



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica  
y del Medio Natural

Análisis de la dinámica de activación de células madre  
neurales en condiciones de regulación metabólica

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Hernández Maciá, Miriam

Tutor/a: Giraldo Reboloso, Esther

Cotutor/a externo: López Fabuel, Irene

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

## **Análisis de la dinámica de activación de células madre neurales en condiciones de regulación metabólica**

**Resumen:** Las células madre neurales (NSCs), localizadas en dos nichos neurogénicos en el cerebro adulto de roedores, pueden encontrarse en diferentes estados de activación, que van desde un estado quiescente, no proliferativo (qNSCs), hasta un estado con proliferación activa (aNSCs) (Cheung and Rando et al., 2013). Conocer los factores responsables de la activación de las NSCs podría permitir regular la neurogénesis. Uno de los factores que controla la activación de las NSCs es el metabolismo. Así, se ha observado cómo el estado quiescente es dependiente de la glucólisis y la oxidación de los ácidos grasos, mientras que el estado activado lo es de la fosforilación oxidativa (Codega et al., 2014; Knobloch et al., 2017). En este trabajo, hemos estudiado el papel de la glucólisis para la inducción y el mantenimiento del estado quiescente de las NSCs adultas en los diferentes nichos neurogénicos. Para ello, hemos utilizado un ratón condicional para eliminar la enzima proglucolítica 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa isoforma 3 (*Pfkfb3*<sup>LoxP/LoxP</sup>) en células madre neurales, gracias al empleo del ratón GFAP::Cre. Los resultados muestran como en la edad adulta se produce una reducción en el número de NSCs en ambos nichos neurogénicos. Además, en el caso de la zona subependimaria los resultados sugieren una mayor diferenciación de las NSCs a neuronas y astrocitos. En conjunto, estos resultados evidencian cómo el metabolismo glucolítico es necesario para el mantenimiento de las NSCs en su estado indiferenciado.

**Palabras clave:** NSCs, glucólisis, hipocampo, SEZ, *Pfkfb3*.

## **Analysis of neural stem cell activation dynamics under conditions of metabolic regulation**

**Abstract:** Neural stem cells (NSCs), located in two neurogenic niches in the adult brain of rodents, can be found in different states of activation, ranging from a quiescent, non-proliferative state (qNSCs) to a state with active proliferation (aNSCs) (Cheung and Rando et al., 2013). Knowing the factors responsible for the activation of NSCs could allow neurogenesis to be regulated. One of the factors that controls the activation of NSCs is metabolism. Thus, it has been observed how the quiescent state is dependent on glycolysis and the oxidation of fatty acids, while the activated state is dependent on oxidative phosphorylation (Codega et al., 2014; Knobloch et al., 2017). In this work, we have studied the role of glycolysis for the induction and maintenance of the quiescent state of adult NSCs in different neurogenic niches. To do this, we have used a conditional mouse to eliminate the proglycolytic enzyme 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase isoform 3 (*Pfkfb3*<sup>LoxP/LoxP</sup>) in neural stem cells, thanks to the use of the GFAP::Cre mouse. The results show how in adulthood there is a reduction in the number of NSCs in both neurogenic niches. Furthermore, in the case of the subependymal zone, the results suggest greater differentiation of NSCs into neurons and astrocytes. Together, these results show how glycolytic metabolism is necessary for the maintenance of NSCs in their undifferentiated state.

**Key words:** NSCs, glycolysis, hippocampus, SEZ, *Pfkfb3*.

# ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN .....	1
1.1	Neurogénesis y nichos neurogénicos.....	1
1.2	Células madre neurales.....	2
1.3	Papel del metabolismo en las NSCs .....	4
2	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	6
3	MATERIALES Y MÉTODOS .....	7
3.1	Animales de experimentación .....	7
3.2	Inmunohistoquímica .....	8
3.3	Obtención de tejido encefálico de ratón .....	10
3.4	Extracción de RNA y análisis de la expresión génica por RT-qPCR .....	10
3.5	Western blot.....	11
3.6	Análisis de imagen .....	12
3.7	Cuantificación y análisis estadístico.....	13
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	13
4.1	La modificación de los niveles de PFKFB3 altera el metabolismo glucolítico en los nichos neurogénicos .....	13
4.2	La supresión de PFKFB3 disminuye la proporción de células madre neurales en los nichos neurogénicos adultos .....	15
4.3	La reducción de metabolismo glucolítico en las NSCs modifica la abundancia relativa de los distintos tipos celulares en los nichos neurogénicos .....	18
4.3.1	Cuantificación de estados diferenciados en la SEZ.....	18
4.4	Los cambios en la activación de las NSCs pueden ser debidos a cambios en la vía de señalización de ERK1,2 en la SEZ .....	22
5	CONCLUSIONES .....	22
6	REFERENCIAS.....	23
7	ANEXOS.....	26
7.1	ANEXO I. Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la agenda 2030 .....	26
7.2	ANEXO II. Script en FiJi para determinar el porcentaje de células positivas para Ki67.....	27

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema en visión sagital del cerebro de roedores adultos en la que se identifican los nichos neurogénicos.....	2
<b>Figura 2.</b> Esquema de la dinámica de división de una NSC.....	3
<b>Figura 3.</b> Esquema de la ruta de la glucólisis. ....	6
<b>Figura 4.</b> Expresión génica relativa de enzimas de la glucólisis en (A) SEZ e (B) hipocampo. ....	14
<b>Figura 5.</b> La supresión de Pfkfb3 en la SEZ modifica la proporción de NSCs.....	15
<b>Figura 6.</b> La supresión de Pfkfb3 en el hipocampo modifica la proporción de NSCs. ....	16
<b>Figura 7.</b> Porcentaje de LRCs en (A) la SEZ y (B) el DG del hipocampo.....	17
<b>Figura 8.</b> Porcentaje de células en proliferación en la SEZ.....	18
<b>Figura 9.</b> La supresión de Pfkfb3 promueve la diferenciación en la SEZ.....	19
<b>Figura 10.</b> La reducción en la expresión de Pfkfb3 en el hipocampo modifica la abundancia de neuronas maduras en la zona. ....	20
<b>Figura 11.</b> La supresión de Pfkfb3 reduce la expresión de Olig2 en el hipocampo. ....	21
<b>Figura 12.</b> La supresión de Pfkfb3 reduce la activación de las kinasas ERK1,2 en SEZ. ....	22

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Listado de anticuerpos primarios para inmunohistoquímica. ....	9
<b>Tabla 2.</b> Listado de anticuerpos secundarios para inmunohistoquímica.....	9
<b>Tabla 3.</b> Sondas TaqMan empleadas en los análisis de expresión génica.....	11
<b>Tabla 4.</b> Anticuerpos primarios para ensayos de transferencia tipo Western.....	12
<b>Tabla 5.</b> Anticuerpos secundarios para ensayos de transferencia tipo Western. ....	12
<b>Tabla 6.</b> Grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS). ....	26

## **NOMENCLATURAS Y ABREVIATURAS**

**Aif1:** factor inflamatorio 1 del aloinjerto

**aNSCs:** células madre neurales activadas

**BCA:** ácido bicinconínico

**$\beta$ -ox:** beta oxidación

**cDNA:** ADN complementario

**DAPI:** 6-diamidino-2-fenilindol

**Dcx:** doblecortina

**DEG:** genes expresados diferencialmente

**DG:** giro dentado

**DNA:** ácido desoxirribonucleico

**DTT:** ditioneitol

**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético

**EdU:** 5-etinil-2'-desoxiuridina

**FAO:**  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos

**GFAP:** proteína glial fibrilar ácida

**Hk2:** hexoquinasa 2

**HRP:** peroxidasa de rábano

**LRCs:** células de retención marcadas

**MBP:** proteína básica de mielina

**mRNA:** ARN mensajero

**NSCs:** células madre neurales

**OB:** bulbo olfatorio

**OXPHOS:** fosforilación oxidativa mitocondrial

**PB:** tampón fosfato

**PBS:** solución salina tamponada con fosfato

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

**PFA:** paraformaldehído

**PFKFB3:** 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bifosfatasa isoforma 3

**PFK1:** 6-fosfofructo-1-quinasa

**Pgk1:** fosfoglicerato quinasa 1

**Pkm2:** piruvato quinasa M2

**qNSCs:** células madre neurales quiescentes

**Rbfox3:** proteína de unión al RNA, homólogo 3 de fox-1

**RIPA:** análisis de radioinmunoprecipitación

**RMS:** vía rostral migratoria

**PMSF:** fluoruro de fenilmetilsulfonilo

**RNA:** ácido ribonucleico

**RNA-seq:** secuenciación de ARN

**RT:** retrotranscripción

**RT-qPCR:** PCR cuantitativa con transcriptasa inversa

**scRNA-seq:** secuenciación de ARN de células individuales

**SEZ:** zona subependimaria

**SGZ:** zona subgranular

**SN:** sistema nervioso

**Sox2:** factor de transcripción con caja SYR 2

**TCA:** ácidos tricarbónicos

**TTBS:** disolución tamponada con Tris y Tween 20

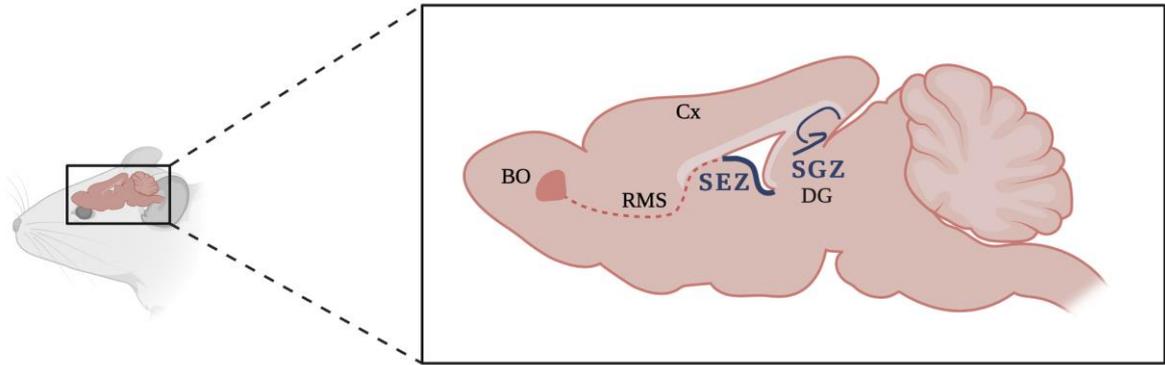
**V-SVZ:** zona subventricular

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 Neurogénesis y nichos neurogénicos

El cerebro es uno de los órganos más complejos de los mamíferos. Para garantizar su correcto funcionamiento es importante controlar el número de células, su tipo y localización dentro de las áreas cerebrales, así como sus conexiones (Knobloch and Jessberger, 2017). El proceso por el cual se forman nuevas neuronas a partir de precursores se define como neurogénesis. Este proceso, altamente regulado, ocurre principalmente durante el desarrollo embrionario y las primeras etapas postnatales para la formación del sistema nervioso (SN). Sin embargo, desde hace unas décadas se sabe que también tiene lugar en el cerebro adulto como mecanismo para el reemplazo neuronal (Navarro-Quiroz et al., 2018). Además, la neurogénesis deficiente o alterada se ha asociado con enfermedades como la epilepsia y la depresión. Por tanto, entender los mecanismos moleculares que rigen el proceso neurogénico en el cerebro adulto puede permitir el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos (Knobloch and Jessberger, 2015).

El reemplazo celular en el SN adulto se lleva a cabo a partir de células madre neurales (NSCs, por sus siglas en inglés) localizadas en los nichos neurogénicos, capaces de autorrenovarse y de generar células diferenciadas propias de este tejido, como son las neuronas, los astrocitos y los oligodendrocitos (Navarro-Quiroz et al., 2018). En el cerebro adulto de mamíferos, existen dos regiones neurogénicas principales que albergan poblaciones remanentes de NSCs, capaces de generar nuevas neuronas durante toda la vida del individuo: la zona subependimaria en las paredes de los ventrículos laterales (SEZ, por sus siglas en inglés; también conocida como zona subventricular o V-SVZ) y la zona subgranular (SGZ, por sus siglas en inglés) del giro dentado (DG, por sus siglas en inglés) del hipocampo (Obernier and Alvarez-Buylla, 2019). Mientras que en el hipocampo los precursores neurales se diferencian cerca de su lugar de origen, en el caso de la SEZ, los neuroblastos migran hasta el bulbo olfatorio a través de la vía rostral migratoria, donde terminarán diferenciándose a interneuronas maduras. En la SEZ también se encuentran precursores gliales que darán lugar a astrocitos y oligodendrocitos (Obernier and Alvarez-Buylla, 2019; Lim and Alvarez-Buylla, 2016) (**Figura 1**).

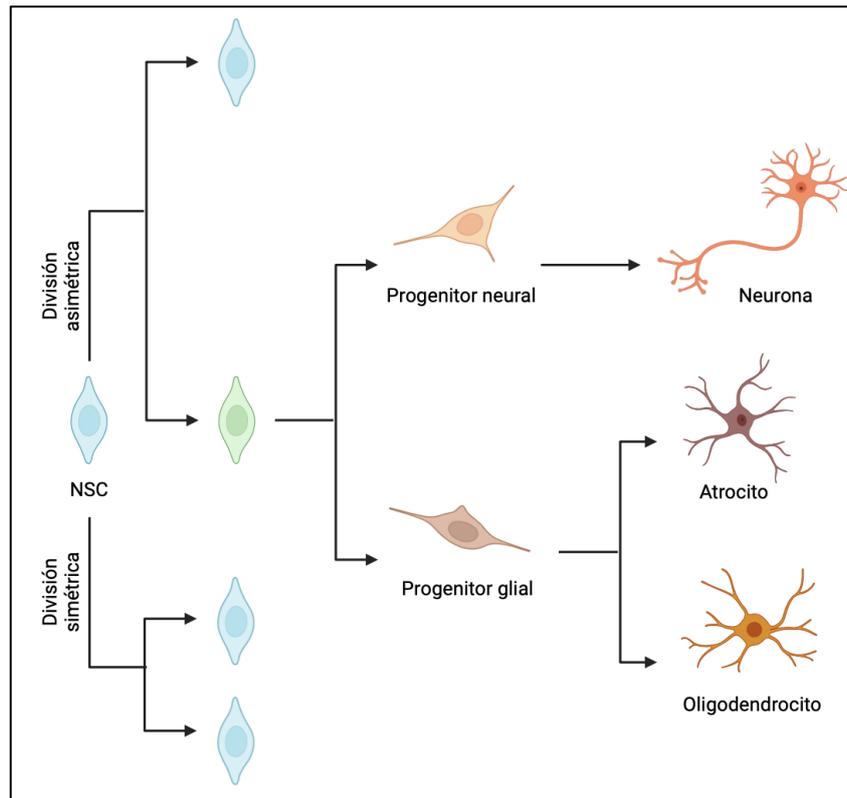


**Figura 1. Esquema en visión sagital del cerebro de roedores adultos en la que se identifican los nichos neurogénicos.** Los nichos principales donde residen las NSCs adultas son la zona subventricular (SEZ) y la zona subgranular (SGZ) del giro dentado (DG) del hipocampo. Las NSCs de SEZ generan neuroblastos que viajan hacia el bulbo olfatorio (OB) a través de la vía rostral migratoria (RMS) donde se diferencian a neuronas maduras, y oligodendrocitos (Figura creada con Biorender). Cx: córtex.

## 1.2 Células madre neurales

Las NSCs son células multipotentes, capaces de dar lugar a precursores neurales y gliales indiferenciados. Estas células, se encuentran en ambientes o nichos especializados, en los que tanto la matriz extracelular como el resto de células que conforman los nichos, ejercen un papel importante en el mantenimiento, activación y diferenciación de las NSCs (Blasco-Chamarro and Fariñas, 2023).

Las NSCs adoptan diferentes modos de división para renovar la población de células madre mientras generan progenies diferenciadas. Mediante divisiones simétricas se mantiene la población de NSCs, en cambio, cuando las NSCs se dividen de manera asimétrica una de las células hija será idéntica a la célula madre y la otra dará lugar a un precursor indiferenciado con alta capacidad proliferativa, a partir del cual se generarán de forma posterior precursores unipotenciales comprometidos con algún tipo celular de la estirpe neural (Obernier et al., 2018; Simons and Clevers, 2011) (**Figura 2**).



**Figura 2. Esquema de la dinámica de división de una NSC.** Las NSCs se pueden dividir simétrica o asimétricamente, lo cual permite mantener la población de NSCs remanente o bien diferenciarse a otros tipos celulares más especializados como son las neuronas, los astrocitos o los oligodendrocitos (Figura creada con Biorender).

Las NSCs presentes en los nichos neurogénicos pueden encontrarse en diferentes estados de activación. Así, podemos encontrar NSCs activadas, es decir, capaces de proliferar y dar progeñe, y células en un estado quiescente, detenidas de forma reversible en la fase G0 del ciclo celular (Urbán et al., 2019). En este contexto, podemos distinguir dos subpoblaciones de NSCs con diferentes grados de quiescencia. Por un lado, el estado *dormant* o de quiescencia profunda (*deep quiescence*) y el estado propenso a activación o *primed* (Llorens-Bobadilla, 2015). Las NSCs quiescentes (qNSCs) se distinguen de las activadas (aNSCs), además de por encontrarse en un arresto del ciclo celular, por un perfil transcriptómico y metabólico diferente. En el caso de las aNSCs, están enriquecidas en RNA mensajeros de genes que participan en la transcripción, traducción y reparación del DNA, mientras que, en las qNSCs, los transcritos se encuentran más relacionados con la matriz extracelular, la adhesión celular, la comunicación célula-célula y el lisosoma (Morales and Mira, 2019). En cuanto al perfil metabólico, los estudios de RNAseq han evidenciado como las aNSCs recurren principalmente a la fosforilación oxidativa mitocondrial (OXPHOS) para obtener energía, mientras que las qNSCs presentan un metabolismo más centrado en la glucólisis y la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos (Beckervordersandforth, 2017; Llorens-Bobadilla, 2015; Shin et al., 2015). De hecho, se ha observado como la salida de quiescencia de las NSCs está

marcada, entre otros procesos, por una inhibición de las vías glucolíticas y una activación de la OXPHOS (Llorens-Bobadilla, 2015). Este perfil es similar al observado en otros tipos de células madre, como las hematopoyéticas (Simsek et al., 2010). Para el mantenimiento de la homeostasis y una correcta función neurogénicas, es importante que exista un equilibrio entre los diferentes estados (Belenguer et al., 2021).

### 1.3 Papel del metabolismo en las NSCs

En este contexto, el metabolismo celular parece jugar un papel clave en el proceso de activación de las NSCs. No obstante, se hace difícil comprender los eventos metabólicos que participan en la transición de quiescencia a activación en las NSCs. Scandella et al. revisaron varios estudios de scRNA-seq que capturaron múltiples estados NSCs *in vivo* en SEZ y DG de cerebros de ratones adultos y comprobaron específicamente la expresión de genes clave en la vía de la glucólisis, en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA),  $\beta$ -ox, metabolismo de la glutamina y OXPHOS (Scandella et al., 2023). Un análisis de los genes diferencialmente expresados entre qNSCs y aNSCs, reveló un patrón mixto, con algunos genes en una vía metabólica más expresados en aNSCs y otros genes en la misma vía más expresados en qNSCs.

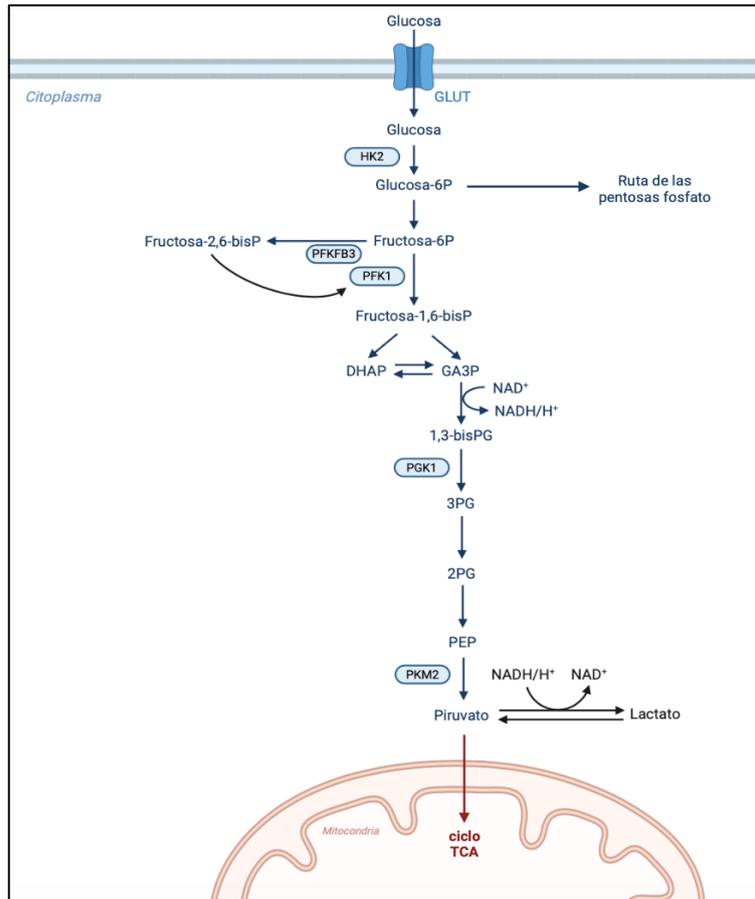
Aunque los datos de expresión génica pueden mostrar la expresión diferencial de genes metabólicos, las vías metabólicas no se regulan solo a nivel de expresión génica. Están fuertemente influenciadas por los niveles de proteínas, las actividades enzimáticas y la disponibilidad de sustratos. Por esta razón, los datos de scRNA-seq deben interpretarse con precaución al estudiar el metabolismo. Para obtener una perspectiva más completa, los datos de secuenciación de RNA (RNA-seq) pueden combinarse con análisis proteómicos y metabolómicos. En un estudio reciente, Wani y su equipo encontraron discrepancias entre el transcriptoma y los niveles de proteínas para las proteínas citosólicas y mitocondriales en un modelo *in vitro* de quiescencia de NSCs (Wani et al., 2022). Descubrieron que los niveles de mRNA relacionados con TCA,  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos (FAO) y OXPHOS en las mitocondrias no necesariamente reflejaban los niveles de proteínas, mientras que las proteínas citosólicas sí mostraban una buena correlación. Estos resultados sugieren que el scRNA-seq podría no reflejar siempre el verdadero estado metabólico. Además, Wani y su equipo compararon los cambios proteómicos entre las aNSC y qNSC, enfocándose en las proteínas relacionadas con el metabolismo energético. Los análisis de enriquecimiento mostraron que los qNSC regulaban las proteínas involucradas en OXPHOS y FAO (Knobloch et al., 2017).

Lange et al. demostraron cómo durante el desarrollo embrionario que las NSCs necesitan de la glucólisis para proliferar, siendo necesario el cambio a fosforilación oxidativa para la diferenciación neural (Lange et al., 2016).

A pesar de la clara dependencia de la glucólisis, la proliferación de las NSCs también se ve afectada cuando se alteran la función mitocondrial, ya que la manipulación de la dinámica y biogénesis mitocondrial condiciona la autorrenovación de las NSCs (Khacho et al., 2017, Beckervordersandforth et al., 2017). Además, cambios en el metabolismo mitocondrial se han asociado con cambios en el patrón de división de las NSCs. Así, se ha observado como durante las divisiones asimétricas aumenta la expresión de genes asociados con el ciclo de Krebs y la  $\beta$ -oxidación ( $\beta$ -ox) de los ácidos grasos (Dong et al., 2022).

También se ha encontrado que el metabolismo de los lípidos es importante en el destino de las NSCs y, en particular, en la neurogénesis del hipocampo, donde se ha demostrado que controla la actividad proliferativa de las NSCs (Knobloch et al., 2017). Así, se ha observado como la  $\beta$ -ox de los ácidos grasos es necesaria para el mantenimiento de la autorrenovación y quiescencia de las NSCs (Xie et al., 2016; Knobloch et al., 2017). Además, la inducción de la lipogénesis y la síntesis de ácidos grasos es suficiente para inducir la salida de la quiescencia y mejorar la proliferación de las NSCs (Knobloch et al., 2013 y 2017).

Aunque los resultados demuestran la relevancia del metabolismo de los ácidos grasos sobre las NSCs, hasta la fecha no está muy claro el papel de la glucólisis en la transición del estado quiescente al activado de las NSCs. La modificación de ciertas enzimas implicadas en el metabolismo podría ser clave para estudiar la activación de estas células. Una enzima interesante que participa en la glucólisis es la enzima pro-glucolítica 6-fosfofructoquinasa/fructosa-2,6-bifosfatasa, isoforma 3 (PFKFB3), un activador alostérico de la 6-fosfofructo-1-quinasa (PFK1) (**Figura 3**). El silenciamiento de esta enzima se presenta como un buen abordaje para estudiar la repercusión de la supresión de la glucólisis en la transición del estado quiescente al estado activado de las NSCs.



**Figura 3. Esquema de la ruta de la glucólisis.** La glucosa es transportada al citoplasma a través del transportador GLUT donde se llevan a cabo las diez reacciones necesarias para su conversión en piruvato. El primer paso de la glucólisis consiste en la fosforilación de la glucosa a glucosa-6-fosfato, reacción catalizada por hexoquinasa 2 (HK2). La glucosa-6-fosfato entonces se transforma en fructosa-6-fosfato, reacción catalizada por una isomerasa, o bien puede seguir la ruta de las pentosas fosfato. A continuación, la fructosa-6-fosfato se fosforila a fructosa-1,6-bisfosfato por acción de 6-fosfofructo-1-quinasa (PFK1), o bien a fructosa-2,6-bisfosfato por acción de 6-fosfofructoquinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa isoforma 3 (PFKFB3). La fructosa-1,6-bisfosfato se rompe por acción de una aldolasa en fosfodihidroxiacetona y gliceraldehído-3-fosfato. Este último se convierte en 1,3-bisfosfoglicerato, permitiendo la obtención de una molécula de NADH/H<sup>+</sup>. Seguidamente, 1,3-bisfosfoglicerato pierde un grupo fosfato por acción de fosfoglicerato quinasa 1 (PGK1), formándose 3-fosfoglicerato, el cual se transforma en el siguiente paso a 2-fosfoglicerato. Por medio de una aldolasa, 2-fosfoglicerato se deshidrata y se convierte en fosfoenolpiruvato. En la última reacción, por acción de piruvato quinasa 2 (PKM2) se obtiene el producto final de la glucólisis, el piruvato, que puede seguir el ciclo de los ácidos tricarboxílicos en la mitocondria o transformarse en lactato. (Figura creada con Biorender).

## 2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

De acuerdo con los antecedentes descritos, la hipótesis de trabajo es que el metabolismo glucolítico es esencial para preservar la quiescencia en las NSCs. Es decir, la supresión de la glucólisis, mediante el silenciamiento del enzima proglucolítico PFKFB3, podría desencadenar la activación y posterior proliferación y/o diferenciación de las NSCs. Para abordar esta hipótesis, se plantea el siguiente objetivo: caracterizar las poblaciones de NSCs en respuesta a la supresión de la glucólisis. Para ello, se proponen los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar la abundancia de NSCs en los nichos neurogénicos adultos de ratones con silenciamiento de PFKFB3, así como su estado de activación o quiescencia.
2. Evaluar cambios en la diferenciación de las NSCs en respuesta a la supresión de la glucólisis en los nichos neurogénicos adultos.

### 3 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Animales de experimentación

El manejo de los animales y todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con la Directiva 86/609/CEE de la Unión Europea y la Recomendación 2007/526/CE, relativa a la protección de los animales utilizados con fines experimentales y otros fines científicos, aplicadas en la legislación española en virtud de la ley 6/2013. Los protocolos experimentales se aprobaron por el Comité de Ética de la Universidad de Valencia (CEEA: 2022 VSC PEA 0243).

Los ratones, con fondo genético C57Bl6/J, fueron suministrados por el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Valencia (Servei Central de Suport a la Investigació Experimental SCSIE, Burjassot). Los animales fueron criados y alojados de acuerdo con su sexo, en períodos de 12 h de luz/oscuridad, temperatura ambiente de 20-22 °C, 40-70% de humedad, con alimentación y bebida ad libitum.

Para estudiar el efecto de la relevancia de la glucólisis, se generaron ratones con delección condicional de la enzima PFKFB3. Para ello, se cruzaron animales *Pfkfb3*<sup>LoxP/LoxP</sup> (De Bock et al., 2013), cedidos por el Prof. Peter Carmeliet, con ratones reporteros Ai6 (B6.Cg-Gt(ROSA)26<sup>Sortm6(CAG-ZsGreen1)Hze</sup>/J; Jackson Laboratory), en los que es posible visualizar las células en las que se produce la recombinación, gracias a la expresión de la proteína verde fluorescente ZsGreen1. Para inducir la recombinación de manera específica en NSCs, se seleccionó un ratón que induce la recombinación bajo un promotor específico de NSCs, como es la proteína glial fibrilar ácida (GFAP), es decir, ratones GFAP::Cre (B6.Cg-Tg(Gfap-cre)73.12Mvs/J; Jackson Laboratory). De esta manera se generaron ratones Control (*Pfkfb3*<sup>LoxP/LoxP</sup>-Ai6<sup>+/-</sup>-GFAP::Cre<sup>-/-</sup>) y ratones con delección de *Pfkfb3* en NSCs (*Pfkfb3*<sup>LoxP/LoxP</sup>-Ai6<sup>+/-</sup>-GFAP::Cre<sup>+/-</sup>), que denominamos PFKFB3cKO.

En todos los experimentos se incluyeron ratones machos y hembras (de 2 meses de edad). Los grupos experimentales se diseñaron distribuyendo a los animales de manera aleatoria en función de su genotipo. Los ratones se genotiparon mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) a partir de DNA genómico purificado de muestras de oreja. Para la digestión del tejido, cada muestra se trató con 100 µl de solución de lisis (Buffer TEN: 50 mM Tris pH 7,5; 5 mM EDTA pH 8,0; 100 mM NaCl suplementado en el

momento con 1 mM DTT; 0,5 mM espermidina y 1,5 unidades de proteinasa K) y se incubaron en un termobloque a 55°C con agitación durante la noche. Posteriormente, el lisado se inactivó a 100°C durante 5 minutos para evitar la acción de la proteinasa K. Finalmente, las muestras se centrifugaron a máxima velocidad a 4°C durante 5 minutos.

Para el genotipado del alelo silvestre y *LoxP* de *Pfkb3* se realizó una PCR con los siguientes cebadores 5'-CGAGACAATGTTCCATAGCTTGAATG-3', 5'-CAGGCCAGACCAAGGACAGC-3', 5'-GGCTGTGCTATAGTGTGAGAATCCT-3', dando como resultado una banda de 435 pb para el alelo mutante (*LoxP*), y de 385 pb para el alelo silvestre. Los cebadores para genotipar Ai6 fueron 5'-AAGGGAGCTGCAGTGGAGTA-3', 5'-CCGAAAATCTGTGGGAAGTC-3', 5'-AACCAGAAGTGGCACCTGAC-3' y 5'-GGCATTAAAGCAGCGTATCC-3', que produjeron una banda de 199 pb para el alelo mutante y una banda de 297 pb para el alelo silvestre. El transgén GFAP::Cre se detectó amplificando una región de 100 pb de la Cre recombinasa mediante PCR. Los oligonucleótidos directos e inversos utilizados fueron, respectivamente, 5'-GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC-3' y 5'-GTGAAACAGCATTGCTGTCACTT-3'. Se utilizó un control interno para detectar falsos negativos amplificando un fragmento de 150 pb del gen endógeno alfa-sinucleína. Sus cebadores directo e inverso son, respectivamente, 5'-CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT-3' y 5'-GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC-3'.

### 3.2 Inmunohistoquímica

Con la finalidad de trazar la proliferación de las NSCs *in vivo*, se administró el análogo de timidina 5-etinil-2'-desoxiuridina (EdU), que se incorpora al DNA de las células en división. Para ello se realizaron 7 inyecciones intraperitoneales, cada 1,5 h de EdU (50 mg/kg) a la edad de 2 meses. Transcurridos 21 días, los animales se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de pentobarbital a 50 mg/kg. A continuación, se perfundieron a velocidad constante (5 ml/min) durante 5 min con 0,9% (peso/vol) NaCl, seguidos de 15 min con 4% (peso/vol) paraformaldehído (PFA) en 0,1 M tampón fosfato (PB; 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 80 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). Los hemisferios cerebrales se sometieron a 2 h de post-fijación en PFA a temperatura ambiente. El hemisferio derecho de cada animal se encastró en agar al 4% (peso/vol) y se realizaron cortes coronales seriados de 40 µm empleando el vibratomo Leica VT1200 S (Leica Biosystems). Se generaron 12 series de la región que comprende la zona SEZ (Bregma 3,08 hasta -0,94 mm), y 6 series de la zona más rostral del hipocampo (Bregma -0,94 hasta -2,54mm). Los cortes de tejido se guardaron en tampón PB con 0,05% de azida sódica a 4°C hasta su utilización.

Los cortes se bloquearon y permeabilizaron en solución de bloqueo (10% (vol/vol) de suero fetal bovino, 0,2% (vol/vol) Triton X-100 en PB 0,1M) durante 1 h a temperatura ambiente en agitación seguida de la incubación con los anticuerpos primarios (**Tabla 1**) durante la noche a 4 °C en agitación, en solución de bloqueo.

**Tabla 1.** Listado de anticuerpos primarios para inmunohistoquímica.

Anticuerpo primario	Origen	Dilución	Casa comercial	Referencia
<b>Anti-Sox2</b>	Cabra	1:500	RyD	AF2018
<b>Anti-GFAP</b>	Pollo	1:800	Millipore	ab5541
<b>Anti-Ki67</b>	Conejo	1:300	Abcam	ab15580
<b>Anti-NeuN</b>	Ratón	1:200	Millipore	MAB377

Al día siguiente, los cortes se lavaron 3 veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS: NaCl 136 mM; KCl 2,7 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 7,8 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,7 mM; pH 7,4) durante 10 min en agitación suave. La incubación de los anticuerpos secundarios (**Tabla 2**) se realizó durante 1 h a temperatura ambiente, en oscuridad y agitación, en solución de bloqueo.

**Tabla 2.** Listado de anticuerpos secundarios para inmunohistoquímica.

Anticuerpo	Fluoróforo	Dilución	Casa comercial	Referencia
<b>Anti-IgG de cabra</b>	Cy3	1:800	Jackson ImmunoResearch	705-166-147
<b>Anti-IgG de pollo</b>	AlexaFluor 647	1:800	Jackson ImmunoResearch	703-606-155
<b>Anti-IgG de conejo</b>	Cy3	1:800	Jackson ImmunoResearch	711-165-152
<b>Anti-IgG de ratón</b>	AlexaFluor 647	1:800	Molecular probes	A31556

A continuación, se realizaron 3 lavados con PBS durante 10 min en agitación suave. Para el marcaje de EdU, se utilizó el kit de imágenes Click-iT™ EdU Alexa Fluor™ 555 (ThermoFisher) siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras ello, se realizaron 3 lavados con PBS durante 10 min. Seguidamente, se realizó una incubación de 5 min en oscuridad, agitación y a temperatura ambiente de 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; 1 µg/ml). Finalmente, los cortes se montaron empleando el medio de montaje FluorSave™ Reagent (Merck Millipore) y se tomaron imágenes empleando un microscopio confocal FluoView™ FV10I (Olympus).

### 3.3 Obtención de tejido encefálico de ratón

Para la extracción del cerebro de los ratones, los animales se sacrificaron mediante dislocación cervical. Se extrajo el encéfalo con ayuda de tijeras y pinzas estériles, y posteriormente se diseccionó con ayuda de una lupa. Para ello, se realizó un corte sagital sobre la línea media y, a continuación, se abrió cada hemisferio por el cuerpo calloso, separando cortex y subcortex. Se extrajo la zona del hipocampo, así como la pared lateral de los ventrículos laterales con ayuda de microbisturís. Los fragmentos de tejido extraído se transfirieron a tubos cónicos, se congelaron en nitrógeno líquido, y posteriormente a -80°C, hasta su posterior procesamiento por RT-qPCR y transferencia tipo *Western*.

### 3.4 Extracción de RNA y análisis de la expresión génica por RT-qPCR

El RNA de las diferentes zonas encefálicas se extrajo usando el kit Aurum Total RNA (Bio-Rad Laboratories), siguiendo las instrucciones del fabricante. El proceso se basa en una combinación de lisis celular, eliminación de contaminantes y tratamiento con DNAsa, captura del RNA en una columna de sílice, lavado y elución. Tras la extracción del RNA, se determinó su concentración y pureza con el NanoDrop™ 2000 (ThermoFisher).

A continuación, se empleó el PrimeScript™ RT Reagent Kit (Takara) para obtener, mediante retrotranscripción (RT), el ácido desoxirribonucleico complementario (cDNA). La reacción consiste en un ciclo a 37 °C durante 15 min seguido de un ciclo a 85 °C durante 5 min (Veriti™, Applied Biosystems).

Por último, el cDNA se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR), empleando, por cada 10 µL de mezcla, 5 µL de la Premix Ex Taq™ 2 x (Takara), 0,2 µL del tinte de referencia ROX (Takara), 3,3 µL de agua libre de DNAsas, 0,5 µL de la sonda TaqMan (**Tabla 3**) y 1 µL del cDNA. Durante la reacción de amplificación, tras una desnaturalización inicial de 20 s a 95 °C, se realizaron 40 ciclos en los que existía una fase de desnaturalización de 1 s a 95 °C y una fase de anillamiento y elongación de 20 s a 60 °C.

Se estudió la expresión de genes relacionados con el metabolismo glucolítico (hexokinasa-2 (*Hk2*), fosfoglicerato quinasa 1 (*Pgk1*), piruvato quinasa M2 (*Pkm2*) y 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bifosfatasa 3 (*Pfkfb3*)), proteínas asociadas a NSCs (*GFAP*, el factor de transcripción con caja SYR 2 (*Sox2*) y la proteína de células madre neuroepiteliales (*Nestin*)), neuronas inmaduras (doblecortina (*Dcx*)), neuronas maduras (proteína de unión al RNA, homólogo 3 de fox-1 (*Rbfox3*)), oligodendrocitos (proteína básica de mielina (*MBP*)) y microglia (factor inflamatorio 1 del aloinjerto (*Aif1*)). Como control endógeno se empleó el gen de la β-actina. Las sondas TaqMan empleadas se muestran en la **Tabla 3**.

**Tabla 3.** Sondas TaqMan empleadas en los análisis de expresión génica.

Sonda TaqMan	Casa comercial	Referencia
<b>Hk2</b>	Thermo Fisher	Mm00443385_m1
<b>Pgk1</b>	Thermo Fisher	Mm00435617_m1
<b>Pkm2</b>	Thermo Fisher	Mm00834102_gH
<b>Pfkfb3</b>	Thermo Fisher	Mm00504650_m1
<b>Gfap</b>	Thermo Fisher	Mm01253033_m1
<b>Sox2</b>	Thermo Fisher	Mm03053810_s1
<b>Nestin</b>	Thermo Fisher	Mm00450205_m1
<b>Dcx</b>	Thermo Fisher	Mm00438400_m1
<b>Rbfox3</b>	Thermo Fisher	Mm01248771_m1
<b>Mbp</b>	Thermo Fisher	Mm01266402_m1
<b>Aif1</b>	Thermo Fisher	Mm00479862_g1

Los niveles de expresión génica se determinaron mediante el método de  $\Delta\Delta Ct$ . Las muestras se analizaron por triplicado.

### 3.5 Western blot

Para evaluar la abundancia de diferentes proteínas en los diferentes nichos neurogénicos se realizaron transferencias tipo *Western*. El tejido se homogeneizó con ayuda de un homogenizador vidrio-teflón en tampón RIPA (1% dodecilsulfato de sodio, 10 mM ácido etilendiaminotetraacético [EDTA], 1% (vol/vol) Triton X-100, 150 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,0) suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete-Mini, Sigma), 100  $\mu$ M fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) e inhibidores de fosfatasa (1mM o-vanadato). Las muestras se hirvieron durante 5 min.

La concentración de proteínas de cada muestra se determinó mediante el método de ácido bicínico, empleando el BCA Protein Assay Kit (Pierce), siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, se cargaron 50  $\mu$ g de proteína en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 8% y se separaron mediante electroforesis. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0,22  $\mu$ m en presencia de tampón de transferencia (25 mM Tris; 192 mM glicina; 20% (vol/vol) metanol; pH 8,3) durante 70 min a 110 V. Las membranas se bloquearon con 5% (peso/vol) de leche en TTBS (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1 % (vol/vol) Tween 20) y se incubaron con los anticuerpos primarios (**Tabla 4**) en BSA al 5% (peso/vol, en TTBS), durante toda la noche, a 4°C.

**Tabla 4.** Anticuerpos primarios para ensayos de transferencia tipo Western.

Anticuerpo primario	Origen	Dilución	Casa comercial	Referencia
<b>Anti-GFAP</b>	Conejo	1:1000	Dako Denmark	Z0334
<b>Anti-Vinculina</b>	Conejo	1:1000	Proteintech	26520-1-AP
<b>Anti-pERK1,2</b>	Conejo	1:1000	Cell Signaling	4370S
<b>Anti-ERK1,2</b>	Conejo	1:1000	Cell Signaling	4695S
<b>Anti-Olig2</b>	Conejo	1:500	Milipore	MAB345

Tras la incubación con el anticuerpo primario, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (**Tabla 5**), acoplado a la peroxidasa de rábano (*Horseradish Peroxidase*, HRP) durante 1 h en leche al 2% (peso/vol) en TTBS, a temperatura ambiente.

**Tabla 5.** Anticuerpos secundarios para ensayos de transferencia tipo Western.

Anticuerpo primario	Dilución	Casa comercial	Referencia
<b>Anti-IgG de ratón-HRP</b>	1:10000	Dako Denmark	P0447
<b>Anti-IgG de conejo-HRP</b>	1:10000	Santa Cruz	sc-2004

Las membranas se visualizaron mediante quimioluminiscencia con el reactivo SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (ThermoFisher). Las imágenes se obtuvieron con el equipo Mini HD9 (Uvitec) y se cuantificaron con el software ImageJ.

Con la finalidad de obtener el mayor grado de información a partir de las membranas, se realizó la eliminación de los anticuerpos, para permitir posteriores determinaciones. Para ello, las membranas se incubaron con glicina (0,1 M, pH 2,5) durante 10 min y SDS al 1% 10 min. Posteriormente, se bloquearon de nuevo las membranas, y se procedió a incubar los anticuerpos primarios y secundarios siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

### 3.6 Análisis de imagen

Se adquirieron imágenes a 60 aumentos de entre 4 a 6 cortes correspondientes a la región del encéfalo en la que se localizan los ventrículos laterales, y 5 ó 6 cortes correspondientes al DG. Se fotografió toda la pared del ventrículo, o todo el DG, tanto en longitud, como en profundidad (cada 1,5 µm).

Para analizar la abundancia relativa de poblaciones de NSCs, se cuantificó el número de células positivas para los distintos marcajes con el software FV10-ASW viewer versión 4.2 (Olympus). Los resultados se muestran como porcentaje de células positivas.

Con el objetivo de cuantificar la abundancia de NeuN en las inmunohistoquímicas del DG del hipocampo, se empleó el software QuPath-0.5.1. Mediante este programa se determinaron la intensidad media del marcaje en la región correspondiente al DG, que fue delimitada de forma manual en cada plano, y en las diferentes áreas. Los resultados se expresan en intensidad media del marcaje en el área (por pixel) para los distintos animales.

En el caso de la determinación del porcentaje de células positivas para la proteína Ki67, se utilizó un script en FiJi (véase **Anexo II**), en el que, tras la segmentación de los núcleos utilizando Stardist, se determinó el porcentaje de células positivas para Ki67. Para ello, se estableció un valor umbral de intensidad a partir del cual se consideró la señal como positiva.

### 3.7 Cuantificación y análisis estadístico

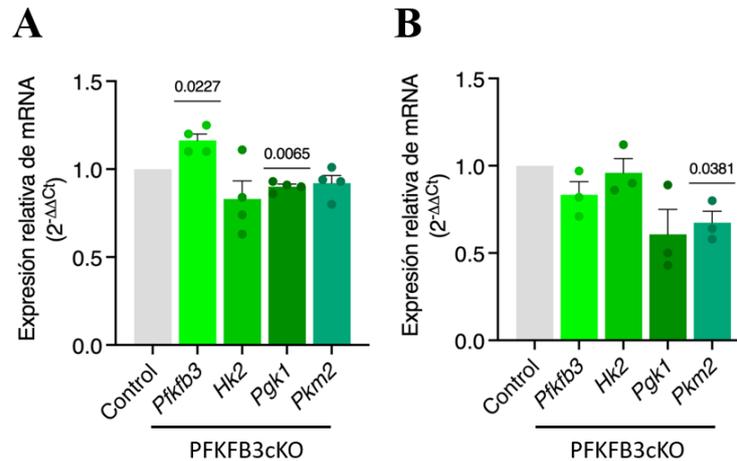
Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa GraphPad Prism 9. Se utilizó la prueba t de Student, o bien para una muestra, o no pareada, en función de las comparativas, para comparar el grupo de ratones Control frente a ratones PFKFB3cKO. El tipo de estadístico se muestra en cada figura, así como el valor de  $p$  cuando este resulta inferior a 0,05. Los datos se presentan como la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). El número de animales (n) con el que se realizó cada experimento se recoge en el pie de figura.

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 La modificación de los niveles de PFKFB3 altera el metabolismo glucolítico en los nichos neurogénicos

Con la finalidad de evaluar el efecto de la supresión de *Pfkfb3* en los nichos neurogénicos adultos, se realizó un estudio de expresión génica de varias enzimas de la vía glucolítica. Así, se evaluó la expresión de: i) hexokinasa 2 (*Hk2*), un enzima que controla el primer paso de la glucólisis, es decir, la transformación de glucosa a glucosa-6-fosfato; ii) fosfoglicerato quinasa 1 (*Pgk1*) catalizadora del paso intermedio que convierte 1,3-bisfosfoglicerato a 3-fosfoglicerato y ATP; iii) piruvato quinasa 2 (*Pkm2*), que cataliza el último paso de la glucólisis, la conversión de fosfoenolpiruvato a piruvato. Asimismo, se evaluó la propia expresión de *Pfkfb3* con la finalidad de corroborar la efectividad del modelo murino tanto en la SEZ como en el hipocampo. En la **Figura 4** podemos observar como la supresión genética del enzima PFKFB3 altera la expresión génica de las enzimas involucradas en la glucólisis (ver **Figura 3**). Así, tanto en la SEZ (**Figura 4A**) como en el hipocampo (**Figura 4B**) se produce una disminución de los enzimas aguas abajo de PFKFB3, como son *Pgk1* y *Pkm2*. No se observan cambios significativos en los niveles de *Hk2*, situada aguas arriba de PFKFB3, lo que sugiere que la entrada de glucosa a la glucólisis no se está viendo alterada.

En cuanto a los niveles de *Pfkfb3*, solo se observa una disminución (no significativa) en la expresión del enzima en el hipocampo, siendo llamativo el incremento que se observa en la SEZ. Estos resultados, pueden considerarse preliminares, en el sentido de que el número de animales analizado es bajo, especialmente en el hipocampo. Por ese motivo, se prevé incrementar el número de animales a estudio.



**Figura 4. Expresión génica relativa de enzimas de la glucólisis en (A) SEZ e (B) hipocampo.** Niveles de expresión génica de *Pfkfb3*, *Hk2*, *Pgk1* y *Pkm2* respecto a la  $\beta$ -actina. Se muestra la media de 4 animales en SEZ y 3 en hipocampo, junto con el error estándar de la media (SEM). La significación estadística se calculó mediante la prueba t de Student para una muestra, mostrándose para cada comparativa estadísticamente significativa su p-valor.

En relación al incremento de la expresión de *Pfkfb3* en la SEZ, pensamos que este efecto podría ser debido a un mecanismo compensatorio entre las distintas poblaciones de la zona. Dado que el lactato, producto final de la glucólisis, actúa como molécula señalizadora en el cerebro (Barros, 2013) y es necesario para mantener el metabolismo de las neuronas, de acuerdo a la hipótesis de la lanzadera de lactato (Pellerin et al., 1998), una supresión de la glucólisis en astrocitos y en NSCs, como la que genera este modelo, podría estimular el aumento de esta vía en otras células del nicho, como pueden ser las células endoteliales o la microglía. Por ese motivo, determinaremos específicamente los niveles de *Pfkfb3* a partir de NSCs sorteadas mediante citometría de flujo (Belenguer et al., 2021).

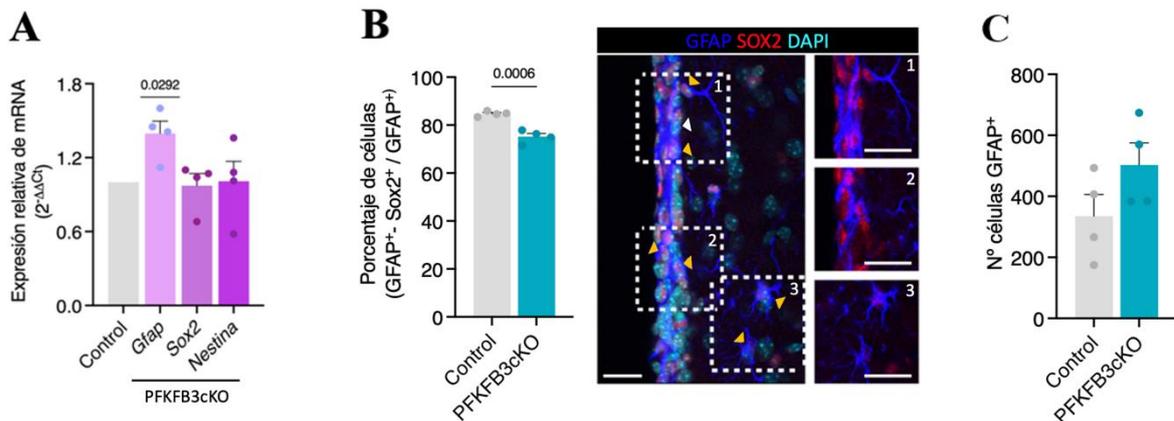
Aunque estos resultados no evidencian una modificación clara de *Pfkfb3*, y por tanto cuestionan la validez del modelo, pensamos que el modelo funciona, ya que se producen cambios en los enzimas glucolíticos en ambos nichos neurogénicos, lo que sugiere una disminución del metabolismo glucídico. Para corroborar que el modelo funciona, además del abordaje propuesto, realizaremos ensayos de hibridación *in situ* para detectar RNA de *Pfkfb3* específicamente en NSCs.

## 4.2 La supresión de PFKFB3 disminuye la proporción de células madre neurales en los nichos neurogénicos adultos

De acuerdo con nuestra hipótesis, la supresión de la glucólisis podría afectar a la dinámica de activación de las NSCs favoreciendo su activación, y disminuyendo de esta forma la proporción de NSCs quiescentes.

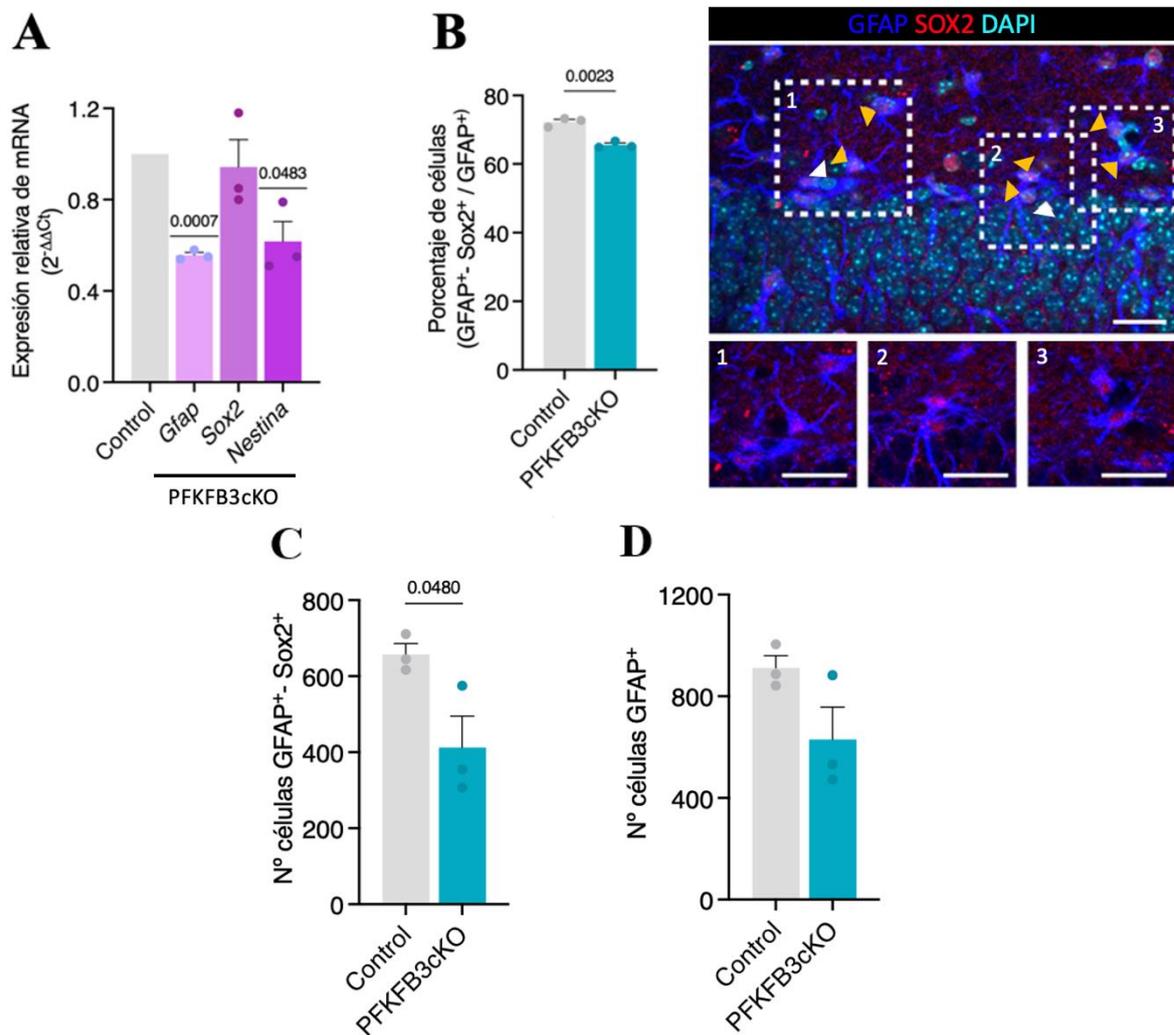
Para abordar esta hipótesis: i) se analizó mediante RT-qPCR la expresión de marcadores de NSCs en los diferentes nichos, como son *Gfap*, el factor de transcripción *Sox2* y el marcador de células madre neurales *Nestina*; ii) se evaluó el porcentaje de NSCs mediante inmunohistoquímica, gracias a la coexpresión de GFAP y SOX2. Los resultados se normalizaron respecto al número de células GFAP<sup>+</sup>, ya que estas pueden ser astrocitos o NSCs.

En la SEZ se observa un incremento en la expresión del mRNA de *Gfap*, sin afectarse la expresión de marcadores asociados a células madre, como son *Sox2* o *Nestina* (**Figura 5A**). Sin embargo, cuando cuantificamos el porcentaje de células GFAP<sup>+</sup>-SOX2<sup>+</sup>, respecto al número de células GFAP<sup>+</sup> (**Figura 5B**), se observa una reducción en esta población. Este resultado, evidencia una disminución en la proporción de NSCs en este nicho neurogénico. Sin embargo, pensamos que no es debido a un cambio en el número absoluto de NSCs en la zona, tal y como podemos evidenciar en la **Figura 5C**, sino a un cambio en la abundancia total de células GFAP<sup>+</sup> en la zona, compatible con un incremento en la cantidad de astrocitos.



**Figura 5. La supresión de *Pfkfb3* en la SEZ modifica la proporción de NSCs.** (A) Niveles de expresión génica de *Gfap*, *Sox2* y *Nestina* respecto a la  $\beta$ -actina ( $n=4$ ). Cuantificación del porcentaje de células GFAP<sup>+</sup>-SOX2<sup>+</sup> respecto al total de células GFAP<sup>+</sup> (B), así como el número total de células GFAP<sup>+</sup>-SOX2<sup>+</sup> (C) en SEZ ( $n=4$ ), realizada por inmunohistoquímica. Se muestra una imagen representativa donde las flechas amarillas señalan células GFAP<sup>+</sup>-SOX2<sup>+</sup>, mientras que las flechas blancas señalan células GFAP<sup>+</sup>. La significación estadística se calculó mediante la prueba *t* de Student para una muestra, mostrándose para cada comparativa estadísticamente significativa su *p*-valor. Los datos se representan como media de los animales  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Barra de escala, 20  $\mu$ m.

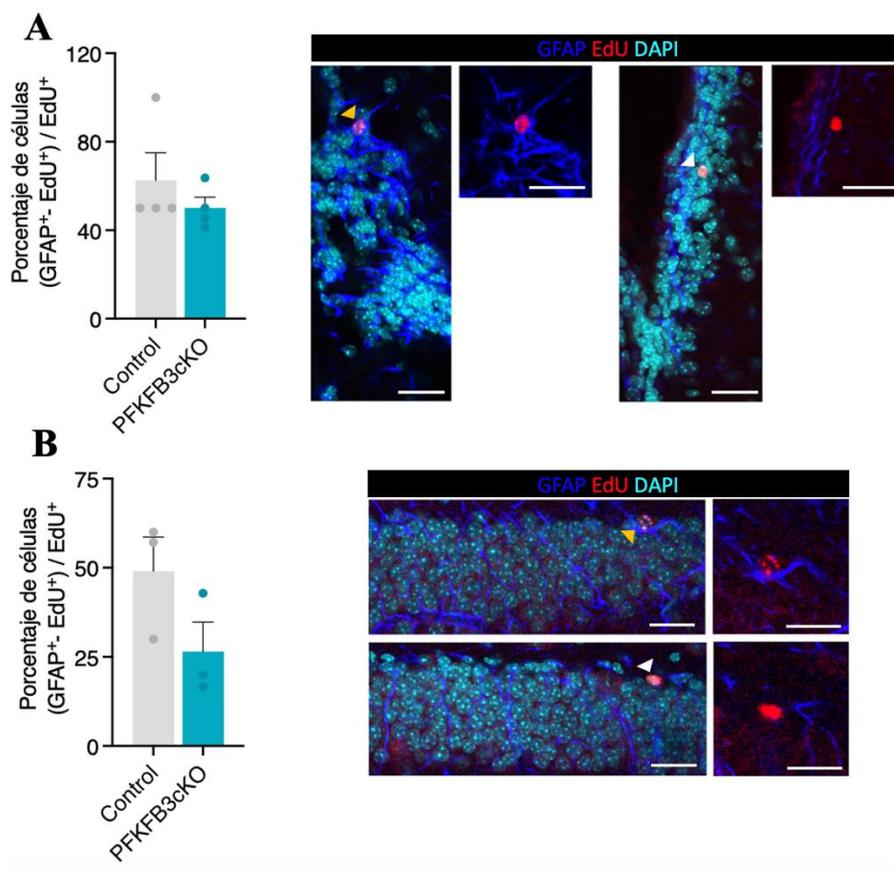
En el caso del hipocampo (**Figura 6A**), se observa una disminución en la expresión de mRNA de *Gfap* y *Nestina*, compatible con una disminución del conjunto de NSCs en este nicho neurogénico. De hecho, al cuantificar el porcentaje de células GFAP<sup>+</sup>-SOX2<sup>+</sup>, respecto al número de células GFAP<sup>+</sup> (**Figura 6B**), así como en el número total de células GFAP<sup>+</sup>-SOX2<sup>+</sup>, se observa una reducción en esta población (**Figura 6C**). Asimismo, observamos una reducción en el número total de células GFAP<sup>+</sup> en esta zona (**Figura 6D**). Estos resultados sugieren una disminución en el número de NSCs, así como en el número de astrocitos, tras la supresión de *Pfkfb3*.



**Figura 6. La supresión de *Pfkfb3* en el hipocampo modifica la proporción de NSCs.** (A) Niveles de expresión génica de *Gfap*, *Sox2* y *Nestina* respecto a la  $\beta$ -actina. ( $n=3$ ). Cuantificación del porcentaje de células GFAP<sup>+</sup>-SOX2<sup>+</sup> respecto al total de células GFAP<sup>+</sup> (B), así como el número total de células GFAP<sup>+</sup>-SOX2<sup>+</sup> (C) y GFAP<sup>+</sup> (D) en el hipocampo ( $n=3$ ), realizada mediante inmunohistoquímica. Se muestra una imagen representativa donde las flechas amarillas señalan células GFAP<sup>+</sup>-SOX2<sup>+</sup>, mientras que las flechas blancas señalan células GFAP<sup>+</sup>. La significación estadística se calculó mediante la prueba *t* de Student para una muestra, mostrándose para cada comparativa estadísticamente significativa su *p*-valor. Los datos se representan como media de los animales  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Barra de escala, 20  $\mu$ m.

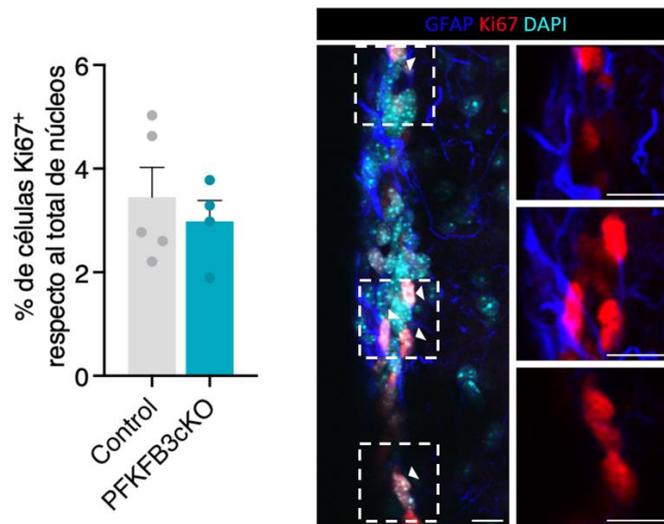
El siguiente paso fue determinar la proporción de qNSCs. Dado que no existen marcadores que permitan diferenciarlas de manera exclusiva, empleamos la estrategia de pulso y caza con el análogo de nucleósidos EdU. Así, realizamos 7 pulsos de EdU durante 1 día, a la edad de 2 meses, con la finalidad de marcar todas las células en proliferación, y esperamos (caza) 21 días, tras los cuales determinamos el número de células GFAP<sup>+</sup>-EdU<sup>+</sup> en los diferentes nichos. Mediante esta aproximación lo que estamos determinando son células que no han proliferado desde el pulso, es decir, células con retención de marcaje, porque si lo hubieran hecho hubieran diluido la marca, y que expresan la proteína GFAP, un marcador de NSCs, por ello, asumimos que son qNSCs.

En la **Figura 7**, observamos cómo en ambos nichos se produce una disminución de la proporción de células de retención marcadas con EdU (EdU-labeling retaining cells o LRCs) positivas para GFAP, que podemos asumir como una disminución de qNSCs. La disminución no resulta significativa en ninguno de los nichos, posiblemente debido al bajo número de animales analizados, motivo por el cual actualmente estamos incrementando la n.



**Figura 7. Porcentaje de LRCs en (A) la SEZ y (B) el DG del hipocampo.** A la izquierda, queda representado el porcentaje de células GFAP<sup>+</sup>-EdU<sup>+</sup> respecto al total de células EdU<sup>+</sup> en los diferentes nichos. Se muestra la media de 4 animales en SEZ y 3 en hipocampo, junto con el error estándar de la media (SEM). La significación estadística se calculó mediante la prueba t de Student, mostrándose para cada comparativa estadísticamente significativa su p-valor. A la derecha, se muestra una imagen representativa de un ensayo de inmunohistoquímica de cada nicho neurogénico donde las flechas amarillas señalan células GFAP<sup>+</sup>-EdU<sup>+</sup>, mientras que las flechas blancas señalan células EdU<sup>+</sup>. Barra de escala, 20  $\mu$ m.

Con la finalidad de determinar si la modificación del metabolismo glucolítico altera la proliferación celular en la SEZ, se realizó una inmunohistoquímica frente al marcador de proliferación Ki67. Los resultados (**Figura 8**) evidencian una ausencia de efecto sobre la proliferación celular en este nicho neurogénico. Aunque resulta contrario a la hipótesis de partida, de acuerdo a la cual esperábamos obtener un cambio en la activación de las NSCs, estos resultados no están cuantificando exactamente el estado de proliferación de las NSCs, sino células positivas para el marcaje. Por ese motivo, se realizarán nuevas tinciones, con la finalidad de valorar de forma más precisa el estado de activación de las NSCs, empleando los marcadores GFAP, SOX2 y Ki67.



**Figura 8. Porcentaje de células en proliferación en la SEZ.** Cuantificación del porcentaje de células positivas para el marcador de proliferación Ki67 respecto al total de núcleos en la SEZ. Se muestra la cuantificación, con la media junto con la SEM ( $n=4-5$ ), así como una imagen representativa de células positivas (marcadas con flechas blancas). Barra de escala, 20  $\mu$ m.

En conjunto, estos resultados sugieren como una disminución del metabolismo glucolítico en las NSCs modifica su abundancia en ambos nichos neurogénicos, siendo especialmente remarcable en el caso del hipocampo.

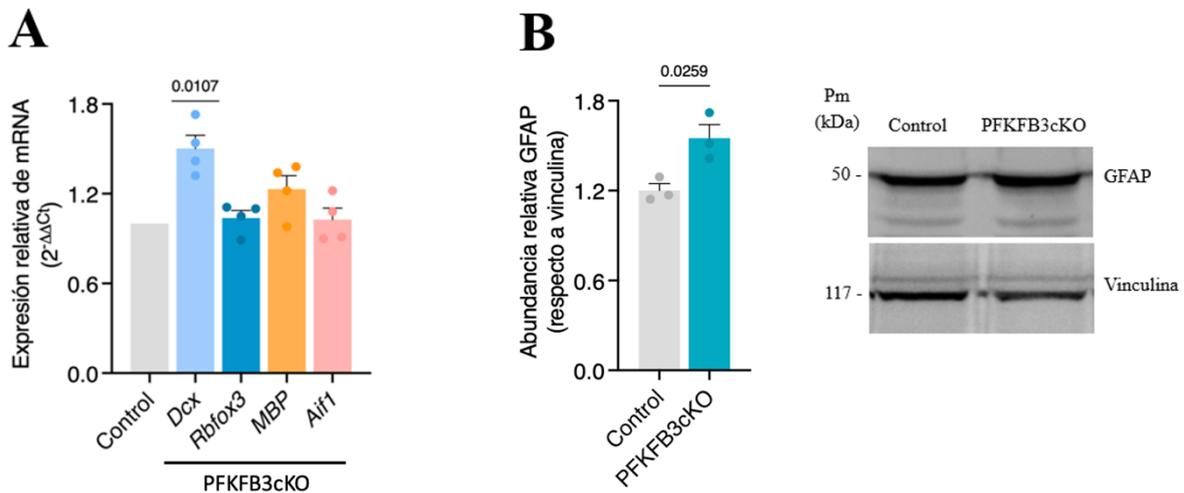
### 4.3 La reducción de metabolismo glucolítico en las NSCs modifica la abundancia relativa de los distintos tipos celulares en los nichos neurogénicos

#### 4.3.1 Cuantificación de estados diferenciados en la SEZ

Con la finalidad de valorar si la pérdida de NSCs en los diferentes nichos neurogénicos está incrementando su diferenciación, realizamos una evaluación de genes asociados a los diferentes linajes. Así, determinamos mediante RT-qPCR la abundancia relativa de doblecortina (*Dcx*), marcador de neuronas inmaduras, el homólogo 3 de fox 1 (*Rbfox3*), que

codifica para el antígeno nuclear neuronal (NeuN), marcador de neuronas maduras, así como para la proteína básica de mielina (*Mbp*), marcadora de oligodendrocitos. Además, determinamos el factor inflamatorio 1 de aloinjerto (*Aif1*), asociado a microglia, por si la modificación del metabolismo condiciona algún tipo de respuesta en la microglia.

En la **Figura 9A** se observa como en la SEZ, tras la supresión de la expresión de *Pfkfb3*, se produce un incremento en la expresión del marcador asociado a neuronas inmaduras *Dcx*, así como en el marcador *Gfap*, asociado a astrocitos (**Figura 5A**). Para confirmar si los cambios asociados a la expresión de *Gfap* se veían reflejados a nivel proteico realizamos una transferencia tipo *Western* (**Figura 9B**), donde observamos un incremento en la expresión de GFAP en los ratones mutantes para PFKFB3. Estos resultados concuerdan con lo observado a nivel de mRNA (**Figura 5A**), y son compatibles con una estimulación de la diferenciación a astrocitos tras la activación de las NSCs en este nicho neurogénico.



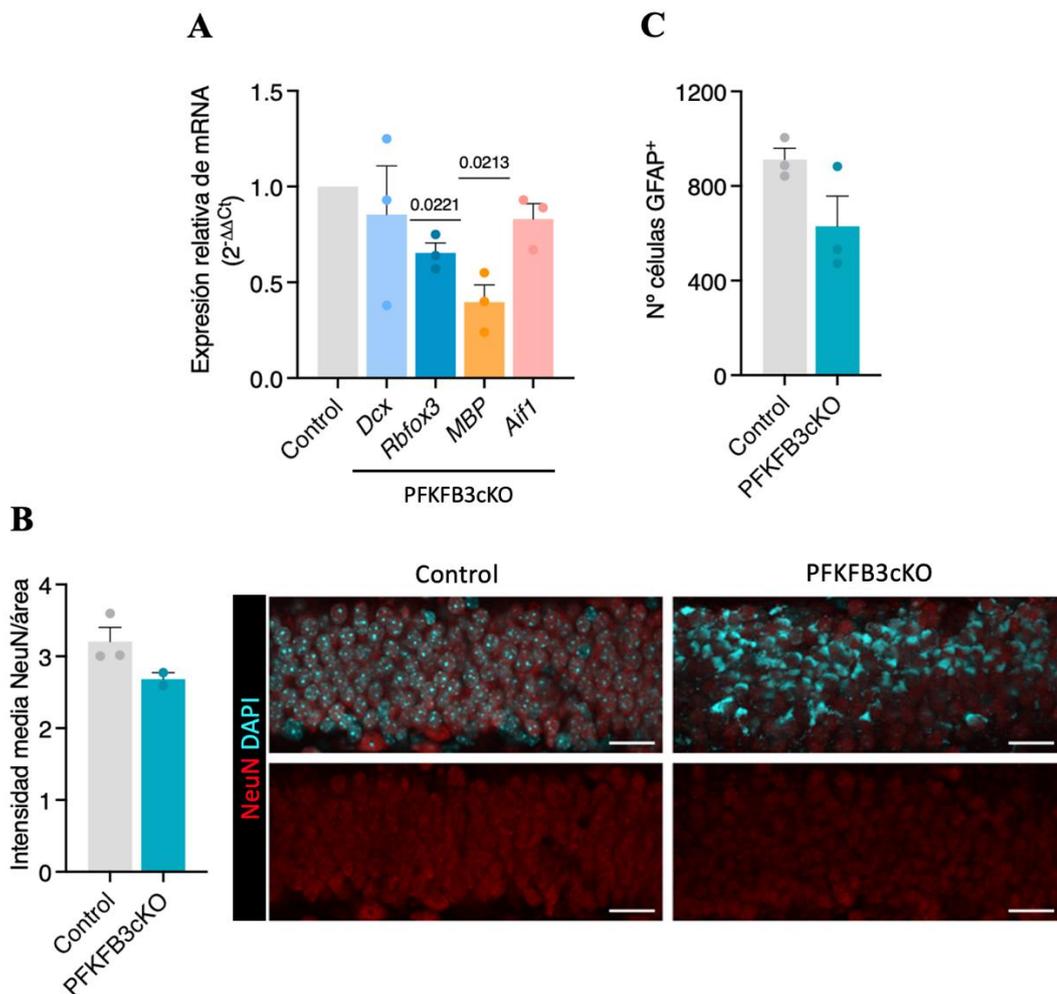
**Figura 9. La supresión de *Pfkfb3* promueve la diferenciación en la SEZ.** (A) Niveles de expresión génica de *Dcx*, *Rbfox3*, *Mbp* y *Aif1* respecto a la  $\beta$ -actina (n=4). (B) Imagen representativa de un ensayo de transferencia tipo *Western* para GFAP, junto con su cuantificación, representándose la media junto con la SEM (n=3). Se empleó Vinculina como control de carga. La significación estadística se calculó mediante la prueba t de Student, para una muestra en el panel A, mostrándose para cada comparativa estadísticamente significativa su p-valor.

En conjunto, estos resultados sugieren un aumento en la diferenciación de las NSCs tras la supresión del metabolismo glucolítico en la SEZ. Queda pendiente la realización de inmunohistoquímicas para cuantificar la abundancia de neuronas inmaduras, ya que los resultados obtenidos mediante RT-qPCR parecen indicar un aumento en esta población tras la supresión del metabolismo glucolítico.

En el caso del hipocampo, se observó una reducción en la expresión de los mRNA de *Rbfox3*, así como de *Mbp* (**Figura 10A**), lo que sugiere una disminución en la proporción de neuronas

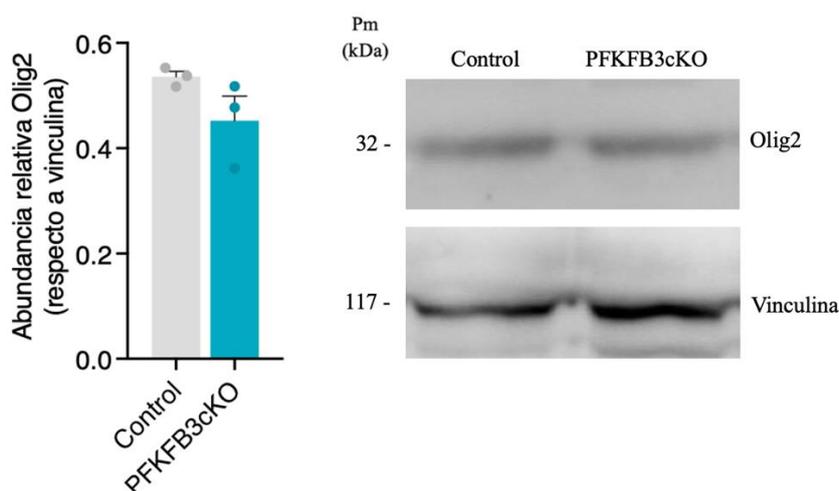
maduras y oligodendrocitos. Para confirmar estos resultados, cuantificamos la intensidad media de NeuN en el DG de ratones Control y PFKFB3cKO mediante inmunohistoquímica (**Figura 10B**). Los resultados confirman la reducción en la abundancia de neuronas maduras en esta región. La bajada no resulta significativa, a pesar de ser del 16%, como consecuencia del bajo número de muestras. Por ese motivo, ya se está trabajando para incrementar la n.

Asimismo, realizamos el conteo total de células GFAP<sup>+</sup> en esta zona, ya que los resultados de RT-qPCR muestran una bajada muy significativa de la abundancia de este marcador (**Figura 6A**). Observamos como el número de células GFAP<sup>+</sup> disminuye tras la supresión de *Pfkfb3* (**Figura 10C**).



**Figura 10.** La reducción en la expresión de *Pfkfb3* en el hipocampo modifica la abundancia de neuronas maduras en la zona. (A) Niveles de expresión génica de *Dcx*, *Rbfox3*, *Mbp* y *Aif1* respecto a la  $\beta$ -actina ( $n=3$ ). (B) Intensidad media de NeuN en el DG del hipocampo de ratones Control y tras la supresión de PFKFB3 ( $n=3$ ). Se muestra una imagen representativa de la inmunohistoquímica. Se representa la media junto con la SEM. La significación estadística se calculó mediante la prueba t de Student, siendo para una muestra en el panel A, mostrándose para cada comparativa estadísticamente significativa su p-valor. Barra de escala, 20  $\mu$ m.

Con la finalidad de confirmar los cambios observados en el mRNA de *Mbp*, realizamos ensayos de transferencia tipo *Western* frente a la proteína de oligodendrocitos Olig2 (**Figura 11**). Los resultados muestran una bajada en su abundancia, que no resulta significativa dado el bajo número de animales analizados.

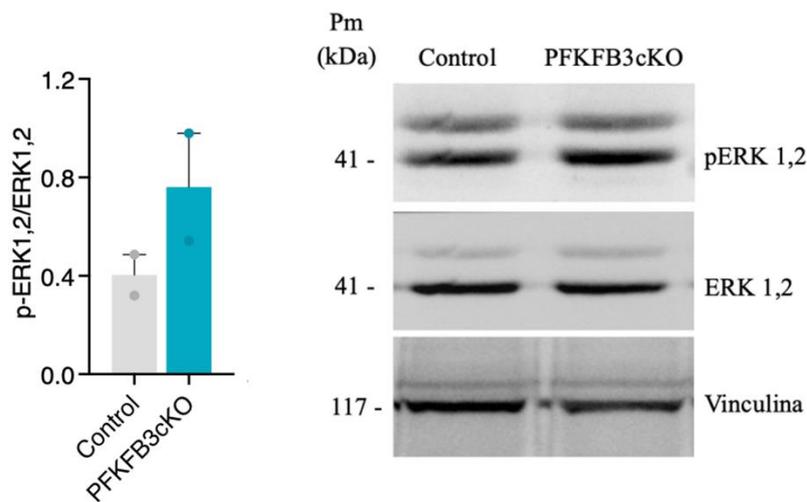


**Figura 11. La supresión de *Pfkfb3* reduce la expresión de *Olig2* en el hipocampo.** Imagen representativa de un ensayo de transferencia tipo *Western* para *Olig2*, junto con su cuantificación ( $n=3$ ). Se empleó *Vinculina* como control de carga. Se muestra la media junto con la SEM. La significación estadística se calculó mediante la prueba *t* de Student, para una muestra en el panel A, mostrándose para cada comparativa estadísticamente significativa su *p*-valor.

En conjunto, todos estos resultados pueden considerarse como preliminares, dado el bajo número de animales, motivo por el cual estamos trabajando para corroborarlos, analizando un mayor número de muestras. No obstante, resultan llamativos, ya que, aunque en la SEZ estamos observando cambios en los marcadores de NSCs y en las distintas poblaciones compatibles con una mayor diferenciación, en el hipocampo lo que sugieren los resultados es una pérdida celular. Debemos evaluar si en conjunto la reducción de NSCs, así como de los diferentes linajes es consecuencia de la muerte celular en respuesta a la reducción de *Pfkfb3*. Para ello se prevé realizar ensayos TUNEL en la región del hipocampo de ratones Control y PFKFB3cKO. Por otro lado, los resultados podrían evidenciar un agotamiento en el reservorio de NSCs, por lo que las poblaciones resultantes se ven disminuidas, ya que la recombinación, y consiguiente disminución de *Pfkfb3* sucede desde el nacimiento. Por ese motivo, podría ser que, a la edad adulta, el número de NSCs haya disminuido y sus poblaciones resultantes también. Para confirmar esta hipótesis, se prevé analizar animales a edades más tempranas, y más tardías, para poder evaluar fluctuaciones a lo largo del tiempo en las distintas poblaciones.

#### 4.4 Los cambios en la activación de las NSCs pueden ser debidos a cambios en la vía de señalización de ERK1,2 en la SEZ

Con el objetivo de determinar la causa de las diferencias en las NSCs y su diferenciación en la SEZ, se realizaron ensayos de transferencia tipo *Western* para detectar cambios en la fosforilación de ERK1,2. Esta proteína controla el ciclo celular, proliferación y diferenciación (Roskoski, 2012), motivo por el cual decidimos analizarla. Los resultados (**Figura 12**) muestran cómo esta vía de señalización parece estar más activa en los ratones PFKFB3cKO en la SEZ, lo que resulta compatible con la mayor diferenciación observada de forma preliminar en esta región.



**Figura 12.** La supresión de *Pfkfb3* reduce la activación de las quinasas *ERK1,2* en *SEZ*. Cuantificación de la abundancia relativa de la forma fosforilada (*p-ERK1,2*) de *ERK1,2*, respecto a la abundancia de la forma no modificada, junto con una imagen representativa del ensayo de transferencia tipo *Western* ( $n=2$ ). Se empleó *Vinculina* como control de carga. Se muestra la media junto con la SEM. La significación estadística se calculó mediante la prueba *t* de Student, mostrándose para cada comparativa estadísticamente significativa su *p*-valor.

## 5 CONCLUSIONES

Los resultados que podemos extraer del presente trabajo son:

1. Ante la supresión de *Pfkfb3* se produce una reducción en la cantidad de NSCs en los dos nichos neurogénicos adultos, siendo el resultado más evidente en la SGZ del hipocampo.
2. La reducción en la proporción de NSCs está acompañada de una mayor diferenciación en astrocitos y neuronas en la SEZ. Sin embargo, en el hipocampo lo que se observa es una pérdida general de las distintas poblaciones, que será evaluada en un futuro próximo.

## 6 REFERENCIAS

- Barros, L. F. (2013). Metabolic signaling by lactate in the brain. *Trends in Neurosciences*, 36(7), 396–404.
- Beckervordersandforth, R., Ebert, B., Schäffner, I., Moss, J., Fiebig, C., Shin, J., Moore, D. L., Ghosh, L., Trincherro, M. F., Stockburger, C., Friedland, K., Steib, K., Von Wittgenstein, J., Keiner, S., Redecker, C., Hölter, S. M., Xiang, W., Wurst, W., Jagasia, R., . . . Lie, D. C. (2017). Role of mitochondrial metabolism in the control of early lineage progression and aging phenotypes in adult hippocampal neurogenesis. *Neuron*, 93(3), 560-573.e6.
- Belenguer, G., Duart-Abadia, P., Jordán-Pla, A., Domingo-Muelas, A., Blasco-Chamarro, L., Ferrón, S. R., Morante-Redolat, J. M., & Fariñas, I. (2021). Adult Neural Stem Cells Are Alerted by Systemic Inflammation through TNF- $\alpha$  Receptor Signaling. *Cell Stem Cell*, 28(2), 285-299.e9.
- Blasco-Chamarro, L., & Fariñas, I. (2023). Fine-tuned rest: unveiling the regulatory landscape of adult quiescent neural stem cells. *Neuroscience*, 525, 26–37.
- Cheung, T. H., & Rando, T. A. (2013). Molecular regulation of stem cell quiescence. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 14(6), 329–340.
- Codega, P., Silva-Vargas, V., Paul, A., Maldonado-Soto, A. R., DeLeo, A. M., Pastrana, E., & Doetsch, F. (2014). Prospective Identification and Purification of Quiescent Adult Neural Stem Cells from Their In Vivo Niche. *Neuron*, 82(3), 545–559.
- De Bock, K., Georgiadou, M., Schoors, S., Kuchnio, A., Wong, B. W., Cantelmo, A. R., Quaegebeur, A., Ghesquière, B., Cauwenberghs, S., Eelen, G., Phng, L., Betz, I., Tembuyser, B., Brepoels, K., Welti, J., Geudens, I., Segura, I., Cruys, B., Bifari, F., . . . Carmeliet, P. (2013). Role of PFKFB3-Driven glycolysis in vessel sprouting. *Cell*, 154(3), 651–663.
- Dong, C., Fu, S., Karvas, R. M., Chew, B., Fischer, L. A., Xing, X., Harrison, J. K., Popli, P., Kommagani, R., Wang, T., Zhang, B., & Theunissen, T. W. (2022). A genome-wide CRISPR-Cas9 knockout screen identifies essential and growth-restricting genes in human trophoblast stem cells. *Nature Communications*, 13(1).
- Khacho, M., Clark, A., Svoboda, D. S., MacLaurin, J. G., Lagace, D. C., Park, D. S., & Slack, R. S. (2017). Mitochondrial dysfunction underlies cognitive defects as a result of neural stem cell depletion and impaired neurogenesis. *Human Molecular Genetics Online/Human Molecular Genetics*, 26(17), 3327–3341.
- Knobloch, M., Braun, S. M. G., Zurkirchen, L., Von Schoultz, C., Zamboni, N., Araúzo-Bravo, M. J., Kovacs, W. J., Karalay, Ö., Suter, U., Machado, R. a. C., Roccio, M., Lutolf, M. P., Semenkovich, C. F., & Jessberger, S. (2012). Metabolic control of adult neural stem cell activity by Fasn-dependent lipogenesis. *Nature*, 493(7431), 226–230.
- Knobloch, M., & Jessberger, S. (2015). Metabolic control of adult neural stem cell behavior. *Frontiers in Biology*, 10(2), 100–106.

- Knobloch, M., & Jessberger, S. (2017). Metabolism and neurogenesis. *Current Opinion in Neurobiology*, 42, 45–52.
- Knobloch, M., Pilz, G., Ghesquière, B., Kovacs, W. J., Wegleiter, T., Moore, D. L., Hruzova, M., Zamboni, N., Carmeliet, P., & Jessberger, S. (2017). A fatty acid Oxidation-Dependent metabolic shift regulates adult neural stem cell activity. *Cell Reports*, 20(9), 2144–2155.
- Lange, C., Garcia, M. T., Decimo, I., Bifari, F., Eelen, G., Quaegebeur, A., Boon, R., Zhao, H., Boeckx, B., Chang, J., Wu, C., Noble, F. L., Lambrechts, D., Dewerchin, M., Kuo, C. J., Huttner, W. B., & Carmeliet, P. (2016). Relief of hypoxia by angiogenesis promotes neural stem cell differentiation by targeting glycolysis. *EMBO Journal*, 35(9), 924–941.
- Lim, D. A., & Alvarez-Buylla, A. (2016). The adult Ventricular–Subventricular Zone (V-SVZ) and olfactory bulb (OB) neurogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(5), a018820.
- Llorens-Bobadilla, E., Zhao, S., Baser, A., Saiz-Castro, G., Zwadlo, K., & Martin-Villalba, A. (2015). Single-Cell Transcriptomics Reveals a Population of Dormant Neural Stem Cells that Become Activated upon Brain Injury. *Cell Stem Cell*, 17(3), 329–340.
- Morales, A. V., & Mira, H. (2019). Adult neural stem cells: born to last. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7.
- Navarro-Quiroz, E., Navarro-Quiroz, R., España-Puccini, P., Ahmad, M., Díaz-Pérez, A., Villarreal, J. L., Vásquez, L., & Torres, A. (2018). Neurogenesis in adult brain. *Salud/Salud Uninorte*, 34(1), 144-159.
- Obernier, K., & Alvarez-Buylla, A. (2019). Neural stem cells: origin, heterogeneity and regulation in the adult mammalian brain. *Development*, 146(4).
- Obernier, K., Cebrian-Silla, A., Thomson, M., Parraguez, J. I., Anderson, R., Guinto, C., Rodriguez, J. R., Garcia-Verdugo, J., & Alvarez-Buylla, A. (2018). Adult neurogenesis is sustained by symmetric Self-Renewal and differentiation. *Cell Stem Cell*, 22(2), 221-234.e8.
- Pellerin, L., Pellegrini, G., Bittar, P. G., Charnay, Y., Bouras, C., Martin, J. L., Stella, N., & Magistretti, P. J. (1998). Evidence supporting the existence of an Activity-Dependent Astrocyte-Neuron lactate shuttle. *Developmental Neuroscience*, 20(4–5), 291–299.
- Roskoski, R. (2012). ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. *Pharmacological Research*, 66(2), 105–143.
- Scandella, V., Petrelli, F., Moore, D. L., Braun, S. M., & Knobloch, M. (2023). Neural stem cell metabolism revisited: a critical role for mitochondria. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 34(8), 446–461.
- Shin, J., Berg, D. A., Zhu, Y., Shin, J. Y., Song, J., Bonaguidi, M. A., Enikolopov, G., Nauen, D. W., Christian, K. M., Ming, G., & Song, H. (2015). Single-Cell RNA-Seq with Waterfall

Reveals Molecular Cascades underlying Adult Neurogenesis. *Cell Stem Cell*, 17(3), 360–372.

Simons, B. D., & Clevers, H. (2011). Strategies for homeostatic Stem cell Self-Renewal in adult tissues. *Cell*, 145(6), 851–862.

Simsek, T., Kocabas, F., Zheng, J., DeBerardinis, R. J., Mahmoud, A. I., Olson, E. N., Schneider, J. W., Zhang, C. C., & Sadek, H. A. (2010). The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. *Cell Stem Cell*, 7(3), 380–390.

Urbán, N., Blomfield, I. M., & Guillemot, F. (2019). Quiescence of adult mammalian neural stem cells: a highly regulated rest. *Neuron*, 104(5), 834–848.

Wani, G. A., Sprenger, H., Ndoci, K., Chandragiri, S., Acton, R. J., Schatton, D., Kochan, S. M., Sakthivelu, V., Jevtic, M., Seeger, J. M., Müller, S., Giavalisco, P., Rugarli, E. I., Motori, E., Langer, T., & Bergami, M. (2022). Metabolic control of adult neural stem cell self-renewal by the mitochondrial protease YME1L. *Cell Reports*, 38(7), 110370.

Xie, Z., Jones, A., Deeney, J. T., Hur, S. K., & Bankaitis, V. A. (2016). Inborn errors of Long-Chain fatty acid B-Oxidation link neural stem cell Self-Renewal to autism. *Cell Reports*, 14(5), 991–999.

## 7 ANEXOS

### 7.1 ANEXO I. Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la agenda 2030

*Tabla 6. Grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).*

Objetivos de desarrollo sostenibles	Alto	Medio	Bajo	No procede
<b>ODS 1. Fin de la pobreza</b>				X
<b>ODS 2. Hambre cero</b>				X
<b>ODS 3. Salud y bienestar</b>		X		
<b>ODS 4. Educación de calidad</b>				X
<b>ODS 5. Igualdad de género</b>				X
<b>ODS 6. Agua limpia y saneamiento</b>				X
<b>ODS 7. Energía asequible y no contaminante</b>				X
<b>ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico</b>				X
<b>ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras</b>				X
<b>ODS 10. Reducción de las desigualdades</b>				X
<b>ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles</b>				X
<b>ODS 12. Producción y consumo responsables</b>				X
<b>ODS 13. Acción por el clima</b>				X
<b>ODS 14. Vida submarina</b>				X
<b>ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres</b>				X
<b>ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas</b>				X
<b>ODS 17. Alianzas para lograr objetivos</b>				X

El presente proyecto cumple principalmente con una de las metas del ODS 3, Salud y bienestar:

3.4 Para 2030, reducir en un tercio la mortalidad prematura por enfermedades no transmisibles mediante la prevención y el tratamiento y promover la salud mental y el bienestar.

Entender cómo se activan las células madre neurales bajo diferentes condiciones metabólicas podría conducir al desarrollo de terapias innovadoras para enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o el Parkinson. Por otro lado, los resultados aportados a este estudio podrían contribuir a la creación de tratamientos para la regeneración de tejido cerebral dañado, lo cual es crucial para la recuperación después de accidentes cerebrovasculares o lesiones traumáticas. Además, las NSCs pueden ofrecer nuevas vías para tratar trastornos mentales, como la depresión y la esquizofrenia, mediante la regeneración de neuronas y la restauración de la homeostasis en el cerebro. Asimismo, identificando cómo ciertos cambios metabólicos afectan a la activación de células madre neurales, podría ayudar a desarrollar

estrategias preventivas basadas en la dieta y el estilo de vida que mantengan la salud neurológica a lo largo de la vida. Por tanto, el trabajo realizado no solo podría abrir nuevas vías terapéuticas para enfermedades y trastornos neurológicos, sino que también podría tener un impacto significativo en la prevención, el tratamiento, y el acceso a la salud, contribuyendo directamente al ODS 3 de salud y bienestar.

## 7.2 ANEXO II. Script para determinar el porcentaje de células positivas para Ki67

```
roiManager("reset");
run("Clear Results");
path = getDirectory("Choose a folder with images");
list = getFileList(path);
run("Set Measurements...", "area mean redirect=None decimal=2");
close("*");

// model path
modelPath = File.openDialog("Select the model file")
pathStrings = split(modelPath, File.separator);
modelPath = "";
for (i = 0; i < pathStrings.length; i++) {
    if (!endsWith(pathStrings[i], ".zip")) {
        modelPath += pathStrings[i] + File.separator + File.separator + File.separator +
File.separator;
    } else {
        modelPath += pathStrings[i];
    }
}

//Output folder
pathres = path +File.separator+ "results_Allslices_colocki67";
File.makeDirectory(pathres);
Table.create("Colocalization analysis");

// list of oif files
oifList = newArray()
```

```

for (i = 0; i < list.length; i++) {
    if (endsWith(list[i], ".oif")) {
        oifList = Array.concat(oifList, list[i]);
    }
}
Array.sort(oifList);

//Start analysis
for (i = 0; i < oifList.length; i++) {
    run("Clear Results");

    run("Bio-Formats Importer", "open=[" + path + File.separator + oifList[i]+"] autoscale
color_mode=Grayscale rois_import=[ROI manager] view=Hyperstack stack_order=XYCZT");
    //setBatchMode(true);
    run("Clear Results");
    title = File.getName(oifList[i]);
    run("Split Channels");
    selectWindow("C1-"+ title);
    rename("DAPI");
    selectWindow("C2-"+ title);
    run("Close");
    selectWindow("C3-"+ title);
    rename("Ki67");
    selectWindow("C4-"+ title);
    run("Close");
    nsl = nSlices-1;
    Table.create("Ki67_results");

    var thr = 500;
    for (s = 1; s < nsl/3; s++) {
        selectWindow("DAPI");
        setSlice(s*3);
        slice = getSliceNumber();
        run("Duplicate...", "use");
    }
}

```

```

        rename("DAPI_prova");
        selectWindow("Ki67");
        setSlice(s*3);
        run("Duplicate...", "use");
        rename("Ki67_prova");
        roiManager("reset");
        ki67_analysis();
    }
selectWindow("DAPI");
close();
selectWindow("Ki67");
close();

selectWindow("Ki67_results");
A = Table.getColumn("Colocalizing");
    totalA = 0;
    for (a = 0; a < A.length; a++){
        totalA = totalA + A[a];
    }
B = Table.getColumn("Total nuclei");
    totalB = 0;
    for (b = 0; b < B.length; b++){
        totalB = totalB + B[b];
    }

selectWindow("Colocalization analysis");
Table.set("Image", i, title);
Table.set("Tot nuclei", i, totalB);
Table.set("KI67+ coloc", i, totalA);
Table.set("Colocalizing/total nuclei", i, totalA/totalB);
Table.update;
//selectWindow("Ki67_results");
//run("Close");
Table.reset("Ki67_results");

```

```

}

selectWindow("Colocalization analysis");

saveAs("results", pathres + File.separator+ "TotResults_" + File.getNameWithoutExtension(path) +
".csv");

function ki67_analysis() {
    // Analyze Ki67 positive cells
    selectWindow("DAPI_prova");
    roiManager("reset");

    run("Command From Macro", "command=[de.csbdresden.stardist.StarDist2D],
args=['input':'DAPI_prova', 'modelChoice':'Model (.zip) from File', 'normalizeInput':'true',
'percentileBottom':'1.2000000000000002', 'percentileTop':'100.0', 'probThresh':'0.5',
'nmsThresh':'0.4', 'outputType':'Both', 'modelFile':''+ modelPath +'', 'nTiles':'1',
'excludeBoundary':'2', 'roiPosition':'Automatic', 'verbose':'false', 'showCsdeepProgress':'false',
'showProbAndDist':'false'], process=[false]");

    n = roiManager("count");
    roiManager("show none");
    selectWindow("Ki67_prova");
    run("Subtract Background...", "rolling=50");
    roiManager("show none");
    roiManager("show all");
    run("Clear Results");
    roiManager("measure");
    selectWindow("Results");
    n = roiManager("count");
    for (r = 1; r < n; r++) {
        roiManager("select", r-1);
        roiManager("rename", r);
    }
    if (s==1){
        waitForUser("check the mean intensities of the nuclei and choose the best
threshold");
        thr= getNumber("Threshold", 500);
    }

    for (j = 0; j < nResults; j++) {
        if (getResult("Mean", j) > thr) {

```

```

        roiManager("select", j);
        roiManager("rename", j+1 + "_coloc");
    }
    if (getResult("Mean", j) < thr) {
        roiManager("select", j);
        roiManager("rename", j+1 + "_Nocoloc");
    }
}

//Nuclei colocalizing with Ki67
nRois = roiManager("count");
nColoc = 0;
tag = "_coloc";
for (j = 0; j < nRois; j++) {
    roiManager("select", j);
    name = Roi.getName;
    index = indexOf(name, tag);
    if (index != -1) {
        nColoc++;
    }
}

selectWindow("Ki67_results");
Table.set("Image name", s-1, title);
Table.set("Slice", s-1, s);
Table.set("Total nuclei", s-1, n);
Table.set("Colocalizing", s-1, nColoc);
Table.update;
roiManager("reset");
selectWindow("Ki67_prova");
close();
selectWindow("DAPI_prova");
close();
selectWindow("Label Image");
close();
}

```