en parte, a una inhibición de la expresión de *Wnt3a* en el “cortical hem”, y por tanto se infiere que

a la inhibición de la señalización por WNT en tejidos circundantes, lo que encaja además con la observación de que la señalización a través de los receptores de BMPs tipo I puede inducir la expresión de *Lef1* en el GD (Choe Y. *et al.*, 2013). De hecho, en estos animales, todas las capas celulares del GD, incluyendo la CG, están muy reducidas (Caronia-Brown G. *et al.*, 2010). Cabe destacar que el receptor de BMPs de tipo I ACVR1 también está implicado en el desarrollo del giro dentado del hipocampo. Como se acaba de mencionar, e ha observado que la pérdida de este receptor produce una bajada muy acusada en la expresión de *Lef1* durante el desarrollo del giro dentado, lo que se traduce en una pérdida del número de células madre radiales de Tipo 1 y progenitores de Tipo 2a *Tbr2+*, así como de células que expresen marcadores de proliferación a día posnatal P30 (Choe Y. *et al.*, 2013). Este descenso conduce a una reducción del número de neuronas granulares *Prox1+* y a una disminución del tamaño del GD. Todos estos datos apuntan a un papel importante de las proteínas BMPs durante el desarrollo del giro dentado del hipocampo.

Estas son solo varias pinceladas de cómo tanto los ligandos, como los receptores, e incluso los antagonistas, de las BMPs son necesarios para el correcto desarrollo del todo el sistema nervioso durante las etapas embrionarias, y especialmente, para el desarrollo del GD (Liu A. y Niswander LE. 2005; Stottmann RW. y Klingensmith J., 2011).

Otro papel importante que desempeñan las proteínas BMPs es el de regular la neuritogénesis de las neuronas. El ligando más relacionado con esta función es BMP7, cuyo papel en la formación de las dendritas ha sido ampliamente estudiado en neuronas corticales e hipocampales (Le Roux P. *et al.*, 1999; Withers GS. *et al.*, 2000; Jan YN. y Jan LY., 2001; Miller FD. y Kaplan DR., 2003). También se ha relacionado con la neuritogénesis al receptor de tipo II *BMPRII*. Este receptor se encuentra altamente expresado en tejido nervioso y, en concreto, se localiza en las puntas de las dendritas corticales (Lee-Hoeflich ST. *et al.*, 2004). Además, como se ha explicado anteriormente (apartados 1.2.4 y 1.2.5), consta de una cola en su extremo C-terminal, de la que carecen el resto de receptores tipo II, y que no interviene en la señalización canónica dependiente de las proteínas Smads. Se ha podido observar que esta cola en el extremo C-terminal del receptor *BMPRII* es esencial para la neuritogénesis inducida por BMP7

(Lee-Hoeflich ST. *et al.*, 2004). Esto es debido a que la quinasa LIM (LIMK), que regula el citoesqueleto de actina a través de la fosforilación de ADF/cofilina (que une F-actina y regula la dinámica de polimerización de los filamentos de actina en el cono de crecimiento), y la quinasa c-Jun (JNK), que regula la estabilidad de los microtúbulos, se unen al extremo C-terminal del receptor Bmpr2 para ser activadas (Podkowa M. *et al.*, 2010). Mutaciones en este extremo del receptor provocan la inactivación de LIMK generando un fenotipo letal en embriones y severas deficiencias en el sistema vascular y sistema nervioso de animales knockout condicionales (Foletta VC. *et al.*, 2003). Todos estos datos indican que el receptor Bmpr2 participa en la remodelación y regulación del citoesqueleto y, por tanto, facilita la neuritogénesis dependiente de BMPs al menos en algunas poblaciones neuronales (Podkowa M. *et al.*, 2010). Sin embargo, existen muchos interrogantes sobre los intermediarios, así como los mecanismos concretos, que participan a lo largo de esta cascada de señalización.

1.2.6.2. *Función de las BMPs durante estadios adultos.*

En etapas adultas la señalización mediada por proteínas BMPs continúa siendo muy importante para el sistema nervioso, sin embargo, su efecto es muy diferente al que presentan durante el desarrollo.

En el GD del hipocampo adulto, las proteínas BMPs son esenciales para mantener el equilibrio entre proliferación y quiescencia de las AH-NSCs en la ZSG, lo que previene la pérdida prematura de la actividad neurogénica hipocampal (Mira H. *et al.*, 2010; Bond AM. *et al.*, 2014). En este nicho neurogénico los receptores de las BMPs siguen un patrón de expresión específico, *Bmpr1a* presenta una mayor expresión y es el principal transductor de la señalización de las BMPs en las NSCs radiales de Tipo 1, mientras que *Bmpr1b* se encuentra más expresado en las neuronas de nueva generación, así como en neuronas maduras. Estudios *in vivo* han recalcado la importancia del receptor BMPR1A y su señalización en la población de AH-NSCs, ya que la pérdida de función de éste específicamente en las NSCs, empleando animales Knockout condicionales, produce una salida de la quiescencia y activación masiva de las NSCs, llegando a agotar la población (Mira H. *et al.*, 2010).

Sin embargo, aunque se ha descrito la expresión de ligandos de la familia de las BMPs en el nicho hipocampal, tenemos que destacar que la fuente fisiológica de las BMPs en el giro dentado no se conoce aún. Se ha observado la existencia de células del nicho que podrían estar secretando ligandos de la familia de las BMPs, en este sentido se ha descrito la co-localización de BMP4 con el endotelio o la de BMP6 con células de microglía (Yousef H. *et al.*, 2015). De la misma forma, se ha descrito que cultivos celulares de AH-NSPCs secretan ligandos de las BMPs de forma autocrina *in vitro*, lo que podría sugerir un mecanismo de control autónomo celular de la proliferación. *In vivo*, se ha observado la expresión de inhibidores de las BMPs, como *Noggin*, en el GD. Estos inhibidores son capaces de bloquear la señalización por BMPs mediante el secuestro del ligando, permitiendo así la proliferación de las AH-NSPCs (Bonaguidi M. *et al.*, 2008). Algunos estudios han descrito como una mayor expresión del inhibidor *Noggin* y, por tanto, una menor señalización de las proteínas BMPs, es capaz de incrementar la proliferación de las NSC radiales de tipo 1, dando lugar a un incremento en la neurogénesis (Guo W. *et al.*, 2011). Nuestro grupo también ha demostrado que la administración de *Noggin* recombinante en el hipocampo adulto, infundida con minibombas osmóticas, aumenta la proliferación de las NSC radiales de Tipo 1 (Mira H. *et al.*, 2010).

También se ha podido observar que las proteínas BMPs están implicadas en la diferenciación y maduración de los progenitores granulares. La expresión de *Bmp4* por medio de un lentivirus no solamente induce la quiescencia de NSCs, progenitores y neuroblastos en el GD de ratones adultos, disminuyendo el número de nuevas neuronas, sino que también ralentiza el proceso de diferenciación neurogénica. De la misma forma, la inhibición de esta señalización, por medio de un lentivirus que expresa *Noggin*, induce la entrada en el ciclo celular, expandiendo la población de progenitores y neuroblastos en el GD de ratones adultos. (Bond AM. *et al.*, 2014). Además, tanto la sobreexpresión de *Noggin* como la ablación de *Bmpr2* aumenta la producción de neuroblastos, acelerándola a corto plazo, pero sin cambiar el número total de nuevas neuronas generadas a largo plazo (Bond AM. *et al.*, 2014). No se han analizado posibles efectos de las BMPs o de sus receptores sobre la maduración morfológica de las nuevas neuronas del GD adulto.

La señalización a través de las BMPs también es la encargada de regular los cambios fisiológicos que sufre el nicho del hipocampo adulto en respuesta a factores externos, como el ejercicio físico. Se ha observado que el ejercicio voluntario en ratones incrementa la expresión del inhibidor de BMPs *Noggin* y disminuye la de *Bmp4*, siendo esta disminución de la señalización de BMPs responsable, al menos en parte, del efecto positivo del ejercicio sobre la proliferación y la neurogénesis hipocampal (Gobeske KT. *et al.*, 2009).

Al igual que en el giro dentado del hipocampo, las BMPs también regulan la proliferación y diferenciación de las NSCs en la ZSV adulta. Las NSCs y los progenitores de rápida amplificación expresan BMP2/4 así como *Bmpr1a* en la ZSV. Sin embargo, los neuroblastos expresan *Bmpr1b* y pierden la expresión de BMP4. Este patrón de expresión es similar al encontrado en la ZSG, y sugiere un papel temprano de las BMPs y del receptor *Bmpr1a* en la decisión del destino celular, así como un papel tardío en el proceso de neurogénesis de *Bmpr1b* (Lim DA. *et al.*, 2000; Panchision D. y McKay RDG., 2002). Algunos experimentos *in vivo* han podido observar que la inyección ventricular de BMP4 inhibe la proliferación de las NSCs y los progenitores en la ZSV (Mercier F. y Douet V., 2014). De la misma forma, estudios *in vitro* han descrito como la proteína BMP4 puede actuar como una señal gliogénica, impidiendo la adquisición del linaje neuronal y promoviendo la del linaje astrogial en cultivos de NSPCs provenientes de la ZSV (Lim DA. *et al.*, 2000). Sin embargo, existen otros estudios *in vitro* en los que la inhibición de la señalización de las BMPs, a través de la inactivación de *Smad4*, aumenta la expresión del factor de transcripción *Olig2*, promoviendo la adquisición del linaje oligodendrogial y reduciendo la neurogénesis (Colak D. *et al.*, 2008).

Una vez los neuroblastos entran en el camino migratorio rostral (CMR) y migran hacia el bulbo olfatorio, éstos vuelven a ser expuestos a los ligandos de las BMPs expresados por las células gliales a lo largo del CMR. Esto sugiere una función de las BMPs en la supervivencia de los progenitores o una función a modo de señal madurativa para las neuronas de nueva generación (Peretto P. *et al.*, 2004; Liu S. *et al.*, 2004; Choe Y. *et al.*, 2016).

En definitiva, el trabajo realizado hasta la fecha indica que las BMPs son proteínas expresadas ampliamente en el cerebro adulto, moduladas por inhibidores como Noggin o LRP2 en los nichos, que ajustarían los niveles de señalización para promover la proliferación y diferenciación de las NSCs (Choe Y. *et al.*, 2016).

1.3. La familia de proteínas Wnt.

1.3.1. Origen y descubrimiento de las proteínas de la familia Wnt.

Las proteínas Wnt (del inglés, Wingless-type MMTV integration site family) constituyen una familia de glicoproteínas de secreción con carácter hidrofóbico que intervienen en la regulación de numerosos procesos biológicos como la proliferación, diferenciación, migración, adhesión, o incluso, la supervivencia y la muerte celular (Nusse R., 2012; Willert K. y Nusse R., 2012). Esta capacidad para regular diferentes procesos biológicos es debida a que se trata de proteínas capaces de activar diferentes cascadas de señalización dependiendo del patrón de expresión temporal de ligandos y receptores que puede presentar una célula (Michaelidis TM. y Lie DC., 2008; Marchetti B. y Pluchino S., 2013).

El primer gen descubierto, relacionado con estas proteínas, fue *Wnt1* en 1982, aunque inicialmente fue denominado *Int1*. Este gen fue descubierto en primer lugar como un gen activado a consecuencia de la integración del DNA vírico en estudios relacionados con la caracterización de tumores de mama inducidos en ratones mediante virus (Nusse R. y Varmus HE., 1982). Cinco años después, en 1987, se identificó en *Drosophila* el gen *Wg* (del inglés, Wingless), como un gen homólogo al gen *Int1* de ratón y responsable de la formación del tronco dorsal y desarrollo de la epidermis. De esta manera, se acuñó el término *Wnt*, como una combinación de *Int1* y *Wg* (Rijsewijk F. *et al.*, 1987). Fue, por tanto, en este organismo, *Drosophila*, en el que se investigaron y caracterizaron muchos de los componentes de esta vía de señalización en los años siguientes.

1.3.2. Caracterización de los ligandos de la familia de Wnt.

Actualmente se han podido caracterizar 19 tipos de proteínas Wnt en mamíferos, cada una de ellas con una longitud de entre 350 a 400 aminoácidos y un peso molecular de 40 KDa aproximadamente (Coudreuse D. y Korswagen HC., 2007; Nusse R., 2012;

Clevers H. y Nusse R., 2012). El primer ligando que se consiguió purificar y caracterizar fue Wnt3A en 2003 en el ratón (Willert K. *et al.*, 2003). Gracias al estudio de esta proteína se observó que los miembros pertenecientes a esta familia de proteínas son ricos en cisteína y presentan modificaciones postraduccionales indispensables para su correcta actividad biológica. Por ejemplo, Wnt3a presenta una glicosilación en el extremo N-terminal que favorece su correcta secreción, así como modificaciones lipídicas por unión covalente de ácido palmítico que ayudan a su reconocimiento por parte del receptor y eficiencia a la hora de activar la señalización (Gao C. *et al.*, 2014; Gross JC. y Boutros M., 2013). Estas modificaciones postraduccionales ocurren en el retículo endoplasmático por la acción de la acetiltransferasa Porcupine (Porcn) justo antes de su secreción. Se ha observado que defectos en la función de esta acetiltransferasa produce errores en la secreción de Wnt3a, llevando a su acumulación en el retículo endoplasmático en *Drosophila* (Kadowaki T., *et al.*, 1996; Takada R. *et al.*, 2006). Una vez secretados, los ligandos de la familia Wnt interactúan en la matriz extracelular con proteoglicanos que ayudan a la estabilización y a evitar la agregación y, por tanto, la pérdida de función, de estas proteínas (Buechling T. y Boutros M., 2011).

1.3.3. Receptores de las Wnts.

Una vez secretados, los ligandos de la familia de las Wnts se unen de forma específica a un complejo de receptores de membrana formado por un receptor de tipo Frizzled (Fz) y un co-receptor de tipo LRP5/6 (Clevers H. y Nusse R., 2012). Los receptores tipo Frizzled fueron los primeros en ser caracterizados y relacionados con la ruta de señalización de las proteínas Wnts, y se caracterizan por ser proteínas con siete dominios transmembrana (Schulte G. y Bryja V., 2007). En la actualidad se conocen 10 receptores Fz, todos ellos conservan los siete dominios transmembrana y, además, presentan un gran dominio extracelular en el extremo N-terminal rico en cisteínas que facilita la unión de los ligandos Wnt (Bhanot P. *et al.*, 1996; Janda CY. *et al.*, 2012). El otro tipo de receptor que forma el complejo son los LRP5/6 (del inglés, Low-Density Lipoprotein Receptor-related Protein). Estas proteínas de membrana actúan como co-receptores necesarios para la señalización (Angers S. y Moon RT., 2009). Al igual que los receptores Fz, estos co-receptores también poseen un dominio de unión de Wnt

extracelular en el extremo N-terminal. Y es la unión de una proteína Wnt con el co-receptor LRP5/6 lo que favorece y estabiliza la interacción de los receptores para formar el complejo de receptores unido con el ligando, Fz-LRP5/6-ligando (Angers S. y Moon RT., 2009).

Además de los receptores típicos que participan en la ruta de las Wnts, Fz y LRP, se han descrito otros receptores atípicos que pueden participar en la señalización. Se trata de proteínas transmembrana que pueden actuar de co-receptores en varios contextos específicos. Podemos destacar a Ryk, un receptor de la familia de receptores tirosina quinasa, que es capaz de unirse a los receptores Fz y actuar como co-receptor activando la señalización en procesos relacionados con la formación, crecimiento y movimiento de los axones neuronales (Kikuchi A. *et al.*, 2007).

1.3.4. Rutas de señalización de las proteínas Wnt.

Cuando un ligando se une al complejo de receptores, el receptor Fz transduce la señal al interior celular activando a la proteína Disheveled (Dvl), que a su vez se encarga de regular la activación del resto de componentes de la cascada. A partir de este punto, se puede inducir la activación de tres tipos de cascadas de señalización diferentes en función de los receptores y ligandos que la han iniciado y del contexto celular. Estas son: la ruta de señalización canónica de las Wnts, mediada por β -catenina (Wnt/ β -catenina); y las rutas conocidas como no canónicas, la ruta de Wnt/PCP (del inglés, Planar Cell Polarity) y la ruta del calcio (Wnt/ Ca^{2+}) (Ciani L. y Salinas PC., 2005; Clevers H. y Nusse R., 2012; Nusse R., 2012).

1.3.4.1. Ruta de señalización canónica, mediada por β -catenina.

Cuando la ruta de señalización está inactiva, no hay unión de ligando con los receptores, los niveles de β -catenina se mantienen bajos. Dichos niveles se encuentran regulados por el conocido como 'complejo de destrucción de β -catenina', que está formado por varias proteínas como la glucógeno sintasa quinasa 3β (GSK- 3β), la caseína quinasa 1α (CK1 α), la proteína APC (del inglés, Adenomatosis Polyposis Coli) y la proteína

Axin entre otras. La β -catenina es secuestrada y fosforilada de forma secuencial, una primera vez por la enzima CK1 α , lo que produce que sea reconocida y fosforilada tres veces más por GSK-3 β . Estas cuatro fosforilaciones actúan como una secuencia de reconocimiento específico que lleva a la ubiquitinación y degradación de β -catenina por el proteasoma, regulando de forma negativa la señalización por la ruta canónica (Moon RT., 2005).

Cuando un ligando de Wnt se une a los receptores Fz y a sus co-receptores LRP y se produce la activación de la vía canónica, el receptor Fz recluta y fosforila a la proteína Dvl, y ésta, a su vez, realizará dos funciones. En primer lugar, Dvl reconoce y recluta a Axin, lo que conlleva que todo el 'complejo de destrucción de β -catenina' se acerque a la membrana y a los receptores; y, en segundo lugar, tras ser fosforilado por CK1 α , reclutará a la proteína GBP, del inglés, GSK-3 β Binding Protein, que reconoce y se une a GSK-3 β , impidiendo que esta fosforile a β -catenina. A la vez, los co-receptores LRP, que han sido activados por el ligando, son activados nuevamente en su cola C-terminal citoplasmática mediante dos fosforilaciones producidas por CK1 α y GSK-3 β , gracias a que todo el 'complejo de destrucción de β -catenina' se encuentra anclado en la membrana. Esta doble activación de los receptores LRP, mediante ligando y mediante CK1 α y GSK-3 β , promueve el reconocimiento de Axin por el dominio citoplasmático del receptor LRP, quedando anclado y favoreciendo su degradación en la membrana. De esta forma, y gracias a la degradación de Axin y la inhibición de GSK-3 β , β -catenina no es fosforilada y degradada y, en consecuencia, se acumula en el citoplasma (Buechling T. y Boutros M., 2011; Clevers H. y Nusse R., 2012; Palomer E. *et al.*, 2019). La acumulación en el citoplasma promueve que parte de dicha β -catenina sea translocada al interior nuclear donde se unirá a factores de transcripción de unión a DNA de la familia de TCF/LEF1 y activará la expresión de diferentes genes diana específicos del tejido en el que se induzca la señalización. Podemos destacar algunos genes como *cMyc*, *Ciclina D1*, *neurogenina-1* o *Axin2* entre muchos otros (Seidensticker MJ. y Behrens J., 2000; Michaelidis TM. y Lie DC., 2008).

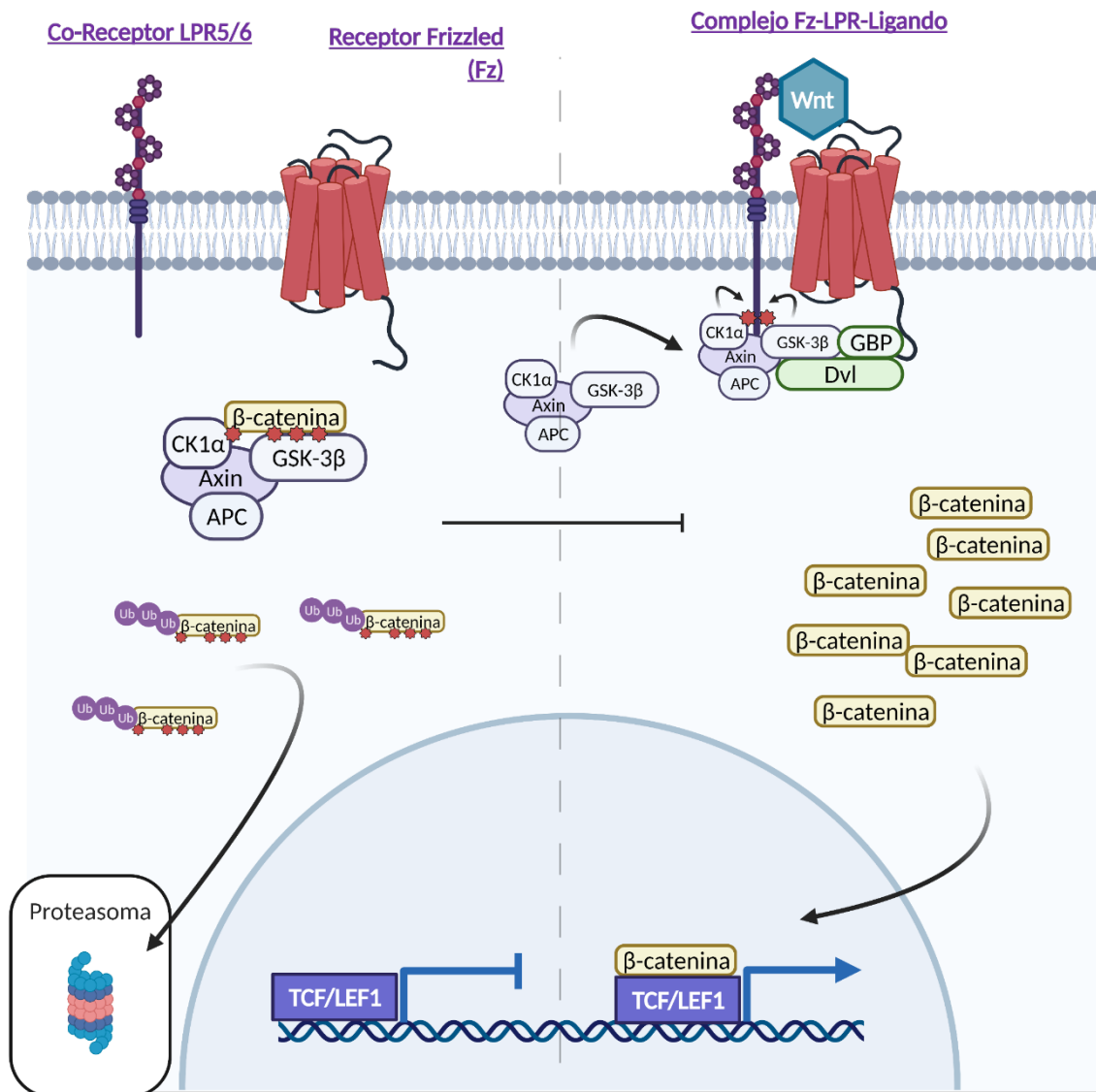


Figura 7. Ruta de señalización canónica, dependiente de β -catenina.

La figura representa la ruta de señalización canónica de las proteínas Wnts tanto activa (derecha) como inactiva (izquierda). Cuando la ruta se encuentra en estado inactivo (izquierda) el complejo de destrucción de β -catenina, formado por Axin, APC, CK1 α y GSK-3 β , se encarga de fosforilar de forma secuencial a β -catenina. Estas fosforilaciones actúan como marcaje para la ubiquitinación y degradación de la proteína mediante el proteasoma. Cuando la ruta se activa por la estimulación con ligando, el complejo de destrucción de β -catenina es anclado próximo a la membrana por la acción de Dvl. La cercanía del complejo promueve que CK1 α y GSK-3 β fosforilen el dominio intracelular del receptor LRP. Al quedar activado, el receptor LRP reconoce y ancla a Axin, lo que favorece su inhibición y degradación. De esta manera β -catenina no es fosforilada ni degradada, y es translocada al interior del núcleo para favorecer la expresión génica junto con factores de transcripción de la familia TCF/LEF1.

1.3.4.2. Rutas de señalización no canónica: Wnt/PCP, Wnt/Ca²⁺.

Las rutas de señalización que no dependen de β -catenina son conocidas como rutas de señalización no canónicas y se caracterizan por estar inducidas por los receptores Fz sin la presencia de co-receptores. Las proteínas Wnt capaces de activar estas rutas son conocidas como Wnt no canónicas y son: Wnt4A, Wnt5A, Wnt7A, Wnt11 y Wnt16; siendo Wnt5A la proteínas más característica y más estudiada, de todo este grupo (Sugimura R. y Li L., 2010; Stewart DJ. *et al.*, 2014).

En la ruta de señalización Wnt/PCP la interacción del receptor Fz con el ligando promueve la activación de PI3K (fosfatidilinositol 3-quinasa) y ésta, a su vez, media la activación de AKT/mTOR. Este tipo de señalización suele estar implicada en procesos relacionados con la síntesis proteica (Sugimura R. y Li L., 2010). Pero esta no es la única cascada englobada dentro de las rutas Wnt/PCP. Existe otra cascada que comienza con el reclutamiento y la activación de la proteína Dvl. Dvl realiza dos funciones, en primer lugar, activa a la GTPasa Rac1; y, en segundo lugar, recluta a DAAM1 (del inglés, Dvl Associated Activator of Morphogenesis 1) para activar a la GTPasa RhoA. Una vez activadas, Rac1 y RhoA activan a ROCK (del inglés, Rho-associated protein kinase) y JNK, lo que lleva a la expresión de genes bajo el control del factor de transcripción ATF2 (del inglés, Activating Transcription Factor 2) relacionados con cambios en el citoesqueleto y procesos relacionados con el movimiento celular (Oishi I. *et al.*, 2003; Zhan T. *et al.*, 2017; Jones C. y Chen P., 2007).

En el caso de la ruta del calcio (Wnt/Ca²⁺), la estimulación del receptor Fz por el ligando promueve la activación de proteínas G heterotriméricas que, a su vez, favorecen la activación de la fosfolipasa C (PLC). La función de PLC es la de procesar fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PIP2), generando diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) en su lugar. IP3 promueve la salida de iones de calcio (Ca²⁺) de compartimentos intracelulares como el retículo endoplasmático y una disminución de los niveles de GMP cíclico (GMPc); los iones de calcio, a su vez, promueven la activación de efectores de la cascada como calmodulina que activa a la quinasa

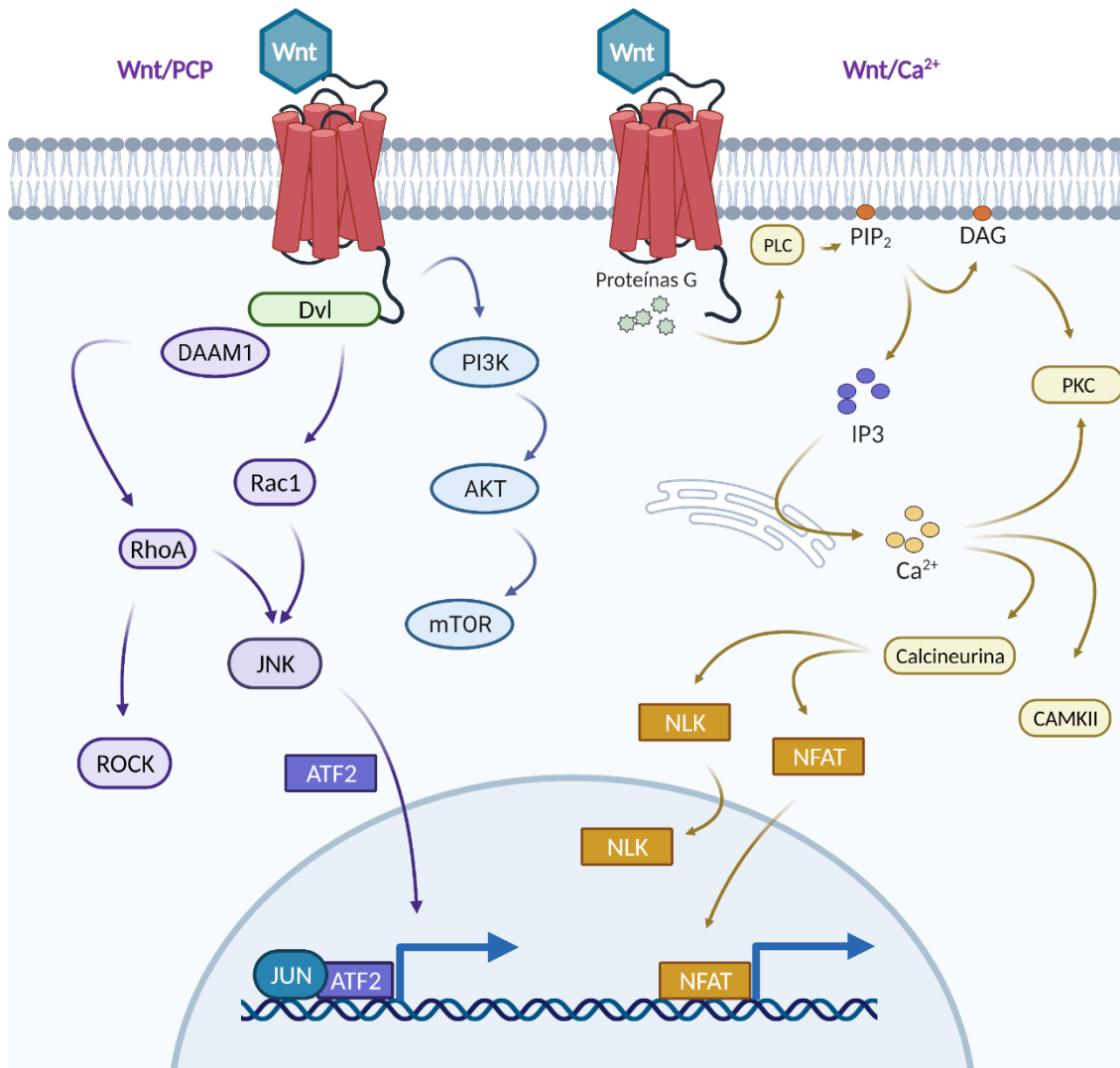


Figura 8. Rutas de señalización no canónicas, independientes de β-catenina.

La figura representa las posibles rutas de señalización de las proteínas Wnts independientes de β-catenina. La ruta de la polaridad celular planar (Wnt/PCP) contiene dos ramas diferenciadas. En primer lugar (morado), Dvl es activada por el receptor Fz, a su vez, esta proteína activa a Rac1 de forma directa y a RhoA a través de la interacción con DAAM1. Estas dos proteínas inducirán la actividad de JNK y ROCK, promoviendo la translocación de ATF2 al núcleo y la expresión de genes específicos del tejido en el que se active la vía. En segundo lugar (azul), el receptor promueve la activación de PI3K, lo que desemboca en la activación de AKT y mTOR. Esta señalización induce procesos de síntesis proteica. Por otro lado, la ruta del calcio (amarillo) depende de la activación de proteínas G por el receptor, lo que promueve que la fosfolipasa PLC genere IP₃ y DAG a partir de PIP₂. El aumento de IP₃ promueve la salida de Ca²⁺ de compartimentos celulares como el retículo endoplasmático, ion necesario para la actividad de Calcineurina, CAMKII y PKC. Este proceso promueve la translocación al núcleo de NFAT, factor de transcripción de diversos genes, y NLK, inhibidor de TCF/LEF1 y, por tanto, de la ruta canónica de las Wnts.

CAMKII, calcineurina o la proteína quinasa C (PKC), la cual también requiere la presencia de DAG (Zhan T. *et al.*, 2017). Estos efectores inducirán la expresión de genes relacionados con la migración celular a través del factor de transcripción NFAT (del inglés, Nuclear Factor of Activated T-cells) (Clark CE. *et al.*, 2012; Gómez-Orte E. *et al.*, 2013), e inhibirán la ruta canónica (dependiente de β -catenina) a través de NLK (del inglés, Nemo Like Kinase), encargada de fosforilar e inhibir la actividad transcripcional de TCF/LEF1 en algunos tipos celulares (Ishitani T. *et al.*, 2003; Ishitani T., 2012).

1.3.5. *Proteínas Wnt en el sistema nervioso.*

Las proteínas Wnt juegan un papel muy importante tanto en el desarrollo como en etapas adultas en el sistema nervioso. A continuación, se resumen algunas de estas funciones, con especial énfasis en aquellas relativas a la neurogénesis hipocampal.

1.3.5.1. *Proteínas Wnt en el desarrollo del sistema nervioso.*

Durante el desarrollo del sistema nervioso de animales vertebrados, las Wnt están encargadas de la formación del eje antero-posterior y del tubo neural, así como de determinar el destino celular de muchas poblaciones estableciendo un gradiente endógeno de proteínas Wnts (Ciani L. y Salinas PC., 2005). Por otro lado, a nivel celular, estas proteínas se encargan de controlar la conectividad neuronal participando en diferentes procesos como el establecimiento de la polaridad neuronal, el crecimiento dendrítico, el crecimiento axonal o la formación de sinapsis. Por ejemplo, se ha observado que el ligando Wnt3A participa en la remodelación del citoesqueleto neuronal y el movimiento de los axones (Purro SA. *et al.*, 2008; Budnik V. y Salinas PC., 2011). También se ha podido observar que ligandos de la familia de Wnt7A incrementan tanto el número como la longitud de las dendritas, y que este efecto es dependiente de la proteína Dvl a través de la activación de JNK (Rosso SB. *et al.*, 2005; Ahmad-Annur A. *et al.*, 2006), o que ligandos de la familia de Wnt2 aumentan la arborización en neuronas hipocampales durante el desarrollo a través de la activación de la ruta no canónica del calcio (Wayman GA. *et al.*, 2006). Otra de las funciones de estas proteínas es la de la

sinaptogénesis, se ha descrito que tanto el receptor Fz5, estimulado por el ligando Wnt7A, como los receptores atípicos Ror1 y Ror2, estimulados por el ligando Wnt5A, son capaces de favorecer y modular la formación de sinapsis en las neuronas hipocampales (Sahores M. *et al.*, 2010; Paganoni S. *et al.*, 2010).

Las proteínas de la familia Wnt también están implicadas en la morfogénesis del GD. Durante el desarrollo del sistema nervioso las proteínas Wnts son secretadas por el “Cortical hem” o limbo cortical (Meyer G. *et al.*, 2002), estructura considerada como un “centro regulador de la señalización” por secretar varios morfógenos (BMPs y Wnts) y moléculas encargadas de la polarización de los axones y dendritas de las neuronas de tejidos adyacentes (Grave EA. *et al.*, 1998; Bagri A. *et al.*, 2002). Una de las proteínas Wnts, secretadas por el cortical hem, a la que se le atribuye mayor importancia en la morfogénesis del DG es Wnt3A. Mutantes para esta proteína presentan una ausencia completa de la estructura del hipocampo, posiblemente debida a que Wnt3A participa en la proliferación de los progenitores hipocampales en las primeras etapas del desarrollo (Lee SM. *et al.*, 2000; Li G. y Pleasure SJ., 2005). De la misma forma, mutantes para Lef1, factor de transcripción intermediario en la cascada de señalización canónica de las Wnts, o para LRP6, receptor que media la señalización por Wnt, presentan un hipocampo de menor tamaño y una ausencia de gran parte de las neuronas granulares (Zhou CJ. *et al.*, 2004; Li G. y Pleasure SJ., 2005), lo que demuestra un papel importante de la ruta de señalización canónica de las Wnt en el correcto desarrollo del GD.

1.3.5.2. *Proteínas Wnt en el sistema nervioso adulto.*

Aunque la función de las proteínas Wnt se centra en su mayor parte en el desarrollo embrionario del sistema nervioso, se ha descrito cierta expresión de sus ligandos y receptores en zonas concretas del cerebro adulto. Estas zonas corresponden entre otras con los nichos neurogénicos, el hipocampo y los ventrículos y el bulbo olfatorio, y a ellas hay que añadir también el cortex (Shimogori T. *et al.*, 2004 (1); Shimogori T. *et al.*, 2004 (2)).

A nivel del hipocampo adulto, las proteínas Wnt3, Wnt5A, Wnt7A y Wnt8B son expresadas sobre todo en el GD, mientras que en el cornu ammonis se ha observado la expresión de Wnt2 (Wayman GA. *et al.*, 2006). Diversos estudios han demostrado que las proteínas Wnts juegan un papel importante en la regulación de la neurogénesis adulta en el GD. Por ejemplo, se ha descrito que la sobreexpresión de Wnt3 es capaz de favorecer y aumentar la neurogénesis de progenitores hipocampales tanto *in vitro* como *in vivo*, mientras que la inhibición de la señalización canónica la reduce drásticamente (Lie DC. *et al.*, 2005). También se ha observado la expresión de muchos de los receptores Fz tanto en el cortex como en el hipocampo adulto, así como la expresión de antagonistas (sFRP) y factores de transcripción implicados en la ruta de señalización (TCF/LEF1) (Shimogori T. *et al.*, 2004; Chen J. *et al.*, 2006). De la misma forma, se ha observado que Wnt7a participa en la proliferación y maduración dendrítica de las neuronas hipocampales. La pérdida de función de esta proteína muestra un descenso en el número de nuevas neuronas en el GD, y en animales mutantes KO se observa una reducción en el grado de maduración dendrítica (Qu Q. *et al.*, 2013). Esto es debido a que Wnt7a es capaz de promover la proliferación y la diferenciación neuronal a través de la ruta canónica (β -catenina-ciclina D1, β -catenina-neurogenina2 respectivamente) (Qu Q. *et al.*, 2013). Estudios más recientes han observado que Wnt5a también juega un papel muy importante en la neurogénesis hipocampal adulta. Una bajada en la expresión de Wnt5a en el giro dentado de ratones adultos reduce el grado de diferenciación de los progenitores hipocampales y la maduración morfológica de las dendritas de las neuronas hipocampales. Esto concuerda con datos *in vitro*, en los que el tratamiento con Wnt5a favorece la diferenciación neuronal y el desarrollo morfológico de los progenitores y las neuronas derivadas de estos. Además, se ha podido observar que estos efectos ocurren a través de las rutas de señalización no canónicas Wnt/JNK y Wnt/CaMKII (Schafer ST. *et al.*, 2015; Arredondo SB., *et al.* 2020).

1.4. La neurogénesis durante el envejecimiento.

La neurogénesis hipocampal adulta ocurre a lo largo de la vida del individuo gracias a la población de células madre y progenitores neurales que se encuentra en este nicho neurogénico. Sin embargo, a pesar de la plasticidad y capacidad proliferativa de estas células, el potencial neurogénico del hipocampo disminuye con la edad debido a alteraciones tanto intrínsecas de las células como del propio nicho.

1.4.1. Alteraciones de la neurogénesis y los nichos durante el envejecimiento.

Aunque en la actualidad podemos encontrar muchos estudios que investigan las causas del declive en el proceso de neurogénesis hipocampal adulta relacionado con la edad, aún existen muchos interrogantes y controversias. Sin embargo, uno de los puntos en el que coinciden la mayoría de los autores es en la observación de que se produce una pérdida progresiva de la población de células madre y nuevas neuronas (van Praag H. *et al.*, 2005; Encinas JM. *et al.*, 2011), así como un descenso en los niveles de proliferación (Kuipers SD. *et al.*, 2015). Este hecho provoca una reducción de la conectividad neuronal lo que se traduce en actividades cognitivas mermadas (Fan X. *et al.*, 2017). El envejecimiento afecta a las características intrínsecas de las células, provocando que las células madre pierdan parte de su capacidad de auto-renovación, que disminuya su capacidad neurogénica y aumente la astrogliogénesis o que se reduzca la supervivencia de las neuronas de nueva generación (Encinas JM. *et al.*, 2011; Beckervordersandforth R. *et al.*, 2017; Fan X. *et al.*, 2017). En el caso de las células madre y progenitores de la ZSV, dichos cambios intrínsecos se han estudiado mediante secuenciación de RNA a nivel de célula única (single-cell RNA seq) (Shi Z. *et al.*, 2018). Estos estudios han puesto de manifiesto, por ejemplo, que las NSCs de animales viejos tienen comprometida la señalización de ERK/MAPK y que ello limita su capacidad de expansión clonal. En general, múltiples estudios describen el malfuncionamiento de las mitocondrias en diversos tipos celulares del cerebro adulto, lo que conlleva un descenso en la capacidad de producción del ATP y un aumento del estrés oxidativo, mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Weinreb O. *et al.*, 2007; Navarro A.

et al., 2008). Estas mismas deficiencias ocurren de manera más exacerbada en patologías neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer o Parkinson (Mattson MP., 2012; Irwin DJ. *et al.*, 2013) y podrían afectar asimismo a las células madre y progenitores. En este sentido, la ablación del factor de transcripción Tfam, que regula la biogénesis y función mitocondrial, limita la proliferación en la neurogénesis hipocampal, simulando el fenotipo observado en el envejecimiento (Beckervordersandforth R. *et al.*, 2017). Por otro lado, las NSCs acumulan agregados proteicos durante el envejecimiento, y la activación de la vía autofagia-lisosomal rescata la pérdida de actividad proliferativa de las NSCs de la ZSV de animales viejos (Leeman DS. *et al.*, 2018).

El envejecimiento también afecta a las características extrínsecas a las células, desestabilizando las propiedades de los nichos neurogénicos y provocando una reducción de la neurogénesis con la edad. Durante el envejecimiento se ha observado una reducción progresiva de la expresión de *Wnt3* por los astrocitos hipocampales y, puesto que esta proteína está implicada en la proliferación y diferenciación de las NSCs, una reducción del marcador pro-neurogénico NeuroD1 (Okamoto M. *et al.*, 2011). Esto ocurre en parte debido a que disminuye la proporción de astrocitos que expresan esta proteína y al aumento de *Dickkopf1*, inhibidor específico de las Wnts (Seib DRM. *et al.*, 2013). También se ha observado una desregulación de muchas otras señales, neurotrofinas y factores de crecimiento. Por ejemplo, en el hipocampo se produce un aumento crónico de los glucocorticoides lo que conlleva un descenso acusado de la neurogénesis (Heine VM. *et al.*, 2004). Los glucocorticoides bloquean la activación de las NSCs, de modo que una reducción en la expresión de su receptor (GR) reactiva la proliferación de las NSCs en animales viejos (Schouten M. *et al.*, 2020). De la misma forma se ha observado un descenso, en las primeras etapas del envejecimiento, de los niveles de expresión de BDNF, FGF2 o IGF, y sus correspondientes receptores, que también conlleva un descenso en los niveles de neurogénesis (Shetty AK. *et al.*, 2005). Otro factor que influye negativamente sobre la neurogénesis es el aumento de citoquinas proinflamatorias y de astrocitos reactivos y microglía con la edad (Pineda *et al.*, 2013). Se ha observado que bloquear su señalización en el cerebro de ratones adultos favorece la neurogénesis (Clarke LE. *et al.*, 2018; Fan X. *et al.*, 2017). Algunos estudios han observado que las señales proinflamatorias, como el interferón (INF α y

INF β), son capaces de mantener las NSCs en estado de quiescencia, reduciendo los niveles de proliferación *in vitro*. De la misma forma, la inhibición mediante la delección de INF α y INF γ produce un aumento en el número de NSCs activadas (aNSC) en animales adultos, equiparándolas al número de aNSCs en animales jóvenes (Kalamakis G. *et al.*, 2019).

Cabe destacar que los nichos neurogénicos están localizados alrededor de vasos sanguíneos, lo que permite la comunicación con otros órganos y tejidos a través del intercambio de moléculas sistémicas (Shen Q. *et al.*, 2004; Carpentier PA. y Palmer TD., 2009). Existen muchos estudios que defienden la posibilidad de que los cambios producidos en los nichos neurogénicos durante el envejecimiento sean consecuencia de dos tipos de señales diferentes, por un lado, señales del propio sistema nervioso central (Lie D. *et al.*, 2005; Renault VM. *et al.*, 2009) y, por otro lado, señales sistémicas circulantes provenientes del torrente sanguíneo (Conboy IM. *et al.*, 2005). Algunos estudios han observado una pérdida en el número de nuevas neuronas DCX+ en el hipocampo de animales jóvenes al ser inyectados con plasma proveniente de animales viejos, lo que sugiere que hay factores solubles en la sangre capaces de afectar de forma negativa la neurogénesis (Villeda SA. *et al.*, 2011). De la misma forma, estudios basados en ensayos de parabiosis heterocrónica han observado que el declive en la actividad de los progenitores asociado al envejecimiento puede regularse por factores sistémicos dependientes de la edad (Conboy IM. *et al.*, 2005; Villeda SA. *et al.*, 2011).

En relación a las alteraciones que se producen en la señalización mediada por BMPs en el hipocampo durante el envejecimiento, diversos estudios, incluyendo los de nuestro grupo, han observado un aumento de la expresión de ligandos de la familia de las BMPs. En concreto, tanto en ratones como en humanos, se ha descrito un aumento de BMP4 y BMP6 en el GD con el envejecimiento y una bajada en la expresión del inhibidor de esta ruta de señalización, Noggin (Yousef H. *et al.*, 2015; Meyers EA. *et al.*, 2016; Díaz-Moreno M. *et al.*, 2018). En el momento de iniciarse esta tesis, el papel que desempeñan las proteínas BMPs sobre el nicho, las AH-NSPCs o su relación con el declive de la neurogénesis durante el envejecimiento no eran del todo conocidas. Sí que se había observado un aumento en los niveles de BMP6 en pacientes de la enfermedad de

Alzheimer y en los modelos murinos correspondientes, y se había descrito que dicho aumento correlacionaba con el descenso de la neurogénesis y de las habilidades cognitivas (Crews L. *et al.*, 2010). De la misma manera, se había descrito que un aumento en la expresión de BMP4 estaba relacionado con un descenso en los niveles de proliferación hipocampal en pacientes de Alzheimer, y que la sobreexpresión de Noggin era capaz de recuperar los niveles normales de neurogénesis en modelos animales (Li D. *et al.*, 2008; Tang J. *et al.*, 2009). Nuestro grupo identificó también un aumento en los niveles de expresión de BMP4 y BMP6 en el hipocampo de animales SAMP8, un modelo murino de envejecimiento acelerado. Este aumento correlacionaba con una disminución precoz del número de NSCs de Tipo 1 del hipocampo (Figura 9), una reducción de la neurogénesis, un aumento en la astrogliogénesis y un descenso en las habilidades

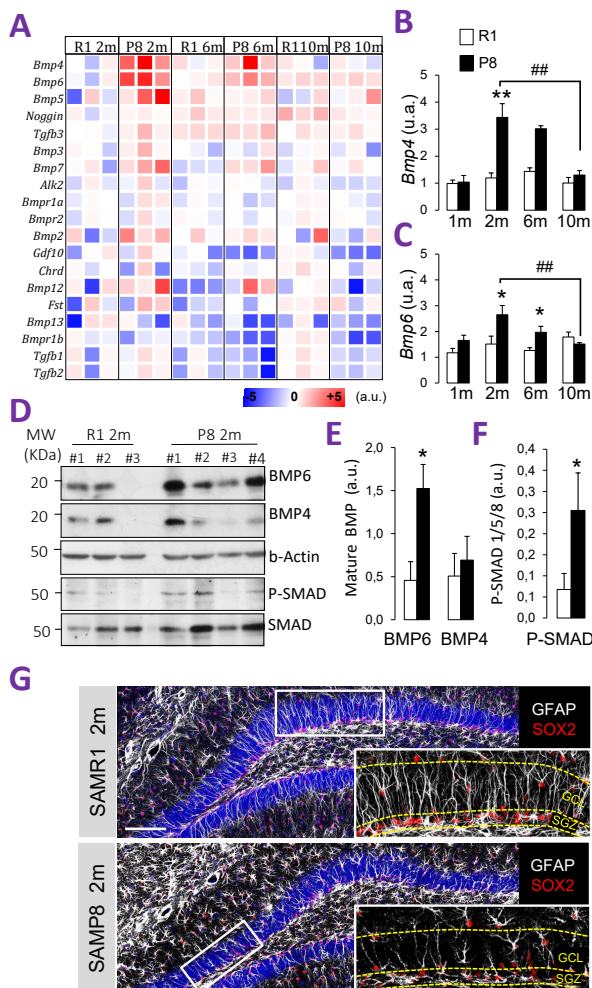


Figura 9. Cambios en la expresión de las BMPs en el GD durante el envejecimiento. La figura muestra los cambios en la expresión de las proteínas BMP4 y BMP6 en el GD de animales SAMP8 respecto a sus controles SAMR1. (A) Mapa de calor mostrando los niveles de RNA (u.a.) de componentes de la señalización de BMPs en el GD de animales SAMR1 y SAMP8 a 2, 6 y 10 meses de edad. Niveles de expresión (mRNA) de Bmp4 (B) y Bmp6 (C) en el GD de animales SAMR1 y SAMP8 de 1, 2, 6 y 10 meses de edad. (D-F) Western blot frente a BMP6, BMP4 y P-SMAD y cuantificación del lisado proteico del GD de animales SAMR1 y SAMP8 de 2 meses de edad. Se utiliza β actina y SMAD total para su normalización. (G) Inmunohistoquímica frente a GFAP (rojo lejano) y Sox2 (rojo) mostrando la pérdida de NSCs Tipo 1 en el GD de animales SAMP8 de 2 meses de edad. Figura modificada de Díaz-Moreno M. *et al.*, 2018.

cognitivas de los animales SAMP8 que conlleva un peor resultado en el MWM (Morris Water Maze). La infusión del inhibidor Noggin en el hipocampo de estos animales rescataba el fenotipo, igualando todos los parámetros neurogénicos y de comportamiento a los de sus respectivos controles SAMR1 (Díaz-Moreno M. *et al.*, 2018).

1.4.2. SAMP8 como modelo de envejecimiento acelerado.

Los animales SAMP8 han sido ampliamente estudiados como modelo no transgénico de envejecimiento acelerado. Su origen data de los años 70, cuando un cruce accidental entre un ratón de la cepa AKR/J y un ratón albino, dio lugar a una descendencia que presentaba ciertos fenotipos relacionados con el envejecimiento acelerado y la senescencia. Estos ratones llegarían a ser los progenitores de las cepas de ratón denominadas SAM (del inglés, Senescence-Accelerated Mouse) (Takeda T. *et al.*, 1997; Shimada A. y Hasegawa-Ishii S., 2011). De entre estos primeros progenitores, cinco de ellos presentaban un fenotipo de envejecimiento acelerado por lo que fueron denominados SAMP (del inglés, Senescence-Accelerated Mouse Prone). Sin embargo, tres animales de esta primera camada presentaban un fenotipo resistente al envejecimiento acelerado, siendo denominados SAMR (del inglés, Senescence-Accelerated Mouse Resistant) (Takeda T. *et al.*, 1997; Shimada A. y Hasegawa-Ishii S., 2011). A partir de este punto, el cruzamiento selectivo de estos primeros progenitores dio lugar a nueve cepas SAMP y a tres SAMR, cada una de ellas presentando diferencias fenotípicas relacionadas con el envejecimiento acelerado y senescencia o la resistencia a ellas (Takeda T. *et al.*, 1994; Takeda T. *et al.*, 1997; Pallas M. *et al.*, 2008). Estas cepas presentan la peculiaridad respecto a otros modelos de que en ningún caso se trata de cepas modificadas genéticamente.

Los animales SAMP8 en concreto presentan características relacionadas con el envejecimiento prematuro y la senescencia y además tienen déficits importantes en memoria y aprendizaje que desarrollan con la edad, por lo que han sido muy estudiados en el campo de la neurociencia. Algunas de las características de estos animales son niveles elevados de estrés oxidativo, alteraciones metabólicas, daño en el DNA

mitocondrial, menor actividad física o pérdida prematura del pelo, lo que ha hecho que este animal se considere un buen modelo de envejecimiento acelerado. Además, los animales SAMP8 también presentan características similares a aquellos individuos que sufren de la enfermedad de Alzheimer, lo que lo hacen un buen modelo para el estudio de la transición entre un envejecimiento normal y un envejecimiento neuropatológico. Una vida media reducida, la hiperfosforilación de la proteína TAU o incluso elevados niveles de la proteína APP (Butterfield DA. y Poon HF., 2005; Pallas M. *et al.*, 2008) son algunas de las características relacionadas con el Alzheimer que desarrollan los SAMP8, a las que hay que sumarles características neurodegenerativas como la pérdida de memoria, déficit en el aprendizaje o pérdida de células neurales (Pallas M. *et al.*, 2008). Además, se ha visto que los astrocitos de los animales SAMP8 tienen una menor capacidad neuroprotectora (García-Matas S. *et al.*, 2008), mientras que la microglía presenta hiperreactividad frente a estímulos de tipo proinflamatorio en animales jóvenes, aunque muestran marcados cambios morfológicos con la edad (Fernández A. *et al.*, 2021; Molina-Martínez P. *et al.*, 2021). A nivel sistémico, los animales SAMP8 tienen niveles elevados de factores pro-inflamatorios circulantes (Miró LI. *et al.*, 2017; Fernández-García C. *et al.*, 2019). En cuanto a los nichos neurogénicos se ha estudiado el fenotipo de los animales a nivel de ZSV. Un trabajo previo de nuestro grupo mostró que los animales SAMP8 presentan una mayor proliferación en la ZSV en edades tempranas con respecto a sus animales control SAMR1. Ensayos basados en la adquisición de BrdU y ensayos *in vitro* de formación de neuroesferas mostraron que este incremento en proliferación se debe a un aumento en la actividad de las NSCs a consecuencia de la sobreexpresión de A β (1-42) en la ZSV de los animales SAMP8. Sin embargo, se trata de un aumento transitorio de la proliferación, quedando ésta comprometida durante el envejecimiento en comparación con los animales SAMR1 (Díaz-Moreno M. *et al.*, 2013). Por otro lado, también se ha observado una reducción del número de NSCs en la ZSV de los animales SAMP8, así como una menor tasa de autorenovación de éstas en edades tempranas (1 mes), efecto asociado al daño en el DNA de las células y a la reducción en la capacidad de respuesta de las propias NSCs a uno de los factores de auto-renovación claves de este nicho, el pigmented epithelium-derived factor (PEDF) (Castro-García P. *et al.*, 2015; Soriano-Cantón R. *et al.*, 2015). Varios estudios han descrito una reducción en la expresión de genes relacionados con la

autorenovación de las NSCs y de indiferenciación, como *Sox2*, *Hes1*, *Hes5* o *Terf1*, y un aumento del gen *Pax6*, relacionado con la diferenciación neuronal y la salida de quiescencia. Estos datos sugieren un defecto en el mantenimiento y pérdida acelerada de la población de NSCs quiescentes en la ZSV de los animales SAMP8 promoviendo características relacionadas con la senescencia, pues el número total de células es menor y su capacidad auto-renovativa está mermada (Castro-García P. *et al.*, 2015; Soriano-Cantón R. *et al.*, 2015). También se ha descrito un aumento en la muerte celular de los neuroblastos durante su migración que contrarresta el incremento en la actividad proliferativa de las NSCs (Soriano-Catón R. *et al.*, 2015).

Todas estas características hacen de esta cepa un buen modelo para el estudio de la neurogénesis hipocampal adulta y de la implicación que tienen las proteínas BMPs en el proceso.

2

Objetivos

1. *Generación de perfiles de expresión in vitro e in vivo de los receptores de BMP tipo 1 (BMPR) tras la diferenciación neuronal de NSPCs hipocampales adultos.*
2. *Evaluación de la función de las BMPs y los receptores de BMPR en la especificación del destino de las NSPCs hipocampales adultas in vitro.*
3. *Evaluación in vitro del papel de las BMPs y los receptores de BMPR en la diferenciación terminal de neuronas inmaduras hipocampales adultas.*
4. *Análisis in vivo de la neurogénesis hipocampal posnatal en ratones tras la expresión de formas activas constitutivas de los receptores de BMPR.*
5. *Análisis del papel de BMP6 en la regulación de NSPCs hipocampales durante el envejecimiento.*

3

Materiales y Métodos

3.1. Experimentos in vitro.

3.1.1. Cultivos Celulares.

3.1.1.1. Mantenimiento y pase de los cultivos celulares.

Para los ensayos de proliferación, muerte y senescencia celular, se usaron cultivos de células madre y progenitores hipocampales de ratón procedentes de animales Crl:CD1, SAMR1 y SAMP8. Estas líneas celulares se mantuvieron en medio Neurobasal (Gibco, 21203049) suplementado con B27 1X (Gibco, 17504044) y con 20 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblasto humano 2 (FGF-2) (PeproTech, 100-18B) y 20 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF) (PeproTech, #315-09). Además, las células fueron crecidas en adhesión en placas de cultivo P100 tratadas con un coating de poly-D-lysina (10µg/ml) (Sigma-Aldrich, 27964-99-4) y laminina (5µg/ml, Sigma-Aldrich, L2020).

Para los ensayos de diferenciación usamos Células Madre y Progenitores del Hipocampo Adulto de rata (AH-NSPCs) (Palmer T.D. *et al.*, 1997). Estas células se mantuvieron en medio N2 compuesto por DMEM/F12(1:1) (Gibco, 31331093) al que se le añadió el suplemento N2 (1X) (Gibco, 17502001) y 20 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblasto humano 2 (FGF-2) (PeproTech, 100-18B), se crecieron en adhesión en placas de cultivo P100 de plástico recubiertas con un coating de poly-ornitina (10µg/ml, Sigma-Aldrich, P3655) y laminina (5µg/ml, Millipore, SCR127) (Hsieh *et al.*, 2004) (Figura 10). En cada pase, las células se levantaron con tripsina y se sembraron a una densidad de 1.500.000 células por P100.

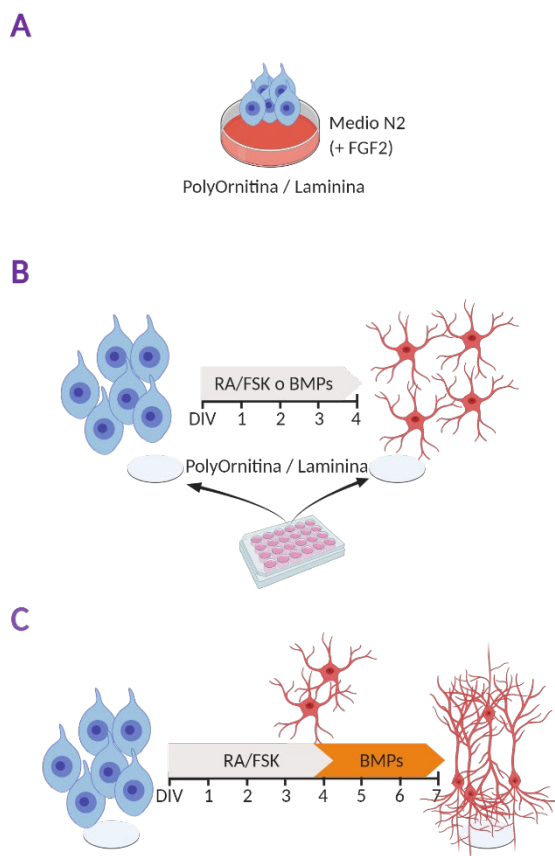


Figura 10. Representación de los cultivos celulares de AH-NSPCs. **(A)** Ilustración que muestra el cultivo de AH-NSPCs en placas P100 tratadas con polyornitina y laminina, en medio DMEM/F12 suplementado con FGF2. **(B)** Esquema ilustrativo temporal de un experimento de diferenciación neuronal. Las AH-NSPCs son tratadas con ácido retinoico y forskolina o con BMPs durante 4 DIV, tras este tiempo se procede a la cuantificación de las neuronas generadas en el cultivo. **(C)** Esquema ilustrativo temporal de un experimento de maduración neuronal. Las AH-NSPCs se cultivan durante 4 DIV en presencia de ácido retinoico y forskolina para favorecer la diferenciación neuronal, posteriormente son tratadas con las diferentes BMPs durante 3 DIV.

3.1.1.2. Ensayos de proliferación, apoptosis y senescencia.

Para todos estos ensayos se sembraron 50.000 células por pocillo en placas MultiWell24 con cubreobjetos circulares de 12mm de diámetro (ThermoScientific) previamente tratados con poly-D-lysina (10µg/ml) (Sigma-Aldrich, 27964-99-4) y laminina (5µg/ml, Sigma-Aldrich, L2020). Las células se cultivaron durante 4 días *in vitro* (DIV) en presencia de mitógenos FGF-2 (10 ng/ml, PeproTech, 100-18B) y EGF (10ng/ml, PeproTech, #315-09), y en presencia o ausencia de 50 ng/ml de BMP6. Para los ensayos de proliferación, las AH-NSPCs fueron tratadas durante 10 minutos con 5µM de Bromodeoxyuridina (BrdU) (Sigma-Aldrich, B5002) o 5µM Clorodeoxyuridina (CldU) (Sigma-Aldrich, C6891) antes del procedimiento de fijación (Paraformaldehido, PFA, 2%, Panreac, 141451.1211). Para los ensayos de senescencia, las AH-NSPCs fueron fijadas

con un tratamiento de 0,2% glutaraldehído e incubadas con X-gal: 20 mg/ml Xgal, 50mM $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ (Sigma-Aldrich, 455989), 50mM $K_3Fe(CN)_6$ (Sigma-Aldrich, 455946), 1M $MgCl_2$ (Sigma-Aldrich, M8266), NP40 0,2% (Sigma-Aldrich, NP40) en PBS 1X; hasta un máximo de 48 horas. Se usaron células C17.2 tratadas con 200nM de H_2O_2 (Roth, 9681.1) durante 4 días *in vitro* (DIV) como control positivo. Para los ensayos de apoptosis, las AH-NSPCs fueron fijadas con Paraformaldehído 2% (Panreac, 141451.1211) y permeabilizadas durante 2 minutos con 0,1% Citrato Sódico (Sigma-Aldrich, 71405) y 0,1% Triton X-100 (ThermoScientific, 93443). La muerte celular fue analizada mediante una inmunocitoquímica para TUNEL, siguiendo el protocolo proporcionado por el kit comercial '*In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red kit*' (ROCHE, 12156792910). El análisis de imagen se realizó con un microscopio Axio Imager A1 (Carl Zeiss). La apoptosis también fue analizada mediante citometría de flujo. La muerte celular fue medida mediante un tratamiento con 0,01 $\mu g/\mu l$ Propidium Iodide (PI) (Sigma-Aldrich, P4170) y Anexina V CF-Blue durante 15 minutos en buffer de unión (Hepes 10mM, $CaCl_2$ 2,5mM, NaCl 140mM pH 7,4). Las células positivas ($PI^+/Anexina^+$) fueron cuantificadas mediante citometría de flujo utilizando '*BD FACSCANTO Flow CytometerTM*'. Utilizamos como control positivo SAMR1 y SAMP8 NSPCs tratadas con 200nM H_2O_2 (Roth, 9681.1) durante 2 horas para inducir muerte celular.

3.1.1.3. Experimentos de diferenciación.

Para los ensayos de diferenciación, cultivamos las AH-NSPCs, en placas multipocillo MW24, sembradas a una densidad de 50000 células/pocillo sobre un cubreobjetos circular de 12mm de diámetro (ThermoScientific) tratado previamente con un coating de poly-ornitina (10 $\mu g/ml$, Sigma-Aldrich, P3655) y laminina (5 $\mu g/ml$, Millipore, SCR127) (Hsieh *et al.*, 2004). Al medio de cultivo se añadieron las proteínas y ligandos correspondientes, a la concentración de interés, durante un periodo de 4 días *in vitro* (DIV) (Figura 10, B): BMP2 (PeproTech, 120-02), BMP4 (PeproTech, 120-05ET), BMP5 (PeproTech, 120-39), BMP6 (PeproTech, 120-06), BMP7 (PeproTech, 120-03) y WNT3A (R&DSystem, 3008-WN). Se usó un tratamiento de 1 μM de Ácido Retinoico (Sigma-Aldrich, 302-79-4) y 5 μM Forskolina (Sigma-Aldrich, F6886) como control positivo de la diferenciación neuronal (Palmer T.D. *et al.*, 1997). Para inhibir la ruta

canónica de las BMPs las células fueron expuestas durante 1 hora a 10 μ M del inhibidor DMH1 (Dorsomorphin Homolog 1) (Merck, 203646) previo al tratamiento con BMPs. De la misma forma, para valorar si la ruta no canónica de las BMPs participa en el proceso de diferenciación, las células fueron expuestas a 10 μ M del inhibidor LIMKi, específico de la LIMK, (Tocris, 4745), a 1 μ M del inhibidor SB203580 (específico para la p38MAPK) (Sigma-Aldrich, S8307), a 1 μ M del inhibidor SP600135 (específico para JNK) (Sigma-Aldrich, 420119), a 1 μ M del inhibidor PD98059 (específico para ERK) (Sigma-Aldrich, P215), y μ M del inhibidor Y-27632 (inhibidor específico para Rho) (Sigma-Aldrich, Y0503), previo al tratamiento con proteínas BMPs. Para inhibir la ruta canónica de las WNT, dependiente de β -catenina, las células fueron expuestas a 1 y 5 μ M del inhibidor XAV393 (Sigma-Aldrich, X3004), inhibidor de la Tankirasa, enzima encargada de la degradación de Axin2.

3.1.1.4. Experimentos de maduración.

En el caso de los experimentos de maduración las AH-NSPCs se cultivaron en placas multipocillo MW24 y sobre un cubreobjetos circular de 12 mm de diámetro (ThermoScientific) tratado previamente con un coating de poly-ornitina (10 μ g/ml, Sigma-Aldrich, P3655) y laminina (5 μ g/ml, Millipore, SCR127) (Hsieh *et al.*, 2004). Se sembraron a igual densidad que en los experimentos de diferenciación pero se siguió un protocolo de 7 días (Figura 10): se cultivaron las células en presencia de un tratamiento de 1 μ M de Ácido Retinoico (Sigma-Aldrich, 302-79-4) y 5 μ M Forskolina (Sigma-Aldrich, F6886) durante los primeros 4 días del experimento, con el fin de favorecer la diferenciación neuronal; posteriormente, se trataron dichas células durante los 3 días restantes con 50 ng/ml de BMP2 (PeproTech, 120-02), BMP4 (PeproTech, 120-05ET), BMP5 (PeproTech, 120-39), BMP6 (PeproTech, 120-06) o BMP7 (PeproTech, 120-03) para analizar el efecto madurativo de estos ligandos. Para dilucidar el efecto de las proteínas BMPs a concentraciones altas, no fisiológicas, se siguió el protocolo anterior y se añadió una concentración de 50, 100, 200, 500 y 1000 ng/ml de BMP6.

3.1.1.5. Experimentos de inhibición química.

Para valorar el efecto de los receptores de las BMPs realizamos experimentos de maduración en los que inhibimos de forma química los receptores de BMP de tipo I y otros componentes de la vía de señalización. Para ello, cultivamos 50000 AH-NSPCs en placas MW24 en presencia de 1 μ M de Ácido Retinoico (Sigma-Aldrich, 302-79-4) y 5 μ M Forskolina (Sigma-Aldrich, F6886), pasado ese tiempo ponemos a las células en presencia del inhibidor correspondiente durante 1 hora, y, tras la hora de inhibición, estimulamos con los ligandos de las BMPs durante 3 días. Tras un total de 7 días *in vitro* el grado de maduración fue medido mediante la inmunocitoquímica frente al citoesqueleto de las neuronas (Tubulina β III). Los inhibidores empleados en estos experimentos fueron los siguientes: inhibidor específico de los receptores de tipo I K02288 (Sigma-Aldrich, SML1307), que inhibe los receptores de tipo I de las BMPs en función de su concentración (siendo 1.1, 6.4 y 34.4 nM las IC50 para los receptores ACVR1, BMPR1B y BMPR1A respectivamente); 10 μ M de DMH1 (Dorsomorphin Homolog 1) (Merck, 203646), inhibidor de la ruta canónica de las BMPs; 10 μ M de LIMKi (Tocris, 4745), inhibidor de la kinasa LIM y, por tanto, de la ruta no canónica de las BMPs.

3.1.2. Inmunocitoquímica.

A término de los distintos experimentos los cultivos celulares fueron fijados con 2% paraformaldehído (Panreac, 141451.1211) durante 10 minutos. Tras la fijación, todas las muestras fueron lavadas en tampón fosfato 0,1M (PB) y bloqueadas durante 1 hora con una solución de bloqueo que consta de: 10% de suero fetal bovino (Corning, 35-079-cv) y 0,2% de Triton-X100 (ThermoScientific, 93443) preparada en PB 0,1M. En todos los casos se incubó toda la noche con los anticuerpos primarios, se lavaron las células y se incubaron 1 hora con los anticuerpos secundarios correspondientes. Los anticuerpos primarios empleados son los siguientes (Tabla 1): Monoclonal Anti-Neuronal Class III β -Tubulin (TuJ1) 1:250 (Covance, mms-435p), Monoclonal Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein 1:300 (Sigma-Aldrich, g3893), Polyclonal Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein 1:300 (Dako, z0334), Anti-Myelin Basic Protein 1:40 (Abcam, ab2404), Phospho-

Smad1/Smad5/Smad8 Antibody 1:1000 (Cell Signalling, #9511), Monoclonal Anti-O4 1:150 (Sigma-Aldrich, MAB345), Goat Anti-Doublecortin (C-18) 1/200 (Santa Cruz Biotechnology, sc8066), Monoclonal Anti-Nestin [Rat-401] 1:500 (Abcam, ab11306), Polyclonal Goat Anti-SOX2 1:300 (R&D Systems, af2018), Rabbit monoclonal anti-Ki67 1:50 (Thermo Scientific, RM-9106), Monoclonal Anti-MAP2 (2a+2b) clone AP-20 1:300 (Sigma-Aldrich, M1406), Monoclonal anti-ID1 (B-8) 1:100 (Santa Cruz Biotechnology, sc133104). Los anticuerpos secundarios empleados son los siguientes (Tabla 2): Cy3 Goat anti-Mouse 1:2000 (Jackson ImmunoResearch, 115-166-062), Cy3 Donkey anti-Rabbit 1:2000 (Jackson ImmunoResearch, 711-165-152), Alexa 488 Donkey anti-Rabbit 1:500 (Jackson ImmunoResearch, 711-546-152), Alexa 555 Donkey anti-Rabbit 1:500 (Invitrogen, A31572), Biotinylated Donkey Horse anti-Goat 1:200 (Vector Laboratories, BA-9500) y Cy5 Streptavidin 1:400 (Jackson ImmunoResearch, 016-170-084). Para realizar la inmunocitoquímica frente a Tunel de los cultivos primarios utilizamos y seguimos las indicaciones del kit comercial "In Situ Cell Death Detection Kit" (Roche, 11684795910). Para marcar el DNA nuclear se empleó una tinción con 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 10 µg/ml (Sigma-Aldrich, D9542). Todas las muestras fueron procesadas con el medio de montaje basado en Dabco/Mowiol 1/20 (Roth, 0718.2/Roth, 0713.2). Todo el análisis de imagen se hizo con un microscopio ImageA1 Axio (Carl Zeiss) para el estudio de diferenciación o con un microscopio confocal SP8 (Leica) para los ensayos de maduración.

3.1.3. Ensayos para valorar la senescencia celular.

Sembramos AH-NSPCs procedentes de ratones Crl:CD1 en placas multipocillo MW24 utilizando un cubreobjetos circular de 12mm de diámetro (ThermoScientific) previamente tratados con poly-D-lysina (10µg/ml) (Sigma-Aldrich, 27964-99-4) y laminina (5µg/ml, Sigma-Aldrich, L2020), suplementadas con sus correspondientes mitógenos, 10 ng/ml FGF2 (PeproTech, 100-18B) y 10 ng/ml EGF (PeproTech, #315-09), y en presencia o ausencia de 50 ng/ml de BMP6 (PeproTech, 120-06) durante 4 DIV. Pasado el tiempo de cultivo, dichas células fueron fijadas con glutaraldehído 0,1% fresco (Roth, 4157.1). Posteriormente, las muestras fueron incubadas con la mezcla de tinción

desde 0,5 a 48 horas a 37°C, dicha mezcla consta de: 20 mg/ml Xgal, 50mM $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ (Sigma-Aldrich, 455989), 50mM $K_3Fe(CN)_6$ (Sigma-Aldrich, 455946), 1M $MgCl_2$ (Sigma-Aldrich, M8266), NP40 0,2% (Sigma-Aldrich, NP40) en PBS 1X. Como control negativo para senescencia se utilizaron células C17.2 cultivadas durante 4 DIV, como control positivo se emplearon células C17.2 tratadas con H_2O_2 (Roth, 9681.1) una vez al día (200nM) durante 4 DIV.

3.1.4. Análisis de la expresión génica.

El RNA fue extraído de células (AH-NSPCs) o de tejido de ratones wild type (Crl:CD1) utilizando el kit comercial Illustra RNAspin Mini Kit (GE Healthcare, 25-0500-71) y la cantidad de RNA extraída fue medida mediante un lector de placa (Infinite M200 TECAN). El cDNA correspondiente fue obtenido a partir de 250-500 ng de RNA mediante una retrotranscripción reversa (RT) y usando el kit PrimeScrip RT Reagent (Perfect Real Time) (Takara, RR037A). Las condiciones de RT empleadas fueron las siguientes: 37C 15 min, 85C 1 min, 4C infinito. Una vez generado el cDNA la expresión génica fue medida por medio de una PCR cuantitativa (qPCR) en un LightCycler480 (Roche) usando SYBR PremixEX Taq (2X) (Takara, RR420A) y los cebadores o primers directo y reverso correspondientes para cada gen (Tabla 3) siguiendo las concentraciones indicadas por el fabricante. Los datos fueron analizados siguiendo el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak K.J. y Schmittgen T.D., 2001) y referidos a su correspondiente control.

3.1.5. Electroforesis de proteínas y Western blot.

Para la extracción de proteínas, las muestras fueron lisadas en tampón de lisis PB 0,1M suplementado con inhibidores de proteasas 1X (Takara, B14011) y 1% Triton TX-100 (ThermoScientific, 93443). En aquellos casos en los que se pretendía analizar proteínas fosforiladas se añadieron al tampón de lisis inhibidores de fosfatasa: 1% Ortovanadato (Sigma-Aldrich, S6508), 1% PMSF (Sigma-Aldrich, 78830), 1% Fluoruro Sódico (Sigma-Aldrich, S1504). Se substituyó el Triton TX-100 por 1% de SDS (Sigma-Aldrich, D6750) en el caso de requerir proteínas nucleares. Dichas fracciones proteicas

fueron separadas mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE), y transferidas a una membrana de polyvinylidene difluoride (PVDF) (Merk Millipore, IPVH00010) siguiendo los protocolos proporcionados por la casa comercial (Bio-Rad). Una vez transferidas las proteínas, las membranas fueron incubadas con tampón de bloqueo durante 1 hora: 5% leche desnatada o 3% BSA (Apolo Scientific, 9048-46-8), en el caso de proteínas fosforiladas, en T-TBS (20mM Tris, 150mM NaCl, 0,1% Tween20, pH 7,5). Tras el bloqueo, las membranas fueron incubadas, en primer lugar, con los anticuerpos primarios toda la noche y, posteriormente, con los anticuerpos secundarios correspondientes durante 1 hora. Los anticuerpos empleados para los análisis por western blot son los siguientes (Tabla 1, Tabla 2): Phospho-Smad1/Smad5/Smad8 antibody (Cell Signalling, #9511 y #13820), Smad1/5/8 (N-18)-R antibody (Santa Cruz Biotechnology, sc-6031-r), Neuronal Class III β -Tubulin antibody (Covance, mms-435p), Glial Fibrillary Acidic Protein antibody (Dako, z0334), Goat Doublecortin (C-18) antibody (Santa Cruz Biotechnology, sc8066), Phospho-LRP6 (Ser1590) antibody (Cell Signalling, 2568), β -actin antibody (Sigma-Aldrich, a5441), Anti-LEF1 antibody (Abcam, ab85052), Anti-BMPR2 antibody [1F12] (Abcam, ab130206), Donkey anti-Rabbit ECL 1:50000 (Amersham, na934), Sheep anti-Mouse ECL 1:50000 (Amersham, na931), Donkey anti-Goat HRP 1:10000 (Santa Cruz Biotechnology, sc-2020).

3.1.6. Análisis filogenético y caracterización de la secuencia del promotor de *Lef1*.

Las distancias filogenéticas entre los distintos ligandos de las BMPs fueron calculadas utilizando CLUSTAL-W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>), usando las secuencias proteicas y los parámetros por defecto. A su vez, para la visualización de los árboles se empleó el programa informático 'Aliview'. La información de las secuencias de las distintas proteínas de ratón fue obtenida de bases de datos a través de los siguientes números de acceso: BMP2 (NP_031579.2), BMP4 (AAH13459.1), BMP5 (NP_031581.2), BMP6 (NP_031582.1), BMP7 (NP_031582.2), BMP8A (NP_031584.1) y BMP8B (NP_031585.2). Para la caracterización del promotor del gen

Lef1, obtuvimos la secuencia de 5kpb de la base de datos de genoma de rata (gil89673387:821409826409), y los análisis tanto para el estudio de regiones promotoras, como para el estudio de posibles sitios de unión para factores de transcripción se llevaron a cabo utilizando el software informático 'Genomatrix Promoter Inspector' y 'MatInspector' tool (Genomatrix Software Suite v3.0).

3.1.7. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).

Cultivamos las AH-NSPCs, en presencia de 25 ng/ml de la proteína BMP4 (PeproTech, 120-05ET) durante 6 horas. Pasado el periodo de estimulación procedimos a realizar el crosslinking entre el DNA y las proteínas asociadas, para ello expusimos las células durante 10 minutos a una concentración final de 1% de formaldehído (a partir de formaldehído 37%, Panreac). Las células fueron recogidas en tubos eppendorf de 1,5 ml y se procedió a la lisis celular empleando un sonicador UP50H Ultrasonic Processor (Hielscher), tras optimizar el siguiente protocolo de sonicación: 30% amplitud, 10 segundos x20 pulsos. Para la inmunoprecipitación, las fracciones proteicas obtenidas fueron incubadas durante 48 horas con 60 µl Protein A agarose/Salmon Sperm DNA (Millipore, 16-157) y 10 µg del anticuerpo SMAD4 Antibody (H-552) (Santa Cruz Biotechnology, sc-7154). Todos los tampones empleados en el proceso de inmunoprecipitación fueron preparados siguiendo las indicaciones del fabricante, Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Assay Kit (Upstate): ChIP Dilution Buffer (0,01% SDS, 1,1% Triton TX-100, 1,2mM EDTA, 16,7mM Tris pH 8.1, 167mM NaCl), Low Salt Immune Complex Wash Buffer (2mM EDTA, 20mM Tris pH 8.1, 150mM NaCl, 0,1% SDS, 1% Triton TX-100), High Salt Immune Complex Wash Buffer (2mM EDTA, 10mM Tris pH 8.1, 500mM NaCl, 0,1% SDS, 1% Triton TX-100), LiCl Immune Complex Wash buffer (1% Igepal-CA360, 0,5M LiCl, 1% Deoxycholic Acid, 100mM Tris pH 9.0), TE Buffer (10mM Tris pH 8.1, 1mM EDTA) y SDS Lysis Buffer (1% SDS, 10mM EDTA, 50mM Tris pH 8.1). El material inmunoprecipitado fue amplificado mediante una PCR convencional utilizando DNA polymerase (Biotools), 10X Standard Reaction Buffer con 2mM MgCl₂ (Biotools), 240 µM dNTP Mix (Invitrogen) y los primers correspondientes para el promotor del gen *Lef1* (Tabla 1) (Figura 11).

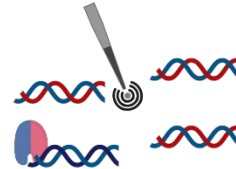
A Cross-link.

Fijamos SMAD4/SMAD158 a la cromatina y al DNA.



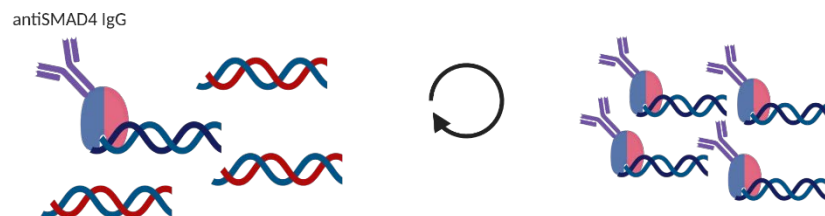
B Sonicación.

Ruptura de la cromatina y DNA en fragmentos de 500pb.



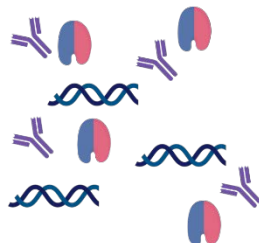
C Precipitación de la cromatina.

Inmunoprecipitación del DNA de interes con anticuerpos específicos.



D Reversión del cross-linking.

Reversión del entrecruzamiento y purificación del DNA.



E PCR.

Amplificación de los fragmentos inmunoprecipitados con primers específicos.

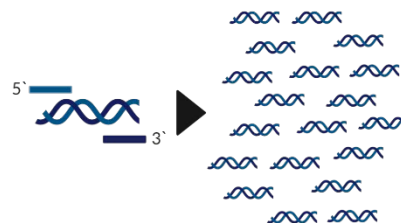


Figura 11. Representación ilustrativa de un experimento de ChIP. **(A)** Representación del cross-link de un dímero de proteínas SMADs (SMAD4/SMAD158) cuando este se une a su sitio de unión en el DNA. **(B)** Representación del proceso de sonicación. El material que ha sido entrecruzado es sonificado para su ruptura en fragmentos de 500pb. **(C)** Representación de la inmunoprecipitación. El material entrecruzado y sonificado es centrifugado para separar aquellos fragmentos de 500 pb que están unidos a los dímeros de proteínas SMADs. **(D)** Representación del proceso de reversión del entrecruzamiento y purificación de los fragmentos de DNA. **(E)** Representación de la PCR. Amplificación de los fragmentos obtenidos tras la purificación del DNA. Se utilizan los cebadores específicos para el promotor de *Lef1* (Tabla 2).

3.1.8. Análisis de las características morfológicas de las neuronas.

3.1.8.1. Análisis de Sholl.

El análisis de Sholl evalúa la morfología y la complejidad de la arborización neuronal. Se basa en superponer sobre la neurona una serie de círculos concéntricos centrados en el soma de dicha neurona y, posteriormente, hacer un recuento de cuántas veces cortan las neuritas de la neurona estudiada con cada uno de los círculos superpuestos (**Figura 12, A**). De esta forma, cuantos más cortes tengan las neuritas de la neurona estudiada y cuanto más alejados estén estos cortes del soma neuronal más madura se considerará dicha neurona. Para los análisis de Sholl de los experimentos de maduración en primer lugar se fotografiaron las distintas muestras en un microscopio confocal Leica TCS SP8, con un objetivo de 40X, apertura numérica de 1,3 y zoom digital de 1. Las neuronas fotografiadas fueron analizadas mediante el plugin 'Sholl Analysis' del software informático FIJI (Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I. & Frise, E. et al. (2012), "[Fiji: an open-source platform for biological-image analysis](#)", *Nature methods* **9(7)**: 676-682, PMID 22743772). Utilizamos los parámetros por defecto además de un radio inicial ajustado al soma de la neurona, una distancia entre círculos de 3,4 μm (20 píxeles) y un radio final de hasta 170 μm (1000 píxeles).

3.1.8.2. Número de puntos finales (End Points).

Esta medida hace referencia al número total de dendritas que posee una neurona, tanto primarias como secundarias. Esta medida se basa en contar el número de terminaciones dendríticas que pertenecen a una neurona (**Figura 12 B**). Cabe destacar que las neuronas generadas *in vitro* a partir de AH-NSPCs pueden tener más de una neurita primaria, mientras que las neuronas hipocampales encontradas *in vivo*, debido a que están muy polarizadas, en condiciones normales solo presentan una única neurita primarias.

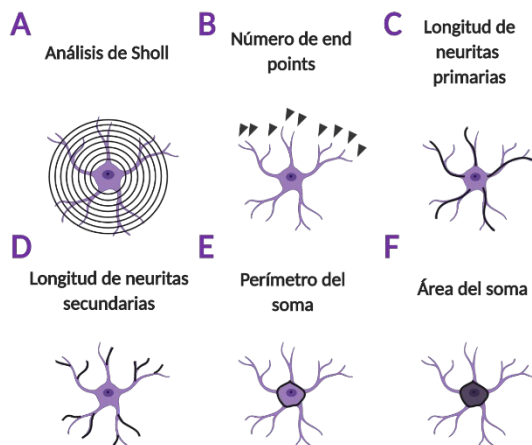


Figura 12. Análisis de Sholl y características morfológicas de una neurona *in vitro*. (A) Ilustración de un análisis de Sholl. Se superponen círculos concéntricos sobre la neurona y se cuantifica el número de cortes que tienen las neuritas de dicha neurona con los círculos. (B) Ilustración del número de puntos finales (End Points) de una neurona. Representados como puntas de flecha (negro). (C) Ilustración de la medida de la longitud de las neuritas primarias. (D) Ilustración de la longitud de las neuritas secundarias. (E) Ilustración de las medidas realizadas para calcular el perímetro (E) y el área (F) del soma.

3.1.8.3. Longitud de neuritas primarias y secundarias.

Para el cálculo de las longitudes se empleó el software informático FIJI, en concreto, la función de 'Segmented Line' se utilizó para delinear todas las neuritas de una neurona. Esta medida que hace referencia a la suma de la longitud, en micras, de todas las neuritas primarias o secundarias de una neurona (Figura 12 C, D).

3.1.8.4. Perímetro y Área del Soma.

De nuevo, se utilizó el software informático FIJI para calcular el perímetro, en μm , y el área, en μm^2 , del soma de las neuronas (Figura 12 E, F).

3.1.9. Ensayos de siRNA frente a los receptores de las BMPs.

Para estos experimentos se procedió a la nucleofección de las AH-NSPCs con los siRNA comerciales diseñados frente a los receptores de BMPs de interés. Para ello se utilizó un equipo Amaxa 4D Nucleofector (Lonza) y el kit comercial Amaxa P3 Primary

Cell 4D-Nucleofector X kit S (Lonza, V4XP-3032) siguiendo las especificaciones de dicho kit. Se levantaron y contaron 500.000 AH-NSPCs por condición, las cuales fueron nucleofectadas con el programa DC100 (programa de nucleofección específico para células madre neurales) y con 300nM del correspondiente siRNA (Figura 13 A, B). Los siRNA utilizados fueron: siRNA Scramble siGENOME Control Pool Non-Targeting #2 (D-001206-14-05), siBMPR2 (M-101651-00), siACVR1 (M-099048-01-0005) y siBMPR1B (M-089942-01-0005). Una vez nucleofectadas se sembraron 500.000 células en placas MW6 y se cultivaron durante 4 DIV en presencia de 1 μ M de Ácido Retinoico (Sigma-Aldrich, 302-79-4) y 5 μ M Forskolina (Sigma-Aldrich, F6886), y, posteriormente, durante 3 DIV en presencia de 50 ng/ml de BMP6 (Figura 13 C). Las células fueron lisadas para extraer la fracción proteica o el RNA celular para realizar un análisis de la expresión de los genes diana por western blot (*Bmpr2*) o PCR cuantitativa (*Acvr1* y *Bmpr1b*). Por otro lado, tras la nucleofección también se sembraron 50.000 células por pocillo en placas multipocillo MW24 y sobre un cubreobjetos circular de 12 mm de diámetro (ThermoScientific) tratado previamente con un coating de poly-ornitina (10 μ g/ml, Sigma- Aldrich, P3655) y laminina (5 μ g/ml, Millipore, SCR127) (Hsieh *et al.*, 2004). Tras lo que las células fueron

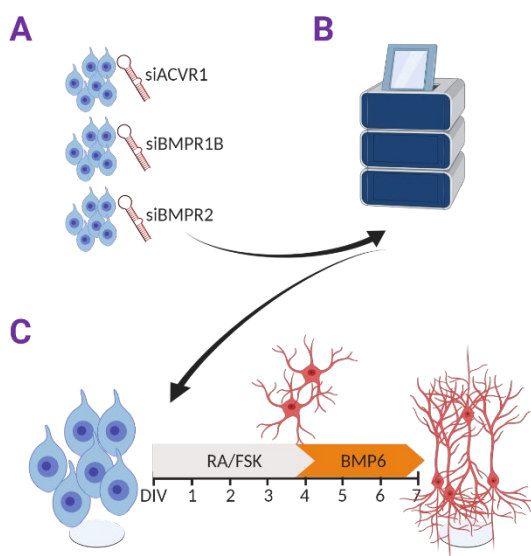


Figura 13. Ilustración de un ensayo de silenciamiento utilizando siRNA. (A) Las AH-NSPCs son incubadas con los correspondientes siRNA (siACVR1, siBMPR1B y siBMPR2). (B) Tras el proceso de incubación las AH-NSPCs son nucleofectadas utilizando un equipo Amaxa 4D Nucleofector (Lonza) y el programa DC100, específico para células neurales. (C) Tras la nucleofección las AH-NSPCs son sembradas y cultivadas siguiendo el protocolo de los experimentos de maduración (7 DIV) previamente descrito (Figura 10 C). A término del experimento las AH-NSPCs son fijadas y se cuantifica la maduración neuronal por medio del análisis de Sholl y las características morfológicas de las neuronas generadas.

cultivadas durante 4 DIV en presencia de un tratamiento de 1 μ M de Ácido Retinoico (Sigma-Aldrich, 302-79-4) y 5 μ M Forskolina (Sigma-Aldrich, F6886) para promover la entrada en el proceso de diferenciación neuronal y posteriormente de 50 ng/ml de BMP6 (PeproTech, 120-06) durante 3 DIV para observar la respuesta a estas proteínas. El grado de maduración conseguido fue medido mediante la inmunocitoquímica frente a la proteína del citoesqueleto tubulina β III (Tuj1) y el análisis de Sholl correspondiente.

3.1.10. Generación de las construcciones virales.

Para los ensayos en los que utilizamos lenti y retrovirus, se procedió en primer lugar a subclonar las construcciones de interés en los vectores virales. Partimos de los plásmidos comerciales que contenían las secuencias codificantes de las formas constitutivas activas de los receptores de tipo I: pcDNA3-Acvr1h-CA (Q207D) (#80871, Addgene) y pcDNA3-BMPR1B-CA (Q203D) (#80883, Addgene). Ambos plásmidos constan del constructo de interés seguidos del tag HA (Figura 14 A).

3.1.10.1. Construcciones Retrovirales.

En el caso de las construcciones retrovirales los plásmidos comerciales que portan las formas constitutivas activas de los receptores fueron digeridos con las enzimas de restricción EcoR1 (Takara, 1040A) y Xho I (Takara, 1094A), de la misma forma, el backbone retroviral (pMY-IRES-GFP) fue digerido con las mismas enzimas, EcoR1 y Xho I. Inserto y vector fueron purificados mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 1% (Pronadisa, 8012) y el kit NZYGelpure (Nzytech, MB01101).

Tras la purificación se procedió a ligar el inserto y el vector manteniendo una proporción 4/1 (inserto/vector) con una T4 DNA ligasa (Takara, 2011A) durante toda la noche. Los plásmidos resultantes constan de las formas constitutivas activas de ACVR1 o BMPR1B, los genes necesarios para la generación de retrovirus en células empaquetadoras, los genes de resistencia a ampicilina, y, además, el reportero GFP (Figura 14 B).

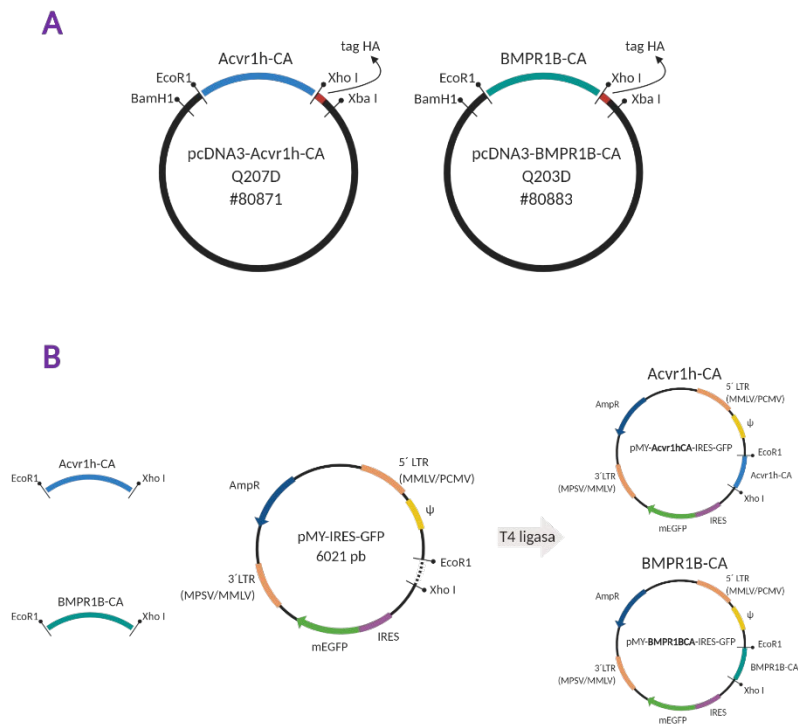


Figura 14. Plásmidos de interés y construcciones retrovirales. **(A)** Representación de los plásmidos comerciales que portan las formas constitutivas activas de los receptores de tipo I, pcDNA3-Acvr1h-CA (Q207D) (#80871, Addgene) y pcDNA3-BMPR1B-CA (Q203D) (#80883, Addgene). Ambos plásmidos portan el tag Ha tras la secuencia de los receptores. **(B)** Representación del protocolo de digestión y ligación para la obtención de las construcciones retrovirales usadas en los experimentos. Los plásmidos que portan las construcciones de interés, así como el plásmido retroviral pMY-IRES-GFP, son digeridos con las enzimas de restricción EcoR1 y XhoI. Posteriormente se realiza la ligación de inserto y vector manteniendo una proporción 4/1 respectivamente.

3.1.10.2. Construcciones Lentivirales.

En el caso de las construcciones lentivirales los plásmidos comerciales con las formas constitutivas activas de los receptores fueron digeridos con la enzima de restricción XbaI (Takara, 1093A), de la misma manera el backbone que porta los genes lentivirales (pHRSIN-CSGW-dINotI) fue digerido con la enzima NotI (Fermentas, ER0595) (Figura 15 A). Una vez digeridos, se procedió a hacer romos los extremos mediante el siguiente protocolo (Figura 15 B): incubamos cada uno de los plásmidos previamente digeridos durante 15 minutos con 1U/ μ g T4 polymerase (Takara, 2040A), 100 μ M dNTPs

(Promega, U1515), y a 12C. Tras este procedimiento tanto el plásmido con el inserto como el plásmido con el vector lentiviral se volvieron a digerir con la enzima de restricción BamHI (Takara, 1010A), esto dio lugar a un inserto con un extremo con la diana de BamHI y otro extremo romo, y, de la misma forma, un backbone lentiviral con un extremo con la diana de BamHI y otro romo. Inserto y vector fueron purificados y concentrados mediante un gel de agarosa (Pronadisa, 8012) al 1% y el kit comercial NZYGelpure (Nzytech, MB01101), y, posteriormente, ligados mediante una T4 DNA ligasa (Takara, 2011A) durante toda la noche. Los plásmidos resultantes constan de las formas constitutivas activas de ACVR1 o BMPR1B etiquetadas con HA, los genes necesarios para la generación de lentivirus y el gen de resistencia a ampicilina (Figura 15 C).

Para ambos casos, se transformaron bacterias competentes XL1Blue (Stratagene, #200249) con los plásmidos obtenidos siguiendo un protocolo de Heat Shock: incubamos las bacterias competentes con los plásmidos durante 30 minutos en hielo, incubamos a 42C durante 45 segundos (heat shock), incubamos 5 minutos en hielo, incubamos a 37C durante 45 minutos en medio Luria Broth (LB) (Pronadisa). Posteriormente, las bacterias transformadas fueron seleccionadas creciéndolas en placas de LB-agar con ampicilina (Apolo, BIA0104) overnight. Se hizo un precultivo de aquellas colonias seleccionadas por la ampicilina y se comprobó mediante una miniprep. y ensayos de restricción que los plásmidos transformados eran los correctos.

3.1.11. Generación de partículas virales.

3.1.11.1. Retrovirus.

Para la generación de los retrovirus se utilizó una transfección mediante Cloruro de calcio de los plásmidos generados en las células empaquetadoras Phoenix (Swift, S. Rapad Production of Retroviruses for Efficient Gene Delivery to Mammalian Cells Using

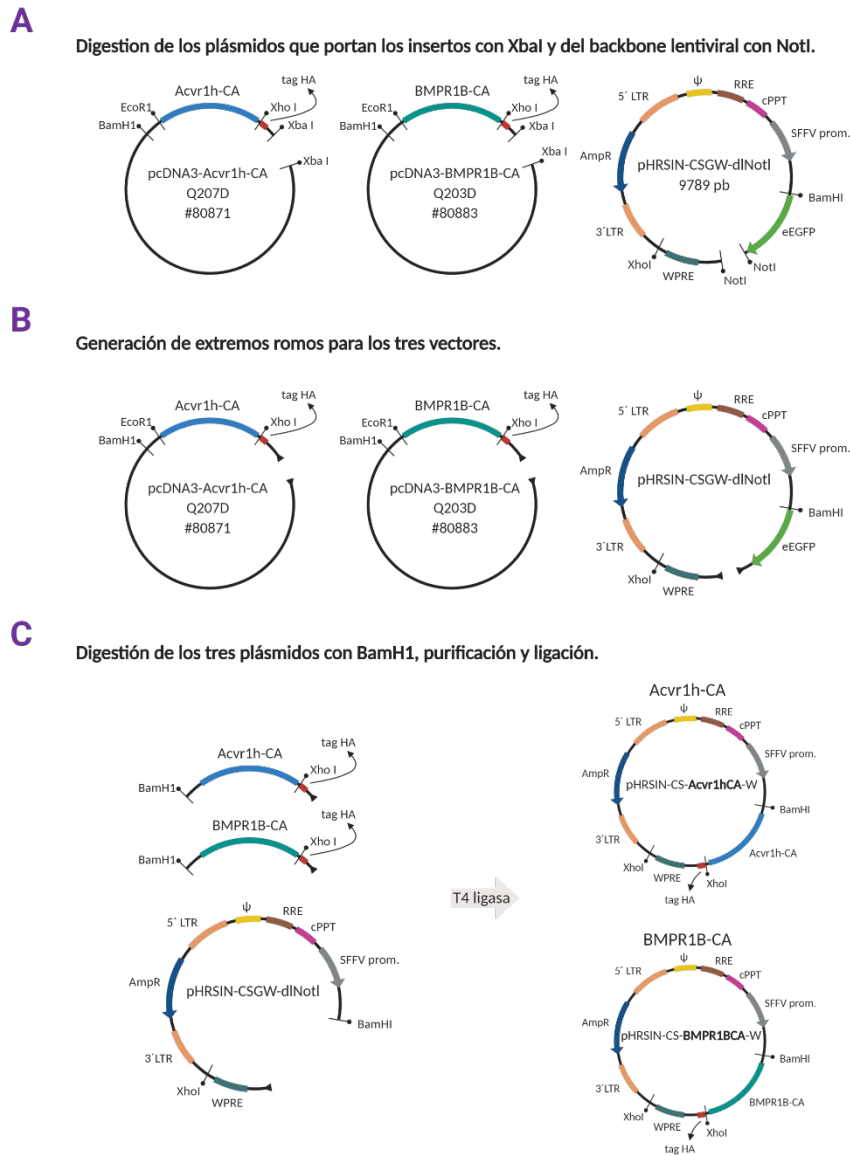


Figura 15. Generación de las construcciones lentivirales.

(A) En primer lugar, los plásmidos de interés fueron digeridos con la enzima de restricción XbaI, de la misma manera, el backbone lentiviral fue digerido con la enzima NotI. (B) Se procedió a transformar los extremos de los tres plásmidos en extremos romos. (C) Posteriormente, tanto los plásmidos con los insertos como el plásmido con el vector lentiviral fueron digeridos con la enzima de restricción BamH1, generando así inserto y vector con un extremo romo y otro para BamH1. Una vez purificados se procedió a la ligación de inserto y vector manteniendo una proporción 4/1 respectivamente. Los dos plásmidos lentivirales generados portan el tag HA.

293T Cell-Based Systems. Current protocols in immunology. 2014). Estas células ya portan los componentes necesarios para la generación de retrovirus. Para estos

experimentos se cultivaron células Phoenix durante 2 DIV, y se generaron tres tipos de retrovirus para lo que se transfectaron tres construcciones retrovirales diferentes: el vector retroviral vacío (Control), el vector retroviral que porta la forma constitutiva activa de ACVR1A, y el que porta la forma constitutiva activa de BMPR1B. Cambiamos el medio de cultivo 6 horas tras la transfección, y, posteriormente, se realizaron dos recogidas de los virus secretados al medio de cultivo: a las 24 y 48 horas. Finalmente, los virus obtenidos se purificaron y concentraron utilizando columnas comerciales Vivaspin20 (Sartorius, VS2042).

3.1.11.2. *Lentivirus.*

Para la generación de los lentivirus, se empleó el sistema de empaquetamiento denominado de segunda generación (2nd generation technology) y se utilizó una transfección mediante Cloruro de calcio, pero, en este caso, de células HEK293T. Se cotransfectaron, además de los plásmidos que portan las construcciones de interés (plásmido lentiviral vacío, ACVR1 constitutivo activo, BMPR1B constitutivo activo), aquellos plásmidos que portan los genes necesarios para sintetizar las proteínas de las envueltas víricas y los genes necesarios para el empaquetamiento, pMD2G (que contiene la proteína de la envuelta VSV-G) y psPAX2 (que contiene *Gag*, *Pol*, *Rev* y *Tat*) respectivamente (Addgene, #12259, #12260). Para la generación de estos virus se cultivaron células 293T en placas P100 durante 2 DIV, se cambió el medio 6 horas antes de la transfección y se realizaron dos recogidas de medio postransfección, una a las 24 y otra a las 48 horas. Posteriormente, los lentivirus fueron purificados y concentrados utilizando las columnas comerciales Vivaspin20 (Sartorius, VS2042).

3.1.12. Transducciones retrovirales y lentivirales.

Para los experimentos de maduración neuronal la sobreexpresión de las formas constitutivas activas de los receptores de tipo I de las BMPs se hizo a través de la infección de las células con retro y lentivirus que portan dichas construcciones. Para ello se cultivaron células AH-NSPCs de rata durante 7 DIV: 4 DIV en presencia de 1 μ M de

Ácido Retinoico (Sigma-Aldrich, 302-79-4) y 5 μ M Forskolina (Sigma-Aldrich, F6886), para favorecer la entrada en el proceso de diferenciación neuronal, y 3 DIV en presencia de 50 ng/ml BMP6 (PeproTech, 120-06). Dichas células fueron infectadas con retro o lentivirus a día 3 del experimento, y se emplearon tres tipos de retrovirus (retrovirus control (GFP), retrovirus ACVR1CA-GFP, retrovirus BMPR1BCA-GFP), y tres tipos de lentivirus (lentivirus control (HA), lentivirus ACVR1CA-HA, lentivirus BMPR1BCA-HA). A día 7 las células fueron fijadas con 2% paraformaldehído (Panreac, 141451) y procedimos a medir las características morfológicas (número de end points, longitud dendrítica total, número de neuritas primarias, número de neuritas secundarias) y el grado de maduración neuronal mediante una inmunocitoquímica frente a Tubulina β III y el análisis de Sholl correspondiente.

3.2. Experimentos in vivo.

3.2.1. Animales.

Usamos ratones machos Crl:CD1 de dos meses de edad para diseccionar el giro dentado del hipocampo. Los animales se mantuvieron en condiciones de SPF y toda manipulación fue aprobada por el Comité para la Investigación Ética y el Bienestar Animal del Instituto de Salud Carlos III, España.

Para los experimentos de electroporación *in vivo* utilizamos animales Crl:CD1. Estos animales fueron electroporados a día posnatal P0 (P0, recién nacidos) y sacrificados a los 21 días tras la electroporación (P21). Para la generación de cultivos primarios de células AH-NSPCs empleamos machos Crl:CD1, SAMR1 y SAMP8 de dos meses de edad. Los animales Crl:CD1 fueron comprados a Charles River (Les Oncins, Francia), las líneas SAMR1 y SAMP8 fueron cedidas por el Dr. Mercè Pallàs de la Universidad de Barcelona (Pallas, M. 2008). Todos estos procedimientos se llevaron a cabo bajo la supervisión y aprobación del Comité de Ética y Subcomité de Bioética del Instituto de Biomedicina de Valencia, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), España.

3.2.2. Cultivos primarios AH-NSCs (Crl:CD1, SAMR1, SAMP8).

Para la obtención y extracción de las células madre hipocampales se siguió el procedimiento descrito por Babu *et al.* (Babu H. *et al.*, 2011). Se sacrificaron seis animales (Crl:CD1, SAMR1 o SAMP8) por cultivo. Una vez sacrificados, procedimos a la disección del giro dentado del hipocampo en cada uno de los hemisferios del cerebro de dichos animales, obteniendo un total de 12 giros por cultivo. Este tejido fue disgregado y homogeneizado mediante el kit P (Miltenyi, 130-092-628) y disociador de tejido GentleMACS Octo Dissociator (Miltenyi,130-096-427), tras lo que procedimos a la eliminación de la mielina mediante un gradiente de percoll (GE17-0891-02). Las células obtenidas fueron sembradas en un pocillo de una placa de MW24 recubierta con un

coating de poly-D-lysina (10µg/ml) (Sigma-Aldrich, 27964-99-4) y laminina (5µg/ml, Sigma-Aldrich, L2020), en medio Neurobasal (Gibco, 21103049) suplementado con B27 (Gibco, 17504044) y en presencia de 20 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblasto humano 2 (FGF-2) (PeproTech, 100-18B) y 20 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF) (PeproTech, #315-09).

3.2.3. Generación de los plásmidos IRES GFP.

Para los experimentos de maduración *in vivo* en los que empleamos la técnica de electroporación el primer paso a seguir fue el de la generación de los plásmidos que portan las construcciones constitutivamente activas de los receptores de las BMPs tipo I ACVR1 y BMPR1B.

Partimos de los plásmidos comerciales que contenían dichas formas de los receptores de tipo I: pcDNA3-Acvr1h-CA (Q207D) (#80871, Addgene) y pcDNA3-BMPR1B-CA (Q203D) (#80883, Addgene); y del plásmido pCAG-IRES-GFP (Addgene, #11159) que usaremos como backbone (Figura 16 A). Estos plásmidos fueron digeridos con las enzimas de restricción EcoRI y XhoI (Takara, 1040A, 1094A respectivamente) y, posteriormente, purificamos las regiones que contenían Acvr1h-CA y BMPR1B-CA mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 1% (Pronadisa, 8012) y el kit NZYGelpure (Nzytech, MB01101). De la misma manera digerimos el plásmido pCAG-IRES-GFP con EcoRI y XhoI (Takara, 1040A, 1094A respectivamente) para después purificar el backbone resultante que consta de la región IRES-GFP. Tras lo cual, ligamos Acvr1-CA y BMPR1B-CA al vector pCAG-IRES-GFP con una proporción 4/1 (inserto/vector) y una T4 DNA ligasa (Takara, 2011A), generando así dos plásmidos: pCAG-Acvr1-IRES-GFP y pCAG-BMPR1B-IRES-GFP (Figura 16 B). Para ambos casos, se transformaron bacterias competentes XL1Blue (Stratagene, #200249) con los plásmidos obtenidos siguiendo un protocolo de Heat Shock: incubamos las bacterias competentes con los plásmidos durante 30 minutos en hielo, incubamos a 42C durante 45 segundos (heat shock), incubamos 5 minutos en hielo, incubamos a 37C durante 45 minutos en medio Luria Broth (LB) (Pronadisa). Posteriormente, las bacterias transformadas fueron

seleccionadas creciéndolas en placas de LB-agar con ampicilina (Apolo, BIA0104) overnight. Se hizo un precultivo de aquellas colonias seleccionadas por la ampicilina y se comprobó mediante una miniprep. y ensayos de restricción que los plásmidos transformados eran los correctos. Una vez comprobada la secuencia de nuestros constructos procedimos a realizar una maxiprep endo-free siguiendo los pasos del kit comercial EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen, 12362).

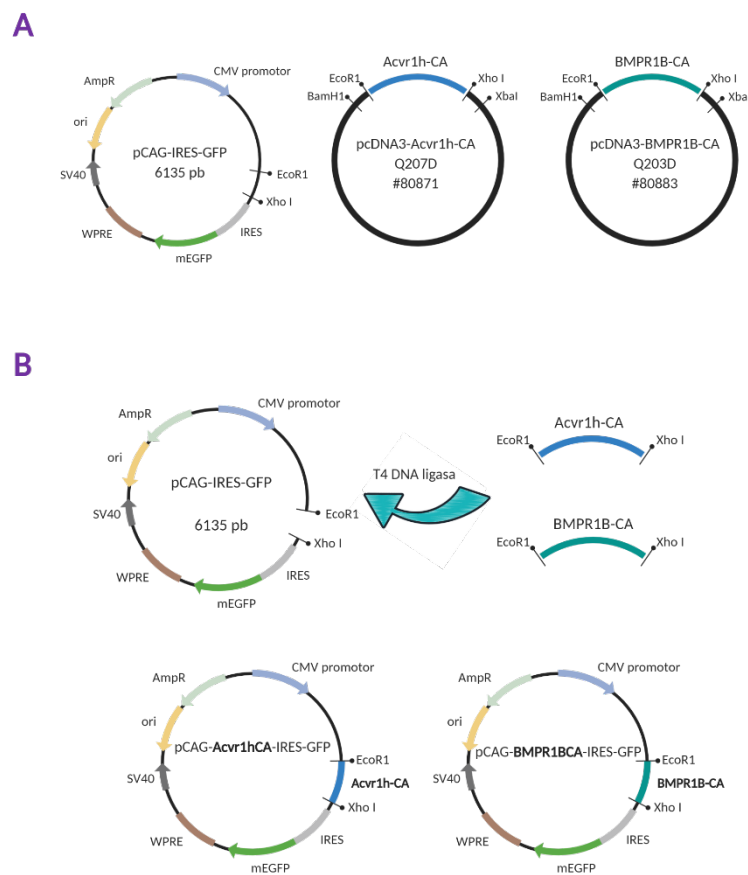


Figura 16. Generación de los plásmidos IRES GFP.

(A) Se procedió a digerir tanto los plásmidos que portan las construcciones constitutivas activas de los receptores de BMPs de tipo I Acvr1h-CA y BMPR1B-CA, como el vector pCAG-IRES-GFP con las enzimas de restricción EcoR1 y Xho1. De esta manera, y tras su purificación, obtuvimos los insertos y vector de interés para nuestro experimento. (B) Posteriormente, procedimos a ligar inserto y vector con una T4 DNA ligasa y manteniendo una proporción 4/1 (inserto/vector). De esta forma generamos dos plásmidos que portan las formas constitutivas activas de los receptores tipo I de las BMPs seguidas de un IRES y GFP (pCAG-AcvrhCA-IRES-GFP y pCAG-BMPR1BCA-IRES-GFP respectivamente). Estas construcciones serán utilizadas en los experimentos de electroporación *in vivo* posteriores.

3.2.4. Electroporaciones *in vivo*.

Se siguió el procedimiento descrito por Ito H. *et al.* (Ito H. *et al.*, 2014). Se anestesiaron animales Crl:CD1 neonatos (P0) mediante hipotermia (3 min en hielo) y se fijaron con cinta adhesiva a un soporte. Con un capilar de vidrio estirado fijado a un soporte estereotáctico se atravesaron la piel y el cráneo hasta que dicho capilar quedó posicionado en el interior del ventrículo lateral izquierdo (Figura 16 A). Se inyectó 1 μ l de ADN (2 μ g/ μ l) disuelto en PBS/FastGreen 0.25% y empleamos tres tipos de construcciones: pCAG-IRES-GFP, pCAG-Acvr1-IRES-GFP y pCAG-BMP1B-IRES-GFP. Si la inyección ha sido correcta se puede ver el ventrículo teñido de verde situando una luz intensa detrás del animal. Cuando así fue, se procedió a la electroporación (Figura 16 B); en caso contrario, se sacrificó el animal mediante decapitación. Para la electroporación se sometió el animal a 5 pulsos de 50 mseg y 140 volt cada uno con electrodos en forma de pinza. Todo el proceso se realiza en frío. Inmediatamente se reanimó al animal sobre una placa calefactora a 37°C, se identificó mediante el corte del extremo de una falange y se devolvió a la jaula junto a la madre y resto de camada donde permaneció durante 21 días, momento en el cual se procedió a la perfusión del mismo y al procesado del tejido (Figura 16 C). Se realizó una supervisión diaria de las crías electroporadas durante la primera semana tras el experimento. Este procedimiento fue realizado por la Dra. Carme Cucarella, del Servicio de Transgénesis, Instituto de Biomedicina de Valencia, CSIC.

3.2.5. Inmunohistoquímica.

Todos los animales fueron perfundidos, en primer lugar, con 0,9% Cloruro Sódico (Panreac, 131659.1211) para eliminar la mayor cantidad de sangre posible del sistema circulatorio; en segundo lugar, con paraformaldehído (Panreac, 141451.1211) al 4% para fijar los tejidos. Una vez extraídos los cerebros, estos fueron post fijados overnight con 4% paraformaldehído (Panreac, 141451.1211). Las muestras fueron embebidas en O.C.T. (Optimal Cutting Temperature Embedding Medium, Tissue-Tek, 2021/01) y congeladas a -80°C durante un mínimo de 24 horas.

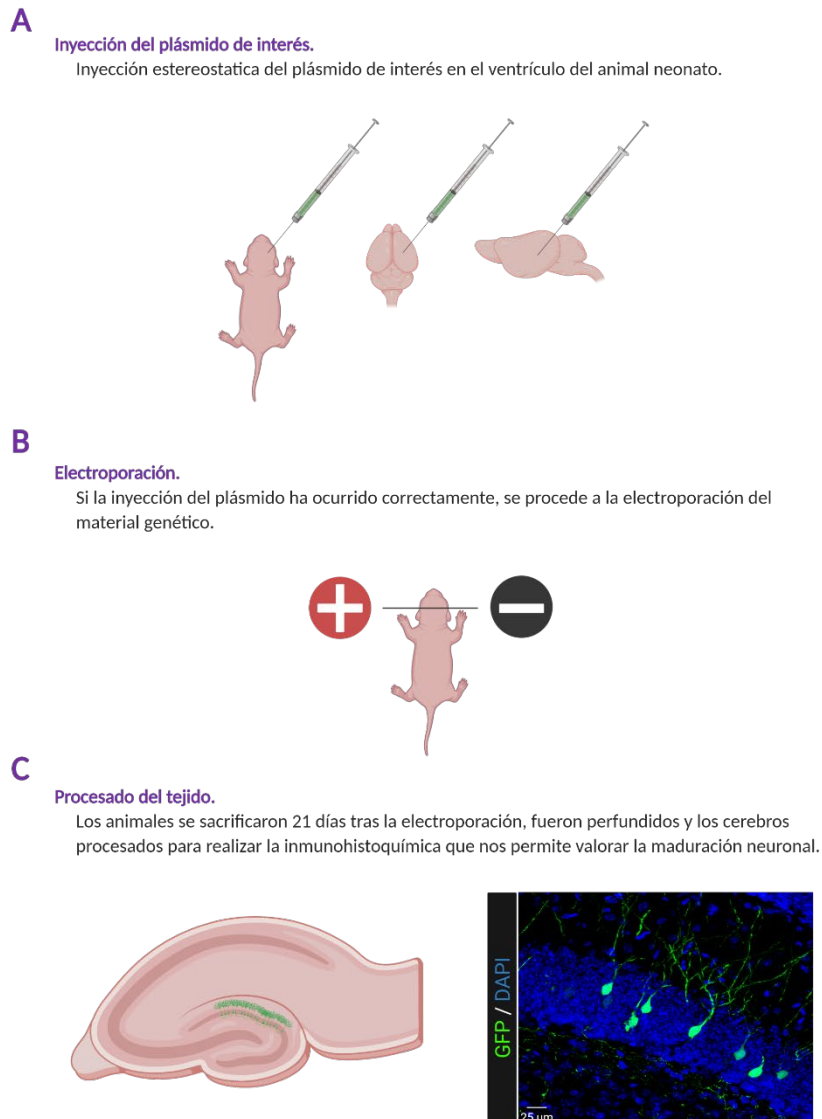


Figura 17. Electroporaciones *in vivo*.

(A) Se inyectan los plásmidos de interés (pCAG-IRES-GFP, pCAG-Acvr1-IRES-GFP y pCAG-BMP1B-IRES-GFP) en el ventrículo de uno de los hemisferios de animales Cr1:CD1 neonatos (P0). (B) Si la inyección del material ha sido correcta se procede a la electroporación. El animal es sometido a 5 pulso de 50 msec y 140 vol. En la posición adecuada para que se electroporen las células del giro dentado, tal y como se describe en Ito H. *et al.* (Ito H. *et al.*, 2014). (C) Una vez acabado el proceso de electroporación, los cerebros son procesados (fijados, congelados y cortados) y se realiza una inmunohistoquímica frente a GFP, y posterior análisis de Sholl para evaluar el grado de madurez de las neuronas generadas.

Los cerebros fueron cortados empleando un criostato CM1900 (Leica) a un grosor de 30 μm y montadas en portaobjetos rectangulares (Dentalab, D100004) previamente

gelatinizados (Panreac, 141341). Todas las muestras fueron bloqueadas durante 1 hora con una solución de bloqueo que consta de: 10% de suero fetal bovino (Corning, 35-079-cv) y 0,2% de Triton-X100 (ThermoScientific, 93443) en tampón 0,1M PB. Se incubó durante toda la noche con los anticuerpos primarios y 1 hora con los anticuerpos secundarios correspondientes (Tabla 1, Tabla 2): Monoclonal Anti-Neuronal Class III β -Tubulin (TuJ1) 1:250 (Covance, mms-435p), Rabbit Anti-GFP (Abcam, ab290), Laminin Antibody 1:1000 (Novus, NB300-144SS), Cy3 Goat anti-Mouse 1:2000 (Jackson ImmunoResearch, 115-166-062), Alexa 488 Donkey anti-Rabbit 1:500 (Jackson ImmunoResearch, 711-546-152). Todo el análisis de imagen se hizo con un microscopio confocal TCS SP8 (Leica).

3.2.6. Análisis de las características morfológicas de las neuronas generadas *in vivo*.

El análisis de Sholl realizado para las neuronas generadas *in vivo* se hizo siguiendo los mismos parámetros que el realizado para las neuronas *in vitro* (Apartado 3.1.8.1). La determinación del número de End Points, de la longitud de las dendritas primarias y secundarias y del perímetro y área del soma se realizaron siguiendo el mismo protocolo (Apartados 3.1.8.2, 3.1.8.3, 3.1.8.4). Cabe destacar que las neuronas generadas *in vitro* a partir de AH-NSPCs pueden tener más de una dendrita primaria, mientras que las neuronas hipocampales encontradas *in vivo*, debido a que están muy polarizadas, en condiciones normales solo presentan una única dendrita primarias (Figura 18 A, C, D, E, F, G).

3.2.6.1. Distancia Dendrítica Apical.

Para medir la longitud dendrítica apical utilizamos el software informático FIJI. Esta distancia, hace referencia a la longitud de la dendrita primaria desde que nace del soma hasta que sale de la zona subgranular del hipocampo y se ramifica por primera vez (Figura 18 H).

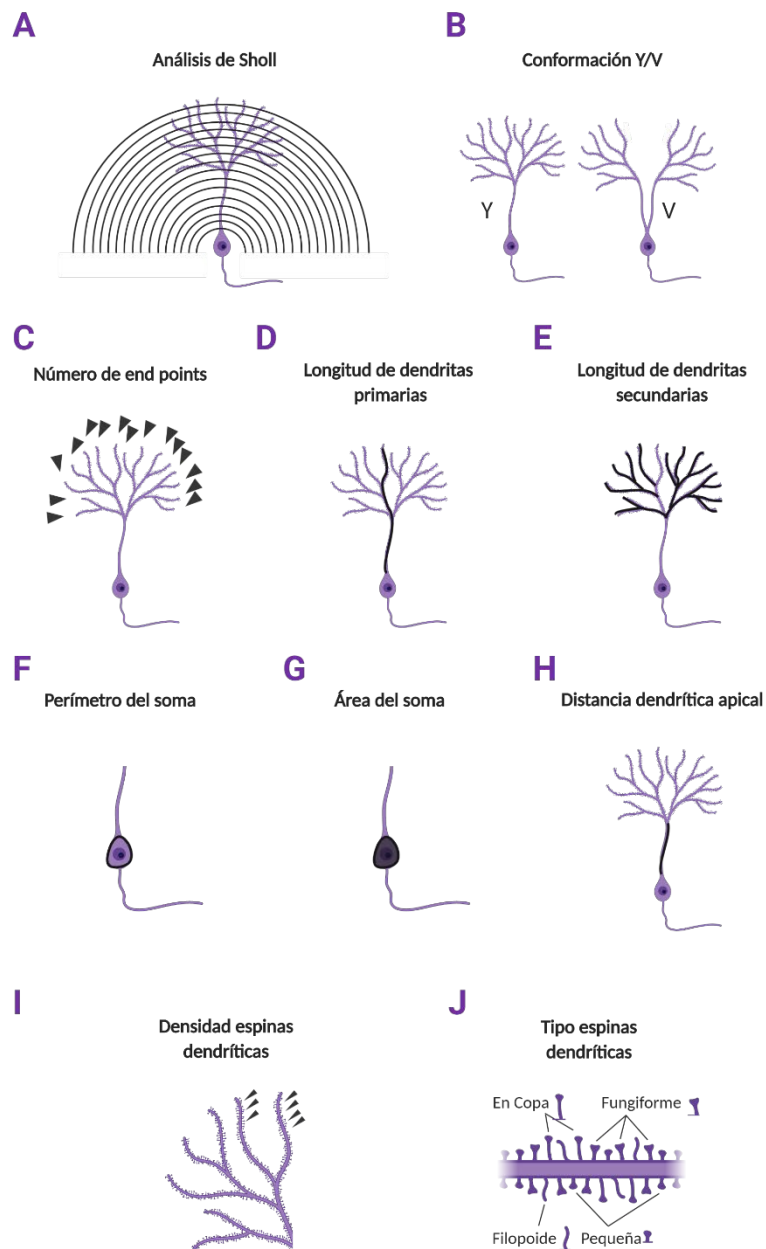


Figura 18. Características morfológicas de las neuronas generadas *in vivo*.

(A) Representación gráfica de un análisis de Sholl de una neurona *in vivo*. Se superpone a la neurona una serie de círculos concéntricos centrados en el soma de la neurona y se cuantifica el número de cortes de las dendritas de la neurona con dichos círculos. (B) Representación gráfica de las dos conformaciones (Y/V) que pueden adoptar las neuronas *in vivo*. Cabe destacar que en condiciones fisiológicas normales la conformación en Y es la predominante. La conformación en V solo se ha observado en condiciones patológicas. Representación gráfica del número de puntos finales (End Points) (C), de la longitud de la dendrita primaria (D), de la longitud de las dendritas secundarias (E) y del perímetro (F) y área del soma (G). (H) Ejemplo gráfico del cálculo de la distancia dendrítica apical, de la densidad de espinas dendríticas

(I) y de los tipos de espinas (J) que se pueden encontrar en la superficie de las dendritas neuronales, siendo las espinas fungiformes el tipo de espina más maduro.

3.2.6.2. *Conformación en “Y” o “V”.*

Las neuronas de la zona subgranular del hipocampo se clasifican en los morfotipos “V” o “Y”. En condiciones fisiológicas, dichas neuronas presentan una única dendrita primaria que se alarga hasta llegar a la capa molecular donde se ramifica. Este tipo de estructura es la que se conoce como morfotipo o conformación en Y. Sin embargo, en condiciones patológicas, este tipo de conformación puede cambiar, ya sea por la aparición de otras dendritas primarias o por el acortamiento de la dendrítica apical, dando lugar a lo que se conoce como conformación en V (Figura 18 B).

3.2.6.3. *Densidad y tipo de las espinas dendríticas.*

Para el cálculo de la densidad de las espinas en los ensayos de maduración se tomaron fotografías de nuestras muestras en un microscopio confocal TCS SP8 (Leica), a un aumento de 63X, con una amplitud numérica de 1,4 y un zoom digital de 3X. Se tomaron fragmentos de 100µm de tamaño de las neuronas fotografiadas, y se procedió a contar el número de espinas presentes en dichos fragmentos con la herramienta ‘counter’ del software informático FIJI (Figura 18 I). Para el cálculo de las espinas de tipo fungiforme se procedió a medir el diámetro mayor y menor de cada espina, y se consideró fungiforme toda aquella espina que presentaba una superficie superior a 0,4 µm² tras aplicar la fórmula ($= \pi \times D_{\text{mayor}} \times D_{\text{menor}}/4$) (Zhao *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2014) (Figura 18 J).

3.3. *Análisis Estadísticos.*

Para el análisis estadístico de los datos, se empleó el programa informático SPSS. Se verificó la distribución normal de los datos mediante un test Kolmogorov-Smirnov y se analizaron los outlayers con un diagrama de tallo-hojas, y se efectuaron distintos tests paramétricos según el caso. La hipótesis nula fue que la media de la variable estudiada fuese la misma en los diferentes grupos.

Las significancias de las diferencias entre las medias para los siguientes ensayos fueron calculadas por medio de una ANOVA de una vía, usando el test de Tukey como comparación post-hoc: patrones de expresión génica de los distintos receptores de tipo I y II de las BMPs durante el proceso de diferenciación neuronal (Figura 20, 21), curva dosis respuesta para la diferenciación con las proteínas BMP2/4 (Figura 22 A), curva dosis respuesta para la diferenciación con la proteína WNT3A (Figura 27 A), expansión de AH-NSPCs CD1 en presencia de BMP6 (Figura 50 B), aumento de la BMP6 sistémica en animales SAMP8 y SAMR1 (Figura 58 D, E). Para calcular la significancia del efecto sinérgico entre las proteínas BMP2/4 y WNT3A (Figura 28 A, B) usamos un análisis ANOVA de dos vías de los porcentajes de las neuronas.

La significancia del resto de los ensayos fue calculada utilizando una prueba T pareada de dos colas: linajes neurales inducidos por ácido retinoico y forskolina (Figura 20 A), dosis respuesta BMP2/4 (Figura 22 C), linajes neurales inducidos por BMP2/4 (Figura 23 A), estimulación con BMP2/4 (Figura 24 B, C), señalización vía canónica de las BMPs (Figura 25 D), inhibición de las rutas de señalización (Figura 26 A), inducción de la neurogénesis con WNT3A (Figura 27 C, E, F), inhibición de la ruta canónica de las WNTs (Figura 28 D), expresión de *Lef1* (Figura 29 A), efecto madurativo de las proteínas BMPs (Figura 31 A, B, C, D, E), análisis morfológico del número y longitud de las neuritas (Figura 32 A, B, C, E, F), maduración neuronal con concentraciones crecientes de BMP6 (Figura 33 B), inhibición del receptor tipo II BMPR2 (Figura 34 B), inhibición de los receptores tipo I (Figura 35 B, C, E), ensayo madurativo inhibiendo el receptor ACVR1 (Figura 37 B, C, D), sobreexpresión de las formas constitutivamente activas de los receptores tipo I (Figura 39), análisis morfológico tras la sobreexpresión de las formas constitutivamente activas de los receptores tipo I (Figura 40), inhibición química de las rutas de señalización de las BMPs (Figura 41 B, C), inhibición de intermediarios (Figura 42), análisis morfológico tras la inhibición química de las rutas de señalización (Figura 43), electroporaciones *in vivo* (Figura 44 B, C), análisis de las características morfológicas de las neuronas *in vivo* (Figura 45), migración neuronal (Figura 46), espinas dendríticas (Figura 47), salida de ciclo celular por BMP6 (Figura 49 D), expresión de BMP en SAMP8 (Figura 51 C, D), tasa de crecimiento de SAMP8 y SAMR1 (Figura 52), proliferación de SAMP8 y SAMR1 (Figura 53 A), respuesta a un estímulo de BMP6 (Figura 54 A, B, D), la

microglía no expresa más BMP6 (Figura 55 C), aumento de BMP6 sistémica en animales Crl:CD1 (Figura 56 A, B) y aumento de la BMP6 sistémica en animales SAMP8 y SAMR1 (Figura 57 D, E).

Para las figuras representadas en fold (Figura 55, 56, 57) se empleó la prueba T de una muestra (one Sample T test).

Todos los valores corresponden a la media \pm sem, y fueron considerados significativos aquellos con un p valor inferior a 0,05 ($*p<0,05$; $**p<0,01$; $***p<0,001$). Para el análisis estadístico de los datos en porcentaje se realizó la transformación matemática Arcsen.

3.4. Ilustraciones gráficas.

Todas las ilustraciones y figuras presentes en esta tesis doctoral se han realizado utilizando el programa informático Graphpad Prism 8, así como los recursos proporcionados por el sitio web Biorender (<http://www.biorender.com>).

Tabla 1. Anticuerpos primarios.

Anticuerpos Primarios		
Nombre	Referencia	Concentración uso
β-actin antibody	Sigma-Aldrich, a5441	1:5000
Anti-BMPR2 antibody [1F12]	Abcam, ab130206	1:1000
Goat Anti-Doublecortin (C-18)	Santa Cruz Biotechnology, sc8066	1:200
Monoclonal Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein	Sigma-Aldrich, g3893	1:300
Polyclonal Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein	Dako, z0334	1:300
Rabbit Anti-GFP	Abcam, ab290	1/250
Monoclonal anti-ID1 (B-8)	Santa Cruz Biotechnology, sc133104	1:100
Rabbit monoclonal anti-Ki67	Thermo Scientific, RM- 9106	1:50
Laminin antibody	NB300-144SS	1:1000
Anti-LEF1 antibody	Abcam, ab85052	1:500
Monoclonal Anti-MAP2 (2a+2b) clone AP-20	Sigma-Aldrich, M1406	1:300
Anti-Myelin Basic Protein	Abcam, ab2404	1:40
Monoclonal Anti-Nestin [Rat-401]	Abcam, ab11306	1:500
Monoclonal Anti-O4	Sigma-Aldrich, MAB345	1:150
Phospho-LRP6 (Ser1590) antibody	Cell Signalling, #2568	1:300
Phospho-Smad1/Smad5/Smad8 Antibody	Cell Signalling, #13820	1:1000
Phospho-Smad1/Smad5/Smad8 Antibody	Cell Signalling, #9511	1:1000
Smad1/5/8 (N-18)-R antibody	Santa Cruz Biotechnology, sc-6031-r	1:500
SMAD4 Antibody (H-552)	Santa Cruz Biotechnology, sc-7154	
Polyclonal Goat Anti-SOX2	R&D Systems, af2018	1:300
Monoclonal Anti-Neuronal Class III β-Tubulin (TuJ1)	Covance, mms-435p	1:250

Tabla 2. Anticuerpos secundarios.

Anticuerpos Secundarios		
Nombre	Referencia	Concentración uso
Alexa 488 Donkey anti-Rabbit	Jackson ImmunoResearch, 711-546-152	1:500
Biotinylated Donkey Horse anti-Goat	Vector Laboratories, BA-9500	1:200
Cy3 Donkey anti-Rabbit	Jackson ImmunoResearch, 711-165-152	1:2000
Cy3 Goat anti-Mouse	Jackson ImmunoResearch, 115-166-062	1:2000
Cy2 Streptavidin	Jackson ImmunoResearch, 016-220-084	1:100
Cy3 Streptavidin	Jackson ImmunoResearch, 016-160-084	1:100
Cy5 Streptavidin	Jackson ImmunoResearch, 016-170-084	1:100
Donkey anti-Rabbit ECL	Amersham, na934	1:50000
Sheep anti-Mouse ECL	Amersham, na931	1:50000
Donkey anti-Goat HRP	Santa Cruz Biotechnology, Sc-2020	1:10000

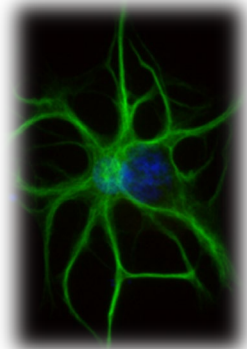
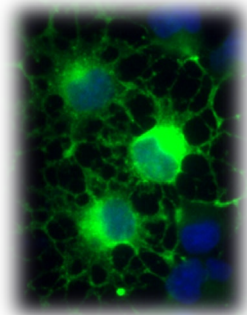
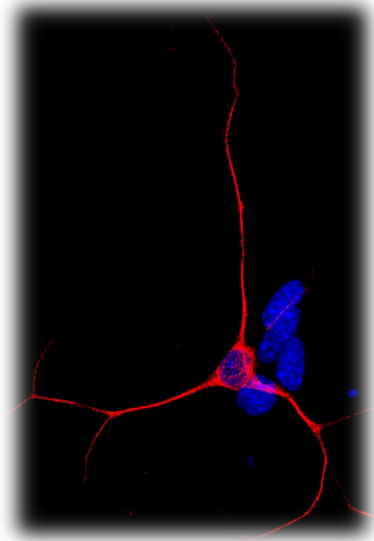
Tabla 3. Cebadores.

Cebadores	
Gen	Secuencia 5' > 3'
<i>Acvr1</i>	F-CTCCGGTCTTCCTTCTGGT; R-GCTGCCCTCCATACTTCTCC
<i>Acvr2a</i>	F-CCATGGCTAGAGGATTGGCAT; R-CCAAAGTCAGCAATGCAAGCT
<i>Acvr2b</i>	F-AAGCAGTCGTGGCAGAGTGA; R-CCCCTTGAGGTAATCCGTGA
<i>Axin2</i>	F-GCTATGTCTTTCACCAGCCA; R-CTTGGCCATTGGCCTTCAC
<i>Bmp4</i>	F-CCTTCCAGCAAGTTTGTCAAG; R-TTGGCATAATAAAACGACCATCAG
<i>Bmp6</i>	F-TGGTGGAGTACGACAAGGAGTTC; R-AGAGTCTCTGTGCTGATGCTCCT
<i>Bmpr1a</i>	F-GAACAGGATGAAGCATTATTCCAGT; R-CATCTGAATCTGTTTGGCAATAGTTC
<i>Bmpr1b</i>	F-GAACATTCTGGGGTTCATTGC; R-CTTGGCATCTAAGGTGGTGGA
<i>Bmpr2</i>	F-GAGTGCCTTTGATGGAACATGAC; R-GCAAGAGCTTACCCAATCACTTGT
<i>Id1</i>	F-ACGGCGAGATCAGTGCCTT; R-CCTCCTGAAGGGCTGGAGTC
<i>Lef1</i>	F-GATCCCACCCGTACACATC; R-AGGTGGGGTGATCTGTCCAAC
<i>Lef1P</i>	F-GCGAAAGGGAAGGAAAGAAGC; R-GTTCAAGAAGGCTCCGTTTGC
<i>Nes</i>	F-AAGTCCAGCTGGCTGTGGA; R-TCTTGAGGTGTGCCAGTTGCT
<i>Sdha</i>	F-AGAGGACAACCTGGAGATGGCATT; R-AACTTGAGGCTCTGTCCACCAA
<i>TubβIII</i>	F-GAGGCCTCCTCTCACAAGTATGTG; R-CCTTGGCCAGTTGTTGC

Tabla 4. Ligandos empleados en cultivos celulares.

Ligandos	
Nombre	Referencia
AR, Ácido Retinoico	302-79-4, Sigma-Aldrich
BMP2	120-02, PeproTech
BMP4	120-05ET, PeproTech
BMP5	120-39, PeproTech
BMP6	120-06, PeproTech
BMP7	120-03, PeproTech
EGF	315-09, PeproTech
FGF-2	100-18B, PeproTech
FSK, Forskolina	F6886, Sigma-Aldrich
WNT3A	3008-WN, R&DSystem

Resultados
Capítulo 1



4.1. Los ligandos y receptores de la familia de las BMPs se expresan en el giro dentado del hipocampo.

Quisimos comenzar nuestro trabajo analizando los distintos ligandos y receptores que forman parte de la familia de las BMPs, así como su expresión en el hipocampo. Para ello empezamos realizando un estudio filogenético basado en la secuencia proteica de los ligandos, utilizamos el programa informático 'Aliview' para generar un árbol filogenético que nos muestra las similitudes entre los ligandos. Así pues, empleamos las secuencias tanto de los péptidos maduros como de la forma no madura (pro-proteína) de éstos, y pudimos observar que cuando generamos un árbol con las secuencias de los péptidos maduros estos se agrupan de manera muy similar a la subdivisión estructural basada en la afinidad de los ligandos por sus receptores (Figura 19, B).

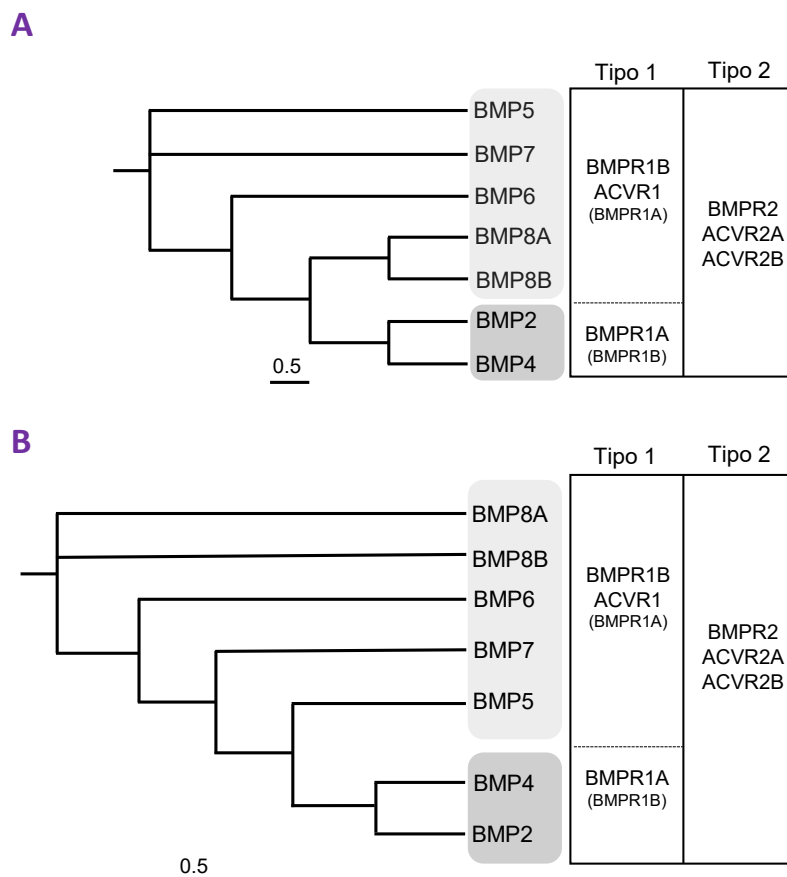


Figura 19. Árboles filogenéticos.

Árboles filogenéticos mostrando las distancias entre cada una de las proteínas BMPs, tanto en su forma inmadura (pre-proteína) (A), como en su forma madura (B). Los árboles filogenéticos fueron generados utilizando el programa informático de alineamiento 'AliView'. En la figura también se muestra la preferencia de cada proteína BMP por el receptor de tipo I y II correspondiente.

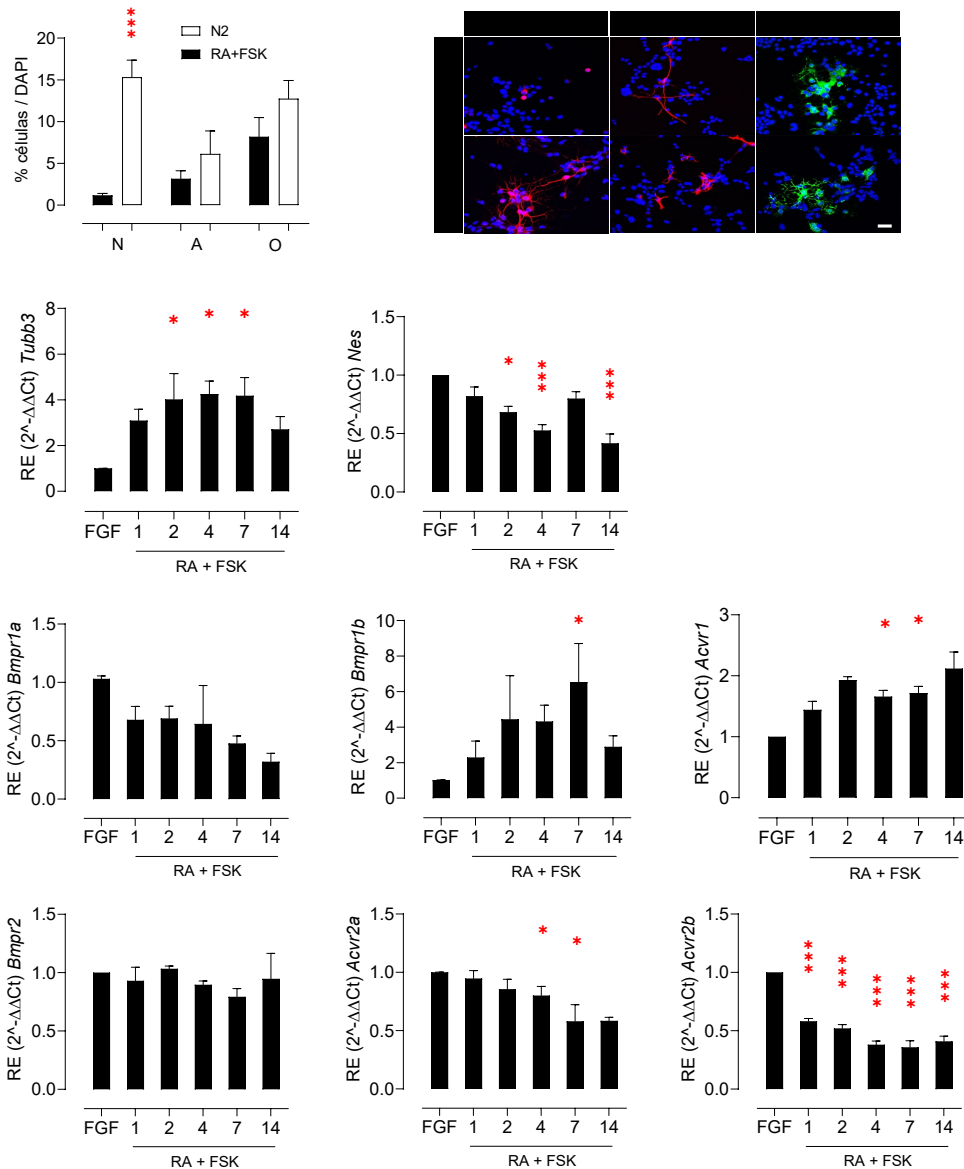


Figura 20. Patrones de expresión de los receptores tipo I y II a lo largo del proceso de diferenciación (*Sdha*). (A) Resultado de la diferenciación de las células hipocámpales de rata (AH-NSPC) en medio control (N2) o medio N2 suplementado con Ácido Retinoico (RA, 1 μ M) y Forskolina (FSK, 5 μ M) durante 4 días *in vitro* (DIV). El porcentaje de neuronas (N), astrocytos (A) y oligodendrocitos (O) fue analizado por inmunocitoquímica frente a los marcadores para β III-tubulina (Tuj1), Proteína Ácida Fibrilar de la Glía (GFAP) y Proteína Básica de Mielina (MBP) respectivamente. Los datos corresponden a la media \pm sem de n=3, el análisis estadístico corresponde a una Ttest de dos colas: ***P<0,001. (B) Inmunofluorescencia mostrando células positivas para Tuj1, GFAP y MBP tras suplementar el medio con Ácido Retinoico (RA, 1 μ M) y Forskolina (FSK, 5 μ M) durante 4 días *in vitro* (DIV). (C-I) Patrones de expresión relativa (RE) durante el proceso de diferenciación para *Tubb3* (C), *Nes* (D), *Bmpr1a* (E), *Bmpr1b* (F), *Acvr1* (G), *Bmpr2* (H), *Acvr2a* (I) y *Acvr2b* (J). Se utilizó *Sdha* como gen "housekeeping" y todos los datos fueron referidos a su correspondiente muestra en proliferación (FGF). Los datos corresponden a la media \pm sem de n=3 experimentos independientes analizados por el método 2 ^{$\Delta\Delta$ Ct} (ANOVA de una vía: *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001). Barra de escala en B, 25 μ m.

Sin embargo, al generar un árbol en función de las secuencias de los péptidos la subdivisión que se genera es completamente diferente a la anterior (Figura 19, A), aunque la agrupación de los ligandos BMP2 y BMP4 se conserva.

El siguiente paso de nuestro estudio fue el de caracterizar el patrón de expresión que tienen estos ligandos y receptores en el proceso de diferenciación in vitro de las células madre y progenitores hipocampales de adulto (AH-NSPCs). Para ello tratamos de AH-NSPCs aisladas de rata (Palmer TD. *et al.*, 1997) con ácido retinoico (RA) y forskolina

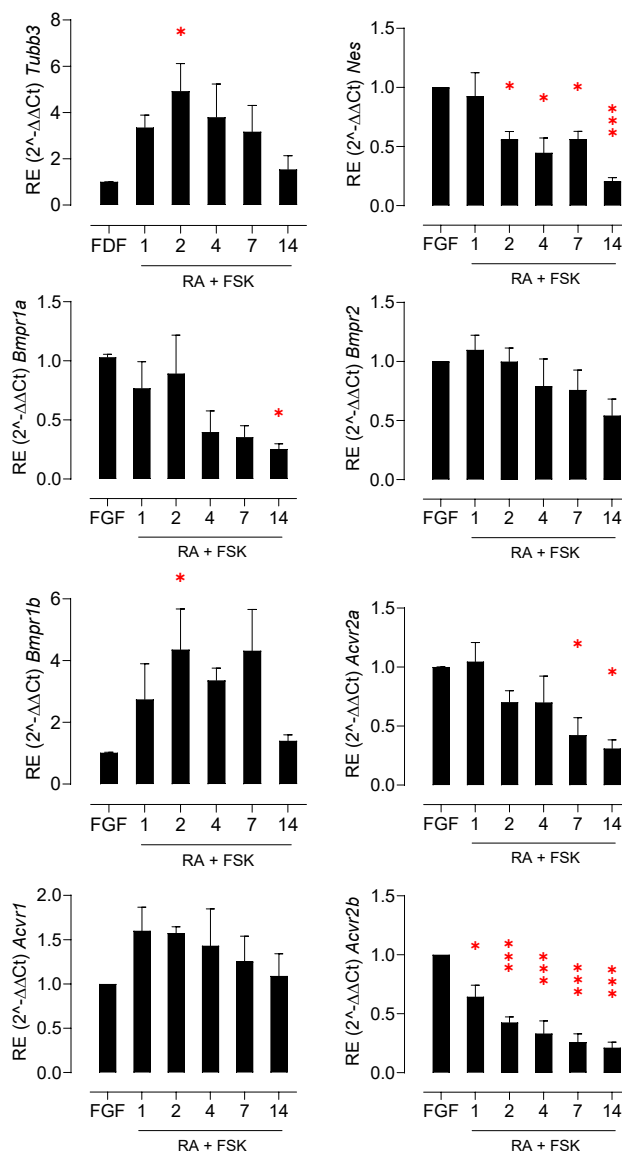


Figura 21. Patrones de expresión de los receptores tipo I y II a lo largo del proceso de diferenciación (*R18S*). (A-H) Patrones de expresión relativa (RE) durante el proceso de diferenciación para *Tubb3* (A), *Nestin* (B), *Bmpr1a* (C), *Bmpr1b* (D), *Acvr1* (E), *Bmpr2* (F), *Acvr2a* (G) y *Acvr2b* (H). Se utilizó *R18S* como gen “housekeeping” y todos los datos fueron referidos a su correspondiente muestra en proliferación (FGF). Los datos corresponden a la media±sem de n=3 experimentos independientes analizados por el método 2^{-ΔΔCt} (ANOVA de una vía: *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001).

(FSK), un tratamiento bien establecido que favorece la entrada en el proceso de diferenciación neuronal, durante 14 días *in vitro* (DIV) (Hsieh J. *et al.*, 2004).

En primer lugar, empleando marcadores específicos de neurona (marcador Tuj1, epítipo de la proteína del citoesqueleto β III-tubulina), oligodendrocito (marcador MBP, Proteína Básica de Mielina) y astrocito (marcador GFAP, Proteína Ácida Fibrilar de la Glía), comprobamos por inmunocitoquímica que conseguíamos aumentar el número de neuronas con el tratamiento con RA+FSK (Figura 20 A y B). Tras la extracción de RNA a distintos tiempos y generación del correspondiente cDNA, realizamos PCRs cuantitativas para analizar la expresión de los diferentes ligandos y receptores de la vía de las BMPs utilizando como gen de referencia o “housekeeping” el gen *Sdha* (Figura 20 C-I) y, posteriormente, *R18S* para corroborar los resultados (Figura 21 A-H). El incremento en la expresión de β III-tubulina (*Tubb3*), marcador del citoesqueleto neuronal, y la pérdida de la expresión de Nestina (*Nes*), marcador de filamentos intermedios característico de células madre y progenitores neurales inmaduros, nos confirma que hemos inducido correctamente el proceso de diferenciación neuronal en las AH-NSPCs (Figura 20 C, D). Nuestros resultados para los receptores de tipo I muestran un descenso en la expresión del receptor *Bmpr1a* conforme aumenta la diferenciación neuronal inducida *in vitro* por RA+FSK, así como un aumento de la expresión de los receptores *Acvr1* y *Bmpr1b* (Figura 20 E, F, G). Por otro lado, en el caso de los receptores de tipo II, la expresión de *Bmpr2* se mantiene constante a lo largo del proceso, mientras que la expresión de *Acvr2a* y *Acvr2b* disminuye (Figura 20 H, I, J). Así pues, todos estos resultados sugieren que los receptores *Bmpr1a*, *Bmpr2*, *Acvr2a* y *Acvr2b* tienen un papel temprano en el proceso de diferenciación neuronal, mientras que *Bmpr1b*, *Acvr1* y *Bmpr2* tienen un papel tardío.

4.2. Los ligandos BMP2 y BMP4 son pro-neurogénicos en AH-NSPCs *in vitro*.

Para continuar con nuestro estudio, y puesto que en el apartado anterior observamos que las células AH-NSPCs expresan una combinación de receptores de la vía de las BMPs durante el proceso de diferenciación neuronal, quisimos comprobar el efecto en diferenciación de varios ligandos de esta familia en las células hipocampales.

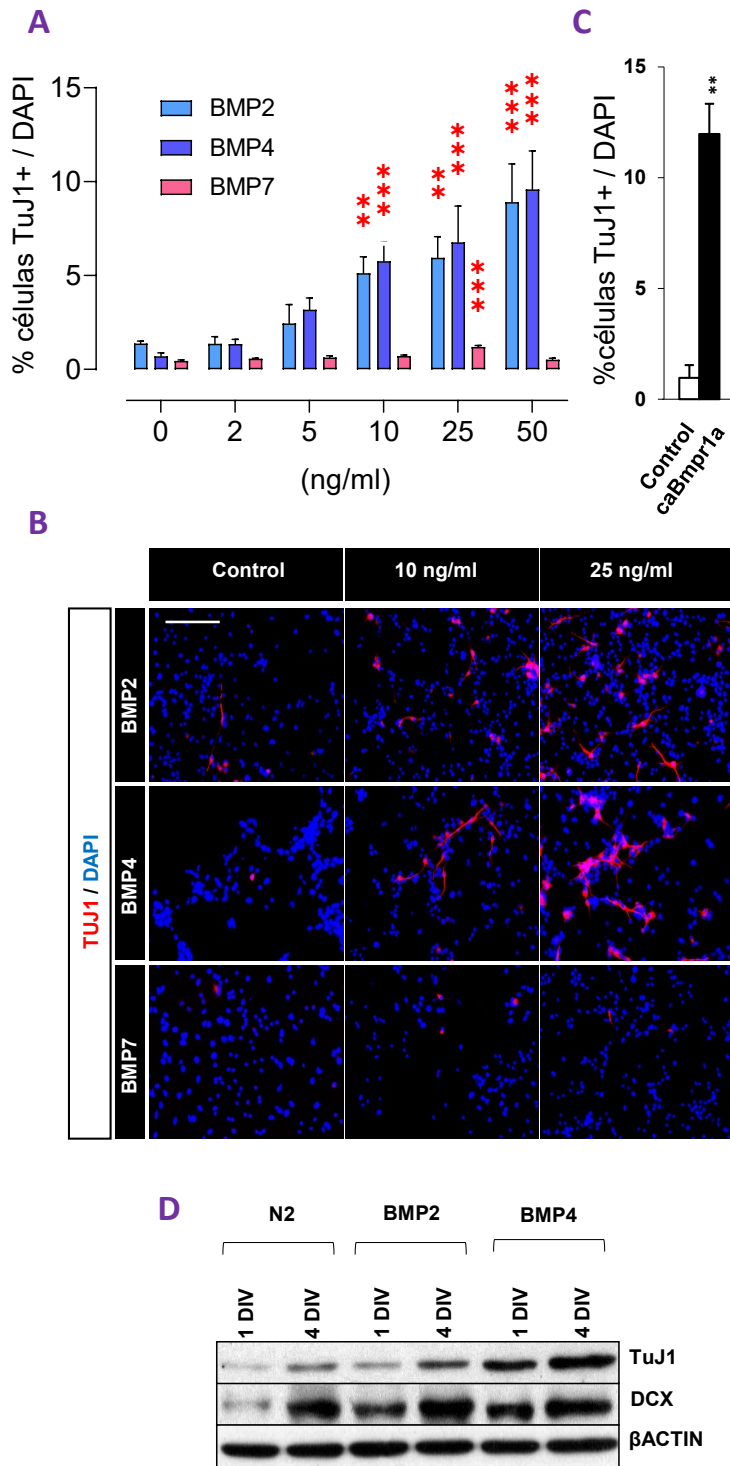


Figura 22. Efecto pro-neurogénico de las proteínas BMPs. BMP2, BMP4 y caBMPR1A aumentan la neurogénesis en AH-NSPCs. (A) Porcentaje de células positivas para β III-tubulina (TuJ1) frente al total de células (DAPI) en presencia de concentraciones crecientes de BMP2, BMP4 o BMP7. Los datos corresponden a la media \pm sem de $n=3$. (B) Panel de inmunofluorescencia mostrando ejemplos de las condiciones en A, se muestran los niveles de células positivas para TuJ1 (Rojo) y el número total de células marcadas con DAPI (Azul). (C) Porcentaje de células TuJ1 positivas del total diferenciadas de células hipocampales (AH-NSPCs) tras la infección con un vector retroviral que sobreexpresa la forma constitutivamente activa del receptor BMPR1A (caBMPR1A) o con un vector vacío como control. (D) Western-blot mostrando los niveles de proteína β III-Tubulina (TuJ1) y Doblecortina (DCX) de las AH-NSPCs tras la estimulación con 25 ng/ml de BMP2 o BMP4 durante 1 o 4 DIV. Los resultados muestran un incremento progresivo tanto de TuJ1 como de DCX con ambos ligandos, sugiriendo así que las proteínas BMP2 y BMP4 aumentan los niveles de maduración *in vitro*. Barra de escala en B, 100 μ m. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ ANOVA.

Con este fin, diseñamos unos experimentos en los que cultivamos durante 4 DIV las células en ausencia de mitógeno, pero en presencia de concentraciones crecientes de

los siguientes ligandos: por un lado, las proteínas recombinantes BMP2 y BMP4, pertenecientes a la subfamilia 'Dpp-like' de las BMPs y con mayor afinidad por el receptor de tipo I BMPR1A; y, por otro lado, la proteína recombinante BMP7, perteneciente a la familia '60A-like' y con afinidad preferente por los receptores de tipo I BMPR1B y ACVR1. Tras 4 DIV fijamos las células y medimos la diferenciación neuronal por inmunocitoquímica frente al marcador TuJ1. Los resultados observados para este experimento muestran cómo tanto la proteína BMP2 como BMP4 aumentan el número de células positivas para TuJ1, y este efecto es dependiente de la concentración de los ligandos (Figura 22 A, B). Sin embargo, no observamos ningún efecto con el ligando BMP7 (Figura 22 A, B). De la misma manera, observamos un aumento en las proteínas β III-tubulina y doblecortina (DCX) por Western blot (Figura 22 D). Todos estos experimentos apoyan la idea de que es la señalización a través del receptor de tipo I BMPR1A (inducida por sus ligandos preferentes, como BMP2 o BMP4) la encargada de

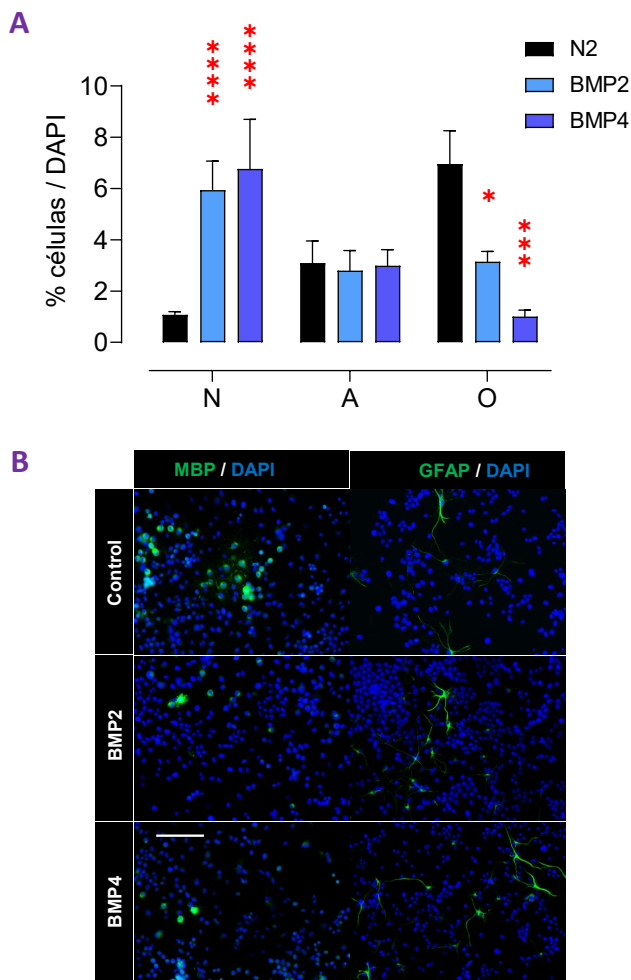


Figura 23. Linajes neurales inducidos por un estímulo de BMP2/4 en AH-NSPCs.

(A) Porcentaje de Neuronas (células positivas para β III-tubulina), Astrocitos (células positivas para GFAP) y Oligodendrocitos (células positivas para MBP) (N, Neuronas; A, Astrocitos; O, Oligodendrocitos) en ausencia (Control, N2) o presencia de 25 ng/ml de BMP2 o BMP4. (B) Representación gráfica de la inmunocitoquímica. El análisis de los linajes muestra un aumento del número de neuronas y un descenso de la cantidad de oligodendrocitos en presencia de las proteínas BMPs. Barra de escala en B, 100 μ m. (ANOVA de una vía: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$).

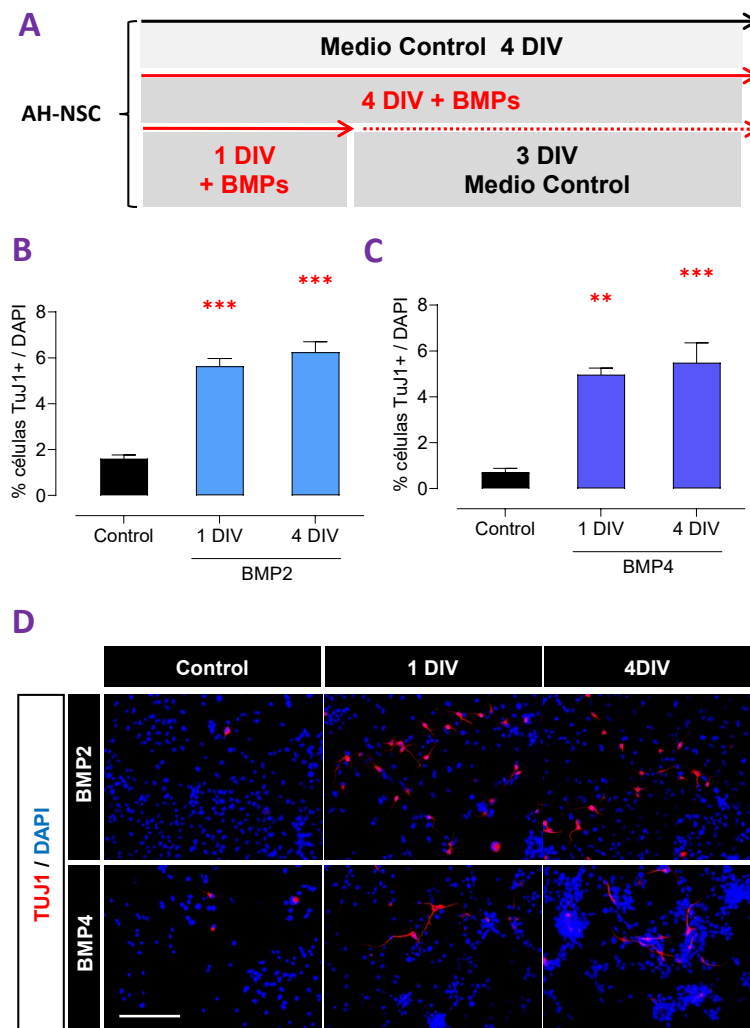


Figura 24. BMP2 y BMP4 inducen la diferenciación al linaje neuronal de las AH-NSPCs en las etapas iniciales del proceso de diferenciación.

(A) Esquema temporal del experimento diseñado. Estimulamos AH-NSPCs durante 1 DIV o 4 DIV con 10 ng/ml de BMP2 o BMP4. Fijamos las células a los 4 DIV y medimos el grado de diferenciación neuronal mediante una inmunocitoquímica frente a la proteína del citoesqueleto β III-Tubulina (Tuj1). (B, C) Porcentaje de células Tuj1 positivas tras estimular durante 1 DIV o 4 DIV con BMP2 (B) o BMP4 (C). Los datos corresponden a la media \pm sem de n=3 experimentos independientes. (D) Imágenes de inmunofluorescencia mostrando los niveles de células Tuj1 positivas (Rojo) y las células totales marcadas con DAPI (Azul) a 1 DIV y a tiempo final del experimento, 4 DIV. Barra de escala en D, 100 μ m. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ Ttest de dos colas.

inducir la adquisición del linaje neuronal, al menos, *in vitro*. Para apoyar estos datos, se transdujeron células AH-NSPCs con un vector retroviral que sobreexpresa la forma

constitutivamente activa (ca) del receptor BMPR1A y se observó que dicho tratamiento simula el mismo efecto pro-neurogénico generado por los ligandos BMP2 y BMP4 (Figura 4, C). Además, encontramos una reducción del número de oligodendrocitos en aquellos cultivos que habían sido tratados con BMP2 y BMP4 (Figura 22 A, B), sin embargo, no observamos ningún cambio en el número de astrocitos generados (Figura 22 A, B). Esto sugiere que las proteínas BMPs (BMP2/4) inducen el proceso de neurogénesis a la vez que inhiben la oligodendrogénesis, sin afectar la astrogliogénesis.

Teniendo en cuenta que el receptor de tipo I BMPR1A se expresa en un estado indiferenciado de las células hipocampales, y que su expresión disminuye conforme la célula entra en el proceso de diferenciación neuronal (Figura 20 E), quisimos comprobar la idea de si BMP2 y BMP4 actúan en una etapa muy temprana del proceso, especificando el linaje neuronal. Con este fin, diseñamos un experimento en el que pusimos a las células hipocampales AH-NSPCs en presencia de las proteínas BMP2 y BMP4 durante solo 1 DIV y, posteriormente, las seguimos cultivando hasta un total de 4 DIV en ausencia de dichos ligandos (Figura 24 A). Los resultados obtenidos muestran como aquellas células que han sido expuestas a BMP2/4 durante solo 1 DIV alcanzan los mismos niveles de diferenciación que aquellas que han sido expuestas a los ligandos constantemente, durante 4 DIV (Figura 24 B-D). Este experimento muestra como una breve exposición a los ligandos de las BMPs (BMP2/4) en las etapas iniciales del proceso de diferenciación es suficiente para inducir la adquisición del linaje neuronal.

4.3. BMP2 y BMP4 inducen el proceso de neurogénesis a través de la ruta canónica de las BMPs.

El siguiente paso en nuestro estudio fue el de intentar dilucidar qué vía de señalización de las BMPs está mediando esta respuesta en el proceso de diferenciación, pudiendo ser, por un lado, la vía canónica de las BMPs, mediada por las proteínas SMADs, o, por otro lado, la vía no canónica. Con ese fin, cultivamos AH-NSPCs en presencia de BMP2 o BMP4, y analizamos los niveles de SMAD1/5/8 fosforiladas (P-SMAD1/5/8) tanto por inmunocitoquímica como por Western blot (Figura 25 A, B, C), al igual que medimos por RT-PCR los niveles de expresión relativa del gen *Id1* (Figura 25

D), diana directa de las proteínas SMAD. Nuestros resultados muestran cómo tanto BMP2 como BMP4 aumentan los niveles y la translocación al núcleo de la forma fosforilada de las proteínas SMAD1/5/8 de manera transitoria, este aumento desaparece 24 horas después de la exposición a los ligandos (Figura 25 A, B, C). De la misma forma, observamos una sobre expresión de los niveles de *Id1* tras la estimulación con BMP2 o BMP4 (Figura 25 D). Estos resultados apuntan a que las proteínas BMP2 y BMP4 favorecen la diferenciación neuronal mediante la activación transitoria de la vía canónica y la fosforilación de las proteínas SMAD1/5/8.

Para corroborar los resultados obtenidos decidimos diseñar un bloque de experimentos basados en el uso de inhibidores químicos que afectan a diferentes componentes de las vías de señalización. Utilizamos Dorsomorphin Homolog 1 (DMH1)

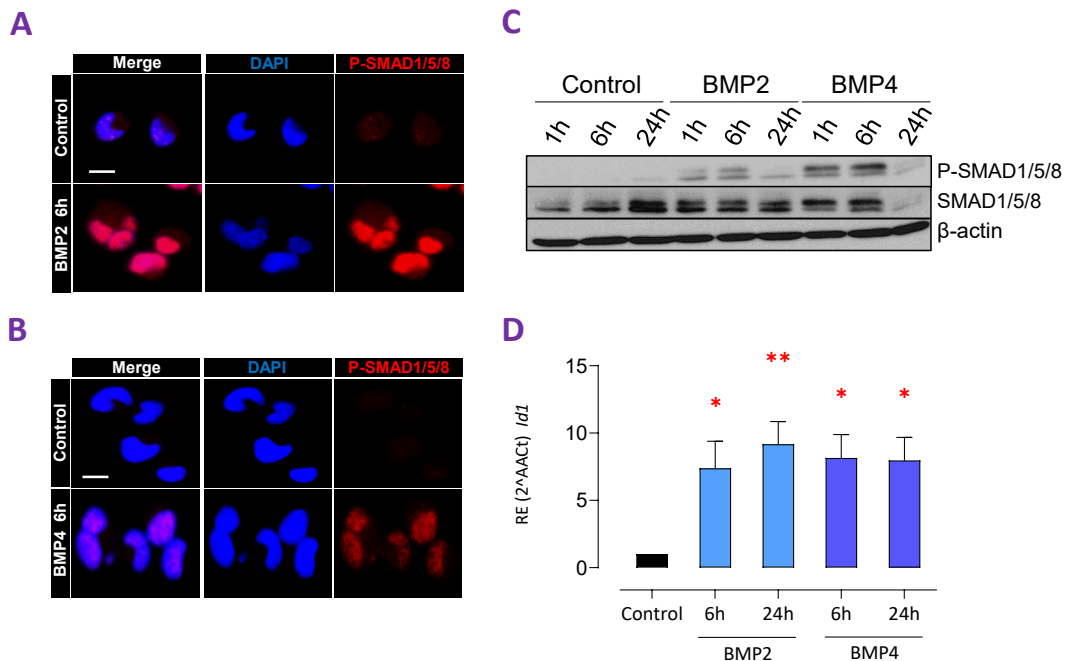


Figura 25. BMP2 y BMP4 inducen el proceso de neurogénesis mediante la activación de la vía canónica mediada por P-SMAD en las AH-NSPCs.

Inmunohistoquímica mostrando los niveles de la forma fosforilada de SMAD (P-SMAD1/5/8) tras estimular AH-NSPCs durante 6 horas con 25ng/ml de BMP2 (A) o BMP4 (B). (C) Western blot frente a la forma fosforilada de SMAD1/5/8 (P-SMAD1/5/8), utilizando SMAD1/5/8 total y β-actina como controles de carga. (D) Patrón de expresión relativa (RE) del gen *Id1* tras estimular AH-NSPCs con 25 ng/ml de BMP2 o BMP4 durante 6 o 24 horas. Barra escala en A y B, 10μm. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; Prueba T de dos colas.

que bloquea específicamente la señalización a través de la ruta canónica de las proteínas BMPs (Hao J. *et al*, 2010); LIM quinasa inhibidor (LIMKi), inhibidor específico de la quinasa LIMK, miembro de la cascada de señalización de la ruta no canónica de las BMPs (Scott RW. *et al*, 2010); así como SB203580, inhibidor específico de la MAP quinasa p38, otro miembro de la ruta no canónica de las proteínas BMPs (Cuenda A. *et al.*, 1995). Los resultados obtenidos muestran como al exponer las AH-NSPCs al inhibidor específico de la ruta canónica de las BMPs (DMH1) este impide que las células entren en el proceso de diferenciación dando lugar a un menor tanto por ciento de células positivas para el marcador neuronal del citoesqueleto Tuj1 ($9,13\pm 3,4$ frente a $2,64\pm 1,01$ en el caso de BMP2 y $26,89\pm 6,9$ frente a $2,49\pm 0,69$ en el caso de BMP4) (Figura 26 A).

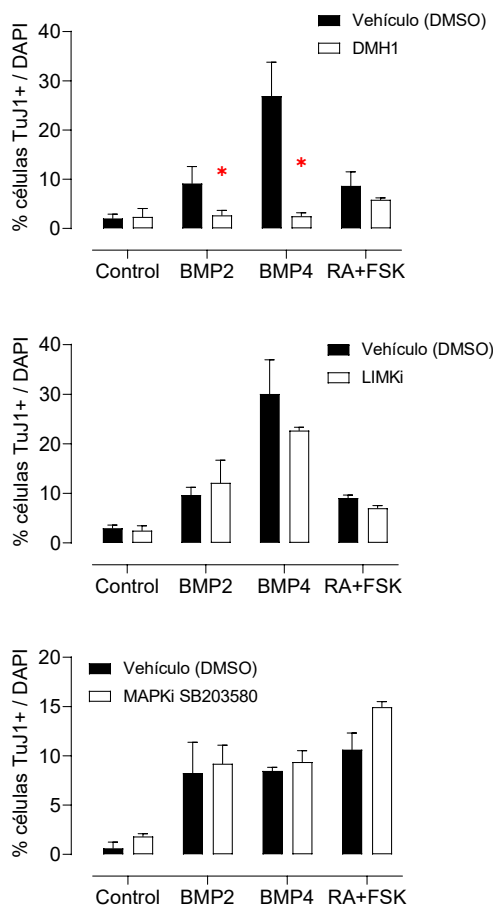


Figura 26. BMP2 y BMP4 inducen el proceso de neurogénesis mediante la activación de la vía canónica. Porcentaje de células positivas para Tubulina β III (Tuj1) cuando diferenciamos AH-NSPCs durante 4 días in vitro con 25 ng/ml de BMP2, BMP4 o con un tratamiento de Ácido Retinoico y Forskolina ($1\mu\text{M}/5\mu\text{M}$) y con la presencia de $10\mu\text{M}$ de DMH1 (dorsomorphin homolog 1) (A), $10\mu\text{M}$ de LIMKi (inhibidor de LIMK) (B) o $1\mu\text{M}$ de P38 MAPKi (SB203580, inhibidor de p38MAPK) (C). Puesto que los inhibidores se resuspendieron en DMSO como vehículo, en todos los casos se usó el mismo volumen de DMSO como control. Los datos corresponden a la media \pm sem de $n\geq 3$ experimentos independientes. * $P < 0,05$ por Ttest de dos colas.

Sin embargo, no observa una bajada significativa en la diferenciación neuronal de las células cuando las exponemos a ninguno de los inhibidores específicos de la ruta no canónica de las BMPs, LIMKi (Figura 26 B) o p38 MAPKi (Figura 26 C).

4.4. La señalización de BMP2 y BMP4 produce un efecto sinérgico con la señalización canónica de las proteínas WNT y ambas incrementan la neurogénesis.

Previamente se había descrito que la vía canónica de las proteínas WNT (mediada por β -catenina) regula el proceso de neurogénesis hipocampal adulta tanto *in vivo* como *in vitro* (Lie DC. *et al.*, 2005), y, concretamente, que WNT3 y WNT3A (dos ligandos de la familia con alta homología de secuencia de aminoácidos) mejoran el proceso de diferenciación neuronal. Los resultados obtenidos hasta este punto para las proteínas BMP2 y BMP4 en este bloque de experimentos eran muy similares a los obtenidos para la ruta de las WNT, por lo que quisimos comprobar si existía alguna interacción o punto en común entre ambas rutas de señalización.

Para ello, expusimos las AH-NSPCs a concentraciones crecientes de la proteína recombinante WNT3A y confirmamos que ésta incrementa los niveles de diferenciación neuronal a los 4 DIV, y que además este efecto es dependiente de la concentración a la que apliquemos el ligando (Figura 27 A). De la misma forma que en los experimentos anteriores, este efecto pro-neurogénico va acompañado de una disminución del número de oligodendrocitos en el cultivo (Figura 27 C). Además, comprobamos que este efecto es desencadenado por la ruta canónica de señalización, ya que podemos observar la fosforilación del receptor de membrana LRP6 (Figura 27 D) y la sobreexpresión de los genes *Axin2* (Figura 27 E) y *Lef1* (Figura 27 F), dianas de la vía canónica de WNT.

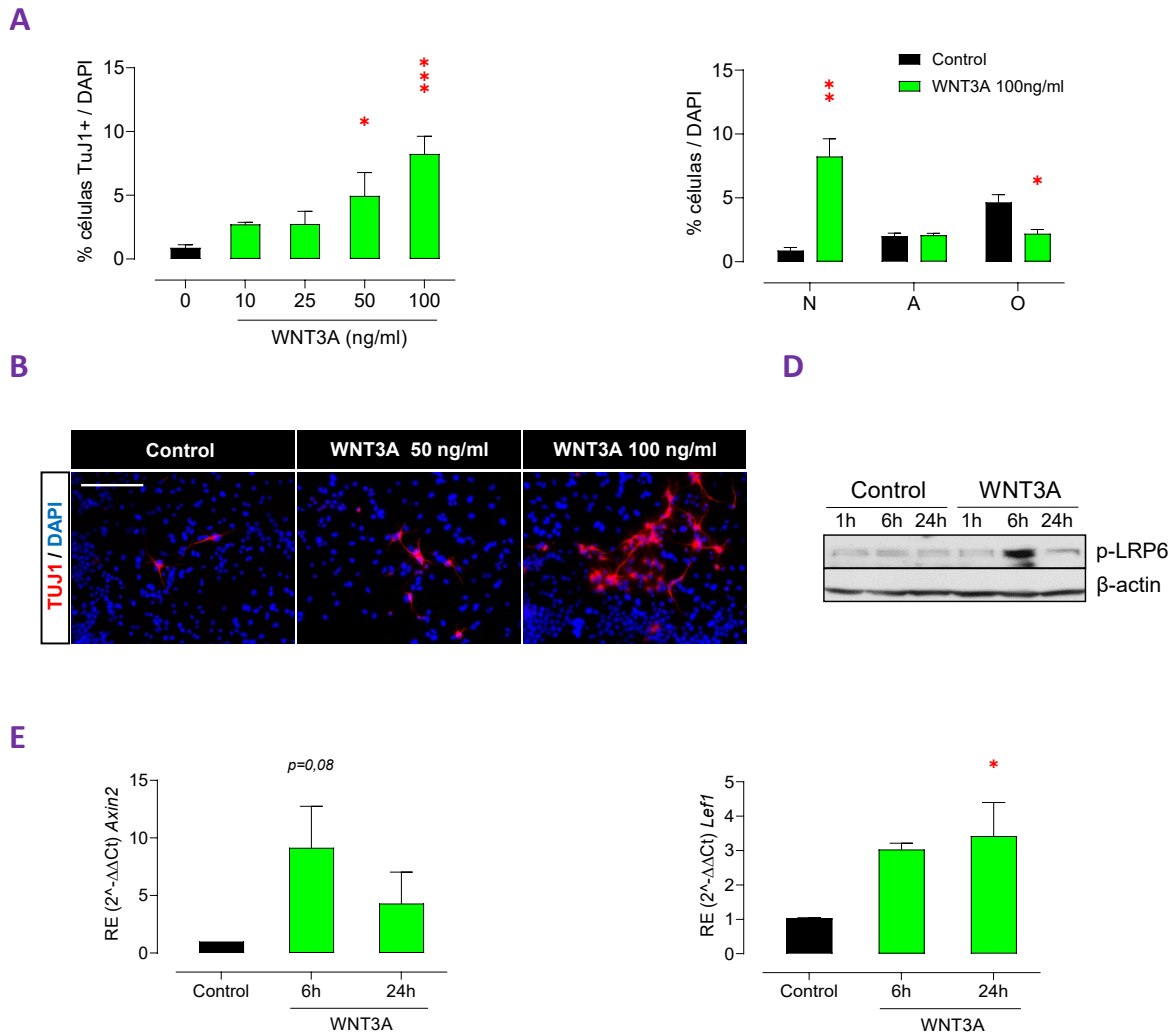


Figura 27. WNT3A induce el proceso de neurogénesis *in vitro* a través de la ruta canónica de las WNT. (A) Porcentaje de células positivas para Tubulina β III (Tuj1) de aquellas diferenciadas en presencia de concentraciones crecientes de WNT3A. Los datos corresponden a la media \pm sem de $n=3$ ($*p<0,05$; $***p<0,001$; ANOVA). (B) Imágenes ejemplo de la inmunocitoquímica mostrando los niveles de células positivas para Tuj1 (Rojo) y DAPI (Azul) a 0, 50 y 100 ng/ml de WNT3A. (C) Porcentaje de neuronas (N, células positivas para Tubulina β III), astrocitos (A, células positivas para la Proteína Ácida Fibrilar Glial, GFAP) y oligodendrocitos (O, células positivas para la Proteína Básica de Mielina, MBP) en ausencia (N2) y presencia de 100 ng/ml de WNT3A. ($*p<0,05$; $**p<0,01$; Ttest de dos colas). (D) Western blot mostrando los niveles del receptor fosforilado P-LRP6 y β -actina como control. Patrones de expresión relativa para los genes pertenecientes a la ruta de señalización de las WNT *Axin2* (E) y *Lef1* (F) tras la estimulación con 100 ng/ml de WNT3A durante 6 y 24 horas. *SdhA* fue usado como gen “housekeeping” y la expresión fue referida a su correspondiente muestra control (0h). Los datos corresponden a la media \pm sem de $n\leq 3$ experimentos independientes analizados por el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$. $*p<0,05$; T-test de dos colas. Barra de escala en B, 100 μ m.

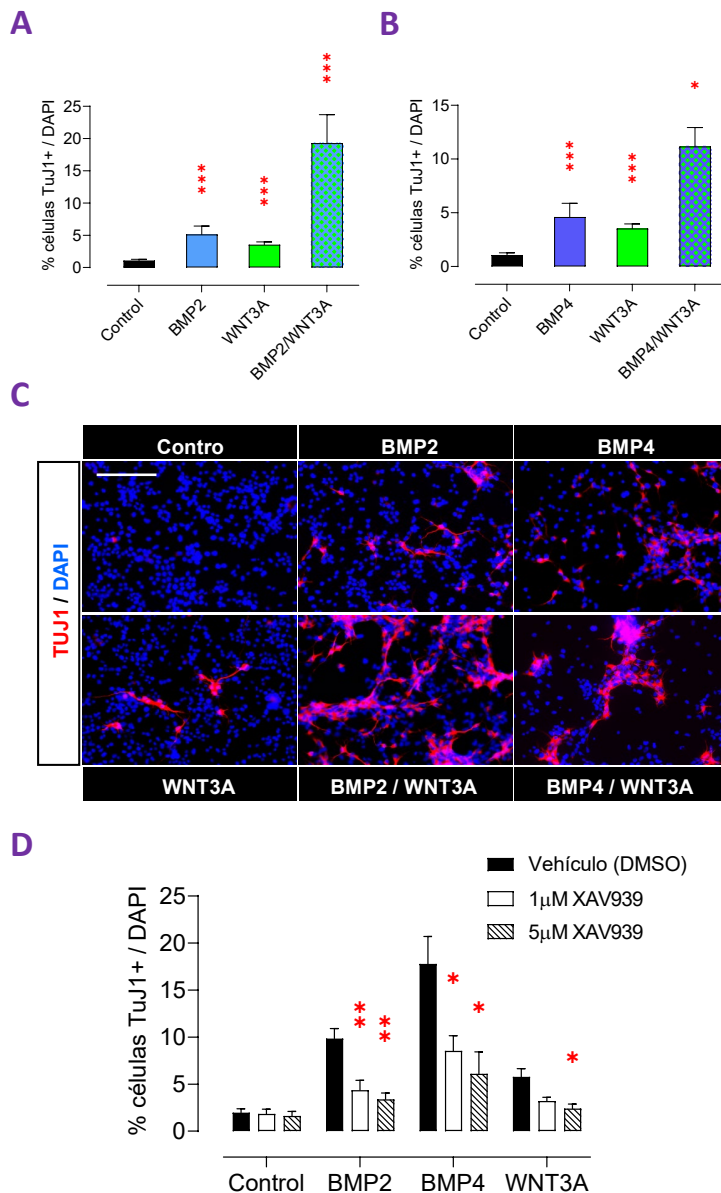


Figura 28. BMP2/4 requiere de la señalización por WNT3A y produce un efecto sinérgico con esta para aumentar la neurogénesis de AH-NSPCs *in vitro*.

(A) Porcentaje de células positivas para Tubulina β III (Tuj1) diferenciadas a partir de AH-NSPCs durante 4 DIV en presencia de BMP2 (25 ng/ml), WNT3A (25 ng/ml) o una combinación de ambas. Los datos corresponden a la media \pm sem de $n \geq 5$ (ANOVA de dos vías: $***p < 0,001$). (B) Porcentaje de células positivas para Tubulina β III (Tuj1) diferenciadas a partir de AH-NSPCs durante 4 DIV en presencia de BMP4 (25 ng/ml), WNT3A (25 ng/ml) o una combinación de ambas. Los datos corresponden a la media \pm sem de $n \geq 6$ (ANOVA de dos vías: $*p < 0,05$; $***p < 0,001$). (C) Imágenes de la inmunocitoquímica mostrando los niveles de células Tuj1 positivas (Rojo) y DAPI (Azul) en las condiciones anteriores. (D) Porcentaje de células positivas para Tubulina β III diferenciadas a partir de AH-NSPCs en presencia de BMP2 (50 ng/ml), BMP4 (50 ng/ml) o WNT3A (50 ng/ml) y 0, 1 o 5 μ M XAV939, inhibidor de la ruta canónica de WNT, o DMSO como control. Los datos corresponden a la media \pm sem de $n = 3$ (T-test de dos colas: $*p < 0,05$; $**p < 0,01$). Barra de escala en C, 100 μ m.

Nuestro siguiente paso, una vez verificado el efecto pro-neurogénico de la proteína recombinante WNT3A en AH-NSPCs, fue el de exponer las células a los ligandos BMP2 o BMP4 y WNT3A individual y simultáneamente, a concentraciones reducidas, con el fin de comprobar si existe alguna interacción entre ambas rutas de señalización

(Figura 28 A-C). Este experimento muestra un incremento significativo en la diferenciación neuronal cuando exponemos las células a dos ligandos; encontramos un aumento de 19 veces cuando BMP2 y WNT3A están presentes a la vez, frente a un aumento de 5 y 3,5 veces cuando tratamos solo con BMP2 o WNT3A respectivamente (ANOVA de dos vías, $F_{1,28}=14.642$, $P<0,001$), lo que demuestra una interacción significativa y sugiere un efecto sinérgico entre ambas vías (Figura 28 A, C). De la misma manera encontramos un aumento significativo de 11 veces cuando tratamos con BMP4 y WNT3A simultáneamente, frente a un aumento de 4,5 y 3 veces cuando tratamos de manera individual, respectivamente (ANOVA de dos vías, $F_{1,30}=5.851$, $P<0,05$ (Figura 28 B, C).

4.5. El efecto pro-neurogénico generado por las proteínas BMP2/4 requiere de la señalización canónica de WNT y está ligado a la expresión de *Lef1*.

Dado que la señalización de WNT es indispensable para el correcto desarrollo del hipocampo y para la neurogénesis en el adulto (Lie DC. *et al.*, 2005), especulamos que, no solo la señalización de BMP y WNT aumentan la neurogénesis cuando ambos ligandos están presentes al mismo tiempo en el cultivo, sino que la señalización a través de las proteínas BMPs requiere de un nivel basal de señalización a través de la ruta de las WNT para dar lugar al efecto neurogénico. Para comprobar esta hipótesis diseñamos un experimento en el que diferenciamos AH-NSPCs en presencia tanto de BMP2/4 (50 ng/ml) como de XAV939, inhibidor de la ruta canónica de las proteínas WNT (Sousa-Victor P. *et al.*, 2014), para prevenir la señalización basal de WNT (Figura 28 D). El bloqueo del efecto neurogénico generado por WNT3A (50 ng/ml) exógena fue usado como control para el tratamiento con el inhibidor XAV939 en este experimento. Los resultados de este experimento muestran como la señalización de WNT es necesaria para el efecto pro-neurogénico de BMP2 y BMP4. En presencia de 1 μ M del inhibidor XAV939, la diferenciación neuronal generada por los ligandos BMP2 y BMP4 disminuye significativamente (9,8 \pm 1,05 frente a 4,3 \pm 1,03 para BMP2 y BMP2+XAV939, respectivamente, y 17,78 \pm 2,02 frente a 8,53 \pm 1,62 para BMP4 y BMP4+XAV939,

respectivamente) (Figura 28 D). Esto mismo se observa a dosis más altas (5 μ M) de XAV939.

Está descrito que los ligandos de la familia de las proteínas WNTs activan la expresión de genes pro-neurogénicos a través de la unión del factor de transcripción de células T/factor potenciador linfocitario (TCF/LEF1) a sus sitios de unión en las secuencias promotoras de dichos genes (Kuwabara T. *et al.*, 2009). De la misma manera, está descrito que la expresión de TCF/LEF1 puede ser activada por la proteína BMP4 en algunos tejidos (Kratochwil K. *et al.*, 1996), por lo que nos planteamos la posibilidad de que el efecto sinérgico descrito en las células entre las proteínas BMP2/4 y WNT3A pudiese estar centrado en el factor de transcripción LEF1. Así pues, el siguiente bloque de experimentos está basado en explorar la idea de si las proteínas BMPs pueden aumentar la expresión de *Lef1* en AH-NSPCs. Nuestros primeros experimentos muestran un aumento de *Lef1* a nivel de mRNA tras un tratamiento de 6h y 24h con el ligando BMP4 (Figura 29 A). Además, este aumento en el nivel de expresión del gen se traduce en un aumento y acumulación a nivel de proteína, como podemos observar en el Western blot frente a LEF1 (Figura 29 B).

Puesto que observamos un aumento en la expresión de *Lef1* cuando tratamos con la proteína BMP4, nuestro siguiente paso fue estudiar el promotor de *Lef1* y buscar posibles sitios de unión de SMADs conservados para estas proteínas. Buscamos en bases de datos el genoma de rata y localizamos, en el cromosoma 2, la secuencia de 5000 pares de bases que precede al codón de inicio de la transcripción (ATG) del gen *Lef1*. Ya que el promotor de *Lef1* en rata no está descrito, realizamos un estudio de dicha secuencia para encontrar posibles regiones promotoras utilizando las herramientas informáticas proporcionadas por el software '*Genomatrix Promoter Inspector*'. Así, encontramos dos posibles regiones con el potencial de ser promotores: una primera secuencia promotora teórica sin caja TATA que va desde la posición -501 hasta la +100 (en relación al codón de inicio de la transcripción, ATG +1) con una longitud de 601 pares de bases (P1) y una segunda secuencia de 684 pares de bases (P2) dentro del primer intrón del gen *Lef1* (Figura 29 C). Cabe destacar que la estructura del promotor del gen *Lef1* de rata que hemos encontrado en nuestro estudio se

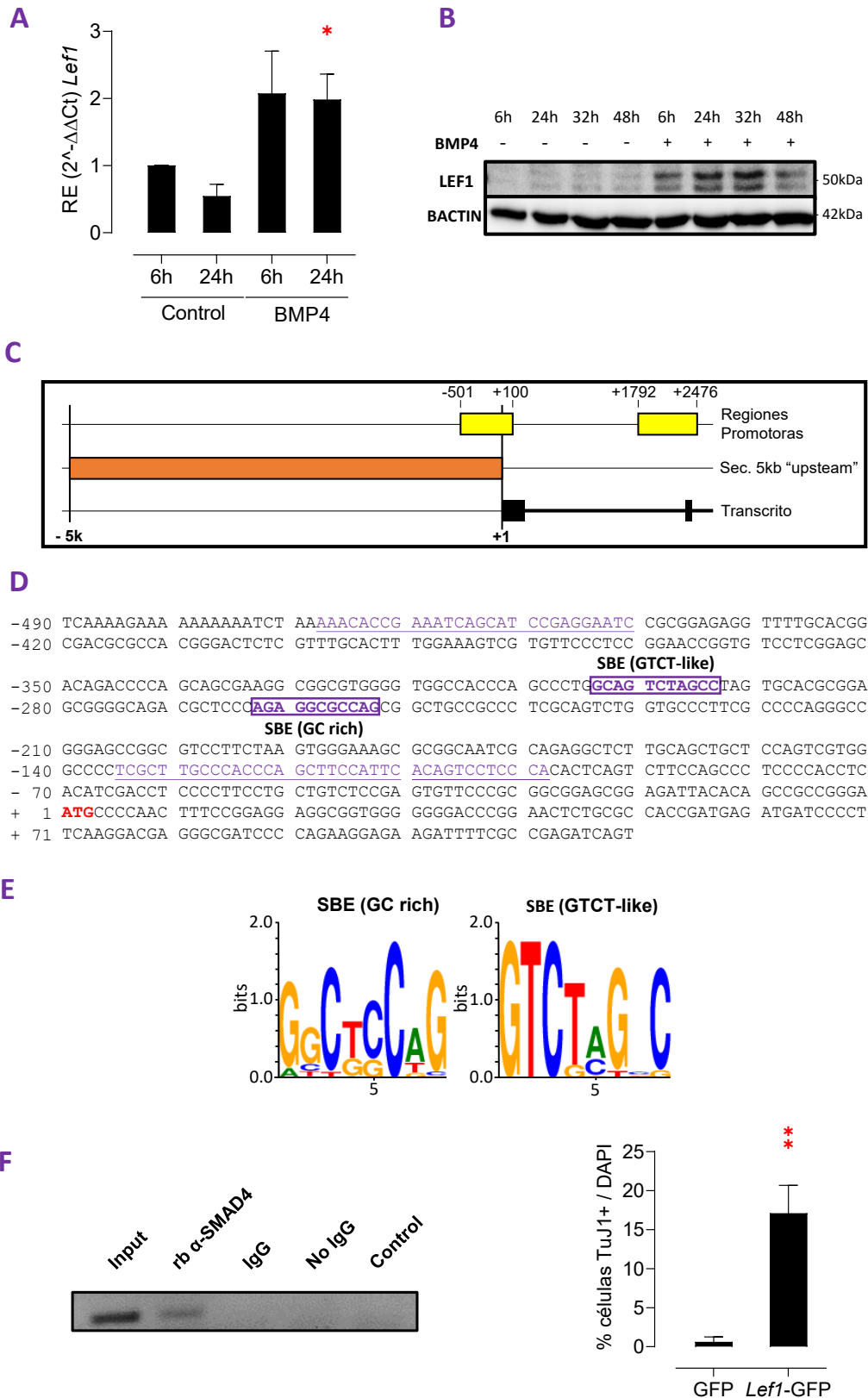


Figura 29. *Lef1* es una diana directa de la señalización por BMP4 en AH-NSPCs.

(A) Patrón de expresión relativa (RE) para el gen *Lef1* tras estimular con BMP4 (50 ng/ml) a diferentes tiempos. *Sdha* se ha usado como gen “housekeeping” y los niveles de expresión han sido referidos a su

respectiva muestra control, AH-NSPCs sin tratar. (B) Western blot de células AH-NSPCs tratadas con BMP4 a 6, 24, 32 y 48 horas, las muestras fueron separadas usando una electroforesis en gel desnaturizante SDS-PAGE y se reveló usando un anticuerpo frente a LEF1 y β -Actina como control de carga. (C) Análisis de posibles zonas que actúen como promotor para el gen *Lef1* utilizando 'Genomatrix Promoter Inspector software'. La imagen muestra la secuencia de 5000 pares de bases (Naranja) "upstream" de la secuencia codificante para *Lef1* (Negro) y las dos posibles regiones promotoras resultado del análisis (Amarillo). (D, E) Secuencia de nucleótidos correspondiente a la región de 5000 pares de bases "upstream" de la secuencia codificante para *lef1*. Se encontraron dos sitios de unión para las proteínas SMAD: el primero, en la posición -304/-294, corresponde a un 'Elemento de unión a proteínas SMAD' (SBE) (GTCT-like), y el segundo, posicionado en -263/-253, corresponde a un sitio de unión rico en GCs. Subrayado (morado) se encuentran las secuencias de los cebadores empleados para amplificar el fragmento durante el ensayo de ChIP. (F) Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) para AH-NSPCs tratadas con BMP4 y utilizando un anticuerpo anti-SMAD4 de conejo (rb, "rabbit"). Para la amplificación por PCR se usaron los primer correspondientes a los nucleótidos subrayados en D. Se usó como control una IgG de conejo (IgG). (G) Porcentaje de células positivas para Tubulina β III (Tuj1) de aquellas diferenciadas durante 4 DIV tras infectar con un lentivirus que sobreexpresa LEF1-GFP o GFP como control. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ T-test de dos colas.

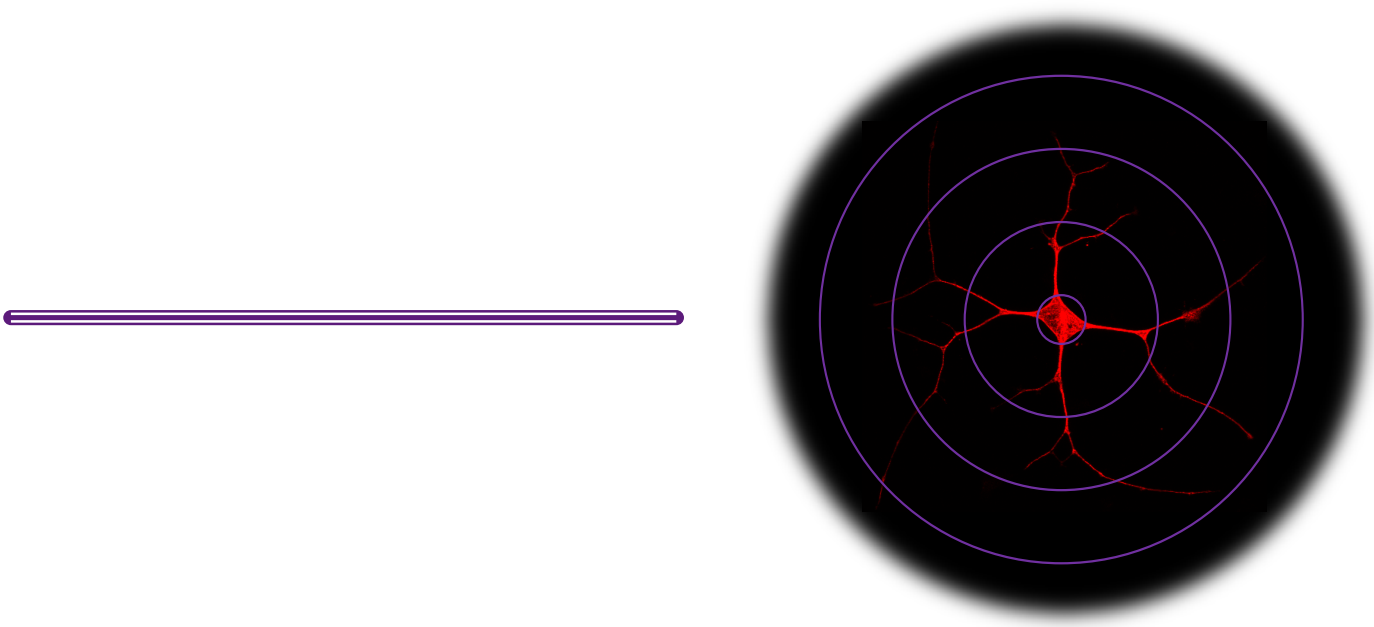
asemeja a la estructura del gen *LEF1* humano, un gen con varios promotores caracterizado por tener una primera secuencia promotora 5' que carece de caja TATA (P1) y una segunda secuencia promotora (P2) localizada por debajo del exón 1 (Pallas M. *et al.*, 2008; Ito K., 2013). En humano, el promotor P1 activa la expresión de la forma completa (full length) de LEF1, por otro lado, el promotor P2 produce una forma truncada de la proteína que carece del sitio de unión a β -catenina y cuya función es inhibir la señalización de la vía de las WNTs (Ito K., 2013).

De estas dos secuencias promotoras (P1, P2), seleccionamos la primera (P1), realizamos nuevos análisis y buscamos sitios de unión para factores de transcripción (TFBS). Encontramos un total de 154 sitios de unión diferentes, de los cuales dos correspondían a sitios de unión para la familia de proteínas SMAD. Estos sitios de unión están localizados en la posición -294/-304 ("5'- GTCT -3' SBE" también conocidos como "Elementos de unión para SMAD4") y -253/-263 ("motivo GCCG-like" también conocidos como "elementos ricos en GCs de unión a SMAD1/5") en relación al codón de inicio de la transcripción (+1 = ATG) y son reconocidos como posibles sitios de unión para dímeros de proteínas SMAD (P-SMAD/SMAD4) (Figura 29 D, E). Seguidamente, intentamos dilucidar si existía unión directa entre las proteínas SMAD y el promotor del gen *Lef1*, para ello planteamos un experimento de Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP)

utilizando un anticuerpo frente a SMAD4 seguida de una PCR con los primers específicos para amplificar la región con un sitio de unión para las proteínas SMADs en el promotor P1 del gen *Lef1* de rata (Figura 29 D). Como se muestra en la figura 29 F, en los resultados de la ChIP-PCR se puede observar la unión de la proteína SMAD4 a la región promotora P1 de *Lef1* comprendida entre los nucleótidos -99 y -468 (inicio y final de nuestros cebadores) cuando tratamos nuestras células con BMP4.

En conjunto, nuestros datos muestran que la proteína SMAD4 está unida a la región promotora P1 en presencia de BMP4, y que dicha región consta de dos sitios de unión para un dímero de proteínas SMAD (P-SMAD/SMAD4). Además, esta unión correlaciona con un incremento en la expresión a nivel de mRNA del gen *Lef1* (Figura 29 A). Por último, diseñamos un experimento para ver si al transducir las AH-NSPCs con lentivirus que portan las construcciones necesarias para sobreexpresar el gen *Lef1* fusionado a GFP somos capaces de observar un efecto positivo en la diferenciación neuronal. Como se puede observar en la Figura 29 G, la sobreexpresión del gen *Lef1* es suficiente para aumentar de manera significativa las células positivas para β III-tubulina, y, por tanto, para aumentar la neurogénesis en AH-NSPCs *in vitro*.

Resultados
Capítulo 2



En el siguiente bloque experimental quisimos estudiar qué papel juegan las proteínas BMPs en el proceso de maduración neuronal en el giro dentado hipocampal, es decir, la función que desempeñan estas proteínas en las etapas tardías de diferenciación de las neuronas inmaduras una vez generadas y en su integración en el circuito preexistente.

5.1. Las proteínas BMPs participan en la maduración neuronal *in vitro*.

El primer experimento que realizamos fue enfocado a discernir si existe o no un papel de las proteínas BMP en el proceso de maduración neuronal *in vitro*. Para ello utilizamos células AH-NSPC, las cultivamos durante 4 DIV, en presencia de Ácido Retinoico (RA) y Forskolina (FSK) para favorecer la producción de neuronas inmaduras, y, tras este periodo, cultivamos las células en presencia de las distintas BMPs durante 3 DIV adicionales (Figura 30). Tras los 7 DIV del experimento fijamos las células con Paraformaldehído (PFA) 2% y realizamos la inmunocitoquímica frente a β III-Tubulina (Tuj1). El análisis posterior se centró exclusivamente en aquellas células que se habían diferenciado a neurona (células Tuj1+), realizándose un estudio de las características morfológicas de las mismas mediante análisis de Sholl (Sholl DA., 1953).

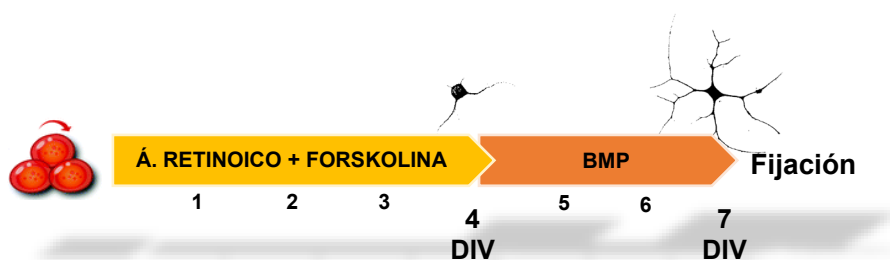


Figura 30. Esquema experimento de maduración neuronal.

Esquema representativo del desarrollo de un experimento de maduración neuronal. Las AH-NSPCs son cultivadas durante 4 DIV en presencia de ácido retinoico y forskolina para favorecer la producción de neuronas inmaduras. Tras este periodo, las células son cultivadas durante 3 DIV adicionales en presencia de las distintas BMPs con el fin de valorar su papel en la maduración neuronal.

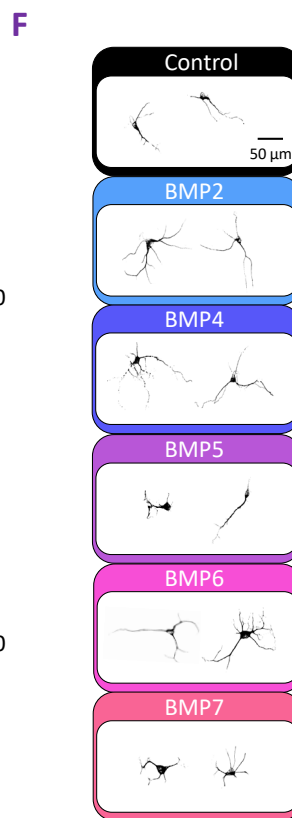
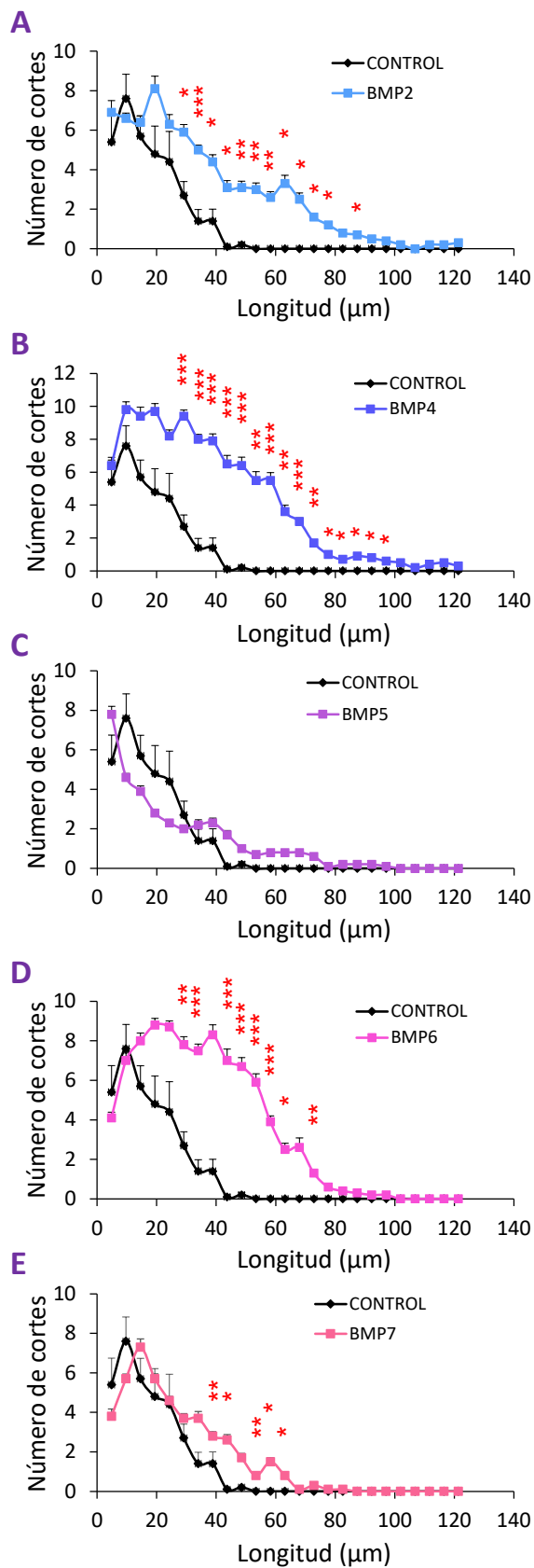


Figura 31. Efecto madurativo de las proteínas BMPs.

Análisis de Sholl de neuronas diferenciadas a partir de células hipocampales de rata (AH-NSPCs), marcadas con un anticuerpo contra β III-Tubulina (Tuj1). Las AH-NSPCs se diferenciaron en medio N" suplementado con Ácido retinoico (RA, $1\mu\text{M}$) y Forskolina (FSK, $5\mu\text{M}$) durante 4 días *in vitro* (DIV) y, posteriormente, se trataron con 50ng/ml de BMP2 (A), BMP4 (B), BMP5 (C), BMP6 (D) y BMP7 (E) durante 3 DIV. (F) Representación de las neuronas analizadas en A-E. El análisis de Sholl fue llevado a cabo con el programa informático Fiji (ImageJ) utilizando un intervalo entre círculos de $4,8\mu\text{m}$. Los resultados corresponden a la media \pm SEM de $n=3$ experimentos ($n \geq 15$ neuronas). El análisis estadístico equivale a una Ttest frente al control. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Barra de escala en F, $50\mu\text{m}$.

Este análisis se basa en superponer una serie de círculos concéntricos sobre la neurona centrados en el soma de ésta, y cuantificar cuántas veces cortan las neuritas con cada una de estos círculos (Ver [Figura 12](#) de Materiales y Métodos). De esta forma una neurona con más arborización, más madura, tendrá más cortes que una neurona menos arborizada, menos madura.

Los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento con BMP2, BMP4 y BMP6 tiene un efecto positivo y bastante notable en la maduración neuronal ([Figura 31 A, B, D](#)), mientras que el tratamiento con BMP7, tiene un efecto positivo, pero menos acusado ([Figura 31 E](#)). Sin embargo, no observamos ningún efecto significativo con la proteína BMP5, aunque se observa una tendencia hacia una menor complejidad en la región más próxima al soma ([Figura 31 C](#)). Con esto pudimos concluir que BMP2, BMP4, BMP6 y, en menor medida, BMP7 desempeñan un papel en el proceso de maduración neuronal, favoreciéndola, al menos, *in vitro*.

5.2. Efecto madurativo de las proteínas BMPs.

Seguidamente nos propusimos dilucidar qué efecto concreto tienen las BMPs y establecer si el aumento en la maduración neuronal se debía a un incremento en el número o en la longitud de las neuritas primarias y/o secundarias, y si correlacionaba con un aumento del tamaño del soma. Para ello realizamos diferentes análisis morfológicos individuales para cada BMP, complementarios al análisis de Sholl.

Como se observa en la [figura 32 \(A, C, E\)](#), el efecto generado por la BMP2, BMP4 y BMP6 parece estar relacionado con la longitud de las neuritas tanto primarias como secundarias. Además, la BMP4 y BMP6 presentan un efecto positivo tanto en el perímetro como en el área del soma celular. La proteína BMP7 por otro lado, tiene un efecto, aunque más reducido, en la longitud de las neuritas primarias, pero no en las secundarias. Por último, BMP5 tiene un efecto negativo sobre el número de neuritas primarias.

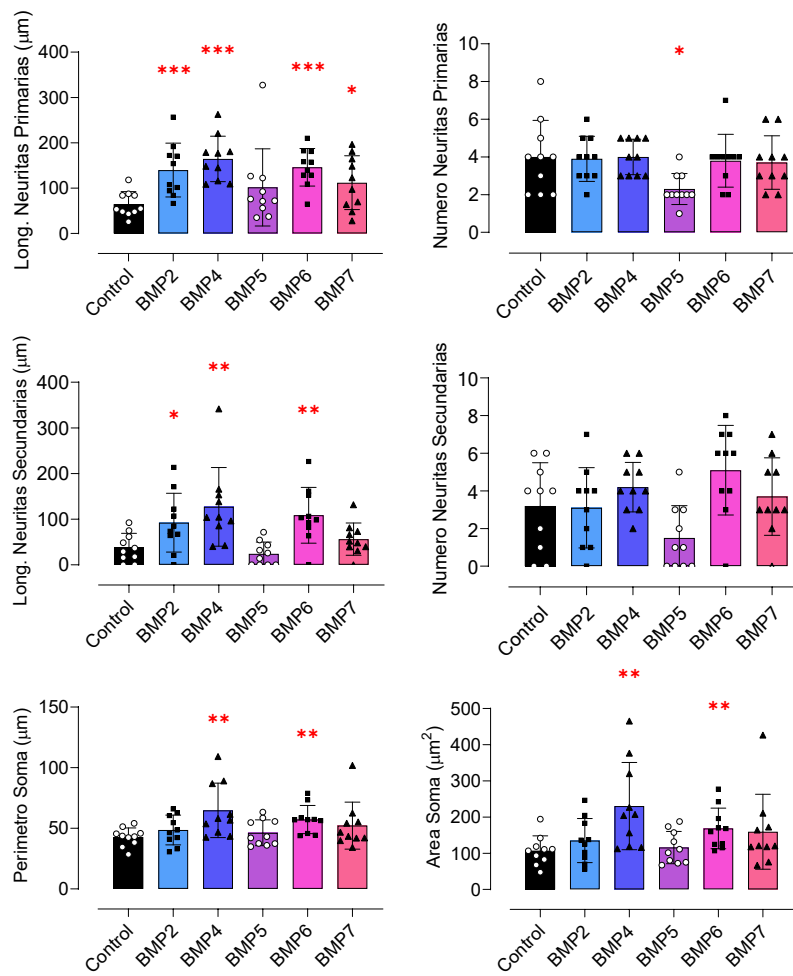


Figura 32. Análisis morfológico del número y la longitud de las neuritas.

Análisis morfológicos de las neuronas generadas en el experimento de maduración con BMP2, BMP4, BMP5, BMP6 y BMP7. Los análisis realizados fueron: longitud de las neuritas primarias (A) y secundarias (C), número de neuritas primarias (B) y secundarias (D), perímetro (E) y área (F) del soma. Todos los análisis fueron realizados con el programa informático Fiji (ImageJ). Los resultados corresponden a la media±SEM de n=3 experimentos (n≥15 neuronas). El análisis estadístico equivale a una Ttest frente a su correspondiente control. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

5.3. BMP6 tiene un efecto negativo a concentraciones altas.

Aunque inicialmente analizamos el efecto de varias de las proteínas BMPs (BMP2, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7) que se expresan de manera natural en el cerebro, para el resto del estudio nos centramos en dos de ellas, BMP4 y, sobre todo, BMP6. Esto se debe a varias razones, la primera de ellas es que son las proteínas de la familia de las BMPs que muestran más efecto madurativo en nuestros experimentos (Figura 31 y 32). Pero, además, resultados previos del laboratorio muestran un incremento aberrante de la proteína BMP6 con la edad en el giro dentado de ratones SAMP8 (modelo murino de

envejecimiento acelerado) (Díaz-Moreno M. *et al.*, 2018). De la misma forma, se ha descrito un aumento de BMP6 en el hipocampo de pacientes de Alzheimer (Crews L. *et al.*, 2010). Todos estos indicios apuntan a un papel clave de la proteína BMP6.

Así pues, decidimos comprobar el efecto que tiene la proteína BMP6 a concentraciones elevadas sobre la maduración neuronal, ya que en los ensayos previos se había trabajado a concentraciones cercanas. Se diseñó un experimento similar a los anteriores (Figura 31), pero en este caso con concentraciones crecientes de la proteína BMP6.

Los resultados obtenidos en este experimento indican que la proteína BMP6 presenta un efecto positivo en el proceso de maduración neuronal a concentraciones

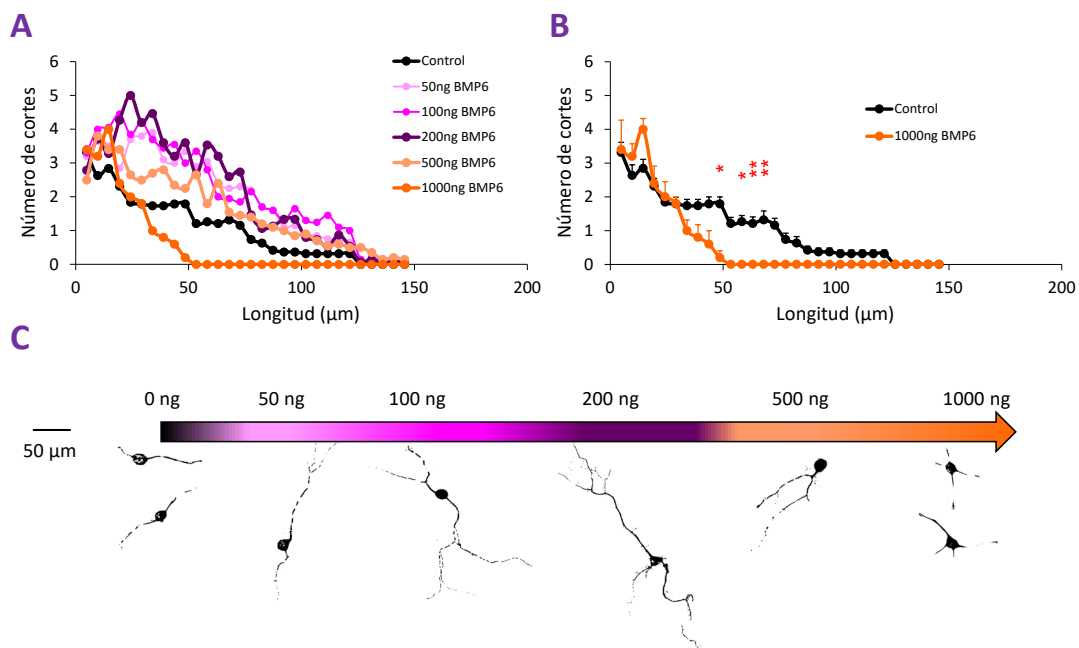


Figura 33. Maduración neuronal con concentraciones crecientes de BMP6.

Experimento de maduración diseñado para concentraciones crecientes de BMP6 (0, 50, 100, 200, 500, 1000ng/ml). Análisis de Sholl tras realizar la inmunofluorescencia frente a Tuj1 (A, B). (C) Representación gráfica del efecto de la proteína BMP6 en las neuronas. Los resultados corresponden a la media \pm SEM de n=3 experimentos ($n\geq 15$ neuronas). El análisis estadístico corresponde a una Ttest individual frente a su correspondiente muestra Control. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$. Barra de escala en C, 50 μm .

moderadas (50ng/ml $p=0,00031$; 100ng/ml $p=0,00018$; 200ng/ml $p=0,00002$), pero a concentraciones más altas, observamos el efecto contrario, una caída importante de la maduración que llega a ser significativa para el tratamiento con 1000 ng/ml de proteína (Figura 33 B). Todos estos datos apuntan a que las proteínas BMPs, en concreto BMP6, juegan un papel importante en el proceso de maduración neuronal hipocampal, y que una regulación adecuada de sus niveles es primordial para mantener la integridad de las neuronas del hipocampo.

5.4. Ensayos de inhibición mediante siRNA de los receptores de BMP de tipo I y II que desencadenan la respuesta madurativa.

El siguiente punto en nuestro estudio fue averiguar qué receptores de la familia de las BMPs están mediando el efecto observado en maduración neuronal. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el apartado 4.1 del capítulo de resultados, en el que analizamos los patrones de expresión de los ligandos y receptores de las BMPs durante la diferenciación neuronal (Figura 19), teníamos varios posibles candidatos a formar parte del complejo de receptores que desencadenaría la cascada de señalización que a su vez daría lugar al efecto madurativo observado: ACVR1 (ALK2) y BMPR1B (ALK6) como receptores de tipo I, y BMPR2 como receptor de tipo II.

Para determinar la implicación de estos receptores en la maduración neuronal, se nucleofectaron las AH-NSPCs con RNAs pequeños de interferencia (siRNAs, del inglés Small interfering RNAs) diseñados para silenciar los diversos receptores de manera independiente o con un RNA de interferencia Scrambled (SC) como control. Una vez nucleofectadas las células se sembraron y crecieron durante 4 DIV con RA y FSK y, seguidamente, 3 DIV en presencia de BMP6. En primer lugar, se interfirió la expresión del receptor BMPR2. La reducción de los niveles de BMPR2 se validó mediante Western blot en extractos proteicos recogidos a día 4 tras la nucleofección justo antes de la adición del ligando. A tiempo final (7 DIV) se realizó la inmunocitoquímica para Tuj1 y los pertinentes análisis morfológicos (análisis de Sholl) para valorar la maduración neuronal (Figura 34).

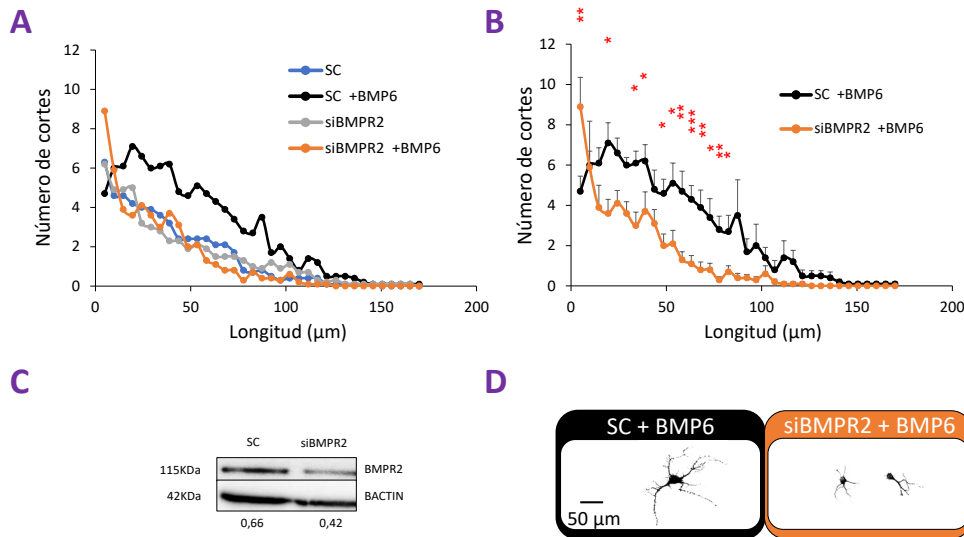


Figura 34. Inhibición del receptor tipo II BMPR2.

Las AH-NSPCs fueron nucleofectadas con un RNA de interferencia Scrambled (SC) o siBMPR2. La figura muestra el resultado del análisis de Sholl tras la inmunocitoquímica frente a Tuj1 realizada a término del experimento (**A**, **B**). (**C**) Western Blot frente al receptor BMPR2 y b-Actina como control tras la nucleofección de ambos siRNAs. (**D**) Ejemplo ilustrativo de una neurona nucleofectada con el siRNA Scramble y siRNA BMPR2 tras tratamiento con BMP6. Los resultados corresponden a la media \pm SEM de n=3 experimentos (n \geq 10 neuronas). El análisis estadístico corresponde a una Ttest individual frente a su correspondiente muestra Scrambled. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Los resultados obtenidos indican que el receptor BMPR2 forma parte indispensable del complejo de receptores implicado en la respuesta a las BMPs durante el proceso de maduración neuronal, ya que cuando reducimos los niveles de expresión de éste se bloquea completamente el efecto en maduración de BMP6 (Figura 34 B).

De la misma forma que para el receptor de tipo 2, realizamos una serie de experimentos de nucleofección con siRNAs para reducir la expresión de los receptores de tipo 1, ACVR1 (ALK2) y BMPR1B (ALK6) y así determinar si forman parte del complejo de receptores junto a BMPR2. En este caso, la reducción de la expresión de las células tratadas con siRNA frente al control tratado con SC se validó mediante RT-qPCR por no disponer de anticuerpos para Western blot (Figura 35).

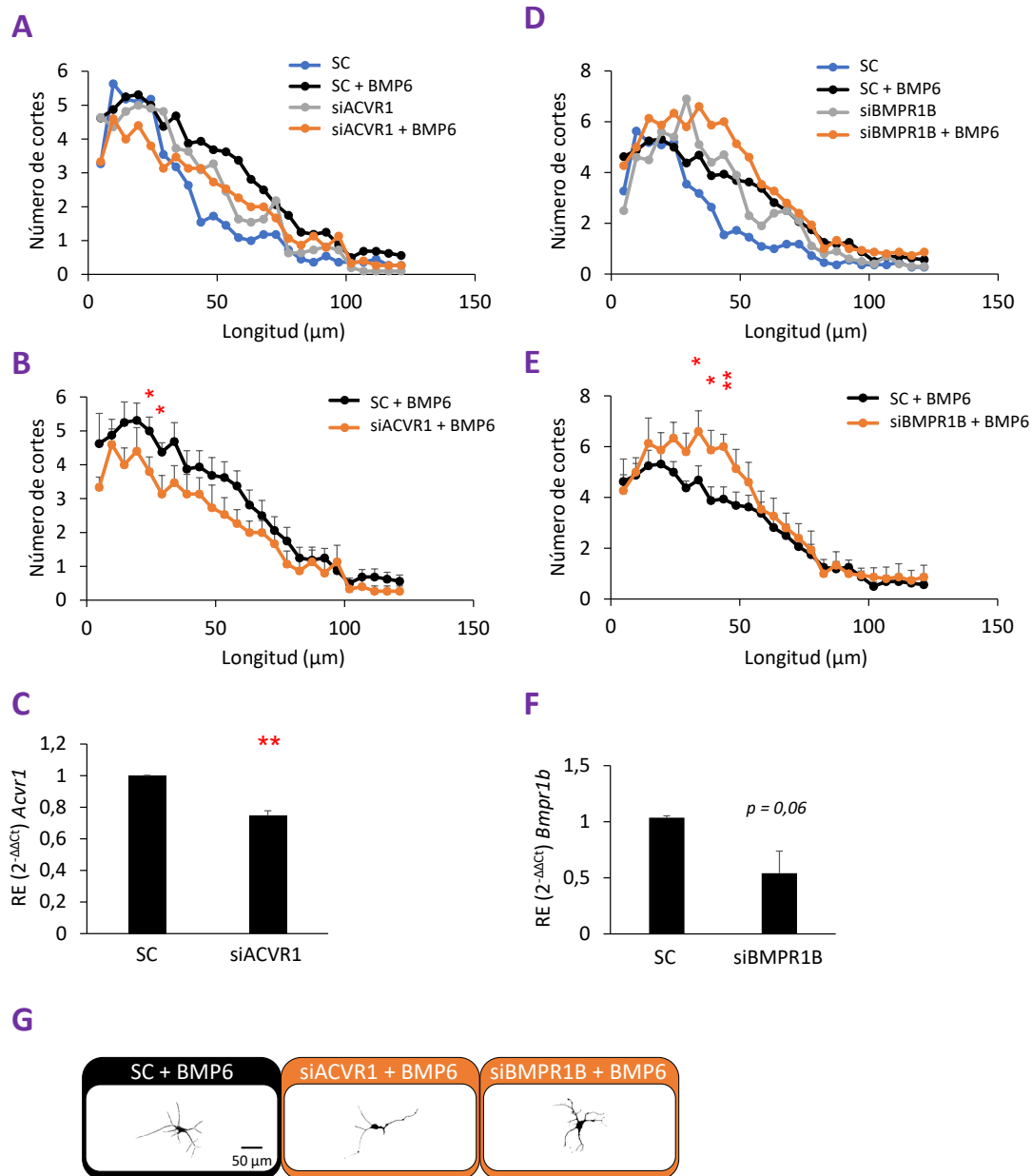


Figura 35. Inhibición de los receptores tipo I, ACVR1 y BMPR1B.

Las AH-NSPCs fueron nucleofectadas con un RNA de interferencia Scramble (SC), siACVR1 o siBMPR1B. La figura muestra el resultado del análisis de Sholl tras la inmunocitoquímica frente a Tuj1 realizada a término del experimento (**A**, **B**, **D**, **E**). (**C**, **F**) RT-PCR cuantitativa mostrando los niveles de expresión de los receptores *Acvr1* y *Bmpr1b* respectivamente. (**G**) Representación gráfica de una neurona nucleofectada con el RNA de interferencia Scramble, siACVR1 y siBMPR1B respectivamente. Los resultados corresponden a la media±SEM de n=3 experimentos (n≥15 neuronas). El análisis estadístico corresponde a una Ttest individual frente a su correspondiente muestra scramble. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Barra escala en **G**, 50 μm .

Como se puede observar en la **figura 35**, el siRNA contra el receptor ACVR1 bloquea parcialmente el efecto de BMP6 en maduración con respecto al siRNA

Scrambled, aunque se trata de una disminución relativamente leve (Figura 35 A, B, C). Por otro lado, de manera inesperada observamos un efecto positivo en los niveles de maduración de aquellas células nucleofectadas con siBMPR1B, especialmente en la complejidad del árbol en neuritas de < 50µm desde el soma, incluso en ausencia del ligando BMP6 ($p=0,0068$) (Figura 35 D, E, F). Este efecto podría ser debido a una respuesta compensatoria de las células, aunque no se ha profundizado en ello en nuestro estudio.

5.5. Ensayos de inhibición química de los receptores de tipo I que desencadenan la respuesta madurativa.

De forma paralela a los experimentos de interferencia de la expresión de los receptores, nos planteamos la inhibición química de éstos utilizando inhibidores específicos. Así pues, se realizaron ensayos de maduración neuronal similares a los anteriores, pero añadiendo un inhibidor químico específico para los receptores de tipo I una hora antes de estimular con el ligando BMP6, con la finalidad de intentar dilucidar qué receptores están implicados. Este inhibidor, K02288 (Sigma-Aldrich, SML1307), inhibe los diferentes receptores de tipo I en función de la concentración, siendo 1,1 nM la IC50 para el receptor ACVR1 (ALK2), 6,4 nM la IC50 del receptor BMPR1B (ALK6) y 34,4 nM la IC50 del receptor BMPR1A (ALK3).

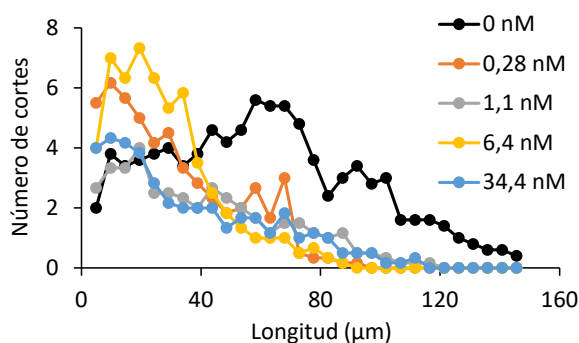


Figura 36. Inhibición química de los receptores de tipo I.

Análisis de Sholl realizado tras crecer AH-NSPC durante 4 DIV en presencia de Ácido Retinoico (RA) y Forskolina (FSK) y 3 DIV con BMP6 previo tratamiento de 1 hora con el inhibidor de receptores de tipo I, K02288, a las siguientes concentraciones: 0,28nM, 1,1nM, 6,4nM, 34,4nM. Vehículo corresponde a un volumen equivalente de DMSO. Los resultados corresponden a la media±SEM de n=1 experimento (5 neuronas).

Así pues, nos planteamos un experimento piloto (n=1) para intentar inhibir cada uno de estos receptores. Para ello trabajamos a las concentraciones IC50 de cada tipo de receptor, así como a una concentración por debajo de la IC50 más baja (0,28 nM), con el objetivo de inhibir solo ACVR1 y no los demás receptores (Figura 36).

Con este ensayo observamos una inhibición del efecto de BMP6 sobre la complejidad neuronal a todas las dosis empleadas, sin que veamos un efecto mayor al aumentar la concentración del inhibidor K02288. Curiosamente, a la dosis de 6,4nM de inhibidor (IC50 de BMPR1B) se observa un incremento en el número de cortes en la zona proximal (neuritas de <50µm desde el soma) de forma similar a lo que sucede en los ensayos de silenciamiento con el siBMPR1B. Por tanto, la concentración de 0,28nM es suficiente para bloquear el efecto pro-madurativo de BMP6, lo que apunta a un papel

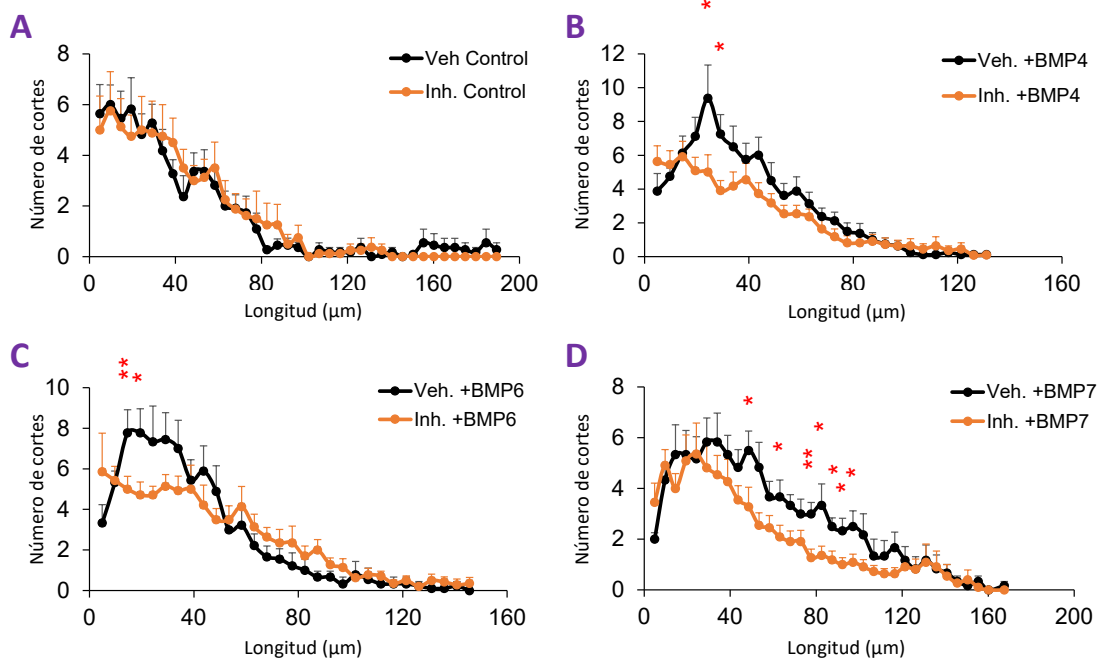


Figura 37. Ensayo madurativo inhibiendo el receptor tipo I, ACVR1.

Análisis de Sholl realizado tras crecer AHNPC durante 4 DIV en presencia de Ácido Retinoico (RA) y Forskolin (FSK) y 3 DIV con BMP4 (B), BMP6 (C) y BMP7 (D) previo tratamiento de 1 hora con el inhibidor de receptores tipo I, K02288, a una concentración de 0,28nM. Vehículo corresponde a un volumen equivalente de DMSO. Los resultados corresponden a la media±SEM de n≥10 experimentos. El análisis estadístico corresponde a una Ttest individual frente a su correspondiente muestra vehículo. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

preferente del receptor de tipo I ACVR1 (ALK2). Teniendo en cuenta esta información, los siguientes experimentos se diseñaron usando 0,28nM del inhibidor K02288, es decir, trabajando a una concentración aproximadamente 4 veces por debajo de la IC50 de ACVR1, 22 veces más baja que la IC50 de BMPR1B o 123 veces inferior a la IC50 de BMPR1A, por lo que la inhibición de estos dos últimos receptores en el ensayo podría considerarse despreciable.

Como se observa en la [figura 37](#), el tratamiento con 0,28nM del inhibidor K02288 disminuye el efecto madurativo de BMP4, BMP6 o BMP7 seguido mediante el análisis de Sholl.

5.6. Ensayos de activación de los receptores de BMP de tipo I mediante sobreexpresión con vectores virales.

Después de todos los experimentos de pérdida de función anteriores, y tras valorar los resultados obtenidos, decidimos cambiar de estrategia y diseñar experimentos de ganancia de función para verificar el efecto de los receptores de BMP de tipo I durante la maduración neuronal. Dichos experimentos se basaron en la sobreexpresión mediante construcciones víricas que portan las formas constitutivamente activas (CA) de los receptores de tipo I, ACVR1 (ALK2) y BMPR1B (ALK6). Estos receptores constitutivamente activos tienen una mutación en su secuencia que los hacen ser activos independientemente de la presencia de ligando (pcDNA3-Acvr1h-CA Q207D #80871, pcDNA3-BMPR1B-CA ms Q203D #80883). El cambio de la glutamina (residuo neutral) en posición 207 por un ácido aspártico (residuo cargado negativamente) (Q207D) tiene un efecto funcional similar en la cascada de señalización de las BMPs al generado por la fosforilación natural de serina y treonina en el dominio GS (Haupt J. *et al.*, 2014).

En primer lugar, nos centramos en generar dichas construcciones virales ([apartado 3.1.10 y 3.1.11](#) de Materiales y Métodos). Decidimos generar retrovirus, capaces de transducir solamente células en proliferación, así como lentivirus, capaces de transducir células tanto mitóticas como postmitóticas.

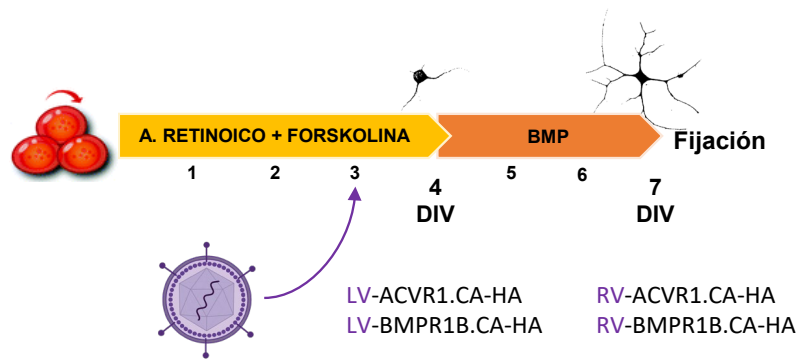


Figura 38. Esquema ensayo retro y lentiviral.

Representación de un experimento de maduración neuronal con retro y lentivirus que portan las construcciones constitutivamente activas de los receptores de tipo I, ACVR1 y BMPR1B. Las AH-NSPCs son cultivadas durante 4 DIV en presencia de RA y FSK para favorecer la diferenciación neuronal, y 3 días en presencia de las diferentes proteínas BMPs. Se procede a la infección viral a día 3, 24 horas antes de la estimulación con BMP.

El diseño experimental fue similar al de los experimentos de maduración mostrados anteriormente, pero con la salvedad de que infectamos las células a día 3 con los lentivirus o retrovirus que portan GFP, como control, o la forma constitutiva activa de los receptores de tipo I ACVR1 (ALK2) o BMPR1B (ALK6). A término del experimento, como en los casos anteriores, llevamos a cabo la inmunocitoquímica frente a la proteína del citoesqueleto neuronal β III-tubulina y, posteriormente, el análisis de Sholl pertinente.

Los resultados que obtuvimos en este experimento muestran como la sobreexpresión de una forma constitutiva activa tanto del receptor ACVR1 como del receptor BMPR1B es suficiente para generar un efecto similar al que observamos con un estímulo de BMP6 (Figura 39). Esto es debido a que los receptores constitutivamente activos no necesitan de ligando para desencadenar su señalización y, por tanto, son capaces de mediar la maduración neuronal en ausencia de ligando. Los resultados indican también que para el caso de LV-ACVR1-CA, además de aumentar la maduración de forma similar al ligando, sus efectos se potencian en presencia del ligando.

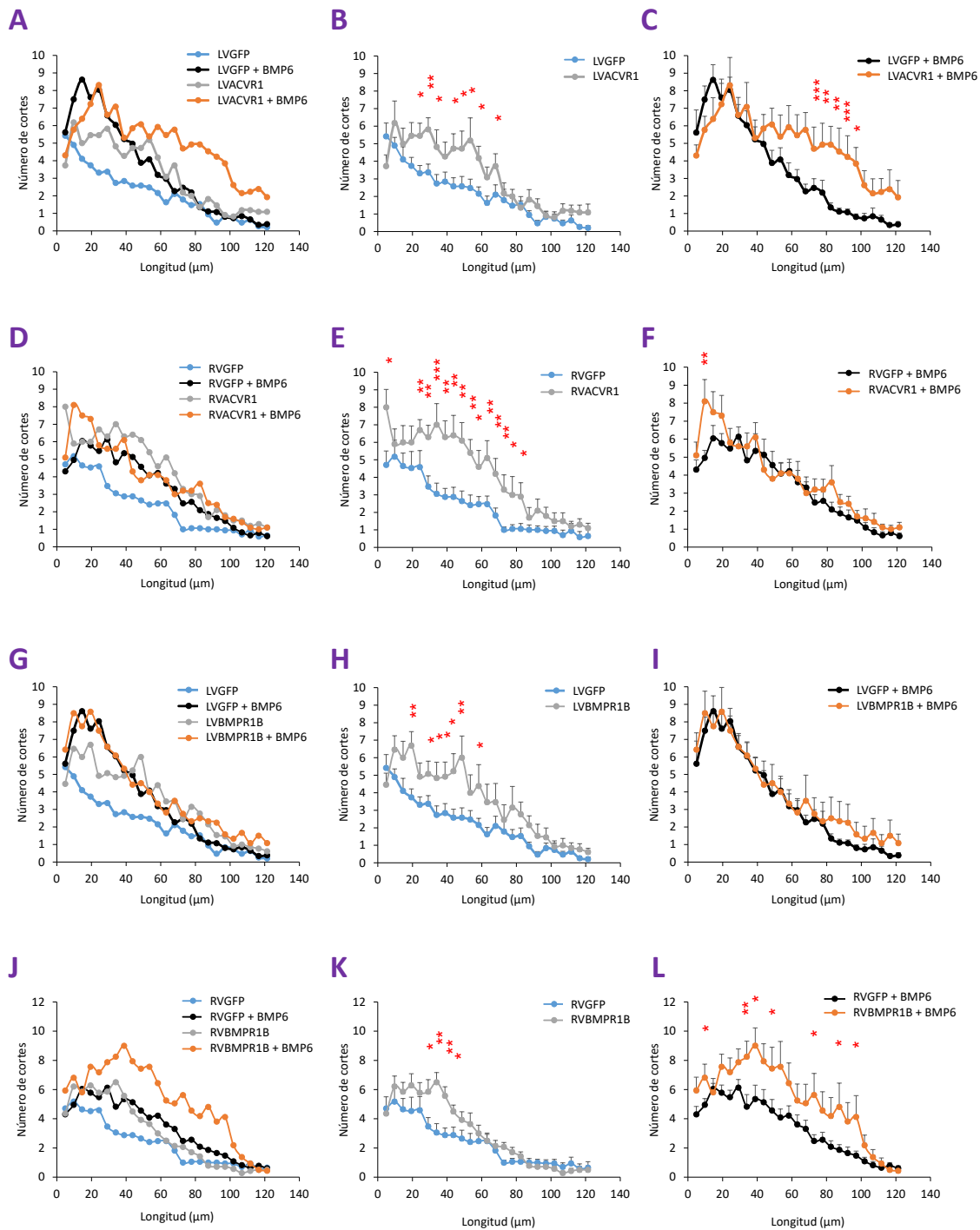


Figura 39. Sobreexpresión de las formas constitutivas activas de los receptores tipo I.

Crecimos AH-NSPCs siguiendo un protocolo de maduración de 7 DIV, 4 DIV con Ácido Retinoico y Forskolina y 3 DIV adicionales con un estímulo de BMP6. Las células fueron infectadas con lentivirus que portaban GFP o las construcciones constitutivas activas para ACVR1 o BMPR1B (A-C, G-I), o con retrovirus que portaban las mismas construcciones (D-F, J-L). Posteriormente se realizó la inmunocitoquímica frente a β III-tubulina y un análisis morfológico de las neuronas (Análisis de Sholl). Los resultados corresponden a la media \pm SEM de $n=3$ experimentos ($n \geq 15$ neuronas). El análisis estadístico corresponde a una Ttest individual frente a su correspondiente muestra control. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

En cambio, RV-ACVR1-CA aumenta la maduración de forma similar al ligando, pero sus efectos no se potencian en presencia del ligando. En este sentido, es posible que ACVR1 tenga un papel preferente en las células postmitóticas. Para el caso de BMPR1B observamos lo contrario: LV-BMPR1B-CA aumenta la maduración de forma similar al ligando, y sus efectos no se potencian en presencia del ligando, mientras que RV-BMPR1b-CA aumenta la maduración de forma similar al ligando, y sus efectos sí que se potencian en presencia del ligando, lo que sugiere un papel preponderante de BMPR1B en células todavía en división.

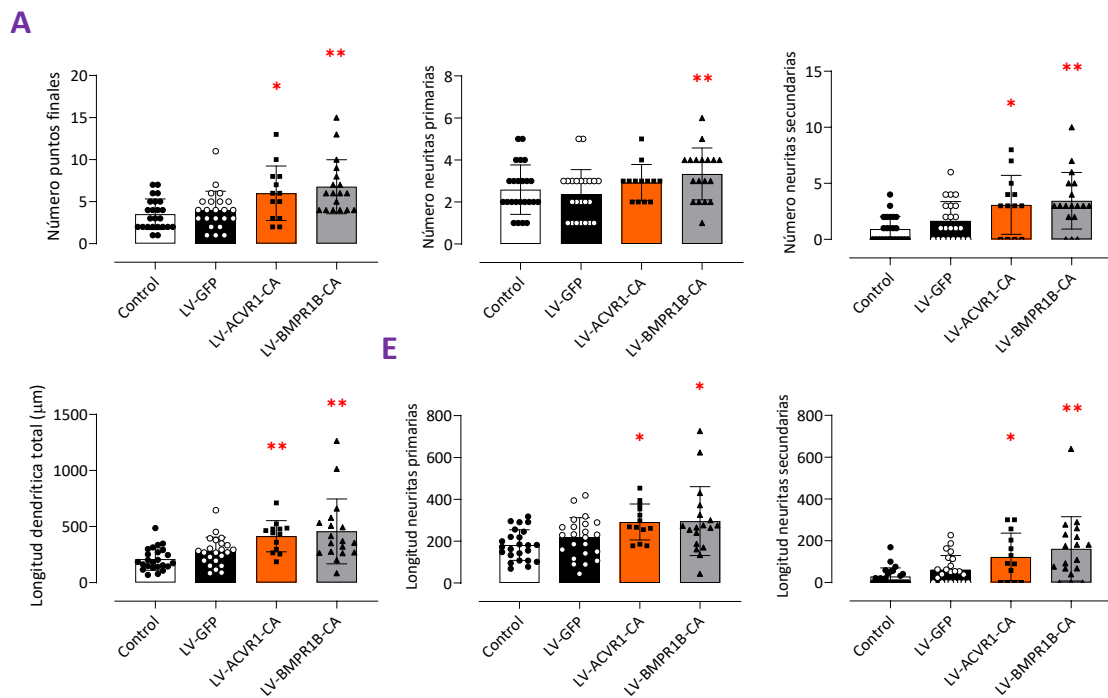


Figura 40. Análisis morfológico tras la sobreexpresión de las formas constitutivas activas de los receptores tipo I.

Análisis morfológico de las neuronas obtenidas al transducir con los lentivirus que portan las construcciones constitutivas activas de los receptores ACVR1 y BMPR1B. En la figura se muestran: Número de puntos finales (A), número de neuritas primarias (B), número de neuritas secundarias (C), longitud dendrítica total (D), longitud de las neuritas primarias (E) y longitud de las neuritas secundarias (F). Los resultados corresponden a la media±SEM de n=3 experimentos (n≥15 neuronas). El análisis estadístico equivale a una Ttest frente a su correspondiente muestra control (LV-GFP). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

En conclusión, este experimento apunta a que ambos receptores de tipo I son suficientes y pueden estar implicados en el proceso de diferenciación neuronal hipocampal adulta. Sin embargo, puede ocurrir que, cada receptor tenga una función diferente y señalice para un aspecto concreto de la maduración neuronal. Por ello, para intentar distinguir el efecto de cada uno de los receptores, se realizó un análisis más exhaustivo de las características morfológicas de las neuronas obtenidas al infectar las células con los lentivirus que portan las construcciones constitutivamente activas (Figura 40).

Podemos observar un efecto positivo y significativo de ambos receptores tanto en el número como en la longitud de las dendritas (Figura 40). Sin embargo, la forma constitutivamente activa del receptor BMPR1B parece tener un efecto mayor sobre el número de dendritas tanto primarias como secundarias que la forma constitutivamente activa del receptor ACVR1A (Figura 40 A-C). Por otro lado, ambos receptores parecen influir sobre la longitud dendrítica de la misma manera (Figura 40 D-F). Estos datos pueden sugerir una función preferente del receptor BMPR1B sobre el número de dendritas.

5.7. Señalización celular durante la maduración neuronal *in vitro* mediada por la ruta no canónica de las BMPs.

Tras haber verificado la participación de los receptores en el proceso de maduración neuronal *in vitro*, decidimos dilucidar qué vía de señalización están desencadenando la respuesta. Como se ha expuesto en la introducción, las BMPs pueden desencadenar dos tipos de rutas: la vía canónica, mediada por las proteínas SMAD, que ya demostramos que es la implicada en el proceso de especificación del destino neuronal (apartado 4.3 de los resultados), y, por otro lado, la vía no canónica. Existen estudios previos en los que se observa como las proteínas BMPs participan en maduración de las neuronas corticales a través de la ruta no canónica (Choe Y. *et al.*, 2013), sin embargo, son estudios que se centran en las etapas del desarrollo, y no en la neurogénesis en los nichos adultos como es nuestro caso.

Para esclarecer qué vía se activa en nuestro modelo experimental, realizamos un experimento de maduración similar a los anteriores, crecimos AH-NSPCs en presencia de Ácido Retinoico y Forskolina durante 4 DIV, para favorecer la diferenciación neuronal de las células, y posteriormente, estimulamos con BMP6 durante 3 DIV pero, en este caso, tratamos las células con dos tipos de inhibidores durante 1 hora previo al estímulo de BMP6: DMH1, inhibidor de la ruta canónica (Hao J. *et al.*, 2010), y LIMKi, inhibidor de la LIM quinasa 1, uno de los principales componentes de la ruta no canónica de las BMPs (Foletta VC. *et al.*, 2003).

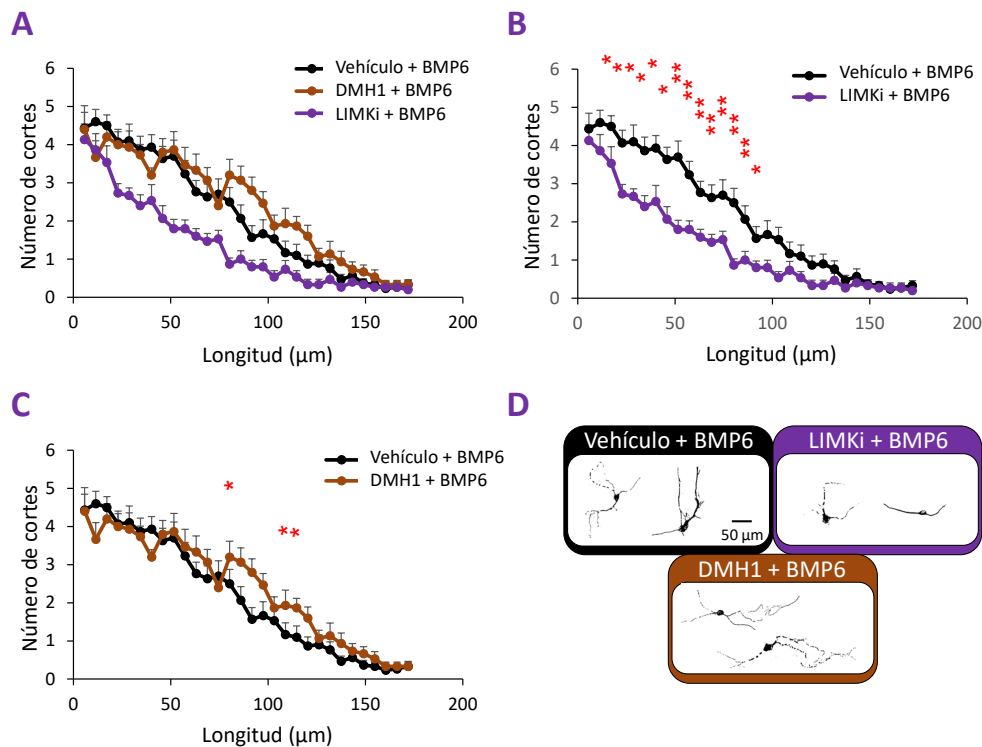


Figura 41. Inhibición química de las rutas de señalización de las BMPs.

Crecimos células AH-NSCs siguiendo un protocolo de maduración de 7 DIV, 4 DIV con Ácido Retinoico y Forskolina y 3 DIV con un estímulo de BMP6. Previo al estímulo con BMP6 tratamos durante 1 hora con los inhibidores de las diferentes rutas de señalización de las BMPs: 10μM DMH1, inhibidor de la ruta canónica (A, C, D); 10μM LIMKi, inhibidor de la ruta no canónica (A, B, D). Posteriormente se realizó la inmunocitoquímica anti TUJ1 y un análisis morfológico de las neuronas (Análisis de Sholl). La condición vehículo corresponde a un volumen equivalente de DMSO. Los resultados corresponden a la media±SEM de n=3 experimentos (n≥15 neuronas). El análisis estadístico corresponde a una Ttest individual frente a su correspondiente muestra vehículo. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

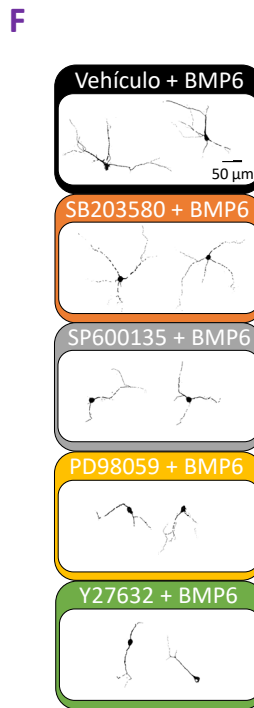
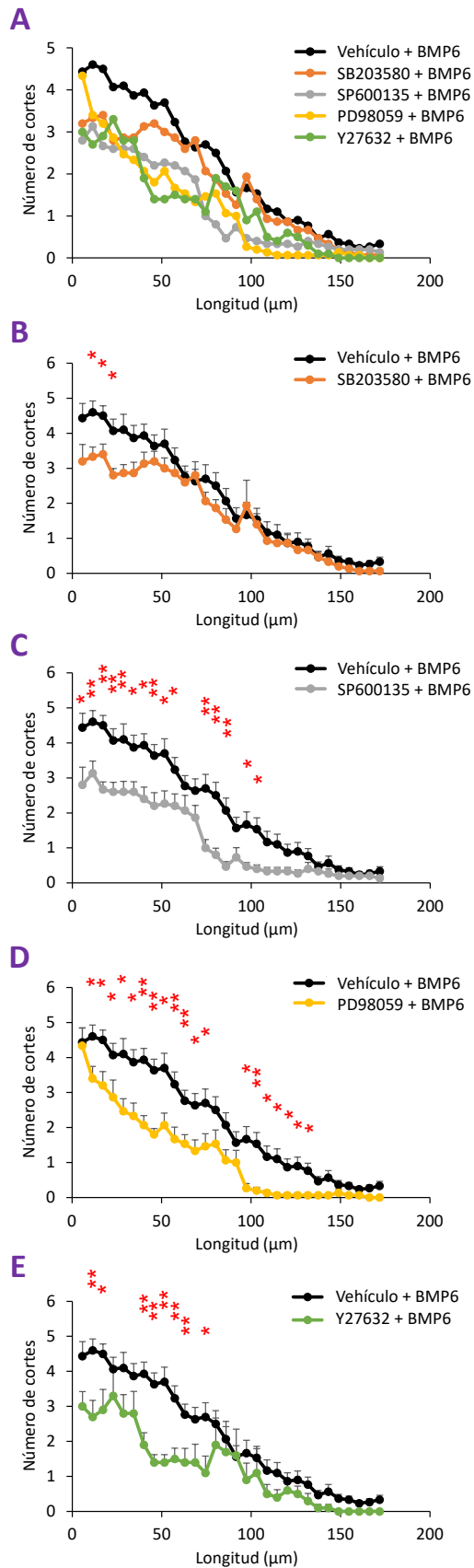


Figura 42. Inhibición química de intermediarios de la ruta de señalización no canónica.

Crecimos células AH-NSPCs siguiendo un protocolo de maduración de 7 DIV, 4 DIV con Ácido Retinoico y Forskolina y 3 DIV con un estímulo de BMP6. Pevio al estímulo con BMP6 tratamos durante 1 hora con los distintos inhibidores de los componentes de la ruta no canónica de las BMPs: 1 μM SB203580 (inhibidor de la p38 MAPK) (**B**), 1 μM SP600135 (inhibidor de JNK) (**C**), 1 μM PD98059 (inhibidor de MEK) (**D**), 1 μM Y27632 (inhibidor de Rock) (**E**). Posteriormente se realizó la inmunocitoquímica anti-TUJ1 y un análisis morfológico de las neuronas (Análisis de Sholl). La condición vehículo corresponde a un volumen equivalente de DMSO. (**F**) Representación gráfica de las neuronas obtenidas en el ensayo con los diferentes inhibidores. Los resultados corresponden a la media \pm SEM de $n=3$ experimentos ($n \geq 15$ neuronas). El análisis estadístico corresponde a una Ttest individual frente a su correspondiente muestra vehículo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

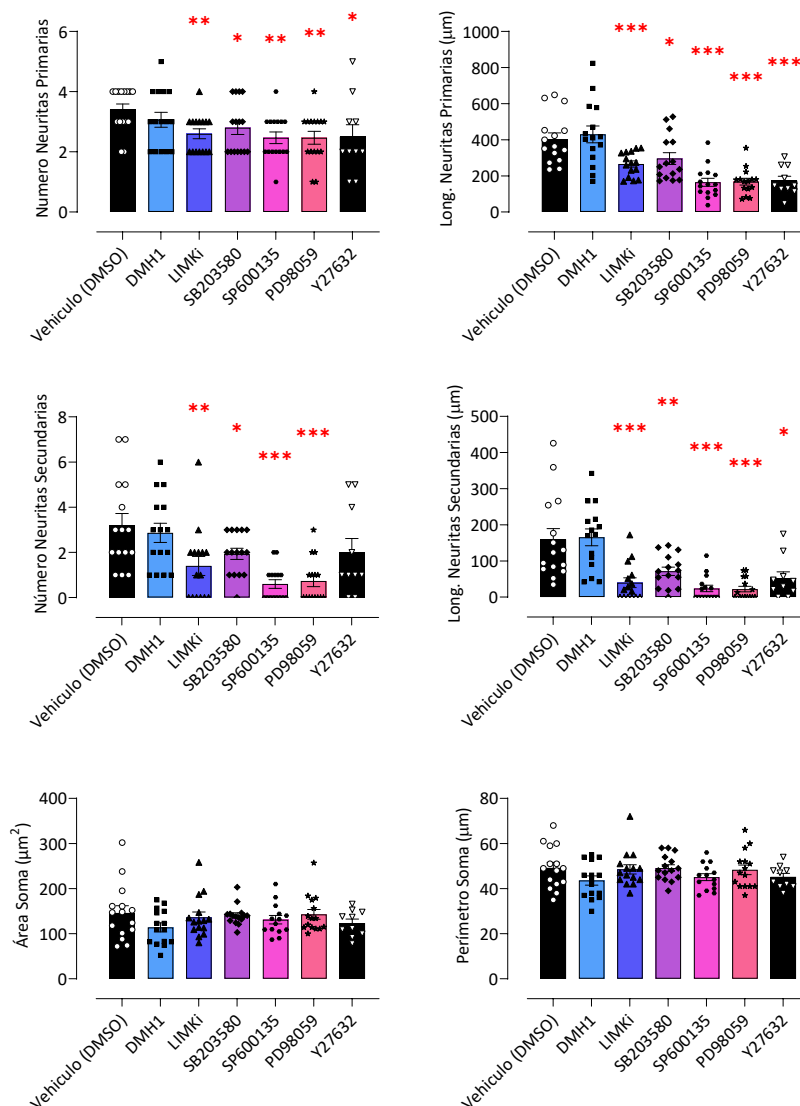


Figura 43. Análisis morfológico tras la inhibición química de las rutas de señalización.

Análisis morfológico de las neuronas obtenidas en los experimentos de maduración en presencia de los inhibidores de los intermediarios de las rutas de señalización canónica y no canónica. Número de las dendritas primarias (A) y secundarias (C), longitud de dendritas primarias (B) y secundarias (D), y área (E) y perímetro (F) del soma. La condición vehículo corresponde a un volumen equivalente de DMSO. Los resultados corresponden a la media±SEM de n>3 experimentos (n≥15 neuronas). El análisis estadístico corresponde a una Ttest individual frente a su correspondiente muestra vehículo. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

La evaluación de la morfología neuronal mediante el análisis de Sholl muestra un escaso efecto del inhibidor DMH1 (Figura 41 A, C-D), sin embargo, sí que podemos observar una pérdida significativa de la maduración neuronal cuando tratamos las células con el inhibidor LIMKi (Figura 41 A-B, D), sugiriendo que es la ruta no canónica de las BMPs la principal implicada en el proceso de maduración neuronal en nuestro ensayo. Seguidamente tratamos de dilucidar si otros intermediarios concretos de la vía no canónica están implicados en el proceso de maduración neuronal. Para ello,

empleamos varios inhibidores químicos específicos para cada uno de estas moléculas, como son: p38 MAPKi, JNKi, MEKi o Rocki.

Los resultados que obtuvimos del análisis de Sholl muestran como una inhibición tanto de JNK, MEK o Rock genera un descenso significativo de la complejidad neuronal inducida por BMP6 (Figura 42 C, D, E), por lo que estas moléculas pueden estar implicadas en el proceso de maduración. Sin embargo, cuando empleamos el inhibidor de la p38 MAPK, aunque observamos un pequeño descenso de la maduración, este no es tan acusado (Figura 42 B). Por otro lado, el análisis morfológico (Figura 43) muestra un efecto más acusado de LIMKi, JNKi (SP600135) y MEKi (PD98059) en el número y longitud de las neuritas secundarias en comparación con el inhibidor de P38MAPK (SB203580) o el inhibidor de ROCK (Y27632) (Figura 43 C, D). Este último parece afectar de forma más importante a las neuritas primarias (Figura 43 B). Los cambios a nivel de área y perímetro del soma no fueron significativos (Figura 43 E, F). Todos estos resultados nos muestran que la ruta no canónica de las proteínas BMPs juega un papel importante en el proceso de maduración neuronal adulta, posiblemente, a través de LIMK junto con JNK, MEK y Rho/ROCK.

5.8. Función de los receptores de BMPs tipo I en la neurogénesis hipocampal *in vivo*.

En el bloque de experimentos anterior mostramos cómo los receptores de tipo I ACVR1 y BMPRI1 están implicados en el proceso de maduración neuronal *in vitro*, ya que la expresión de una forma constitutivamente activa de ambos genera un aumento de maduración neuronal.

Tras estos experimentos quisimos comprobar si los resultados obtenidos *in vitro* se mantienen también en un contexto *in vivo*. Para ello diseñamos un experimento basado en la electroporación de un plásmido de nuestro interés en el hipocampo de ratones a día postnatal 0 (P0) (Hidenori I. *et al.*, 2014). Las neuronas del giro dentado se generan mayoritariamente de forma gradual entre los días E15.5 y P14 del desarrollo, con un pico de neurogénesis alrededor del día posnatal P1 (Bond AM. *et al.*, 2020). El

objetivo fue electroporar los plásmidos (pCAG) que portan las construcciones constitutivamente activas de los receptores de tipo I ACVR1 y BMPR1B seguidas de un cassette IRES-GFP en el hipocampo de ratones salvajes CD1 a P0, justo antes del pico neurogénico, y evaluar la maduración neuronal hipocampal 21 días tras la electroporación. Este experimento fue realizado en colaboración con la Dra. Carme Cucarella del Servicio de Transgénesis del IBV, que fue la persona encargada de realizar las inyecciones intracraneales. A los 21 días post-electroporación los animales fueron sacrificados, procesamos y cortamos los cerebros, realizamos la inmunohistoquímica frente a GFP y caracterizamos las neuronas GFP⁺.

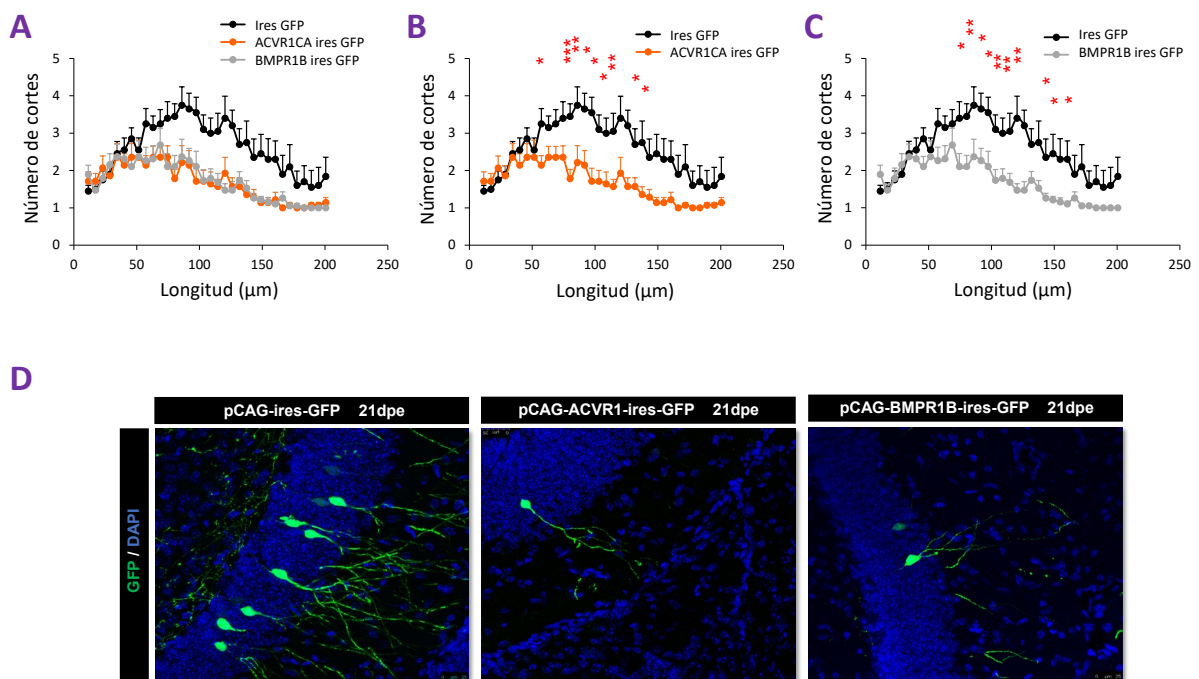


Figura 44. Electroporaciones *in vivo* de las formas constitutivamente activas de los receptores de tipo I ACVR1 y BMPR1B.

Electroporación de los plásmidos pCAG (REF) que portan las construcciones constitutivas activas de los receptores de tipo I en el hipocampo de ratones CD1 a tiempo P0: iresGFP (A, D), ACVR1CAiresGFP (B, D) y BMPR1BiresGFP (C, D). Los animales se sacrificaron 21 días post electroporación, se procesó el tejido y se realizó la inmunohistoquímica antiGFP para, posteriormente, evaluar el grado de maduración neuronal mediante un análisis de Sholl *in vivo* (A-C). Los datos corresponden a la media±sem de n≥4 animales. El análisis estadístico corresponde a una Ttest individual frente a su correspondiente muestra control iresGFP. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Sorprendentemente, los resultados obtenidos muestran un efecto en maduración neuronal opuesto al observado *in vitro*. En el análisis de Sholl (Figura 43) observamos una pérdida importante de los niveles de complejidad morfológica cuando

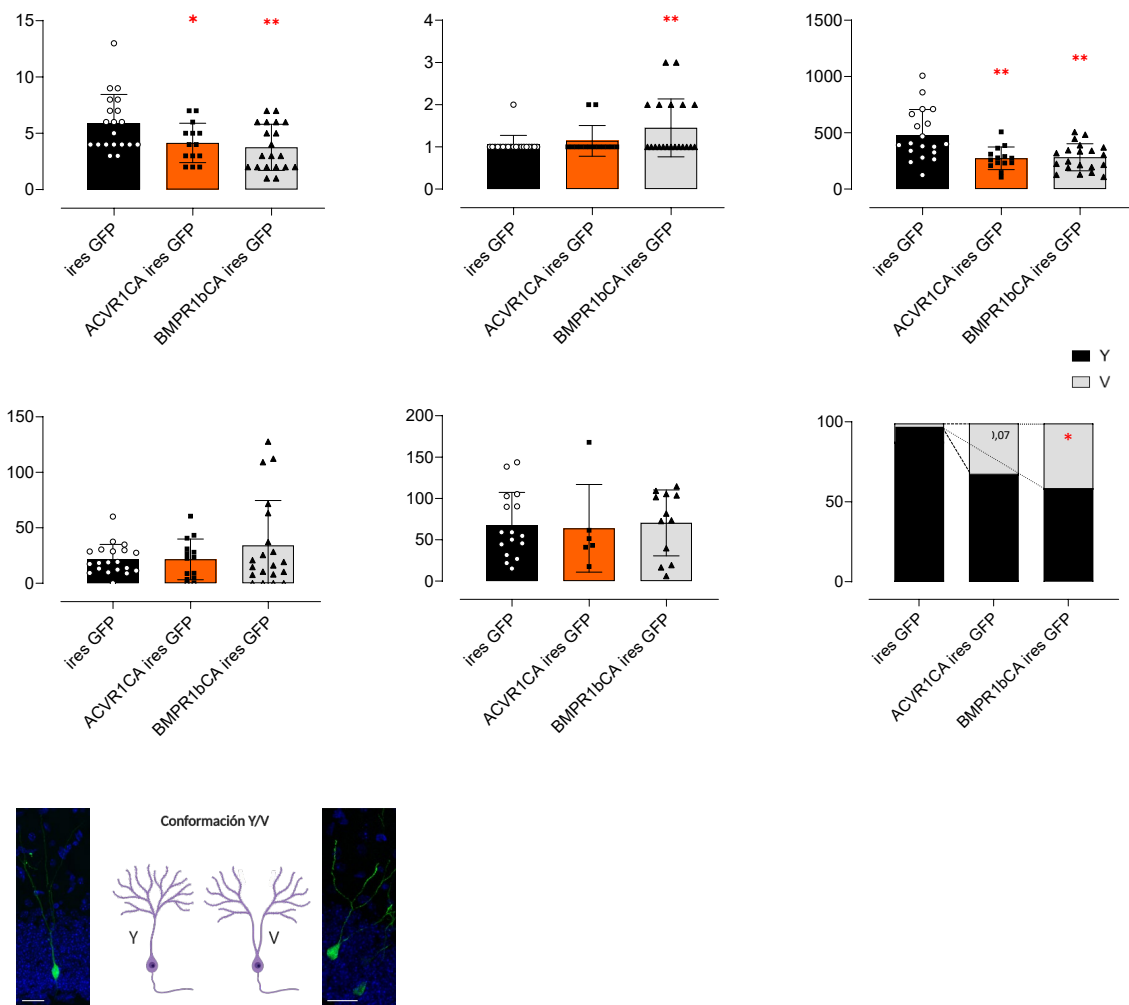


Figura 45. Análisis de las características morfológicas de las neuronas *in vivo*.

Medida de las características morfológicas de aquellas neuronas obtenidas tras la electroporación de los plásmidos pCAG ires GFP, pCAG ACVR1 ires GFP y pCAG BMPR1B ires GFP. (A) Medida del número total de end points, (B) número de dendritas primarias, aquellas que nacen del soma neuronal, (C) longitud dendrítica total, (D) longitud dendrítica apical, longitud dendrítica axonal, (F) porcentaje de aquellas neuronas que adoptan una conformación en forma de Y o V. (G) Representación gráfica de las diferentes conformaciones en 'Y' y 'V' que pueden adoptar las neuronas *in vivo*. Todas las medidas se han realizado con el programa informático Fiji (imageJ). Los datos corresponden a la media±sem de n≥4 animales. Los análisis estadísticos corresponden a una Ttest frente a su control (iresGFP). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

expresamos en las neuronas del GD las formas constitutivamente activas tanto del receptor ACVR1 como del receptor BMPR1B (Figura 43).

Realizamos también un análisis más exhaustivo de las características morfológicas de estas neuronas. *In vivo*, las neuronas granulares están muy polarizadas y es posible diferenciar claramente las dendritas del axón, así como distinguir dos morfotipos neuronales. Así pues, medimos la longitud dendrítica total, el número total de puntos finales “End points”, el número de dendritas primarias, la longitud de la dendrita apical, la longitud del axón, la proporción de neuronas que adoptan una estructura o morfotipo en ‘V’ o ‘Y’, la migración dentro de la capa granular y el número y tipo de espinas que presentan (ver Figura 18 de Materiales y Métodos para un esquema).

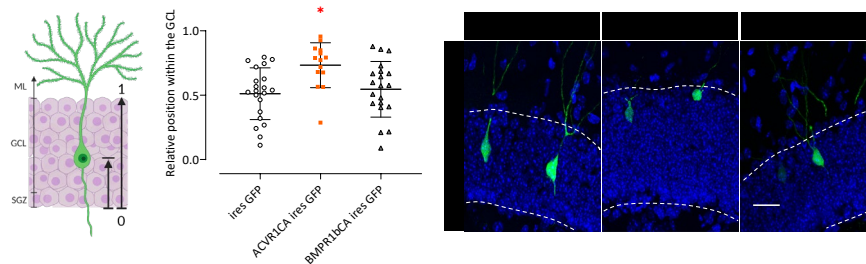


Figura 46. Análisis de las características morfológicas de las neuronas *in vivo*, migración neuronal. Análisis de la migración de las neuronas de nueva generación a lo ancho de la capa granular del giro dentado en los ensayos de maduración *in vivo*. (A) Esquema representativo de la medida empleada para calcular la migración neuronal a lo largo de la capa granular del giro dentado. (B) Medida de la migración neuronal a lo largo de la capa granular del giro dentado para neuronas electroporadas con los plásmidos ires GFP, ACVR1CA ires GFP y BMPR1bCA ires GFP respectivamente. (C) Representación gráfica de una inmunohistoquímica frente a GFP utilizadas para el cálculo de la migración neuronal. Todas las medidas se han realizado con el programa informático Fiji (imageJ). Los datos corresponden a la media±sem de n≥4 animales. Los análisis estadísticos corresponden a una Ttest frente a su control (iresGFP). * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

Todos los resultados que hemos obtenido apuntan a una pérdida de la maduración neuronal o una desregulación de los parámetros morfológicos normales de una neurona granular del GD. Tanto cuando sobreexpresamos ACVR1A-CA como BMPR1B-CA, observamos una disminución del número de puntos finales (Figura 45 A), lo que indica una menor ramificación del árbol dendrítico. También observamos en ambos casos una disminución de la longitud dendrítica total (Figura 44 C). Curiosamente se observa una desregulación exclusiva del número de dendritas primarias que presentan las neuronas al sobreexpresar el receptor BMPR1B-CA, que aumenta significativamente (Figura 45 B). En ambos casos podemos observar una disminución de la conformación en 'Y' y un aumento de la forma en 'V' (Figura 45 F, G) que llega a ser significativo para el caso de la sobreexpresión de BMPR1B-CA, en concordancia con el aumento en el número de neuritas primarias. De la misma forma, también se puede observar una desregulación de la migración a lo largo de la capa granular. Las neuronas que han sido electroporadas con ACVR1A-CA migran más y se posicionan más cerca de la capa molecular que el resto de condiciones (Figura 46 A-C). Por otro lado, se analizaron las espinas dendríticas de las neuronas GFP⁺. Las espinas dendríticas son pequeñas protuberancias formadas en la superficie de la membrana dendrítica capaces de establecer contactos funciones con los axones de las neuronas vecinas. Se trata de estructuras muy plásticas capaces de variar su tamaño y forma en función de la actividad neuronal (Pchitskaya E. y Bezprozvanny I., 2020). Se clasifican en cuatro tipos fundamentales en función de las características que presente su cabeza y cuello: fungiformes (en inglés "mushroom"), en copa (en inglés "thin"), pequeñas (en inglés "stubby") y filopoides (en inglés "filopoides"). Sin embargo, son las espinas fungiformes las que forman parte de la memoria a largo plazo, ya que son capaces de formar una conexión sináptica más fuerte y presentan una vida media mayor que el resto de tipos (Bourne J. y Harris KM., 2007; Pchitskaya E. y Bezprozvanny I., 2020). Las neuronas granulares del GD reciben inputs glutamatérgicos en las espinas dendríticas, por lo que la aparición de estas estructuras refleja una transición madurativa importante de estas neuronas. En el cerebro adulto, las espinas de las nuevas neuronas comienzan a aparecer a día 16 tras el nacimiento de las neuronas, aumentando su número de forma muy notable a día 21-28, cuando se produce, además, un incremento en las espinas de

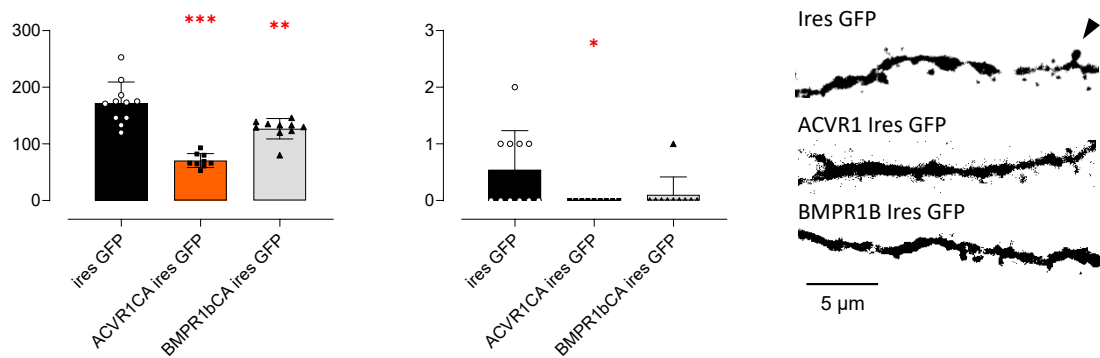


Figura 47. Análisis de las espinas dendríticas *in vivo*.

Análisis morfológico de las espinas dendríticas de las neuronas obtenidas en los ensayos de maduración *in vivo*. (A) Número de espinas dendríticas totales por cada 100 μm. (B) Número de espinas fungiformes por cada 100 μm. (C) Imágenes representativas de segmentos dendríticos de las neuronas GFP⁺ a P21. Se muestran ejemplos de las espinas fungiformes (punta de flecha) halladas en los ensayos de maduración *in vivo*. Todas las medidas se han realizado con el programa informático Fiji (imageJ). Los datos corresponden a la media ± sem de n ≥ 4 animales. Los análisis estadísticos corresponden a una Ttest frente a su control (iresGFP).

tipo fungiforme (Zhao C. *et al.*, 2006). Como se muestra en la [figura 47](#), al electroporar las construcciones constitutivamente activas de los receptores ACVR1A y BMPR1B podemos observar una disminución del número total de espinas ([figura 47 A](#)), así como una disminución del número de espinas fungiformes ($\pi \times D_{\text{mayor}} \times D_{\text{menor}} / 4 \geq 0,4 \mu\text{m}^2$) que presentan las dendritas ([Figura 47 B-C](#)).



6.1. El efecto de la proteína BMP6 durante el envejecimiento.

Tal y como se ha comentado en la introducción, los niveles de BMP6 aumentan en el hipocampo durante el envejecimiento. En concreto, en animales del modelo de senescencia SAMP8 dicho aumento se detecta ya a 2 meses de edad y correlaciona con una pérdida de la población de células madre (Díaz-Moreno M. *et al.*, 2018). Para caracterizar mejor la función de BMP6, en el último bloque experimental de la tesis decidimos evaluar el efecto que tiene la proteína BMP6 sobre las células madre y progenitores del hipocampo adulto (AH-NSPCs) *in vitro*.

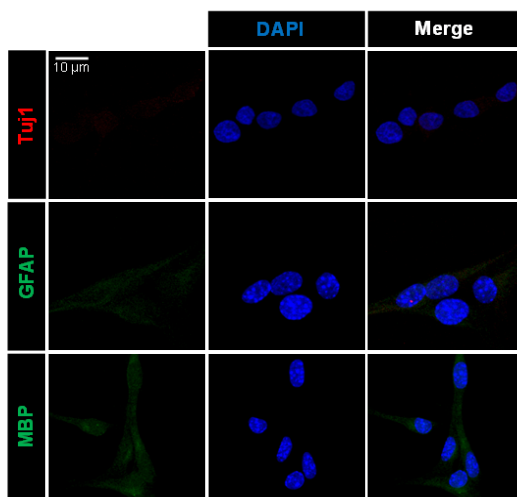
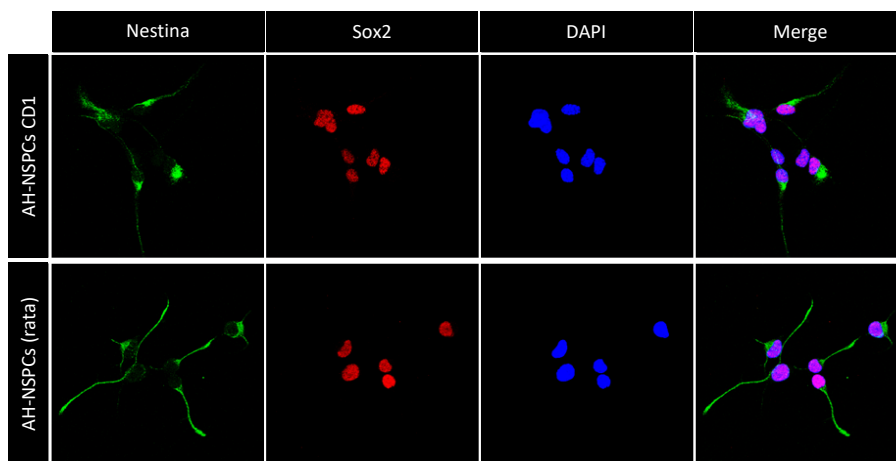


Figura 48. Caracterización de la línea primaria de células AH-NSPC CD1.

Immunocitoquímica frente a Nestina y Sox2 (A), marcadores que identifican a las células madre neurales, tanto para la línea primaria de células de ratón, AH-NSPC CD1, como para las células AH-NSPC HC7, de rata empleadas a lo largo de la tesis. (B) Immunocitoquímica frente a los marcadores de los tres linajes neurales: Tuj1, neurona; GFAP, astrocito; MBP, oligodendrocito. Como se puede ver en la figura, las células AH-NSPC CD1 crecidas con mitógenos son negativas para los tres linajes, por lo que conseguimos mantenerlas en un estado indiferenciado de célula madre y progenitor.

Para acercarnos lo más posible al efecto *in vivo*, decidimos extraer células madre y progenitores hipocampales de ratones wild type adultos Crl:CD1 de 2 meses de edad,

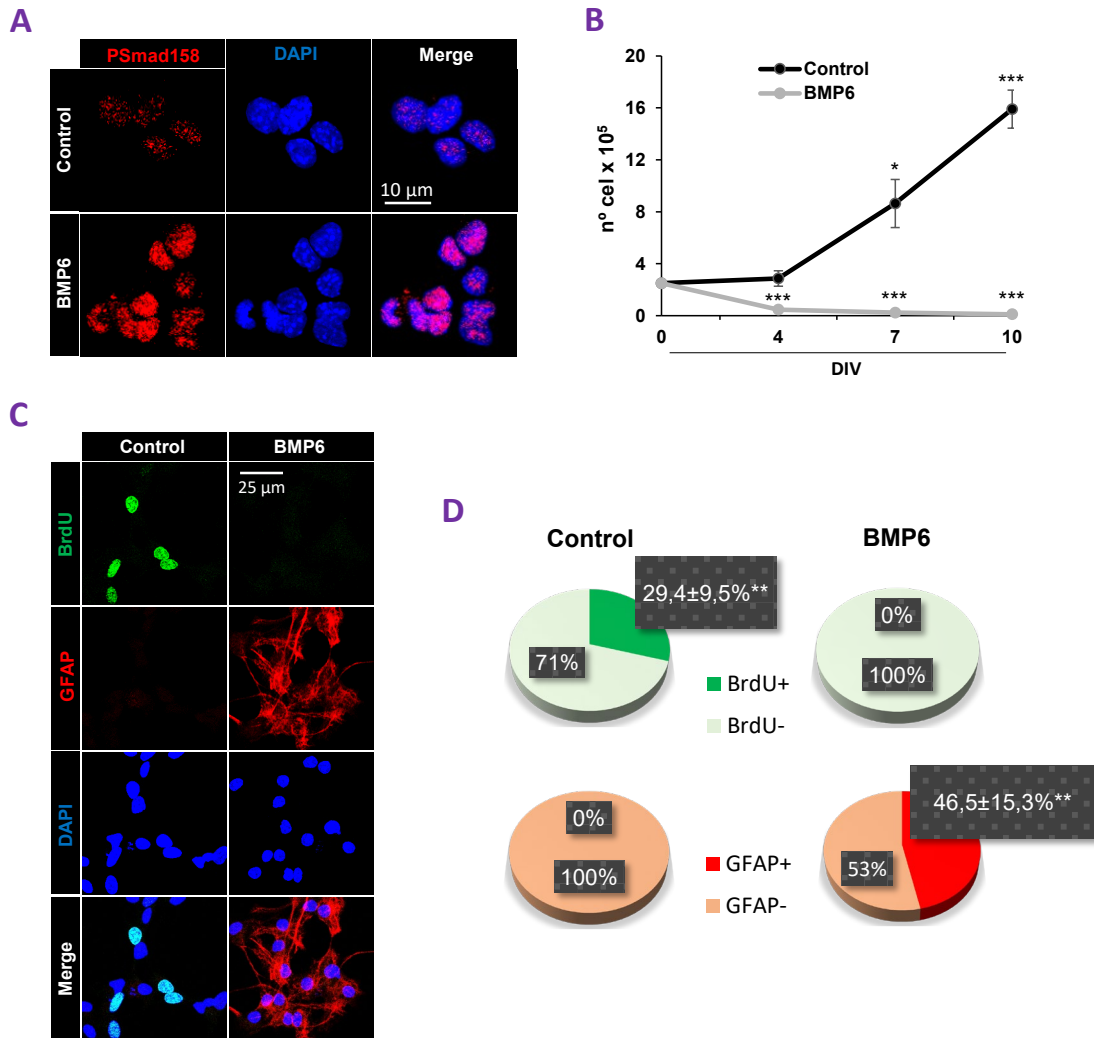


Figura 49. BMP6 induce la salida de ciclo celular de AH-NSPCs de CD1.

Cultivamos AH-NSPCs provenientes de animales CD1 en presencia de 10 ng/ml de FGF2 y 10 ng/ml de EGF y presencia o ausencia de 50 ng/ml de la proteína BMP6 hasta un total de 10 DIV. **(A)** Inmunocitoquímica frente a la forma fosforilada de SMAD1/5/8 realizada sobre AH-NSPCs de CD1 tras 4 DIV de cultivo en presencia o ausencia de BMP6 mostrando que dicha proteína induce la señalización de la vía canónica y, por tanto, la fosforilación de SMAD1/5/8 en el núcleo. **(B)** Cinética de crecimiento de las células AH-NSPCs de CD1 hasta un total de 10 DIV. Como se puede observar en la figura, la presencia de BMP6 induce la salida del ciclo celular y, por tanto, la extinción del cultivo con los sucesivos pases celulares. **(C)** Inmunocitoquímica frente a BrdU (células proliferativas) y GFAP (astrocitos) tras 4 DIV de cultivo en presencia o ausencia de BMP6, y su respectivo contaje **(D)**. Estos resultados muestran como la presencia de BMP6 es suficiente para reducir el número de células positivas para BrdU a un 0% y aumentar el número de células positivas para GFAP. Barra escala en A, 10µm. Barra escala en C, 25µm. En B, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ mediante ANOVA de una vía.

expandirlas en presencia de los mitógenos FGF2 y EGF, y diseñar una serie de experimentos *in vitro*. Una vez establecida la línea de AH-NSPCs murinas, lo primero que hicimos fue verificar la identidad de dichas células, para ello realizamos una inmunofluorescencia frente a Nestina y Sox2, comprobando así que estas células (AH-NSPC CD1) expresan marcadores de célula madre y progenitores neurales (Figura 48 A), al igual que la línea de AH-NSPCs de rata empleada en los capítulos anteriores de la tesis. De la misma forma, comprobamos que estas células no están diferenciadas, ya que son

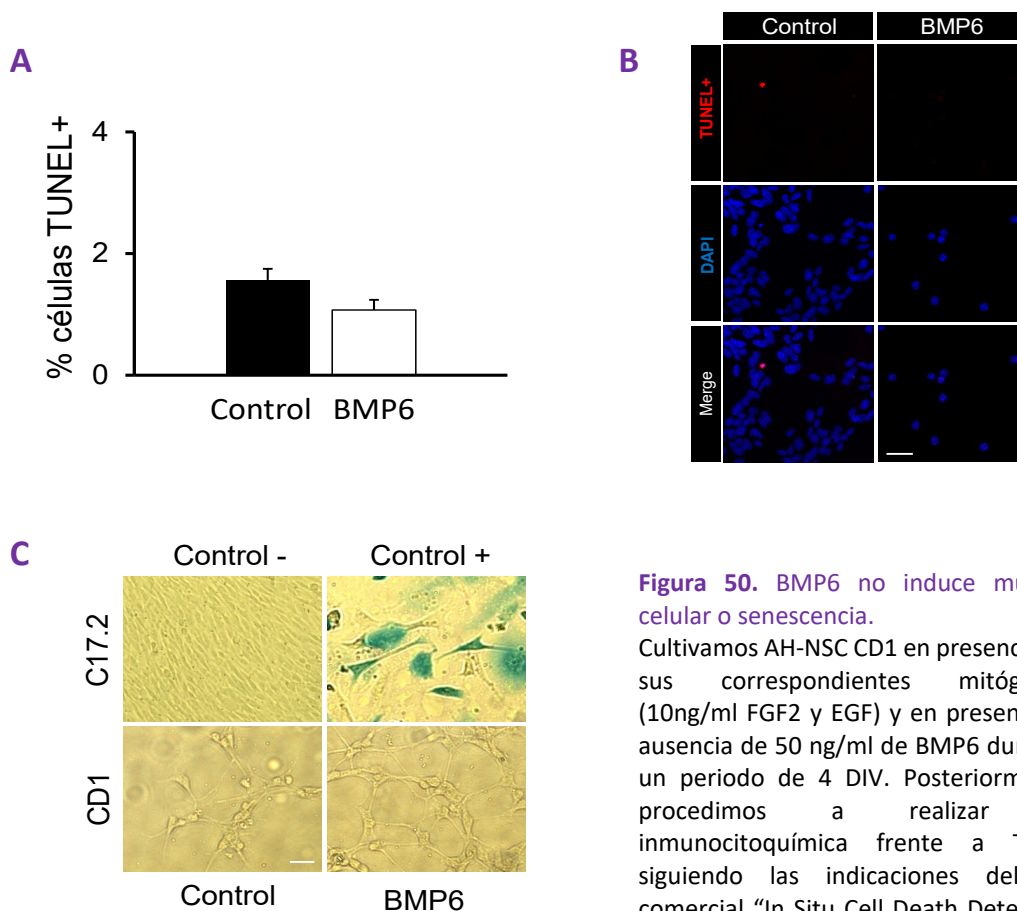


Figura 50. BMP6 no induce muerte celular o senescencia.

Cultivamos AH-NSC CD1 en presencia de sus correspondientes mitógenos (10ng/ml FGF2 y EGF) y en presencia o ausencia de 50 ng/ml de BMP6 durante un periodo de 4 DIV. Posteriormente procedimos a realizar la inmunocitoquímica frente a TUNEL siguiendo las indicaciones del kit comercial "In Situ Cell Death Detection Kit" (Roche, 11684795910). Como se puede observar en la figura no observamos diferencias en las células

TUNEL+ entre el control y aquellas células tratadas con BMP6 (media±sem, n=4) (A). (B) Ejemplo de la inmunocitoquímica frente a TUNEL (Rojo), DAPI fue utilizado como marcador del número total de células (Azul). (C) Ensayo para la detección de β-galactosidasa asociada a senescencia (SA-β-gal), utilizando células C17.2 tratadas con H₂O₂ como control positivo y c17.2 sin tratar como control negativo del experimento. Como se puede observar, las células AH-NSPCs CD1 son negativas para SA-β-gal tanto en ausencia como en presencia de BMP6. Barra escale en B, 25µm. Barra escala en C, 100µm.

negativas para los marcadores de los tres principales linajes neurales (Tuj1, neurona inmadura; GFAP, astrocito; MBP, oligodendrocito; [Figura 48 B](#)).

Así pues, diseñamos unos experimentos para dilucidar el efecto de la proteína BMP6 en estas células madre del hipocampo. Para ello, mantuvimos dichas células en proliferación con sus correspondientes mitógenos (10 ng/ml EGF y 10 ng/ml FGF2) y en presencia o ausencia de 50 ng/ml de BMP6. Como se puede observar en la [Figura 49](#), la presencia de BMP6 induce la activación de la ruta canónica de las BMPs mediada por las proteínas SMAD, aumentando los niveles de la forma fosforilada de SMAD1/5/8 en el núcleo de las AH-NSPCs ([Figura 49 A](#)), y promoviendo el que las células hipocampales salgan de ciclo, perdiendo por completo su marcaje de BrdU (porcentaje de AH-NSPCs BrdU⁺: 29,4±9,5 en el control frente a 0% en el tratamiento con BMP6) ([Figura 49 C, D](#)). Por esta razón, si intentamos mantener un cultivo celular de AH-NSC CD1 este se agota en presencia de BMP6, incluso en presencia de los correspondientes mitógenos ([Figura 49 B](#)).

Sin embargo, la presencia de BMP6 aumenta el porcentaje de células marcadas con GFAP (porcentaje de AH-NSPCs GFAP⁺BrdU⁻: 0% en el control frente a 46,5±15,3% en el tratamiento con BMP6), indicando que las células se diferencian al linaje astrogliar ([Figura 49 C, D](#)). Para comprobar que la extinción del cultivo de AH-NSPCs CD1 que observamos en el experimento anterior se debe únicamente a la salida de ciclo consecuencia de la presencia de BMP6, decidimos realizar una serie de experimentos para corroborar si esta proteína está produciendo otro tipo de efecto como la apoptosis (células TUNEL⁺) o la senescencia (células positivas para la actividad enzimática β-galactosidasa asociada a senescencia, SA-β-gal⁺). Los resultados obtenidos en ambos casos muestran que la presencia de proteína BMP6 no tiene ningún efecto en la muerte celular por apoptosis (AH-NSC CD1 positivas para Tunel: 1,56±0,18% en el control frente al 1,07±0,16% en el tratamiento con BMP6) ([Figura 50 A, B](#)) ni induce la senescencia de las células (células SA-β-gal⁺) ([Figura 50 C](#)). Como control positivo de la reacción SA-β-gal, se indujo la senescencia mediante estrés oxidativo en la línea de NSCs c17.2. Los experimentos anteriores indican que la BMP6 promueve la astrogliogénesis de los cultivos de AH-NSPCs murinas, limitando su expansión, de forma similar a lo que sucede

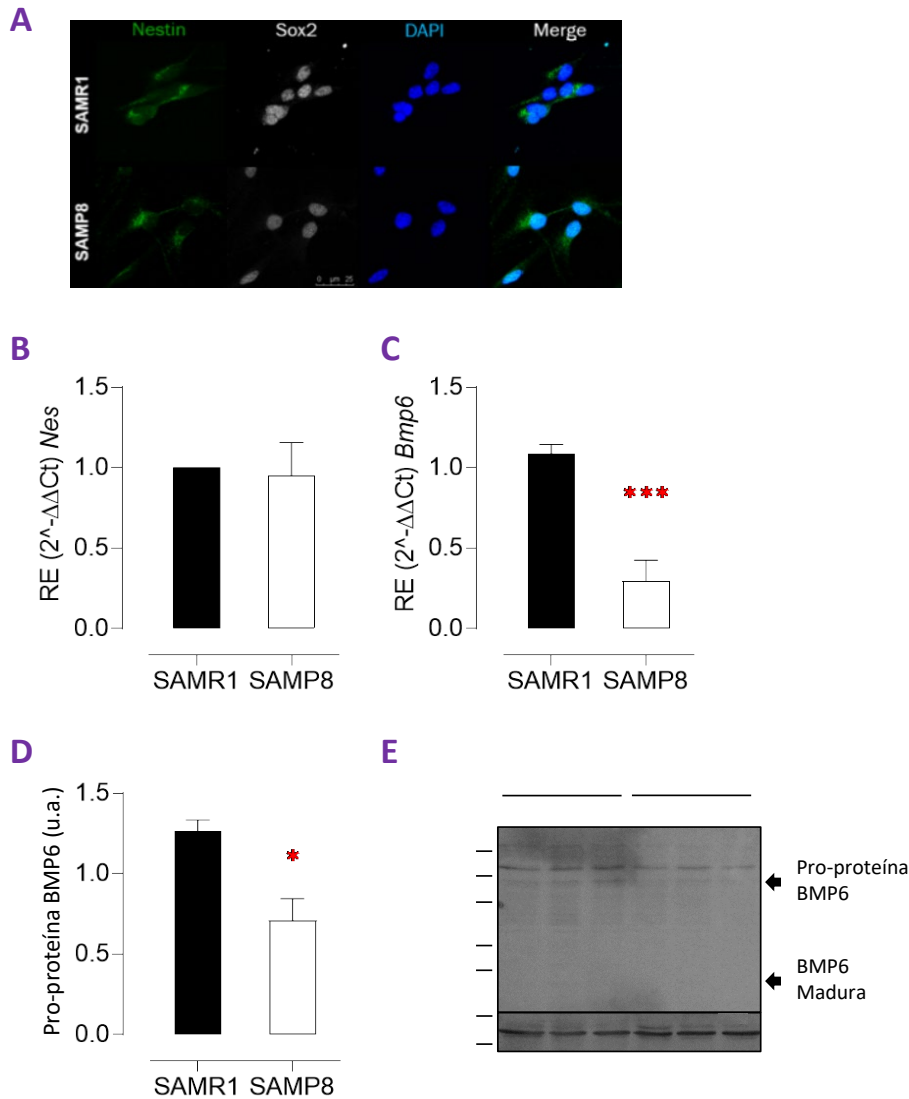


Figura 51. La expresión de BMP6 está reducida en AH-NSPCs de SAMP8.

Establecimos unos cultivos primarios de células madre y progenitores hipocampales de animales SAMR1 y SAMP8. **(A)** Inmunoquímica mostrando que dichos cultivos son positivos para Nestina (Verde) y Sox2 (Rojo Lejano), marcadores específicos para células madre neurales. PCR cuantitativa mostrando los niveles de mRNA de AH-NSPCs de SAMP8 frente a AH-NSPCs de SAMR1 para los genes de Nestina **(B)** y Bmp6 **(C)**. **(D, E)** Western-blot frente a la proteína BMP6, tanto en su forma inmadura como madura. Como se puede observar, los niveles de expresión de BMP6 son menores en AH-NSC SAMP8 tanto a nivel de mRNA como a nivel de proteína. Todos los datos corresponden a la media±sem, de n≥3 experimentos independientes. Barra escala en A, 25μm. En C y D, *p<0,05, ***p<0,001 resultado de una Ttest.

in vivo en el GD de los animales SAMP8 a 2 meses de edad.

Para estudiar si el efecto producido por la BMP6 que hemos observado en experimentos anteriores y que se observa también *in vivo* en SAMP8 puede ser de tipo autónomo celular, es decir, producido por la BMP6 expresada por las propias AH-NSPCs,

o si, por el contrario, es producido por la BMP6 proveniente del nicho, quisimos establecer unos cultivos primarios de células provenientes del giro dentado de ratones SAMP8 y SAMR1 de 2 meses de edad y realizar un estudio sobre ellas.

En primer lugar, caracterizamos cultivos para comprobar la identidad de las células extraídas. Para ello realizamos una inmunocitoquímica frente a Nestina y Sox2, marcadores de células madre neurales (Figura 51 A), verificando que las AH-NSPCs de SAMR1 Y SAMP8 los expresan.

Por otro lado, mediante RT-qPCR, pudimos observar que los niveles de mRNA para Nestina son similares tanto en células madre hipocampales provenientes de animales SAMR1 como SAMP8 (Figura 51 B), sin embargo, los niveles de mRNA BMP6 descienden de manera notable en los cultivos de SAMP8 (descenso de $0,29\pm 0,26$ con respecto a su control SAMR1, Figura 51 C). De la misma forma, encontramos una disminución en los niveles de BMP6 en su forma de pro-proteína en los cultivos de animales SAMP8 con respecto a los SAMR1 ($0,70\pm 0,13$ veces frente a SAMR1, Figura 51 D, E). De este bloque de experimentos pudimos concluir que la expresión endógena de BMP6 en las células AH-NSPCs de SAMP8, tanto a nivel de RNA mensajero como de proteína, es muy pequeña y, además, que la expresión de BMP6 en su forma madura es prácticamente despreciable (Figura 51 E). Por tanto, no parece que la BMP6 pueda tener un papel de tipo autónomo celular que explique el fenotipo de los animales SAMP8 a nivel del nicho hipocampal.

Por otro lado, en nuestro estudio también pudimos observar que las AH-NSC provenientes del hipocampo de ratones SAMP8 expanden de manera más lenta (Figura 52 A) y tienen una menor tasa de incorporación de BrdU (disminución de $0,71\pm 0,09$ veces, Figura 52 B) comparadas con sus controles AH-NSC SAMR1. Sin embargo, no somos capaces de observar diferencias significativas en el número de células positivas para el marcador de ciclo celular Ki67 (Figura 52 C), ni en la apoptosis o la necrosis medida mediante citometría de flujo con AnexinaV y yoduro de propidio (PI) (Figura 52 E).

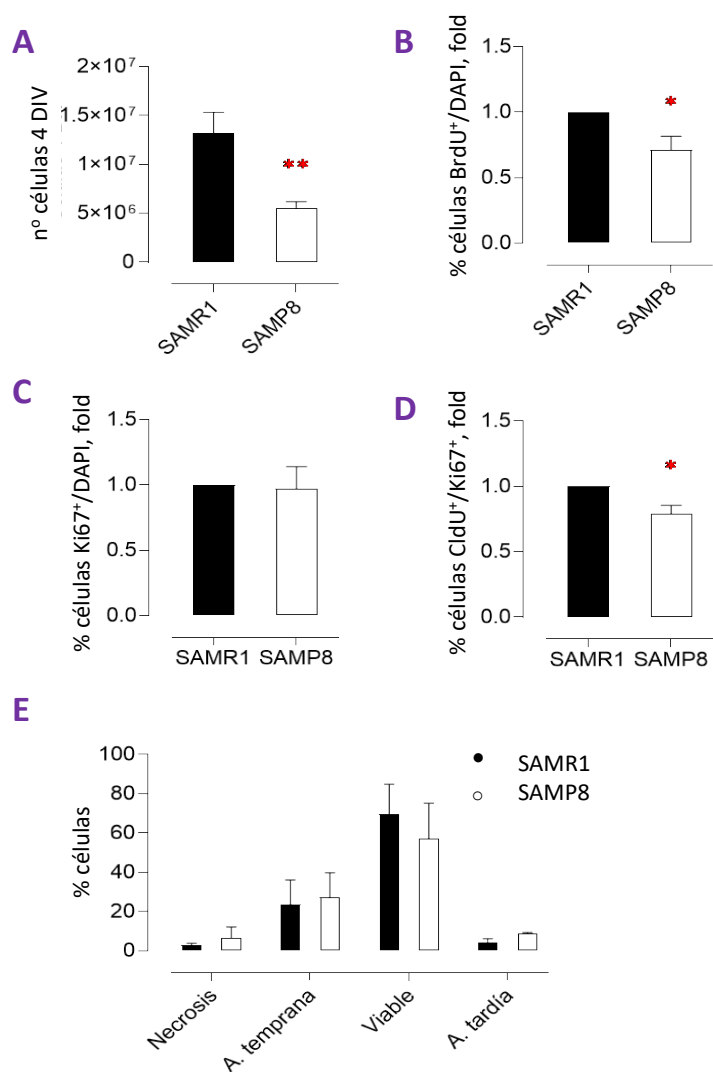


Figura 52. Las AH-NSPCs de SAMP8 tienen una tasa de crecimiento inferior a las SAMR1.

(A) Cuantificación del número de células obtenidas tras sembrar y cultivar durante 4 DIV 1500000 células tanto AH-NSPCs de SAMR1 como SAMP8, en medio de crecimiento suplementado con los correspondientes mitógenos: 20 ng/ml FGF2 y 20 ng/ml EGF. Los datos corresponden a la media±sem de n=9 experimentos.

(B) Porcentaje de células positivas para BrdU para ambos cultivos con presencia de mitógeno (10 ng/ml FGF2, 10ng/ml EGF) (media±sem, n≥4). (C) Porcentaje de células positivas para Ki67 de AH-NSC SAMP8 y SAMR1 en presencia de 10ng/ml FGF2/EGF (media±sem, n=3). (D) Ratio CldU/Ki67 en cultivos de AH-NSC SAMP8 y AH-NSC SAMR1 en presencia de 10 ng/ml FGF2/EGF (media±sem,

n=3). (E) Porcentaje de células viable (AnnexinaV-PI-), necróticas (AnnexinV-PI+), apoptóticas tempranas (AnnexinV+PI-) y tardías (AnnexinV+PI+) en cultivos de AH-NSC SAMP8 y SAMR1 crecidas en la presencia de mitógenos (10 ng/ml FGF2/EGF) medidas por citometría de flujo (media±sem, n=3). La estadística corresponde a una Ttest frente a su correspondiente control, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Finalmente, analizamos el porcentaje de células Ki67⁺ (en ciclo) que incorporan el análogo de timidina CldU en fase S como una medida que indica un posible alargamiento del ciclo celular, o alternativamente, un acortamiento de la fase S. Las AH-NSPCs de SAMP8 muestran una reducción de $0,79 \pm 0,04$ veces en el porcentaje de células CldU⁺/Ki67⁺ respecto a las AH-NSPCs de SAMR1, que puede explicar la menor expansión de los cultivos de los animales senescentes.

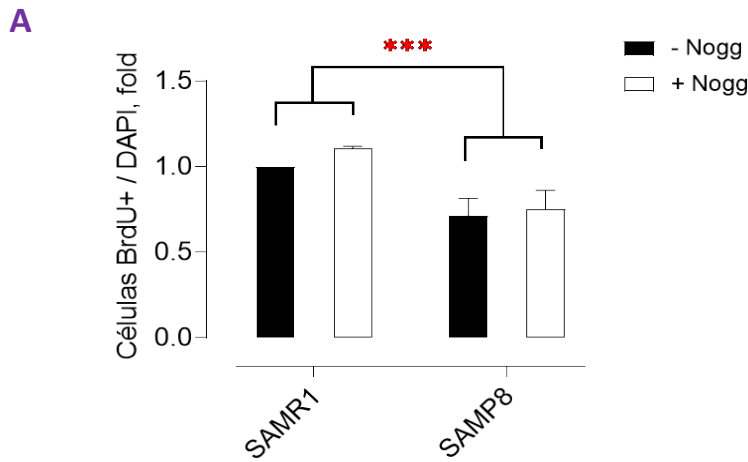
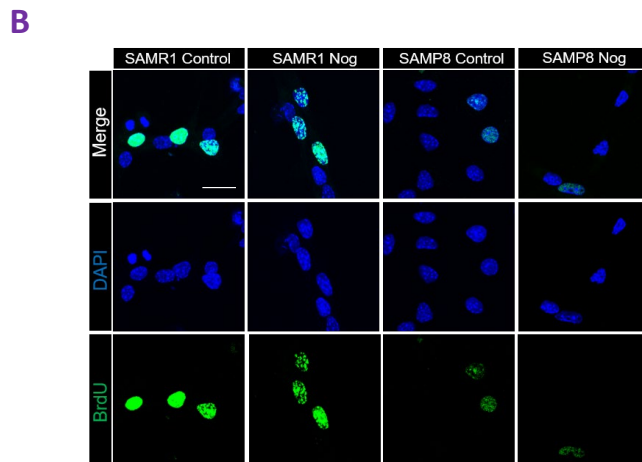


Figura 53. La proliferación de AH-NSPCs SAMP8 y SAMR1 no es afectada por Noggin.

Cultivamos AH-NSPCs SAMP8 y SAMR1 en presencia de 10 mg/ml FGF2 y EGF y en presencia o ausencia de 25 ng/ml del inhibidor de las BMPs Noggin. Las células fueron fijadas tras 4 días in vitro (DIV). (A) Porcentaje de células AH-NSPCs SAMP8 y SAMR1 positivas para BrdU. Los datos están expresados en fold relativo a la muestra correspondiente a AH-NSPCs SAMR1 sin tratar y corresponden a la media±sem, de n=4 experimentos



(B) Imágenes representativas de la inmunocitoquímica frente a BrdU (Verde). Se uso como marcaje nuclear DAPI (Azul). Barra de escala en B, 25 μm. La estadística corresponde a una Ttest, ***p<0,001.

Para intentar descartar que si la diferencia en proliferación encontrada entre los cultivos de AH-NSC SAMP8 y SAMR1 se deba a las proteínas BMPs decidimos tratar ambos cultivos con Noggin, un inhibidor específico de esta vía de señalización que es capaz de secuestrar los ligandos (BMPs). Como se puede observar en la **Figura 53**, no encontramos diferencias significativas entre tratar o no estos cultivos con Noggin (**Figura 53 A, B**).

Los experimentos anteriores indican que la menor tasa de proliferación que presentan las AH-NSPC de SAMP8 no está ocasionada por un efecto autónomo celular, relacionado con la propias BMPs expresadas por las células. Decidimos comprobar si el tratamiento de las AH-NSPCs de SAMR1 y SAMP8 con BMP6 exógena limita la expansión

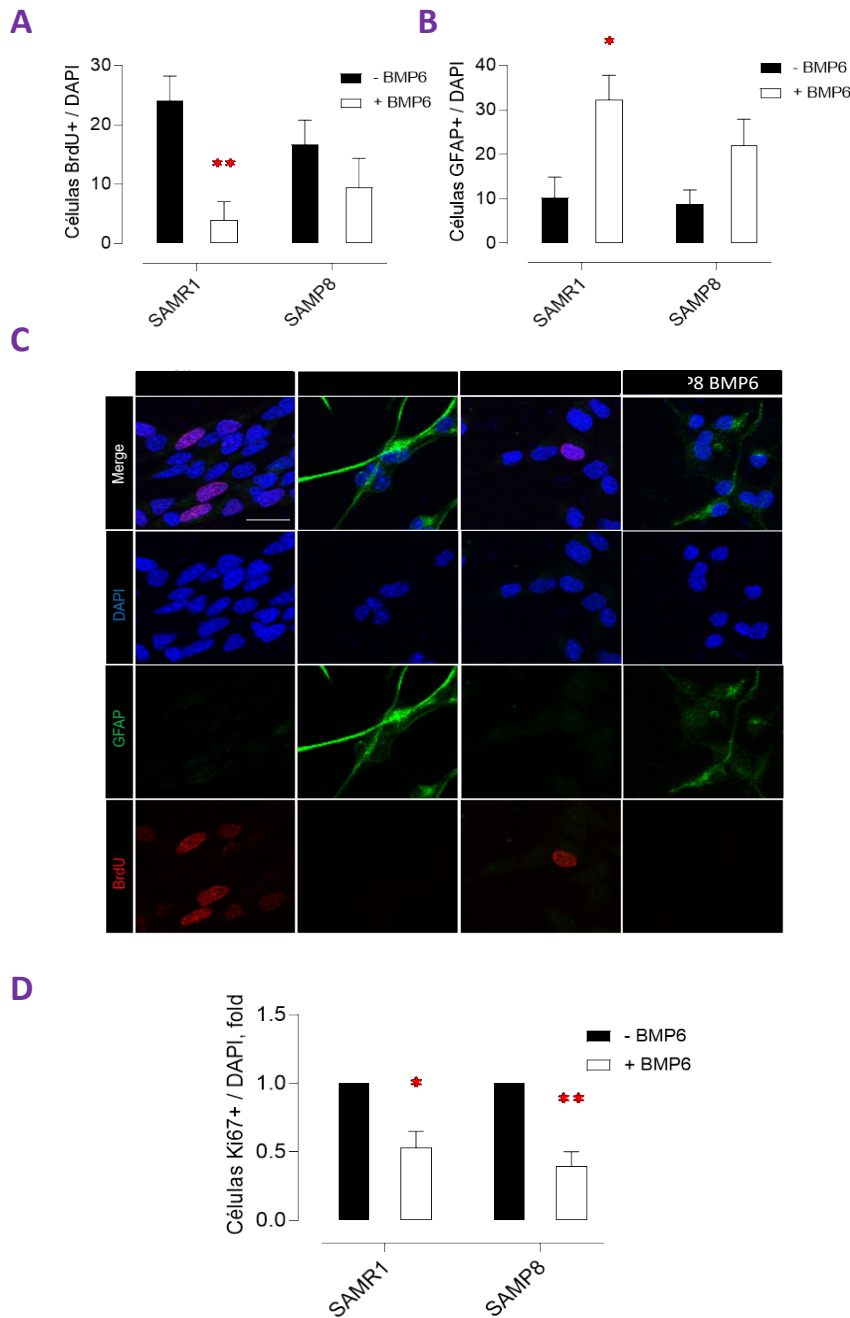


Figura 54. AH-NSC SAMP8 y SAMR1 responden a un estímulo de BMP6 de la misma manera. Cultivamos AH-NSC SAMP8 y AH-NSC SAMR1 durante 4 DIV en presencia de 10 ng/ml de FGF2 y 10 ng/ml de EGF, y, además, en presencia o ausencia de 50 ng/ml de BMP6. **(A)** Recuento de células positivas para BrdU tras la inmunocitoquímica frente a dicho epítipo en presencia de mitógenos (10 ng/ml FGF2 y EGF) y 50 ng/ml de BMP6 tanto para AH-NSC SAMP8 y SAMR1. Los datos corresponden a la media±sem, n=3. ** $p < 0,01$ por una Prueba T. **(B)** Recuento de células positivas para GFAP en presencia de mitógenos (10 ng/ml FGF2 y EGF) y ausencia de 50 ng/ml de BMP6 tanto para AH-NSC SAMP8 y SAMR1 (media±sem, n=3). * $p < 0,05$ Prueba T. **(C)** Imágenes representativas de la inmunocitoquímica frente a BrdU (Rojo) y GFAP (Verde) para ambos cultivos celulares. Se usó DAPI como marcaje nuclear (Azul). **(D)** Recuento de células positivas para Ki67 tras cultivar AH-NSC SAMP8 y AH-NSC SAMR1 en presencia de 10 mg/ml de FGF2 y EGF y presencia o ausencia de 50 ng/ml de BMP6. Los datos corresponden a la media±sem representada en fold respecto a su correspondiente muestra sin tratar, n=4. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ mediante una Prueba T pareada. Barra de escala en B, 25 μm.

de los cultivos y promueve la astrogliogénesis, al igual que sucede con las AH-NSPCs de animales wild type CD1. Para ello cultivamos AH-NSPC de SAMP8 y SAMR1 en presencia

de sus correspondientes mitógenos (FGF2/EGF) y 50 ng/ml de la proteína BMP6.

Como se puede observar en los datos mostrados en la [Figura 54](#), tanto en las AH-NSPCs de SAMP8 como en las de SAMR1 disminuyen el marcaje para BrdU en presencia de BMP6 y, por tanto, disminuye su capacidad proliferativa ($24,06 \pm 4,17\%$ control frente a $3,94 \pm 3,12\%$ tratado con BMP6 para AH-NSPCs SAMR1, y $16,75 \pm 4,01\%$ control frente a $9,48 \pm 4,87\%$ tratado con BMP6 en el caso de AH-NSPCs de SAMP8; [Figura 54 A](#)). De la misma manera podemos observar que la presencia de BMP6 aumenta el porcentaje de células positivas para el marcador de astrogliá, GFAP ($10,27 \pm 4,58\%$ control frente a $32,28 \pm 5,43\%$ tratadas con BMP6 para AH-NSPCs de SAMR1, y $8,77 \pm 3,17\%$ control frente a $21,93 \pm 5,95\%$ tratadas con BMP6 en el caso de AH-NSPCs de SAMP8; [Figura 54 B](#)). Cabe destacar que, en ambos casos, tanto para la disminución de células BrdU+ como para el aumento de células GFAP+, es más acusado el efecto observado para las células AH-NSPCs de SAMR1 que para las SAMP8. Por último, también pudimos observar que la presencia de BMP6 reduce el número de células positivas para Ki67 en las dos líneas celulares, lo que corrobora los datos anteriores (disminución de $0,53 \pm 0,11$ veces y $0,39 \pm 0,10$ veces para AH-NSPCs de SAMR1 y SAMP8 tratadas con BMP6 respectivamente; [Figura 54 D](#)). Todos los experimentos anteriores apuntan a que, al menos *in vitro*, tanto las AH-NSPCs de SAMR1 como las AH-NSPCs de SAMP8 responden de la misma manera a un aporte exógeno de BMP6.

Por tanto, podemos concluir que la pérdida de células madre en etapas adultas en los ratones con envejecimiento acelerado y su diferenciación a astrogliá puede deberse a un efecto no autónomo celular provocado por un estímulo de BMP6 exógena proveniente del nicho que, a través de la señalización canónica, fuerza a las células a entrar en un proceso pro-gliogénico. Cabe destacar que también hemos podido observar que las AH-NSPCs provenientes de ratones SAMP8 presentan un alargamiento del ciclo celular de manera intrínseca que no puede explicarse por el efecto de BMP6, pudiéndose tratar de una característica similar a las encontradas en los estudios recientes realizados en la zona subependimal o subventricular (Apostolopoulou M. *et al.*, 2017).

6.2. Las AH-NSPCs no expresan más BMP6 en animales SAMP8.

Como hemos apuntado anteriormente varios estudios han observado un aumento de la proteína BMP6 en el hipocampo con la edad del individuo (Yousef H. *et al.*, 2015; Meyers EA. *et al.*, 2016; Díaz-Moreno M. *et al.*, 2018). También se ha podido observar un aumento de esta proteína en pacientes de la enfermedad de Alzheimer, y se ha relacionado su expresión con una pérdida en los niveles de proliferación hipocampal (Li D. *et al.*, 2008; Tang J. *et al.*, 2009; Crews L. *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta todas las implicaciones de las BMPs en el proceso de neurogénesis nos propusimos explorar posibles fuentes causantes de dicho incremento de la proteína BMP6 con la edad.

Como se ha demostrado en la [Figura 51](#), cuando realizamos una PCR cuantitativa de AH-NSPCs procedentes de animales SAMP8 y SAMR1 crecidas en cultivo para *Bmp6*, observamos un descenso significativo de la expresión en las células provenientes de animales SAMP8 ([Figura 51 C](#)). Todos estos datos nos llevaron a la hipótesis de que no son las células AH-NSPCs las causantes del aumento de BMP6 en edades avanzadas.

6.3. La microglía no expresa más BMP6 en animales SAMP8.

Un estudio previo en animales viejos mostró un aumento de BMP6 en el GD de éstos y sugirió que la marca de la proteína co-localizaba con el marcador de células microgliales Iba-1 (Yousef *et al.*, 2015). Para explorar si la microglía de SAMP8 expresa mayores niveles de BMP6 extrajimos células microgliales hipocampales (CD45⁺) de animales SAMP8 y SAMR1 mediante un gradiente de percol seguido de la separación de las células CD45⁺ a través de MACS. Posteriormente, realizamos una RT-qPCR cuantitativa para *Bmp6* ([Figura 55 A](#)). Los resultados obtenidos no muestran diferencias entre las células CD45⁺ provenientes de los hipocampos de animales SAMP8 y SAMR1, lo que sugiere que la microglía no es la responsable del aumento de la proteína BMP6 en animales adultos.

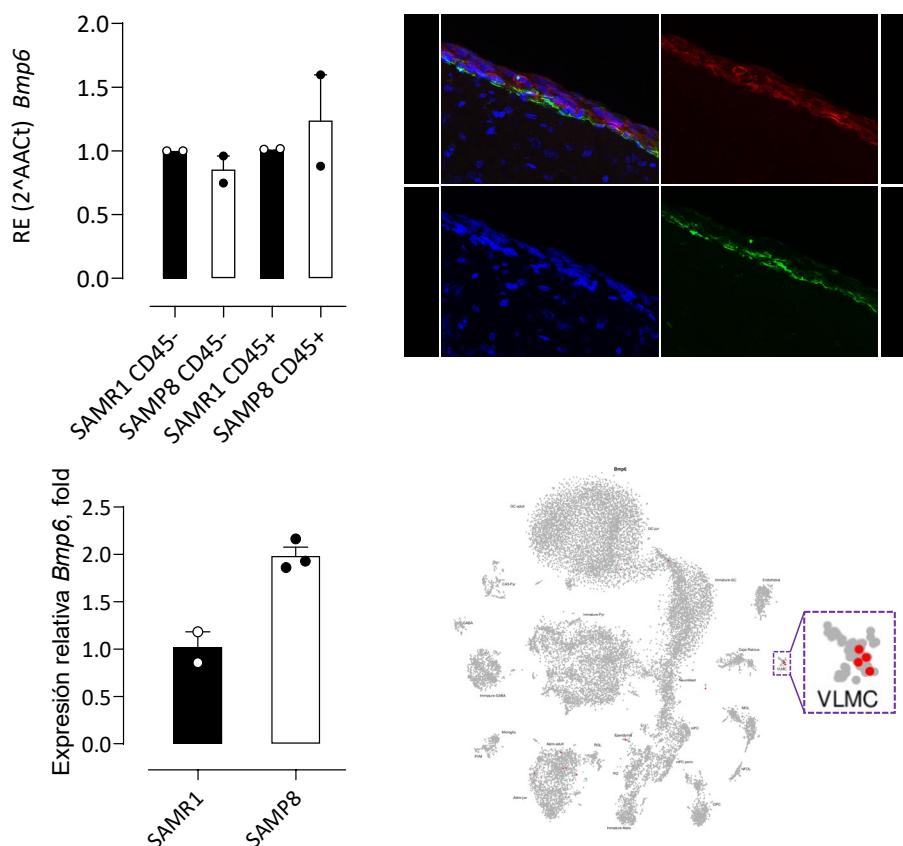


Figura 55. Expresión de BMP6 durante el envejecimiento.

La figura muestra la expresión de BMP6 de las AH-NSPCs y la microglía de animales SAMP8 y SAMR1. **(A)** PCR cuantitativa para *Bmp6* de AH-NSPCs CD45- y CD45+ obtenidas del hipocampo de animales SAMR1 y SAMP8. Los datos corresponden a la media±sem de una n=2. Cada experimento corresponde a un pool de células de los hipocampos de 6 animales. **(B)** Representación de los datos obtenidos para BMP6 en el análisis de “RNA seq” en cultivos gliales realizado en García-Matas S. *et al.*, 2015. En la figura se muestra un aumento de dos veces en la expresión de BMP6 en cultivos gliales de animales SAMP8 frente a SAMR1. **(C)** Inmunofluorescencia de un corte de tejido procedente del cerebro de animales Crl:CD1 de 21 días de edad mostrando la colocalización de la proteína BMP6 (Rojo) y las meninges, Laminin (Verde). Se utiliza DAPI (Azul) como marcaje nuclear. **(D)** Representación de los datos obtenidos para BMP6 en el análisis “single-cell RNA seq” para animales jóvenes realizado en Zeisel A. *et al.*, 2015. En la figura se puede observar como las células VLMC (del inglés, Vascular Leptomeningeal Cells) son las únicas células que expresan BMP6 a niveles detectables junto con alguna célula astrogliar.

6.4. Aumento de la proteína BMP6 sistémica en animales adultos.

Aunque ni las células madre ni la microglía parecen responsables del aumento de BMP6 en el hipocampo de animales SAMP8 adultos respecto a los SAMR1, otros tipos

celulares podrían estar secretando BMP6. En este sentido, estudios de RNAseq de astrocitos de SAMP8 muestran un incremento en el mRNA de BMP6 cuando se compara con astrocitos de SAMR1 (García-Matas S. *et al.*, 2015) (Figura 55 B). Además, analizamos la posible expresión de BMP6 en las meninges, ya que en estudios previos se ha podido observar su expresión por las células VLMC (del inglés, Vascular leptomeningeal cells) (Zeisel A. *et al.*, 2015) (Figura 55 D). En ese sentido realizamos una inmunofluorescencia frente a las proteínas BMP6 y Laminin en animales de 21 días de edad. Como se puede observar en la figura 55 C ambas proteínas parecen colocalizar, corroborando los datos obtenidos por Zeisel A.

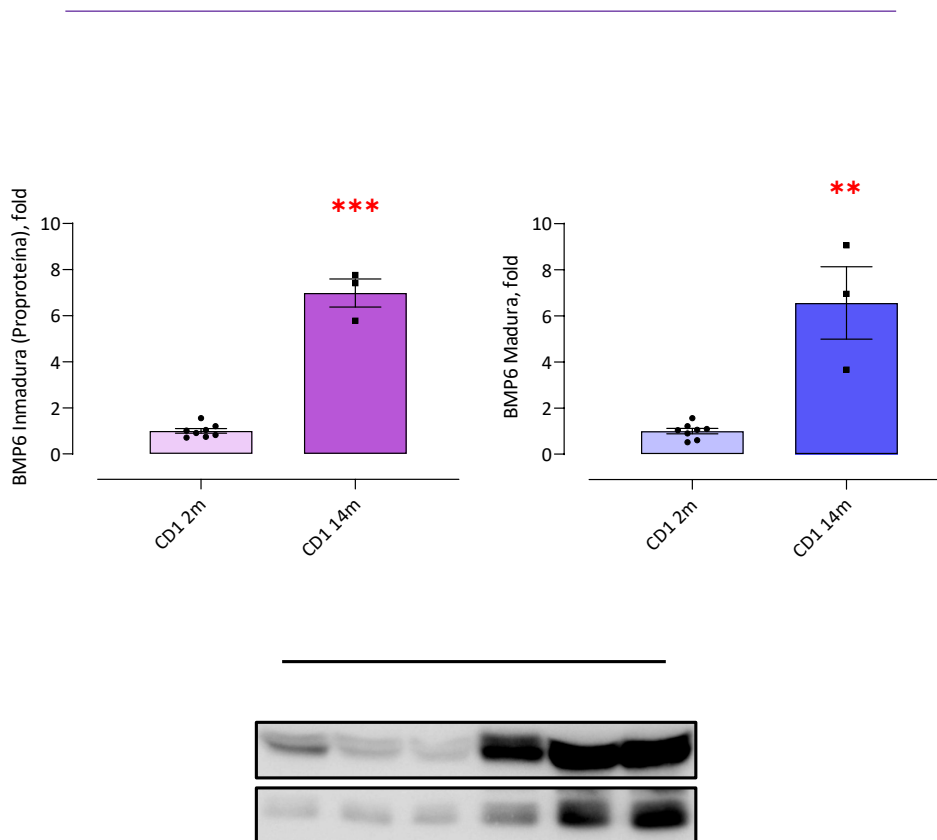


Figura 56. Aumento de la BMP6 sistémica en animales Crl:CD1 con la edad.

Wester blot mostrando el incremento de proteína BMP6 encontrado en animales Crl:CD1 adultos. (A) Representación del incremento de la forma inmadura (pro-proteína) de BMP6 encontrado en ratones Crl:CD1 de 14m frente a los niveles encontrados en ratones de 2 meses de edad (fold). (B) Representación del incremento de la forma madura de BMP6 encontrado en ratones Crl:CD1 de 14m frente a los niveles encontrados en ratones de 2 meses de edad (fold). (C) Western blot frente la forma inmadura y madura de la proteína BMP6 de muestras de suero obtenidas de ratones Crl:CD1 de 2 y 14 meses de edad. Las muestras están normalizadas por volumen de carga. Los datos corresponden a la media \pm sem de una n=3 (3 animales). La estadística corresponde a una Ttest frente a su correspondiente muestra control, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

et al., 2015. Estos datos parecen sugerir que las meninges podrías ser una de las fuentes de la proteína BMP6 en el cerebro adulto, sin embargo, serán necesarios más estudios

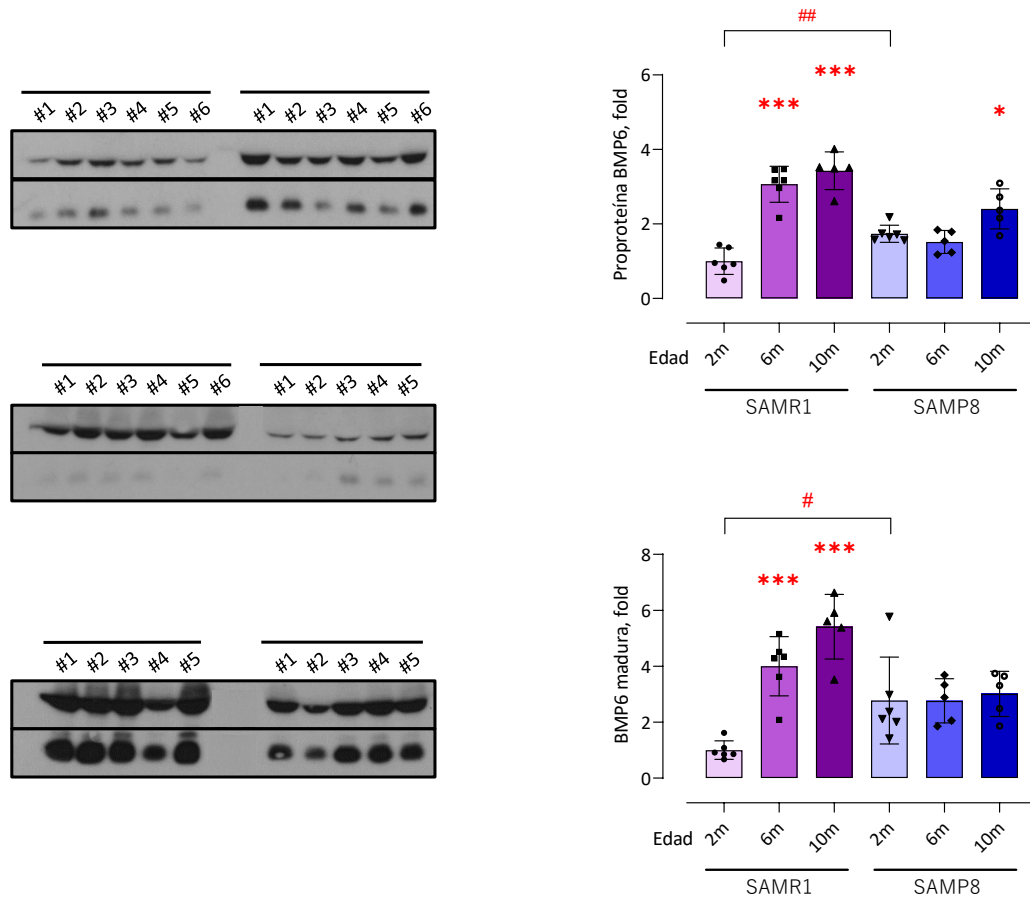


Figura 57. Aumento de la BMP6 sistémica en animales SAMP8 y SAMR1.

La figura muestra el aumento de BMP6 encontrado en ratones SAMP8 y SAMR1 con la edad. (A) Western blot de muestras de suero de animales SAMR1 y SAMP8 de 2 meses de edad frente a la proteína BMP6 en su forma inmadura (pro-proteína) y madura. (B) Western blot de muestras de suero de animales SAMR1 y SAMP8 de 6 meses de edad frente a la proteína BMP6 en su forma inmadura (pro-proteína) y madura. (C) Western blot de muestras de suero de animales SAMR1 y SAMP8 de 10 meses de edad frente a la proteína BMP6 en su forma inmadura (pro-proteína) y madura. (D) Representación gráfica de los datos obtenidos en los western blots de ratones SAMP8 y SAMR1 para la proteína BMP6 en su forma inmadura (pro-proteína). Los datos están representados utilizando el valor SAMR1 de 2 meses como muestra de referencia, fold. (E) Representación gráfica de los datos obtenidos en los western blots de ratones SAMP8 y SAMR1 para la proteína BMP6 en su forma madura. Los datos están representados utilizando el valor SAMR1 de 2 meses como muestra de referencia, fold. Los datos muestran un incremento significativo de BMP6 con la edad en las muestras obtenidas de ratones SAMR1 y para ambas formas de BMP6, incremento que no es observado para las muestras de ratones SAMP8. La estadística corresponde a una ANOVA de una vía para cada población de animales utilizando la edad como factor, * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. Los datos también reflejan un aumento en ambas formas de BMP6 en los ratones SAMP8 de 2 meses con respecto las ratones SAMR1 de la misma edad. La estadística corresponde a una Ttest, # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$. Todos los datos corresponden a la media \pm sem de una $n \geq 5$ (animales).

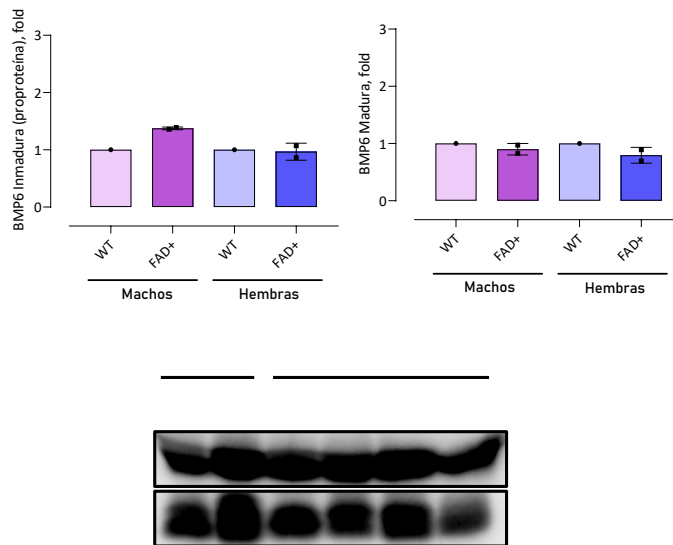


Figura 58. Los ratones triple transgénicos FAD no presentan más BMP6 sistémica.

(A) Representación gráfica de los datos obtenidos en el western blot frente a BMP6 inmadura (pro-proteína) de muestras de suero de animales wild type (WT) y transgénicos FAD. Los datos están representados en fold tomando el valor de los ratones wild type como control. (B) Representación gráfica de los datos obtenidos en el western blot frente a BMP6 madura de muestras de suero de animales wild type (WT) y transgénicos FAD. Los datos están representados en fold tomando el valor de los ratones wild type como control. (C) Western blot frente a las formas inmadura (pro-proteína) y madura de BMP6 de muestras de suero obtenidas de animales Wild type (WT) y transgénicos FAD (triple mutante para Tau P301L, APP y PS1 M146V) separando los animales entre machos (m) y hembras (f). Los datos corresponden a la media±sem de una n=1 para los animales WT y una n=2 para los FAD.

que refuercen esta teoría. Por otro lado, decidimos explorar si existía un aumento sistémico de esta proteína con la edad. Cuando se analizaron mediante Western blot muestras de suero obtenidas de animales CD1 de 14 meses de edad, se observó que presentan una mayor cantidad de BMP6, tanto de su forma inmadura como de su forma madura, en comparación con muestras de suero obtenidas de animales CD1 de 2 meses (Figura 56). Estos datos muestran un incremento notable de la proteína BMP6 circulante con la edad en el suero de estos animales.

6.5. Incremento de BMP6 sistémica en animales SAMP8.

Puesto que observamos un aumento de la BMP6 sistémica con la edad en animales CD1, quisimos comprobar si dicho incremento se mantenía en el modelo de envejecimiento acelerado SAMP8. Para ello tomamos muestras de suero de animales SAMP8 y SAMR1 a 2, 6 y 10 meses de edad y comprobamos la cantidad de BMP6 circulante mediante Western blot frente a esta proteína (Figura 57 A, B, C). Los resultados muestran un incremento significativo de BMP6, tanto en su forma madura como inmadura, con la edad en los animales SAMR1 (Figura 57 D, E). Los animales SAMP8 presentan mayor cantidad de BMP6 ya en edades tempranas (2 meses) que los animales SAMR1, sin embargo, no observamos un aumento de esta proteína con la edad de estos animales (Figura 57 D, E), sino que al parecer se alcanza un plateau o meseta.

6.6. Los animales transgénicos FAD no presentan un aumento de BMP6.

Puesto que varios estudios han observado un aumento de la proteína BMP6 en pacientes de Alzheimer y han relacionado esta proteína con la despoblación del giro del hipocampo, la pérdida de proliferación neuronal y neurogénesis, quisimos comprobar la cantidad de BMP6 circulante en ratones transgénicos FAD (triple mutante para Tau P301L, APP y PS1 M146V). Para ello extrajimos muestras de suero de animales, machos y hembras, wild type y FAD⁺, y comprobamos la cantidad de BMP6 a través de un Western blot frente a dicha proteína. Los resultados obtenidos no muestran ningún tipo de diferencia entre los animales wild type y los animales transgénicos FAD, así como ninguna diferencia entre machos y hembras, ambos muestran la misma cantidad de BMP6 sistémica (Figura 58 A, B, C).

7

Discusión

7.1. Efecto de las BMPs sobre la diferenciación de las AH-NSPCs.

Se ha observado que la neurogénesis en el cerebro adulto de animales mamíferos está regulada por un gran número de señales locales procedentes del nicho, entre estas señales están incluidas las proteínas BMPs y WNTs. Este hecho se ha podido constatar gracias a los estudios que han reportado una alta activación de la ruta canónica de las BMPs en el nicho del hipocampo, observando que las NSCs y los progenitores presentan las formas fosforiladas de las proteínas SMAD1/5/8 en el núcleo celular (Mira H. *et al.*, 2010; Bonaguidi MA. *et al.*, 2008). Además, se ha observado la implicación de ligandos de la familia de las BMPs (en particular BMP4) en la regulación del mantenimiento de la quiescencia de las NSCs (Mira H. *et al.*, 2010; Bonaguidi MA. *et al.*, 2008), así como en la regulación de la maduración de los progenitores en diversas etapas durante la neurogénesis (Bond AM. *et al.*, 2014). Sin embargo, el papel que desempeña la señalización desencadenada por las proteínas BMPs en la especificación del destino de la progenie de las NSCs hipocampales en estadios adultos, y su relación con otras señales del nicho, se encuentra poco estudiado. Los resultados que se presentan en esta tesis profundizan en algunos aspectos concretos de la compleja función que desempeñan las BMPs como reguladores de la diferenciación de las NSCs en la etapa adulta. Estos resultados nos han permitido proponer un modelo en el que la función de las BMPs es dependiente de las proteínas WNTs, favoreciendo la adquisición del linaje neuronal, posiblemente, a expensas del linaje oligodendroglial (figura 23 A). Este resultado correlaciona con el efecto pro-neurogénico que presentan las proteínas BMPs durante las etapas neurogénicas del desarrollo del cerebro anterior (Hall AK. y Miller RH., 2004; Chen HL. y Panchision DM., 2007).

También se ha observado que la señalización a través de las BMPs puede promover la adquisición del linaje astrogliar, por ejemplo, en cultivos celulares de NSPCs de la zona subventricular embrionaria crecidos en presencia de EGF (Gomes WA. *et al.*, 2003; Gross RE. *et al.*, 1996). Sin embargo, en nuestro estudio, BMP2/4 no altera la adquisición del linaje astrogliar en AH-NSPCs procedentes del hipocampo adulto de rata y crecidas en presencia de FGF2 (figura 23 A). Esto puede deberse al diferente origen de las células, a las condiciones de nuestros cultivos o, quizás, al nivel basal de la

señalización por WNT y/o de factores pro-neurogénicos presente en nuestras células. Cabe destacar que en estudios *in vivo* se ha observado que un aumento en los niveles de BMP4 en el hipocampo de ratones adultos (inducido mediante la inyección de lentivirus que sobreexpresan BMP4) disminuye los niveles de proliferación celular de las NSPCs y retrasa la maduración neuronal, pero no se ha observado un aumento en la proporción de células que se diferencian a astrogliá (Bond AM. *et al.*, 2014). En conjunto, estas observaciones sugieren que, al menos en condiciones fisiológicas, la señalización a través de las BMPs de la familia de BMP2/4 sería pro-neurogénica y no pro-gliogénica en el hipocampo adulto. Sin embargo, no podemos descartar un papel pro-gliogénico en situaciones de elevada y prolongada señalización por esta vía o en condiciones patológicas que desemboquen en un aumento de la gliosis (Gomes WA. *et al.*, 2003; Gross RE. *et al.*, 1996).

En cuanto al papel de cada uno de los receptores en la regulación de las AH-NSPCs, el patrón de expresión obtenido *in vitro* cuando se comparan las células en proliferación con las células diferenciadas en presencia de RA y FSK (figura 20 E-G) sugiere que el receptor BMPR1A tiene un papel temprano en el proceso de diferenciación, mientras que los receptores BMPR1B y ACVR1 pueden tener un papel tardío, más relacionado con el proceso de maduración neuronal, puesto que su pico de expresión es posterior. El papel temprano del receptor BMPR1A concuerda con los resultados obtenidos en los ensayos de diferenciación con los ligandos preferentes para este receptor (BMP2/4) y con los ensayos retrovirales en los que sobreexpresamos la forma constitutivamente activa de BMPR1A (figura 22 A, C). Además, hemos observado que los niveles de diferenciación neuronal obtenidos con una exposición transitoria a los ligandos BMP2/4 son similares a aquellos obtenidos con una exposición continua a dichos ligandos, lo que sugiere que la señalización que induce la adquisición del linaje neuronal ocurre en las primeras etapas del proceso de diferenciación y, por tanto, es más probable que dicha señal sea transducida por el receptor de tipo 1 más expresado en las etapas iniciales, BMPR1A. Estos resultados complementan los hallazgos de estudios previos, en los que se ha visto que la sobreexpresión de una forma dominante negativa del receptor BMPR1A (dnBMPR1A) promueve de forma compensatoria la sobreexpresión del receptor BMPR1B en cultivos de AH-NSPCs, y que la señalización a

través de este último receptor es la que aumenta los niveles de astrogliogénesis en dichos cultivos (Brederlau A. *et al.*, 2004). Por otro lado, nuestros estudios con inhibidores químicos indican que el efecto pro-neurogénico de BMP2/4 depende de la vía de señalización canónica de las BMPs, pues solamente se bloquea en presencia del inhibidor DMH1 (específico de esta vía), pero no de otros inhibidores de las vías no canónicas, lo que concuerda con el aumento observado en la fosforilación de las proteínas SMAD1/5/8 tanto por Western blot como por inmunofluorescencia (figura 26 A-C).

Para dilucidar el mecanismo molecular del efecto pro-neurogénico producido por las proteínas BMPs/BMPR1a/SMADs en nuestros ensayos, quisimos estudiar su relación con la señalización de las proteínas WNTs, ya que éstas son conocidas como las principales reguladoras de la neurogénesis hipocampal adulta (Lie DC. *et al.*, 2005; Schafer ST. *et al.*, 2015; Arredondo SB. *et al.*, 2020; Heppt J. *et al.*, 2020). Observamos que el efecto pro-neurogénico producido por la señalización canónica por BMPs requiere de un nivel basal de señalización también de tipo canónico a través de WNT (figura 27 D), y que ambas rutas muestran una interacción sinérgica. Cuando combinamos ligandos de ambas familias (BMP y WNT) el efecto neurogénico es mayor que la suma de sus efectos por separado a la misma dosis (figura 28 A, B). Estos resultados sugieren que dichas rutas de señalización pueden estar compartiendo intermediarios en sus correspondientes cascadas y potenciarse.

En estudios previos, se había descrito que las rutas de señalización de las BMPs y de WNT interactúan entre ellas a varios niveles, por ejemplo, mediante la unión de los factores de transcripción SMAD4 y TCF/LEF a las regiones promotoras de varios genes (Theil T. *et al.*, 2002; Hussein SM. *et al.*, 2003). La familia de factores de transcripción de TCF/LEF consta de cuatro miembros en mamíferos y es la encargada de mediar el efecto inducido por la ruta canónica de señalización de las WNTs (dependiente de β -catenina), siendo LEF1 el mejor caracterizado (Cadigan KM. y Waterman ML., 2012). Nos centramos en la idea de que *Lef1* pudiese ser el punto de unión entre ambas rutas de señalización dado que se expresa en las NSPCs del hipocampo adulto y es requerido para el proceso de neurogénesis, junto al hecho de que la expresión de *Lef1* puede ser

activada por BMP4, al menos en otros tipos celulares (Kratochwil K. *et al.*, 1996). Con esta hipótesis en mente, identificamos elementos reguladores de las BMPs en el promotor del gen *Lef1* y diseñamos una serie de experimentos funcionales. Nuestros ensayos muestran cómo aumenta la expresión de *Lef1* tras la exposición a BMP4 y cómo la sobreexpresión de este gen es suficiente para aumentar la neurogénesis. Todos estos datos sugieren un nuevo mecanismo por el que ambas rutas de señalización trabajan conjuntamente en las células madre y progenitores hipocampales. Un mecanismo similar podría estar activo de la misma forma durante el desarrollo del giro dentado del hipocampo, ya que algunos estudios han observado que la expresión del gen *Lef1* durante las etapas embrionarias está regulada por el receptor de BMPs de tipo I ACVR1 (Choe Y. *et al.*, 2013). Estos estudios muestran como la expresión de una forma constitutivamente activa del receptor de BMPs de tipo I ACVR1A en el giro dentado durante las etapas del desarrollo es capaz de aumentar de forma directa la expresión de *Lef1* y como el inhibidor de las BMPs Noggin es capaz de reducirla. De la misma forma, el estudio de ratones transgénicos hGFAP-Cre;SMAD4^{lox/-} en los que las células que expresan GFAP pierden la expresión de la proteína SMAD4 reveló que estos animales presentan importantes defectos en el número de células madre, progenitores y neuronas granulares durante el desarrollo del GD, llegando a concluir que la inhibición de la señalización embrionaria de las BMPs reduce la integridad del nicho. Además, knockout para el receptor ACVR1A (hGFAP-Cre;Acvr1^{lox/lox}) presentan una menor expresión tanto de *Lef1* como de *Prox1*, lo que se traduce en un menor número de progenitores y un GD de menor tamaño en el adulto. Todos estos estudios sugieren que las BMPs juegan un papel importante durante el desarrollo del giro dentado a través de la regulación de *Lef1* (Choe Y. *et al.*, 2013).

En resumen, la señalización a través del receptor de tipo I BMPR1A juega un papel importante en la regulación de la neurogénesis hipocampal adulta, no solo mediante la regulación de la quiescencia de las NSCs (Bonaguidi MA. *et al.*, 2008; Mira H. *et al.*, 2010; Bond AM. *et al.*, 2014), sino probablemente también mediante la regulación de las primeras etapas del proceso de diferenciación neuronal, como indican los resultados de esta tesis. Al menos *in vitro*, la señalización canónica de las proteínas WNT interacciona con, y puede ser regulada por, la señalización de las proteínas BMPs

para producir el efecto pro-neurogénico, gracias al aumento de la expresión del factor de transcripción LEF1. Aunque son necesarios más estudios *in vivo* para dilucidar la función de las BMPs en la especificación del destino celular, nuestros resultados *in vitro* ya sugieren que el papel de las BMPs y sus receptores durante la neurogénesis adulta es más complejo de lo que se pensaba hasta la fecha.

7.2. Efecto de las BMPs en el proceso de maduración de las AH-NSPCs.

Una vez estudiado el papel de las BMPs en el proceso de especificación del destino neuronal de las AH-NSPCs, nuestro estudio nos llevó a preguntarnos la importancia de estas proteínas en etapas posteriores de la neurogénesis hipocampal, durante el proceso de maduración final de las nuevas neuronas. Sin embargo, existía una cantidad mucho más reducida de trabajos que abordasen el estudio del papel de las BMPs y de sus receptores en este proceso. Algunos estudios habían descrito funciones de otros ligandos de la familia del TGF- β en el proceso de maduración, es el caso del receptor ALK5. Se había descrito que la señalización a través de este receptor es necesaria durante el proceso de neurogénesis adulta, ya que animales knockout que carecen de esta proteína muestran una menor supervivencia de las células DCX⁺ y de las neuronas de nueva generación (He Y. *et al.*, 2014). De la misma forma, este estudio había descrito que la señalización del TGF- β a través de ALK5 promueve la maduración de las neuronas inmaduras en el hipocampo mejorando el desarrollo del árbol dendrítico y el tamaño del soma de dichas neuronas (He Y. *et al.*, 2014). Es por esto que nuestro siguiente objetivo fue el de dilucidar si las proteínas BMPs participaban en la maduración de las neuronas generadas en etapas posnatal y adulta.

Nuestro primer abordaje fue trabajar con cultivos neuronales generados a partir de AH-NSPCs. En nuestros experimentos se puede observar como BMP2, BMP4, BMP6 y, de forma menos marcada, BMP7 presentan un efecto pro-madurativo sobre las neuronas inmaduras crecidas *in vitro*. Estos resultados pueden resultar contradictorios atendiendo al patrón de expresión de los receptores de BMPs tipo I presentado en el primer bloque de resultados de esta tesis (Resultados 1.1, figura 19) y a la preferencia de unión de los ligandos a los distintos receptores descrita previamente. Como se puede

observar en dicha figura, la expresión a nivel de mRNA de los receptores tipo I BMPR1B y ACVR1 aumenta según avanza el grado de maduración neuronal, mientras que la expresión del receptor BMPR1A, más expresado en estadios inmaduros, disminuye según avanzan los días de diferenciación *in vitro*. Teniendo en cuenta dicha observación, cabría esperar un efecto pro-madurativo de aquellos ligandos que tienen mayor afinidad por los receptores BMPR1B y ACVR1 (BMP6, BMP5, BMP7), pero no un efecto de los ligandos que presentan mayor afinidad por el receptor BMPR1A (BMP2, BMP4). Este argumento explicaría el efecto tan marcado observado con BMP6, sin embargo, no explicaría el efecto pro-madurativo observado con las proteínas BMP2 y BMP4. Por tanto, al menos en nuestro modelo celular y de confirmarse el patrón de expresión de los receptores a nivel de proteína, las proteínas BMPs y sus receptores presentarían cierto grado de promiscuidad, un hecho cada vez observado por más autores y en más trabajos (Mueller TD. Y Nickel J., 2012; Nickel J. y Mueller TD., 2019). Por otro lado, nuestros resultados muestran un efecto pro-madurativo muy leve de la proteína BMP7 y ningún efecto de BMP5, dos ligandos que son ampliamente relacionados con la longitud dendrítica y la maduración neuronal en las etapas de desarrollo (Withers GS. *et al.*, 2000; Esquenazi S. *et al.*, 2002; Choe Y. *et al.*, 2013). Esta diferencia puede deberse a que nuestro estudio se centra en la función de las BMPs sobre neuronas derivadas de AH-NSPCs, aisladas de la etapa adulta del individuo, lo que denotaría una diferencia notable en el papel que desempeñan dichos ligandos en función del estadio de desarrollo del organismo. En definitiva, este resultado pone de manifiesto que la respuesta celular no solamente va a depender de la señal inductiva, sino también de la competencia de las células para interpretar dicha señal, que a su vez viene determinada tanto por los receptores e intermediarios de señalización que exprese, como por su programa molecular (Sagner A. y Briscoe K., 2017).

En cuanto al efecto observado tras tratar con la proteína BMP6, nuestros resultados muestran un efecto bifásico de dosis-respuesta (activación seguida de inhibición de la maduración neuronal *in vitro*), que podría corresponder con lo que algunos autores denominan como comportamiento de carácter hormético (Figura 33).

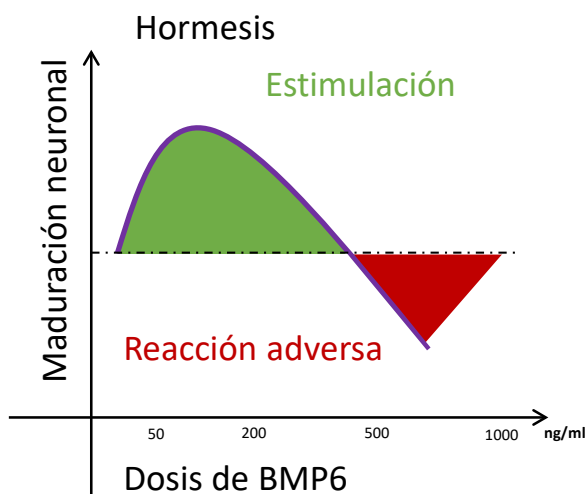


Figura 59. Representación de la relación de hormesis entre la proteína BMP6 y el proceso de maduración neuronal.

La hormesis hace referencia a la relación dosis-respuesta separada en dos zonas, un área de dosis baja con respuestas estimuladoras y, tras superar un umbral toxicológico, un área de dosis alta con efectos adversos o inhibitorios. En nuestro caso, la proteína BMP6 tiene un efecto positivo sobre la maduración neuronal de las AH-NSPCs alcanzando un punto máximo aproximadamente a los 200ng/ml de proteína. Por encima del umbral de 500 ng/ml aproximadamente encontramos una reducción de la maduración neuronal (reacción adversa) (Figura 33).

La hormesis describe una relación dosis-respuesta separada en dos zonas, un área de dosis baja con respuesta estimuladora (antes del umbral toxicológico tradicional) y un área de dosis alta con efectos adversos o inhibitorios, después del umbral toxicológico tradicional (Figura 59). El efecto de BMP6 sobre las neuronas encaja con este tipo de comportamiento. Estas observaciones concuerdan además con el hecho de que BMP6 aumenta en el hipocampo durante el envejecimiento, lo que correlaciona con la reducción de la neurogénesis y con el retraso madurativo que sufren las neuronas hipocámpales en los animales viejos (Trincherro MF. *et al.*, 2017). Se ha descrito un aumento de las proteínas BMP6 y BMP4 con la edad en el hipocampo de ratones C57BL6/J de 22-24 meses de edad (Yousef H. *et al.*, 2015; Meyers EA. *et al.*, 2016) y en ratones con envejecimiento acelerado SAMP8 (Díaz-Moreno M. *et al.*, 2018). En los estudios en animales C57BL6/J, la señal del anticuerpo anti-BMP6 aparece asociada a la microglía y se ha visto además que hay un aumento en los niveles de P-SMAD1/5/8 en las células del GD que expresan SOX2. En estos animales, la inhibición de la señalización por BMPs mediante la inyección *in vivo* de lentivirus que expresan un shRNA para *Smad1*, o mediante la delección de *Bmpr1a* en animales *Bmpr1a^{lox/lox} Bmpr1b^{+/-} Rosa26lacZ*, aumenta la proliferación de las células de tipo 2b y se rescata la producción de nuevas neuronas (en cuanto a su número), aunque no se ha evaluado el posible

efecto en la maduración neuronal a nivel morfológico ni si existe señalización de tipo no canónico (Yousef H. *et al.*, 2015). En cuanto al estudio con los animales SAMP8, que ha sido realizado en nuestro laboratorio, hemos podido demostrar que las nuevas neuronas (células DCX⁺) del GD migran más profundamente en la capa de las neuronas granulares al tiempo que se reduce la adquisición del marcador neuronal más madura Calretinina (CR) (Díaz-Moreno M. *et al.*, 2018). En cuanto a su complejidad morfológica, las nuevas neuronas hipocampales de los animales SAMP8, marcadas mediante la inyección de un retrovirus que expresa GFP, muestran una menor arborización en el análisis de Sholl y una reducción en el número de puntos de ramificación y en la longitud dendrítica total (Schouten M. *et al.*, 2020) indicando una alteración del programa de diferenciación neuronal normal en la cepa SAMP8. Este efecto depende al menos en parte del aumento de la señalización por BMPs, pues la sobreexpresión del inhibidor de BMPs, Noggin, es capaz de recuperar el fallo neurogénico hipocampal de estos animales (Díaz-Moreno M. *et al.*, 2018). De la misma forma, se ha descrito un aumento de BMP6 a nivel de mRNA y de proteína (pero no de otras BMPs, como BMP2 o BMP7) en el hipocampo de pacientes de Alzheimer, que se exagera con el avance de la severidad de la enfermedad. Este aumento también se observa en animales mThy1-hAPP751, que expresan niveles muy elevados de hAPP mutante en las neuronas del GD y de la región CA1, acumulando A β 1-42 (Crews L. *et al.*, 2010). En los casos severos de Alzheimer, se ha observado la presencia de células inmunoreactivas para BMP6 tanto en la ZSG como en la capa granular, y en ocasiones la marca se detecta próxima a las células DCX⁺. Además, se ha observado un patrón de señal de BMP6 en halo, alrededor de las placas de A β 1-42 localizadas en las capas molecular y piramidal del hipocampo. El aumento en BMP6 correlaciona con una reducción en el número de células DCX⁺ del GD en estas mismas muestras hipocampales de pacientes de AD, así como en los animales transgénicos mThy1-hAPP751 (Crews L. *et al.*, 2010). Todos estos datos apuntan a que la proteína BMP6 podría jugar un papel importante en el mantenimiento de la neurogénesis y la maduración neuronal de las células hipocampales en edades adultas, y a que una alteración al alza de sus niveles durante el envejecimiento o en condiciones patológicas puede ocasionar severas consecuencias sobre la estructura y el funcionamiento del hipocampo.

En cuanto a la participación de los diferentes receptores de las BMPs en las etapas tardías de diferenciación, nuestros resultados *in vitro* muestran un papel fundamental del receptor de BMPs tipo II BMPR2 en el proceso de maduración neuronal hipocampal. Como se puede observar en la [figura 34](#), el silenciamiento de los niveles de expresión de dicho receptor es suficiente para disminuir la maduración neuronal *in vitro*. Este resultado concuerda con el hecho de que el receptor BMPR2 es el único de la familia de receptores tipo II que cuenta con un dominio de unión para LIMK en su extremo C-terminal, lo que lo convierte en el único receptor capaz de activar la ruta de señalización no canónica de las BMPs a través de este intermediario (Foletta VC. *et al.*, 2003; Lee-Hoeflich ST. *et al.*, 2004; Scott RW. *et al.*, 2010). Aunque se conoce la importancia del receptor BMPR2 y la ruta no canónica de las BMPs en el proceso de maduración neuronal y en la neuritogénesis, existen muchos interrogantes en la actualidad acerca de los mecanismos que subyacen a este proceso. Por ejemplo, se ha observado que la activación de LIMK depende del reclutamiento de ésta por el receptor BMPR2 y de su fosforilación por parte de Cdc42 (Lee-Hoeflich ST. *et al.*, 2004; Gámez B. *et al.*, 2013). De la misma forma se ha observado que intermediarios como PI3K o Rho juegan un papel importante en la cascada de señalización (Gámez B. *et al.*, 2013), sin embargo, los mecanismos concretos por los cuales ocurren todos estos procesos en las neuronas están poco caracterizados y serán necesarios nuevos estudios para ahondar en ellos.

En cuanto a los experimentos para determinar la ruta de señalización implicada en el proceso de maduración neuronal, nuestros resultados muestran como al inhibir LIMK las células no son capaces de responder a un estímulo de BMP6, reduciéndose así la maduración con respecto a las muestras sin inhibidor ([Figura 41 A, B](#)). Una vez fosforilada, LIMK es la encargada de reclutar y activar al resto de intermediarios de la ruta de señalización, por lo que la inhibición de esta quinasa inhibe la señalización a través de la ruta no canónica. Estos datos concuerdan con los obtenidos al silenciar el receptor BMPR2 ([Figura 34](#)), ya que BMPR2 es el único receptor con un dominio de unión para LIMK en su extremo intermolecular, por lo que el silenciamiento de BMPR2 impide el reclutamiento de LIMK y la activación de la cascada de señalización. Por otro lado, la inhibición de la vía canónica dependiente de las SMAD1/5/8 con DMH1 (Dorsomorphin homolog 1) ([Figura 41 A, C](#)) no afecta a la maduración neuronal. Todos

estos datos indican que la maduración neuronal de las AH-NSPCs está mediada por la ruta de señalización no canónica de las BMPs.

Una vez establecido que la ruta de señalización de BMPs relacionada con la maduración era la no canónica, quisimos determinar otros posibles intermediarios implicados. Nuestros experimentos muestran que al inhibir individualmente JNK, MEK y Rho se produce una pérdida en la respuesta a BMP y una bajada significativa de la maduración. Esto nos indica que estos tres intermediarios están implicados en el proceso, aunque con nuestros datos no podemos determinar su papel exacto. Estudios futuros de tipo mecanístico tendrán que determinar la función concreta que desempeñan los diferentes intermediarios de la ruta no canónica en el proceso de maduración neuronal.

Otro de los objetivos principales de nuestro estudio era el de intentar determinar qué receptor de tipo I está implicado en la activación de la ruta no canónica durante el proceso de maduración junto a BMPR2. Para ello diseñamos una serie de experimentos de inhibición y silenciamiento de estos receptores, así como de sobreexpresión de los mismos. Los ensayos de silenciamiento muestran un descenso de la maduración neuronal al reducir los niveles de expresión del receptor ACVR1 (Figura 35 B), lo que sugiere un papel de dicho receptor en este proceso. Sin embargo, encontramos un aumento significativo no esperado de la maduración neuronal al silenciar la expresión del receptor BMPR1B. Una posible explicación para este efecto sería que estuviésemos ante una respuesta compensatoria del sistema sobre la expresión de ACVR1 al disminuir la de BMPR1B. Esto podría explicar que al reducir la expresión del receptor BMPR1B aumentase la de ACVR1 y, por tanto, la maduración de las células. Existen muchos estudios en la actualidad en los que se observa que los receptores de la familia del TGF, y las BMPs, pueden compensar la pérdida de algún receptor de la misma familia (Hebert JM. *et al.*, 2003; Wine-Lee L. *et al.*, 2004; Fernandes M. *et al.*, 2007; Caronia G. *et al.*, 2010), si bien tendríamos que verificarlo en nuestro modelo celular.

Por otro lado, realizamos una batería de experimentos de ganancia de función para expresar una forma constitutivamente activa de los receptores tipo I por medio de

lentivirus y retrovirus (Figura 39). Estos experimentos muestran cómo tanto la expresión de la forma activa de ACVR1, como la de BMPR1B, independientemente de la estrategia empleada (lenti o retrovirus), son suficientes para incrementar la maduración neuronal *in vitro*, medida mediante análisis de Sholl, en ausencia del estímulo de BMP (Figura 39 B, E, H, K). Estos datos nos sugieren que ambos receptores tipo I son suficientes para desencadenar la respuesta y tal vez ambos están implicados en el proceso de maduración neuronal, abriendo la puerta a que se trate de dos receptores redundantes, que ambos tengan la misma función, o, por el contrario, que cada uno de ellos esté implicado en diferentes aspectos concretos de la maduración neuronal, como el número de dendritas o su longitud. En este sentido, tras un análisis más detallado nuestros datos sugieren que el receptor BMPR1B, en comparación con el receptor ACVR1, está más implicado en regular el número de dendritas, tanto primarias como secundarias, ya que hemos podido observar un aumento de éstas tras expresar la forma constitutivamente activa de BMPR1B, tanto *in vitro* (Figura 40 A-C) como *in vivo* (Figura 45 A, B), pero no al sobreexpresar la de ACVR1. En el resto de parámetros podemos observar una tendencia al alza al expresar las formas constitutivamente activas de ambos receptores.

Para estudiar el proceso de maduración *in vivo* decidimos realizar electroporaciones de plásmidos de nuestro interés en el hipocampo de animales posnatales, adaptando un protocolo previamente descrito (Ito H. *et al.*, 2014). La neurogénesis en el GD es un proceso gradual y extendido en el tiempo que alcanza su punto máximo justo después del nacimiento durante la primera semana posnatal, tras este periodo la neurogénesis decae durante la adolescencia y continúa disminuyendo durante la madurez del individuo (Altman J. y Das GD., 1965; Kuhn HG. *et al.*, 1996; Bond AM. *et al.*, 2020). Esta técnica nos proporciona la ventaja de que permite estudiar la maduración neuronal *in vivo* en cualquier punto del proceso seleccionando el momento del sacrificio del animal tras la electroporación. Para ello, decidimos electroporar a día posnatal P0 plásmidos con las formas constitutivamente activas de los receptores de BMPs tipo I y estudiar el efecto que éstas tienen sobre la maduración de las neuronas del GD. Nuestros datos muestran como la señalización constitutiva de estos receptores produce una reducción significativa de la maduración de las neuronas granulares hipocampales (Figura 44 B, C) así como una desregulación de la mayoría de

los parámetros morfológicos que presentan estas neuronas (Figura 45, 46 y 47). Podemos observar neuronas con más de una dendrita primaria (las neuronas hipocampales *in vivo* se encuentran muy polarizadas y al tiempo que hemos analizado solo presentan una dendrita primaria en condiciones normales) (Wang S. *et al.*, 2000; Kerloch T. *et al.*, 2019) (Figura 45 B), un descenso en el número y longitud de dendritas secundarias (Figura 45 A, C), un aumento de la conformación neuronal en forma de “V” (Figura 45 F, G), una desregulación de la migración a lo largo de la capa granular (Figura 46) o la pérdida en la densidad de las espinas dendríticas (Figura 47). El incremento de la conformación en “V” es interesante, puesto que este morfotipo prevalece en condiciones patológicas o de inflamación. En este sentido, se ha observado por ejemplo un aumento de neuronas con esta conformación en ratones GSK-3-OE y en pacientes de Alzheimer (Llorens-Martín M. *et al.*, 2013; Llorens-Martín M. *et al.*, 2014), en los que, como se ha mencionado anteriormente, se detecta también un aumento de los niveles del ligando BMP6 (Crews L. *et al.*, 2010; Villasana LE. *et al.*, 2015).

Sin embargo, hay que tener en cuenta que este experimento se centra en el estudio de neuronas neonatales, ya que se electroporan neuronas que se están generando a tiempo P0. Esta distinción es importante ya que recientemente se han descrito diferencias significativas tanto morfológicas como diferencias en el proceso de desarrollo entre las neuronas neonatales y las posnatales (Cole JD. *et al.*, 2020), a pesar de que anteriormente estas diferencias no se habían detectado (Toni N. *et al.*, 2007). Los datos de este estudio revelan que las neuronas nacidas en etapas adultas se someten a dos fases o “olas” madurativas. La primera de estas olas madurativas es similar a la experimentan las neuronas neonatales y ocurre aproximadamente a las 3 semanas (21 días) tras su nacimiento, dando lugar a neuronas inmaduras poco desarrolladas. La segunda ola madurativa ocurre aproximadamente a las 7 semanas tras el nacimiento de la célula, dando lugar a neuronas altamente maduras con dendritas más gruesas, somas de mayor tamaño y una mayor cantidad de espinas funcionales (Cole JD. *et al.*, 2020). Además, se han observado diferencias morfológicas relevantes entre las neuronas a lo largo de estas dos olas consecutivas, por ejemplo, las neuronas más jóvenes (de entre 2 y 4 semanas desde su generación) presentan una única dendrita primarias y una conformación en forma de “Y”, pero esta estructura cambia con el

tiempo y el grado de maduración de la neurona. Así, entre las 2 y las 24 semanas se produce un acortamiento de la dendrita primaria y a las 24 semanas tras su nacimiento se observa como la estructura en forma de “Y” se transforma en una conformación en “V”, conformación que hasta la fecha se había atribuido exclusivamente a condiciones patológicas (Cole JD. *et al.*, 2020). Se ha propuesto un modelo de conversión entre conformaciones por apertura del morfotipo “Y” a modo “cremallera” (del inglés, “unzipping”) hasta dar lugar al morfotipo “V”. En este modelo, la dendrita apical primaria se iría acortando hasta que la primera ramificación contactaría con el soma. Otra posibilidad es que el acortamiento sea debido a una migración del soma de la neurona hacia el primer punto de ramificación (Cole JD. *et al.*, 2020). Nuestros datos sugieren que la señalización constitutiva de los receptores de BMPs podría promover la migración del soma a la par que la reducción de la dendrita primaria, y esto podría explicar la transición de la conformación “Y” a “V”. alternativamente, podría emerger una nueva neurita primaria directamente del soma. El reciente estudio de Cole y colaboradores (Cole JD. *et al.*, 2020) tiene muchas implicaciones importantes en la neurogénesis hipocampal. En primer lugar, se establece una diferencia morfológica y madurativa entre las neuronas en función de la etapa del desarrollo en la que nace cada célula que había pasado desapercibida, observando como las neuronas neonatales maduran de forma más rápida que las adultas, que adquieren un grado de maduración mayor a través de una maduración más prolongada en el tiempo, con dos olas madurativas. En segundo lugar, todas estas observaciones apuntan a un modelo acumulativo de neurogénesis, en el cual las neuronas adultas forman un remanente de neuronas inmaduras que confieren una gran plasticidad estructural al giro dentado. Además, las estimaciones de este trabajo sugieren que la neurogénesis de la etapa adulta genera la mitad de las neuronas y la mayoría de las espinas dendríticas del giro dentado (Cole JD. *et al.*, 2020). Teniendo en cuenta que, debido a las condiciones en las cuales realizamos nuestro experimento *in vivo* hemos estudiado exclusivamente neuronas neonatales a las 3 semanas (21 días) tras su nacimiento, y que esta fase es similar a la primera ola madurativa que experimentan las neuronas nacidas en la etapa adulta, es muy probable que los resultados que hemos obtenido se puedan extrapolar a la neurogénesis hipocampal adulta. Aun así, serán necesarios nuevos experimentos que

confirmen el papel de las BMPs y sus receptores en neuronas generadas específicamente en el GD en la etapa adulta.

Por otro lado, los nuevos datos observados por Cole y colaboradores sobre el desarrollo y la morfología de las neuronas posnatales abren la puerta a nuevas interpretaciones sobre los resultados obtenidos en esta tesis. Como se describe anteriormente, hemos podido observar un aumento de la conformación en forma de “V” de las dendritas primarias al electroporar las formas constitutivamente activas de los receptores ACVR1 y BMPR1B en neuronas neonatales a tiempo P0 (Figura 44 B, C). Unido al hecho del que el resto de parámetros medidos apuntan a una pérdida de la maduración (Figura 44, 45, 46 y 47), similar a la que se obtiene *in vitro* a dosis altas de BMP6, inicialmente atribuimos este resultado a una desregulación de los parámetros habituales de las neuronas, que podría relacionarse con condiciones patológicas (Llorens-Martín M. et al., 2013; Llorens-Martín M. et al., 2014). Sin embargo, puesto que el estudio de Cole y colaboradores indica que la conformación en forma de “V” también se alcanza por maduración en condiciones normales (Cole JD. *et al.*, 2020), cabe la posibilidad de que la señalización por BMPs participe *in vivo* en la adquisición de esta característica de las neuronas con un alto grado de maduración. Esta interpretación encajaría con funciones ya establecidas de las proteínas BMPs, que son conocidas por promover la neuritogénesis (apartado 1.2.6, Función de las BMPs en el sistema nervioso; Lee-Hoeflich ST. *et al.*, 2004). Por tanto, los receptores ACVR1 y BMPR1B podrían estar implicados en la adquisición de esta conformación morfológica, presuntamente más madura, en las neuronas del giro dentado.

La diferencia entre los datos *in vitro* y los datos *in vivo* de otros parámetros podría ser atribuible, en parte, a la expresión continuada de los receptores desde un promotor fuerte (promotor CAG) durante 21 días, que estaría promoviendo una gran acumulación de las formas constitutivamente activas de los receptores tipo I hasta el punto de recapitular el efecto tóxico que produce la exposición a concentraciones elevadas de BMP6 en nuestros experimentos *in vitro* (Figura 33), o el fenotipo descrito en animales SAMP8 en los que se han observado elevados niveles de esta BMP (Díaz-Moreno M. *et al.*, 2018). También hay que tener en presente que en los ensayos *in vitro*

las neuronas sobreexpresan los receptores únicamente durante 4 días, un tiempo mucho más corto. Por ello, sería interesante a futuro diseñar nuevos ensayos, tal vez con sistemas inducibles basados en tetraciclina (tet), para estudiar la maduración de las neuronas hipocampales *in vivo* controlando la expresión de los receptores. Del mismo modo, sería interesante abordar el estudio de la pérdida de función *in vivo* mediante electroporación de plásmidos que permitan el silenciamiento de los receptores empleando shRNAs.

7.3. Efecto de la proteína BMP6 en el hipocampo adulto.

Por otro lado, como ya se ha comentado, en un trabajo del grupo se había descrito que BMP6 se encuentra sobreexpresada de forma aberrante en el hipocampo de los animales SAMP8, a nivel tanto de mRNA como de proteína, y que este aumento interfiere con la maduración de las nuevas neuronas y además causa una depleción de las células madre, que parecen diferenciarse a astrocitos (Díaz-Moreno M. *et al.*, 2018). Para completar el estudio del efecto de la proteína BMP6 sobre el hipocampo adulto, decidimos extraer células madre y progenitores del hipocampo de ratones salvajes Crl:CD1 de 2 meses de edad y ver si BMP6 era suficiente *in vitro* para simular el fenotipo observado *in vivo*. Nuestros datos sugieren que un estímulo de BMP6, en presencia de mitógenos, sobre estas células produce la activación de la ruta canónica de las BMPs, a través de la fosforilación de SMAD1/5/8, y esto a su vez, promueve la salida del ciclo celular y la diferenciación de las AH-NSPCs a células astrogliales (Figura 49). Esta salida de ciclo celular es tal que un estímulo continuo de BMP6 produce el agotamiento del cultivo (Figura 49 B), que no puede ser expandido con los sucesivos pases. El agotamiento del cultivo puede ser atribuido completamente a la salida de ciclo y diferenciación astrogliar, ya que no encontramos indicios ni de senescencia o ni de muerte celular (Figura 50). Este efecto de BMP6 contrasta con el efecto atribuido a BMP4, pues un estímulo de dicha proteína es capaz de inducir la salida de ciclo celular y entrada en un estado de quiescencia reversible (Mira H. *et al.*, 2010), siendo la diferenciación astrogliar un proceso irreversible.

Otro punto importante es la procedencia de esta BMP6 en el hipocampo de animales adultos y envejecidos. Como hemos mencionado anteriormente se ha descrito un incremento aberrante de los niveles de BMP6 en el hipocampo de los animales con el avance de la edad, así como en pacientes con la enfermedad de Alzheimer y ratones transgénicos modelo de esta enfermedad (Díaz-Moreno M. *et al.*, 2018; Crews L. *et al.*, 2010). Los resultados de esta tesis apoyan la idea de que este aumento puede provocar efectos adversos sobre la estructura y la viabilidad de las células del GD del hipocampo. Sin embargo, en la actualidad no se conoce la procedencia de esta proteína ni la razón por la cual se acumula en el hipocampo con la edad del individuo.

La primera hipótesis con respecto a la procedencia de BMP6 fue pensar que se tratase de un efecto autónomo celular, y que fuesen las propias AH-NSPCs las responsables de la expresión de dicha proteína. Para ello decidimos trabajar con AH-NSPCs extraídas de los animales SAMP8, el modelo de envejecimiento acelerado empleado en esta tesis. Sin embargo, nuestros resultados muestran que las AH-NSPCs provenientes de animales SAMP8 no expresan más BMP6 que sus correspondientes controles (SAMR1), si no que en todo caso existe una reducción en su expresión (Figura 51 y 55). También hemos podido observar una tasa de crecimiento inferior en estas células que no puede ser revertida por el inhibidor de BMPs Noggin (Figura 52 y 53), lo que indicaría que las BMPs expresadas endógenamente por las AH-NSPCs no son la causa. Nuestros datos también muestran como ambos tipos celulares, las AH-NSPCs de SAMR1 y de SAMP8, son capaces de responder a un estímulo externo de BMP6 de la misma manera, aumentando los niveles de gliogénesis y disminuyendo la adquisición del marcador Ki67, abandonando las células el ciclo celular (Figura 54), al igual que ocurre al tratar las células aisladas de animales Crl:CD1 jóvenes. Todos estos datos sugieren que la pérdida precoz de células madre descrita durante el envejecimiento en el GD de SAMP8 no se debe a un efecto autónomo celular, sino a un efecto exógeno producido por el acúmulo de BMP6 en el nicho del hipocampo que disminuye la proliferación celular y promueve la gliogénesis. Cabe destacar, que también hemos podido observar que las AH-NSPCs provenientes de ratones SAMP8 presentan un alargamiento del ciclo celular de manera intrínseca que no puede explicarse por el efecto de BMP6 que nosotros describimos pero que justifica la tasa de crecimiento

inferior de estos cultivos. Se trata de una característica similar a la encontrada en los estudios recientes realizados en las células madre de la ZSG durante el envejecimiento (Apostolopoulou M, *et al.* 2017).

Teniendo en cuenta los datos anteriores, el objetivo de futuros estudios debería ser el de dilucidar con mayor precisión la fuente o fuentes exógenas de la BMP6 que se acumula en el hipocampo, y que a día de hoy aún se desconoce. Valoramos la posibilidad de que fuesen las células microgliales las responsables de dicho acúmulo de BMP6, pues se había descrito la co-localización de BMP6 en células de microglía de animales viejos mediante inmunofluorescencia (Yousef H. *et al.*, 2015). Sin embargo, nuestros resultados no apoyan dicha hipótesis (Figura 55 D). Datos de RNAseq obtenidos con cultivos de astrocitos de animales SAMR1 y SAMP8 por otro grupo de investigación sugieren que la astrogliá podría estar produciendo más BMP6 (García-Matas S. *et al.*, 2015). Por otro lado, el análisis de las bases de datos de expresión de RNA a nivel de célula única (sc-RNAseq) sugieren que las células con mayor nivel de expresión de BMP6 en el cerebro son las de las leptomeninges (Zeisel A. *et al.*, 2015). De hecho, por inmunofluorescencia hemos sido capaces de detectar la expresión de BMP6 a nivel de proteína en las meninges del cerebro de ratones jóvenes. Sin embargo, no sabemos si los niveles de BMP6 en las meninges aumentan con la edad ni el papel que esto puede tener. Es interesante resaltar que se ha descrito la expresión de otra BMP (concretamente BMP7) en las meninges del ratón, y que esta expresión durante el desarrollo juega un papel muy relevante en el crecimiento de los axones del cuerpo calloso (Choe Y. *et al.*, 2012). Posiblemente, la BMP7 de las meninges es necesaria también para la supervivencia de la glía radial y la neurogénesis durante la corticogénesis (Segklia A. *et al.*, 2012) y es esencial asimismo para el correcto desarrollo del giro dentado. De hecho, la delección de *Bmp7* en las meninges empleando animales knockout condicionales causa una reducción en el número de células madre LEF1⁺ del GD y del número de neuronas granulares ya a E15.5/E17.5 (Choe Y. *et al.*, 2013).

Finalmente, cabe destacar que el aumento de BMP6 observado con la edad en el hipocampo de animales viejos coincide con el aumento de BMP6 circulante en el suero de ratones CD1 (Figura 56). Esto abre la posibilidad de que el acúmulo de BMP6 no sea

específico del hipocampo, si no de que se trate de un aumento sistémico de esta proteína. Obtuvimos datos similares al estudiar los niveles de la proteína BMP6 en el suero de animales SAMP8 y SAMR1, así como en el suero de animales progéricos (no mostrado) pero no de animales del modelo 5xFAD de Alzheimer, lo que sugiere que el aumento en suero sería característico del envejecimiento *per se*. Nuestros datos de hecho reflejan un aumento con la edad de la BMP6 procedente del suero en animales SAMR1, y, aunque no observamos este aumento en animales SAMP8 con el paso del tiempo, sí que podemos concluir que, a edades tempranas, antes de los síntomas neurodegenerativos, los animales SAMP8 presentan una mayor cantidad de esta proteína que sus respectivos controles (Figura 57). Futuros estudios deberán determinar si el aumento de BMP6 sistémica de estos animales a edades tempranas pueden provocar un efecto negativo sobre la neurogénesis, o si el aumento sistémico de esta proteína tiene alguna relación con el acúmulo descrito en el nicho del hipocampo, bien porque cruce la barrera hematoencefálica o de forma indirecta. En este sentido, se han realizado estudios de parabiosis heterocrónica en los cuales se ha podido observar que factores sistémicos pueden modular la señalización de los nichos neurogénicos. De esta forma el entorno sistémico de un animal joven es capaz de promover la neurogénesis adulta en un animal viejo, y viceversa, las señales sistémicas circulantes en un animal viejo disminuyen la neurogénesis adulta de un animal joven (Convoy IM. *et al.*, 2005). Estudios más recientes han podido identificar a la quimioquina CCL11 como un factor sistémico relacionado con la edad y asociado a la pérdida de neurogénesis. De hecho, la administración intraperitoneal de este factor reduce de manera significativa los niveles de células DCX⁺ en el GD de ratones (Villeda SA. *et al.*, 2011). En otros estudios se ha observado que la inyección intravenosa de sangre procedente de ratones jóvenes en ratones transgénicos para la enfermedad de Alzheimer y APP aporta factores solubles que son capaces de disminuir las proteínas neuronales que sirven como marcadores de la neurodegeneración. Por ejemplo, se ha observado un aumento de los niveles de proteínas sinápticas tras inyectar sangre procedente de ratones jóvenes en ratones transgénicos para APP a pesar de los niveles de amiloide de estos, así como una mejora en las capacidades de aprendizaje y memoria de los animales (Middeldorp J. *et al.*, 2016). Estos datos, junto con los expuestos en esta tesis, nos llevan a formular la hipótesis un tanto arriesgada de que la proteína BMP6 pueda ser un factor sistémico

asociado a la edad y relacionado con la pérdida de la neurogénesis hipocampal. Sin embargo, serán necesarios nuevos estudios que confirmen esta idea. También sería interesante poder evaluar los niveles circulantes de BMP6 en suero humano durante el envejecimiento o incluso en suero de pacientes con Alzheimer, con vistas a determinar si puede tener algún valor como marcador temprano de la enfermedad.

Conclusiones

1. Las proteínas BMPs participan en el proceso de diferenciación neuronal a través de los receptores de BMPs de tipo I y tipo II expresados a lo largo del proceso. El receptor de tipo I BMPR1A juega un papel temprano en el proceso, mientras que los receptores BMPR1B y ACVR1 juegan un papel tardío.
2. Los ligandos BMP2 y BMP4 son pro-neurogénicos *in vitro*. En ensayos de diferenciación celular, la exposición de AH-NSPCs a estos ligandos es suficiente para aumentar el porcentaje de células β III-tubulina positivas. Estas proteínas inducen la diferenciación al linaje neuronal en las primeras 24 horas del proceso a través de la activación de la ruta canónica de las BMPs, como demuestran tanto el aumento de pSmad1/5/8 como el bloqueo de la diferenciación neuronal por el inhibidor específico de la ruta canónica DMH1.
3. El efecto neurogénico producido por las proteínas BMP2/4 está ligado a la señalización canónica de las WNTs, siendo dependiente de la expresión del gen *Lef1*. La activación de ambas rutas de señalización simultáneamente produce un efecto sinérgico que aumenta el grado de diferenciación neuronal de las AH-NSPCs *in vitro*.
4. La expresión de *Lef1* en AH-NSPCs está regulada de forma directa por la señalización canónica de las BMPs, dado que el promotor de *Lef1* presenta sitios de unión para las proteínas SMADs.
5. Las proteínas BMP2/4/6 modulan las etapas madurativas del proceso neurogénico en ensayos *in vitro*. Este proceso depende de la señalización no canónica desencadenada por estas proteínas, siendo necesaria para el proceso la expresión y actividad de la quinasa LIMK, junto con JNK, MEK y Rho/ROCK.
6. La proteína BMP6 requiere del receptor de BMPs tipo II BMPR2 durante la maduración neuronal, ya que el silenciamiento de la expresión de éste por medio de RNA de interferencia bloquea el efecto madurativo de BMP6. De la misma

forma, la inhibición química del receptor de tipo I ACVR1 también disminuye el efecto madurativo de la proteína.

7. La expresión de una forma constitutivamente activa de los receptores de BMPs tipo I ACVR1 y BMPR1B a través de vectores virales incrementa la maduración neuronal *in vitro*. La expresión constitutiva de BMPR1B aumenta el número de neuritas primarias y secundarias *in vitro*, mientras que la expresión constitutiva de ambos receptores de tipo I tiene un efecto al alza sobre la longitud neurítica.
8. Las proteínas BMPs pueden inducir un efecto negativo sobre la maduración tal y como ocurre al exponer las AH-NSPCs a una alta concentración de BMP6 *in vitro* o al expresar mediante electroporación *in vivo* las formas constitutivamente activas de los receptores tipo I ACVR1 y BMPR1B bajo un promotor fuerte (CAG).
9. La expresión de las formas constitutivas de los receptores de BMPs tipo I BMPR1B y ACVR1 en el hipocampo de animales Crl:CD1 bajo un promotor fuerte (CAG) inducen la desregulación de la mayoría de los parámetros morfológicos que presentan las neuronas. Observamos un descenso en el número y longitud de dendritas secundarias, un aumento de la conformación neuronal en forma de "V", mayor migración a lo largo de la capa granular, así como una pérdida de la densidad de espinas dendríticas.
10. La exposición a BMP6 induce la salida de ciclo celular de AH-NSPCs procedentes de animales Crl:CD1 y la extinción del cultivo, así como la gliogénesis. En este proceso no intervienen la muerte celular ni la senescencia.
11. Las AH-NSPCs procedentes de animales SAMP8 presentan *in vitro* una tasa de crecimiento inferior a sus respectivos controles SAMR1 que no puede atribuirse a una mayor señalización de BMPs, ya que la exposición al inhibidor de BMPs Noggin no es capaz de rescatar el fenotipo.

12. El aumento de BMP6 en el hipocampo y su efecto sobre las AH-NSPCs durante el envejecimiento no es autónomo celular, pues las AH-NSPCs procedentes de animales SAMP8 no expresan más BMP6. De la misma forma, las células microgliales no expresan más BMP6 en animales SAMP8. Datos preliminares sugieren que las meninges y, tal vez, los astrocitos son posibles fuentes celulares de BMP6.

13. La proteína BMP6 aumenta a nivel sistémico durante el envejecimiento como se puede observar en animales Crl:CD1. Los animales SAMP8 presentan mayores niveles de BMP6 a edades tempranas que sus respectivos controles SAMR1, aunque no se observa un aumento de esta proteína con la edad. Sin embargo, los animales transgénicos FAD, triple mutante para Tau, APP y PS1, no presentan un aumento de BMP6 con respecto a sus controles.

- Ables, J.L.**, Decarolis, N.A., Johnson, M.A., Rivera, P.D., Gao, Z., Cooper, D.C., Radtke, F., Hsieh, J., Eisch, A.J., 2010. Notch1 is required for maintenance of the reservoir of adult hippocampal stem cells. *J Neurosci* 30, 10484–10492. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4721-09.2010>
- Abrous, D.N.**, Adriani, W., Montaron, M.-F., Aourousseau, C., Rougon, G., Le Moal, M., Piazza, P.V., 2002. Nicotine self-administration impairs hippocampal plasticity. *J. Neurosci.* 22, 3656–3662. <https://doi.org/20026324>
- Aguilar-Arredondo, A.**, Arias, C., Zepeda, A., 2015. Evaluating the functional state of adult-born neurons in the adult dentate gyrus of the hippocampus: from birth to functional integration. *Rev Neurosci* 26, 269–279. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2014-0071>
- Ahmad-Annuar, A.**, Ciani, L., Simeonidis, I., Herreros, J., Fredj, N.B., Rosso, S.B., Hall, A., Brickley, S., Salinas, P.C., 2006. Signaling across the synapse: a role for Wnt and Dishevelled in presynaptic assembly and neurotransmitter release. *J. Cell Biol.* 174, 127–139. <https://doi.org/10.1083/jcb.200511054>
- Aimone, J.B.**, Deng, W., Gage, F.H., 2011. Resolving new memories: a critical look at the dentate gyrus, adult neurogenesis, and pattern separation. *Neuron* 70, 589–596. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.010>
- Altman, J., Das, G.D.**, 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124, 319–335. <https://doi.org/10.1002/cne.901240303>
- Alvarez-Buylla, A.**, Garcia-Verdugo, J.M., 2002. Neurogenesis in adult subventricular zone. *J. Neurosci.* 22, 629–634.
- Álvarez-Buylla, A.**, Ihrie, R.A., 2014. Sonic hedgehog signaling in the postnatal brain. *Semin. Cell Dev. Biol.* 33, 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.05.008>
- Amthor, H., Christ, B.**, Rashid-Doubell, F., Kemp, C.F., Lang, E., Patel, K., 2002. Follistatin regulates bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) activity to stimulate embryonic muscle growth. *Dev. Biol.* 243, 115–127. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0555>
- Angers, S., Moon, R.T.**, 2009. Proximal events in Wnt signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 468–477. <https://doi.org/10.1038/nrm2717>
- Apostolopoulou, M.**, Kiehl, T.R., Winter, M., Cardenas De La Hoz, E., Boles, N.C., Bjornsson, C.S., Zuloaga, K.L., Goderie, S.K., Wang, Y., Cohen, A.R., Temple, S., 2017. Non-monotonic Changes in Progenitor Cell Behavior and Gene Expression during Aging of the Adult V-SVZ Neural Stem Cell Niche. *Stem Cell Reports* 9, 1931–1947. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.10.005>

- Armenteros, T.**, Andreu, Z., Hortigüela, R., Lie, D.C., Mira, H., 2018. BMP and WNT signalling cooperate through LEF1 in the neuronal specification of adult hippocampal neural stem and progenitor cells. *Sci Rep* 8, 9241. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27581-0>
- Arredondo, S.B.**, Guerrero, F.G., Herrera-Soto, A., Jensen-Flores, J., Bustamante, D.B., Oñate-Ponce, A., Henny, P., Varas-Godoy, M., Inestrosa, N.C., Varela-Nallar, L., 2020. Wnt5a promotes differentiation and development of adult-born neurons in the hippocampus by noncanonical Wnt signaling. *Stem Cells* 38, 422–436. <https://doi.org/10.1002/stem.3121>
- Arsenijevic, Y.**, Villemure, J.G., Brunet, J.F., Bloch, J.J., Déglon, N., Kostic, C., Zurn, A., Aebischer, P., 2001. Isolation of multipotent neural precursors residing in the cortex of the adult human brain. *Exp. Neurol.* 170, 48–62. <https://doi.org/10.1006/exnr.2001.7691>
- Babu, H.**, Claasen, J.-H., Kannan, S., Rünker, A.E., Palmer, T., Kempermann, G., 2011. A protocol for isolation and enriched monolayer cultivation of neural precursor cells from mouse dentate gyrus. *Front Neurosci* 5, 89. <https://doi.org/10.3389/fnins.2011.00089>
- Bagri, A.**, Gurney, T., He, X., Zou, Y.-R., Littman, D.R., Tessier-Lavigne, M., Pleasure, S.J., 2002a. The chemokine SDF1 regulates migration of dentate granule cells. *Development* 129, 4249–4260.
- Bagri, A.**, Marín, O., Plump, A.S., Mak, J., Pleasure, S.J., Rubenstein, J.L.R., Tessier-Lavigne, M., 2002b. Slit proteins prevent midline crossing and determine the dorsoventral position of major axonal pathways in the mammalian forebrain. *Neuron* 33, 233–248. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(02\)00561-5](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(02)00561-5)
- Bai, F.**, Bergeron, M., Nelson, D.L., 2003. Chronic AMPA receptor potentiator (LY451646) treatment increases cell proliferation in adult rat hippocampus. *Neuropharmacology* 44, 1013–1021. [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(03\)00104-7](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(03)00104-7)
- Beckervordersandforth, R.**, Ebert, B., Schäffner, I., Moss, J., Fiebig, C., Shin, J., Moore, D.L., Ghosh, L., Trincherro, M.F., Stockburger, C., Friedland, K., Steib, K., von Wittgenstein, J., Keiner, S., Redecker, C., Hölter, S.M., Xiang, W., Wurst, W., Jagasia, R., Schinder, A.F., Ming, G.-L., Toni, N., Jessberger, S., Song, H., Lie, D.C., 2017. Role of Mitochondrial Metabolism in the Control of Early Lineage Progression and Aging Phenotypes in Adult Hippocampal Neurogenesis. *Neuron* 93, 560-573.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.12.017>
- Bhanot, P.**, Brink, M., Samos, C.H., Hsieh, J.C., Wang, Y., Macke, J.P., Andrew, D., Nathans, J., Nusse, R., 1996. A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature* 382, 225–230. <https://doi.org/10.1038/382225a0>

- Blomfield, I.M.**, Rocamonde, B., Masdeu, M.D.M., Mulugeta, E., Vaga, S., van den Berg, D.L., Huillard, E., Guillemot, F., Urbán, N., 2019. Id4 promotes the elimination of the pro-activation factor *Ascl1* to maintain quiescence of adult hippocampal stem cells. *Elife* 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.48561>
- Boldrini, M.**, Fulmore, C.A., Tartt, A.N., Simeon, L.R., Pavlova, I., Poposka, V., Rosoklija, G.B., Stankov, A., Arango, V., Dwork, A.J., Hen, R., Mann, J.J., 2018. Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. *Cell Stem Cell* 22, 589-599.e5. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.03.015>
- Bonafina, A.**, Trincherro, M.F., Ríos, A.S., Bekinschtein, P., Schinder, A.F., Paratcha, G., Ledda, F., 2019. GDNF and GFR α 1 Are Required for Proper Integration of Adult-Born Hippocampal Neurons. *Cell Rep* 29, 4308-4319.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.11.100>
- Bonaguidi, M.A.**, McGuire, T., Hu, M., Kan, L., Samanta, J., Kessler, J.A., 2005. LIF and BMP signaling generate separate and discrete types of GFAP-expressing cells. *Development* 132, 5503–5514. <https://doi.org/10.1242/dev.02166>
- Bonaguidi, M.A.**, Peng, C.-Y., McGuire, T., Falciglia, G., Gobeske, K.T., Czeisler, C., Kessler, J.A., 2008. Noggin expands neural stem cells in the adult hippocampus. *J. Neurosci.* 28, 9194–9204. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3314-07.2008>
- Bond, A.M.**, Berg, D.A., Lee, S., Garcia-Epelboim, A.S., Adusumilli, V.S., Ming, G.-L., Song, H., 2020. Differential Timing and Coordination of Neurogenesis and Astrogenesis in Developing Mouse Hippocampal Subregions. *Brain Sci* 10. <https://doi.org/10.3390/brainsci10120909>
- Bond, A.M.**, Peng, C.-Y., Meyers, E.A., McGuire, T., Ewaleifoh, O., Kessler, J.A., 2014. BMP signaling regulates the tempo of adult hippocampal progenitor maturation at multiple stages of the lineage. *Stem Cells* 32, 2201–2214. <https://doi.org/10.1002/stem.1688>
- Bothwell, M.**, 2014. NGF, BDNF, NT3, and NT4. *Handb Exp Pharmacol* 220, 3–15. https://doi.org/10.1007/978-3-642-45106-5_1
- Bourne, J.**, Harris, K.M., 2007. Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Curr Opin Neurobiol* 17, 381–386. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2007.04.009>
- Bracko, O.**, Singer, T., Aigner, S., Knobloch, M., Winner, B., Ray, J., Clemenson, G.D., Suh, H., Couillard-Despres, S., Aigner, L., Gage, F.H., Jessberger, S., 2012. Gene expression profiling of neural stem cells and their neuronal progeny reveals IGF2 as a regulator of adult hippocampal neurogenesis. *J. Neurosci.* 32, 3376–3387. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4248-11.2012>

- Bragdon, B.**, Moseychuk, O., Saldanha, S., King, D., Julian, J., Nohe, A., 2011. Bone morphogenetic proteins: a critical review. *Cell. Signal.* 23, 609–620. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.10.003>
- Braun, S.M.G.**, Jessberger, S., 2014. Adult neurogenesis: mechanisms and functional significance. *Development* 141, 1983–1986. <https://doi.org/10.1242/dev.104596>
- Brederlau, A.**, Faigle, R., Elmi, M., Zarebski, A., Sjöberg, S., Fujii, M., Miyazono, K., Funa, K., 2004. The bone morphogenetic protein type Ib receptor is a major mediator of glial differentiation and cell survival in adult hippocampal progenitor cell culture. *Mol. Biol. Cell* 15, 3863–3875. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-08-0584>
- Brezun, J.M.**, Daszuta, A., 1999. Depletion in serotonin decreases neurogenesis in the dentate gyrus and the subventricular zone of adult rats. *Neuroscience* 89, 999–1002. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(98\)00693-9](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(98)00693-9)
- Budnik, V.**, Salinas, P.C., 2011. Wnt signaling during synaptic development and plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* 21, 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2010.12.002>
- Buechling, T.**, Boutros, M., 2011. Wnt signaling signaling at and above the receptor level. *Curr. Top. Dev. Biol.* 97, 21–53. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385975-4.00008-5>
- Butterfield, D.A.**, Poon, H.F., 2005. The senescence-accelerated prone mouse (SAMP8): a model of age-related cognitive decline with relevance to alterations of the gene expression and protein abnormalities in Alzheimer's disease. *Exp. Gerontol.* 40, 774–783. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2005.05.007>
- Cadigan, K.M.**, Waterman, M.L., 2012. TCF/LEFs and Wnt signaling in the nucleus. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007906>
- Cameron, H.A.**, Gould, E., 1994. Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. *Neuroscience* 61, 203–209. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90224-0](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90224-0)
- Cameron, H.A.**, McEwen, B.S., Gould, E., 1995. Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus. *J. Neurosci.* 15, 4687–4692.
- Cameron, H.A.**, McKay, R.D., 1999. Restoring production of hippocampal neurons in old age. *Nat. Neurosci.* 2, 894–897. <https://doi.org/10.1038/13197>

- Caronia, G.**, Wilcoxon, J., Feldman, P., Grove, E.A., 2010. Bone morphogenetic protein signaling in the developing telencephalon controls formation of the hippocampal dentate gyrus and modifies fear-related behavior. *J. Neurosci.* 30, 6291–6301. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0550-10.2010>
- Caronia-Brown, G.**, Yoshida, M., Gulden, F., Assimakopoulos, S., Grove, E.A., 2014. The cortical hem regulates the size and patterning of neocortex. *Development* 141, 2855–2865. <https://doi.org/10.1242/dev.106914>
- Carpentier, P.A.**, Palmer, T.D., 2009. Immune influence on adult neural stem cell regulation and function. *Neuron* 64, 79–92. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.08.038>
- Carro, E.**, Trejo, J.L., Busiguina, S., Torres-Aleman, I., 2001. Circulating insulin-like growth factor I mediates the protective effects of physical exercise against brain insults of different etiology and anatomy. *J. Neurosci.* 21, 5678–5684.
- Castro-Garcia, P.**, Díaz-Moreno, M., Gil-Gas, C., Fernández-Gómez, F.J., Honrubia-Gómez, P., Álvarez-Simón, C.B., Sánchez-Sánchez, F., Cano, J.C.C., Almeida, F., Blanco, V., Jordán, J., Mira, H., Ramírez-Castillejo, C., 2015. Defects in subventricular zone pigmented epithelium-derived factor niche signaling in the senescence-accelerated mouse prone-8. *FASEB J* 29, 1480–1492. <https://doi.org/10.1096/fj.13-244442>
- Catavero, C.**, Bao, H., Song, J., 2018. Neural mechanisms underlying GABAergic regulation of adult hippocampal neurogenesis. *Cell Tissue Res* 371, 33–46. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2668-y>
- Chang, C.**, Holtzman, D.A., Chau, S., Chickering, T., Woolf, E.A., Holmgren, L.M., Bodorova, J., Gearing, D.P., Holmes, W.E., Brivanlou, A.H., 2001. Twisted gastrulation can function as a BMP antagonist. *Nature* 410, 483–487. <https://doi.org/10.1038/35068583>
- Chen, D.**, Zhao, M., Mundy, G.R., 2004. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 22, 233–241. <https://doi.org/10.1080/08977190412331279890>
- Chen, H.-L.**, Lein, P.J., Wang, J.-Y., Gash, D., Hoffer, B.J., Chiang, Y.-H., 2003. Expression of bone morphogenetic proteins in the brain during normal aging and in 6-hydroxydopamine-lesioned animals. *Brain Res* 994, 81–90. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2003.09.020>
- Chen, H.-L.**, Panchision, D.M., 2007. Concise review: bone morphogenetic protein pleiotropism in neural stem cells and their derivatives--alternative pathways, convergent signals. *Stem Cells* 25, 63–68. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0339>

- Chen, J.**, Park, C.S., Tang, S.-J., 2006. Activity-dependent synaptic Wnt release regulates hippocampal long term potentiation. *J. Biol. Chem.* 281, 11910–11916. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511920200>
- Cheng, A.**, Wang, S., Cai, J., Rao, M.S., Mattson, M.P., 2003. Nitric oxide acts in a positive feedback loop with BDNF to regulate neural progenitor cell proliferation and differentiation in the mammalian brain. *Dev. Biol.* 258, 319–333. [https://doi.org/10.1016/s0012-1606\(03\)00120-9](https://doi.org/10.1016/s0012-1606(03)00120-9)
- Choe, Y.**, Kozlova, A., Graf, D., Pleasure, S.J., 2013. Bone morphogenic protein signaling is a major determinant of dentate development. *J. Neurosci.* 33, 6766–6775. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0128-13.2013>
- Choe, Y.**, Pleasure, S.J., Mira, H., 2015. Control of Adult Neurogenesis by Short-Range Morphogenic-Signaling Molecules. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018887>
- Choe, Y.**, Siegenthaler, J.A., Pleasure, S.J., 2012. A cascade of morphogenic signaling initiated by the meninges controls corpus callosum formation. *Neuron* 73, 698–712. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.11.036>
- Ciani, L.**, Salinas, P.C., 2005. WNTs in the vertebrate nervous system: from patterning to neuronal connectivity. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 351–362. <https://doi.org/10.1038/nrn1665>
- Clark, C.E.J.**, Nourse, C.C., Cooper, H.M., 2012. The tangled web of non-canonical Wnt signalling in neural migration. *Neurosignals* 20, 202–220. <https://doi.org/10.1159/000332153>
- Clarke, L.E.**, Liddelow, S.A., Chakraborty, C., Münch, A.E., Heiman, M., Barres, B.A., 2018. Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, E1896–E1905. <https://doi.org/10.1073/pnas.1800165115>
- Clevers, H.**, Nusse, R., 2012. Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell* 149, 1192–1205. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.012>
- Codega, P.**, Silva-Vargas, V., Paul, A., Maldonado-Soto, A.R., Deleo, A.M., Pastrana, E., Doetsch, F., 2014. Prospective identification and purification of quiescent adult neural stem cells from their in vivo niche. *Neuron* 82, 545–559. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.02.039>
- Colak, D.**, Mori, T., Brill, M.S., Pfeifer, A., Falk, S., Deng, C., Monteiro, R., Mummery, C., Sommer, L., Götz, M., 2008. Adult neurogenesis requires Smad4-mediated bone morphogenic protein signaling in stem cells. *J Neurosci* 28, 434–446. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4374-07.2008>

- Cole, J.D.**, Espinueva, D.F., Seib, D.R., Ash, A.M., Cooke, M.B., Cahill, S.P., O’Leary, T.P., Kwan, S.S., Snyder, J.S., 2020. Adult-Born Hippocampal Neurons Undergo Extended Development and Are Morphologically Distinct from Neonatally-Born Neurons. *J Neurosci* 40, 5740–5756.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1665-19.2020>
- Conboy, I.M.**, Conboy, M.J., Wagers, A.J., Girma, E.R., Weissman, I.L., Rando, T.A., 2005. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature* 433, 760–764. <https://doi.org/10.1038/nature03260>
- Contreras, A.**, Hines, D.J., Hines, R.M., 2019. Molecular Specialization of GABAergic Synapses on the Soma and Axon in Cortical and Hippocampal Circuit Function and Dysfunction. *Front Mol Neurosci* 12, 154.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00154>
- Coudreuse, D.**, Korswagen, H.C., 2007. The making of Wnt: new insights into Wnt maturation, sorting and secretion. *Development* 134, 3–12.
<https://doi.org/10.1242/dev.02699>
- Couillard-Despres, S.**, Winner, B., Schaubek, S., Aigner, R., Vroemen, M., Weidner, N., Bogdahn, U., Winkler, J., Kuhn, H.-G., Aigner, L., 2005. Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *Eur. J. Neurosci.* 21, 1–14.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03813.x>
- Crews, L.**, Adame, A., Patrick, C., Delaney, A., Pham, E., Rockenstein, E., Hansen, L., Masliah, E., 2010. Increased BMP6 levels in the brains of Alzheimer’s disease patients and APP transgenic mice are accompanied by impaired neurogenesis. *J. Neurosci.* 30, 12252–12262. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1305-10.2010>
- Cuenda, A.**, Rouse, J., Doza, Y.N., Meier, R., Cohen, P., Gallagher, T.F., Young, P.R., Lee, J.C., 1995. SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett.* 364, 229–233.
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00357-f](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00357-f)
- David, L.**, Mallet, C., Keramidas, M., Lamandé, N., Gasc, J.-M., Dupuis-Girod, S., Plauchu, H., Feige, J.-J., Bailly, S., 2008. Bone morphogenetic protein-9 is a circulating vascular quiescence factor. *Circ. Res.* 102, 914–922.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.165530>
- Deng, W.**, Aimone, J.B., Gage, F.H., 2010. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 339–350. <https://doi.org/10.1038/nrn2822>
- Derynck, R.**, Zhang, Y.E., 2003. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425, 577–584.
<https://doi.org/10.1038/nature02006>

- Díaz-Moreno, M.**, Armenteros, T., Gradari, S., Hortigüela, R., García-Corzo, L., Fontán-Lozano, Á., Trejo, J.L., Mira, H., 2018. Noggin rescues age-related stem cell loss in the brain of senescent mice with neurodegenerative pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115, 11625–11630. <https://doi.org/10.1073/pnas.1813205115>
- Díaz-Moreno, M.**, Hortigüela, R., Gonçalves, A., García-Carpio, I., Manich, G., García-Bermúdez, E., Moreno-Estellés, M., Eguiluz, C., Vilaplana, J., Pelegrí, C., Vilar, M., Mira, H., 2013. A β increases neural stem cell activity in senescence-accelerated SAMP8 mice. *Neurobiol Aging* 34, 2623–2638. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.05.011>
- Dudas, M.**, Sridurongrit, S., Nagy, A., Okazaki, K., Kaartinen, V., 2004. Craniofacial defects in mice lacking BMP type I receptor Alk2 in neural crest cells. *Mech. Dev.* 121, 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2003.12.003>
- Dupret, D.**, Revest, J.-M., Koehl, M., Ichas, F., De Giorgi, F., Costet, P., Abrous, D.N., Piazza, P.V., 2008. Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. *PLoS ONE* 3, e1959. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001959>
- Duveau, V.**, Laustela, S., Barth, L., Gianolini, F., Vogt, K.E., Keist, R., Chandra, D., Homanics, G.E., Rudolph, U., Fritschy, J.-M., 2011. Spatiotemporal specificity of GABAA receptor-mediated regulation of adult hippocampal neurogenesis. *Eur. J. Neurosci.* 34, 362–373. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07782.x>
- Eaton, B.A.**, Davis, G.W., 2005. LIM Kinase1 controls synaptic stability downstream of the type II BMP receptor. *Neuron* 47, 695–708. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.08.010>
- Ehm, O.**, Göritz, C., Covic, M., Schäffner, I., Schwarz, T.J., Karaca, E., Kempkes, B., Kremmer, E., Pfrieder, F.W., Espinosa, L., Bigas, A., Giachino, C., Taylor, V., Frisé, J., Lie, D.C., 2010. RBPJ κ -dependent signaling is essential for long-term maintenance of neural stem cells in the adult hippocampus. *J Neurosci* 30, 13794–13807. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1567-10.2010>
- Ehrlich, M.**, Horbelt, D., Marom, B., Knaus, P., Henis, Y.I., 2011. Homomeric and heteromeric complexes among TGF- β and BMP receptors and their roles in signaling. *Cell. Signal.* 23, 1424–1432. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.04.004>
- Eisch, A.J.**, Barrot, M., Schad, C.A., Self, D.W., Nestler, E.J., 2000. Opiates inhibit neurogenesis in the adult rat hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 7579–7584. <https://doi.org/10.1073/pnas.120552597>

- Encinas, J.M.**, Michurina, T.V., Peunova, N., Park, J.-H., Tordo, J., Peterson, D.A., Fishell, G., Koulakov, A., Enikolopov, G., 2011. Division-coupled astrocytic differentiation and age-related depletion of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell* 8, 566–579. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.03.010>
- Engler, A.**, Zhang, R., Taylor, V., 2018. Notch and Neurogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1066, 223–234. https://doi.org/10.1007/978-3-319-89512-3_11
- Eriksson, P.S.**, Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A., Gage, F.H., 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.* 4, 1313–1317. <https://doi.org/10.1038/3305>
- Esquenazi, S.**, Monnerie, H., Kaplan, P., Le Roux, P., 2002. BMP-7 and excess glutamate: opposing effects on dendrite growth from cerebral cortical neurons in vitro. *Exp Neurol* 176, 41–54. <https://doi.org/10.1006/exnr.2002.7906>
- Faigle, R.**, Song, H., 2013. Signaling mechanisms regulating adult neural stem cells and neurogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 2435–2448. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.002>
- Fan, X.**, Wheatley, E.G., Villeda, S.A., 2017. Mechanisms of Hippocampal Aging and the Potential for Rejuvenation. *Annu. Rev. Neurosci.* 40, 251–272. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-072116-031357>
- Faure, S.**, de Santa Barbara, P., Roberts, D.J., Whitman, M., 2002. Endogenous patterns of BMP signaling during early chick development. *Dev. Biol.* 244, 44–65. <https://doi.org/10.1006/dbio.2002.0579>
- Feiner, N.**, Begemann, G., Renz, A.J., Meyer, A., Kuraku, S., 2009. The origin of bmp16, a novel Bmp2/4 relative, retained in teleost fish genomes. *BMC Evol. Biol.* 9, 277. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-277>
- Feiner, N.**, Ericsson, R., Meyer, A., Kuraku, S., 2011. Revisiting the origin of the vertebrate Hox14 by including its relict sarcopterygian members. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 316, 515–525. <https://doi.org/10.1002/jez.b.21426>
- Feng, X.-H.**, Derynck, R., 2005. Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 659–693. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.022404.142018>
- Fernandes, M.**, Gutin, G., Alcorn, H., McConnell, S.K., Hébert, J.M., 2007. Mutations in the BMP pathway in mice support the existence of two molecular classes of holoprosencephaly. *Development* 134, 3789–3794. <https://doi.org/10.1242/dev.004325>

- Fernández, A.**, Quintana, E., Velasco, P., Moreno-Jimenez, B., de Andrés, B., Gaspar, M.L., Liste, I., Vilar, M., Mira, H., Cano, E., 2021. Senescent accelerated prone 8 (SAMP8) mice as a model of age dependent neuroinflammation. *J Neuroinflammation* 18, 75. <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02104-3>
- Fernández-García, C.**, Rancan, L., Paredes, S.D., Montero, C., de la Fuente, M., Vara, E., Tresguerres, J.A.F., 2019. Xanthohumol exerts protective effects in liver alterations associated with aging. *Eur J Nutr* 58, 653–663. <https://doi.org/10.1007/s00394-018-1657-6>
- Foletta, V.C.**, Lim, M.A., Soosairajah, J., Kelly, A.P., Stanley, E.G., Shannon, M., He, W., Das, S., Massagué, J., Bernard, O., 2003. Direct signaling by the BMP type II receptor via the cytoskeletal regulator LIMK1. *The Journal of Cell Biology* 162, 1089. <https://doi.org/10.1083/jcb.200212060>
- Frankland, P.W.**, Köhler, S., Josselyn, S.A., 2013. Hippocampal neurogenesis and forgetting. *Trends Neurosci* 36, 497–503. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.05.002>
- Frankland, P.W.**, Josselyn, S.A., 2016. Hippocampal Neurogenesis and Memory Clearance. *Neuropsychopharmacology* 41, 382–383. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.243>
- Fuentealba, L.C.**, Eivers, E., Ikeda, A., Hurtado, C., Kuroda, H., Pera, E.M., De Robertis, E.M., 2007. Integrating patterning signals: Wnt/GSK3 regulates the duration of the BMP/Smad1 signal. *Cell* 131, 980–993. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.09.027>
- Furuta, Y.**, Piston, D.W., Hogan, B.L., 1997. Bone morphogenetic proteins (BMPs) as regulators of dorsal forebrain development. *Development* 124, 2203–2212.
- Gage, F.H.**, 2000. Mammalian neural stem cells. *Science* 287, 1433–1438. <https://doi.org/10.1126/science.287.5457.1433>
- Gamell, C.**, Osses, N., Bartrons, R., Rückle, T., Camps, M., Rosa, J.L., Ventura, F., 2008. BMP2 induction of actin cytoskeleton reorganization and cell migration requires PI3-kinase and Cdc42 activity. *J. Cell. Sci.* 121, 3960–3970. <https://doi.org/10.1242/jcs.031286>
- Gamell, C.**, Susperregui, A.G., Bernard, O., Rosa, J.L., Ventura, F., 2011. The p38/MK2/Hsp25 pathway is required for BMP-2-induced cell migration. *PLoS ONE* 6, e16477. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016477>
- Gámez, B.**, Rodríguez-Carballo, E., Ventura, F., 2013. BMP signaling in telencephalic neural cell specification and maturation. *Front Cell Neurosci* 7, 87. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00087>

- Gao, C.**, Xiao, G., Hu, J., 2014. Regulation of Wnt/ β -catenin signaling by posttranslational modifications. *Cell Biosci* 4, 13. <https://doi.org/10.1186/2045-3701-4-13>
- Gao, Y.**, Shen, M., Gonzalez, J.C., Dong, Q., Kannan, S., Hoang, J.T., Eisinger, B.E., Pandey, J., Javadi, S., Chang, Q., Wang, D., Overstreet-Wadiche, L., Zhao, X., 2020. RGS6 Mediates Effects of Voluntary Running on Adult Hippocampal Neurogenesis. *Cell Rep* 32, 107997. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107997>
- Garcia-Fernàndez, J.**, D’Aniello, S., Escrivà, H., 2007. Organizing chordates with an organizer. *Bioessays* 29, 619–624. <https://doi.org/10.1002/bies.20596>
- García-Matas, S.**, Gutierrez-Cuesta, J., Coto-Montes, A., Rubio-Acero, R., Díez-Vives, C., Camins, A., Pallàs, M., Sanfeliu, C., Cristòfol, R., 2008. Dysfunction of astrocytes in senescence-accelerated mice SAMP8 reduces their neuroprotective capacity. *Aging Cell* 7, 630–640. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2008.00410.x>
- García-Matas, S.**, Paul, R.K., Molina-Martínez, P., Palacios, H., Gutierrez, V.M., Corpas, R., Pallas, M., Cristòfol, R., de Cabo, R., Sanfeliu, C., 2015. In vitro caloric restriction induces protective genes and functional rejuvenation in senescent SAMP8 astrocytes. *Aging Cell* 14, 334–344. <https://doi.org/10.1111/accel.12259>
- Garcion, E.**, Halilagic, A., Faissner, A., French-Constant, C., 2004. Generation of an environmental niche for neural stem cell development by the extracellular matrix molecule tenascin C. *Development* 131, 3423–3432. <https://doi.org/10.1242/dev.01202>
- Garthe, A.**, Behr, J., Kempermann, G., 2009. Adult-generated hippocampal neurons allow the flexible use of spatially precise learning strategies. *PLoS ONE* 4, e5464. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005464>
- Gebara, E.**, Bonaguidi, M.A., Beckervordersandforth, R., Sultan, S., Udry, F., Gijs, P.-J., Lie, D.C., Ming, G.-L., Song, H., Toni, N., 2016. Heterogeneity of Radial Glia-Like Cells in the Adult Hippocampus. *Stem Cells* 34, 997–1010. <https://doi.org/10.1002/stem.2266>
- Giachino, C.**, Barz, M., Tchorz, J.S., Tome, M., Gassmann, M., Bischofberger, J., Bettler, B., Taylor, V., 2014. GABA suppresses neurogenesis in the adult hippocampus through GABAB receptors. *Development* 141, 83–90. <https://doi.org/10.1242/dev.102608>
- Gobeske, K.T.**, Das, S., Bonaguidi, M.A., Weiss, C., Radulovic, J., Disterhoft, J.F., Kessler, J.A., 2009. BMP signaling mediates effects of exercise on hippocampal neurogenesis and cognition in mice. *PLoS One* 4, e7506. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007506>
- Gomes, W.A.**, Mehler, M.F., Kessler, J.A., 2003. Transgenic overexpression of BMP4 increases astroglial and decreases oligodendroglial lineage commitment. *Dev. Biol.* 255, 164–177. [https://doi.org/10.1016/s0012-1606\(02\)00037-4](https://doi.org/10.1016/s0012-1606(02)00037-4)

- Gómez-Orte, E., Sáenz-Narciso, B., Moreno, S., Cabello, J., 2013.** Multiple functions of the noncanonical Wnt pathway. *Trends Genet.* 29, 545–553. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.06.003>
- Gonçalves, J.T., Schafer, S.T., Gage, F.H., 2016.** Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. *Cell* 167, 897–914. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.021>
- Goto, K., Kamiya, Y., Imamura, T., Miyazono, K., Miyazawa, K., 2007.** Selective inhibitory effects of Smad6 on bone morphogenetic protein type I receptors. *J. Biol. Chem.* 282, 20603–20611. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702100200>
- Gould, E., Tanapat, P., Hastings, NB., Shors, TJ., 1999.** Neurogenesis in adulthood: a possible role in learning. *Trends Cogn. Sci. (Regul. Ed.)* 3, 186–192. [https://doi.org/10.1016/s1364-6613\(99\)01310-8](https://doi.org/10.1016/s1364-6613(99)01310-8)
- Greenblatt, M.B., Shim, J.-H., Glimcher, L.H., 2010.** TAK1 mediates BMP signaling in cartilage. *Ann N Y Acad Sci* 1192, 385–390. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05222.x>
- Gross, J.C., Boutros, M., 2013.** Secretion and extracellular space travel of Wnt proteins. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 23, 385–390. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2013.02.017>
- Gross, R.E., Mehler, M.F., Mabie, P.C., Zang, Z., Santschi, L., Kessler, J.A., 1996.** Bone morphogenetic proteins promote astroglial lineage commitment by mammalian subventricular zone progenitor cells. *Neuron* 17, 595–606. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80193-2](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80193-2)
- Guo, J., Wu, G., 2012.** The signaling and functions of heterodimeric bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev.* 23, 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2012.02.001>
- Guo, W., Zhang, L., Christopher, D.M., Teng, Z.-Q., Fausett, S.R., Liu, C., George, O.L., Klingensmith, J., Jin, P., Zhao, X., 2011.** RNA-binding protein FXR2 regulates adult hippocampal neurogenesis by reducing Noggin expression. *Neuron* 70, 924–938. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.03.027>
- Haïk, S., Gauthier, L.R., Granotier, C., Peyrin, J.M., Lages, C.S., Dormont, D., Boussin, F.D., 2000.** Fibroblast growth factor 2 up regulates telomerase activity in neural precursor cells. *Oncogene* 19, 2957–2966. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203596>
- Hall, A.K., Miller, R.H., 2004.** Emerging roles for bone morphogenetic proteins in central nervous system glial biology. *J. Neurosci. Res.* 76, 1–8. <https://doi.org/10.1002/jnr.20019>

- Hao, J.**, Ho, J.N., Lewis, J.A., Karim, K.A., Daniels, R.N., Gentry, P.R., Hopkins, C.R., Lindsley, C.W., Hong, C.C., 2010. In vivo structure-activity relationship study of dorsomorphin analogues identifies selective VEGF and BMP inhibitors. *ACS Chem. Biol.* 5, 245–253. <https://doi.org/10.1021/cb9002865>
- Haupt, J.**, Deichsel, A., Stange, K., Ast, C., Boccardi, R., Ravazzolo, R., Di Rocco, M., Ferrari, P., Landi, A., Kaplan, F.S., Shore, E.M., Reissner, C., Seemann, P., 2014. ACVR1 p.Q207E causes classic fibrodysplasia ossificans progressiva and is functionally distinct from the engineered constitutively active ACVR1 p.Q207D variant. *Hum Mol Genet* 23, 5364–5377. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu255>
- He, Y.**, Zhang, H., Yung, A., Villeda, S.A., Jaeger, P.A., Olayiwola, O., Fainberg, N., Wyss-Coray, T., 2014. ALK5-dependent TGF- β signaling is a major determinant of late-stage adult neurogenesis. *Nat Neurosci* 17, 943–952. <https://doi.org/10.1038/nn.3732>
- Hébert, J.M.**, Hayhurst, M., Marks, M.E., Kulesa, H., Hogan, B.L.M., McConnell, S.K., 2003. BMP ligands act redundantly to pattern the dorsal telencephalic midline. *Genesis* 35, 214–219. <https://doi.org/10.1002/gene.10183>
- Hegarty, S.V.**, O’Keeffe, G.W., Sullivan, A.M., 2013. BMP-Smad 1/5/8 signalling in the development of the nervous system. *Prog. Neurobiol.* 109, 28–41. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.07.002>
- Heine, V.M.**, Maslam, S., Joëls, M., Lucassen, P.J., 2004a. Prominent decline of newborn cell proliferation, differentiation, and apoptosis in the aging dentate gyrus, in absence of an age-related hypothalamus-pituitary-adrenal axis activation. *Neurobiol. Aging* 25, 361–375. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(03\)00090-3](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(03)00090-3)
- Heine, V.M.**, Maslam, S., Zareno, J., Joëls, M., Lucassen, P.J., 2004b. Suppressed proliferation and apoptotic changes in the rat dentate gyrus after acute and chronic stress are reversible. *Eur J Neurosci* 19, 131–144. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.03100.x>
- Heppt, J.**, Wittmann, M.-T., Schäffner, I., Billmann, C., Zhang, J., Vogt-Weisenhorn, D., Prakash, N., Wurst, W., Taketo, M.M., Lie, D.C., 2020. β -catenin signaling modulates the tempo of dendritic growth of adult-born hippocampal neurons. *EMBO J* 39, e104472. <https://doi.org/10.15252/embj.2020104472>
- Herrera, D.G.**, Yague, A.G., Johnsen-Soriano, S., Bosch-Morell, F., Collado-Morente, L., Muriach, M., Romero, F.J., Garcia-Verdugo, J.M., 2003. Selective impairment of hippocampal neurogenesis by chronic alcoholism: protective effects of an antioxidant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 7919–7924. <https://doi.org/10.1073/pnas.1230907100>
- Hill, C.S.**, 2009. Nucleocytoplasmic shuttling of Smad proteins. *Cell Res.* 19, 36–46. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.325>

- Hinck, A.P.**, 2012. Structural studies of the TGF- β s and their receptors - insights into evolution of the TGF- β superfamily. *FEBS Lett.* 586, 1860–1870. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.05.028>
- Hino, J.**, Kangawa, K., Matsuo, H., Nohno, T., Nishimatsu, S., 2004. Bone morphogenetic protein-3 family members and their biological functions. *Front. Biosci.* 9, 1520–1529. <https://doi.org/10.2741/1355>
- Hodge, R.D.**, Nelson, B.R., Kahoud, R.J., Yang, R., Mussar, K.E., Reiner, S.L., Hevner, R.F., 2012. Tbr2 is essential for hippocampal lineage progression from neural stem cells to intermediate progenitors and neurons. *J Neurosci* 32, 6275–6287. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0532-12.2012>
- Holick, K.A.**, Lee, D.C., Hen, R., Dulawa, S.C., 2008. Behavioral effects of chronic fluoxetine in BALB/cj mice do not require adult hippocampal neurogenesis or the serotonin 1A receptor. *Neuropsychopharmacology* 33, 406–417. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301399>
- Hori, K.**, Sen, A., Artavanis-Tsakonas, S., 2013. Notch signaling at a glance. *J. Cell. Sci.* 126, 2135–2140. <https://doi.org/10.1242/jcs.127308>
- Houser, C.R.**, 2007. Interneurons of the dentate gyrus: an overview of cell types, terminal fields and neurochemical identity. *Prog. Brain Res.* 163, 217–232. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)63013-1](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)63013-1)
- Hsieh, J.**, Aimone, J.B., Kaspar, B.K., Kuwabara, T., Nakashima, K., Gage, F.H., 2004. IGF-I instructs multipotent adult neural progenitor cells to become oligodendrocytes. *J Cell Biol* 164, 111–122. <https://doi.org/10.1083/jcb.200308101>
- Husein, S.M.**, Duff, E.K., Sirard, C., 2003. Smad4 and beta-catenin co-activators functionally interact with lymphoid-enhancing factor to regulate graded expression of Msx2. *J. Biol. Chem.* 278, 48805–48814. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305472200>
- Irwin, D.J.**, Lee, V.M.-Y., Trojanowski, J.Q., 2013. Parkinson's disease dementia: convergence of α -synuclein, tau and amyloid- β pathologies. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 626–636. <https://doi.org/10.1038/nrn3549>
- Ishida, W.**, Hamamoto, T., Kusanagi, K., Yagi, K., Kawabata, M., Takehara, K., Sampath, T.K., Kato, M., Miyazono, K., 2000. Smad6 is a Smad1/5-induced smad inhibitor. Characterization of bone morphogenetic protein-responsive element in the mouse Smad6 promoter. *J. Biol. Chem.* 275, 6075–6079. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.9.6075>

- Ishitani, T.**, Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K., 2003. Regulation of lymphoid enhancer factor 1/T-cell factor by mitogen-activated protein kinase-related Nemo-like kinase-dependent phosphorylation in Wnt/beta-catenin signaling. *Mol. Cell. Biol.* 23, 1379–1389. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.4.1379-1389.2003>
- Ishitani, T.**, 2012. Context-dependent dual and opposite roles of nemo-like kinase in the Wnt/ β -catenin signaling. *Cell Cycle* 11, 1743–1745. <https://doi.org/10.4161/cc.20183>
- Ito, H.**, Morishita, R., Iwamoto, I., Nagata, K., 2014. Establishment of an in vivo electroporation method into postnatal newborn neurons in the dentate gyrus. *Hippocampus* 24, 1449–1457. <https://doi.org/10.1002/hipo.22325>
- Ito, K.**, 2013. Frontiers of model animals for neuroscience: two prosperous aging model animals for promoting neuroscience research. *Exp. Anim.* 62, 275–280. <https://doi.org/10.1538/expanim.62.275>
- Itoh, S.**, Itoh, F., Goumans, M.J., Ten Dijke, P., 2000. Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins. *Eur. J. Biochem.* 267, 6954–6967. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01828.x>
- Jacobs, B.L.**, van Praag, H., Gage, F.H., 2000. Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression. *Mol. Psychiatry* 5, 262–269. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4000712>
- Jan, Y.N.**, Jan, L.Y., 2001. Dendrites. *Genes Dev.* 15, 2627–2641. <https://doi.org/10.1101/gad.916501>
- Janda, C.Y.**, Waghray, D., Levin, A.M., Thomas, C., Garcia, K.C., 2012. Structural basis of Wnt recognition by Frizzled. *Science* 337, 59–64. <https://doi.org/10.1126/science.1222879>
- Jin, W.**, Yun, C., Kim, H.-S., Kim, S.-J., 2007. TrkC binds to the bone morphogenetic protein type II receptor to suppress bone morphogenetic protein signaling. *Cancer Res.* 67, 9869–9877. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0436>
- Jones, C.**, Chen, P., 2007. Planar cell polarity signaling in vertebrates. *Bioessays* 29, 120–132. <https://doi.org/10.1002/bies.20526>
- Josselyn, S.A.**, Frankland, P.W., 2012. Infantile amnesia: a neurogenic hypothesis. *Learn. Mem.* 19, 423–433. <https://doi.org/10.1101/lm.021311.110>
- Kadowaki, T.**, Wilder, E., Klingensmith, J., Zachary, K., Perrimon, N., 1996. The segment polarity gene porcupine encodes a putative multitransmembrane protein involved in Wingless processing. *Genes Dev.* 10, 3116–3128. <https://doi.org/10.1101/gad.10.24.3116>

- Kalamakis, G.**, Brüne, D., Ravichandran, S., Bolz, J., Fan, W., Ziebell, F., Stiehl, T., Catalá-Martinez, F., Kupke, J., Zhao, S., Llorens-Bobadilla, E., Bauer, K., Limpert, S., Berger, B., Christen, U., Schmezer, P., Mallm, J.P., Berninger, B., Anders, S., Del Sol, A., Marciniak-Czochra, A., Martin-Villalba, A., 2019. Quiescence Modulates Stem Cell Maintenance and Regenerative Capacity in the Aging Brain. *Cell* 176, 1407-1419.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.040>
- Kang, Q.**, Sun, M.H., Cheng, H., Peng, Y., Montag, A.G., Deyrup, A.T., Jiang, W., Luu, H.H., Luo, J., Szatkowski, J.P., Vanichakarn, P., Park, J.Y., Li, Y., Haydon, R.C., He, T.-C., 2004. Characterization of the distinct orthotopic bone-forming activity of 14 BMPs using recombinant adenovirus-mediated gene delivery. *Gene Ther.* 11, 1312–1320. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302298>
- Kempermann, G.**, 2011. The pessimist's and optimist's views of adult neurogenesis. *Cell* 145, 1009–1011. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.011>
- Kempermann, G.**, 2006. They are not too excited: the possible role of adult-born neurons in epilepsy. *Neuron* 52, 935–937. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.12.004>
- Kempermann, G.**, Chesler, E.J., Lu, L., Williams, R.W., Gage, F.H., 2006. Natural variation and genetic covariance in adult hippocampal neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 780–785. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510291103>
- Kempermann, G.**, Gage, F.H., Aigner, L., Song, H., Curtis, M.A., Thuret, S., Kuhn, H.G., Jessberger, S., Frankland, P.W., Cameron, H.A., Gould, E., Hen, R., Abrous, D.N., Toni, N., Schinder, A.F., Zhao, X., Lucassen, P.J., Frisén, J., 2018. Human Adult Neurogenesis: Evidence and Remaining Questions. *Cell Stem Cell* 23, 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.04.004>
- Kempermann, G.**, Gast, D., Kronenberg, G., Yamaguchi, M., Gage, F.H., 2003. Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development* 130, 391–399. <https://doi.org/10.1242/dev.00203>
- Kempermann, G.**, Jessberger, S., Steiner, B., Kronenberg, G., 2004. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci.* 27, 447–452. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.05.013>
- Kempermann, G.**, Kuhn, H.G., Gage, F.H., 1997. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386, 493–495. <https://doi.org/10.1038/386493a0>
- Kempermann, G.**, Song, H., Gage, F.H., 2015. Neurogenesis in the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, a018812. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018812>

- Kerloch, T.**, Clavreul, S., Goron, A., Abrous, D.N., Pacary, E., 2019. Dentate Granule Neurons Generated During Perinatal Life Display Distinct Morphological Features Compared With Later-Born Neurons in the Mouse Hippocampus. *Cereb Cortex* 29, 3527–3539. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhy224>
- Kikuchi, A.**, Yamamoto, H., Kishida, S., 2007. Multiplicity of the interactions of Wnt proteins and their receptors. *Cell. Signal.* 19, 659–671. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2006.11.001>
- King, J.A.**, Marker, P.C., Seung, K.J., Kingsley, D.M., 1994. BMP5 and the molecular, skeletal, and soft-tissue alterations in short ear mice. *Dev. Biol.* 166, 112–122. <https://doi.org/10.1006/dbio.1994.1300>
- Kirby, E.D.**, Muroy, S.E., Sun, W.G., Covarrubias, D., Leong, M.J., Barchas, L.A., Kaufer, D., 2013. Acute stress enhances adult rat hippocampal neurogenesis and activation of newborn neurons via secreted astrocytic FGF2. *Elife* 2, e00362. <https://doi.org/10.7554/eLife.00362>
- Klempin, F.**, Kempermann, G., 2007. Adult hippocampal neurogenesis and aging. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 257, 271–280. <https://doi.org/10.1007/s00406-007-0731-5>
- Knight, P.G.**, Glister, C., 2006. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction* 132, 191–206. <https://doi.org/10.1530/rep.1.01074>
- Kowtharapu, B.S.**, Prakasam, R.K., Murín, R., Koczan, D., Stahnke, T., Wree, A., Jünemann, A.G.M., Stachs, O., 2018. Role of Bone Morphogenetic Protein 7 (BMP7) in the Modulation of Corneal Stromal and Epithelial Cell Functions. *Int J Mol Sci* 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19051415>
- Kratochwil, K.**, Dull, M., Farinas, I., Galceran, J., Grosschedl, R., 1996. Lef1 expression is activated by BMP-4 and regulates inductive tissue interactions in tooth and hair development. *Genes Dev.* 10, 1382–1394. <https://doi.org/10.1101/gad.10.11.1382>
- Krause, C.**, Guzman, A., Knaus, P., 2011. Noggin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43, 478–481. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.01.007>
- Krausova, M.**, Korinek, V., 2014. Wnt signaling in adult intestinal stem cells and cancer. *Cell. Signal.* 26, 570–579. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.11.032>
- Kuhn, H.**, Dickinson-Anson, H., Gage, F., 1996. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 16, 2027–2033. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-06-02027.1996>

- Kuhn, H.G.**, Winkler, J., Kempermann, G., Thal, L.J., Gage, F.H., 1997. Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J. Neurosci.* 17, 5820–5829.
- Kuipers, S.D.**, Schroeder, J.E., Trentani, A., 2015. Changes in hippocampal neurogenesis throughout early development. *Neurobiol. Aging* 36, 365–379. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.07.033>
- Kulkarni, V.A.**, Jha, S., Vaidya, V.A., 2002. Depletion of norepinephrine decreases the proliferation, but does not influence the survival and differentiation, of granule cell progenitors in the adult rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 16, 2008–2012. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02268.x>
- Kurozumi, K.**, Nishita, M., Yamaguchi, K., Fujita, T., Ueno, N., Shibuya, H., 1998. BRAM1, a BMP receptor-associated molecule involved in BMP signalling. *Genes Cells* 3, 257–264. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.1998.00186.x>
- Kuwabara, T.**, Hsieh, J., Muotri, A., Yeo, G., Warashina, M., Lie, D.C., Moore, L., Nakashima, K., Asashima, M., Gage, F.H., 2009. Wnt-mediated activation of NeuroD1 and retro-elements during adult neurogenesis. *Nat. Neurosci.* 12, 1097–1105. <https://doi.org/10.1038/nn.2360>
- Laussu, J.**, Khuong, A., Gautrais, J., Davy, A., 2014. Beyond boundaries--Eph:ephrin signaling in neurogenesis. *Cell Adh Migr* 8, 349–359. <https://doi.org/10.4161/19336918.2014.969990>
- Le Roux, P.**, Behar, S., Higgins, D., Charette, M., 1999. OP-1 enhances dendritic growth from cerebral cortical neurons in vitro. *Exp Neurol* 160, 151–163. <https://doi.org/10.1006/exnr.1999.7194>
- Lee, J.**, Seroogy, K.B., Mattson, M.P., 2002. Dietary restriction enhances neurotrophin expression and neurogenesis in the hippocampus of adult mice. *J. Neurochem.* 80, 539–547. <https://doi.org/10.1046/j.0022-3042.2001.00747.x>
- Lee, S.M.**, Tole, S., Grove, E., McMahon, A.P., 2000. A local Wnt-3a signal is required for development of the mammalian hippocampus. *Development* 127, 457–467.
- Lee-Hoeflich, S.T.**, Causing, C.G., Podkova, M., Zhao, X., Wrana, J.L., Attisano, L., 2004. Activation of LIMK1 by binding to the BMP receptor, BMPRII, regulates BMP-dependent dendritogenesis. *The EMBO Journal* 23, 4792. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600418>
- Leeman, D.S.**, Hebestreit, K., Ruetz, T., Webb, A.E., McKay, A., Pollina, E.A., Dulken, B.W., Zhao, X., Yeo, R.W., Ho, T.T., Mahmoudi, S., Devarajan, K., Passegué, E., Rando, T.A., Frydman, J., Brunet, A., 2018. Lysosome activation clears aggregates and enhances quiescent neural stem cell activation during aging. *Science* 359, 1277–1283. <https://doi.org/10.1126/science.aag3048>

- Leuner, B.**, Gould, E., Shors, T.J., 2006. Is there a link between adult neurogenesis and learning? *Hippocampus* 16, 216–224. <https://doi.org/10.1002/hipo.20153>
- Li, D.**, Tang, J., Xu, H., Fan, X., Bai, Y., Yang, L., 2008. Decreased hippocampal cell proliferation correlates with increased expression of BMP4 in the APP^{swe}/PS1^{DeltaE9} mouse model of Alzheimer's disease. *Hippocampus* 18, 692–698. <https://doi.org/10.1002/hipo.20428>
- Li, G.**, Pleasure, S.J., 2005. Morphogenesis of the dentate gyrus: what we are learning from mouse mutants. *Dev. Neurosci.* 27, 93–99. <https://doi.org/10.1159/000085980>
- Li, W.**, Cogswell, C.A., LoTurco, J.J., 1998. Neuronal differentiation of precursors in the neocortical ventricular zone is triggered by BMP. *J. Neurosci.* 18, 8853–8862.
- Lie, D.-C.**, Colamarino, S.A., Song, H.-J., Désiré, L., Mira, H., Consiglio, A., Lein, E.S., Jessberger, S., Lansford, H., Dearie, A.R., Gage, F.H., 2005. Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature* 437, 1370–1375. <https://doi.org/10.1038/nature04108>
- Liem, K.F.**, Tremml, G., Jessell, T.M., 1997. A role for the roof plate and its resident TGF β -related proteins in neuronal patterning in the dorsal spinal cord. *Cell* 91, 127–138. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)80015-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)80015-5)
- Lim, D.A.**, Tramontin, A.D., Trevejo, J.M., Herrera, D.G., García-Verdugo, J.M., Alvarez-Buylla, A., 2000. Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron* 28, 713–726. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)00148-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)00148-3)
- Liu, A.**, Niswander, L.A., 2005. Bone morphogenetic protein signalling and vertebrate nervous system development. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 945–954. <https://doi.org/10.1038/nrn1805>
- Liu, F.**, Ventura, F., Doody, J., Massagué, J., 1995. Human type II receptor for bone morphogenic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs. *Mol. Cell. Biol.* 15, 3479–3486. <https://doi.org/10.1128/mcb.15.7.3479>
- Liu, S.-Y.**, Zhang, Z.-Y., Song, Y.-C., Qiu, K.-J., Zhang, K.-C., An, N., Zhou, Z., Cai, W.-Q., Yang, H., 2004. SVZa neural stem cells differentiate into distinct lineages in response to BMP4. *Exp. Neurol.* 190, 109–121. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.07.015>
- Livak, K.J.**, Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

- Lledo, P.-M.,** Valley, M., 2016. Adult Olfactory Bulb Neurogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018945>
- Llorens-Martín, M.,** Blazquez-Llorca, L., Benavides-Piccione, R., Rabano, A., Hernandez, F., Avila, J., DeFelipe, J., 2014. Selective alterations of neurons and circuits related to early memory loss in Alzheimer's disease. *Front Neuroanat* 8. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00038>
- Llorens-Martín, M.,** Fuster-Matanzo, A., Teixeira, C.M., Jurado-Arjona, J., Ulloa, F., Defelipe, J., Rábano, A., Hernández, F., Soriano, E., Avila, J., 2013. GSK-3 β overexpression causes reversible alterations on postsynaptic densities and dendritic morphology of hippocampal granule neurons in vivo. *Mol Psychiatry* 18, 451–460. <https://doi.org/10.1038/mp.2013.4>
- Lu, M.,** Lin, S.-C., Huang, Y., Kang, Y.J., Rich, R., Lo, Y.-C., Myszka, D., Han, J., Wu, H., 2007. XIAP induces NF-kappaB activation via the BIR1/TAB1 interaction and BIR1 dimerization. *Mol. Cell* 26, 689–702. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.05.006>
- Lugert, S.,** Basak, O., Knuckles, P., Haussler, U., Fabel, K., Götz, M., Haas, C.A., Kempermann, G., Taylor, V., Giachino, C., 2010. Quiescent and active hippocampal neural stem cells with distinct morphologies respond selectively to physiological and pathological stimuli and aging. *Cell Stem Cell* 6, 445–456. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.03.017>
- Ma, D.K.,** Kim, W.R., Ming, G., Song, H., 2009. Activity-dependent extrinsic regulation of adult olfactory bulb and hippocampal neurogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1170, 664–673. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04373.x>
- Ma, D.K.,** Marchetto, M.C., Guo, J.U., Ming, G., Gage, F.H., Song, H., 2010. Epigenetic choreographers of neurogenesis in the adult mammalian brain. *Nat. Neurosci.* 13, 1338–1344. <https://doi.org/10.1038/nn.2672>
- Mabie, P.C.,** Mehler, M.F., Kessler, J.A., 1999. Multiple roles of bone morphogenetic protein signaling in the regulation of cortical cell number and phenotype. *J. Neurosci.* 19, 7077–7088.
- Malberg, J.E.,** Eisch, A.J., Nestler, E.J., Duman, R.S., 2000. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J. Neurosci.* 20, 9104–9110.
- Marchetti, B.,** Pluchino, S., 2013. Wnt your brain be inflamed? Yes, it Wnt! *Trends Mol Med* 19, 144–156. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.12.001>
- Martín-Suárez, S.,** Valero, J., Muro-García, T., Encinas, J.M., 2019. Phenotypical and functional heterogeneity of neural stem cells in the aged hippocampus. *Aging Cell* 18, e12958. <https://doi.org/10.1111/accel.12958>

- Martynoga, B.**, Mateo, J.L., Zhou, B., Andersen, J., Achimastou, A., Urbán, N., van den Berg, D., Georgopoulou, D., Hadjur, S., Wittbrodt, J., Ettwiller, L., Piper, M., Gronostajski, R.M., Guillemot, F., 2013. Epigenomic enhancer annotation reveals a key role for NFIX in neural stem cell quiescence. *Genes Dev.* 27, 1769–1786. <https://doi.org/10.1101/gad.216804.113>
- Matsumoto, Y.**, Otsuka, F., Hino, J., Miyoshi, T., Takano, M., Miyazato, M., Makino, H., Kangawa, K., 2012. Bone morphogenetic protein-3b (BMP-3b) inhibits osteoblast differentiation via Smad2/3 pathway by counteracting Smad1/5/8 signaling. *Mol. Cell. Endocrinol.* 350, 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.11.023>
- Mattson, M.P.**, 2012. Energy intake and exercise as determinants of brain health and vulnerability to injury and disease. *Cell Metab.* 16, 706–722. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.08.012>
- Menn, B.**, Garcia-Verdugo, J.M., Yaschine, C., Gonzalez-Perez, O., Rowitch, D., Alvarez-Buylla, A., 2006. Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J. Neurosci.* 26, 7907–7918. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1299-06.2006>
- Mercier, F.**, Douet, V., 2014. Bone morphogenetic protein-4 inhibits adult neurogenesis and is regulated by fractone-associated heparan sulfates in the subventricular zone. *J Chem Neuroanat* 57–58, 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.ichemneu.2014.03.005>
- Meyer, G.**, Perez-Garcia, C.G., Abraham, H., Caput, D., 2002. Expression of p73 and Reelin in the developing human cortex. *J. Neurosci.* 22, 4973–4986.
- Meyers, E.A.**, Gobeske, K.T., Bond, A.M., Jarrett, J.C., Peng, C.-Y., Kessler, J.A., 2016. Increased bone morphogenetic protein signaling contributes to age-related declines in neurogenesis and cognition. *Neurobiol Aging* 38, 164–175. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.10.035>
- Meynard, D.**, Kautz, L., Darnaud, V., Canonne-Hergaux, F., Coppin, H., Roth, M.-P., 2009. Lack of the bone morphogenetic protein BMP6 induces massive iron overload. *Nat. Genet.* 41, 478–481. <https://doi.org/10.1038/ng.320>
- Michaelidis, T.M.**, Lie, D.C., 2008. Wnt signaling and neural stem cells: caught in the Wnt web. *Cell Tissue Res.* 331, 193–210. <https://doi.org/10.1007/s00441-007-0476-5>
- Middeldorp, J.**, Lehallier, B., Villeda, S.A., Miedema, S.S.M., Evans, E., Czirr, E., Zhang, H., Luo, J., Stan, T., Mosher, K.I., Masliah, E., Wyss-Coray, T., 2016. Preclinical Assessment of Young Blood Plasma for Alzheimer Disease. *JAMA Neurol* 73, 1325–1333. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2016.3185>

- Miller, F.D.**, Kaplan, D.R., 2003. Signaling mechanisms underlying dendrite formation. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13, 391–398. [https://doi.org/10.1016/s0959-4388\(03\)00072-2](https://doi.org/10.1016/s0959-4388(03)00072-2)
- Mine, N.**, Anderson, R.M., Klingensmith, J., 2008. BMP antagonism is required in both the node and lateral plate mesoderm for mammalian left-right axis establishment. *Development* 135, 2425–2434. <https://doi.org/10.1242/dev.018986>
- Ming, G.-L.**, Song, H., 2011. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron* 70, 687–702. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.001>
- Mira, H.**, Andreu, Z., Suh, H., Lie, D.C., Jessberger, S., Consiglio, A., San Emeterio, J., Hortigüela, R., Marqués-Torrejón, M.A., Nakashima, K., Colak, D., Götz, M., Fariñas, I., Gage, F.H., 2010. Signaling through BMPRIIA regulates quiescence and long-term activity of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell* 7, 78–89. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.04.016>
- Miró, L.**, Garcia-Just, A., Amat, C., Polo, J., Moretó, M., Pérez-Bosque, A., 2017. Dietary Animal Plasma Proteins Improve the Intestinal Immune Response in Senescent Mice. *Nutrients* 9. <https://doi.org/10.3390/nu9121346>
- Miyazono, K.**, Hellman, U., Wernstedt, C., Heldin, C.H., 1988. Latent high molecular weight complex of transforming growth factor beta 1. Purification from human platelets and structural characterization. *J. Biol. Chem.* 263, 6407–6415.
- Miyazono, K.**, Kamiya, Y., Morikawa, M., 2010. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J. Biochem.* 147, 35–51. <https://doi.org/10.1093/jb/mvp148>
- Miyazono, K.**, Maeda, S., Imamura, T., 2005. BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16, 251–263. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2005.01.009>
- Molina-Martínez, P.**, Corpas, R., García-Lara, E., Cosín-Tomás, M., Cristòfol, R., Kaliman, P., Solà, C., Molinuevo, J.L., Sánchez-Valle, R., Antonell, A., Lladó, A., Sanfeliu, C., 2020. Microglial Hyperreactivity Evolved to Immunosuppression in the Hippocampus of a Mouse Model of Accelerated Aging and Alzheimer’s Disease Traits. *Front Aging Neurosci* 12, 622360. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.622360>
- Moon, R.T.**, 2005. Wnt/beta-catenin pathway. *Sci. STKE* 2005, cm1. <https://doi.org/10.1126/stke.2712005cm1>
- Morales, A.V.**, Mira, H., 2019. Adult Neural Stem Cells: Born to Last. *Front Cell Dev Biol* 7, 96. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00096>

- Mueller, T.D.**, Nickel, J., 2012. Promiscuity and specificity in BMP receptor activation. *FEBS Lett* 586, 1846–1859. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.02.043>
- Munji, R.N.**, Choe, Y., Li, G., Siegenthaler, J.A., Pleasure, S.J., 2011. Wnt signaling regulates neuronal differentiation of cortical intermediate progenitors. *J. Neurosci.* 31, 1676–1687. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5404-10.2011>
- Murakami, G.**, Watabe, T., Takaoka, K., Miyazono, K., Imamura, T., 2003. Cooperative inhibition of bone morphogenetic protein signaling by Smurf1 and inhibitory Smads. *Mol. Biol. Cell* 14, 2809–2817. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-07-0441>
- Nacher, J.**, Rosell, D.R., Alonso-Llosa, G., McEwen, B.S., 2001. NMDA receptor antagonist treatment induces a long-lasting increase in the number of proliferating cells, PSA-NCAM-immunoreactive granule neurons and radial glia in the adult rat dentate gyrus. *Eur. J. Neurosci.* 13, 512–520. <https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2000.01424.x>
- Nafstad, P.H.**, 1967. An electron microscope study on the termination of the perforant path fibres in the hippocampus and the fascia dentata. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 76, 532–542. <https://doi.org/10.1007/bf00339754>
- Nakase, T.**, Yoshikawa, H., 2006. Potential roles of bone morphogenetic proteins (BMPs) in skeletal repair and regeneration. *J. Bone Miner. Metab.* 24, 425–433. <https://doi.org/10.1007/s00774-006-0718-8>
- Nakashima, K.**, Yanagisawa, M., Arakawa, H., Kimura, N., Hisatsune, T., Kawabata, M., Miyazono, K., Taga, T., 1999. Synergistic signaling in fetal brain by STAT3-Smad1 complex bridged by p300. *Science* 284, 479–482. <https://doi.org/10.1126/science.284.5413.479>
- Nakashima, M.**, Tachibana, K., Iohara, K., Ito, M., Ishikawa, M., Akamine, A., 2003. Induction of reparative dentin formation by ultrasound-mediated gene delivery of growth/differentiation factor 11. *Hum. Gene Ther.* 14, 591–597. <https://doi.org/10.1089/104303403764539369>
- Navarro, A.**, López-Cepero, J.M., Bández, M.J., Sánchez-Pino, M.-J., Gómez, C., Cadenas, E., Boveris, A., 2008. Hippocampal mitochondrial dysfunction in rat aging. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 294, R501-509. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00492.2007>
- Nickel, J.**, Mueller, T.D., 2019. Specification of BMP Signaling. *Cells* 8. <https://doi.org/10.3390/cells8121579>
- Nieto-Estévez, V.**, Oueslati-Morales, C.O., Li, L., Pickel, J., Morales, A.V., Vicario-Abejón, C., 2016. Brain Insulin-Like Growth Factor-I Directs the Transition from Stem Cells to Mature Neurons During Postnatal/Adult Hippocampal Neurogenesis. *Stem Cells* 34, 2194–2209. <https://doi.org/10.1002/stem.2397>

- Nohe, A.**, Keating, E., Knaus, P., Petersen, N.O., 2004. Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. *Cell. Signal.* 16, 291–299. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2003.08.011>
- Nusse, R.**, 2012. Wnt signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011163>
- Nusse, R.**, Varmus, H.E., 1982. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 31, 99–109. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90409-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90409-3)
- Oishi, I.**, Suzuki, H., Onishi, N., Takada, R., Kani, S., Ohkawara, B., Koshida, I., Suzuki, K., Yamada, G., Schwabe, G.C., Mundlos, S., Shibuya, H., Takada, S., Minami, Y., 2003. The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signalling pathway. *Genes Cells* 8, 645–654. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2003.00662.x>
- Okamoto, M.**, Inoue, K., Iwamura, H., Terashima, K., Soya, H., Asashima, M., Kuwabara, T., 2011. Reduction in paracrine Wnt3 factors during aging causes impaired adult neurogenesis. *FASEB J.* 25, 3570–3582. <https://doi.org/10.1096/fj.11-184697>
- Onichtchouk, D.**, Chen, Y.G., Dosch, R., Gawantka, V., Delius, H., Massagué, J., Niehrs, C., 1999. Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature* 401, 480–485. <https://doi.org/10.1038/46794>
- Osses, N.**, Gutierrez, J., Lopez-Rovira, T., Ventura, F., Brandan, E., 2006. Sulfation is required for bone morphogenetic protein 2-dependent Id1 induction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 344, 1207–1215. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.04.029>
- Oxburgh, L.**, Dudley, A.T., Godin, R.E., Koonce, C.H., Islam, A., Anderson, D.C., Bikoff, E.K., Robertson, E.J., 2005. BMP4 substitutes for loss of BMP7 during kidney development. *Dev. Biol.* 286, 637–646. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.08.024>
- Ozkaynak, E.**, Schnegelsberg, P.N., Jin, D.F., Clifford, G.M., Warren, F.D., Drier, E.A., Oppermann, H., 1992. Osteogenic protein-2. A new member of the transforming growth factor-beta superfamily expressed early in embryogenesis. *J. Biol. Chem.* 267, 25220–25227.
- Paganoni, S.**, Bernstein, J., Ferreira, A., 2010. Ror1-Ror2 complexes modulate synapse formation in hippocampal neurons. *Neuroscience* 165, 1261–1274. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.11.056>
- Pallas, M.**, Camins, A., Smith, M.A., Perry, G., Lee, H., Casadesus, G., 2008. From aging to Alzheimer's disease: unveiling “the switch” with the senescence-accelerated mouse model (SAMP8). *J. Alzheimers Dis.* 15, 615–624. <https://doi.org/10.3233/jad-2008-15408>

- Palmer, T.D.,** Takahashi, J., Gage, F.H., 1997. The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 8, 389–404. <https://doi.org/10.1006/mcne.1996.0595>
- Palomer, E.,** Buechler, J., Salinas, P.C., 2019. Wnt Signaling Deregulation in the Aging and Alzheimer's Brain. *Front Cell Neurosci* 13, 227. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00227>
- Panchision, D.M.,** McKay, R.D.G., 2002. The control of neural stem cells by morphogenic signals. *Curr Opin Genet Dev* 12, 478–487. [https://doi.org/10.1016/s0959-437x\(02\)00329-5](https://doi.org/10.1016/s0959-437x(02)00329-5)
- Panchision, D.M.,** Pickel, J.M., Studer, L., Lee, S.H., Turner, P.A., Hazel, T.G., McKay, R.D., 2001. Sequential actions of BMP receptors control neural precursor cell production and fate. *Genes Dev.* 15, 2094–2110. <https://doi.org/10.1101/gad.894701>
- Pchitskaya, E.,** Bezprozvanny, I., 2020. Dendritic Spines Shape Analysis-Classification or Clusterization? *Perspective. Front Synaptic Neurosci* 12, 31. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2020.00031>
- Pencea, V.,** Bingaman, K.D., Wiegand, S.J., Luskin, M.B., 2001. Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *J. Neurosci.* 21, 6706–6717.
- Peretto, P.,** Cummings, D., Modena, C., Behrens, M., Venkatraman, G., Fasolo, A., Margolis, F.L., 2002. BMP mRNA and protein expression in the developing mouse olfactory system. *J. Comp. Neurol.* 451, 267–278. <https://doi.org/10.1002/cne.10343>
- Peretto, P.,** Dati, C., De Marchis, S., Kim, H.H., Ukhanova, M., Fasolo, A., Margolis, F.L., 2004. Expression of the secreted factors noggin and bone morphogenetic proteins in the subependymal layer and olfactory bulb of the adult mouse brain. *Neuroscience* 128, 685–696. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.06.053>
- Pérez-Domper, P.,** Gradari, S., Trejo, J.L., 2013. The growth factors cascade and the dendrito-/synapto-genesis versus cell survival in adult hippocampal neurogenesis: the chicken or the egg. *Ageing Res. Rev.* 12, 777–785. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2013.06.001>
- Perron, J.C.,** Dodd, J., 2012. Structural distinctions in BMPs underlie divergent signaling in spinal neurons. *Neural Dev* 7, 16. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-7-16>

- Pilz, G.-A.**, Bottes, S., Betizeau, M., Jörg, D.J., Carta, S., Simons, B.D., Helmchen, F., Jessberger, S., 2018. Live imaging of neurogenesis in the adult mouse hippocampus. *Science* 359, 658–662. <https://doi.org/10.1126/science.aao5056>
- Pineda, R.**, Beattie, C.E., Hall, C.W., 2013. Closed-loop neural stimulation for pentylentetrazole-induced seizures in zebrafish. *Dis Model Mech* 6, 64–71. <https://doi.org/10.1242/dmm.009423>
- Pous, L.**, Deshpande, S.S., Nath, S., Mezey, S., Malik, S.C., Schildge, S., Bohrer, C., Topp, K., Pfeifer, D., Fernández-Klett, F., Doostkam, S., Galanakis, D.K., Taylor, V., Akassoglou, K., Schachtrup, C., 2020. Fibrinogen induces neural stem cell differentiation into astrocytes in the subventricular zone via BMP signaling. *Nat Commun* 11, 630. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14466-y>
- Purro, S.A.**, Ciani, L., Hoyos-Flight, M., Stamatakou, E., Siomou, E., Salinas, P.C., 2008. Wnt regulates axon behavior through changes in microtubule growth directionality: a new role for adenomatous polyposis coli. *J. Neurosci.* 28, 8644–8654. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2320-08.2008>
- Qu, Q.**, Sun, G., Murai, K., Ye, P., Li, W., Asuelime, G., Cheung, Y.-T., Shi, Y., 2013. Wnt7a regulates multiple steps of neurogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 33, 2551–2559. <https://doi.org/10.1128/MCB.00325-13>
- Quiñones-Hinojosa, A.**, Sanai, N., Soriano-Navarro, M., Gonzalez-Perez, O., Mirzadeh, Z., Gil-Perotin, S., Romero-Rodriguez, R., Berger, M.S., Garcia-Verdugo, J.M., Alvarez-Buylla, A., 2006. Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells. *J. Comp. Neurol.* 494, 415–434. <https://doi.org/10.1002/cne.20798>
- Reddi, A.H.**, 2003. Cartilage morphogenetic proteins: role in joint development, homeostasis, and regeneration. *Ann. Rheum. Dis.* 62 Suppl 2, ii73-78. https://doi.org/10.1136/ard.62.suppl_2.ii73
- Reddi, A.H.**, 1998. Cartilage-derived morphogenetic proteins and cartilage morphogenesis. *Microsc. Res. Tech.* 43, 131–136. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19981015\)43:2<131::AID-JEMT6>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19981015)43:2<131::AID-JEMT6>3.0.CO;2-C)
- Renault, V.M.**, Rafalski, V.A., Morgan, A.A., Salih, D.A.M., Brett, J.O., Webb, A.E., Villeda, S.A., Thekkat, P.U., Guillerey, C., Denko, N.C., Palmer, T.D., Butte, A.J., Brunet, A., 2009. FoxO3 regulates neural stem cell homeostasis. *Cell Stem Cell* 5, 527–539. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.09.014>
- Reynolds, B.A.**, Tetzlaff, W., Weiss, S., 1992. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J. Neurosci.* 12, 4565–4574.

- Richards, B.A.**, Frankland, P.W., 2017. The Persistence and Transience of Memory. *Neuron* 94, 1071–1084. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.04.037>
- Rijsewijk, F.**, Schuermann, M., Wagenaar, E., Parren, P., Weigel, D., Nusse, R., 1987. The Drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell* 50, 649–657. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90038-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90038-9)
- Ross, J.J.**, Shimmi, O., Vilmos, P., Petryk, A., Kim, H., Gaudenz, K., Hermanson, S., Ekker, S.C., O'Connor, M.B., Marsh, J.L., 2001. Twisted gastrulation is a conserved extracellular BMP antagonist. *Nature* 410, 479–483. <https://doi.org/10.1038/35068578>
- Rosso, S.B.**, Sussman, D., Wynshaw-Boris, A., Salinas, P.C., 2005. Wnt signaling through Dishevelled, Rac and JNK regulates dendritic development. *Nat. Neurosci.* 8, 34–42. <https://doi.org/10.1038/nn1374>
- Roybon, L.**, Hjalt, T., Stott, S., Guillemot, F., Li, J.-Y., Brundin, P., 2009. Neurogenin2 directs granule neuroblast production and amplification while NeuroD1 specifies neuronal fate during hippocampal neurogenesis. *PLoS One* 4, e4779. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004779>
- Sagner, A.**, Briscoe, J., 2017. Morphogen interpretation: concentration, time, competence, and signaling dynamics. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 6. <https://doi.org/10.1002/wdev.271>
- Sahni, V.**, Mukhopadhyay, A., Tysseling, V., Hebert, A., Birch, D., McGuire, T.L., Stupp, S.I., Kessler, J.A., 2010. BMPR1a and BMPR1b signaling exert opposing effects on gliosis after spinal cord injury. *J Neurosci* 30, 1839–1855. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4459-09.2010>
- Sahores, M.**, Gibb, A., Salinas, P.C., 2010. Frizzled-5, a receptor for the synaptic organizer Wnt7a, regulates activity-mediated synaptogenesis. *Development* 137, 2215–2225. <https://doi.org/10.1242/dev.046722>
- Sampath, T.K.**, Coughlin, J.E., Whetstone, R.M., Banach, D., Corbett, C., Ridge, R.J., Ozkaynak, E., Oppermann, H., Rueger, D.C., 1990. Bovine osteogenic protein is composed of dimers of OP-1 and BMP-2A, two members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J. Biol. Chem.* 265, 13198–13205.
- Sampath, T.K.**, Maliakal, J.C., Hauschka, P.V., Jones, W.K., Sasak, H., Tucker, R.F., White, K.H., Coughlin, J.E., Tucker, M.M., Pang, R.H., 1992. Recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1) induces new bone formation in vivo with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation in vitro. *J. Biol. Chem.* 267, 20352–20362.

- Sampath, T.K.**, Rashka, K.E., Doctor, J.S., Tucker, R.F., Hoffmann, F.M., 1993. Drosophila transforming growth factor beta superfamily proteins induce endochondral bone formation in mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 6004–6008. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.13.6004>
- Sawala, A.**, Sutcliffe, C., Ashe, H.L., 2012. Multistep molecular mechanism for bone morphogenetic protein extracellular transport in the Drosophila embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 11222–11227. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202781109>
- Schafer, S.T.**, Han, J., Pena, M., von Bohlen Und Halbach, O., Peters, J., Gage, F.H., 2015. The Wnt adaptor protein ATP6AP2 regulates multiple stages of adult hippocampal neurogenesis. *J. Neurosci.* 35, 4983–4998. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4130-14.2015>
- Scheufler, C.**, Sebald, W., Hülsmeier, M., 1999. Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 287, 103–115. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.2590>
- Schindelin, J.**, Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A., 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9, 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schouten, M.**, Bielefeld, P., Garcia-Corzo, L., Passchier, E.M.J., Gradari, S., Jungenitz, T., Pons-Espinal, M., Gebara, E., Martín-Suárez, S., Lucassen, P.J., De Vries, H.E., Trejo, J.L., Schwarzacher, S.W., De Pietri Tonelli, D., Toni, N., Mira, H., Encinas, J.M., Fitzsimons, C.P., 2020. Circadian glucocorticoid oscillations preserve a population of adult hippocampal neural stem cells in the aging brain. *Mol. Psychiatry* 25, 1382–1405. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0440-2>
- Schulte, G.**, Bryja, V., 2007. The Frizzled family of unconventional G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 28, 518–525. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2007.09.001>
- Scott, R.W.**, Hooper, S., Crighton, D., Li, A., König, I., Munro, J., Trivier, E., Wickman, G., Morin, P., Croft, D.R., Dawson, J., Machesky, L., Anderson, K.I., Sahai, E.A., Olson, M.F., 2010. LIM kinases are required for invasive path generation by tumor and tumor-associated stromal cells. *J. Cell Biol.* 191, 169–185. <https://doi.org/10.1083/jcb.201002041>
- Segkilia, A.**, Seuntjens, E., Elkouris, M., Tsalavos, S., Stappers, E., Mitsiadis, T.A., Huylebroeck, D., Remboutsika, E., Graf, D., 2012. Bmp7 regulates the survival, proliferation, and neurogenic properties of neural progenitor cells during corticogenesis in the mouse. *PLoS One* 7, e34088. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034088>

- Seib, D.R.M.,** Corsini, N.S., Ellwanger, K., Plaas, C., Mateos, A., Pitzer, C., Niehrs, C., Celikel, T., Martin-Villalba, A., 2013. Loss of Dickkopf-1 restores neurogenesis in old age and counteracts cognitive decline. *Cell Stem Cell* 12, 204–214. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.11.010>
- Seidensticker, M.J.,** Behrens, J., 2000. Biochemical interactions in the wnt pathway. *Biochim. Biophys. Acta* 1495, 168–182. [https://doi.org/10.1016/s0167-4889\(99\)00158-5](https://doi.org/10.1016/s0167-4889(99)00158-5)
- Shen, Q.,** Goderie, S.K., Jin, L., Karanth, N., Sun, Y., Abramova, N., Vincent, P., Pumiglia, K., Temple, S., 2004. Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science* 304, 1338–1340. <https://doi.org/10.1126/science.1095505>
- Shetty, A.K.,** Hattiangady, B., Shetty, G.A., 2005. Stem/progenitor cell proliferation factors FGF-2, IGF-1, and VEGF exhibit early decline during the course of aging in the hippocampus: role of astrocytes. *Glia* 51, 173–186. <https://doi.org/10.1002/glia.20187>
- Shi, Y.,** Hata, A., Lo, R.S., Massagué, J., Pavletich, N.P., 1997. A structural basis for mutational inactivation of the tumour suppressor Smad4. *Nature* 388, 87–93. <https://doi.org/10.1038/40431>
- Shi, Z.,** Geng, Y., Liu, Jiping, Zhang, H., Zhou, L., Lin, Q., Yu, J., Zhang, K., Liu, Jie, Gao, X., Zhang, Chunxue, Yao, Y., Zhang, Chong, Sun, Y.E., 2018. Single-cell transcriptomics reveals gene signatures and alterations associated with aging in distinct neural stem/progenitor cell subpopulations. *Protein Cell* 9, 351–364. <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0450-2>
- Shimada, A.,** Hasegawa-Ishii, S., 2011. Senescence-accelerated Mice (SAMs) as a Model for Brain Aging and Immunosenescence. *Aging Dis* 2, 414–435.
- Shimogori, T.,** Banuchi, V., Ng, H.Y., Strauss, J.B., Grove, E.A., 2004a. Embryonic signaling centers expressing BMP, WNT and FGF proteins interact to pattern the cerebral cortex. *Development* 131, 5639–5647. <https://doi.org/10.1242/dev.01428>
- Shimogori, T.,** VanSant, J., Paik, E., Grove, E.A., 2004b. Members of the Wnt, Fz, and Frp gene families expressed in postnatal mouse cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.* 473, 496–510. <https://doi.org/10.1002/cne.20135>
- Shingo, T.,** Gregg, C., Enwere, E., Fujikawa, H., Hassam, R., Geary, C., Cross, J.C., Weiss, S., 2003. Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. *Science* 299, 117–120. <https://doi.org/10.1126/science.1076647>
- Sholl, D.A.,** 1953. Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat* 87, 387–406.

- Shou, J.**, Rim, P.C., Calof, A.L., 1999. BMPs inhibit neurogenesis by a mechanism involving degradation of a transcription factor. *Nat. Neurosci.* 2, 339–345. <https://doi.org/10.1038/7251>
- Sibbe, M.**, Kulik, A., 2017. GABAergic Regulation of Adult Hippocampal Neurogenesis. *Mol. Neurobiol.* 54, 5497–5510. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0072-3>
- Sieber, C.**, Kopf, J., Hiepen, C., Knaus, P., 2009. Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 20, 343–355. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2009.10.007>
- Sierra, A.**, Encinas, J.M., Deudero, J.J.P., Chancey, J.H., Enikolopov, G., Overstreet-Wadiche, L.S., Tsirka, S.E., Maletic-Savatic, M., 2010. Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell* 7, 483–495. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.08.014>
- Soriano-Cantón, R.**, Perez-Villalba, A., Morante-Redolat, J.M., Marqués-Torrejón, M.Á., Pallás, M., Pérez-Sánchez, F., Fariñas, I., 2015. Regulation of the p19(Arf)/p53 pathway by histone acetylation underlies neural stem cell behavior in senescence-prone SAMP8 mice. *Aging Cell* 14, 453–462. <https://doi.org/10.1111/accel.12328>
- Sousa-Victor, P.**, Gutarra, S., García-Prat, L., Rodríguez-Ubreva, J., Ortet, L., Ruiz-Bonilla, V., Jardí, M., Ballestar, E., González, S., Serrano, A.L., Perdiguero, E., Muñoz-Cánoves, P., 2014. Geriatric muscle stem cells switch reversible quiescence into senescence. *Nature* 506, 316–321. <https://doi.org/10.1038/nature13013>
- Spalding, K.L.**, Bergmann, O., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Huttner, H.B., Boström, E., Westerlund, I., Vial, C., Buchholz, B.A., Possnert, G., Mash, D.C., Druid, H., Frisén, J., 2013. Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell* 153, 1219–1227. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.002>
- Stewart, D.J.**, Chang, D.W., Ye, Y., Spitz, M., Lu, C., Shu, X., Wampfler, J.A., Marks, R.S., Garces, Y.I., Yang, P., Wu, X., 2014. Wnt signaling pathway pharmacogenetics in non-small cell lung cancer. *Pharmacogenomics J.* 14, 509–522. <https://doi.org/10.1038/tpj.2014.21>
- Stopa, M.**, Anhof, D., Terstegen, L., Gatsios, P., Gressner, A.M., Dooley, S., 2000. Participation of Smad2, Smad3, and Smad4 in transforming growth factor beta (TGF-beta)-induced activation of Smad7. THE TGF-beta response element of the promoter requires functional Smad binding element and E-box sequences for transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.* 275, 29308–29317. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003282200>

- Stottmann, R.W.**, Berrong, M., Matta, K., Choi, M., Klingensmith, J., 2006. The BMP antagonist Noggin promotes cranial and spinal neurulation by distinct mechanisms. *Dev. Biol.* 295, 647–663. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.03.051>
- Stottmann, R.W.**, Klingensmith, J., 2011. Bone morphogenetic protein signaling is required in the dorsal neural folds before neurulation for the induction of spinal neural crest cells and dorsal neurons. *Dev. Dyn.* 240, 755–765. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22579>
- Sugimura, R.**, Li, L., 2010. Noncanonical Wnt signaling in vertebrate development, stem cells, and diseases. *Birth Defects Res. C Embryo Today* 90, 243–256. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20195>
- Suh, H.**, Consiglio, A., Ray, J., Sawai, T., D'Amour, K.A., Gage, F.H., 2007. In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2+ neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell* 1, 515–528. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.09.002>
- Sultan, S.**, Li, L., Moss, J., Petrelli, F., Cassé, F., Gebara, E., Lopatar, J., Pfrieder, F.W., Bezzi, P., Bischofberger, J., Toni, N., 2015. Synaptic Integration of Adult-Born Hippocampal Neurons Is Locally Controlled by Astrocytes. *Neuron* 88, 957–972. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.10.037>
- Sun, Y.**, Nadal-Vicens, M., Misono, S., Lin, M.Z., Zubiaga, A., Hua, X., Fan, G., Greenberg, M.E., 2001. Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms. *Cell* 104, 365–376. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00224-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00224-0)
- Takada, R.**, Satomi, Y., Kurata, T., Ueno, N., Norioka, S., Kondoh, H., Takao, T., Takada, S., 2006. Monounsaturated fatty acid modification of Wnt protein: its role in Wnt secretion. *Dev. Cell* 11, 791–801. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.10.003>
- Takeda, T.**, 2009. Senescence-accelerated mouse (SAM) with special references to neurodegeneration models, SAMP8 and SAMP10 mice. *Neurochem. Res.* 34, 639–659. <https://doi.org/10.1007/s11064-009-9922-y>
- Takeda, T.**, Hosokawa, M., Higuchi, K., 1997. Senescence-accelerated mouse (SAM): a novel murine model of senescence. *Exp. Gerontol.* 32, 105–109. [https://doi.org/10.1016/s0531-5565\(96\)00036-8](https://doi.org/10.1016/s0531-5565(96)00036-8)
- Takeda, T.**, Hosokawa, M., Higuchi, K., Hosono, M., Akiguchi, I., Katoh, H., 1994. A novel murine model of aging, Senescence-Accelerated Mouse (SAM). *Arch Gerontol Geriatr* 19, 185–192. [https://doi.org/10.1016/0167-4943\(94\)90039-6](https://doi.org/10.1016/0167-4943(94)90039-6)

- Tanapat, P.**, Hastings, N.B., Reeves, A.J., Gould, E., 1999. Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *J. Neurosci.* 19, 5792–5801.
- Tang, J.**, Song, M., Wang, Y., Fan, X., Xu, H., Bai, Y., 2009. Noggin and BMP4 co-modulate adult hippocampal neurogenesis in the APP(swe)/PS1(DeltaE9) transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 385, 341–345. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.05.067>
- Tashiro, A.**, Makino, H., Gage, F.H., 2007. Experience-specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis: a critical period during an immature stage. *J. Neurosci.* 27, 3252–3259. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4941-06.2007>
- Temple, S.**, 2001. The development of neural stem cells. *Nature* 414, 112–117. <https://doi.org/10.1038/35102174>
- Theil, T.**, Aydin, S., Koch, S., Grotewold, L., Rütger, U., 2002. Wnt and Bmp signalling cooperatively regulate graded Emx2 expression in the dorsal telencephalon. *Development* 129, 3045–3054.
- Toda, T.**, Gage, F.H., 2018. Review: adult neurogenesis contributes to hippocampal plasticity. *Cell Tissue Res.* 373, 693–709. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2735-4>
- Toni, N.**, Teng, E.M., Bushong, E.A., Aimone, J.B., Zhao, C., Consiglio, A., van Praag, H., Martone, M.E., Ellisman, M.H., Gage, F.H., 2007. Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus. *Nat Neurosci* 10, 727–734. <https://doi.org/10.1038/nn1908>
- Tozuka, Y.**, Wada, E., Wada, K., 2009. Diet-induced obesity in female mice leads to peroxidized lipid accumulations and impairment of hippocampal neurogenesis during the early life of their offspring. *FASEB J.* 23, 1920–1934. <https://doi.org/10.1096/fj.08-124784>
- Tozuka, Y.**, Wada, E., Wada, K., 2009. Diet-induced obesity in female mice leads to peroxidized lipid accumulations and impairment of hippocampal neurogenesis during the early life of their offspring. *FASEB J.* 23, 1920–1934. <https://doi.org/10.1096/fj.08-124784>
- Trejo, J.L.**, Carro, E., Torres-Aleman, I., 2001. Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. *J. Neurosci.* 21, 1628–1634.

- Trinchero, M.F.**, Buttner, K.A., Sulkes Cuevas, J.N., Temprana, S.G., Fontanet, P.A., Monzón-Salinas, M.C., Ledda, F., Paratcha, G., Schinder, A.F., 2017. High Plasticity of New Granule Cells in the Aging Hippocampus. *Cell Rep* 21, 1129–1139. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.064>
- Urbán, N.**, van den Berg, D.L.C., Forget, A., Andersen, J., Demmers, J.A.A., Hunt, C., Ayrault, O., Guillemot, F., 2016. Return to quiescence of mouse neural stem cells by degradation of a proactivation protein. *Science* 353, 292–295. <https://doi.org/10.1126/science.aaf4802>
- Urist, M.R.**, 1965. Bone: formation by autoinduction. *Science* 150, 893–899. <https://doi.org/10.1126/science.150.3698.893>
- Urist, M.R.**, Strates, B.S., 2009. The classic: Bone morphogenetic protein. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 467, 3051–3062. <https://doi.org/10.1007/s11999-009-1068-3>
- Valera, E.**, Isaacs, M.J., Kawakami, Y., Izpisua Belmonte, J.C., Choe, S., 2010. BMP-2/6 heterodimer is more effective than BMP-2 or BMP-6 homodimers as inducer of differentiation of human embryonic stem cells. *PLoS ONE* 5, e11167. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011167>
- van Praag, H.**, 2009. Exercise and the brain: something to chew on. *Trends Neurosci.* 32, 283–290. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.12.007>
- van Praag, H.**, Schinder, A.F., Christie, B.R., Toni, N., Palmer, T.D., Gage, F.H., 2002. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415, 1030–1034. <https://doi.org/10.1038/4151030a>
- van Praag, H.**, Shubert, T., Zhao, C., Gage, F.H., 2005. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J. Neurosci.* 25, 8680–8685. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1731-05.2005>
- Vilar, M., Mira, H.**, 2016. Regulation of Neurogenesis by Neurotrophins during Adulthood: Expected and Unexpected Roles. *Front Neurosci* 10, 26. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00026>
- Villasana, L.E.**, Kim, K.N., Westbrook, G.L., Schnell, E., 2015. Functional Integration of Adult-Born Hippocampal Neurons after Traumatic Brain Injury(1,2,3). *eNeuro* 2, ENEURO.0056-15.2015. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0056-15.2015>
- Villeda, S.A.**, Luo, J., Mosher, K.I., Zou, B., Britschgi, M., Bieri, G., Stan, T.M., Fainberg, N., Ding, Z., Eggel, A., Lucin, K.M., Czirr, E., Park, J.-S., Couillard-Després, S., Aigner, L., Li, G., Peskind, E.R., Kaye, J.A., Quinn, J.F., Galasko, D.R., Xie, X.S., Rando, T.A., Wyss-Coray, T., 2011. The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature* 477, 90–94. <https://doi.org/10.1038/nature10357>

- von Bohlen Und Halbach, O.**, 2007. Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell Tissue Res.* 329, 409–420. <https://doi.org/10.1007/s00441-007-0432-4>
- Walker, T.L.**, Overall, R.W., Vogler, S., Sykes, A.M., Ruhwald, S., Lasse, D., Ichwan, M., Fabel, K., Kempermann, G., 2016. Lysophosphatidic Acid Receptor Is a Functional Marker of Adult Hippocampal Precursor Cells. *Stem Cell Reports* 6, 552–565. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.03.002>
- Wan, M.**, Cao, X., 2005. BMP signaling in skeletal development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328, 651–657. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.11.067>
- Wang, S.**, Scott, B.W., Wojtowicz, J.M., 2000. Heterogenous properties of dentate granule neurons in the adult rat. *J Neurobiol* 42, 248–257.
- Wang, X.**, Harris, R.E., Bayston, L.J., Ashe, H.L., 2008. Type IV collagens regulate BMP signalling in *Drosophila*. *Nature* 455, 72–77. <https://doi.org/10.1038/nature07214>
- Warner-Schmidt, J.L.**, Duman, R.S., 2006. Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment. *Hippocampus* 16, 239–249. <https://doi.org/10.1002/hipo.20156>
- Wayman, G.A.**, Impey, S., Marks, D., Saneyoshi, T., Grant, W.F., Derkach, V., Soderling, T.R., 2006. Activity-dependent dendritic arborization mediated by CaM-kinase I activation and enhanced CREB-dependent transcription of Wnt-2. *Neuron* 50, 897–909. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.05.008>
- Whitford, K.L.**, P, D., F, P., A, G., 2002. Molecular control of cortical dendrite development. *Annual review of neuroscience.* <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.25.112701.142932>
- Weinreb, O.**, Drigues, N., Sagi, Y., Reznick, A.Z., Amit, T., Youdim, M.B.H., 2007. The application of proteomics and genomics to the study of age-related neurodegeneration and neuroprotection. *Antioxid. Redox Signal.* 9, 169–179. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.9.169>
- Wicks, S.J.**, Grocott, T., Haros, K., Maillard, M., ten Dijke, P., Chantry, A., 2006. Reversible ubiquitination regulates the Smad/TGF-beta signalling pathway. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 761–763. <https://doi.org/10.1042/BST0340761>
- Willert, K.**, Brown, J.D., Danenberg, E., Duncan, A.W., Weissman, I.L., Reya, T., Yates, J.R., Nusse, R., 2003. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 423, 448–452. <https://doi.org/10.1038/nature01611>
- Willert, K.**, Nusse, R., 2012. Wnt proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4, a007864. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007864>

- Wine-Lee, L.,** Ahn, K.J., Richardson, R.D., Mishina, Y., Lyons, K.M., Crenshaw, E.B., 2004. Signaling through BMP type 1 receptors is required for development of interneuron cell types in the dorsal spinal cord. *Development* 131, 5393–5403. <https://doi.org/10.1242/dev.01379>
- Wiskott, L.,** Rasch, M.J., Kempermann, G., 2006. A functional hypothesis for adult hippocampal neurogenesis: avoidance of catastrophic interference in the dentate gyrus. *Hippocampus* 16, 329–343. <https://doi.org/10.1002/hipo.20167>
- Withers, G.S.,** Higgins, D., Charette, M., Banker, G., 2000. Bone morphogenetic protein-7 enhances dendritic growth and receptivity to innervation in cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 12, 106–116. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2000.00889.x>
- Wozney, J.M.,** Rosen, V., 1998. Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 26–37.
- Wrana, J.L.,** 2000. Crossing Smads. *Sci. STKE* 2000, re1. <https://doi.org/10.1126/stke.2000.23.re1>
- Xiao, Y.-T.,** Xiang, L.-X., Shao, J.-Z., 2007. Bone morphogenetic protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362, 550–553. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.08.045>
- Yamaguchi, K.,** Nagai, S., Ninomiya-Tsuji, J., Nishita, M., Tamai, K., Irie, K., Ueno, N., Nishida, E., Shibuya, H., Matsumoto, K., 1999. XIAP, a cellular member of the inhibitor of apoptosis protein family, links the receptors to TAB1-TAK1 in the BMP signaling pathway. *EMBO J.* 18, 179–187. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.1.179>
- Yamauchi, K.,** Phan, K.D., Butler, S.J., 2008. BMP type I receptor complexes have distinct activities mediating cell fate and axon guidance decisions. *Development* 135, 1119–1128. <https://doi.org/10.1242/dev.012989>
- Ybot-Gonzalez, P.,** Gaston-Massuet, C., Girdler, G., Klingensmith, J., Arkell, R., Greene, N.D.E., Copp, A.J., 2007. Neural plate morphogenesis during mouse neurulation is regulated by antagonism of Bmp signalling. *Development* 134, 3203–3211. <https://doi.org/10.1242/dev.008177>
- Yoshimizu, T.,** Chaki, S., 2004. Increased cell proliferation in the adult mouse hippocampus following chronic administration of group II metabotropic glutamate receptor antagonist, MGS0039. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315, 493–496. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.01.073>

- Yousef, H.**, Morgenthaler, A., Schlesinger, C., Bugaj, L., Conboy, I.M., Schaffer, D.V., 2015. Age-Associated Increase in BMP Signaling Inhibits Hippocampal Neurogenesis. *Stem Cells* 33, 1577–1588. <https://doi.org/10.1002/stem.1943>
- Zagorski, M.**, Tabata, Y., Brandenburg, N., Lutolf, M.P., Tkačik, G., Bollenbach, T., Briscoe, J., Kicheva, A., 2017. Decoding of position in the developing neural tube from antiparallel morphogen gradients. *Science* 356, 1379–1383. <https://doi.org/10.1126/science.aam5887>
- Zeisel, A.**, Muñoz-Manchado, A.B., Codeluppi, S., Lönnerberg, P., La Manno, G., Juréus, A., Marques, S., Munguba, H., He, L., Betsholtz, C., Rolny, C., Castelo-Branco, G., Hjerling-Leffler, J., Linnarsson, S., 2015. Brain structure. Cell types in the mouse cortex and hippocampus revealed by single-cell RNA-seq. *Science* 347, 1138–1142. <https://doi.org/10.1126/science.aaa1934>
- Zhan, T.**, Rindtorff, N., Boutros, M., 2017. Wnt signaling in cancer. *Oncogene* 36, 1461–1473. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.304>
- Zhang, R.**, Boareto, M., Engler, A., Louvi, A., Giachino, C., Iber, D., Taylor, V., 2019. Id4 Downstream of Notch2 Maintains Neural Stem Cell Quiescence in the Adult Hippocampus. *Cell Rep* 28, 1485–1498.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.07.014>
- Zhang, S.**, Fei, T., Zhang, L., Zhang, R., Chen, F., Ning, Y., Han, Y., Feng, X.-H., Meng, A., Chen, Y.-G., 2007. Smad7 antagonizes transforming growth factor beta signaling in the nucleus by interfering with functional Smad-DNA complex formation. *Mol. Cell. Biol.* 27, 4488–4499. <https://doi.org/10.1128/MCB.01636-06>
- Zhang, Y.E.**, 2009. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res.* 19, 128–139. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.328>
- Zhao, C.**, Deng, W., Gage, F.H., 2008. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132, 645–660. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.033>
- Zhao, C.**, Jou, J., Wolff, L.J., Sun, H., Gage, F.H., 2015. Spine morphogenesis in newborn granule cells is differentially regulated in the outer and middle molecular layers. *J. Comp. Neurol.* 523, 1588. <https://doi.org/10.1002/cne.23800>
- Zhao, C.**, Teng, E.M., Summers, R.G., Ming, G.-L., Gage, F.H., 2006. Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J. Neurosci.* 26, 3–11. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3648-05.2006>
- Zhou, C.-J.**, Zhao, C., Pleasure, S.J., 2004. Wnt signaling mutants have decreased dentate granule cell production and radial glial scaffolding abnormalities. *J. Neurosci.* 24, 121–126. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4071-03.2004>

10

Anexo

ANEXO

Publicaciones que forman parte de la tesis

Armenteros, T., Andreu, Z., Hortigüela, R., Lie, D.C., Mira, H., 2018.

BMP and WNT signalling cooperate through LEF1 in the neuronal specification of adult hippocampal neural stem and progenitor cells.

Sci Rep 8, 9241. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27581-0>


Díaz-Moreno, M., Armenteros, T., Gradari, S., Hortigüela, R., García-Corzo, L., Fontán-Lozano, Á., Trejo, J.L., Mira, H., 2018.

Noggin rescues age-related stem cell loss in the brain of senescent mice with neurodegenerative pathology.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 115, 11625–11630.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1813205115>

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

BMP and WNT signalling cooperate through LEF1 in the neuronal specification of adult hippocampal neural stem and progenitor cells

Tomás Armenteros¹, Zoraida Andreu², Rafael Hortigüela³, D. Chichung Lie⁴ & Helena Mira¹

Neuronal production from neural stem cells persists during adulthood in the subgranular zone of the hippocampal dentate gyrus. Extracellular signals provided by the hippocampal microenvironment regulate the neuronal fate commitment of the stem cell progeny. To date, the identity of those signals and their crosstalk has been only partially resolved. Here we show that adult rat hippocampal neural stem and progenitor cells (AH-NSPCs) express receptors for bone morphogenetic proteins (BMPs) and that the BMP/P-Smad pathway is active in AH-NSPCs undergoing differentiation towards the neuronal lineage. *In vitro*, exposure to the BMP2 and BMP4 ligands is sufficient to increase neurogenesis from AH-NSPCs in a WNT dependent manner while decreasing oligodendrogenesis. Moreover, BMP2/4 and WNT3A, a key regulator of adult hippocampal neurogenesis, cooperate to further enhance neuronal production. Our data point to a mechanistic convergence of the BMP and WNT pathways at the level of the T-cell factor/lymphoid enhancer factor gene *Lef1*. Altogether, we provide evidence that BMP signalling is an important regulator for the neuronal fate specification of AH-NSPCs cultures and we show that it significantly cooperates with the previously described master regulator of adult hippocampal neurogenesis, the WNT signalling pathway.

Neurogenesis in mammals persists throughout adult life in specific brain locations or “niches” due to the existence of reservoirs of largely quiescent neural stem cells (NSCs) that can generate new neurons through a series of intermediate progenitors. The two main niches in rodents are located in the subgranular zone (SGZ) of the hippocampal dentate gyrus and in the ventricular-subventricular zone or subependymal zone (SEZ) of the lateral ventricles [reviewed in^{1,2}]. The activation of quiescent neural stem cells to give rise to progenitor cells, their expansion, neuronal cell fate determination, migration and full differentiation are the main sequential phases required for proper adult neurogenesis. Local niche signals from the neural stem cell microenvironment dynamically regulate all these phases [reviewed in³]. Among these signals, short-range niche morphogens, including ligands from the WNT and Bone morphogenetic protein (BMP)/Growth and Differentiation Factor (GDF) families, are thought to play a prominent modulatory role.

WNT ligands are secreted glycoproteins implicated in a variety of brain developmental processes^{4,5}. WNTs signal through the Frizzled receptors and several co-receptors, such as LRP5 and LRP6, and elicit both canonical and non-canonical signalling pathways. In the canonical (β -catenin-dependent) pathway, WNT leads to the stabilization of β -catenin and its entrance into the nucleus where it binds to T-cell factor/lymphoid enhancer-binding factor (TCF/LEF) transcription factors, activating WNT target genes⁶. Adult NSCs and progenitor cells secrete functional ligands that stimulate a baseline WNT autocrine signalling necessary for maintaining multipotency^{7,8}. Concomitantly, WNT ligands are also released from niche astroglial cells, exerting paracrine effects on NSCs/progenitors that regulate some of the sequential steps of adult neurogenesis. As an example, WNT7A secreted from SEZ astrocytes promotes NSC self-renewal through the non-canonical signalling pathway⁹ whereas WNT3 secreted from hippocampal astrocytes promotes neuronal differentiation through the canonical signalling

¹Stem cells and Aging Unit, Instituto de Biomedicina de Valencia, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, València, Spain. ²Centro de Investigación Príncipe Felipe, València, Spain. ³Chronic Disease Programme, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Spain. ⁴Institute of Biochemistry, Emil Fischer Center, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Erlangen, Germany. Correspondence and requests for materials should be addressed to H.M. (email: hmira@ibv.csic.es)

pathway¹⁰. *In vivo* studies also demonstrate that the β -catenin-mediated canonical signalling is required for proper adult neurogenesis¹¹. Moreover, WNTs are key for the terminal differentiation of the newborn neurons and control late phases of adult neurogenesis, such as dendritogenesis and migration^{12,13}. Despite this prominent role of the WNT pathway in adult neurogenesis, its interaction with other niche signalling pathways remains poorly characterized.

The BMP/GDF signalling pathway plays a crucial role in regulating the adult neurogenesis process³. BMPs and GDFs are the largest subfamily of the TGF- β ligand superfamily. Two of the BMP/GDF subgroups, the Dpp class (BMP2/4) and the 60 A class (BMP5-8) markedly influence neurogenesis during brain development, but their precise function in adult neurogenesis remains less explored. BMP ligands signal through a heterotetrameric complex formed by two types of Ser–Thr kinase receptors (type 1 and type 2 receptors). *In vitro* binding assays have shown that type 2 receptors (BMPR2, Act-RIIA, Act-RIIB) interact similarly with all BMP ligands from the Dpp and 60 A class. However, type 1 receptors bind the ligands with variable affinities and consequently, the specificity in ligand recognition is dictated through the identity of the BMP type 1 receptor expressed by the cells. There are three main type 1 receptor family members: BMPRI1A (ALK3), with high affinity for the Dpp protein family¹⁴, and BMPRI1B (ALK6) and ACVR1 (ALK2), with affinity for the 60 A protein family^{14–16}. Regardless of the combination of type 1/type 2 receptors in the heterotetrameric complex, the ligand-receptor interactions can trigger either the canonical (SMAD-dependent) or the non-canonical (SMAD-independent) signalling pathways¹⁷. In the canonical pathway, SMAD1, 5 and 8 are phosphorylated at the C-terminus by the activated type 1 receptor and then complex with SMAD4 and translocate into the nucleus. The complex interacts with co-activators or co-repressors to regulate gene expression. In the adult hippocampus, several studies have established a principal role for the type 1 receptor BMPRI1A and for canonical BMP signalling in regulating the balance between NSC quiescence and proliferation^{18–22}. However, the function of this family of morphogens and receptors in neuronal fate determination during adulthood remains less characterized.

Herein, we investigated the role of canonical BMP signalling in promoting neurogenesis from adult rat hippocampal neural stem and progenitor cells (AH-NSPCs). We show that a short exposure to BMP ligands from the Dpp class (BMP2 and BMP4) elicits the SMAD-dependent canonical signalling pathway in AH-NSPCs, which is sufficient to specify the neuronal fate of the stem cell progeny while decreasing oligodendrogenesis, but without affecting the astrocyte fate. Overexpression of a constitutive active form of the type 1 receptor BMPRI1A recapitulates the phenotype. The increase in neurogenesis triggered by BMP2/4 requires endogenous canonical WNT signalling. We also describe in detail a synergistic crosstalk between the BMP and WNT canonical signalling that leads to an increase in neurogenesis, and we provide evidence for a role of the transcription factor LEF1 in the mechanistic convergence of the BMP and WNT pathways.

Experimental Procedures

Animals. 2 month old Crl:CD1 males were used to dissect the hippocampal dentate gyrus. Mice were maintained under SPF conditions and all manipulations were approved by the Committee for Research Ethics and Animal Welfare of the Instituto de Salud Carlos III, Spain. All experiments were performed in accordance with the Spanish and European guidelines and regulations (RD53/2013).

Cell Culture. For proliferation and differentiation assays we used rat Adult Hippocampal Neural Stem and Progenitor Cells (AH-NSPC)²³. AH-NSPCs were maintained in N2 medium, DMEM/F-12(1:1) (Gibco) adding N2 Supplement (100 \times) (Gibco), with 20 ng/ml of human fibroblast growth factor 2 (FGF-2) (PeproTech), growing in poly-ornithine (10 μ g/ml)/laminin (5 μ g/ml) (Sigma-Aldrich/Millipore) coated dishes (Hsieh *et al.*, 2004). For the differentiation assays AH-NSPCs were cultured in MW24 dishes using poly-ornithine/laminin treated 12 mm cover glasses (ThermoScientific), recombinant BMP2, BMP4, BMP7 and WNT3A (PeproTech) were added at the indicated concentration, using 1 μ M Retinoic Acid (Sigma-Aldrich) and 5 μ M Forskolin (Sigma-Aldrich) as positive control²³. In those experiments in which we inhibited the p38 MAPK pathway we used 1 μ M of SB203580 (Abcam). To inhibit the β -catenin-dependent WNT canonical pathway we used 1 and 5 μ M of XAV939 (Sigma). The caBMPRI1a retroviral vector was kindly provided by Kinichi Nakashima, Kyushu University, Japan. The GFP and LEF1-GFP lentiviral vectors were from OriGene.

Immunostaining. Cultured cells were fixed with 2% paraformaldehyde (Panreac). Samples were incubated with blocking solution (10% Fetal Bovine Serum, 0.2% Triton-X100). Primary and secondary antibodies used for the stainings are as follows: Monoclonal Anti-Neuronal Class III β -Tubulin 1:250 (Covance, Ref. mms-435p), Monoclonal Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein 1:300 (Sigma-Aldrich, Ref. g3893), Polyclonal Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein 1:300 (Dako, Ref. z0334), Anti-Myelin Basic Protein 1:40 (Abcam, Ref. ab2404), Phospho-Smad1/Smad5/Smad8 Antibody 1:100 (Cell Signalling, Ref. 9511), Monoclonal Anti-O4 1:150 (Sigma-Aldrich, Ref. MAB345), Goat Anti-Doublecortin (C-18) (Santa Cruz Biotechnology, Ref. sc8066), Monoclonal Anti-Nestin [Rat-401] 1:500 (Abcam, Ref. ab11306), Polyclonal Goat Anti-SOX2 1:300 (R&D Systems, Ref. af2018), Rabbit monoclonal anti-Ki67 1:50 (Thermo Scientific, Ref. RM-9106), Monoclonal Anti-MAP2 (2a + 2b) clone AP-20 1:300 (Sigma-Aldrich, Ref. M1406), Monoclonal anti-ID1 (B-8) 1:100 (Santa Cruz Biotechnology, Ref. sc133104), Cy3 Goat anti-Mouse 1:2000 (Jackson ImmunoResearch, Ref. 115-166-062), Cy3 Donkey anti-Rabbit 1:2000 (Jackson ImmunoResearch, Ref. 711-165-152), Alexa 488 Donkey anti-Rabbit 1:500 (Jackson ImmunoResearch, Ref. 711-546-152), Biotinylated Donkey Horse anti-Goat 1:200 (Vector Laboratories, Ref. BA-9500) and Cy5 Streptavidin 1:400 (Jackson ImmunoResearch, Ref. 016-170-084). The RIP monoclonal antibody developed by S. Hockfield was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank, created by the NICHD of the NIH and maintained at The University of Iowa. DNA was stained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 10 μ g/ml (Sigma). Samples were processed with Dabco/Mowiol 1/20 (Sigma/Merck), and analysed with an ImageA1 Axio microscope (Carl Zeiss).

Gene Expression analysis. RNA was extracted from cells or 2-month old wild type (CD-1) mice using Illustra RNAspin Mini Kit (GE Healthcare) and measured with a Microplate Reader (Infinite M200 TECAN). cDNA was obtained by reverse-transcription (RT) employing PrimeScrip RT Reagent kit (Takara). Gene expression was determined by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) in a LightCycler480 (Roche) using SYBR PremixEX Taq (2×) (Takara) and the corresponding forward and reverse primer for each gene, following the manufacturer protocol. Data were analysed according to the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method²⁴. Primer sequences are available upon request.

Western-blot assays. Cell extracts were fractionated by SDS-PAGE and transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane following the manufacturer's protocol (Bio-Rad). Membranes were incubated with 5% nonfat milk or 3% BSA (Sigma) in TBST for 60 min. Primary and secondary antibodies used for the western-blot assays are as follows: Phospho-Smad1/Smad5/Smad8 antibody (Cell Signalling, Ref. 9511 and Ref. 13820), Smad1/5/8 (N-18)-R antibody (Santa Cruz Biotechnology, Ref. sc-6031-r), Neuronal Class III β -Tubulin antibody (Covance, Ref. mms-435p), Glial Fibrillary Acidic Protein antibody (Dako, Ref. z0334), Goat Doublecortin (C-18) antibody (Santa Cruz Biotechnology, Ref. sc8066), Phospho-LRP6 (Ser1490) antibody (Cell Signalling, Ref. 2568), β -actin antibody (Sigma-Aldrich, Ref. a5441), Donkey anti-Rabbit ECL 1:50000 (Amersham, Ref. na934), Sheep anti-Mouse ECL 1:50000 (Amersham, Ref. na931), Donkey anti-Goat HRP 1:10000 (Santa Cruz Biotechnology, Ref. sc-2020).

Phylogenetic tree and *Lef1* Promoter Characterization. Phylogenetic Tree distances between BMPs were calculated using CLUSTAL-W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>) using default settings and the alignment viewer *AliView*. The accession numbers of the BMP protein sequences analysed in mouse were as follows: BMP2 (NP_031579.2), BMP4 (AAH13459.1), BMP5 (NP_031581.2), BMP6 (NP_031582.1), BMP7 (NP_031583.2), BMP8A (NP_031584.1) and BMP8B (NP_031585.2). The 5 kb sequence upstream of the initial ATG start codon from the *Rattus norvegicus Lef1* gene was retrieved (gi1389673387:821409826409), and promoter and transcriptional factor binding sites analysis were carried out using *Genomatix Promoter Inspector* and *MatInspector* tool (*Genomatix Software Suite v3.0*).

Chromatin Immunoprecipitation (ChIP). AH-NSPC were treated with BMP4 (25 ng/ml) for 6 h. Proteins and DNA were crosslinked for 10 mins with formaldehyde 37% (Panreac) to a final concentration of 1%. Extracted material was sonicated using a UP50H Ultrasonic Processor (Hielscher), sonication conditions were as follow: 30% amplitude, 10 sec x20 pulses. Proteins were pulled down using 60 μ l Protein A agarose/Salmon Sperm DNA (Millipore) and 10 μ g of Smad4 Antibody (H-552) (Santa Cruz Biotechnology, Ref. sc-7154). ChIP Dilution Buffer, Low Salt Immune Complex Wash Buffer, High Salt Immune Complex Wash Buffer, LiCl Immune Complex Wash Buffer, TE Buffer and SDS Lysis Buffer were prepared as described in Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Assay Kit (Upstate). Immunoprecipitated material was amplified by PCR using DNA polymerase (Biotools), 10× Standard Reaction Buffer with 2 mM MgCl₂ (Biotools), 240 μ M dNTP Mix (Invitrogen) and *Lef1* promoter primers (sequences available upon request).

Statistical Analysis. The statistical significance of the difference between means for the kinetics experiments was assessed by one-way ANOVA, using the Tukey test as post-hoc comparison. To determine the significance of the BMP2/4 and WNT3A synergic effect we used two-way ANOVA analysis of the percentage of neurons. The significance between means of the remaining experiments was calculated using paired 2-tailed Student *t* test. All the values correspond to average \pm sem, and those with a *P* value < 0.05 were considered significant (**P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001). Arcsine transformation was carried out for the statistical analysis of percentages.

Results

BMP ligands and BMP receptors are expressed in the adult hippocampal dentate gyrus and are differentially regulated during AH-NSPC differentiation. Based on sequence similarity and function, BMP ligands can be subdivided into several subgroups that share a number of BMP type 1 and type 2 receptors (Fig. 1A). To gain a deeper understanding on their role in adult neurogenesis, we first examined their expression in the adult mouse hippocampal dentate gyrus (DG) and in cultured adult hippocampal neural stem and progenitor cells (AH-NSPCs) from rat by quantitative RT-PCR. On the basis of the *C_t* (cycle threshold) values, we found that most BMP ligands and receptors are expressed at the mRNA level in the adult DG (Supplementary Fig. S1).

We next evaluated the timing of BMP receptor expression in AH-NSPC cultures undergoing differentiation. AH-NSPCs were induced to differentiate for up to 14 days *in vitro* (DIV) using a combination of Retinoic Acid (RA) and Forskolin (FSK), a well-established treatment that facilitates the acquisition of the neuronal fate (Fig. 1B,C; Hsieh *et al.*, 2004). After RNA extraction and cDNA synthesis, the gene expression pattern of the BMP type 1 receptors (*Bmpr1a*, *Bmpr1b* and *Acvr1*) and the BMP type 2 receptors (*Bmpr2*, *Acvr2a* and *Acvr2b*) was determined by quantitative RT-PCR and referred to the housekeeping genes *Sdha* (Fig. 1) and *18S* (Supplementary Fig. S2). Increased expression of the neuronal cytoskeleton gene β III-tubulin (*Tubb3*) and decreased expression of the immature intermediate filament gene Nestin (*Nes*) were used to confirm the differentiation of the cultures (Fig. 1D,E). Our results showed a decrease in the expression of *Bmpr1a* and an increase in the expression of *Bmpr1b* and *Acvr1* as the cells differentiate (Fig. 1F–H). Expression of *Bmpr2* at the mRNA level remained relatively constant during the process whereas *Acvr2a* and *Acvr2b* expression progressively decreased (Fig. 1I–K). This regulated gene expression profile of the type 1 and type 2 receptors suggests an early role for BMPR1A, BMPR2, ACVR2A, ACVR2B and a late role for BMPR1B, ACVR1, BMPR2 during adult hippocampal neurogenesis.

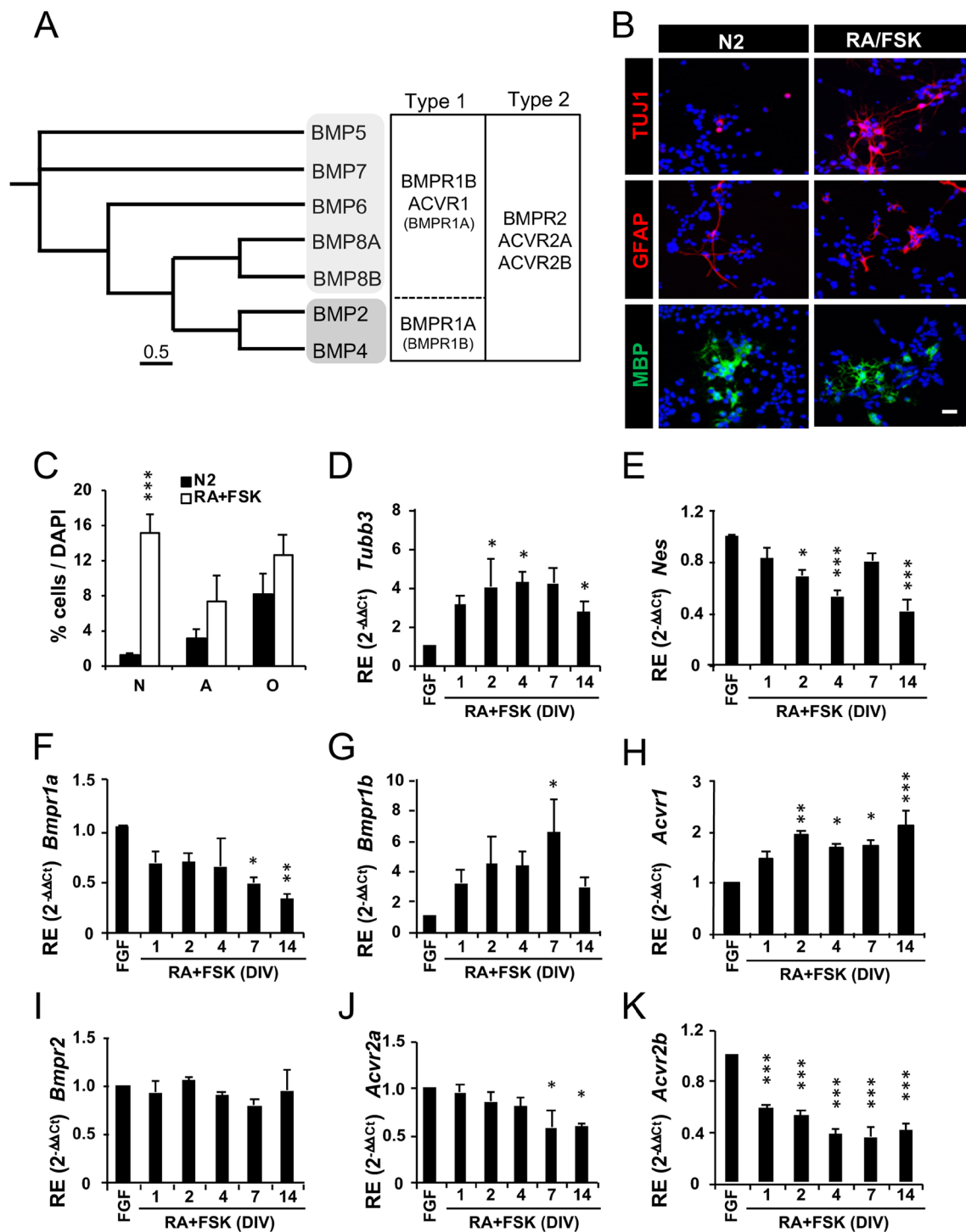


Figure 1. Expression of BMP ligands and BMP receptors in the adult hippocampal dentate gyrus and in AH-NSPCs undergoing differentiation. **(A)** Phylogenetic Tree showing distances between the mouse BMPs (left). The tree was generated using the alignment viewer ‘AliView’. The preferred type1/2 receptors bound by the different BMP ligands are also shown (right). **(B–C)** Differentiation of AH-NSPCs in control medium (N2) or N2 supplemented with Retinoic Acid (RA, 1 μ M) and Forskolin (FSK, 5 μ M) during 4 days *in vitro*. The percentage of neurons (N), astrocytes (A) and oligodendrocytes (O) was analysed by immunostaining against Tubulin β III (Tuj1), Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) and Myelin Basic Protein (MBP), respectively. The RA + FSK treatment favoured neuronal differentiation (average \pm sem, $n = 3$, two-tailed *T*-test: *** $P < 0.001$). **(D–K)** Relative gene expression (RE) patterns during the time course of AH-NSPC differentiation for *Tubb3* (D), *Nes* (E), *Bmpr1a* (F), *Bmpr1b* (G), *Acvr1* (H), *Bmpr2* (I), *Acvr2a* (J) and *Acvr2b* (K). *Sdha* was used as the housekeeping gene and expression levels were referred to those of proliferating AH-NSPCs grown in fibroblast growth factor 2 (FGF). Data correspond to average \pm sem of $n = 3$ independent experiments analysed by the 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} method (ANOVA: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$). Scale bar in B, 25 μ m.

BMP2 and BMP4 are pro-neurogenic in AH-NSPCs. Since AH-NSPCs express different receptor combinations throughout differentiation, we next analysed whether BMP ligands with different affinities for those receptors influence neurogenesis. To this end, we cultured AH-NSPCs in the absence of mitogenic stimulation but in the presence of an increasing concentration of several prototypic BMP ligands: BMP2 and BMP4 recombinant proteins, belonging to the Dpp subgroup that preferentially bind to BMPR1A; and BMP7 recombinant protein, belonging to the 60 A family that is best bound by BMPR1B and ACVR1^{14,15}. After 4 DIV, neurogenesis was measured by immunostaining against the neuronal marker β III-tubulin (TuJ1). Our data show that BMP2 and BMP4 induce a marked dose-dependent increase in the percentage of TuJ1⁺ neurons, while BMP7 has a very mild effect (Fig. 2A,B). BMP2/4 also increased the number of neurons expressing the immature neuronal marker doublecortin (DCX) and the more mature neuronal marker MAP2 (25 ng/ml BMP4: $6.7 \pm 1.1\%$ MAP2⁺ cells, average \pm sem, $n = 3$) compared to the control condition (N2 medium: $0.4 \pm 0.2\%$ MAP2⁺ cells, average \pm sem, $n = 3$, $P < 0.01$, two-tailed T-test; Supplementary Fig. S3). Western blot analysis showed increased protein levels of β III-tubulin and doublecortin (DCX) after BMP2/4 exposure (Supplementary Fig. S4), indicating altogether that ligands of the BMPR1A receptor such as BMP2/4 may be involved in instructing a neuronal cell fate *in vitro*. In support of this view, transduction of AH-NSPCs with a retroviral vector overexpressing a constitutive active form of BMPR1A mimicked the pro-neurogenic effect triggered by BMP2/4 (Fig. 2C). In addition, we found a reduction in oligodendrocytes in cultures treated with BMP2/4 but no change in the number of astrocytes (Fig. 2D and Supplementary Fig. S3), suggesting that BMP2/4 induce neurogenesis while decreasing oligodendrogenesis. Of note, a large fraction of the cells in the culture remained undifferentiated at 4 DIV ($28.4 \pm 2.4\%$ of the cells were SOX2⁺ stem/progenitors in 25 ng/ml BMP4 vs. $62.6 \pm 5.2\%$ in control N2 medium, average \pm sem, $n = 3$, $P < 0.01$, two-tailed T-test). Out of the SOX2⁺ cells, only $16.4 \pm 3.7\%$ were cycling (Ki67⁺) in the presence of BMP4, suggesting that most of the AH-NSPCs that did not engage in the differentiation programme stayed quiescent¹⁹.

Since *Bmpr1a* is markedly expressed in undifferentiated AH-NSPCs and decreases throughout the neuronal differentiation process¹⁹ (Fig. 1F), we hypothesized that BMP2/4 would be acting very early in the neurogenic lineage, influencing the cell fate choice decision of the AH-NSPC progeny. To test this idea, we transiently exposed AH-NSPCs to BMP2 or BMP4 for 24 hours (1 DIV) and then cultured the cells for 3 additional days in the absence of BMP stimulation (Fig. 3A). We found that AH-NSPCs exposed to BMP2 or BMP4 for 1 DIV reached similar neuronal differentiation levels than AH-NSPCs cultured for 4 DIV in the continuous presence of BMPs (Fig. 3B–D). These data show that a brief BMP2/4 treatment during the initial stages of differentiation is sufficient to promote neurogenesis and indicate that BMP2/4 can specify the neuronal fate of AH-NSPCs within the first 24 hours of the differentiation time course.

BMP2 and BMP4 induce neurogenesis through the activation of the BMP canonical pathway. We next wanted to check whether BMP2/4 signal through the SMAD-dependent canonical pathway. AH-NSPCs were treated with BMP2 or BMP4 and were then analysed at different time points by immunofluorescence, Western blot and quantitative RT-PCR. As shown in Fig. 4, BMP2 and BMP4 rapidly triggered the phosphorylation and nuclear translocation of SMAD1/5/8 (Fig. 4A–C) and upregulated the expression of the SMAD target gene *Id1* (Fig. 4D and Supplementary Fig. S3) confirming the activation of the canonical pathway. In agreement with this finding, inhibition of non-canonical BMP signalling employing the P38MAPK inhibitor SB203580 had no effect on the increase in neurogenesis induced by BMP2/4 exposure (Fig. 4E). Phosphorylation of SMAD1/5/8 was transient and decreased after the initial 24 hours of stimulation with the BMP ligands, indicating that AH-NSPCs did not maintain sustained activation of the BMP canonical pathway during the 4 DIV differentiation period (Fig. 4C and Supplementary Fig. S6). This further reinforces the view that the signalling inducing the neuronal fate occurs in the first 24 hours (1 DIV) of the differentiation process (Fig. 3). Together, the data indicate that BMP2 and BMP4 enhance neuronal production through the transient activation of the P-SMAD1/5/8-dependent canonical signalling pathway.

BMP2/4 canonical signalling synergizes with WNT canonical signalling to increase neurogenesis. It has been previously reported that adult hippocampal neurogenesis is tightly regulated by the canonical WNT/ β -catenin signalling pathway, both *in vitro* and *in vivo* [reviewed in²⁵], and that WNT3/WNT3A ligands markedly enhance the neuronal differentiation of AH-NSPCs^{10,26}. Given the phenotypic similarity resulting from the activation of the BMP and WNT pathways, we searched for a possible crosstalk between the two.

To this end, we first exposed AH-NSPCs to increasing amounts of the WNT3A ligand and confirmed that recombinant WNT3A increased the number of neurons at 4DIV in a dose-dependent manner (Fig. 5A,B). Interestingly, as with BMP2/4, the acquisition of the neuronal fate in the presence of WNT3A was also accompanied by a reduction in the oligodendroglial fate (Fig. 5C). In addition, we confirmed that WNT3A triggered the canonical pathway in AH-NSPCs, since it increased the phosphorylation of LRP6 (Fig. 5D) and the expression of the *Axin2* gene (Fig. 5E).

Having verified the pro-neurogenic effect of WNT3A, we next exposed AH-NSPCs to low doses of the BMP2/4 and WNT3A ligands separately or in combination to test for a possible interaction between the two pathways (Fig. 6A–C). Statistical analysis by 2-way ANOVA revealed a significant synergistic effect in neurogenesis of the BMP and WNT factors ($F_{1,28} = 14.642$, $P < 0.001$). At BMP2 and WNT3A concentrations of 25 ng/ml, a marked raise in TuJ1⁺ cells was elicited with a 19-fold increase in the number of neurons when both ligands were present, relative to the 5- and 3.5-fold increases elicited by BMP2 or WNT3A treatments alone, respectively (Fig. 6A). A similar profile was obtained for BMP4 and WNT3A ($F_{1,30} = 5.851$, $P < 0.05$, Fig. 6B).

The pro-neurogenic BMP2/4 activity requires endogenous canonical WNT signalling and is linked to LEF1 expression. Given that WNT signalling is absolutely required for neurogenesis to proceed

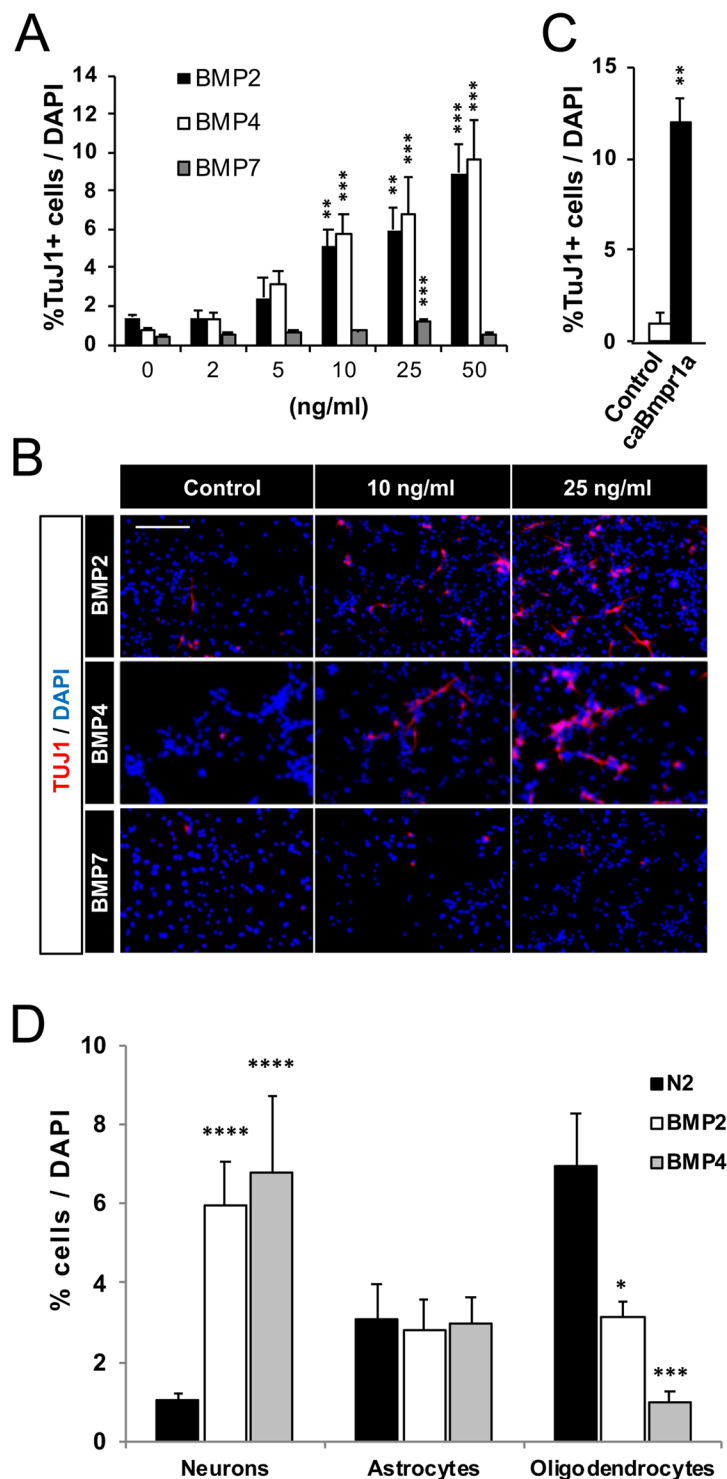


Figure 2. BMP2, BMP4 and caBMPRI1A increase neurogenesis in AH-NSPC differentiation assays. (A) Percentage of Tubulin β III (Tuj1) positive cells out of the total number of cells differentiated from AH-NSPCs in the presence of increasing concentrations of BMP2, BMP4 or BMP7. Data correspond to the average \pm sem of $n = 3$. (B) Immunofluorescence images showing the levels of Tuj1 positive cells (red) and DAPI stain (blue) at 0, 10 and 25 ng/ml of BMP2, BMP4 and BMP7. As illustrated, BMP2 and BMP4 (but not BMP7) markedly induce neurogenesis *in vitro* in a dose-dependent manner. (C) Percentage of Tuj1 positive cells out of the total number of cells differentiated from AH-NSPCs transduced with a retroviral vector overexpressing a constitutive active form of BMPRI1A (caBmpr1a) or with an empty vector as a control. (D) Percentage of neurons (N, Tubulin β III positive cells), astrocytes (A, Glial Fibrillary Acidic Protein, GFAP positive cells) and oligodendrocytes (O, Myelin Basic Protein, MBP positive cells) in the absence (N2) or presence of 25 ng/ml of BMP2 or BMP4. The cell lineage analysis shows an increase in neurons and a decrease in oligodendrocytes in the presence of BMPs. Scale bar on B, 100 μ m. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ by ANOVA.

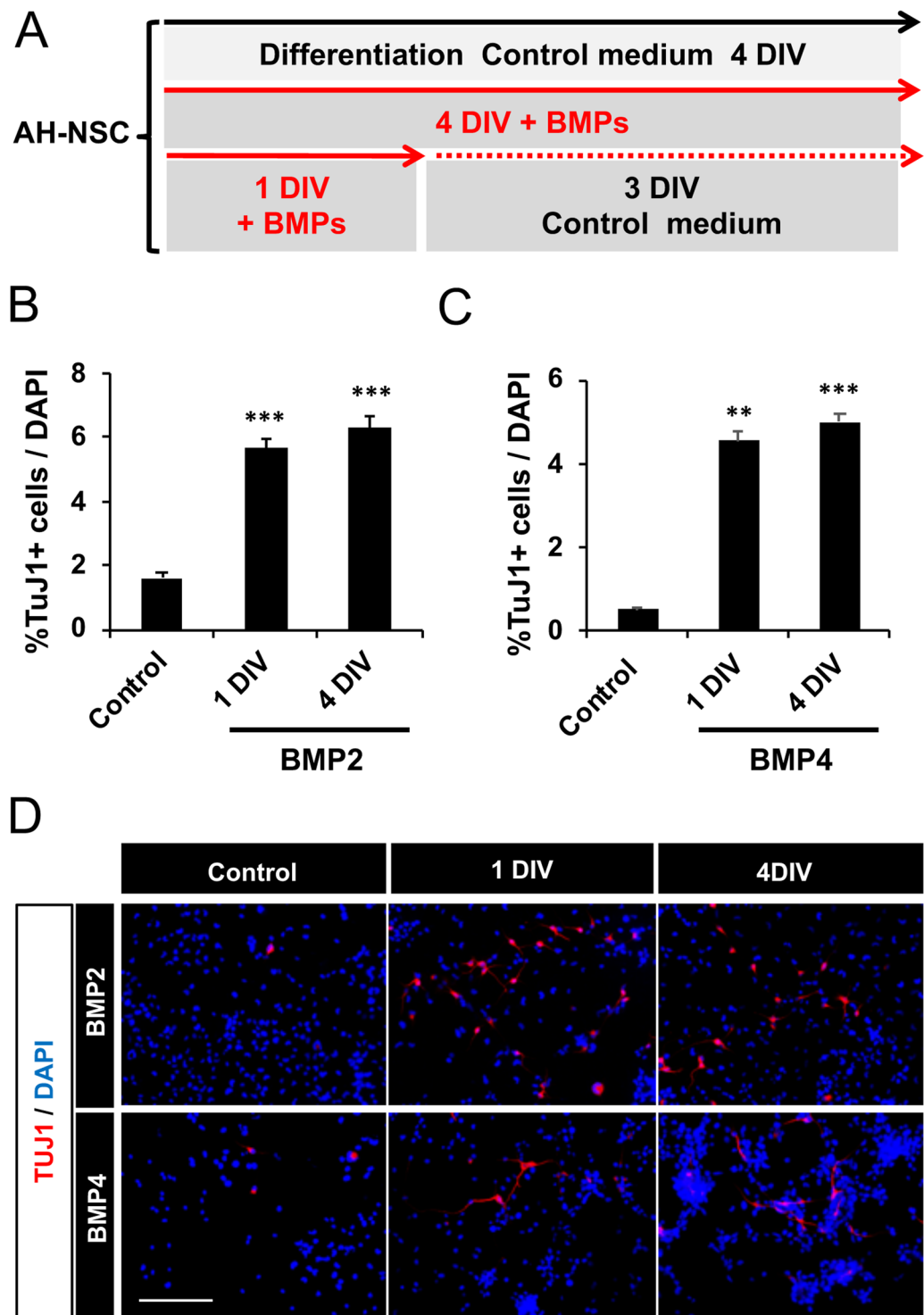


Figure 3. BMP2 and BMP4 influence the neuronal fate choice decision of the AH-NSPC progeny at an early timepoint. (A) Diagram describing the procedure. AH-NSPCs were stimulated transiently during 1 DIV or continuously during 4 DIV with 10 ng/ml of BMP2 or BMP4. Cells were fixed at 4 DIV and neurogenesis was measured by immunostaining against Tubulin β III (Tuj1). (B,C) Percentage of Tuj1 positive cells after stimulating for 1 or 4 DIV with BMP2 (B) and BMP4 (C). Data correspond to the average \pm sem of $n = 3$ independent experiments. (D) Immunofluorescence images showing the levels of Tuj1 positive cells (red) and DAPI stain (blue) at 4DIV in cultures stimulated transiently (1 DIV) or continuously (4 DIV) with BMP2 or BMP4. Scale bar in D, 100 μ m. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ by two-tailed *T*-test.

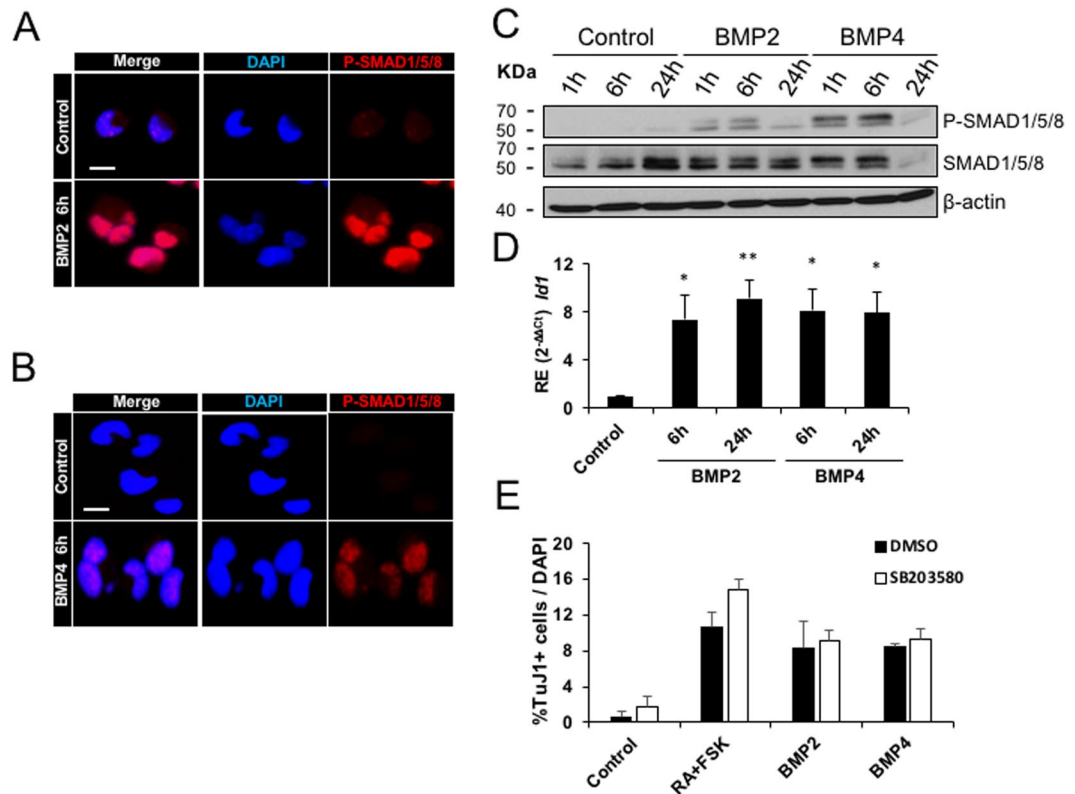


Figure 4. BMP2 and BMP4 induce neurogenesis through the activation of the P-SMAD canonical pathway in AH-NSPCs. (A,B) Immunofluorescence images of AH-NSPCs showing the increase in P-SMAD1/5/8 levels and the nuclear translocation of the phosphorylated proteins upon BMP2 stimulation (A) or BMP4 stimulation (B) for 6 hours. (C) Western immunoblot of whole cell lysates from AH-NSPCs treated with BMP2 or BMP4, separated by SDS-PAGE and blotted sequentially with antibodies against P-SMAD1/5/8, total SMAD1/5/8 and β -actin as loading control. Full-length blots are included in Supplementary Fig. S5. (D) Relative gene expression (RE) patterns for the canonical BMP pathway target gene *Id1* upon BMP2 or BMP4 stimulation at the indicated time points. *Sdha* was used as the housekeeping gene and expression levels were referred to untreated AH-NSPCs (Control). Data correspond to average \pm sem of $n = 3$ independent experiments analysed by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (two-tailed *T*-test: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$). (E) Percentage of Tubulin β III (Tuj1) positive cells out of the total number of cells differentiated from AH-NSPCs during 4 days *in vitro* in the presence of Retinoic Acid (RA, 1 μ M) and Forskolin (FSK, 5 μ M), BMP2 (25 ng/ml) or BMP4 (25 ng/ml) and P38MAPK inhibitor SB203580 or DMSO as a control. Data correspond to the average \pm sem of $n = 3$. Inhibition of the non-canonical BMP signalling employing SB203580 had no effect on the increase in neurogenesis. Scale bar in A and B, 100 μ m.

in the adult hippocampus²⁵, we speculated that, not only the BMP and WNT pathways synergize when both ligands are added exogenously to the AH-NSPC culture, but that BMP signalling requires a basal level of WNT signalling to exert its pro-neurogenic effect. In other words, we hypothesized that the BMP treatment alone could be potentiating endogenous WNT signalling. To test for this hypothesis, we differentiated AH-NSPCs in the presence of BMP2/4 (50 ng/ml) concomitant with increasing concentrations of the canonical WNT signalling inhibitor XAV939²⁷ to prevent endogenous canonical WNT signalling (Fig. 6D). Blockade of the signalling elicited by exogenously added WNT3A (50 ng/ml) was used as a control for the XAV939 treatment. Interestingly, we found that endogenous WNT signalling is required at least in part for the neurogenic action of the BMP2/4 ligands.

Canonical WNT signalling triggers the expression of pro-neurogenic genes through T-cell factor/lymphoid enhancer factor (TCF/LEF)-binding sites in their promoters²⁶. It has been reported that the expression of *Lef1* can be activated by BMP4 in BMP-mediated inductive tissue interactions²⁸, raising the possibility that the convergence between BMP2/4 and WNT3A signalling is located nearby LEF1. Thus, we next explored whether BMPs could increase *Lef1* expression in AH-NSPCs. As shown in Fig. 7A, following a 6-hour or 24-hour treatment with BMP4, *Lef1* mRNA levels were increased. This resulted in the accumulation of LEF1 protein (Fig. 7B).

We next analysed the *Lef1* gene promoter region to check for the presence of conserved BMP regulatory elements. We searched the rat genome databases, retrieved the 5 kb sequence upstream of the initial *Lef1* ATG start codon located in Chr2 and performed a theoretical analysis of the sequence using promoter inspector tools. We found a validated TATA-less promoter sequence spanning from -501 to $+100$ relative to the translational start site ATG codon at $+1$ (601 bases in length, P1) and a second theoretical promoter region (684 bases in length, P2) within the first intron of the *Lef1* gene (Fig. 7C). The structure of the rat *Lef1* gene resembles that of the human *LEF1* gene, a multipromoter gene characterized by a first 5' promoter (P1) lacking a consensus TATA box

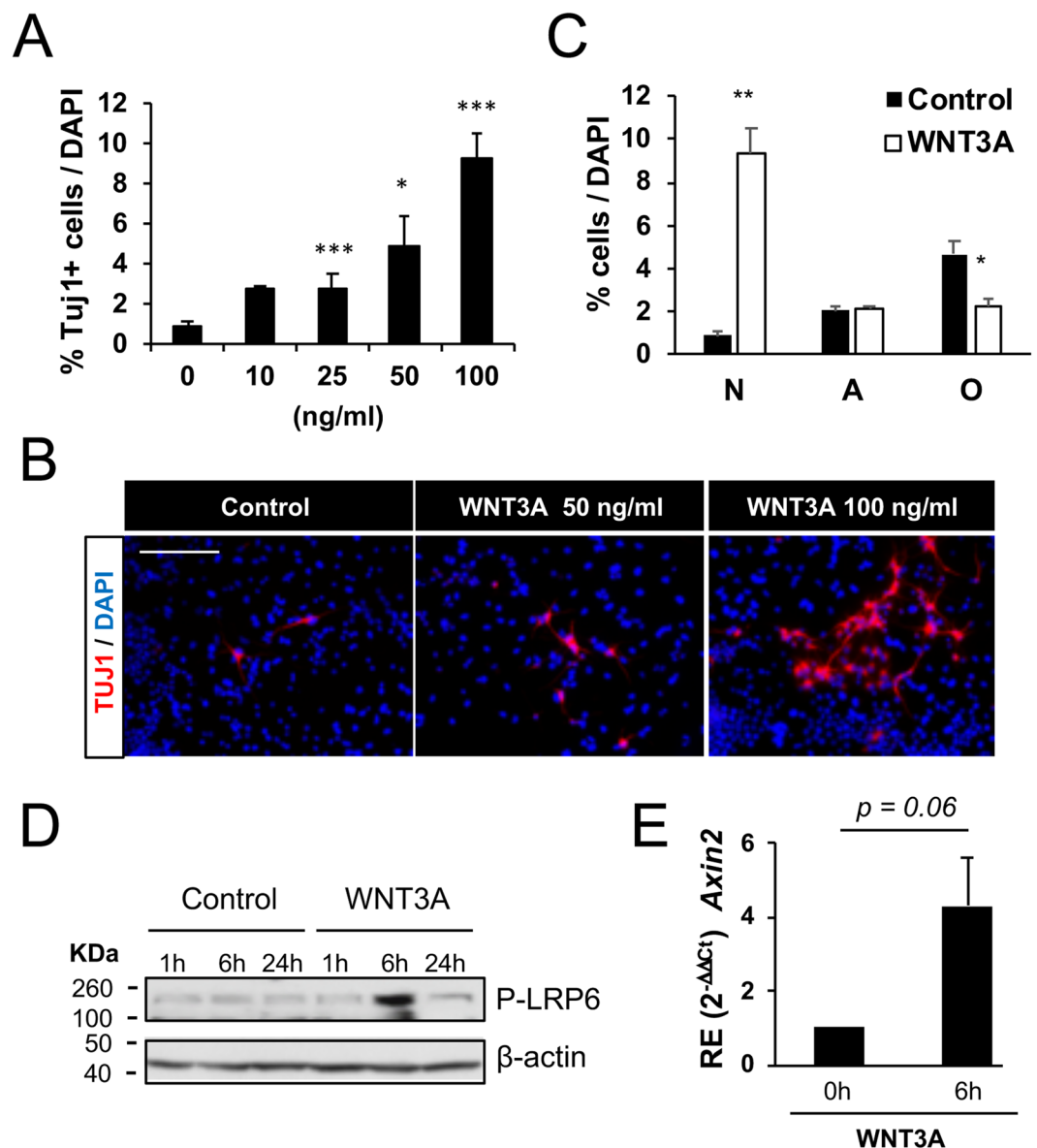


Figure 5. WNT3A increases neurogenesis in AH-NSPC differentiation assays. **(A)** Percentage of Tubulin β III (Tuj1) positive cells out of the total number of cells differentiated from AH-NSPCs in the presence of increasing concentrations of WNT3A. Data correspond to the average \pm sem of $n = 3$ ($*P < 0.05$; $***P < 0.001$ by ANOVA). **(B)** Immunofluorescence images showing the levels of Tuj1 positive cells (red) and DAPI stain (blue) at 0, 50 and 100 ng/ml of WNT3A. As illustrated, WNT3A induces neurogenesis *in vitro* in a dose-dependent manner. **(C)** Percentage of neurons (N, Tubulin β III positive cells), astrocytes (A, Glial Fibrillary Acidic Protein, GFAP positive cells) and oligodendrocytes (O, Myelin Basic Protein, MBP positive cells) in the absence (N2) or presence of 100 ng/ml of WNT3A. The cell lineage analysis shows an increase in neurons and a decrease in oligodendrocytes in the presence of WNT3A ($*P < 0.05$; $***P < 0.01$ by ANOVA). **(D)** Western immunoblot of whole cell lysates from AH-NSPCs treated with WNT3A (100 ng/ml), separated by SDS-PAGE and blotted sequentially with antibodies against P-LRP6 and β -actin as loading control. Full-length blots are included in Supplementary Fig. S7. **(E)** Relative gene expression (RE) pattern for the WNT pathway target gene *Axin2* upon WNT3A (100 ng/ml) stimulation at 6 h. *Sdha* was used as the housekeeping gene and expression levels were referred to untreated AH-NSPCs (0 h). Data correspond to average \pm sem of $n = 3$ independent experiments analysed by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (*two-tailed T-test*: $P = 0.06$). Scale bar in B, 100 μ m.

and a second intronic promoter (P2) located downstream of exon 1^{29,30}. In human, the P1 promoter drives the expression of a full-length LEF1 polypeptide; the P2 promoter instead produces a truncated protein that lacks the beta-catenin binding domain and suppresses WNT signalling³⁰. From these two promoter sequences, we selected the upstream -501/+100 P1 promoter for further analysis and scanned the sequence for transcription factor binding sites (TFBS). Out of the 154 total TFBS sites mapped to the proximal upstream promoter region, two

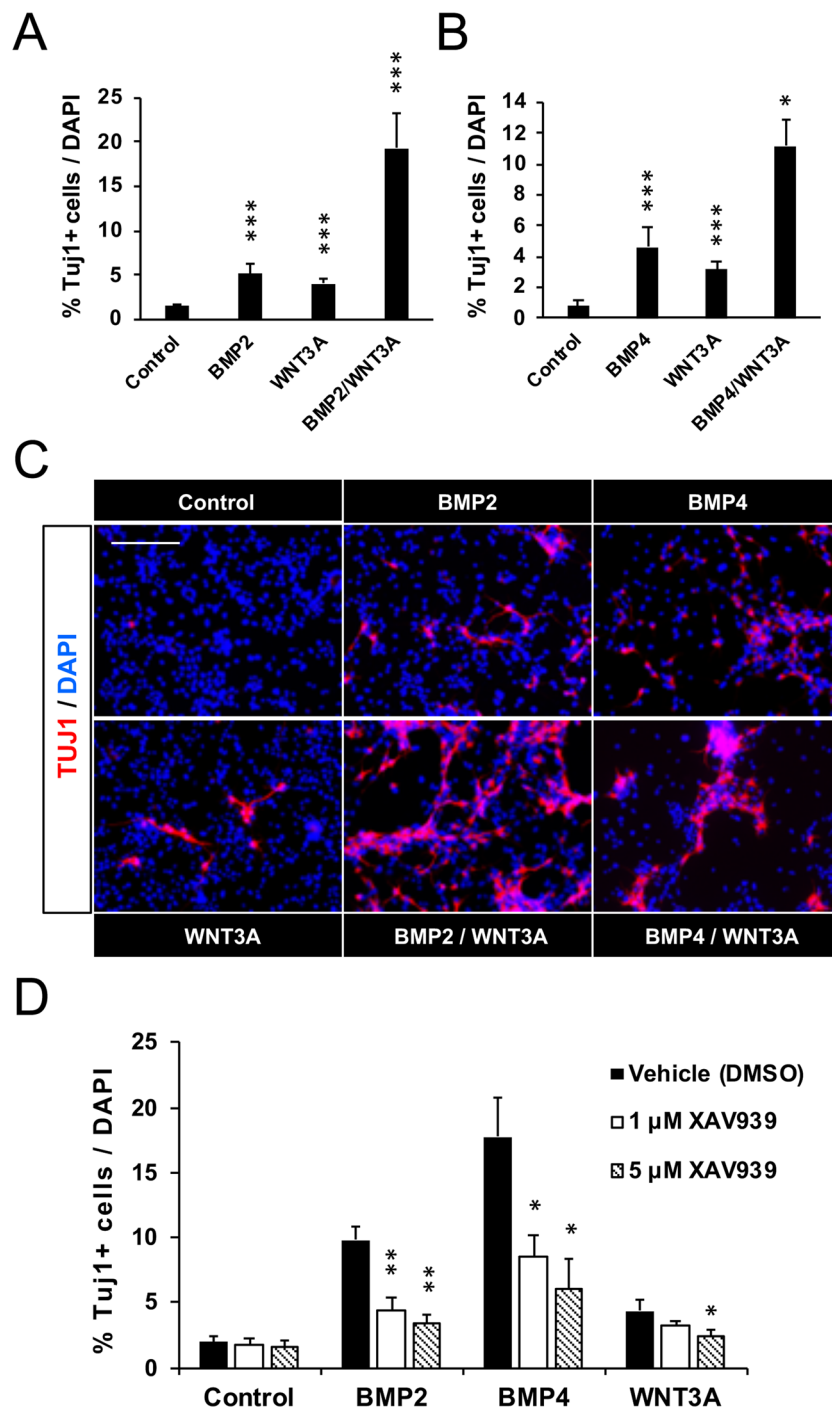


Figure 6. BMP2/4 require endogenous WNT signalling and synergize with exogenous WNT3A to increase neurogenesis in AH-NSPC differentiation assays. **(A)** Percentage of Tubulin β III (Tuj1) positive cells out of the total number of cells differentiated from AH-NSPCs during 4 days *in vitro* in the presence of BMP2 (25 ng/ml), WNT3A (25 ng/ml) or a combination of both BMP2 and WNT3A. Data correspond to the average \pm sem of $n \geq 5$ (2-way ANOVA: *** $P < 0.001$). **(B)** Percentage of Tubulin β III (Tuj1) positive cells out of the total number of cells differentiated from AH-NSPCs during 4 days *in vitro* in the presence of BMP4 (25 ng/ml), WNT3A (25 ng/ml) or a combination of both BMP4 and WNT3A. Data correspond to the average \pm sem of $n \geq 6$. (2-way ANOVA: * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$). **(C)** Immunofluorescence images showing the levels of Tuj1 positive cells (red) and DAPI stain (blue) at the indicated conditions. As illustrated, the number of neurons in the combined BMP2/4 + WNT3A treatment is higher than in the BMP2/4 or WNT3A independent treatments, evidencing a synergistic effect in neurogenesis of the BMP and WNT pathways. **(D)** Percentage of Tubulin β III (Tuj1) positive cells out of the total number of cells differentiated from AH-NSPCs during 4 days *in vitro* in the presence of BMP2 (50 ng/ml), BMP4 (50 ng/ml) or WNT3A (50 ng/ml) and XAV939 (a compound that blocks Wnt/b-catenin activity through the stabilization of Axin via tankyrase inhibition) or DMSO as a control. Data correspond to the average \pm sem of $n = 3$ (two-tailed *T*-test: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$). Scale bar in B, 100 μ m.

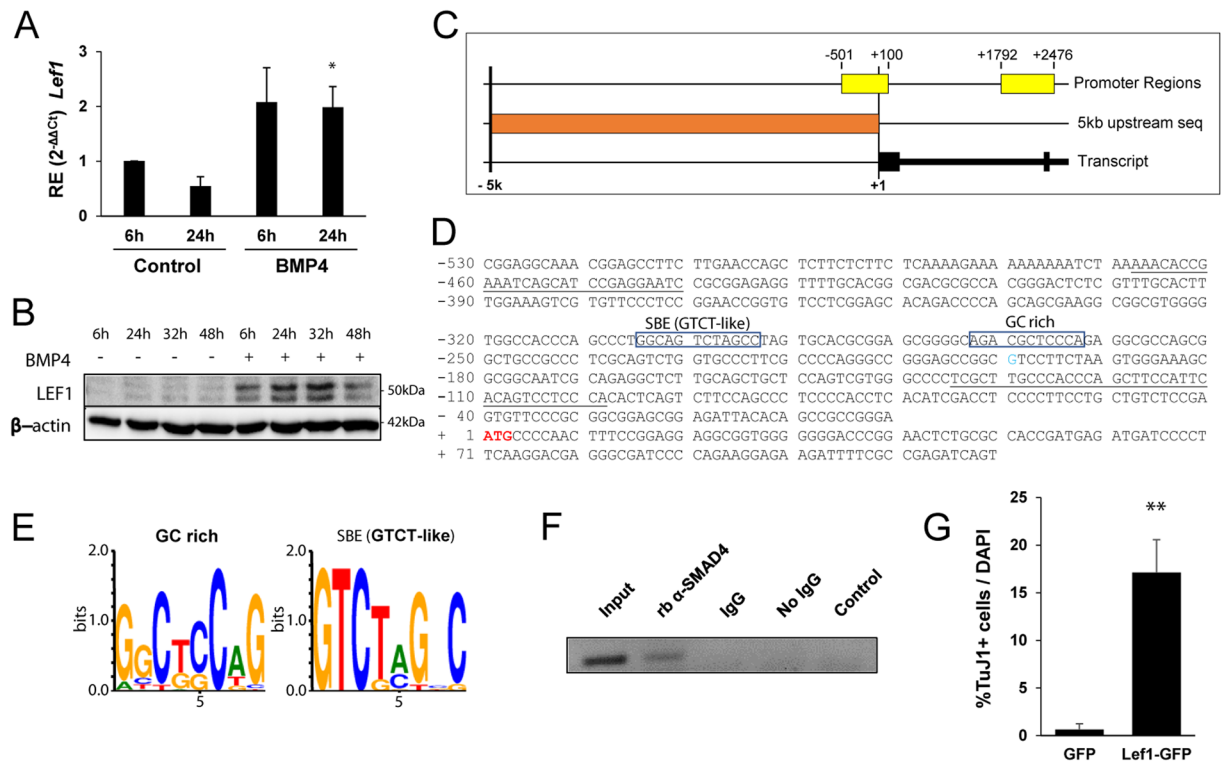


Figure 7. Lef1 is a direct target of BMP4 signalling in AH-NSPCs. **(A)** Relative gene expression (RE) pattern for the *Lef1* gene upon BMP4 (50 ng/ml) stimulation at the indicated time points. *Sdhα* was used as the housekeeping gene and expression levels were referred to untreated AH-NSPCs (Control). **(B)** Western immunoblot of whole cell lysates from AH-NSPCs treated with BMP4 at the indicated time points, separated by SDS-PAGE and blotted sequentially with antibodies against LEF1 and β -actin as loading control. Full-length blots are included in Supplementary Fig. S8. **(C)** *Lef1* promoter region analysis using *Genomatix Promoter Inspector* software. Image shows the retrieved 5 kb sequence (orange) upstream of the *Lef1* coding sequence (black) and two validated promoter regions that result from the promoter analysis (yellow). **(D,E)** Nucleotide sequence upstream of the *Lef1* translational start site (ATG, red). Two SMAD transcription factor binding sites were predicted: the first one, positioned at $-274/-264$, corresponds to a SMAD Binding Element (SBE) (GTCT-like), and the second one, positioned at $-233/-223$, corresponds to a GC rich element. **(F)** ChIP assay of BMP4-treated AH-NSPCs using a SMAD4 rabbit antibody. For the PCR amplification of the precipitated material, the underlined primers in **(D)** were employed. Rabbit IgG (IgG) was used as a control. Full-length gel is included in Supplementary Fig. S9. **(G)** Percentage of Tubulin β III (Tuj1) positive cells out of the total number of cells differentiated from AH-NSPCs transduced with a lentiviral vector overexpressing Lef1-GFP or GFP as a control. Cells were cultured during 4 days *in vitro*. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ by two-tailed *T*-test.

corresponded to canonical SMAD protein binding sites. The SMAD binding sites were located at position -302 (“5′-GTCT-3′ SBE” or SMAD4 binding element) and -261 (“GCCG-like motif” or GC-rich SMAD1/5 binding element) from the start codon, and were recognized as putative binding sites for P-SMAD/SMAD4 dimers (Fig. 7D,E). To investigate the direct interaction between SMAD proteins and the *Lef1* promoter, we performed a Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) assay with anti-SMAD4 antibodies, followed by PCR analysis with primer pairs amplifying the region containing the putative SMAD binding sites (Fig. 7D). As shown in Fig. 7F, the ChIP-PCR results revealed the presence of SMAD4 on the *Lef1* gene promoter region comprised between -361 and -625 nucleotides in AH-NSPCs exposed to BMP4. Thus, our results show that in response to BMP stimulation SMAD4 associates with the DNA at the *Lef1* proximal promoter region, which includes the predicted SMAD binding elements. The binding correlates with an increase in *Lef1* mRNA levels (Fig. 7A). Finally, we found that transduction of AH-NSPCs with a retroviral vector overexpressing *Lef1* is sufficient to enhance neuronal production even in the absence of exogenous WNT stimulation (Fig. 7G), thereby mimicking the BMP2/4 effect.

Altogether, the data indicate that *Lef1* is a direct target gene of SMAD4 and suggest that the increase in the expression of the transcription factor LEF1 downstream of BMP signalling may be potentiating adult hippocampal neurogenesis.

Discussion

It has been previously reported that neurogenesis in the adult mammalian brain is dynamically regulated by a number of local signals from the neural stem cell microenvironment, including BMPs and WNTs. High levels of canonical BMP signalling have been detected in the hippocampal niche, the majority of the stem and progenitor cells showing phosphorylated SMAD1/5/8 proteins in the nucleus^{19,20}. Moreover, ligands from the BMP family

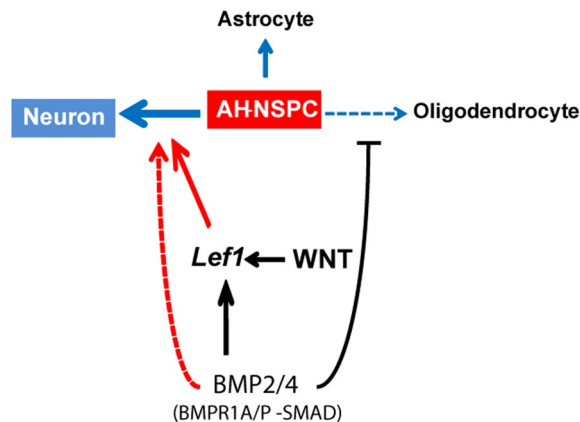


Figure 8. BMP2/4 increase neurogenesis from adult hippocampal NSPCs and synergize with WNT3A. Schematic of our proposed model summarizing the main results. BMP2/4 induce neurogenesis through the activation of the P-SMAD canonical pathway downstream of the BMPRI1A type 1 receptor. The pro-neurogenic effect of BMP signalling is partly dependent on endogenous WNT signalling, and the mechanism relies on the up-regulation of the *Lef1* gene, a direct SMAD target. WNT-independent effects of the BMPs are not excluded (dashed line, red). BMP2/4 also decrease the number of oligodendrocytes.

have been involved in the regulation of adult hippocampal stem cell quiescence^{19,20} and in the control of progenitor maturation at multiple stages along the neurogenic lineage¹⁸. However, the contribution of the BMP pathway to the fate specification of the hippocampal neural stem cell progeny during adulthood, in concert with other key niche signals, has remained largely unexplored. The *in vitro* data included herein give further insight into the extensive role of BMP molecules as regulators of stem cell differentiation in the adult hippocampus, and support a model whereby BMPs would have WNT-dependent instructive effects, favouring the acquisition of the neuronal fate possibly at the expense of the oligodendroglial fate (Fig. 8). This lines up with the early pro-neurogenic role of BMP signalling during the neurogenic phases of forebrain development^{31,32}.

BMP signalling has been previously shown to promote an astrocytic fate in embryonic subventricular zone multipotent NSPC mouse cultures grown in EGF^{33,34}. In our *in vitro* setup, however, BMP2/4 did not change the astroglial fate of adult hippocampal NSPCs isolated from rat and expanded in FGF2. This inconsistency may be due to a difference in the origin of the cells, in the cell culture conditions or perhaps in their basal level of WNT signalling. Interestingly, *in vivo* it has been shown that increasing BMP4 levels in the adult mouse hippocampus, by means of injecting a lentivirus overexpressing BMP4, decreases neural stem/progenitor cell proliferation, delays maturation, but it does not increase the proportion of cells that differentiate into astroglia¹⁸. This suggests that under physiological conditions BMP may not be pro-gliogenic in the adult hippocampal niche. However, we cannot exclude pro-gliogenic effects of the BMP pathway upon sustained up-regulation of BMP signalling or under pathological conditions that lead to an increase in gliosis^{33,35}.

As for the contribution of the specific subtypes of BMP receptors, the gene expression patterns obtained suggest that BMPRI1A receptor has an early role in the differentiation process, while BMPRI1B and ACVR1 may possibly have a late role. The early role of BMPRI1A is consistent with the results obtained in the differentiation assays employing the preferred BMPRI1A ligands (BMP2/4) and with the retroviral experiments in which we overexpressed a constitutive active form of BMPRI1A. Moreover, we found that the differentiation levels attained under an initial and transient exposure to BMP2/4 were similar to those obtained with a continuous exposure to the ligands, further indicating that the signalling inducing the neuronal fate occurs in the first stages of the differentiation process and thus is likely transduced by the most highly expressed type 1 receptor in those initial stages, BMPRI1A. Our results partly complement a previous study³⁶, in which a dominant negative form of BMPRI1A (dnBMPRI1A) was overexpressed in AH-NSPCs. The dnBMPRI1A, with a non-functional intracellular domain but a functional extracellular domain that traps the endogenously produced BMP ligands, increased astroglial differentiation of the cultures and this was likely mediated by the concomitant increase in the expression of BMPRI1B in the cultures³⁶.

To gain insight into potential mechanisms underlying the BMP pro-neurogenic action uncovered in our assay, we examined its dependency on WNT signalling, a master regulator of adult hippocampal neurogenesis¹⁰. We found that the BMP pro-neurogenic effect requires basal levels of endogenous WNT signalling and that the BMP and WNT pathway show a synergistic interaction. When combining the BMP and WNT ligands at non-saturating concentrations, the effect of the two taken together was greater than the sum of their separate effects at the same doses. In the light of these data, it seemed likely that the two signalling pathways would share components of the same mechanistic route.

The BMP and WNT pathways have been shown to interact with each other at multiple levels, for instance, via the binding of both SMAD4 and TCF/LEF transcription factors to the promoter and enhancer regions of certain target genes^{37,38}. The TCF/LEF family of transcription factors mediate the downstream effects of canonical Wnt/ β -catenin cascade and has four members in mammals, LEF1 being the most well characterized³⁹. Given LEF1 is expressed in adult hippocampal neural stem cells and is required for neurogenesis^{3,26,40}, and since the

expression of *Lef1* can be activated by BMP4 in BMP-mediated inductive tissue interactions²⁸, we focused on the *Lef1* gene as a possible convergence point between the BMP and the WNT routes. We identified functional BMP regulatory elements on the *Lef1* promoter, we found that *Lef1* expression was increased shortly after BMP exposure and we demonstrated that overexpressing *Lef1* is sufficient to enhance neurogenesis, uncovering a novel mechanistic link between the BMP/WNT signalling pathways operating in adult hippocampal neural stem and progenitor cells. A similar mechanism could be active as well during the development of the hippocampal dentate gyrus, since it has been recently reported that *Lef1* expression at embryonic stages is regulated by the BMP type I receptor ACVR1⁴¹.

In summary, signalling through the BMP type I receptor BMPRI1A plays a relevant role in the modulation of adult hippocampal neurogenesis, regulating not only NSC quiescence^{18–20} but possibly also the early stages of the differentiation cascade. At least *in vitro*, the pro-neurogenic canonical WNT signalling interplays with, and is subjected to regulation by, BMP signalling. This may be achieved by increasing the expression of the transcription factor LEF1. Although future *in vivo* studies are needed to further evaluate the effect of BMP signalling in fate specification, our *in vitro* model already shows that the role of BMPs/BMPRs during adult neurogenesis is much more complex than was previously thought.

References

- Lim, D. A. & Alvarez-Buylla, A. The Adult Ventricular-Subventricular Zone (V-SVZ) and Olfactory Bulb (OB) Neurogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **8** (2016).
- Aimone, J. B. *et al.* Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition. *Physiol Rev* **94**, 991–1026 (2014).
- Choe, Y., Pleasure, S. J. & Mira, H. Control of Adult Neurogenesis by Short-Range Morphogenic-Signaling Molecules. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **8**, a018887 (2015).
- Ciani, L. & Salinas, P. C. WNTs in the vertebrate nervous system: from patterning to neuronal connectivity. *Nat Rev Neurosci* **6**, 351–362 (2005).
- Inestrosa, N. C. & Arenas, E. Emerging roles of Wnts in the adult nervous system. *Nat Rev Neurosci* **11**, 77–86 (2010).
- Angers, S. & Moon, R. T. Proximal events in Wnt signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 468–477 (2009).
- Qu, Q. *et al.* Orphan nuclear receptor TLX activates Wnt/beta-catenin signalling to stimulate neural stem cell proliferation and self-renewal. *Nat Cell Biol* **12**, 31–40; sup pp 1 (2010).
- Wexler, E. M., Paucer, A., Kornblum, H. I., Palmer, T. D. & Geschwind, D. H. Endogenous Wnt signaling maintains neural progenitor cell potency. *Stem Cells* **27**, 1130–1141 (2009).
- Moreno-Estellés, M. *et al.* Symmetric expansion of neural stem cells from the adult olfactory bulb is driven by astrocytes via WNT7A. *Stem Cells* **30**, 2796–2809 (2012).
- Lie, D.-C. *et al.* Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature* **437**, 1370–1375 (2005).
- Mao, Y. *et al.* Disrupted in schizophrenia 1 regulates neuronal progenitor proliferation via modulation of GSK3beta/beta-catenin signaling. *Cell* **136**, 1017–1031 (2009).
- Qu, Q. *et al.* Wnt7a regulates multiple steps of neurogenesis. *Mol Cell Biol* **33**, 2551–2559 (2013).
- Schafer, S. T. *et al.* The Wnt adaptor protein ATP6AP2 regulates multiple stages of adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci* **35**, 4983–4998 (2015).
- Heinecke, K. *et al.* Receptor oligomerization and beyond: a case study in bone morphogenetic proteins. *BMC Biol* **7**, 59 (2009).
- Saremba, S. *et al.* Type I receptor binding of bone morphogenetic protein 6 is dependent on N-glycosylation of the ligand. *FEBS J* **275**, 172–183 (2008).
- Ten Dijke, P. *et al.* Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4. *J Biol Chem* **269**, 16985–16988 (1994).
- Von Bubnoff, A. & Cho, K. W. Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: pathway or network? *Dev Biol* **239**, 1–14 (2001).
- Bond, A. M. *et al.* BMP signaling regulates the tempo of adult hippocampal progenitor maturation at multiple stages of the lineage. *Stem Cells* **32**, 2201–2214 (2014).
- Mira, H. *et al.* Signaling through BMPRI1A regulates quiescence and long-term activity of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell* **7**, 78–89 (2010).
- Bonaguidi, M. A. *et al.* Noggin expands neural stem cells in the adult hippocampus. *J Neurosci* **28**, 9194–9204 (2008).
- Gobeske, K. T. *et al.* BMP signaling mediates effects of exercise on hippocampal neurogenesis and cognition in mice. *PLoS ONE* **4**, e7506 (2009).
- Yousef, H. *et al.* Age-Associated Increase in BMP Signaling Inhibits Hippocampal Neurogenesis. *Stem Cells* **33**, 1577–1588 (2015).
- Palmer, T. D., Takahashi, J. & Gage, F. H. The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol Cell Neurosci* **8**, 389–404 (1997).
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
- Varela-Nallar, L. & Inestrosa, N. C. Wnt signaling in the regulation of adult hippocampal neurogenesis. *Front Cell Neurosci* **7**, 100 (2013).
- Kuwabara, T. *et al.* Wnt-mediated activation of NeuroD1 and retro-elements during adult neurogenesis. *Nat Neurosci* **12**, 1097–1105 (2009).
- Huang, S.-M. A. *et al.* Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature* **461**, 614–620 (2009).
- Kratochwil, K., Dull, M., Farinas, I., Galceran, J. & Grosschedl, R. Lef1 expression is activated by BMP-4 and regulates inductive tissue interactions in tooth and hair development. *Genes Dev* **10**, 1382–1394 (1996).
- Hovanes, K., Li, T. W. & Waterman, M. L. The human LEF-1 gene contains a promoter preferentially active in lymphocytes and encodes multiple isoforms derived from alternative splicing. *Nucleic Acids Res* **28**, 1994–2003 (2000).
- Li, T. W.-H. *et al.* Wnt activation and alternative promoter repression of LEF1 in colon cancer. *Mol Cell Biol* **26**, 5284–5299 (2006).
- Hall, A. K. & Miller, R. H. Emerging roles for bone morphogenetic proteins in central nervous system glial biology. *J Neurosci Res* **76**, 1–8 (2004).
- Chen, H.-L. & Panchision, D. M. Concise review: bone morphogenetic protein pleiotropism in neural stem cells and their derivatives—alternative pathways, convergent signals. *Stem Cells* **25**, 63–68 (2007).
- Gomes, W. A., Mehler, M. F. & Kessler, J. A. Transgenic overexpression of BMP4 increases astroglial and decreases oligodendroglial lineage commitment. *Dev Biol* **255**, 164–177 (2003).
- Gross, R. E. *et al.* Bone morphogenetic proteins promote astroglial lineage commitment by mammalian subventricular zone progenitor cells. *Neuron* **17**, 595–606 (1996).
- Sahni, V. *et al.* BMPRI1a and BMPRI1b signaling exert opposing effects on gliosis after spinal cord injury. *J Neurosci* **30**, 1839–1855 (2010).

36. Brederlau, A. *et al.* The bone morphogenetic protein type Ib receptor is a major mediator of glial differentiation and cell survival in adult hippocampal progenitor cell culture. *Mol Biol Cell* **15**, 3863–3875 (2004).
37. Theil, T., Aydin, S., Koch, S., Grotewold, L. & Rüther, U. Wnt and Bmp signalling cooperatively regulate graded Emx2 expression in the dorsal telencephalon. *Development* **129**, 3045–3054 (2002).
38. Hussein, S. M., Duff, E. K. & Sirard, C. Smad4 and beta-catenin co-activators functionally interact with lymphoid-enhancing factor to regulate graded expression of Msx2. *J Biol Chem* **278**, 48805–48814 (2003).
39. Cadigan, K. M. & Waterman, M. L. TCF/LEFs and Wnt signaling in the nucleus. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4** (2012).
40. Ashbrook, D. G. *et al.* Transcript co-variance with Nestin in two mouse genetic reference populations identifies Lef1 as a novel candidate regulator of neural precursor cell proliferation in the adult hippocampus. *Front Neurosci* **8**, 418 (2014).
41. Choe, Y., Kozlova, A., Graf, D. & Pleasure, S. J. Bone morphogenetic protein signaling is a major determinant of dentate development. *J Neurosci* **33**, 6766–6775 (2013).

Acknowledgements

We thank Prof. Kinichi Nakashima for providing the caBMPR1a retroviral construct. This work was supported by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (grant number SAF2015-70433-R).

Author Contributions

T.M.: experimental design, collection and assembly of data, interpretation of findings, manuscript preparation. Z.A.: collection and assembly of data. R.H.: collection and assembly of data. D.C.L.: interpretation of findings, final approval of manuscript. H.M.: experimental design, collection and assembly of data, interpretation of findings, manuscript preparation, final approval of manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27581-0>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018



Noggin rescues age-related stem cell loss in the brain of senescent mice with neurodegenerative pathology

María Díaz-Moreno^a, Tomás Armenteros^b, Simona Gradari^{c,1}, Rafael Hortigüela^{a,1}, Laura García-Corzo^b, Ángela Fontán-Lozano^c, José Luis Trejo^c, and Helena Mira^{a,b,2}

^aChronic Disease Programme, Unidad Funcional de Investigación en Enfermedades Crónicas, Instituto de Salud Carlos III, 28220 Majadahonda, Spain; ^bStem Cells and Aging Unit, Instituto de Biomedicina de Valencia, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 46010 València, Spain; and ^cDepartment of Molecular, Cellular and Developmental Neuroscience, Instituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 28002 Madrid, Spain

Edited by Fred H. Gage, The Salk Institute for Biological Studies, San Diego, CA, and approved September 26, 2018 (received for review August 3, 2018)

Increasing age is the greatest known risk factor for the sporadic late-onset forms of neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease (AD). One of the brain regions most severely affected in AD is the hippocampus, a privileged structure that contains adult neural stem cells (NSCs) with neurogenic capacity. Hippocampal neurogenesis decreases during aging and the decrease is exacerbated in AD, but the mechanistic causes underlying this progressive decline remain largely unexplored. We here investigated the effect of age on NSCs and neurogenesis by analyzing the senescence accelerated mouse prone 8 (SAMP8) strain, a non-transgenic short-lived strain that spontaneously develops a pathological profile similar to that of AD and that has been employed as a model system to study the transition from healthy aging to neurodegeneration. We show that SAMP8 mice display an accelerated loss of the NSC pool that coincides with an aberrant rise in BMP6 protein, enhanced canonical BMP signaling, and increased astroglial differentiation. In vitro assays demonstrate that BMP6 severely impairs NSC expansion and promotes NSC differentiation into postmitotic astrocytes. Blocking the dysregulation of the BMP pathway and its proglial effect in vivo by intracranial delivery of the antagonist Noggin restores hippocampal NSC numbers, neurogenesis, and behavior in SAMP8 mice. Thus, manipulating the local microenvironment of the NSC pool counteracts hippocampal dysfunction in pathological aging. Our results shed light on interventions that may allow taking advantage of the brain's natural plastic capacity to enhance cognitive function in late adulthood and in chronic neurodegenerative diseases such as AD.

neural stem cells | adult neurogenesis | aging | Alzheimer's disease | BMP signaling

Decades of research have firmly established that new neurons are produced in the postnatal and adult hippocampus of most mammals, including humans, due to the existence of a stem cell reservoir that confers regenerative capacity to this brain area essential in forming memories (1, 2). Despite the long-lasting plastic potential of the hippocampus, defects in hippocampal neurogenesis emerge during aging (3–6) and are exacerbated in pathological conditions such as Alzheimer's disease (AD) (7–9). Previous studies indicated that the newly generated cells in aged mice develop at a slower pace (6), have a reduced survival (10, 11), and differentiate less into neurons and more into astrocytes (10–13), but why this defective fate choice occurs and how we might manipulate stem cells or their niche to effectively counteract hippocampal dysfunction upon healthy and pathological aging remains largely unknown.

The neurogenic process involves several sequential steps. First, quiescent neural stem cells (NSCs) with radial morphology located in the subgranular zone (SGZ) of the dentate gyrus (DG) are activated and enter the cell cycle; next, the NSCs asymmetrically divide and produce nonradial (NR) proliferative progenitors that generate the new neurons. Finally, the young neurons mature and integrate into preexisting networks. Extracellular short-range niche signals regulate neurogenesis at all these different stages (14–16) and alterations in the niche

microenvironment may be linked to the age-related neurogenic decline (17). A relevant family of secreted factors whose function in the aged SGZ remains poorly defined is the bone morphogenetic protein (BMP) family (18). The expression of several BMPs is dysregulated in the hippocampus of old mice, in transgenic mouse models of familial AD, and in the brains of patients with early and severe AD compared with nondemented controls (19–24), pointing to a causative role of BMP signaling in the neurogenic defects found during aging and in AD.

We here analyze the causes underlying the decline in adult NSCs and neurogenesis during pathological aging, taking advantage of the senescence-accelerated mouse strain SAMP8. This nontransgenic short-lived strain precociously and progressively develops learning and memory deficits and a multi-systemic aging phenotype (25–27). SAMP8 also exhibits increased amyloid precursor protein (APP) and amyloid β ($A\beta$) levels, oxidative stress, tau phosphorylation, astrogliosis, and many of the biochemical findings of AD starting at the age of 6 mo (28–30). Due to the spontaneous onset of pathology similar to that of human disease, SAMP8 is considered a good animal model for research into the transition from healthy aging to the onset phase of sporadic AD (28–31). SAMP8 is evaluated in reference to SAMR1, a genetically related strain that is resistant to accelerated senescence (25). We herein show that SAMP8

Significance

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of age-related neurodegeneration. Damage initially occurs in the hippocampus, a neurogenic brain region essential in forming memories. Since there is no cure for AD, therapeutic strategies that may aid to slow hippocampal dysfunction are necessary. We describe the precocious hippocampal stem cell loss of a mouse model that mimics the onset of pathological AD-like neurodegeneration. The loss is due to an increase in BMP6 that limits neurogenesis. We demonstrate that blocking BMP signaling by means of Noggin administration is beneficial to the hippocampal microenvironment, restoring stem cell numbers, neurogenesis, and behavior. Our findings support further development of BMP antagonists into translatable molecules for the rescue of stem cells and neurogenesis in neurodegeneration/aging.

Author contributions: J.L.T. and H.M. designed research; M.D.-M., T.A., S.G., R.H., L.G.-C., Á.F.-L., J.L.T., and H.M. performed research; M.D.-M., T.A., S.G., J.L.T., and H.M. analyzed data; and J.L.T. and H.M. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

This open access article is distributed under [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License 4.0 \(CC BY-NC-ND\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

¹S.G. and R.H. contributed equally to this work.

²To whom correspondence should be addressed. Email: hmira@ibv.csic.es.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1813205115/-DCSupplemental.

Published online October 23, 2018.

mice display an accelerated depletion of the hippocampal NSC pool compared with SAMR1 that coincides in space and time with an increase in astroglial differentiation, a reduction in neurogenesis, an increase in BMP6 protein level, and a dysregulation of the BMP signaling pathway. We also demonstrate that blocking the enhanced BMP signaling of the SAMP8 strain restores normal NSC numbers by counteracting the BMP-mediated NSC astroglial differentiation and simultaneously ameliorates the neurogenic and behavioral deficits of the senescent strain.

Results

SAMP8 Mice Show an Accelerated Depletion of the Adult Hippocampal NSC Pool. We first measured the time course of stem cell decay in the SGZ of mice with pathological aging (SAMP8) and age-matched control animals with healthy aging (senescence accelerated-resistant mice, SAMR1). We found a progressive age-dependent decrease in SOX2⁺GFAP⁺ NSCs with radial morphology in both strains; however, SAMP8 mice exhibited lower radial NSC numbers compared with SAMR1 mice already at the age of 2 mo (Fig. 1*A* and *E*), evidencing the loss of the stem cell population before the onset of AD symptoms (28–30). The total number of SOX2⁺ cells (*SI Appendix*, Fig. S1) and SOX2⁺GFAP[−] NR progenitors (Fig. 1*B*) was also lower in 2-mo SAMP8 vs. SAMR1. The proportion of NSCs and NR cells that stained for the cell-cycle marker Ki67 was higher in SAMP8 (Fig. 1*C* and *D*). No statistically significant differences were found in the proportion of NSCs that incorporated the thymidine analog BrdU during S phase (2 h after BrdU injection, $P = 0.24$) and, consequently, the BrdU/Ki67 ratio [which is inversely proportional to cell-cycle length (32)] was lower in SAMP8 vs. SAMR1. In summary, the stem and progenitor cell pools become precociously depleted in the hippocampus of the senescence model SAMP8 but the remaining NSCs remain proliferative and apparently lengthen their cell cycle.

The Newly Generated Hippocampal Cells Fail to Undergo Normal Differentiation and Survival in SAMP8 Mice. To analyze the dynamics of neuronal production in 2-mo SAMP8 and SAMR1 animals, we employed a BrdU pulse-chase approach. BrdU incorporates into the newly synthesized DNA during cell division, enabling the labeling of dividing cells at the time of injection and their progenies after prolonged chase periods (33). We performed a single injection (pulse) of BrdU and chased the analog at 2 h, 1 d, and 3 d postpulse (Fig. 2*A*). The total number of BrdU⁺ cells in the SGZ was similar between both strains at the 2-h and 1-d chase time points but decreased in SAMP8 animals later on (Fig. 2*B*). The number of BrdU⁺ NSCs and BrdU⁺ NR cells was similar for both strains and there were no differences in their temporal dynamics, suggesting that the cells give rise to new progeny at a similar pace (Fig. 2*C* and *D*). When we examined the DCX⁺ immature neuron compartment, we found equal numbers of newly generated BrdU⁺DCX⁺ cells at 2 h and 1 d postpulse but a significant reduction at 3 d, pointing to a loss of the newborn neurons as they progress toward maturation (Fig. 2*E*). In accordance with this finding, we detected a rise in the number of active Caspase3⁺ apoptotic cells in SAMP8 mice (Fig. 2*F*). Concomitant with the loss of the newborn BrdU⁺DCX⁺ neurons, we found an abnormal accumulation of the DCX⁺ cell population (Fig. 3*A* and *B*). Not only was the total number of DCX⁺ cells abnormally increased in SAMP8 animals but also their location was altered (Fig. 3*A–C*). In animals with pathological aging, DCX⁺ cells migrated deeper into the granule cell layer (GCL) and were aberrantly positioned. Moreover, the number of DCX⁺ cells that acquired the more mature neuronal marker calretinin (CR) was decreased (Fig. 3*D*). Overall, the data suggest that the increase in cell death of the newly generated cells is accompanied by a failure to undergo a normal

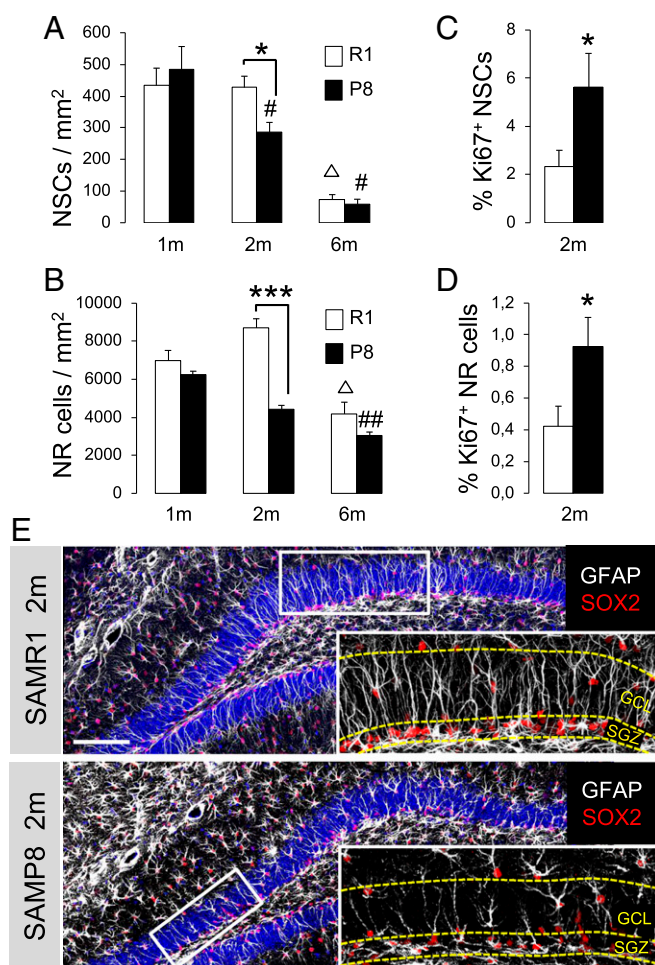


Fig. 1. NSCs and progenitor (NR) cells are precociously depleted in the hippocampus of the SAMP8 model. (*A* and *B*) SAMP8 animals show a decreased number of SOX2+GFAP+ radial NSC (*A*) and SOX2+GFAP− NR cells (*B*) compared with 2-mo SAMR1 (* $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$, respectively). Both strains show an age-related reduction of these cell populations (SAMR1: ^Δ $P < 0.05$; SAMP8: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$). (*C* and *D*) Two-month SAMP8 animals exhibit a higher percentage of actively dividing Ki67+ radial NSCs (*C*) and NR cells (*D*) vs. SAMR1 (* $P < 0.05$). (*E*) Representative coronal micrograph showing the reduction of the number of radial NSCs and NR cells in 2-mo SAMP8 strain vs. SAMR1. (Scale bar, 100 μ m.) (Magnification: *E*, Insets, 5 \times .)

neuronal differentiation program in the SAMP8 microenvironment. To confirm whether this defect finally results in a reduction in the number of new granule neurons reaching maturity, we injected another cohort of animals with BrdU and killed it 3 wk later. The number of newly generated NeuN⁺BrdU⁺ neurons that had matured and integrated into the DG was significantly reduced in the SAMP8 strain (Fig. 3*E*). Notably, concomitant with the decrease in neurogenesis at 2 mo, we also detected a fourfold increase in the number of newly generated S100b⁺BrdU⁺ astrocytes (Fig. 3*F*), suggesting that the loss of the stem cell population in SAMP8 mice could be due to their preferential differentiation into mature astrocytic cells. This cellular output is in accordance with previous findings in aged animals (10–13).

BMP6 Levels Are Elevated in the Hippocampal DG of SAMP8 Mice. The signals that regulate the age-related depletion of the adult hippocampal stem cells and their conversion to astroglia have not yet been identified. Given the proglial role of BMPs at late developmental stages (34), and since the expression of BMP family members is dysregulated in the aging and AD murine and

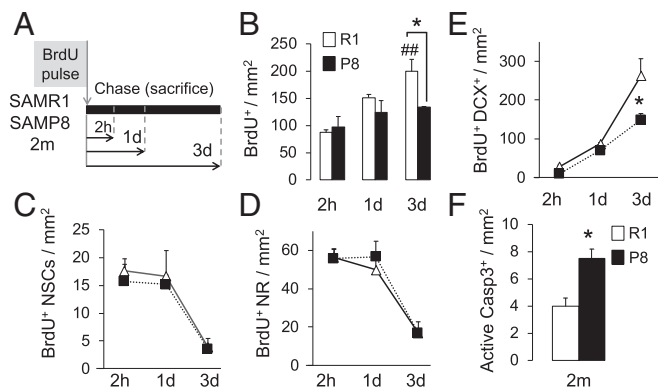


Fig. 2. Newborn neurons are lost in 2-mo SAMP8 animals. (A) Pulse-chase experimental design using BrdU. Animals were killed at 2 h (2h), 1 d (1d) and 3 d (3d) after BrdU injection. (B) BrdU⁺ cells at the chase time points after injection. SAMP8 animals show a reduction at 3 d vs. SAMR1 (**P* < 0.05). SAMR1 animals show an increase over time (###*P* < 0.01). (C and D) BrdU⁺ radial NSCs (C) and BrdU⁺ NR progenitors (D) at different chase time points. Neither radial NSCs nor NR cells show differences in temporal dynamics. (E) BrdU⁺DCX⁺ newborn neurons at all chase time points. SAMP8 strain shows a reduction in this population at 3 d compared with SAMR1. (F) Active Casp3⁺ cells at 3 d after BrdU injection, showing an increase in cell death in the DG of 2-mo SAMP8 vs. SAMR1.

human hippocampus (19–24), we speculated that an early rise in BMP ligands and BMP signaling could underlie the SAMP8 defects. We screened the gene expression of BMPs and BMP-related signaling components in the SAMP8 and SAMR1 DG tissue (Fig. 4A). We found a significant age-dependent increase in *Bmp4* and *Bmp6* mRNAs in SAMP8 that peaked at the age of 2 mo (Fig. 4B) and was specific for the DG (SI Appendix, Fig. S2). We selected these two genes to further analyze their expression at the protein level (Fig. 4D and E). We also measured the amount of P-SMAD1/5/8 relative to total SMAD1/5/8 as an estimate of the canonical BMP signaling pathway activity (Fig. 4D–F). We confirmed a significant threefold rise in the mature BMP6 protein, but not in the mature BMP4 protein, as well as an increase in canonical BMP signaling in the DG of 2-mo SAMP8 animals vs. age-matched SAMR1 animals. A similar rise in BMP6 has been described in AD patients (22).

BMP6 Blocks the Expansion of Adult Hippocampal Stem and Progenitor Cell Cultures by Promoting Astroglial Differentiation. To directly evaluate the effect of BMP6 on adult hippocampal neural stem and progenitor cells (NSPCs) we turned to an in vitro assay. We isolated mouse primary NSPC cultures from wild-type Crl:CD1 2-mo-old animals and expanded them with mitogens in the presence or absence of 50 ng/mL BMP6. The purity of the NSPC cultures was confirmed before the treatment (SI Appendix, Fig. S3). As shown in Fig. 5A, BMP6 treatment effectively induced canonical signaling in adult hippocampal NSPCs. Despite the continuous mitogenic stimulation, BMP6 severely impaired the expansion of the cultures (Fig. 5B) and promoted their differentiation into postmitotic GFAP⁺BrdU[−] astroglial cells (Fig. 5C and D). We did not observe signs of increased apoptosis (TUNEL⁺ cells) or cellular senescence (SA-β-gal⁺ cells) (SI Appendix, Fig. S4). To elucidate whether the BMP6 effects are cell-autonomous or not, we analyzed BMP6 expression in NSPCs isolated from the DG of 2-mo SAMP8 and SAMR1 animals (SI Appendix, Figs. S3 and S5). BMP6 mRNA and preprotein levels were very low and the amount was reduced in SAMP8 NSPCs compared with SAMR1 NSPCs (SI Appendix, Fig. S5). BMP6 production in its mature functional form was negligible in both cultures. Of note, we found that SAMP8 NSPCs expanded more slowly (*n* = 9, *P* < 0.01) and had a

decreased CldU/Ki67 ratio compared with SAMR1 NSPCs (79% lower, *n* = 3, *P* < 0.05); no significant differences in apoptosis were encountered (SI Appendix, Fig. S6). Treating the cells with the BMP natural antagonist Noggin had no effect on the growth of the cultures (SI Appendix, Fig. S7). Furthermore, SAMP8 NSPCs and SAMR1 NSPCs responded similarly to exogenously added BMP6 ligand (SI Appendix, Fig. S8). Together, the in vitro data suggest that the loss of the adult hippocampal stem cell population in mice with accelerated aging could be due to a noncell autonomous (niche) proglial effect of BMP6 canonical signaling. Moreover, NSPCs from SAMP8 mice display a cell-cycle lengthening trend that seems rather an intrinsic feature of the cells, in line with recent aging studies in the subependymal zone niche (35).

Intracranial Infusion of the BMP Antagonist Noggin Rescues Hippocampal Stem Cell Loss in SAMP8 Mice and Ameliorates the Neurogenic Deficits.

To test whether increased BMP signaling plays a role in the stem cell depletion and neurogenic defects in mice with pathological aging we analyzed the impact of administering the antagonist Noggin. For this purpose, we implanted osmotic minipumps in SAMP8 and SAMR1 animals and infused Noggin or saline solution as a control into the brain. Mice were injected with BrdU on the last day of infusion and were either killed 3 d (Fig. 6) or 3 wk later (Fig. 7). As shown in Fig. 6, Noggin efficiently rescued the precocious loss of hippocampal radial NSCs in SAMP8 (Fig. 6B–E). The total number of stem cells increased almost twofold in SAMP8 animals and reached the values of the SAMR1 strain. As previously reported by our group (18), Noggin did not change the total number of radial NSCs in control animals (Fig. 6B), although it increased their cycling activity (Fig. 6C and D), suggesting that under normal healthy conditions Noggin enhances the asymmetric division of NSCs. In contrast, although Noggin augmented the total number of radial NSCs in SAMP8 animals, it did not further increase their cell cycle, pointing to a specific

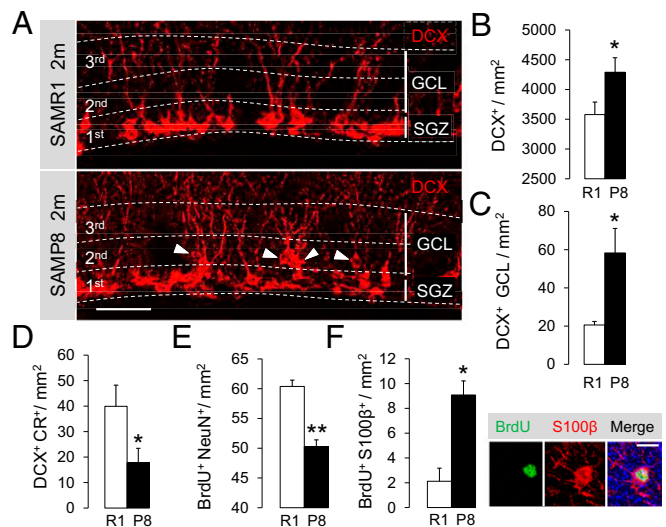


Fig. 3. Newborn neurons of 2-mo SAMP8 animals fail to undergo proper maturation. (A) Representative images of the altered number and location of DCX⁺ cells in 2-mo SAMP8 vs. SAMR1. Arrows indicate DCX⁺ cells with altered location in SAMP8 GCL. (Scale bar, 25 μm.) (B and C) Number of DCX⁺ cells (B) and analysis of their location (C). In control animals, DCX⁺ cells were mainly confined to the innermost (first) third of the DG. SAMP8 animals showed an increased number and abnormal location of this cell population. (D) Number of DCX⁺CR⁺ cells at 2 mo, showing a decrease in SAMP8. (E and F) Number of NeuN⁺BrdU⁺ mature neurons (E) and S100β⁺BrdU⁺ mature astrocytes (F) 3 wk after BrdU injection. SAMP8 animals generate fewer mature neurons and more mature astrocytes. (Right) Image showing a SAMP8 S100β⁺BrdU⁺ mature astrocyte, as an example. (Scale bar, 10 μm.) **P* < 0.05, ***P* < 0.01.

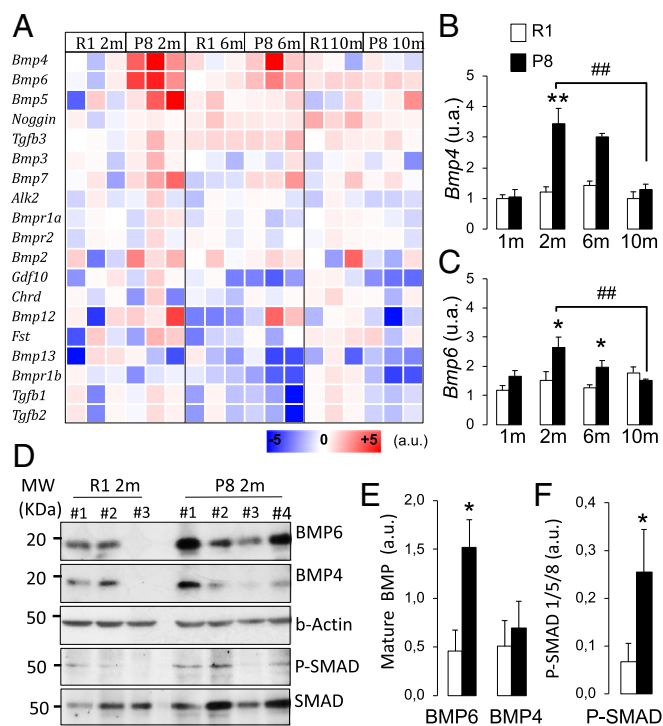


Fig. 4. BMP6 levels are increased in the DG of SAMP8 mice. (A) Heat map showing the mRNA levels (a.u.) of BMP-related signaling components in the DG of 2-mo, 6-mo, and 10-mo SAMR1 and SAMP8. (B) *Bmp4* and (C) *Bmp6* mRNA expression is significantly increased in 2-mo SAMP8 vs. SAMR1. (D–F) Western blot and densitometry analysis of 2-mo DG lysates (D) showing an increased content in BMP6 normalized to β -actin (E) and P-SMAD1/5/8 normalized to total SMAD1/5/8 (F) in 2-mo SAMP8 vs. SAMR1. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

effect of Noggin exposure in animals with pathological aging, which are endowed with higher DG levels of BMP6 and BMP signaling compared with control mice. We next explored whether Noggin administration rescued the proglial phenotype of the SAMP8 animals and/or ameliorated the neurogenic defects. Noggin infusion diminished the differentiation of the NSC pool toward the astrocytic lineage and increased the production of fully mature neurons (Fig. 7A). It also significantly reduced the aberrant accumulation and ectopic location of the immature DCX⁺ cells (SI Appendix, Fig. S9). Together, the data suggest that blocking the enhanced BMP signaling of the SAMP8 strain restores normal hippocampal NSC numbers, most likely by counteracting the BMP-mediated astroglial differentiation, and simultaneously improves the neurogenic defects of the senescent strain.

Behavioral Deficits in SAMP8 Mice Are Rescued by Noggin. SAMP8 mice show age-associated behavioral impairments at 6 mo, such as learning and memory deficits (36) and reduced anxiety (37), so next we analyzed the behavioral phenotype of both SAMR1 and SAMP8 6-mo animals infused with Noggin or saline (Fig. 7B). We found that SAMP8 animals spent significantly longer times at the open arms of the elevated plus maze compared with SAMR1 mice, pointing to clear differences in anxiety (Fig. 7C). Interestingly, Noggin normalized the anxiety behavior of SAMP8 animals to the levels of SAMR1 animals (Fig. 7C). To test their learning and memory capabilities, SAMR1 and SAMP8 5-mo animals were injected with a lentivirus (LV) overexpressing Noggin or GFP as a control and their performance in the Morris water maze test was evaluated (Fig. 7D). Noggin improved the acquisition phase of the test in SAMP8 animals; learning of the LV-Noggin-SAMP8 group was superior to that of LV-GFP-SAMP8 group across a number of days of testing (Fig. 7E). A

clear effect was also found when the animals were tested in the probe trial to analyze the quality of the learning process or short-term memory retention (Fig. 7F and SI Appendix, Fig. S10). SAMP8 mice obtained a lower score, pointing to worse learning. This difference was fully restored by Noggin in SAMP8 animals, which spent similar times in the platform quadrant compared with SAMR1 mice.

Discussion

Age-related neurodegenerative disorders such as AD slowly undermine cognitive function and behavioral abilities. Although AD is not a part of normal healthy aging, the rate of the disease doubles every decade after the age of 60. Alterations in hippocampal neurogenesis, which have been extensively documented both during normal aging and in AD (7–9), possibly contribute to the age- and AD-related hippocampal dysfunction, but the mechanistic causes underlying this phenomenon remain poorly understood. Hence, unraveling the changes affecting the hippocampal neurogenic niche and the hippocampal stem cell dynamics during aging and, most importantly, at early presymptomatic AD stages, may provide new insights into the progression of the disease.

We herein show that BMP6 accumulates very early in the hippocampal niche of SAMP8 animals, a senescent strain that has been used to model some age-related aspects of the onset of sporadic AD. BMP6 is also significantly increased at the mRNA and protein levels in the hippocampus of patients with early and severe AD compared with nondemented controls and in a transgenic mouse model of familial AD (22). BMP6 accumulates around A β plaques in the hippocampus and, as in SAMP8, the accumulation in human tissue is accompanied by reduced hippocampal neurogenesis and SOX2⁺ cells. Moreover, at least in vitro, hippocampal stem cells exposed to A β overexpress

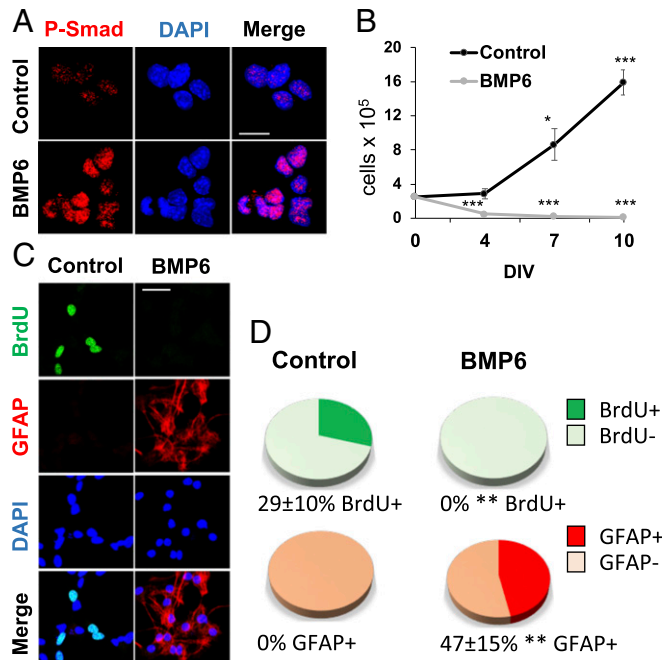


Fig. 5. BMP6 promotes astroglial differentiation of cultured adult hippocampal NSPCs. (A) Canonical signaling activation in cultured NSPCs after BMP6 treatment. (B) In vitro cell growth kinetics at 0, 4, 7, and 10 d (DIV). BMP6 impaired the expansion of NSPC cultures (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$). (C) Postmitotic astroglial differentiation (GFAP+BrdU⁻) of primary NSPC cultures after BMP6 treatment. (D) Percentage of GFAP⁺ and BrdU⁺ cells after BMP6 treatment. BMP6 impairs proliferation (0% BrdU⁺, *** $P < 0.01$) and induces astroglial differentiation (0% GFAP⁺, *** $P < 0.01$). Data correspond to the average \pm SEM, $n = 3$. (Scale bars, 10 μ m in A and 20 μ m in B.)

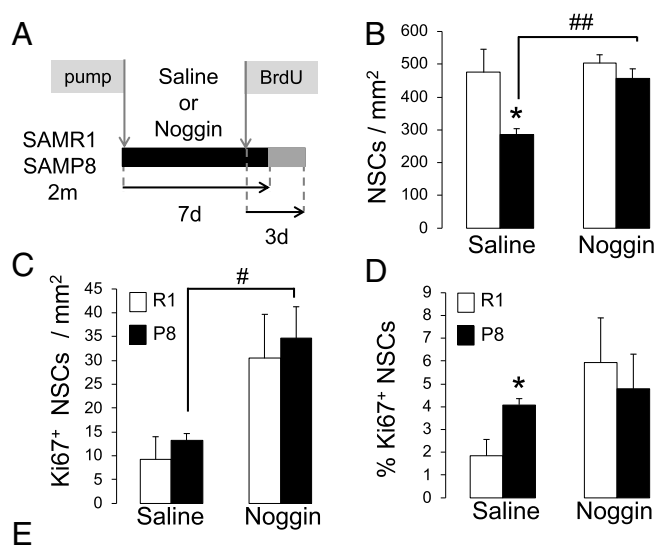


Fig. 6. Intracranial infused Noggin rescues hippocampal NSC loss in SAMP8. (A) Minipump infusion and pulse-chase experimental design using Noggin and BrdU. Two-month animals were infused with Noggin for 7 d and injected with BrdU the last day of infusion. Animals were killed 3 d after BrdU injection (21 d for Fig. 7A). (B) SAMP8 animals show an increase in the number of radial NSCs when treated with Noggin compared with control saline-treated animals ($^{##}P < 0.01$). (C and D) The number of proliferating Ki67⁺ radial NSCs is increased in SAMP8 animals treated with Noggin (C, $^{*}P < 0.05$). The percentage of proliferating radial NSCs is restored to SAMR1 levels (D, $^{*}P < 0.05$). (E) Representative images showing the increase in radial NSCs after intracranial Noggin infusion in 2-mo SAMP8 animals. (Scale bar, 100 μ m.) (Magnification: E, Insets, 5 \times .)

BMP6 (22). An increase in BMP6 has been also reported during healthy aging in wild-type mice, possibly associated to microglial cells, the resident immune cells of the brain (23). Thus, although the available data suggest that BMP6 accumulates during healthy aging, the process may be exacerbated in pathological conditions such as AD that lead to increased A β levels, the activation of microglia, and an unfavorable inflammatory microenvironment (38, 39). Increased A β levels and inflammation have been detected in the SAMP8 brain (40–42) and could therefore contribute to the rise of BMP6 in this mouse model.

Our results indicate that the increase in BMP6 and in canonical BMP signaling mainly results in the precocious depletion of the adult hippocampal NSCs due to their BMP-mediated differentiation into astroglial cells. Interestingly, in 2-mo SAMP8 mice the remaining hippocampal NSCs proliferate and continue to generate new immature neurons, but these cells have a reduced survival and display an aberrant delay in differentiation, leading to a reduction in the number of NeuN⁺ granule neurons reaching maturity, as reported elsewhere (43). A similar aberrant

hindrance to the normal development of the immature neuronal population has been described in the aging brain of wild-type mice (6), in the brain of AD patients, and in some transgenic AD models of the familial early-onset forms of the disease (7–9, 22, 44).

Increasing evidence suggests that the aged and AD neurogenic niche is no longer optimal for neurogenesis (7–9); however, taking advantage of the SAMP8 model and employing the BMP antagonist Noggin we demonstrate that it is still possible to influence the niche microenvironment, to rescue stem cell numbers, and to revert the pathological neurogenic phenotype by means of blocking the aberrant BMP signaling. The treatment with Noggin also normalized the behavioral phenotype of SAMP8 animals, making the scores similar to those of control SAMR1 animals. The SAMP8 anxiety phenotype, the spatial learning defects, and the short-term memory retention capacity were improved by Noggin. In line with our results, hippocampal neurogenesis has been also rescued in transgenic AD models with Noggin (20) and it has been shown that increased BMP signaling results in cognitive impairments, while its reduction ameliorates hippocampus-dependent cognitive function in young and aged mice (24, 45, 46).

In summary, age-related stem cell depletion and dysfunction may result from a combination of several factors, both intrinsic and extrinsic to the stem cell compartment, that are dysregulated with increasing age and that may be exacerbated in pathological conditions such as AD. Our data show that the temporal increase of BMP6 expression in the DG may be one of such altered extrinsic factors. The cell cycle lengthening of NSPCs may be rather a cell intrinsic feature (35). The loss of the stem cell population in SAMP8 mice is due to their differentiation into mature astrocytic cells, which is in accordance with previous findings in aged animals

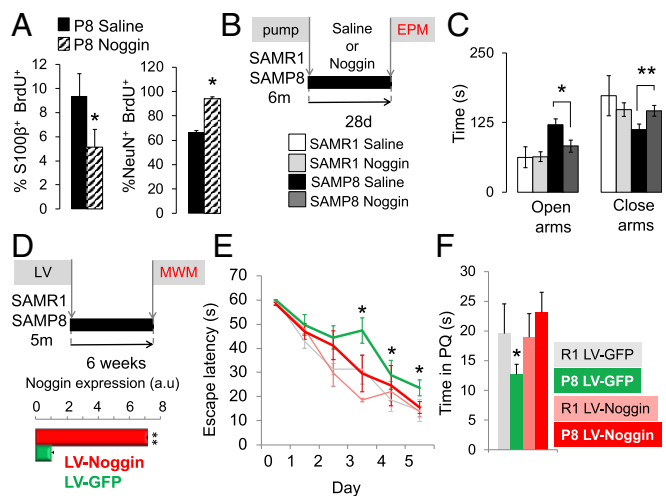


Fig. 7. Noggin infusion counteracts the NSC astroglial differentiation and the neurogenic and behavioral defects in SAMP8. (A) Percentage of S100 β ⁺ BrdU⁺ mature astrocytes (Left) and NeuN⁺ BrdU⁺ mature neurons (Right) after treating 2-mo SAMP8 with saline or Noggin (7-d infusion as in Fig. 6A) at 21 d after BrdU injection. SAMP8 show an increased number of mature neurons at the expense of mature astrocytes ($^{*}P < 0.05$). (B) Experimental design for the Noggin 28-d infusion employing minipumps and elevated plus maze (EPM). (C) Total time spent in the open and closed arms of the elevated plus maze. Noggin restored SAMP8 anxiety behavior to control levels ($^{*}P < 0.05$, $^{***}P < 0.01$). (D–F) Experimental design for the Morris water maze (MWM). (D) Experimental design of the lentiviral injection and MWM. Relative Noggin mRNA expression by RT-qPCR is also shown in fold (a.u.) ($^{*}P < 0.01$). (E) Learning curve calculated as daily mean escape latency during five consecutive days ($^{*}P < 0.05$; LV-Noggin-SAMP8 vs. LV-GFP-SAMP8). A habituation trial (60 s without platform was performed on day 0; see SI Appendix, SI Materials and Methods). (F) Probe trial showing the absolute time spent at the platform quadrant (PQ) of the pool ($^{*}P < 0.05$; LV-Noggin-SAMP8 vs. LV-GFP-SAMP8).

(19–24). We have uncovered why this defective fate choice occurs and how we might mitigate it by manipulating the stem cell niche. The increased glial differentiation of the NSCs can further help to explain the hippocampal astrogliosis that is detected in the SAMP8 strain starting at 6 mo of age (26) and that characterizes the late stages of AD (47). Our findings, combined with previous reports in which the in vivo delivery of lentiviral shRNA against downstream effectors of the BMP pathway partially rejuvenated NSC function in the aged brain (23, 24), support further development of BMP antagonists into translatable molecules for the rescue of stem cell depletion and neurogenesis during healthy and pathological aging.

Materials and Methods

Animals. SAMP8 and SAMR1 males were used at 1, 2, 6, and 10 mo. Crl:CD1 males were used at 2 mo (*SI Appendix*). Mice were maintained under specific-pathogen-free conditions and all manipulations were approved by the Animal Care Committee of the Instituto de Salud Carlos III.

Immunostaining. Antibody stainings were performed as described in *SI Appendix*.

DG NSPC Culture. NSPCs were isolated from dissected hippocampi of 2-mo-old Crl:CD1, SAMR1, and SAMP8 mice and cultured in FGF2 and EGF (*SI Appendix*).

Intracerebroventricular Infusion. Alzet osmotic minipumps were implanted in SAMR1 and SAMP8 mice for Noggin or vehicle solution infusion. Different experimental paradigms of infusion and BrdU administration were applied (*SI Appendix*).

Lentiviral Injections. Five-month-old SAMP8 and SAMR1 males underwent stereotaxic surgery, and a 1.5- μ L suspension of lentiviral ORF particles expressing Noggin or GFP (Origene Technologies) was injected into both hemispheres at DG coordinates (*SI Appendix*).

Behavioral Assessments. Animals' general activity was tested with a Versa-Max Animal Activity Monitoring System. For anxiety measurement and spatial learning and memory tests, elevated plus maze and Morris water maze were performed as described in *SI Appendix*.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank Prof. Gerd Kempermann and members of his laboratory for technical guidance in the NSPC isolation and the ISCI Confocal Microscopy Core and of Lucía Casares-Crespo at the Instituto de Biomedicina de Valencia for assistance. This work was supported by a predoctoral fellowship from the Spanish Ministerio de Educación (to M.D.-M.), Spanish Ministerio de Economía y Competitividad Grant BFU2013-48907-R (to J.L.T.), and Grants PI12/101 and SAF2015-70433-R (to H.M.). We acknowledge support of the publication fee by the CSIC Open Access Publication Support Initiative through its Unit of Information Resources for Research (URIC).

- Aimone JB, et al. (2014) Regulation and function of adult neurogenesis: From genes to cognition. *Physiol Rev* 94:991–1026.
- Kempermann G, et al. (2018) Human adult neurogenesis: Evidence and remaining questions. *Cell Stem Cell* 23:25–30.
- Drapeau E, Nora Abrous D (2008) Stem cell review series: Role of neurogenesis in age-related memory disorders. *Aging Cell* 7:569–589.
- Lee SW, Clemenson GD, Gage FH (2012) New neurons in an aged brain. *Behav Brain Res* 227:497–507.
- Spalding KL, et al. (2013) Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell* 153:1219–1227.
- Trinchero MF, et al. (2017) High plasticity of new granule cells in the aging hippocampus. *Cell Rep* 21:1129–1139.
- Lazarov O, Marr RA (2010) Neurogenesis and Alzheimer's disease: At the crossroads. *Exp Neurol* 223:267–281.
- Winner B, Winkler J (2015) Adult neurogenesis in neurodegenerative diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7:a021287.
- Mu Y, Gage FH (2011) Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 6:85.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1998) Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J Neurosci* 18:3206–3212.
- van Praag H, Shubert T, Zhao C, Gage FH (2005) Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci* 25:8680–8685.
- Bondolfi L, Ermini F, Long JM, Ingram DK, Jucker M (2004) Impact of age and caloric restriction on neurogenesis in the dentate gyrus of C57BL/6 mice. *Neurobiol Aging* 25:333–340.
- Encinas JM, et al. (2011) Division-coupled astrocytic differentiation and age-related depletion of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell* 8:566–579.
- Alvarez-Buylla A, Lim DA (2004) For the long run: Maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* 41:683–686.
- Faigle R, Song H (2013) Signaling mechanisms regulating adult neural stem cells and neurogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1830:2435–2448.
- Choe Y, Pleasure SJ, Mira H (2015) Control of adult neurogenesis by short-range morphogenic-signaling molecules. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8:a018887.
- Rolando C, Taylor V (2014) Neural stem cell of the hippocampus: Development, physiology regulation, and dysfunction in disease. *Curr Top Dev Biol* 107:183–206.
- Mira H, et al. (2010) Signaling through BMPR-IA regulates quiescence and long-term activity of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell* 7:78–89.
- Li D, et al. (2008) Decreased hippocampal cell proliferation correlates with increased expression of BMP4 in the APP^{swE}/PS1^{DeltaE9} mouse model of Alzheimer's disease. *Hippocampus* 18:692–698.
- Tang J, et al. (2009) Noggin and BMP4 co-modulate adult hippocampal neurogenesis in the APP^{swE}/PS1^{DeltaE9} transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 385:341–345.
- Xu H, et al. (2013) The function of BMP4 during neurogenesis in the adult hippocampus in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev* 12:157–164.
- Crews L, et al. (2010) Increased BMP6 levels in the brains of Alzheimer's disease patients and APP transgenic mice are accompanied by impaired neurogenesis. *J Neurosci* 30:12252–12262.
- Yousef H, et al. (2015) Age-associated increase in BMP signaling inhibits hippocampal neurogenesis. *Stem Cells* 33:1577–1588.
- Meyers EA, et al. (2016) Increased bone morphogenetic protein signaling contributes to age-related declines in neurogenesis and cognition. *Neurobiol Aging* 38:164–175.
- Takeda T (2009) Senescence-accelerated mouse (SAM) with special references to neurodegeneration models, SAMP8 and SAMP10 mice. *Neurochem Res* 34:639–659.
- Diaz-Moreno M, et al. (2013) β increases neural stem cell activity in senescence-accelerated SAMP8 mice. *Neurobiol Aging* 34:2623–2638.
- Sousa-Victor P, et al. (2014) Geriatric muscle stem cells switch reversible quiescence into senescence. *Nature* 506:316–321.
- Butterfield DA, Poon HF (2005) The senescence-accelerated prone mouse (SAMP8): A model of age-related cognitive decline with relevance to alterations of the gene expression and protein abnormalities in Alzheimer's disease. *Exp Gerontol* 40:774–783.
- Pallas M, et al. (2008) From aging to Alzheimer's disease: Unveiling "the switch" with the senescence-accelerated mouse model (SAMP8). *J Alzheimers Dis* 15:615–624.
- Ito K (2013) Frontiers of model animals for neuroscience: Two prosperous aging model animals for promoting neuroscience research. *Exp Anim* 62:275–280.
- Cheng XR, Zhou WX, Zhang YX (2014) The behavioral, pathological and therapeutic features of the senescence-accelerated mouse prone 8 strain as an Alzheimer's disease animal model. *Ageing Res Rev* 13:13–37.
- Falcão AM, et al. (2012) Topographical analysis of the subependymal zone neurogenic niche. *PLoS One* 7:e38647.
- Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G (2004) Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci* 27:447–452.
- Nakashima K, Taga T (2002) Mechanisms underlying cytokine-mediated cell-fate regulation in the nervous system. *Mol Neurobiol* 25:233–244.
- Apostolopoulou M, et al. (2017) Non-monotonic changes in progenitor cell behavior and gene expression during aging of the adult V-SVZ neural stem cell niche. *Stem Cell Reports* 9:1931–1947.
- Miyamoto M, et al. (1986) Age-related changes in learning and memory in the senescence-accelerated mouse (SAM). *Physiol Behav* 38:399–406.
- Miyamoto M, Kiyota Y, Nishiyama M, Nagaoka A (1992) Senescence-accelerated mouse (SAM): Age-related reduced anxiety-like behavior in the SAM-P/8 strain. *Physiol Behav* 51:979–985.
- Mrak RE (2012) Microglia in Alzheimer brain: A neuropathological perspective. *Int J Alzheimers Dis* 2012:165021.
- Fuster-Matanzo A, Llorens-Martín M, Hernández F, Avila J (2013) Role of neuroinflammation in adult neurogenesis and Alzheimer disease: Therapeutic approaches. *Mediators Inflamm* 2013:260925.
- Morley JE, Farr SA, Kumar VB, Armbrecht HJ (2012) The SAMP8 mouse: A model to develop therapeutic interventions for Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des* 18:1123–1130.
- Torregrosa-Muñumer R, et al. (2016) Reduced apurinic/aprimidinic endonuclease 1 activity and increased DNA damage in mitochondria are related to enhanced apoptosis and inflammation in the brain of senescence-accelerated P8 mice (SAMP8). *Biogerontology* 17:325–335.
- Griñan-Ferré C, et al. (2016) Behaviour and cognitive changes correlated with hippocampal neuroinflammation and neuronal markers in female SAMP8, a model of accelerated senescence. *Exp Gerontol* 80:57–69.
- Gang B, et al. (2011) Limited hippocampal neurogenesis in SAMP8 mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Res* 1389:183–193.
- Ekonomou A, et al.; Medical Research Council Cognitive Function and Ageing Neuropathology Study (2015) Stage-specific changes in neurogenic and glial markers in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 77:711–719.
- Fan X-T, Cai W-Q, Yang Z, Xu H-W, Zhang J-H (2003) Effect of antisense oligonucleotide of noggin on spatial learning and memory of rats. *Acta Pharmacol Sin* 24:394–397.
- Gobeske KT, et al. (2009) BMP signaling mediates effects of exercise on hippocampal neurogenesis and cognition in mice. *PLoS One* 4:e7506.
- Adamowicz DH, Mertens J, Gage FH (2015) Alzheimer's disease: Distinct stages in neurogenic decline? *Biol Psychiatry* 77:680–682.