

Impacto de la senescencia endotelial cerebral sobre la neurogénesis: aplicación de nuevas estrategias para la detección de senescencia asociada a la edad.

Introducción:

El envejecimiento es un proceso fisiológico que se acompaña de un deterioro funcional generalizado y de un aumento de la carga de células senescentes en los tejidos (López-Otín et al., 2013; 2023). Las células expuestas a factores estresantes generan una respuesta de daño en el ADN que puede desencadenar un destino senescente, alternativo a la apoptosis. Estos factores de estrés pueden ser de distinta índole, como el acortamiento de los telómeros, mutaciones en el ADN, aumento del estrés oxidativo (especies reactivas del oxígeno, o “ROS” por sus siglas en inglés), entre otros. La senescencia celular se caracteriza por el aumento de inhibidores del ciclo, como p16 o p21, y la pérdida irreversible de la capacidad proliferativa que, además, se acompaña de otros cambios en la biología de la célula (Herranz and Gil, 2018; Muñoz-Spín and Serrano, 2014). Uno de los rasgos fenotípicos más frecuentes en estas células es la alta actividad de la enzima β -Galactosidasa (β -Gal o “SA- β -Gal”) debido al aumento del compartimento lisosomal (Kurz et al., 2000). A su vez, las células senescentes poseen un potente fenotipo secretor (“SASP” por sus siglas en inglés) mediante el que liberan factores pro-inflamatorios y pro-oxidantes que contribuyen a la propagación de la senescencia en el tejido de forma paracrina (Childs et al., 2017; van Deursen, 2014).

Las células senescentes desarrollan mecanismos anti-apoptóticos que favorecen su acumulación con la edad potenciando un entorno senescente (Zhu et al., 2015; Yosef et al., 2016; Ovadya et al., 2018). La persistencia del SASP promueve un ambiente pro-inflamatorio que afecta a la función tisular. De hecho, el aumento de la carga de senescencia durante el envejecimiento conduce al agotamiento de las células madres residentes en el intento de reparar y recuperar la funcionalidad del tejido. De este modo, así como la senescencia al detener el ciclo celular puede actuar como mecanismo de defensa frente a tumores, durante el envejecimiento esta promueve el desarrollo de diversas enfermedades, incluido el cáncer (Childs et al., 2017; Zhang et al., 2019). Es por esta dicotomía que, cuando se habla de senescencia crónica asociada a la edad, esencialmente se contempla el “lado oscuro” de este proceso celular que contribuye a la degeneración de los tejidos. Asimismo, la carga senescente se considera una de las principales características del envejecimiento y su adecuada detección se ha convertido en una prioridad para el desarrollo de estrategias terapéuticas (Muñoz-Spín and Serrano, 2014; López-Otín et al., 2023).

Desafortunadamente, no hay un único marcador universal para identificar células senescentes y, además, las características fenotípicas de estas células varían según su origen, ubicación y el proceso de inducción (Hernández-Segura et al., 2018). No obstante, la medida de la actividad β -Gal representa uno de los marcadores de senescencia más empleados en el campo. Aunque esta actividad enzimática se ha determinado tradicionalmente mediante tinción histoquímica X-gal, esta estrategia presenta muchas limitaciones para su uso en combinación con otros marcadores de senescencia (Dimri et al., 1995; Debacq-Chainiaux et al., 2009).

Actualmente, está emergiendo el desarrollo de sondas fluorogénicas para la determinación de la actividad SA-β-Gal mediante fluorescencia, lo que puede ser útil para la detección de senescencia *ex vivo* junto a otros marcadores (Lozano-Torres et al., 2017; 2023; Rojas-Vázquez et al., submitted). Sin embargo, la asociación de alteraciones relacionadas con la edad con la carga senescente del organismo de manera longitudinal, es algo que todavía no se ha conseguido. Este tipo de estrategia sería interesante para el diagnóstico de enfermedades relacionadas con senescencia, así como para monitorizar terapias que persigan el rejuvenecimiento de los tejidos (Rojas-Vázquez et al., submitted).

El deterioro progresivo con la edad se manifiesta con la aparición de diversas patologías que alteran el bienestar del individuo. En este sentido, la fuerza muscular, la coordinación y habilidades motoras, así como la memoria, cognición o emoción, entre otros aspectos, empiezan a deteriorarse creando un desequilibrio en el estado de salud entre animales jóvenes y viejos que puede ser evaluado de forma externa mediante test específicos (Yanai and Endo, 2021). Curiosamente, las estrategias senolíticas han tenido efectos beneficiosos sobre la salud de ratones envejecidos, mejorando la función física, reduciendo el comportamiento ansioso y fomentando un envejecimiento saludable (Xu et al., 2018; Ogrodnik et al., 2019; Ogrodnik et al., 2021). Estos resultados sostienen que muchos de los cambios acaecidos con el aumento de la edad son directamente proporcionales a la prevalencia de las células senescentes en los tejidos.

El desarrollo de desórdenes neurológicos y enfermedades neurodegenerativas representa una de las principales inquietudes del panorama socio-sanitario actual, debido al incremento de la población envejecida y de la incidencia de estas patologías (Zheng and Chen, 2022). Las investigaciones a este respecto avanzan lentamente debido, en parte, a la complejidad del estudio del proceso de envejecimiento a nivel cerebral. En modelos de ratón de envejecimiento natural, como la cepa C57BL/6, este tipo de alteraciones no comienzan a manifestarse hasta al menos los 12 meses de edad (Yanai and Endo, 2021). En este sentido, los modelos animales de envejecimiento acelerado representan una buena alternativa en términos de coste y tiempo. Los ratones de la cepa propensa a la senescencia acelerada (SAMP) o resistente a esta (SAMR) constituyen unos de los modelos más interesantes en el estudio gerontológico (Takeda, 1999). En concreto, los ratones SAMP8 se caracterizan por presentar déficits de memoria y aprendizaje tempranos, así como por compartir muchos rasgos del envejecimiento cerebral humano, convirtiéndolos en modelos de estudio de enfermedades como Alzheimer (Takeda, 2009; Ito, 2013; Akiguchi et al., 2017). El deterioro temprano de los ratones SAMP8 es consecuencia de la senectud fisiológica, cuya incidencia y severidad aumenta con la edad. Por tanto, los estudios llevados a cabo usando el modelo SAM para dilucidar los mecanismos que conducen al envejecimiento acelerado, pueden dar una idea de los mecanismos fundamentales del envejecimiento natural.

Recientemente, se ha establecido que el agotamiento de las células madre en los tejidos desencadena un imparable declive funcional en los órganos (Schultz and Sinclair, 2016; Rojas-Vázquez et al., 2021; López-Otín et al., 2023). Las células madre adultas residentes en tejidos específicos constituyen un grupo único de células indiferenciadas que es responsable del mantenimiento de los tejidos adultos en homeostasis y de la potencial regeneración en respuesta a daño (Simons and Clevers, 2011). En relación al cerebro adulto de los mamíferos,

existen dos regiones principales que albergan células madre neurales (“NSCs” por sus siglas en inglés) capaces de generar nuevas neuronas destinadas a circuitos específicos: la zona subependimaria (“SEZ” por sus siglas en inglés) y la zona subgranular (“SGZ” por sus siglas en inglés) del giro dentado (“DG” por sus siglas en inglés) del hipocampo. La SEZ es el nicho más prolífico con diferencia en el cerebro de ratón, generando millones de nuevas neuronas a lo largo de la vida para que se integren en el bulbo olfatorio (“OB” por sus siglas en inglés) (Silva-Vargas et al., 2013; Ruddy and Morshead, 2018; Obernier and Alvarez-Buylla, 2019). Sin embargo, la neurogénesis adulta experimenta un gran declive con el envejecimiento por razones que aún no se conocen bien (Encinas et al., 2011; Conover and Shook, 2011; Kalamakis et al., 2019).

Las NSCs en los nichos coexisten con células de su progenie y otros componentes celulares (células gliales, vasculares, ...) y, por tanto, están expuestas a diferentes estímulos extrínsecos que modulan su comportamiento y pueden ser partícipes de la pérdida de actividad neurogénica que acontece con la edad (Silva-Vargas et al., 2013). El desarrollo de estrategias que permiten la detección de estas células mediante la combinación de marcadores específicos, y los estudios transcriptómicos a nivel de célula única, revelan que existe una gran heterogeneidad en las NSCs subependimarias en relación a su dinámica de proliferación. De este modo, se distinguen NSCs con distintos grados de quiescencia, que simplificamos en quiescentes (qNSCs) y propensas a la activación (“primed” en inglés) (pNSCs), que conviven con NSCs proliferativas o activas (aNSCs). El equilibrio entre estos estados es necesario para mantener la homeostasis y la correcta función neurogénica (Llorens-Bobadilla et al., 2015; Urbán et al., 2019; Belenguer et al., 2021). Sin embargo, estudios de secuenciación de ARN (“RNA-sequencing” en inglés) en estas células madre a lo largo del tiempo apuntan a una mayor prevalencia de qNSCs resistentes a la activación con el aumento de la edad (Kalamakis et al., 2019). De forma llamativa, las qNSCs envejecidas recuperan parte de su actividad ante determinados estímulos pro-rejuvenecimiento (Lugert et al., 2010; Katsimpardi et al., 2014). En este contexto, parece que el entorno envejecido, y las señales extrínsecas que reciben las NSCs durante el envejecimiento, pueden ser potenciales inhibidores de la transición del estado quiescente al activado y, por tanto, contribuir a la pérdida de la actividad neurogénica.

Entre aquellos componentes de los nichos neurogénicos que pueden ejercer mayor influencia en las NSCs, y su descendencia, destaca la vasculatura. Las NSCs mantienen un contacto íntimo con los vasos sanguíneos que componen la barrera hematoencefálica (“BBB” por sus siglas en inglés) tanto en la SEZ como en el DG. La BBB desempeña un papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis cerebral, protegiendo el parénquima neural y suministrando nutrientes y oxígeno (Tavazoie et al., 2008; Shen et al., 2008; Rafii et al., 2016; Smith et al., 2018; Vicidomini et al., 2020). Las NSCs, en concreto, mantienen una estrecha relación con las células endoteliales de los vasos (“ECs” por sus siglas en inglés), con las que interactúan de forma activa y recíproca. Los factores angiocrinos liberados por las ECs han demostrado jugar un rol fundamental en la proliferación, auto-renovación y diferenciación de las NSCs (Delgado et al., 2014; Rojas-Vázquez et al., 2021). Por tanto, esta vía de comunicación entre ambas poblaciones parece estar involucrada de forma activa en la regulación del comportamiento de las NSCs y, por ende, de la neurogénesis.

Con la edad, la BBB también experimenta una transformación profunda que compromete su integridad y aumenta la exposición de las células progenitoras neurales a factores circulantes pro-envejecimiento (Villeda et al., 2011; Obermeier et al., 2013; Segarra et al., 2021). Especialmente, las ECs sufren cambios que alteran su función celular con la edad y afectan a su papel regulador sobre la actividad de las NSCs (Rojas-Vázquez et al., 2021). Un destino senescente en estas células vasculares podría contribuir a estos acontecimientos deletéreos, pero aún no hay estudios funcionales publicados sobre la senescencia asociada a la edad en las ECs de cerebro. No obstante, se han descrito una serie de cambios fenotípicos en estas células con la edad, como una bajada en la proliferación, el aumento en los niveles de p16 y p21 o cambios a nivel metabólico, entre otros, que típicamente se asocian a un perfil senescente (Rojas-Vázquez et al., 2021). A nivel transcriptómico también se han detectado cambios respecto a las ECs jóvenes, que incluyen liberación de citoquinas pro-inflamatorias y generación de especies reactivas del oxígeno (Kalamakis et al., 2019; Kiss et al., 2020). En este escenario, las ECs de cerebro aparecen como una diana interesante en el estudio del deterioro de la actividad neurogénica con la edad en ambos nichos. Sin embargo, determinar el impacto directo de la senescencia endotelial sobre la neurogénesis en un organismo envejecido es una ardua tarea, ya que la acumulación de células senescentes se produce a nivel sistémico y esta puede contribuir al efecto anti-neurogénico por otros medios. De acuerdo con lo anterior, se necesitan estrategias que permitan discernir el papel de la senescencia endotelial sobre el declive neurogénico. Con todo, esta información sitúa al endotelio cerebral como un punto de investigación prometedor para entender el envejecimiento cerebral y buscar enfoques terapéuticos que impulsen la longevidad de la salud cerebral.

En los últimos años, la eliminación selectiva de células senescentes (senolisis) se ha convertido en una de las estrategias con mayor interés para el rejuvenecimiento tisular (Rojas-Vázquez et al., 2021 para una revisión). Los fármacos senolíticos más prometedores en el panorama actual son aquellos dirigidos a inhibir los mecanismos anti-apoptóticos (“SCAPs” por sus siglas en inglés) que desarrollan las células senescentes (Zhu et al., 2016; Hickson et al., 2019). A este respecto, la combinación de los fármacos senolíticos dasatinib y quercetin (D+Q) ha demostrado reducir la carga senescente *in vivo* con efectos insignificantes sobre otras células (Zhu et al., 2015). El tratamiento intermitente con estos fármacos de ratones envejecidos, o con determinadas patologías asociadas a senescencia, ha demostrado efectos beneficiosos en la renovación de tejidos dañados, así como en la esperanza de vida de estos animales (Xu et al., 2018; Ogrodnik et al., 2019; Hickson et al., 2019; Ogrodnik et al., 2021). D y Q son capaces de atravesar la BBB y favorecer la reducción de placas amiloides o incluso potenciar la neurogénesis en la SEZ (Ogrodnik et al., 2019; Zhang et al., 2019). Además, han demostrado mejorar la función vasomotora de ratones envejecidos (Roos et al., 2016). Estos resultados sostienen que los fármacos senolíticos pueden aliviar las alteraciones asociadas a la edad a nivel cerebral y demuestran la estrecha relación entre la senescencia y la neurodegeneración. En este sentido, la detección y eliminación de células senescentes podría representar una nueva estrategia terapéutica para recuperar la neurogénesis y prolongar la salud cerebral.

Objetivos:

El envejecimiento engloba el desarrollo de diversas enfermedades que se han asociado a una mayor carga de senescencia, como aquellas neurodegenerativas. De hecho, se ha descrito que la neurogénesis disminuye con el aumento de la edad tanto en la SEZ, como en la SGZ. Sin embargo, no está claro cómo contribuye la senescencia a este fin. Sorprendentemente, todavía no existe una verdadera correlación longitudinal entre el envejecimiento y la senescencia, debido a la falta de herramientas para la detección fiable de células senescentes *in vivo*. En este sentido, nuestro grupo está desarrollando nuevas estrategias para detectar células senescentes tanto *in vivo* como *ex vivo* que resulten útiles para comprender cómo contribuye la senescencia al envejecimiento en diferentes tejidos, incluido el cerebro.

Las NSCs están expuestas a múltiples señales que regulan extrínsecamente su comportamiento. De hecho, la vasculatura y, especialmente las ECs, ejercen una fuerte influencia sobre la función neurogénica de las NSCs mediante diversas vías. La íntima relación entre las ECs y las NSCs hace del endotelio cerebral una interesante diana de estudio. Las ECs sufren alteraciones funcionales con el envejecimiento que pueden contribuir a la pérdida de neurogénesis con la edad. No obstante, apenas se ha explorado si las ECs pueden sufrir un destino senescente, y mucho menos si esto afecta a la función neurogénica de las NSCs.

En este contexto, nuestro trabajo se basa en la hipótesis de que la senescencia de las ECs de cerebro asociada al envejecimiento tiene efectos deletéreos sobre la neurogénesis. Para ello, hemos abordado los dos siguientes objetivos principales:

1. Desarrollo de estrategias novedosas para monitorizar longitudinalmente la senescencia asociada al envejecimiento *in vivo*.
2. Caracterización de la senescencia endotelial cerebral asociada al envejecimiento y su impacto en la neurogénesis adulta.

Material y métodos:

- Cepas animales:

Los ratones fueron criados y alojados en el animalario de la Universitat de València (Servei Central de Suport a la Investigació Experimental, Burjassot) según las directrices de la Unión Europea. En el desarrollo experimental se utilizaron las cepas de ratón SAMP8 (como modelo de envejecimiento acelerado) y SAMR1 (como su control), así como C57BL/6 (como modelo de envejecimiento natural), a diferentes edades.

- Evaluación externa de la progresión del envejecimiento:

Con ratones SAMP8 se llevó a cabo un estudio pormenorizado del proceso de envejecimiento (desde los 2 a los 12 meses de edad) mediante la evaluación externa de diversos

cambios fenotípicos asociados a la edad, de forma comparativa a la cepa control SAMR1. De este modo, llevamos a cabo pruebas específicas para la evaluación de la función física, motora, metabólica, así como emocional. A este último respecto, analizamos el comportamiento ansioso de los animales SAMP8 con la prueba de Campo Abierto (“Open Field test” en inglés). Este parámetro emocional también se evaluó durante el envejecimiento natural, con la cepa C57BL/6.

- Validación de nuevas sondas fluorogénicas para la detección de SA- β -Gal *in vitro* y *ex vivo*:

En el grupo liderado por el profesor Ramón Martínez-Mañez se han desarrollado nuevas sondas fluorogénicas para la detección de la actividad β -Gal (AHGa, NBGal y WOS-Cy7Gal) (Lozano-Torres et al., 2017; 2023; Rojas-Vázquez et al., submitted). Brevemente, estas sondas consisten en un fluoróforo asociado a un derivado de galactosa, mediante un enlace O- o N-glicosídico, susceptible de ser hidrolizado por la enzima β -Gal. Cuando el fluoróforo es liberado, emite una alta fluorescencia permitiendo identificar aquellas células con mayor actividad β -Gal, es decir, las senescentes. Aunque el mecanismo funcional es similar a todas, estas sondas difieren, principalmente, en la naturaleza del fluoróforo.

Con ECs humanas (hUVECs), se desarrolló un modelo de senescencia *in vitro* mediante el tratamiento con el fármaco inhibidor de CDKs 4 y 6 palbociclib. La inducción fue testada mediante análisis inmunocitoquímico, con el uso de diversos marcadores asociados a senescencia: Ki67, Lamin B1, γ H2Ax, p21. Para ello, las células tratadas y no tratadas (controles) se fijaron con paraformaldehído (PFA) 4% y se incubaron con anticuerpos primarios específicos y anticuerpos secundarios marcados fluorescentemente. Además, se llevó a cabo la tinción citoquímica X-gal siguiendo las instrucciones del Kit comercial de Sigma-Aldrich (ref.: CS0030-1KT). Las células marcadas fueron fotografiadas con un microscopio confocal (Olympus FV10i) y se utilizó el programa *Image J* para el análisis de imagen.

Utilizando este modelo de senescencia, evaluamos la señal asociada a cada una de las sondas fluorogénicas mediante microscopía confocal (Olympus FV-1000). Para este fin, añadimos la sonda diluida en DMEM (AHGa 10 μ M, NBGal 2 μ M y WOS-Cy7Gal 20 μ M) y tomamos imágenes durante la primera hora de incubación. Para cuantificar la diferencia en la mediana de intensidad de fluorescencia (“MFI” por sus siglas en inglés) entre células controles y senescentes, incubamos las células con cada sonda durante 15 minutos. Tras centrifugar, analizamos la fluorescencia asociada a estas sondas mediante citometría de flujo (FACS) en un citómetro LSR-Fortessa (Becton Dickinson).

Además, la eficiencia de la sonda WOS-Cy7Gal ha sido testada en otros modelos *in vitro*, así como en la medida *ex vivo* de la senescencia asociada a la edad. *In vitro*, WOS-Cy7Gal se ha utilizado para medir la actividad β -Gal tras la inducción de senescencia replicativa en hUVECs o tras la exposición de células bEnd.3 (línea de ECs de cerebro de ratón) a estrés oxidativo (H_2O_2), en paralelo a otros marcadores como p16 y γ H2AX. Con este fin, las ECs se despegaron de la placa con una solución de 0,05% tripsina/0,02% EDTA. Una fracción de estas células se incubó con la sonda durante 15 minutos y la otra se fijó y permeabilizó, siguiendo el protocolo detallado

en el kit “Pharmingen™ Transcription-Factor Buffer Set” (BD-Biosciences), para su posterior incubación con anticuerpos primarios específicos y secundarios marcados fluorescentemente. El análisis se llevó a cabo por citometría de flujo (LSR-Fortessa BD).

Respecto a la detección de senescencia *ex vivo*, la sonda WOS-Cy7Gal se utilizó en paralelo a p16 y Lamin B1, para la determinación de los niveles de senescencia en hígado y riñón de ratones SAMP8 en comparación a SAMR1. Para este fin, se extrajo el riñón derecho y una porción de hígado de ratones SAMP8 y SAMR1 de 7 meses. Ambos tejidos se digirieron de forma enzimática con colagenasa/dispasa y ADNasa en un disociador automático (gentleMACS Octo Dissociator, Miltenyi) y se filtraron. Parte de la muestra se incubó con la sonda WOS-Cy7Gal durante 15 minutos. La otra parte, se fijó y permeabilizó para el marcaje con anticuerpos primarios específicos y secundarios fluorescentes, siguiendo el protocolo descrito en el kit “Pharmingen™ Transcription-Factor Buffer Set” (BD). Las muestras se analizaron por citometría de flujo (LSR-Fortessa BD).

- Cultivo de NSCs y evaluación de los efectos paracrinos de las ECs senescentes:

Los detalles metodológicos y los medios de cultivo empleados para el establecimiento y propagación de cultivos de NSCs se pueden consultar en el trabajo publicado por nuestro grupo en 2016 (Belenguer et al., 2016).

Para el experimento de NSCs condicionadas por factores derivados de células endoteliales senescentes y controles, se utilizaron los modelos de senescencia establecidos en hUVECs (usando palbociclib) y células bEnd.3 (exponiéndolas a un estímulo oxidativo). En ambos casos, las células controles y senescentes condicionaron el medio completo de NSCs desprovisto de BSA durante 24-48h. Tras este periodo, se obtuvo la fracción soluble del medio mediante sucesivas centrifugaciones (1.200 *xg*, 10 min y 10.000 *xg*, 60 min), filtración, y una ultracentrifugación (100.000 *xg* 80 min). Las NSCs se sembraron con los medios que contienen los factores solubles liberados por ECs controles o senescentes diluidos 1/4, así como con medio fresco (no condicionado). Una fracción de estas células fueron marcadas con el trazador de división celular Oregon Green 488 Carboxy-DFFDA-SE (DFFDA, ThermoFisher) antes de ser sembradas, con objeto de analizar la proliferación de estas células en presencia de factores endoteliales senescentes. A los 4 días *in vitro*, las NSCs se disociaron con Acutase® y se procesaron para su análisis. Por un lado, las células vivas se procesaron para el análisis de DFFDA, de la actividad β-Gal con la sonda WOS-Cy7Gal, y de la producción de ROS con la sonda comercial mitoSOX®-red (Invitrogen, consultar protocolo del fabricante). Por otro lado, las NSCs se fijaron, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado anterior, para el análisis de Lamin B1. Todas las muestras fueron analizadas por citometría de flujo (LSR-Fortessa BD).

- Fenotipado de ECs senescentes en cerebro mediante citometría de flujo:

Este procedimiento se ha llevado a cabo con las cepas murinas SAMP8, SAMR1 y C57BL/6. Tras la eutanasia del animal, se obtuvo el cerebro y se descartaron bulbos y cerebelo. El tejido se digirió enzimáticamente con colagenasa/dispasa y ADNasa en un disociador automático (gentleMACS Octo Dissociator, Miltenyi). Seguidamente, este se filtró y procesó para retirar la

mielina (Debris Removal Solution, Miltenyi). Para el análisis de ECs de cerebro, se utilizaron los anticuerpos CD45 para la exclusión de células inmunes, y CD31 para la selección de ECs (ambos de BD-Biosciences). Las células se incubaron con estos anticuerpos (asociados a un fluoróforo) durante 30 min a 4 °C. A continuación, las muestras se dividieron para la incubación con sondas (WOS-Cy7Gal/NBGal y mitoSOX®) y para su fijación-permeabilización (BD Pharmingen™ Transcription-Factor Buffer Set). Las células fijadas fueron incubadas con anticuerpos primarios específicos (p16, γ H2AX) y anticuerpos secundarios marcados fluorescentemente. Las muestras se analizaron mediante citometría de flujo (LSR-Fortessa BD).

- Fenotipado del linaje neurogénico de la SEZ mediante citometría de flujo:

En paralelo al fenotipado de la senescencia endotelial en cerebro, se analizó el linaje neurogénico de la SEZ siguiendo el protocolo detallado en el trabajo publicado por nuestro grupo en 2021 ([Belenguer et al., 2021](#)).

- Medida de la actividad β -Gal sistémica *in vivo*:

La sonda WOS-Cy7Gal fue químicamente modificada, mediante la adición de dos grupos sulfónicos a la molécula de fluoróforo, con el objetivo de hacerla más difusible y que pueda excretarse en orina. Esta sonda modificada recibió el nombre de Cy7Gal. Primero, Cy7Gal fue analizada mediante microscopía confocal del mismo modo que la WOS-Cy7Gal, con el modelo de senescencia de hUVECs tratadas con palbociclib. Seguidamente, se estudió su biodistribución en comparación a la sonda WOS-Cy7Gal mediante la inyección intraperitoneal (i.p.) de ambas sondas, o del vehículo (DMEM), en ratones SAMP8 de avanzada edad. Tras la administración, los animales fueron anestesiados vía inhalatoria con isoflurano durante 10 min. Pasado este tiempo, se obtuvieron muestras de sangre (vena submandibular) y orina. La sangre se recogió en tubos heparinizados para obtener plasma (350 μ g, 4 min). Las muestras de plasma y orina se diluyeron (1/10 y 1/20 respectivamente) en 100 μ l de agua destilada previo al análisis de fluorescencia (Horiba Scientific Fluoromax-4 spectrofluorometer).

Para la medida de los niveles sistémicos de actividad β -Gal como lectura de la carga senescente asociada al envejecimiento y/o a tratamientos senolíticos, la sonda fue inyectada i.p. en los ratones de experimentación (140 mg/kg) y estos se anestesiaron con isoflurano (2%) durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo, se recogieron las muestras de orina y con cada una se realizó una dilución 1/20 en 100 μ l de agua destilada previo a su análisis en el fluorímetro. Para evitar que la variabilidad en la micción altere los resultados, las unidades arbitrarias de fluorescencia obtenidas se multiplicaron por el volumen total de orina recogido para cada muestra.

- Tratamiento senolítico:

Los animales fueron tratados vía oral con la combinación de fármacos D (5 mg/kg) + Q (50 mg/kg) ([Xu et al., 2018](#)). Los ratones SAMP8 de 7 meses recibieron la mezcla de estos fármacos durante 5 semanas consecutivas, alternando regímenes de 5 o 1 día de tratamiento por semana. La misma cohorte de animales recibió otra ronda de tratamiento a los 10 meses siguiendo la

misma pauta. Por otro lado, los ratones C57BL/6 de 15 meses recibieron una pauta de D+Q de 5 semanas con 2 dosis por semana.

- Análisis inmunohistoquímico de la neurogénesis adulta en el OB y la SGZ:

Los ratones fueron inoculados vía i.p. con una dosis de 50 mg/kg del análogo de timidina BrdU (10 mg/ml) dos veces al día, con un intervalo de 6 horas entre cada inyección, durante 3 días consecutivos. Para el análisis inmunohistoquímico de BrdU, los animales inyectados fueron anestesiados (con una mezcla de medetomidina y ketamina, i.p.) y sometidos a una perfusión transcardíaca con PFA 4%. En el caso de los ratones bajo tratamiento senolítico, la eutanasia se llevó a cabo 26 días después de la inyección de BrdU, mientras que en los infectados con AAV-BR1 se practicó a los 17 días. Con estos últimos, no se realizó perfusión, y bulbo e hipocampo fueron diseccionados y post-fijados por inmersión con PFA 4% durante 24 h. Cerebro/hipocampo y OBs fueron procesados para su corte en vibratomo. Posteriormente, la detección de BrdU y otros marcadores se llevó a cabo con anticuerpos primarios específicos y anticuerpos secundarios marcados fluorescentemente. El número de células BrdU⁺ en la capa glomerular ("GL" por sus siglas en inglés) del OB, y en la SGZ del DG, se contó de forma manual bajo un microscopio de fluorescencia Nikon ECLIPSE. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio confocal (Olympus FV10i).

- Análisis de la transducción de AAV2-BR1-GFP-p16 en ECs de cerebro y su efecto en neurogénesis:

Ratones C57BL/6 jóvenes fueron inyectados por vía intravenosa (i.v.) con 1×10^{12} gc (copias genómicas) del vector adenoasociado AAV2-BR1-GFP-p16 en la vena de la cola (Körbelin et al., 2016). Como control, se inyectó PBS i.v. en ratones de la misma cepa y edad. Los días 14, 15 y 16 tras la inoculación del virus se inyectó BrdU siguiendo el protocolo antes especificado. Tras 31 días de la administración del vector, se extrajo el cerebro y una porción del hígado y se procesaron, como se ha descrito previamente, para la identificación de ECs y el análisis de marcadores asociados a senescencia por FACS, como SA- β -Gal (NBGal), p16 y γ H2AX. Además, se evaluó la fluorescencia asociada a GFP en hígado y en otras poblaciones celulares de cerebro para comprobar la especificidad de infección del virus. Para el análisis inmunohistoquímico de la neurogénesis en el OB y la SGZ, se procedió de forma semejante a la expuesta en el apartado anterior.

Resultados y discusión:

Los resultados de esta tesis responden a los objetivos planteados: pasando de un estudio más general de la senescencia asociada al envejecimiento, a otro más específico centrado en el envejecimiento cerebral mediante la evaluación de la senescencia endotelial en el cerebro y su impacto en la neurogénesis adulta.

1. Desarrollo de estrategias novedosas para monitorizar longitudinalmente la senescencia asociada al envejecimiento *in vivo*

Con objeto de mejorar nuestra comprensión sobre el envejecimiento y su relación con la senescencia, nos propusimos, en primera instancia, evaluar diversas características fenotípicas asociadas a la edad en un modelo animal de envejecimiento acelerado. Para ello, llevamos a cabo un estudio de carácter longitudinal, atendiendo a diversos parámetros fácilmente medibles y relacionados con la edad (físicos, bioquímicos, y emocionales), que nos permitió caracterizar el proceso de envejecimiento en los ratones SAMP8, en comparación a la cepa SAMR1. Gracias a la evaluación de pruebas específicas, de diversa índole y a distintas edades, pudimos discernir el comienzo de déficits típicamente relacionados con envejecimiento en los ratones SAMP8. Sorprendentemente, encontramos que varios signos de deterioro aparecían antes de lo descrito en la bibliografía y esto nos permitió seleccionar edades diana de forma precisa para relacionar el envejecimiento con la carga sistémica de senescencia. Cabe destacar que los ratones SAMP8 mostraron un deterioro emocional particularmente temprano, solo a 4 meses de edad, con evidentes signos de ansiedad en la percepción del espacio abierto (Open Field test). Para dilucidar si la ansiedad es una característica robusta y útil para trazar el envejecimiento natural, también evaluamos el comportamiento ansioso en la cepa C57BL/6, comparando animales de 3 y 17 meses. Los resultados obtenidos en la prueba de Open Field indicaron que los ratones de 17 meses también experimentan un aumento significativo en los niveles de ansiedad.

Con el propósito de estudiar si estos cambios con la edad se relacionan con un aumento de la carga senescente, empleamos sondas fluorogénicas basadas en la detección de la SA- β -Gal para la detección de células senescentes. Primero, validamos estas sondas moleculares (WOS-Cy7Gal, NBGal y AHGa) en un modelo de senescencia *in vitro* bien caracterizado, hUVECs tratadas con el fármaco palbociclib. Mediante microscopía confocal y citometría de flujo comprobamos que, en aquellas células tratadas con palbociclib, las sondas exhibían un marcaje punteado y con mayor intensidad de fluorescencia que en las células no tratadas (controles). Este resultado se correlaciona con la lectura de otros marcadores asociados a senescencia, indicando que las sondas identifican de forma eficiente la mayor actividad β -gal lisosomal de las células senescentes. Seguidamente, utilizamos una de estas sondas para estimar los niveles de senescencia de ratones SAMP8 de 7 meses, en comparación a ratones SAMR1 de la misma edad. Para ello, procesamos hígado y riñón, dos órganos diana para la acumulación de células senescentes. A continuación, analizamos la actividad β -Gal con la sonda WOS-Cy7Gal, junto a los niveles de p16 y Lamin B1 (dos marcadores altamente aceptados en el campo), por citometría de flujo. Los resultados indicaron que existe una mayor carga de células senescentes en la cepa SAMP8 a esta edad.

Dada la eficiencia de la sonda WOS-Cy7Gal en la lectura de senescencia asociada a la edad *ex vivo*, decidimos modificarla a nivel químico incluyendo dos grupos sulfónicos para favorecer su excreción en orina. Esta sonda modificada, de ahora en adelante denominada Cy7Gal, fue inyectada en ratones SAMP8 de avanzada edad, en comparación a la WOS-Cy7Gal, para analizar su biodistribución. A los 10 minutos de la inyección, se recogieron muestras de orina y plasma y, posteriormente, se analizaron los niveles de fluorescencia. La sonda con grupos sulfónicos fue

detectada tanto en orina como en plasma, mientras que los niveles de fluorescencia en los animales inyectados con WOS-Cy7Gal apenas se diferenciaron de los animales administrados con DMEM (vehículo). En base a estos resultados, inferimos que Cy7Gal difunde rápidamente de las células a la sangre y se filtra en los riñones acumulándose en la orina. A continuación, inyectamos Cy7Gal en animales SAMP8 y SAMR1 de 7 meses de edad y, de acuerdo al experimento *ex vivo*, la lectura de fluorescencia en orina indicó una mayor actividad β -Gal sistémica en los ratones SAMP8. Por tanto, la sonda Cy7Gal aparece como una herramienta valiosa para la estimación de los niveles de senescencia *in vivo* y de forma no invasiva. Además, también testamos la sonda Cy7Gal en un modelo de envejecimiento natural con ratones C57BL/6 de 3 y 15 meses. Los niveles de fluorescencia registrados fueron significativamente más altos en los ratones más viejos, apoyando la utilidad de esta sonda en la medida de senescencia asociada a envejecimiento en estudios longitudinales. A este respecto, decidimos testar la eficiencia de la sonda como herramienta de monitorización en terapias senolíticas.

Primero, llevamos a cabo un tratamiento senolítico con D+Q en ratones SAMP8 y analizamos los efectos de la senolisis con la lectura de la sonda Cy7Gal y con la evaluación del comportamiento ansioso. A corto plazo tras el tratamiento senolítico (20 días), detectamos una reducción en signos de ansiedad en los ratones que recibieron los fármacos en correlación a una disminución en los niveles de fluorescencia asociados a Cy7Gal en orina. Por tanto, la sonda nos indica una reducción en la carga senescente tras el tratamiento que, además, tiene efectos positivos a nivel de comportamiento. Por otro lado, cuando evaluamos los efectos senolíticos a más largo plazo tras el tratamiento (más de 50 días), no detectamos cambios significativos ni en el comportamiento ansioso, ni en la sonda entre ratones tratados y vehículos. Este resultado pone de manifiesto que los efectos de los fármacos senolíticos *in vivo* son transitorios. Para comprobar que los ratones podían responder de nuevo al tratamiento, se llevó a cabo otro ciclo con D+Q en los mismos animales. De forma interesante, detectamos una recuperación en los efectos de la senolisis, con signos de ansiedad disminuidos y carga senescente reducida en los ratones SAMP8 tratados. Además, cuando evaluamos el tratamiento a corto plazo, identificamos una correlación significativa entre el comportamiento ansioso y los resultados de la lectura de la sonda. Este resultado pone en relieve que la sonda es lo suficientemente sensible como para predecir un comportamiento emocional asociado a la edad.

Segundo, iniciamos el tratamiento senolítico con D+Q en ratones C57BL/6 de 15 meses. Tras la intervención senolítica, detectamos una bajada en los niveles de senescencia con la sonda Cy7Gal, así como una disminución en el comportamiento ansioso. Por tanto, Cy7Gal permite una medida fiable de la carga senescente *in vivo* y resulta una herramienta útil en estudios longitudinales diagnósticos o en la monitorización de terapias senolíticas. Además, encontramos una correlación significativa entre la ansiedad y la lectura de la sonda, lo que indica que la senescencia tiene un fuerte impacto deletéreo a nivel cerebral.

2. Caracterización de la senescencia endotelial cerebral asociada al envejecimiento y su impacto en la neurogénesis adulta

Con el objeto de investigar si las ECs de cerebro adquieren un destino senescente con la edad en relación a una disminución en la neurogénesis, evaluamos distintos marcadores asociados a senescencia en esta población vascular y analizamos el linaje neurogénico de la SEZ. Para este fin, desarrollamos un panel de FACS para el fenotipado de ECs senescentes de cerebro mediante el que evaluamos la actividad β -Gal (con las sondas desarrolladas por nuestro grupo), p16 y otros marcadores como γ H2AX o la producción de ROS (mitoSOX). Para el análisis de la neurogénesis en la SEZ, empleamos el protocolo de citometría de flujo publicado por nuestro grupo (Belenguer et al., 2021). Tras aplicar estas estrategias en ratones SAMP8 versus SAMR1, así como en ratones C57BL/6 jóvenes versus viejos, los resultados obtenidos mostraron que en las ECs de cerebro aumentan los niveles de marcadores asociados a senescencia con la edad y que, además, el potencial neurogénico de la SEZ disminuye.

Para comprobar si la correlación entre senescencia endotelial y neurogénesis se mantenía bajo una intervención senolítica, analizamos esta conexión en ratones SAMP8 después del tratamiento con D+Q. Además de aplicar nuestros paneles de citometría, los ratones fueron inyectados con BrdU para el posterior análisis inmunohistoquímico de la neurogénesis en el OB y el DG. Los resultados indicaron una bajada en los niveles de marcadores asociados a senescencia en las ECs de cerebro y una recuperación en el potencial neurogénico de la SEZ de los SAMP8 tratados. Este se acompañó de un aumento en el número de nuevas neuronas que se integran en el OB. Además, la cantidad de células BrdU⁺ en la SGZ también fue notablemente superior en los ratones tratados con los fármacos senolíticos. Estos resultados demuestran una consistencia en la relación entre la senescencia endotelial y la neurogénesis adulta.

Para analizar si existe una conexión causa-efecto entre la senescencia endotelial cerebral y la bajada en neurogénesis, diseñamos un modelo de inducción genética de senescencia en ECs de cerebro, y estudiamos su impacto en neurogénesis. Esta estrategia consiste en un vector viral adenoasociado cuya proteína de la cápside tiene tropismo por las ECs cerebrales (AAV-BR1) (Körbelin et al., 2016). En este vector incluimos material genético para la sobreexpresión de p16 en las ECs e inducción de senescencia. Además, también incluimos GFP para analizar de forma sencilla la transducción del virus. Tras la inyección i.v. de este vector o de PBS (como control) en ratones C57BL/6, administramos BrdU con objeto de analizar la neurogénesis en el OB y el DG. Los ratones fueron eutanasiados 31 días después de la inoculación del vector adenoasociado, y evaluamos la senescencia endotelial tanto en cerebro como en hígado, mediante citometría de flujo. Los resultados mostraron que solo las ECs de cerebro de los ratones inyectados con el virus exhibían niveles significativamente más altos de GFP y p16, resaltando la especificidad del abordaje. Además, esta población mostraba mayor actividad β -Gal y niveles más altos de γ H2AX, confirmando la inducción de senescencia. El análisis inmunohistoquímico de la neurogénesis reveló un número menor de nuevas neuronas, tanto en el OB como en el DG, en los animales inyectados con el vector. De este modo, concluimos que la senescencia endotelial tiene un fuerte impacto en la neurogénesis adulta, y es suficiente para reducir el número de nuevas neuronas que se forman en los principales nichos neurogénicos del cerebro. En conjunto, los

resultados apuntan a la población endotelial como una diana de investigación interesante en el estudio del envejecimiento cerebral.

Conclusiones:

1. Las sondas fluorogénicas, específicamente diseñadas para ser recuperadas en la orina, permiten una lectura de la actividad β -Gal sistémica, lo que posibilita la estimación de la carga de senescencia de forma no-invasiva en estudios longitudinales, ya sean asociados a envejecimiento o a tratamientos senolíticos.
2. Los estudios longitudinales, correlacionando la ansiedad asociada a la edad y los niveles de β -Gal sistémicos mediante sondas fluorogénicas que se recuperan en orina, indican que los efectos de los fármacos senolíticos son transitorios y desaparecen con el tiempo.
3. Las células endoteliales de cerebro entran en senescencia con la edad y este destino celular tiene un impacto perjudicial en las células madre neurales y en la neurogénesis.

Referencias:

Akiguchi, I., Pallàs, M., Budka, H., Akiyama, H., Ueno, M., Han, J., Yagi, H., Nishikawa, T., Chiba, Y., Sugiyama, H., Takahashi, R., Unno, K., Higuchi, K., & Hosokawa, M. (2017). SAMP8 mice as a neuropathological model of accelerated brain aging and dementia: Toshio Takeda's legacy and future directions. *Neuropathology: Official Journal of the Japanese Society of Neuropathology*, 37(4), 293–305.

Belenguer, G., Domingo-Muelas, A., Ferrón, S. R., Morante-Redolat, J. M., & Fariñas, I. (2016). Isolation, culture and analysis of adult subependymal neural stem cells. *Differentiation; Research in Biological Diversity*, 91(4–5), 28–41.

Belenguer, G., Duart-Abadia, P., Domingo-Muelas, A., Morante-Redolat, J. M., & Fariñas, I. (2021). Cell population analysis of the adult murine subependymal neurogenic lineage by flow cytometry. *STAR Protocols*, 2(2).

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- α Receptor Signaling. *Cell Stem Cell*, 28(2), 285-299.e9.

Childs, B. G., Gluscevic, M., Baker, D. J., Laberge, R. M., Marquess, D., Dananberg, J., & Van Deursen, J. M. (2017). Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 16(10), 718.

Conover, J. C., & Shook, B. A. (2011). Aging of the Subventricular Zone Neural Stem Cell Niche. *2*(1), 49–63.

Debacq-Chainiaux, F., Erusalimsky, J. D., Campisi, J., & Toussaint, O. (2009). Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA- β gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nature Protocols*, *4*(12), 1798–1806.

Delgado, A. C., Ferrón, S. R., Vicente, D., Porlan, E., Perez-Villalba, A., Trujillo, C. M., D'Ocón, P., & Fariñas, I. (2014). Endothelial NT-3 delivered by vasculature and CSF promotes quiescence of subependymal neural stem cells through nitric oxide induction. *Neuron*, *83*(3), 572–585.

Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., Peacocke, M., & Campisi, J. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(20), 9363–9367.

Encinas, J. M., Michurina, T. V., Peunova, N., Park, J. H., Tordo, J., Peterson, D. A., Fishell, G., Koulakov, A., & Enikolopov, G. (2011). Division-coupled astrocytic differentiation and age-related depletion of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell*, *8*(5), 566–579.

Hernandez-Segura, A., Nehme, J., & Demaria, M. (2018). Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends in Cell Biology*, *28*(6), 436–453.

Herranz, N., & Gil, J. (2018). Mechanisms and functions of cellular senescence. *The Journal of Clinical Investigation*, *128*(4), 1238–1246.

Hickson, L. T. J., Langhi Prata, L. G. P., Bobart, S. A., Evans, T. K., Giorgadze, N., Hashmi, S. K., Herrmann, S. M., Jensen, M. D., Jia, Q., Jordan, K. L., Kellogg, T. A., Khosla, S., Koerber, D. M., Lagnado, A. B., Lawson, D. K., LeBrasseur, N. K., Lerman, L. O., McDonald, K. M., McKenzie, T. J., ... Kirkland, J. L. (2019). Senolytics decrease senescent cells in humans: Preliminary report from a clinical trial of Dasatinib plus Quercetin in individuals with diabetic kidney disease. *EBioMedicine*, *47*, 446–456.

Ito, K. (2013). Frontiers of model animals for neuroscience: two prosperous aging model animals for promoting neuroscience research. *Experimental Animals*, *62*(4), 275–280.

Kalamakis, G., Brüne, D., Ravichandran, S., Bolz, J., Fan, W., Ziebell, F., Stiehl, T., Catalá-Martinez, F., Kupke, J., Zhao, S., Llorens-Bobadilla, E., Bauer, K., Limpert, S., Berger, B., Christen, U., Schmezer, P., Mallm, J. P., Berninger, B., Anders, S., ... Martin-Villalba, A. (2019). Quiescence Modulates Stem Cell Maintenance and Regenerative Capacity in the Aging Brain. *Cell*, *176*(6), 1407-1419.e14.

Katsimpardi, L., Litterman, N. K., Schein, P. A., Miller, C. M., Loffredo, F. S., Wojtkiewicz, G. R., Chen, J. W., Lee, R. T., Wagers, A. J., & Rubin, L. L. (2014). Vascular and neurogenic rejuvenation of the aging mouse brain by young systemic factors. *Science (New York, N.Y.)*, *344*(6184), 630.

Kiss, T., Nyúl-Tóth, Á., Balasubramanian, P., Tarantini, S., Ahire, C., DelFavero, J., Yabluchanskiy, A., Csipo, T., Farkas, E., Wiley, G., Garman, L., Csiszar, A., & Ungvari, Z. (2020). Single-cell RNA sequencing identifies senescent cerebromicrovascular endothelial cells in the aged mouse brain. *GeroScience*, 42(2), 429–444.

Körbelin, J., Dogbevia, G., Michelfelder, S., Ridder, D. A., Hunger, A., Wenzel, J., Seismann, H., Lampe, M., Bannach, J., Pasparakis, M., Kleinschmidt, J. A., Schwaninger, M., & Trepel, M. (2016). A brain microvasculature endothelial cell-specific viral vector with the potential to treat neurovascular and neurological diseases. *EMBO Molecular Medicine*, 8(6), 609.

Kurz, D., Decary, S., Hong, Y., & Erusalimsky, J. (2000). Senescence-associated β -galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *Journal of cell science*, 113 (Pt 20):3613-22.

López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6), 1194.

López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2023). Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell*, 186(2), 243–278.

Lozano-Torres, B., Galiana, I., Rovira, M., Garrido, E., Chaib, S., Bernardos, A., Muñoz-Espín, D., Serrano, M., Martínez-Mañez, R., & Sancenón, F. (2017). An OFF-ON Two-Photon Fluorescent Probe for Tracking Cell Senescence in Vivo. *Journal of the American Chemical Society*, 139(26), 8808–8811.

Lozano-Torres, B., García-Fernández, A., Domínguez, M., Sancenón, F., Blandez, J. F., & Martínez-Mañez, R. (2023). β -Galactosidase-Activatable Nile Blue-Based NIR Senoprobe for the Real-Time Detection of Cellular Senescence. *Analytical Chemistry*, 95(2).

Lugert, S., Basak, O., Knuckles, P., Haussler, U., Fabel, K., Götz, M., Haas, C. A., Kempermann, G., Taylor, V., & Giachino, C. (2010). Quiescent and active hippocampal neural stem cells with distinct morphologies respond selectively to physiological and pathological stimuli and aging. *Cell Stem Cell*, 6(5), 445–456.

Muñoz-Espín, D., & Serrano, M. (2014). Cellular senescence: from physiology to pathology. *15(7)*, 482–496.

Obermeier, B., Daneman, R., & Ransohoff, R. M. (2013). Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nature Medicine*, 19(12), 1584–1596.

Obernier, K., & Alvarez-Buylla, A. (2019). Neural stem cells: Origin, heterogeneity and regulation in the adult mammalian brain. In *Development (Cambridge)* (Vol. 146, Issue 4). Company of Biologists Ltd.

Ogrodnik, M., Evans, S. A., Fielder, E., Victorelli, S., Kruger, P., Salmonowicz, H., Weigand, B. M., Patel, A. D., Pirtskhalava, T., Inman, C. L., Johnson, K. O., Dickinson, S. L., Rocha, A., Schafer, M.

J., Zhu, Y., Allison, D. B., von Zglinicki, T., LeBrasseur, N. K., Tchkonja, T., ... Jurk, D. (2021). Whole-body senescent cell clearance alleviates age-related brain inflammation and cognitive impairment in mice. *Aging Cell*, 20(2).

Ogrodnik, M., Zhu, Y., Langhi, L. G. P., Tchkonja, T., Krüger, P., Fielder, E., Victorelli, S., Ruswhandi, R. A., Giorgadze, N., Pirtskhalava, T., Podgorni, O., Enikolopov, G., Johnson, K. O., Xu, M., Inman, C., Palmer, A. K., Schafer, M., Weigl, M., Ikeno, Y., ... Jurk, D. (2019). Obesity-Induced Cellular Senescence Drives Anxiety and Impairs Neurogenesis. *Cell Metabolism*, 29(5), 1233.

Ovadya, Y., Landsberger, T., Leins, H., Vadai, E., Gal, H., Biran, A., Yosef, R., Sagiv, A., Agrawal, A., Shapira, A., Windheim, J., Tsoory, M., Schirmbeck, R., Amit, I., Geiger, H., & Krizhanovsky, V. (2018). Impaired immune surveillance accelerates accumulation of senescent cells and aging. *Nature Communications* 2018 9, 1, 9(1), 1–15.

Rafii, S., Butler, J. M., & Ding, B. Sen. (2016). Angiocrine functions of organ-specific endothelial cells. *Nature* 2016 529:7586, 529(7586), 316–325.

Rojas-Vázquez, S., Blasco-Chamarro, L., López-Fabuel, I., Martínez-Máñez, R., & Fariñas, I. (2021). Vascular Senescence: A Potential Bridge Between Physiological Aging and Neurogenic Decline. *Frontiers in Neuroscience*, 15.

Rojas-Vázquez, Sara; Lozano-Torres, Beatriz; García-Fernández, Alba; Galiana, Irene; Perez-Villalba, Ana; Martí-Rodrigo, Pablo; Palop, M. José; Orzáez, Mar; Sancenón, Félix; Blandez, Juan F.; Fariñas, Isabel and Martínez-Máñez, R. (n.d.). A renal clearable fluorogenic probe for the in vivo detection of cellular senescence. *Nature Aging*. Submitted.

Roos, C. M., Zhang, B., Palmer, A. K., Ogrodnik, M. B., Pirtskhalava, T., Thalji, N. M., ... Miller, J. D. (2016). Chronic senolytic treatment alleviates established vasomotor dysfunction in aged or atherosclerotic mice. *Aging Cell*, 15(5), 973–977.

Ruddy, R. M., & Morshead, C. M. (2018). Home sweet home: the neural stem cell niche throughout development and after injury. *Cell and Tissue Research*. Springer Verlag, 371(1), 125-141.

Schultz, M. B., & Sinclair, D. A. (2016). When stem cells grow old: phenotypes and mechanisms of stem cell aging. *Development (Cambridge, England)*, 143(1), 3–14.

Segarra, M., Aburto, M. R., & Acker-Palmer, A. (2021). Blood-Brain Barrier Dynamics to Maintain Brain Homeostasis. *Trends in Neurosciences*, 44(5), 393–405.

Shen, Q., Wang, Y., Kokovay, E., Lin, G., Chuang, S. M., Goderie, S. K., ... Temple, S. (2008). Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions. *Cell Stem Cell*, 3(3), 289–300.

Silva-Vargas, V., Crouch, E. E., & Doetsch, F. (2013). Adult neural stem cells and their niche: A dynamic duo during homeostasis, regeneration, and aging. *Current Opinion in Neurobiology*, 23(6), 935–942.

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

Smith, L. K., White, C. W., & Villeda, S. A. (2018). The systemic environment: at the interface of aging and adult neurogenesis. *Cell and Tissue Research*, 371(1), 105–113.

Takeda, T. (1999). Senescence-accelerated mouse (SAM): A biogerontological resource in aging research. *Neurobiology of Aging*, 20(2), 105–110.

Takeda, T. (2009). Senescence-accelerated mouse (SAM) with special references to neurodegeneration models, SAMP8 and SAMP10 mice. *Neurochemical Research*, 34(4), 639–659.

Tavazoie, M., Van der Veken, L., Silva-Vargas, V., Louissaint, M., Colonna, L., Zaidi, B., ... Doetsch, F. (2008). A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell Stem Cell*, 3(3), 279–288.

Urbán, N., Blomfield, I. M., & Guillemot, F. (2019). Quiescence of Adult Mammalian Neural Stem Cells: A Highly Regulated Rest. *Neuron*, 104(5), 834–848.

Van Deursen, J. M. (2014). The role of senescent cells in ageing. *Nature*, 509(7501), 439–446.

Vicidomini, C., Guo, N., & Sahay, A. (2020). Communication, Cross Talk, and Signal Integration in the Adult Hippocampal Neurogenic Niche. *Neuron*, 105(2), 220–235.

Villeda, S. A., Luo, J., Mosher, K. I., Zou, B., Britschgi, M., Bieri, G., ... Wyss-Coray, T. (2011). The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature*, 477(7362), 90–96.

Xu, M., Pirtskhalava, T., Farr, J. N., Weigand, B. M., Palmer, A. K., Weivoda, M. M., ... Kirkland, J. L. (2018). Senolytics Improve Physical Function and Increase Lifespan in Old Age. *Nature Medicine*, 24(8), 1246.

Yanai, S., & Endo, S. (2021). Functional Aging in Male C57BL/6J Mice Across the Life-Span: A Systematic Behavioral Analysis of Motor, Emotional, and Memory Function to Define an Aging Phenotype. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 13, 457.

Yosef, R., Pilpel, N., Tokarsky-Amiel, R., Biran, A., Ovadya, Y., Cohen, S., ... Krizhanovsky, V. (2016). Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nature Communications*, 7.

Zhang, P., Kishimoto, Y., Grammatikakis, I., Gottimukkala, K., Cutler, R. G., Zhang, S., ... Mattson, M. P. (2019). Senolytic therapy alleviates A β -associated oligodendrocyte progenitor cell

senescence and cognitive deficits in an Alzheimer's disease model. *Nature Neuroscience*, 22(5), 719–728.

Zheng, J. C., & Chen, S. (2022). Translational Neurodegeneration in the era of fast growing international brain research. *Translational Neurodegeneration*, 11(1), 1–2.

Zhu, Y., Tchkonina, T., Pirskhalava, T., Gower, A. C., Ding, H., Giorgadze, N., ... Kirkland, J. L. (2015). The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell*, 14(4), 644.