

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Biología Molecular



**ESTUDIO DE LA NEUROGÉNESIS
ADULTA EN UN MODELO MURINO
DE SOBREEXPRESIÓN DE LA
GLUCÓGENO SINTASA QUINASA 3 β
EN PRECURSORES NEURALES**

TESIS DOCTORAL

Jerónimo Jurado Arjona

Madrid, 2013



CENTRO DE BIOLOGÍA MOLECULAR "SEVERO OCHOA"

Madrid, 31 de Octubre de 2013

Jesús Ávila de Grado, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, y Félix Hernández Pérez, Profesor Titular de la Universidad Autónoma de Madrid

INFORMAN

Que la presente tesis doctoral titulada “Estudio de la neurogénesis adulta en un modelo murino de sobreexpresión de la glucógeno sintasa quinasa 3β en precursores neuronales” ha sido realizada bajo nuestra dirección por D. Jerónimo Jurado Arjona. Consideramos que el trabajo reviste las características de originalidad y calidad científica requeridas para ser defendida como Tesis Doctoral para optar al Grado de Doctor.

Los directores de la tesis,

Dr. Jesús Avila de Grado

Dr. Félix Hernández Pérez

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ABREVIATURAS	VII
SUMMARY	XIII
INTRODUCCIÓN	1
1. Neurogénesis adulta	3
1.1. Visión general.....	3
1.2. Historia.....	4
1.3. Regiones neurogénicas.....	5
1.3.1. Zona subventricular (SVZ).....	6
1.3.2. Zona subgranular (SGZ).....	6
1.3.2.1. Etapas de la neurogénesis.....	8
1.3.2.2. Intermediarios neurogénicos.....	10
1.3.2.3. Marcadores de los diferentes intermediarios neurogénicos.....	11
1.4. Funciones de la neurogénesis adulta.....	18
1.5. Regulación de la neurogénesis hipocampal adulta.....	19
1.6. Precursores neurales o células madre neurales.....	22
1.7. Trastornos por alteraciones de la neurogénesis.....	24
2. Glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3)	26
2.1. Mecanismos de regulación de la actividad de GSK3.....	28
2.2. GSK3 y enfermedades neurológicas.....	29
2.3. GSK3 y enfermedad de Alzheimer.....	30
2.4. GSK3 y neurogénesis.....	33
OBJETIVOS	35
MATERIALES Y MÉTODOS	39
1. Materiales	41
1.1. Reactivos.....	41

1.2. Anticuerpos.....	41
1.3. Animales.....	42
1.4. Grupos experimentales.....	45
2. Métodos.....	46
2.1. Técnicas bioquímicas.....	46
2.1.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	46
2.1.2. Preparación de extractos proteicos.....	47
2.1.3. Electroforesis, electrotransferencia e inmunodetección (<i>Western Blot</i>).....	47
2.1.4. PCR cuantitativa (qRT-PCR).....	48
2.1.5. <i>Array</i> de citoquinas.....	50
2.1.6. Determinación de los niveles de glucógeno.....	51
2.2. Técnicas histológicas.....	51
2.2.1. Preparación de las muestras de tejido.....	51
2.2.2. Inmunohistoquímica.....	52
2.2.3. Medición del volumen del giro dentado y área total de SGZ.....	53
2.2.4. Inmunofluorescencia de tejido.....	54
2.2.5. Cuantificación de células.....	55
2.2.6. Inyección estereotáxica de retrovirus.....	56
2.2.6.1. Producción de los retrovirus.....	57
2.2.7. Cuantificación de parámetros morfométricos.....	57
2.2.7.1. Cuantificación de parámetros morfométricos sinápticos.....	58
2.3. Cultivos celulares.....	59
2.3.1. Cultivo de astrocitos.....	59
2.3.2. Cultivo de neurosféricas.....	60
2.3.3. Pase del cultivo de neurosféricas.....	61
2.3.4. Experimentos de proliferación <i>in vivo</i>	61
2.3.5. Inmunofluorescencia de cultivos de precursores neurales.....	62
2.4. Pruebas de comportamiento.....	62
2.4.1. Test de campo abierto (<i>Open field</i>).....	62

2.4.2. Test de condicionamiento al miedo (Fear conditioning test).....	63
2.4.3. Test de Rotarod.....	63
2.5. Análisis estadístico.....	64
RESULTADOS	65
1. Generación y caracterización del patrón de expresión del ratón GFAP/OE GSK3 β	67
2. El ratón GFAP/OE GSK3 β presenta un aumento del peso corporal y cerebral.....	70
3. El ratón GFAP/OE GSK3 β sobreexpresa GSK3 β en precursores neurales del giro dentado.....	72
4. El ratón GFAP/OE GSK3 β presenta un incremento del volumen total del giro dentado del hipocampo y del número de neuronas granulares maduras.....	77
5. Aumento del número de precursores neurales y neuroblastos en el ratón GFAP/OE GSK3 β	80
6. El ratón GFAP/OE GSK3 β no presenta diferencias en cuanto a la tasa de proliferación celular.....	84
7. El ratón GFAP/OE GSK3 β no presenta diferencias en supervivencia de las nuevas neuronas generadas.....	85
8. El ratón GFAP/OE GSK3 β no presenta diferencias en la maduración de las células con 4 semanas de edad.....	88
9. El ratón GFAP/OE GSK3 β no muestra diferencias en la reentrada en el ciclo celular de los precursores neuronales con motivo de la sobreexpresión de GSK3 β	90
10. En el ratón GFAP/OE GSK3 β aparece la tendencia a una mayor muerte neuronal.....	93
11. El ratón GFAP/OE GSK3 β no presenta alteración en la enzima sintetizadora de glucógeno ni en las cantidades de éste en el cerebro.....	96

12. El ratón GFAP/OE GSK3 β presenta mayor abundancia de microglía en el GD.....	98
13. El perfil de citoquinas secretadas se encuentra alterado en el ratón GFAP/OE GSK3 β	100
13.1. <i>Array</i> de citoquinas.....	100
13.2. PCR cuantitativa (qRT-PCR).....	102
14. El ratón GFAP/OE GSK3 β presenta niveles elevados de inhibidores de la vía <i>Wnt</i> , que regulan la neurogénesis adulta.....	104
15. El ratón GFAP/OE GSK3 β presenta alteraciones comportamentales.....	106
16. Los precursores neurales procedentes del ratón GFAP/OE GSK3 β presentan una mayor proliferación en cultivo <i>in vitro</i>	108
17. Las nuevas neuronas producidas en el ratón GFAP/OE GSK3 β presentan alteraciones morfológicas del árbol dendrítico y las espinas dendríticas.....	111
17.1. Cambios en la arborización dendrítica.....	112
17.2. Cambios en la conectividad sináptica.....	118
DISCUSIÓN	121
1. Caracterización inicial del modelo GFAP/OE GSK3 β	123
2. El ratón GFAP-tTA/OE GSK3 β presenta un número mayor de progenitores neurales en la SGZ.....	126
3. La sobreexpresión de GSK3 β en precursores neurales provoca alteraciones en las neuronas granulares adultas	131
4. Papel de GSK3 β en la neurogénesis adulta en el modelo GFAP-tTA/OE GSK3 β	134
CONCLUSIONES	137
BIBLIOGRAFÍA	141
ANEXO	157

ABREVIATURAS

- ANOVA:** *Analysis of variance*/ Análisis de la varianza
- APP:** *Amyloid Precursor Protein*/ Proteína precursora del amiloide
- APC:** *Adenomatous polyposis coli*
- ApoE:** *Apolipoprotein E*/ Apolipoproteína E
- A β :** *β -amyloid peptide*/ Péptido β -amiloide
- BDNF:** *Brain-derived neurotrophic factor*/ Factor de crecimiento neurotrófico derivado de cerebro
- BLBP:** *Brain lipid-binding protein*/ Proteína de unión a lípidos del cerebro
- BrdU:** *5-bromo-2'-deoxyuridine*/5-bromo-2'-deoxuridina
- BSA:** *Bovine serum albumin*/ Albúmina de suero bovino
- CA:** *Cornu Ammonis*/ Cuerno de Ammon
- CamKII α :** *Calcium-calmodulin-dependent kinase type II*/ Calcio-calmodulina quinasa II α
- Cdk5:** *Cyclin- dependent kinase 5*/ Quinasa 5 dependiente de ciclina
- cDNA:** *complementary DNA*/ ADN complementario
- CldU:** *5-chloro-2'-deoxyuridine*/ 5-cloro-2'-deoxuridina
- CREB:** *cAMP response element-binding protein*/ Proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP
- C-terminal:** Carboxilo-terminal
- DAB:** *3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride*/3,3'-Diaminobencidina tetrahidroclorada
- DAPI:** *4',6-Diamidino-2-phenylindole*/ 4',6-diamidino-2-fenilindol
- DCX:** *Doublecortin*/ Doblecortina
- DISC-1:** *Disrupted in schizophrenia 1*/ Truncado en esquizofrenia 1
- Dkk1:** *Dickkopf 1*
- DMEM:** *Dulbecco's modified eagle's medium*
- DNA:** *Deoxyribonucleic acid*/ Ácido desoxirribonucleico
- dNTP:** *Deoxyribonucleotide triphosphate*/ Desoxirribonucleótidos trifosfato.
- Doxy:** *Doxycycline*/ Doxiciclina
- Dvl:** *Dishevelled*
- EA:** Enfermedad de Alzheimer
- EGF:** *Epithelial growth factor*/ Factor de crecimiento epitelial

- FAD:** *Familial Alzheimer's Disease*
- FBS:** *Fetal bovine serum*/ Suero bovino fetal
- FGF-2:** *Fibroblast growth factor-2*/ Factor de crecimiento fibroblástico tipo 2
- FMR1:** *Fragile X mental retardation 1*
- GABA:** *Gamma-aminobutyric acid*/ Ácido gamma-aminobutírico
- GD:** Giro dentado
- GFAP:** *Glial fibrillary acidic protein*/ Proteína acídica fibrilar glial
- GFP:** *Green fluorescent protein*/ Proteína verde fluorescente
- GSK-3:** *Glycogen synthase kinase 3*/ Glucógeno sintasa quinasa 3
- HBSS:** *Hank's balanced salt solution*
- HRP:** *Horseradish peroxidase*/ Peroxidasa de rábano
- Iba-1:** *Ionized calcium binding adapter molecule 1*/ Molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1
- IdU:** *5-iodo-2'-deoxyuridine*/ 5-yodo-2'-deoxiuridina
- IF:** Inmunofluorescencia
- IGF-1:** *Insulin-like growth factor 1*/ Factor de crecimiento insulínico tipo 1
- IHQ:** Inmunohistoquímica
- IL:** Interleuquina
- Kb:** Kilobases
- KDa:** KiloDaltons
- Ki67:** Anticuerpo contra la proteína asociada a ciclo celular (mKi67)
- KO:** *Knock-out*
- LRP 5/6:** *LDL receptor-related proteins 5 and 6*/ Proteínas 5 y 6 relacionadas con LDL
- LTP:** *Long term potentiation*/ Potenciación a largo plazo
- MAPs:** *Microtubule-associated proteins*/ Proteínas asociadas a microtúbulos
- mRNA:** *messenger RNA*/ ARN mensajero
- MEM:** *Minimun essential media*/ Medio mínimo esencial
- NB:** *Neurobasal medium*
- NeuN:** *Neuronal nuclei*/ Proteína nuclear neuronal
- NeuroD:** *Neurogenic differentiation*/ Diferenciación neurogénica
- Nfat:** *Nuclear factor of activated T cells*/ Factor nuclear de células T activadas

- Nfr2:** *Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*/ Factor nuclear derivado de eritrocitos 2
- NLS:** *Nuclear location signal*/ Señal de localización nuclear
- NMDA:** *N-Methyl-D-aspartate*/ N-Metil-D-aspartato
- pb:** Pares de bases
- PB:** *Phosphate buffered*/ Tampón fosfato
- PBS:** *Phosphate buffered saline*/ Tampón fosfato salino
- PCNA:** *Proliferating cell nuclear antigen*/ Antígeno nuclear de células en proliferación
- PCR:** *Polymerase chain reaction*/ Reacción en cadena de la polimerasa
- PFA:** *Paraformaldehyde*/ Paraformaldehído
- PHF:** *Paired helical filaments*/ Filamentos pareados helicoidales
- PHisH3:** *Phosphohistone H3*/ Fosfohistona H3
- PI3K:** *Phosphatidylinositol 3-kinase*/ Fosfatidilinositol 3 quinasa
- PKB o Akt:** *Protein kinase B or Akt*/ Proteína quinasa B o Akt
- PMSF:** Fenilmetilsulfonil fluoruro
- Prox-1:** *Prospero homeobox protein 1*/ Homólogo del gen *prospero* de *D. melanogaster*
- PS1:** *Presenilin-1*/ Presenilina-1
- PSA-NCAM:** *Polysialylated neural cell adhesion molecule*/ Forma poli-sializada de la molécula neuronal de adhesión
- PSD95:** *Post-synaptic density protein 95*/ Proteína 95 de la densidad postsináptica
- PTEN:** *Phosphatase and tensin homolog*/ Homólogo de fosfatasa y tensina
- qRT-PCR:** *Quantitative real time PCR*/ PCR cuantitativa a tiempo real
- RMS:** *Rostral migratory stream*/ Corriente migratoria rostral
- RNA:** *Ribonucleic acid*/ Ácido ribonucleico
- rpm:** Revoluciones por minuto
- SDS:** *Sodium dodecyl sulphate*/ Dodecil sulfato sódico
- SEM:** *Standard error of the mean*/ Error estándar de la media
- sFRP3:** *Secreted frizzled-related protein 3*/ Proteína secretada 3 relacionada con frizzled
- SGZ:** *Subgranular zone*/ Zona Subgranular
- SMAD:** *Proteins homologs to MAD and SMA*/ Proteínas homólogas a MAD y SMA
- Shh:** *Sonic Hedgehog*

SNC: Sistema nervioso central

Sox-2: *Sex determining region Y-box 2*/ Región determinante del sexo Y-2

SVZ: *Subventricular zone*/ Zona subventricular

TetO: *Operator region of tet system*/ Región operadora del sistema *tet*

TNF- α : *Tumoral necrosis factor α* / Factor de necrosis tumoral α

TPK1: *Tau protein kinase 1*/ Proteína quinasa de tau 1

tTA: *Transactivator protein of tet system*/ Proteína transactivadora del sistema *tet*

TUC4 (TOAD): *Turn on after division*/ Proteína que aparece después de la división

Tuj1: Anticuerpo contra β -tubulina de clase III específica de neuronas

TSC1: *Tuberous sclerosis 1*

VEGF: *Vascular endothelial growth factor*/ Factor de crecimiento vascular endotelial

WB: *Western blot*

Wt: *Wild type*/ Silvestre

β -Gal: β -galactosidasa

SUMMARY

GSK3 plays an important role in many physiological processes such as microtubule dynamics, cell cycle division, glucose metabolism, apoptosis, embryonic development, cell differentiation and adult neurogenesis. We have previously reported the effects on dentate gyrus (DG) neurogenesis of overexpress GSK3 β in adult neurons under CamKII α promoter. These mice present atrophied DG and less neurogenic niches which show a reduced proliferative activity leading to almost a total depletion with age. Here, by using GFAP promoter, we have generated a transgenic mice overexpressing GSK3 β in glial cells.

First, differences have been detected in GFAP/OE GSK-3 β mice due to GSK3 β overexpression such as an increase in brain weight, volume of dentate gyrus and number of mature granule neurons. Interestingly, main astrocytes overexpressing GSK3 β are those present in the cerebellum as well as those present in the SGZ of the hippocampus. Behavioral tests suggest that GSK3 β overexpression can be helpful as demonstrated by the Rotarod test or by the increasing freezing time observed in the fear conditioning test.

Focusing our study in the SGZ, we have demonstrated that the increase in DG observed in this animal model could be due in part to alterations in neurogenesis. Thus, we have detected an increase in the number of neural progenitor cells in the overexpressing mice by using molecular markers such as BLBP, Sox2 and DCX. In good agreement, neural precursors isolated from GFAP/OE GSK3 mice, exhibit increased cell proliferation in culture. However, although that animal model has a higher number of neuronal progenitors we did not observed differences in parameters such as cell proliferation, survival of newly generated neurons or division cycle reentry. Interestingly, an increase in Dkk1 y sFRP3 mRNA, inhibitors of Wnt-frizzled complex, is observed. Moreover, some alterations occur because an increase in active microglial cells as well as changes in levels of some cytokine molecules is observed. This could be the explanation for changes in morphology of dendritic tree observed in mature newborn neurons of GFAP/OE GSK3 after switching off the transgene.

In summary, these findings suggest that an increase in GSK3 β activity in neural progenitors provokes an increase in these precursors at least in SGZ as well an increase in granular neurons in the DG.

INTRODUCCIÓN

1. Neurogénesis adulta

1.1. Visión general

La neurogénesis es el proceso por el cual se generan nuevas neuronas. Esta producción tiene lugar principalmente en la etapa embrionaria, durante la formación y desarrollo del sistema nervioso. Sin embargo, no es el único momento de generación de neuronas, también hay producción de éstas durante la vida adulta. Este evento se denomina neurogénesis adulta y es el proceso de formación de nuevas neuronas durante la vida adulta del organismo, una vez finalizado su desarrollo.

Este es un concepto relativamente nuevo para la ciencia. A pesar de los primeros indicios, que datan de hace unos 50 años, no fue hasta hace un par de décadas cuando este proceso tomó auge y fue considerado y tenido en cuenta. La idea más aceptada en la comunidad científica era que nacíamos con un número determinado de neuronas y estas iban muriendo durante la vida del individuo.

Hoy en día se acepta que la producción de neuronas no se detiene durante la vida adulta. Hay ciertas zonas, llamadas regiones neurogénicas, donde no cesa la producción de nuevas neuronas así como su integración funcional en la red neuronal y sináptica preexistente. Bajo condiciones fisiológicas, estas regiones son la zona subventricular (SVZ) y la zona subgranular (SGZ) del giro dentado (GD). La primera de ellas se encuentra en la pared del ventrículo lateral. Aquí tiene lugar la generación de nuevas neuronas, cuyo destino final no se encuentra en esta zona ventricular. Las neuronas aquí producidas migran por la vía migratoria rostral (RMS), hasta alcanzar el bulbo olfatorio, donde se harán maduras y desempeñarán su función. La SGZ se encuentra dentro del hipocampo y es la región delimitada entre el GD y el hilus. Estas nuevas neuronas desempeñarán su funcionalidad en el mismo GD, donde se conectarán sinápticamente con las vías aferentes procedentes de la corteza entorrinal y enviarán sus axones con información eferente a las neuronas piramidales de CA3.

1.2. Historia

El establecimiento del concepto de neurogénesis adulta se logró, como cualquier saber científico, gracias al aporte de pequeños avances de muchos investigadores. Con anterioridad al establecimiento de la neurogénesis adulta como tal, se hicieron diversas observaciones que apoyaban la división celular en el cerebro. Hace más de un siglo, Erza Allen en 1912 observó células en mitosis en las paredes del ventrículo lateral del cerebro adulto de roedores (Allen 1912). Fue el primer dato que se conoce de la observación de la división de células en el cerebro. No sería hasta 46 años más tarde cuando se publicó, no sólo la observación de figuras mitóticas en el cerebro, sino el marcaje activo de células que se estaban dividiendo. Empleando timidina tritiada que se incorpora durante la síntesis del DNA, Messier, Leblond y Smart observaron de nuevo el marcaje de células en las paredes ventriculares del cerebro de roedores que demostraba, inequívocamente que había células que se estaban dividiendo (Messier, Leblond et al. 1958).

A pesar de que las primeras observaciones se hicieron en la SVZ, la neurogénesis adulta se descubrió como tal en la zona subgranular del GD. La razón fue que la migración de las nuevas neuronas generadas en la SVZ hasta el bulbo, no se descubrió hasta la década de los años 60. Los trabajos de Joseph Altman fueron los primeros que establecieron el inicio del conocimiento acerca de la neurogénesis adulta. En sus publicaciones de la década de los años 60 describió la neurogénesis adulta primero en el hipocampo y luego en la SVZ, realizando un estudio bastante detallado del proceso en ambas regiones, incluyendo la migración y localización final de las neuronas producidas en la SVZ (Altman 1962; Altman 1962; Altman 1963; Altman and Das 1965; Altman and Das 1965; Altman 1969).

La existencia de neurogénesis adulta, a pesar de todas estas evidencias, no era claramente aceptada por la comunidad científica y se veía con escepticismo. Aunque se continuaron haciendo importantes aportaciones como los trabajos en los años 70 y 80 de investigadores como Kaplan, que demostró mediante microscopía electrónica, que las células que se estaban generando eran nuevas neuronas (Kaplan and Hinds 1977). Los trabajos de Nottebohm pueden considerarse la primera evidencia de la funcionalidad desempeñada por las nuevas neuronas generadas. Demostró como la neurogénesis

intervenía en el dimorfismo sexual que existe en el núcleo cerebral encargado del canto en pájaros cantores como los canarios. Era esta neurogénesis la que permitía el aprendizaje de nuevos cantos en la estación de cría (Goldman and Nottebohm 1983; Paton and Nottebohm 1984).

No fue hasta 30 años más tarde, la década de los años 90, cuando la neurogénesis volvió a ser un tema científico de interés, aceptado y en auge. A esto contribuyó la publicación de trabajos como el descubrimiento en 1992 de la presencia de células madre neurales en mamíferos adultos por Reynolds y Weiss (Reynolds and Weiss 1992), trabajos que demostraban la presencia de neurogénesis en primates no humanos (Gould, McEwen et al. 1997; Gould, Reeves et al. 1999; Kornack and Rakic 1999) y finalmente el trabajo de Eriksson en 1998 que apoyaba la presencia de neurogénesis en humanos (Eriksson, Perfilieva et al. 1998).

En este resurgimiento de la neurogénesis, tuvo gran importancia el avance de las técnicas metodológicas. Entre otras, cabe destacar el marcaje con timidina tritiada combinada con técnicas inmunohistoquímicas para demostrar el carácter neuronal de las células generadas (Cameron, Woolley et al. 1993) o el uso de análogos de timidina como sustituto del marcaje radiactivo que permitió visualizar las neuronas de nueva generación mediante dobles y triples inmunomarcajes combinado con microscopía confocal (Kuhn, Dickinson-Anson et al. 1996). Por último, el marcaje mediante el uso de retrovirus de las nuevas neuronas maduras e integradas (van Praag, Schinder et al. 2002).

1.3. Regiones neurogénicas

Son aquellas regiones del cerebro adulto donde, debido a sus características particulares, se produce la generación de nuevas neuronas. Las características de estas regiones serán la presencia de precursores neuronales capaces de dividirse y un microambiente permisivo donde estos precursores puedan producir neuronas nuevas. En condiciones fisiológicas existen dos regiones neurogénicas en el cerebro adulto de roedores: la zona subventricular y la zona subgranular.

1.3.1. Zona subventricular (SVZ)

En esta región, también llamada zona subependimal, tiene lugar la producción de nuevas neuronas que están implicadas en el funcionamiento del sistema olfativo. La SVZ se encuentra en la pared lateral de los ventrículos laterales y es el remanente de la zona de proliferación embrionaria. Una vez finalizado el desarrollo embrionario, aquí se siguen produciendo nuevas neuronas que pasarán a ser funcionales en el bulbo olfatorio. En este caso se trata de varios tipos de interneuronas: un tipo de la zona granular y dos tipos de interneuronas de la zona periglomerular. Una característica de las neuronas que se generan en la SVZ, es que tienen su destino funcional a una gran distancia de donde son generadas. Estas neuronas inmaduras tendrán que migrar un largo recorrido hasta llegar a su ubicación final. El camino que siguen recibe el nombre de vía migratoria rostral (RMS) y se produce migración de los neuroblastos en modo cadena ([Imagen 1](#)).

Los trabajos de Fiona Doetsch en el laboratorio de Alvarez-Buylla, caracterizaron los distintos tipos celulares presentes en la SVZ. Existen tres tipos de intermediarios neurogénicos. Las células tipo B son astrocitos y son los encargados de generar las nuevas neuronas, son los precursores neurales. Las células tipo C son células de amplificación transitoria y son las que más activamente se dividen. Por último, las células tipo A son los neuroblastos inmaduros que migran hasta su localización final en el bulbo olfatorio (Doetsch, Garcia-Verdugo et al. 1997). Esta región neurogénica tiene una gran producción de neuronas en roedores mientras que en humanos parece desaparecer a los pocas semanas tras el nacimiento (Sanai, Nguyen et al. 2011).

El sistema olfatorio tiene otra zona de producción de nuevas neuronas durante toda la vida del organismo, como es el epitelio olfativo. En este caso se encuentra fuera del sistema nervioso central y su función es regenerar las neuronas receptoras del sistema olfativo.

1.3.2. Zona subgranular (SGZ)

El hipocampo se localiza en el lóbulo temporal de manera bilateral. En él residen importantes funciones como son, entre otras, la memoria a corto plazo y la memoria espacial. Anatómicamente, podemos diferenciar distintas estructuras como el subículo, el *cornu ammonis* (CA) o cuerno de Amón (que se subdivide en las regiones CA1, CA2

y CA3) y la *fascia dentata* o giro dentado (GD).

Es aquí en el GD, donde hay una continua producción de neuronas durante toda la vida adulta. En este caso la región donde se localizan los precursores neuronales es la zona subgranular (SGZ) del GD que queda delimitada por los somas de las células granulares del GD y el hilus (Imagen 2). Una gran diferencia con el caso de la neurogénesis en la SVZ, es que las nuevas neuronas del GD no migran grandes distancias, sino que se producen en la SGZ y tienen su destino a pocas micras, en el mismo GD, donde maduran y son funcionales.

Las nuevas neuronas formadas establecen sinapsis de tipo gabaérgico durante las primeras etapas de su maduración, pasando posteriormente a establecer contactos sinápticos de tipo glutamatérgico (Esposito, Piatti et al. 2005; Ge, Goh et al. 2006; Overstreet-Wadiche, Bromberg et al. 2006). En los primeros estadios, estas nuevas neuronas son hiperexcitables y con mayor plasticidad sináptica en comparación con las granulares maduras (Schmidt-Hieber, Jonas et al. 2004; Ge, Sailor et al. 2008).

Al final de todo este proceso, se generan neuronas granulares maduras que pasan a formar parte de la red sináptica preexistente del GD. Se integran en el primer punto del circuito trisináptico del hipocampo, donde recibirán información de la vía perforante procedente de la corteza entorrinal. Estas nuevas neuronas mandan sus axones a CA3 formando las fibras musgosas.

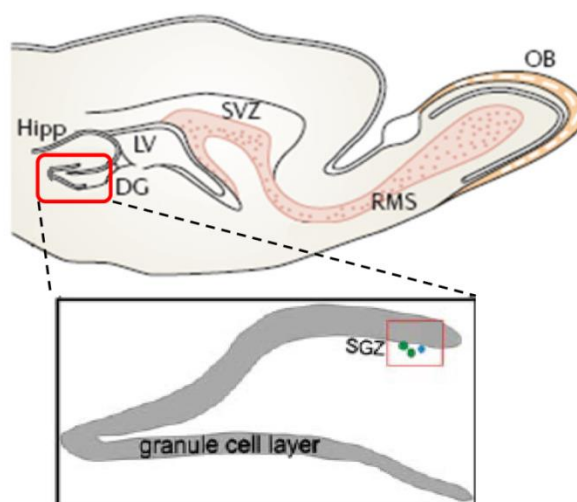


Imagen 1. Representación esquemática de las regiones neurogénicas en el cerebro adulto. El recuadro rojo marca la zona ampliada, que corresponde con el giro dentado (DG) del hipocampo (Hipp). Los precursores neurales se localizarán en la SGZ. La otra región neurogénica es la SVZ, en la pared del ventrículo lateral (LV). Las nuevas interneuronas generadas migran por la vía migratoria rostral (RMS) hasta alcanzar su destino final en el bulbo olfatorio (OB).

1.3.2.1. Etapas de la neurogénesis

El proceso de la neurogénesis se puede dividir en varias etapas para su estudio, cada una de las cuales se caracteriza por distintos marcadores que permiten marcar los distintos tipos celulares y estudiar las distintas fases y eventos que tienen lugar en este proceso. De forma esquemática se pueden reconocer las siguientes etapas (Halbach 2007):

1. **Proliferación:** los precursores neurales residentes en la SGZ se dividen para dar lugar a dos células hijas. Estos precursores se caracterizan por la expresión de GFAP y nestina. La división puede ser simétrica o asimétrica, existiendo cierta controversia en este punto. Hay estudios que *in vitro* muestran la posibilidad de aislar precursores que se dividen indefinidamente. En este caso los precursores neurales darían lugar a una célula hija que acabaría diferenciando a neurona y otra que continuaría siendo célula madre. Otros autores no consiguen obtener neuroesferas secundarias a partir de una única célula por lo que postulan que el tipo celular residente en la SGZ son células de linaje restringido (Seaberg and van der Kooy 2002; Seaberg and van der Kooy 2003; Bull and Bartlett 2005).
2. **Diferenciación:** en esta etapa las células de amplificación transitoria se dividen y dan lugar a células hijas que son neuronas inmaduras. En esta fase las células ya no expresan GFAP, pero continúan expresando nestina. En los puntos más tardíos de la fase, las células paran su expresión de nestina y comienzan a expresar doblecortina (DCX) y la forma modificada postraduccionalmente con ácido polisiálico de la molécula de adhesión neural (PSA-NCAM).
3. **Migración:** en esta fase los neuroblastos inmaduros migran dentro de la capa granular del GD. Siguen expresando DCX y PSA-NCAM. En esta fase las nuevas células generadas siguen siendo mitóticas, es decir, todavía pueden dividirse.

4. **Contacto dendrítico y axonal:** a partir de esta fase las nuevas neuronas ya son postmitóticas. Extienden sus dendritas dentro de la capa molecular del GD y envían su axón hacia CA3, donde contactarán con las neuronas piramidales. En esta etapa las neuronas inmaduras siguen expresando DCX y PSA-NCAM. Además, comienzan a expresar la proteína de unión a calcio calretinina y el marcador neuronal NeuN, propio de neurona postmitótica.

5. **Integración sináptica:** en esta última fase, las nuevas neuronas pasan a estar totalmente maduras y a establecer sus contactos sinápticos. Reciben inputs aferentes procedentes de la corteza entorrinal en las dendritas localizadas en la capa molecular. Al mismo tiempo, establecen contacto con las neuronas de CA3 para enviar los inputs eferentes. En esta fase, las neuronas ya maduras dejan de expresar calretinina y comienzan a expresar calbindina. Estas neuronas maduras continúan expresando NeuN.

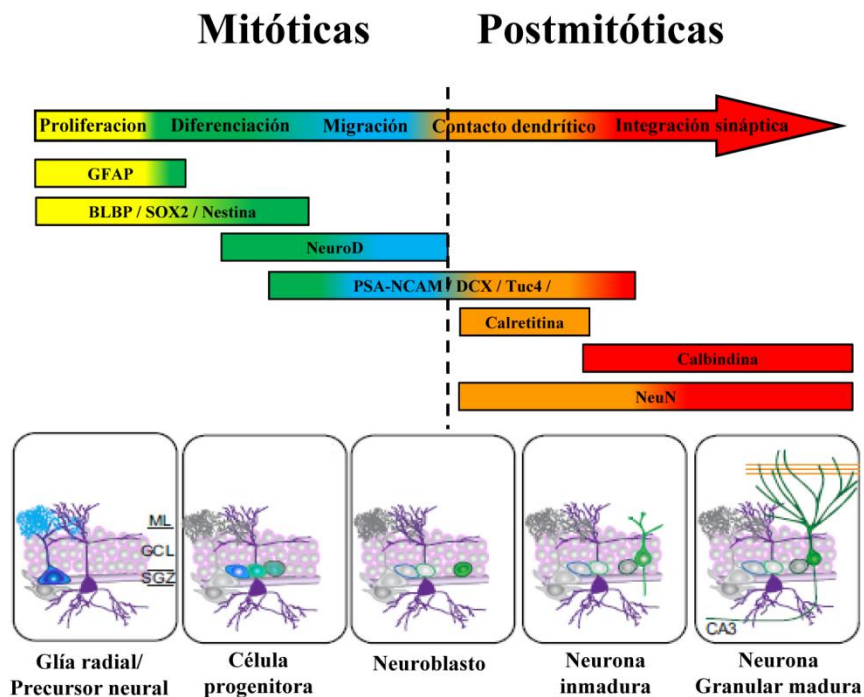


Imagen 2. Esquema orientativo del patrón de expresión temporal de los marcadores del proceso de neurogénesis. Se puede observar como los diferentes estadios celulares en función de la etapa de diferenciación en la que se encuentran, expresan marcadores característicos que nos permite identificarlas. (Modificado de von Bohlen und Halbach O. *Cell Tissue Res.* 2007 y Ming G *et. al. Neuron* 2001).

Esta división no es rígida y cerrada sino que, dependiendo de los autores, se pueden encontrar diferencias; por ejemplo, los marcadores que caracterizan cada etapa, así como el tiempo durante el cual se expresa cada marcador. Además de los antes mencionados, GFAP y nestina, otros marcadores ampliamente utilizados característicos de los precursores neurales, son BLBP y Sox2. En las fases de diferenciación y migración, donde encontramos células de amplificación transitoria y neuroblastos inmaduros, podemos también encontrar marcadores como TUC4, Tuj1 o NeuroD, que colocalizarían con DCX y PSA-NCAM. Por otro lado Prox1, que es un marcador que aparece al final de la fase mitótica y perdura en las neuronas granulares maduras e integradas en el cerebro postnatal (Halbach 2007; Ming and Song 2011).

1.3.2.2. Intermediarios neurogénicos

Al igual que fue descrito para la SVZ, los tipos celulares identificados para la SGZ son equivalentes y muy similares:

-**Células B**: constituyen el reservorio de células madre situados en la SGZ, que al igual que en la SVZ, son astrocitos y expresan GFAP y nestina. A éstos se les llamó, por similitud con la otra zona neurogénica, células B (Seri, Garcia-Verdugo et al. 2001).

-**Células D**: son las células generadas a partir de la división de las células B. Dentro de estas células tipo D se han establecido varios subtipos: las D1, con capacidad proliferativa y las D2 y D3 que ya son postmitóticas y pasarán a ser neuronas granulares maduras (Seri, Garcia-Verdugo et al. 2004). Estas células tipo D corresponderían a las que llevan a cabo las fases de diferenciación, migración y contacto dendrítico y axonal. Se tratan de varios estadios, donde las D1 serían células de amplificación transitoria todavía mitóticas. Las D2 y D3 serían neuroblastos y neuronas inmaduras ya postmitóticas que migran y se integran en la red de neuronas granulares antes de ser totalmente funcionales. Estas células D se marcarán con anticuerpos como DCX (Francis, Koulakoff et al. 1999; Gleeson, Lin et al. 1999), PSA-NCAM, (Seki and Arai 1991), NeuroD (Lee, Hollenberg et al. 1995), Prox1 ó TUC4 (Minturn, Geschwind et al. 1995).

-**Células G**: son las neuronas granulares maduras.

Esta no es la única nomenclatura existente para denominar a los distintos tipos celulares que intervienen en la neurogénesis. Otra clasificación es la propuesta por Kempermann (Filippov, Kronenberg et al. 2003; Kempermann, Jessberger et al. 2004):

-Células tipo-1: las células B serían equivalentes a las células tipo-1 y se caracterizan por los marcadores GFAP, BLBP, Sox2 y nestina.

-Células tipo-2: son las generadas a partir de las células tipo-1. Las tipo-2 se subdividen en tipo-2a, que serían las células de amplificación transitoria que ya no expresan GFAP, pero si nestina y Sox2. Éstas no tendrían un equivalente en la nomenclatura alfabética, ya que las células D, que son las que derivan de los precursores o tipo B, siempre expresaban PSA-NCAM. A continuación vendría el tipo-2b, que continúa siendo positiva para nestina y, a diferencia de las 2a, también lo son para DCX. Las tipo-2b son precursores de amplificación transitoria equivalentes a las células D1.

-Células tipo-3: estas células dejan de expresar nestina y seguirán expresando DCX y PSA-NCAM. Son mitóticas y su equivalencia serían las tipo D1/D2.

-Etapa calretinina: cuando los neuroblastos se vuelven neuronas inmaduras postmitóticas, entrarían en la etapa calretinina, donde además expresan DCX, Prox1 y NeuN. Este tipo celular de etapa calretinina serían los tipos D2 tardíos y D3.

-Neurona granular madura: las neuronas granulares maduras expresan los marcadores de calbindina, Prox1 y NeuN y equivaldrían a las células G en la nomenclatura de Alvarez-Buylla.

1.3.2.3. Marcadores de los diferentes intermediarios neurogénicos

Como hemos visto, es posible marcar e identificar los distintos tipos de células que participan en el proceso de neurogénesis en base a la expresión de distintas proteínas. Los marcadores característicos para los diferentes intermediarios neurogénicos son:

Precusores neurales, células B o células tipo 1

-**GFAP** (*glial fibrillary acidic protein*): es un marcador característico de astrocitos maduros de cerebro adulto que además se expresa en las células precursoras que darán lugar a la génesis de nuevas neuronas. Diversos estudios demostraron que la neurogénesis adulta, tanto en la SVZ como en la SGZ, tenía lugar a partir de unos precusores neurales con propiedades astrocíticas y que expresaban el marcador GFAP (Doetsch, Caille et al. 1999; Seri, Garcia-Verdugo et al. 2001). Aunque astrocitos y precusores neurales expresan GFAP, su morfología es distinta, siendo unipolar o bipolar la morfología de los precusores neuronales y multipolar la de los astrocitos maduros. Por otro lado, los precusores son negativos para S100 β , que es un marcador de astrocitos maduros. El empleo únicamente de GFAP como identificador de precusores neurales es problemático, debido fundamentalmente a que marca también los astrocitos maduros.

-**Nestina**: se trata de un filamento intermedio específico neuronal. Con el descubrimiento y aislamiento de células precursoras en el cerebro de los mamíferos (Reynolds and Weiss 1992), se describió que estas células expresaban como marcador característico la nestina. Mediante el marcaje con GFP bajo el promotor de la nestina se vio que las células marcadas eran las que daban lugar a la generación en el adulto de nuevas neuronas (Yamaguchi, Saito et al. 2000). Sin embargo, se ha documentado que no todos los precusores (tipo-1) expresan nestina, sino alrededor de dos tercios del total. Además, este marcador no se restringe a un tipo de intermediario neurogénico, pues también se expresa en células tipo-2. Este marcador se expresa también en astrocitos durante el desarrollo del cerebro y luego desaparece (Kalman and Ajtai 2001). Su uso puede tener limitaciones debido a que se puede producir una reexpresión en células gliales tras diferentes eventos como son la isquemia cerebral (Duggal, Schmidt-Kastner et al. 1997), traumatismo cerebral (Sahin Kaya, Mahmood et al. 1999), neurotoxicidad (Yoo, Lee et al. 2005) o la deaferenciación del GD (Brook, Perez-Bouza et al. 1999).

-**Sox2** *Sex determining Region Y-box2* (Sry-related HMG box 2): es un factor de transcripción que controla el desarrollo del sistema nervioso (Gubbay, Collignon et al. 1990) y se expresa en las células madre embrionarias de la masa celular interna del blastocisto. Es un factor esencial para mantener la autorrenovación e inducir pluripotencialidad en las células madre (Lowry, Richter et al. 2008; Park, Lerou et al. 2008). Así, Sox2 está presente tanto en células madre embrionarias pluripotentes como en precursores neurales multipotentes. En cuanto a la neurogénesis adulta, Sox2 se expresa tanto en células tipo 1 como tipo 2 y es el factor de transcripción más firmemente asociado a la capacidad de la célula de ser progenitor neuronal.

-**BLBP** (*brain lipid binding protein*): pertenece a una familia de proteínas pequeñas de localización citoplasmática que unen largas cadenas de ácidos grasos, interviniendo en su captación, transporte y metabolismo. Se expresa en la glía radial durante el desarrollo por la activación de la vía de Notch (Anthony, Mason et al. 2005). Además, en el cerebro adulto está presente en el citoplasma y núcleo de los precursores neuronales (Feng, Hatten et al. 1994; Kurtz, Zimmer et al. 1994).

Células de amplificación transitoria, células D1/D2, células tipo-2 y 3

-**Doblecortina** (DCX): es una proteína asociada a microtúbulos que promueve su polimerización. Está presente en neuroblastos y neuronas jóvenes en migración (Francis, Koulakoff et al. 1999; Gleeson, Lin et al. 1999), sobretudo en sus proyecciones principales (Schaar, Kinoshita et al. 2004) y en los conos de crecimiento de las neuritas (Friocourt, Koulakoff et al. 2003). Su mutación en humanos produce defectos en la laminación cortical, como por ejemplo en la lisencefalia asociada al X. En el desarrollo, su expresión solapa en gran medida con la reelina (Meyer, Perez-Garcia et al. 2002) y su función está muy regulada por la acción de quinasas y fosfatasas (Schaar, Kinoshita et al. 2004). Así muchas rutas de señalización convergen en la DCX, modulando la estabilidad de los microtúbulos y la migración celular (LoTurco 2004; Tanaka, Serneo et al. 2004).

La proteína DCX se considera específica de las nuevas neuronas generadas ya que prácticamente todas las células DCX+ expresan marcadores neuronales tempranos

(Rao and Shetty 2004). Su expresión empieza cuando termina la de la nestina, que deja de expresarse tras la especificación neuronal (Couillard-Despres, Winner et al. 2005). Sin embargo, existe solapamiento (células tipo-2b) como se ha visto con ratones transgénicos Nestina-GFP (Kronenberg, Reuter et al. 2003; Steiner, Klempin et al. 2006). El apagado de DCX coincide con el encendido del marcador NeuN, aunque exista cierto solapamiento de ambos (Brandt, Jessberger et al. 2003; Brown, Couillard-Despres et al. 2003; Couillard-Despres, Winner et al. 2006). En la SGZ este marcador permite identificar las células tipo-2b y tipo-3 (o células D) y en la SVZ las células C. Por todo ello, DCX es un buen marcador en las regiones neurogénicas donde identificará las fases de migración y extensión de neuritas, es decir, células implicadas en diferentes fases del proceso de neurogénesis.

-PSA-NCAM (*polysialylated form of neural cell adhesion molecule*): encontramos una alta expresión durante el desarrollo del cerebro, marcándose los progenitores neurales (Ben-Hur, Rogister et al. 1998). En el cerebro adulto se expresa en las nuevas neuronas granulares generadas y en desarrollo (Seki and Arai 1991; Seki and Arai 1993; Seki and Arai 1993; Seki 2002). Los residuos de ácido siálico reducen la adhesión celular mediada por NCAM (Sadoul, Hirn et al. 1983), de ahí que sea un marcador presente en lugares de plasticidad y en nuevas neuronas migratorias. Tanto en la SGZ como en la SVZ su expresión solapa casi completamente con la de DCX no encontrándose colocalización entre PSA-NCAM y GFAP (Seki and Arai 1999).

-NeuroD (*neurogenic differentiation*): es un factor de transcripción que se expresa en las etapas tardías del compromiso neuronal (Lee, Hollenberg et al. 1995) actuando como gen de determinación y diferenciación neuronal (Tamimi, Steingrimsson et al. 1996). Se ha identificado como un factor de diferenciación en neurogénesis de varias especies, desde *Xenopus* a humanos. Es importante para el correcto desarrollo del GD, siendo crucial para el desarrollo de las neuronas en el GD y para su diferenciación postnatal (Miyata, Maeda et al. 1999; Liu, Pleasure et al. 2000). Se expresa durante la neurogénesis adulta (Kawai, Takagi et al. 2004), localizándose las células positivas en la SGZ (Seki 2002; Hevner, Hodge et al. 2006). Su expresión es anterior a la de PSA-NCAM, aunque se puede encontrar cierto grado de solapamiento (Seki 2002; Seki

2002).

-**TUC4**: empieza a expresarse cuando la neurona comienza a migrar (Minturn, Geschwind et al. 1995). Los máximos niveles se alcanzan durante el crecimiento axonal. TUC4 se expresa tanto en neuronas mitóticas tardías como en postmitóticas tempranas (Munoz-Elias, Woodbury et al. 2003), teniendo un patrón de expresión coincidente con PSA-NCAM o DCX (Cecchini, Ciaroni et al. 2003). Su utilización como marcador tiene inconvenientes como la dificultad para hacer colocalizaciones y cuantificaciones, ya que se expresa principalmente en la parte distal de los conos de crecimiento.

- **β -III-tubulina**: también llamado Tuj1, por el nombre del anticuerpo empleado, reconoce un isotipo de tubulina específico de neuronas. Se expresa en fases embrionarias y se ha empleado para el estudio de neuronas inmaduras durante el desarrollo (Easter, Ross et al. 1993; Menezes and Luskin 1994), donde se da en paralelo a NeuroD *in vitro* (Uittenbogaard and Chiamello 2002). En neurogénesis adulta, se usa como marcador específico de nuevas neuronas (Doetsch, Garcia-Verdugo et al. 1997; Parent, Yu et al. 1997; Gould, Vail et al. 2001). Se expresa en neuronas postmitóticas tempranas y neuronas diferenciadas que expresan NeuN (Ambrogini, Lattanzi et al. 2004), pero también en mitóticas tardías pues se han descrito casos de colocalización con DCX (Yang, Sundholm-Peters et al. 2004). Algunos datos dicen que sólo teñiría una subpoblación de células del GD (basket cells), lo que haría que este marcador no fuese útil para identificar todas las nuevas neuronas formadas (Seri, Garcia-Verdugo et al. 2004).

Células postmitóticas o células tipo D2/D3

-**Calretinina**: es un marcador específico de neuronas no piramidales gabaérgicas que se pueden encontrar en todas las regiones del hipocampo, CA1-CA3 y GD (Jacobowitz and Winsky 1991; Gulyas, Miettinen et al. 1992; Miettinen, Gulyas et al. 1992). En la neurogénesis adulta se expresa en unas neuronas del GD que no expresan marcadores de interneuronas como GABA (Liu, Fujise et al. 1996). Así, en las últimas

fases de este proceso, las nuevas neuronas postmitóticas expresan calretinina junto a DCX o NeuN, (Brandt, Jessberger et al. 2003). Por tanto, la expresión de calretinina en el GD ocurre en un corto plazo de tiempo, durante el cual tiene lugar la conexión del axón y las dendritas con sus dianas (Kempermann, Jessberger et al. 2004; Ming and Song 2005).

-Calbindina: esta proteína se expresa en todas las neuronas maduras del GD, en la mayoría de las neuronas piramidales de CA1 y CA2 y también en las células de Purkinje del cerebelo (Sequier, Hunziker et al. 1988; Seress, Gulyas et al. 1991; Seress, Gulyas et al. 1992). Se usa como marcador de la última etapa de la neurogénesis adulta, para marcar neuronas granulares maduras (Rami, Brehier et al. 1987; Eriksson, Perfilieva et al. 1998; Liu, Solway et al. 1998; Nilsson, Perfilieva et al. 1999; Dominguez, Blasco-Ibanez et al. 2003), pero no junto a PSA-NCAM (Dominguez, Blasco-Ibanez et al. 2003) ni junto a calretinina que marcaba también neuronas postmitóticas inmaduras (Nacher, Blasco-Ibanez et al. 2002; Brandt, Jessberger et al. 2003).

-NeuN (*neuronal nuclei*): se trata de una proteína nuclear soluble específica de neuronas postmitóticas que se localiza en el núcleo y el citoplasma que rodea al núcleo, entrando en ocasiones en las neuritas (Mullen, Buck et al. 1992; Lind, Franken et al. 2005). NeuN se puede unir al DNA, donde se piensa que puede actuar como factor de transcripción cuando se inicia la última fase de diferenciación (Mullen, Buck et al. 1992; Sarnat, Nochlin et al. 1998). Su expresión se da en la mayoría de las neuronas del sistema nervioso, con algunas excepciones como las células de Purkinje, los fotorreceptores o las células mitrales del bulbo olfatorio (Mullen, Buck et al. 1992; Winner, Cooper-Kuhn et al. 2002), no expresándose en células no neuronales (Wolf, Buslei et al. 1996). En la neurogénesis adulta del GD sirve como marcador de todas las neuronas postmitóticas, las maduras y las de reciente generación. El doble marcaje con marcadores como la DCX, que se expresa en mitóticas pero también en postmitóticas tempranas, ayuda a diferenciar las diferentes poblaciones de neuronas postmitóticas. Es de gran utilidad para estudios de colocalización con BrdU, debido a que ambos se encuentran en el mismo compartimento celular así como gracias a su expresión estable.

Células proliferativas

Otro tipo de información relevante en el estudio de la neurogénesis es la proliferación de las células que van a generar las nuevas neuronas granulares. Para ello se utilizan marcadores que nos permitirán visualizar el proceso de división o que marcarán a la nueva célula. Así, es posible estimar parámetros como la tasa de proliferación, seguir el desarrollo en el tiempo de una nueva neurona, determinar la supervivencia de las nuevas neuronas, etc. Estos marcadores son:

-Análogos de timidina: la base para la utilización de estos marcadores es su incorporación al DNA cuando se produce su síntesis durante la fase S de la mitosis. Son bases que compiten por las endógenas, que se incorporan de manera estable, y se pueden detectar mediante inmunohistoquímica, permitiendo realizar análisis de supervivencia pasado un periodo de tiempo tras su administración. El primer análogo que se empezó a utilizar en los años 50 fue la timidina marcada radiactivamente con tritio (Friedkin and Wood 1956; Messier, Leblond et al. 1958). Este marcaje se ha utilizado hasta la década de los años 90, pero hoy en día ha sido sustituido por el empleo de otros análogos como la 5-bromo-2-deoxyuridina (BrdU) y sus derivados con cloro (CldU) o iodo (IdU) (Corotto, Henegar et al. 1993; Kuhn, Dickinson-Anson et al. 1996). Estos análogos se detectan con anticuerpos, por lo que aportan la ventaja de realizar dobles y triples inmunofluorescencias y visualizarlas mediante microscopia confocal.

-Antígenos celulares de proliferación celular: son marcadores que permiten confirmar y complementar los datos obtenidos mediante el empleo de los análogos de timidina por métodos independientes. Son proteínas que se expresan durante la fase de división, algunos ejemplos son:

PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), se expresa en las fases G1 y S (Hall, Levison et al. 1990). Su empleo no es muy recomendado ya que requiere tratamiento para desenmascarar antígenos con citrato y los marcajes no son estables.

Ki67, es una proteína asociada a ciclo celular que parece ser esencial para su progresión (Starborg, Gell et al. 1996; Endl and Gerdes 2000). Identifica a células en

fase G1 tardía, S, G2 y M (Scholzen and Gerdes 2000). Estudios comparativos con BrdU han mostrado que es un marcador con una gran variabilidad con el cual, en ocasiones se obtiene un mayor número de células marcadas (Kee, Sivalingam et al. 2002) y en otras un menor número (McKeever, Ross et al. 1997).

Fosfohistona H3 (PHisH3), se basa en el reconocimiento de la fosforilación en la serina 10 de la histona 3 que ocurre durante la mitosis. Únicamente detecta la cromatina durante la fase M, por lo que da evidencias directas del número de mitosis, pero con el inconveniente de detectar un periodo muy corto del ciclo celular (Hendzel, Wei et al. 1997; Bilang-Bleuel, Ulbricht et al. 2005).

-Retrovirus: son virus capaces de infectar a células en división. En base a esto, podemos utilizarlos para infectar los intermediarios neurogénicos que están en división generando nuevas neuronas. El virus se integrará en la neurona y se expresará así que, modificándolo para que no sea virulento y exprese una proteína reportera como la proteína verde fluorescente (GFP), podremos visualizar a las nuevas neuronas que fueron infectadas. Como los análogos de timidina, es un marcaje estable, pudiendo así analizar células en diferentes fases del desarrollo, dependiendo el tiempo que dejemos tras la infección (Carlen, Cassidy et al. 2002; van Praag, Schinder et al. 2002).

1.4. Funciones de la neurogénesis adulta

Las implicaciones exactas que tiene el proceso de neurogénesis y reemplazamiento neuronal para el desarrollo de las funciones del hipocampo y del cerebro en general, no son del todo bien conocidas. Se ha propuesto que la neurogénesis adulta interviene en funciones propias del hipocampo como son la memoria y el aprendizaje (Barnea and Nottebohm 1996; Gould, Beylin et al. 1999; Feng, Rampon et al. 2001; Shors, Miesegaes et al. 2001; Aimone, Wiles et al. 2006; Wiskott, Rasch et al. 2006; Garthe, Behr et al. 2009). Las nuevas e inmaduras neuronas podrían jugar, según algunas hipótesis, un papel en el procesamiento de la información en relación con el almacenamiento de la memoria (Gould, Tanapat et al. 1999). Sin embargo, en oposición a esta teoría donde son las neuronas inmaduras los elementos principales, otras hipótesis propondrían que las nuevas neuronas son reclutadas en fases tardías de su desarrollo.

Esto se produciría en respuesta a cambios de complejidad y novedad, con la finalidad de adaptar la red neuronal a cambios similares en el futuro (Kempermann 2006). Por otro lado, se ha demostrado que la neurogénesis adulta está implicada en la respuesta a comportamientos de ansiedad y depresión (Santarelli, Saxe et al. 2003). En este sentido, muchos antidepressivos estimulan la neurogénesis (Malberg, Eisch et al. 2000).

La hipótesis más aceptada actualmente, es que las nuevas neuronas generadas se requieren para muchas, pero no todas las tareas dependientes de hipocampo. Entre ellas estarían el aprendizaje espacial (navegación espacial y retención de memoria espacial a largo plazo), discriminación de patrones espaciales, condicionamiento contextual al miedo, eliminación de memoria hipocampal y reorganización de memoria extrahipocampal (Deng, Aimone et al. 2010).

1.5. Regulación de la neurogénesis hipocampal adulta

La neurogénesis es un proceso de plasticidad neuronal. Es un proceso de adaptación y cambio del cerebro en función de una situación determinada. Por esto, la neurogénesis se ve influenciada y modulada por múltiples factores, tanto intrínsecos como extrínsecos.

Algunos de estos factores intrínsecos o moleculares son:

-Edad: es el regulador negativo más fuerte en la neurogénesis adulta en todas las especies (Altman and Das 1965; Seki and Arai 1995; Kuhn, Dickinson-Anson et al. 1996; Kempermann, Kuhn et al. 1998). El descenso no es total y, aunque a niveles muy bajos, puede ser detectada en avanzada edad, incluso en humanos, donde no llega a desaparecer (Eriksson, Perfilieva et al. 1998).

-Niveles hormonales: destacan los corticoesteroides, que juegan un papel importante en la reducción de la neurogénesis debida al estrés (Gould, Cameron et al. 1992; Tanapat, Hastings et al. 1999) y a la edad (Cameron and McKay 1999). Sin embargo, también pueden tener el efecto contrario. Incrementos agudos y fuertes producen efectos negativos mientras que incrementos moderados y crónicos tienen el efecto contrario. Por tanto, los niveles hormonales no siempre correlacionan con los efectos en neurogénesis adulta, teniendo diversas situaciones fisiológicas con altos

niveles de corticoesteroides, asociadas a un incremento de la neurogénesis (Kempermann 2006).

-Niveles de neurotransmisores: algunos ejemplos son la neurotransmisión excitatoria glutamatérgica que tiene efectos duales sobre la neurogénesis. Tiene un efecto inhibitorio de la proliferación celular. Así, tras la lesión de la mayor vía excitatoria que va al GD y que procede de la corteza entorrinal, se produce un incremento de la proliferación celular (Gould 1994; Cameron, McEwen et al. 1995) y el bloqueo de los receptores de NMDA incrementa la neurogénesis adulta (Gould, Cameron et al. 1994; Cameron, McEwen et al. 1995; Bernabeu and Sharp 2000; Nacher, Rosell et al. 2001; Okuyama, Takagi et al. 2004). Por otro lado, la activación de otros receptores de glutamato, los activados por kainato, produce una gran proliferación celular (Parent, Yu et al. 1997). Por tanto, hay un balance en el mecanismo regulatorio de la excitación glutamatérgica y su efecto sobre la neurogénesis.

La innervación colinérgica ejerce su efecto promoviendo la supervivencia. Así, la disminución de esta innervación produce la reducción de la neurogénesis adulta y aumenta el número de células apoptóticas (Cooper-Kuhn, Winkler et al. 2004).

La innervación serotoninérgica incrementa la neurogénesis adulta (Brezun and Daszuta 1999). Cuando dicha innervación desaparece se produce un descenso del proceso, el cual se rescata trasplantando tejido serotoninérgico en la lesión.

-Factores de crecimiento: el *epidermal growth factor* (EGF), tiene efecto mitogénico, provocando proliferación en las regiones neurogénicas (Kuhn, Winkler et al. 1997). El *fibroblast growth factor-2* (FGF2), tiene funciones mitogénicas similares a EGF. Así induce la actividad telomerasa en progenitores neurales, siendo importante para mantener la función de los mismos (Haik, Gauthier et al. 2000). Tanto EGF como FGF2, son necesarios para el mantenimiento de neuroesferas de distintas especies (Reynolds, Tetzlaff et al. 1992; Kirschenbaum, Nedergaard et al. 1994; Arsenijevic, Villemure et al. 2001). Otros factores de crecimiento importantes son: IGF-1, que media la acción de BDNF e induce proliferación celular (Aberg, Aberg et al. 2000; Lichtenwalner, Forbes et al. 2001; Aberg, Aberg et al. 2003). IGF-1 media los efectos positivos de la actividad física sobre la neurogénesis (Carro, Nunez et al. 2000; Carro, Trejo et al. 2001; Trejo, Carro et al. 2001). VEGF (vascular endotelial growth factor), induce proliferación de los precursores neuronales *in vivo* e *in vitro*. BDNF (brain

derived neurotrophic factor) incrementa la neurogénesis (Pencea, Bingaman et al. 2001; Lee, Duan et al. 2002) e *in vitro* induce diferenciación y evita la proliferación de los precursores (Cheng, Wang et al. 2003).

En cuanto a factores ambientales o extrínsecos tenemos:

-Ejercicio físico: el ejercicio físico, como por ejemplo correr, es un robusto inductor de la neurogénesis adulta en la SGZ, pero no en SVZ (Brown, Cooper-Kuhn et al. 2003). Aumenta la proliferación celular (van Praag, Christie et al. 1999; van Praag, Kempermann et al. 1999) afectando a los progenitores tipo-2 (Kronenberg, Reuter et al. 2003). El ejercicio físico provoca un aumento de la potenciación a largo plazo (LTP) del GD así como mejoras en la realización de tareas de aprendizaje dependientes de hipocampo. Tiene dos efectos diferentes: uno más agudo, que es transitorio y afecta a la proliferación celular y otro que es más prolongado en el tiempo, que afecta al nicho de las células precursoras como un todo (Kempermann 2006).

-Enriquecimiento ambiental: consiste en exponer a los animales a un ambiente novedoso y cambiante. Es un regulador positivo de la neurogénesis de la SGZ, pero que no afecta a la SVZ (Brown, Cooper-Kuhn et al. 2003). Su efecto promueve la supervivencia de las nuevas neuronas, observándose mayor número de nuevas neuronas granulares que en los animales control (Kempermann, Kuhn et al. 1997). Este efecto potenciador es incluso mayor en edades avanzadas (Kempermann, Kuhn et al. 1998).

-Estrés: es uno de los reguladores negativos de la neurogénesis hipocampal más importantes. Así, diversos paradigmas de estrés crónico, reducen la proliferación celular en la SGZ (Gould, Cameron et al. 1992; Cameron, Woolley et al. 1993; Cameron and Gould 1994; Gould 1994; Mirescu and Gould 2006). Este estrés se traduce en variaciones de nivel de los glucocorticoides y, al igual que pasaba con éstos, dosis moderadas de estrés se traducen en efectos potenciadores de la neurogénesis (Kempermann 2006).

-Inflamación: puede ser producida por diversos daños, irradiación o neurodegeneración y es un importante regulador negativo (Carpentier and Palmer 2009). Disminuye la capacidad proliferativa y el destino neuronal de los progenitores, y además altera el nicho neurogénico con angiogénesis aberrante y activación microglial (Monje, Toda et al. 2003).

-Estados patológicos: se ha descrito que los daños cerebrales producen alteraciones del proceso. Así, los ataques epilépticos aumentan la proliferación tanto en la SGZ como la SVZ (Benzon, Kokaia et al. 1997; Scott, Wang et al. 1998; Madsen, Treschow et al. 2000). Además, se produce un error de migración con localización ectópica de nuevas neuronas en el hilus (Parent, Yu et al. 1997; Kron, Zhang et al. 2010). Otro importante inductor es la isquemia (Takagi, Nozaki et al. 1999; Liu, Caldji et al. 2000). Se induce la proliferación y migración celular a la zona del daño, pero la mayoría de las neuronas mueren por no establecer contactos sinápticos funcionales (Arvidsson, Collin et al. 2002). El aumento de la proliferación es dependiente de la activación de receptores de NMDA (Arvidsson, Kokaia et al. 2001).

-Abusos de sustancias: el alcohol y los opiáceos (Eisch, Barrot et al. 2000) entre otras sustancias alteran la neurogénesis.

1.6. Precusores neurales o células madre neurales

La neurogénesis adulta tiene lugar gracias a la existencia de células madre neurales o células precursoras neurales, que tienen la capacidad de dividirse generando neuronas nuevas. En el establecimiento de la neurogénesis como fenómeno generalizado en diversos grupos de organismos, fue decisivo el avance de la biología de las células madre y su descubrimiento en el cerebro adulto. En 1992 Reynolds y Weiss publicaron, por primera vez, la existencia de células madre neurales, a partir de células del estriado que en cultivo generaban neuronas y astrocitos. Esto, junto a otros trabajos, permitieron establecer en pocos años la existencia de células madre neurales (Richards, Kilpatrick et al. 1992)(Richards 1992), describir su aislamiento y condiciones para cultivarlas *in vitro*, así como la necesidad de utilizar EGF y FGF2 para mantener su indiferenciación y multipotencia (Kilpatrick and Bartlett 1993; Kitchens, Snyder et al. 1994; Ray, Raymon et al. 1995).

Numerosas preguntas quedan todavía por responder en la biología de las células madre neurales. Entre ellas nos encontraríamos la posibilidad de que existan otras zonas neurogénicas, si son iguales las células precursoras de las distintas regiones, etc. Distintos experimentos parecen señalar que no sólo en la SVZ y SGZ existen células madre, ya que células aisladas de otras regiones como el estriado o el septum, bajo

determinadas condiciones de cultivo, también producen neuronas y astrocitos (Reynolds and Weiss 1992; Palmer, Ray et al. 1995). En cuanto a la igualdad en la identidad de las células madre, trasplantes de precursores aislados de la SGZ y trasplantados de nuevo en la SGZ y SVZ, producen el tipo de progenie propia de la región receptora del implante (Suhonen, Peterson et al. 1996). Mientras que estas mismas células implantadas en regiones no neurogénicas, como el cerebelo, no producen diferenciación neuronal. De la misma forma, precursores aislados de SVZ, sólo se integran y diferencian en la SVZ y no en el estriado o corteza (Herrera, Garcia-Verdugo et al. 1999). Estos experimentos sugieren que el microambiente neurogénico es muy importante y que no depende tanto del precursor, sino del tipo de ambiente que le rodea, el que dé lugar a una descendencia de un tipo u otro. Este fenómeno podría explicar los hallazgos de neurogénesis en zonas no neurogénicas tras una lesión como muerte celular inducida en la corteza (Magavi, Leavitt et al. 2000) o tras una isquemia (Arvidsson, Collin et al. 2002; Parent, Vexler et al. 2002). En estas situaciones se podría producir un cambio de las condiciones microambientales de la región que favorezcan la neurogénesis regenerativa, en una zona no neurogénica.

Las características que definen a una célula precursora son la capacidad de autorrenovación y la multipotencia. La autorrenovación se consigue a través de la división celular. Para ello, la célula madre se dividirá dando lugar a una célula hija con las mismas características que la célula madre y otra que estará más diferenciada, que se le llama célula progenitora. Este progenitor tiene un destino celular más restringido y, por tanto, se diferenciará y generará nuevas neuronas. En este caso hablamos de división asimétrica. En el modelo propuesto, las células progenitoras también se dividen y con una tasa mayor que la de las células precursoras, por eso también se les llama células progenitoras de amplificación transitoria. Estos progenitores se dividen de forma simétrica, lo que por definición lleva a una no autorrenovación, pero amplificarán la población que generará nuevas neuronas.

La segunda característica que identifica a una célula madre es la multipotencia. Por multipotencia se entiende la capacidad de generar diferentes tipos celulares. El grado de multipotencia puede ser variable, y así hay células totipotentes, pluripotentes, multipotentes, bipotentes o unipotentes.

Desde la identificación de células madre neurales, pasó cierto tiempo hasta la

caracterización más precisa y conocimiento de su identidad celular. Aunque se sabía de la existencia de células que se dividían en el cerebro, no se conocía qué tipo de células eran las encargadas de proliferar. Lo primero que se observó fue que era en la zona subependimaria donde residían las células que mostraban características de precursores neurales (Morshead, Reynolds et al. 1994). En primer lugar se publicó que en la SVZ eran las células endimarias las que tenían las características de células madre y eran las encargadas de dividirse (Johansson, Momma et al. 1999). Sólo unos meses más tarde se publicó que realmente las células madre neurales son un tipo celular con propiedades de astrocitos, que son las que dan lugar a las nuevas neuronas (Doetsch, Caille et al. 1999). Las mismas características de astrocitos se vieron que tenían las células precursoras en el GD (Seri, Garcia-Verdugo et al. 2001).

1.7. Trastornos por alteraciones de la neurogénesis

Además de la importancia propia por la función que la neurogénesis desempeña, también es importante el conocimiento de este proceso por su implicación en diversas neuropatologías. La alteración del proceso de neurogénesis y de la correcta regulación de la proliferación y maduración de los precursores neuronales, conducen al desarrollo de diversas enfermedades.

Por ejemplo, la generación de diversos tumores cerebrales se producen por alteraciones en la correcta proliferación de los precursores neuronales (Noble and Dietrich 2004). Además se han aislado poblaciones celulares en los gliomas que *in vitro* se comportan como células madre. Otra prueba de la importancia de conocer la fisiología de las células madre, es el problema del desarrollo de tumores en terapias de trasplante con células madre neurales.

Otra enfermedad donde se ve alterada la neurogénesis es en la epilepsia. La inducción de convulsiones epilépticas puede ser modelizada de múltiples formas (con inyecciones de kainato, penteniltetrazolio, electrodos...), pero en todos los casos se produce un gran aumento de la neurogénesis adulta debido a una inducción masiva de la proliferación celular (Bengzon, Kokaia et al. 1997; Parent, Yu et al. 1997; Gray and Sundstrom 1998; Parent, Janumpalli et al. 1998; Scott, Wang et al. 1998; Parent, Tada et al. 1999; Covolan, Ribeiro et al. 2000; Madsen, Treschow et al. 2000; Nakagawa,

Aimi et al. 2000; Auvergne, Lere et al. 2002; Ferland, Gross et al. 2002; Parent, Valentin et al. 2002; Parent, Vexler et al. 2002; Jiang, Wan et al. 2003). Aparecen nuevas neuronas ectópicas, no localizadas en su lugar correspondiente y que no establecen correctamente sus conexiones. Se cree que lo que está ocurriendo es una aceleración del desarrollo que conduce a un fallo de la migración.

Otras patologías donde la implicación de la neurogénesis está bastante confirmada son la depresión y la esquizofrenia. En depresión se ha comprobado que el efecto de numerosos antidepresivos se ejerce a través de su acción sobre la neurogénesis adulta de la SGZ. En modelos donde se impide la neurogénesis, el uso de los antidepresivos no es efectiva (Duman, Malberg et al. 2000; Jacobs, van Praag et al. 2000; Malberg, Eisch et al. 2000; Czeh, Michaelis et al. 2001; Kempermann 2002; Santarelli, Saxe et al. 2003). Además, se ha observado que los pacientes tienen atrofia hipocampal y síntomas asociados al incorrecto funcionamiento del hipocampo (Sheline 1996; Rajkowska, Miguel-Hidalgo et al. 1999), que estarían relacionados con esta alteración de la neurogénesis. En cuanto a la esquizofrenia, se han encontrado hallazgos similares, como el descenso de proliferación de las células madres neurales en esta enfermedad (Reif, Fritzen et al. 2006) y el aumento de la proliferación celular que producen diferentes antipsicóticos (Wakade, Mahadik et al. 2002).

Fallos en la neurogénesis también se han implicado como posible causa de enfermedades neurodegenerativas. Por ejemplo en la enfermedad de Parkinson, se ha visto un descenso de células precursoras en pacientes, que se postula podría estar provocado por la falta de innervación dopaminérgica en el hipocampo (Hoglinger, Rizk et al. 2004).

Entre las enfermedades neurodegenerativas, la que más atención ha recibido por la posible contribución en la patogénesis de la disfunción de los precursores neurales, ha sido la enfermedad de Alzheimer (EA). Aunque los resultados son contradictorios. En humanos se ha observado la presencia de marcadores neurogénicos como DCX o PSA-NCAM, pero las neuronas inmaduras tiene morfología aberrante que hace pensar que no acabarán madurando en neuronas granulares. En modelos de ratón transgénicos de APP, los resultados también son contradictorios. Hay resultados que demuestran que la neurogénesis está disminuida (Haughey, Liu et al. 2002; Haughey, Nath et al. 2002) mientras que en otros, se ha reportado un aumento de la neurogénesis y la proliferación

(Caille, Allinquant et al. 2004; Jin, Galvan et al. 2004). Lo mismo ocurre *in vitro*; así, hay datos que muestran un aumento de la proliferación de los precursores neurales por efecto del APP (Ohsawa, Nishimaki et al. 2008) y en cambio en otros no ocurre lo mismo (Haughey, Liu et al. 2002). En modelos transgénicos de presinilina-1, la cual se expresa en precursores neuronales, se ha visto una menor plasticidad para responder a estímulos como el enriquecimiento ambiental (Feng, Rampon et al. 2001). Con estos datos lo que se postularía es que en la enfermedad, los precursores neuronales tendrían menor plasticidad. Habría intentos de producción de nuevas neuronas, lo que explicaría los datos de una mayor neurogénesis, pero serían fallidos. Este fallo de la neurogénesis hipocampal adulta, se traduciría en el deterioro cognitivo que se observa en los pacientes de la enfermedad.

2. Glucógeno Sintasa Quinasa 3 (GSK3)

La glucógeno sintasa quinasa GSK3, fue identificada y se caracterizó por su implicación en el metabolismo del glucógeno. Se expresa en todos los tejidos de los mamíferos, pero presenta sus niveles más altos de expresión en el sistema nervioso central (Woodgett 1990). Está altamente conservada en la evolución y consta de dos isoformas (GSK3 α y GSK3 β) cada una codificada por genes distintos, localizados en los cromosomas 19q12.3 y 3q13.3 respectivamente. El producto del primer gen da una proteína de 51 kDa (GSK3 α) mientras que el producto del segundo es de 47 kDa (GSK3 β). Tienen una homología entre ellas del 85%, pero llegando al 95% en su centro catalítico (Doble and Woodgett 2003) siendo sus funciones a menudo indistinguibles. GSK3 β también se ha llamado Tau Protein Kinase I (TPK1) ya que se había identificado en paralelo en extractos de cerebro debido a su capacidad para fosforilar la proteína tau *in vitro* (Ishiguro, Shiratsuchi et al. 1993). Es una serina/treonina quinasa dirigida por prolina, esto quiere decir que para actuar, GSK3 necesita que el sustrato haya sido previamente fosforilado por otra quinasa. Esta primera fosforilación tiene lugar en una serina o treonina 4 aminoácidos hacia el extremo C-terminal del residuo que GSK3 fosforilará. Algunas de las quinasas que prefosforilan los sustratos son Cdk5, Par1, casein quinasa 1 y proteína quinasa A (Singh, Zaidi et al. 1995; Sengupta, Wu et

al. 1997; Amit, Hatzubai et al. 2002). La resolución cristalográfica de la estructura de GSK3 muestra que la interacción con su sustrato previamente fosforilado, tiene lugar por el reconocimiento de éste en un bolsillo de unión cargado positivamente (Dajani, Fraser et al. 2001; ter Haar, Coll et al. 2001).

GSK3 está implicada en la transducción de señales de la vía del factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1). Además, también participa en la vía de señalización de wnt/wingless regulando la estabilidad de β -catenina, permitiendo su translocación al núcleo y, por tanto, permitiendo o no que ejerza su actividad como factor de transcripción.

GSK3 participa en la regulación de numerosos procesos celulares como son el desarrollo embrionario, la proliferación y ciclo celular, diferenciación celular, adhesión celular, metabolismo de la glucosa, apoptosis, etc. (Cohen and Frame 2001; Frame and Cohen 2001; Jope and Johnson 2004), pero sobretodo juega un papel central en el control de múltiples procesos en el desarrollo del sistema nervioso. Algunos de estos procesos del neurodesarrollo en los que GSK3 tiene un papel fundamental son: la polarización neuronal, el crecimiento axonal, la migración neuronal, apoptosis, la neurotransmisión, el desarrollo y plasticidad sináptica y la neurogénesis (Hur and Zhou 2010). Este variado abanico de procesos en los cuales está involucrada, es debido al amplio rango de sustratos que tiene GSK3, la mayoría de los cuales juegan un importante papel en el desarrollo neural. Muchos de ellos son factores de transcripción, que tienen gran importancia en el neurodesarrollo controlando la expresión génica, como CREB, Nfat, SMAD1, c-Jun o β -catenina (Aberle, Bauer et al. 1997; Grimes and Jope 2001). Otros son proteínas de citoesqueleto como las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) (Zhou and Snider 2005), las cuales juegan un papel importante en la morfogénesis o citoarquitectura celular, controlando el uso mitótico durante la división celular, coordinando el movimiento durante la migración celular o direccionando el cono de crecimiento en el desarrollo y guía axonal.

2.1. Mecanismos de regulación de la actividad de GSK3

GSK3 tiene una actividad basal alta en la célula y es inactivada en respuesta a distintos estímulos. La regulación postraduccional de GSK3 es compleja y puede llevarse a cabo a distintos niveles, una de las más estudiadas es la fosforilación (Wang, Fiol et al. 1994). Para ser activa la quinasa necesita estar fosforilada en la tirosina 216 en el caso de GSK3 β o en la 276 en el caso de GSK3 α (Hughes, Nikolakaki et al. 1993). En mamíferos la quinasa Fyn junto a otras, parecen ser las encargadas de llevar a cabo esta fosforilación (Lesort, Jope et al. 1999). Además, esta fosforilación activadora parece que puede llevarla a cabo la propia GSK3 mediante autofosforilación (Cole, Frame et al. 2004; Lochhead, Kinstrie et al. 2006). Los estudios estructurales proponen que la presencia de la tirosina 216/276 sin fosforilar impediría el acceso del sustrato. Esto viene apoyado por la cristalización de GSK3 β en su forma fosforilada (Bax, Carter et al. 2001), que demuestra que la fosforilación en dicho residuo produce un cambio conformacional que permite la unión del sustrato pre-fosforilado al sitio activo de GSK3.

La fosforilación también puede actuar inhibiendo la enzima, como es el caso de la fosforilación de la serina 9 en la isoforma β o la 21 en la α . De nuevo el modelo propuesto gracias a los modelos estructurales, sugieren que la serina fosforilada se une a modo de pseudosustrato al sitio catalítico inhibiendo así la acción de GSK3 al impedir la unión del sustrato prefosforilado. Un ejemplo que desencadena este mecanismo de inhibición, sería la respuesta de la célula a insulina y factores de crecimiento, donde se produce la activación de receptores que activan la ruta PI3K. Esto conlleva la inhibición de GSK3 debido a su fosforilación, mediada principalmente por las quinasas PKB y Akt (Cross, Alessi et al. 1995).

La función de GSK3 también se puede regular mediante la formación de complejos con otras proteínas. Algunos ejemplos de la inhibición de GSK3 por formación de complejos sería la vía de transducción de Wnt. En ausencia de activación de vía Wnt, GSK3 forma un complejo multiproteico con las proteínas Axina y APC (*adenomatous polyposis coli*) el cual es capaz de fosforilar β -catenina y marcarla para su degradación por el proteosoma (Aberle, Bauer et al. 1997). La estimulación por las

proteínas Wnt del receptor Frizzled, activa la proteína Dishevelled (Dvl) que lleva al reclutamiento de GSK3 a la membrana junto con el co-receptor de Wnt, LRP5/6. Este secuestro, impide que GSK3 pueda actuar sobre su sustrato β -catenina, que ya no es degradada, acumulándose y translocándose al núcleo, pudiendo ejercer su papel como factor de transcripción (Piao, Lee et al. 2008; Wu, Huang et al. 2009). Otro ejemplo sería la acción de disrupted in schizophrenia 1 (DISC1) el cual, mediante la interacción física con GSK3, evitaría la fosforilación de β -catenina y su degradación (Mao, Ge et al. 2009).

GSK3 también puede ser regulada por truncación. Este mecanismo consiste en la proteólisis de GSK3 por calpaína. Calpaína es una proteína de la familia de las cisteína proteasas intracelulares activadas por calcio, que cataliza cortes proteolíticos de un gran número de proteínas celulares (Goll, Thompson et al. 2003). De manera basal se encuentra en la célula de forma inactiva y unida a su inhibidor endógeno, la calpastatina. Tras un estímulo como puede ser el glutamato, vía receptores ionotrópicos tipo NMDA, se produce la entrada de calcio al interior celular. En respuesta a esta señal de calcio, se activa por un corte autoproteolítico de su extremo amino, obteniéndose la activación de calpaína que, entre otras proteínas, trunca el extremo amino de GSK3. Esta truncación es específica, ya que no tiene lugar si se utiliza calpeptina, un inhibidor de calpaína. La liberación del extremo amino, elimina el residuo donde tiene lugar la fosforilación inhibitoria, dando lugar a una forma de GSK3 que se podría considerar constitutivamente activa (Goni-Oliver, Lucas et al. 2007).

2.2. GSK3 y enfermedades neurológicas

Una alteración en el metabolismo de GSK3 parece estar relacionado con numerosas enfermedades psiquiátricas y neurodegenerativas. Algunos ejemplos son autismo, retraso mental, desorden bipolar, esquizofrenia o EA. Así, en el caso de desórdenes relacionados con autismo, los estudios de asociación y *arrays* han encontrado que los genes asociados codifican para proteínas afectadas o moduladas por GSK3, como PTEN, FMR1 (*Fragile X mental retardation 1*), TSC1 y 2, Reelina y APC (Kwon, Luikart et al. 2006; Zhou, Giacobini et al. 2007; Abrahams and Geschwind 2008; Beaulieu, Zhang et al. 2008). En el caso de la esquizofrenia, algunos

genes que se han asociado con ella codifican para proteínas implicadas en la señalización de GSK3, como DISC1, neuroregulina 1 y frizzled 3 (Lovestone, Killick et al. 2007). Estas evidencias de susceptibilidad genética relacionadas con el desarrollo funcional y anatómico del sistema nervioso, junto a la hipótesis que sugiere que alteraciones en el correcto desarrollo del cerebro, donde GSK3 juega un papel crucial, podrían estar detrás de la etiología de estos tipos de enfermedades, ha hecho que GSK3 aparezca como una interesante diana terapéutica para diferentes fármacos psiquiátricos (Beaulieu 2007; Beaulieu, Gainetdinov et al. 2009; Medina and Avila 2010). De hecho, el litio, que es un inhibidor de GSK3, se administra a pacientes desde hace muchos años para tratar alteraciones en el estado de ánimo de personas con desorden bipolar y se han visto mejoras en las funciones cognitivas tanto en pacientes como en modelos animales de neurodegeneración y de isquemia (Chiu and Chuang 2010).

2.3. GSK3 y enfermedades de Alzheimer

En el caso de la EA, GSK3 también está implicada y se ha propuesto como un elemento central de convergencia entre las distintas características patológicas de la enfermedad, pudiendo jugar un importante papel en su etiología. Las dos marcas histopatológicas características de la EA son los ovillos neurofibrilares compuestos por filamentos helicoidales apareados (PHFs) y las placas seniles (Alzheimer 1911). Los primeros son agregados intracelulares, que están constituidos por la proteína de unión a microtúbulos tau en su forma hiperfosforilada (Grundke-Iqbal, Iqbal et al. 1986; Grundke-Iqbal, Iqbal et al. 1986). Por el contrario, las placas seniles, son agregados extracelulares y están compuestos por el péptido β -amiloide, que procede del corte de una proteína mayor llamada proteína precursora amiloide (APP) (Glennner, Wong et al. 1984; Masters, Simms et al. 1985).

GSK3 es la quinasa que más residuos fosforila en la proteína tau, aumentando su propensión a agregar en los ovillos neurofibrilares. Dichos residuos aparecen hiperfosforilados en los PHFs (Hernandez, Lucas et al. 2003) tanto en células transfectadas (Lovestone, Reynolds et al. 1994; Morishima-Kawashima, Hasegawa et al. 1995) como *in vivo* (Hong, Chen et al. 1997; Munoz-Montano, Moreno et al. 1997). Por otro lado, los niveles de GSK3 en cerebros de pacientes de la enfermedad se

encuentran incrementados y se acumula en el citoplasma de neuronas con pre-ovillos y en los ovillos neurofibrilares (Imahori and Uchida 1997; Pei, Braak et al. 1999).

En cuanto a las placas seniles, se ha descrito que APP es sustrato de GSK3 (Aplin, Gibb et al. 1996) y, además, la producción de péptido A β también es regulada por GSK3 (Sun, Sato et al. 2002; Phiel, Wilson et al. 2003; Sereno, Coma et al. 2009). El péptido A β , en su forma oligomérica, puede interferir con las vías de señalización de la insulina y Wnt al unirse a sus receptores (Takashima, Murayama et al. 1998; Townsend, Mehta et al. 2007; Magdesian, Carvalho et al. 2008), esto impide la activación de las quinasas efectoras de la vía como PI3K y, por consiguiente, Akt que no fosforilará a GSK3 provocando un incremento de la actividad. Por otro lado, mutaciones de PS1 pueden afectar su interacción con la subunidad reguladora de PI3K disminuyendo su actividad, y en consecuencia, la activación de GSK3 (Baki, Shioi et al. 2004). En cuanto a factores genéticos de riesgo en los casos esporádicos de la enfermedad, también tienen una estrecha relación con GSK3. Por ejemplo, ApoE pueden inhibir la vía de Wnt al interferir con LRP5/6, el correceptor de Wnt, afectando la actividad de GSK3 (Tamai, Semenov et al. 2000; Caruso, Motolese et al. 2006; Cselenyi, Jernigan et al. 2008; Bryja, Andersson et al. 2009). Además, también se ha visto que ApoE4 tiene un efecto mayor activando GSK3 que otras isoformas de ApoE (Cedazo-Minguez, Popescu et al. 2003). Al mismo tiempo, ApoE está implicada en la degradación de péptido A β y la isoforma de riesgo ApoE4 haría menos efectivo este proceso (Yang, Small et al. 1999; Jiang, Lee et al. 2008). Por otro lado, variaciones genéticas de LRP5/6 (De Ferrari, Papassotiropoulos et al. 2007), al igual que polimorfismos en GSK3, (Schaffer, Bertram et al. 2008) se han asociado con la enfermedad.

El estrés oxidativo también se ha propuesto que podría estar participando en el desencadenamiento de la enfermedad de Alzheimer (Nunomura, Perry et al. 2001; Ohsawa, Nishimaki et al. 2008). GSK3 estaría relacionada con esta hipótesis ya que un aumento de su actividad inhibe la respuesta antioxidante celular, al fosforilar el factor de transcripción Nfr2 (Martin, Rojo et al. 2004). Además, la fosforilación de GSK3 por la quinasa p38, se puede activar en respuesta al estrés oxidativo regulando la actividad de GSK3 (Thornton, Pedraza-Alva et al. 2008). Sin embargo, el mayor factor

de riesgo en los casos esporádicos es la edad y también se han visto cambios en la inmunorreactividad de GSK3 en ratas de avanzada edad (Lee, Chung et al. 2006). Otro indicio más es la disminución de la expresión de reelina en la corteza entorrinal (donde comienza EA) y el hipocampo con la edad (Chin, Massaro et al. 2007; Knuesel, Nyffeler et al. 2009). La señalización por reelina disminuye la actividad de GSK3, con lo cual este descenso asociado a la edad podría, de nuevo, estar produciendo un aumento de la activación de GSK3 (Beffert, Morfini et al. 2002).

Por todo lo mencionado anteriormente, GSK3 ha tomado importancia como elemento central que podría explicar la etiología de la EA. Para profundizar en el estudio de la implicación de GSK3 en la EA, se han generado diferentes modelos transgénicos que sobreexpresan la quinasa (Hernandez, Lim et al. 2002). En nuestro laboratorio hemos generado un modelo animal caracterizado por la sobreexpresión de la quinasa bajo el promotor de la CamKII que presenta tau hiperfosforilado y degeneración de GD (Lucas, Hernandez et al. 2001). Una posible causa de esta degeneración, podría ser el incorrecto funcionamiento del proceso de neurogénesis adulta, igual que se ha visto en paciente de la EA. La sobreexpresión de GSK3 β en neuronas maduras, dirigida por el promotor CamKII, produce la disminución y desorganización de los nichos neurogénicos, afectando la proliferación de los precursores y la maduración/migración de las nuevas neuronas inmaduras. Esto conlleva un aumento de la muerte celular que produce, como consecuencia, la activación microglial que a su vez afectará la neurogénesis. Todo esto se traduce en una reducción del volumen del GD (Sirerol-Piquer, Gomez-Ramos et al. 2011). Un análisis más exhaustivo demostró que se estaba produciendo también una alteración en el patrón temporal de expresión de DCX. Además, estas neuronas inmaduras positivas para DCX tenían alterada su maduración, localización, supervivencia y muerte. Se demostró también que algunos de estos efectos son reversibles. Tras el apagado de la expresión de GSK3 β , todas las alteraciones anteriores, junto con la microglia reactiva se revierten. Esta reversión no ocurre con el descenso en el número de neuronas granulares maduras y el número de células precursoras, que también se veía reducido (Fuster-Matanzo, Llorens-Martin et al. 2013). El estudio morfológico y de conectividad de las nuevas neuronas generadas en este ratón, mostró alteraciones en estos parámetros en comparación con los ratones control. De nuevo, estas diferencias en la morfología del árbol dendrítico y de las densidades

postsinápticas pueden revertirse tanto silenciando la expresión del transgen como con protocolos que favorecen la plasticidad hipocampal, como el enriquecimiento ambiental. Además se observaron grandes similitudes entre la morfología de las neuronas granulares de estos ratones y de pacientes con la enfermedad de Alzheimer (Llorens-Martin, Fuster-Matanzo et al. 2013).

2.4. GSK3 y neurogénesis

Las implicaciones que GSK3 puede tener sobre la neurogénesis adulta están tomando importancia en los últimos años. Resulta de gran interés conocer como la desregulación de la quinasa afecta este proceso y si esto estaría interviniendo en la patogénesis de dichas enfermedades. Además de los datos comentados anteriormente obtenidos por los estudios realizados en nuestro laboratorio, otros datos importantes han sido revelados a cerca de la implicación de GSK3 en neurogénesis.

El papel de GSK3 en neurogénesis adulta también se ha abordado con aproximaciones en sentido opuesto a la del modelo de ratón que sobreexpresa GSK3. Mediante la utilización de modelos genéticos se ha estudiado el efecto producido por la carencia de la quinasa. En esta dirección se ha generado un modelo por delección de GSK3 en precursores neurales, los cuales no presentarán la expresión de la quinasa (Woo-Yang K). En este modelo la ausencia de ambas isoformas de GSK3 en células nestina positiva, produce un aumento del tamaño cerebral debido al incremento de la proliferación de los precursores neurales. En concordancia con estos resultados, la expresión en otro modelo de una forma de la quinasa constitutivamente activa de manera ubicua, se traduce en una disminución de la proliferación de los precursores neurales (Woo-Yang K 2009).

Los efectos observados sobre la neurogénesis en estos trabajos, están ejercidos por ambas isoformas de la quinasa GSK3. La modificación de cualquiera de ellas de forma individual no produce alteraciones fenotípicas (Woo-Yang K).

GSK3 juega un importante papel en la biología de los precursores neurales, de manera que las alteraciones se traducen en defectos de proliferación y diferenciación de éstos. Esto se pone de manifiesto al afectar proteínas que influyen la regulación de

GSK3 y, por tanto, modifican su acción señalizadora. Así la molécula DISC1, implicada en esquizofrenia, inhibe a GSK3 mediante interacción proteína-proteína. Esta inhibición se traduce en una reducción de la proliferación de los precursores neurales y una mayor diferenciación (Mao Y).

Otro ejemplo es el de la proteína FMR1, cuya mutación produce el síndrome del X frágil. La función biológica de esta proteína es la regulación de la traducción de los mRNA, a los cuales se une. Uno de los que se ven regulados por ella es el de GSK3 β . Modelos por falta de la proteína demuestran que la deficiencia produce un aumento de la proliferación de los precursores. Además de la alteración en la proliferación, se producen defectos en la diferenciación, observándose un menor porcentaje de diferenciación en neuronas y un incremento del porcentaje de diferenciación en astrocitos (Luo Y 2010 *PLoS Genet*). La inhibición de GSK3 en ratón KO para FMR1, rescata la neurogénesis en SGZ y revierte los déficits en el aprendizaje dependiente de hipocampo (Guo W et al 2012 *Human Molecular Genetics*)

Las alteraciones observadas en todos estos casos, son debidas a nivel molecular a la falta de señalización de GSK3 en las vías en las que se encuentra implicada como Wnt, Shh, Notch y sobre c-Myc mediante la vía FGF/PI3K (Woo-Yang K) y a defectos en la señalización por factores tróficos como el VEGF (Woo-Yang K 2009). La vía canónica sobre la que ejerce su función GSK3, es la vía de Wnt. Así se ha visto que los efectos antes descritos, son debido a la acción de GSK3 sobre β -catenina. La actividad de GSK3 por falta de una correcta función de sus moléculas moduladoras, producirá un fosforilación de la β -catenina para que sea degradada. La β -catenina no se translocará al núcleo regulando la expresión génica que produce la reducción de la proliferación de las células precursoras.

OBJETIVOS

En esta tesis doctoral nos propusimos analizar, en un modelo de ratón transgénico, el efecto que tiene sobreexpresar GSK3 β en precursores neurales en la neurogénesis adulta. El estudio se centrará en la región subgranular del giro dentado hipocampal, área implicada en el procesamiento de la memoria y en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer. Para este fin, nos propusimos los siguientes objetivos:

1. Generación y caracterización del ratón transgénico que sobreexpresa la quinasa GSK3 β en sus precursores neurales. Dicho modelo se generará al cruzar animales que expresan la proteína transactivadora tTA bajo el promotor GFAP con animales BiTetO-Gal/GSK-3 β . En primer lugar se comprobará del patrón de expresión del transgen y estudiará el fenotipo presentado por el modelo doble transgénico.
2. Estudiar, utilizando este modelo de ratón transgénico, las alteraciones en la neurogénesis adulta hipocampal derivadas de la sobreexpresión de GSK3 β . Esta caracterización abarcará aspectos relacionados con la neurogénesis adulta como son la proliferación, supervivencia, maduración, gliosis, morfología y conectividad de las nuevas neuronas.
3. Estudio del papel de la sobreexpresión de GSK3 β sobre la proliferación de los precursores neurales en cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

1.1. Reactivos

Los reactivos utilizados fueron: 5-yodo-2'-deoxiuridina (Yododeoxiuridina; IdU) y 5-cloro-2'-deoxiuridina (Clorodeoxiuridina; CldU) Sigma-Aldrich, (St. Louis, MO). Ácido okadaico (inhibidor de fosfatasa) se obtuvo de LC Laboratories. El cóctel de inhibidores de proteasas COMPLETE™ (Roche) contiene 1mM fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF), aprotinina 10 µg/ml, leupeptina 10 µg/ml y pepstatina 10 µg/ml. El Percoll se obtuvo GE Healthcare. EGF y FGF2 fue suministrado por PreproTech, Inc. El paraformaldehído (PFA) 16% se obtuvo de Electron Microscopy Science.

1.2. Anticuerpos

Los anticuerpos primarios utilizados en la inmunodetección de proteínas en *Western blot* (WB), inmunofluorescencia (IF) y en inmunohistoquímica (IHQ), se recogen en la [Tabla 1](#).

En los ensayos de WB, se utilizaron los siguientes anticuerpos secundarios conjugados con HRP (*horseradish peroxidase*; peroxidasa de rábano): anticuerpo de cabra anti-ratón y anticuerpo de cabra anti-conejo (DAKO), utilizados a una dilución 1:5000.

En los estudios inmunohistoquímicos se empleó el anticuerpo secundario de caballo anti-ratón, conjugado con biotina, en una dilución 1:200 (Vectastin Elite ABC Kit, Vector Laboratories).

En los ensayos de inmunofluorescencia, se utilizaron los siguientes anticuerpos secundarios conjugados: anti-ratón, anti-conejo, anti-rata y anti-cabra Alexa 488/555/633/647, a una dilución 1/1000 (Invitrogen) y todos producidos en burro. Para el marcaje de núcleos, se utilizó el marcador de ácidos nucleicos 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI)

Anticuerpo primario	Proteína/ Epítipo	Especie	Casa Comercial	Dilución IF/IHQ	Dilución WB
Anti- β -galactosidasa (β -Gal)	β -galactosidasa	Ratón	Promega	1:5000	1:5000
Anti-GFAP	Proteína ácida fibrilar glial	Conejo	Promega	1:500	1:500
Anti-Iba1	Molecular adaptadora de unión a calcio de microglía	Conejo	Wako Pure Chemical Industries	1:500	
Anti-Sox2	Factor de transcripción Sox2	Cabra	R&D Systems	1:500	
Anti-Myc	GSK3 β transgénica	Ratón	Roche	1:500	1:500
Anti-NeuN	Proteína de unión a ADN	Ratón	Millipore	1:1000	
Anti-BLBP	Proteína de unión a ácidos grasos	Conejo	Abcam	1:400	
Anti-IdU	5-yodo-2'deoxiuridina	Ratón	BD Bioscience	1:500	
Anti-BrdU/CldU	5-bromo/cloro-2'deoxiuridina	Rata	Accurate Chemical & Scientific Corp	1:400	
Anti-fractina	Fragmento escindido de actina	Conejo	BD Pharmingen	1:500	
Anti-Doblecortina	Extremo C-terminal de DCX	Cabra	Santa Cruz	1:500	
Anti-PHisH3	Fosfo-histona H3 (Serina 10)	Conejo	Millipore	1:250	
Anti-calbindina	Proteína de unión a calcio	Conejo	Swant	1:500	
Anti-Nestina	Filamento intermedio	Ratón	BD Bioscience	1:200	
Anti-GFP	Proteína verde fluorescente	Conejo	Life Technologies	1:1000	
Anti-Glucógeno sintasa	Proteína sintetizadora de glucógeno	Conejo	Cell Signaling		1:1000
Anti-P-Glucógeno sintasa	Proteína sintetizadora de glucógeno fosforilada	Conejo	Cell Signaling		1:1000
Anti- β -actina	Proteína de citoesqueleto	Ratón			1:5000

Tabla 1. Anticuerpos utilizados y diluciones empleadas en WB e IF/IHQ

1.3. Animales

Los animales empleados en este estudio, fueron criados en el animalario del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CBMSO). Se estabularon de 4 a 5 animales por jaula, con comida y agua disponible *ad libitum*. Se mantuvieron en un ambiente con temperatura controlada y ciclos de luz/oscuridad de 12/12 horas respectivamente, con el comienzo de la fase de luz a las 8:00 a.m. Todos los

procedimientos llevados a cabo con los animales fueron aprobados por la Comisión de Bioética del CBMSO (UAM-CSIC, Madrid, España).

Los estudios sobre neurogénesis adulta se llevaron a cabo con el modelo de ratón transgénico GFAP/OE GSK-3 β . La generación de dicho modelo doble transgénico se obtuvo del cruce de las líneas Bi-TetO β -Gal GSK-3 β (Lucas, Hernandez et al. 2001) y GFAP-tTA (Lin, Kemper et al. 2004), ambas con fondo genético similar (C57BL/6) (**Figura 1A**).

La primera es una línea transgénica homocigota para GSK3 β , portadora de un constructo con un promotor bidireccional (Bi-TetO). Éste codifica en dirección 5' la expresión de GSK3 β unida al epítipo *myc* en el extremo amino terminal, mientras que en dirección 3', codifica la expresión de la proteína β -galactosidasa (β -Gal) unido a una señal de localización nuclear (NLS). La proteína β -Gal será utilizada como reportero de la expresión del transgen. Este constructo es condicional e inducible ya que posee el promotor de respuesta al sistema *tet*. Para que esta construcción se transcriba es necesaria la unión del transactivador (tTa) a la secuencia operadora (**Figura 1B**). La otra línea transgénica (*Jackson Laboratory B6.Cg-Tg(GFAP-tTA)110Pop/J* n° 005964) es portadora del transgen que contiene el transactivador reprimible por tetraciclina, bajo el promotor de GFAP humano (Besnard, Brenner et al. 1991).

En los animales doble transgénicos resultantes del cruce de las dos líneas anteriores, la proteína tTa se unirá a la zona operadora (TetO) del promotor bidireccional, activando la expresión de los transgenes de GSK3 β y β -Gal. Esto ocurrirá, en aquellas células que expresen GFAP y que, por tanto, serán las que expresen la proteína tTa. Esta sobreexpresión es reprimible gracias a la administración de tetraciclina o análogos, pudiendo regular el patrón temporal de expresión del transgen. La presencia de este antibiótico produce el cambio de conformación del transactivador por la interacción de ambos, impidiendo su unión a la zona operadora y evitando, de este modo, la expresión del transgen (sistema tet-off) (**Figura 1B**).

Como ratones control del estudio, se utilizaron los descendientes silvestres (Wild type; Wt) procedentes del cruce de la línea heterocigota GFAP-tTa con la línea silvestre C57BL/6.

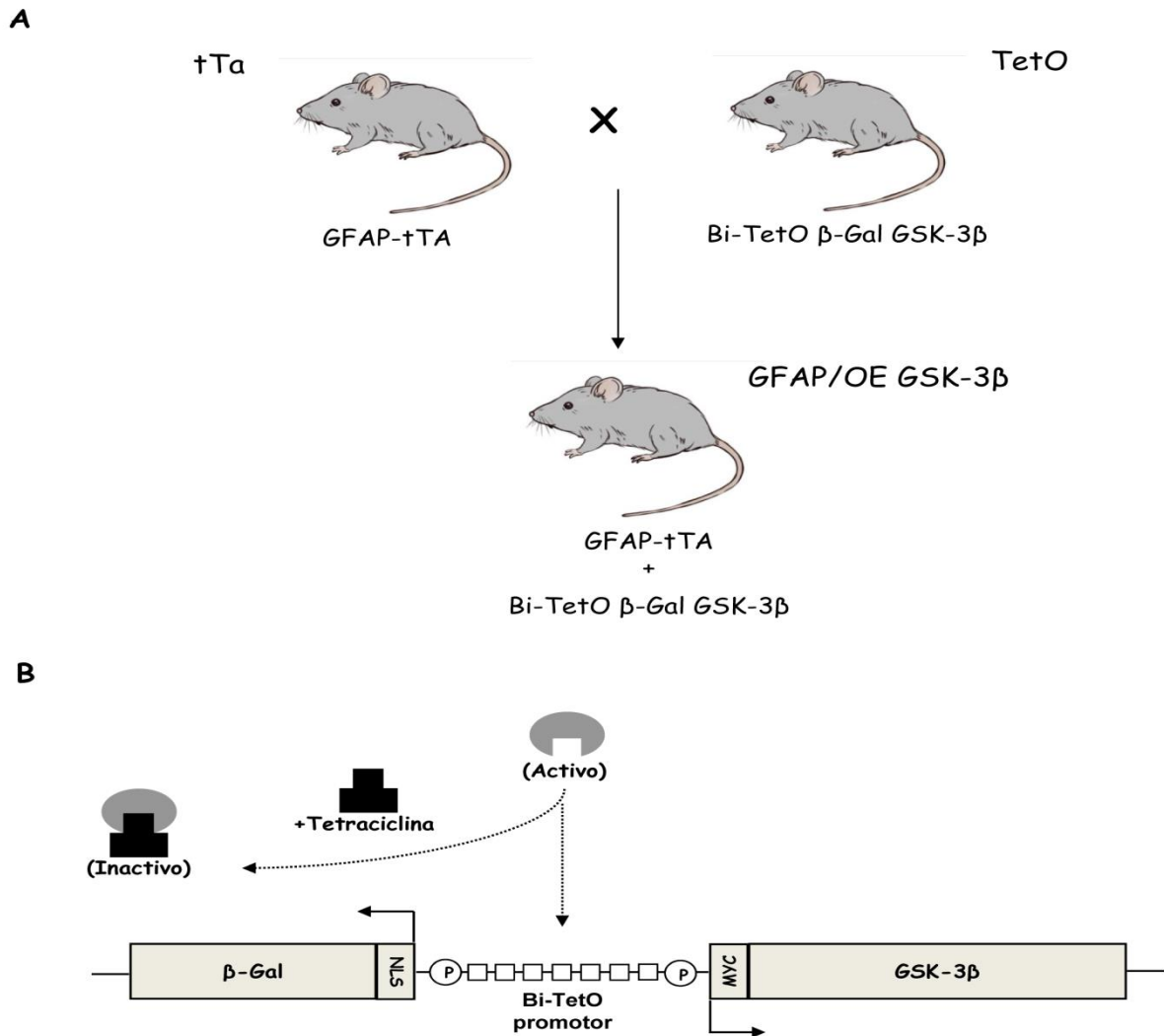


Figura 1. Representación esquemática del cruce para obtener el ratón GFAP/OE GSK-3 β y del transgen de GSK3 β . **A**, el ratón utilizado para los estudios de neurogénesis adulta se obtuvo del cruce entre la línea portadora del transgen de GSK3 β (Bi-TetO β -Gal GSK-3 β) y la línea que expresa el transactivador bajo el promotor de GFAP (GFAP-tTA). El ratón doble transgénico GFAP/OE GSK-3 β , sobreexpresará GSK3 β en aquellas células donde esté presente la proteína transactivadora (tTA) y que serán las que expresen el promotor GFAP. **B**, representación esquemática del constructo de GSK3 β que portan los ratones transgénicos. El transgen consta de un promotor bidireccional Bi-TetO, formado por 7 repeticiones de la secuencia palindrómica del operador del sistema Tet y flanqueado por la secuencia del promotor del citomegalovirus en orientaciones opuestas (P). La unión a la zona operadora del transactivador (tTA), activará el promotor y la transcripción de GSK3 β y de β -galactosidasa. Esta expresión es reprimible por la administración de tetraciclina o análogos como la doxiciclina. Estos antibióticos cambian la conformación del transactivador evitando su unión a la zona promotora.

1.4. Grupos experimentales

Para el estudio de las implicaciones de la sobreexpresión de GSK3 β sobre los precursores neurales, se utilizaron diferentes grupos de animales de edades comprendidas entre los 3 y 5 meses. En grupos de 3,5 meses se llevaron a cabo diferentes estudios de caracterización de las poblaciones neurogénicas. Para complementar estos datos, algunos de estos grupos experimentales fueron inyectados con análogos de timidina a distintos tiempos. Los grupos de inyecciones de análogos de timidina se inyectaron con 2 meses de edad con el primer análogo y se dejó transcurrir el tiempo deseado hasta la inyección del segundo análogo y el sacrificio. Los diferentes grupos experimentales, con sus respectivos tratamientos de análogos de timidina quedan recogidos en la [Imagen 3](#).

Los animales empleados para los análisis de los pesos tenían 7 y 15 meses de edad. Los grupos utilizados para los experimentos del *array* de citoquinas y de qPCR tenían 5 meses de edad. Los animales utilizados para los cultivos de neurosféricas tenían una edad comprendida entre 7-9 semanas.

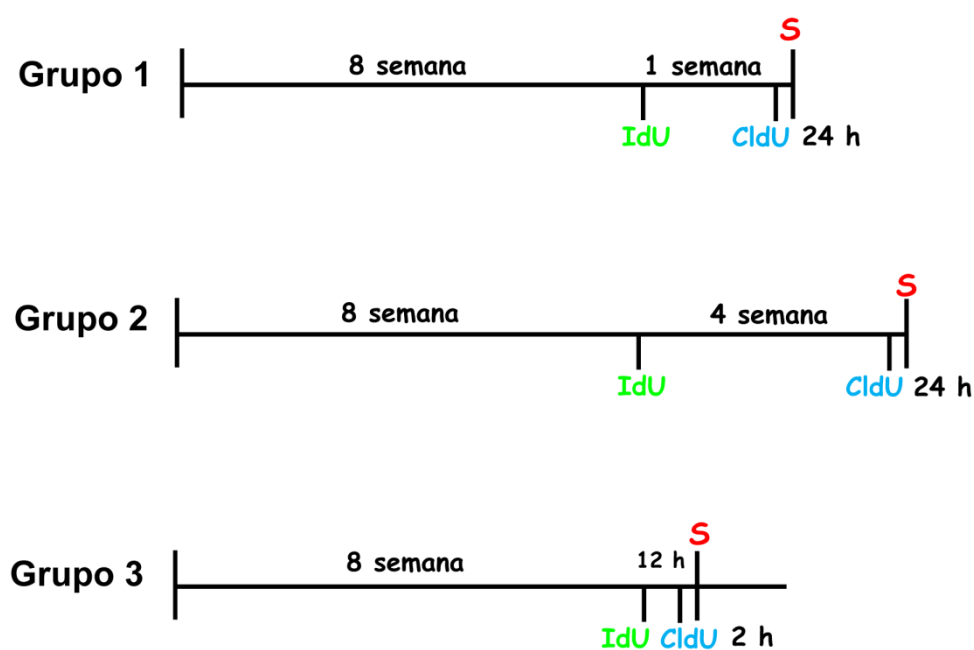


Imagen 3. Esquema representativo de los grupos de animales, tanto controles como transgénicos, utilizados para los tratamientos con análogos de timidina. En la figura se señalan los puntos temporales en los que fue inyectado cada análogo y el tiempo transcurrido hasta el momento de sacrificio (cruz roja).

2. Métodos

2.1. Técnicas bioquímicas

2.1.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para determinar el genotipo de los ratones se extrajo el DNA genómico de una pequeña porción de cola de los animales. El fragmento de tejido fue digerido en NaOH 50 mM a 100°C y 1400 revoluciones por minuto (rpm) durante 30 minutos. La digestión fue neutralizada añadiendo un décimo del volumen de la digestión de Tris-HCl 1M, pH 8. Separamos los restos no digeridos mediante centrifugación a 14000 rpm durante 10 minutos. El DNA presente en el sobrenadante se utilizó para poder realizar la reacción en cadena de la polimerasa (Mullis and Faloona 1987), utilizándose los oligonucleótidos indicados en la [Tabla 2](#).

Para el genotipado de la línea Bi-TetO β -Gal GSK-3 β , la PCR se llevó a cabo en un medio que contenía el tampón de la Taq DNA polimerasa (5X), mezcla de desoxirribonucleótidos (dNTP) 0,25 mM, MgCl₂ 1,5 mM, oligo sentido 0,5 mM, oligo antisentido 0,5 mM, 2 μ l de DNA y 1,25 U de Taq polimerasa (Promega), en un volumen final de 50 μ l.

El protocolo de amplificación para estos oligos constó de 30 ciclos, cada uno de los cuales consistió en 40 segundos a 94°C, seguido de 40 segundos a 58°C y 90 segundos a 72°C. La amplificación da lugar a un fragmento de 650 pb, que se verificó por electroforesis en geles de agarosa al 1% conteniendo SYBR Safe (Invitrogen) para teñir y visualizar el DNA.

En cuanto al genotipado de la línea GFAP-tTa, la PCR se llevó a cabo en un medio que contenía el tampón de la Taq DNA polimerasa (5X), dNTP 0,2 mM, MgCl₂ 4 mM, oligo sentido 0,5 mM, oligo antisentido 0,5 mM, 1 μ l de DNA y 0,5 U de Taq polimerasa (Promega), en un volumen final de 50 μ l.

El protocolo de amplificación para estos oligos, constó de 35 ciclos cada uno de los cuales consistió en 30 segundos a 94°C, seguido de 60 segundos a 57°C y 60 segundos a 72°C. La amplificación da lugar a un fragmento de 450 pb, que se verificó por electroforesis en geles de agarosa al 1% conteniendo SYBR Safe (Invitrogen).

Transgen	Oligonucleótidos Genotipado	
	Sentido	Antisentido
Bi-TetO β -Gal GSK-3 β	CATGGTCAGGTCATGGATGAGC	TAATCAGCCACTGATCCACCCAG
GFAP-tTa	CGCTGTGGGGCATTTTACTTTAG	CATGTCCAGATCGAAATCGTC

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para el genotipado de las dos líneas transgénicas utilizadas en este trabajo.

2.1.2. Preparación de extractos proteicos

Los animales empleados fueron sacrificados mediante el uso de una cámara de CO₂. Se diseccionaron para extraer el cerebro y dividir éste a su vez en las estructuras deseadas, habitualmente corteza, hipocampo y cerebelo. Para preparar los extractos de proteína totales, se extrajo el tejido cerebral fresco y se homogeneizó utilizando un potter vidrio-vidrio. El extracto se hizo en buffer de homogeneización Ripa cuya composición es Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NP-40 1%, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, deoxicolato de sodio 0,25%, inhibidores de fosfatasas (NaF 1 mM, Na₃VO₄ 1 mM y ácido okadaico 1 μ M) y el cóctel de inhibidores de proteasas COMPLETE™ (Roche). Posteriormente, la concentración proteica de cada uno de los homogeneizados se determinó por duplicado mediante el método de Bradford (Bradford 1976), utilizando BSA como patrón. A los extractos proteicos totales se les añadió tampón de ruptura (Tris 250 mM pH 6,8, SDS 4%, glicerol 10%, β -mercaptoetanol 2% y azul de bromofenol 0,0006%) y se conservaron congelados a -20°C.

2.1.3. Electroforesis, electrotransferencia e inmunodetección (*Western Blot*)

Los extractos proteicos se descongelaron e hirvieron a 100°C durante 5 minutos y, a continuación, se les dió un pulso de centrifugación. De cada extracto se cargaron 20 μ g de proteína por pocillo. Las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida (acrilamida/bisacrilamida) al 10% en presencia de SDS a voltaje constante durante alrededor de 2 horas. Posteriormente, las proteínas se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell, Keene, NH) a un amperaje constante de 150 mA durante 1 hora, utilizando el sistema Mini-Protean de Bio-Rad. Para comprobar la eficiencia del proceso de transferencia, las membranas se tiñeron con Rojo Ponceau.

Tras la comprobación, se retiró el colorante mediante lavados con PBS-0,1%

Tween-20 (v/v). A continuación, se bloquearon las membranas utilizando leche en polvo 5% (p/v) en PBS-0,1% Tween-20 (v/v) durante 30-45 minutos en agitación. El siguiente paso fue la incubación con los anticuerpos primarios diluidos en medio de bloqueo a 4°C durante toda la noche y en agitación. Posteriormente, las membranas fueron lavadas 2 veces durante 10 minutos con PBS-0,1% Tween-20 (v/v). Para la inmunodetección, las membranas se incubaron durante 45 minutos con anticuerpos secundarios, conjugados con HRP, diluidos en medio de bloqueo (1/5000). Por último, se lavaron utilizando PBS-0,1% Tween-20 (v/v) 4 veces durante 10 minutos cada una. Las proteínas inmunoreactivas fueron visualizadas utilizando el sistema ECL (Enhanced Chemiluminescence Detection System) de Amersham.

2.1.4. PCR cuantitativa (qRT-PCR)

Los animales utilizados para estos experimentos fueron sacrificados mediante el uso de una cámara de CO₂. Se diseccionaron para extraer el cerebro y rápidamente se pusieron sobre hielo. Se extrajeron, lo más rápidamente posible, las diferentes estructuras cerebrales que fueron instantáneamente ultracongeladas por baño en nitrógeno líquido y conservadas a -80°C. La extracción de RNA se realizó utilizando QIAzol Lysis Reagent de Qiagen y el kit RNeasy Mini kit de Qiagen. Las muestras se homogenizaron en el TissueLyser II (85300) con Stainless Steel Beads, 5mm. La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo con el kit de Applied “High capacity RNA-to-cDNA Master Mix”, en la que la concentración final fue de 20ng de RNA/ul de reacción. Tanto la extracción del RNA, el diseño de oligonucleótidos y el experimento de qRT-PCR fueron llevados a cabo por el servicio de genómica del SIdI (Parque Científico de la Universidad Autónoma de Madrid).

La reacción de 10 µl contenía 5 ng de molde (DNA complementario al RNA aislado o cDNA), 100nM de sondas UPL, 250 nM de cebadores y LightCycler 480 Probes Master (2x) de Roche. Los niveles de expresión de cada gen analizado fueron normalizados respecto a los del gen 18S ribosomal murino que fue usado como control. Además, se llevó a cabo un control negativo de la reacción en ausencia de molde (H₂O en lugar de cDNA) y un control para comprobar la ausencia de DNA genómico en cada muestra (RT- en lugar de cDNA).

El protocolo de amplificación consistió en un paso de 10 minutos a 95°C, para activar la Taq polimerasa. A continuación, 50 ciclos de 15 segundos a 95°C y 60 segundos a 60°C (desnaturalización e hibridación-extensión). Tras la amplificación, se obtuvo la curva de disociación aumentando progresivamente la temperatura de 60°C hasta 95°C. La fluorescencia emitida se adquirió en cada fase de hibridación mediante el sistema de detección del modelo LightCycler 480 (Roche).

Para comprobar la especificidad de la reacción, se analizaron las curvas de disociación correspondientes para cada par de oligonucleótidos. La medida del valor del ciclo umbral (C_T : cycle threshold) de cada muestra para cada gen, realizada por triplicado, se normalizó con respecto al valor C_T del gen 18S para esa muestra, obteniéndose el valor ΔC_T . El valor C_T es inversamente proporcional a la cantidad inicial de cDNA en la muestra. El aumento de fluorescencia en cada ciclo es exponencial, por lo que, a la hora de representar los resultados obtenidos, el nivel de expresión (moléculas de cDNA iniciales) se calculó como $2^{-\Delta C_T}$ y se representó en forma de porcentajes, dando el valor 100% al nivel de expresión de cada gen en los ratones silvestres.

Gen	Proteína	Secuencias sondas UPL	
		Sentido	Antisentido
TNFα	TNF α	TCTTCTCATTCTGCTTGTGG	GGTCTGGGCCATAGAACTGA
Cxcl16	CXCL16	TGAACTAGTGGACTGCTTTGAGC	GCAAATGTTTTTGGTGGTGA
Cx3cl1	FRACTALKINA	CGCGTTCTTCCATTTGTGTA	CATGATTTTCGATTTTCGTCA
IL1β	IL1 β	AGTTGACGGACCCCAAAG	TTTGAAGCTGGATGCTCTCAT
IL3	IL3	TACATCTGCGAATGACTCTGC	GGCTGAGGTGGTCTAGAGGTT
IL4	IL4	GAGAGATCATCGGCATTTTGA	AGCCCTACAGACGAGCTCAC
IL10	IL10	CAGAGCCACATGCTCCTAGA	GTCCAGCTGGTCCTTTGTTT
VEGF	VEGF	GTACCTCCACCATGCCAAGT	TGGGACTTCTGCTCTCCTTC
BDNF	BDNF	AGTCTCCAGGACAGCAAAGC	TGCAACCGAAGTATGAAATAACC
DKK1	DKK1	CCGGGAACTACTGCAAAAAT	CCAAGGTTTTCAATGATGCTT
sFRP3	sFRP3	CACCGTCAATCTTTATACCACCT	TCAGCTATAGAGCCTTCTACCAAGA
Rn18s	ARN RIBOSÓMICO 18S	CGGCTACCACATCCAAGGAA	GCTGGAATTACCGCGGCT

Tabla 3. Secuencias de las sondas UPL utilizadas para los genes analizados mediante qRT-PCR.

2.1.5. Array de citoquinas

Para la realización del *array* de citoquinas usamos el *kit* comercial *Raybio Mouse Cytokine Antibody Array 3* (RayBiotech, Inc.). El experimento fue llevado a cabo, utilizando hipocampos de animales de 5 meses de edad, con un número total de 6 animales silvestres (Wt) y 6 animales transgénicos GFAP/OE GSK-3 β . Los hipocampos se homogeneizaron en tampón de lisis proporcionado en el *Kit*. Tras la extracción, las muestras fueron sometidas a un pulso de centrifugación, y se determinó la concentración total de proteínas mediante el método Bradford (Bradford 1976).

El experimento para cada genotipo se realizó en unas membranas independientes proporcionadas por el *kit* y siempre llevadas en paralelo. Para cada membrana se utilizaron 250 μ g de proteínas. Esta cantidad procedió de cantidades iguales de proteína de cada uno de los 6 animales que formaban cada grupo (41,67 μ g por animal), para tener una muestra representativa. La muestra fue llevada a un volumen final de 1 ml, utilizando para la dilución tampón de bloqueo 1X.

Una vez preparadas las muestras, se llevó a cabo el *array* siguiendo el protocolo del fabricante. Brevemente, el primer paso fue el bloqueo de las membranas durante 30 minutos y en agitación con tampón de bloqueo 1X. Acto seguido, se retiró el bloqueo y se incubó cada membrana con la muestra, durante toda la noche a 4°C y en agitación. Al día siguiente, se lavaron las membranas con tampón de lavado I tres veces, 5 minutos cada una. A continuación, 2 lavados más de 5 minutos cada uno con tampón de lavado II. Todos los lavados se realizaron a temperatura ambiente y en agitación. El siguiente paso consistió en la incubación con la mezcla de anticuerpo secundario proporcionada por el *kit*. Este anticuerpo está conjugado con biotina, y reconoce las 62 citoquinas diferente de que consta el *kit*. Nuevamente se hicieron los lavados del mismo modo indicado anteriormente y se continuó con la incubación de las membranas con estreptavidina conjugada con peroxidasa (HRP) durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, se repitieron los lavados como en los pasos anteriores y se pasó a incubar las membranas 2 minutos con la solución de revelado suministrada en el *kit*. Se reveló la membrana utilizando el sistema ImageQuant LAS 4000 Mini (GE) y se densitómetró el valor de cada citoquina mediante el uso del programa ImageJ. Los valores obtenidos para cada una, fueron corregidos por los valores de los controles internos presentes en

cada una de las membranas, para luego comparar los niveles de cada citoquina entre cada genotipo.

Algunas de las citoquinas analizadas en el *array* y que mostraban diferencias, fueron validadas mediante experimentos de PCR cuantitativa tal y como se describe en el apartado 2.1.4.

2.1.6. Determinación de los niveles de glucógeno

Para realizar esta cuantificación utilizamos cortezas cerebrales de animales de 5 meses de edad. Los extractos de corteza cerebral se realizaron 1:10 (p/v) en HClO₄ al 2% y se mantuvieron en agitación durante 24 h a 4°C. Al día siguiente se centrifugaron 10 min a 10.000 rpm a 4°C, el sobrenadante se utilizó para la determinación de glucógeno. Se añadió primero una gota de indicador de pH y se neutralizó con KOH al 5%. El glucógeno se determina midiendo la cantidad de glucosa total obtenida después de una hidrólisis con amiloglucosidasa que degrada totalmente el glucógeno hasta convertirlo en glucosa. Por último, la glucosa se oxida a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno por la glucosa oxidasa. El peróxido de hidrógeno reacciona con o-dianisidina en presencia de peroxidasa para formar un producto coloreado que en presencia de ácido sulfúrico forma un producto coloreado más estable. La intensidad del color rosa medido a 540 nm es proporcional a la concentración original de glucosa. Para el ensayo se utilizó el Kit comercial de SIGMA (GLUCOSE (GO) ASSAY KIT Product Number GAGO-20). La cuantificación de glucógeno se expresa sustrayendo a la cantidad total de glucosa medida tras la acción de la amiloglucosidas, la glucosa hepática libre determinada antes de tratar con amiloglucosidasa.

2.2. Técnicas histológicas

2.2.1. Preparación de las muestras de tejido

Los ratones fueron anestesiados por inyección intraperitoneal de pentobarbital. Seguidamente fueron perfundidos transcárdialmente, lavando primero con 50 ml de

buffer salino (NaCl 0,9%) y, a continuación, fijando con 50 ml de paraformaldehído (PFA) al 4%. Seguidamente se extrajo el cerebro y fue partido por la mitad separando ambos hemisferios. Los hemisferios fueron post-fijado en PFA 4%, durante toda la noche. Al día siguiente, a los cerebros se les hizo 3 lavados, con tampón fosfato (PB) 0,1N (14 g. de K_2HPO_4 y 2,65 g. de NaH_2PO_4), de 20 minutos cada uno. Posteriormente, fueron incluidos en una mezcla de sacarosa 10% y agarosa al 4%. Los bloques de cerebro incluidos se tallaron quitando el exceso de medio de inclusión y se cortaron en secciones sagitales de 50 μ m de grosor en un vibratomo VT1200S (Leica). Las secciones de cerebro se hicieron seriadas, formando series que contienen 1 corte cada 8, y se conservaron en PB 0,1N a 4°C. Las series no utilizadas en un plazo corto de tiempo fueron preservadas a -20°C inmersas en glicol, una solución crioprotectora compuesta por etilenglicol 30%, glicerol 30% y 10% de tampón fosfato 0,1M pH 7.

2.2.2. Inmunohistoquímica

Las secciones en solución crioprotectora se lavaron durante 5 minutos en PBS 1X. A continuación, se incubaron con H_2O_2 al 1% en PBS 1X durante 45 minutos para inactivar la peroxidasa endógena del tejido. Seguidamente, se lavaron 2 veces durante 10 minutos con PBS 1X y se incubaron durante al menos una hora en solución de bloqueo compuesta de BSA al 1%, suero bovino fetal (FBS) al 5% y Triton X-100 1/10 en PBS al 2%. Una vez bloqueadas las secciones, fueron incubadas con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C y en agitación. Los siguientes pasos de reconocimiento del anticuerpo primario y amplificación de la señal se llevaron a cabo usando el *kit* comercial Elite Vectastin (Vector Laboratorios, Burlingame, CA). Al día siguiente las secciones se lavaron 3 veces, de 10 minutos cada una, con PBS 1X y se incubaron con anticuerpo secundario biotilado durante 1 hora. De nuevo, se realizaron 3 lavados con PBS 1X, de 10 minutos cada uno y se incubaron con el complejo Avidina-peroxidasa (ABC) que reconoce las moléculas de biotina conjugadas con el anticuerpo secundario. Finalmente, se realizaron 2 lavados de 10 minutos con PBS 1X y se procedió al revelado. Para la reacción cromógena se incubaron las secciones en una solución de DAB (3,3'-diaminobencidina tetrahidroclorada; una tableta en 10 ml de PBS 1X y 10 μ l de H_2O_2 al 3%) durante 10

minutos. En presencia de H_2O_2 , el DAB se oxida por la reacción de la peroxidasa, generando un precipitado de color marrón allí donde se unió el anticuerpo. Para detener la reacción con DAB las secciones se traspasaron a agua destilada. Por último, las secciones se montaron en portaobjetos utilizando como medio de montaje FluoroSave Reagent (Calbiochem). Una vez seco el medio de montaje, se tomaron fotografías de las muestras en un microscopio vertical Axioskop2 plus (Zeiss) acoplado a una cámara Coolsnap FX color (Roper Scientific).

2.2.3. Medición del volumen del giro dentado y área total de SGZ

Los animales fueron perfundidos y los cerebros procesados tal y como se explica en el apartado 2.2.1. La tinción realizada para el marcaje nuclear fue la tinción de Nissl, que tiñe específicamente los ácidos nucleicos. Se utilizó una de las series de cortes de cada animal que fueron montadas sobre portaobjetos previamente gelatinizados. Se tuvieron alrededor de 10 días montadas y secando para conseguir una buena adherencia del corte. El protocolo realizado consistió en la tinción de las secciones incubándolas en una solución de azul de toluidina durante 8 minutos. Seguidamente, se traspasaron las secciones a un baño con agua destilada durante 10 minutos, para lavar el exceso de colorante. A continuación, se llevó a cabo la deshidratación progresiva de las secciones mediante inmersión en baños de etanol de graduación creciente. Se realizaron baños de 2 minutos en etanol 70%, 96%, 100% I, 100% II. Finalizados los baños de etanol creciente, los portaobjetos con los cortes teñidos fueron pasados a un baño de xileno. Por último, se montaron con medio hidrofóbico DePex (Serva Electrophoresis GmbH). Se tomaron fotografías de cada una de las secciones que conforman la serie, utilizando un objetivo 10x en un microscopio vertical Axioskop2 plus (Zeiss) acoplado a una cámara Coolsnap FX color (Roper Scientific).

La obtención del volumen del GD se llevó a cabo siguiendo el método de Cavalieri. Se midió el área del GD de cada sección delimitando el borde de la capa granular con ayuda del *software* ImageJ (ImageJ, v. 1.33, NIH, Bethesda, MD, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij>). El volumen del giro dentado se obtuvo de la suma de todas las áreas, multiplicado por la distancia entre dos secciones consecutivas de la serie (400 μ m, 50 μ m del grosor de cada sección multiplicado por 8 que es el número de secciones

entre 2 consecutivas).

En cuanto a la SGZ, el dato calculado es un área y no un volumen. La razón viene de la definición teórica de la SGZ, que es la línea comprendida entre los somas de las neuronas granulares y el hilus, y por tanto, esto es equivalente a un plano teórico carente de volumen. Es en este plano en el cual estarán dispuestos los precursores neuronales. Para calcular el área total de SGZ, se midió en cada sección de la serie teñida con Nissl, la longitud de la SGZ mediante el uso del *software* ImageJ. El área total de SGZ se obtuvo de la suma de todas las longitudes, multiplicado por la distancia entre dos secciones consecutivas de la serie.

2.2.4. Inmunofluorescencia de tejido

Las series de secciones fueron lavadas 1 minuto en PB 0,1N. A continuación, se traspasaron a la solución de bloqueo (BSA 1% y Triton-X-100 1% en PB 0,1N) conteniendo el anticuerpo primario, donde se incubaron durante 48 horas a 4°C y con agitación suave. En el siguiente paso, se efectuaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con la solución de bloqueo. Seguidamente se incubaron los cortes con los anticuerpos secundarios diluidos 1:1000 en la misma solución de bloqueo a 4°C durante toda la noche y con agitación. Después de la incubación con los anticuerpos secundarios, las secciones se lavaron con PB 0,1N 3 veces, 10 minutos cada vez. A continuación, se incubaron 10 minutos con DAPI (Merck) diluido 1:10.000 en PB 0,1N. Terminada la tinción de ácidos nucleicos, se volvieron a realizar 3 lavados de 10 minutos cada uno con PB 0,1N.

Un caso particular son las inmunofluorescencias para detectar análogos de timidina. En estos casos, se necesita un paso previo antes del bloqueo, que consiste en la incubación de las secciones con HCl 2N durante 30 minutos. Este paso se utiliza para provocar la apertura de la doble hélice del DNA, y permitir el reconocimiento del análogo incorporado. Tras el tratamiento con HCl, las secciones se lavaron 3 veces durante 20 minutos cada una. Finalizados los lavados, ya se prosigue con el protocolo como en cualquier otra inmunofluorescencia.

Por último, las secciones fueron montadas en portaobjetos utilizando como medio de montaje *Prolong Gold Antifade* (Invitrogen).

Una vez secas, se tomaron las imágenes en un microscopio de barrido laser confocal LSM710 acoplado a un microscopio vertical AxioImager.M2 (Zeiss).

2.2.5. Cuantificación de células

El conteo de células positivas para los marcadores DCX, BLBP, Iba-1 y DAPI fueron llevados a cabo mediante la técnica de disector físico, acoplado a microscopía confocal (Zeiss LSM710) como ha sido previamente descrito (Llorens-Martin, Torres-Aleman et al. 2006). Para ello se realizaron 6 *stacks* (3 para GD dorsal y 3 para GD ventral), escogidos de forma ciega y al azar en la serie de secciones, para cada uno de los animales analizados.

Para las células positivas para DCX y BLBP, los *stacks* se adquirieron con un objetivo 63x de inmersión, constando de 11 planos separados entre ellos por 1,7 μm (tamaño de *stack* en eje z de 18,7 μm) y de un tamaño de 103,81 μm en los ejes x e y . De cada *stack* se extrajo la densidad de células marcadas por unidad de línea subgranular. La densidad media (células/ mm^2) se multiplicó por la longitud de SGZ total, obteniendo así el valor total de células marcadas positivamente en todo el GD.

Para el marcaje con Iba-1 los *stacks* se adquirieron con un objetivo de inmersión 40x. Cada *stack* tenía un tamaño de 212,55 μm en los ejes x e y , y un tamaño en el eje z que abarcaba todo el grosor de la capa granular de la sección, con una separación entre planos de 1 μm . Se midió el área de todo el GD en cada uno de los *stacks*, con la ayuda del *software* ImageJ. Utilizando dicha área y el tamaño en z de cada *stack* se obtuvo la densidad de células marcadas (células/ mm^3). Finalmente, se obtuvo el dato total de células Iba-1 positivas en el GD, utilizando la densidad media y el volumen total para cada uno de los animales analizados.

Para el conteo del total de neuronas maduras (marcadas con DAPI) los *stacks* fueron tomados con un objetivo de inmersión 100x. Se contaron todas las neuronas maduras presentes descartando aquellas que eran inmaduras, fácilmente reconocibles por su contorno nuclear irregular y su alta condensación de la cromatina. También se hizo lo propio y se descartaron aquellas en proceso degenerativo o apoptótico. Los *stacks* constaban de 6 planos, separados entre ellos por una distancia de 2 μm , con un tamaño total en z de 12 μm y de 34 μm en los ejes x e y . Se obtuvo la densidad

(células/mm³) de células maduras por *stack*, y utilizando la densidad media y el volumen del GD de cada animal se obtuvo el número total de neuronas granulares maduras del GD.

La cuantificación de células marcadas con IdU, CldU, PHisH3 y fractina, se realizó siguiendo el método del disector óptico (Llorens-Martin and Trejo 2011). Brevemente, se contabilizaron todas las células positivas para cada uno de los marcadores, presentes dentro de una serie de secciones para cada animal analizado. Este recuento se realizó utilizando un microscopio de fluorescencia invertido Axiovert200 (Zeiss), utilizando un objetivo de inmersión 40x. El número total de células presentes se multiplicó por 8 (ya que se contó una serie de entre las 8 obtenidas del cerebro) para obtener el número total de células marcadas en el GD.

El estudio de colocalizaciones de IdU con DCX, Calretinina o NeuN (grupo de animales 2) y con CldU o DCX (grupo de animales 3), se hizo contando un número suficiente de células marcadas con el análogo de timidina (todas las células IdU+ con 4 semanas de edad, y 1000 células CldU+ por genotipo en el grupo de 12 horas) obtenidas de un grupo representativo de animales para cada grupo. Los datos se presentan como porcentaje de células IdU+ también positivas o no para el resto de marcadores.

2.2.6. Inyección estereotáxica de retrovirus

Los animales operados, fueron anestesiados utilizando la aplicación inhalatoria de isoflurano mezclado con oxígeno. Fueron colocados en un estereotáxico (Stoelting), donde se continuó con la aplicación de anestesia durante toda la operación y con la precaución de tener el cráneo del animal siempre plano. Utilizando un bisturí estéril, se realizó una escisión en la piel de la cabeza para dejar accesible el cráneo. Utilizando un bastoncillo de algodón, se aplicó H₂O₂ para desinfectar la zona y visualizar más fácilmente la unión de los huesos craneales y el punto Bregma. Con ayuda de agujas de punta roma, se realizó una perforación en cada hemisferio en el lugar de la inyección. El lugar de la inyección fue el GD, localizándolo con las coordenadas (mm) -2 en el plano anteroposterior, -1,4 en el plano mediolateral y -2,2 en el plano dorsoventral, tomando Bregma como punto de referencia (0,0,0).

Con la ayuda de un puller, se construyeron micropipetas de vidrio con 1,65/1,1 mm diámetro externo/interno (World Precision Instruments). La micropipeta de vidrio se conectó a través de tubing 1,09/0,38 mm diámetro externo/interno (Stoelting) a una jeringa Hamilton. Se inyectó un volumen de 2µl de retrovirus en cada hemisferio. La inyección se realizó a una velocidad constante y un flujo de 0,2µl/min mediante el empleo de una bomba de inyección de precisión (Stoelting). Una vez finalizada la inyección en cada hemisferio, se esperaron unos minutos antes de comenzar la extracción de la micropipeta para evitar el reflujo. La extracción se realizó muy lentamente tardando alrededor de 5 minutos. Una vez inyectados los dos hemisferios, los animales fueron suturados utilizando grapas de 7mm Reflex (Stoelting). Finalizada la operación, se les mantuvo aislados hasta despertar de la anestesia (15 min aprox.) antes de devolverlos con sus compañeros.

2.2.6.1 Producción de los retrovirus

Utilizamos dos tipos de virus distintos que difieren en los genes que codifican. El retrovirus CAG-GFP que codifica para GFP (Zhao, Teng et al. 2006) y el retrovirus PSD95:GFP codifica para la proteína GFP fusionada con PSD95 (Kelsch, Lin et al. 2008). Este último permite la visualización de las estructuras postsinápticas, como resultado de la expresión de la proteína PSD95:GFP. La producción de los virus se llevó a cabo transfectando células 293T en placas P100 con 5µg del plásmido a empaquetar, utilizando Lipofectamine and Lipofectamine Plus Reagent (Invitrogen). A las 24 horas, se les cambió el medio (DMEM 10%) añadiendo 5 ml de medio fresco. Tras 24 horas, se filtró el medio con un filtro de 0,45 µm de diámetro de poro. A continuación, se concentraron las partículas víricas, centrifugando a 26000 rpm en vacío y un rotor flotante, durante 2 horas a 4°C. Por último, se resuspendió el pellet en PBS 1X y se tituló. Los virus producidos tuvieron un título entre 10^6 y 10^7 . Hasta su utilización se conservaron a -80°C.

2.2.7. Cuantificación de parámetros morfométricos

Los animales inyectados se mantuvieron durante 2 semanas antes de su sacrificio

para estudios morfológicos del árbol dendrítico u 8 semanas para estudios morfológicos del árbol dendrítico y espinas sinápticas. Los animales fueron perfundidos y procesados tal y como se explicó anteriormente en el apartado 2.2.1. Se realizó la tinción de 3 series de cada hemisferio en cada animal, siguiendo los pasos explicados en el apartado 2.2.4. La particularidad en estas inmunofluorescencias es que la tinción de animales inyectados con PSD95:GFP se realiza con anticuerpo anti-GFP y con anticuerpo secundario Alexa-555. Así visualizaremos en el canal rojo la morfología neuronal y todo el árbol dendrítico y en el verde las densidades postsinápticas por la propia autofluorescencia de la GFP.

Para el grupo de 2 semanas, las fotos para la reconstrucción de las neuronas se tomaron utilizando un objetivo de inmersión 40x, en un microscopio de barrido laser confocal LSM710 acoplado a un microscopio vertical AxioImager.M2 (Zeiss). Para el grupo de 8 semanas las fotos se adquirieron con un objetivo de inmersión 25x.

Se analizaron un mínimo de 50 neuronas escogidas al azar procedentes de 3 animales distintos para cada grupo de estudio. Se obtuvieron los *stacks* con una separación de planos de $2\mu\text{m}$ y un tamaño en z que recogiera la totalidad de la neurona. A partir de la proyección en z se analizaron parámetros como la longitud y número de dendritas primarias, la distancia de migración y el área de los terminales axónicos en CA3. La proyección en z también se utilizó para trazar las neuronas utilizando el *plugin* NeuronJ de ImageJ. Con estos trazos se determinó la longitud dendrítica total y se realizó el análisis de Sholl. Este último con la ayuda del *plugin* ShollAnalysis de ImageJ.

2.2.7.1. Cuantificación de parámetros morfométricos sinápticos

En el grupo de 8 semanas inyectados con PSD95:GFP, donde las neuronas ya son maduras, es posible cuantificar parámetros sinápticos. Para ello se tomaron las fotografías con un objetivo de inmersión 63x en un microscopio confocal LSM710 (Zeiss). Los *stacks* obtenidos tenían un tamaño de $67,4\mu\text{m}$ en los ejes x e y , y un tamaño en z que recogiese toda la dendrita, con una separación entre los planos de $0,13\mu\text{m}$. Se cuantificó el número de *clusters* PSD95-GFP y su área en cada orden de ramificación. Fueron analizados un mínimo de 30 segmentos para cada orden de ramificación

dendrítica, procedentes de 3 animales distintos para cada genotipo. Para ello, se obtuvo la proyección en z de los dos canales y se midió la longitud dendrítica de cada segmento. A continuación, se analizó el número de *clusters* y el área de los mismos, utilizando el *plugin* semiautomático Particle Analyzer de ImageJ.

2.3. Cultivos celulares.

Los cultivos celulares se mantuvieron en un incubador a una temperatura de 37°C, una concentración de CO₂ del 5% y una humedad relativa del 95%. Toda la manipulación y tratamiento de los cultivos se realizó en condiciones de esterilidad y dentro de campanas de flujo laminar.

2.3.1. Cultivo de astrocitos

Para realizar los cultivos de microglía, se utilizaron 5-6 ratones postnatales con 24 horas de vida del ratón transgénico para GSK3 β y ratones control. La disección se realizó en medio HBSS frío. Se extrajeron las cortezas cerebrales, se retiraron las meninges y se trocearon. Se realizó un lavado con HBSS y se digirieron utilizando tripsina y DNAsa a una concentración final en HBSS de 0,25% y 0,1 mg/ml respectivamente. La mezcla de digestión se incubó durante 15 minutos a 37°C, agitando de vez en cuando. Se retiró bien la tripsina con 3 lavados de HBSS. Se añadió medio glial (MEM 1X, glucosa 0,6%, suero de caballo 10%, mezcla de antibióticos 1:1000) y se disoció la digestión utilizando una pipeta. El tejido disgregado se centrifugó 10 minutos a 1500 r.p.m. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en medio glial. Los astrocitos se plaquearon en placas p35 y se les renovó totalmente el medio cada 3-4 días. Para este tipo de cultivos, las placas donde se crecieron las células no fueron previamente sometidas a ningún tratamiento. Para preparar los extractos, las células se recogieron en tampón de ruptura y se hirvieron durante 5 minutos.

2.3.2. Cultivo de neuroesferas

El cultivo de neuroesferas que se realizó fue en monocapa adherente en vez de en flotación, siguiendo el protocolo de Babu H. *et al.* (Babu, Claasen et al. 2011).

Se utilizaron de 5 a 6 animales por genotipo. Los animales fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal de pentobarbital y diseccionados para extraer el cerebro. Se colocó el cerebro en una placa con medio Neurobasal (NB) (Invitrogen Life-Technologies-Gibco) frío. Se extrajeron los hipocampos y, seguidamente, se diseccionaron los GDs, que se colocaron en una placa con NB sobre hielo, mientras se diseccionaban el resto de animales.

Una vez extraído todos los GDs, se retiró el NB y se sustituyó por la solución de digestión que contiene papaína y DNAsa, siguiendo el protocolo del fabricante (Worthington). Se trocearon los GDs en pequeños fragmentos y se incubaron en la solución de digestión a 37°C durante 30-45 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de digestión, se recogió el tejido digerido y se pasó a un tubo Falcon de 15 ml. Se terminó la disgregación del tejido, utilizando una pipeta Pasteur de vidrio siliconizada, hasta obtener una suspensión celular homogénea, con precaución de no formar burbujas. Se centrifugó la suspensión durante 5 minutos a 1000 rpm, y se retiró el sobrenadante. A continuación, se añadieron 3,9 ml de NB atemperado y 1,1 ml de una solución de Percoll al 22% en PBS (v/v). La muestra en gradiente de Percoll se centrifugó 15 minutos a 450 g. Mediante este gradiente lo que se consigue es separar los distintos tipos celulares, aislando en el pellet los precursores neurales. Retiramos el sobrenadante con precaución de no llevarnos el pellet, y lo lavamos 3 veces con NB atemperado para eliminar los restos de Percoll. Después de los lavados, resuspendemos el pellet de precursores neurales en 1 ml de medio de proliferación compuesto por B27 al 2% v/v (Gibco-BRL), Glutamax al 1% v/v (Gibco), EGF (20ng/ml) y FGF2 (20ng/ml) en NB. Finalmente, el aislado de precursores fue sembrado en medio de proliferación. Las placas donde se plaquéó el cultivo de precursores, fueron M12 previamente tratadas con Poli-L-Lisina (10µg/ml) (Sigma) diluida en H₂O durante toda una noche. Al día siguiente se lavaron con H₂O 3 veces durante 20 minutos cada uno, y se trataron con Laminina (10µg/ml) (Sigma) diluida en NB durante 2-3 horas a 37°C. Trascurrido este tiempo, las placas se lavaron con NB 3 veces durante 10 minutos. Finalizado el tratamiento, se les añadió a

las placas medio de proliferación y se atemperó hasta el momento del plaqueo del cultivo de precursores neurales.

Transcurridas 48 horas, se retiró la mitad del volumen de cada pocillo, y se sustituyó por medio de proliferación fresco. El volumen retirado, se centrifugó 3 minutos a 200 g, se descartó el sobrenadante, y el pellet se resuspendió en medio de proliferación fresco. Con este paso intentamos recuperar los precursores que aún no se habían pegado a la placa y se volvieron a plaquear de nuevo sobre el mismo cultivo.

Cada 2-3 días se retiraba el 50% de medio y se sustituía por medio fresco.

2.3.3. Pase del cultivo de neurosferas

A las 2-3 semanas tras el aislamiento inicial de los precursores, el cultivo tiene un alto grado de confluencia. Los precursores neuronales pueden ser pasados a nuevas placas y conservados a lo largo del tiempo. Para ello se retira el medio de cultivo y se realiza un lavado de 1 minuto con PBS 1X atemperado. Añadimos Tripsina-EDTA (0,5% v/v) durante 1 minuto a 37°C para despegar las células de la placa. La acción de la papaína se neutralizó con el doble de volumen del inhibidor ovomucoide de papaína (Worthington). Se centrifugó la suspensión celular 2 minutos a 200 g. Se descartó el sobrenadante, se añadió medio de proliferación fresco y se volvieron a sembrar sobre placas tratadas como se explicó en el [apartado 2.3.1](#).

2.3.4. Experimentos de proliferación *in vitro*

Tras uno de los pases de los precursores, se sembraron sobre cristales estériles de 12 mm de diámetro, pretratados con polilisina/laminina como se explicó anteriormente. Se sembraron unas 50.000 células/cristal y se tuvieron 48 horas en cultivo antes del tratamiento.

Para marcar las células en división se añadió al medio IdU a una concentración de 10 μ M durante 6 horas. Transcurrido el tiempo de tratamiento, se retiró el medio con el análogo de timidina y se lavó el cultivo con PBS 1X. A continuación, se fijaron las células con PFA 4% durante 20 minutos. Las células fijadas se lavaron con PBS 1X, 2 veces durante 10 minutos, y se conservaron a 4°C en PBS 1X.

2.3.5. Inmunofluorescencia de cultivos de precursores neurales

Las células fijadas se permeabilizaron con 0,1% Tritón X-100 en PBS 1X durante 15 minutos. A continuación, se incubaron los cristales con glicina 1M en PBS 1X durante 30 minutos, para eliminar la autofluorescencia. Después se realizó un lavado con PBS 1X durante 5 minutos. Seguidamente, se procedió al bloqueo de la muestra utilizando albúmina de suero bovino (BSA) al 1% en PBS 1X. El bloqueo se mantuvo alrededor de 45 minutos, tras los cuales se incubaron los cristales con el anticuerpo primario en la misma solución de bloqueo durante toda la noche. Al día siguiente, realizamos 2 lavados con PBS 1X de 5 minutos cada uno. El siguiente paso fue la incubación con anticuerpo secundario diluido 1:500 en medio de bloqueo durante 2-3 horas y en oscuridad. Las células se lavaron del mismo modo que se hizo tras la incubación con el anticuerpo primario. Por último, incubamos las células con DAPI a una dilución 1:10000 en PBS 1X. Tras el marcaje nuclear, lavamos 2 veces con PBS 1X 5 minutos y montamos los cristales sobre portaobjetos, utilizando como medio de montaje *Prolong Gold Antifade*.

Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio de confocal de fluorescencia LSM710 (Zeiss). Se contaron las células presentes en 12 campos procedentes de 3 preparaciones distintas. Se cuantificaron un mínimo de 1000 células por condición, obteniendo el porcentaje de ellas positivamente marcadas con el análogo de timidina.

2.4. Pruebas de comportamiento

Se analizó posibles variaciones comportamentales de los ratones transgénicos, sometiéndolos a diferentes test de comportamiento ampliamente utilizados.

2.4.1. Test de campo abierto (Open field)

En primer lugar, los ratones se sometieron a este test de locomoción global, que nos informará de manera general de cualquier posible alteración. Los ratones se situaron en cajas cuadradas de dimensiones 29x29 cm. Estas cajas se encuentran monitorizadas,

para recoger cualquier movimiento del ratón, con 16 fotocélulas para medir actividad horizontal y 8 fotocélulas para medir actividad vertical (Med Associates, Inc). Los ratones fueron analizados durante 15 minutos. El *software* informático que controla las cajas, nos da información acerca de numerosos parámetros relacionados con la distancia recorrida, velocidad, estereotipias, etc.

2.4.2. Test de condicionamiento al miedo (Fear conditioning test)

Para este test se colocó al ratón en un sistema comercial para miedo condicionado (Panlab). Este sistema consiste en una caja especial de atenuación sonora, cuya base metálica detecta cualquier mínimo movimiento del ratón. La base está conectada a un generador que permite dar descargas eléctricas. En la caja existe un generador de sonidos que permite emitir señales acústicas de manera controlada. La prueba consta de dos fases: la de entrenamiento y el test. El primer día se sitúa cada ratón de forma individual dentro de la caja cerrada y en oscuridad y se somete a una fase de entrenamiento. Esta fase consta de unos 6 minutos, en los que de forma repetida y espaciada entre ellas, se da una señal acústica durante unos segundos seguida de una descarga eléctrica. El protocolo seguido consistió en 3 minutos de periodo de exploración y, a continuación, de dos ciclos de tono-descarga (tono de 30 segundos, y descarga de 0,8mA de 2 segundos) espaciados 1 minuto entre ellos. Un minuto tras la segunda descarga se devolvió el ratón a su caja. Trascurridas 24 horas, se somete a los animales a la fase de test de 6 minutos de duración. Se sitúan de nuevo dentro de la misma caja, pero sin darles ni señales acústicas ni descargas. Si el ratón recuerda el ambiente en el cual se le entrenó, espera recibir descargas eléctricas dentro de la caja y esto se traduce en quedarse inmóvil (*freezing*). Este es un test de memoria dependiente de hipocampo, que se refleja en el porcentaje de *freezing*, que será mayor si se recuerda el condicionamiento.

2.4.3. Test de Rotarod

El test se realizó utilizando el aparato de aceleración rotarod (Ugo Basile, Comerio, Italia). Los ratones fueron entrenados los dos días previos al test durante 5

minutos con una velocidad de giro constante, 4 r.p.m. el primero y 8 r.p.m. el segundo día. El día del test, el rotarod se configuró para acelerar de manera constante desde 4 a 40 r.p.m. y se analizó a los animales durante 5 minutos. El test se repitió 4 veces a cada animal. Durante estos ensayos acelerados, se cuantificó la latencia en caer del rotarod.

2.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo utilizando el programa SPSS Statistics 20. Los gráficos representan los valores medios \pm S.E.M. (*standard error of the mean*). Previamente se analizó la normalidad de los datos aplicando la prueba Kolmogorov-Smirnov. La mayoría de los datos se ajustaban a los criterios de normalidad y se aplicó el test de análisis de la varianza (ANOVA) para más de dos grupos, de una o dos vías (dos vías en los casos de análisis de dos factores de la muestra como zona del GD y genotipo). Tras el análisis ANOVA se realizó el test de corrección *post hoc* Bonferroni para casos de comparaciones múltiples. En los casos donde la comparación era entre dos grupos, se aplicó el test de la *t* de Student. Cuando los datos no se ajustaban a los criterios de normalidad, se aplicaron las pruebas no paramétricas equivalentes a las anteriores: Kruskal-Wallis para el estudio de más de dos grupos y la U de Mann-Whitney para la comparación de dos grupos.

Para los estudios de colocalización, en los que la variable considerada era cualitativa, se aplicó un test no paramétrico específico para este tipo de datos como es la Chi-cuadrado (χ^2) de Pearson. En todos los casos el nivel de significación aceptado fue de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Caracterización de la neurogénesis adulta en un modelo murino de sobreexpresión de GSK3 β en los precursores neurales.

Datos previos del laboratorio han demostrado que la sobreexpresión de la quinasa GSK3 β produce alteraciones en el proceso de neurogénesis adulta en la SGZ. En el ratón transgénico utilizado para estos estudios, la sobreexpresión de GSK3 β se produce bajo el promotor de la calmodulina quinasa II (CamkII). En este modelo, GSK3 β se sobreexpresará de forma postnatal en neuronas maduras del sistema nervioso central (SNC). Los efectos que esto conlleva, como fue comentado en la Introducción, son entre otros: la degeneración del GD, disminución de los nichos neurogénicos (Sirerol-Piquer, Gomez-Ramos et al. 2011), alteración en la expresión de DCX, alteración en el proceso de maduración/supervivencia de neuronas inmaduras (Fuster-Matanzo, Llorens-Martin et al. 2013) y cambios en la morfología y conectividad de las nuevas neuronas generadas (Llorens-Martin, Fuster-Matanzo et al. 2013).

Con estos antecedentes, nos propusimos investigar cual era el efecto sobre la neurogénesis adulta de sobreexpresar GSK3 β , no en neuronas maduras sino en precursores neurales.

1. Generación y caracterización del patrón de expresión del ratón GFAP/OE GSK3 β

Para llevar a cabo el estudio propuesto, se escogió la expresión del marcador de precursores neurales GFAP, para dirigir la sobreexpresión de GSK3 β . Para ello se cruzaron ratones homocigotos Bi-TetO GSK3 β y heterocigotos GFAP-tTa, tal y como se explica en el apartado 1.3. de Materiales y Métodos. Aunque GFAP tiene una expresión prenatal (Lewis and Cowan 1985; Brenner, Kisseberth et al. 1994), no se observaron efectos tóxicos de dicha expresión en el ratón doble transgénico. El porcentaje obtenido de crías de cada genotipo fue el esperado (50%) por las frecuencias mendelianas de segregación de los caracteres. Los ratones doble transgénicos GFAP/OE GSK3 β son viables y se desarrollan con normalidad, no apreciándose diferencias *de visu* con los ratones silvestres. Lo mismo ocurre con su esperanza de vida, que es normal y

comparable a la de los ratones control.

El siguiente paso fue analizar los niveles y patrón de expresión del transgen. Para detectar la expresión del transgen utilizamos el gen reportero β -Gal, que se expresa de forma bidireccional junto a GSK3 β . Para ello utilizamos técnicas bioquímicas, como el *western blot*, e histológicas como la tinción inmunohistoquímica de tejido. Cuando los ratones GFAP/OE GSK3 β y sus correspondientes controles fueron analizados mediante *western blot*, pudimos detectar la expresión del transgen en el ratón doble transgénico. La expresión tenía lugar en estructuras cerebrales tales como el hipocampo (**Figura 2A**), la corteza cerebral (**Figura 2B**) y el cerebelo (no mostrado). Por el contrario, no se detectó ningún tipo de señal en las mismas estructuras de los ratones control.

Estas muestras también fueron analizadas utilizando el anticuerpo contra *myc*. Se puede observar el reconocimiento de GSK3 β transgénica marcada con *myc* en extractos de hipocampo, donde los niveles de expresión son mayores. Esto confirma el correcto funcionamiento de la herramienta del promotor bidireccional. Como se pudo comprobar, la detección utilizando el anticuerpo contra *myc* es menos eficiente. Además su utilización falla en situaciones donde la proteína tiene su conformación nativa y no está desnaturalizada, como en inmunohistoquímica de tejido. Por eso, de ahora en adelante usaremos el reportero β -Gal para detectar la expresión del transgen.

A continuación, analizamos mediante tinción inmunohistoquímica el patrón de expresión de GSK3 β en cortes de tejido de cerebro del ratón GFAP/OE GSK3 β y su correspondiente control. Podemos observar la expresión restringida de β -Gal en las mismas regiones (hipocampo, corteza cerebral y cerebelo) que la detectábamos mediante *western blot*. Más concretamente, dentro del hipocampo la expresión de β -Gal vemos que está restringida al giro dentado (GD) región donde se sitúan los precursores neurales (**Figura 2C**). Ningún indicio de señal fue detectado en otras regiones del hipocampo como CA1, CA2 o CA3. En corteza, la detección del transgen se restringe a los astrocitos. Se puede observar que no todos los astrocitos aparecen marcados, ya que el número de estas células presentes en corteza es mayor que los que detectamos positivos para β -Gal (**Figura 2D**). En el cerebelo un intenso marcaje es observado, entre otras, en las células granulares del cerebelo (**Figura 2E**). Por último, también se

observa marcaje en la otra región neurogénica del cerebro adulto, en la zona subventricular (**Figura 2F**). No se detectó expresión del transgen en otras regiones cerebrales como el tálamo, estriado o médula espinal.

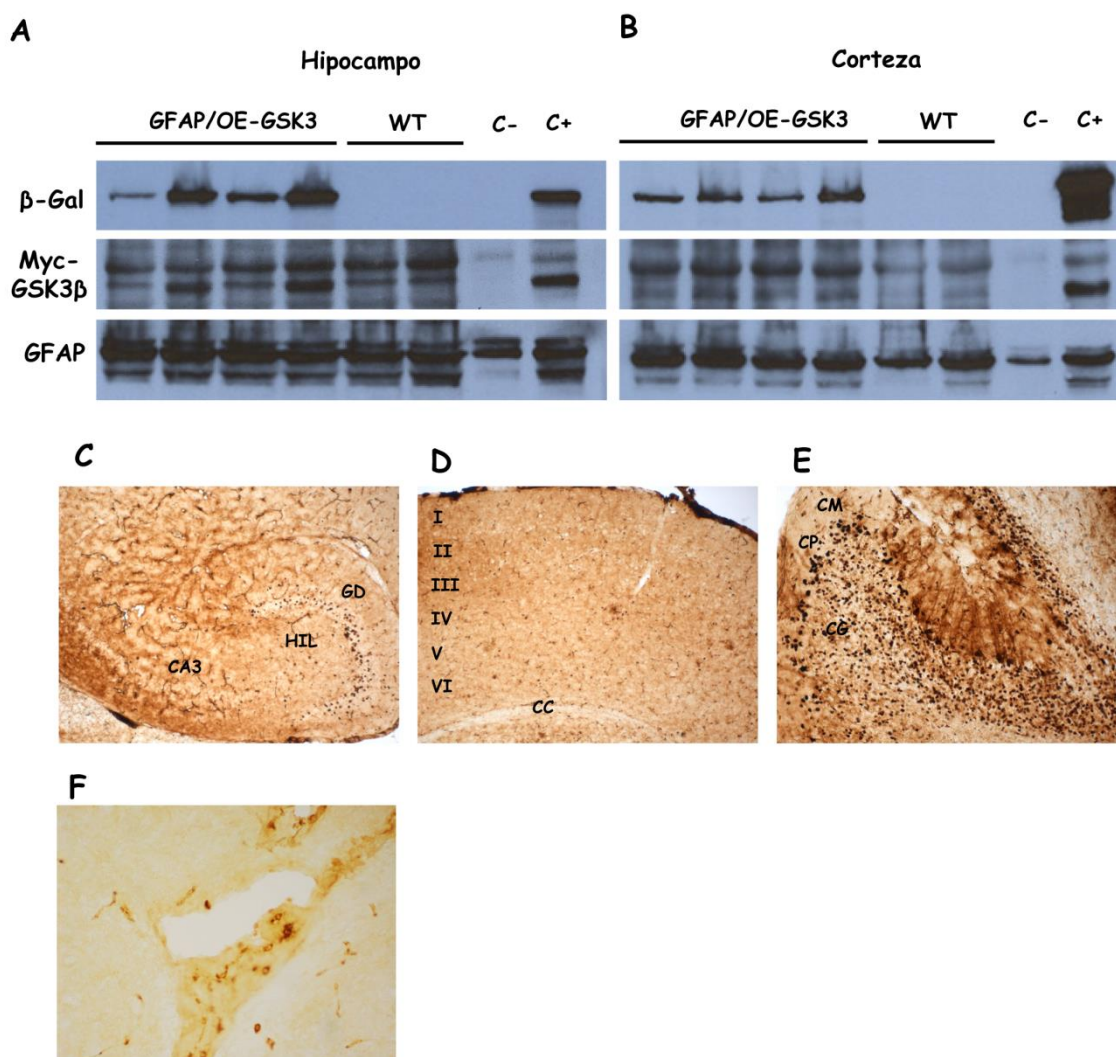


Figura 2. Patrón de distribución y expresión del transgen. Análisis mediante *western blot* de la expresión del transgen en el hipocampo (**A**) y en corteza (**B**). Se utilizaron los anticuerpos contra la proteína reportera β -galactosidasa (β -Gal), contra el epítipo unido a GSK3 β c-Myc y contra la GFAP como control de carga. Análisis del patrón de expresión del transgen en cortes de cerebro mediante inmunohistoquímica. Se detectó la expresión del transgen utilizando el anticuerpo contra β -Gal en giro dentado (**C**), en corteza (**D**), en cerebelo (**E**) y en ventrículo lateral (**F**). (Wt= control, GD= giro dentado, HIL= hilus, CA3= región 3 del cuerno de Ammon, CC= cuerpo calloso, CG= células granulares, CP= células de Purkinge, CM= capa molecular).

2. El ratón GFAP/OE GSK3 β presenta un aumento del peso corporal y cerebral.

Tras comprobar que el transgen se estaba expresando en el ratón doble transgénico, lo primero que nos planteamos fue una caracterización de parámetros macroscópicos fácilmente cuantificables. El más inmediato que nos propusimos medir fue el peso de los animales, ya que GSK3 β es una proteína implicada en la regulación del ciclo del glucógeno. Trabajos previos indican que la sobreexpresión de GSK3 β en astrocitos del núcleo cerebral que controla el apetito produce sobrepeso en los ratones. Por todo ello, quisimos comprobar si el ratón transgénico GFAP/OE GSK3 β , tenía alguna alteración a este nivel. Se pesaron ratones de 2 grupos de edades diferentes, uno de ellos de 7 meses y el otro con 15 meses de edad. Diferenciando por sexo, este pesaje mostró que ya a los 7 meses se observa una diferencia significativa en el peso en los machos, teniendo el ratón transgénico un mayor peso corporal que su respectivo control (Wt= 31,35 \pm 0,27; GFAP/OE GSK3 β = 36,44 \pm 1,31 gramos). A esta edad no se encontraron diferencias entre las hembras de ambos genotipos (Wt= 25,08 \pm 0,15; GFAP/OE GSK3 β = 26 \pm 0,5 gramos) (**Figura 3A**).

Analizando el grupo de animales de mayor edad, observamos unas claras diferencias entre los pesos de los dos genotipos y en esta ocasión en ambos sexos. Tanto los machos (Wt= 33,32 \pm 0,53; GFAP/OE GSK3 β = 41,63 \pm 1,36 gramos) como las hembras (Wt= 27,41 \pm 0,39; GFAP/OE GSK3 β = 33,75 \pm 1,02 gramos) que sobreexpresan GSK3 β presentan un mayor peso corporal que los ratones control (**Figura 3B**).

Lo siguiente que decidimos hacer fue analizar si había alguna diferencia en el peso de nuestra estructura de interés, el cerebro. Medimos el peso del cerebro de los animales de estos grupos de edad. En el grupo de 7 meses observamos diferencias significativas para ambos sexos, tanto en el caso de los machos (Wt= 0,45 \pm 0,004; GFAP/OE GSK3 β = 0,49 \pm 0,004 gramos), como en el de las hembras (Wt= 0,47 \pm 0,004; GFAP/OE GSK3 β = 0,49 \pm 0,005 gramos) presentando un mayor peso cerebral los ratones transgénicos (**Figura 3C**). Lo mismo ocurre en el grupo de 15 meses, hay diferencias entre los pesos del cerebro entre los machos (Wt= 0,45 \pm 0,006; GFAP/OE

GSK3 β = 0,49 \pm 0,012 gramos) y también entre las hembras (Wt= 0,47 \pm 0,004; GFAP/OE GSK3 β = 0,5 \pm 0,005 gramos) de los ratones GFAP/OE GSK3 β y los ratones controles (**Figura 3D**).

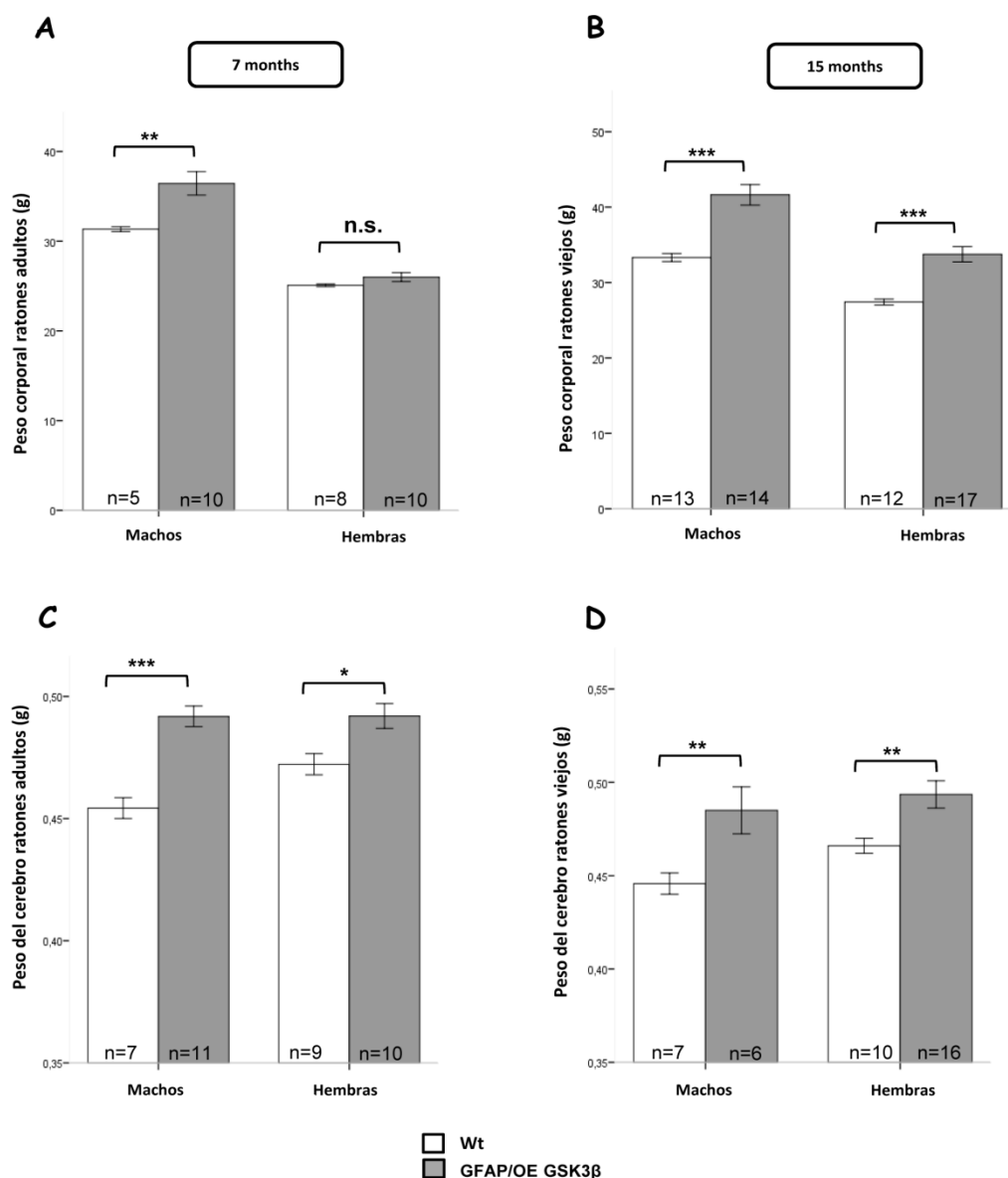


Figura 3. Variación del peso corporal y cerebral en el ratón GFAP/OE GSK-3 β . Cuantificación del peso corporal en ratones control y transgénico expresado en gramos. **A**, animales de 7 meses de edad dividido por sexos (ANOVA de dos vías; machos $p=0,005$; hembras $p=1,00$). **B**, animales de 15 meses de edad separando por sexos (ANOVA de dos vía; machos $p=0,000$; hembras $p=0,000$). Cuantificación del peso cerebral de ratones control y transgénico expresado en gramos. **C**, animales de 7 meses de edad diferenciando entre ambos sexos (ANOVA de dos vías; machos $p=0,000$; hembras $p=0,025$). **D**, animales de 15 meses de edad diferenciando por sexos (ANOVA de dos vías; machos $p=0,009$; hembras $p=0,002$). * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; n.s.= no significativo.

3. El ratón GFAP/OE GSK3 β sobreexpresa GSK3 β en precursores neurales del giro dentado.

Nuestro propósito es investigar el efecto que tiene la sobreexpresión de GSK3 β sobre la neurogénesis adulta. Para ello, el siguiente paso fue comprobar que la expresión que habíamos visto en el hipocampo se estaba produciendo en nuestras células de interés. Realizamos doble inmunofluorescencia para detectar al mismo tiempo los precursores neurales mediante el anticuerpo GFAP y la presencia de la proteína reportera con β -Gal. Al analizar los resultados pudimos comprobar que aparecían células marcadas para ambos marcadores. Algunas de ellas aparecían en la SGZ, lugar esperado si se trata de precursores neurales (**Figura 4A, flechas verdes**). Además, aparecían otras células marcadas, que claramente estaban expresando el transgen, pero que estaban situadas en el hilus (**Figura 4A, puntas de flechas blancas**). Como el promotor que dirige la expresión de nuestro gen es GFAP, estas células localizadas fuera de la SZG son astrocitos. Esto nos indicaba que la expresión del transgen estaba siendo correctamente dirigida por el promotor GFAP.

Comprobamos que verdaderamente los astrocitos estaban expresando el transgen, realizando cultivos celulares de astrocitos obtenidos a partir del ratón doble transgénico. Mediante *western blot* pudimos detectar la presencia de la proteína reportera β -Gal en extractos totales de astrocitos del ratón GFAP/OE GSK3 β , mientras que no detectamos la proteína en astrocitos procedentes de ratones control (**Figura 4B**).

A pesar que GFAP es expresado de forma característica por los precursores neurales, no podíamos utilizar este único marcador como criterio de validez. Como también es expresado por astrocitos maduros, sólo la colocalización de GFAP y β -Gal, no es suficiente para asegurar que lo que estamos observando son precursores neurales que sobreexpresan GSK3 β . Podríamos valernos de otros criterios como la morfología y la localización, pero debido al marcaje filamentoso y la presencia de astrocitos por todo el GD nunca sabríamos si se trata de un precursor o no.

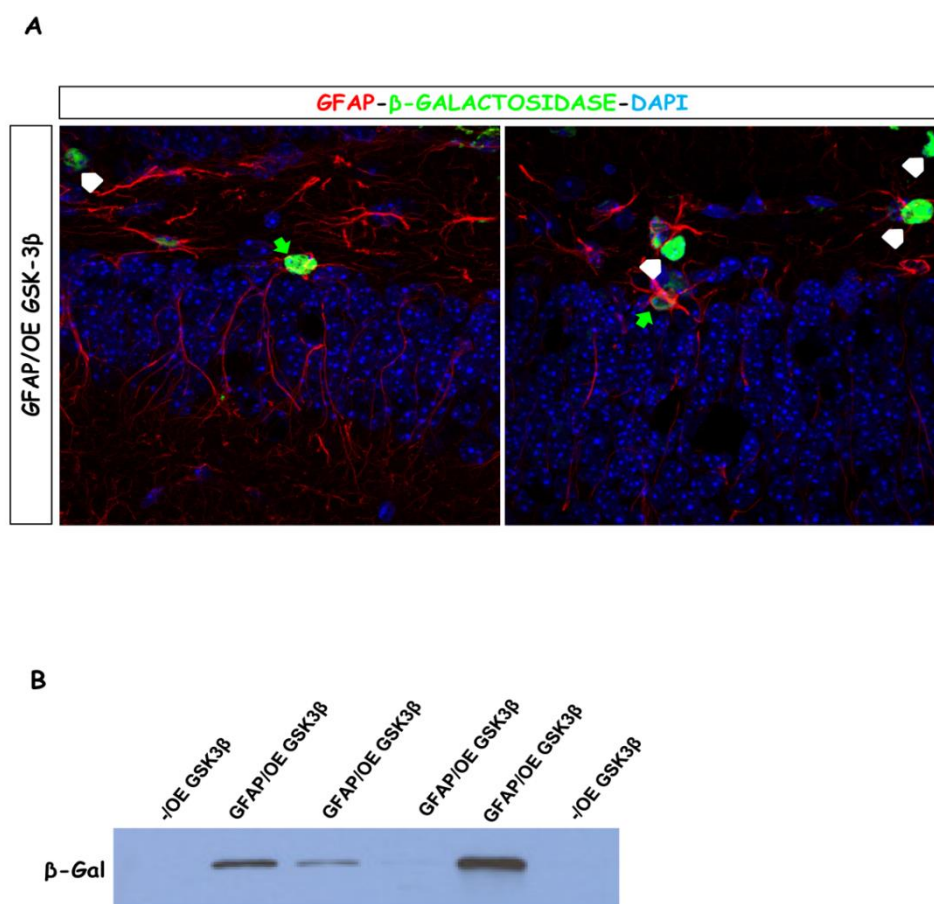


Figura 4. Expresión del transgen en células GFAP+, precusores y astrocitos. **A**, doble inmunofluorescencia en secciones sagitales de animales GFAP/OE GSK-3 β utilizando los anticuerpos GFAP y β -Gal. Los núcleos aparecen teñidos en azul utilizando DAPI. Las flechas verdes indican células positivas para ambos marcadores y situados en la SGZ, en principio precusores neurales. Las cabezas de flechas blancas indican células positivas para ambos marcadores y situados en el hilus, por lo que corresponderían con astrocitos. **B**, *western blot* utilizando el anticuerpo β -Gal en extractos de astrocitos en cultivo extraídos del ratón transgénico para la sobreexpresión de GSK3 β .

Para asegurarnos que los precusores neurales estaban sobreexpresando el transgen, realizamos doble inmunofluorescencia utilizando otros marcadores específicos de precusores neurales como la proteína BLBP junto a β -Gal. Pudimos comprobar la presencia de ambos marcajes en la misma célula, demostrando que nuestro ratón sí que estaba expresando el transgen en el subtipo celular de interés (**Figura 5**).

Trabajos previos han demostrado la existencia de numerosas diferencias tanto anatómicas como funcionales entre las dos regiones del hipocampo, la parte dorsal y ventral (Moser and Moser 1998; Fanselow and Dong 2010). Por este motivo ambas estructuras fueron tenidas en consideración en los análisis, dorsal (**Figura 5A-E**) y

ventral (**Figura 5F-J**). En ambas regiones pudimos detectar la expresión del transgen en los precursores neurales. Cortes trasversales en el eje z demuestran la colocalización de ambos marcadores en la misma célula (**Figura 5D, E, I y J**).

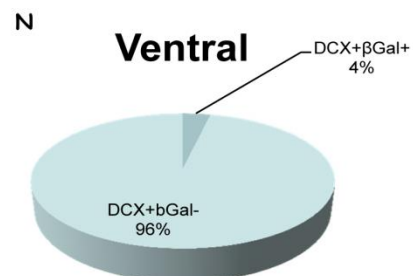
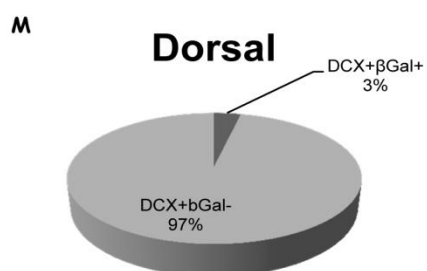
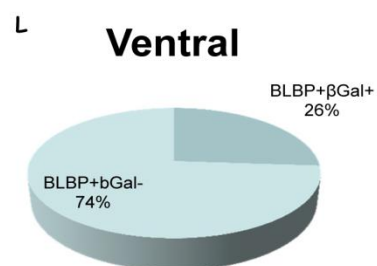
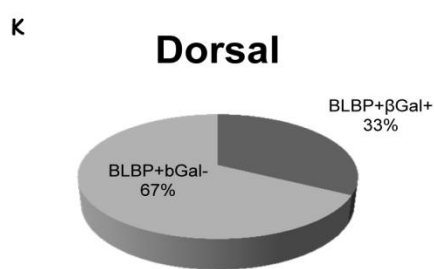
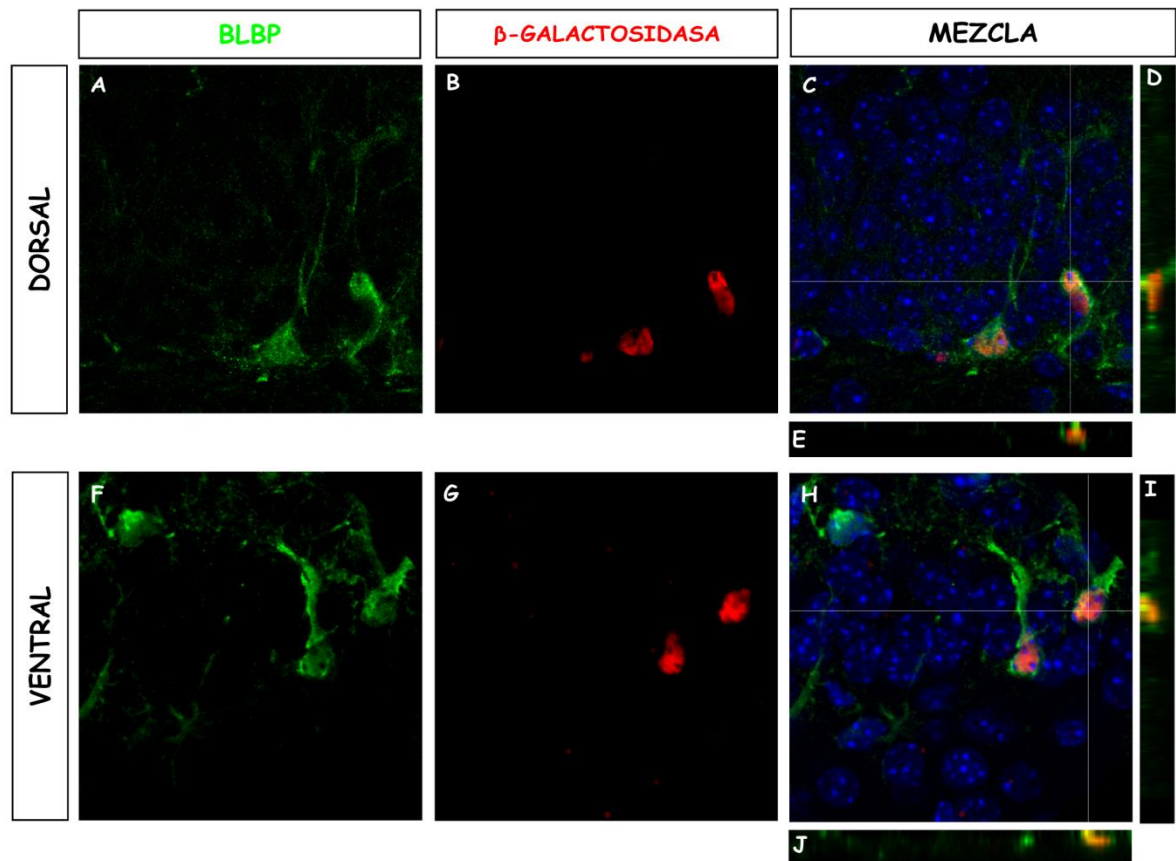


Figura 5. Expresión del transgen en precursores neurales BLBP+ del giro dentado. Doble inmunofluorescencia utilizando los anticuerpos BLBP y β -Gal en cortes sagitales de animales GFAP/OE GSK-3 β (A-J). El análisis se llevó a cabo tanto en la parte dorsal del GD (A-E) como en la ventral (F-J). También se muestra la mezcla de ambos canales junto a la tinción de núcleos con DAPI en azul (C, H). Las imágenes D, E, I y J, corresponden a la vista de los dos canales en cortes ortogonales marcados por las líneas blancas en C y H.

Cuantificación de células positivas para ambos anticuerpos (BLBP y β -Gal) expresado en porcentaje, en la región dorsal (K) y también en la parte ventral (L). Cuantificación de células positivas para los anticuerpos DCX y β -Gal expresado en forma de porcentaje. El análisis se realizó en la región dorsal del GD (M) y en la ventral (N) por separado.

En la mayoría de los ratones transgénicos no se consigue una expresión del 100% del transgen. Por eso quisimos cuantificar qué porcentaje representaban las células positivas para BLBP que expresaban β -Gal. En la parte dorsal del GD, el porcentaje obtenido fue del 32,61% (Figura 5K). Un porcentaje similar fue obtenido en la parte ventral, con un 26,14% (Figura 5L). Para comprobar que la expresión del transgen estaba teniendo lugar en las células adecuadas, y que la expresión se apaga cuando el precursor madura, cuantificamos si había neuroblastos (DCX+) que seguían expresando β -Gal. Sólo un residual porcentaje de células alrededor del 3%, tanto en el GD dorsal como ventral, fueron positivas para ambos marcadores (Figura 5M, N). Esto corrobora que la expresión del transgen es correctamente dirigida por el promotor GFAP en los precursores neuronales. Cuando la nueva neurona generada toma un destino neuronal, apaga la expresión del transgen. Este 3% de células DCX+ que expresan β -Gal, se trataría de nuevas neuronas donde acaba de ocurrir la transición hacia un mayor grado de diferenciación y todavía perdura la proteína reportera debido, probablemente, a su larga vida media.

Los precursores neurales tienen varios marcadores propios que los caracterizan. Además de mediante la utilización de BLBP, quisimos replicar este resultado con otro marcador y corroborar que los precursores neurales estaban expresando el transgen. Para ello se utilizó el marcador de progenitores Sox2. Utilizando este marcador obtuvimos el mismo resultado y observamos como los precursores neurales (Sox2+) también expresan β -Gal (Figura 6). Esta expresión tenía lugar tanto en la región dorsal (Figura 6A-E) como en la ventral del hipocampo (Figura 6F-J). La imagen de un corte en el eje z muestra, de nuevo, la colocalización en la misma célula de ambos marcadores

(Figura 6D, E, I y J). Al igual que ocurría con el marcador BLBP, observamos que no todas las células Sox2 positivas expresan el transgen. Quisimos conocer cuál era el porcentaje de estas células en las que estaba teniendo lugar la sobreexpresión de GSK3 β . La cuantificación en la región dorsal mostró que un 23% de las células Sox2 positivas lo eran también para β -Gal (Figura 6K), mientras que en la región ventral el porcentaje fue del 9,5% (Figura 6L). Los resultados de la parte dorsal son bastantes similares a los obtenidos en con el marcador BLBP, mientras que en la parte ventral podemos observar que el porcentaje es algo menor.

En base a estos resultados podemos afirmar que el ratón transgénico GFAP/OE GSK3 β , sobreexpresa GSK3 β en los precursores neurales de la SGZ.

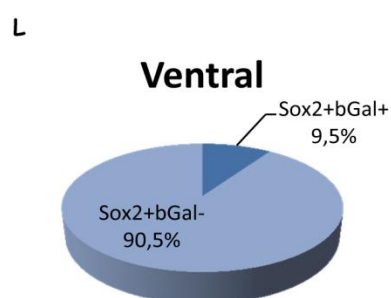
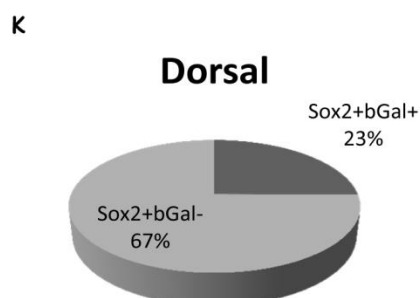
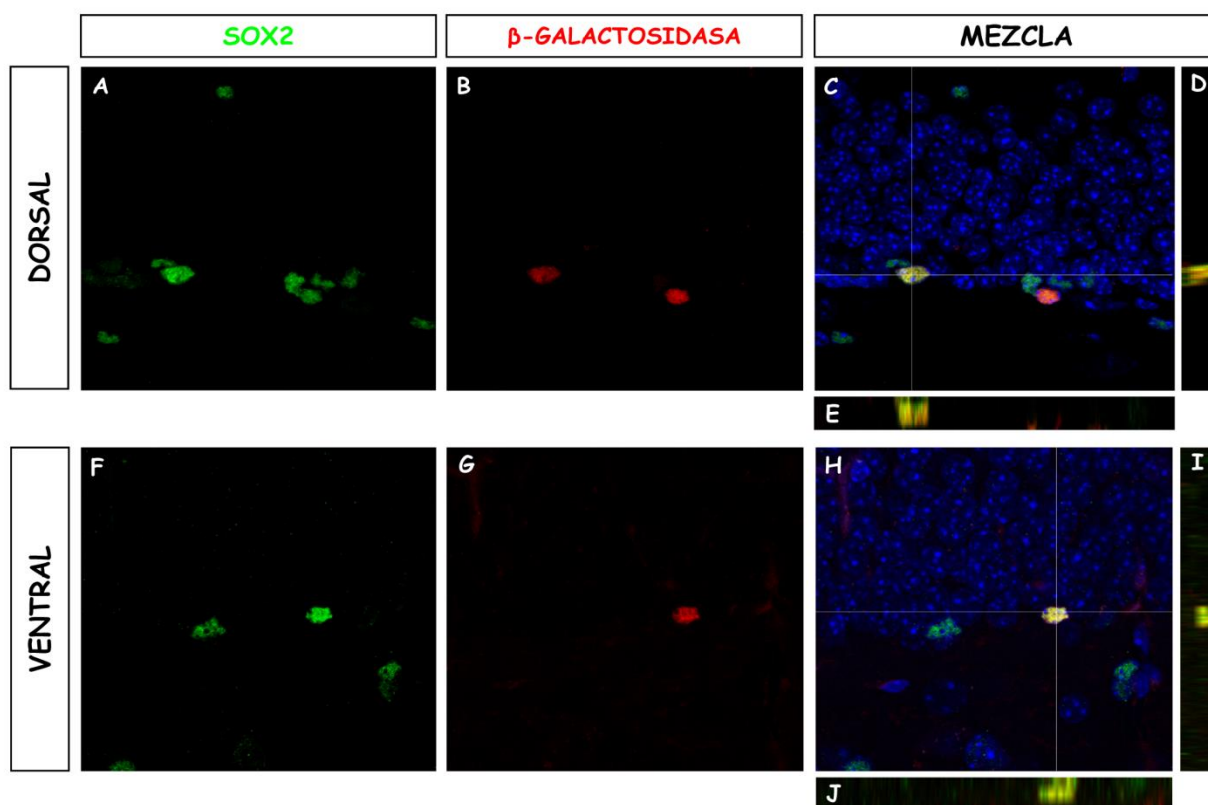


Figura 6. Expresión del transgen en precursores neurales Sox2+ del giro dentado. Doble inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo Sox2 y β -Gal en cortes sagitales de animales GFAP/OE GSK-3 β (A-J). La presencia de ambos marcadores se corroboró tanto en la región dorsal del GD (A-E), como en la parte ventral (F-J). También se muestra la mezcla de ambos canales junto a la tinción de núcleos con DAPI en azul (C, H). La colocalización de ambos marcadores se muestra en las imágenes D, E, I y J, correspondientes a las vistas de los dos canales en cortes ortogonales marcados por las líneas blancas en C y H.

Cuantificación de células positivas para ambos anticuerpos (Sox2 y β -Gal) expresado en porcentaje, en la región dorsal (K) y también en la parte ventral (L).

4. El ratón GFAP/OE GSK3 β presenta un incremento del volumen total del giro dentado del hipocampo y del número de neuronas granulares maduras.

Una vez comprobada la correcta expresión del transgen, nos propusimos analizar si esta sobreexpresión se traducía en algún efecto sobre la morfología del GD. Como nuestro interés es analizar que efecto tiene GSK3 β sobre la neurogénesis de la SGZ, nuestra primera aproximación fue medir el volumen total del GD para ver si podía estar produciéndose alguna alteración. Cuantificamos el volumen del GD en animales de 3,5 meses de edad mediante el método de Cavalieri. El análisis se realizó en animales transgénicos y en sus controles correspondientes, tanto en la parte dorsal (Figura 7A, C) como en la ventral (Figura 7B, D). Tras la cuantificación, se observó un aumento significativo del tamaño del GD dorsal en el animal que sobreexpresa GSK3 β con respecto al control (Wt= $0,34 \pm 0,021$; GFAP/OE GSK3 β = $0,43 \pm 0,011$ mm³). Cabe destacar que no se encontraron diferencias en lo que se refiere la estructura ventral del GD entre ambos genotipos (Wt= $0,14 \pm 0,016$; GFAP/OE GSK3 β = $0,12 \pm 0,011$ mm³) (Figura 7E). Este resultado no se explica por una expresión diferencial del transgen, ya que como hemos visto, éste se está expresando en ambas estructuras por igual. Posiblemente la explicación resida en las distintas propiedades funcionales y de conectividad de las estructuras dorsal y ventral del GD. En cualquier caso, la neurogénesis adulta parece ser menor en el GDv que en el GDd (Sirerol-Piquer, Gomez-Ramos et al. 2011).

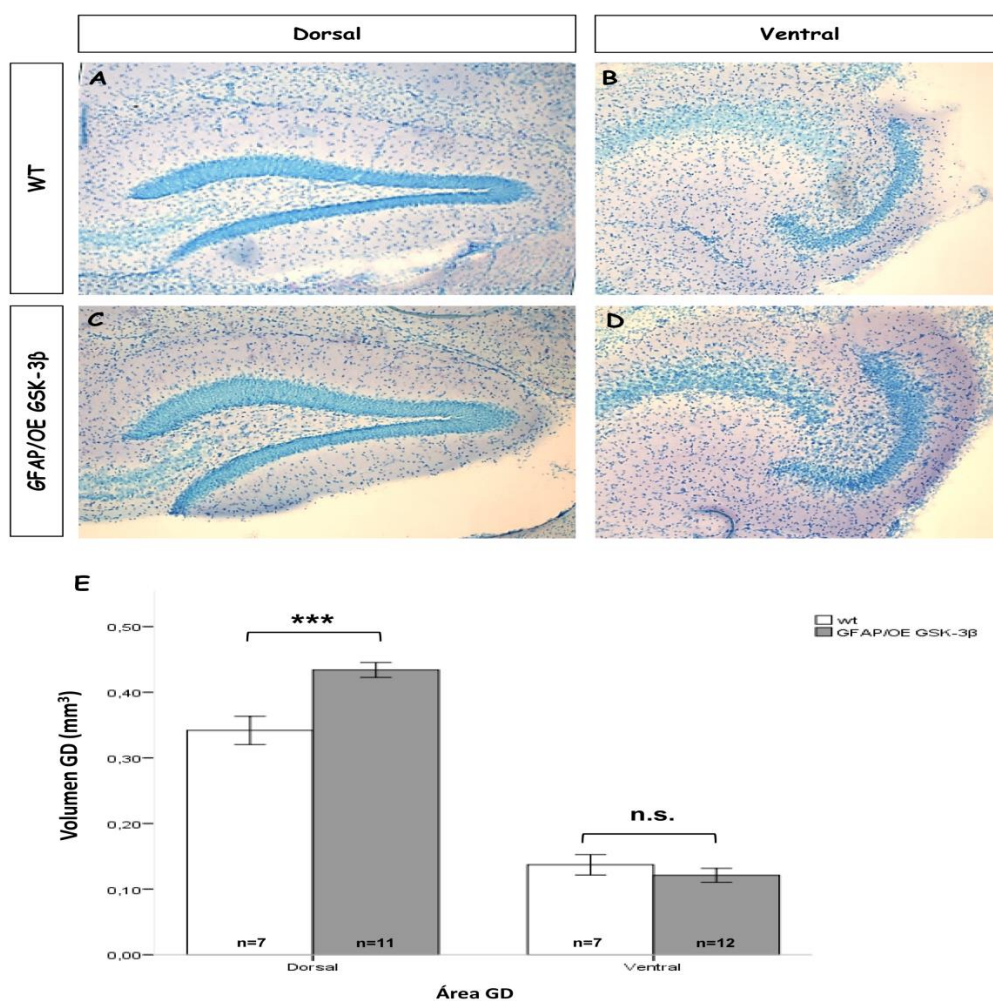


Figura 7. Análisis del volumen del giro dentado. Tinción de Nissl en cortes sagitales de animales control (A, B) y ratones GFAP/OE GSK-3 β (C, D). Las imágenes muestran una sección representativa del GD dorsal en ambos genotipos (A, C) y del GD ventral (B, D). En el panel inferior (E), se representa la cuantificación del volumen total del GD expresado en mm³. (ANOVA de dos vías; dorsal p= 0,000; ventral p= 1,00). ***p<0,001; n.s.= no significativo.

Teniendo en cuenta el aumento de volumen del GD, nos propusimos profundizar un poco más en la caracterización de esta alteración. Para ello cuantificamos el número total de neuronas granulares maduras en el GD, tratando de determinar si esta era la causa del aumento de volumen observado. Se llevó a cabo un recuento del número de núcleos maduros marcados con DAPI en animales con 3,5 meses de edad en ambas estructuras del hipocampo, dorsal (Figura 8A, C) y ventral (Figura 8B, D). Del conteo se descartaron aquellos núcleos irregulares pertenecientes a neuronas inmaduras y los núcleos apoptóticos. De acuerdo con el resultado del volumen total del GD, el animal transgénico GFAP/OE GSK3 β presenta un aumento significativo de neuronas

granulares maduras con respecto al animal control (Wt= 1.158.490,51 \pm 84899,57; GFAP/OE GSK3 β = 1.475.523,85 \pm 81898,97 células). En esta ocasión, podemos de nuevo observar como los datos arrojan resultados significativos únicamente en la parte dorsal. Como ocurre con el volumen total, no observamos diferencias en lo referido a la parte ventral (Wt= 357.792,83 \pm 46.699,89; GFAP/OE GSK3 β = 332.056,97 \pm 31.167,63 células) (**Figura 8E**).

Por tanto, los parámetros de volumen total y número de neuronas maduras totales muestran un aumento de ambos parámetros en el ratón que sobreexpresa GSK3 β en el GD dorsal únicamente.

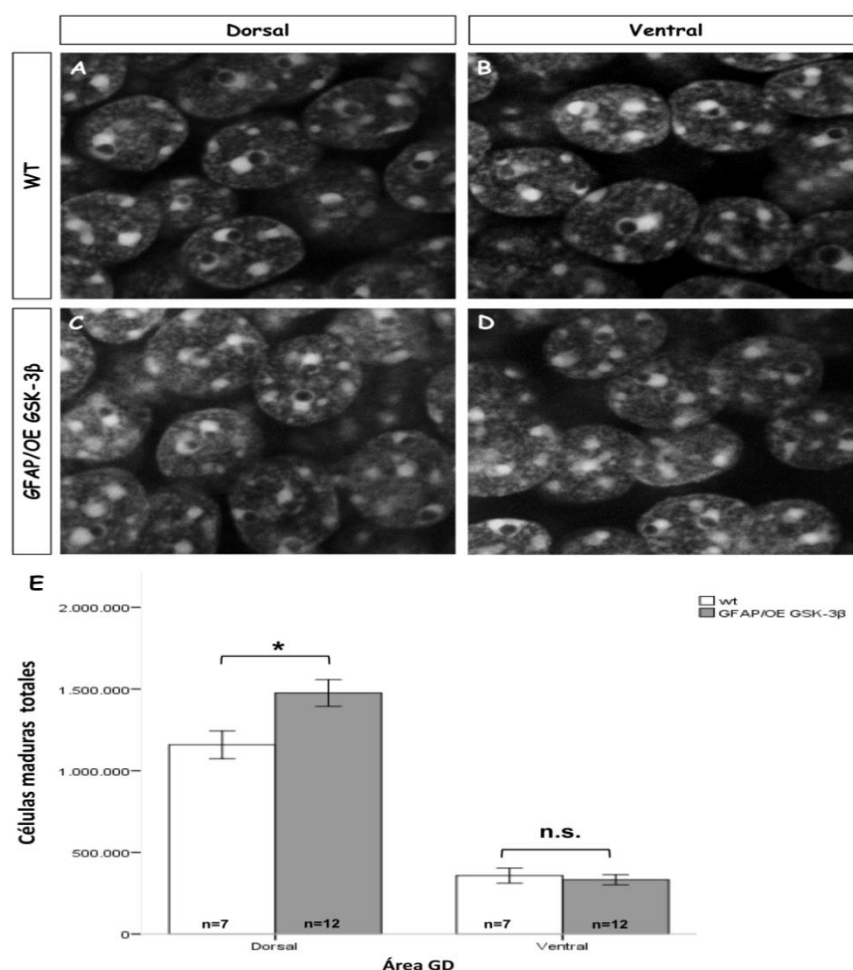


Figura 8. Cuantificación del número de neuronas granulares maduras. Marcaje de los núcleos de las neuronas granulares utilizando el colorante fluorescente DAPI. **A y B**, corresponden imágenes representativas de secciones de un ratón control. **C y D**, corresponden a fotografías representativas de secciones de un ratón GFAP/OE GSK-3 β . **E**, representación gráfica de la cuantificación de neuronas maduras totales llevada a cabo en ambos genotipos y en las regiones dorsal y ventral del GD. (ANOVA de dos vías; dorsal p= 0,015; ventral p= 1,00). *p<0,05; n.s.= no significativo.

5. Aumento del número de precursores neurales y neuroblastos en el ratón GFAP/OE GSK3 β .

Con los datos obtenidos hasta el momento, sabemos que los precursores neurales están sobreexpresando GSK3 β . Para profundizar en los posibles efectos que la sobreexpresión de la quinasa tiene sobre los precursores, nos propusimos cuantificar si existía alguna alteración en el número de precursores presentes en ambos genotipos.

Abordando la cuantificación mediante la técnica estereológica del disector físico, calculamos el número total de precursores presentes en ambos genotipos. Para ello se realizó un conteo del número total de células marcadas con BLBP en los grupos de animales con 3,5 meses de edad. Este recuento se realizó tanto en el GD dorsal (**Figura 9A, B**) como en la región ventral (**Figura 9C, D**). Tras el análisis se observó un incremento del número de precursores BLBP+, en el ratón GFAP/OE GSK3 β comparado con el ratón control (Wt= 6.382,19 \pm 1.650,01; GFAP/OE GSK3 β = 10.923,79 \pm 736,86 células). Este aumento únicamente se produce en la parte dorsal del GD mientras que no ocurre así en la parte ventral (Wt= 3.036,72 \pm 297,89; GFAP/OE GSK3 β = 3.666,73 \pm 496,99 células) (**Figura 9E**). De nuevo, se cumple la falta de alteración en la parte ventral del GD, manteniéndose la concordancia con los resultados anteriores referentes al volumen del GD y el número de neuronas granulares maduras.

Quisimos corroborar este resultado obtenido, utilizando otro marcador de precursores neurales como es Sox2. Siguiendo la misma metodología que la empleada con el marcador BLBP, cuantificamos el número total de células precursoras presentes en la SGZ en ambos genotipos. Los resultados obtenidos mostraron de nuevo una diferencia significativa en el número de progenitores neurales Sox2. El ratón transgénico para GSK3 β , presenta un mayor número que el ratón control en la región dorsal del GD (Wt= 19.828,90 \pm 2.592,96; GFAP/OE GSK3 β = 27.164,65 \pm 2.602,25 células) (**Figura 10A, B, E**). Del mismo modo que ocurría con BLBP, no se observaron diferencias entre ambos genotipos en la región ventral del GD (Wt= 6.462,87 \pm 1.447,94; GFAP/OE GSK3 β = 7036,10 \pm 721,31 células) (**Figura 10C, D, E**).

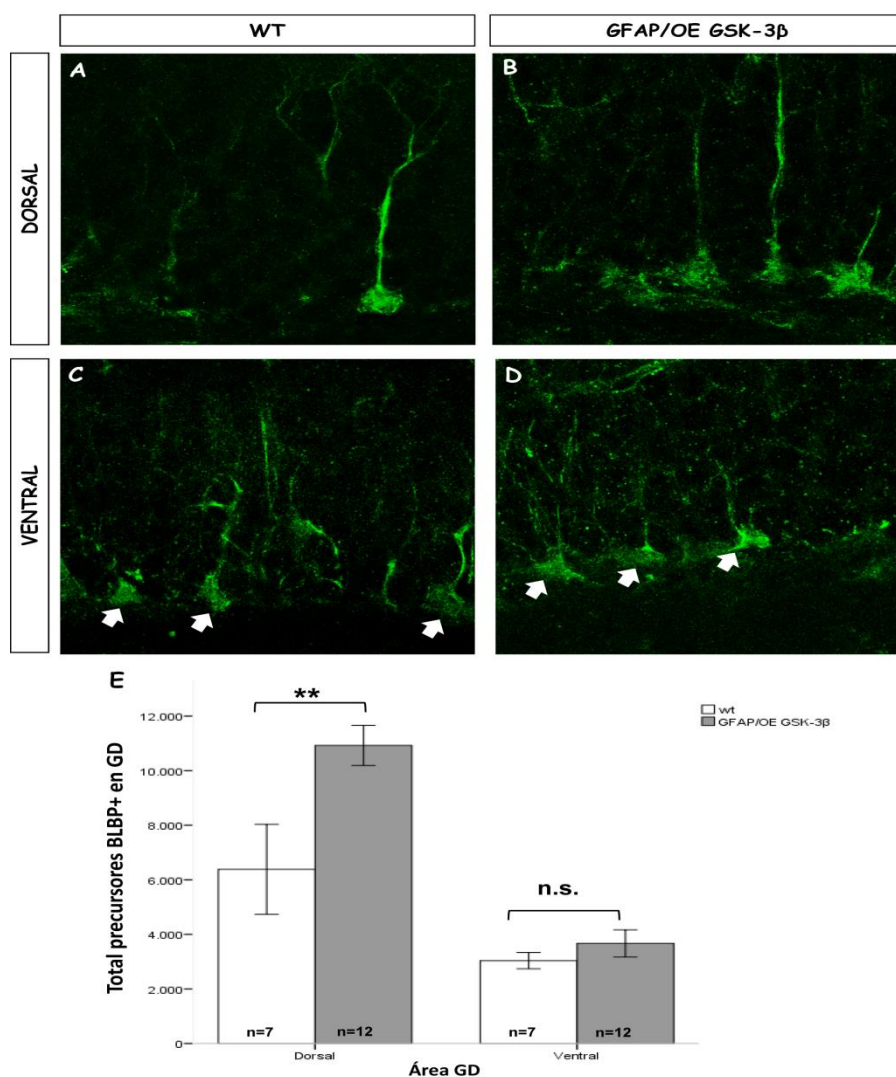


Figura 9. Recuento del número total de precursores neurales (BLBP+). Inmunofluorescencia con el anticuerpo BLBP en secciones sagitales de animales control (A, C) y de animales GFAP/OE GSK-3β (B, D). La cuantificación se llevó a cabo en la zona dorsal del GD (A, B) y en la zona ventral (C, D). En la parte inferior se muestra la gráfica de la cuantificación expresada en número total de precursores BLBP+ (E). (ANOVA de dos vías; dorsal $p=0,004$; ventral $p=1,00$). ** $p<0,01$; n.s.= no significativo. Las flechas blancas señalan células positivas para el marcador.

El paso siguiente que quisimos abordar fue continuar con el estudio de las alteraciones del número de precursores debido a la sobreexpresión de GSK3β. Así nos propusimos caracterizar el siguiente tipo celular del proceso de neurogénesis, los neuroblastos. Para ello, cuantificamos el número de estas neuronas de nueva generación, de estadio de diferenciación posterior a las que expresan BLBP y cuyo marcador característico es DCX.

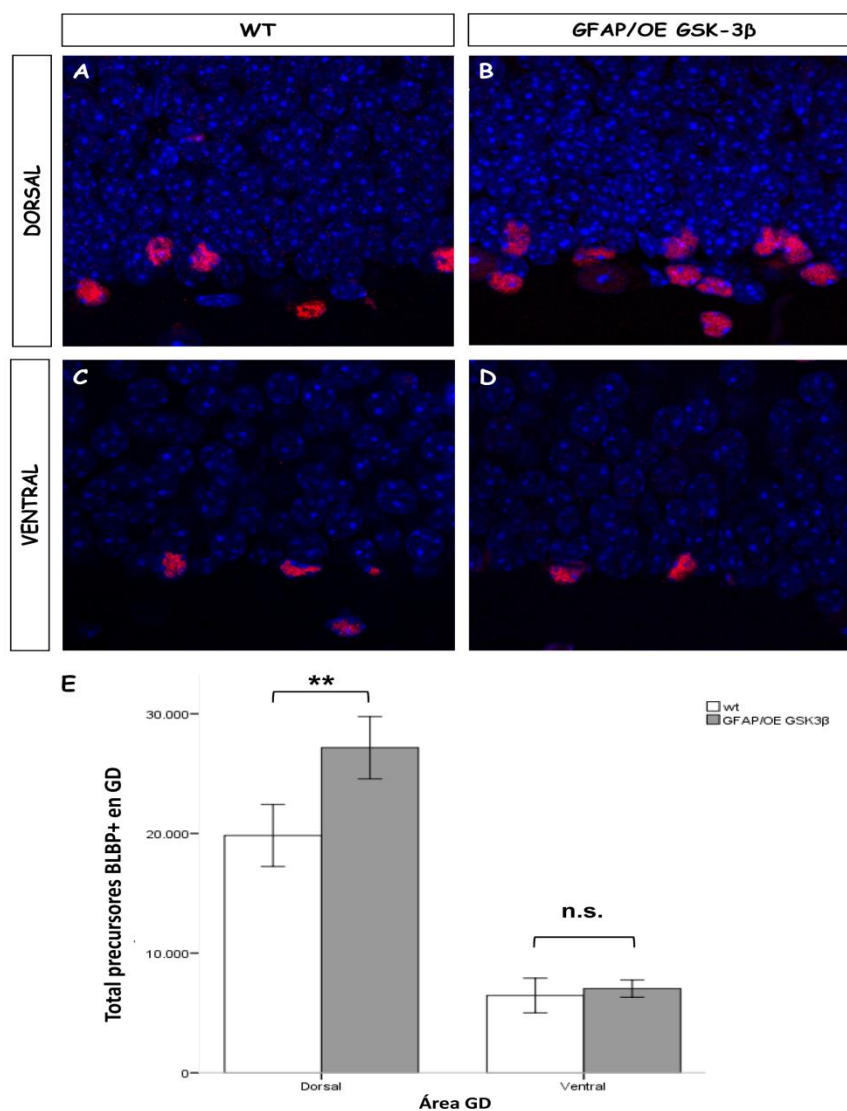


Figura 10. Recuento del número total de precursores neurales (Sox2+). Inmunofluorescencia con el anticuerpo Sox2 en secciones sagitales de animales control (A, C) y de animales GFAP/OE GSK-3 β (B, D). La cuantificación se llevó a cabo en la zona dorsal del GD (A, B) y en la zona ventral (C, D). En la parte inferior se muestra la gráfica de la cuantificación expresada en número total de precursores Sox2+ (E). (ANOVA de dos vías; dorsal $p=0,019$; ventral $p=0,848$). ** $p<0,01$; n.s.= no significativo.

Llevamos a cabo un recuento de células DCX+ totales en animales de 3,5 meses de edad, siguiendo la misma metodología que para el recuento de células BLBP+. Como en las cuantificaciones anteriores, el análisis lo realizamos tanto en el GD dorsal (Figura 11A, B) como en el ventral (Figura 11C, D). Cuando analizamos qué ocurría con esta población celular, pudimos observar de nuevo un aumento de estos neuroblastos en los ratones transgénicos en comparación con sus respectivos controles. De nuevo las diferencias observadas se restringían sólo a la parte dorsal (Wt= 8.633,98

$\pm 1.688,73$; GFAP/OE GSK3 β = $18.707,04 \pm 1535,44$ células), mientras que no se observaron diferencias significativas en el número total de células DCX+ en la parte ventral (Wt= $1.508,56 \pm 440,63$; GFAP/OE GSK3 β = $1.621,18 \pm 469,06$ células) (Figura 11E).

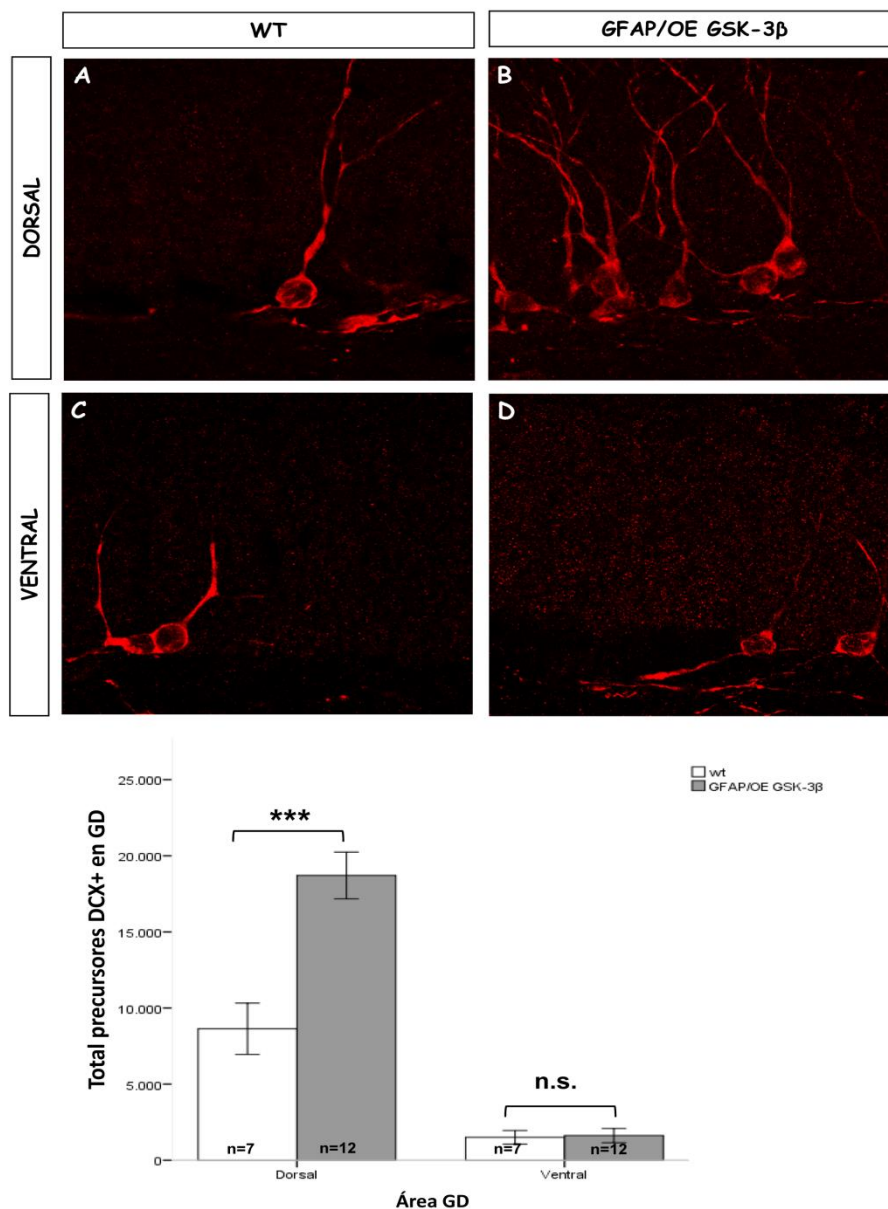


Figura 11. Cuantificación del número total de neuroblastos (DCX+). Inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo DCX en secciones sagitales de animales control (A, C) y de animales GFAP/OE GSK-3 β (B, D). El análisis se realizó tanto en la zona dorsal del GD (A, B) como en la zona ventral (C, D). En la parte inferior se muestra la representación gráfica de la cuantificación expresada en número total de neuroblastos DCX+ (E). (ANOVA de dos vías; dorsal $p= 0,000$; ventral $p= 1,00$). *** $p<0,001$; n.s.= no significativo.

6. El ratón GFAP/OE GSK3 β no presenta diferencias en cuanto a la tasa de proliferación celular.

Con los datos analizados hasta el momento, habíamos comprobado el aumento en el número de precursores neurales que presenta el ratón GFAP/OE GSK3 β con motivo de la sobreexpresión de GSK3 β . Nos preguntamos si este aumento podía estar causado por una mayor proliferación de los precursores neurales. Se planteaba la posibilidad que con motivo de la expresión del transgen, el exceso GSK3 β sobre las células madre neurales provocase una mayor división. Para profundizar en las causas que producen este aumento, el primer parámetro que quisimos analizar fue la tasa de proliferación. Para ello cuantificamos la proliferación celular que estaba teniendo lugar en el ratón control (**Figura 12A**) y en el ratón transgénico (**Figura 12B**). Para este fin, utilizamos el marcador para la proteína histona H3 fosforilada (PHisH3) que marca división celular, más concretamente, las células que se encuentran en fase M.

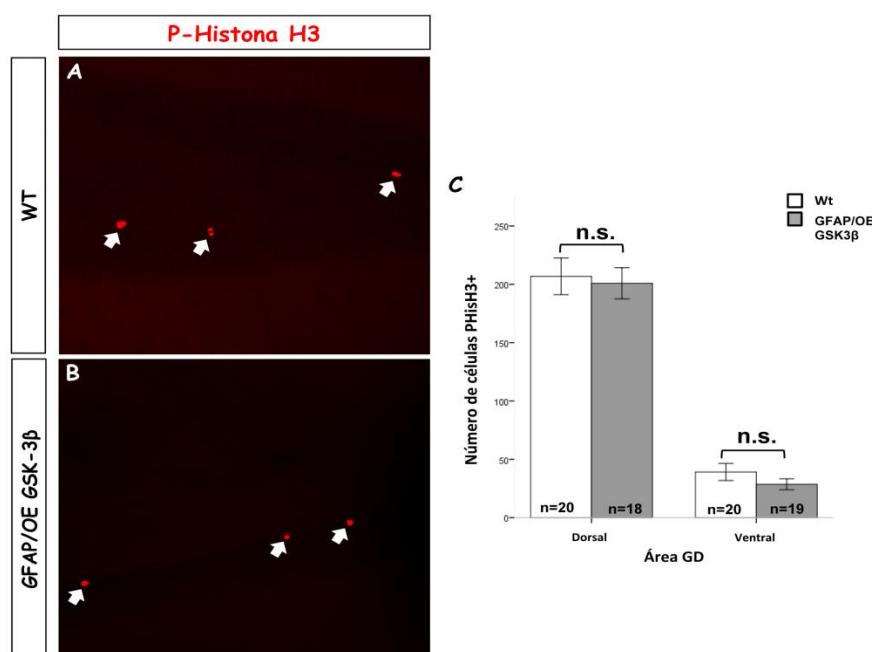


Figura 12. Análisis de la proliferación de los precursores neurales. Inmunofluorescencia utilizando el marcador de división celular de la histona 3 fosforilada (PHisH3). **A**, imagen representativa de la tinción en secciones sagitales de ratón control. **B**, imagen representativa de del marcaje en el ratón GFAP/OE GSK-3 β . **C**, Representación gráfica de la cuantificación realizada separando ambas regiones del GD y expresada como número total de células en división. (ANOVA de dos vías; dorsal p= 1,00; ventral p= 1,00). n.s.= no significativo. Las flechas blancas señalan las células marcadas con PHisH3.

La cuantificación se realizó en animales de 2 grupos diferentes, uno de ellos con 12 semanas de edad y el otro con 9 semanas de edad. El análisis se llevó a cabo tanto en el GD dorsal como ventral mediante la técnica del disector óptico. En esta ocasión, los resultados, tras el contaje del número total de células marcadas, mostraron que no había diferencias significativas en la tasa de proliferación entre ambos genotipos, ni en la región dorsal del GD (Wt= $206,8 \pm 15,66$; GFAP/OE GSK3 β = $200,89 \pm 13,35$ células), ni tampoco en la zona ventral (Wt= $39,2 \pm 7,34$; GFAP/OE GSK3 β = $28,63 \pm 4,71$ células) (Figura 12C).

7. El ratón GFAP/OE GSK3 β no presenta diferencias en supervivencia de las nuevas neuronas generadas.

En vistas del resultado que mostraba la ausencia de cambios en la división de los precursores, nos planteamos otra posibilidad como causante del aumento en el número de precursores neuronales. Así, es posible que se estuviese produciendo una mayor supervivencia de las nuevas neuronas que se están generando, resultando en el aumento del número de progenitores que observamos. Para tratar de responder esta pregunta, llevamos a cabo experimentos de seguimiento en el tiempo o *time course* utilizando marcaje con análogos de timidina. Estos análogos se incorporan al DNA de nueva síntesis cuando el precursor neuronal se está dividiendo, siendo capaces de detectarlos mediante técnicas de inmunofluorescencia.

Los diferentes grupos tratados, se sacrificaron a distintos tiempos. Así pudimos cuantificar las neuronas marcadas que todavía quedan presentes y que se produjeron en el momento de la inyección con los análogos. Empleando esta aproximación, podemos cuantificar si hay diferencias en el número de neuronas supervivientes en un determinado punto temporal entre ambos genotipos.

Llevamos a cabo el análisis de distintos puntos temporales, como son 24 horas (grupos de animales 1 y 2), 1 semana (grupo de animales 1) y 4 semanas post-inyección (grupo de animales 2). Cuantificamos el número de neuronas marcadas presentes utilizando la metodología del disector óptico.

En el grupo de una semana, los animales fueron inyectados con el análogo IdU.

Transcurridos 6 días los mismos animales fueron inyectados, pero esta vez con CldU. A las 24 horas de la inyección de CldU (7 días tras la inyección de IdU), los animales fueron sacrificados. Lo mismo con el grupo de 4 semanas. Los animales fueron inyectados con IdU y un día antes de cumplirse las 4 semanas, fueron inyectados con CldU. 24 horas post inyección de CldU y 4 semanas post inyección de IdU, los animales fueron sacrificados.

En primer lugar se cuantificó la supervivencia a 24 horas. Para ello contamos el número de neuronas marcadas con CldU que se generaron 24 horas antes (**Figura 13A, B**). Mediante la técnica del disector óptico se calculó el número de neuronas totales supervivientes tras 24 horas teniendo en cuenta, al realizar el análisis, las diferentes regiones del GD. Los resultados obtenidos mostraron que no había diferencias significativas entre ambos genotipos ni en la parte dorsal (Wt= $889 \pm 88,81$; GFAP/OE GSK3 β = $962,29 \pm 146,91$ células) ni tampoco en la ventral (Wt= $156 \pm 34,51$; GFAP/OE GSK3 β = $128 \pm 34,17$ células) (**Figura 13E**).

A continuación, cuantificamos el número de neuronas marcadas tras una semana de haber sido inyectados con IdU (**Figura 13C, D**). Utilizando la misma metodología obtuvimos el número total de neuronas supervivientes con una semana de edad en cada una de las regiones del GD. De nuevo, en este punto temporal tampoco se encontraron diferencias significativas entre los dos genotipos, ni en la parte dorsal (Wt= $353,45 \pm 73,31$; GFAP/OE GSK3 β = $232,67 \pm 70,62$ células) ni en la parte ventral (Wt= $34,18 \pm 9,35$; GFAP/OE GSK3 β = $19,33 \pm 7,78$ células), en cuanto a la supervivencia de las neuronas de nueva generación tras una semana (**Figura 13F**).

Por último, analizamos si encontrábamos diferencias en supervivencia a tiempos más largos. Para ello, utilizamos el grupo inyectado con IdU que habíamos tratado 4 semanas antes de sacrificarlo. Como en los casos anteriores, se contabilizó el número total de neuronas marcadas presentes en cada una de las regiones del GD, utilizando la misma metodología del disector óptico. Cuando contamos el número de neuronas marcadas que encontrábamos pasado un mes, no observamos diferencias significativas entre el ratón que sobreexpresa GSK3 β , en comparación con el ratón control, en ninguna de las dos zonas, la dorsal (Wt= $215 \pm 31,66$; GFAP/OE GSK3 β = $265,14 \pm 93,61$ células) y la ventral (Wt= $34 \pm 11,78$; GFAP/OE GSK3 β = $17,33 \pm 4,34$ células) (**Figura 13G**).

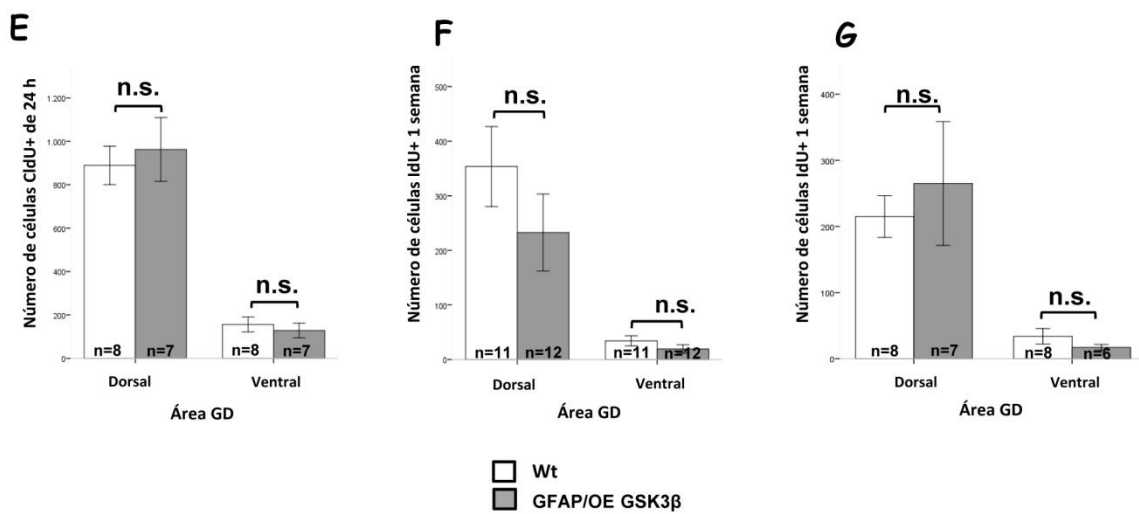
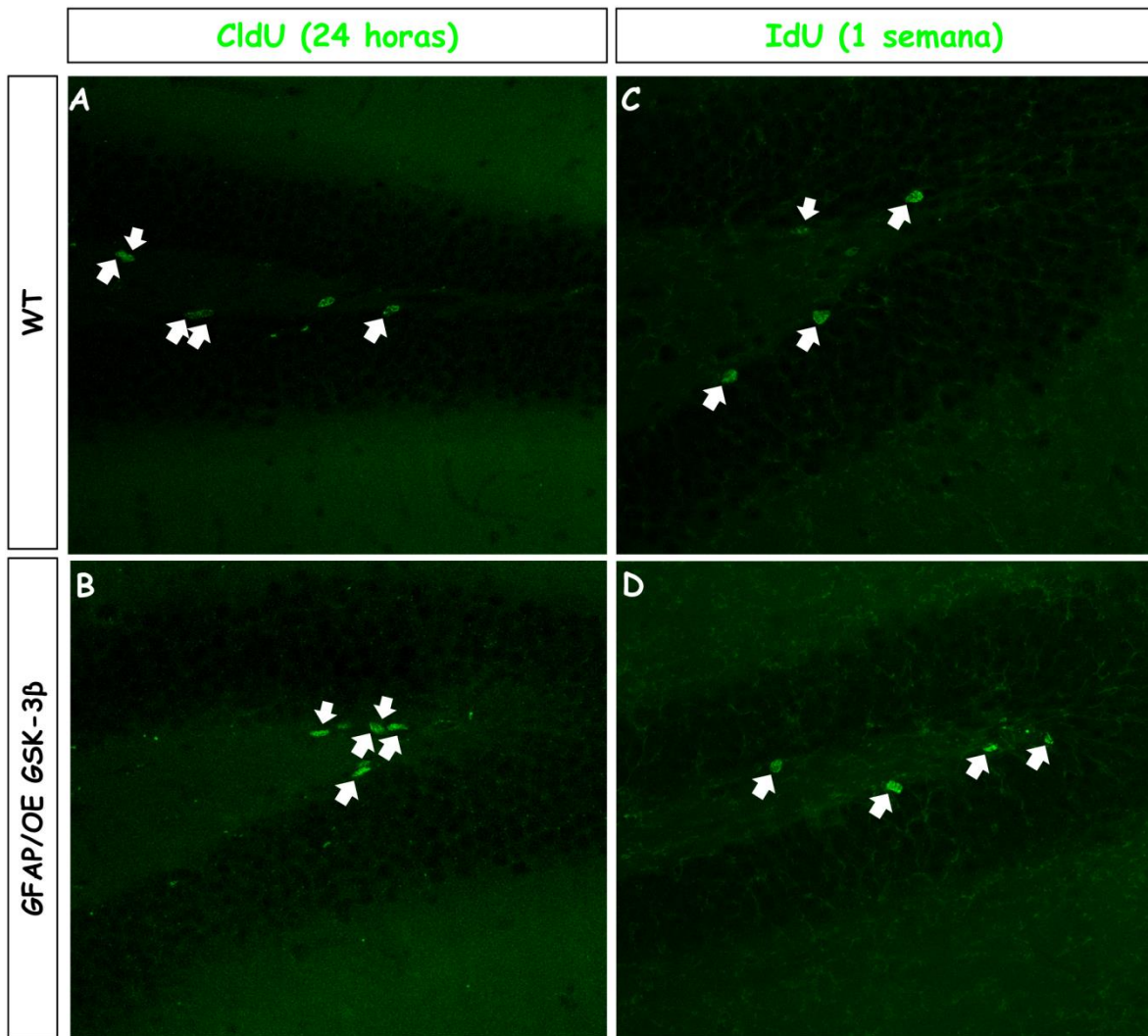


Figura 13. Estudio de la supervivencia de las nuevas neuronas generadas. Inmunofluorescencia contra análogos de timidina inyectados a distintos tiempos. **A y B**, imágenes representativas de células marcadas con el análogo CldU 24 horas antes del sacrificio (grupos 1 y 2) en ratones control (**A**) y transgénico (**B**). **C y D**, fotografías en secciones sagitales mostrando la detección del análogo IdU inyectado una semana antes del día de sacrificio de los animales (grupo 1), en ratones control (**C**) y GFAP/OE GSK-3 β (**D**). **E**, cuantificación de la supervivencia de neuronas totales con 24 horas de edad (grupos 1 y 2). (ANOVA de dos vías; dorsal p= 1,00; ventral p= 1,00). **F**, gráfico de la cuantificación de la supervivencia del total de neuronas con 1 semana de edad (grupo 1). (ANOVA de dos vías; dorsal p= 0,619; ventral p= 1,00). **G**, representación gráfica de la cuantificación de la supervivencia de las nuevas neuronas generadas con 4 semanas de edad (grupo 2) expresado como total de neuronas supervivientes. (ANOVA de dos vías; dorsal p= 1,00; ventral p= 1,00). n.s.= no significativo. Las flechas blancas señalan células que incorporaron el análogo de timidina en el momento de su generación.

A la vista de estos experimentos de *time course*, donde se ha investigado la supervivencia a diferentes tiempos, nuestro ratón transgénico no parece presentar ninguna alteración en el parámetro de supervivencia. Las neuronas que se están generando fruto de la neurogénesis adulta, no presentan una supervivencia diferencial, a pesar que un porcentaje del reservorio de precursores neurales esté sobreexpresando GSK3 β .

8. El ratón GFAP/OE GSK3 β no presenta diferencias en la maduración de las células con 4 semanas de edad.

Tras comprobar que no había diferencias en la supervivencia celular, quisimos profundizar más en cómo eran estas neuronas de nueva generación de 4 semanas de edad. Así, analizamos la expresión de otros marcadores de diversas fases de maduración. Para ello, cuantificamos el porcentaje de células de 4 semanas, que expresaban el marcador de neuroblastos doblecortina (DCX), así como un marcador de neurona más madura y ya postmitótica como es la calbindina.

El análisis se realizó estudiando la coexpresión de estos marcadores con los análogos de timidina y empleando microscopia confocal, cuantificando el porcentaje de células positivas para la combinación de estos marcadores.

Comenzando con la ausencia de coexpresión, los resultados no mostraron diferencias significativas entre ambos genotipos, en el número de neuronas marcadas

con IdU y que no expresaban ni DCX, ni Calbindina (Wt= 26,02%; GFAP/OE GSK3 β = 28,07%) (**Figura 14A**).

Continuando con la coexpresión de IdU y DCX, los recuentos de células mostraron que tampoco existía una variación en el porcentaje de células de 4 semanas que expresaban DCX (Wt= 28,46%; GFAP/OE GSK3 β = 20,18%) (**Figura 14B**). El mismo proceso se llevó a cabo para contabilizar la colocación de los marcadores IdU y Calbindina. Como en el caso anterior, los resultados no mostraron diferencias significativas en los porcentajes de células que coexpresan los dos marcadores entre ambos genotipos (Wt= 42,28%; GFAP/OE GSK3 β = 36,84%) (**Figura 14C**). Esto nos estaría indicando que la proporción de nuevas neuronas con 4 semanas de edad que están expresando un determinado tipo de marcador se conserva invariable a pesar de la sobreexpresión de GSK3 β bajo el promotor GFAP.

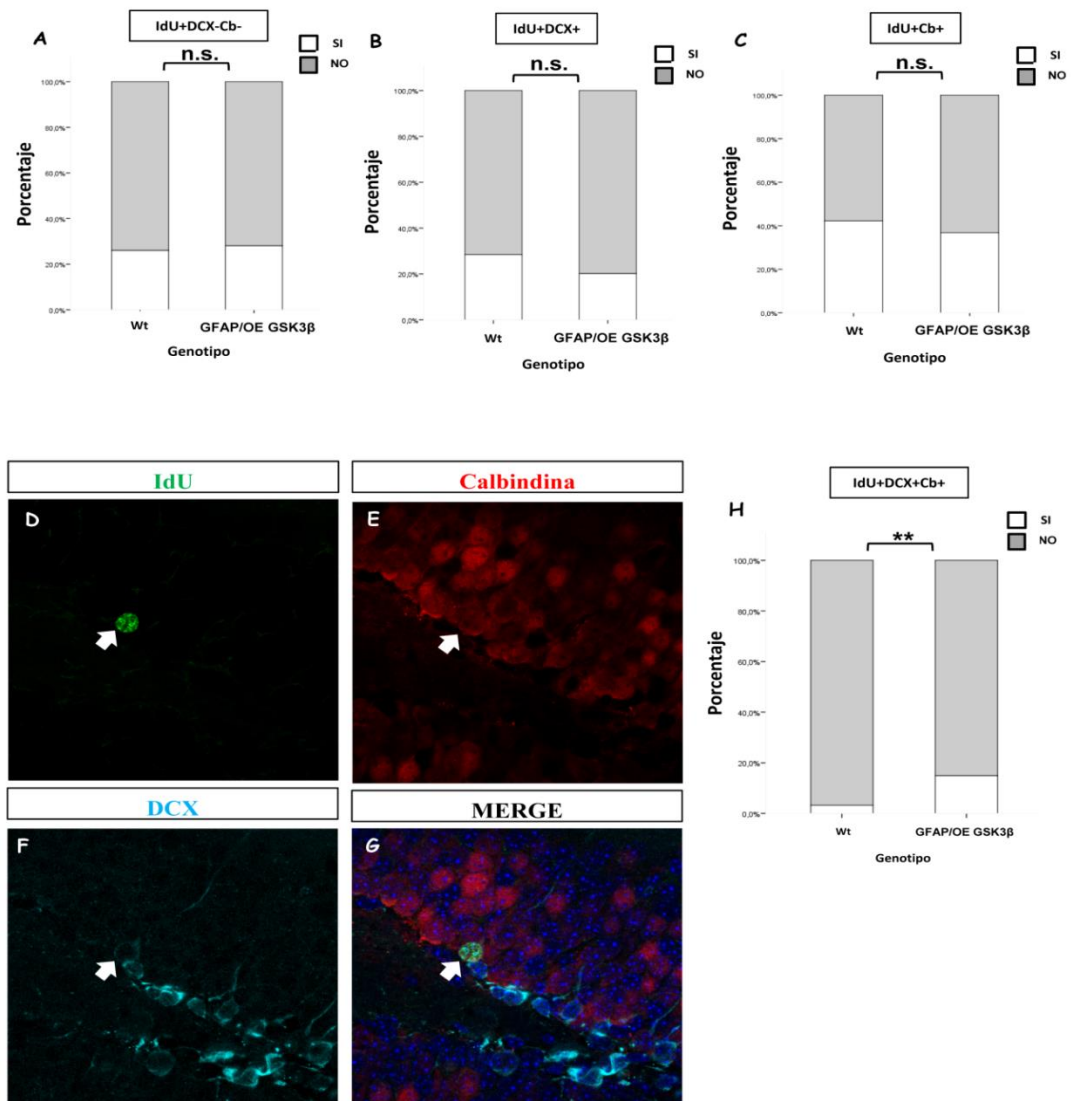


Figura 14. Estudio de la maduración de las neuronas con 4 semanas de edad. **A**, gráfico de la cuantificación del número de neuronas IdU positivas que no coexpresaban DCX o Calbindina, expresado como porcentaje (Chi-cuadrado de Pearson, χ^2 p= 0,771). **B**, representación gráfica del conteo de neuronas que coexpresaban al mismo tiempo IdU y DCX (Chi-cuadrado de Pearson, χ^2 p= 0,173). **C**, gráfico de la cuantificación del número de neuronas que coexpresaban IdU y Calbindina (Chi-cuadrado de Pearson, χ^2 p= 0,427). Triple inmunofluorescencia con los anticuerpos IdU (**D**), Calbindina (**E**) y DCX (**F**) en secciones sagitales de ratones inyectados con el análogo de timidina IdU 4 semanas antes del sacrificio. **G**, mezcla de los tres canales mostrados en D, E y F con tinción de núcleos con DAPI en azul. **H**, representación gráfica de la cuantificación de neuronas de 4 semanas que coexpresaban DCX y Calbindina (Chi-cuadrado de Pearson, χ^2 p= 0,002). **p<0,01; n.s.= no significativo. Las flechas blancas señalan células positivas para los 3 marcadores.

Para finalizar, analizamos la proporción de estas neuronas de 4 semanas de edad, que estaban expresando simultáneamente, tanto DCX como Calbindina (**Figura 14D-G**). Siguiendo la misma metodología, se cuantificó las células triplemente marcadas. En esta ocasión, los resultados sí que arrojaban diferencias significativas entre ambos genotipos (Wt= 3,25%; GFAP/OE GSK3 β = 14,91%). Observamos que el animal transgénico GFAP/OE GSK3 β en comparación con el ratón control, presenta una mayor proporción de estas células que muestran a la vez el marcaje de IdU, DCX y Calbindina (**Figura 14H**).

9. El ratón GFAP/OE GSK3 β no muestra diferencias en la reentrada en el ciclo celular de los precursores neuronales con motivo de la sobreexpresión de GSK3 β .

Tras estudiar qué estaba ocurriendo en la tasa de proliferación celular y en la supervivencia celular de las nuevas neuronas producidas, comprobamos que no había alteraciones en nuestro ratón transgénico con respecto al control. Por ello, nos propusimos estudiar cómo se estaban dividiendo los precursores neuronales. De esta forma, no estaríamos observando únicamente un punto fijo en el tiempo, como es la proliferación marcada con PHisH3. El objetivo era analizar si la sobreexpresión de GSK3 β estaba produciendo diferencias en la reentrada en el ciclo de división en los precursores neuronales.

Para ello utilizamos de nuevo la herramienta de los análogos de timidina,

inyectando uno de ellos (IdU) y a las 12 horas el otro (CldU) (grupo de animales 3). Transcurridas dos horas desde la inyección de la CldU los animales fueron sacrificados. Con este protocolo y aprovechando la detección diferencial de ambos análogos, somos capaces de ver qué precursores se estaban dividiendo tras la primera inyección de análogos y cuales tras la segunda (**Figura 15A, B**). De este modo, también podremos determinar el porcentaje de precursores que se dividieron en ambas rondas de marcaje, pues estarán doblemente marcados con los anticuerpos contra ambos análogos.

Se llevó a cabo la cuantificación, utilizando un microscopio confocal y contando un número suficiente (mínimo 1000 células) por genotipo. El porcentaje de precursores doblemente marcados y, por tanto, que se han dividido al menos dos veces con 12 horas de diferencia, no difería de manera significativa entre ambos genotipos (Wt= 13,22%; GFAP/OE GSK3 β = 12,11%) (**Figura 15C**).

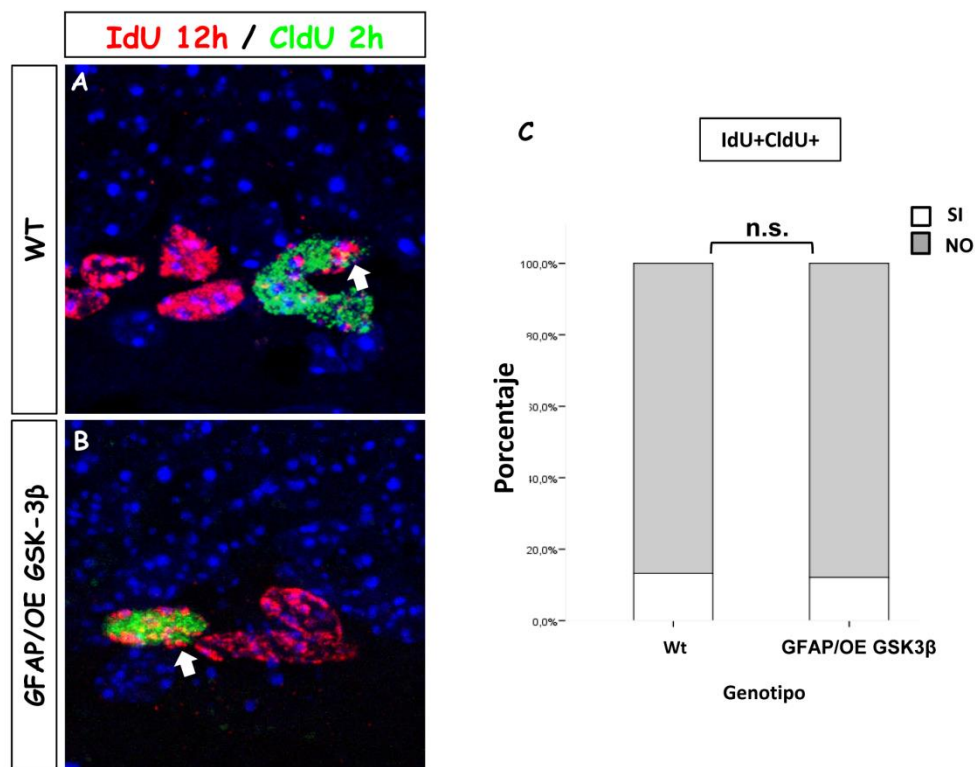


Figura 15. Estudio de la reentrada en ciclo de división celular de los precursores neurales. **A** y **B**, doble inmunofluorescencia detectando los dos análogos de timidina inyectados a distintos tiempos (grupo 3) en ratones control (**A**) y en ratones GFAP/OE GSK-3 β (**B**), con los núcleos marcados en azul con DAPI. **C**, cuantificación del recuento del número de células que coexpresan los análogos IdU y CldU, expresado como porcentaje (Chi-cuadrado de Pearson, χ^2 p= 0,488). n.s.= no significativo. Las flechas blancas señalan células positivas para los 2 análogos de timidina inyectados.

Intentando profundizar un poco más y de forma similar a la realizada en células de 4 semanas de edad, realizamos dobles inmunofluorescencias utilizando marcadores de las distintas fases del proceso neurogénico. Empleando microscopia confocal y siguiendo la misma metodología que hasta ahora, cuantificamos el porcentaje de células que coexpresaban IdU y DCX (**Figura 16A-F**). Los resultados obtenidos muestran diferencias significativas, con un mayor porcentaje de células IdU+ (con 14 horas de edad), que también expresan DCX en los animales controles comparado con el ratón que sobreexpresa GSK3 β (Wt= 13,22%; GFAP/OE GSK3 β = 8,73%) (**Figura 16G**).

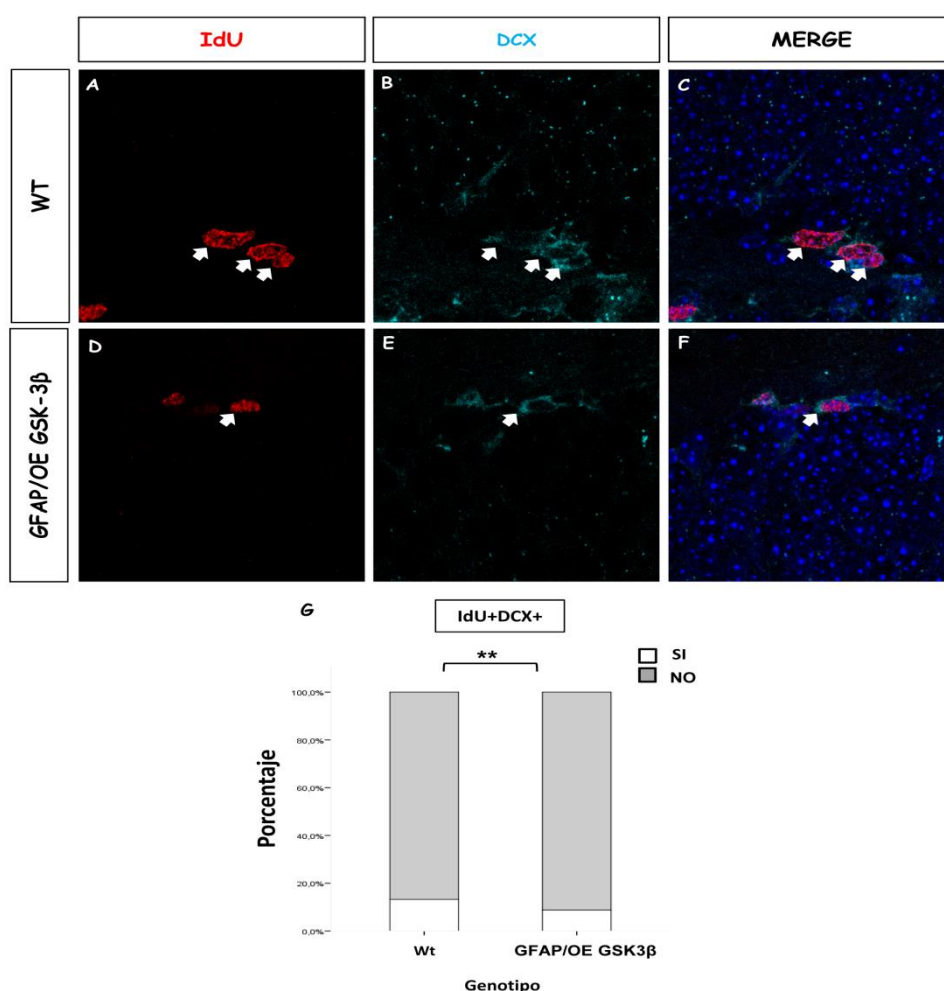
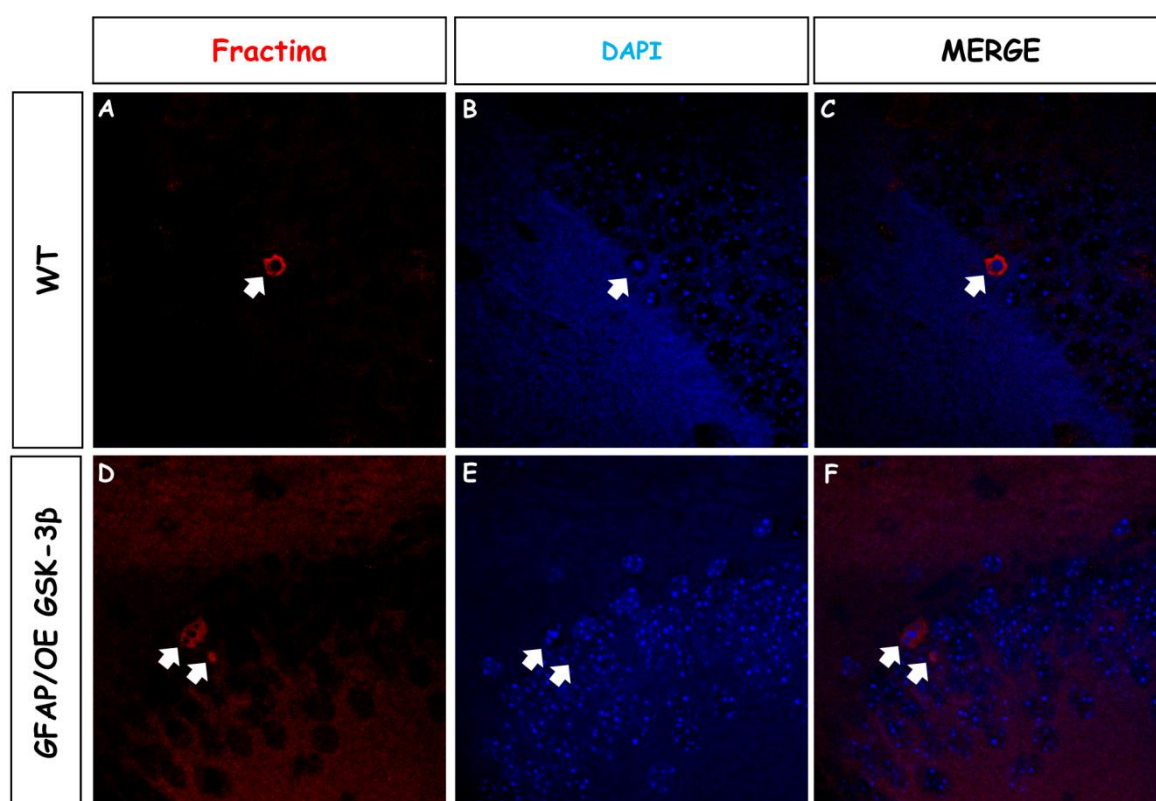


Figura 16. Estudio de la expresión de marcadores en neuronas de 12 horas de edad. Doble inmunofluorescencia en secciones sagitales de animales control (**A-C**) y de animales transgénicos (**D-F**), frente al análogo de timidina IdU y el marcador DCX. **C y F**, mezcla de los canales de ambos anticuerpos, con los núcleos teñidos por DAPI en azul. **G**, cuantificación del número de células marcadas con IdU que coexpresan el marcador DCX, expresado en porcentaje (Chi-cuadrado de Pearson, χ^2 p= 0,002). **p<0,01. Las flechas blancas señalan células positivas para los 2 marcadores.

10. En el ratón GFAP/OE GSK3 β aparece la tendencia a una mayor muerte neuronal.

Un parámetro bien conocido en el proceso de neurogénesis adulta es la muerte de un elevado porcentaje de las nuevas neuronas producidas, las cuáles no alcanzarán el estadio de neuronas maduras. Nos propusimos, por tanto, cuantificar en el ratón transgénico de sobreexpresión de GSK3 β y en el ratón control si había alguna diferencia en la tasa de muerte celular en el GD. Hasta el momento, habíamos observado un aumento en las células BLBP+ y DCX+, pero no pudimos detectar ninguna variación en la supervivencia de las células de nueva generación que quedaban tras un mes de haber sido marcadas. Con estos datos, la hipótesis que nos planteamos fue si aunque hubiese mayor número de progenitores, éstos podrían morir en una mayor proporción que lo hacen en el ratón control.

Utilizamos los ratones del grupo de animales 3, y realizamos inmunofluorescencia con el anticuerpo fractina (**Figura 17A-F**). Este es un marcador de apoptosis que aparece por la proteólisis de la actina cuando se está produciendo el proceso de muerte celular.



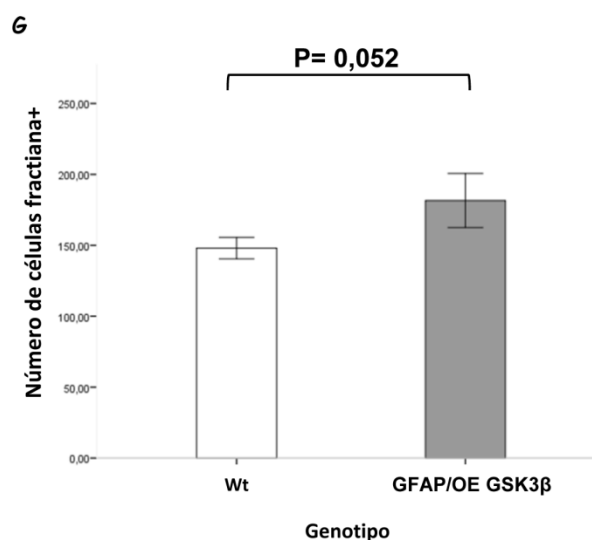


Figura 17. Análisis de la muerte celular en la SGZ en el ratón GFAP/OE GSK-3β. **A-F**, inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo contra fractina (**A, D**) en cortes sagitales de ratones control (**A-C**) y transgénico (**D-F**). Los núcleos de las neuronas granulares aparecen teñidos en azul utilizando DAPI (**B, E**). Los paneles **C y F** muestran la mezcla de ambos canales. **G**, representación gráfica de la cuantificación del número total de células fractina positivas presentes en ambos genotipos. (t- Student $p = 0,052$). Las flechas blancas muestran células fractina positivas.

Mediante la técnica de disector óptico, cuantificamos el número de células fractina+ presentes en el GD en ambos genotipos. Se contabilizaron las células marcadas dentro de la SGZ, para intentar excluir del contaje la muerte de neuronas maduras. Tras el análisis de los resultados se pudo ver una tendencia, al borde de la significatividad, de un mayor número de células fractina+ o lo que es lo mismo una tendencia mayor de muerte neuronal en el ratón GFAP/OE GSK3β comparado con el control ($Wt = 148 \pm 7,57$; $GFAP/OE GSK3\beta = 181,6 \pm 19,08$ células) (**Figura 17G**).

Para profundizar un poco más, quisimos ver cuál era el tipo celular que estaba sufriendo dicho proceso apoptótico. Para ello realizamos dobles inmunofluorescencias utilizando el anticuerpos de fractina junto a DCX para marcar neuroblastos (**Figura 18A-D**) o con el análogo de timidina IdU inyectado 14 horas antes (**Figura 18E-H**). En la mayoría de células fractina positivas no se aprecia colocación con estos marcadores, pues su estado de muerte es muy avanzado. Sin embargo, en algunas de las células que estaban sufriendo apoptosis si se pudo observar colocación con estos dos marcadores.

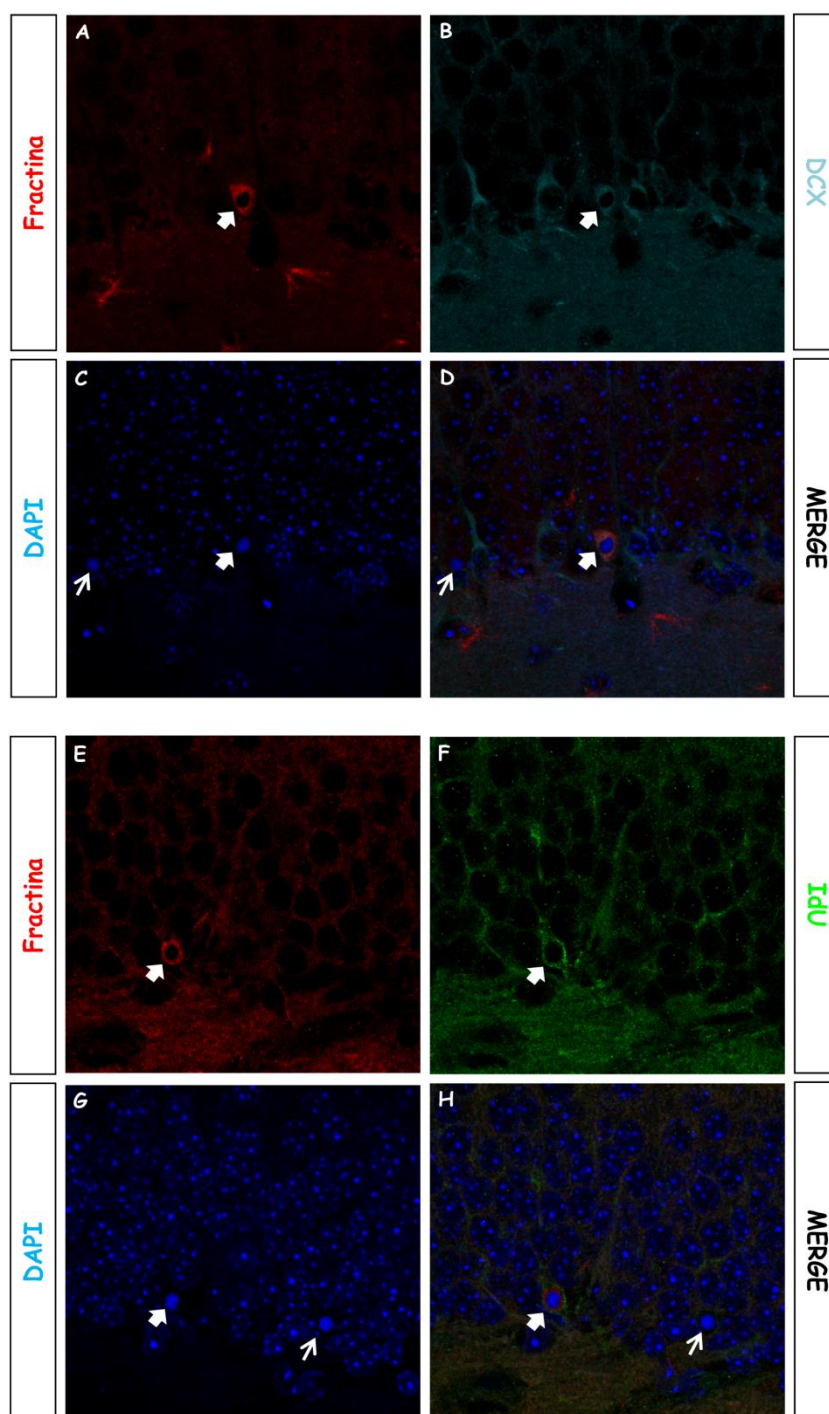


Figura 18. Estudio de la muerte de progenitores tempranos y neuroblastos. Doble inmunofluorescencia en cortes sagitales de ratón GFAP/OE GSK-3 β . Los anticuerpos utilizados han sido fractina (A y E), DCX (B) e IdU (F). Los núcleos aparecen marcados con DAPI en los paneles C y G. Los paneles D y E muestran la mezcla de los tres canales anteriores. Las flechas blancas gruesas muestran las células que coexpresan ambos marcajes. Las flechas blancas finas señalan núcleos apoptóticos marcados con DAPI pero no positivos para fractina.

11. El ratón GFAP/OE GSK3 β no presenta alteración en la enzima sintetizadora de glucógeno ni en las cantidades de éste en el cerebro.

GSK3 β es una enzima esencial en el metabolismo del glucógeno y son los astrocitos en los que reside el glucógeno dentro del cerebro. Como hemos señalado anteriormente, la expresión del transgen tiene lugar también en astrocitos por lo que quisimos profundizar, si el metabolismo del glucógeno podría estar alterado en el ratón transgénico con motivo de la expresión del transgen.

Analizamos mediante *western blot*, en extractos de hipocampo de ratones transgénicos y control, si había variaciones en la enzima encargada de sintetizar el glucógeno, la glucógeno sintasa (**Figura 19A**). Se analizó tanto la forma total de la enzima como la forma inhibida de la misma, cuando está fosforilada. Como control de los animales transgénicos se muestra la expresión de β -Gal en ellos y como control de carga se utilizó la detección de la proteína actina. Los resultados mostraron que no había diferencia en el ratio normalizado de la forma fosforilada frente a la cantidad total de glucógeno sintasa (**Figura 19B**).

Otro experimento que llevamos a cabo, fue analizar si había alteraciones en las cantidades de glucógeno presentes en el cerebro de los ratones que sobreexpresan GSK3 β en comparación con los controles. Quisimos comprobar si el exceso de actividad de GSK3 β en astrocitos podría estar alterando las reservas energéticas cerebrales. Para ello determinamos tanto la glucosa en forma libre, como la glucosa total tras la hidrólisis del glucógeno presente. Los resultados mostraron que no había diferencias en las cantidades de glucosa, ni libre ni total, entre ambos genotipos (**Figura 19C**). A la vista de los resultados obtenidos, la expresión del transgen en células astrocíticas no altera el metabolismo del glucógeno cerebral en los ratones GFAP/OE GSK3 β .

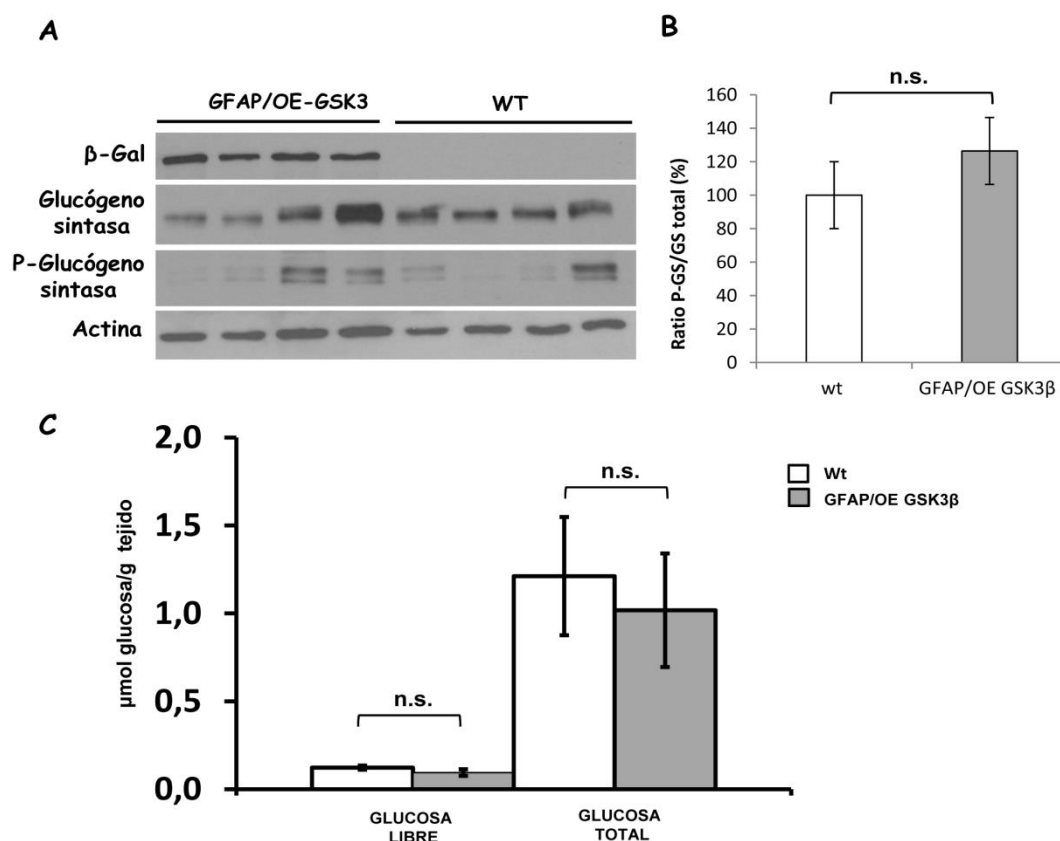


Figura 19. Efectos de la expresión del transgen sobre el metabolismo de la glucosa. **A, B,** *western blot* en extractos de hipocampo de animales transgénicos y controles utilizando los anticuerpos β-Gal, glucógeno sintasa y glucógeno sintasa en su forma inactiva por estar fosforilada. Como control de carga se ha utilizado actina. **C,** representación gráfica de la cuantificación de los niveles relativos de la forma fosforilada y total de la glucógeno sintasa normalizados por su correspondiente control de carga. Los resultados se expresan como porcentaje de variación con respecto al control. (U de Mann-Whitney $p=0,73$). **D,** cuantificación de la cantidad de glucosa total presente en el cerebro, determinada a partir de cortezas cerebrales de ratones transgénicos y control de 5 meses de edad. El resultado se expresa en μmoles de glucosa/ gramo de tejido. (U de Mann-Whitney; glucosa libre $p=0,114$; glucosa total $p=0,686$). n.s.= no significativo.

12. El ratón GFAP/OE GSK3 β presenta mayor abundancia de microglía en el GD.

Otro aspecto importante, por el papel que puede desempeñar sobre la neurogénesis, es el estado de la gliosis. La microglía, es un componente importante cuya actividad influye en el correcto funcionamiento del hipocampo. Se ha visto que se puede activar por un proceso inflamatorio (Ekdahl, Claasen et al. 2003; Monje, Toda et al. 2003; Butovsky, Ziv et al. 2006) o cuando se estimula la neurogénesis mediante un protocolo de enriquecimiento ambiental (Ziv, Ron et al. 2006). Son varios los trabajos que apoyarían que esta activación juega un papel crucial en el proceso de neurogénesis adulta, pudiendo afectarla de manera tanto favorable como deletérea (Ekdahl, Claasen et al. 2003).

Estudios previos de nuestro laboratorio ya han demostrado que la sobreexpresión de GSK3 β en neuronas produce un incremento y activación de la microglía, debido al desencadenamiento de un proceso inflamatorio (Lucas, Hernandez et al. 2001; Engel, Hernandez et al. 2006; Sirerol-Piquer, Gomez-Ramos et al. 2011). Por todo esto, nos propusimos investigar el estado en que se encontraba la microglía en el ratón transgénico GFAP/OE GSK3 β . En este ratón, la sobreexpresión del transgen también puede estar produciendo un ambiente fisiológico alterado que podría estar conduciendo a la activación microglial.

Para cuantificar si existía alguna variación cuantitativa en la microglía, realizamos inmunofluorescencia contra el anticuerpo específico de microglía Iba-1 (**Figura 20A-D**). Mediante disector físico cuantificamos el número total de células microgliales presentes dentro del GD en cada uno de los genotipos. Este conteo nos indicó, que existen diferencias significativas en la cantidad de este tipo celular entre los dos genotipos. En este caso, el ratón transgénico para GSK3 β presenta mayor número de microglía dentro de su GD comparado con un ratón control. De nuevo en este conteo, diseccionamos la cuantificación para ambas estructuras dentro del GD. Como ocurría para los parámetros del volumen de GD, número de maduras o número de precursores, podemos apreciar una diferencia significativa dentro del GD dorsal (Wt= $7624,75 \pm 338,01$; GFAP/OE GSK3 β = $9130,58 \pm 283,12$ células), mientras que no observamos diferencias en el GD ventral (**Figura 20E**).

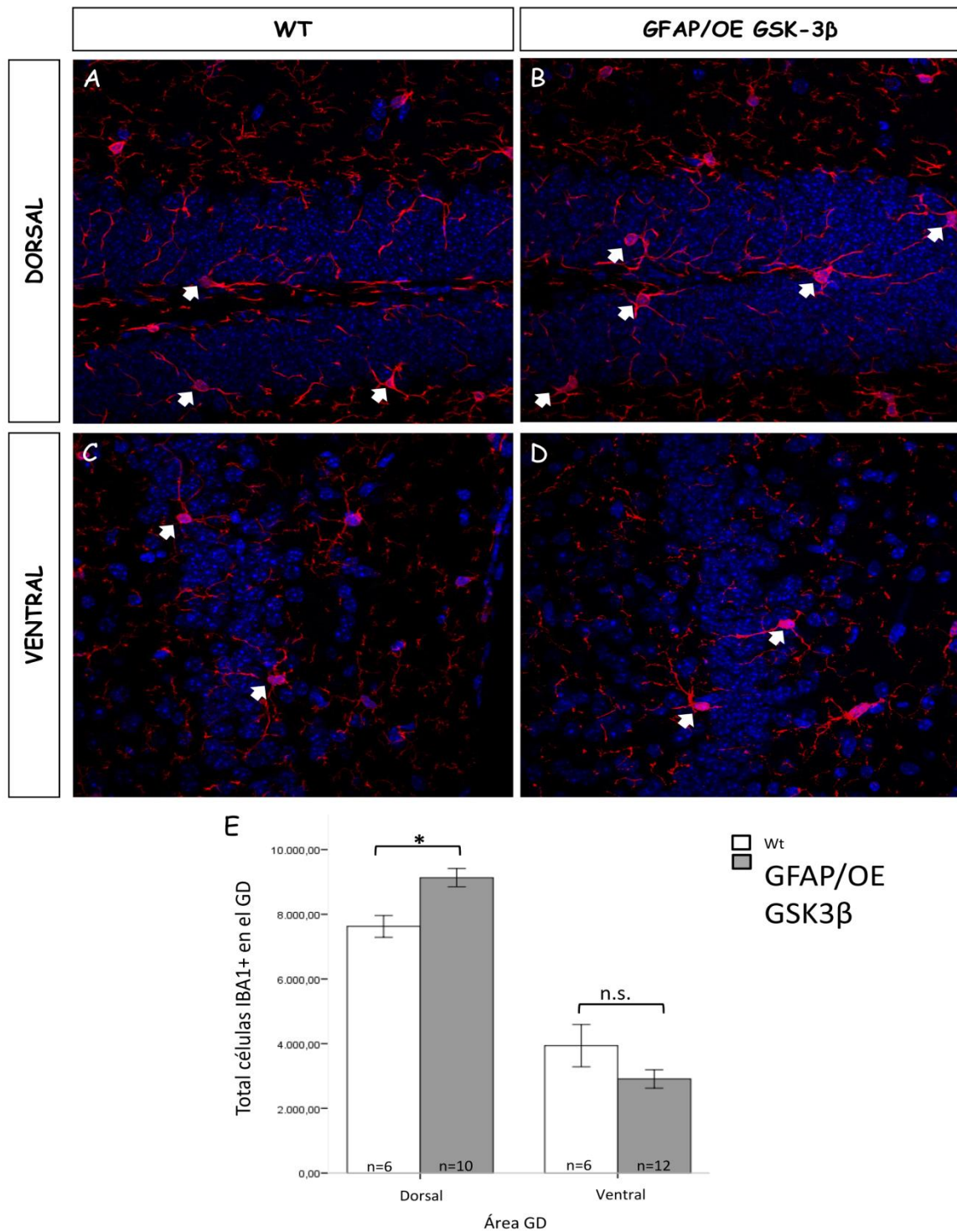


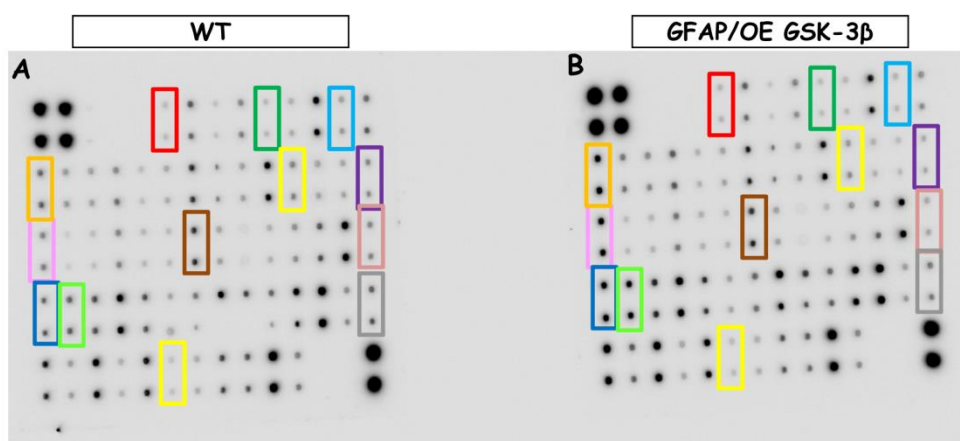
Figura 20. Estudio cuantitativo de microglía presente en el GD. Inmunofluorescencia en cortes sagitales utilizando el anticuerpo específico de microglía IBA-1, en cortes de ratones control y transgénicos para la sobreexpresión de GSK-3 β respectivamente. Los núcleos aparecen teñidos en azul con DAPI. El análisis se realizó tanto en la zona dorsal del GD (A, B) como en la zona ventral (C, D). En la parte inferior se muestra la representación gráfica de la cuantificación expresada como número total de células microgliales (E). (ANOVA de dos vías; dorsal $p=0,011$; ventral $p=0,064$). * $p<0,05$; n.s.= no significativo. Las flechas blancas señalan células microgliales.

13. El perfil de citoquinas secretadas se encuentra alterado en el ratón GFAP/OE GSK3 β .

13.1. Array de citoquinas

Los resultados anteriores nos mostraban las diferencias cuantitativas existentes al estudiar la microglía. Las células microgliales se caracterizan por sus propiedades fagocíticas, tras ser activadas cuando existe un daño dentro del SNC. Además, también son capaces de secretar diferentes mediadores y quimioatrayentes que modulan el ambiente de la región dañada. Estas sustancias liberadas por la microglía, a su vez, reclutarán y harán migrar a la zona dañada otras células como los linfocitos que participarán en este proceso inflamatorio. Estas células del sistema inmune llevan a cabo la reacción inflamatoria en la cual se liberan numerosos mediadores pro- y anti-inflamatorios, citoquinas y especies reactivas de oxígeno. Esta respuesta inflamatoria multifactorial afectará a la neurogénesis adulta, tanto de forma favorable como adversa (Das and Basu 2008; Miller, Rostene et al. 2008; Whitney, Eidem et al. 2009).

Nos propusimos realizar un estudio para analizar cómo se encontraban los niveles de citoquinas en el ratón GFAP/OE GSK3 β . Para ello, utilizamos un *array* comercial que recogía una amplia batería de estas citoquinas junto a algunos factores de crecimiento y transductores de vías de señalización, muchas de los cuales son producidas y secretadas en la reacción desencadenada por la activación microglial. De este modo, pudimos analizar si existía algún tipo de variación en los niveles de las distintas citoquinas entre los animales transgénicos y los controles (**Figura 21A, B**).



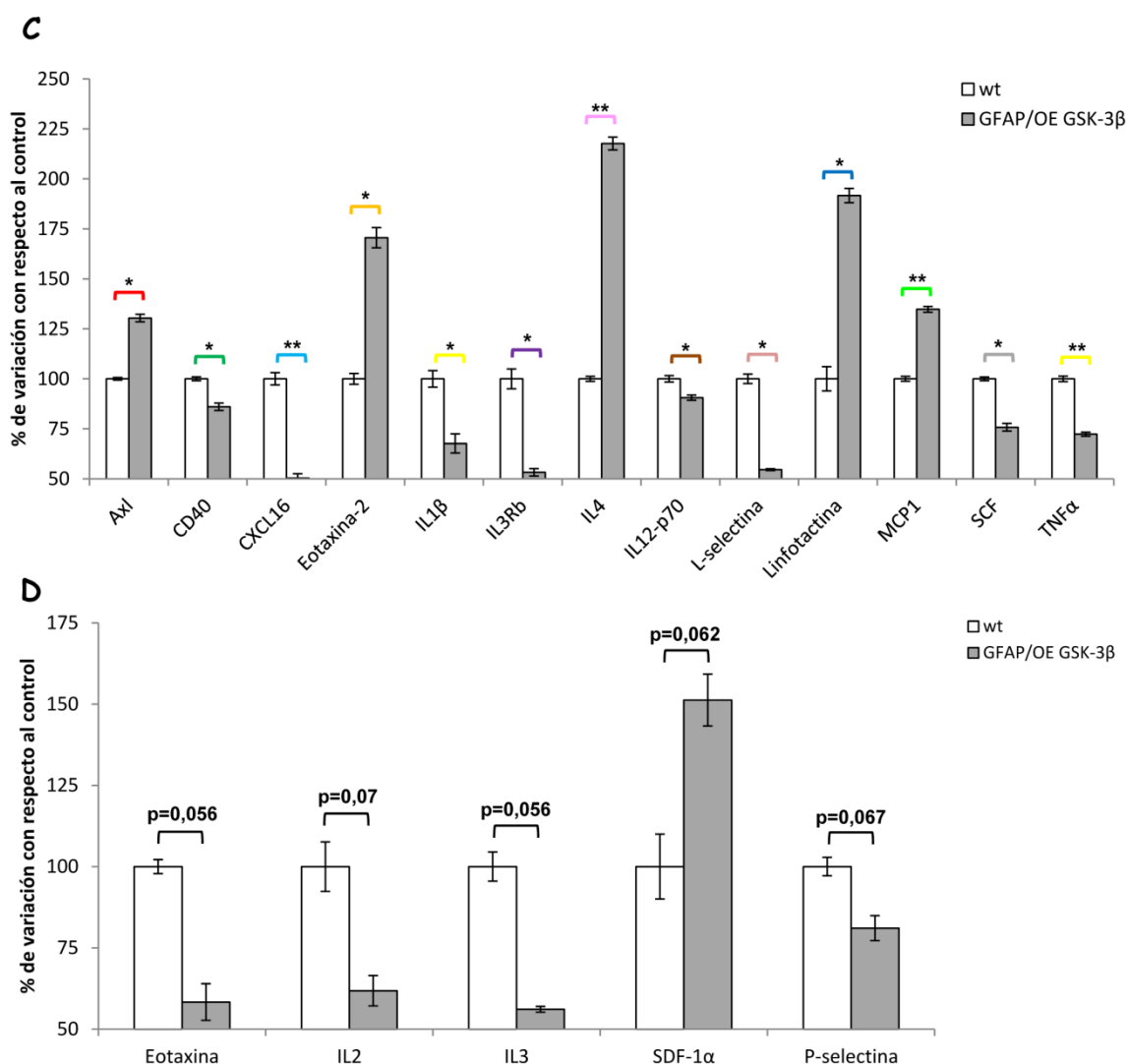


Figura 21. Array de cuantificación de citoquinas. **A**, membrana para la detección de citoquinas testada con extractos proteicos totales de hipocampos de ratones control. **B**, membrana para realizar la misma detección en paralelo con ratones GFAP/OE GSK-3β. Los recuadros de colores corresponden a los puntos de detección por duplicado de los niveles citoquinas en las que se encontraron diferencias significativas entre ambos genotipos. **C**, representación gráfica de la cuantificación de las citoquinas que mostraban variaciones significativas de sus niveles. La cuantificación se expresa en porcentaje y los colores corresponden a los recuadros coloreados en **A** y **B**. (t- Student; Axl p= 0,023; CD40 p= 0,041; CXCL16 p= 0,008; Eotaxina-2 p= 0,016; IL1β p= 0,038; IL3Rb p= 0,042; IL4 p= 0,007; IL12-p70 p= 0,048; L-selectina p= 0,027; linfotactina p= 0,012; MCP1 p= 0,003; SCF p= 0,022; TNFα p= 0,005). En el último panel (**D**) se representa la cuantificación de las citoquinas que mostraron tendencia a la diferencia, pero no eran significativas, expresado en porcentaje. (t- Student). *p<0,05; **p<0,01.

El experimento se realizó utilizando el hipocampo de animales de 5 meses de edad. Del total de 62 citoquinas que se analizan en el *array*, encontramos diferencias significativas entre ambos genotipos en 13: el receptor tirosina quinasa Axl (Wt= 100%

$\pm 0,65$; GFAP/OE GSK3 β = 130,39% \pm 1,88), el miembro de la superfamilia de receptores TNF CD40 (Wt= 100% \pm 0,97; GFAP/OE GSK3 β = 86,02% \pm 1,83), la quimioquina ligando 16 (CXCL16) (Wt= 100% \pm 3,06; GFAP/OE GSK3 β = 50,41% \pm 2,15), la eotaxina-2 (Wt= 100% \pm 2,7; GFAP/OE GSK3 β = 170,57% \pm 5,04), la interleuquina 1 β (IL1 β) (Wt= 100% \pm 4,11; GFAP/OE GSK3 β = 67,70% \pm 4,81), el receptor de interleuquina 3 (IL3Rb) (Wt= 100% \pm 4,95; GFAP/OE GSK3 β = 53,27% \pm 1,86), la interleuquina 4 (IL4) (Wt= 100% \pm 1,25; GFAP/OE GSK3 β = 217,65% \pm 3,21), la interleuquina12 (IL12-p70) (Wt= 100% \pm 1,6; GFAP/OE GSK3 β = 90,57% \pm 1,31), la molécula de adhesión celular de linfocitos L-selectina (Wt= 100% \pm 2,37; GFAP/OE GSK3 β = 54,59% \pm 0,48), la quimioquina linfotactina (también llamada XCL1) (Wt= 100% \pm 6,08; GFAP/OE GSK3 β = 191,64% \pm 3,59), la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP1) (Wt= 100% \pm 1,2; GFAP/OE GSK3 β = 134,77% \pm 1,44), el factor de célula madre (SCF) (Wt= 100% \pm 0,93; GFAP/OE GSK3 β = 75,79% \pm 1,93) y el factor de necrosis tumoral α (TNF α) (Wt= 100% \pm 1,36; GFAP/OE GSK3 β = 72,32% \pm 1) (**Figura 21C**). Por el contrario, otras citoquinas que sin ser estadísticamente significativas mostraban una tendencia en sus diferencias fueron: la eotaxina (Wt= 100% \pm 2,17; GFAP/OE GSK3 β = 58,35% \pm 5,63), la interleuquina 2 (IL2) (Wt= 100% \pm 7,62; GFAP/OE GSK3 β = 61,83% \pm 4,67), la interleuquina 3 (IL3) (Wt= 100% \pm 4,49; GFAP/OE GSK3 β = 56,11% \pm 0,89), el factor derivado de células estromales 1 (SDF-1 α , también conocido como CXCL12) (Wt= 100% \pm 9,99; GFAP/OE GSK3 β = 151,25% \pm 7,98) y la molécula de adhesión celular de células endoteliales P-selectina (Wt= 100% \pm 2,82; GFAP/OE GSK3 β = 81,01% \pm 3,84) (**Figura 21D**).

13.2. Validación del *array* por PCR cuantitativa (qRT-PCR)

Tras realizar el *array* de citoquinas y obtener algunas diferencias significativas, nos propusimos validar estos resultados mediante otra técnica. Quisimos comprobar si estas variaciones obtenidas también se mantenían a nivel de expresión, a nivel de RNA mensajero (mRNA). Para ello, escogimos algunas de las citoquinas y validamos los resultados mediante qRT-PCR. Seleccionamos algunas de las que mostraban variaciones significativas y que eran de nuestro interés, junto a otras en las que no había diferencias, a modo de control. Entre las citoquinas que analizamos se encontraban:

fractalkina, VEGF, BDNF, IL1 β , IL3, IL4, IL10, TNF α y CXCL16 (Figura 22).

Analizando los resultados de los niveles de expresión, comprobamos que fractalkina y VEGF no eran significativas en el *array* y tampoco lo fueron esta vez por qRT-PCR (fractalkina; Wt= 100% \pm 6,91; GFAP/OE GSK3 β = 105,86% \pm 7,99), (VEGF; Wt= 100% \pm 3,64; GFAP/OE GSK3 β = 103,87% \pm 5,46). Otro factor trófico que analizamos fue BDNF, por su papel e implicación en neurogénesis, pero tampoco se detectaron diferencias significativas (Wt= 100% \pm 11,83; GFAP/OE GSK3 β = 114,60% \pm 9,28). En cuanto a IL3, en el *array* de proteínas no se obtuvieron diferencias significativas, pero había cierta tendencia, sin embargo por qRT-PCR no se observaron variaciones (Wt= 100% \pm 17,10; GFAP/OE GSK3 β = 150,88% \pm 60,03). IL1 β en el *array* sí que presentaba variaciones significativas, pero en la qRT-PCR sólo mostraba una tendencia a aumentar (Wt= 100% \pm 39,43; GFAP/OE GSK3 β = 512,06% \pm 109,13). Lo mismo ocurre con CXCL16, donde la variación de los niveles de mRNA sólo muestran una tendencia (Wt= 100% \pm 9,85; GFAP/OE GSK3 β = 73,91% \pm 11,56). Finalmente, el resultado positivo que se reprodujo por ambas técnicas fue para TNF α . En ambos casos, con el *array* y por qRT-PCR se confirmó su variación significativa, observándose un descenso de los niveles de esta citoquina en el animal transgénico para la sobreexpresión de GSK3 β (Wt= 100% \pm 10,73; GFAP/OE GSK3 β = 66,39% \pm 15,17). Para todos los casos de interleuquinas se vió que los niveles de expresión eran muy bajos, llegando incluso la IL4 e IL10 a que no fuese posible su detección mediante las sondas de la qRT-PCR.

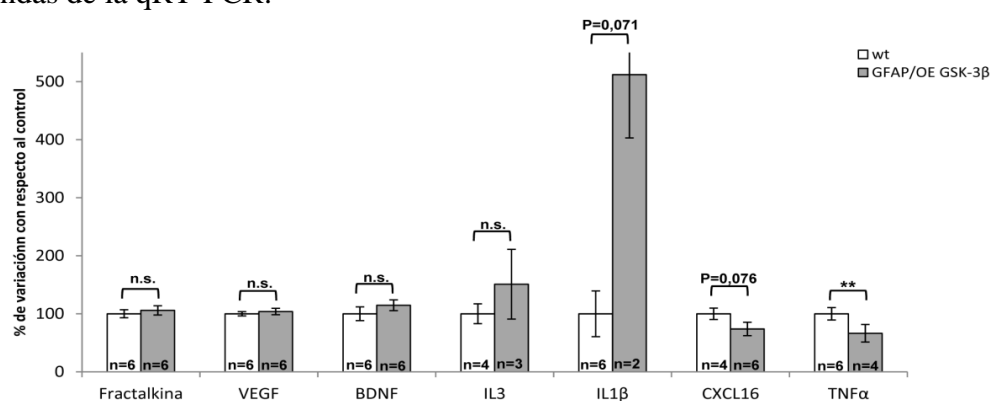


Figura 22. Validación mediante qRT-PCR de algunas citoquinas que mostraron diferencias significativas en el *array*. La figura muestra la representación gráfica de la cuantificación de los resultados obtenidos por qRT-PCR normalizados por los valores del gen control 18S y expresados en porcentaje. (t- Student; Fractalkina p= 0,546; VEGF p= 0,57; BDNF p= 0,354) (U de Mann-Whitney; IL3 p= 0,629; IL1 β p= 0,071; CXCL16 p= 0,076; TNF α p= 0,01). **p<0,01; n.s.= no significativo.

14. El ratón GFAP/OE GSK3 β presenta niveles elevados de inhibidores de la vía *Wnt*, que regulan la neurogénesis adulta.

Entre las múltiples vías de señalización que están implicadas en la regulación de la neurogénesis hipocampal adulta, *Wnt* es una de ellas (Lie, Colamarino et al. 2005; Varela-Nallar and Inestrosa 2013). Es un importante factor inductor de la especificación neuronal (Munoz-Sanjuan and Brivanlou 2002; Muroyama, Fujihara et al. 2002). Se ha visto que *Wnt3a* es necesario para el correcto desarrollo del hipocampo controlando la expansión de los precursores neurales (Lee SM, Tole S 2000b Development). La vía de *Wnt* juega un importante papel ya no sólo en las células madre neurales, sino en la biología de las células madre en general, favoreciendo su autorrenovación y manteniendo su estado indiferenciado (Miki, Yasuda et al. 2011; ten Berge, Kurek et al. 2011).

La aparición de dos artículos en el mismo número de la revista *Cell Stem Cell*, que trataban sobre dos moléculas inhibitoras del complejo *wnt* (Jang, Bonaguidi et al. 2013; Seib, Corsini et al. 2013), nos hizo preguntarnos como se encontrarían estas moléculas en nuestro ratón transgénico. Se tratan de *Dickkopf 1 (Dkk1)* y *secreted frizzled-related protein 3 (sFRP3)*. Ambas son inhibitoras del complejo que forman *Wnt* y *Frizzled*, complejo que promueve la transcripción de determinados genes, favoreciendo la neurogénesis adulta. *Dkk1* aumenta con la edad, lo cual explicaría el descenso de neurogénesis en la vejez. Mayores niveles de *Dkk1*, inhibirían la función neurogénica que tienen el complejo *Wnt-Frizzled*. Por otro lado, sFRP3 se produce en menor medida por estímulos como el ejercicio físico o el shock eléctrico. Ya que se trata de un inhibidor, la bajada de sus niveles, favorecerá que tenga lugar la neurogénesis promovida por el complejo *Wnt-Frizzled*. Esta sería una explicación del aumento de neurogénesis observado, por ejemplo, con el ejercicio físico (**Figura 23A**).

En base a estos datos, nos propusimos analizar los niveles de expresión de estas dos proteínas inhibitoras en el ratón transgénico GFAP/OE GSK3 β . Utilizamos las mismas muestras de ratones de 5 meses de edad que habíamos utilizado para validar el resultado de las citoquinas. En ellas medimos los niveles de mRNA de estas dos proteínas mediante qRT-PCR. Tras el análisis de resultados obtuvimos que, para ambas

proteínas, se producía un incremento significativo de los niveles del ratón transgénico frente al ratón control (Dkk1; Wt= 100% \pm 20,56; GFAP/OE GSK3 β = 313,98% \pm 38,77), (sFRP3; Wt= 100% \pm 3,91; GFAP/OE GSK3 β = 132,41% \pm 6,51) (**Figura 23B**).

Una posible hipótesis para entender estos resultados, es que en el ratón transgénico se estuviera dando un proceso de compensación para regular y disminuir el proceso de neurogénesis, que como ya hemos descrito previamente, se encuentra aumentado.

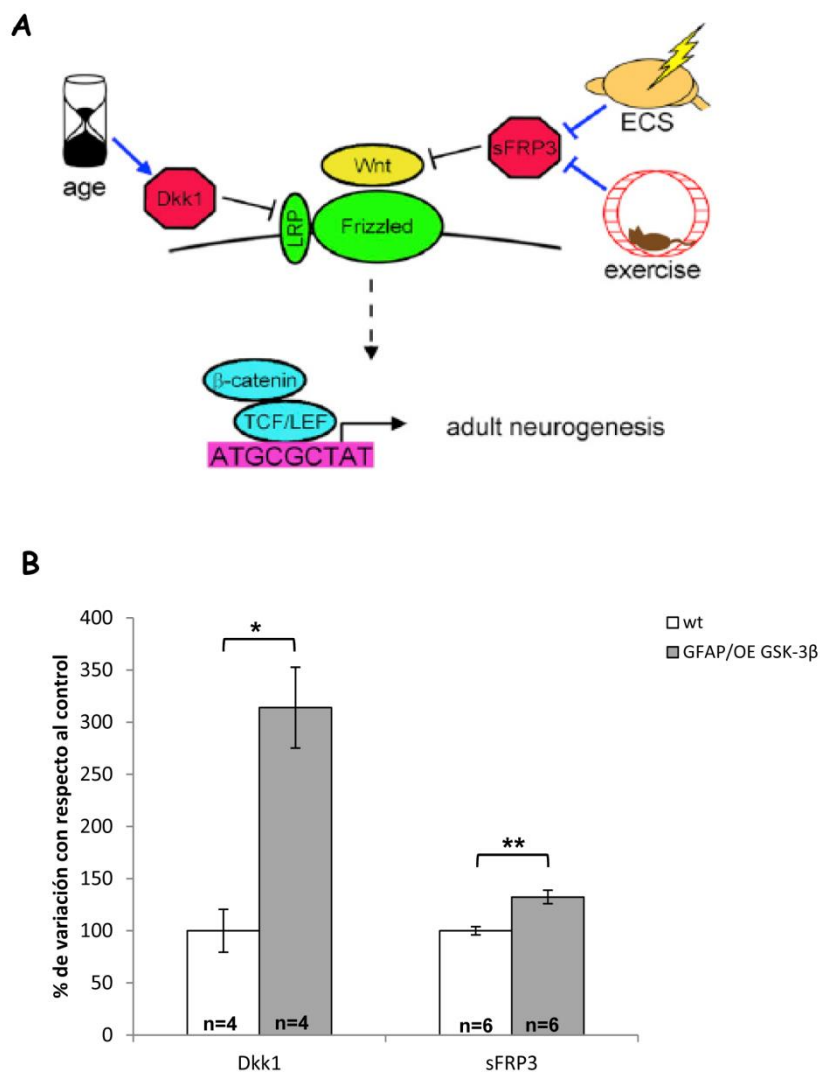


Figura 23. Cuantificación mediante qRT-PCR de inhibidores de la vía *Wnt* que regulan la neurogénesis. **A**, figura esquemática de la acción de ambos inhibidores sobre el complejo *Wnt-Frizzled* que llevan a la regulación de la neurogénesis adulta. (Modificado de Wu MV. *et. al. Cell stem cell* 2013). **B**, gráfico de la cuantificación de los niveles de expresión de ambos inhibidores mediante qRT-PCR normalizados por los valores del gen control 18S y expresados en porcentaje. (U de Mann-Whitney; Dkk1 p= 0,029), (t- Student; sFRP3 p= 0,002). *p<0,05; **p<0,01.

15. El ratón GFAP/OE GSK3 β presenta alteraciones comportamentales.

Tras todo el estudio llevado a cabo hasta el momento en la caracterización del ratón transgénico GFAP/OE GSK3 β , nos preguntamos si las diferencias que habíamos detectado en los parámetros analizados se traducirían en una alteración del comportamiento. Para ello, sometimos a ratones de 3,5 meses de edad de ambos genotipos a diversos test de comportamiento para evaluar diferentes parámetros.

En primer lugar analizamos el comportamiento de los ratones en el test de campo abierto de locomoción general. Éste evalúa de forma amplia el estado de los ratones referente a parámetros de exploración, tipos de movimiento, velocidades, etc. El análisis de los datos mostró diferencias entre ambos genotipos en variables como la distancia ambulatoria total (Wt= 100% \pm 6,82; GFAP/OE GSK3 β = 74,78% \pm 5,05), los movimientos estereotípicos (Wt= 100% \pm 2,84; GFAP/OE GSK3 β = 84,36% \pm 1,93) y velocidad total (Wt= 100% \pm 9,05; GFAP/OE GSK3 β = 77,68% \pm 5,85). En los parámetros anteriores el ratón transgénico presentaba valores inferiores a los de los ratones control. En otro parámetro como el tiempo de descanso el ratón GFAP/OE GSK3 β presentaba valores por encima del control (Wt= 100% \pm 1,82; GFAP/OE GSK3 β = 107,17% \pm 1,78) (**Figura 24A**).

Los ratones de ambos genotipos también fueron sometidos a un test de memoria dependiente de hipocampo, para analizar si existían diferencias con motivo de las alteraciones en neurogénesis que habíamos visto. Este test de condicionamiento al miedo, cuantifica el grado de recuerdo que tienen los ratones de una situación aversiva a la que fueron sometidos y que se traduce en inmovilidad o *freezing*. La realización de este test mostró como los ratones que sobreexpresan GSK3 β pasaban mayor cantidad de tiempo inmóviles (Wt= 35,43% \pm 4,41; GFAP/OE GSK3 β = 50,78% \pm 5,73) (**Figura 24B**), lo que indicaría que recuerdan mejor la situación que vivieron durante el entrenamiento del test.

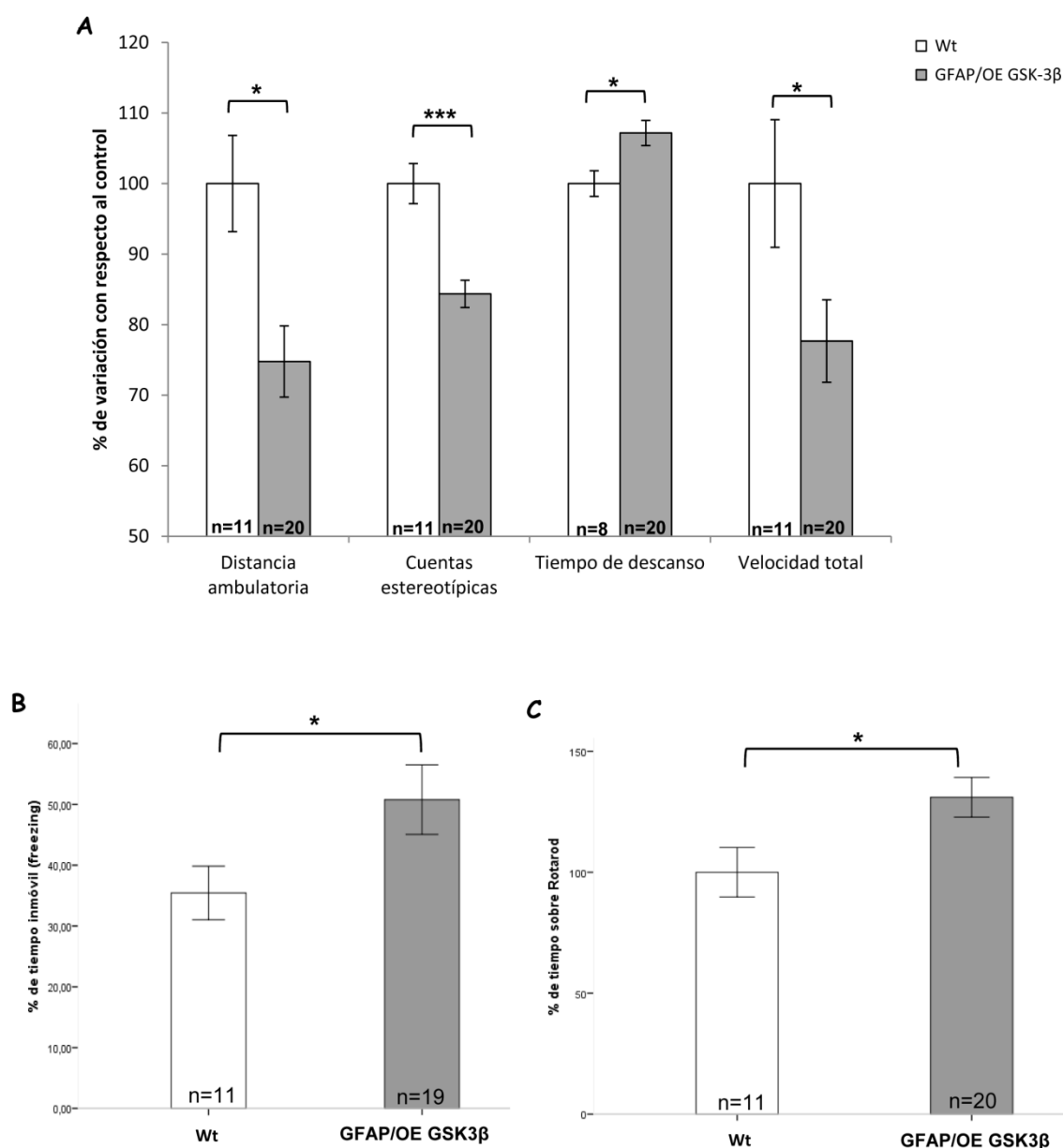


Figura 24. Alteraciones en el comportamiento derivadas de la sobreexpresión de GSK-3 β . **A**, representación gráfica del test de comportamiento de campo abierto realizado en ratones control y ratones GFAP/OE GSK-3 β de 3,5 meses de edad. Los resultados se expresan en porcentaje. (t-Student; Distancia ambulatoria $p=0,006$; Cuentas estereotípicas $p=0,000$; Velocidad total $p=0,039$) (U de Mann-Whitney; Tiempo de descanso $p=0,021$). **B**, cuantificación del test de condicionamiento al miedo realizado en ratones transgénicos y control, expresado como porcentaje (t-Student; $p=0,043$). **C**, representación gráfica de la cuantificación del test de comportamiento rotarod. Los datos representados son el tiempo de latencia antes de caer, expresados como porcentaje. (t-Student $p=0,028$). * $p<0,05$; *** $p<0,001$.

16. Los precursores neurales procedentes del ratón GFAP/OE GSK3 β presentan una mayor proliferación en cultivo *in vitro*.

Los análisis realizados en el ratón GFAP/OE GSK3 β para caracterizar la neurogénesis adulta *in vivo*, nos indicaba la presencia de un mayor número de progenitores BLBP+ y neuroblastos DCX+. *In vivo* no encontramos evidencias significativas de una mayor proliferación de los precursores neurales como posible explicación. Quisimos intentar otro abordaje para comprobar si realmente existían diferencias en la proliferación de dichos precursores. Para ello, realizamos cultivos de neuroesferas extraídas del ratón que sobreexpresa GSK3 β y analizamos la proliferación de estos precursores *in vitro*.

Tras realizar los cultivos de neuroesferas, tal y como se explica en el [apartado 2.3.](#) de Materiales y Métodos, y siguiendo el protocolo de Babu H. *et. al.* lo primero que hicimos fue cerciorarnos que realmente estábamos consiguiendo cultivos de neuroesferas. Para ello observamos que nuestros cultivos se asemejaban morfológicamente al tipo celular descrito. Además, como era de esperar, el cultivo se dividía y colonizaban la placa con la disposición, la dinámica y tiempos descritos (Babu, Claasen et al. 2011). Para continuar caracterizando el tipo celular del cultivo, el siguiente paso fue comprobar que las células cultivadas estaban expresando los marcadores propios de precursores neurales. Se realizaron inmunofluorescencias contra los marcadores GFAP, nestina, Sox2 y BLBP y pudimos comprobar como los precursores neuronales que teníamos en el cultivo presentaban inmunoreactividad para dichos marcadores (**Figura 25A-D**). Otro aspecto importante era comprobar que los precursores estaban expresando el transgen. Para ello se realizó la inmunofluorescencia contra la proteína β -galactosidasa, para detectar la expresión del transgen en los mismos. Pudimos ver que la expresión no tenía lugar en los precursores procedentes de ratones control (**Figura 25E-G**), mientras que sí se detectaba en los precursores neurales procedentes del ratón GFAP/OE GSK3 β (**Figura 25H-J**). Lo que pudimos comprobar fue que la detección de β -Gal no era generalizada en todos los precursores. Al igual que pasaba en el *ratón in vivo*, el 100% de los precursores neurales no expresaban el transgen. La detección de la proteína reportera nos confirmaba la

procedencia de estos precursores neurales del ratón transgénico y la sobreexpresión en ellos de GSK3 β .

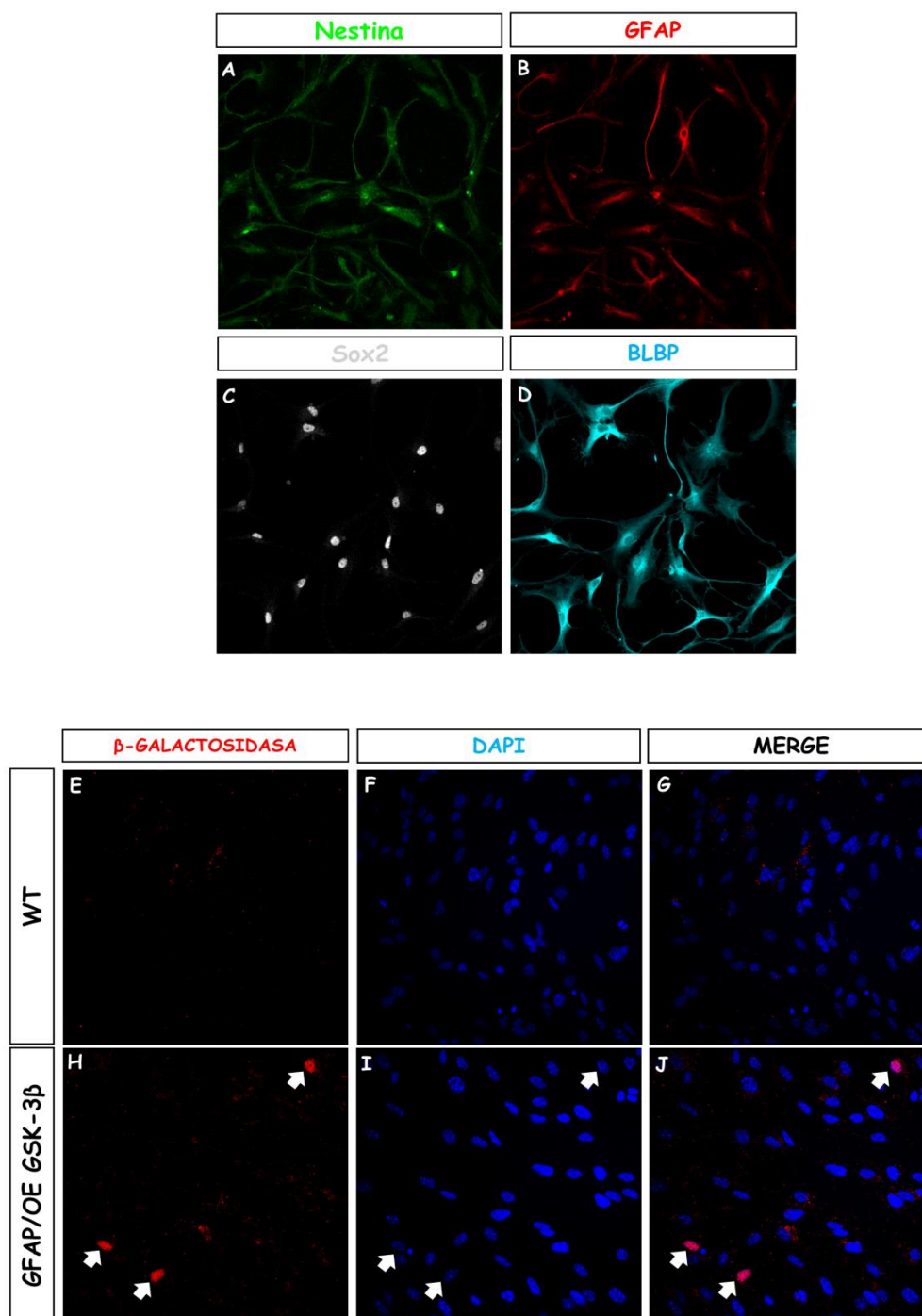


Figura 25. Caracterización de los marcadores expresados por los precursores neurales en cultivo. Inmunofluorescencias realizadas en cultivos de precursores neurales en monocapa empleando los anticuerpos característicos de células precursoras nestina (A), GFAP (B), Sox2 (C) y BLBP (D). E-J, inmunofluorescencias en cultivos de neuroesferas extraídas de ratones control (E-G) y de ratones GFAP/OE GSK-3 β (H-J) utilizando anticuerpo contra la proteína reportera β -Gal. Los núcleos aparecen teñidos en azul utilizando DAPI. Las flechas blancas señalan células precursoras expresando el transgen de GSK3 β .

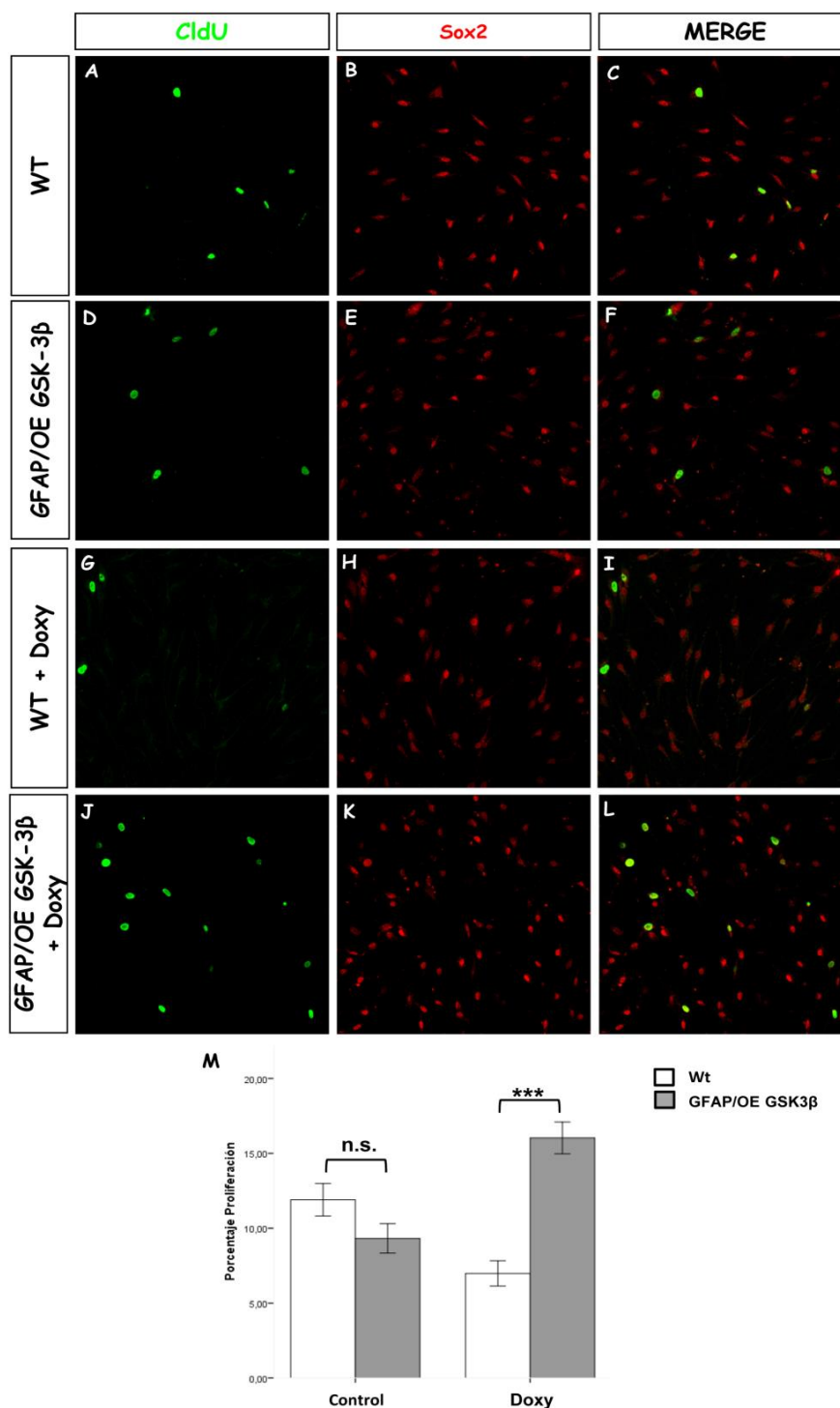


Figura 26. Cuantificación de la proliferación *in vitro* de los precursores neurales. Inmunofluorescencias realizadas en cultivos de precursores neurales, extraídos de ratones control (A-C) y de ratones GFAP/OE GSK-3β (D-F). En paralelo se cultivaron también neuroesferas de ambos genotipos tratadas con doxyciclina (G-L), la cual fue retirada 48 horas antes del experimento. Las inmunofluorescencias se realizaron utilizando el anticuerpo contra IdU y Sox2. M, representación gráfica de la cuantificación de la proliferación de los precursores neurales en cultivo, expresado como porcentaje con respecto al total de células. (ANOVA de dos vías; control $p = 0,425$; doxy $p = 0,000$). *** $p < 0,001$; n.s.= no significativo.

Una vez caracterizado el cultivo, nos propusimos evaluar la tasa de proliferación de los precursores en función del genotipo. Para ello se siguieron dos estrategias. A unos cultivos, tanto de células control como GFAP/OE GSK3 β , se añadió doxiciclina (**Figura 26G-L**) que inhibe la expresión del transgen durante el periodo de cultivo, mientras que a otros no se les añadió el antibiótico (**Figura 26A-F**). 48 horas antes de realizar el experimento de proliferación, se retiraron los medios de cultivo y se sustituyó por medio fresco sin doxiciclina. A continuación, se añadió al medio el análogo de timidina IdU y, transcurridas 6 horas, se fijaron las células.

El análisis de los datos mostró que existían diferencias estadísticamente significativas entre la proliferación de los precursores de ambos genotipos. En los que estuvieron bajo el efecto de la doxiciclina, los precursores neurales procedentes del ratón GFAP/OE GSK3 β se dividían en mayor proporción que los precursores extraídos de los ratones control (Wt+Doxy= 7,32%; GFAP/OE GSK3 β +Doxy= 16,27%). No se observó la misma diferencia significativa en los cultivos llevados en paralelo y con ausencia de doxiciclina (Wt= 12,11%; GFAP/OE GSK3 β = 9,80%) (**Figura 26M**).

17. Las nuevas neuronas producidas en el ratón GFAP/OE GSK3 β presentan alteraciones morfológicas del árbol dendrítico y las espinas dendríticas.

Un nuevo abordaje que quisimos darle a la caracterización del ratón que sobreexpresa GSK3 β , fue estudiar cómo se encontraban las nuevas neuronas generadas en un ambiente, que como hemos visto, presentaba microgliosis. Para ello se marcaron mediante el empleo de retrovirus, las nuevas neuronas que se están generando en el GD del hipocampo. Los ratones de 8 semanas de edad fueron inyectados mediante cirugía estereotáxica, introduciendo retrovirus que codifican para proteínas marcadoras en el GD. Como el retrovirus únicamente infectará a células en división, las nuevas neuronas que se produzcan por la división de los precursores, mientras se encuentra presente el retrovirus, quedarán marcadas. El sacrificio de los animales a diferentes tiempos, permite estudiar las neuronas marcadas en todo su proceso de maduración. Este análisis lo quisimos realizar en dos puntos temporales distintos desde su nacimiento, el primero

cuando la neurona aun no es madura y el segundo cuando ya está integrada en la red sináptica preexistente. Este tipo de estrategias nos da la posibilidad de poder visualizar neuronas individuales y aisladas del resto, pudiendo cuantificar parámetros como distancia dendrítica total, arborización dendrítica, número y área de las espinas dendríticas, etc.

17.1. Cambios en la arborización dendrítica

Nos propusimos analizar cómo se encontraban las nuevas neuronas generadas en el punto temporal de las 2 semanas. Para ello, los ratones fueron inyectados con retrovirus que codificaban para la proteína verde fluorescente (GFP), que nos permite observar la morfología de las neuronas (**Figura 27A, B**).

En primer lugar, cuantificamos si había variaciones con respecto a la longitud dendrítica total de las neuronas en función del genotipo. El análisis de los datos demostró que había diferencias significativas en la longitud dendrítica total entre ambos genotipos. Comparando el ratón transgénico y el ratón control se observó que existía una mayor longitud total de dendritas en las neuronas del ratón GFAP/OE GSK3 β (Wt= $108,48 \pm 9,91$; GFAP/OE GSK3 β = $161,68 \pm 15,17 \mu\text{m}$) (**Figura 27C**).

El siguiente parámetro que cuantificamos fue el número de ramificaciones dendríticas en función de la distancia del soma (Análisis de Sholl). Para ello, trazamos círculos concéntricos, centrados en el soma y separados $50 \mu\text{m}$ entre ellos, y cuantificamos el número de cruces de las dendritas en cada circunferencia. Al cuantificar estos datos, pudimos ver diferencias en este parámetro de ramificación dendrítica entre ambos genotipos (**Figura 27D**). El ratón transgénico presenta, de forma significativa, un mayor número de cruces en los dos primeros puntos de distancia del soma, entre $10-50 \mu\text{m}$ (Wt= $7,09 \pm 0,6$; GFAP/OE GSK3 β = $9,02 \pm 0,63$ cruces) y entre $60-100 \mu\text{m}$ (Wt= $2,61 \pm 0,81$; GFAP/OE GSK3 β = $4,37 \pm 0,81$ cruces). En el resto de puntos cuantificados, más alejados del soma, no se observaron diferencias significativas con respecto al control, ni de $110-150 \mu\text{m}$ (Wt= $0,98 \pm 0,53$; GFAP/OE GSK3 β = $0,69 \pm 0,27$ cruces), ni entre $160-200 \mu\text{m}$ (Wt= $0,35 \pm 0,29$; GFAP/OE GSK3 β = $0,12 \pm 0,09$ cruces), ni entre $210-250 \mu\text{m}$ (Wt= $0,06 \pm 0,06$; GFAP/OE GSK3 β = $0,08 \pm 0,08$ cruces). Lo que parece sugerir esta información es que el ratón transgénico GFAP/OE

GSK3 β presenta un mayor número de dendritas cerca del soma que los controles. Este exceso de ramificación, se normaliza conforme nos desplazamos hacia la parte distal del árbol dendrítico.

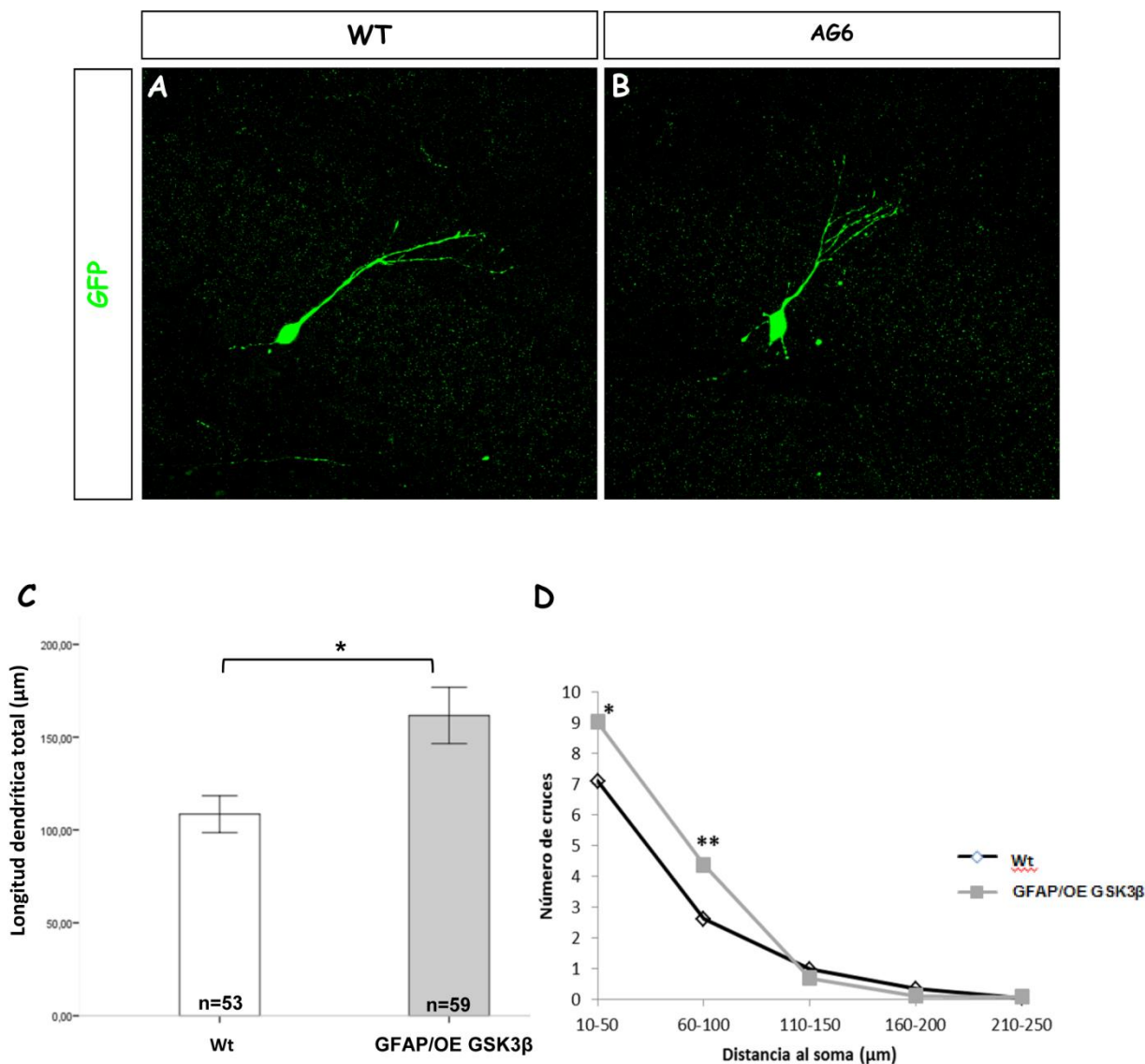


Figura 27. Análisis de los parámetros morfológicos de neuronas granulares con 2 semanas de edad. Inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo contra la proteína GFP en secciones sagitales de ratones control (A) y ratones GFAP/OE GSK-3 β (B) inyectados estereotaxicamente con retrovirus GFP 2 semanas antes del sacrificio. C, cuantificación de la longitud dendrítica total en neuronas de ambos genotipos de dos semanas de edad. (U de Mann-Whitney $p=0,017$). D, representación gráfica del análisis de Sholl expresado en número de cruces en función de la distancia al soma en neuronas de dos semanas de edad. (U de Mann-Whitney; 10-50 $p=0,017$; 60-100 $p=0,002$). * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

A continuación, escogimos otro punto temporal para seguir estudiando y viendo la evolución de las variaciones morfológicas que presentaba el ratón transgénico GFAP/OE GSK3 β . Se analizaron las neuronas marcadas 8 semanas después de la inyección, cuando las nuevas neuronas generadas que han sobrevivido ya han madurado y se ha integrado en la red neural preexistente. En este caso se utilizó un retrovirus que codificaba para la proteína de fusión PSD95:GFP. Esta es una proteína que está presente en la densidad postsináptica (*post-synaptic density 95*, PSD95), y cuya expresión permite la visualización de la morfología neuronal. Esto es debido al tráfico de PSD95 desde su síntesis en el soma hasta su localización funcional en las espinas dendríticas (**Figura 28A, B**). Se analizaron los mismos parámetros morfológicos que en el punto temporal anterior. En esta ocasión, los resultados no mostraron diferencias significativas en cuanto a la longitud dendrítica total, comparando el ratón transgénico y el control (Wt= $870,41 \pm 26,19$; GFAP/OE GSK3 β = $850,32 \pm 29,67 \mu\text{m}$) (**Figura 28D**). Estos datos nos estarían indicando que al parecer este parámetro se iguala con el aumento de la edad de la nueva neurona.

Llevamos también a cabo la cuantificación de la arborización dendrítica mediante el análisis de Sholl (**Figura 28E, F**). En esta ocasión, podemos observar cómo el análisis de los datos demuestra que se siguen manteniendo las diferencias significativas. Al igual que ocurría a las 2 semanas, el ratón transgénico GFAP/OE GSK3 β presenta un mayor número de cruces en distancias cercanas al soma con respecto al ratón control, distancias entre 10-50 μm (Wt= $4,70 \pm 0,17$; GFAP/OE GSK3 β = $7,55 \pm 0,43$ cruces) y entre 60-100 (Wt= $15,48 \pm 0,85$; GFAP/OE GSK3 β = $19,84 \pm 0,68 \mu\text{m}$). A diferencia con el punto de las 2 semanas, a niveles más distales podemos ver diferencias entre ambos genotipos. Mientras que a 2 semanas no encontrábamos diferencias en la arborización distal, a las ocho semanas, la arborización cambia y en distancias mayores al soma, el ratón transgénico presenta un menor número de cruces. No hay diferencias a las distancias de 110-150 (Wt= $22,23 \pm 0,77$; GFAP/OE GSK3 β = $21,78 \pm 1,02 \mu\text{m}$), se observa una tendencia entre 160-200 (Wt= $19,48 \pm 1,15$; GFAP/OE GSK3 β = $16,75 \pm 1,16 \mu\text{m}$), y las diferencias son significativas a distancias más alejadas del soma entre 210-250 (Wt= $11,36 \pm 1,21$; GFAP/OE GSK3 β = $7,67 \pm 0,95 \mu\text{m}$), perdiéndose ya entre 260-300 (Wt= $2,43 \pm 0,71$; GFAP/OE GSK3 β = $0,03 \pm 0,02 \mu\text{m}$) (**Figura 28G**).

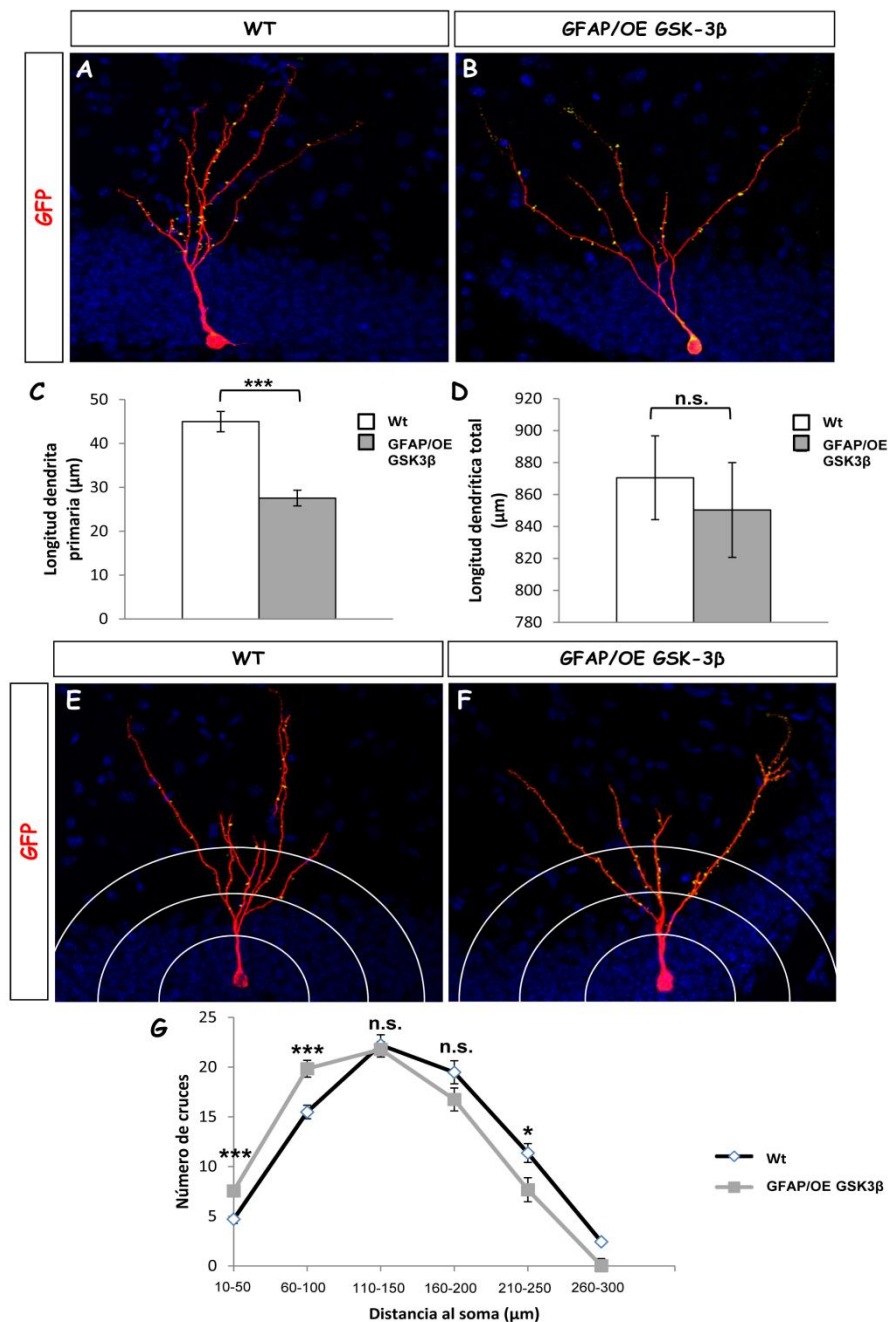


Figura 28. Análisis de los parámetros morfológicos de neuronas granulares maduras con 8 semanas de edad (I). **A y B**, inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo GFP en secciones sagitales de ratones control (**A**) y ratones GFAP/OE GSK-3β (**B**) inyectados estereotaxicamente con retrovirus GFP:PSD95 8 semanas antes del sacrificio. Los núcleos de las neuronas granulares aparecen teñidos en azul empleando DAPI. **C**, cuantificación de la longitud de la dendrita primaria. (t- Student $p=0,000$). **D**, representación gráfica del análisis de la longitud dendrítica total (t- Student $p=0,613$). **E y F**, inmunofluorescencia con el anticuerpo GFP donde se representa de forma esquemática el fundamento del análisis de Sholl. Las circunferencias blancas son las distancias concéntricas al soma a las cuales se cuenta el número de cruces con dendritas. **G**, cuantificación del análisis de Sholl expresado en número de cruces en función de la distancia al soma. (t- Student; 10-50 $p=0,000$; 60-100 $p=0,000$; 110-150 $p=0,737$; 160-200 $p=0,099$; 210-250 $p=0,017$). * $p<0,05$; *** $p<0,001$; n.s.= no significativo.

Por tanto, el árbol dendrítico de las neuronas producidas en el ratón transgénico es diferente al del control, siendo más ramificado en zonas cercanas al soma y menos ramificado en la zona distal. En las neuronas control, la ramificación se produce más alejada del soma y por eso presenta menos número de dendritas cercanas al soma que el transgénico y más en la zona distal que el ratón que sobreexpresa GSK3 β .

Además de la cuantificación de los parámetros morfológicos antes mencionados, se consideraron otras variables. Entre ellas se analizó si existían diferencias entre ambos genotipos en cuanto a la longitud de la dendrita primaria. Se analizaron neuronas maduras de 8 semanas de edad y los datos extraídos mostraron que existían diferencias estadísticamente significativas (**Figura 28C**). Las longitudes de las dendritas primarias no eran iguales en ambos genotipos, presentando el ratón transgénico para la sobreexpresión de GSK3 β una reducción en la longitud de la dendrita primaria con respecto al ratón control (Wt= $45 \pm 2,32$; GFAP/OE GSK3 β = $28 \pm 1,79 \mu\text{m}$). Este resultado estaría de acuerdo con el análisis de Sholl. Al ser menor la dendrita primaria, el resto de ramificación dendrítica se encontrará más cercana al soma, obteniéndose un mayor número de cruces, tal y como se observa en el análisis de Sholl.

Otro parámetro morfológico que se cuantificó en las células de 8 semanas fue el número de neuronas con más de una dendrita primaria (**Figura 29A, B**). El recuento y análisis de estos datos mostraron un mayor porcentaje de neuronas con más de una dendrita primaria (en forma de “V”) en el ratón GFAP/OE GSK3 β que en el ratón control (Wt= 8,33%; GFAP/OE GSK3 β = 19,59%) (**Figura 29C**).

Otro parámetro que se cuantificó fue la distancia migrada por las neuronas maduras con respecto a su lugar de producción en la SGZ (**Figura 29D**). En base a los datos obtenidos, no se observó una diferencia estadísticamente significativa entre la distancia migrada por las neuronas en función de su genotipo (Wt= $15,14 \pm 0,98$; GFAP/OE GSK3 β = $13,21 \pm 0,46 \mu\text{m}$).

Por último, también se analizaron parámetros referentes a la conectividad eferente que realizan las nuevas neuronas generadas mediante sus axones. Para ello, se cuantificó el área que ocupaban los terminales axónicos de los contactos de las nuevas neuronas generadas con las neuronas granulares de CA3 (**Figura 29E**). La cuantificación de estos datos mostró que no existían diferencias estadísticamente

significativas en cuanto al área que ocupan los terminales axónicos de las neuronas de ambos genotipos (Wt= $10,26 \pm 0,78$; GFAP/OE GSK3 β = $9,91 \pm 0,55 \mu\text{m}^2$).

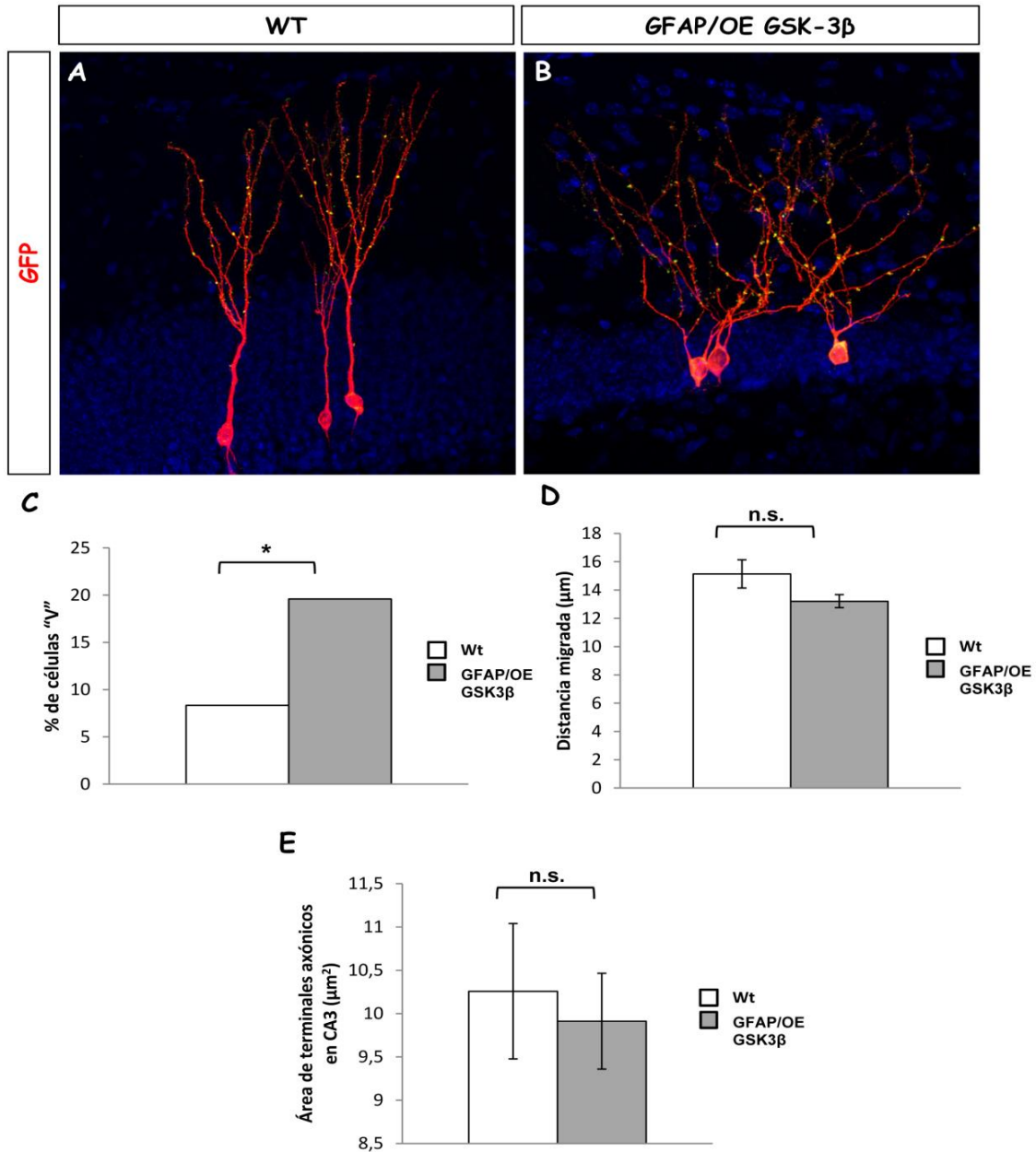


Figura 29. Análisis de los parámetros morfológicos de neuronas granulares maduras con 8 semanas de edad (II). **A y B**, inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo GFP en secciones sagitales de ratones control (**A**) y ratones GFAP/OE GSK-3 β (**B**) inyectados estereotóxicamente con retrovirus GFP:PSD95 8 semanas antes del sacrificio. Los núcleos de las neuronas granulares aparecen teñidos en azul empleando DAPI. **C**, cuantificación del número de células con más de una dendrita primaria (forma de "V") en ambos genotipos, expresado en porcentaje. (Chi-cuadrado de Pearson, χ^2 p= 0,034). **D**, representación gráfica de la cuantificación de la distancia migrada desde la SGL por las nuevas neuronas. (t- Student; p= 0,934). **E**, cuantificación del área de los terminales axónicos de las nuevas neuronas en CA3. (t- Student; p= 0,974). *p<0,05; n.s.= no significativo.

17.2. Cambios en la conectividad sináptica

Tras analizar la morfología del árbol dendrítico, nos propusimos sacar ventaja de la utilización del retrovirus codificante para PSD95:GFP y estudiar el estado de los contactos sinápticos. PSD95 es una proteína presente en la componente postsináptica de las sinápsis. Las densidades postsinápticas se establecen cuando las neuronas son maduras y será en este momento cuando expresen PSD95. Además de poder visualizar la morfología neuronal, con la expresión de esta proteína de fusión seremos capaces de visualizar los contactos sinápticos por la fluorescencia de la proteína GFP (**Figura 30A, B**).

En primer lugar quisimos cuantificar el número de contactos sinápticos que tenían las neuronas maduras de 8 semanas en ambos genotipos. Para ello se contabilizaron todas las espinas dendríticas, en función del orden de ramificación en que se encontraban (**Figura 30C-F**). El análisis de los datos obtenidos mostró que existían diferencias significativas en el número de espinas por unidad de longitud entre el ratón que sobreexpresa GSK3 β y el ratón control. Observamos que el ratón GFAP/OE GSK3 β presenta menos espinas, teniendo desde el 2º orden de ramificación una tendencia casi al borde de la significatividad (Wt= $0,49 \pm 0,09$; GFAP/OE GSK3 β = $0,28 \pm 0,05 \mu\text{m}$). En los órdenes de ramificación 3º (Wt= $0,76 \pm 0,07$; GFAP/OE GSK3 β = $0,42 \pm 0,05 \mu\text{m}$) y 4º (Wt= $1,22 \pm 0,12$; GFAP/OE GSK3 β = $0,84 \pm 0,10 \mu\text{m}$) las diferencias son claramente significativas y únicamente en el orden de ramificación más distal analizado no se observan diferencias (Wt= $1,27 \pm 0,12$; GFAP/OE GSK3 β = $1,39 \pm 0,13 \mu\text{m}$) (**Figura 30G**).

Además del número de espinas, se analizaron otros parámetros como el área de la densidad postsináptica de PSD95. Se cuantificó al igual que en el caso anterior, el área de PSD95 en cada orden de ramificación dendrítica para cada genotipo por separado. El análisis y comparación de los datos demostró, de nuevo, que existen unas claras diferencias significativas en el tamaño de la densidad postsináptica. El ratón transgénico GFAP/OE GSK3 β posee una menor área de PSD95 en todas las ramificaciones dendríticas en comparación con el ratón control, siendo los valores en el 2º orden de ramificación (Wt= $0,17 \pm 0,05$; GFAP/OE GSK3 β = $0,05 \pm 0,01 \mu\text{m}$), en el 3º (Wt= $0,19 \pm 0,02$; GFAP/OE GSK3 β = $0,10 \pm 0,01 \mu\text{m}$), en el 4º (Wt= $0,19 \pm 0,02$;

GFAP/OE GSK3 β = 0,09 \pm 0,01 μ m) y en el 5 $^{\circ}$ (Wt= 0,19 \pm 0,01; GFAP/OE GSK3 β = 0,09 \pm 0,01 μ m) (Figura 30H).

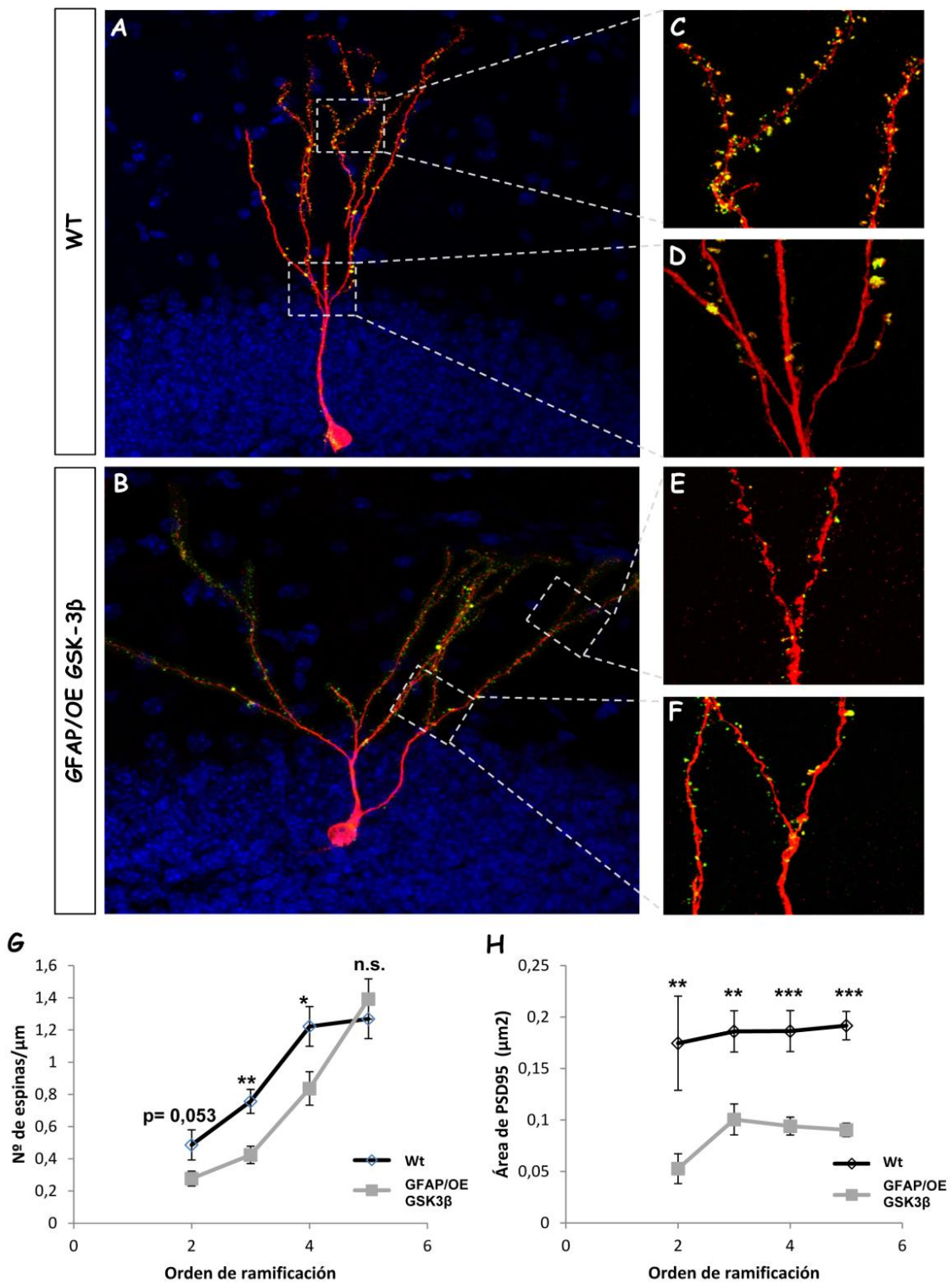


Figura 30. Análisis de parámetros morfológicos de las espinas dendríticas en neuronas granulares maduras con 8 semanas de edad. **A y B**, inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo GFP en secciones sagitales de ratones control (**A**) y ratones GFAP/OE GSK-3 β (**B**) inyectados estereotaxicamente con retrovirus GFP:PSD95 8 semanas antes del sacrificio. Los núcleos de las neuronas granulares aparecen teñidos en azul empleando DAPI. Los recuadros blancos señalan las regiones de las que se han obtenido las imágenes aumentadas en **C, D, E y F**. Las fotos a mayor aumento de ambos genotipos muestran dendritas distales (**C y E**) y dendritas más proximales (**D y F**) para visualizar las espinas dendríticas en verde. **G**, gráfico del recuento de número de espinas en función del orden de ramificación dendrítica expresado como densidad (n° espinas/ μ m). (t- Student; 2° orden p= 0,053; 3er orden p=0,001; 4°orden p=0,021; 5° orden p= 0,459). **H**, cuantificación del área ocupada por el marcaje de PSD95 en los contactos sinápticos en función del orden de ramificación dendrítica. (t- Student; 2° orden p= 0,001; 3er orden p=0,001; 4°orden p=0,000; 5° orden p= 0,000). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; n.s.= no significativo.

DISCUSIÓN

En esta tesis hemos estudiado el efecto que tiene, sobre la neurogénesis adulta, la sobreexpresión de GSK3 β en los precursores neurales, centrando nuestro estudio en la SGZ. Para ello nos hemos valido de un modelo transgénico para GSK3 β , Bi-TetO β -Gal GSK-3 β , generado previamente en nuestro laboratorio (Lucas, Hernandez et al. 2001), el cual hemos cruzado con otro que expresa la proteína transactivadora tTA bajo el promotor de GFAP. Utilizando esta herramienta hemos obtenido un ratón doble transgénico en el que la sobreexpresión de GSK3 β tiene lugar en los precursores neurales responsables de la neurogénesis adulta.

Trabajos previos del laboratorio ya habían demostrado que la sobreexpresión de GSK3 β en neuronas juega un papel fundamental en la neurogénesis adulta (Sirerol-Piquer, Gomez-Ramos et al. 2011; Fuster-Matanzo, Llorens-Martin et al. 2013; Llorens-Martin, Fuster-Matanzo et al. 2013). En estos trabajos el modelo empleado sobreexpresa la quinasa bajo el promotor CamKII α , por tanto, la sobreexpresión de GSK3 β tiene lugar en neuronas ya maduras. En esta tesis nuestro objetivo ha consistido en profundizar en el conocimiento del papel de GSK3 β en la neurogénesis adulta al sobreexpresar la quinasa en los precursores neurales gracias al uso del promotor de hGFAP.

1. Caracterización inicial del modelo GFAP/OE GSK3 β

Los astrocitos son un componente celular de naturaleza heterogénea que desempeñan funciones clave en el sistema nervioso central. Así, además de participar en el metabolismo cerebral suministrando nutrientes a las neuronas y metabolizando diferentes moléculas generadas por las mismas, responden a diversos daños cerebrales dando lugar a una gliosis reactiva. Por otra parte, en determinadas regiones del sistema nervioso (SVZ y SGZ en roedores) son los responsables de generar nuevas neuronas. El principal objetivo de este trabajo ha consistido en estudiar la neurogénesis adulta en el hipocampo en un modelo que sobreexpresa la quinasa GSK3 β en precursores neurales presentes en dicha región. El promotor utilizado para expresar esta quinasa ha sido el promotor hGFAP formado por las 2,2 Kb adyacentes al codón de iniciación de la proteína. Este promotor no es específico de este subtipo de células gliales y, por tanto, en primer lugar analizamos el efecto que dicha expresión pudiera tener sobre el

metabolismo astrocítico en nuestro modelo animal.

Los animales generados en este trabajo no presentan alteraciones fenotípicas evidentes, excepto un incremento en el peso que es más acusado con la edad. Dicho incremento no parece deberse a una expresión del promotor hGFAP en otros tejidos, como por ejemplo el tejido adiposo o hepático (Lin, Kemper et al. 2004). Así, se puede sugerir que o bien en nuestro modelo se encuentran alteradas regiones hipotalámicas implicadas en el control del apetito o que la expresión cerebelar de la quinasa pudiera hacer que el animal sea menos activo. Nuestros resultados apoyarían esta última hipótesis pues hemos demostrado, en un análisis de Open field, que nuestros ratones se mueven menos en dicho test (**Figura 24A**).

La quinasa GSK3 está implicada, como su nombre indica, en la regulación del metabolismo del glucógeno. La fosforilación de la glucógeno sintasa por GSK3 inhibe la adición de nuevas moléculas de glucosa al polímero. En el sistema nervioso central este sistema es especialmente importante porque los astrocitos son capaces de almacenar glucosa en forma de glucógeno y suministrar energía a las neuronas, muchas veces en forma de lactato (Brown 2004). Por ello, uno de nuestros primeros objetivos consistió en medir los niveles de glucógeno cerebral en nuestro modelo transgénico. El análisis de los resultados obtenidos ha demostrado que los niveles de glucógeno no se ven alterados, ni la forma fosforilada (inactiva) de la glucógeno sintasa presenta diferencias significativas con los animales control. Teniendo en cuenta un mecanismo de regulación tan complejo como es el sistema de la síntesis/degradación de glucógeno pueden existir, por tanto, múltiples explicaciones para interpretar estos resultados. Sin embargo, la interpretación más simple es que estos datos parecen correlacionar bien con el bajo número de astrocitos marcados con β -galactosidasa y que estarían expresando el transgen.

El patrón de expresión del gen reportero se muestra en la **Fig. 2** y coincide con el descrito previamente para el mismo promotor truncado de hGFAP (Lin, Kemper et al. 2004). El patrón de expresión es especialmente evidente en el cerebelo y el hipocampo, aunque algunos núcleos positivos para el marcador también se encuentran en el cuerpo calloso y en la SVZ. Una característica de nuestro modelo es la importante sobreexpresión que se observa en el cerebelo. Así, aunque no ha sido tampoco objeto de esta tesis, nuestros resultados demuestran que el marcador β -galactosidasa se expresa en

el cerebelo en la capa de células de Purkinje, pero no en estas, sino en células que por su morfología podemos adscribir a la glía de Bergman. Así mismo, se puede encontrar el marcador en un alto porcentaje de células en la capa granular. Este patrón cerebelar de expresión coincide con el descrito previamente al cruzar esta línea transgénica hGFAP-tTA con una línea reportera TetO-LacZ (Lin, Kemper et al. 2004). En este sentido, la mejora observada en la prueba de Rotarod bien pudiera deberse a dicha sobreexpresión cerebelar aunque este punto necesita un análisis más detallado. Así, el test de Rotarod se ha realizado en animales jóvenes en los que el incremento de peso observado en animales viejos aún no es evidente. El test de Rotarod mide la capacidad de coordinación de los animales y nuestros resultados muestran que los ratones transgénicos son capaces de mantenerse un mayor tiempo en el aparato que los controles silvestres. Este dato parece sugerir que sobreexpresar la quinasa en el cerebelo podría tener un efecto beneficioso en la coordinación. Un efecto similar se ha observado en un modelo animal con sobreexpresión de la forma constitutivamente activa de GSK3 β . En dicho modelo se observa una mejoría en los defectos de coordinación asociados a la sobreexpresión transgénica de la proteína tau, fundamentalmente en la médula espinal (Spittaels, Van den Haute et al. 2000). En este sentido es bien conocido que la administración de litio, un inhibidor entre otras enzimas de GSK3, provoca problemas de coordinación en enfermos bipolares.

La expresión del transgen está por tanto restringida a una subpoblación de astrocitos GFAP+ en nuestro modelo animal. Este resultado no es extraño si tenemos en cuenta que, en primer lugar, la actividad de un promotor depende del sitio de integración del transgén y, en segundo lugar, en eucariotas depende también de regiones que pueden estar muy alejadas del codón de iniciación. Todo esto sugiere que diferentes astrocitos utilizan regiones reguladoras que no se encuentran en nuestro modelo hGFAP-tTA (2,2 Kb de la región 5'). Así, y a modo de ejemplo, se ha descrito que la iniciación del mRNA-GFAP en las células de Schwann (células GFAP+) es distinto del presente en astrocitos. De hecho nuestro modelo no expresa la proteína transactivadora en el sistema nervioso periférico (Lin, Kemper et al. 2004).

La transcripción del gen para el filamento intermedio GFAP se incrementa en respuesta a diversas lesiones cerebrales (Eng and Ghirnikar 1994). Dicha reacción no ha sido objeto de estudio en esta tesis, sin embargo las inyecciones de retrovirus que se han

realizado para estudiar la morfología de las nuevas neuronas generadas, nos ha permitido llevar a cabo un análisis de la gliosis reactiva que tiene lugar en la zona del pinchazo. Dicho análisis no ha revelado un incremento en los niveles de proteína reportera β -galactosidasa (resultados no mostrados). El proceso de gliosis reactiva se encuentra regulado a nivel del promotor y, aunque en nuestro modelo alguno de estos elementos parecen encontrarse (Brenner, Kisseberth et al. 1994), un fragmento que se encuentra en los 13, 2 kb del mismo en vez de las 2,2 kb presentes en nuestro modelo media una respuesta más robusta a la lesión (Mucke, Oldstone et al. 1991).

Como resumen, los astrocitos de diferentes regiones cerebrales tienen diferentes mecanismos reguladores a la hora de controlar la expresión de GFAP, sugiriendo una heterogeneidad celular (Lee, Su et al. 2006). La combinación de factores tales como el tamaño del promotor empleado, así como probablemente el sitio de inserción, hacen que en nuestro modelo se observe una expresión especialmente robusta en cerebelo e hipocampo, similar al modelo descrito con el mismo promotor y LacZ como proteína reportera (Lin, Kemper et al. 2004). En este sentido es especialmente relevante otro modelo transgénico, equivalente al nuestro, en el que la proteína transactivadora tTA se encuentra regulada por una secuencia similar del promotor de GFAP, pero en este caso la versión murina. En este modelo la sobreexpresión de la proteína reportera es, como en nuestro caso, fundamentalmente hipocampal y en la region SGZ, siendo muy infrecuente el marcaje de astrocitos en otras zonas (Weber, Baier et al. 2011). Al igual que en nuestro modelo, que emplea el promotor humano, únicamente en algunas células de la capa granular del cerebelo se encuentra la proteína reportera, aunque en este caso no en la glía de Bergmann.

2. El ratón GFAP/OE GSK3 β presenta un número mayor de progenitores neuronales en la SGZ.

Para estudiar la neurogénesis adulta en el hipocampo, el primer paso consistió en comprobar que la sobreexpresión del transgen estaba teniendo lugar en los precursores neurales de la SGZ. Como hemos demostrado en este trabajo, podemos detectar la proteína reportera de la expresión del transgen en células que expresan los marcadores

BLBP y Sox2. Estos marcadores son característicos de células B (nomenclatura de Alvarez-Buylla) o células tipo 1 (nomenclatura de Kempermann), que son el tipo celular correspondiente a los precursores neurales. Estas células son de tipo astrocitario y, por tanto, caracterizadas por la expresión de GFAP (Doetsch, Caille et al. 1999; Seri, Garcia-Verdugo et al. 2001). En este punto habría que decir que teniendo en cuenta nuestros resultados no podemos descartar que el incremento observado en dichos progenitores se deba en parte a células tipo-2a, que serían las células de amplificación transitoria que ya no expresan GFAP, pero si nestina, BLBP y Sox2.

Cuando estos precursores neurales se dividen dan lugar a otro tipo de células más diferenciadas. Estos neuroblastos, cuya nomenclatura es células D o tipo-2, se caracterizan por la expresión de otros marcadores, siendo el más utilizado la DCX. El análisis de la sobreexpresión del transgen en este tipo celular demostró que únicamente un pequeño porcentaje residual de células coexpresaban la proteína reportera y DCX. La expresión del marcador DCX, se da en una ventana temporal muy amplia, pudiéndose detectar desde las 2-4 horas de la generación de la nueva neurona hasta 6 semanas más tarde. Muy probablemente las neuronas DCX+ donde encontramos presencia de la proteína reportera, se trate del pequeño porcentaje con respecto al total de células DCX que se generaron hace pocas horas. En ellas, aunque se haya producido el apagado del transgen todavía es posible detectar la presencia de la proteína reportera de origen procariota, probablemente porque posee una vida media larga.

Un dato llamativo es que no todas las células que aparecen teñidas con los marcadores de precursores neurales, parecen estar expresando el transgen. Como hemos cuantificado en este trabajo, el porcentaje que representan las que expresan el transgen es alrededor del 30%. Ciñéndonos a la base genética, este tipo de resultado no tendría explicación, pues todos los precursores neurales son GFAP+ y, por tanto, en todos ellos debería expresarse el transgen. Una posible explicación podría encontrarse en la variegación, que es un fenómeno que ocurre en numerosos modelos transgénicos, por el cual no todas las células teóricas en las que se debería expresar un transgen lo hacen. Dicho efecto se debe muchas veces a la zona de inserción del transgen (Robertson, Garrick et al. 1995). Sin embargo, no se puede descartar la existencia de una población heterogénea de precursores que no fuesen exactamente iguales en sus propiedades. A modo de ejemplo, se ha descrito que la expresión del marcador nestina, no se da en la

totalidad de los precursores neuronales (Kempermann 2006). La existencia de diferentes tipos de precursores se ha demostrado en la SVZ (Lledo, Merkle et al. 2008; Giachino, Basak et al. 2013), aunque en la SGZ dicha variación no se ha documentado.

El estudio del modelo GFAP/OE GSK3 β a nivel de las células precursoras, nos ha llevado a confirmar que su fisiología se encuentra alterada. Los análisis que hemos llevado a cabo han demostrado que existe un aumento del número de precursores BLBP+ y de neuroblastos DCX+. A la vista de estos datos, la sobreexpresión de GSK3 β parece estar alterando la fisiología de las células madre neurales. Una primera hipótesis para explicar este aumento es que la proliferación de los precursores estuviese afectada. Para estudiar esta hipótesis utilizamos el anticuerpo PHisH3, que marca las células que están en división en fase M. Sin embargo, no encontramos ninguna diferencia entre los ratones transgénicos y los controles. Este tipo de abordaje nos está mostrando un punto estático en el tiempo, en el cual visualizamos el número de divisiones que están teniendo lugar en ese momento, por ello lo que podría estar pasando es que el número de precursores que están llevando a cabo la división en un momento determinado fuese el mismo y por eso no vemos diferencias, aunque la cantidad de precursores BLBP/Sox2 de partida sea mayor.

Otra hipótesis que podría explicar el mayor número de precursores observados, sería una división más rápida de aquellos que sobreexpresan GSK3 β . Si esto fuese cierto, en un punto temporal fijo el número de divisiones serían las mismas, pero en un periodo de tiempo, el número de divisiones sería mayor. Para comprobar esta hipótesis realizamos los experimentos de reentrada de ciclo celular marcando con análogos de timidina (grupo de animales 3) y analizamos si la sobreexpresión de GSK3 β estaba produciendo diferencias en la reentrada en el ciclo de división en los precursores neuronales. El resultado nos demostró que tampoco había diferencias en este parámetro entre los precursores neuronales de ambos genotipos (Fig. 15).

Llegados a este punto, una posible interpretación de los resultados observados podría ser un ralentizamiento de las células BLBP y DCX en progresar hacia un estadio de maduración más avanzado en el cual se apagaría la expresión de dichos marcadores. Esto podría producir un acumulación de precursores como la que observamos en un proceso de proliferación normal. Para profundizar en el estudio de la maduración de las nuevas neuronas, analizamos la colocalización de análogos de timidina con diferentes

marcadores. Como se indicó en los resultados, se observan variaciones en el porcentaje de células de nueva generación que expresan DCX (grupo de animales 3) y DCX con calbindina (grupo de animales 2). Estos resultados demuestran que en el ratón transgénico hay un desplazamiento de la ventana temporal de expresión de DCX, apareciendo retrasado el apagado del marcador (la proporción de células DCX+/calbindina+ es mayor en el animal transgénico, Fig. 14H).

Un exceso de precursores proliferando a una tasa normal, resultaría en un aumento del número de divisiones que detectaríamos con un marcaje como PHisH3 en un punto determinado. Pero en un sistema *in vivo* integrado por muchos factores, se podría estar regulando este exceso de divisiones totales que existirían en el ratón transgénico, para conseguir una normalización del sistema. Esta podría ser la explicación del hallazgo en este trabajo de niveles significativamente altos de las moléculas inhibitoras de la vía *Wnt*, Dkk1 y sFRP3. Ambos se producen bajo diferentes circunstancias, pero la acción que ejercen es la de inhibir el complejo *Wnt-Frizzled* dando como resultado una inhibición de la neurogénesis adulta (Jang, Bonaguidi et al. 2013; Seib, Corsini et al. 2013). Al mismo tiempo, la muerte neuronal que se está produciendo en el ratón transgénico para GSK3 β (Fig. 17-18) influirá en la estabilización de los niveles de nuevas neuronas generadas. Por ello postulamos que en el ratón GFAP/OE GSK3 β , se está produciendo un intento de normalizar los niveles alterados de neurogénesis.

Por último, para comprobar que un exceso de GSK3 provoca un incremento en el número de precursores neurales, decidimos llevar a cabo un estudio de los mismos en condiciones controladas de cultivo celular *in vitro*. Para ello los aislamos y cultivamos a partir del ratón GFAP/OE GSK3 β y su respectivo control. De esta forma hemos podido analizar parámetros como la proliferación de los precursores, pero fuera de su ambiente en el GD y comparar los resultados obtenidos con la caracterización del ratón.

Decidimos llevar a cabo cultivos de precursores neurales en monocapa y adheridos en placa, en vez de cultivos de neurosféricas en flotación. La principal razón para elegir el cultivo en monocapa es evitar la diferenciación que sufren algunas de las células más internas que conforman la neurosfera. Otra de las ventajas es que las condiciones son iguales para todos los precursores al estar expuestos por igual a los factores del medio. Por el contrario, en los cultivos de neurosféricas, las células más

internas tienen menor accesibilidad a los factores de crecimiento del medio creándose gradientes de diferenciación.

Lo primero que quisimos comprobar era que los precursores neurales extraídos del ratón que sobreexpresa GSK3 β estaban expresando el transgen. Para ello realizamos inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo β -galactosidasa para detectar la proteína reportera del constructo. En dicho análisis no se detecta la proteína β -Gal en precursores neurales extraídos de ratones control, mientras que si podemos ver precursores que están expresando el transgen en los procedentes del ratón transgénico. Al igual que pasaba en el ratón *in vivo*, no todos los precursores expresan el transgén como cabría esperar. De nuevo surge la pregunta de si hay variabilidad entre los distintos tipos de precursores neuronales. Una posible explicación es que los precursores que tenemos en el cultivo podrían haber dejado de expresar el transgen, porque el tiempo que pasa hasta que se establece el cultivo pueda producir cierto grado de diferenciación. En cualquier caso, al menos una proporción de los precursores expresa correctamente el transgén de GSK3 β .

El siguiente punto que nos propusimos estudiar con este modelo fue analizar la capacidad proliferativa de estos precursores en cultivo. Para ello marcamos las células en división con análogos de timidina y cuantificamos qué porcentaje del total de células se había dividido. Lo que pudimos ver fue que los precursores extraídos del animal transgénico se dividen en una mayor proporción que los procedentes del ratón control. Las diferencias se pudieron observar cuando el cultivo se mantuvo con doxiciclina y, por tanto, el sistema transgénico estaba apagado hasta pocas horas antes de parar el cultivo. El papel de GSK3 β sobre la proliferación de los precursores en cultivo difiere de los resultados de proliferación *in vivo*. La explicación de este resultado podría deberse a que en cultivo, los precursores están fuera del microambiente de la región neurógena y, por tanto, no estará influyendo sobre ellos ni los niveles de inhibidores del complejo Wnt, ni el efecto de la inflamación (activación microglial y niveles alterados de citoquinas).

3. La sobreexpresión de GSK3 β en precursores neurales provoca alteraciones en las neuronas granulares adultas.

La sobreexpresión de GSK3 β en el modelo animal GFAP/OE GSK3 β , como hemos demostrado en este trabajo, solo se observa en progenitores neurales o en las células de amplificación transitoria que expresan BLBP y Sox2 pero no en las neuronas maduras generadas a partir de los mismos. Sin embargo, nos planteamos la pregunta de si dicha expresión temprana tenía algún efecto en la maduración y morfología de las neuronas granulares maduras presentes en el GD. Un primer paso consistió en analizar la supervivencia de las nuevas neuronas generadas. Para abordar este tipo de experimentos, se inyectaron análogos de timidina i.p. a los ratones y se mataron a diferentes tiempos (grupos de animales 1 y 2). Como se ha comentado previamente, no encontramos diferencias significativas entre el ratón GFAP/OE GSK3 β y el ratón control en cuanto a lo que a supervivencia de las nuevas neuronas generadas se refiere. La igualdad en la supervivencia se vio en todos los puntos temporales analizados, a 24 horas tras la división del precursor, a la semana y al mes de vida de la nueva neurona. Este hecho sugiere que es en los precursores donde se producen las alteraciones, pero que en fases más avanzadas de diferenciación, donde se ha terminado la sobreexpresión de la quinasa, sigue su curso normal teniendo una supervivencia comparable con la de un ratón control.

Sin embargo, quisimos profundizar más en este aspecto y nos propusimos analizar el efecto que tenía la sobreexpresión de GSK3 β no ya en la supervivencia si no en la morfología de las neuronas generadas en la SGZ. Para llevar a cabo este estudio, hemos marcado dichas neuronas con retrovirus que sobreexpresan GFP y PSD95. Gracias a esta aproximación experimental hemos podido cuantificar diferencias entre las neuronas de nueva generación del ratón GFAP/OE GSK3 β y el control. Así, observamos alteraciones en la morfología de su árbol dendrítico en comparación con el ratón control. Las neuronas granulares de roedores normalmente extienden una única dendrita apical (Seress and Pokorny 1981; Zhao, Teng et al. 2006). Sin embargo, en nuestro modelo transgénico una alta proporción de células granulares adultas muestran dos o más dendritas primarias apicales que se bifurcan más cerca del soma celular y que muestran, además, un reducido grado de ramificación en la capa molecular (Fig. 28-29).

El estudio de neuronas granulares maduras mediante el marcaje con retrovirus, también nos mostró claras diferencias significativas en parámetros sinápticos como el número de espinas y el área de éstas (Fig. 30). En las neuronas producidas en la SGZ del ratón transgénico para GSK3 β , se observó un descenso en el número de espinas y en el área de las densidades postsinápticas.

Esta morfología aberrante no puede deberse a un efecto de la GSK3 β endógena en los neuroblastos o neuronas maduras. En los puntos temporales que hemos analizado (2 y 8 semanas) éstas neuronas ya no tienen sobreexpresión del transgen de GSK3 β , por ello, algún factor, probablemente extrínseco, debe estar afectando a las nuevas neuronas, produciéndoles las alteraciones morfológicas que observamos. Los resultados de qRT-PCR sugieren que los niveles de factores hormonales como son los de BDNF o VEGF no están alterados. Sin embargo, hemos observado alteraciones en los niveles de diferentes citoquinas reflejando que un proceso inflamatorio está teniendo lugar en nuestro modelo animal. De hecho, se observa un incremento de la microglia en el GD de los animales transgénicos. Esta ampliamente establecido en la literatura que la neuroinflamación tiene un efecto muy importante, no solo en la neurogénesis (Fuster-Matanzo, Llorens-Martin et al. 2013), sino también en la morfología neuronal (Fuster-Matanzo, Llorens-Martin et al. 2013; Llorens-Martin, Fuster-Matanzo et al. 2013). En este sentido en procesos inflamatorios crónicos dicha inflamación tiene un efecto negativo sobre el proceso neurogénica, mientras que parece tener un papel beneficioso o protector en la inflamación aguda. Una causa para este incremento en la microglia pudiera ser el incremento marginalmente significativo observado en nuestro modelo animal de células fractina⁺ y que, por tanto, están sufriendo un proceso de apoptosis (Fig. 17).

Por todo ello el ambiente inflamatorio observado en nuestro modelo animal con los niveles generales de citoquinas alterados, puede estar detrás de las alteraciones morfológicas y sinápticas observadas en las nuevas neuronas producidas. Sin embargo, las alteraciones observadas van acompañada por un mayor número de neuronas granulares maduras, así como un incremento del volumen del GD.

Las variaciones sinápticas que observamos podrían ser debidas a un fenómeno de compensación. Así, en términos de una neurona concreta el número de espinas es menor y tendría una conectividad reducida si la comparamos con una neurona control.

Sin embargo, en términos totales, el número reducido de espinas se compensaría con el mayor número de neuronas. Podría tratarse de una forma de compensar el exceso de neuronas, reduciendo los contactos sinápticos y extensión de éstos, que producirían un exceso de actividad de las neuronas granulares del GD. Estas alteraciones se traducen alteraciones en aspectos cognitivos. Así, en el test de condicionamiento al miedo los animales transgénicos presentan una inmovilidad o freezing mayor, que significaría un mayor recuerdo del ambiente.

En nuestro trabajo hemos llevado a cabo un estudio detallado del proceso neurogénico tanto en el GD dorsal como en la región ventral del mismo. La región dorsal hipocampal está implicada en procesos de aprendizaje y memoria, mientras que la región ventral está más relacionada con procesos emocionales y de ansiedad (Snyder, Radik et al. 2009). Ambas regiones difieren no solo en los niveles de expresión génica, sino también en la conectividad neuronal (Fanselow and Dong 2010). Alteraciones en el comportamiento y la memoria no siempre se dan en paralelo en numerosas enfermedades neurodegenerativas sugiriendo que estas dos subregiones hipocampales no degeneran o se alteran en paralelo. Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que en un ratón transgénico con sobreexpresión de la quinasa GSK3 β en neuronas granulares presenta una degeneración de la región dorsal, pero no así de la ventral, (Fuster-Matanzo, Llorens-Martin et al. 2011). Nuestros resultados demuestran que un fenómeno similar parece suceder cuando la quinasa se sobreexpresa en los progenitores neurales. Todas estas observaciones parecen sugerir que la región dorsal es más sensible a la sobreexpresión de la quinasa. Así, nuestros resultados demuestran que la sobreexpresión de GSK3 β *in vivo* resulta en alteraciones en el hipocampo dorsal, pero no en el ventral, aunque la expresión del transgen tenga lugar en ambas áreas hipocampales. Por tanto, creemos que podría ser debido a las diferencias intrínsecas que existen entre ambas regiones. Quizá la expresión diferencial de proteínas, el efecto de la innervación diferencial o diferencias en el procesamiento de información y tareas que realizan cada zona, podría permitir que el exceso de GSK3 β en la región ventral no afecte la neurogénesis adulta. De hecho, nuestro grupo ha descrito que la zona ventral del hipocampo en condiciones basales y en animales silvestres presenta unos niveles de GSK3 β fosforilada en la Ser9 (dominio inhibitor) mayores que la región dorsal (Fuster-Matanzo, Llorens-Martin et al. 2011).

4. Papel de GSK3 β en la neurogénesis adulta en el modelo GFAP/OE GSK3 β .

El desarrollo del cerebro requiere la exquisita coordinación de la proliferación y diferenciación de células progenitoras. La inhibición de la GSK3 se ha asociado con el mantenimiento del estado pluripotente en células madre embrionarias (Miki, Yasuda et al. 2011). Así, se ha sugerido que GSK3 actúa como una molécula de integración para la proliferación debido a su papel esencial en la señalización de Wnt3 secretado por los astrocitos hipocampales (Okamoto, Inoue et al. 2011). La ruta de transducción de Wnt implica inhibición de GSK3 β que provoca un incremento en los niveles de β -catenina y la consiguiente activación de promotores implicados en proliferación y mantenimiento del estado pluripotente de las células madre presentes en la SGZ. La importancia de esta ruta en esta estructura queda reflejada en el hecho de que un ratón deficiente en Wnt-3a no presenta GD (Lee, Tole et al. 2000). In vivo, tanto la sobreexpresión de β -catenina (Chenn and Walsh 2002) como el knockout condicional de todas las isoformas de GSK3 en progenitores neurales (Kim, Wang et al. 2009) da como resultado una masiva hiperproliferación de los mismos en el estadio embrionario. Sin embargo, otros estudios sugieren que Wnt disminuye el número neuroesferas (Hirabayashi, Itoh et al. 2004; Muroyama, Kondoh et al. 2004; Kuwahara, Hirabayashi et al. 2010) y conduce a la diferenciación neuronal (Hirabayashi, Itoh et al. 2004; Muroyama, Kondoh et al. 2004; Kuwabara, Hsieh et al. 2009; Kuwahara, Hirabayashi et al. 2010; Munji, Choe et al. 2011). Para complicar aún más el escenario, la respuesta de los progenitores neuronales parece depender de los niveles de GSK3. Así, la decisión celular de estas células para diferenciarse o dividirse depende en gran medida de si se inhibe parcial o totalmente la actividad enzimática de la quinasa (Holowacz, Alexson et al. 2013).

La mayoría de los estudios descritos más arriba se han desarrollado o bien en cultivos celulares de progenitores *in vitro* o en modelos animales basados fundamentalmente en la generación de animales deficientes en algunas de las proteínas implicadas en la ruta de transducción de Wnt (GSK3 ó β -catenina). Sin embargo, nuestro modelo se basa en la sobreexpresión de la quinasa en un modelo transgénico y en progenitores neuronales. Las conclusiones obtenidas, mayor número de progenitores neuronales o de células de amplificación transitoria que ya no expresan GFAP, pero si

BLBP y Sox2, así como un volumen mayor del GD acompañado por un mayor número de neuronas granulares, parece sugerir que un incremento moderado de la actividad GSK3 es importante en la generación de nuevas neuronas. Curiosamente, nuestros resultados reflejan, en cierta medida, lo que sucede en el desarrollo del GD. Esta estructura presenta un desarrollo fundamentalmente postnatal y es en este periodo cuando los niveles de GSK3 alcanzan unos valores más altos en el sistema nervioso central (Takahashi, Tomizawa et al. 2000). De hecho la enzima GSK3 β , pero no la α , presenta un pico a las dos semanas, un periodo de intensa crecimiento neurítico, pero también de división celular, al menos en el GD.

Teniendo en cuenta todos los datos previos, un mecanismo plausible por el cual la GSK3 podría regular la neurogénesis en nuestro modelo animal es mediante el control de los niveles de las moléculas que están implicadas en la neurogénesis, fundamentalmente β -catenina en la vía Wnt, para una revisión (Hur and Zhou 2010). Esta hipótesis descansa en el hallazgo de que durante la división celular mitótica β -catenina fosforilada por GSK3 β , que está marcada para degradación en el proteasoma, es heredada por una sola hija (Fuentealba, Eivers et al. 2008). Por lo tanto, es posible que durante la división asimétrica de los progenitores neuronales, las dos células hijas tengan diferentes niveles de GSK-3. Así, en la división asimétrica que tiene lugar en los progenitores neurales la célula hija con la actividad GSK3 inferior acumulará β -catenina (y quizás otras proteínas pro- proliferativas) y por lo tanto sigue siendo un progenitor . Por el contrario, la célula hija con la actividad GSK3 mayor elimina las proteínas pro-proliferativas y otras proteínas que están implicadas en el ensamblaje de los microtúbulos, presumiblemente a través del sistema ubiquitina-proteasoma de degradación de proteínas. En estas células hija APC no puede unirse a los microtúbulos astrales teniendo como resultado que la célula se separe de la superficie de la SVZ y se convierte en un progenitor intermediario primero y después en una neurona granular madura. Para apoyar esta hipótesis se ha descrito que cuando se inhibe la actividad de GSK3, APC se ancla a los microtúbulos astrales importantes para la división celular. APC es una pieza clave en la división asimétrica de las células madre mediante el anclaje de una célula hija en un nicho específico para que no pierda la capacidad de autorrenovación (Yamashita, Jones et al. 2003).

En resumen, la sobreexpresión de GSK3 β en precursores neurales tiene como

principal consecuencia un incremento en el número de progenitores neuronales, probablemente células de amplificación transitoria del tipo 2a, que conduce a un mayor número de neuronas granulares en el caso del GD. Este incremento se refleja en un mayor peso de los cerebros de los animales transgénicos. El ratón presenta un aumento de mRNA de las proteínas Dkk1 y sFRP3, inhibidores del complejo Wnt-frizzled que impiden la expresión de genes proneurogénicos, compensando probablemente de este modo el exceso de precursores encontrados en este modelo animal.

CONCLUSIONES

1. El ratón doble transgénico que sobreexpresa GSK3 β bajo el promotor de GFAP es viable. En él, la sobreexpresión de la quinasa se produce, entre otras células gliales, en los precursores neurales de la zona subgranular del giro dentado del hipocampo.
2. La sobreexpresión del transgen provoca un aumento del tamaño del cerebro de los ratones transgénicos, probablemente debido en gran medida a su expresión durante etapas tempranas del desarrollo. Los ratones GFAP/OE GSK3 β presentan un incremento del tamaño del giro dentado del hipocampo, así como un aumento del número de células maduras en esta región.
3. La sobreexpresión de GSK3 β en astrocitos no neurogénicos no altera la fosforilación de la glucógeno sintasa glial ni tampoco las cantidades de glucógeno presente en el cerebro.
4. La sobreexpresión de GSK3 β en precursores neurales se traduce en un aumento del número de precursores neurales positivos para el marcador BLBP, Sox2 y de neuroblastos DCX+ en la región neurogénica SGZ de los ratones doble transgénicos.
5. El ratón GFAP/OE GSK3 β no presenta diferencias, en parámetros como la proliferación celular, la supervivencia de las nuevas neuronas generadas a diferentes tiempos o la reentrada en ciclo de división de los precursores neurales. En cuanto a la muerte celular que tiene lugar en la SGZ, aparece una tendencia a una mayor muerte en el ratón transgénico. Por otro lado, sí aparecen diferencias en la temporalidad de expresión del marcador DCX. En el ratón que sobreexpresa la quinasa, el marcador se enciende y se apaga de manera más tardía.
6. El ratón transgénico de GSK3 β presenta un aumento de las células microgliales Iba1+. Esta alteración provoca una variación en los niveles de diferentes citoquinas.
7. El ratón presenta un aumento de mRNA de las proteínas Dkk1 y sFRP3, inhibidores del complejo Wnt-frizzled que impiden la expresión de genes proneurogénicos, compensando probablemente de este modo el exceso de precursores encontrados en este modelo animal. .

8. El ratón GFAP/OE GSK3 β muestra variaciones con respecto al ratón control en aspectos cognitivos. Así, en el test de condicionamiento al miedo los animales transgénicos presentan una inmovilidad o *freezing* mayor, que significaría un mayor recuerdo del ambiente. Por otro lado, en el test de campo abierto los ratones transgénicos se comportan de manera más estática. Esta mayor parálisis podría explicarse en parte por el mayor peso corporal. Por último, observamos que los ratones transgénicos realizan mejor el test de coordinación motora del RotaRod. Este resultado podría explicarse por la influencia de la sobreexpresión de GSK3 β en el cerebelo.
9. Los precursores neurales aislados del ratón GFAP/OE GSK3 β , que expresan el transgen de GSK3 β , presentan un aumento de la proliferación celular en cultivo.
10. La neuronas generadas durante la neurogénesis adulta en el ratón transgénico de GSK3 β , tanto inmaduras (2 semanas) como maduras (8 semanas), presenta alteraciones en la morfología de su árbol dendrítico en comparación con el ratón control. Además, las que son maduras y se han integrado en la red sináptica preexistente, presentan alteraciones a nivel de conectividad en el tamaño y número de espinas dendríticas.

BIBLIOGRAFÍA

- Aberg, M. A., N. D. Aberg, et al. (2000). "Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus." *J Neurosci* **20**(8): 2896-2903.
- Aberg, M. A., N. D. Aberg, et al. (2003). "IGF-I has a direct proliferative effect in adult hippocampal progenitor cells." *Mol Cell Neurosci* **24**(1): 23-40.
- Aberle, H., A. Bauer, et al. (1997). "beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway." *EMBO J* **16**(13): 3797-3804.
- Abrahams, B. S. and D. H. Geschwind (2008). "Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology." *Nat Rev Genet* **9**(5): 341-355.
- Aimone, J. B., J. Wiles, et al. (2006). "Potential role for adult neurogenesis in the encoding of time in new memories." *Nat Neurosci* **9**(6): 723-727.
- Altman, J. (1962). "Are new neurons formed in the brains of adult mammals?" *Science* **135**(3509): 1127-1128.
- Altman, J. (1962). "Autoradiographic study of degenerative and regenerative proliferation of neuroglia cells with tritiated thymidine." *Exp Neurol* **5**: 302-318.
- Altman, J. (1963). "Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats." *Anat Rec* **145**: 573-591.
- Altman, J. (1969). "Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb." *J Comp Neurol* **137**(4): 433-457.
- Altman, J. and G. D. Das (1965). "Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats." *J Comp Neurol* **124**(3): 319-335.
- Altman, J. and G. D. Das (1965). "Post-natal origin of microneurons in the rat brain." *Nature* **207**(5000): 953-956.
- Alzheimer, A. (1911). "Über eigenartige Krankheitsfälle des späteres Alters." *Zbl. ges. Neuroñ. Psych* **4**: 356-385.
- Allen, E. (1912). "The cessation of mitosis in the central nervous system of the albino rat." *Journal of Comparative Neurology* **22**: 547-568.
- Ambrogini, P., D. Lattanzi, et al. (2004). "Morpho-functional characterization of neuronal cells at different stages of maturation in granule cell layer of adult rat dentate gyrus." *Brain Res* **1017**(1-2): 21-31.
- Amit, S., A. Hatzubai, et al. (2002). "Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway." *Genes Dev* **16**(9): 1066-1076.
- Anthony, T. E., H. A. Mason, et al. (2005). "Brain lipid-binding protein is a direct target of Notch signaling in radial glial cells." *Genes Dev* **19**(9): 1028-1033.
- Aplin, A. E., G. M. Gibb, et al. (1996). "In vitro phosphorylation of the cytoplasmic domain of the amyloid precursor protein by glycogen synthase kinase-3beta." *J Neurochem* **67**(2): 699-707.
- Arsenijevic, Y., J. G. Villemure, et al. (2001). "Isolation of multipotent neural precursors residing in the cortex of the adult human brain." *Exp Neurol* **170**(1): 48-62.
- Arvidsson, A., T. Collin, et al. (2002). "Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke." *Nat Med* **8**(9): 963-970.
- Arvidsson, A., Z. Kokaia, et al. (2001). "N-methyl-D-aspartate receptor-mediated increase of neurogenesis in adult rat dentate gyrus following stroke." *Eur J Neurosci* **14**(1): 10-18.
- Auvergne, R., C. Lere, et al. (2002). "Delayed kindling epileptogenesis and increased neurogenesis in adult rats housed in an enriched environment." *Brain Res* **954**(2): 277-285.
- Babu, H., J. H. Claassen, et al. (2011). "A protocol for isolation and enriched monolayer cultivation of neural precursor cells from mouse dentate gyrus." *Front Neurosci* **5**: 89.
- Baki, L., J. Shioi, et al. (2004). "PS1 activates PI3K thus inhibiting GSK-3 activity and tau overphosphorylation: effects of FAD mutations." *EMBO J* **23**(13): 2586-2596.
- Barnea, A. and F. Nottebohm (1996). "Recruitment and replacement of hippocampal neurons in young and adult chickadees: an addition to the theory of hippocampal learning." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(2): 714-718.
- Bax, B., P. S. Carter, et al. (2001). "The structure of phosphorylated GSK-3beta complexed with a peptide, FRATtide, that inhibits beta-catenin phosphorylation." *Structure* **9**(12): 1143-1152.
- Beaulieu, J. M. (2007). "Not only lithium: regulation of glycogen synthase kinase-3 by antipsychotics and serotonergic drugs." *Int J Neuropsychopharmacol* **10**(1): 3-6.
- Beaulieu, J. M., R. R. Gainetdinov, et al. (2009). "Akt/GSK3 signaling in the action of psychotropic drugs." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **49**: 327-347.
- Beaulieu, J. M., X. Zhang, et al. (2008). "Role of GSK3 beta in behavioral abnormalities induced by

- serotonin deficiency." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(4): 1333-1338.
- Beffert, U., G. Morfini, et al. (2002). "Reelin-mediated signaling locally regulates protein kinase B/Akt and glycogen synthase kinase 3beta." *J Biol Chem* **277**(51): 49958-49964.
- Ben-Hur, T., B. Rogister, et al. (1998). "Growth and fate of PSA-NCAM+ precursors of the postnatal brain." *J Neurosci* **18**(15): 5777-5788.
- Bengzon, J., Z. Kokaia, et al. (1997). "Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(19): 10432-10437.
- Bernabeu, R. and F. R. Sharp (2000). "NMDA and AMPA/kainate glutamate receptors modulate dentate neurogenesis and CA3 synapsin-I in normal and ischemic hippocampus." *J Cereb Blood Flow Metab* **20**(12): 1669-1680.
- Besnard, F., M. Brenner, et al. (1991). "Multiple interacting sites regulate astrocyte-specific transcription of the human gene for glial fibrillary acidic protein." *J Biol Chem* **266**(28): 18877-18883.
- Bilang-Bleuel, A., S. Ulbricht, et al. (2005). "Psychological stress increases histone H3 phosphorylation in adult dentate gyrus granule neurons: involvement in a glucocorticoid receptor-dependent behavioural response." *Eur J Neurosci* **22**(7): 1691-1700.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Brandt, M. D., S. Jessberger, et al. (2003). "Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice." *Mol Cell Neurosci* **24**(3): 603-613.
- Brenner, M., W. C. Kisseberth, et al. (1994). "GFAP promoter directs astrocyte-specific expression in transgenic mice." *J Neurosci* **14**(3 Pt 1): 1030-1037.
- Brezun, J. M. and A. Daszuta (1999). "Depletion in serotonin decreases neurogenesis in the dentate gyrus and the subventricular zone of adult rats." *Neuroscience* **89**(4): 999-1002.
- Brook, G. A., A. Perez-Bouza, et al. (1999). "Astrocytes re-express nestin in deafferented target territories of the adult rat hippocampus." *Neuroreport* **10**(5): 1007-1011.
- Brown, A. M. (2004). "Brain glycogen re-awakened." *J Neurochem* **89**(3): 537-552.
- Brown, J., C. M. Cooper-Kuhn, et al. (2003). "Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis." *Eur J Neurosci* **17**(10): 2042-2046.
- Brown, J. P., S. Couillard-Despres, et al. (2003). "Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis." *J Comp Neurol* **467**(1): 1-10.
- Bryja, V., E. R. Andersson, et al. (2009). "The extracellular domain of Lrp5/6 inhibits noncanonical Wnt signaling in vivo." *Mol Biol Cell* **20**(3): 924-936.
- Bull, N. D. and P. F. Bartlett (2005). "The adult mouse hippocampal progenitor is neurogenic but not a stem cell." *J Neurosci* **25**(47): 10815-10821.
- Butovsky, O., Y. Ziv, et al. (2006). "Microglia activated by IL-4 or IFN-gamma differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells." *Mol Cell Neurosci* **31**(1): 149-160.
- Caille, I., B. Allinquant, et al. (2004). "Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone." *Development* **131**(9): 2173-2181.
- Cameron, H. A. and E. Gould (1994). "Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus." *Neuroscience* **61**(2): 203-209.
- Cameron, H. A., B. S. McEwen, et al. (1995). "Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus." *J Neurosci* **15**(6): 4687-4692.
- Cameron, H. A. and R. D. McKay (1999). "Restoring production of hippocampal neurons in old age." *Nat Neurosci* **2**(10): 894-897.
- Cameron, H. A., C. S. Woolley, et al. (1993). "Adrenal steroid receptor immunoreactivity in cells born in the adult rat dentate gyrus." *Brain Res* **611**(2): 342-346.
- Cameron, H. A., C. S. Woolley, et al. (1993). "Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat." *Neuroscience* **56**(2): 337-344.
- Carlen, M., R. M. Cassidy, et al. (2002). "Functional integration of adult-born neurons." *Curr Biol* **12**(7): 606-608.
- Carpentier, P. A. and T. D. Palmer (2009). "Immune influence on adult neural stem cell regulation and function." *Neuron* **64**(1): 79-92.
- Carro, E., A. Nunez, et al. (2000). "Circulating insulin-like growth factor I mediates effects of exercise on the brain." *J Neurosci* **20**(8): 2926-2933.
- Carro, E., J. L. Trejo, et al. (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(15): 5678-5684.
- Caruso, A., M. Motolese, et al. (2006). "Inhibition of the canonical Wnt signaling pathway by apolipoprotein E4 in PC12 cells." *J Neurochem* **98**(2): 364-371.
- Cecchini, T., S. Ciaroni, et al. (2003). "Alpha-tocopherol, an exogenous factor of adult hippocampal neurogenesis regulation." *J Neurosci Res* **73**(4): 447-455.
- Cedazo-Minguez, A., B. O. Popescu, et al. (2003). "Apolipoprotein E and beta-amyloid (1-42) regulation of glycogen synthase kinase-3beta." *J Neurochem* **87**(5): 1152-1164.
- Cohen, P. and S. Frame (2001). "The renaissance of GSK3." *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(10): 769-776.
- Cole, A., S. Frame, et al. (2004). "Further evidence that the tyrosine phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in mammalian cells is an autophosphorylation event." *Biochem J* **377**(Pt 1): 249-255.
- Cooper-Kuhn, C. M., J. Winkler, et al. (2004). "Decreased neurogenesis after cholinergic forebrain lesion in the adult rat." *J Neurosci Res* **77**(2): 155-165.
- Corotto, F. S., J. A. Henegar, et al. (1993). "Neurogenesis persists in the subependymal layer of the adult mouse brain." *Neurosci Lett* **149**(2): 111-114.
- Couillard-Despres, S., B. Winner, et al. (2006). "Targeted transgene expression in neuronal precursors: watching young neurons in the old brain." *Eur J Neurosci* **24**(6): 1535-1545.
- Couillard-Despres, S., B. Winner, et al. (2005). "Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis." *Eur J Neurosci* **21**(1): 1-14.
- Covolan, L., L. T. Ribeiro, et al. (2000). "Cell damage and neurogenesis in the dentate granule cell layer of adult rats after pilocarpine- or kainate-induced status epilepticus." *Hippocampus* **10**(2): 169-180.
- Cross, D. A., D. R. Alessi, et al. (1995). "Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B." *Nature* **378**(6559): 785-789.
- Cselenyi, C. S., K. K. Jernigan, et al. (2008). "LRP6 transduces a canonical Wnt signal independently of Axin degradation by inhibiting GSK3's phosphorylation of beta-catenin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(23): 8032-8037.
- Czeh, B., T. Michaelis, et al. (2001). "Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(22): 12796-12801.
- Cheng, A., S. Wang, et al. (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**(2): 319-333.
- Chenn, A. and C. A. Walsh (2002). "Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors." *Science* **297**(5580): 365-369.
- Chin, J., C. M. Massaro, et al. (2007). "Reelin depletion in the entorhinal cortex of human amyloid precursor protein transgenic mice and humans with Alzheimer's disease." *J Neurosci* **27**(11): 2727-2733.
- Chiu, C. T. and D. M. Chuang (2010). "Molecular actions and therapeutic potential of lithium in preclinical and clinical studies of CNS disorders." *Pharmacol Ther* **128**(2): 281-304.
- Dajani, R., E. Fraser, et al. (2001). "Crystal structure of glycogen synthase kinase 3 beta: structural basis for phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition." *Cell* **105**(6): 721-732.
- Das, S. and A. Basu (2008). "Inflammation: a new candidate in modulating adult neurogenesis." *J Neurosci Res* **86**(6): 1199-1208.
- De Ferrari, G. V., A. Papassotiropoulos, et al. (2007). "Common genetic variation within the low-density lipoprotein receptor-related protein 6 and late-onset Alzheimer's disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(22): 9434-9439.
- Deng, W., J. B. Aimone, et al. (2010). "New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory?" *Nat Rev Neurosci* **11**(5): 339-350.
- Doble, B. W. and J. R. Woodgett (2003). "GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase." *J Cell Sci* **116**(Pt 7): 1175-1186.
- Doetsch, F., I. Caille, et al. (1999). "Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain." *Cell* **97**(6): 703-716.
- Doetsch, F., J. M. Garcia-Verdugo, et al. (1997). "Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain." *J Neurosci* **17**(13): 5046-5061.
- Dominguez, M. I., J. M. Blasco-Ibanez, et al. (2003). "Calretinin/PSA-NCAM immunoreactive granule cells after hippocampal damage produced by kainic acid and DEDTC treatment in mouse." *Brain*

- Res **966**(2): 206-217.
- Duggal, N., R. Schmidt-Kastner, et al. (1997). "Nestin expression in reactive astrocytes following focal cerebral ischemia in rats." Brain Res **768**(1-2): 1-9.
- Duman, R. S., J. Malberg, et al. (2000). "Neuronal plasticity and survival in mood disorders." Biol Psychiatry **48**(8): 732-739.
- Easter, S. S., Jr., L. S. Ross, et al. (1993). "Initial tract formation in the mouse brain." J Neurosci **13**(1): 285-299.
- Eisch, A. J., M. Barrot, et al. (2000). "Opiates inhibit neurogenesis in the adult rat hippocampus." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(13): 7579-7584.
- Ekdahl, C. T., J. H. Claassen, et al. (2003). "Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(23): 13632-13637.
- Endl, E. and J. Gerdes (2000). "The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function." Exp Cell Res **257**(2): 231-237.
- Eng, L. F. and R. S. Ghirnikar (1994). "GFAP and astrogliosis." Brain Pathol **4**(3): 229-237.
- Engel, T., F. Hernandez, et al. (2006). "Full reversal of Alzheimer's disease-like phenotype in a mouse model with conditional overexpression of glycogen synthase kinase-3." J Neurosci **26**(19): 5083-5090.
- Eriksson, P. S., E. Perfilieva, et al. (1998). "Neurogenesis in the adult human hippocampus." Nat Med **4**(11): 1313-1317.
- Esposito, M. S., V. C. Piatti, et al. (2005). "Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development." J Neurosci **25**(44): 10074-10086.
- Fanselow, M. S. and H. W. Dong (2010). "Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures?" Neuron **65**(1): 7-19.
- Feng, L., M. E. Hatten, et al. (1994). "Brain lipid-binding protein (BLBP): a novel signaling system in the developing mammalian CNS." Neuron **12**(4): 895-908.
- Feng, R., C. Rampon, et al. (2001). "Deficient neurogenesis in forebrain-specific presenilin-1 knockout mice is associated with reduced clearance of hippocampal memory traces." Neuron **32**(5): 911-926.
- Ferland, R. J., R. A. Gross, et al. (2002). "Increased mitotic activity in the dentate gyrus of the hippocampus of adult C57BL/6J mice exposed to the flurothyl kindling model of epileptogenesis." Neuroscience **115**(3): 669-683.
- Filippov, V., G. Kronenberg, et al. (2003). "Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes." Mol Cell Neurosci **23**(3): 373-382.
- Frame, S. and P. Cohen (2001). "GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery." Biochem J **359**(Pt 1): 1-16.
- Francis, F., A. Koulakoff, et al. (1999). "Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons." Neuron **23**(2): 247-256.
- Friedkin, M. and H. I. Wood (1956). "Utilization of thymidine-C14 by bone marrow cells and isolated thymus nuclei." J Biol Chem **220**(2): 639-651.
- Friocourt, G., A. Koulakoff, et al. (2003). "Doublecortin functions at the extremities of growing neuronal processes." Cereb Cortex **13**(6): 620-626.
- Fuentealba, L. C., E. Eivers, et al. (2008). "Asymmetric mitosis: Unequal segregation of proteins destined for degradation." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(22): 7732-7737.
- Fuster-Matanzo, A., M. Llorens-Martin, et al. (2011). "Different susceptibility to neurodegeneration of dorsal and ventral hippocampal dentate gyrus: a study with transgenic mice overexpressing GSK3beta." PLoS One **6**(11): e27262.
- Fuster-Matanzo, A., M. Llorens-Martin, et al. (2013). "Role of neuroinflammation in adult neurogenesis and Alzheimer disease: therapeutic approaches." Mediators Inflamm **2013**: 260925.
- Fuster-Matanzo, A., M. Llorens-Martin, et al. (2013). "Dual effects of increased glycogen synthase kinase-3beta activity on adult neurogenesis." Hum Mol Genet **22**(7): 1300-1315.
- Garthe, A., J. Behr, et al. (2009). "Adult-generated hippocampal neurons allow the flexible use of spatially precise learning strategies." PLoS One **4**(5): e5464.
- Ge, S., E. L. Goh, et al. (2006). "GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain." Nature **439**(7076): 589-593.
- Ge, S., K. A. Sailor, et al. (2008). "Synaptic integration and plasticity of new neurons in the adult hippocampus." J Physiol **586**(16): 3759-3765.
- Giachino, C., O. Basak, et al. (2013). "Molecular diversity subdivides the adult forebrain neural stem cell

- population." *Stem Cells*.
- Gleeson, J. G., P. T. Lin, et al. (1999). "Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons." *Neuron* **23**(2): 257-271.
- Glenner, G. G., C. W. Wong, et al. (1984). "The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis." *Appl Pathol* **2**(6): 357-369.
- Goldman, S. A. and F. Nottebohm (1983). "Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(8): 2390-2394.
- Goll, D. E., V. F. Thompson, et al. (2003). "The calpain system." *Physiol Rev* **83**(3): 731-801.
- Goni-Oliver, P., J. J. Lucas, et al. (2007). "N-terminal cleavage of GSK-3 by calpain: a new form of GSK-3 regulation." *J Biol Chem* **282**(31): 22406-22413.
- Gould, E. (1994). "The effects of adrenal steroids and excitatory input on neuronal birth and survival." *Ann N Y Acad Sci* **743**: 73-92; discussion 92-73.
- Gould, E., A. Beylin, et al. (1999). "Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation." *Nat Neurosci* **2**(3): 260-265.
- Gould, E., H. A. Cameron, et al. (1992). "Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus." *J Neurosci* **12**(9): 3642-3650.
- Gould, E., H. A. Cameron, et al. (1994). "Blockade of NMDA receptors increases cell death and birth in the developing rat dentate gyrus." *J Comp Neurol* **340**(4): 551-565.
- Gould, E., B. S. McEwen, et al. (1997). "Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation." *J Neurosci* **17**(7): 2492-2498.
- Gould, E., A. J. Reeves, et al. (1999). "Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(9): 5263-5267.
- Gould, E., P. Tanapat, et al. (1999). "Neurogenesis in adulthood: a possible role in learning." *Trends Cogn Sci* **3**(5): 186-192.
- Gould, E., N. Vail, et al. (2001). "Adult-generated hippocampal and neocortical neurons in macaques have a transient existence." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(19): 10910-10917.
- Gray, W. P. and L. E. Sundstrom (1998). "Kainic acid increases the proliferation of granule cell progenitors in the dentate gyrus of the adult rat." *Brain Res* **790**(1-2): 52-59.
- Grimes, C. A. and R. S. Jope (2001). "CREB DNA binding activity is inhibited by glycogen synthase kinase-3 beta and facilitated by lithium." *J Neurochem* **78**(6): 1219-1232.
- Grundke-Iqbal, I., K. Iqbal, et al. (1986). "Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments." *J Biol Chem* **261**(13): 6084-6089.
- Grundke-Iqbal, I., K. Iqbal, et al. (1986). "Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(13): 4913-4917.
- Gubbay, J., J. Collignon, et al. (1990). "A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes." *Nature* **346**(6281): 245-250.
- Gulyas, A. I., R. Miettinen, et al. (1992). "Calretinin is present in non-pyramidal cells of the rat hippocampus--I. A new type of neuron specifically associated with the mossy fibre system." *Neuroscience* **48**(1): 1-27.
- Haik, S., L. R. Gauthier, et al. (2000). "Fibroblast growth factor 2 up regulates telomerase activity in neural precursor cells." *Oncogene* **19**(26): 2957-2966.
- Halbach, O. v. B. u. (2007). "Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus." *Cell Tissue Research*.
- Hall, P. A., D. A. Levison, et al. (1990). "Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms." *J Pathol* **162**(4): 285-294.
- Haughey, N. J., D. Liu, et al. (2002). "Disruption of neurogenesis in the subventricular zone of adult mice, and in human cortical neuronal precursor cells in culture, by amyloid beta-peptide: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease." *Neuromolecular Med* **1**(2): 125-135.
- Haughey, N. J., A. Nath, et al. (2002). "Disruption of neurogenesis by amyloid beta-peptide, and perturbed neural progenitor cell homeostasis, in models of Alzheimer's disease." *J Neurochem* **83**(6): 1509-1524.
- Henzel, M. J., Y. Wei, et al. (1997). "Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation." *Chromosoma* **106**(6): 348-360.
- Hernandez, F., F. Lim, et al. (2002). "Transgenic mouse models with tau pathology to test therapeutic

- agents for Alzheimer's disease." *Mini Rev Med Chem* **2**(1): 51-58.
- Hernandez, F., J. J. Lucas, et al. (2003). "GSK-3 dependent phosphoepitopes recognized by PHF-1 and AT-8 antibodies are present in different tau isoforms." *Neurobiol Aging* **24**(8): 1087-1094.
- Herrera, D. G., J. M. Garcia-Verdugo, et al. (1999). "Adult-derived neural precursors transplanted into multiple regions in the adult brain." *Ann Neurol* **46**(6): 867-877.
- Hevner, R. F., R. D. Hodge, et al. (2006). "Transcription factors in glutamatergic neurogenesis: conserved programs in neocortex, cerebellum, and adult hippocampus." *Neurosci Res* **55**(3): 223-233.
- Hirabayashi, Y., Y. Itoh, et al. (2004). "The Wnt/beta-catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells." *Development* **131**(12): 2791-2801.
- Hoglinger, G. U., P. Rizk, et al. (2004). "Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease." *Nat Neurosci* **7**(7): 726-735.
- Holowacz, T., T. O. Alexson, et al. (2013). "The responses of neural stem cells to the level of GSK-3 depend on the tissue of origin." *Biol Open* **2**(8): 812-821.
- Hong, M., D. C. Chen, et al. (1997). "Lithium reduces tau phosphorylation by inhibition of glycogen synthase kinase-3." *J Biol Chem* **272**(40): 25326-25332.
- Hughes, K., E. Nikolakaki, et al. (1993). "Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation." *EMBO J* **12**(2): 803-808.
- Hur, E. M. and F. Q. Zhou (2010). "GSK3 signalling in neural development." *Nat Rev Neurosci* **11**(8): 539-551.
- Imahori, K. and T. Uchida (1997). "Physiology and pathology of tau protein kinases in relation to Alzheimer's disease." *J Biochem* **121**(2): 179-188.
- Ishiguro, K., A. Shiratsuchi, et al. (1993). "Glycogen synthase kinase 3 beta is identical to tau protein kinase I generating several epitopes of paired helical filaments." *FEBS Lett* **325**(3): 167-172.
- Jacobowitz, D. M. and L. Winsky (1991). "Immunocytochemical localization of calretinin in the forebrain of the rat." *J Comp Neurol* **304**(2): 198-218.
- Jacobs, B. L., H. van Praag, et al. (2000). "Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression." *Mol Psychiatry* **5**(3): 262-269.
- Jang, M. H., M. A. Bonaguidi, et al. (2013). "Secreted frizzled-related protein 3 regulates activity-dependent adult hippocampal neurogenesis." *Cell Stem Cell* **12**(2): 215-223.
- Jiang, Q., C. Y. Lee, et al. (2008). "ApoE promotes the proteolytic degradation of Abeta." *Neuron* **58**(5): 681-693.
- Jiang, W., Q. Wan, et al. (2003). "Dentate granule cell neurogenesis after seizures induced by pentylenetetrazol in rats." *Brain Res* **977**(2): 141-148.
- Jin, K., V. Galvan, et al. (2004). "Enhanced neurogenesis in Alzheimer's disease transgenic (PDGF-APP^{Sw,Ind}) mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(36): 13363-13367.
- Johansson, C. B., S. Momma, et al. (1999). "Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system." *Cell* **96**(1): 25-34.
- Jope, R. S. and G. V. Johnson (2004). "The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3." *Trends Biochem Sci* **29**(2): 95-102.
- Kalman, M. and B. M. Ajtai (2001). "A comparison of intermediate filament markers for presumptive astroglia in the developing rat neocortex: immunostaining against nestin reveals more detail, than GFAP or vimentin." *Int J Dev Neurosci* **19**(1): 101-108.
- Kaplan, M. S. and J. W. Hinds (1977). "Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs." *Science* **197**(4308): 1092-1094.
- Kawai, T., N. Takagi, et al. (2004). "Characterization of BrdU-positive neurons induced by transient global ischemia in adult hippocampus." *J Cereb Blood Flow Metab* **24**(5): 548-555.
- Kee, N., S. Sivalingam, et al. (2002). "The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis." *J Neurosci Methods* **115**(1): 97-105.
- Kelsch, W., C. W. Lin, et al. (2008). "Sequential development of synapses in dendritic domains during adult neurogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(43): 16803-16808.
- Kempermann, G. (2002). "Regulation of adult hippocampal neurogenesis - implications for novel theories of major depression." *Bipolar Disord* **4**(1): 17-33.
- Kempermann, G. (2006). "Adult Neurogenesis." *Oxford University Press*.
- Kempermann, G., S. Jessberger, et al. (2004). "Milestones of neuronal development in the adult hippocampus." *Trends Neurosci* **27**(8): 447-452.
- Kempermann, G., H. G. Kuhn, et al. (1997). "More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment." *Nature* **386**(6624): 493-495.
- Kempermann, G., H. G. Kuhn, et al. (1998). "Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate

- gyrus." *J Neurosci* **18**(9): 3206-3212.
- Kilpatrick, T. J. and P. F. Bartlett (1993). "Cloning and growth of multipotential neural precursors: requirements for proliferation and differentiation." *Neuron* **10**(2): 255-265.
- Kim, W. Y., X. Wang, et al. (2009). "GSK-3 is a master regulator of neural progenitor homeostasis." *Nat Neurosci* **12**(11): 1390-1397.
- Kirschenbaum, B., M. Nedergaard, et al. (1994). "In vitro neuronal production and differentiation by precursor cells derived from the adult human forebrain." *Cereb Cortex* **4**(6): 576-589.
- Kitchens, D. L., E. Y. Snyder, et al. (1994). "FGF and EGF are mitogens for immortalized neural progenitors." *J Neurobiol* **25**(7): 797-807.
- Knuesel, I., M. Nyffeler, et al. (2009). "Age-related accumulation of Reelin in amyloid-like deposits." *Neurobiol Aging* **30**(5): 697-716.
- Kornack, D. R. and P. Rakic (1999). "Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(10): 5768-5773.
- Kron, M. M., H. Zhang, et al. (2010). "The developmental stage of dentate granule cells dictates their contribution to seizure-induced plasticity." *J Neurosci* **30**(6): 2051-2059.
- Kronenberg, G., K. Reuter, et al. (2003). "Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli." *J Comp Neurol* **467**(4): 455-463.
- Kuhn, H. G., H. Dickinson-Anson, et al. (1996). "Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation." *J Neurosci* **16**(6): 2027-2033.
- Kuhn, H. G., J. Winkler, et al. (1997). "Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain." *J Neurosci* **17**(15): 5820-5829.
- Kurtz, A., A. Zimmer, et al. (1994). "The expression pattern of a novel gene encoding brain-fatty acid binding protein correlates with neuronal and glial cell development." *Development* **120**(9): 2637-2649.
- Kuwabara, T., J. Hsieh, et al. (2009). "Wnt-mediated activation of NeuroD1 and retro-elements during adult neurogenesis." *Nat Neurosci* **12**(9): 1097-1105.
- Kuwahara, A., Y. Hirabayashi, et al. (2010). "Wnt signaling and its downstream target N-myc regulate basal progenitors in the developing neocortex." *Development* **137**(7): 1035-1044.
- Kwon, C. H., B. W. Luikart, et al. (2006). "Pten regulates neuronal arborization and social interaction in mice." *Neuron* **50**(3): 377-388.
- Lee, J., W. Duan, et al. (2002). "Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice." *J Neurochem* **82**(6): 1367-1375.
- Lee, J. E., S. M. Hollenberg, et al. (1995). "Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein." *Science* **268**(5212): 836-844.
- Lee, S. J., Y. H. Chung, et al. (2006). "Age-related changes in glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) immunoreactivity in the central nervous system of rats." *Neurosci Lett* **409**(2): 134-139.
- Lee, S. M., S. Tole, et al. (2000). "A local Wnt-3a signal is required for development of the mammalian hippocampus." *Development* **127**(3): 457-467.
- Lee, Y., M. Su, et al. (2006). "Astrocyte heterogeneity revealed by expression of a GFAP-LacZ transgene." *Glia* **53**(7): 677-687.
- Lesort, M., R. S. Jope, et al. (1999). "Insulin transiently increases tau phosphorylation: involvement of glycogen synthase kinase-3beta and Fyn tyrosine kinase." *J Neurochem* **72**(2): 576-584.
- Lewis, S. A. and N. J. Cowan (1985). "Temporal expression of mouse glial fibrillary acidic protein mRNA studied by a rapid in situ hybridization procedure." *J Neurochem* **45**(3): 913-919.
- Lichtenwalner, R. J., M. E. Forbes, et al. (2001). "Intracerebroventricular infusion of insulin-like growth factor-I ameliorates the age-related decline in hippocampal neurogenesis." *Neuroscience* **107**(4): 603-613.
- Lie, D. C., S. A. Colamarino, et al. (2005). "Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis." *Nature* **437**(7063): 1370-1375.
- Lin, W., A. Kemper, et al. (2004). "Interferon-gamma induced medulloblastoma in the developing cerebellum." *J Neurosci* **24**(45): 10074-10083.
- Lind, D., S. Franken, et al. (2005). "Characterization of the neuronal marker NeuN as a multiply phosphorylated antigen with discrete subcellular localization." *J Neurosci Res* **79**(3): 295-302.
- Liu, D., C. Caldji, et al. (2000). "Influence of neonatal rearing conditions on stress-induced adrenocorticotropin responses and norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus." *J Neuroendocrinol* **12**(1): 5-12.

- Liu, J., K. Solway, et al. (1998). "Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils." *J Neurosci* **18**(19): 7768-7778.
- Liu, M., S. J. Pleasure, et al. (2000). "Loss of BETA2/NeuroD leads to malformation of the dentate gyrus and epilepsy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(2): 865-870.
- Liu, Y., N. Fujise, et al. (1996). "Distribution of calretinin immunoreactivity in the mouse dentate gyrus. I. General description." *Exp Brain Res* **108**(3): 389-403.
- Lochhead, P. A., R. Kinstrie, et al. (2006). "A chaperone-dependent GSK3beta transitional intermediate mediates activation-loop autophosphorylation." *Mol Cell* **24**(4): 627-633.
- LoTurco, J. (2004). "Doublecortin and a tale of two serines." *Neuron* **41**(2): 175-177.
- Lovestone, S., R. Killick, et al. (2007). "Schizophrenia as a GSK-3 dysregulation disorder." *Trends Neurosci* **30**(4): 142-149.
- Lovestone, S., C. H. Reynolds, et al. (1994). "Alzheimer's disease-like phosphorylation of the microtubule-associated protein tau by glycogen synthase kinase-3 in transfected mammalian cells." *Curr Biol* **4**(12): 1077-1086.
- Lowry, W. E., L. Richter, et al. (2008). "Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(8): 2883-2888.
- Lucas, J. J., F. Hernandez, et al. (2001). "Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice." *EMBO J* **20**(1-2): 27-39.
- Lledo, P. M., F. T. Merkle, et al. (2008). "Origin and function of olfactory bulb interneuron diversity." *Trends Neurosci* **31**(8): 392-400.
- Llorens-Martin, M., A. Fuster-Matanzo, et al. (2013). "GSK-3beta overexpression causes reversible alterations on postsynaptic densities and dendritic morphology of hippocampal granule neurons in vivo." *Mol Psychiatry* **18**(4): 451-460.
- Llorens-Martin, M., I. Torres-Aleman, et al. (2006). "Pronounced individual variation in the response to the stimulatory action of exercise on immature hippocampal neurons." *Hippocampus* **16**(5): 480-490.
- Llorens-Martin, M. and J. L. Trejo (2011). "Mifepristone prevents stress-induced apoptosis in newborn neurons and increases AMPA receptor expression in the dentate gyrus of C57/BL6 mice." *PLoS One* **6**(11): e28376.
- Madsen, T. M., A. Treschow, et al. (2000). "Increased neurogenesis in a model of electroconvulsive therapy." *Biol Psychiatry* **47**(12): 1043-1049.
- Magavi, S. S., B. R. Leavitt, et al. (2000). "Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice." *Nature* **405**(6789): 951-955.
- Magdesian, M. H., M. M. Carvalho, et al. (2008). "Amyloid-beta binds to the extracellular cysteine-rich domain of Frizzled and inhibits Wnt/beta-catenin signaling." *J Biol Chem* **283**(14): 9359-9368.
- Malberg, J. E., A. J. Eisch, et al. (2000). "Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus." *J Neurosci* **20**(24): 9104-9110.
- Mao, Y., X. Ge, et al. (2009). "Disrupted in schizophrenia 1 regulates neuronal progenitor proliferation via modulation of GSK3beta/beta-catenin signaling." *Cell* **136**(6): 1017-1031.
- Martin, D., A. I. Rojo, et al. (2004). "Regulation of heme oxygenase-1 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and the Nrf2 transcription factor in response to the antioxidant phytochemical carnosol." *J Biol Chem* **279**(10): 8919-8929.
- Masters, C. L., G. Simms, et al. (1985). "Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome." *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(12): 4245-4249.
- McKeever, P. E., D. A. Ross, et al. (1997). "A comparison of the predictive power for survival in gliomas provided by MIB-1, bromodeoxyuridine and proliferating cell nuclear antigen with histopathologic and clinical parameters." *J Neuropathol Exp Neurol* **56**(7): 798-805.
- Medina, M. and J. Avila (2010). "Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease." *Curr Pharm Des* **16**(25): 2790-2798.
- Menezes, J. R. and M. B. Luskin (1994). "Expression of neuron-specific tubulin defines a novel population in the proliferative layers of the developing telencephalon." *J Neurosci* **14**(9): 5399-5416.
- Messier, B., C. P. Leblond, et al. (1958). "Presence of DNA synthesis and mitosis in the brain of young adult mice." *Exp Cell Res* **14**(1): 224-226.
- Meyer, G., C. G. Perez-Garcia, et al. (2002). "Selective expression of doublecortin and LIS1 in developing human cortex suggests unique modes of neuronal movement." *Cereb Cortex* **12**(12): 1225-1236.
- Miettinen, R., A. I. Gulyas, et al. (1992). "Calretinin is present in non-pyramidal cells of the rat

- hippocampus--II. Co-existence with other calcium binding proteins and GABA." *Neuroscience* **48**(1): 29-43.
- Miki, T., S. Y. Yasuda, et al. (2011). "Wnt/beta-catenin signaling in embryonic stem cell self-renewal and somatic cell reprogramming." *Stem Cell Rev* **7**(4): 836-846.
- Miller, R. J., W. Rostene, et al. (2008). "Chemokine action in the nervous system." *J Neurosci* **28**(46): 11792-11795.
- Ming, G. L. and H. Song (2005). "Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system." *Annu Rev Neurosci* **28**: 223-250.
- Ming, G. L. and H. Song (2011). "Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions." *Neuron* **70**(4): 687-702.
- Minturn, J. E., D. H. Geschwind, et al. (1995). "Early postmitotic neurons transiently express TOAD-64, a neural specific protein." *J Comp Neurol* **355**(3): 369-379.
- Mirescu, C. and E. Gould (2006). "Stress and adult neurogenesis." *Hippocampus* **16**(3): 233-238.
- Miyata, T., T. Maeda, et al. (1999). "NeuroD is required for differentiation of the granule cells in the cerebellum and hippocampus." *Genes Dev* **13**(13): 1647-1652.
- Monje, M. L., H. Toda, et al. (2003). "Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis." *Science* **302**(5651): 1760-1765.
- Morishima-Kawashima, M., M. Hasegawa, et al. (1995). "Proline-directed and non-proline-directed phosphorylation of PHF-tau." *J Biol Chem* **270**(2): 823-829.
- Morshead, C. M., B. A. Reynolds, et al. (1994). "Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells." *Neuron* **13**(5): 1071-1082.
- Moser, M. B. and E. I. Moser (1998). "Functional differentiation in the hippocampus." *Hippocampus* **8**(6): 608-619.
- Mucke, L., M. B. Oldstone, et al. (1991). "Rapid activation of astrocyte-specific expression of GFAP-lacZ transgene by focal injury." *New Biol* **3**(5): 465-474.
- Mullen, R. J., C. R. Buck, et al. (1992). "NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates." *Development* **116**(1): 201-211.
- Mullis, K. B. and F. A. Faloon (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." *Methods Enzymol* **155**: 335-350.
- Munji, R. N., Y. Choe, et al. (2011). "Wnt signaling regulates neuronal differentiation of cortical intermediate progenitors." *J Neurosci* **31**(5): 1676-1687.
- Munoz-Elias, G., D. Woodbury, et al. (2003). "Marrow stromal cells, mitosis, and neuronal differentiation: stem cell and precursor functions." *Stem Cells* **21**(4): 437-448.
- Munoz-Montano, J. R., F. J. Moreno, et al. (1997). "Lithium inhibits Alzheimer's disease-like tau protein phosphorylation in neurons." *FEBS Lett* **411**(2-3): 183-188.
- Munoz-Sanjuan, I. and A. H. Brivanlou (2002). "Neural induction, the default model and embryonic stem cells." *Nat Rev Neurosci* **3**(4): 271-280.
- Muroyama, Y., M. Fujihara, et al. (2002). "Wnt signaling plays an essential role in neuronal specification of the dorsal spinal cord." *Genes Dev* **16**(5): 548-553.
- Muroyama, Y., H. Kondoh, et al. (2004). "Wnt proteins promote neuronal differentiation in neural stem cell culture." *Biochem Biophys Res Commun* **313**(4): 915-921.
- Nacher, J., J. M. Blasco-Ibanez, et al. (2002). "Non-granule PSA-NCAM immunoreactive neurons in the rat hippocampus." *Brain Res* **930**(1-2): 1-11.
- Nacher, J., D. R. Rosell, et al. (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**(3): 512-520.
- Nakagawa, E., Y. Aimi, et al. (2000). "Enhancement of progenitor cell division in the dentate gyrus triggered by initial limbic seizures in rat models of epilepsy." *Epilepsia* **41**(1): 10-18.
- Nilsson, M., E. Perfilieva, et al. (1999). "Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory." *J Neurobiol* **39**(4): 569-578.
- Noble, M. and J. Dietrich (2004). "The complex identity of brain tumors: emerging concerns regarding origin, diversity and plasticity." *Trends Neurosci* **27**(3): 148-154.
- Nunomura, A., G. Perry, et al. (2001). "Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease." *J Neuropathol Exp Neurol* **60**(8): 759-767.
- Ohsawa, I., K. Nishimaki, et al. (2008). "Age-dependent neurodegeneration accompanying memory loss in transgenic mice defective in mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 activity." *J Neurosci* **28**(24): 6239-6249.
- Okamoto, M., K. Inoue, et al. (2011). "Reduction in paracrine Wnt3 factors during aging causes impaired

- adult neurogenesis." *FASEB J* **25**(10): 3570-3582.
- Okuyama, N., N. Takagi, et al. (2004). "Phosphorylation of extracellular-regulating kinase in NMDA receptor antagonist-induced newly generated neurons in the adult rat dentate gyrus." *J Neurochem* **88**(3): 717-725.
- Overstreet-Wadiche, L. S., D. A. Bromberg, et al. (2006). "Seizures accelerate functional integration of adult-generated granule cells." *J Neurosci* **26**(15): 4095-4103.
- Palmer, T. D., J. Ray, et al. (1995). "FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain." *Mol Cell Neurosci* **6**(5): 474-486.
- Parent, J. M., S. Janumpalli, et al. (1998). "Increased dentate granule cell neurogenesis following amygdala kindling in the adult rat." *Neurosci Lett* **247**(1): 9-12.
- Parent, J. M., E. Tada, et al. (1999). "Inhibition of dentate granule cell neurogenesis with brain irradiation does not prevent seizure-induced mossy fiber synaptic reorganization in the rat." *J Neurosci* **19**(11): 4508-4519.
- Parent, J. M., V. V. Valentin, et al. (2002). "Prolonged seizures increase proliferating neuroblasts in the adult rat subventricular zone-olfactory bulb pathway." *J Neurosci* **22**(8): 3174-3188.
- Parent, J. M., Z. S. Vexler, et al. (2002). "Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke." *Ann Neurol* **52**(6): 802-813.
- Parent, J. M., T. W. Yu, et al. (1997). "Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus." *J Neurosci* **17**(10): 3727-3738.
- Park, I. H., P. H. Lerou, et al. (2008). "Generation of human-induced pluripotent stem cells." *Nat Protoc* **3**(7): 1180-1186.
- Paton, J. A. and F. N. Nottebohm (1984). "Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits." *Science* **225**(4666): 1046-1048.
- Pei, J. J., E. Braak, et al. (1999). "Distribution of active glycogen synthase kinase 3beta (GSK-3beta) in brains staged for Alzheimer disease neurofibrillary changes." *J Neuropathol Exp Neurol* **58**(9): 1010-1019.
- Pencea, V., K. D. Bingaman, et al. (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**(17): 6706-6717.
- Phiel, C. J., C. A. Wilson, et al. (2003). "GSK-3alpha regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides." *Nature* **423**(6938): 435-439.
- Piao, S., S. H. Lee, et al. (2008). "Direct inhibition of GSK3beta by the phosphorylated cytoplasmic domain of LRP6 in Wnt/beta-catenin signaling." *PLoS One* **3**(12): e4046.
- Rajkowska, G., J. J. Miguel-Hidalgo, et al. (1999). "Morphometric evidence for neuronal and glial prefrontal cell pathology in major depression." *Biol Psychiatry* **45**(9): 1085-1098.
- Rami, A., A. Brehier, et al. (1987). "Cholecalciferol (28-kDa calcium-binding protein) in the rat hippocampus: development in normal animals and in altered thyroid states. An immunocytochemical study." *Dev Biol* **124**(1): 228-238.
- Rao, M. S. and A. K. Shetty (2004). "Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus." *Eur J Neurosci* **19**(2): 234-246.
- Ray, J., H. K. Raymon, et al. (1995). "Generation and culturing of precursor cells and neuroblasts from embryonic and adult central nervous system." *Methods Enzymol* **254**: 20-37.
- Reif, A., S. Fritzen, et al. (2006). "Neural stem cell proliferation is decreased in schizophrenia, but not in depression." *Mol Psychiatry* **11**(5): 514-522.
- Reynolds, B. A., W. Tetzlaff, et al. (1992). "A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes." *J Neurosci* **12**(11): 4565-4574.
- Reynolds, B. A. and S. Weiss (1992). "Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system." *Science* **255**(5052): 1707-1710.
- Richards, L. J., T. J. Kilpatrick, et al. (1992). "De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(18): 8591-8595.
- Robertson, G., D. Garrick, et al. (1995). "Position-dependent variegation of globin transgene expression in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(12): 5371-5375.
- Sadoul, R., M. Hirn, et al. (1983). "Adult and embryonic mouse neural cell adhesion molecules have different binding properties." *Nature* **304**(5924): 347-349.
- Sahin Kaya, S., A. Mahmood, et al. (1999). "Expression of nestin after traumatic brain injury in rat brain." *Brain Res* **840**(1-2): 153-157.

- Sanai, N., T. Nguyen, et al. (2011). "Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy." *Nature* **478**(7369): 382-386.
- Santarelli, L., M. Saxe, et al. (2003). "Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants." *Science* **301**(5634): 805-809.
- Sarnat, H. B., D. Nochlin, et al. (1998). "Neuronal nuclear antigen (NeuN): a marker of neuronal maturation in early human fetal nervous system." *Brain Dev* **20**(2): 88-94.
- Scott, B. W., S. Wang, et al. (1998). "Kindling-induced neurogenesis in the dentate gyrus of the rat." *Neurosci Lett* **248**(2): 73-76.
- Schaar, B. T., K. Kinoshita, et al. (2004). "Doublecortin microtubule affinity is regulated by a balance of kinase and phosphatase activity at the leading edge of migrating neurons." *Neuron* **41**(2): 203-213.
- Schaffer, B. A., L. Bertram, et al. (2008). "Association of GSK3B with Alzheimer disease and frontotemporal dementia." *Arch Neurol* **65**(10): 1368-1374.
- Schmidt-Hieber, C., P. Jonas, et al. (2004). "Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus." *Nature* **429**(6988): 184-187.
- Scholzen, T. and J. Gerdes (2000). "The Ki-67 protein: from the known and the unknown." *J Cell Physiol* **182**(3): 311-322.
- Seaberg, R. M. and D. van der Kooy (2002). "Adult rodent neurogenic regions: the ventricular subependyma contains neural stem cells, but the dentate gyrus contains restricted progenitors." *J Neurosci* **22**(5): 1784-1793.
- Seaberg, R. M. and D. van der Kooy (2003). "Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions." *Trends Neurosci* **26**(3): 125-131.
- Seib, D. R., N. S. Corsini, et al. (2013). "Loss of Dickkopf-1 restores neurogenesis in old age and counteracts cognitive decline." *Cell Stem Cell* **12**(2): 204-214.
- Seki, T. (2002). "Expression patterns of immature neuronal markers PSA-NCAM, CRMP-4 and NeuroD in the hippocampus of young adult and aged rodents." *J Neurosci Res* **70**(3): 327-334.
- Seki, T. (2002). "Hippocampal adult neurogenesis occurs in a microenvironment provided by PSA-NCAM-expressing immature neurons." *J Neurosci Res* **69**(6): 772-783.
- Seki, T. and Y. Arai (1991). "The persistent expression of a highly polysialylated NCAM in the dentate gyrus of the adult rat." *Neurosci Res* **12**(4): 503-513.
- Seki, T. and Y. Arai (1993). "Distribution and possible roles of the highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) in the developing and adult central nervous system." *Neurosci Res* **17**(4): 265-290.
- Seki, T. and Y. Arai (1993). "Highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) is expressed by newly generated granule cells in the dentate gyrus of the adult rat." *J Neurosci* **13**(6): 2351-2358.
- Seki, T. and Y. Arai (1995). "Age-related production of new granule cells in the adult dentate gyrus." *Neuroreport* **6**(18): 2479-2482.
- Seki, T. and Y. Arai (1999). "Temporal and spacial relationships between PSA-NCAM-expressing, newly generated granule cells, and radial glia-like cells in the adult dentate gyrus." *J Comp Neurol* **410**(3): 503-513.
- Sengupta, A., Q. Wu, et al. (1997). "Potentiation of GSK-3-catalyzed Alzheimer-like phosphorylation of human tau by cdk5." *Mol Cell Biochem* **167**(1-2): 99-105.
- Sequier, J. M., W. Hunziker, et al. (1988). "Localization of calbindin D28 mRNA in rat tissues by in situ hybridization." *Neurosci Lett* **86**(2): 155-160.
- Sereno, L., M. Coma, et al. (2009). "A novel GSK-3beta inhibitor reduces Alzheimer's pathology and rescues neuronal loss in vivo." *Neurobiol Dis* **35**(3): 359-367.
- Seress, L., A. I. Gulyas, et al. (1991). "Parvalbumin- and calbindin D28k-immunoreactive neurons in the hippocampal formation of the macaque monkey." *J Comp Neurol* **313**(1): 162-177.
- Seress, L., A. I. Gulyas, et al. (1992). "Pyramidal neurons are immunoreactive for calbindin D28k in the CA1 subfield of the human hippocampus." *Neurosci Lett* **138**(2): 257-260.
- Seress, L. and J. Pokorny (1981). "Structure of the granular layer of the rat dentate gyrus. A light microscopic and Golgi study." *J Anat* **133**(Pt 2): 181-195.
- Seri, B., J. M. Garcia-Verdugo, et al. (2004). "Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus." *J Comp Neurol* **478**(4): 359-378.
- Seri, B., J. M. Garcia-Verdugo, et al. (2001). "Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus." *J Neurosci* **21**(18): 7153-7160.
- Sheline, Y. I. (1996). "Hippocampal atrophy in major depression: a result of depression-induced

- neurotoxicity?" *Mol Psychiatry* **1**(4): 298-299.
- Shors, T. J., G. Miesegaes, et al. (2001). "Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories." *Nature* **410**(6826): 372-376.
- Singh, T. J., T. Zaidi, et al. (1995). "Modulation of GSK-3-catalyzed phosphorylation of microtubule-associated protein tau by non-proline-dependent protein kinases." *FEBS Lett* **358**(1): 4-8.
- Sirerol-Piquer, M., P. Gomez-Ramos, et al. (2011). "GSK3beta overexpression induces neuronal death and a depletion of the neurogenic niches in the dentate gyrus." *Hippocampus* **21**(8): 910-922.
- Snyder, J. S., R. Radik, et al. (2009). "Anatomical gradients of adult neurogenesis and activity: young neurons in the ventral dentate gyrus are activated by water maze training." *Hippocampus* **19**(4): 360-370.
- Spittaels, K., C. Van den Haute, et al. (2000). "Glycogen synthase kinase-3beta phosphorylates protein tau and rescues the axonopathy in the central nervous system of human four-repeat tau transgenic mice." *J Biol Chem* **275**(52): 41340-41349.
- Starborg, M., K. Gell, et al. (1996). "The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression." *J Cell Sci* **109** (Pt 1): 143-153.
- Steiner, B., F. Klempin, et al. (2006). "Type-2 cells as link between glial and neuronal lineage in adult hippocampal neurogenesis." *Glia* **54**(8): 805-814.
- Suhonen, J. O., D. A. Peterson, et al. (1996). "Differentiation of adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons in vivo." *Nature* **383**(6601): 624-627.
- Sun, X., S. Sato, et al. (2002). "Lithium inhibits amyloid secretion in COS7 cells transfected with amyloid precursor protein C100." *Neurosci Lett* **321**(1-2): 61-64.
- Takagi, Y., K. Nozaki, et al. (1999). "Proliferation of neuronal precursor cells in the dentate gyrus is accelerated after transient forebrain ischemia in mice." *Brain Res* **831**(1-2): 283-287.
- Takahashi, M., K. Tomizawa, et al. (2000). "Distribution of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3beta, phosphatases 2A and 2B, and phosphorylated tau in the developing rat brain." *Brain Res* **857**(1-2): 193-206.
- Takashima, A., M. Murayama, et al. (1998). "Presenilin 1 associates with glycogen synthase kinase-3beta and its substrate tau." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(16): 9637-9641.
- Tamai, K., M. Semenov, et al. (2000). "LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction." *Nature* **407**(6803): 530-535.
- Tamimi, R., E. Steingrimsson, et al. (1996). "The NEUROD gene maps to human chromosome 2q32 and mouse chromosome 2." *Genomics* **34**(3): 418-421.
- Tanaka, T., F. F. Serneo, et al. (2004). "Lis1 and doublecortin function with dynein to mediate coupling of the nucleus to the centrosome in neuronal migration." *J Cell Biol* **165**(5): 709-721.
- Tanapat, P., N. B. Hastings, et al. (1999). "Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat." *J Neurosci* **19**(14): 5792-5801.
- ten Berge, D., D. Kurek, et al. (2011). "Embryonic stem cells require Wnt proteins to prevent differentiation to epiblast stem cells." *Nat Cell Biol* **13**(9): 1070-1075.
- ter Haar, E., J. T. Coll, et al. (2001). "Structure of GSK3beta reveals a primed phosphorylation mechanism." *Nat Struct Biol* **8**(7): 593-596.
- Thornton, T. M., G. Pedraza-Alva, et al. (2008). "Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3beta inactivation." *Science* **320**(5876): 667-670.
- Townsend, M., T. Mehta, et al. (2007). "Soluble Abeta inhibits specific signal transduction cascades common to the insulin receptor pathway." *J Biol Chem* **282**(46): 33305-33312.
- Trejo, J. L., E. Carro, et al. (2001). "Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus." *J Neurosci* **21**(5): 1628-1634.
- Uittenbogaard, M. and A. Chiaramello (2002). "Constitutive overexpression of the basic helix-loop-helix Nex1/MATH-2 transcription factor promotes neuronal differentiation of PC12 cells and neurite regeneration." *J Neurosci Res* **67**(2): 235-245.
- van Praag, H., B. R. Christie, et al. (1999). "Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(23): 13427-13431.
- van Praag, H., G. Kempermann, et al. (1999). "Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus." *Nat Neurosci* **2**(3): 266-270.
- van Praag, H., A. F. Schinder, et al. (2002). "Functional neurogenesis in the adult hippocampus." *Nature* **415**(6875): 1030-1034.
- Varela-Nallar, L. and N. C. Inestrosa (2013). "Wnt signaling in the regulation of adult hippocampal neurogenesis." *Front Cell Neurosci* **7**: 100.

- Wakade, C. G., S. P. Mahadik, et al. (2002). "Atypical neuroleptics stimulate neurogenesis in adult rat brain." *J Neurosci Res* **69**(1): 72-79.
- Wang, Q. M., C. J. Fiol, et al. (1994). "Glycogen synthase kinase-3 beta is a dual specificity kinase differentially regulated by tyrosine and serine/threonine phosphorylation." *J Biol Chem* **269**(20): 14566-14574.
- Weber, T., V. Baier, et al. (2011). "Inducible gene expression in GFAP+ progenitor cells of the SGZ and the dorsal wall of the SVZ-A novel tool to manipulate and trace adult neurogenesis." *Glia* **59**(4): 615-626.
- Whitney, N. P., T. M. Eidem, et al. (2009). "Inflammation mediates varying effects in neurogenesis: relevance to the pathogenesis of brain injury and neurodegenerative disorders." *J Neurochem* **108**(6): 1343-1359.
- Winner, B., C. M. Cooper-Kuhn, et al. (2002). "Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb." *Eur J Neurosci* **16**(9): 1681-1689.
- Wiskott, L., M. J. Rasch, et al. (2006). "A functional hypothesis for adult hippocampal neurogenesis: avoidance of catastrophic interference in the dentate gyrus." *Hippocampus* **16**(3): 329-343.
- Wolf, H. K., R. Buslei, et al. (1996). "NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology." *J Histochem Cytochem* **44**(10): 1167-1171.
- Woodgett, J. R. (1990). "Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A." *EMBO J* **9**(8): 2431-2438.
- Wu, G., H. Huang, et al. (2009). "Inhibition of GSK3 phosphorylation of beta-catenin via phosphorylated PPPSPXS motifs of Wnt coreceptor LRP6." *PLoS One* **4**(3): e4926.
- Yamaguchi, M., H. Saito, et al. (2000). "Visualization of neurogenesis in the central nervous system using nestin promoter-GFP transgenic mice." *Neuroreport* **11**(9): 1991-1996.
- Yamashita, Y. M., D. L. Jones, et al. (2003). "Orientation of asymmetric stem cell division by the APC tumor suppressor and centrosome." *Science* **301**(5639): 1547-1550.
- Yang, D. S., D. H. Small, et al. (1999). "Apolipoprotein E promotes the binding and uptake of beta-amyloid into Chinese hamster ovary cells in an isoform-specific manner." *Neuroscience* **90**(4): 1217-1226.
- Yang, H. K., N. L. Sundholm-Peters, et al. (2004). "Distribution of doublecortin expressing cells near the lateral ventricles in the adult mouse brain." *J Neurosci Res* **76**(3): 282-295.
- Yoo, Y. M., U. Lee, et al. (2005). "Apoptosis and nestin expression in the cortex and cultured astrocytes following 6-OHDA administration." *Neurosci Lett* **382**(1-2): 88-92.
- Zhao, C., E. M. Teng, et al. (2006). "Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus." *J Neurosci* **26**(1): 3-11.
- Zhou, F. Q. and W. D. Snider (2005). "Cell biology. GSK-3beta and microtubule assembly in axons." *Science* **308**(5719): 211-214.
- Zhou, X. L., M. Giacobini, et al. (2007). "Association of adenomatous polyposis coli (APC) gene polymorphisms with autism spectrum disorder (ASD)." *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **144B**(3): 351-354.
- Ziv, Y., N. Ron, et al. (2006). "Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood." *Nat Neurosci* **9**(2): 268-275.

ANEXO
