



VNIVERSIDAD  
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



INSTITUTO DE  
NEUROCIENCIAS  
CASTILLA Y LEÓN

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y PATOLOGÍA  
INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEÓN  
LABORATORIO DE PLASTICIDAD NEURONAL Y NEURORREPARACIÓN

*El lóbulo X del cerebelo: análisis génico y  
molecular de su resistencia a la  
degeneración neuronal del ratón PCD*

**-Tesis Doctoral-**

Carlos Hernández Pérez

Directores:

Prof. Dr. D. Eduardo Weruaga Prieto

Prof. Dr. D. David Díaz López

Salamanca, 2022





VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEÓN

Laboratorio de plasticidad neuronal y neuroreparación

Prof. Dr. Eduardo Weruaga Prieto

Prof. Dr. David Díaz López

EDUARDO WERUAGA PRIETO DNI 10076566J y DAVID DÍAZ LÓPEZ DNI 71504866M,  
Catedrático y Profesor Titular de la Universidad de Salamanca y ambos investigadores  
en el Instituto de Neurociencias de Castilla y León,

HACEMOS CONSTAR

QUE la Tesis Doctoral titulada “El lóbulo X del cerebelo: análisis génico y molecular de su  
resistencia a la degeneración neuronal del ratón PCD” ha sido realizada por **D. Carlos  
Hernández Pérez** DNI 70909757K, Graduado en Biología y Magíster en Neurociencias,  
bajo nuestra dirección.

QUE, en nuestra opinión, reúne todos los requisitos científicos y formales para ser  
defendida y optar así al título de Doctor en Neurociencias por la Universidad de  
Salamanca.

Para que así conste a quien convenga, todo ello lo firmamos en Salamanca, a veintisiete de  
junio de dos mil veintidós.

Fdo.: Eduardo Weruaga Prieto

Fdo.: David Díaz López



Aquí viene, una de las páginas más complicadas de escribir la Tesis y la que, posiblemente, va a ser la más leída de todas. Sé que habéis venido a ver si os he mencionado o no en los agradecimientos (lo siento si no es así), a mirar si me he puesto muy ñoño o simplemente estáis echando un vistazo porque el resto del libro os parece muy aburrido. De todas formas, si habéis dedicado un segundo de vuestro tiempo a leer hasta aquí, os lo agradezco.

Durante el transcurso de mi doctorado siempre me han dicho que lo he llevado con mucha tranquilidad y con muy buen humor. El motivo es simple, la gente que me ha rodeado tanto dentro como fuera del laboratorio me ha apoyado incondicionalmente y ha facilitado que el proceso de escribir una Tesis sea lo más liviano posible; por ello, os doy las gracias.

En primer lugar, debo agradecerles al Dr. Eduardo Weruaga y al Dr. David Díaz su dirección y, aunque no firme este documento, al Dr. Alonso también, puesto que me ha ayudado como a uno más de sus doctorandos. Para mí no han sido solo directores, han sido compañeros de trabajo. De ellos he aprendido a trabajar con rigor, constancia y humildad. Les agradezco sus ánimos, sus broncas y sus reflexiones; todo ello me ha ayudado a mejorar como persona y como investigador, no lo olvidaré nunca.

A mis colegas de laboratorio, gracias por aguantar mis bromas y chistes malos, aunque os quejaseis estoy seguro de que los habéis disfrutado. Tanto a los que os habéis ido, como a los que seguís en el laboratorio: ¡no os podré olvidar nunca! Sois la clave para que el laboratorio tenga un ambiente tan positivo y los descansos con vosotros hacen que merezca la pena ir a trabajar cada día. No os podéis imaginar lo que voy a echar de menos que me interrumpáis mientras escribo en la salita (la *llojería*).

Al resto de profesores del Departamento de Biología Celular y Patología, con quienes he tenido el gusto de colaborar en las clases. Con este magnífico equipo de docentes he podido reafirmar mi gusto por la docencia, gracias.

Todo el trabajo de biología molecular de este documento se lo debo al laboratorio de la Dra. Verónica González Núñez y al Dr. Andrés Ángel Calderón García, sin vosotros esta Tesis no habría sido posible. Andrés, gracias por todos los ratos que hemos pasado juntos y por compartir tanto tus conocimientos de *Western Blot* como tus combinaciones raras de bocadillos.

A quien vio nacer este proyecto de vida: a todos mis compañeros del Máster en Neurociencias; ese curso fue inolvidable y me permitió conocer a gente extraordinaria. En especial a Alicia, mi compañera de penurias en el doctorado, te aseguro que ha sido un placer apoyarte y escucharte; lo haría todo el tiempo que necesitases. A Sofía y Michu, que habéis convertido los últimos años de Tesis en una aventura increíble, espero seguir viviéndola mucho más tiempo. A Ana, porque no hiciste más fácil solo el Máster, sino el Grado de Biología también, el tiempo y la distancia no reducen el aprecio que te tengo. A Belén, Rubén, Sandra y, por último, a Paloma (*falto yo...*), que siempre estaba dispuesta a conducir 600 km para pasar un fin de semana juntos.

A mis amigos Edu, Juli, Saúl, Víctor y Alejandra. Sois mi válvula de escape, aunque este agradecimiento sea breve, os aseguro que tenéis un papel clave en el mantenimiento de mi salud mental, para bien o para mal lo elegís vosotros.

A toda mi familia, siento no poder poner todos vuestros nombres, gracias por haberos preocupado de que estuviese bien y haberme apoyado incondicionalmente. En especial, a mis abuelos, los que están y los que no, ojalá pudiese disfrutar este momento tan especial con todos vosotros.

Y por último, y quizás más importante, a mis padres, a Sheila y como no podía faltar, a Leia (aunque no pueda leerlo). A mis padres, os lo agradezco todo, sin vosotros sí que no sería posible haber llegado donde estoy. Soy quien soy gracias a vuestro amor y a vuestros cuidados, todas las felicitaciones que reciba por esta Tesis os corresponden a vosotros. No podríais haberlo hecho mejor como padres. Y a Sheila, la primera línea de batalla ante desesperaciones, noches sin dormir y el estrés que supone todo este trabajo. Si alguien ha evitado que no me rinda durante este proyecto has sido tú, deseo seguir abriendo y cerrando etapas contigo. Eres la mejor maestra que conozco.



# Índice



<b>ABREVIATURAS</b>	3
<b>INTRODUCCIÓN</b>	6
<b>EL CEREBELO</b>	7
<i>Tipos celulares y circuitos cerebelosos</i>	9
<i>Regiones de la corteza cerebelosa</i>	11
<i>Patologías cerebelosas</i>	13
<b>MODELOS DE DEGENERACIÓN CEREBELOSAS</b>	14
<i>Modelo Leiner</i>	14
<i>Modelo Toppler</i>	15
<i>Modelo Robotic</i>	15
<i>Modelo Shaker</i>	16
<i>Modelo Lurcher</i>	17
<i>Modelo NPC1</i>	18
<b>EL MODELO PCD</b>	19
<i>Modificaciones en el citoesqueleto</i>	22
<i>Glutamilación y desglutamilación del citoesqueleto</i>	24
<i>Gen Ccp1</i>	27
<b>PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO</b>	29
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	33
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	37
<b>GENOTIPADO DE ANIMALES</b>	39
<i>Extracción de DNA</i>	39
<i>Amplificación del DNA</i>	39
<b>ANÁLISIS HISTOLÓGICO</b>	40
<i>Obtención del tejido</i>	41
<i>Inmunohistoquímica (fluorescencia)</i>	41
<i>Controles de especificidad</i>	42
<i>Recuento celular</i>	43
<i>Inmunohistoquímica (DAB) y tinción con toluidina</i>	43
<i>Disección del lóbulo X y control de la técnica</i>	44
<b>ANÁLISIS GÉNICO</b>	45
<i>Extracción de RNA</i>	45
<i>Retrotranscripción</i>	46
<i>PCR cuantitativa</i>	47
<i>Análisis de datos</i>	52

<b>ANÁLISIS PROTEICO</b>	52
<i>Extracción de proteínas</i>	53
<i>Cuantificación de proteínas: método de Bradford</i>	53
<i>Electroforesis en gel de poliacrilamida y transferencia</i>	53
<i>Incubación</i>	54
<i>Revelado</i>	54
<i>Desnudamiento de las membranas</i>	55
<i>Cuantificación</i>	55
<b>RESULTADOS</b>	57
<b>EL LÓBULO X DEL RATÓN PCD RESISTE MÁS TIEMPO LA DEGENERACIÓN NEURONAL Y EXPRESA MÁS HSP25 QUE EL DE LOS ANIMALES SILVESTRES</b>	59
<b>PKC-<math>\delta</math> Y HSP25-P SE EXPRESAN MÁS EN EL LÓBULO X DE LOS RATONES PCD QUE EN EL DE LOS RATONES CONTROL</b>	63
<b>ALGUNAS CÉLULAS DE PURKINJE NO EXPRESAN CALBINDINA EN LOS RATONES PCD</b>	66
<b>DISECCIÓN DEL LÓBULO X Y CONTROL DE LA TÉCNICA</b>	68
<b>PATRÓN DE EXPRESIÓN GÉNICO A LO LARGO DEL TIEMPO EN CONTROLES</b>	68
<b>DIFERENCIAS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DE Ccp1, Ccp4, Ccp6 Y Ttll1 EN CONTROLES</b>	71
<b>DIFERENCIAS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DE Ccp4, Ccp6 Y Ttll1 EN LOS RATONES PCD</b>	74
<b>DIFERENCIAS DE EXPRESIÓN EN Ccp4, Ccp6 Y Ttll1 ENTRE RATONES PCD Y CONTROLES</b>	76
<b>ANÁLISIS PROTEICO DE CCP1, CCP6 Y TTLL1</b>	78
<b>DISCUSIÓN</b>	81
<b>SOBRE LA EXPRESIÓN DE Ccp1, Ccp4, Ccp6 Y Ttll1 EN EL CEREBELO DEL RATÓN</b>	83
<i>Sobre Ccp1</i>	83
<i>Sobre Ccp4</i>	86
<i>Sobre Ccp6</i>	87
<i>Sobre Ttll1</i>	89
<b>CONSECUENCIAS DE LA MUTACIÓN PCD SOBRE EL ESTABLECIMIENTO SINÁPTICO</b>	91
<b>FACTORES NEUROPROTECTORES EN EL LÓBULO X: HSP25 Y SU VERSIÓN FOSFORILADA</b>	92
<i>Sobre la expresión de HSP25 en el lóbulo X</i>	93
<i>Sobre la expresión de PKC-<math>\delta</math> y HSP25-P en el lóbulo X</i>	94
<b>¿POR QUÉ EL LÓBULO X ES DISTINTO AL RESTO DE LÓBULOS?</b>	97
<b>CONCLUSIONES</b>	101
<b>ANEXO I: SOLUCIONES DE USO COMÚN</b>	105
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	109

## Abreviaturas



**AGTPBP1:** proteína de unión a ATP/GTP 1 (del inglés *ATP/GTP binding protein*)

**C<sub>T</sub>:** ciclo umbral (del inglés *threshold cycle*).

**CCP:** carboxipeptidasa citosólica (del inglés *cytosolic carboxypeptidase 1*).

**CSAP:** proteína asociada a los cilios y el huso (del inglés *cilia and spindle-associated protein*)

**DAB:** diaminobencidina

**DAPI:** 4', 6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato.

**dNTP:** desoxinucleótidos trifosfato (

**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético (del inglés *ethylenediaminetetraacetic acid*).

**ENU:** N-etil-N-nitrosourea

**GAPDH:** gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

**HRP:** peroxidasa de rábano (del inglés *horseradish peroxidase*)

**HSP:** proteína de choque térmico (del inglés *heat shock protein*).

**NNA1:** proteína 1 nuclear del sistema nervioso inducida por axotomía (del inglés *neuronal nuclear protein induced by axotomy 1*)

**PB:** pares de bases

**PB:** tampón fosfato (del inglés *phosphate buffer*)

**PBS:** tampón fosfato salino (del inglés *phosphate buffered saline*)

**PCD:** degeneración de las células de Purkinje (del inglés *Purkinje cell degeneration*)

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa (del inglés *polymerase chain reaction*)

**qPCR:** reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (del inglés *quantitative polymerase chain reaction*)

**SDS:** dodecilsulfato sódico (del inglés *sodium dodecyl sulfate*)

**SHSP:** proteínas de choque térmico pequeñas (del inglés *small heat shock protein*)

**TBS:** tampón Tris salino (del inglés *tris buffered saline*)

**TBS-T:** tampón Tris salino con Tween (del inglés *tris buffered saline Tween*)

**TR1:** hace referencia a la pareja de oligonucleótidos específicos al transcrito mayor del gen *Ccp1*

**TRTOT:** hace referencia a la pareja de oligonucleótidos específicos a los transcritos totales del gen *Ccp1*

**TTL:** del inglés *tubulin tyrosine Ligase*

**TLL1:** del inglés *tubulin tyrosine ligase like*

# Introducción

En los países desarrollados, con una esperanza de vida muy larga, las patologías de carácter neurodegenerativo son cada vez más frecuentes. Ello es debido a que la edad es su factor de riesgo principal (Hou et al., 2019). Este tipo de enfermedades suelen tener en común la pérdida progresiva de poblaciones neuronales de naturaleza diversa. Así, una de las múltiples formas de clasificarlas es en función de sus manifestaciones clínicas: trastornos del movimiento, de la cognición o del comportamiento. Sin embargo, pocos pacientes presentan síntomas puros y a menudo aparecen signos patológicos diversos (Dugger y Dickson, 2017).

Las enfermedades neurodegenerativas resultan tremendamente diversas y el planteamiento de su estudio depende enormemente de su etiología, los tipos celulares, los circuitos implicados, etc. Hoy en día, este tipo de enfermedades son incurables y la comunidad científica está volcada en la búsqueda de medios para mejorar su pronóstico. Una herramienta muy potente para ello son los modelos animales: los modelos *in vivo* son un paso fundamental en el entendimiento de los procesos patológicos y el desarrollo de fármacos (Kari et al., 2007), y son fundamentales para los que actúan sobre el sistema nervioso.

Precisamente, en la presente Tesis Doctoral se usa un modelo murino de degeneración neuronal, el ratón *Purkinje Cell Degeneration* (PCD). Como veremos, este es un animal que sufre una mutación en el gen *Ccp1*, lo que provoca la muerte de las células de Purkinje del cerebelo, entre otros tipos celulares. Con este animal se pretende conocer qué sucede durante el proceso degenerativo que sufre el cerebelo a nivel génico y proteico. Por otro lado, también buscamos conocer cuáles son los patrones normales de expresión génica del cerebelo, y de este modo poder entender qué sucede durante su alteración en el modelo con la mutación.

En las enfermedades neurodegenerativas es frecuente el estrés celular. Ante este las células expresan diversos factores neuroprotectores propios, como pueden ser las proteínas de choque térmico. Por lo tanto, otro objetivo de la Tesis Doctoral es el estudio específico de las proteínas de choque térmico en nuestro modelo animal.

Comenzaremos esta Tesis haciendo una introducción de nuestro órgano de estudio, el cerebelo, para más adelante presentar diversos modelos de neurodegeneración cerebelosa, entre ellos, el ratón PCD. Una vez presentado nuestro animal, estudiaremos su gen mutado, el gen *Ccp1* y su influencia sobre la dinámica del citoesqueleto y la supervivencia neuronal. Finalmente, hablaremos de las proteínas de choque térmico y, en concreto, sobre HSP25 y sus modificaciones postraduccionales.

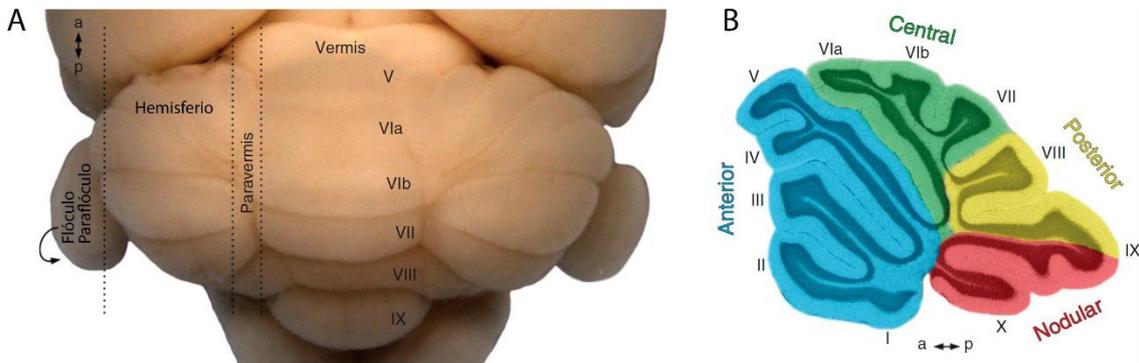
## El cerebelo

El término cerebelo deriva del vocablo latino *cerebellum*, que significa “cerebro pequeño”, debido a que inicialmente se consideraba que este era un añadido más pequeño del cerebro principal, ya que este órgano solo representa el 10% del peso total del encéfalo. Su localización marginal a los distintos centros y vías nerviosas ha llevado a pensar tradicionalmente que su papel es únicamente de coordinación y refinamiento del control motor (Lisberger y Thach, 2013).

Macroscópicamente en el cerebelo de los mamíferos y aves se pueden observar varias estructuras con facilidad (**Fig. 1**): en la zona más central y en todo su plano sagital encontramos el **vermis**, y en sus laterales se sitúan los **hemisferios cerebelosos**. De los hemisferios salen dos pequeñas estructuras llamadas **flóculos** y **paraflóculos** y, por último, toda la estructura cerebelosa se une al encéfalo mediante los **pedúnculos cerebelosos** (Voogd y Glickstein, 1998).

## Introducción

La corteza cerebelosa es muy extensa y, pero ocupa un tamaño muy reducido. Ello se debe a que presenta numerosas circunvoluciones o *folia*, que, a diferencia de otras estructuras del sistema nervioso central, atraviesan la línea media sin interrupción y son perpendiculares al plano sagital (Delgado-García, 2001). A su vez, estas *folia* se agrupan en lóbulos cuyas separaciones se denominan fisuras. En aves y mamíferos se pueden distinguir en la parte más central hasta 10 lóbulos (**Fig. 1**), que se enumeran con numeración romana del I al X rostrocaudalmente (Lisberger y Thach, 2013).



**Figura 1. Cerebelo de un ratón adulto y sección sagital del vermis.** (A) Cerebelo visto desde su zona dorsal, en el que se pueden distinguir las tres regiones principales de izquierda a derecha: paraflóculo, hemisferio y vermis. En el vermis, visto desde su parte dorsal, se observan desde la zona anterior a la posterior solo los lóbulos V al IX. (B) Vermis cortado sagitalmente que permite distinguir las 4 regiones cerebelosas principales en sentido anteroposterior: anterior, central, posterior y nodular. A su vez podemos ver estas regiones divididas en los 10 lóbulos cerebelosos, identificados con numeración romana. Modificado de White y Sillitoe, 2013.

Esta disposición en lóbulos nos permite distinguir las distintas regiones cerebelosas. Empezando con la más primitiva de todas, nos encontramos el **arquicerebelo** o **vestibulocerebelo**, asociado a la zona floculonodular (lóbulo X y flóculos cerebelosos). Equivale a la única *folia* que presentan los vertebrados más primitivos, recibe aferencias vestibulares y visuales, y proyecta a los núcleos vestibulares, lo que coincide con su participación en el equilibrio, reflejos vestibulares y movimientos oculares. Después nos encontramos con el **paleocerebelo** o **espinocerebelo**, comprendido por el vermis (lóbulos I-IX) y parte de los hemisferios. El segundo de sus nombres se debe a que recibe aferencias somatosensoriales y propioceptivas de origen espinal, y proyecta hacia vías descendentes que controlan la musculatura axial, a lo que se vincula su función. Finalmente, en la filogenia nos encontramos el **neocerebelo** o **cerebrocerebelo**, que alcanza su mayor desarrollo en los primates, y corresponde a los grandes hemisferios laterales del cerebelo. Sus aferencias principales proceden de la corteza cerebral y, a su vez, sus eferencias regresan a las zonas motora, premotora y prefrontal de la corteza. De todas sus funciones, parece que la más conocida es la planificación y ejecución de movimientos finos y precisos (Brooks y Thach, 2011).

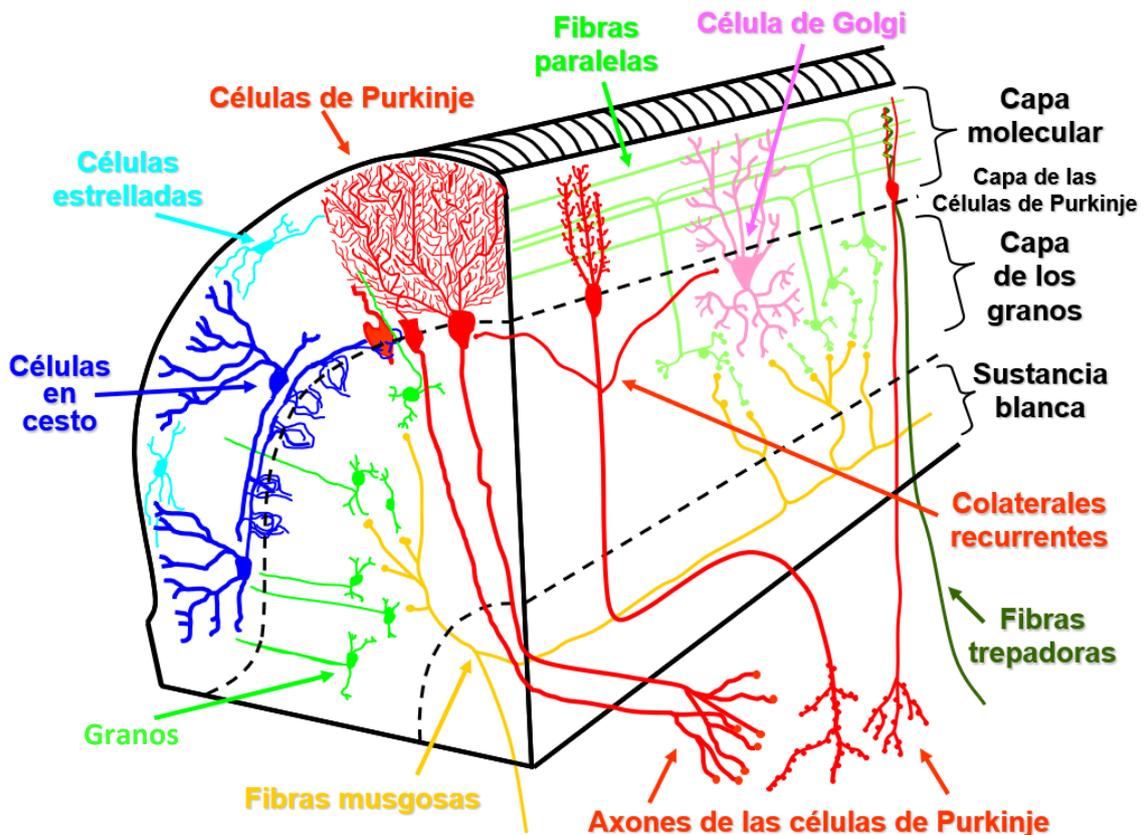
Aunque se sabe que las funciones del cerebelo están claramente involucradas en el control motor, recientemente se comenzó a sospechar que este órgano podría estar implicado en el control cognitivo o emocional (Galliano et al., 2013). Estas sospechas comenzaron de mano de la electrofisiología, puesto que se comprobó que la activación del núcleo fastigial activaba neuronas del hipocampo y viceversa (Newman y Reza, 1979). Más tarde, con las nuevas técnicas de imagen se pudo comprobar la activación de distintas regiones cerebelosas durante distintas tareas afectivo/cognitivas (Petersen et al., 1988). Por lo tanto, del mismo modo que el cerebelo tiene funciones afectivo/cognitivas, como se detallará más adelante, se ha comprobado la existencia de alteraciones y patologías cerebelosas no motoras, como en el caso del autismo o la esquizofrenia.

### Tipos celulares y circuitos cerebelosos

La organización celular de la corteza cerebelosa es llamativa, ya que sus neuronas se encuentran en una disposición y conectividad muy bien conservada desde los vertebrados más primitivos, y que se repite con poca variación (**Fig. 2**). La corteza se encuentra dividida en 3 capas que, desde la parte más interna a la más externa, se denominan capa de los granos, capa de las células de Purkinje y capa molecular (**Fig. 2**).

La **capa de los granos** se denomina así debido al elevado número de células que la componen, denominadas **células granulosas** o **granos**, de tamaño reducido y con un núcleo que se tiñe con mucha intensidad; estas células son el tipo neuronal más abundante del encéfalo. También podemos encontrar otros tipos celulares como las células de Golgi, interneuronas de un tamaño mayor que los granos, y otros dos tipos celulares menos conocidos, como las células de Lugaro o las células en cepillo (Sillitoe y Joyner, 2007). Las últimas, curiosamente, solo se encuentran en los lóbulos I, IX y X en los mamíferos (Mugnaini et al., 1997).

La **capa de las células de Purkinje**, como su nombre indica, está formada por los somas de las células de Purkinje. Los axones de estas neuronas se dirigen hacia los núcleos cerebelosos profundos a través de la capa de los granos y sus árboles dendríticos se extienden por la capa molecular. Las células de Purkinje son uno de los tipos celulares más grandes del encéfalo y constituyen las únicas neuronas eferentes de la corteza cerebelosa. En esta capa podemos encontrar además las células en candelabro (Allin et al., 2001) y los somas de la glía de Bergmann

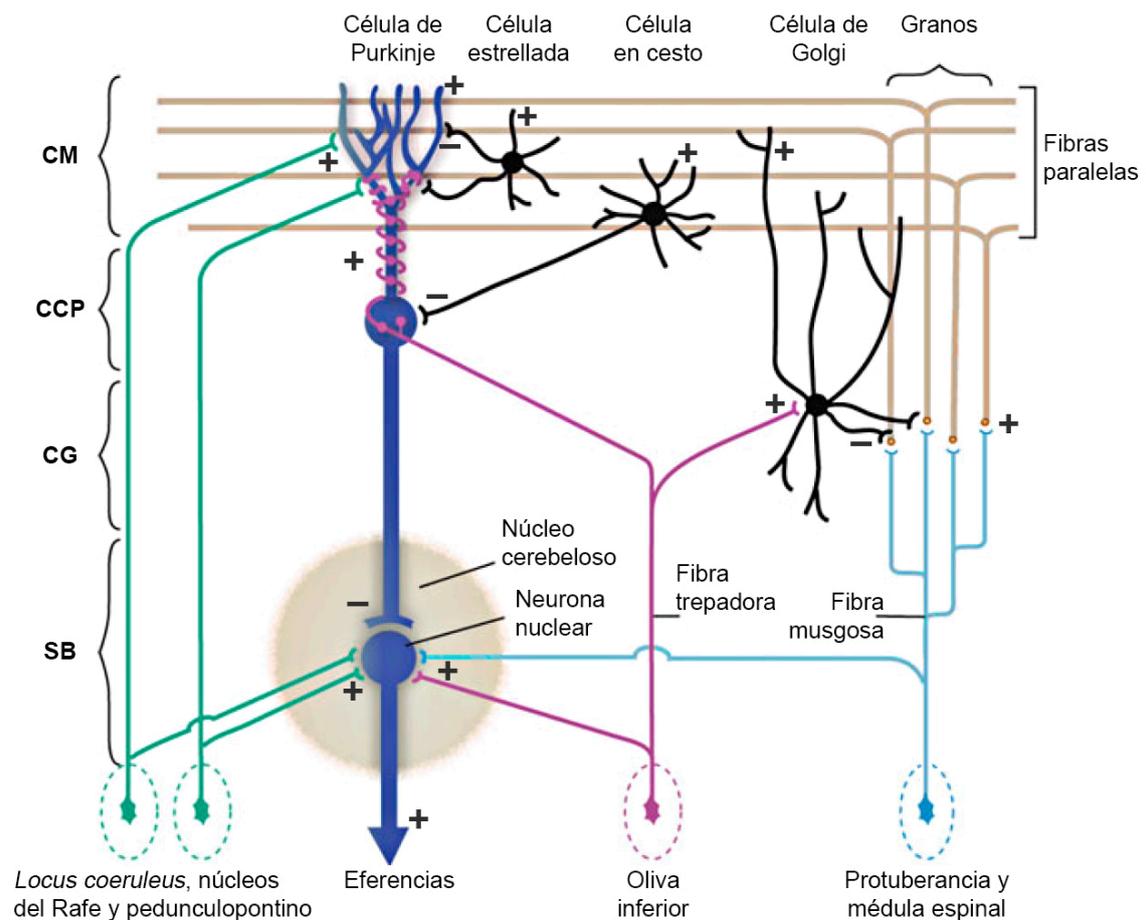


**Figura 2. Estructura de la corteza cerebelosa.** En la parte más externa nos encontramos la capa molecular, compuesta por las dendritas de las células de Purkinje, junto a las células en cesto y las células estrelladas, además de los axones de los granos (fibras paralelas) y las fibras trepadoras. Contigua a esta capa nos encontramos la capa de las células de Purkinje, formada por los somas de dichas células. Hacia el interior de la corteza cerebelosa se encuentra la capa de los granos, constituida por los granos y otras interneuronas, como las células de Golgi. Modificado de Recio 2008.

(Voogd y Glickstein, 1998). Este último tipo celular está relacionado con la glía radial y se encarga de guiar a las células de Purkinje y a los granos a su posición final (Levitt y Rakic, 1980).

La capa más externa es la **capa molecular**. En ella podemos encontrar las arborizaciones dendríticas de las células de Purkinje orientadas en un plano sagital de 500  $\mu\text{m}$  de extensión, aunque muy estrecho en el eje transversal. Aparte de dichas arborizaciones, aquí también podemos encontrar las células estrelladas, más hacia la superficie, y las células en cesto, hacia el interior. Además, la estructura repetitiva de la corteza cerebelosa se ve reforzada al comprobar que los árboles dendríticos de las células estrelladas y en cesto comparten la orientación del árbol dendrítico de las células de Purkinje (Voogd y Glickstein, 1998). Por último, en esta capa también podremos encontrar las fibras paralelas, que son los axones de los granos, que ramifican y contactan con cientos de células de Purkinje (White y Sillitoe, 2013).

La conectividad del cerebelo también se conoce con detalle (**Fig. 3**; Beckinghausen y Sillitoe, 2019): como hemos visto anteriormente, la información aferente puede llegar de la médula espinal, del tronco del encéfalo e incluso desde la corteza cerebral (Ito, 2006). La información llega principalmente a través del pedúnculo medio en forma de fibras musgosas y fibras trepadoras. Por un lado, las fibras musgosas llegan desde distintas regiones a la capa de los granos a unas estructuras denominadas glomérulos cerebelosos. Es aquí donde hacen sinapsis excitatorias sobre las dendritas de los granos en una relación de 1 fibra sobre 400-600



**Figura 3. Esquema básico de los circuitos cerebelosos.** En este esquema podemos diferenciar los principales tipos neuronales que encontramos en el cerebelo, además de las aferencias, compuestas por las fibras musgosas y las trepadoras, y las eferencias, que parten hacia los núcleos cerebelosos profundos. +, sinapsis excitatoria; -, sinapsis inhibitoria; CM, capa molecular; CCP, capa de las células de Purkinje; CG, capa de los granos; SB, sustancia blanca. Modificado de Miall 2013.

granos. En esta misma estructura, los axones de las células de Golgi hacen sinapsis inhibitorias sobre las dendritas de los granos (Barmack et al., 1992a, b). Por otro lado, las fibras trepadoras proyectan directamente a la capa molecular y contactan con las dendritas de las células de Purkinje en una relación 1:1 con cada célula. A su vez tanto fibras musgosas como trepadoras envían colaterales hacia las neuronas de los núcleos cerebelosos profundos (Voogd y Glickstein, 1998).

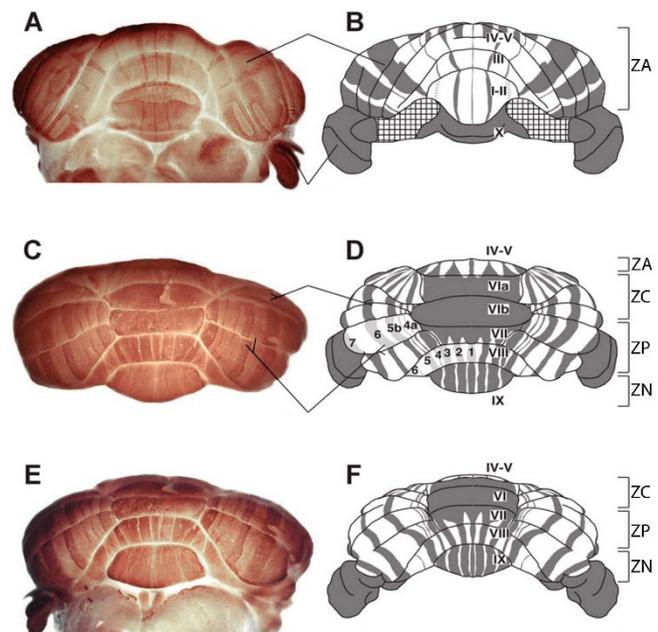
Los granos, por su parte, emiten sus axones a la capa molecular donde se ramifican y dan lugar a las fibras paralelas, estas fibras se extienden varios milímetros y contactan con cientos de células de Purkinje (White y Sillitoe, 2013). A su vez, las células estrelladas contactan con las dendritas de las células de Purkinje y las células en cesto con el soma de estas últimas (Miall, 2013).

Por último, las únicas fibras eferentes son las que parten de las células de Purkinje. De este modo, la información procesada en la corteza cerebelosa sale desde sus axones hasta los núcleos cerebelosos profundos, desde donde viaja a los centros motores en el tronco encefálico y a la corteza cerebral (Sillitoe y Joyner, 2007).

### Regiones de la corteza cerebelosa

El cerebelo es una estructura con patrones muy conservados a lo largo de la evolución que histológicamente parece uniforme y se ha clasificado tradicionalmente en un patrón de lóbulos (Larsell 1952). Sin embargo, detrás de esta uniformidad existen más parcelaciones en forma de bandas parasagitales (Hawkes, 1997; Voogd y Glickstein, 1998; Apps y Hawkes, 2009) como las que se pueden visualizar mediante el uso de determinados marcadores inmunocitoquímicos como *Zebrin II*, cuyo nombre se debe al patrón en bandas que presenta en su distribución por la corteza cerebelosa (Brochu et al., 1990).

Precisamente, gracias a estos patrones bandeados podemos distinguir las 4 regiones transversales que hemos visto anteriormente (**Fig. 1 y 4**): anterior (lóbulos I-V), central (VI-VII), posterior (VIII-IX) y nodular (X). El patrón de bandas consiste en grupos de células de Purkinje muy inmunorreactivas a *Zebrin II* y zonas con una inmunoreactividad menor, o nula. La zona anterior no presenta apenas células fuertemente positivas a *Zebrin II*; una mitad de las células de Purkinje de la zona posterior suelen marcarse intensamente con *Zebrin II* y la otra mitad no; y, por último, todas las células de Purkinje de las zonas central y nodular son muy positivas a esta proteína (Sarna et al., 2003). Esta

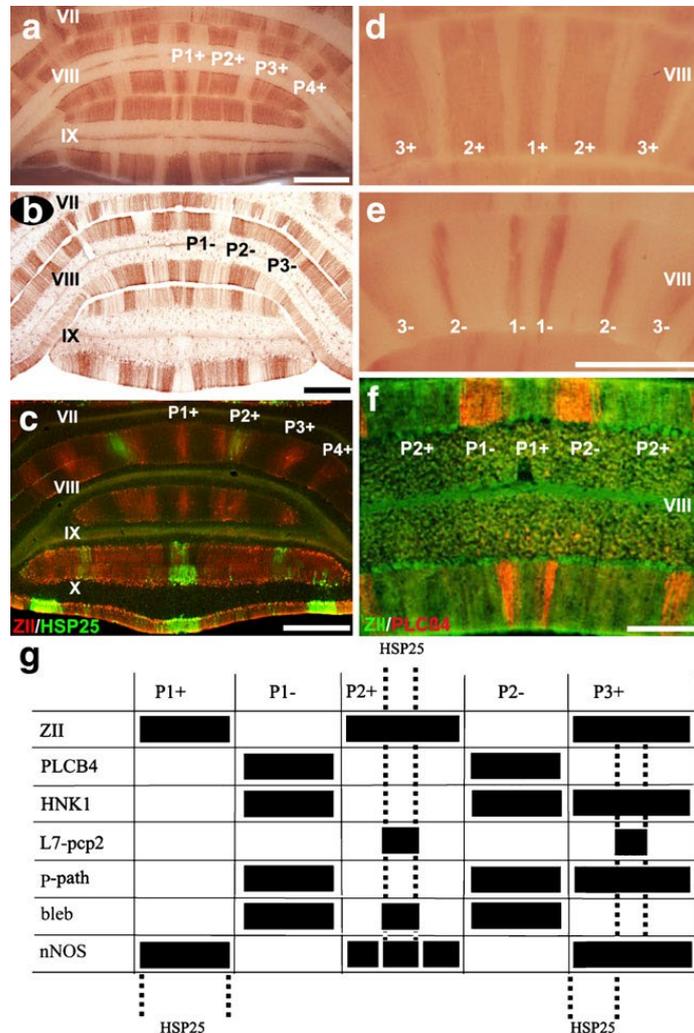


**Figura 4. Patrón de marcaje de *Zebrin II*.** A la izquierda en **A**, **C** y **E** se ven cerebelos *in toto* sobre los que se ha realizado una tinción inmunohistoquímica con peroxidasa para visualizar *Zebrin II*. A la derecha, en **B**, **D** y **F**, se ven los esquemas correspondientes a los tejidos tratados. En cada pareja de imágenes podemos observar cómo las distintas regiones del cerebelo tienen marcajes diferentes de *Zebrin II*: la zona anterior (ZA) no presenta apenas marcaje, en la zona posterior (ZP) suele haber la mitad de células positivas y la otra mitad negativas, y de las zonas central (ZC) y nodular (ZN) prácticamente todas las células de Purkinje son positivas a *Zebrin II*. Modificado de Sillitoe y Hawkes, 2002.

topografía cerebelosa se mantiene en el desarrollo prenatal y parece estable durante el desarrollo (Larouche et al., 2006; Marzban et al., 2007). Por último, aunque en este trabajo nos estamos centrando en las células de Purkinje, existen compartimentalizaciones similares con marcadores de granos (Hawkes y Turner, 1994; Ozol y Hawkes, 1997), interneuronas (Sillitoe et al., 2008; Chung et al., 2009), fibras musgosas (Armstrong et al., 2009) y fibras trepadoras (Voogd et al., 2003).

Además de *Zebrin II* en ratones, se conocen patrones de bandas parasagitales con otros marcadores y en múltiples especies, es por ello que en 2011 se realizó un estudio de colocalización de algunos de los marcadores más utilizados en más de 20 especies distintas, mamíferos y aves (Marzban y Hawkes, 2011). Este estudio se realizó concretamente sobre la zona postero-nodular del cerebelo debido a que en esta existía el mayor número de bandas positivas a *Zebrin II*. Después del trabajo se concluyó que el patrón de bandas estaba muy conservado en los distintos mamíferos y en parte de las aves. Con relación a los otros antígenos estudiados, pudieron comprobar que las bandas parasagitales que formaban sus marcajes en ocasiones eran coincidentes con las bandas de *Zebrin II* y en otras ocasiones eran positivas para las bandas que no expresaban *Zebrin II* de forma intensa. Otros marcajes, sin embargo formaban patrones mixtos en los que a veces coincidían con los marcajes de *Zebrin II* o no (Fig. 5; HSP25, como veremos más adelante).

En un tejido tan uniforme como es el cerebelo, hemos destacado esta heterogeneidad debido a que las distintas regiones que podemos diferenciar nos van a ayudar más tarde a distinguir otros patrones. Se detallará más adelante en otros apartados, pero se puede adelantar que estos patrones de expresión se encuentran también analizando otras proteínas, como son las proteínas de choque térmico. Lo



**Figura 5. Compartimentación de distintos antígenos en la zona posterior del cerebelo de ratón adulto.** En A nos encontramos *Zebrin II* marcada con inmunoprecipitación. En B está marcado un antígeno de células *Natural Killer* (HNK 1) con inmunoprecipitación. En C podemos ver una colocalización de HSP25 y *Zebrin II*. En D también podemos observar en detalle unas bandas de *Zebrin II*. En E se ha marcado una fosfolipasa (PLCβ4). En F se puede observar en detalle la colocalización de *Zebrin II* y de PLCβ4. Por último, en G se ha realizado un esquema en el que se representan los distintos marcajes en 5 zonas estipuladas en base a la expresión de *Zebrin* (P1+, P1-, P2+, P2- y P3+). Los lóbulos del cerebelo se indican con números romanos. Barras de escala 500 μm en A-C, 250 μm en D-E y 250 μm en F. Extraído de Marzban y Hawkes, 2011

más importante —puesto que está relacionado con los objetivos de la presente Tesis—, es que estas regiones también muestran vulnerabilidad selectiva ante la neurodegeneración.

### *Patologías cerebelosas*

Como ya hemos visto, las funciones del cerebelo son clave para el buen mantenimiento del equilibrio, la precisión y el ritmo de los distintos movimientos. Para finalizar este capítulo, veremos que las enfermedades cerebelosas suelen tener en común 4 síntomas relacionados con el movimiento: la hipotonía, la astasia, la abasia y la ataxia

El primero de ellos es la **hipotonía** o disminución del tono muscular. En humanos se detecta cuando después de provocar el reflejo patelar, la pierna de los afectados no vuelve a su sitio, sino que se balancea como un péndulo durante un breve tiempo. Otro ejemplo se puede observar al coger un bebé afectado por este problema: se siente como si se levantase un muñeco, ya que sus extremidades se mantienen extendidas y relajadas, mientras que un bebé con un tono normal suele tener los codos y las rodillas flexionados (Lisberger y Thach, 2013).

Los dos siguientes síntomas característicos son la **astasia** y la **abasia**. La primera de estas manifestaciones es la incapacidad de mantenerse vertical y la segunda hace referencia a la falta de coordinación al caminar. Los afectados suelen extender sus pies para tener más superficie de apoyo e intentar estabilizarse. Al desplazarse mueven las piernas de forma irregular y a menudo acaban cayéndose (Lisberger y Thach, 2013).

El cuarto y último síntoma es la **ataxia**. Consiste en una falta de coordinación en los movimientos que involucran varias extremidades. Los afectados tienen dificultad al iniciar este tipo de acciones, además de que una vez iniciado, el movimiento no es preciso y a menudo se excede o se queda corto. Este síntoma también es evidente durante los movimientos repetitivos, ya que carecen de regularidad (Bastian et al., 1996). La ataxia también se reconoce como un tipo de temblor al final de los movimientos. Los pacientes al querer cesar cualquier movimiento activan los músculos antagonistas dando lugar a una serie de correcciones erróneas que resultan en un temblor característico de las patologías asociadas al cerebelo (Bastian et al., 1996). La ataxia es tan característica en los casos de degeneración cerebelosa que la mayor parte de las veces se hace referencia solo a ella como síntoma de este tipo de daño neurológico.

Hasta aquí hemos hablado de los síntomas motores derivados de las patologías cerebelosas. Sin embargo, anteriormente hemos hablado de las implicaciones del cerebelo en las funciones cognitivas y afectivas. Un ejemplo claro sucede en el autismo: mediante técnicas de neuroimagen en pacientes con esta afección se ha comprobado que presentan alteraciones morfológicas y funcionales en el cerebelo. Se vio que dichas alteraciones estaban relacionadas con trastornos en comunicación y en la interacción social (Fatemi et al., 2002). Además de las técnicas de neuroimagen, estudios *postmortem* mostraron que estos pacientes tienen una población de células de Purkinje menor que personas sin esta afección (Palmen et al., 2004; White y Sillitoe, 2013). Por su lado, en los casos de esquizofrenia se ha podido comprobar también mediante técnicas de neuroimagen la existencia de alteraciones cerebelosas durante la realización de diversas tareas cognitivas (Levitt et al., 1999; Andreasen y Pierson, 2008; Picard et al., 2008). Para comprender mejor la relación entre las afecciones no motoras y el cerebelo, se han realizado estudios de comportamiento en animales con alteraciones cerebelosas. Sin embargo, debido a que muchas tareas cognitivas tienen una clara implicación motora, es muy complicado conocer el peso de cada función en estos trastornos.

### Modelos de degeneración cerebelosa

El factor perjudicial que provoca las distintas enfermedades neurodegenerativas suele ser uniforme en todo el sistema nervioso central, como puede ser una mutación, una toxina, envejecimiento, etc. Sin embargo, distintas poblaciones neuronales acaban degenerando ante estos factores mientras que otras son menos vulnerables y conservan sus funciones (Double et al., 2010). Con relación a esta vulnerabilidad selectiva, un tejido puede ser muy susceptible a ciertos factores neurodegenerativos y a su vez, puede no serlo ante otros factores distintos. Sin embargo, como veremos más adelante, existen regiones del sistema nervioso central que presentan una menor vulnerabilidad generalizada ante todos los factores neurodegenerativos que hemos citado; nos referiremos a este fenómeno como **resistencia** a la neurodegeneración o **neuroprotección**.

Precisamente, un ejemplo muy llamativo de resistencia a la neurodegeneración lo podemos encontrar en el cerebelo (Sarna y Hawkes, 2003). A pesar de la similitud de todas las células de Purkinje y de las estructuras repetitivas en su conectividad, la neurodegeneración no transcurre de forma uniforme en toda la corteza cerebelosa, dando lugar a patrones de degeneración que no solo se repiten en una patología concreta, sino en una gran diversidad de ellas (Chung et al., 2016). Anteriormente hemos hablado de la existencia de diferentes regiones con fenotipos neuroquímicos diferentes, como el detectado usando anticuerpos como *Zebrin II*. Además, mencionábamos que estas regiones estaban relacionadas con vulnerabilidades selectivas a la neurodegeneración. De este modo, se ha comprobado la existencia de un patrón común de neurodegeneración en función de la región cerebelosa: la zona anterior es la más sensible de todas, siendo generalmente la primera en degenerar; por otro lado, se puede encontrar una susceptibilidad intermedia en las áreas central y posterior; por último, la mayor resistencia de todas se encuentra en la región nodular, compuesta por el lóbulo X principalmente. Las enfermedades que muestran este patrón de vulnerabilidad anteroposterior son muy variadas. Algunas son derivadas de mutaciones, como ataxias espino-cerebelosas (Clark et al., 1997), déficit en saposina C, una de las causas de la enfermedad de Gaucher (Yoneshige et al., 2010), ataxia telangiectasia (Tavani et al., 2003), enfermedad de Niemann-Pick A/B y C (Sarna et al., 2001; 2003) o atrofia multisistémica (Kume et al., 1991). Otras pueden deberse a toxinas, como el alcohol (Torvik y Torp, 1986); hipoxia-isquemia (Biran et al., 2011); o incluso, el envejecimiento normal (Andersen et al., 2003). Para algunas de estas enfermedades existen modelos animales que las reproducen, como sucede con la enfermedad de Niemann-Pick C1 (NPC1), que manifiesta el mismo patrón de neurodegeneración que en los humanos. Además de en estas patologías, esta vulnerabilidad selectiva también se ha encontrado en modelos de roedores, como el ratón *Leaner* (Heckroth y Abbott, 1994), el ratón *Toppler* (Duchala et al., 2004), el ratón *Robotic* (Isaacs et al., 2003), la rata *Shaker* (Tolbert et al., 1995), el ratón *Lurcher* (Armstrong et al., 2011) o el ratón PCD, utilizado en la presente Tesis (Wang y Morgan, 2007).

No podemos detallar todos los modelos animales con ataxia cerebelosa y patrón de neurodegeneración anteroposterior debido a que la lista es demasiado larga. Sin embargo, ya que el modelo de nuestro estudio —el ratón PCD— existe debido a una mutación, a continuación detallaremos brevemente los modelos genéticos que hemos citado.

#### Modelo *Leaner*

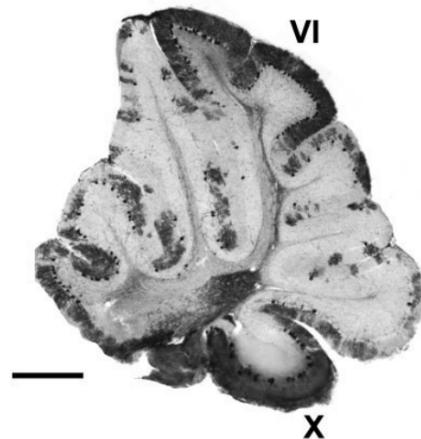
Para comenzar, tenemos el ratón mutante *Leaner*, cuya patología se debe a una mutación espontánea sobre la subunidad  $\alpha_{1A}$  de un canal de  $Ca^{2+}$ . La mutación es de tipo recesivo y provocada por una sustitución por cambio de base que resulta en la interrupción de la

transcripción del marco de lectura abierta, de modo que la expresión de la proteína se ve truncada y no es funcional (Doyle et al., 1997). La subunidad afectada se expresa mayoritariamente en las células de Purkinje, de modo que su déficit provoca en humanos migraña hemipléjica, ataxia episódica tipo 2 y ataxia espinocerebelosa tipo 6. A su vez, esta mutación es el origen de los ratones con fenotipo *Leaner*, que también sufren ataxia (Lorenzon et al., 1998).

Los ratones *Leaner* ya muestran ataxia cerebelosa a partir del décimo día postnatal (P10). Los análisis morfológicos realizados sobre el cerebelo de los ratones *Leaner* muestran que la degeneración afecta a los granos, a las células de Purkinje y a las células de Golgi, sobre todo en la zona anterior. El comienzo de la ataxia, a P10, coincide temporalmente con la degeneración de los granos, pero no es hasta P40 cuando comienza la pérdida de células de Purkinje (Herrup y Wilczynski, 1982). Por otro lado, se ha comprobado en este modelo un patrón en bandas con anticuerpos frente a una proteína ligante de calcio dependiente de vitamina D: las zonas anteriores presentan una menor expresión de la proteína estudiada y la zona nodular la mayor expresión de toda la corteza cerebelosa (Heckroth y Abbott, 1994). De nuevo, un patrón análogo al que nos encontrábamos con *Zebrin II* que a su vez coincide con que las zonas posterior y nodular en este modelo muestran una menor vulnerabilidad a la neurodegeneración que las zonas más anteriores.

### Modelo Toppler

El descubrimiento del ratón *Toppler* es relativamente reciente si lo comparamos con el de otros mutantes con degeneración cerebelosa: la primera vez que se describe este modelo fue en 2004 como resultado de una mutación espontánea en la cepa de ratones FVB (Duchala et al., 2004). Los ratones FVB se han criado durante muchas generaciones sin anomalías, pero en una camada de 4 crías se observó que estas comenzaron a presentar ataxia y posturas anormales a las 4-5 semanas de edad. Las crías se utilizaron como progenitores para otros cruces y se comprobó que su patología era hereditaria. Como sus afecciones eran motoras y posturales se sospechó que podía ser de origen bien cerebeloso o desmielinizante. Para comprobarlo, mediante estudios histológicos se pudo observar una pérdida evidente de células de Purkinje (Duchala et al., 2004). Lo llamativo de estos análisis fue que el número de células de Purkinje en los ratones *Toppler* a P30 se mantenía en el lóbulo X (Fig. 6), aunque su morfología era anormal. Siendo esta característica típica de las regiones más afectadas por la neurodegeneración (Duchala et al., 2004).



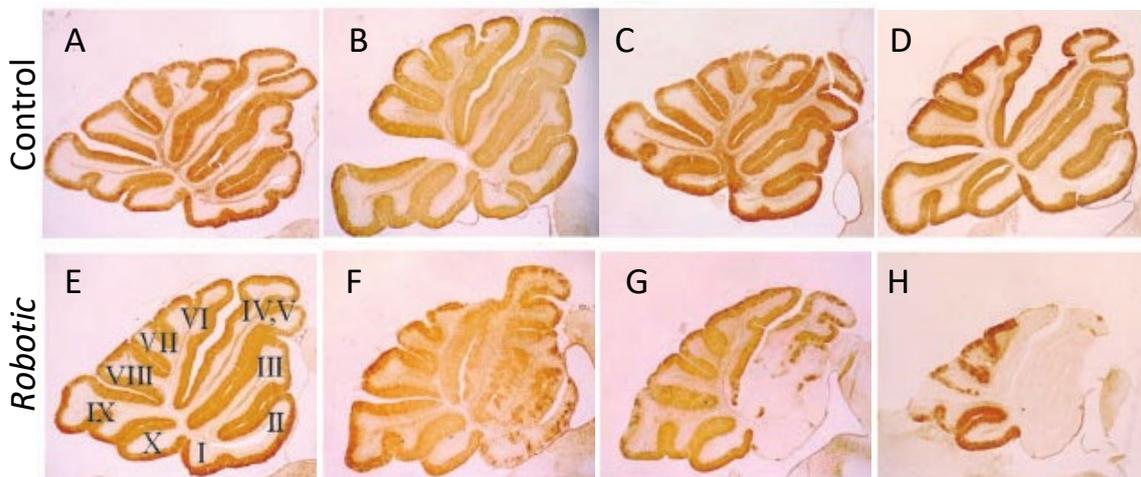
**Figura 6. Vermis cerebeloso del ratón *toppler* a P30.** En la imagen podemos observar como los únicos lóbulos que se mantienen visualmente intactos son el VI y el X. Barra de escala 50µm. Modificado de Duchala et al., 2004.

### Modelo Robotic

El origen del ratón *Robotic* es llamativo, en este caso tenemos un modelo mutante autosómico dominante, pero no es de origen espontáneo, sino inducido. Al igual que los otros modelos descritos, este presenta marcha atáxica y muestra pérdida de células de Purkinje al comienzo de la adultez. Además de la ataxia, el ratón *Robotic* murino desarrolla también cataratas (Isaacs et al., 2003).

Los ratones mutantes son una herramienta importantísima a la hora de entender las funciones de distintos genes en mamíferos, y una de las vías para desarrollarlos es usando un mutágeno: en el caso del *Robotic*, a ratones C3Heb/Fej macho se les inyectó el mutágeno N-etil-N-nitrosourea y se pusieron en cruce con hembras de la misma cepa. Las crías resultantes se estudiaron en busca de patologías dominantes o codominantes y estas se volvieron a cruzar para buscar patologías recesivas (Hrabé de Angelis et al., 2000). De este experimento surgió el ratón *Robotic*, y después de mapear su genética se comprobó que su patología se debía a una mutación sin sentido -una sustitución de bases que da lugar a un codón de terminación- en el gen *Af4* (Isaacs et al., 2003). Inicialmente, hablamos de que el origen de este modelo era llamativo, no solo porque nos encontramos ante un modelo inducido por mutagénesis química, sino por el gen implicado. *Af4* es un gen implicado en la leucemia y, aunque no se conoce en profundidad la relación entre el gen y la enfermedad, sí se ha visto que los ratones *knock-out* para *Af4* tienen un desarrollo anómalo de los linfocitos B y T (Isnard et al., 2000). Con relación a la función del gen, sabemos que la proteína resultante pertenece a una familia de cofactores de transcripción que en la leucemia infantil se suele encontrar translocada (Bitoun y Davies, 2009).

Para estudiar la relación entre *Af4* y la neurodegeneración se realizaron varios estudios en los que comprobaron que *Af4* se expresaba mayoritariamente en las células de Purkinje de modo que su forma truncada en los ratones *Robotic* se acumulaba y daba lugar a la neurodegeneración. Por otro lado, para comprobar cómo progresaba la pérdida neuronal mediante técnicas inmunohistoquímicas se analizó la expresión de calbindina en cortes coronales y sagitales del cerebelo. Una vez más, se volvió a observar un patrón de bandas, al igual que sucedía con *Zebrin II* y otras proteínas ligantes de calcio en otros modelos. Por su lado, en los cortes sagitales se pudo observar la progresión anteroposterior de la neurodegeneración: las regiones anteriores degeneran mucho antes que la zona nodular y posterior (**Fig. 7**).



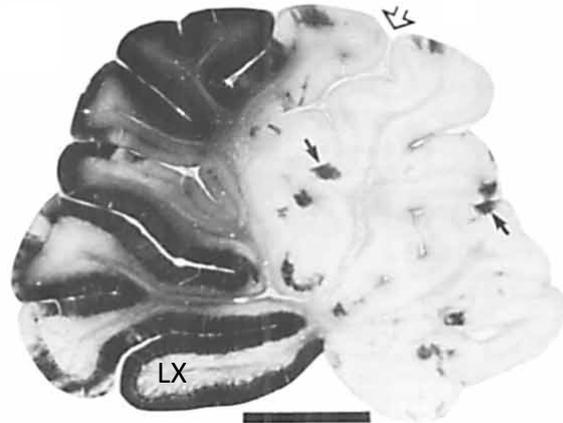
**Figura 7. Progresión de la pérdida de células de Purkinje en el cerebelo del ratón *robotic*.** (A-D) secciones de cerebelo a 3 (A), 10 (B), 20 (C) y 42 (D) semanas de edad en controles. Respectivamente en (E-H) se ven las mismas edades en secciones de ratón *robotic*. La neurodegeneración comienza a las 10 semanas en los lóbulos anteriores y el lóbulo X se mantiene aparentemente intacto a las 42 semanas en el modelo mutante. Modificado de Isaacs et al., 2003.

### Modelo *Shaker*

En este caso en vez de un ratón nos encontramos con un modelo de rata. La rata *Shaker* se describe por primera vez como un modelo hereditario que no está ligado al sexo y que con la edad desarrolla una ataxia muy pronunciada. Al estudiar la causa de este trastorno se comprobó

una ausencia de células de Purkinje, sobre todo en los lóbulos anteriores que, concretamente, eran un 52% más pequeños en las ratas *Shaker* que en las control (La Regina et al., 1992).

Unos años más tarde de la primera publicación, con la 5ª y 6ª generación de las ratas originales se publicaron dos artículos paralelos: en uno se hicieron estudios de comportamiento (Wolf et al., 1996) y en el otro se marcaron secciones de cerebelo con calbindina mediante inmunoprecipitación (Tolbert et al., 1995). En el primer artículo citado se comprobó que había dos variantes en la patología de la rata *Shaker*, una que se traduciría como leve y otra como fuerte. La variante leve correspondía al 77% del total de ratas y eran aquellas que solo presentaban ataxia; por otro lado, la variante fuerte constituía el 23% restante y presentaban ataxia y un temblor en todo el cuerpo a los 3 meses de edad. Además, las ratas *Shaker* leves nunca desarrollan el temblor característico de las *Shaker* fuertes (Wolf et al., 1996). Por otro lado, el segundo artículo analiza la distribución de las células de Purkinje a distintas edades y comprueba a los 11 meses de edad lo que ya hemos visto en los modelos anteriores: una pérdida anteroposterior de células de Purkinje en los lóbulos I al IX, pero del lóbulo X se dice textualmente que “parece similar al de las ratas normales” (Fig. 8; Tolbert et al., 1995)



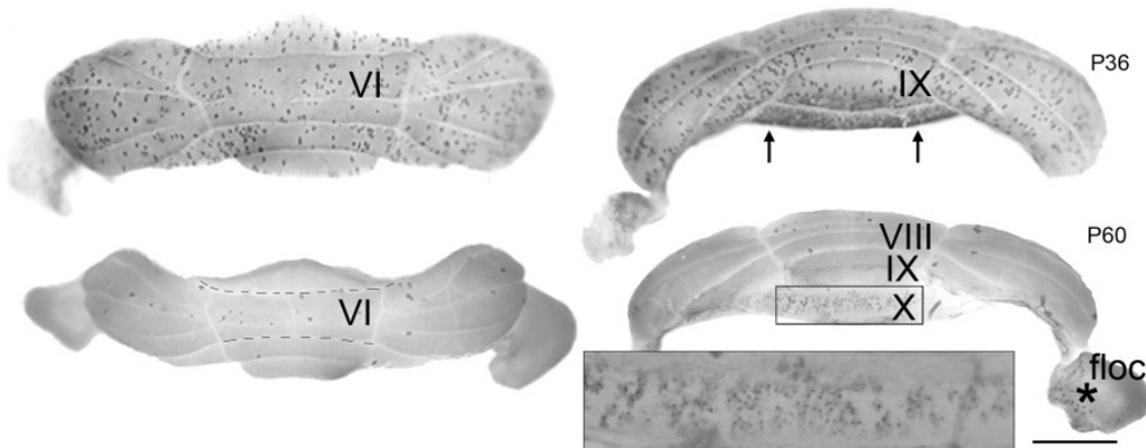
**Figura 8. Marcaje de calbindina en vermis de rata *Shaker* variante fuerte.** Arriba, la flecha vacía señala la fisura que separa los lóbulos anteriores (derecha) del resto (izquierda). Se puede observar como la neurodegeneración progresa de las zonas anteriores a las posteriores y el último lóbulo, el X, se mantiene intacto. Barra de escala 1 mm. LX, lóbulo X. Modificado de Tolbert 1995).

### *Modelo Lurcher*

El modelo *Lurcher* es un modelo de degeneración cerebelosa causado por una mutación que se describió por primera vez en 1960 (Phillips, 1960). Los mutantes heterocigotos *Lurcher* (+/*Lc*) sufren la pérdida de todas las células de Purkinje —entre otros tipos celulares— desde P10 a P65, lo que provoca la pérdida de funcionalidad del cerebelo. La mutación *Lurcher* en homocigosis es letal: los embriones se desarrollan aparentemente normales, pero las crías mueren a los pocos días de nacer debido a que son incapaces de mamar (Cheng y Heintz, 1997).

Se sabe que este modelo murino posee una mutación por cambio de base en el receptor para glutamato  $\delta 2$  y que esto provoca que el receptor se comporte como un pequeño canal de  $\text{Ca}^{2+}$ , función hipotéticamente perdida durante el proceso evolutivo (Vogel et al., 2007). Los mecanismos de muerte en las células de Purkinje son variados: necróticos, autofágicos, apoptóticos, excitotoxicidad por niveles más elevados de glutamato o derivados de altos niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  (Vogel et al., 2007). Sin embargo, aunque se han descrito diversos mecanismos de muerte celular, en realidad no se conoce el mecanismo exacto por el que mueren las células de Purkinje (McFarland et al., 2007).

Por otro lado, lo que sí se conoce con claridad es el proceso degenerativo que sufre. La neurodegeneración del ratón *Lurcher* comienza en torno a la segunda semana postnatal en toda la extensión del cerebelo. Sin embargo, a P25-P36 esta muerte celular se acelera en la zona anterior (lóbulos I al V) y después en las zonas central y posterior (lóbulos VI al VII y VIII al IX, respectivamente). Es por este motivo que la neurodegeneración de la zona nodular (lóbulo X) queda algo retrasada con respecto al resto de regiones (**Fig. 9**). Además, paralela a esta neurodegeneración selectiva se ha descrito la existencia de bandas de expresión parasagital de la proteína de choque térmico HSP25 en las células de Purkinje supervivientes (Duffin et al., 2010).

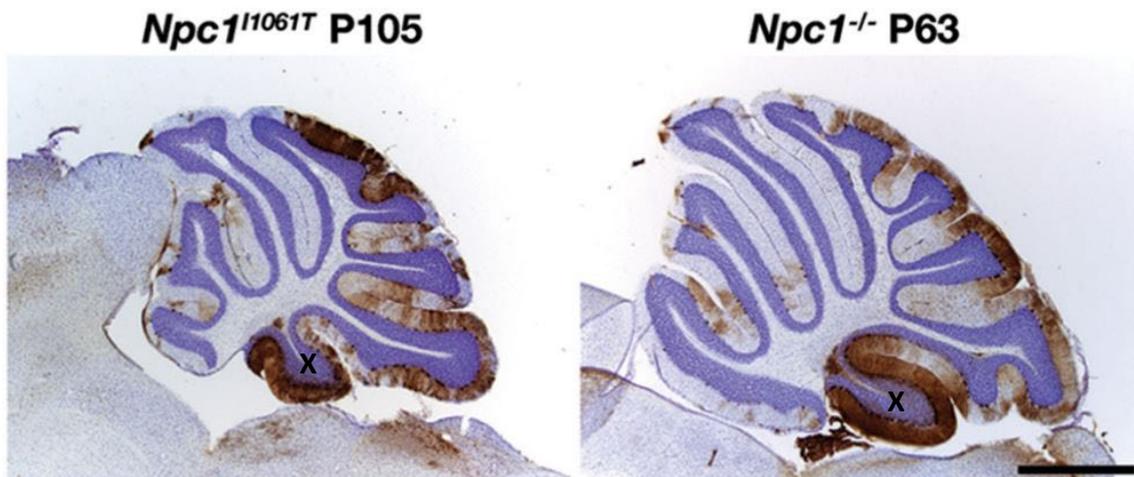


**Figura 9.** Cerebelos *in toto* con marcaje de calbindina de un ratón *Lurcher* a P36 (superior) y a P60 (inferior). En las imágenes de la izquierda se visualizan cerebelos desde su parte superior (izquierda) y posterior (derecha). El patrón punteado que se observa a P36 es debido a que solo quedan unas pocas células de Purkinje repartidas por el cerebelo; en el lóbulo IX y X (debajo del IX) se observa una densidad mayor de células. Por otro lado, a P60 apenas quedan células de Purkinje supervivientes en el cerebelo, salvo en el lóbulo X (como se observa en el recuadro con aumento) y unas pocas células en el lóbulo VI. Floc, flóculo. Barra de escala 1 mm. Modificado de Duffin et al. 2010.

### Modelo NPC1

La enfermedad NPC1 es un trastorno hereditario recesivo que afecta al almacenamiento de lípidos y está causada por un defecto en el transporte y la homeostasis intracelular del colesterol (Pentchev et al., 1986). En humanos, esta enfermedad provoca hepatoesplenomegalia al nacer; además, los niños que la padecen desarrollan ataxia, deterioro psicomotor y/o demencia, y mueren a los 5-15 años (Vanier et al., 1991). Afortunadamente, para su estudio existen 2 modelos murinos que desarrollan esta patología por una mutación espontánea en el mismo gen que en los humanos, el gen *Npc1*. Además, este gen mutado en ratones corresponde al mismo grupo complementario que el gen *NPC1* humano (Akaboshi et al., 1997).

Aunque las crías de ratón NPC1 no se pueden distinguir de las de tipo silvestre, cuando alcanzan la madurez comienzan a desarrollar ataxia y la degeneración cerebelosa es evidente a partir de P40, cuando las células de Purkinje están en pleno proceso de muerte celular. Sin embargo, del mismo modo que sucede en los otros modelos, la neurodegeneración no es uniforme en todo el cerebelo: las zonas más rostrales del vermis son más sensibles a la neurodegeneración que las más caudales, siendo el lóbulo X la región más neuroprotegida de todas (**Fig. 10**; Sarna et al., 2003).



**Figura 10. Secciones sagitales de cerebelo de dos modelos NPC1.** En ambos cortes se ha marcado la calbindina por inmunohistoquímica (marrón) y posteriormente se ha realizado una tinción de Nissl (azul). A la izquierda se puede observar la sección sagital del cerebelo de un animal *knock-out* que desarrolla la enfermedad NPC1 con 105 días de edad; a la derecha vemos un modelo genético también para la enfermedad NPC1, aunque a P63. En ambos modelos se puede ver en tiempos distintos un resultado similar: la muerte generalizada de las células de Purkinje excepto en el lóbulo X, que se muestra como una región resistente. También se observó en ambos modelos que la zona central (lóbulos VI al VIII) también conserva más células que las zonas anteriores (lóbulos I al V). Barra de escala 1 mm. Modificado de Praggastis 2015.

Como ya hemos mencionado, se ha comprobado que la zona nodular tiene una mayor expresión de *Zebrin II*, y que en función a esta expresión se pueden delimitar diferentes regiones cerebelosas que, además, coinciden con diferentes patrones de degeneración: en el modelo NPC1, al analizar en secciones coronales la degeneración de las células de Purkinje, se observó que las primeras células que degeneran son aquellas que no expresan *Zebrin II* (Sillitoe y Hawkes, 2002). Por otro lado, un estudio reciente con ayuda de herramientas bioinformáticas cruzó datos disponibles de otros experimentos de hibridación *in situ* con el objetivo de encontrar genes que se expresasen más en la zona nodular. Esto se hizo con el objetivo de encontrar genes que influyesen en la mayor resistencia de esta región. El resultado del experimento demostró que la expresión de la proteína de choque térmico HSP25 (HSPB1 en el artículo) era mayor en el lóbulo X que en el resto de los lóbulos en los ratones NPC1 y, además, el hecho de que se encuentre fosforilada o no influye enormemente en sus propiedades neuroprotectoras (Chung et al., 2016). Más adelante, en el apartado *Proteínas de Choque Térmico* se desarrollará este tema con mayor profundidad.

### El modelo PCD

El ratón PCD es el animal de estudio de la presente Tesis Doctoral. Es un modelo de degeneración cerebelosa causada por una mutación autosómica. Las crías *pcd/pcd* son algo más pequeñas que las crías de tipo silvestre, aunque no presentan ningún otro signo hasta P20, cuando comienzan a desarrollar ataxia debido a la muerte progresiva de las células de Purkinje.

Aunque el modelo PCD se caracteriza como un modelo de degeneración cerebelosa, también sufre la muerte de otros tipos neuronales, como son algunas poblaciones talámicas (O'Gorman y Sidman, 1985), los fotorreceptores de la retina (Mullen y LaVail, 1975) o las células mitrales del bulbo olfativo (Greer y Shepherd, 1982). Por otro lado, los espermatozoides del ratón PCD presentan una morfología anormal que provoca esterilidad en los machos. Las hembras, por el contrario, sí son fértiles, aunque incapaces de cuidar a las crías adecuadamente (Wang y Morgan, 2007).

También debemos comentar que aunque la degeneración neuronal del cerebelo es evidente en el ratón PCD a partir de P20, se ha comprobado la existencia de dos etapas en el cerebelo, la etapa **pre-degenerativa** y la etapa **degenerativa**. La primera etapa comienza a P15 y termina a P18; se caracteriza por alteraciones nucleares, citológicas y morfológicas en células de Purkinje todavía vivas. A continuación, con el inicio de la muerte de dichas células, se considera el comienzo la etapa degenerativa (Muñoz-Castañeda et al., 2018).

La mutación *pcd* surgió de manera espontánea en la cepa C57BR/cdJ y afecta a una región reguladora del gen *Ccp1*, situado en el cromosoma 13 (Mullen et al., 1976). La proteína afectada por esta mutación se denomina “proteína de unión a ATP/GTP 1” o “proteína 1 nuclear del sistema nervioso inducida por axotomía” (AGTPB1<sup>1</sup> o NNA1<sup>2</sup> respectivamente). El segundo nombre es debido al origen de su descubrimiento, puesto que se comprobó que se expresaba tras una axotomía del nervio ciático y se asoció su expresión a procesos de diferenciación y regeneración axonal (Harris et al., 2000). Por otro lado, esta enzima es una peptidasa capaz de hidrolizar los extremos carboxi-terminales de las cadenas de glutamato de las tubulinas  $\alpha$  y  $\beta$ , y debido a esto, pertenece a la familia de las carboxipeptidasas citosólicas. De hecho, su nombre más actual y el que se usará en la presente Tesis es “carboxipeptidasa citosólica tipo 1” o CCP1<sup>3</sup>, por la función que desarrolla.

Hasta el momento hemos hablado principalmente de la primera mutación *pcd* que surgió, la mutación *pcd<sup>fl</sup>*, que es la correspondiente al modelo de estudio de este trabajo. Sin embargo, en la **Tabla 1** se muestran las múltiples variantes alélicas que se han desarrollado hasta el momento, incluyendo mutantes espontáneos, inducidos químicamente con N-etil-N-nitrosourea (como el modelo *Robotic*), transgénicos y *knock-out* (Baltanás et al., 2021).

El gen *Ccp1* es complejo y en nuestro laboratorio disponemos de una cepa híbrida fruto de la cepa C57, en la que se encuentra originalmente la mutación *pcd*, y la cepa DBA, ligada al trasfondo silvestre. Sin embargo, el peso molecular del alelo mutado (ligado a la estirpe C57), no se distingue del silvestre (ligado a la estirpe DBA), por lo que su genotipado no es posible de forma directa. Afortunadamente, cercanos al gen *Ccp1* existen 2 microsatélites que están ligados al trasfondo genético PCD o al silvestre. A su vez, ambos microsatélites muestran un peso molecular diferente en función al trasfondo genético al que están ligados. Se pueden utilizar cebadores para amplificar estos dos microsatélites mediante una reacción en cadena de la polimerasa o PCR<sup>4</sup> para distinguir el genotipo de los ratones antes de que se manifiesten los síntomas de la mutación. En nuestro caso, cuando la genotipamos, la descendencia obtenida de un cruce de heterocigotos sigue una distribución de  $\frac{1}{4}$  silvestres,  $\frac{1}{2}$  heterocigotos y  $\frac{1}{4}$  mutantes *pcd*. Si bien es cierto, existen otros modelos como el mutante *knock out* del ratón PCD (Zhou et al., 2018) que al sufrir una delección no presenta el problema de genotipado de nuestra cepa. De este modo se puede determinar directamente la presencia o ausencia del gen funcional sin necesidad de los microsatélites.

---

<sup>1</sup> Del inglés *AGT/GTP binding protein 1*

<sup>2</sup> Del inglés *neuronal nuclear protein induced by axotomy 1*

<sup>3</sup> Del inglés *cytosolic carboxypeptidase 1*

<sup>4</sup> Del inglés *polymerase chain reaction*

Tabla 1. Origen, efectos y localización de los alelos de la mutación *pcd*. Modificado de Baltanás 2021.

ENU, N-etil-N-nitrosourea

Alelo	Origen	Fenotipo	Mutación
<i>agtpbp1<sup>pcd-1J</sup></i>	Espontáneo	Tamaño corporal reducido. Ataxia. Atrofia cerebelosa. Degeneración de neuronas talámicas, células de Purkinje, células mitrales y fotorreceptores. Infertilidad en machos e infertilidad parcial en hembras.	Posible región reguladora
<i>agtpbp1<sup>pcd-2J</sup></i>	Espontáneo	Alelo hipomorfo con expresión de proteína reducida.	Inserción de exones entre el 14 y el 15
<i>agtpbp1<sup>pcd-3J</sup></i>	Espontáneo	Tamaño corporal reducido. Ataxia. Atrofia cerebelosa. Degeneración de neuronas talámicas, células de Purkinje, células mitrales y fotorreceptores. Infertilidad en machos e infertilidad parcial en hembras. Número de folículos de de Graaf reducido.	Deleción de los exones 7, 8 y 9
<i>agtpbp1<sup>pcd-4J</sup></i>	Inducido químicamente (ENU)	Ataxia. Degeneración de las células de Purkinje.	Desconocida
<i>agtpbp1<sup>pcd-5J</sup></i>	Espontáneo	Ataxia. Degeneración de células de Purkinje y células mitrales.	Inserción de un codón de ácido aspártico en el exón 18
<i>agtpbp1<sup>pcd-6J</sup></i>	Inducido químicamente (ENU)	Ataxia. Atrofia cerebelosa y testicular. Degeneración postnatal de células de Purkinje, células mitrales y fotorreceptores. Tamaño de las fibras musculares reducido. Infertilidad en machos.	Desconocida
<i>agtpbp1<sup>pcd-7J</sup></i>	Espontáneo	Ataxia. Degeneración postnatal de células de Purkinje. Hipocampo agrandado. Audición anómala. Afectación en el comportamiento. Tamaño corporal reducido. Alteración en el desarrollo del sistema nervioso, reproductor y visión.	Desconocida
<i>agtpbp1<sup>pcd-8J</sup></i>	Espontáneo	Ataxia, tamaño corporal reducido, degeneración de las células de Purkinje del cerebelo, degeneración retiniana, infertilidad masculina, fertilidad femenina parcial.	Desconocida
<i>agtpbp1<sup>pcd-9J</sup></i>	Espontáneo	Ataxia, pero comienza más tarde que en la mutación original.	Inserción A en exón 11
<i>agtpbp1<sup>pcd-Tg(Dhfr)1-JWG</sup></i>	Inserción del gen <i>Dhfr</i> y el promotor SV40	Ataxia. Degeneración de las células de Purkinje, células mitrales y fotorreceptores. Infertilidad en machos e infertilidad parcial en hembras. Degeneración del esperma.	Anomalía genética aleatoria
<i>agtpbp1<sup>Drunk</sup></i>	Inducido químicamente	Degeneración de las células de Purkinje y fotorreceptores. Infertilidad en machos. Temblores y esperma anómalo.	Cambio de base T > A en sitio de empalme del intrón 11
<i>agtpbp1<sup>pcd-m2Btlr (rio)</sup></i>	Inducido químicamente (ENU)	Ataxia, tamaño corporal reducido, degeneración de las células de Purkinje del cerebelo, infertilidad masculina, fertilidad femenina parcial y degeneración de los espermatozoides.	Cambio de base A > G destruye el sitio de empalme del intrón 7
<i>agtpbp1<sup>pcd-m3Btlr (wooble)</sup></i>	Inducido químicamente (ENU)	Tamaño corporal reducido, ataxia y alteración del comportamiento motor.	Cambio de base A > T Ac. aspártico por valina
<i>agtpbp1<sup>babe</sup></i>	Inducido químicamente (ENU)	Ataxia. Paraparesia.	Cambio de base C > T provoca un codón de terminación
<i>agtpbp1<sup>pcd-Btlr</sup></i>	Inducido químicamente (ENU)	Ataxia. Degeneración de las células de Purkinje, células mitrales y fotorreceptores. Infertilidad en machos. Oligozoospermia y teratozoospermia.	Transversión en el intrón 11
<i>agtpbp1<sup>pcd-Sid</sup></i>	Espontáneo	Tamaño corporal reducido. Ataxia. Atrofia cerebelosa.	Deleción del exón 7
<i>Agtpbp1<sup>atms</sup></i>	Espontáneo	Ataxia, atrofia cerebelosa, degeneración postnatal de CP y fotorreceptores, infertilidad en machos.	Cambio de base A > T Prolina por arginina
<i>pcd<sup>KO</sup></i>	Knock-out	Ataxia. Atrofia cerebelosa. Degeneración postnatal de las células de Purkinje y fotorreceptores.	Deleción de los exones 21 y 22

Más adelante se detallará la relación entre la mutación de *Ccp1* y la degeneración neuronal del ratón PCD en el apartado *Modificaciones en el citoesqueleto*. No obstante, aunque las causas de la degeneración del ratón PCD son diferentes a las de los modelos anteriormente descritos, se puede volver a observar una degeneración neuronal selectiva, de tal modo que el lóbulo X del cerebelo se muestra una vez más como una región neuroprotegida, hasta el punto de que a los 9 meses de edad, cuando el resto de las células han desaparecido, en el lóbulo X todavía se pueden observar algunas células de Purkinje (Mullen et al., 1976).

Las afectaciones cognitivas fruto de la degeneración cerebelosa también son evidentes en nuestro modelo animal. De hecho, en nuestro laboratorio se ha comprobado que sumado a los fallos motores, existe un desarrollo gradual de trastornos cognitivos paralelo al daño celular en los ratones PCD (Muñoz-Castañeda et al., 2018). Además, esto se refuerza al observar que con determinados tratamientos farmacológicos se frena la muerte de las células de Purkinje y los comportamientos cognitivos de los ratones PCD se normalizan (Pérez-Martín et al., 2021).

Por último, del mismo modo que el modelo murino NPC1 tiene un análogo humano, el ratón PCD no es menos. Recientemente se ha comprobado la existencia de la mutación *AGTPBP1* en humanos, la cual cursa de forma similar que en ratones. Los pacientes muestran retraso temprano en el desarrollo, hipotonía y debilidad muscular generalizada. Además, las imágenes de resonancia magnética muestran principalmente atrofia cerebelosa, aunque se ven otras lesiones en el resto del encéfalo (Shashi et al., 2018; Karakaya et al., 2019; Sheffer et al., 2019).

### *Modificaciones en el citoesqueleto*

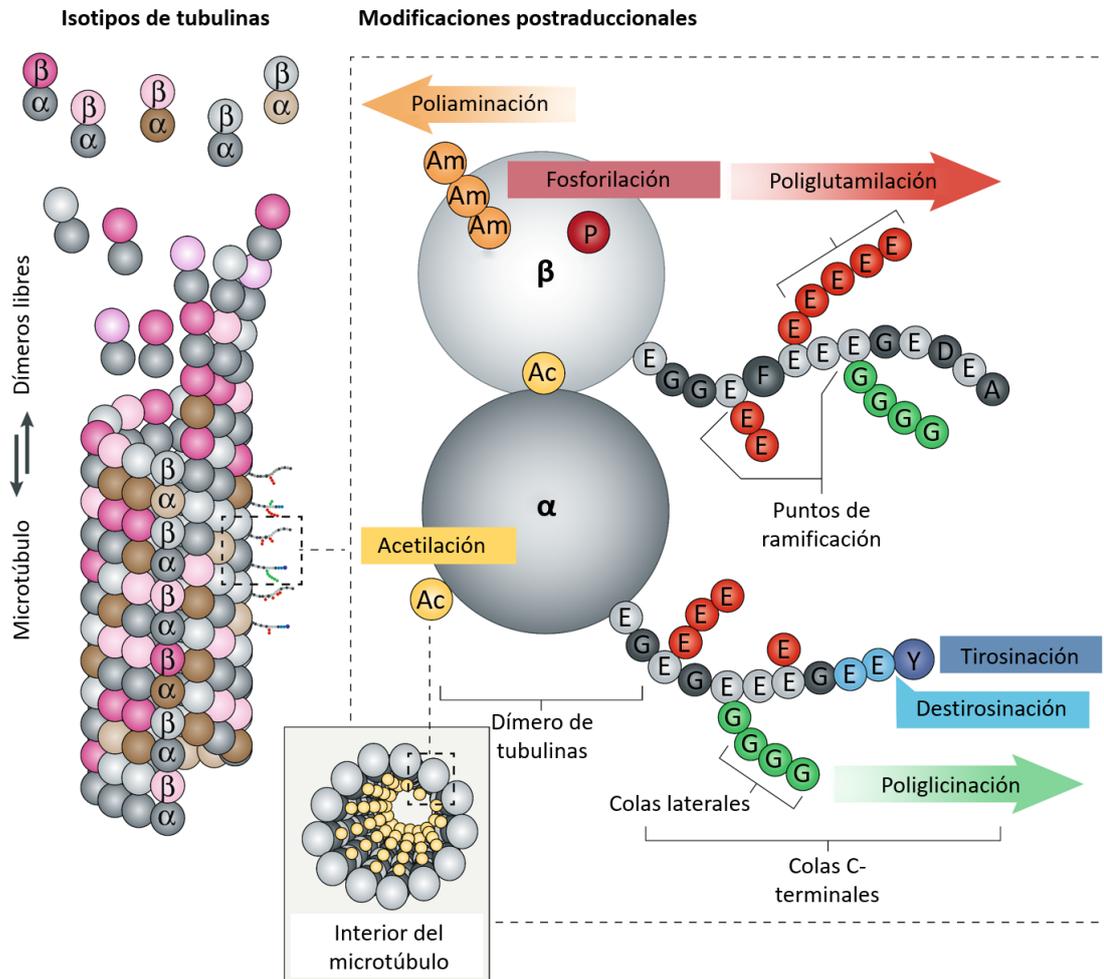
Ya hemos hablado de CCP1 y de su acción sobre las tubulinas. Sin embargo, para entender con detalle qué efecto tiene la mutación del ratón PCD sobre las células de Purkinje es necesario entender las modificaciones postraduccionales que sufre el citoesqueleto y, en concreto, las glutamilaciones y desglutamilaciones.

Los microtúbulos, debido a su importancia y ubicuidad evolutiva, tienen una estructura muy conservada, de forma que están constituidos por unas proteínas globulares llamadas tubulinas  $\alpha$  y  $\beta$  (Howes et al., 2017). Ambos tipos de tubulinas se unen formando heterodímeros que se ensamblan unos con otros formando hileras de 13 protofilamentos que dan lugar al microtúbulo, un cilindro hueco de 25 nm de diámetro. Aunque mecánicamente son rígidas, estas estructuras son muy dinámicas gracias al delicado equilibrio que hay entre los procesos de polimerización y despolimerización de sus tubulinas (Gittes et al., 1993). En este balance influyen una gran variedad de proteínas asociadas a microtúbulos o MAP<sup>5</sup>, que se unen de manera específica a las distintas regiones del microtúbulo y regulan su crecimiento, su unión a otras estructuras o su estabilidad. Por otro lado, además de las distintas modificaciones que pueden ejercer las MAP, el microtúbulo puede estar constituido por distintos isotipos de tubulinas aportándole una dimensión mayor de complejidad. Aunque no tuvo popularidad hasta varias décadas después, a principios de 1970 se acuñó el término **código de tubulinas** (traducido del término original inglés *Tubulin code*; **Fig. 11**) refiriéndose al hecho de que los isotipos de

---

<sup>5</sup> Del inglés *microtubule-associated proteins*

tubulinas que constituyen el microtúbulo y las diferentes modificaciones postraduccionales de las mismas pudiesen controlar las funciones de los microtúbulos (Verhey y Gaertig, 2007).



**Figura 11. Los elementos del código de las tubulinas.** Los microtúbulos se ensamblan dinámicamente a partir de dimeros de tubulinas  $\alpha$  y  $\beta$ . Las tubulinas son grandes estructuras proteicas que forman el cuerpo del microtúbulo, mientras que sus aminoácidos C-terminales forman colas fuera de la estructura, que protruyen de la superficie del microtúbulo. Los distintos isotipos de tubulinas ( $\alpha$  en color gris oscuro y marrón, y  $\beta$  en color gris claro y rosa) están codificados por distintos genes y se pueden mezclar durante el ensamblaje. Las modificaciones postraduccionales son catalizadas por un amplio rango de enzimas que añaden o quitan residuos funcionales y actúan sobre el microtúbulo en sí mismo o sobre las colas C-terminales. Las polimodificaciones deben iniciarse con un punto de ramificación (*branching point*) a partir del que comienza a alargarse la cadena. Los residuos que se observan son: aminas (Am), acetilos (Ac), glicinas (G), glutamatos (E), grupos fosfato (P) y tirosinas (Y). Modificado de Janke y Magiera, 2020.

El código de las tubulinas está, por lo tanto, compuesto por dos elementos. En primer lugar, por los **isotipos de las tubulinas**, que son fruto de la expresión de distintos genes que codifican diversos tipos de tubulinas. A medida que aumenta la complejidad del organismo, se ha comprobado que existe una mayor cantidad de tubulinas diferentes: las levaduras, por ejemplo, poseen dos tipos de tubulina  $\alpha$  y solo uno de  $\beta$ ; y por el contrario, los seres humanos tienen nueve tipos diferentes de cada tipo de tubulina (Janke y Magiera, 2020).

En segundo lugar, nos encontramos con las **modificaciones postraduccionales** de las tubulinas. Estas proteínas están expuestas a numerosas modificaciones como las tirosinaciones, glicinaciones o glutamilaciones, o en caso de repetirse la adición de los diferentes sustratos, poliglicinaciones y poliglutamilaciones, entre otras muchas. Además, en algunos tipos de modificaciones, las tubulinas también pueden sufrir el proceso reverso, como las

destirosinaciones, desglicinaciones o desglutamilaciones, respectivamente (Janke y Magiera 2020).

La mayoría de las modificaciones postraduccionales sirve para señalar los microtúbulos para destinarlos a sus distintas funciones. Otras modificaciones, como las tirosinaciones, acetilaciones, poliglutamilaciones y sus inversas, pueden afectar a la des-/polimerización del propio microtúbulo (Janke y Magiera 2020).

### *Glutamilación y desglutamilación del citoesqueleto*

De entre todas las modificaciones postraduccionales que sufren las tubulinas hemos citado las glutamilaciones y las desglutamilaciones. En nuestro caso, estas son de especial interés puesto que su equilibrio se encuentra afectado por la mutación del ratón PCD y es por ello por lo que las describiremos en detalle a continuación.

La poliglutamilación consiste en una modificación reversible en la que se generan cadenas laterales de glutamato sobre las tubulinas  $\alpha$  y  $\beta$ . Las enzimas responsables de este proceso son las TLL<sup>6</sup>, cuyo nombre se debe a que comparten un dominio con unas enzimas que añaden tirosina a los microtúbulos, las TTL<sup>7</sup> (Janke et al., 2005). De esta familia se conocen 9 enzimas involucradas en el proceso de poliglutamilación: TTLL1, TTLL2, TTLL4, TTLL5, TTLL6, TTLL7, TTLL9, TTLL11 y TTLL13 (van der Laan et al., 2019). Para estudiar el efecto de algunas de estas proteínas se han desarrollado numerosos modelos *knock-out*: un ejemplo de ello son los ratones que no expresan TTLL1, que desarrollan cilios anómalos en el epitelio respiratorio que desembocan en problemas de respiración (Ikegami et al., 2010). Otro modelo desarrollado consiste en una delección de TTLL6 en el pez cebra, que provoca un ensamblaje defectuoso de los cilios olfativos (Pathak et al., 2007). Por otro lado, la sobreexpresión de las TLL también tiene efectos negativos: por ejemplo, la hiperglutamilación causada por esta sobreexpresión da lugar a cilios defectuosos en protozoos del género *Tetrahymena* (Janke et al., 2005).

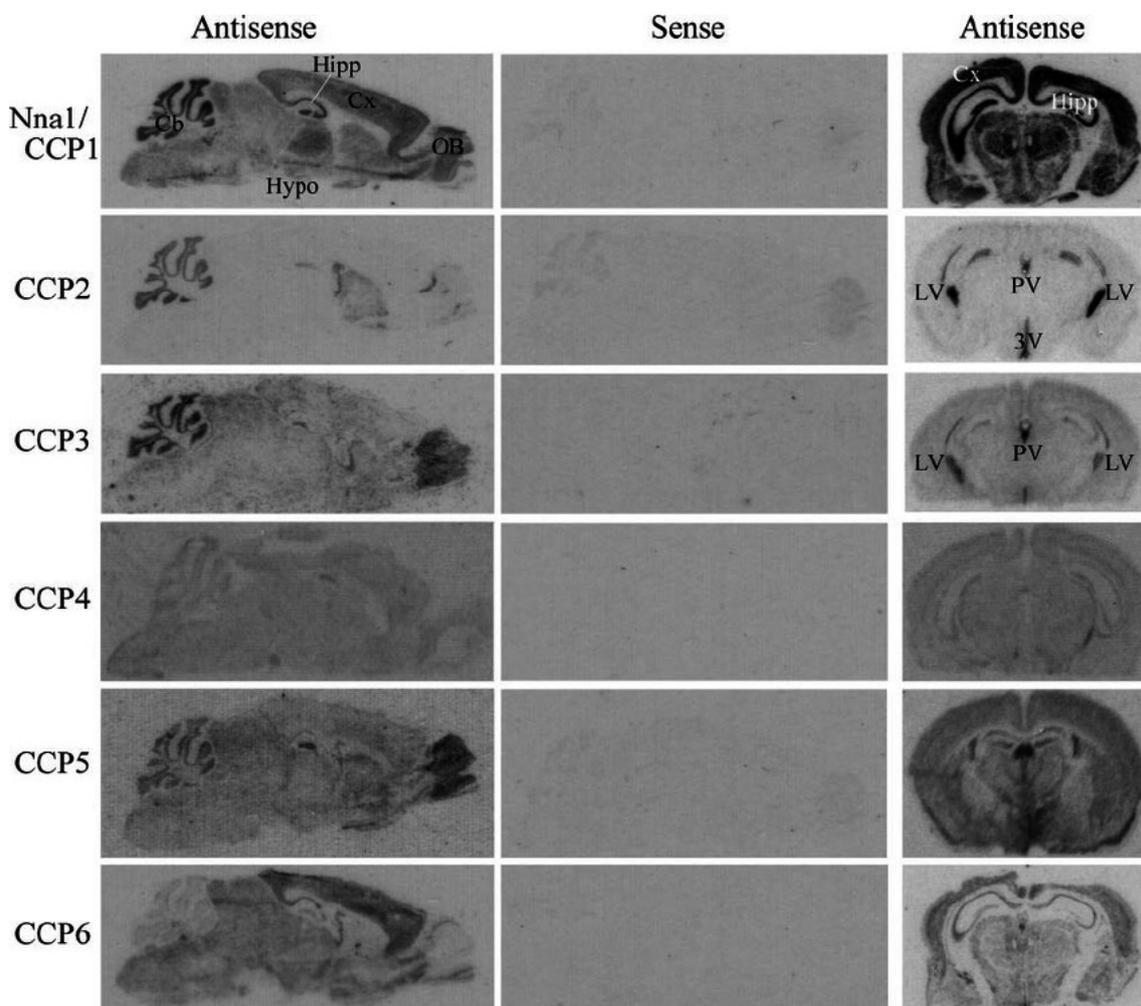
Análogamente, también existe el proceso inverso a la poliglutamilación, la desglutamilación. En este caso las desglutamilasas se encargan de eliminar los glutamatos que han sido anteriormente añadidos por las TLL. Las enzimas responsables pertenecen a la familia de carboxipeptidasas citosólicas o CCP<sup>8</sup>. Aunque todas ellas conservan la función desglutamilante, en la familia de CCP existen varias enzimas con distintas funciones que se distribuyen en patrones más o menos conocidos por el encéfalo (**Fig. 12**). Se sabe que CCP1, y en menor medida CCP4 y CCP6, acortan las cadenas laterales de glutamato (Rogowski et al., 2010); por su parte, CCP5 elimina el glutamato inicial de cada cadena lateral (Kimura et al., 2010). Los modelos *knock-out* para las distintas CCP son también variados y gracias a ellos se ha observado que la falta de CCP1 provoca un exceso de poliglutamilación similar al efecto de una sobreexpresión de TTLL1, ambas modificaciones causan la degeneración de las células de Purkinje (Magiera et al., 2018). Por otro lado, la degeneración neuronal causada por esta hiperglutamilación se evita con la co-delección de CCP1 y TTLL1; es decir, que la ausencia de desglutamilación se compensa con la falta de glutamilación, lo que refuerza la idea anterior (Magiera et al., 2018). Ya hemos citado los distintos tipos neuronales que degeneran durante la mutación *pcd*. Sin embargo, no se han descrito signos claros de degeneración en otras regiones, como la corteza cerebral. Esta menor vulnerabilidad se ha comprobado que puede ser debida a una mayor expresión de CCP6 que compensa la falta de CCP1 (Magiera et al., 2018).

<sup>6</sup> Del inglés *tubulin tyrosine ligase like*

<sup>7</sup> Del inglés *tubulin tyrosine ligase*

<sup>8</sup> Del inglés *cytosolic carboxypeptidase*

Efectivamente, la falta de CCP1 y CCP6 simultánea sí que causa una hiperglutamilación generalizada en todo el encéfalo, de modo que bajo esta situación se ven afectados tipos neuronales adicionales a los del modelo PCD, como son las neuronas piramidales de la corteza cerebral (Magiera et al., 2018). De hecho, en relación con esto último, se ha comprobado que la poliglutamilación está fuertemente incrementada tanto en la corteza cerebral como en el cerebelo del ratón PCD en las etapas más tempranas del desarrollo. Sin embargo, los niveles de glutamilación vuelven a sus niveles normales solo en la corteza cerebral debido a que en el cerebelo no hay suficiente expresión de CCP1 (Rogowski et al., 2010). De este modo, parece existir un mecanismo compensatorio solo en la corteza cerebral del ratón PCD, se estudió la expresión de CCP4 y CCP6 por tener la misma funcionalidad que CCP1 y se comprobó que CCP6 se expresaba mucho más en la corteza cerebral que en el cerebelo. CCP4, por su parte muestra una expresión mucho menor en ambos tejidos (Rogowski et al., 2010) aunque sí se expresa significativamente en el ojo (Kalinina et al., 2007). De hecho, se ha comprobado que su mutación está involucrada en una patología humana denominada distrofia corneal de Fuchs (Eghrari et al., 2015). Además, estudios de hibridación *in situ* han mostrado que CCP1 se expresa mucho en la corteza cerebral y en el cerebelo, sin embargo, la expresión de CCP6 se restringe



**Figura 12. Distribución de la expresión de las distintas *Ccp* en el encéfalo.** Resultados de hibridación *in situ* que muestran la diferente expresión de las distintas *Ccp*. Nótase la fuerte expresión de *Ccp1* de forma más o menos generalizada en el encéfalo. Cabe destacar que la expresión de las *Ccp* no se limita al tejido nervioso. Hipp, hipocampo; OB, bulbo olfativo; Cx, corteza; LV, ventrículo lateral; PV, núcleos talámicos adyacentes al tercer ventrículo; 3V, tercer ventrículo. Extraído de Kalinina et al., 2007.

principalmente a la corteza cerebral. CCP4 por su parte se expresa poco de forma general (Kalinina et al., 2007).

Como hemos visto, la función de las distintas CCP es la de eliminar glutamatos de las cadenas de tubulina (Kimura et al., 2010; Rogowski et al., 2010). Así, esta familia de enzimas tiene especificidades muy parecidas y sus funciones son redundantes. De hecho, a raíz de esta similitud se realizó un estudio en el que se compararon en una amplia variedad de organismos las secuencias de la familia M14 de las metalocarboxipeptidasas, familia a la que pertenecen las CCP. Una de las conclusiones obtenidas fue que CCP1, CCP2, CCP3, CCP5 y CCP6 son proteínas **parálogos** (Rodríguez de la Vega et al., 2007); es decir, que sus genes son fruto de la duplicación de un gen anterior, de manera que las dos copias han divergido más o menos entre ellas. Esta conclusión se fundamenta en que durante la evolución muchos genes de cordados surgieron o se expandieron mediante duplicaciones (McLysaght et al., 2002). Una de las ventajas de los genes parálogos es que entre ellos se respaldan funcionalmente, lo que disminuye la presión evolutiva sobre cada uno de ellos y permite acumular mutaciones y promover la especialización de cada gen. La diversificación de la familia de las CCP ha dado como resultado una variabilidad que puede permitir cierta compensación entre ellas, lo que explica por qué las mutaciones en las distintas proteínas no son mortales (Rodríguez de la Vega et al., 2007), como hemos citado anteriormente.

Como hemos podido ver, las poliglutamilaciones y las desglutamilaciones originan cadenas laterales de glutamato que crecen o decrecen. Durante el ensamblaje de los microtúbulos dichas cadenas quedan expuestas hacia el exterior y crean sitios de unión para algunas MAP que ayudan a su estabilidad (Rogowski et al., 2010). El efecto coordinado de las TLL y las CCP permite una regulación muy precisa de las propiedades fisicoquímicas de la superficie de los microtúbulos, de modo que el equilibrio entre la poliglutamilación y la desglutamilación es clave para mantener la estructura del citoesqueleto. Con relación a la regulación de estos dos procesos, sobre la regulación de las CCP no hay apenas información. Sin embargo, se conoce un tipo de MAP, denominada CSAP<sup>9</sup>, que interacciona con el citoesqueleto y a su vez regula la actividad de las proteínas de la familia TLL, de tal modo que da lugar a un posible mecanismo de regulación del estado de glutamilación del citoesqueleto (Bompard et al., 2018).

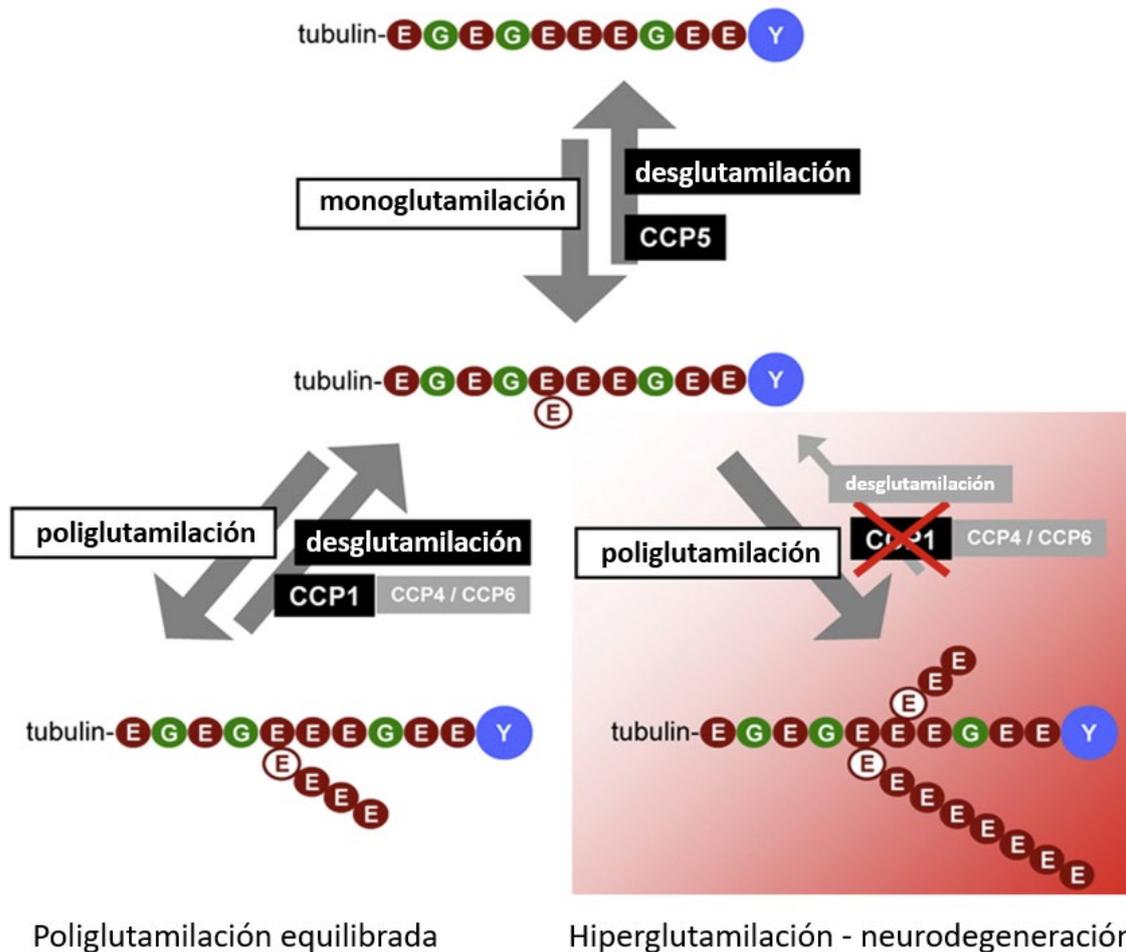
Por otro lado, se ha comprobado que los cambios estructurales de los microtúbulos se encuentran ligados a la maduración neuronal (Favre et al., 1985): las neuronas más maduras presentan unos microtúbulos más estables y, por el contrario, las neuronas en desarrollo poseen unos microtúbulos menos estables y por ello más dinámicos. Esta inestabilidad puede resultar en una mayor plasticidad neuronal y, de hecho, el ratón PCD sufre la muerte de las células de Purkinje al final de su desarrollo. Es posible que la falta del equilibrio des/poliglutamilación afecte a la dinámica del citoesqueleto y por ello se produzca la muerte de las células de Purkinje (Muñoz-Castañeda et al., 2018). Se ha comprobado también que esta afectación del citoesqueleto influye sobre el transporte anterógrado y retrógrado de moléculas diversas (Strzyz, 2019).

Como hemos dicho, en el modelo PCD la falta de CCP1 y, por ello, el déficit en la desglutamilación de las tubulinas provoca que estas se hiperglutamilen y el citoesqueleto ya no sea tan dinámico, de modo que se desestabiliza y colapsa (**Fig. 13**), efecto similar al observado cuando se sobreexpresa TLL1. Si bien es cierto, parece que la poliglutamilación es necesaria en

---

<sup>9</sup> Del inglés *cilia and spindle-associated protein*

las etapas más iniciales del desarrollo del cerebelo y la expresión de *Ccp1* es relativamente baja. De este modo, *Ccp1* aumenta su expresión a P15 en ratones silvestres, una vez que la corteza cerebelosa ya está formada y requiere un aumento de desglutamilación del citoesqueleto (Baltanás et al., 2011).



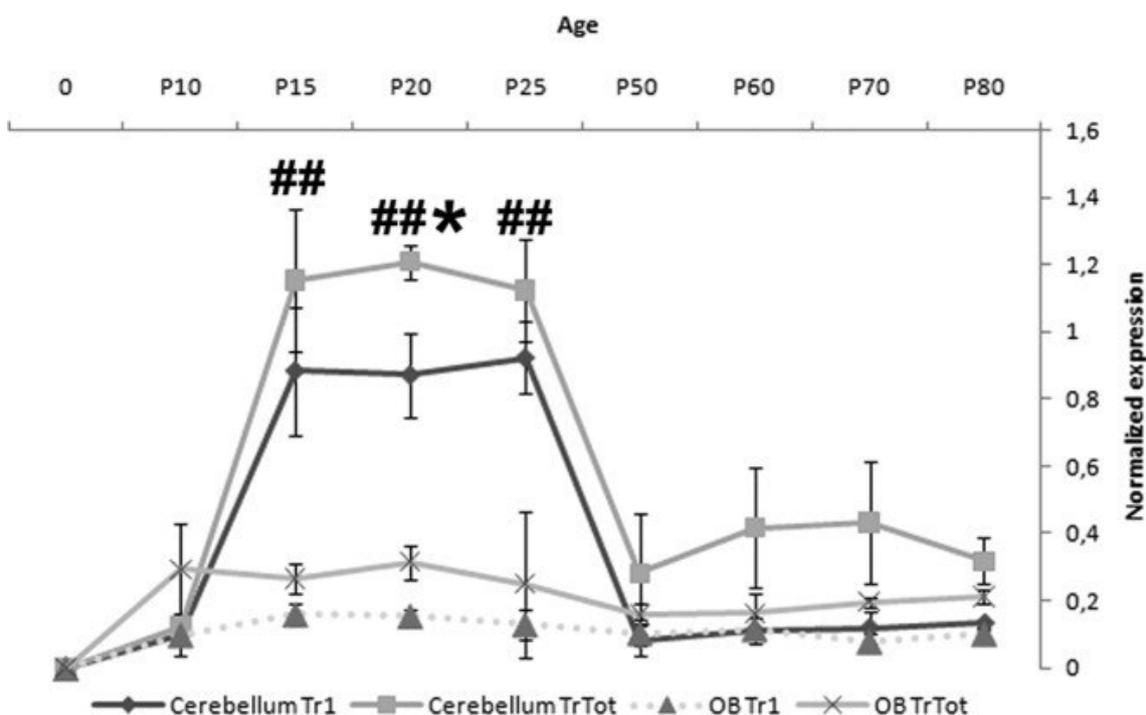
**Figura 13. Esquema de un proceso normal y patológico del equilibrio en la des/poliglutamilación de los microtúbulos.** Partiendo de una cadena sin glutamato (arriba), una TLL se encarga de crear el punto de ramificación con el primer glutamato de la cadena. A continuación, otras TLL se encargan de alargar la ramificación durante un proceso llamado poliglutamilación. El proceso contrario lo realizan las CCP: CCP1 y en menor medida CCP4 y CCP6 desglutamilan la cadena anteriormente formada y CCP5 elimina el último glutamato que queda (que a su vez es el primero que se unió en el proceso de glutamilación). Durante la mutación del ratón PCD, donde no hay expresión de CCP1, el citoesqueleto se hiperglutamila (derecha) y da lugar a un proceso neurodegenerativo. Adaptado de Rogowski, et al, 2010.

### Gen *Ccp1*

Una vez entendido el proceso de des/glutamilación, para poder entender en profundidad el efecto de la mutación *pcd*, debemos terminar hablando del gen afectado, el gen *Ccp1*. Se sabe que la cepa *pcd<sup>1J</sup>* presenta su mutación en una región reguladora del gen *Ccp1* (Fernández-González et al., 2002). En la práctica, la mutación de este gen provoca en nuestra cepa una patología de tipo recesivo: al cruzar dos ratones heterocigotos la descendencia obtenida es ¼ ratones silvestres, ½ heterocigotos y ¼ PCD. Además, los ratones heterocigotos no muestran ningún rasgo distintivo de los silvestres. Sin embargo, en nuestro laboratorio ya se han hecho experimentos con estos animales y se ha comprobado que a partir de P300 los

ratones heterocigotos también acaban sufriendo pérdida de células de Purkinje, aunque mínimamente (Díaz et al., 2012). La patología de los ratones homocigotos para la mutación *pcd<sup>1J</sup>* es recesiva debido a la ausencia de la proteína CCP1. Además, se ha visto que el RNA mensajero (mRNA<sup>10</sup>) de *Ccp1* es indetectable mediante *Northern Blot* en todos los tejidos, excepto en los testículos, que se expresa unas 20 veces menos en los ratones PCD que en los silvestres (Chakrabarti et al., 2006; Fernández-González et al., 2002). Parece que los ratones PCD sí son capaces de expresar este gen, pero los niveles son tan bajos que no son suficientes para mantener un citoesqueleto adecuado en diferentes poblaciones neuronales.

Por otro lado, también se han realizado estudios de qPCR del gen *Ccp1* en nuestro modelo murino (Baltanás et al., 2013). A la hora de estudiar dicho gen se diseñaron unos cebadores teniendo en cuenta que el gen estaba compuesto solo por 2 transcritos (Fernández-González et al., 2002), afirmación que hemos visto no se mantiene en la actualidad. En función a esto se realizaron 2 parejas de oligonucleótidos: una específica para el transcrito mayor (*Tr1*) y otra común para ambos transcritos (*TrTot*). Además, su expresión se analizó en animales silvestres tanto en el cerebelo como en el bulbo olfativo para estudiar los patrones normales de expresión y para relacionarlo con la patología del ratón PCD (Fig. 14). Por un lado, se comprobó que existía un pico de expresión significativo en el cerebelo de P15 a P25 con las dos parejas de oligonucleótidos. Por otra parte, no se vio ningún aumento de expresión de *Ccp1* en el bulbo olfativo a P60-P70.



**Figura 14. Patrón de expresión de *Ccp1* en cerebelo y bulbo olfativo de ratones silvestres.** Se utilizaron 2 parejas de cebadores para el estudio de *Ccp1* (*TrTot* y *Tr1*). Existe un pico de expresión significativo de *Ccp1* en el cerebelo a P15-P25, a continuación descende y a partir de P50 se mantienen unos niveles mínimos. En el bulbo olfativo no se observaron diferencias para ambas parejas de cebadores. ##,  $p < 0,01$  entre cerebelo y bulbo olfativo; \*,  $p < 0,05$  entre la expresión analizada con *TrTot* y la analizada con *Tr1*. OB, bulbo olfativo; *Tr1*, cebadores para el transcrito mayor de *Ccp1*; *TrTot*, cebadores para todos los transcritos de *Ccp1*. Extraído de Baltanás, 2013.

Estos datos de animales silvestres tienen más interés si estudiamos paralelamente la degeneración del ratón PCD a lo largo del tiempo: a partir de P20 el cerebelo sufre una fuerte degeneración en la que mueren la mayoría de las células de Purkinje y, por otro lado, a partir de

<sup>10</sup> Del inglés *messenger ribonucleic acid*

P70 es cuando comienza la degeneración en el bulbo olfativo, aunque bastante más leve que la del cerebelo. Si analizamos estos datos en conjunto podremos ver que **la expresión de *Ccp1* en el cerebelo y en el bulbo coincide en tiempo y en intensidad con la degeneración neuronal que sufre el ratón PCD en sendos tejidos**. Esto podría ser debido a que los patrones de expresión de *Ccp1* revelan la dependencia del tejido estudiado a dicha expresión. De este modo, una mayor expresión del gen implicaría que el tejido es muy dependiente de esta para su homeostasis y, por ello, ante la mutación del ratón PCD los daños causados serán mucho más graves (caso del cerebelo) que en otros tejidos donde haya menos expresión constitutiva (caso del bulbo olfativo). Hasta el momento, ya se conoce la expresión de *Ccp1* en el cerebelo hasta P25, sin embargo, no se ha estudiado cómo es esta expresión a edades más tardías, cuando todavía está progresando la degeneración neuronal del cerebelo. Además, tampoco se conoce si la resistencia del lóbulo X en el PCD también puede estar debida a una menor expresión constitutiva -y por ende menor dependencia- de *Ccp1* en los animales silvestres.

### *Proteínas de choque térmico*

El nombre de este grupo de proteínas se debe al origen de su descubrimiento: en 1974 después de someter a células de *Drosophila* a un aumento casi letal y repentino de temperatura, se apreciaba la expresión de unas proteínas desconocidas hasta el momento y que posteriormente se denominarían HSP<sup>11</sup>. Como se comprobó más tarde, este era uno de los mecanismos más primitivos de protección celular puesto que esta respuesta se observó en multitud de organismos, desde bacterias hasta humanos. Desde entonces se ha acumulado una amplia bibliografía sobre las HSP y sus distintos papeles (Schlesinger, 1990, De Maio, 1999). Aunque su descubrimiento está relacionado con el estrés térmico, su inducción no está limitada a ello y su expresión puede ser estimulada por distintos tipos de estrés celular, es por ello que a menudo se las puede denominar **proteínas de respuesta al estrés**, aunque en la bibliografía científica se suelen seguir denominando de choque térmico. Del mismo modo que su expresión no se ve inducida únicamente por estrés térmico, sus funciones no se limitan a proteger de este y se ha visto que tienen características muy variadas:

1. Las HSP pueden estar inducidas por otros agentes de estrés: isquemia, virus, compuestos tóxicos, etc. Estas actúan como chaperonas y evitan la precipitación de otras proteínas (Whitley et al., 1999).
2. Su expresión puede ser constitutiva, de modo que ayudan al plegamiento de nuevas proteínas (Whitley et al., 1999; Armstrong et al., 2000).
3. No tienen por qué actuar como chaperonas. También pueden tener función de transporte de otras proteínas (Borges et al., 2005), influir en la respuesta inmune (Zuo et al., 2016) o inhibir la apoptosis (Kostenko y Moens, 2009).

Con relación a su función como chaperonas, se ha visto que durante una situación de estrés el medio celular cambia de una manera o de otra: pH, presión, temperatura... de modo que muchas proteínas se desnaturalizan y precipitan, agravando la situación que esté sufriendo la célula. Las HSP tienen una función clave en estas situaciones: contribuyen a los procesos de reparación celular ayudando al plegado y a la correcta formación de nuevas proteínas (Pelham, 1986), y contribuyendo a que las proteínas precipitadas puedan volver a ser solubilizadas y que la célula aumente así su tolerancia al estrés (De Maio, 1999).

---

<sup>11</sup> Del inglés *Heat Shock Proteins*

Las proteínas de choque térmico o HSP son un gran grupo de proteínas que se clasifican y se nombran en función de su peso molecular. Algunos ejemplos de ello pueden ser los siguientes (Armstrong et al., 2001; Dubey et al., 2015):

1. HSP grandes cuando su peso es mayor a 100 kDa.
2. HSP90 cuando su peso es de 81-90 kDa.
3. HSP70 cuando su peso es de 65-80 kDa
4. HSP60 cuando el peso es de 55-64 kDa.
5. HSP pequeñas o sHSP<sup>12</sup> cuando pesan 20-30 kDa.

Centrándonos en las sHSP, además de tener en común un peso molecular menor a los 34 kDa, esta familia posee un dominio muy conservado en el extremo C-terminal. Este dominio es el denominado alfa-cristalino y es el responsable de su función como chaperonas (Arrigo, 2007). Mediante dicho dominio, las sHSP se unen y forman dímeros que posteriormente pueden formar oligómeros. Los oligómeros resultantes se pueden unir a las proteínas en un paso previo a su precipitación, para evitar que esta sea irreversible (Ehrnsperger et al., 1997).

### **Proteína de choque térmico de 25 kDa**

Existe una gran variedad de sHSP, pero merece la pena destacar la *Heat Shock Protein* de 25 kDa (HSP25) debido a sus demostrados efectos neuroprotectores en modelos murinos como los que hemos visto anteriormente. Sin embargo, antes de ahondar más en su naturaleza, haremos un inciso sobre su confusa nomenclatura. De forma general se la conoce como HSP27 en humanos y otros mamíferos (Arrigo, 2007); sin embargo, en los ratones no es así, ya que aunque la proteína murina presente una alta homología con HSP27 (Vidyasagar et al., 2008), pesa 2 kDa menos y por eso se denomina HSP25. Además, recientemente, cuando se habla de esta proteína en humanos se ha extendido la nomenclatura de HSP $\beta$ 1, o HSPB1 para simplificarlo. Técnicamente, HSP25, HSP27 y HSPB1 no son la misma proteína, sino que son **proteínas homólogas**. Sin embargo, aunque este concepto es sencillo, debido a su similitud, nos encontramos ejemplos en los que los autores intercambian los términos y hablan indistintamente de HSP27 o HSPB1 en ratones (Huang et al., 2007; Picard et al., 2016). Otro ejemplo se puede comprobar cuando se revisa la bibliografía de algunos artículos que hablan de HSP27 y citan artículos sobre HSP25 o HSPB1 o viceversa (Chung et al., 2016). En la presente Tesis, vamos a utilizar la nomenclatura más precisa, e independientemente de cómo lo haga el artículo que la que se cite, nos referiremos a la proteína de choque térmico en cuestión como HSP25 cuando se trate de la proteína en ratones, HSP27 cuando sea en otros mamíferos (ratas generalmente) y HSPB1 en humanos. Cuando se hable de las características comunes a ambas proteínas se hablará de HSP25/27.

Se ha comprobado que HSP25 se expresa de manera constitutiva en la corteza cerebelosa del ratón, y es llamativo que las células de Purkinje inmunorreactivas a HSP25 se encuentren, de nuevo, agrupadas en bandas parasagitales simétricas en el vermis y en las zonas flocular y paraflocular (**Fig. 15**; Armstrong et al., 2000). Como hemos visto, en el modelo de degeneración cerebelosa *Lurcher* se ha comprobado que existe expresión constitutiva de HSP25

---

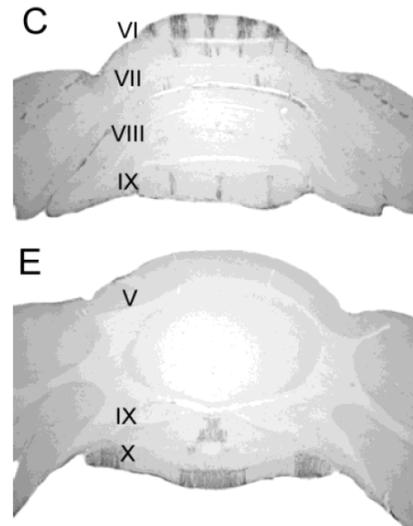
<sup>12</sup> Del inglés *small Heat Shock Protein*

y parece tener un efecto neuroprotector: las células de Purkinje que sobreviven más tiempo en la región floculonodular expresan HSP25 (Duffin et al., 2010). El modelo NPC1 también presenta un caso similar. Como ya se ha descrito anteriormente, presenta una degeneración progresiva del vermis cerebeloso, siendo el lóbulo X el menos vulnerable de todos los lóbulos. Mediante un cruce masivo de datos de hibridación *in situ*, un estudio comprobó que, precisamente, existe una expresión constitutiva de HSP25 en el lóbulo X. Posteriormente, se provocó por un lado una inducción y por otro lado una inhibición de la expresión de HSP25 en el cerebelo y se observó que la supervivencia celular aumentaba y disminuía respectivamente, además de que los síntomas de la patología asociada a la enfermedad NPC1 también disminuían o aumentaban (Chung et al., 2016).

Al igual que la mayoría de sHSP, HSP25 actúa como una chaperona. Se ha demostrado que su homóloga HSP27 interviene en la estabilidad de la actina, plegado de otras proteínas, daño oxidativo y apoptosis (Arrigo, 2007). No obstante, se sabe que HSP27 en otros modelos no murinos es un inhibidor directo de la apoptosis a distintos niveles: se une y bloquea al citocromo C (Bruey et al., 2000) y a la caspasa-3 (Pandey et al., 2000), inhibe la activación de BAX (Havasi et al., 2008) y la señalización DAXX (Charette y Landry, 2000), todos ellos pasos de gran importancia en la señalización de la apoptosis celular. Sin embargo, estos procesos no los realiza HSP27 en su forma nativa, sino que es necesario que esta se encuentre fosforilada. Por el momento, salvo para la señalización de DAXX, se desconoce por qué esta fosforilación es imprescindible para algunos de los procesos en los que interviene (Chung et al., 2016). HSP25/27 pueden ser fosforiladas en sus distintos residuos de serina (HSP-P-Ser): Ser-15, Ser-78, Ser-82 o Ser-86, en función de si se trata de HSP25 o HSP27 (Rogalla et al., 1999). Por otro lado, no todas las fosforilaciones les confieren capacidad antiapoptótica. Y se ha comprobado que HSP25/27-P-Ser15 y HSP25/27-P-Ser86 son las formas con esta capacidad, siendo la proteína quinasa C- $\delta$  o PKC- $\delta$  la enzima que las fosforila (Maizels et al., 1998). En el modelo NPC1 se ha observado que HSP25-P-Ser15 y PKC- $\delta$  coexpresan en los lóbulos posteriores y nodular (Chung et al., 2016).

De esta manera, se ha hablado mucho de la presencia de HSP25 en las regiones posteriores del cerebelo y de su capacidad neuroprotectora. Sin embargo, como hemos visto en la **Fig. 15**, en ocasiones se ha comprobado la presencia de HSP25 en otros lóbulos, como el VI, a pesar de que no se muestran como regiones de especial resistencia (Lewis et al., 1999; Armstrong et al., 2000). Esto nos puede indicar que, aunque HSP25 puede ser un factor clave en la resistencia de las diversas regiones, parece que no es suficiente por sí misma para proteger de la neurodegeneración.

Como hemos visto, HSP25 y sus homólogas se expresan ampliamente en varios modelos animales en el lóbulo X y se ha comprobado que tiene efectos protectores sobre esta región. Sin embargo, la bibliografía sobre HSP25 en el modelo PCD es prácticamente inexistente y sería de gran interés conocer si esta proteína tiene el mismo protagonismo en este animal que en el resto de los modelos de degeneración cerebelosa, pudiendo ser un denominador común de la resistencia intrínseca al lóbulo X.



**Figura 15. Expresión de HSP25 en el modelo murino CD1.** La expresión de HSP25 forma un patrón de bandas localizado en los lóbulos VI-VII y en los IX-X. Modificado de Armstrong et al., 2000.



## Hipótesis y objetivos



El ratón PCD es un modelo genético que sufre ataxia cerebelosa debido a la muerte de las células de Purkinje. Sin embargo, el lóbulo X del cerebelo de este animal resiste dicha degeneración neuronal más tiempo que el resto de los lóbulos. Es llamativo, además, que esta resistencia en el cerebelo sea constante en etiologías distintas de ataxia, e incluso en especies diferentes. Ello podría implicar que los mecanismos que subyacen a esta resistencia podrían ser aplicables para otras enfermedades neurodegenerativas, diferentes a las ataxias espinocerebelosas.

En el ratón PCD, la muerte de las células de Purkinje en el cerebelo es evidente a partir de P20 y, aunque no es tan severa, también existe muerte de las células mitrales del bulbo olfativo a partir de P70. Por otro lado, estudios previos del laboratorio han demostrado en ratones silvestres que existe un fuerte pico de expresión de *Ccp1* en el cerebelo a P15-P20 y una expresión mínima en el bulbo olfativo a P60-P80. La expresión de *Ccp1* en controles coincide en intensidad y en tiempo con la degeneración neuronal que sufre el ratón PCD. Parece pues que en el ratón silvestre, el nivel de expresión de *Ccp1* en un tejido o en una región encefálica es determinante para alcanzar la homeostasis de estos: a mayor expresión de *Ccp1*, mayor parece la dependencia para alcanzar la homeostasis en caso de falta de *Ccp1*. Por ello, es posible que parte de la menor vulnerabilidad del lóbulo X a la degeneración neuronal en el ratón PCD sea debida a una menor dependencia a la expresión de *Ccp1*.

Por otro lado, se ha comprobado que la falta de *Ccp1* en otros tejidos del encéfalo no es tan dañina como en el cerebelo, esto es debido a que existe una mayor expresión de otras proteínas de la misma familia de *Ccp1*, como *Ccp6*. De hecho, una inhibición simultánea de la expresión de *Ccp1* y *Ccp6* causa daños más generalizados en todo el encéfalo que los que sufre el ratón PCD. Por otro lado, existen experimentos que demuestran que el déficit de TLL1, la proteína con la función inversa a la de CCP1, anula los efectos neurodegenerativos de la mutación *pcd*.

Por último, se ha comprobado en otros modelos animales que HSP25 es una proteína con demostrados efectos neuroprotectores en el lóbulo X del cerebelo. Además de su actividad como chaperona, su estado de fosforilación también parece ser clave a la hora de detener los procesos apoptóticos. De hecho, estudios previos han mostrado el efecto neuroprotector de HSP25-P y de la quinasa que la produce, PKC- $\delta$ .

Por lo tanto, la **hipótesis** de la presente Tesis Doctoral es que *“el lóbulo X del cerebelo es menos vulnerable a la mutación pcd y, además, presenta un fenotipo celular neuroprotector; por ello es una región resistente a la degeneración neuronal”*.

En función a la hipótesis planteada se desglosarán los siguientes objetivos generales y específicos:

- 1. Analizar los patrones normales de expresión de *Ccp1* en el lóbulo X y el resto de los lóbulos cerebelosos.**
  - a. Estudiar la expresión génica de *Ccp1* en animales sin la mutación para conocer su patrón normal.
- 2. Analizar los patrones de expresión normales y patológicos de *Ccp4*, *Ccp6* y *Ttll1* en el lóbulo X y el resto de los lóbulos cerebelosos.**
  - a. Comprobar la expresión génica de *Ccp4*, *Ccp6* y *Ttll1* en ratones control y PCD para conocer su expresión normal y patológica.
  - b. Examinar CCP1, CCP4, CCP6 y TTLL1 a nivel proteico en el mismo tejido.
- 3. Analizar la expresión de factores neuroprotectores en el lóbulo X de los ratones PCD.**
  - a. Conocer la expresión de HSP25 en el lóbulo X de ratones silvestres y PCD.
  - b. Examinar la expresión de HSP25-P en el lóbulo X de ratones silvestres y PCD.
  - c. Analizar la expresión de PKC- $\delta$  en el lóbulo X de ratones silvestres y PCD.

## Material y métodos



### Genotipado de animales

Para esta Tesis Doctoral se han utilizado ratones (*Mus musculus* L. 1758; Muridae, Rodentia, Mammalia) de la estirpe híbrida C57/DBA, establecidos en una colonia en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca. Los ratones se mantuvieron, manipularon y sacrificaron según lo establecido en la directiva del Consejo de las Comunidades Europeas (2010/63/UE) y la Legislación Española (RD 53/2013 y ley 32/2007) vigentes para el uso y cuidado de animales de laboratorio. Asimismo, el Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca aprobó los procedimientos realizados (números de referencia 291 y 613)

En este trabajo se han utilizado ratones silvestres y mutantes PCD con el alelo *pcd*<sup>fl</sup>. Para la obtención de ratones PCD se cruzaron ratones heterocigotos, debido a que los ratones PCD macho son estériles y que las hembras tienen dificultades para cuidar a las crías, lo que aumenta enormemente la mortalidad de la camada. De estos cruces, la herencia esperada sigue una distribución mendeliana:  $\frac{1}{4}$  +/+,  $\frac{1}{2}$  +/*pcd* y  $\frac{1}{4}$  *pcd/pcd*. Los ratones PCD se pueden distinguir fácilmente de los silvestres a partir de P25 debido a su tamaño reducido o la ataxia cerebelosa que presentan. Sin embargo, es necesario comprobar el genotipo con antelación a esta edad ya que en la presente Tesis Doctoral se han utilizado ratones PCD más jóvenes, sin fenotipo aún aparente. Además, los animales heterocigotos para la mutación no se pueden distinguir de los ratones silvestres. Por todo ello, se determinó el genotipo de los ratones mediante el análisis de diferencias genéticas entre razas utilizando PCR.

Como la mutación *pcd* de nuestra estirpe se encuentra en la región promotora del gen y no se ha podido identificar, el peso molecular del alelo mutado y del silvestre no se pueden distinguir por tamaño. Por ello, se analizó el peso molecular de los microsatélites D13Mit250 y D13Mit283; estos microsatélites son secuencias repetitivas de DNA que están ligados al gen *Ccp1*. El microsatélite D13Mit250 de la estirpe C57 (ligado al trasfondo genético *pcd*) tiene 130 pares de bases (pb) y el de la estirpe DBA (ligado al gen silvestre) tiene 116 pb. Por otro lado, el microsatélite D13Mit283 de la estirpe C57 tiene 114 pb y el de la estirpe DBA tiene 136 pb. La diferencia de pares de bases, y, por consiguiente, de tamaños, nos va a permitir distinguir el alelo mutado y el silvestre (**Fig. 16**).

### Extracción de DNA

La extracción de DNA comienza tomando una pequeña muestra de la cola de las crías a P7-P10, momento que se aprovecha para marcar individualmente a los ratones por perforación auricular. La biopsia de la cola se introduce a 55 °C durante 3 h en 430 µl de tampón de lisis (ver en *Soluciones de uso común*). Después de la incubación se agita en un vórtex y se centrifuga 2 min a 16 g. El sobrenadante se pasa a otro tubo, se le añaden 430 µl de isopropanol y se agita. Se vuelve a centrifugar 10 min a 16 g y se desecha el sobrenadante; al precipitado se le añaden 430 µl de etanol al 70% (v/v) y se homogeneiza con un vórtex para limpiar el DNA. Dicho homogenado se centrifuga de nuevo 10 min a 16 g para desechar el sobrenadante, el precipitado se deja secar unos 30 min y finalmente se añaden 20-100 µl de agua Elix en función de la cantidad observada de DNA (en el paso del isopropanol). La muestra obtenida y resuspendida en agua se puede utilizar para el siguiente paso, o almacenar a -25 °C.

### Amplificación del DNA

Con el DNA extraído, el siguiente paso fue amplificar mediante PCR los microsatélites D13Mit250 y D13Mit283. El medio que se utilizó estaba compuesto por tampón de reacción para

## Material y métodos

la *Taq* Polimerasa<sup>13</sup> 1X (Promega, Madison, EUA<sup>14</sup>), *Taq* polimerasa a 0,125 U/μL (Promega), desoxinucleótidos trifosfato 0,2 mM (dNTP; Promega), dimetilsulfóxido al 5% (v/v), MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, pareja de cebadores a 2,5 μM cada uno (ver **Tabla 2**) y 1 μL del DNA muestra.

**Tabla 2. Oligonucleótidos empleados para genotipar la mutación *pcd***

D13Mit250	Secuencias	D13Mit283	Secuencias
Sentido	ACACTCATTTCATGCACGA	Sentido	GGAAGCAGTCTCCTGCCTC
Antisentido	AGGCCTCAAATCTCACAAGTAGG	Antisentido	GAGAGGTGGCACATGAGGTT

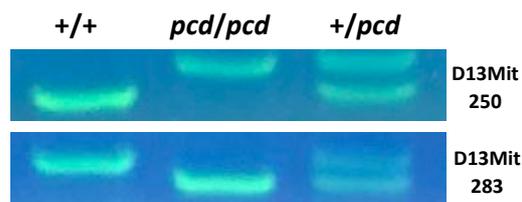
Con el medio descrito y los oligonucleótidos anteriores se llevó a cabo una PCR utilizando el programa descrito en la **Tabla 3**.

**Tabla 3. Programas de la PCR para genotipar la mutación *pcd***

D13Mit250	Paso 1	Paso 2 (40 ciclos)			Paso 3	Paso 4
Temperatura °C	94	94	54	72	72	4
Tiempo (min)	5	1	1	1,5	10	∞
D13Mit283	Paso 1	Paso 2 (40 ciclos)			Paso 3	Paso 4
Temperatura °C	94	94	53	72	72	4
Tiempo (min)	5	1	1	1,5	10	∞

Una vez finalizada la PCR, los fragmentos se separan por electroforesis en un gel de agarosa MS8 (Condalab, Madrid) al 3% (p/v) en tampón Tris-borato ácido etilendiaminotetracético (Tris-borato EDTA; ver en *Soluciones de uso común*). Antes de la solidificación del gel, se añadieron 5 μl del intercalante de DNA RedSafe™ (iNtRON Biotechnology, Seongnam, República de Corea) al gel para poder visualizar los fragmentos bajo la luz ultravioleta. Como se ha explicado anteriormente, el microsatélite D13Mit250 de la estirpe ligada al alelo mutante es de mayor tamaño que el ligado al alelo silvestre, por lo que la banda correspondiente al genotipo *pcd* se desplaza menos distancia. Con el microsatélite D13Mit283 sucede lo contrario, y la banda correspondiente al alelo mutado es más ligera y se desplaza más que la silvestre (**Fig. 16**).

**Figura 16. Fotografías de un gel de agarosa correspondiente al genotipado para la mutación *pcd*.** En la fotografía superior se muestra el genotipado para el microsatélite D13Mit250 y en la inferior para el microsatélite D13Mit283. De izquierda a derecha, se pueden observar en ambas imágenes las bandas correspondientes a un ratón control (+/+), un ratón PCD (*pcd/pcd*), y un animal heterocigoto (+/*pcd*).



## Análisis histológico

Para el análisis histológico se realizaron diversas técnicas en función a las necesidades planteadas que se nos plantearon. Para estudiar la expresión proteica de HSP25, HSP25-P o PKC-δ se utilizaron técnicas inmunofluorescentes. Para comprobar la expresión de calbindina se realizaron técnicas inmunohistoquímicas con diaminobencidina (DAB) y posterior tinción con azul de toluidina. También se tiñó con azul de toluidina el resto de tejido no utilizado para biología molecular, comprobando así la correcta microdissección del lóbulo X.

<sup>13</sup> *Taq* polimerasa es la polimerasa de la bacteria termófila *Thermus aquaticus* (Brock y Freeze, 1969).

<sup>14</sup> Estados Unidos de América

### *Obtención del tejido*

Para analizar la expresión de calbindina y HSP25 se usaron 50 ratones repartidos en 10 grupos de 5 animales cada uno: 5 grupos correspondieron a ratones PCD y 5 a controles; a su vez se analizaron 5 edades distintas para cada genotipo: P15, P20, P25, P30 y P35. Los animales se anestesiaron con hidrato de cloral 0,9% (p/v) a una dosis de 10 µl/g peso del animal por vía intraperitoneal. Una vez que dejaron de observarse reflejos palpebrales, plantar y de pinzamiento de la cola, los animales se sacrificaron mediante exanguinación/perfusión a través del ventrículo izquierdo con ayuda de una bomba peristáltica. Para el lavado de sangre se utilizó solución salina 0,9% (p/v) y a continuación se fijó el tejido durante 15 min con Somogyi sin glutaraldehído (ver en *Soluciones de uso común*). Transcurridos los 15 min de perfusión, se extrajo el cerebelo y se mantuvo sumergido en Somogyi durante 2 h para postfijarlo.

Se realizaron varios lavados de las muestras con tampón fosfato (PB<sup>15</sup>) 0,1 M (3x10 min) tras lo que se sumergieron en una solución de sacarosa al 30% (p/v) en PB 0,1M para su crioprotección y posterior congelación. Los bloques de tejido se seccionaron con un micrótopo de deslizamiento (Leica SM 2000, Wetzlar, Alemania) con una unidad de congelación acoplada (Frigomobil. Leica). Se realizaron secciones paralelas al plano sagital de 30 µm de espesor, que se recogieron de forma seriada en una placa de 24 pocillos. Los cortes se lavaron con PB 3x10 min y se almacenaron a -25 °C protegidos con mezcla congeladora (ver en *Soluciones de uso común*).

### *Inmunohistoquímica (fluorescencia)*

Se seleccionaron las secciones más cercanas a la zona central del vermis, debido a que aquí es donde se pueden observar todos los lóbulos en su mayor tamaño; además, en cortes coronales se ha comprobado que la expresión de HSP25 se distribuye en 3 bandas sagitales, localizándose una de estas en la zona más central de vermis. Las secciones se lavaron primero con PB 0,1 M (3x10 min), y después con tampón fosfato salino (PBS<sup>16</sup>; ver en *Soluciones de uso común*; 3x10 min). Los cortes se incubaron durante 72 h a 4 °C en el antisero primario, compuesto por Tritón X-100 0,2% (v/v), suero de cabra 5% (v/v), los anticuerpos frente a calbindina y HSP25 (ver **Tabla 4**), todo ello diluido en PBS.

Después de la incubación se lavaron de nuevo con PBS (3x10 min) y se incubaron a temperatura ambiente durante 90 min en el antisero secundario, compuesto únicamente por anticuerpo α-IgG de conejo unido al fluorocromo Cy2 y el anticuerpo α-IgG de ratón unido al fluorocromo Cy3. En los últimos 10 min de incubación se añadió 4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI) 1:10.000 (v/v) para marcar los núcleos celulares. Tras la incubación se hizo un breve lavado con PBS de las secciones, que a continuación se montaron en un portaobjetos gelatinizado (ver en *Soluciones de uso común*), tras lo que se cubrieron con un cubreobjetos usando un medio anti-desvanecimiento (ver en *Soluciones de uso común*).

Por su parte, el análisis de PKC-δ y la versión fosforilada de HSP25 supuso un problema: los anticuerpos comerciales disponibles estaban hechos en conejo, de manera que el antisero secundario no permitiría discernir el marcaje de HSP25-P del de PKC-δ en una inmunohistoquímica fluorescente doble. Por lo tanto, para solventarlo, se hizo una inmunohistoquímica secuencial: esta consiste en hacer una primera incubación con el anticuerpo α-HSP25-P y una primera incubación con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo

<sup>15</sup> Del inglés *phosphate buffer*

<sup>16</sup> Del inglés *phosphate buffered saline*

unido al fluoróforo Cy3 (rojo) en saturación. Una vez marcada HSP25-P, se realizó una segunda incubación con el anticuerpo frente a PKC- $\delta$  y, por último, una segunda incubación con el anticuerpo secundario contra la IgG de conejo unido al fluoróforo Cy2 (verde).

Los lavados con PBS y la primera incubación con el anticuerpo primario se realizaron igual que lo descrito anteriormente; el antisuero contenía Triton X-100 0,2% (v/v), suero de cabra 5% (v/v) y el anticuerpo frente a HSP25-P. Después de 72 h a 4 °C, el tejido se incubó con el anticuerpo secundario con Cy3 a 1:50 en PBS durante 5 h. Se aumentó notablemente la concentración del anticuerpo secundario y el tiempo de incubación para saturar los epítomos del anticuerpo primario y que en la subsecuente incubación con el otro anticuerpo secundario no hubiese posibilidad de unión al anticuerpo anti HSP25-P. Después de hacer la inmunohistoquímica para HPS25-P, las secciones se lavaron con PBS (6x10 min) y se incubaron 72 h a 4 °C con otro antisuero primario con suero de cabra 5% (v/v) y el anticuerpo contra PKC- $\delta$ . Por último, se lavaron con PBS (3x10 min) y se incubaron con el anticuerpo  $\alpha$ -IgG de conejo con Cy2 a 1:500 (v/v) durante 1 h; en los últimos 10 min se añadió DAPI a una dilución final de 1:10.000 (v/v). El protocolo siguió como se describió anteriormente: los cortes se montaron, secaron brevemente y cubrieron con una solución anti-desvanecimiento.

Tabla 4. Relación de anticuerpos utilizados para la técnica inmunohistoquímica.

	Anticuerpo	Dilución	Animal	Casa comercial
Anticuerpos primarios	Calbindina	1:2.000	Ratón	Swant (Burgdorf, Suiza)
	HSP25	1:1.000	Conejo	Enzo Life Sciences (Farmingdale, EUA)
	PKC- $\delta$	1:2.000	Conejo	Invitrogen (Carlsbad, EUA)
	HSP25-P-S15	1:1.000	Conejo	BioWorld Technology (St. Louis Park, EUA)
Anticuerpos secundarios	Cy2 anti- <i>Mouse</i>	1:500	Cabra	Jackson ImmunoResearch (West Grove, EUA)
	Cy2 anti- <i>Rabbit</i>	1:500	Cabra	Jackson ImmunoResearch
	Cy3 anti- <i>Rabbit</i>	1:500 o 1:50	Cabra	Jackson ImmunoResearch
	Anti- <i>Rabbit</i> (biotinilado)	1:300	Cabra	Jackson ImmunoResearch

### Controles de especificidad

Era necesario asegurar que las técnicas inmunohistoquímicas empleadas eran específicas para los antígenos buscados, más si tenemos en cuenta que la inmunohistoquímica secuencial puede provocar más marcaje inespecífico que una inmunohistoquímica simple. Para ello se realizaron los siguientes controles:

- Omitir los anticuerpos primarios y comprobar si los anticuerpos secundarios se unían de forma inespecífica.
- Omitir los anticuerpos secundarios para comprobar si existía fluorescencia inespecífica.
- En la inmunofluorescencia doble y la doble secuencial se omitía uno de los anticuerpos primarios para comprobar si los anticuerpos secundarios se unían de forma inespecífica

al anticuerpo primario incubado. Este control se realizó igualmente para cada uno de los antígenos buscados.

En ningún caso se observó marcaje inespecífico, lo que validó todas las técnicas utilizadas.

### *Recuento celular*

Las muestras se visualizaron bajo un microscopio de epifluorescencia (Olympus Provis AX70, Tokio, Japón). Las imágenes se tomaron con una cámara acoplada (Olympus DP70) y se mejoró su calidad mediante el programa Adobe Photoshop® Creative Cloud 2015 (Adobe Systems Software, Dublín, Irlanda). Se hizo un recuento del número de células de Purkinje positivas a calbindina, positivas a HSP25 y utilizando el programa NeuroLucida® se midió la longitud de la capa de las células de Purkinje en el lóbulo X. Con el número de células positivas a calbindina, a HSP25 y la longitud de la capa se calculó la densidad lineal para ambos marcadores expresada en células/mm. Finalmente, para conocer de manera aproximada cuántas células de Purkinje expresaban HSP25 del total del cerebelo, y asumiendo que el marcaje con calbindina marca la práctica totalidad de las células de Purkinje (Celio, 1990), se calculó el porcentaje de células positivas a HSP25. Con estos datos y con ayuda del programa SPSS Statistics 26 (IBM SPSS, Armonk, EUA) hicimos una comparación entre ratones PCD y control a las distintas edades mediante el test U de Mann-Whitney. También se compararon estos datos entre las distintas edades para cada grupo experimental mediante el test Kruskal-Wallis. Cuando se encontraron diferencias significativas con este test ( $p < 0,05$ ) se realizó el test *post hoc por pasos en sentido descendente*. Esta prueba nos permite agrupar nuestras edades en los subgrupos más probables cuando el test Kruskal-Wallis nos muestra diferencias significativas.

Las mediciones de PKC- $\delta$  y de HSP25-P se realizaron de forma similar: se hizo un recuento de las células de Purkinje positivas a PKC- $\delta$  y de positivas a HSP25-P, y se midió la capa de las células de Purkinje. Con estos datos se calcularon las densidades lineales en células/mm y se analizaron estadísticamente comparando los datos de los ratones PCD frente a los controles mediante U de Mann-Whitney o las diferencias entre edades para cada grupo mediante Kruskal-Wallis.

### *Inmunohistoquímica (DAB) y tinción con toluidina*

Cuando se realizaron los recuentos de células de Purkinje positivas a calbindina y a HSP25, se confirmó la existencia, en algunos casos, de células positivas a HSP25, pero no a calbindina (ver en *Resultados*). De este modo, podíamos evidenciar la existencia de células de Purkinje que no expresaban calbindina, lo que contradecía la bibliografía utilizada. Aunque su número fuese escaso, esto suponía un problema: si tenemos en cuenta que usamos calbindina como marcador de células de Purkinje totales, en nuestros recuentos se podría obviar un cierto número de este tipo de neuronas, lo que alteraría los porcentajes finales. Por ello, quisimos comprobar la magnitud de este sesgo, por lo que decidimos analizar la expresión de dicha proteína en las células de Purkinje, al mismo tiempo que visualizamos los núcleos de todas las células de Purkinje.

En una primera instancia, se intentaron realizar estos nuevos recuentos con las muestras que ya habíamos procesado con DAPI y calbindina con inmunofluorescencia, pero los núcleos de las células de Purkinje son muy tenues. Esto sumado a la presencia de numerosos granos con un núcleo más intenso en secciones de 30  $\mu\text{m}$ , nos impidió identificar adecuadamente los

## Material y métodos

núcleos de las células de Purkinje. Por ello, hicimos pruebas con yoduro de propidio, que es otro marcador fluorescente que permite diferenciar bien el núcleo y el citoplasma, pero obtuvimos los mismos resultados. Por último, se optó por aplicar una técnica inmunohistoquímica con DAB para marcar la calbindina y una tinción con azul de toluidina para marcar los núcleos, en secciones de menor grosor.

Esta comprobación se realizó solo a P35 ya que era la edad donde más se apreciaba el fenómeno de las células de Purkinje que no expresaban calbindina (a otras edades, de existir, su número fue despreciable). De este modo, se utilizaron 3 ratones PCD a P35.

Los animales se sacrificaron y se perfundieron mediante exanguinación y perfusión del mismo modo que para las técnicas anteriores. Sin embargo, en este caso el tejido no se seccionó con un microtomo de deslizamiento, sino con un criostato *Microm HM 560* (Thermofisher, Waltham, EUA). Con este criostato pudimos cortar el tejido de forma seriada en secciones de 10  $\mu\text{m}$ , colocándolas directamente en portaobjetos. El menor grosor de las secciones nos permitió visualizar los núcleos de las células de Purkinje más eficazmente, debido a que apenas se solapaban con los de los granos.

Sobre las secciones del portaobjetos se añadieron 400  $\mu\text{l}$  de un antisuero primario con la misma composición que el que se utilizó para marcar calbindina con fluorescencia, pero sin anticuerpos frente a HSP25. Se dejó incubar en una cámara húmeda durante 72 h a 4 °C y tras ello se lavó con PBS (3x10 min). Tras los lavados, el tejido se incubó durante 1,5 h con un antisuero que contenía anticuerpo secundario biotinilado, diluido 1:300. Tras este paso, las secciones se volvieron a lavar con PBS (3x10 min) y se incubaron con un complejo de avidina-biotina-peroxidasa del kit comercial Vectastain® ABC Kit, *peroxidase* (Vector Laboratories, Burlingame, EUA), diluido 1:200 en PBS, durante 1 h a temperatura ambiente. Mediante este paso, se logran asociar moléculas de peroxidasa a los anticuerpos secundarios biotinilados, a su vez unidos a la proteína de interés (calbindina). De nuevo, se volvió a lavar con PBS (3x10 min) seguido de un lavado con el tampón Tris-HCl 0,2 M pH 7,6. Para finalizar y revelar la técnica inmunohistoquímica, se añadió al tejido un medio que contenía agua oxigenada al 0,003% y DAB al 0,02%, todo ello diluido en Tris-HCl 0,2 M pH 7,6. La peroxidasa cataliza el agua oxigenada liberando agua y O<sub>2</sub>. El O<sub>2</sub> oxida a la DAB y esta se vuelve insoluble, precipita y toma un color marrón que nos permite visualizar dónde se han unido originalmente los anticuerpos primarios frente a calbindina. Esta reacción se debe revisar bajo el microscopio y detenerla con más tampón Tris cuando haya adquirido un contraste adecuado. Para finalizar, los portaobjetos se lavaron con PBS (3x10 min) y se procedió a su tinción con toluidina.

Los portaobjetos se introdujeron en toluidina durante 10 min, tras lo que se pasaron por una batería de alcoholes en concentración creciente, durante 5 min por cada cubeta (50%, 60%, 70%, 90%, 96%, y 3 de 100%; v/v para todas las cubetas) para deshidratar los tejidos. Finalmente se hicieron 3 aclarados de 5 min en xileno y se cubrieron usando el medio de montaje *Entellan* (Merck, Darmstadt, Alemania).

Las muestras se visualizaron bajo el microscopio y se buscaron los núcleos de las células de Purkinje sin tinción con DAB.

### *Disección del lóbulo X y control de la técnica*

Uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral es comparar la expresión génica y proteica de distintas moléculas entre el lóbulo X y el resto de los lóbulos cerebelosos. Para ello, los ratones se sacrificaron mediante dislocación cervical y posterior decapitación y se extrajo su

cerebelo en fresco rápidamente mediante un corte coronal del encéfalo. Del bloque de tejido se retiró el tronco encefálico cortando los pedúnculos cerebelosos para acceder al cerebelo por su parte ventral. De este modo, se extrajo el lóbulo X introduciendo una cuchilla por el surco que lo separa del lóbulo IX adyacente. Una vez extraído el lóbulo X, se retiraron los hemisferios cerebelosos del vermis; estos no se diseccionan antes que el lóbulo X para asegurarnos de no eliminar las partes más laterales del mismo.

Debido a que la extracción del lóbulo X a partir del vermis es un procedimiento muy delicado, se quiso comprobar su eficacia. Para ello, se utilizaron 6 ratones control, 1 por cada edad de estudio: P20, P25, P30, P35, P40 y P50. Los animales se sacrificaron y sus cerebelos se diseccionaron tal y como se ha descrito anteriormente. Los vermis sin lóbulo X se sumergieron 24 h en paraformaldehído 4% (p/v). Una vez fijados se sumergieron en sacarosa al 30% (p/v) hasta que se hundieron y se cortaron en el criostato *Microm HM 560* (Thermofisher) en secciones de 10 µm que se recogieron de forma seriada sobre portaobjetos.

Con las secciones ya en el portaobjetos, la tinción con toluidina se hizo igual que en la técnica anterior. Los portaobjetos se introdujeron en toluidina durante 10 min, se pasaron por la batería de alcoholes en concentración creciente, durante 5 min por cada cubeta. Se hicieron los 3 aclarados de 5 min en xileno y se cubrieron usando *Entellan*<sup>®</sup> (Merck).

Se visualizaron las muestras en el microscopio y se comprobó que se había seccionado correctamente el lóbulo X para cada edad.

### Análisis génico

Para analizar la expresión génica de *Ccp1*, *Ccp4*, *Ccp6* y *Ttl1* se utilizó la técnica de la PCR cuantitativa (qPCR<sup>17</sup>). La qPCR es una técnica muy útil para conocer con precisión la expresión génica de distintos tejidos en el momento exacto de su extracción. Dicha técnica se puede abordar de varias formas; para el presente trabajo se utilizó la variante de la qPCR relativa, que —a diferencia de la absoluta— nos permite estudiar la expresión génica comparándola entre dos tejidos. Para ello, se diseccionó el cerebelo, descrito anteriormente. Del tejido se extrajo el RNA total mediante un kit comercial (ver más adelante) y utilizando el RNA como molde se retrotranscribió un DNA copia (cDNA). Finalmente, con el cDNA se realizó la qPCR. Consiste en una PCR normal, con la diferencia de que al medio en el que transcurre la reacción se le añade un fluoróforo que se intercala en el DNA de doble cadena, y que solo emite una señal fluorescente cuando está intercalado en la doble cadena de DNA y no antes. Además, el termociclador es capaz de excitar con una luz de determinada longitud de onda que estimula dicha molécula fluorescente, y su respuesta puede detectarse de nuevo al final de cada ciclo de amplificación. De este modo, se puede detectar de manera indirecta cómo aumenta la cantidad de DNA de doble cadena con cada ciclo. A continuación se describirán con más detalle cada uno de los pasos de esta técnica.

### Extracción de RNA

Para este experimento se utilizaron 45 animales repartidos en distintos grupos (n = 5-7 cada uno) como se detalla en la **Tabla 5**. Todo el material utilizado para esta técnica se lavó concienzudamente y las RNAsas se inactivaron por calor seco a 230 °C durante 2 h. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical seguida de decapitación. A continuación, y con la mayor brevedad posible, se diseccionaron los cerebelos y bajo lupa se separó el lóbulo X del resto del

---

<sup>17</sup> Del inglés *quantitative Polymerase Chain Reaction*.

## Material y métodos

cerebelo, tal y como se ha descrito anteriormente, y además se retiraron los hemisferios cerebelosos. Tanto el lóbulo X como el resto del vermis se guardaron por separado en tubos eppendorf y se congelaron rápidamente sumergiéndolos en nitrógeno líquido.

**Tabla 5. Número de ratones utilizados por edad (columnas) y genotipo (filas).** Nótese que a partir de P30 no se utilizan ratones PCD debido a que la gran mayoría de sus células de Purkinje han desaparecido.

	P20	P25	P30	P35	P40	P50
Control	5	6	5	5	6	6
PCD	5	7				

La extracción de RNA se llevó a cabo mediante el kit de extracción por columna *PureLink™ RNA Mini Kit* (Invitrogen). El mismo kit comercial dispone de todos los tampones usados y descritos a continuación. Cada muestra se homogeneizó en 600 µl de tampón de lisis con β-mercaptoetanol 1:100 (v/v) con ayuda del homogeneizador Ultra Turrax T-10 basic (I.C.T, Madrid, España). El homogeneizado se pasó por una jeringuilla 30 G para asegurar que se había triturado correctamente y se centrifugó 2 min a 12 g. Se tomó el sobrenadante y se desechó el precipitado, a menudo inexistente; al sobrenadante se le añadieron 600 µl de etanol 70% (v/v) y se mezcló con un vórtex. A continuación, la nueva mezcla se añadió a la columna y se centrifugó 30 s a 12 g; de este modo, el RNA se quedaba adherido a la columna que actuaba como filtro y el medio sin RNA pasaba libremente y se desechaba acto seguido. Después, el RNA se limpió de impurezas mediante 4 lavados con 2 tampones de lavado distintos (2 lavados con *Wash buffer I* y otros 2 lavados con *Wash buffer II*) añadiéndolos a la columna, centrifugándola de nuevo y desechando los medios sobrantes. Además, después del primer lavado con el primer tampón se utilizó el kit de DNasas *PureLink™ DNase* (Invitrogen) para destruir los restos de DNA que quedasen unidos a la columna: en cada columna se añadieron 80 µl de un tampón compuesto por 8 µL de *DNase Buffer 10X*, 62 µL de agua libre de RNasas y 10 µL de DNasas y se dejó actuar durante 15 min a temperatura ambiente. La columna se limpió de DNasas cuando se hizo el segundo lavado con *Wash buffer I*. Una vez realizados los 2 lavados con *Wash Buffer II*, se secó la columna mediante una última centrifugación sin añadir ningún tampón. Finalmente, se añadieron 30 µl de agua libre de RNasas y se esperó 1 min al menos antes de centrifugar: el agua cambia de pH en la columna y provoca la separación del RNA de la misma, de modo que el RNA se disuelve en el agua y, al centrifugar, queda almacenado en un tubo nuevo.

Una vez extraído, fue necesario medir la concentración y pureza del RNA. Con ayuda de un espectrofotómetro *Nanophotometer IMPLEN Pearl* (IMPLEN, Múnich, Alemania), se pudo conocer la concentración de RNA en las muestras y, además, se comprobó si la extracción había sido la adecuada de acuerdo con los perfiles de absorbancia obtenidos. El espectrofotómetro mide la concentración utilizando distintas frecuencias de onda, entre ellas una de 260 nm y otra de 280 nm, y la relación entre estas dos debe ser cercana a 2 cuando se trata de RNA; valores por encima o por debajo indicarían la presencia de contaminación. Una vez conocida la concentración se pudo proceder al siguiente paso, la retrotranscripción.

### Retrotranscripción

La retrotranscripción, o transcripción reversa, implica el uso de una polimerasa capaz de polimerizar una cadena de cDNA a partir de un RNA monocatenario como molde. La enzima responsable es la retrotranscriptasa, presente en la naturaleza en la familia de virus *Retroviridae*.

Para este paso se utilizó el kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Invitrogen), que nos permite sintetizar cDNA a partir de 0,02 a 2 µg de RNA. Para que la reacción fuese

homogénea en todos los grupos de estudio, se usaron 596 ng de RNA en 14,2  $\mu$ L por muestra; esta concentración específica fue la mayor obtenida entre las muestras más diluidas, asegurándonos así la obtención de resultados de retrotranscripción para todas y cada una de las muestras.

Siguiendo el protocolo del kit, para cada reacción se usaron 5,8  $\mu$ L de un medio compuesto por: 2  $\mu$ L de 10X RT Buffer, 0,8  $\mu$ L de 25X dNTP Mix, 2  $\mu$ L de 10X RT Random Primers y 1  $\mu$ L de MultiScribe™ Reverse Transcriptase. A este medio se le añadieron 14,2  $\mu$ L de cada muestra de RNA diluida en agua MilliQ, de modo que hubiese 596 ng de RNA total. Las muestras se mezclaron con el vórtex y se centrifugaron brevemente antes de ponerlas en el termociclador con el programa descrito en la **Tabla 6**.

**Tabla 6. Programa del termociclador para la retrotranscripción**

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
Temperatura (°C)	25	37	85	4
Tiempo (min)	10	120	5	$\infty$

#### PCR cuantitativa

La qPCR utilizada en el presente trabajo es la qPCR relativa: mediante el cDNA obtenido, la técnica nos permite estudiar de forma indirecta la cantidad de RNA que se ha transcrito de nuestros genes de interés. Al ser relativa, podremos conocer si la expresión de un gen varía entre dos grupos: en nuestro caso, el lóbulo X frente al resto de lóbulos del vermis. Además, para que la cuantificación se ajuste de forma más realista, los datos deben normalizarse con un gen de expresión constitutiva (*housekeeping*). Dos de los genes constitutivos más utilizados son la  $\beta$ -actina o la Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*Gapdh*); debido a que la  $\beta$ -actina es una proteína citoesquelética y el ratón PCD tiene afectado el citoesqueleto, se optó por usar la *Gapdh* como gen constitutivo.

Los oligonucleótidos o cebadores para *Ccp1* y *Gapdh* se tomaron de Baltanás et al. (2013). Por otro lado, los oligonucleótidos para *Ccp4*, *Ccp6* y *Ttl1* (**Tabla 7**) se diseñaron mediante la herramienta on-line *Universal Probelibrary Assay Design Center* de Roche (no disponible desde el 31 de diciembre de 2020). El diseño de los cebadores siempre se realizó cumpliendo con una serie de condiciones: cada cebador debía tener un tamaño aproximado de 20 pb; la temperatura de fundido (*melting*) del amplicón debía rondar los 60 °C; y, por último, el amplicón se debía encontrar entre dos exones. Este último requisito sirve para que durante la qPCR no se midan las posibles contaminaciones de DNA genómico que pudiesen quedar en las muestras o, por otro lado, sirve para que la pareja de oligonucleótidos sea específica de un cDNA resultado de un RNA que haya pasado por un proceso de maduración o *splicing*, proceso en el que se eliminan los intrones y los exones quedan contiguos.

**Tabla 7. Oligonucleótidos empleados para estudiar los distintos genes mediante qPCR**

	Sentido	Antisentido
<i>Gapdh</i>	GCCTATGTGGCCTCCAAGGA	GTGTTGGGTGCCCTAGTTG
<i>Ccp1_Tot</i>	CCCCATTGTAGTTCCACAG	CTTCCTGGCTTCTCTCCT
<i>Ccp4</i>	GATCGCAAAGTGGGAGTACAG	TGGGCTCGTCTAACTGAAGA
<i>Ccp6</i>	TCTTCATTTGTGTCCAAGG	GACTAAATGTTCTCGTAGGACAG
<i>Ttl1</i>	CCAAGGAAGTACTTGGCAAC	GGCGGTTTCTAAGCTCTCG

## Material y métodos

Para comprobar que los oligonucleótidos que habíamos diseñado eran específicos para nuestros genes y no lo eran para otros, se utilizó la herramienta *on-line* de *Ensembl genome browser 103*. *Ensembl* es un buscador genómico cuyas funciones pueden ser la de comparar regiones de apareamiento entre secuencias con un genoma deseado. Dicha herramienta se llama BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) y nos ofrece para cada secuencia introducida que se introduzca varios índices de especificidad de los oligonucleótidos diseñados para distintos genes (**Fig. 17**).

Results for F Ttll1

Job details

Job name: F Ttll1

Species: Mouse (Mus musculus)

Assembly: GRCm39

Search type: BLASTN (NCBI Blast)

Download results file | New job

Results table

Genomic Location	Overlapping Gene(s)	Orientation	Query start	Query end	Length	Score	E-val	%ID
15:83373681-83373701 (Sequence)	Ttll1	Reverse	1	21	21 (Sequence)	42.0	0.002	100.00 (Alignment)
2:95356293-95356309 (Sequence)		Forward	4	20	17 (Sequence)	34.1	0.44	100.00 (Alignment)
15:34032507-34032522 (Sequence)	Gm41290	Forward	5	20	16 (Sequence)	32.1	1.7	100.00 (Alignment)
2:71516097-71516116 (Sequence)		Reverse	1	20	20 (Sequence)	32.1	1.7	95.00 (Alignment)
13:12741412-12741427 (Sequence)		Forward	1	16	16 (Sequence)	32.1	1.7	100.00 (Alignment)

**Figura 17.** Captura de pantalla de *Ensembl* en el que se ha introducido la secuencia de oligonucleótidos para *Ttll1*; **CCCAAGGAAGTACTTGGCAAC**. Los criterios para que este sea un buen cebador son varios. En primer lugar, (1) que el primer gen que aparezca en la lista *Overlapping Gene(s)* sea el de nuestro interés y que además no aparezcan otros. Por su parte, (2) los valores de *Query start* y *Query end* indican dónde comienza y acaba de emparejarse nuestro cebador al gen; si nuestro cebador tiene *n* bases (*length*), los valores para *start* y *end* deben ser 1 y *n* respectivamente. (3) El índice *Score* es la afinidad con la que se unirá el cebador a la secuencia y cuanto mayor sea, mejor será el cebador. (4) *E-val* indica el error de hibridación y es un valor indirectamente proporcional a *Score*; así, cuanto menor sea, mejor será el cebador. Finalmente, (5) *%ID* es cuánto porcentaje del cebador está unido a la secuencia y debe valer 100. En el ejemplo con el recuadro rojo, el oligonucleótido diseñado cumpliría los criterios de un buen cebador. Extraído de [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)

Con el cDNA ya retrotranscrito, se utilizó SYBR Green como intercalante del DNA en la qPCR (*PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix*, Applied Biosystems, Foster City, EUA). Siguiendo el protocolo, se utilizaron por pocillo 10 µL de *SYBR® Green Master Mix 2x*, los oligonucleótidos a una concentración final de 1 µM, un cDNA molde y agua MilliQ hasta completar 20 µL. No es necesario añadir desoxinucleotidos trifosfato (dNTP), la polimerasa o el tampón debido a que todo va incluido en el *Master Mix*. Como se detallará más adelante, se utilizó cDNA a diferentes diluciones con distintos objetivos. Sin embargo, para todos los experimentos se utilizó el siguiente programa **Tabla 8**:

**Tabla 8.** Programa de la qPCR

	Paso 1	Paso 2	Paso 3 (40 ciclos)		Paso 4
Temperatura °C	50	95	95	60	4
Tiempo (min)	2	10	0:15	1	∞

Al final de cada ciclo es cuando toma protagonismo el *SYBR® Green*. Dicha molécula es un intercalante de DNA con la particularidad de que solo emite una señal fluorescente cuando está unido al DNA de doble cadena y no antes. Gracias a la propiedad de nuestro fluoróforo, a medida

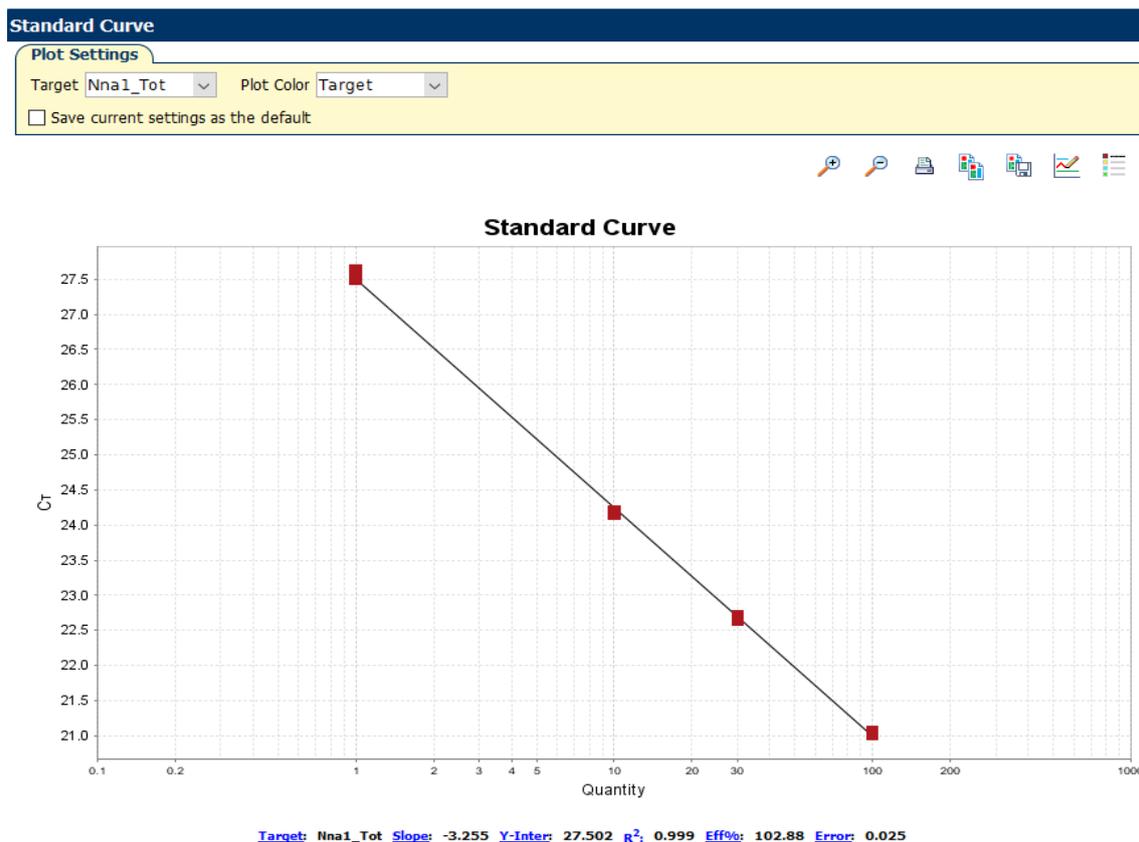
que transcurre la PCR aumenta la cantidad de DNA de doble cadena, lo que provoca a su vez un aumento en el nivel de fluorescencia emitido. El termociclador *QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR System* (Applied BioSystems) es capaz de medir el nivel de fluorescencia al final de cada ciclo y representarlo en una gráfica. La curva representada, si la reacción ha transcurrido con normalidad, sigue un patrón sigmoideo: al principio no varía a penas hasta que llegado un momento comienza a aumentar de forma exponencial para, finalmente, estabilizarse en una fase de meseta. En función de la fluorescencia que exista de fondo, el *software* del termociclador determina un nivel umbral o *threshold* 10 veces mayor que dicho fondo. Cuando la curva de fluorescencia se corta con dicho umbral, el ciclo en el que sucede se denomina ciclo umbral o  $C_T$ <sup>18</sup>. Este valor es de gran importancia, puesto que todas las interpretaciones que se hagan serán en función de este número: cuando el  $C_T$  es un valor relativamente bajo, implica que hay gran cantidad o expresión del gen estudiado, puesto que la fase exponencial de la curva ha comenzado antes y el ciclo en el que se ha superado el umbral es más temprano; por otro lado, un  $C_T$  mayor implica que hay menos cantidad o expresión del gen estudiado y la curva exponencial ha cruzado el umbral en un ciclo más tardío.

Para cada uno de nuestros genes, se añadieron las muestras de cDNA por triplicado, los controles negativos y una recta patrón en placas de 96 pocillos de 0,2 µL de volumen. La recta patrón fue lo primero que se hizo antes de analizar nuestras muestras. Era necesario para calcular la eficiencia con los oligonucleótidos de los que se disponía: utilizando el mismo tampón de reacción para cada pareja de cebadores, se hizo por triplicado una qPCR con 4 diluciones distintas del mismo cDNA (1:10, 3:100, 1:100 y 1:1.000). Con los valores de los  $C_T$  obtenidos se genera una recta de regresión donde se relaciona la concentración de cDNA inicial y su correspondiente  $C_T$  (**Fig. 18**). A continuación, con la pendiente de esta recta ( $m$ ), se puede calcular la eficiencia de la reacción según la siguiente fórmula:

$$Eficiencia = -1 + 10^{-\left(\frac{1}{m}\right)}$$

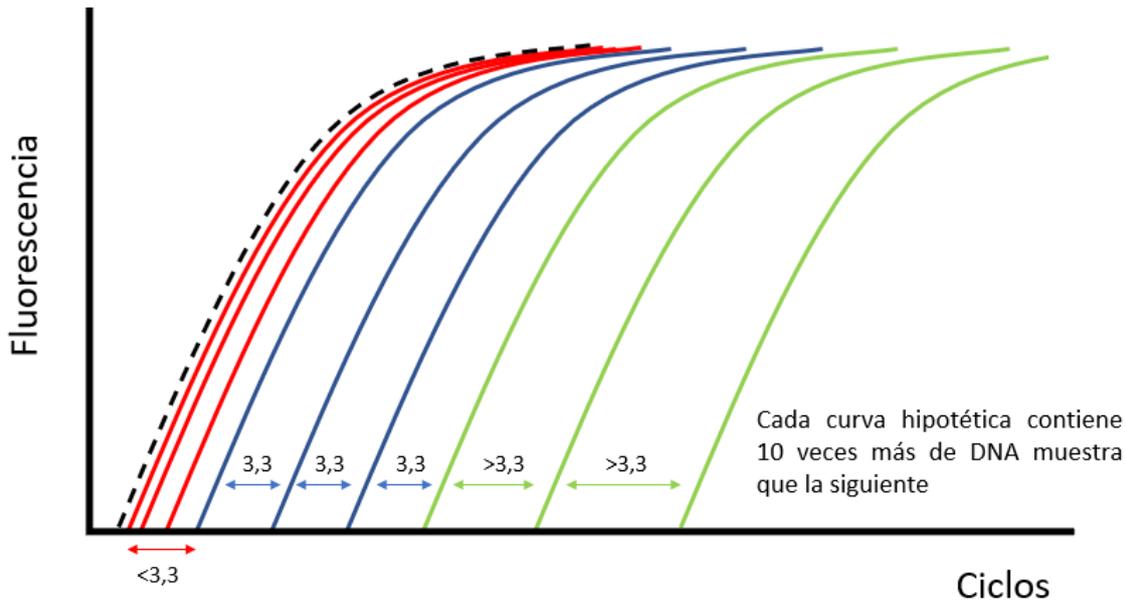
---

<sup>18</sup> Del inglés *Threshold Cycle*



**Figura 18. Gráfica de la recta patrón extraída del programa Quantum Studio7.** En la gráfica se representan en cuadrados rojos las diluciones de cDNA 1:1.000, 1:100, 3:100 y 1:10 de izquierda a derecha. Con la recta proyectada sobre dichos puntos se puede calcular la pendiente, y con esta la eficiencia. En este caso, una pendiente de -3,255 significa que con estos oligonucleótidos un aumento/descenso de 10 veces la cantidad de cDNA implica un aumento/disminución de 3,255 ciclos.

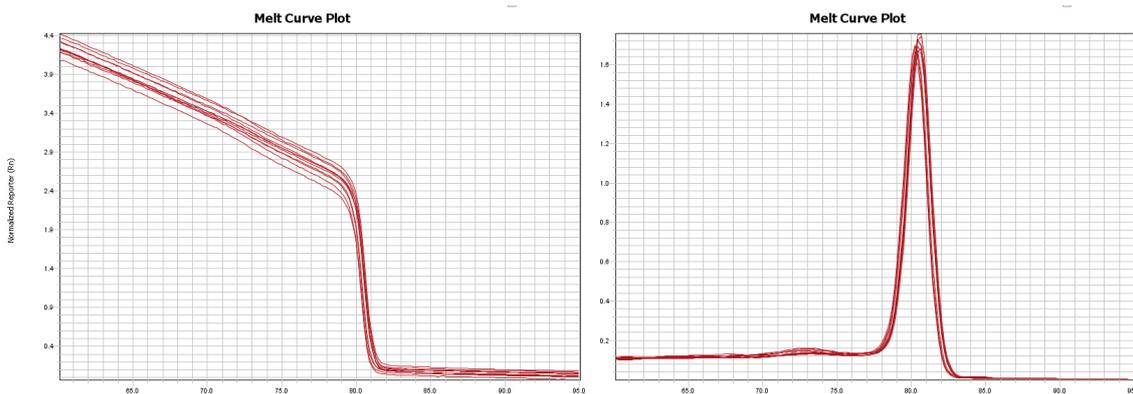
Si el valor de  $m$  es cercano a -3,3 el valor de la eficiencia será próximo a 1. Este valor, se multiplica por 100 para expresarlo como un porcentaje. Cuando la eficiencia es próxima al 100%, significa que el número de moléculas de nuestra secuencia se duplica en cada ciclo. Por otro lado, si la eficiencia es menor del 100%, el número de moléculas al final de un ciclo no llegará a ser el doble que las del ciclo anterior, será menor. Esto puede deberse a un mal diseño de los oligonucleótidos, un mal ajuste de concentraciones de reactivos o de las condiciones de la PCR, entre otros motivos. El rango de eficiencia deseado para nuestros oligonucleótidos será del 95-105%. Ya se ha explicado por qué la eficiencia puede ser menor del 100%, sin embargo, también es posible que exceda este valor. Si se utiliza la interpretación anterior de cuánto cambia la cantidad de secuencias de cDNA, una eficiencia mayor del 100% implicaría que de una cantidad de cDNA obtendríamos más del doble al final del ciclo, lo que es molecularmente imposible. El principal motivo es debido a una saturación de la reacción: como se ha explicado anteriormente, a mayor cantidad de cDNA los valores de  $C_T$  serán menores, sin embargo, en todas las reacciones enzimáticas, aumentar el sustrato de la reacción no aumenta la velocidad de esta de forma ilimitada, sino que existe un momento en el que la enzima se satura. Aplicado a las curvas de la qPCR, lo que se puede observar es que cada 10 incrementos de DNA la curva se desplazaría 3,3 ciclos a la izquierda hasta acercarse al punto de saturación donde las curvas se encontrarían cada vez más cercanas entre sí (**Fig. 19**). Una cercanía mayor entre los  $C_T$  de diluciones sucesivas provoca que la recta de regresión tenga una pendiente mayor de -3,3 y, por consiguiente, que la eficiencia de la reacción sea mayor del 100%.



**Figura 19. Curvas hipotéticas de diluciones sucesivas.** (1) En azul se representan las curvas con la dilución idónea y que se separan entre ellas en 3,3 ciclos. (2) En rojo se representan las curvas más concentradas cuyos  $C_T$  están más cercanos entre ellos. (3) En verde se representan las diluciones menos concentradas cuya reacción no transcurre a la máxima eficiencia y las distancias entre los  $C_T$  son mayores de 3,3.

Quando la reacción ha finalizado, el termociclador parte de una temperatura de 60 °C, cuando la doble hélice del DNA se encuentra unida, y va elevando la temperatura a un ritmo de 0,05 °C/s a la vez que mide el nivel de fluorescencia. De este modo, llega un momento en el que la doble hebra del amplicón generado durante la PCR se desnaturaliza y cae de forma brusca la fluorescencia, proceso llamado desnaturalización o *melting*. Si en la gráfica encontramos varias caídas de fluorescencia (o picos, si se representa en escala logarítmica negativa), significa que o bien había contaminaciones en nuestra muestra o nuestros oligonucleótidos son específicos para otros genes aparte de los nuestros (**Fig. 20**).

Solo se utilizaron las parejas de oligonucleótidos cuya eficiencia fuese del 95-105% y que su curva de *melting* no mostrase ningún pico extra diferente del de nuestro amplicón.



**Figura 20. Gráficas extraídas del programa Quantum Studio7 de las curvas de *melting*.** Estas dos gráficas representan la misma caída de fluorescencia al subir la temperatura (eje horizontal). En la gráfica de la izquierda el valor de fluorescencia se muestra sin procesar y en la de la izquierda como la derivada negativa de dicho valor; de esta manera lo que se ve como una caída brusca de fluorescencia a la izquierda se ve como un pico a la derecha. Una sola caída (o pico) representa el fundido de un solo amplicón de DNA. Si en las gráficas viésemos más de una/o, significaría que o bien los oligonucleótidos no son específicos de un solo gen o que existen contaminaciones en la muestra.

Una vez que se comprobó que los oligonucleótidos eran los adecuados y la reacción transcurre correctamente se realizó la qPCR para todas las muestras y genes de interés.

### Análisis de datos

Los  $C_T$  obtenidos se estudiaron mediante la cuantificación relativa ( $\Delta\Delta C_T$ ). Esto es comparar la expresión de nuestro gen de interés en el lóbulo X con relación a su expresión en el resto de los lóbulos, y normalizándolos respecto a la expresión del gen constitutivo (en nuestro caso, *Gapdh*) en cada muestra. Esto nos da un valor conocido como *Fold change*, término de difícil traducción al castellano que representa la medida de cuánto cambia una cantidad con respecto a otra. Un *Fold change* de 1 entre dos muestras significaría que no hay diferencia de expresión entre estas dos, pero un *Fold change* de 2 entre una muestra A respecto a B significa que hay el doble de expresión de un gen en A con respecto a B. Para calcular el *Fold change* del lóbulo X con relación al resto de lóbulos se aplicó la siguiente fórmula:

$$Fold\ change_{por\ región} = 2^{\left(\frac{(Ct\ resto\ de\ lóbulos - Ct\ lóbulo\ X)_{gen\ de\ interés}}{(Ct\ resto\ de\ lóbulos - Ct\ lóbulo\ X)_{gen\ constitutivo}}\right)}$$

La comparación de *Fold change* entre lóbulo X y el resto de lóbulos se hizo con ayuda del programa IBM SPSS Statistics 26 (IBM Statistics) mediante el test U de Mann-Whitney.

Por otro lado, para conocer cómo variaba la expresión en los distintos tejidos a lo largo del tiempo, además de calcular el *Fold Change* por región, se puede estudiar el *Fold Change* de los tejidos a diferentes edades tratando las muestras de lóbulo X y resto de lóbulos de forma independiente. La utilización de una edad u otra de referencia como tejido control no cambiará los patrones de expresión, solo el punto de vista. Para este tipo de análisis generalmente se utiliza como referencia o el primer grupo de estudio o el último, sin embargo, en nuestro análisis el tejido nervioso del primer grupo de estudio, P20, está sometido a grandes cambios. Por este motivo, para nuestros cálculos se escogió P50:

$$Fold\ change_{por\ edad} = 2^{\left(\frac{(Ct\ P50 - Ct\ edad\ interés)_{gen\ de\ interés}}{(Ct\ P50 - Ct\ edad\ interés)_{gen\ constitutivo}}\right)}$$

La comparación estadística realizada con los resultados obtenidos entre las distintas edades se realizó con el test Kruskal-Wallis. En el caso de encontrar diferencias significativas se aplicó un test *post hoc por pasos en sentido descendente* que nos permite agrupar las distintas edades en los subconjuntos más probables.

Por último, para las edades de P20 y P25, también se calculó el *Fold Change* entre los lóbulos X de los ratones PCD frente a los de los controles, y, por otro lado, el *Fold Change* de los vermis (resto de lóbulos) de los ratones PCD frente a los de los controles. Se aplicó la siguiente fórmula para los lóbulos X y para los vermis por separado.

$$Fold\ change_{por\ genotipo} = 2^{\left(\frac{(Ct\ Control - Ct\ PCD)_{gen\ de\ interés}}{(Ct\ Control - Ct\ PCD)_{gen\ constitutivo}}\right)}$$

Finalmente, al igual que el *Fold change* por región, las comparaciones entre lóbulo X o vermis de PCD frente a lóbulo X o vermis de control respectivamente también se estudiaron aplicando la U de Mann-Whitney.

### Análisis proteico

Los resultados de la qPCR hacen referencia a la expresión de RNA total. Sin embargo, un aumento en la expresión del RNA no implica necesariamente un aumento en la expresión de proteína, y más teniendo en cuenta que el gen *Ccp1* posee una gran cantidad de regiones no

codificantes. De hecho, según los datos que obtuvimos mediante qPCR, existe cierta expresión de dicho gen en el tejido de los ratones PCD. De este modo, el siguiente paso después de hacer los análisis genéticos mediante qPCR fue realizar un análisis de cómo es la expresión proteica. Debido a que el estudio principal de los genes relacionados con la mutación *pcd* se realizó mediante qPCR, la técnica de *Western Blot* se hizo de forma complementaria y meramente confirmativa, de manera que no se usó un gran número de ratones por grupo.

Los grupos de estudio coincidieron con los de qPCR: 2 grupos de PCD, uno a P20 y el otro a P25 y 6 grupos control, a P20, P25, P30, P35, P40 y P50. Para cada grupo se usaron 2 ratones, que se sacrificaron por dislocación cervical y posterior decapitación, tras lo que se extrajo el cerebelo. A continuación, se diseccionó bajo lupa el lóbulo X del cerebelo, y del tejido restante se descartaron los hemisferios cerebelosos para quedarnos solo con la parte del vermis. Tanto el lóbulo X como el resto de los lóbulos se introdujeron en tubos *ependorf* independientes y se congelaron en nitrógeno líquido para almacenarlos a -20 °C.

### *Extracción de proteínas*

Para comenzar la extracción de proteínas se descongeló el tejido lentamente en hielo. Mientras tanto, a un tampón RIPA<sup>19</sup> (ver en *Soluciones de uso común*) se le añadieron inhibidores de proteasas (*Protease Inhibitor Cocktail*, Sigma, San Luis, EUA) en una relación de 7,3 µL por mL de tampón. A los tubos que contenían el vermis se les añadieron 80 µL del tampón y, debido a su pequeño tamaño, a los que contenían lóbulo X se les añadieron 40 µL, para evitar que las proteínas se diluyesen demasiado.

Las muestras de tejido se disgregaron mecánicamente con unos pistilos de plástico, tras lo que se centrifugaron durante 10 min a 10 g a 4 °C. Los sobrenadantes se pasaron a tubos nuevos y los precipitados se desecharon.

### *Cuantificación de proteínas: método de Bradford*

Para cuantificar la cantidad de proteínas de nuestras muestras se procedió a utilizar la técnica de *Bradford*. El reactivo de *Bradford* (Sigma) toma un color azul más o menos intenso en presencia de proteínas, así que con distintas diluciones de seroalbúmina bovina (BSA<sup>20</sup>, Sigma) con reactivo de *Bradford*, en el espectrofotómetro *SmartSpec™ Plus Spectrophotometer* (BioRad, Hercules, EUA) se elaboró una recta patrón que relaciona la intensidad de color azul (absorbancia) con la cantidad de proteína. Nuestras muestras se diluyeron a 1:10 ó 1:30 en solución salina en 30 µL finales, y se mezclaron por duplicado 15 µL de muestra diluida con 500 µL de reactivo de *Bradford*. Tras una incubación de 5 min se midió la absorbancia en el espectrofotómetro. Finalmente, utilizando las absorbancias y la recta patrón se halló la cantidad de proteínas en µg/µL, que más tarde se ajustó a la real multiplicando por 10 ó 30 en función de la dilución previa.

### *Electroforesis en gel de poliacrilamida y transferencia*

Una vez conocida su concentración, las muestras se diluyeron en una proporción 1:1 con tampón de carga Laemmli 2X (ver en *Soluciones de uso común*). Tras ello, se incubaron a 100 °C durante 7 min para desnaturalizar las proteínas y exponer sus epítopos. Se cargaron 30 µg de proteína por pocillo en un gel de poliacrilamida al 10%; además, en uno de los pocillos se añadieron 5 µL de marcador de peso molecular (*Page Ruler Prestained Protein Ladder*,

---

<sup>19</sup> Del inglés *Radioimmunoprecipitation assay*

<sup>20</sup> Del inglés *Bovine serum albumin*

## Material y métodos

ThermoFisher). Los geles se sometieron a un voltaje de 90 V durante unos 45 min en una cubeta de electroforesis con tampón de electroforesis (ver en *Soluciones de uso común*) para que las proteínas penetren en el gel y a 120 V durante 1 h para que se separen entre ellas.

Después de haber separado las proteínas, se transfirieron del gel a una membrana de polifluoruro de vinilideno activada con metanol durante 1 min. La membrana y el gel unidos se sometieron a una corriente de 220 mAh durante 2-2,5 h sumergidos en tampón de transferencia (ver en *Soluciones de uso común*).

### Incubación

Con las proteínas en la membrana, el gel se desechó y la membrana se incubó 1 h en agitación suave con BSA 3% disuelto en tampón Tris salino (TBS<sup>21</sup>; ver en *Soluciones de uso común*) con Tween-20 al 0,1% (TBS-T; Sigma) con la finalidad de que durante la incubación con los anticuerpos primarios estos no se unan de forma inespecífica.

Después del bloqueo con BSA, las membranas se incubaron a 4 °C durante la noche con el antisuero primario frente a las proteínas de nuestro interés. Las concentraciones a las que se usaron los anticuerpos, la altura de peso molecular y otros datos se detallan en la **Tabla 9**:

Al día siguiente las membranas se lavaron 3x10 min en TBS-T para eliminar el exceso de anticuerpos. A continuación, se incubaron 50 min con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano (HRP<sup>22</sup>) a 1:10.000 en TBS-T con leche en polvo desnatada al 5%. La leche en polvo desnatada inhibe las uniones inespecíficas de los anticuerpos secundarios. A partir de este paso, todo el proceso se desarrolló en oscuridad para evitar la activación de la HRP. Finalmente, se lavaron de nuevo 3x10 min con TBS-T.

Tabla 9. Anticuerpos usados para Western Blot

	Anticuerpo	Animal	Dilución/concentración	Peso Ag	Casa comercial
<b>Primario</b>	anti-CCP1	Conejo	1:2.000	137 kDa	Proteintech (Rosemont, EUA)
<b>Primario</b>	anti-CCP6	Conejo	1:1.000	62 kDa	MyBioSource San Diego, EUA)
<b>Primario</b>	anti-TLL1	Conejo	1:1.000	49 kDa	ThermoFisher
<b>Primario</b>	anti-GAPDH	Ratón	1 µg/µL	35 kDa	Applied Biosystems
<b>Secundario</b>	HRP anti-Rabbit	Cabra	1:10.000		Jackson ImmunoResearch
<b>Secundario</b>	HRP anti-Mouse	Cabra	1:10.000		Jackson ImmunoResearch

Ag: Antígeno correspondiente; HRP: *horseradish peroxidase*

### Revelado

Mediante el kit de revelado *Chemiluminescent Detection Reagent* (Advansta, San José, EUA) se detectó el anticuerpo secundario unido a las membranas. El kit consiste en dos reactivos, uno de ellos contiene luminol y el otro un amplificador de la reacción. En un medio

<sup>21</sup> Del inglés *tris-buffered saline*

<sup>22</sup> Del inglés *horseradish peroxidase*

acuoso, cuando se unen los dos componentes del kit a la HRP del anticuerpo, el luminol se oxida y emite luz que posteriormente se detecta con el equipo MicroChemi 4.2 (*DNR Bio-Imaging Systems*, Jerusalén, Israel). Este sistema permite tomar varias imágenes a distintas exposiciones con las que podremos cuantificar los niveles de las distintas proteínas.

### *Desnudamiento de las membranas*

A menudo sucede que existen varias proteínas de pesos similares, de manera que no se pueden revelar a la vez porque no se podría distinguir cuánto marcaje es de una proteína o de la otra. Para resolver este problema se procede al desnudamiento o *stripping* de la membrana, que consiste en pasarla por una serie de tampones que rompen las uniones anticuerpo-antígeno y nos permiten “limpiar” la membrana para volver a incubarla con otros anticuerpos. Para este procedimiento, se lavaron 10 min en TBS-T, 10 min en glicina 0,1 M pH 2,5, 10 min en SDS 1% (v/v) y finalmente otros 10 min en TBS-T. A continuación, se repitió el proceso de incubación, con otros anticuerpos comenzando por el bloqueo durante 1 h con BSA 3% en TBS-T.

### *Cuantificación*

Una vez fotografiadas las membranas, las imágenes se analizaron con el programa *Adobe® Photoshop® 2020*. Este programa nos permite medir la intensidad de las bandas en forma de densidad integrada de píxeles. A cada valor de cada muestra se le restó la densidad de fondo y los resultados se normalizaron con la densidad de GAPDH de cada muestra. No se realizó ningún análisis estadístico debido al bajo número de muestras: como se describió al principio, esta técnica nos sirvió para corroborar si la expresión de mRNA estudiada mediante la qPCR se veía reflejada o no en una expresión proteica real.



## Resultados

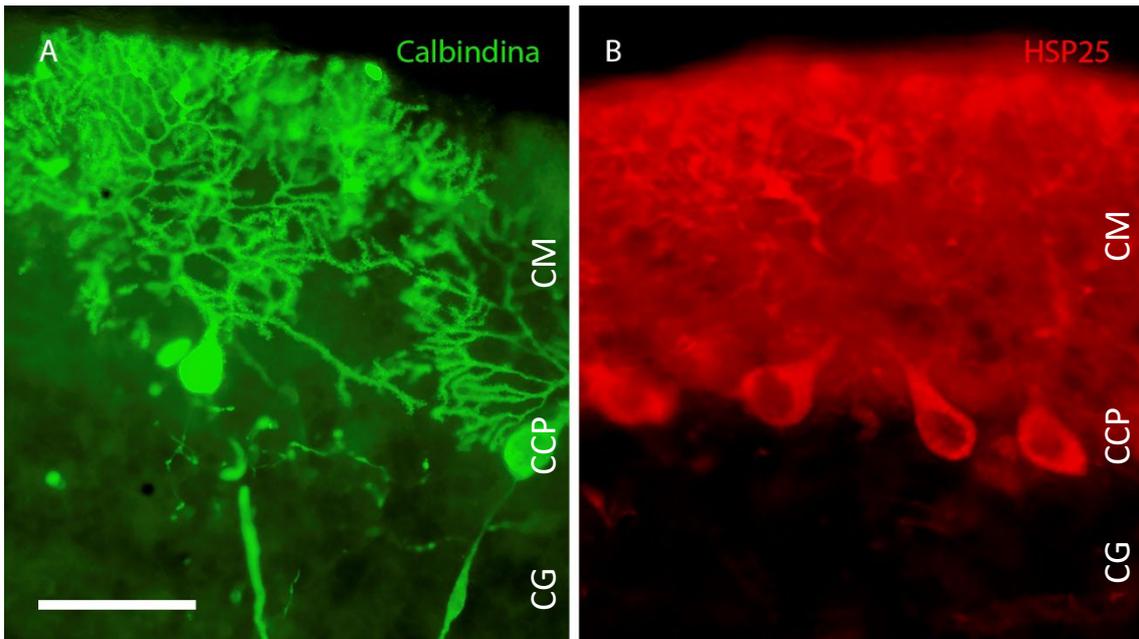


La degeneración de las células de Purkinje en el cerebelo ha sido estudiada ampliamente en diferentes modelos animales. Como hemos visto, el lóbulo X se comporta en casi todos ellos como una región resistente, y nuestro modelo de estudio no es diferente, incluso si tenemos en cuenta que la degeneración cerebelosa que sufre el ratón PCD es de las más rápidas y agresivas que conocemos. Es por ello que el trabajo realizado durante la presente Tesis Doctoral ha pretendido ahondar en cómo se desarrolla la degeneración neuronal en el lóbulo X del ratón PCD y cuáles pueden ser los posibles mecanismos de su resistencia.

*El lóbulo X del ratón PCD resiste más tiempo la degeneración neuronal y expresa más HSP25 que el de los animales silvestres*

La calbindina es una proteína ligante de calcio que se expresa ampliamente en las células de Purkinje, por lo que se utilizó como marcador de elección para realizar los recuentos de estas células, al igual que en otros estudios previos con otros modelos (Celio, 1990; Duchala et al., 2004; Duffin et al., 2010; Tolbert et al., 1995; Praggastis et al., 2015). Con el marcaje de calbindina pudimos observar nítidamente la morfología de estas neuronas: un gran soma, un profuso árbol dendrítico hacia la capa molecular y un axón que penetra hacia la capa de los granos (**Fig. 21**). Por lo general, el criterio para contabilizar las células de Purkinje fue que se viese el soma y el árbol dendrítico (el axón no es siempre visible, dependiendo de la posición de la sección). Sin embargo, en los casos en los que la degeneración neuronal no está muy avanzada, el árbol dendrítico no se distingue entre unas células y otras, así que se escogió como criterio de selección que se pudiese visualizar el comienzo de la dendrita principal.

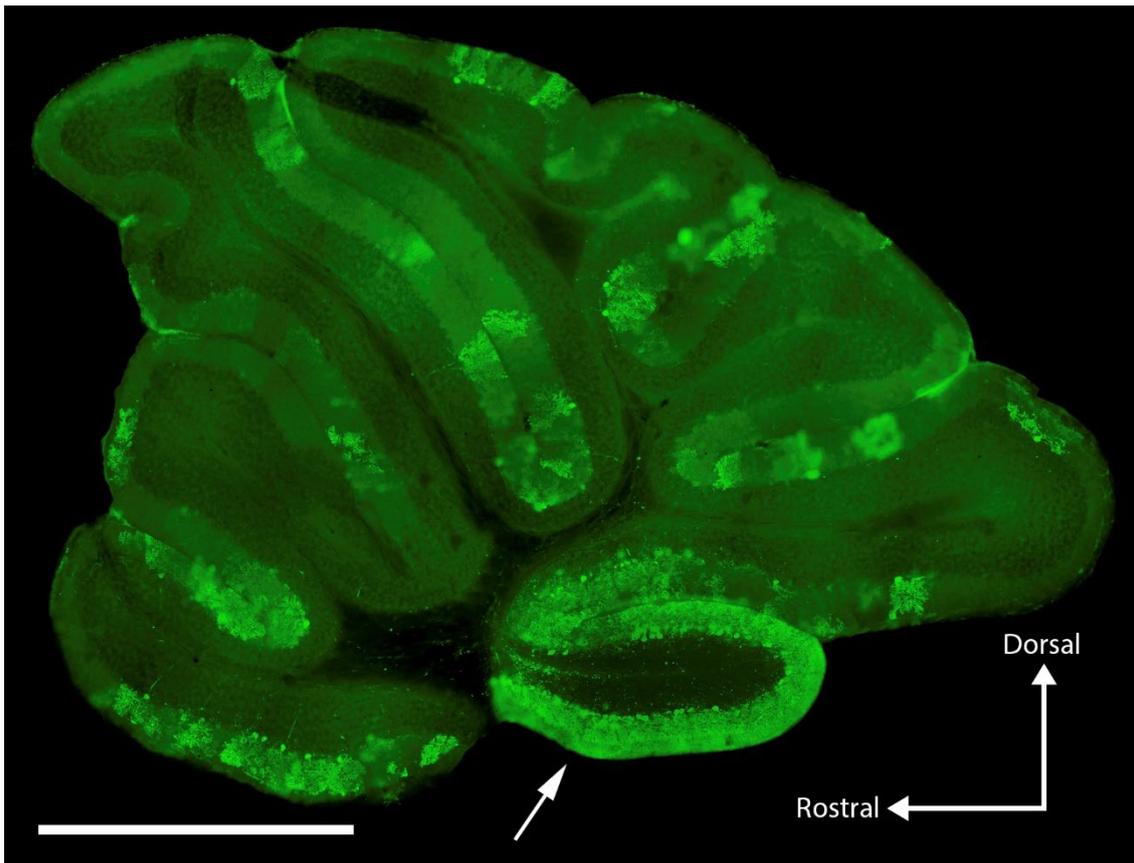
Por otro lado, el marcaje con HSP25, aunque también era muy claro, presentaba más fondo y no nos permitía ver la arborización de las células de Purkinje con tanta definición como en el caso anterior, sino que tan solo se podía ver el comienzo de esta. Como consecuencia, las células de Purkinje marcadas con HSP25 presentaron una forma de gota y, a menudo, una región central sin marcar correspondiente al núcleo (**Fig. 21**). Solo se contabilizaron las células que presentaban estas características



**Figura 21. Células de Purkinje de un ratón PCD.** A la izquierda se pueden observar dos células de Purkinje marcadas con calbindina (verde) con su morfología clásica: gran soma, árbol dendrítico muy desarrollado en la capa molecular y parte de su axón hacia la capa de los granos. A la derecha se pueden observar varias células de Purkinje marcadas con HSP25 (rojo); los somas se ven claramente con un hueco correspondiente al núcleo y, con algo de dificultad, se puede intuir la arborización dendrítica en la parte más externa de la capa molecular o su inicio partiendo desde de los somas neuronales. Barras de escala 100  $\mu\text{m}$ . CM, capa molecular; CCP, capa de las células de Purkinje; CG, capa de los granos.

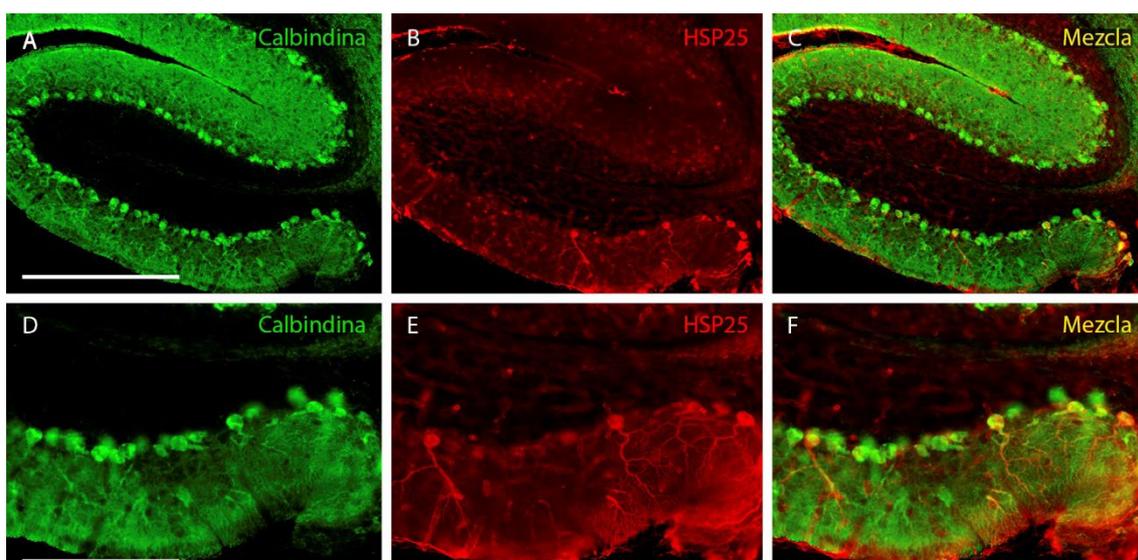
Como se ha descrito anteriormente (Mullen et al., 1976), la corteza cerebelosa del ratón PCD degenera rápidamente y pierde una gran cantidad de células de Purkinje, hasta el punto de que a P30 únicamente podemos visualizar pequeñas poblaciones o células aisladas. Sin embargo, el lóbulo X a esta edad aparentemente se muestra intacto (**Fig. 22**).

Como se puede ver en la **Fig. 22**, la degeneración neuronal es muy rápida y esto nos permitiría un análisis completo de toda la longitud de la corteza solo en las edades más iniciales. Además, para el presente estudio nos hemos querido centrar en la zona de supervivencia, de modo que los recuentos celulares solo se han realizado en el lóbulo X.



**Figura 23.** Corte sagital de cerebelo de ratón PCD a P30. Con el marcaje de calbindina (verde) se pueden observar poblaciones aisladas de células en todos los lóbulos cerebelosos excepto en el lóbulo X, que permanece prácticamente intacto (flecha). Barra de escala 1mm.

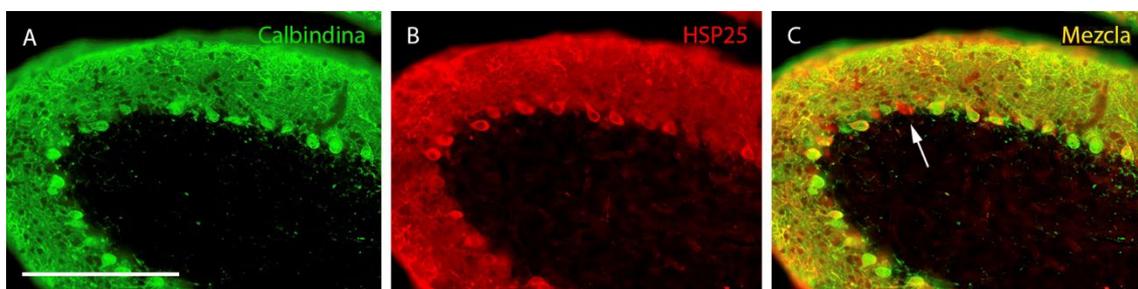
En lo que a la colocación del marcaje se refiere, pudimos observar que, en los animales silvestres todas las células que expresaban HSP25 también expresaban calbindina. Asimismo, al analizar la expresión de HSP25 fue llamativo que las células de Purkinje positivas a HSP25 en el lóbulo X de los animales silvestres se disponían principalmente en la zona más ventral de este (**Fig. 23**).



**Figura 22.** Marcaje del lóbulo X de ratón silvestre a P25. En las imágenes A, B y C se puede observar el lóbulo X de un ratón control con marcaje de calbindina en verde y HSP25 en rojo. Las imágenes D, E y F corresponden a un aumento de la zona ventral de las imágenes anteriores. Nótese que el marcaje de HSP25 en el lóbulo X de los ratones control se localiza en las zonas más ventrales de este. Barras de escala 500 µm en A, B y C, y 200 µm en D, E y F.

## Resultados

Por otro lado, en los animales PCD se pudo comprobar a simple vista que existía una mayor expresión de HSP25 que en los controles, puesto que las células de Purkinje positivas a HSP25 aparecían en toda la longitud del lóbulo X. Además, a las edades más avanzadas pudimos empezar a observar algunas células positivas para HSP25, pero no para calbindina **Fig. 24**.



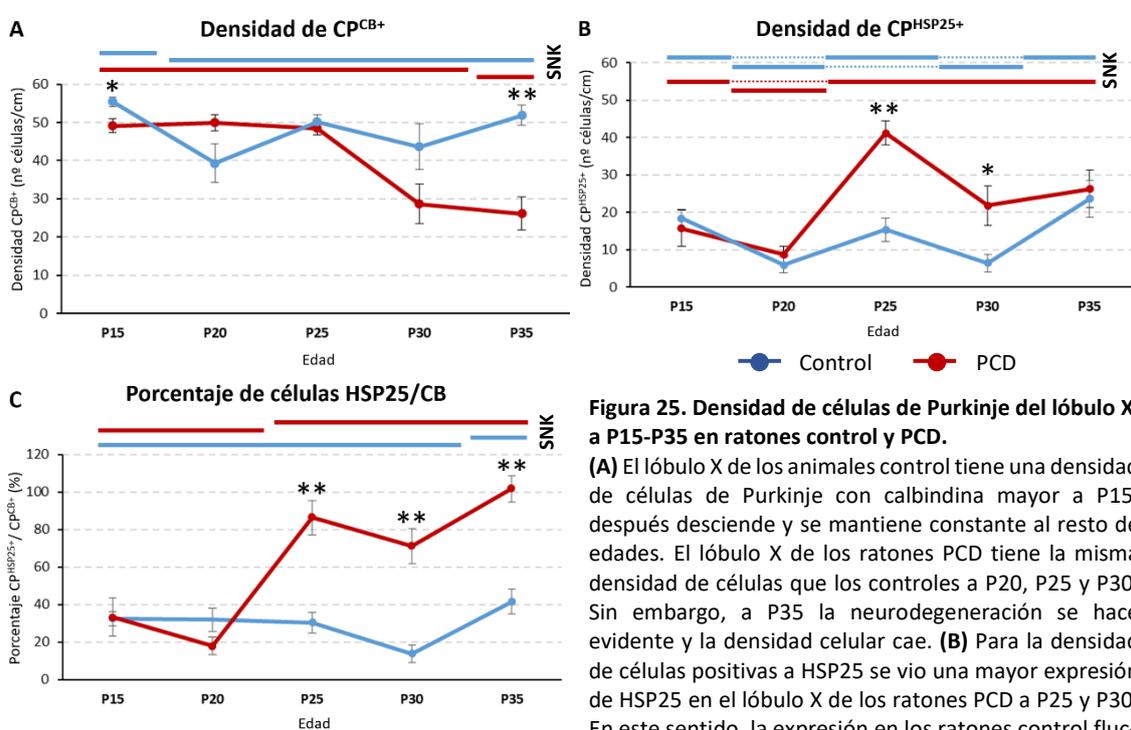
**Figura 24. Marcaje del lóbulo X de un ratón PCD de P30.** En la imagen **A** se puede observar en verde el marcaje con calbindina, en **B** el marcaje de HSP25 en rojo y en **C** la mezcla de ambos canales. La inmunoreactividad para HSP25 se reparte de forma homogénea en toda la longitud de la capa de las Células de Purkinje del lóbulo X. En **C** se puede ver marcada con una flecha una célula de Purkinje que expresa HSP25, pero no calbindina. Barra de escala 400  $\mu\text{m}$ .

Finalmente, una vez visualizadas las muestras y con unos criterios de inclusión objetivos, se procedió a contar el número de células de Purkinje en el lóbulo X para los dos marcadores neuronales; además, también se midió la capa de las células de Purkinje aprovechando el marcaje con DAPI. Esto último se realizó para calcular la densidad lineal de las células positivas a calbindina y a HSP25, para así evitar errores en la comparación del número de células debido a posibles variaciones de tamaño del lóbulo X entre muestras. También se calculó el porcentaje de células que expresaban HSP25 sobre el total de las que expresaban calbindina. Los datos obtenidos se representaron como la media de densidades celulares (células/mm)  $\pm$  el error estándar de la media o como la media del porcentaje (positivas a HSP25+/positivas a calbindina  $\times$  100)  $\pm$  el error estándar de la media (**Fig. 25**).

En la **Fig. 25. A** en un comienzo vemos que el lóbulo X de los animales silvestres tiene una mayor densidad celular que el de los PCD ( $p=0,032$ ). Sin embargo, a continuación sufre una pequeña pérdida de células de Purkinje, de modo que a P20, P25 y P30 tanto los ratones controles como los PCD tienen el mismo número de células. A partir de esta franja de edad la degeneración neuronal del ratón PCD se hace evidente y a P35 el lóbulo X tiene menos células que en los animales silvestres ( $p=0,003$ ). En un estudio longitudinal podemos comprobar que la densidad celular en ambos genotipos varía a lo largo del tiempo ( $p_{\text{control}}=0,035$  y  $p_{\text{PCD}}=0,002$ ). Las pruebas *post hoc* muestran que en los animales silvestres P15 se comporta como un grupo diferente del resto de edades. Y, por otro lado, en los animales PCD la densidad celular se mantiene constante durante P15-P30 y comienza a caer a P35, la edad en la que más se evidencia la pérdida de células de Purkinje del lóbulo X.

Con relación a la expresión de HSP25, en la **Fig. 25. B** la prueba Kruskal-Wallis nos mostró que en los controles existe un patrón fluctuante, pero sin cambios drásticos de densidad. Por el contrario, en los ratones PCD la expresión decae ligeramente de P15 a P20 (de forma similar a los controles) para después cuadruplicar su expresión a P25 y, aunque desciende sin valor significativo, este aumento se mantiene al menos hasta P35 ( $p_{\text{control}}=0,007$  y  $p_{\text{PCD}}=0,009$ ). Al comparar la expresión entre los dos grupos, se vio que a las edades P25 y P30 la expresión de HSP25 es mayor en los ratones PCD que en los controles ( $p_{\text{P25}}=0,08$  y  $p_{\text{P30}}=0,03$ ). A P35 no se encontraron diferencias significativas, pero es necesario destacar que la caída de expresión a esta edad en los PCD es debida a la pérdida neuronal. En efecto, en la **Fig. 25. C** podemos ver que el porcentaje de células que expresan HSP25 varía a lo largo del tiempo en los ratones PCD ( $p=0,009$ ) y se puede dividir en dos etapas: de P15 a P20 una expresión basal de HSP25 similar a la de los controles, y una segunda fase de mayor expresión de P25 a P35. En esta segunda etapa

podemos encontrar a P35 que el porcentaje de HSP25 llega a ser superior al 100%: es decir, que existirían más células expresando HSP25 que calbindina. Esta paradoja se debe a que en este punto de la degeneración neuronal un porcentaje de células de Purkinje dejan de expresar calbindina, aunque sean positivas a HSP25 (**Fig. 24**) Por su lado, los controles también muestran dos etapas diferentes en el porcentaje de células que expresan HSP25 ( $p=0,007$ ): una fase basal de P15 a P30 y otra etapa a P35 donde aumenta el porcentaje. Si comparamos estos porcentajes entre los dos grupos de animales a distintas edades se puede observar que no hay diferencias a P15 y P20, pero a P25, P30 y P35 los ratones PCD muestran un porcentaje mayor de HSP25 que los controles ( $p_{P25}=0,008$ ,  $p_{P30}=0,003$  y  $p_{P35}=0,002$ ). Como vimos en la gráfica B, hay una caída de expresión de HSP25 a P35, y si tomamos este dato de forma individual se podría interpretar incorrectamente como que la expresión de HSP25 decae. Sin embargo, es en este momento donde la gráfica C complementa esta información y nos muestra que en realidad la expresión de HSP25 está aumentada en los animales PCD aunque coexista una pérdida neuronal.



**Figura 25. Densidad de células de Purkinje del lóbulo X a P15-P35 en ratones control y PCD.**

**(A)** El lóbulo X de los animales control tiene una densidad de células de Purkinje con calbindina mayor a P15, después desciende y se mantiene constante al resto de edades. El lóbulo X de los ratones PCD tiene la misma densidad de células que los controles a P20, P25 y P30. Sin embargo, a P35 la neurodegeneración se hace evidente y la densidad celular cae. **(B)** Para la densidad de células positivas a HSP25 se vio una mayor expresión de HSP25 en el lóbulo X de los ratones PCD a P25 y P30. En este sentido, la expresión en los ratones control fluctúa a lo largo de todas las edades y en los ratones PCD hay 2 etapas, una de menor expresión a P15-P20 y otra de mayor a partir de P25. **(C)** Por último, comparando el porcentaje de células que expresan HSP25 sobre las que expresan calbindina, se observó que los ratones PCD tienen un mayor porcentaje de HSP25 a P25, P30 y P35. En los ratones PCD se vio de nuevo que hay 2 etapas en el porcentaje de HSP25, a P15-P20 una etapa de menor expresión y a partir de P25 una de mayor expresión. Por su lado, los ratones control tienen un porcentaje estable de HSP25 hasta P35, que incrementa levemente. Los datos vienen expresados como la media  $\pm$  el error estándar de la media. Cuando el test Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas para cada grupo experimental se hizo una comparación *post hoc por pasos en sentido descendente*: las líneas superiores horizontales de cada gráfica equivalen a los subconjuntos más probables según dicha comparación. \*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,01$  entre la media de los controles y los PCD

-túa a lo largo de todas las edades y en los ratones PCD hay 2 etapas, una de menor expresión a P15-P20 y otra de mayor a partir de P25. **(C)** Por último, comparando el porcentaje de células que expresan HSP25 sobre las que expresan calbindina, se observó que los ratones PCD tienen un mayor porcentaje de HSP25 a P25, P30 y P35. En los ratones PCD se vio de nuevo que hay 2 etapas en el porcentaje de HSP25, a P15-P20 una etapa de menor expresión y a partir de P25 una de mayor expresión. Por su lado, los ratones control tienen un porcentaje estable de HSP25 hasta P35, que incrementa levemente. Los datos vienen expresados como la media  $\pm$  el error estándar de la media. Cuando el test Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas para cada grupo experimental se hizo una comparación *post hoc por pasos en sentido descendente*: las líneas superiores horizontales de cada gráfica equivalen a los subconjuntos más probables según dicha comparación. \*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,01$  entre la media de los controles y los PCD

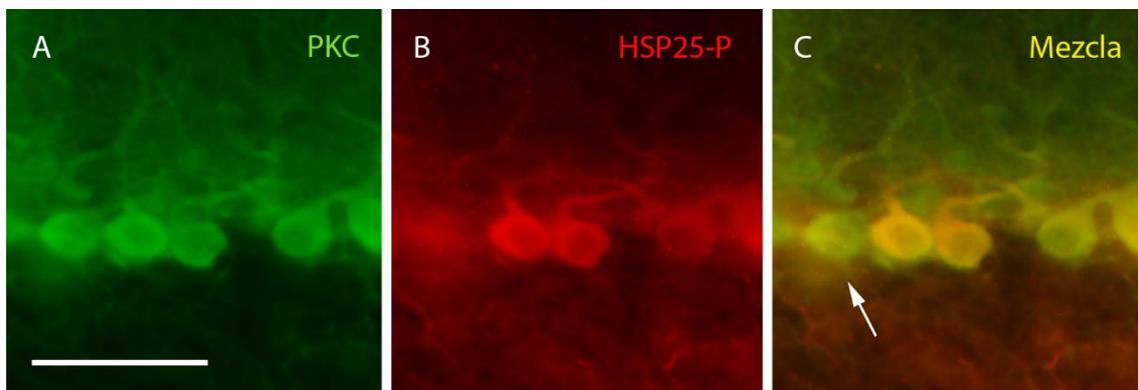
### *PKC- $\delta$ y HSP25-P se expresan más en el lóbulo X de los ratones PCD que en el de los ratones control*

PKC- $\delta$  es una fosfoquinasa encargada de fosforilar diversas proteínas, entre ellas HSP25. El marcaje de PKC- $\delta$  se limitó principalmente al soma de las células de Purkinje, de modo que, aunque en muchos casos sí se podía ver el comienzo del árbol dendrítico, no podíamos visualizar el resto de la arborización, al igual que sucedía con el axón. Por otro lado, en el soma, podíamos

## Resultados

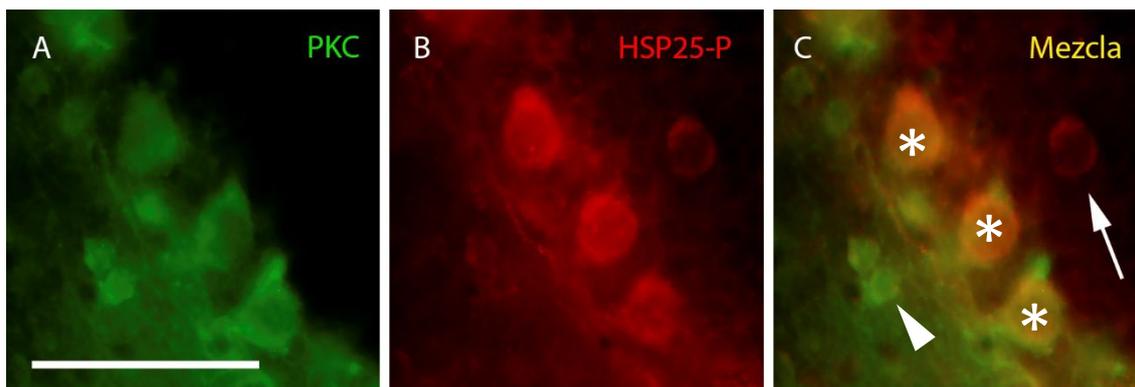
distinguir el citoplasma del núcleo debido a que este último se veía más tenue (**Fig. 26. A**). De este modo, para los recuentos celulares se utilizó como criterio ver tan solo el soma de las células de Purkinje. Con relación a HSP25-P, el marcaje fue semejante al que obtuvimos con HSP25: se veía el soma con un espacio menos marcado en el centro (correspondiente al núcleo) y el comienzo de la arborización dendrítica (**Fig. 26. B**). Tampoco pudimos observar el axón de las células de Purkinje con este marcador. Por lo tanto, el criterio que se tomó para los recuentos de este marcaje fue igual que el de HSP25, ver el soma neuronal y el comienzo de la arborización.

A simple vista se podía ver que la expresión de estas dos proteínas era mucho menor que la de calbindina y HSP25. A su vez, la expresión de HSP25-P se encontraba relegada de nuevo al lóbulo X, además de algunas células puntuales en el lóbulo VI. Por el contrario, pudimos encontrar expresión de PKC- $\delta$  en todos los lóbulos del cerebelo. Debido a esta diferencia entre la expresión de una y otra proteína, fue muy sencillo encontrar células positivas a PKC- $\delta$  y negativas a HSP25-P, pero no al revés.



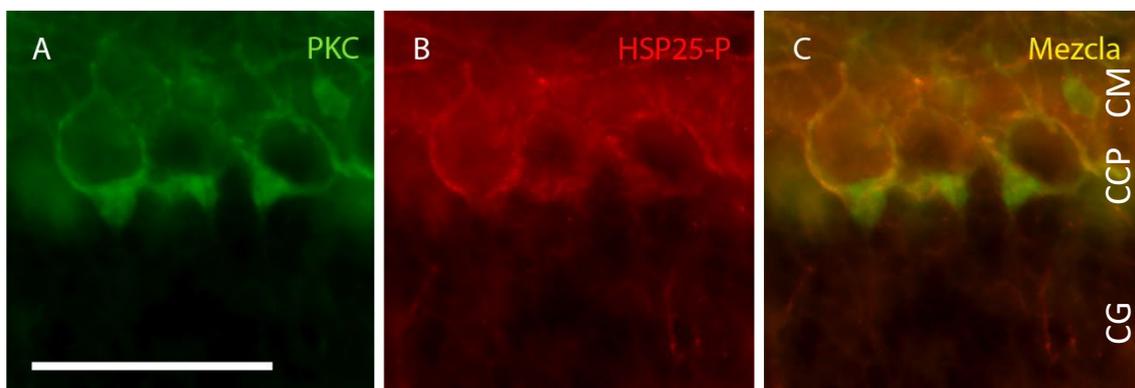
**Figura 26.** Marcaje con PKC- $\delta$  y HSP25-P en células de Purkinje del lóbulo X de un ratón PCD de P25. En la imagen **A** se pueden observar 4 células completas marcadas con PCK- $\delta$ . En **B** se pueden observar 3 células de Purkinje marcadas con HSP25-P. Finalmente, en **C** se puede ver la mezcla de ambos canales y como PKC- $\delta$  y HSP25-P colocalizan excepto en la primera célula por la izquierda (flecha). Barra de escala 50  $\mu$ m.

Como ya se describió en *Material y métodos*, la inmunohistoquímica secuencial utilizada para marcar PKC- $\delta$  y HSP25-P podría aumentar el riesgo de marcaje inespecífico cruzado debido a que el animal en el que se hicieron ambos anticuerpos primarios fue el conejo. Como el marcaje de PKC- $\delta$  se hace después que el de HSP25-P, de haber alguna unión inespecífica sería del anticuerpo secundario de PKC- $\delta$  sobre el anticuerpo primario de HSP25-P. Comprobar que no se hubiese dado esta unión era sencillo en principio: bastaba con buscar un marcaje de HSP25-P que no colocalizase con el de PKC- $\delta$ . La dificultad de encontrar este marcaje radica en que la presencia de HSP25-P depende en gran medida de que se exprese también PKC- $\delta$  y, de hecho, aunque sí se encontró marcaje de HSP25-P sin PKC- $\delta$  (**Fig. 27**), la mayoría de las veces colocalizaban. En todo caso, este resultado demuestra la validez de la técnica empleada.



**Figura 28. Distintos marcajes para PKC- $\delta$  y HSP25-P en ratón PCD de P25.** En estas imágenes podemos comprobar las 3 situaciones posibles de colocación de nuestros marcajes: en los asteriscos podemos encontrar 2 células de Purkinje que expresan tanto PKC- $\delta$  como HSP25-P; la punta de flecha señala unas células que expresan PKC- $\delta$  de forma intensa y HSP25-P de forma mucho más tenue; por último, a la derecha de las imágenes, señalada con una flecha, podemos encontrar una posible célula de Purkinje desplazada que expresa HSP25-P, pero no expresa PKC- $\delta$ . Células como esta demuestran que no se ha dado un marcaje cruzado e inespecífico por parte de los anticuerpos. Barra de escala 50  $\mu$ m.

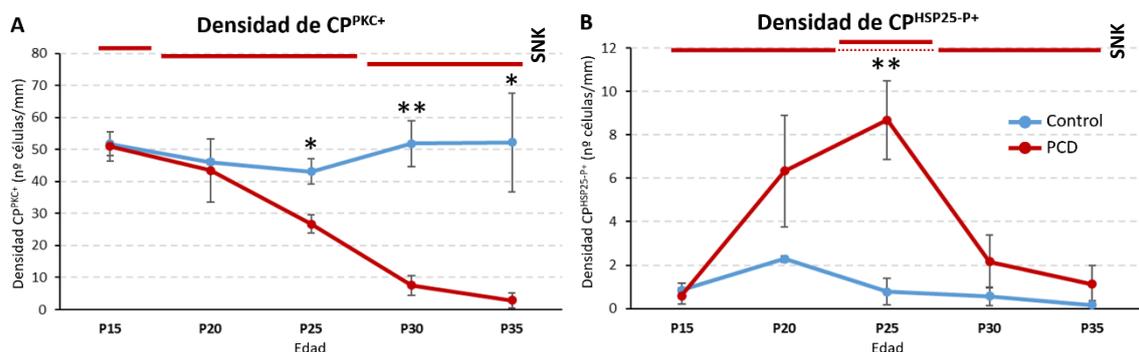
Por otro lado, el marcaje para estas dos proteínas en ocasiones no fue específico únicamente para las células de Purkinje y en ocasiones se encontraban unas estructuras que rodeaban a estas neuronas (**Fig. 28**). Aunque a bajo aumento era complicado de diferenciar, si se observaba en detalle era sencillo distinguir un marcaje de otro, ya que la estructura que se visualizaba era ligeramente más grande que una célula de Purkinje y, además, sus márgenes eran sensiblemente más delgados que el citoplasma de dichas neuronas (**Fig. 28**). Con esta información y lo visualizado en otros artículos (Ango et al., 2008) podemos hipotetizar que este marcaje corresponde a fibras que contacten con los somas de las células de Purkinje, como podrían ser las de las células en cesto. Sin embargo, para poder afirmarlo con mayor seguridad serían necesarios análisis más exhaustivos de este tipo de estructura, más allá de los objetivos de la presente Tesis Doctoral.



**Figura 27. Marcaje de PKC- $\delta$  y HSP25-P inespecífico a las células de Purkinje.** En las imágenes se puede ver un marcaje que no corresponde a las células de Purkinje. Las fibras que rodean el hueco correspondiente a estas células son muy delgadas, el tamaño de la estructura completa es más grande que una célula de Purkinje, hacia la capa molecular hay un pequeño pico resultado de la unión de las ramificaciones y hacia la capa de los granos hay otra protuberancia más grande que la superior. Barra de escala 50  $\mu$ m.

Con los criterios marcados anteriormente, se realizaron los recuentos de las células positivas a estos dos marcadores de forma similar a la que se hizo con el marcaje de calbindina y HSP25 sin fosforilar. Así, se contó el número de células de Purkinje del lóbulo X positivas a PKC- $\delta$ , a HSP25-P y se midió la longitud de la capa de las células de Purkinje. Con estos datos se hallaron las densidades celulares correspondientes (células/mm; **Fig. 29**).

Como se puede ver en la **Fig. 29. A**, la expresión de PKC- $\delta$  no varía a lo largo del tiempo en los animales control; sin embargo, sí lo hace en los animales PCD ( $p=0,001$ ): en un primer momento nos encontramos la misma expresión que en los animales silvestres, sin diferencias significativas, y esta va descendiendo a medida que progresa la degeneración neuronal. De este modo, tenemos una etapa con los mismos niveles que los animales controles a P15, una etapa neurodegenerativa a P20 y P25 donde desciende la expresión, y una última etapa del final de la degeneración neuronal a P30 y P35 donde se alcanzan los mínimos. Al comparar ambos grupos experimentales se comprobó que el número de células de Purkinje que expresa PKC- $\delta$  era significativamente menor que en los ratones silvestres a P25 ( $p=0,016$ ), P30 ( $p=0,008$ ) y P35 ( $p=0,036$ ). Por otro lado, en la **Fig. 29. B** se puede observar de nuevo que la expresión de HSP25-P no varía a lo largo del tiempo en los controles, además de que los valores no superan las 2 células por milímetro. Por su lado, en los ratones PCD la densidad celular sí que varía a lo largo del tiempo ( $p=0,01$ ): la expresión parte de un mínimo, al igual que en los controles, y comienza a aumentar hasta P25, cuando vuelve a disminuir, debido probablemente a la muerte de las células de Purkinje. P25, momento de mayor expresión de HSP25-P en los ratones PCD, es la única edad en la que vimos diferencias significativas con respecto a los controles ( $p=0,008$ ). Por otro lado, no hemos mostrado los recuentos realizados en el resto de los lóbulos debido a la baja expresión de ambas proteínas: para PKC- $\delta$ , el lóbulo IX mostraba una expresión menor que el lóbulo X y las zonas más rostrales ni siquiera superaban las 5 células por lóbulo; por su parte, no encontramos expresión de HSP25-P. No obstante, en el lóbulo VI encontrábamos una expresión de PKC- $\delta$  y HSP25-P ligeramente mayor que la del resto de lóbulos, aunque no era nada comparable a la que mostraba el lóbulo X.

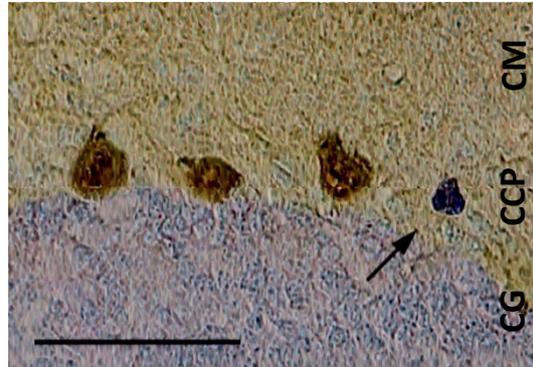


**Figura 29. Densidad de células de Purkinje positivas a PKC- $\delta$  y HSP25-P del lóbulo X a P15-P35 en ratones control y PCD. (A)** En los ratones control no se observaron cambios en la densidad de células de Purkinje positivas a PKC- $\delta$  a lo largo del tiempo. Sin embargo, en los ratones PCD sí se distinguen 3 etapas descendentes, una a P15, otra a P20-P25 y la última a P30-P35. Al comparar entre genotipos se ve que a P25, P30 y P35 los ratones PCD tienen una expresión menor de esta proteína. **(B)** Al analizar los datos de HSP25-P en ratones silvestres tampoco se encontraron diferencias significativas. Por el contrario, en los ratones PCD se observa un pico de expresión a P25. De hecho, a esta misma edad es cuando se encuentran diferencias significativas entre los ratones PCD y los controles. Cuando el test Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas para cada grupo experimental se hizo una comparación *post hoc por pasos en sentido descendente*: las líneas superiores horizontales de cada gráfica equivalen a los subconjuntos más probables según dicha comparación. \*  $p<0,05$  y \*\*  $p<0,01$  entre la media de los controles y los PCD.

### Algunas células de Purkinje no expresan Calbindina en los ratones PCD

En los apartados anteriores analizamos la expresión de HSP25 en forma de densidad celular y en forma de porcentaje. Así, el porcentaje de células de Purkinje que expresaban HSP25 se realizó interpretando las neuronas que expresaban calbindina como si estas constituyesen la totalidad de las células vivas, tal y como se ha sugerido con anterioridad (Celio, 1990; Tolbert et al., 1995; Duchala et al., 2004; Duffin et al., 2010; Praggastis et al., 2015). Sin embargo, al observar los valores obtenidos, pudimos comprobar que, en algunos casos, el porcentaje de

células positivas a HSP25 era superior al 100%, lo que significaba que había más células de Purkinje positivas a HSP25 que las positivas a calbindina. Aunque la diversa bibliografía ha demostrado que la calbindina es un marcador clásico de células de Purkinje por lo fiable que es, queríamos comprobar cómo de relevante podía ser el número de células de Purkinje que no se marcaban con calbindina y no estábamos contabilizando. De este modo, decidimos estudiar las células de Purkinje positivas a calbindina y a la vez las totales. Para contabilizar estas últimas, nos decantamos por visualizar los núcleos de dichas células. En el apartado de *Material y métodos* citamos todas las pruebas que hicimos para visualizar los núcleos a la vez que intentábamos ver el marcaje de calbindina y nos decantamos por realizar una inmunoprecipitación con DAB para marcar la calbindina y una tinción con azul de toluidina para ver los núcleos. En este caso el marcaje de calbindina se limitó a la totalidad del soma celular pero no del axón y del árbol dendrítico, de modo que a menudo podíamos visualizar las células con la característica forma de gota que ya hemos citado anteriormente. La toluidina, por su lado, marcaba el núcleo, que evidentemente era de un tamaño menor al soma y en ocasiones replicaba la forma de este (**Fig. 30**).



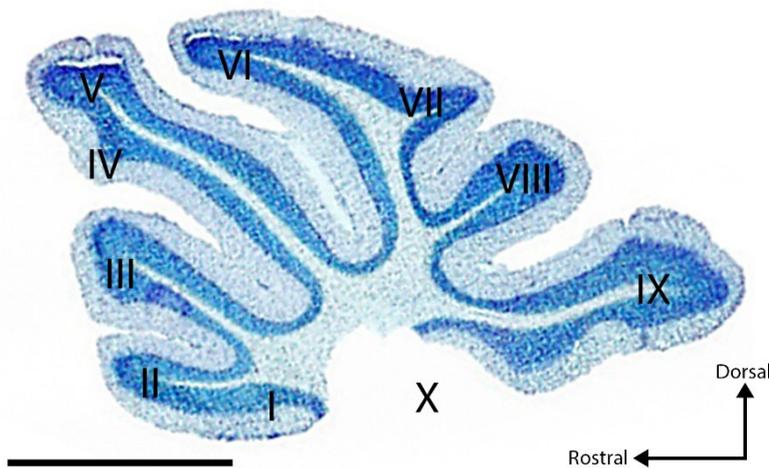
**Figura 30.** Inmunohistoquímica para calbindina y tinción nuclear con azul de toluidina en un ratón PCD a P35. Las 3 primeras células son células de Purkinje que expresan calbindina y la cuarta, señalada con la flecha, es una célula de Purkinje que no expresa calbindina, de modo que solo podemos observar su núcleo. Barra de escala 100  $\mu$ m. CM, capa molecular; CCP, capa de las células de Purkinje; CG, capa de los granos.

El resultado obtenido fue llamativo, el precipitado que se forma sobre las células de Purkinje en cierto modo es tan intenso que no nos permitía visualizar claramente la tinción de toluidina, de modo que las células que expresan calbindina, y por consiguiente se marcan de marrón, no muestran un núcleo teñido intensamente de azul. Por el contrario, las células con marcajes más tenues sí permiten vislumbrar su núcleo azul mejor que las que tienen un marcaje más intenso de calbindina. La cuestión que queríamos resolver con esta técnica eran las células de Purkinje que no expresaban calbindina, de modo que este tipo celular al no tener un precipitado de DAB no impedía la visualización del azul de toluidina, por lo que su núcleo se podía ver perfectamente teñido. Con relación al número, estas células no eran muy abundantes y a menudo se limitaban a un par de células por tejido, pero solo en el lóbulo X de los ratones PCD de edades más avanzadas, en el resto de los animales no pudimos ver este tipo de células de Purkinje. No se realizaron recuentos más exhaustivos debido a la escasa influencia que suponían y haberlas visualizado nos confirmó la fiabilidad de los resultados de calbindina.

## Resultados

### Dissección del lóbulo X y control de la técnica

Para comprobar que la disección del lóbulo X era la correcta para las técnicas posteriores, se utilizó 1 animal control para cada grupo de edad. Se diseccionó el lóbulo X (como ya se ha descrito en la sección *Material y Métodos*) y lo que quedaba del vermis se fijó, seccionó y se le aplicó una tinción con azul de toluidina. Esta tinción es una técnica muy rápida y sencilla que nos permite marcar los núcleos celulares y ver la morfología del vermis (**Fig. 31**).



**Figura 31. Sección sagital del vermis sin lóbulo X teñido con azul de toluidina.** En la imagen se puede observar la morfología del vermis de un ratón silvestre de P30. Numerados del I al IX se pueden observar los distintos lóbulos cerebelosos. Señalado con el número X se encuentra el espacio correspondiente al lóbulo X. Mediante imágenes como esta pudimos comprobar que la extracción del lóbulo X era la correcta para cada grupo de edad. Barra de escala 1 mm.

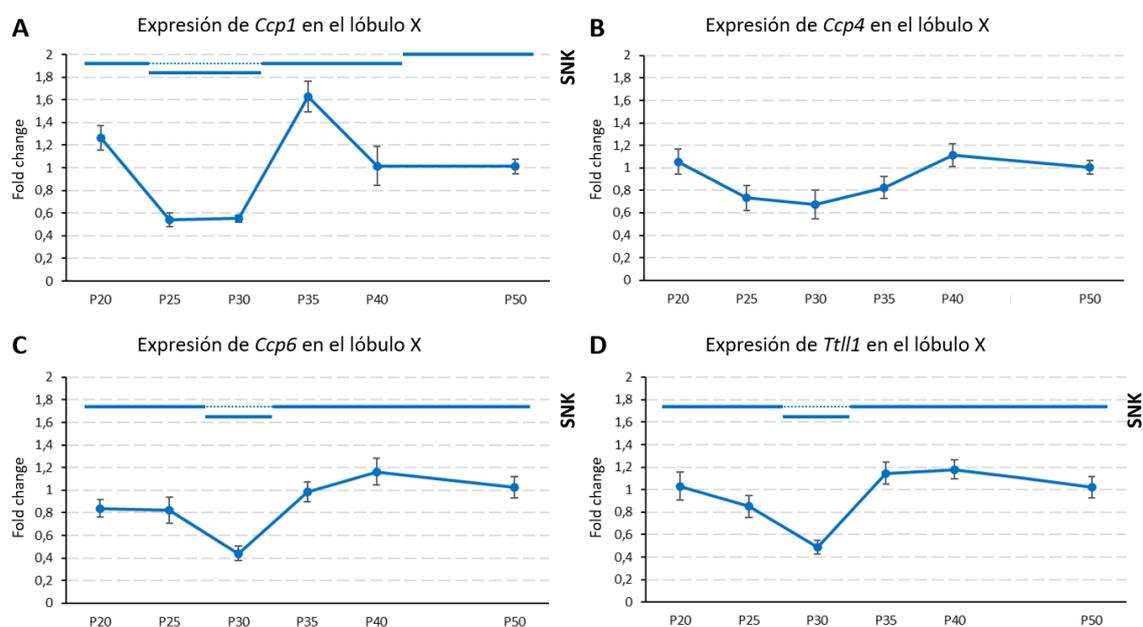
Una vez que se comprobó que la disección del lóbulo X era adecuada, comenzamos las técnicas moleculares: el lóbulo X debía estar extraído en su totalidad sin dejar ninguna parte en el vermis y, por otro lado, el resto de lóbulos debían estar intactos y no haberse arrastrado durante la extracción por error.

### Patrón de expresión génica a lo largo del tiempo en controles

Antes de adentrarnos en los resultados de qPCR, es necesario explicar el patrón de colores a utilizar. Para representar la media de *Fold change*, los círculos rellenos representan el lóbulo X y los círculos vacíos representan el resto de los lóbulos (del I al IX; abreviado como **vermis** en las gráficas). A su vez, el color azul representa a los animales controles y, como se verá más adelante, el color granate representa a los PCD.

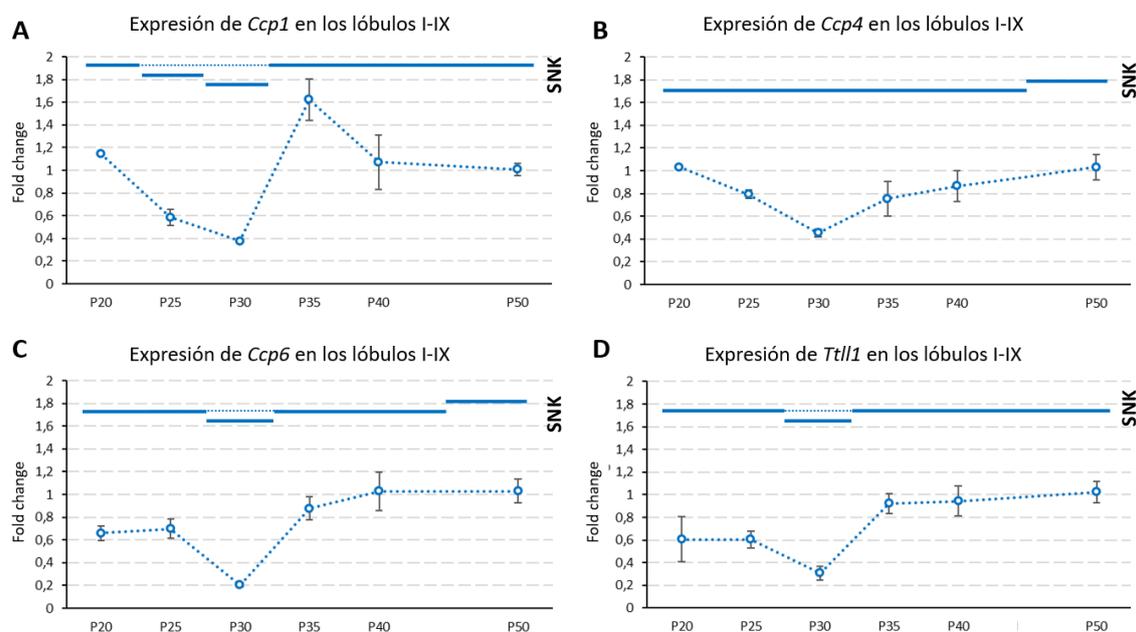
Se ha analizado la expresión de *Ccp1*, *Ccp4*, *Ccp6* y *Ttll1* a lo largo de P15, P20, P25, P30, P35, P40 y P50. Primero se mostrarán los resultados de lóbulo X y después del resto de lóbulos, debido a que no se pueden unificar todos los resultados en una sola representación por no ser comparables. En las gráficas se muestra la media de *Fold change* de las distintas edades  $\pm$  el error estándar de la media.

Los resultados en el lóbulo X fueron variados en función del gen estudiado. Si comenzamos por *Ccp1*, el test Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas a lo largo de las edades ( $p > 0,001$ ). Mediante el test *post hoc* pudimos agrupar las edades en los subconjuntos más probables, de modo que por un lado vimos que P20, P35 y P40 constituyen un grupo, P25 y P30 otro, y, por último, P50 constituye un grupo en sí mismo (**Fig. 32. A**). De esta manera podemos inferir que la expresión baja de P20 a P25 y se mantiene hasta P30. A P35 vuelve a aumentar y se mantiene hasta P40, para volver a bajar hasta P50 a un nivel, aparentemente intermedio entre el mínimo de P25-P30 y el anterior de P35-P40. Por otro lado, si analizamos la expresión a lo largo del tiempo de *Ccp4* no pudimos observar ninguna diferencia significativa en el lóbulo X (**Fig. 32. B**); ello no obstante, al observar los valores de  $C_T$  de este gen comprobamos que rondan el ciclo 32, cuando el resto de los genes estudiados suelen estar comprendidos entre los ciclos 22 y 27. Esto nos hace sospechar de su baja expresión y podría explicar por qué no varía a lo largo del tiempo. Por último, podemos visualizar como *Ccp6* y *Ttl1* se comportan de la misma forma: parten de un nivel de expresión inicial a P20 que se mantiene hasta P25 para luego descender a P30 y volver de nuevo a los niveles iniciales durante el resto de las edades (**Fig. 32. C y D**). Ambos patrones de expresión mostraron diferencias significativas mediante el test Kruskal-Wallis ( $p_{Ccp6}=0,006$  y  $p_{Ttl1}=0,014$ ) y el test *post hoc* agrupó a todas las edades en un solo grupo, salvo la edad de P30, que constituye un grupo en sí misma.



**Figura 32. Expresión de *Ccp1*, *Ccp4*, *Ccp6* y *Ttl1* en el lóbulo X de animales control de P20 a P50.** (A) Para la expresión de *Ccp1* se vieron diferencias significativas a lo largo de la edad. Estas diferencias se mostraron como un patrón fluctuante: existe una bajada en la expresión de P20 a P25 que se mantiene hasta P30; a continuación, a P35 y P40 la expresión vuelve a aumentar aproximadamente al mismo nivel que antes para finalmente descender ligeramente a P50. (B) No se vieron diferencias significativas a lo largo del tiempo para *Ccp4*, además de que detectamos unos niveles de expresión muy bajos ( $C_T$  en torno a 32). (C y D) Con diferencias significativas, se observó el mismo patrón de expresión en el lóbulo X tanto para *Ccp6* como para *Ttl1*: una expresión inicial a P20 y P25, un pequeño descenso a P30 y después se retoman los niveles anteriores durante el resto de edades. Cuando el test Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas se hizo una comparación *post hoc por pasos en sentido descendente*: las líneas superiores horizontales de cada gráfica equivalen a los subconjuntos más probables según dicha comparación.

Por su parte, hemos analizado la expresión de los 4 genes estudiado en los lóbulos I-IX a lo largo de las distintas edades. En este caso, para *Ccp1* hemos encontrado un patrón parecido al que pudimos observar en el lóbulo X, con diferencias significativas ( $p=0,001$ ): partimos de una expresión inicial a P20 que desciende a P25, pero en vez de mantenerse como sucedía en el lóbulo X, vuelve a descender incluso más a P30. A partir de esta edad la expresión de *Ccp1* vuelve a incrementar hasta sus niveles originales y se mantiene durante el resto de las edades (**Fig. 33. A**). Con relación a la expresión de *Ccp4*, en los lóbulos I-IX sí obtuvimos diferencias significativas ( $p=0,041$ ), y según los test *post hoc*, las edades se agruparon en un grupo inicial compuesto por P20 hasta P40 y un grupo final compuesto solo por P50, cuya expresión es ligeramente mayor que la de edades anteriores (**Fig. 33. B**). Si bien, estos datos deben ser tomados con cautela, puesto que hemos detectado una baja expresión de este gen. Para la expresión de *Ccp6* también se observaron diferencias significativas ( $p=0,002$ ) y las edades se dispusieron en el siguiente patrón: la expresión a P20 y P25 desciende a P30 y vuelve a aumentar a P35 y P40; por último, P50, como sucede con *Ccp4*, vuelve a mostrarse como un grupo independiente del resto (**Fig. 33. C**). Finalmente, *Ttll1* mostró diferencias significativas ( $p=0,009$ ) y el mismo patrón que vimos en el lóbulo X: todas las edades conforman un único grupo salvo P30, que muestra una expresión menor que el resto (**Fig. 33. D**).



**Figura 33. Expresión de *Ccp1*, *Ccp4*, *Ccp6* y *Ttll1* en los lóbulos I-IX de animales control de P20 a P50. (A)** Con diferencias significativas, la expresión de *Ccp1* baja desde P20 a P25 y a P30, después se eleva a los niveles iniciales y se mantiene desde P35 a P50. **(B)** La expresión de *Ccp4* se mantiene constante desde P20 hasta P40, y P50 se muestra como una edad diferente al resto. **(C)** Con relación a *Ccp6*, la expresión parte de una inicial a P20 y P25, desciende ligeramente a P30 y aumenta de nuevo a los niveles iniciales a P35 y P40; P50 se vuelve a mostrar como una edad independiente del resto. **(D)** *Ttll1* parte desde una expresión inicial a P20 y P25, para volver a bajar a P30, y de nuevo elevarse a los niveles iniciales durante el resto de edades. Cuando el test Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas se hizo una comparación *post hoc por pasos en sentido descendente*: las líneas superiores horizontales de cada gráfica equivalen a los subconjuntos más probables según dicha comparación.

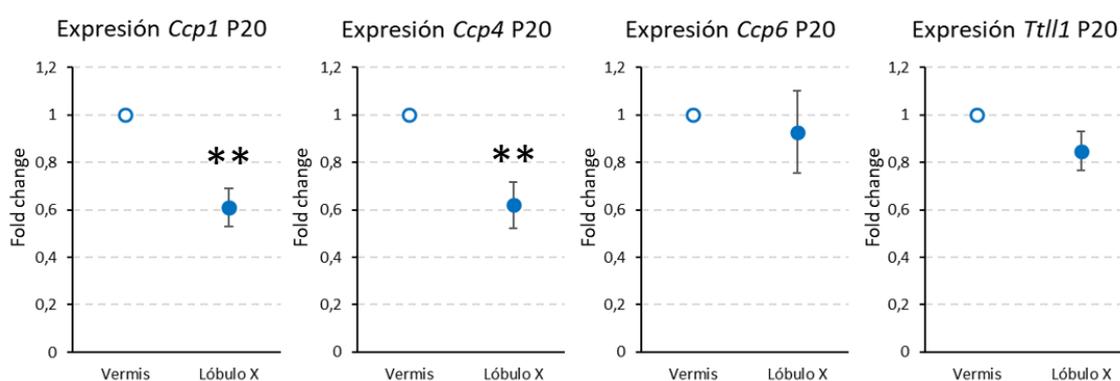
Lo más reseñable del estudio longitudinal de la expresión génica es que salvo en la expresión de *Ccp4*, cuya expresión es muy reducida, P30 supone una edad clave en la expresión de estos genes. En ambos tejidos la expresión desciende, para elevarse nuevamente a P35 retomando, por lo general, los valores iniciales de P20. Del mismo modo, aunque no ha sido tan constante como P30, P50 se ha mostrado en 3 escenarios como una edad diferente al resto de edades, aunque en las gráficas no se ve de forma clara, si comparamos la expresión de P50 con

el grupo mayoritario del que se diferencia, se podría ver que la expresión es ligeramente mayor que las anteriores. De todos modos, estos datos se analizarán con más profundidad en el apartado *Discusión*.

#### *Diferencias en la expresión génica de Ccp1, Ccp4, Ccp6 y Ttl1 en controles*

En este caso, para analizar los genes *Ccp1*, *Ccp4*, *Ccp6* y *Ttl1* mediante qPCR en controles se comparó dicha expresión entre el lóbulo X y el resto de los lóbulos a las edades de P20, P25, P30, P35, P40 y P50. Los resultados se desglosarán en cada una de estas edades por separado. En las gráficas se muestra la media de *Fold change* de los distintos animales  $\pm$  el error estándar de la media. Los valores de *Fold change* para el resto de los lóbulos, al ser comparados frente a sí mismos, son iguales a 1 y tienen un error estándar muy bajo. Además, aunque hemos detectado que la expresión de *Ccp4* es muy baja, la técnica de qPCR nos permite comparar su expresión, de modo que aunque debamos interpretarlos con cautela, se mostrarán sus resultados igualmente.

Comenzamos por describir los resultados a P20, la primera de las edades estudiadas. En esta etapa hemos visto que el lóbulo X tiene una menor expresión de *Ccp1* y *Ccp4* que el resto de lóbulos ( $p_{Ccp1}=0,008$  y  $p_{Ccp4}=0,008$ ). *Ccp6* y *Ttl1*, sin embargo, no mostraron diferencias significativas entre el lóbulo X y el resto de los lóbulos (**Fig. 34**).

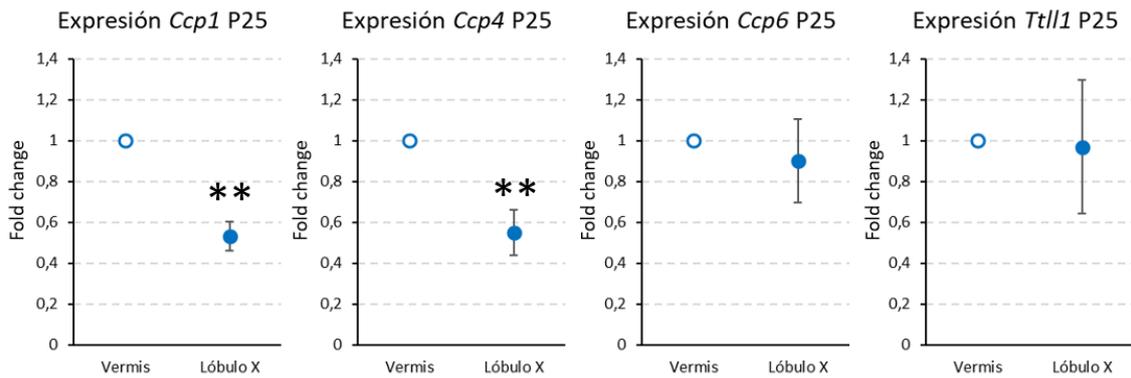


**Figura 34.** Expresión de *Ccp1*, *Ccp4*, *Ccp6* y *Ttl1* entre el lóbulo X y el resto del vermis a P20. A esta edad el lóbulo X presenta una menor expresión que resto de lóbulos para los genes *Ccp1* y *Ccp4*. Los datos vienen expresados como la media de *Fold change*  $\pm$  el error estándar de la media. \*\*  $p < 0,01$ .

Los resultados del análisis génico a P25 fueron idénticos que a P20: vimos diferencias de expresión entre el lóbulo X y el resto de lóbulos en *Ccp1* y *Ccp4* ( $p_{Ccp1}=0,002$  y  $p_{Ccp4}=0,002$ ), en los que pudimos volver a ver como dichos genes se expresan en menor medida en el lóbulo X que en el resto del vermis; y, por otro lado, no encontramos diferencias entre el lóbulo X y el resto de los lóbulos en la expresión de *Ccp6* y *Ttl1* (**Fig. 35**).

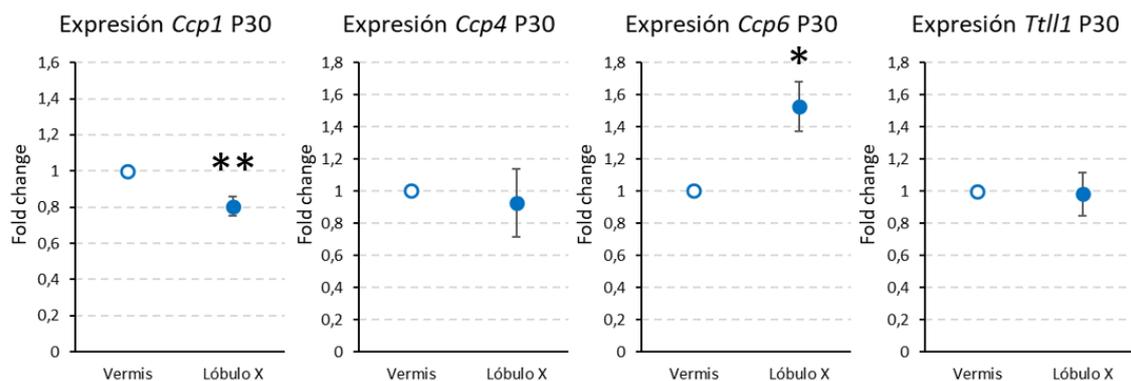
Como hemos visto, a P20 y P25 en el lóbulo X de los animales control hay una menor expresión de *Ccp1* y *Ccp4*, ambas proteínas relacionadas con la desglutamilación del citoesqueleto. Merece la pena recalcar que estos niveles, al suceder en los animales silvestres, no están sujetos a la mutación *pcd*, es decir, que de forma constitutiva el lóbulo X podría requerir unos niveles de desglutamilación menores que el resto de los lóbulos.

## Resultados



**Figura 36. Expresión de *Ccp1*, *Ccp4*, *Ccp6* y *Ttl1* entre el lóbulo X y el resto del vermis de controles a P25.** El lóbulo X a esta edad presenta una menor expresión que resto de lóbulos para los genes *Ccp1* y *Ccp4*. Los datos vienen expresados como la media de *Fold change*  $\pm$  el error estándar de la media. \*\*  $p < 0,01$ .

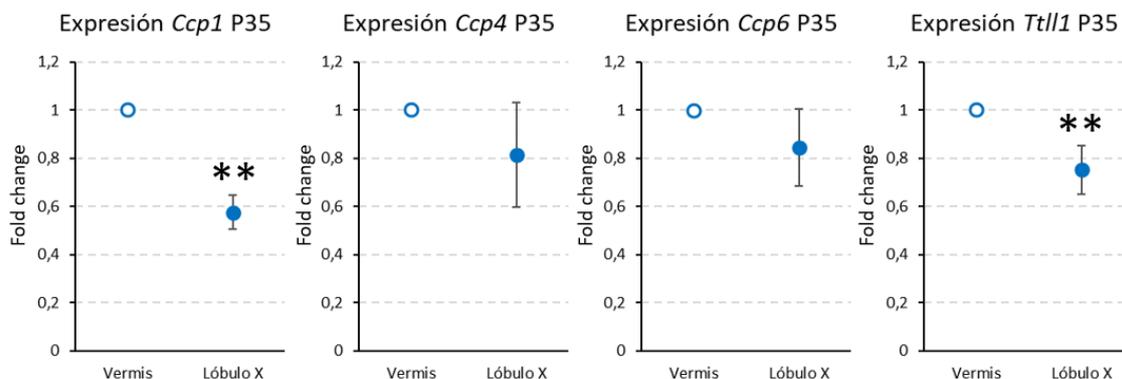
La siguiente edad estudiada fue P30. A esta edad, al igual que en las anteriores, la expresión de *Ccp1* sigue siendo menor en el lóbulo X que en el resto de los lóbulos ( $p=0,008$ ), pero ya no sucede lo mismo con *Ccp4*, que ha aumentado su expresión hasta llegar a ser la misma en ambas regiones. Por otro lado, es llamativo que *Ccp6*, que no había mostrado diferencias hasta el momento, incrementa su expresión en el lóbulo X con relación al resto de lóbulos ( $p=0,029$ ; **Fig. 36**). Este aumento de expresión, tanto de *Ccp4*, como de *Ccp6*, es interesante, puesto que hasta el momento habíamos visto que el lóbulo X mostraba una menor necesidad aparente de desglutamilación y, en este caso, el aumento de expresión de *Ccp4* y *Ccp6* implica lo contrario. Esto podría explicarse si entendemos que el lóbulo X a esta edad requiere unos niveles de desglutamilación algo mayores que antes, y *Ccp4* y *Ccp6* están cumpliendo una función compensatoria a la baja expresión de *Ccp1*. Que en este momento sea necesaria una mayor capacidad de desglutamilación cobra más sentido si tenemos en cuenta que P30 es un momento crítico de la degeneración neuronal en el lóbulo X a partir del cual comienza a ser evidente la pérdida de células de Purkinje.



**Figura 35. Expresión de *Ccp1*, *Ccp4*, *Ccp6* y *Ttl1* entre el lóbulo X y el resto del vermis de controles a P30.** La expresión de *Ccp1* sigue siendo menor en el lóbulo X que en el resto del vermis. Por otro lado, a esta edad se comprobó que la expresión de *Ccp6* es mayor en el lóbulo X que en el resto de lóbulos. Los datos vienen expresados como la media de *Fold change*  $\pm$  el error estándar de la media. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

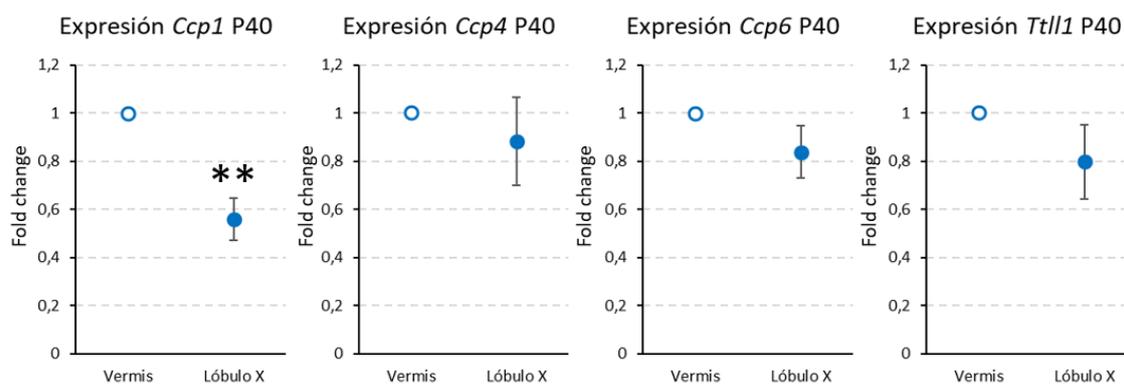
A P35 observamos un fenómeno equivalente al de P30: *Ccp1* sigue expresándose menos en el lóbulo X que en el resto de los lóbulos ( $p=0,008$ ). *Ccp4* y *Ccp6* no muestran diferencias significativas, y ahora es *Ttl1* el que ha reducido su expresión en el lóbulo X respecto al resto de lóbulos ( $p=0,008$ ; **Fig. 37**). Como ya hemos visto, TTL1 se encarga de glutamilar el citoesqueleto, y por ello es la enzima con efecto opuesto al de CCP1. Aunque *Ccp6* a esta edad en el lóbulo X no sigue actuando igual que a P30, el efecto global podría ser equivalente en ambas edades

puesto que el descenso de *Ttll1* daría como resultado que el citoesqueleto de las células de Purkinje del lóbulo X se encuentre menos glutamylado. Es decir, el efecto sería similar al que obtendríamos al aumentar la expresión de una enzima desglutamylante como *Ccp6*. Por lo tanto, el aumento de *Ccp6* a P30 o el descenso de *Ttll1* a P35 solo en el lóbulo X podría dar como resultado que este tejido sea menos susceptible a la mutación *pcd*.



**Figura 37. Expresión de *Ccp1*, *Ccp4*, *Ccp6* y *Ttll1* entre el lóbulo X y el resto del vermis de controles a P35.** A esta edad *Ccp1* se expresa menos en el lóbulo X que en el resto de lóbulos. *Ccp4* y *Ccp6* por su parte no muestran diferencias significativas, pero *Ttll1* sí, cuya expresión se encuentra reducida en el lóbulo X respecto al resto de lóbulos. Los datos vienen expresados como la media de *Fold change*  $\pm$  el error estándar de la media. \*\*  $p < 0,01$ .

A la siguiente edad, P40, salvo por *Ccp1*, cuya expresión se encuentra nuevamente disminuida en el lóbulo X frente al resto de los lóbulos ( $p = 0,002$ ), no se encontraron diferencias significativas para el resto de los genes entre ambas localizaciones. Si lo relativizamos con P35, *Ccp4* y *Ccp6* no han cambiado su patrón de expresión, pero sí lo hace *Ttll1* que pasa de una expresión disminuida en el lóbulo X a una equivalente entre ambos tejidos, lo que se entendería como que el lóbulo X ha aumentado su expresión hasta los mismos niveles que el resto de los lóbulos (Fig. 38).

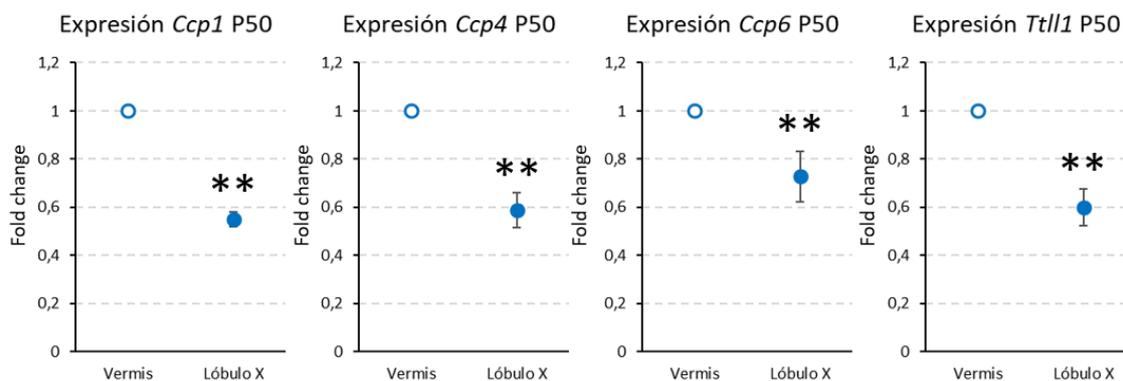


**Figura 38. Expresión de *Ccp1*, *Ccp4*, *Ccp6* y *Ttll1* entre el lóbulo X y el resto del vermis de controles a P40.** A esta edad solo se encontraron diferencias significativas en *Ccp1*, que se expresa menos en el lóbulo X que en el resto de los lóbulos. Los datos vienen expresados como la media de *Fold change*  $\pm$  el error estándar de la media. \*\*  $p < 0,01$ .

Por último, tenemos los datos de P50, edad a la que se observaron diferencias altamente significativas para todos los genes ( $p_{Ccp1} = 0,002$ ,  $p_{Ccp4} = 0,008$ ,  $p_{Ccp6} = 0,002$  y  $p_{Ttll1} = 0,002$ ). Como ha ocurrido a todas las edades estudiadas, *Ccp1* se expresa en menor medida en el lóbulo X que en el resto de lóbulos; *Ccp4* y *Ccp6*, enzimas con función análoga a la de *Ccp1* también se expresan menos en el lóbulo X; y, por último, *Ttll1* también se expresa menos en el lóbulo X que en el resto del vermis (Fig. 39).

## Resultados

A P50 el descenso en la expresión de todas las enzimas estudiadas es llamativo, pero el descenso de expresión de *Ccp1*, *Ccp4* y *Ccp6* se podría entender como que el citoesqueleto de las células del lóbulo X requiere menos desglutamilación debido a que no se encuentra tan



**Figura 39. Expresión de *Ccp1*, *Ccp4*, *Ccp6* y *Ttl1* entre el lóbulo X y el resto del vermis de controles a P50.** En esta última edad se comprobó que el lóbulo X presenta una menor expresión para los genes de todas las enzimas estudiadas. Los datos vienen expresados como la media de *Fold change*  $\pm$  el error estándar de la media. \*\*  $p < 0,01$ .

glutamilado. Precisamente, uno de los motivos de ello puede ser la reducida expresión de *Ttl1*.

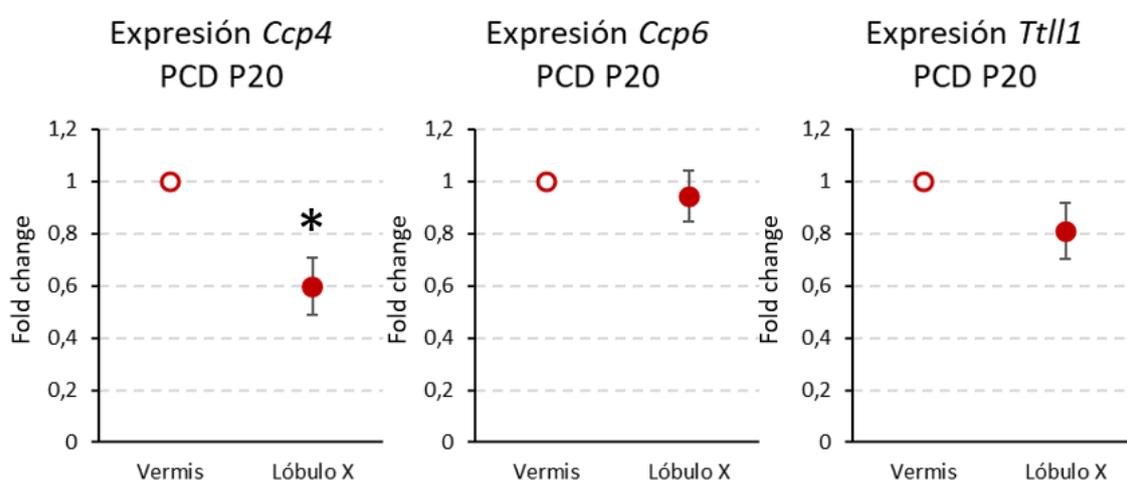
Los resultados correspondientes a los animales silvestres podrían resumirse en que la expresión de *Ccp1* a todas las edades es menor en el lóbulo X que en el vermis. Ello podría entenderse como que el citoesqueleto de las células de Purkinje del lóbulo X no requiere tanta desglutamilación como el del resto de lóbulos y por ello, hay menos expresión de *Ccp1* de manera constitutiva. Sin embargo, para el resto de los genes no se ha encontrado un patrón general en las distintas edades y tan solo se pudieron observar diferencias en momentos puntuales. En el apartado *Discusión* se valorarán estos cambios de expresión con más detalle.

### Diferencias en la expresión génica de *Ccp4*, *Ccp6* y *Ttl1* en los ratones PCD

Una vez analizada la expresión génica en el cerebelo de los animales silvestres, se procedió a estudiar los mismos genes en los ratones PCD. Ya se explicó en el apartado *Material y métodos* que los oligonucleótidos de *Ccp1* utilizados en la presente Tesis no habían sido desarrollados específicamente para este trabajo, sino que se tomaron unos diseñados con anterioridad y puestos a punto de un artículo que estudiaba *Ccp1* mediante qPCR en nuestro mismo modelo animal. En este se demostraba que la expresión del gen en los ratones PCD era despreciable (Baltanás et al., 2013) aunque se sabe que la mutación que sufre nuestro modelo de estudio se encuentra en una región reguladora, lo que no inhibiría la expresión total de *Ccp1*. De hecho, existe bibliografía al respecto que confirma cierta expresión de *Ccp1* en el ratón PCD: aunque en el encéfalo no se ha observado expresión, sí se ha comprobado su existencia en los testículos, aunque menos que en los controles (Fernández-González et al., 2002). En un inicio, no había intenciones de realizar el estudio de *Ccp1* sobre animales PCD por su probada expresión nula con estos cebadores. Sin embargo, como ya disponíamos del tejido y la técnica estaba puesta a punto decidimos probarlo. Lo inesperado fue que sí observamos cierta expresión de *Ccp1* con los mismos oligonucleótidos que anteriormente negaban su existencia en ratones de la misma cepa que la que utilizamos nosotros. Para comprobar la validez de esta expresión diseñamos 3 parejas más de oligonucleótidos, ratificando los resultados de los cebadores iniciales. Por otro lado, para descartar que este fenómeno se debiese a una mutación de la estirpe de nuestro animalario, hicimos el mismo experimento con animales PCD provenientes de otras instalaciones y, de nuevo, obtuvimos resultados similares. De todas formas, comprobamos que la expresión de *Ccp1* en los ratones PCD era claramente menor que la de los

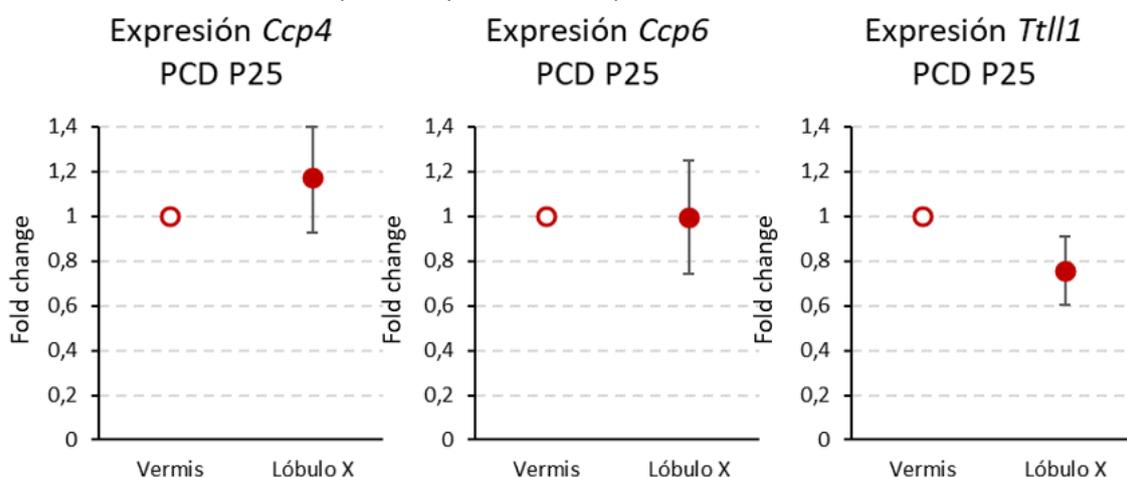
controles. Ya hemos mencionado la complejidad de este gen y la gran cantidad de regiones no codificantes de proteína que posee, es por ello, que debido a que nuestros resultados de qPCR se basan en la expresión de mRNA, y este no tiene por qué desembocar en la presencia de proteína, se decidió que los datos de *Ccp1* en ratones PCD no se analizarían mediante qPCR, sino que se haría mediante *Western Blot* para conocer de forma directa la presencia o no de proteína (ver más adelante). Aparte, respecto al resto de genes, como veremos a continuación, solo se han analizado las edades de P20 y P25 debido a que más adelante la degeneración neuronal es evidente y la cantidad de células de Purkinje está muy reducida, y los datos a edades posteriores no harían referencia a la expresión de dichas neuronas, sino a la de otros tipos celulares.

A P20 hemos comprobado que el patrón de expresión del lóbulo X con respecto al vermis de los ratones PCD es similar a los resultados que obtuvimos en los animales control: sin diferencias en *Ccp6* y *Ttll1*, pero con una expresión disminuida de *Ccp4* ( $p=0,029$ ). Así pues, la mutación del ratón PCD no parece afectar a la expresión de los genes estudiados a esta edad tanto en el lóbulo X como en el resto de los lóbulos (**Fig. 40**). De este modo, siguen existiendo evidencias de que el lóbulo X requiere menos desglutamilación aun sufriendo la mutación *pcd*.



**Figura 40.** Expresión de *Ccp4*, *Ccp6* y *Ttll1* entre el lóbulo X y el resto del vermis de PCD a P20. De todos los genes estudiados, solo se encontraron diferencias significativas en la expresión de *Ccp4*. \*  $p<0,05$ .

Por otro lado, a P25, no se han encontrado diferencias significativas en el tejido PCD (**Fig. 41**), ni siquiera en la expresión de *Ccp4*, lo que difiere con los resultados obtenidos en controles, donde sí se vio que la expresión de *Ccp4* era inferior en el lóbulo X. Este suceso



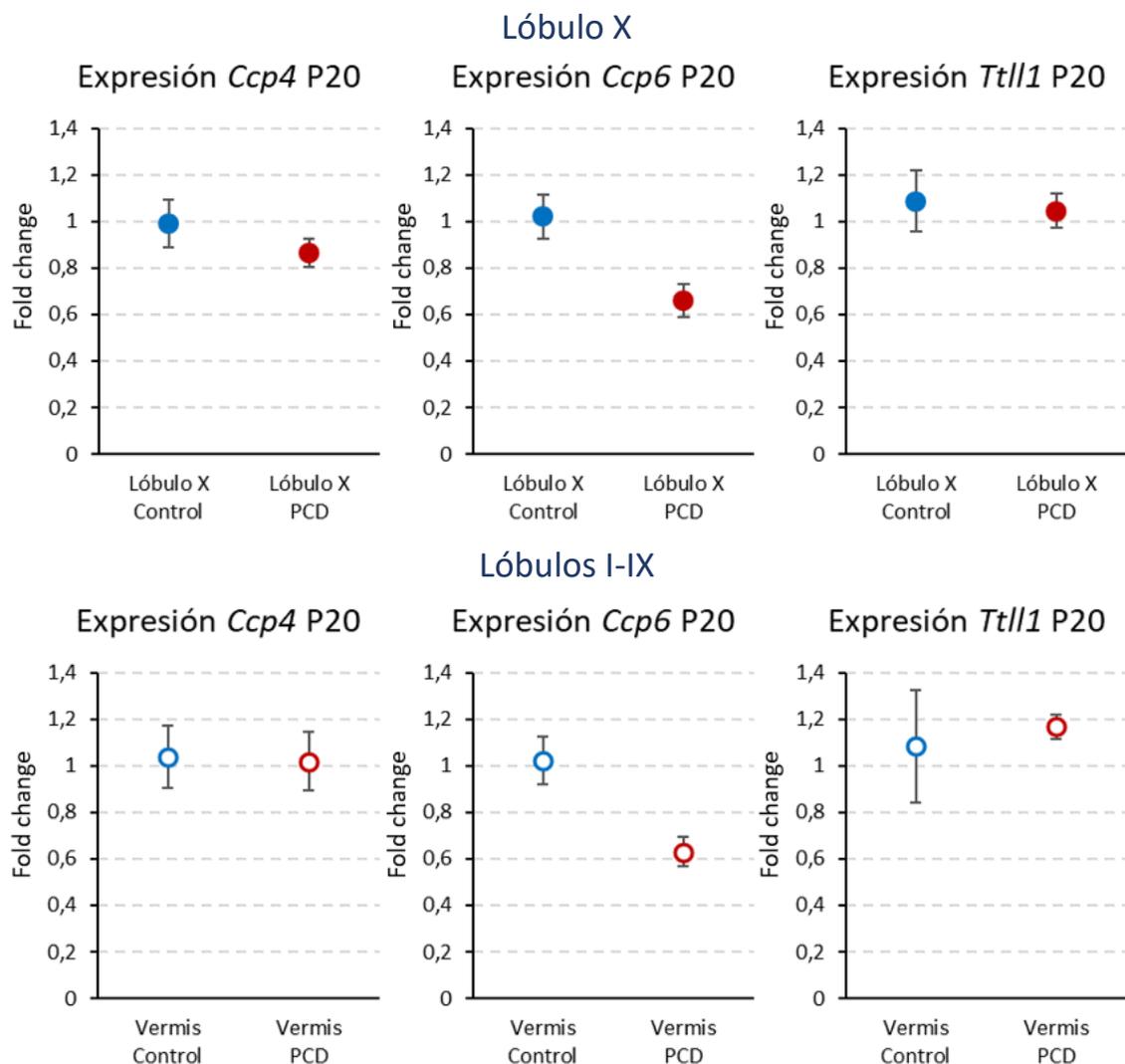
**Figura 41.** Expresión de *Ccp4*, *Ccp6* y *Ttll1* entre el lóbulo X y el resto del vermis de PCD a P25. A esta edad estudiada no pudimos observar diferencias significativas en ningún tejido.

## Resultados

implica, por un lado, que de P20 a P25 la expresión de *Ccp4* ha aumentado en el lóbulo X y, por otro lado, que la expresión relativa del lóbulo X en los ratones PCD ha aumentado frente a la expresión relativa de los controles. Si bien es cierto, este cambio también podría ser debido a que haya disminuido la expresión de *Ccp4* en el resto de los lóbulos de modo que la expresión relativa del lóbulo X parezca mayor. Para confirmar ambas hipótesis analizamos la expresión de dichos genes comparándolos entre el tejido control y el PCD.

### Diferencias de expresión en *Ccp4*, *Ccp6* y *Ttll1* entre ratones PCD y controles

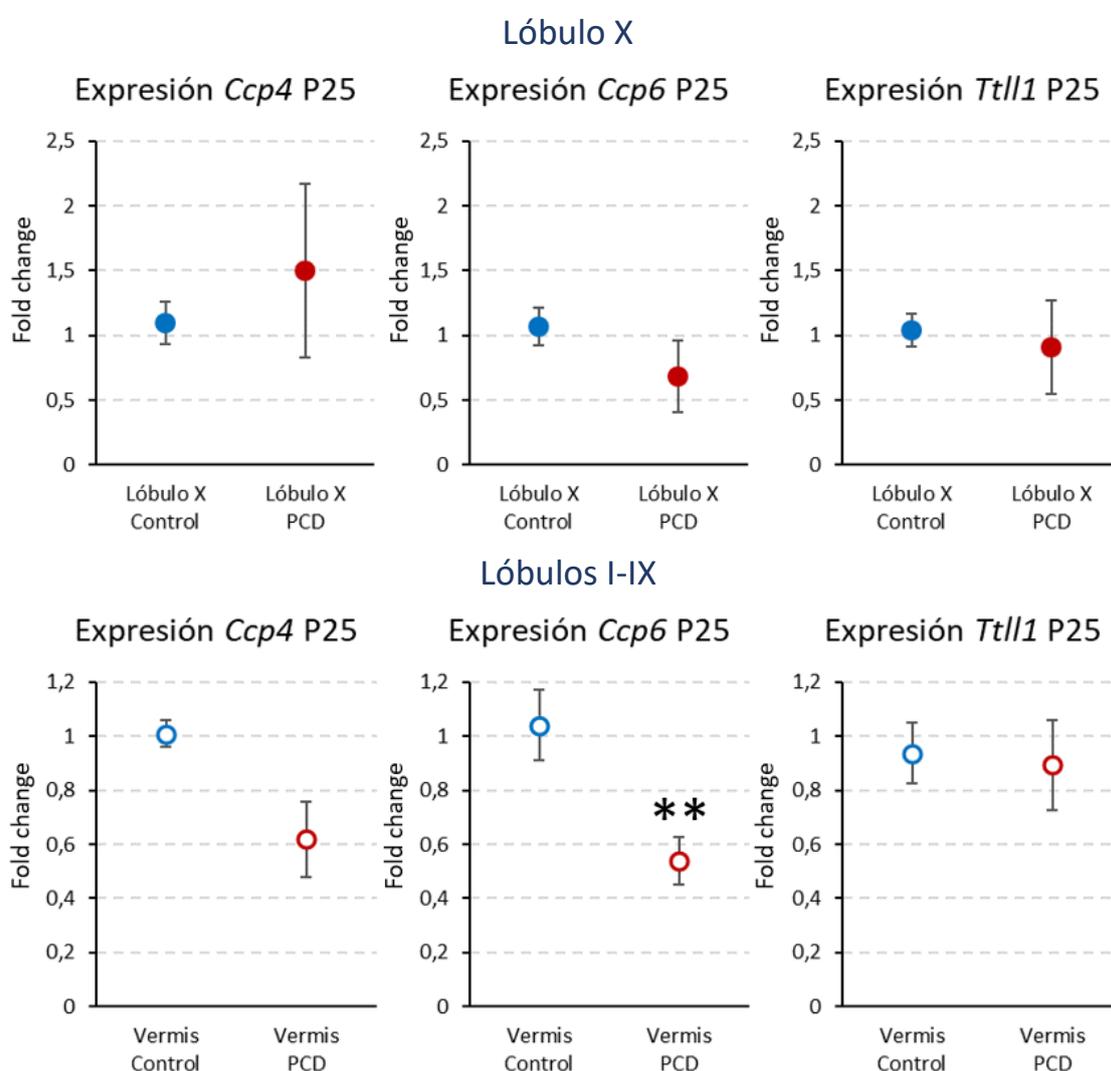
Para comprobar si la mutación *pcd* afectaba de alguna forma a la expresión de *Ccp4*, *Ccp6* y *Ttll1* se calculó el *Fold change* de dichos genes para compararlos considerando el tejido de los ratones PCD y el de los controles. Esta técnica no nos permite comparar la expresión conjunta del lóbulo X y del resto del vermis, de modo que se contrasta por un lado la expresión del lóbulo X PCD frente al lóbulo X control, y, por otro lado, el resto de los lóbulos, a P20 (Fig. 42) y P25 (Fig. 43) por separado.



**Figura 42. Expresión relativa de *Ccp4*, *Ccp6* y *Ttll1* entre animales control y PCD a P20.** En las gráficas superiores se muestran los resultados de las comparaciones en el lóbulo X de los animales silvestres y de los PCD, y en las inferiores los resultados, concernientes al resto del vermis. No se encontraron diferencias significativas en la expresión de ningún gen.

Los resultados obtenidos a P20 no mostraron diferencias significativas entre los dos grupos experimentales ni para el lóbulo X ni para el resto de los lóbulos (**Fig. 42**). De este modo se podría afirmar que la mutación *pcd* no afecta a la expresión de los genes estudiados a P20.

Con respecto a los resultados a P25, es necesario tener en cuenta que los resultados en los lóbulos I-IX a esta edad se deben tomar con cautela: del mismo modo que no hemos hecho análisis génico en el lóbulo X a edades más avanzadas porque la población de células de Purkinje está reducida, a esta edad el resto del vermis es una región con bastante pérdida neuronal, de modo que los resultados podrían estar afectados por este fenómeno. En este caso, en el lóbulo X no se encontraron diferencias entre los ratones PCD y los controles. Sin embargo, sí encontramos que en los lóbulos I-IX los ratones PCD muestran casi la mitad de expresión que los controles ( $p=0,009$ ; **Fig. 43**). Esta expresión reducida podría implicar que la mutación *pcd* sí afecta a la expresión de *Ccp6* en esta región y a esta edad.

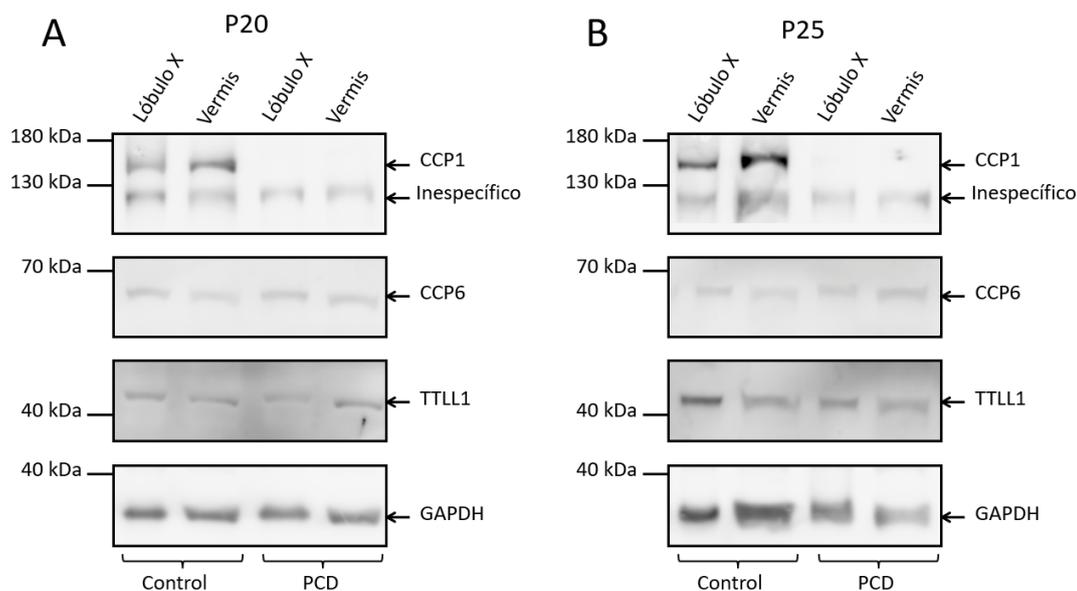


**Figura 43. Expresión relativa de *Ccp4*, *Ccp6* y *Ttll1* entre animales silvestres y PCD a P25.** En las gráficas superiores se muestran los resultados de las comparaciones en el lóbulo X de los animales silvestres y de los PCD, y en las inferiores los resultados del resto del vermis. Solo se encontraron diferencias para *Ccp6* en los lóbulos I-IX a esta edad, siendo su expresión menor en los ratones PCD. \*\*  $p<0,01$ .

### Análisis proteico de CCP1, CCP6 y TTLL1

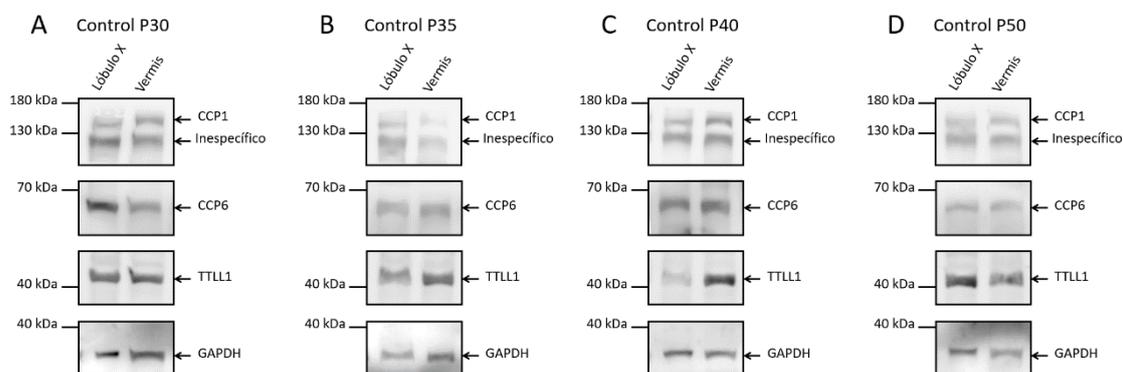
Como ya se vio en el apartado anterior referente a la expresión génica en ratones mutantes, no se describieron resultados de qPCR para *Ccp1* en los animales PCD debido a que la expresión observada podría hacer referencia a fragmentos de RNA no codificantes de proteína. Esto sumado a los conflictos que surgían en la bibliografía nos obligó a comprobar la expresión de *Ccp1* mediante *Western Blot*. Por otro lado, para *Ccp4*, *Ccp6* y *Ttll1*, si bien los resultados de expresión génica basados en el RNA pueden ser muy reveladores, siempre hay que tener en cuenta que los aumentos en la expresión génica no implican necesariamente un aumento en la expresión proteica correspondiente. Es por ello por lo que, posteriormente al análisis génico, realizamos un estudio **confirmatorio** de la expresión proteica de nuestros tejidos. Por esta razón, el número de ratones utilizados para esta parte del estudio fue más reducido y no se realizó ningún tipo de análisis estadístico cuantitativo, sino que el análisis fue cualitativo. Desafortunadamente, no hemos podido estudiar CCP4 mediante esta aproximación: aunque generalmente suele ser más fácil encontrar anticuerpos para *Western Blot* que para técnicas inmunohistoquímicas, en este caso fue al revés. Aun así, compramos anticuerpos comerciales destinados a técnicas inmunohistoquímicas y los probamos mediante *Western Blot*, aunque sin ningún resultado. Por esta razón los utilizamos según sus especificaciones y los probamos mediante inmunofluorescencia, inmunoprecipitación y con distintas técnicas de recuperación antigénica, pero tampoco obtuvimos ningún resultado. Debemos recordar que los resultados de qPCR mostraron una baja expresión del gen, lo que podría explicar por qué no detectamos la proteína mediante los anticuerpos. Con relación al resto de genes, hemos replicado los mismos grupos experimentales que con los experimentos de qPCR, de modo que veremos la expresión proteica de animales silvestres a P20, P25, P30, P35, P40 y P50 y de ratones PCD a P20 y P25.

A P20 pudimos observar la presencia de CCP1 en los animales control y la ausencia en los animales PCD. Por otro lado, para ambos tejidos y genotipos, podemos ver la presencia tanto de CCP6 como de TTLL1 (**Fig. 44. A**). GAPDH se estudia como control de carga, para comprobar que la técnica se ha realizado correctamente, además de que nos ayuda a ver la cantidad relativa que hay de las otras proteínas. A su vez, a P25 vimos unos resultados semejantes a los anteriores: presencia de CCP1, CCP6 y TTLL1 en controles, y presencia solo de CCP6 y TTLL1 en PCD. (**Fig. 44. B**).



**Figura 45. Resultados de Western Blot de CCP1, CCP6 y TTLL1 a P20 y P25 en animales control y PCD.** (A) En las imágenes de la izquierda se ven los resultados correspondientes a P20. En el recuadro superior, se puede comprobar la presencia de CCP1 en los ratones silvestres y su ausencia en los animales PCD; la banda inferior a la de CCP1 corresponde a un marcaje inespecífico del que ya nos advierte el fabricante del anticuerpo. Por otro lado, se comprobó la existencia de CCP6 y TTLL1 en todos los tejidos y genotipos. (B) En las gráficas de la derecha vemos los resultados de P25. En este caso podemos ver de nuevo la ausencia de expresión de CCP1 en los ratones PCD; en el caso del vermis de control parece que la banda tiene una intensidad mayor. En la parte inferior aparece la banda correspondiente a GAPDH se utiliza como control de carga en ambas series de imágenes.

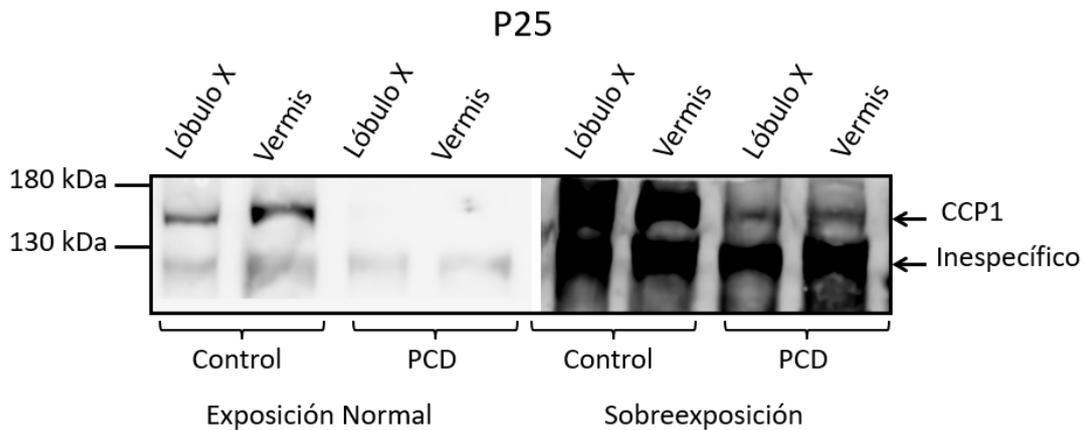
A continuación, se estudiaron las edades P30, P35, P40 y P50 en animales control, y pudimos confirmar de nuevo la presencia de CCP1, CCP6 y TTLL1 tanto en el lóbulo X como en el resto de los lóbulos del vermis (Fig. 45).



**Figura 44. Resultados de Western Blot de CCP1, CCP6 y TTLL1 a P30, P35, P40 y P50 en animales control.** Expresión proteica de CCP1, CCP6 y TTLL1 en ratones control de P30, P35, P40 y P50. Se confirmó la presencia de dichas proteínas en todas las regiones a todas las edades. (C) A P40 parece que la expresión de TTLL1 en el lóbulo X es menor. En la parte inferior aparece la banda correspondiente a GAPDH se utiliza como control de carga.

## Resultados

Para finalizar, cuando se toman las fotografías de la membrana en el último paso de esta técnica, las imágenes se van capturando cada vez con más exposición, de tal manera, que las últimas imágenes generadas suelen estar sobreexpuestas y a menudo se descartan por ello. Por otro lado, anteriormente, hemos descrito que en ratones PCD la expresión de CCP1 era nula, pero nos llamó la atención que en los espacios correspondientes a CCP1 en estos animales se veían unas bandas muy tenues en las últimas imágenes. Estas bandas no pueden corresponder a partes no funcionales de la proteína y a la vez ser específicas para nuestros anticuerpos. Porque si fuesen fragmentos proteicos no funcionales y específicos para nuestros anticuerpos tendrían otros pesos moleculares diferentes de CCP1; o, por el contrario, si fuese una proteína del mismo peso que CCP1, pero no tuviese que ver con ella, sería extremadamente improbable que fuese específica con nuestros anticuerpos. Por lo tanto, estas imágenes sobreexpuestas están evidenciando que sí existe una expresión, aunque muy reducida, de CCP1 en el cerebelo de nuestros ratones PCD (**Fig. 46**). Como no se han omitido las imágenes de los ratones control, podemos comparar la diferencia de intensidad de las bandas entre ambos genotipos y ver que, evidentemente, los ratones control siguen teniendo una expresión mucho mayor de CCP1 que los ratones PCD. Estos datos se encontraron tanto a P20 como a P25, aunque solo se han mostrado los de la última edad.



**Figura 46. Membrana de Western Blot con exposición normal y sobreexposición.** Estas dos imágenes corresponden a la misma membrana, pero con exposiciones diferentes. La izquierda con una exposición estándar muestra la presencia de CCP1 en animales control y su ausencia en animales PCD. Sin embargo, en la imagen de la derecha podemos ver la misma membrana sobreexpuesta: en ella podemos distinguir unas bandas muy tenues correspondientes a CCP1 en animales PCD que parecen indicar una expresión residual.

## Discusión



### Sobre la expresión de *Ccp1*, *Ccp4*, *Ccp6* y *Ttll1* en el cerebelo del ratón

Para comprender los resultados de *Ccp1*, *Ccp4*, *Ccp6* y *Ttll1* en el contexto neurodegenerativo del ratón PCD se detallará una cuestión previa relacionada con la degeneración neuronal atrasada del lóbulo X: mediante los recuentos de calbindina hemos comprobado que el lóbulo X de los ratones PCD empieza a mostrar una reducción significativa en el número de células de Purkinje frente al de los ratones silvestres a P35. Si bien es cierto, aún sin diferencias significativas a P30, ya se empieza a visualizar un descenso en el número de estas neuronas, y quizás con un número mayor de ratones podríamos encontrar diferencias estadísticas ya a esta edad. Es por ello por lo que del mismo modo que se estipula que la etapa de degeneración neuronal del cerebelo PCD comienza a P18, con el inicio de la muerte de las células de Purkinje, podríamos considerar que el comienzo de la degeneración neuronal específica del lóbulo X comienza a partir de P30. De modo que la fase de degeneración neuronal del lóbulo X **parece encontrarse atrasada unos 15 días**.

La primera hipótesis que se planteó en la presente Tesis Doctoral era que la muerte de las células de Purkinje en el lóbulo X era menor —o más retrasada— en los ratones PCD, debido a que este debería expresar menos *Ccp1* que el resto de los lóbulos, lo que nos indicaba una posible menor dependencia de la expresión de este gen. De este modo, durante su ausencia bajo los efectos de la mutación *pcd*, los daños causados serían menos graves. Para ello se quisieron conocer, por un lado, los patrones de expresión normales —en animales silvestres- de *Ccp1* a lo largo del tiempo y, por otro lado, la diferencia de expresión entre el lóbulo X y el resto de los lóbulos.

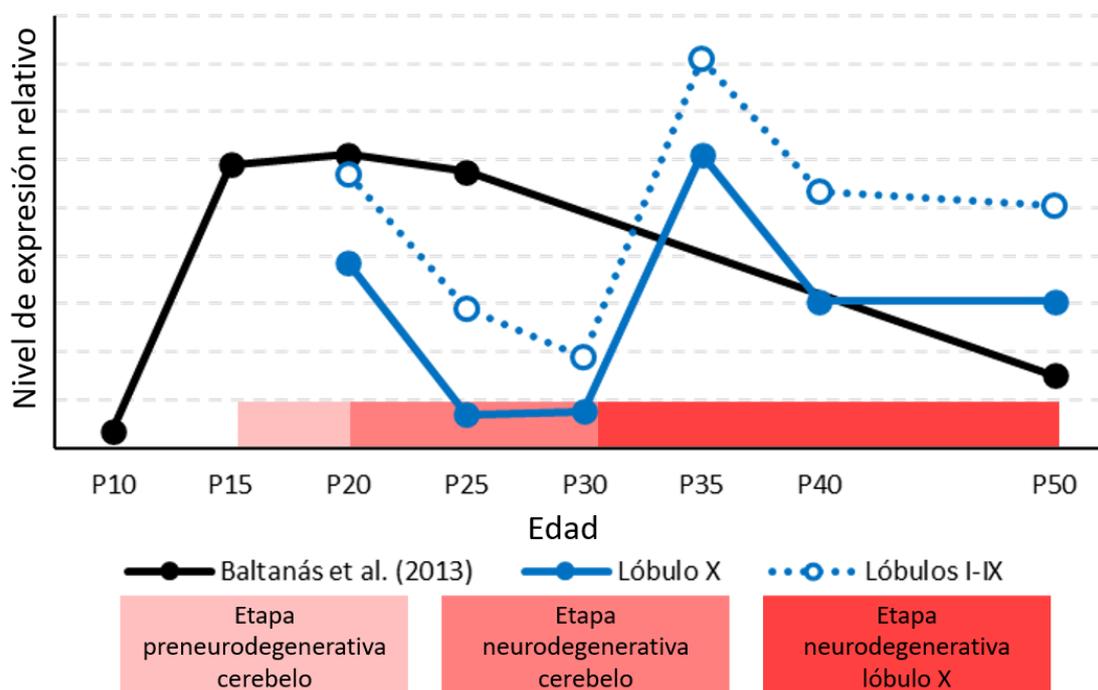
#### Sobre *Ccp1*

Los resultados obtenidos han demostrado **a todas las edades estudiadas** una menor expresión de *Ccp1* en el lóbulo X con relación al resto de lóbulos en los ratones silvestres. Ya se ha observado que la degeneración neuronal del ratón PCD coincide en intensidad y en tiempo con los niveles de expresión del *Ccp1* en ratones silvestres si se comparan cerebelo y bulbo olfativo (Baltanás et al., 2013). Del mismo modo, parece que la fisiología del vermis cerebeloso es más dependiente de la expresión de dicho gen, de forma que ante su déficit debido a la mutación *pcd* los daños causados son más graves que los causados en el lóbulo X. Si bien es cierto, aunque el descenso de expresión de *Ccp1* coincide con la resistencia del lóbulo X, este también acaba degenerando en última instancia. Hemos comprobado que, aunque la expresión del gen es menor, esta no es nula, de modo que el lóbulo X sí que muestra cierta dependencia por la expresión de *Ccp1*, lo que explicaría por qué al final también acaba perdiendo sus células de Purkinje.

A continuación, seguiremos discutiendo la expresión de *Ccp1* a lo largo del tiempo para poder hacernos mejor a la idea de la relación entre la degeneración neuronal y la expresión de este gen en los distintos lóbulos cerebelosos. Para ello se ha elaborado la **Fig. 47** con los datos obtenidos de *Ccp1* a lo largo del tiempo en este trabajo, junto a información bibliográfica para integrar nuestros resultados en el contexto neurodegenerativo del PCD y poder comprenderlos mejor. Para la elaboración de dicha figura hemos utilizado los resultados de qPCR de *Ccp1* del lóbulo X y del resto de lóbulos a lo largo del tiempo. También se han añadido los resultados de la **Fig. 14**, en los que se mostraba la expresión de *Ccp1* en el cerebelo de forma integral a lo largo del tiempo, según los datos de Baltanás et al. (2013). Y, por último, hemos destacado la etapa pre-degenerativa que sufre el ratón PCD de P15 a P18 (Muñoz-Castañeda et al., 2018) y el

comienzo de la hipotética etapa degenerativa del lóbulo X a partir de P30. Debemos destacar que los datos de expresión génica representados para el lóbulo X y el resto de lóbulos, así como los datos bibliográficos correspondientes a todo el cerebelo no se pueden comparar entre sí debido a que las expresiones son relativas para cada región estudiada. En todo caso, como hemos comprobado que la expresión de *Ccp1* ha sido inferior en todas las edades estudiadas en el lóbulo X con relación al resto del vermis, para que la gráfica sea más intuitiva, hemos representado la línea de expresión del lóbulo X por debajo de la del resto de los lóbulos.

### Expresiones relativas de *Ccp1*



**Figura 47. Representación de la expresión de *Ccp1* en el cerebelo general, lóbulo X y el resto de lóbulos de controles.** Los datos del lóbulo X y del resto de lóbulos son propios del presente trabajo. En negro se representan los datos obtenidos en nuestro mismo laboratorio publicados en Baltanás et al., 2013. La banda roja horizontal representa en 3 intensidades de rojo la etapa preneurodegenerativa y neurodegenerativa del cerebelo y la hipotética etapa neurodegenerativa del lóbulo X en ese orden. Los resultados del lóbulo X se han representado por debajo de los del resto de lóbulos para indicar la menor expresión observada mediante la comparación entre ambas regiones para cada edad estudiada.

Baltanás et al. (2013) estudiaron la expresión de *Ccp1* de P10 a P50, y en sus datos comprobaron un pico de expresión en el cerebelo entre P15-P25. A partir de esta edad no hay datos hasta P50, mostrándose un descenso de expresión generalizado. En nuestros resultados pudimos comprobar, tanto en el lóbulo X como en el resto de los lóbulos, que la expresión parte de un valor determinado a P20 y desciende hasta P30. Después la expresión aumenta de nuevo a P35, tras lo que, en el caso del lóbulo X, a P50 la expresión desciende ligeramente. Si relacionamos estos datos con las etapas de degeneración neuronal del ratón PCD, podemos comprobar que unos días después de la etapa pre-degenerativa, la expresión parte de unos niveles determinados, que descienden en plena etapa neurodegenerativa del vermis; de este modo, este descenso podría implicar una necesidad menor de expresión a la edad de P25-P30, justo las edades en las que hemos visto que el lóbulo X continúa comportándose como un lóbulo sano. Sin embargo, a P35 encontramos en ambos tejidos un segundo aumento de expresión adicional al análisis de 2013. En este trabajo anterior, dicho aumento se pudo pasar por alto

debido a que no se estudió la franja de edad comprendida entre P25 y P50. Este aumento de expresión a P35 nos puede estar señalando un nuevo incremento de dependencia de *Ccp1* que, precisamente, coincide con el momento en el que el lóbulo X comienza a mostrar el descenso de células de Purkinje. Con estos datos, podría parecer que el lóbulo X resiste el primer déficit de *Ccp1* de P10-P20 por su menor expresión constitutiva comparada a la del resto de lóbulos, pero a P35 cuando vuelve a aumentar la expresión en los controles, y por ello su dependencia, la pérdida de células se hace evidente en el lóbulo X de los ratones PCD. De este modo, podemos entender la posible relación entre la expresión de *Ccp1* en los ratones controles y la degeneración neuronal provocada por su déficit en el ratón PCD.

El hecho de que la expresión regional de determinados genes revele su dependencia para los distintos tejidos en los que se expresan, y que la degeneración causada ante su déficit sea proporcional a dicha dependencia no es un concepto nuevo. Así, ya se han descrito casos análogos a esta menor vulnerabilidad del lóbulo X a la mutación *pcd* por ser menos dependiente de la expresión de *Ccp1*. Precisamente, dentro de la familia de las CCP, se ha comprobado que CCP1, CCP5 y CCP6 están ampliamente distribuidas en el encéfalo (Kalinina et al., 2007). Por el contrario, CCP4 se expresa abundantemente en el ojo y sus niveles en el encéfalo no son tan apreciables (Kalinina et al., 2007). Si seguimos la premisa de la dependencia, una mutación o defecto en CCP4 no debería causar daños muy pronunciados en el encéfalo, pero en el ojo sí. De hecho, se ha comprobado que existe una mutación en *Ccp4* que provoca una patología ocular denominada distrofia corneal de Fuchs en humanos (Eghrari et al., 2015). En el caso concreto de CCP5, se ha comprobado que su mutación no es tan perjudicial como la de otras CCP y solo causa esterilidad en un modelo de ratón (Wu et al., 2017), si bien su función es algo particular, puesto que solo se encarga de eliminar el primer glutamato de cada ramificación (Rogowski et al., 2010). Con relación a CCP2 y CCP3, se han desarrollado modelos *knock-out*, pero parece que su déficit se ve compensado por la actividad de CCP1, CCP4 y CCP6, de modo que los daños provocados no son tan graves como con la falta de otras carboxipeptidasas (Tort et al., 2014). Por último, sobre CCP6 se sabe que su expresión se distribuye de forma similar a la de CCP1, salvo que no se expresa tanto en el cerebelo (Kalinina et al., 2007) y sus déficits se comentarán más adelante. De hecho, un estudio comprobó que la mayor expresión de CCP6 ocurre en la médula ósea (Ye et al., 2014) y su ausencia provoca una maduración defectuosa de los megacariocitos —que origina plaquetas defectuosas— y esplenomegalia (Ye et al., 2014). Además, se ha comprobado una fuerte presencia de algunas CCP en los testículos (Kalinina et al., 2007) y como se puede esperar (salvo con CCP2 y CCP3) sus déficits también provocan esterilidad en machos (Landis y Mullen, 1978; Wu et al., 2017). De este modo, con todo lo que hemos visto hasta ahora sobre las CCP y sus correspondientes mutaciones, es lícito pensar que los patrones de dependencia-degeneración existen y que el lóbulo X es un ejemplo más de menor dependencia a la expresión de *Ccp1* y, por ello, menor vulnerabilidad en el ratón PCD. No obstante, todavía es necesario estudiar por qué el lóbulo X es menos dependiente de la desglutamilación. Para responder a esta cuestión profundizaremos en los resultados de *Ccp4*, *Ccp6* y *Ttll1*.

Por último, debemos hacer un breve inciso sobre la expresión de *Ccp1* en el cerebelo de los ratones PCD. En estudios anteriores, con los mismos cebadores y la misma técnica de qPCR que hemos utilizado en el presente trabajo se comprobó que los ratones PCD no mostraban expresión alguna de *Ccp1* en el cerebelo (Baltanás et al., 2013). Además, mediante *Northern Blot* tampoco se detectó la existencia de mRNA de *Ccp1* en el cerebelo, solo en los testículos (Fernández-González et al., 2002; Chakrabarti et al., 2006). Sin embargo, hemos comprobado que sí existe cierta expresión de *Ccp1* en el cerebelo de los ratones PCD. La explicación a esta paradoja puede ser que los trabajos anteriores utilizaban kits comerciales de extracción y

retrotranscripción diferentes a los que hemos utilizado nosotros. Conjuntamente a esto, en los estudios de qPCR anteriores tanto el termociclador como la cantidad inicial de cDNA son diferentes a los que utilizamos en nuestro trabajo. Aun así, los resultados de *Western Blot*, muestran que, aunque sí existe cierta expresión de CCP1 en el tejido de los ratones PCD, esta es mínima, y es necesario sobreexponer las imágenes para visualizarla. De hecho, el fenotipo que podemos observar en nuestros ratones confirma que la baja cantidad de CCP1 que puedan expresar no es suficiente como para prevenir los efectos de la mutación. Estos experimentos son congruentes con que la mutación *pcd<sup>11</sup>* se encuentre en una región reguladora del gen (Fernández-González et al., 2002), lo que explica que hayamos detectado cierta cantidad de expresión tanto a nivel génico como proteico.

### Sobre Ccp4

CCP4 y CCP6 son dos proteínas funcionalmente homólogas a CCP1 y que se encargan de acortar las cadenas de glutamato de las tubulinas (Rogowski et al., 2010). En el caso concreto de CCP4, varios estudios han mostrado que esta no tiene una especial relevancia en el cerebelo: mediante análisis de retrotranscripción se comprobó una baja expresión de *Ccp4* tanto en esta estructura como en la corteza cerebral del ratón PCD (Rogowski et al., 2010); por otro lado, estudios de hibridación *in situ* mostraron una alta expresión de *Ccp4* en varios órganos como el ojo y el encéfalo, aunque la expresión en este último era bastante reducida (Kalinina et al., 2007). Esos datos concuerdan con nuestros resultados, ya que no pudimos detectar la proteína CCP4 ni mediante *Western Blot* ni con inmunohistoquímica en el cerebelo. Además, mediante la técnica de qPCR —mucho más sensible— pudimos comprobar que los valores de  $C_T$  rondan el ciclo 32, cuando los del resto de genes estudiados están comprendidos generalmente entre los ciclos 22 y 27, lo que confirma la bajísima expresión de *Ccp4*. En todo caso, los análisis de qPCR nos permiten estudiar las diferencias de expresión de *Ccp4*, aunque esta se encuentre muy reducida. Si bien la correlación entre el mRNA y la expresión de proteína puede ser variable, la qPCR es una técnica de gran precisión y sensibilidad, siempre y cuando se apliquen una serie de estándares de calidad de la técnica (Udvardi et al., 2008), como hemos realizado en el presente trabajo. De este modo, aunque hemos comprobado la baja relevancia de este gen en el cerebelo, se describirán sus variaciones de expresión puesto que pueden mostrarnos un reflejo de la dependencia a la desglutamilación de las distintas regiones cerebelosas.

A lo largo del tiempo nuestros resultados han mostrado que la expresión de *Ccp4* no varía apenas en las dos regiones cerebelosas estudiadas, salvo a P50, que aumenta ligeramente en los lóbulos I al IX. Así, si analizamos los resultados en los que se compara la expresión de *Ccp4* entre el lóbulo X y el resto de los lóbulos, estos muestran que *Ccp4* se expresa menos en el lóbulo X que en el resto de lóbulos a P20 y a P25, lo que sostiene la idea de que este lóbulo tiene menores requerimientos de desglutamilación que el resto a estas edades. Después de esta etapa, a P30, P35 y P40 el lóbulo X ya no muestra diferencias significativas de expresión con respecto al resto de lóbulos, lo que podríamos entender como una dependencia similar a *Ccp4* en ambas regiones. Esto concuerda con los resultados de *Ccp1*, ya que esta etapa coincide temporalmente con el segundo aumento de su expresión en el cerebelo, y que hemos hipotetizado anteriormente como un aumento general de la dependencia a *Ccp1*, y por ende a la desglutamilación (representado en la **Fig. 47**). Finalmente, a P50 volvemos a ver un descenso relativo de la expresión de *Ccp4* en el lóbulo X con relación al resto de los lóbulos, edad en la que detectamos también un pequeño aumento de expresión de *Ccp4* en el resto de lóbulos con relación al resto de edades. Aunque la expresión de *Ccp4* sea muy reducida, sus datos coinciden con el descenso de expresión de *Ccp1* en el lóbulo X a P50. Así, parece que el lóbulo X a esta

edad tiene unos menores requerimientos de desglutamilación que se evidencian en la expresión de *Ccp1* y *Ccp4*, de manera que ambas moléculas parecen fluctuar en consonancia. Lo que tiene sentido si tenemos en cuenta que los genes de la familia *Ccp* son parálogos (Rodríguez de la Vega et al., 2007) y del mismo modo que comparten funciones es posible que también muestren patrones de expresión semejantes.

Al analizar la expresión de *Ccp4* en los ratones PCD pudimos comprobar que a P20 el lóbulo X mostraba una expresión menor que el resto de los lóbulos. Sin embargo, a P25 comprobamos que la expresión era igual en las dos regiones estudiadas del cerebelo. Como hemos visto, la expresión relativa es igual a P20 en ratones PCD y silvestres, pero a P25 no es así: los ratones silvestres muestran una menor expresión de *Ccp4* en el lóbulo X con relación al resto de lóbulos, pero en los ratones PCD podemos observar que la expresión de *Ccp4* es la misma en ambas regiones. Aunque ya sabemos que la influencia de *Ccp4* es pequeña en el cerebelo, podríamos pensar que durante la mutación PCD hay un ligero aumento de expresión en el lóbulo X, posiblemente intentando suplir la falta de *Ccp1*. Sin embargo, al comparar los resultados relativos de los ratones PCD frente a los silvestres ni a P20 ni a P25 observamos diferencias de expresión de *Ccp4* en ninguna región estudiada entre ratones silvestres y PCD. De este modo, con lo que hemos visto hasta el momento, parece que la expresión de *Ccp4* no se ve afectada de forma indirecta por la mutación *pcd*. Como vimos anteriormente, las enzimas de la familia CCP son parálogas (Rodríguez de la Vega et al., 2007) y por ello han diversificado sus regiones de actuación, lo que explica la baja importancia que tiene *Ccp4* en este tejido y no en otros como en el ojo. A su vez, al compartir un origen común, se explica por qué los patrones de expresión de CCP4 se asemejan a los de CCP1.

### Sobre Ccp6

CCP6 parece tener más relevancia en la corteza cerebral y el cerebelo que CCP4 (Rogowski et al., 2010). La poliglutamilación se incrementa mucho en ambas regiones en las etapas más tempranas del desarrollo del ratón PCD (de forma similar a los ratones silvestres). Más adelante, en la corteza cerebral los niveles de poliglutamilación descienden hasta equipararse a los niveles de los ratones silvestres, pero no sucede lo mismo en el cerebelo, que se mantiene hiperglutamilado (Rogowski et al., 2010). De este modo, parece que existe un mecanismo compensatorio a la falta de CCP1 en la corteza cerebral que no es eficiente en el cerebelo. El estudio de este mecanismo compensatorio implica necesariamente a las enzimas con funcionalidad semejante a CCP1, como son CCP4 y CCP6. Se comprobó una fuerte expresión de *Ccp1* en corteza cerebral y cerebelo, mientras que *Ccp6* mostraba fuertes niveles de expresión solo en la corteza cerebral, siendo su expresión más reducida en el cerebelo (Kalinina et al., 2007). Es por ello por lo que CCP6 parece que se expresa lo suficiente como para compensar el déficit de CCP1 en el ratón PCD únicamente en la corteza cerebral, pero no en el cerebelo. Nuestros resultados de *Western Blot* confirmaron la presencia de CCP6 en el cerebelo tanto en ratones silvestres como PCD y los valores de  $C_T$  de la qPCR mostraron que *Ccp6* tiene una expresión similar a la de *Ccp1*, a diferencia de lo observado con *Ccp4* que se expresaba mucho menos. Al comparar la expresión a lo largo del tiempo, pudimos comprobar un comportamiento similar al que vimos en *Ccp1*: *Ccp6* parte de unos niveles determinados a P20 y P25, su expresión desciende a P30, y a P35 se revierte y vuelve a los niveles iniciales. En el caso del lóbulo X esta expresión se mantiene hasta P50, pero en el resto de los lóbulos a P50 volvemos a observar un pequeño aumento en la expresión de este gen (**Fig. 32 y 33**). Con estos datos se reafirma la idea de que P30 es una edad en la que no es tan necesaria la desglutamilación como a otras edades y que a P35 vuelve a ser necesaria dicha modificación postraduccional: una vez más, se produce

una variación en paralelo de la expresión génica de dos enzimas con actividad similar y que comparten un ancestro común (Rodríguez de la Vega et al., 2007)

Al analizar la expresión de *Ccp6* comparando el lóbulo X y el resto de los lóbulos, no observamos diferencias a P20 y P25. Sin embargo, a P30, la edad en la que desciende la expresión de *Ccp1* de forma generalizada en el cerebelo, *Ccp6* **aumenta** su expresión en el lóbulo X. De este modo, a P30 encontramos un fenómeno semejante al que ocurre en la corteza cerebral respecto al cerebelo: existe una mayor expresión de *Ccp6* que compensa el déficit de *Ccp1* bajo los efectos de la mutación *pcd* (Magiera et al., 2018). De este modo, **hemos comprobado un proceso análogo en el lóbulo X**: existe una mayor expresión fisiológica de *Ccp6* que coincide temporalmente con la menor expresión de *Ccp1*, hecho que no se había descrito hasta el momento y que podría explicar por qué esta región degenera más tarde. El aumento de *Ccp6* podría otorgar al lóbulo X cierta independencia a la expresión de *Ccp1* a esta edad, de modo que, ante su déficit, esta región no se encontraría tan afectada. Sumado a esta idea, debemos recordar que *Ccp6* repetía el patrón de *Ccp1* a lo largo del tiempo, pero al compararlo entre regiones no era así: mientras que la expresión de *Ccp1* era siempre menor en el lóbulo X que en el resto de los lóbulos, la expresión de *Ccp6* nunca fue inferior en el lóbulo X, y de hecho llega a ser mayor que la del resto de lóbulos a P30. Por todo ello, el lóbulo X muestra unos niveles de expresión relativos de *Ccp6* mayores que los de *Ccp1*, de modo que el déficit de *Ccp1* durante la mutación *pcd* afectará menos a esta región por tener una mayor expresión de *Ccp6*, de forma análoga a lo que sucedía entre la corteza cerebral y el cerebelo (Magiera et al., 2018).

Por otro lado, pudimos comprobar que a P35 y P40 esta diferencia de expresión desaparece y ambas regiones vuelven a tener expresiones similares. De este modo, el mecanismo compensatorio de *Ccp6* que veíamos a P30 parece desaparecer, coincidiendo en el tiempo con el momento en el que el lóbulo X del ratón PCD comienza su degeneración, lo que sostiene la idea de la posible función compensatoria de *Ccp6* en dicho lóbulo. Por último, a P50 la expresión de *Ccp6* vuelve a descender, al igual que sucedía con *Ccp1* y *Ccp4*. Esta última edad es llamativa, puesto que hemos visto que la expresión de *Ccp4* y *Ccp6* aumenta ligeramente en los lóbulos I-IX y, además, dicha expresión es menor en el lóbulo X que en el resto de los lóbulos. De este modo, a P50 el lóbulo X parece ser, una vez más, menos dependiente de la desglutamilación. Si bien es cierto, en el modelo PCD a esta edad la degeneración neuronal está muy avanzada en todo el cerebelo y los cambios de expresión que encontremos puede que no tengan tanta importancia como en las etapas pre- y degenerativas.

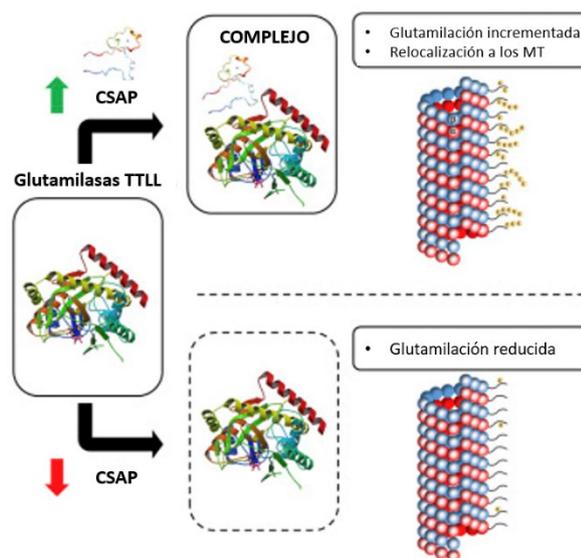
Al comparar la expresión de *Ccp6* en el cerebelo de los ratones PCD no pudimos encontrar diferencias entre el lóbulo X y el resto de los lóbulos a ninguna de las edades estudiadas, al igual que observamos en los ratones silvestres a las mismas edades. No obstante, al comparar la expresión de *Ccp6* entre los ratones silvestres y los ratones PCD, pudimos comprobar que los lóbulos I-IX de los ratones mutantes expresaban menos *Ccp6* que los de los ratones silvestres a P25 (**Fig. 43**). Debemos recordar que a esta edad y en esta región del cerebelo nos encontramos en plena etapa de degeneración neuronal, de modo que el descenso de expresión de *Ccp6* puede estar causado por la muerte de las células de Purkinje, puesto que se ha comprobado que dicho gen se expresa en este tipo celular (Rodríguez de la Vega et al., 2007). A su vez, al comparar la expresión de *Ccp6* entre los ratones PCD y los silvestres no obtuvimos diferencias significativas en ambas regiones cerebelosas. De este modo, si achacamos el descenso de expresión mencionado anteriormente de los lóbulos I-IX a la muerte de las células de Purkinje y que en el resto de las comparaciones no observamos diferencias significativas,

podemos afirmar que la mutación *pcd* no afecta a la expresión de dicho gen a P20-P25, al igual que se ha comprobado en células HEK293T con la mutación *pcd* (Berezniuk et al., 2012).

### Sobre *Ttll1*

Para hablar de *Ttll1*, la proteína responsable de glutamilar las tubulinas, debemos recordar que los cambios estructurales de los microtúbulos se encuentran ligados a la maduración neuronal. De este modo, las neuronas maduras poseen unos microtúbulos más estables, mientras que en las neuronas en desarrollo estas estructuras son más inestables y, por ello, más dinámicas (Faivre et al., 1985). A su vez, sabemos que la poliglutamilación del citoesqueleto, precisamente para propiciar su dinamismo, es necesaria durante las primeras etapas del desarrollo. Sin embargo, a partir de P15, cuando la corteza cerebelosa está prácticamente formada, es cuando se observa un aumento en la expresión de *Ccp1* en los animales silvestres (Baltanás et al., 2011) para disminuir la glutamilación y aumentar la estabilidad (Muñoz-Castañeda et al., 2018). En el caso del ratón PCD este aumento de expresión no es posible y por ello degeneran sus células de Purkinje (Muñoz-Castañeda et al., 2018). Al contrario que con las CCP, la regulación de las TTLL es muy conocida y se ha comprobado recientemente que su actividad puede ser regulada mediante su fosforilación (Melo-Hanchuk y Kobarg, 2021). Por otro lado, se sabe que las proteínas CSAP pueden interaccionar con algunas proteínas de la familia TTLL y a su vez con el citoesqueleto (Bompard et al., 2018).

Con relación a esto último, se sabe que las CSAP pueden unirse a todas las TTLL para formar unos complejos que, a su vez, pueden interaccionar con los microtúbulos. Además, se ha comprobado que las CSAP promueven la relocalización de alguna TTLL hacia los microtúbulos (Bompard et al., 2018), y por todo esto las CSAP se presentan como un regulador de la glutamilación de los microtúbulos a través de las TTLL (Fig. 48; Bompard et al., 2018). De este modo, y sin descartar un posible mecanismo de regulación de las CCP, es plausible pensar que la interacción entre las CSAP y las TTLL, al regular el estado de glutamilación de los microtúbulos, pueda ser un factor diferencial adicional en la menor vulnerabilidad a la degeneración neuronal del lóbulo X.



**Figura 48. Esquema de la actuación de las CSAP.** Altos niveles de CSAP favorecen su unión con las TTLL para formar más complejos que se relocalizan en las tubulinas y aumentan su glutamilación; bajos niveles de CSAP no favorecen la formación de los complejos, y por ello se reduce la glutamilación. MT, microtúbulo. Modificado de Bompard et al., 2018.

Con relación a su expresión génica en los ratones silvestres, pudimos comprobar a P30 un descenso de su expresión en las dos regiones cerebelosas estudiadas. Precisamente, P30 es la edad en la que tanto *Ccp1* como *Ccp6* muestran sus menores niveles de expresión temporal. Por su parte, *Ccp4* no mostró diferencias a esta edad, pero también es cierto que su expresión es muy baja y la habíamos descartado. De este modo, el descenso de expresión de *Ccp1* y *Ccp6* puede estar ligado al descenso de expresión de *Ttll1*: una menor cantidad de TTLL1 provocará una menor glutamilación del citoesqueleto y, por ende, una menor necesidad de desglutamilación.

Cuando analizamos la expresión de *Ttll1* comparándola entre el lóbulo X y el resto de los lóbulos a las distintas edades, comprobamos que el lóbulo X mostraba una menor expresión que el resto de lóbulos solo a P35 y P50. Por el contrario, la expresión de *Ccp1* siempre era menor en el lóbulo X frente al resto de lóbulos. De este modo, parece que el efecto de la glutamilasa TTLL1 en el lóbulo X es similar al del resto de los lóbulos (salvo a P35 y P50, caso que discutiremos más tarde), pero no lo es para CCP1, la desglutamilasa principal. Así, lo que podría estar ocurriendo en el lóbulo X es que su citoesqueleto se encuentre más glutamilado de forma constitutiva. Ya hemos comentado anteriormente que el estado de glutamilación de los microtúbulos modifica la estabilidad del citoesqueleto para hacerlo más o menos dinámico (Muñoz-Castañeda et al., 2018). Hasta P15, existe una fuerte hiperglutamilación en el cerebelo, asociada a su inmadurez y a la necesidad de un citoesqueleto dinámico. De este modo, una hipótesis posible es que el lóbulo X, más glutamilado, requiera o tolere una inestabilidad o dinamismo mayor en su citoesqueleto debido a que es una región más simple y primitiva, como describimos inicialmente en el apartado *Introducción*.

Con relación a P35 y P50, momentos en los que el lóbulo X expresa menos *Ttll1* que el resto de los lóbulos; podríamos pensar que estos descensos de expresión, y por consiguiente de glutamilación del citoesqueleto, promoverían una menor dependencia a *Ccp1* en el ratón PCD. No obstante, a P35 detectamos el comienzo de la muerte de las células de Purkinje en este lóbulo, de modo que la hipotética menor vulnerabilidad a la mutación *pcd* por el descenso en la actividad de esta molécula llegaría demasiado tarde y no tendría tanto efecto.

Se ha comprobado en el cerebelo de los ratones PCD que los niveles proteicos de TTLL1 y TTLL7 son ligeramente menores que los de los ratones silvestres, aunque sin diferencias significativas. Lo que sugiere que el estado hiperglutamilado del citoesqueleto no induce la expresión de estas dos enzimas (Berezniuk et al., 2012). Por nuestra parte, cuando analizamos la expresión de *Ttll1* en los ratones PCD no se observaron diferencias entre el lóbulo X y el resto de los lóbulos a P20 y a P25, del mismo modo que sucedía con los controles. De esta forma, parece que el estado anómalo del citoesqueleto del ratón PCD no afecta a la expresión relativa de *Ttll1* entre las distintas partes del cerebelo. Del mismo modo, cuando se realizaron las comparaciones entre la expresión de *Ttll1* en los ratones PCD y los silvestres tampoco observamos ninguna diferencia significativa, de modo que no tenemos evidencias de que la mutación *pcd* afecte a dicha expresión.

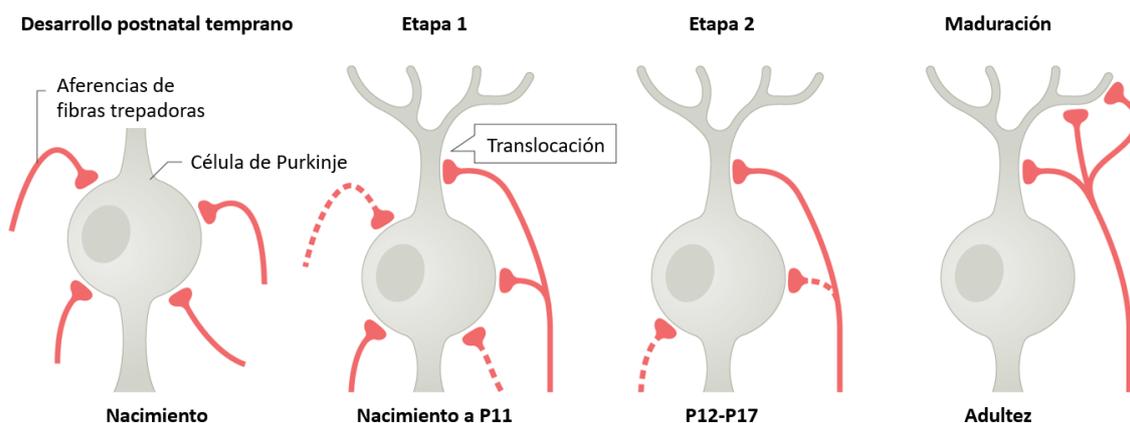
Hasta el momento hemos podido comprobar que la menor expresión de *Ccp1* en el lóbulo X —comparada con el resto de los lóbulos— puede revelar un patrón de menor dependencia a dicho gen en esta región. Además, también hemos podido comprobar que existe una expresión similar de *Ttll1* entre el lóbulo X y el resto de los lóbulos, mostrando así que dicho lóbulo X puede mostrar un citoesqueleto más glutamilado y, posiblemente más flexible o dinámico. Por último, también hemos comprobado que no existen regulaciones positiva ni negativa de *Ccp6* ni de *Ttll1* respectivamente provocadas por la mutación *pcd*. Berezniuk et al. en 2012 comprobaron un fenómeno similar, puesto que no detectaron cambios de expresión de distintas CCP debidos a la mutación *pcd* en células HEK293T. Además, también comprobaron mediante *Western Blot* que la expresión de TTLL1 en el cerebelo de los ratones PCD no se veía afectada por la mutación. De este modo, como hemos comprobado que la expresión de las CCP y de TTLL1 no se ve afectadas en el ratón PCD, una futura línea de investigación podría ser el estudio de CSAP en este modelo murino. Sabemos que esta proteína puede regular la actividad de las TTLL (Bompard et al., 2018), de modo que quizás no sea necesario modificar directamente la expresión y traducción de dichas proteínas cuando los microtúbulos se encuentran

hiperglutamilados. De esta manera, otro factor en la resistencia del lóbulo X podría estar debido a la expresión de CSAP y su influencia sobre TTLL1.

### Consecuencias de la mutación *pcd* sobre el establecimiento sináptico

Pudimos comprobar que el lóbulo X de los ratones silvestres muestra una densidad lineal de células de Purkinje mayor que el de los ratones PCD a P15. Cabe recordar que a esta edad todavía no ha comenzado la etapa degenerativa en ninguna de las dos regiones estudiadas (Muñoz-Castañeda et al., 2018), de modo que esta diferencia en el número de células no puede ser debida a la muerte neuronal que sufre el ratón PCD. De este modo, una hipótesis que parece factible para explicar este fenómeno es la poda neuronal: mediante este proceso grandes grupos de axones, dendritas y sinapsis que en un inicio son muy abundantes, son eliminados durante el desarrollo del sistema nervioso central, mientras que otras son reforzadas para conseguir circuitos neuronales más estables, eficientes y precisos (Faust et al., 2021). Se ha comprobado que la poda neuronal ocurre en el cerebelo en varias etapas (**Fig. 49**; Faust et al., 2021):

1. Desarrollo prenatal: distintas fibras trepadoras contactan con los somas de las células de Purkinje.
2. P0-P11: denominada primera etapa de la poda neuronal; algunas fibras trepadoras se eliminan y otras se relocalizan.
3. P12-P17: denominada segunda etapa de poda neuronal; se eliminan más conexiones.
4. Adultez: las conexiones que se han mantenido maduran.



**Figura 49. Poda neuronal sobre las células de Purkinje.** En el cerebelo, los somas de las células de Purkinje son inervados por múltiples fibras trepadoras. En la primera etapa las fibras más débiles son podadas, mientras que las más fuertes se translocan. En la segunda etapa de la poda las fibras que quedan en los somas se eliminan y solo se mantienen las que contactan con el árbol dendrítico. Modificado de Faust et al., 2021.

Con relación al número de células, se sabe que la apoptosis neuronal tiene un papel crucial durante el desarrollo del sistema nervioso (Burek y Oppenheim, 1996). Durante su desarrollo, las neuronas se producen en exceso para asegurar que se formen conexiones productivas, y las neuronas que no consiguen inervar de forma útil un objetivo no son necesarias y se eliminan mediante apoptosis (Geden et al., 2019). Para ahondar en este fenómeno, se desarrolló un modelo de ratón mutante para *Apaf1*, gen cuya proteína participa en la activación de la vía apoptótica. Los animales homocigotos para dicha mutación morían prematuramente (en el día 16 de desarrollo embrionario) y su fenotipo incluía un número excesivo de neuronas (Cecconi et al., 1998). Es por ello por lo que la apoptosis en este contexto provoca que los únicos tipos neuronales que se mantengan sean solo aquellos que han conseguido inervar correctamente sus objetivos y que, consiguientemente, formarán circuitos útiles (Geden et al., 2019). El descenso en el número de células de Purkinje que hemos observado en los ratones

silvestres de P15 a P20 coincide temporalmente con este periodo de poda y maduración neuronal. Además, hemos detectado este proceso de dos formas: por un lado, nuestros resultados muestran un descenso de la densidad lineal de P15 a P20 en los ratones silvestres; y, por otro lado, a P15 hemos comprobado que hay una mayor densidad celular en el lóbulo X de los ratones silvestres con relación al de los ratones PCD. Por lo tanto, si asumimos que los ratones silvestres sufren parte del proceso de poda neuronal de P15 a P20 y que en los ratones PCD no hemos observado estos cambios en el número de células de Purkinje, es posible que la poda neuronal sea un proceso afectado también por la mutación *pcd*.

Ya hemos descrito que en el cerebelo del ratón PCD se han detectado dos etapas: la de pre-degeneración neuronal a P15-P17 y la de degeneración neuronal de P17 en adelante (Muñoz-Castañeda et al., 2018). Resulta llamativo que la etapa pre-degenerativa coincida temporalmente con la segunda etapa de poda neuronal y con el menor número de células que presentan los ratones PCD a P15. Una de las características de esta etapa pre-degenerativa es que la dendrita principal de la célula de Purkinje es más corta y estrecha que en los ratones silvestres (Muñoz-Castañeda et al., 2018), hecho que pudiese estar afectando a la sinapsis de las fibras trepadoras y, por ello, a la segunda etapa de la poda neuronal. De este modo, podrían existir un número mayor de células de Purkinje que no sean inervadas correctamente y se eliminen por apoptosis (Geden et al., 2019), hecho que hemos detectado con el menor número de células de Purkinje a P15. No hemos encontrado datos en la bibliografía que hagan referencia a la poda neuronal en el ratón PCD o su relación con la etapa pre-degenerativa, de modo que sería interesante estudiarlo más en profundidad en el ratón mutante para poder dilucidar cómo está afectado en este modelo.

### *Factores neuroprotectores en el lóbulo X: HSP25 y su versión fosforilada*

Se ha comprobado en multitud de animales, incluido el ratón PCD, que la muerte de las células de Purkinje no ocurre de forma uniforme. Precisamente, los patrones de neurodegeneración en bandas fueron descritos claramente por primera vez en el ratón PCD, junto al ratón *Nervous* y el *Tambaleante* (Wassef et al., 1987). Si consideramos los estudios que se han realizado sobre los patrones de degeneración en el cerebelo podemos comprobar que apenas hay ejemplos en los que las células de Purkinje mueran de forma aleatoria. De este modo, se ha comprobado que existen varios patrones de vulnerabilidad de las células de Purkinje (Sarna y Hawkes, 2003), siendo la relación entre los patrones de expresión de *Zebrin II* y la neurodegeneración uno de los ejemplos más llamativos. Así, se ha comprobado por un lado, que las células de Purkinje que no expresan *Zebrin II* son más sensibles a la degeneración neuronal, como en el ratón *Tottering* (Fletcher et al., 1996). O, por otro lado, que las células de Purkinje que sí expresan *Zebrin II* son más sensibles a la degeneración neuronal, como sucede en el ratón *Nervous* (Wassef et al., 1987). De esta forma, parece que la presencia *Zebrin II* nos está informando de vías específicas que convergen en la muerte de las células de Purkinje y no de que unas poblaciones sean más vulnerables que otras (Sarna y Hawkes, 2003), como tradicionalmente se pensaba. De este modo, podríamos plantearnos que dichas células mueren según estos patrones determinados debido a que existe un estrés celular que sigue esos mismos patrones. O, por otro lado, también podría ocurrir que dicho estrés actuase de forma uniforme sobre todas las células de Purkinje, y que unas sean más sensibles que otras a la degeneración neuronal. La segunda opción es la más frecuente, y un ejemplo claro de un estrés uniforme sobre todo el cerebelo pero con una neurodegeneración heterogénea del mismo lo tenemos en el ratón *Tottering*. Este modelo sufre una mutación en un gen que codifica un canal de calcio (Fletcher et al., 1996). Diversos estudios han comprobado que todas sus células de Purkinje

expresan niveles similares de mRNA de este gen mutado, pero no todas sufren la misma degeneración neuronal, y en este caso, solo mueren aquellas que no expresan *Zebrin II* (Fletcher et al., 1996). También tenemos el caso del ratón NPC1, en el que se ha comprobado que el factor neurodegenerativo —acumulaciones de vesículas de colesterol— es uniforme en todas las células de Purkinje, y las primeras que degeneran también son las negativas a *Zebrin II* (Sarna et al., 2003). En estos dos casos, como las células de Purkinje positivas a *Zebrin II* son menos vulnerables a la neurodegeneración podría parecer que este es un factor neuroprotector; más aún si tenemos en cuenta que las células de Purkinje del lóbulo X lo expresan abundantemente (Sarna y Hawkes, 2003). Sin embargo, se conoce un ratón mutante en el que las células de Purkinje positivas a *Zebrin II* son más susceptibles a la degeneración neuronal, el ratón *Nervous* (Wassef et al., 1987), lo que descarta los posibles efectos neuroprotectores de *Zebrin II*, al menos de una forma generalizada. De esta manera, sería lógico pensar que todas las células de Purkinje del lóbulo X del ratón *Nervous* morirían, ya que todas expresan *Zebrin II*. Sin embargo, aunque las células de Purkinje positivas a este marcador son más vulnerables a la degeneración neuronal en este modelo, se encontraron zonas con células positivas a *Zebrin II* que no degeneraban, precisamente en los lóbulos IX y X (Edwards et al., 1994). De forma secundaria también se encontraron en los flóculos y paraflóculos y en el lóbulo VI. Por todo ello, como hemos mencionado anteriormente, las bandas de expresión de *Zebrin II* definen poblaciones de células de Purkinje distintas entre ellas, y que por ello muestran susceptibilidades distintas ante diferentes procesos neurodegenerativos o tipos de estrés celular, pero no una predisposición hacia la supervivencia o la muerte celular. Por el contrario, la zona nodular presenta células de Purkinje más resistentes independientemente de los patrones y sensibilidades que se mostraban con *Zebrin II*. De este modo, en esta región no se puede afirmar que sus células sean susceptibles a algunos procesos neurodegenerativos y a otros no, como sucede con el patrón de bandas visualizadas con *Zebrin II*: el lóbulo X **siempre** es más resistente sea cual sea el factor neurodegenerativo. Aunque no se conocen bien los mecanismos que subyacen a su resistencia, se ha comprobado una relación entre esta y la expresión de HSP25 en diversos modelos de degeneración cerebelosa; algunos de ellos son el ratón *weaver* (Armstrong y Hawkes, 2001), el *Lurcher* (Duffin et al., 2010) y el NPC1 (Sarna y Hawkes, 2003). Además, tal y como hemos visto en nuestros resultados, el modelo PCD es otro ejemplo de ello, como detallaremos a continuación. Igualmente, Chung et al. en 2016 comprobaron el potente efecto neuroprotector que poseía HSP25 cuando era fosforilada en algunos de sus residuos de serina. Esta reacción enzimática sucede de forma natural en algunos procesos neurodegenerativos y, como veremos en nuestro modelo animal, también sucede en el lóbulo X.

### *Sobre la expresión de HSP25 en el lóbulo X*

Hemos comprobado que el lóbulo X del cerebelo es más resistente que el resto de los lóbulos en numerosos modelos animales que sufren la muerte de las células de Purkinje. Tal y como hemos visto, algunos ejemplos son los modelos *Leaner* (Heckroth y Abbott, 1994), *Toppler* (Duchala et al., 2004), *Robotic* (Isaacs et al., 2003), *Shaker* (Tolbert et al., 1995), *Lurcher* (Duffin et al., 2010) o NPC1 (Praggastis et al., 2015). Además, en algunos de los modelos mencionados, como el modelo NPC1 (Sarna et al., 2003) o el *Lurcher* (Duffin et al., 2010), se ha comprobado que existe una expresión mayor de HSP25 en el lóbulo X, convirtiendo a esta proteína en una clara candidata a ser responsable de dicha resistencia.

Con relación a los resultados obtenidos de HSP25, hemos comprobado que el lóbulo X de los ratones PCD muestra una mayor expresión que el de los ratones silvestres a P25 y P30. Esta mayor expresión, al coincidir temporalmente con la mayor supervivencia del lóbulo X,

sostiene la idea de que HSP25 puede ser uno de los factores generales por los que esta región sobrevive más tiempo la neurodegeneración, al igual que se ha comprobado en otros modelos, como el *Lurcher* (Armstrong et al., 2011). Si bien es cierto, a P35 no hemos observado diferencias en la densidad de células de Purkinje positivas a HSP25 entre ambos genotipos, pero si comparamos estos resultados con la densidad de células de Purkinje positivas a calbindina, podemos comprobar que a esta edad hay una pérdida aproximada del 50% de las células de Purkinje en el lóbulo X de los animales PCD. De este modo, se puede explicar que el descenso de células positivas a HSP25 sea debido a un descenso en el número total de células de Purkinje. De hecho, al analizar el porcentaje de células que expresan HSP25 sobre las que expresan calbindina, observamos que este valor es del 100%. Es decir, que la práctica totalidad de las células de Purkinje que expresan calbindina expresan HSP25. Si consideramos que en este momento de fuerte degeneración neuronal las únicas células que se mantienen vivas son aquellas que expresan HSP25, esto convierte a esta proteína de choque térmico en una responsable muy probable de la resistencia que muestra el lóbulo X. Sumado a esta idea nos encontramos con que se estudió el progreso de la muerte de las células de Purkinje en secciones coronales de un modelo equivalente al NPC1, y se comprobó que a P240 la mayor cantidad de células de Purkinje supervivientes del lóbulo X (y de todo el cerebelo) se localizaban en una banda central (Sarna et al., 2003). Dicha banda, además, coincide con una de las franjas —la más central— en las que se expresa HSP25 (Marzban y Hawkes, 2011).

Por último, esta relación entre la resistencia del lóbulo X y la expresión de HSP25 plantea dos alternativas. Por un lado, que el lóbulo X pueda resistir más tiempo la neurodegeneración puede deberse a una mayor expresión de HSP25. Por otro lado, que el lóbulo X exprese más cantidad de HSP25 también podría deberse a que al ser más resistente tenga más tiempo para expresar esta proteína; dicho de otro modo, que el resto de los lóbulos degeneren tan pronto hace que no les dé tiempo a expresar este factor neuroprotector, al contrario que al lóbulo X. Para elegir entre una de estas dos hipótesis, debemos saber que en los ratones silvestres existe una expresión de HSP25 constitutiva, definiendo el conocido patrón de bandas que ya hemos descrito en numerosas ocasiones (Duffin et al., 2010; Armstrong et al., 2000; Marzban y Hawkes, 2011). Este patrón, además, determina una mayor expresión de HSP25 en la zona nodular de forma constitutiva. De este modo, parece que HSP25 es un factor neuroprotector que se expresa más en esta región, tal y como se muestra en los ratones silvestres, y que a su vez aumenta su expresión ante un proceso neurodegenerativo, como hemos visto en los diversos modelos de neurodegeneración cerebelosa.

Por otro lado, también hemos mencionado que HSP25 se expresa notablemente en la zona central del cerebelo (lóbulos VI-VIII), particularmente en el lóbulo VI (Praggastis et al., 2015). En el modelo NPC1 se ha demostrado que esta región también resiste ligeramente mejor la neurodegeneración (Praggastis et al., 2015), lo que también sustenta la teoría de que HSP25 se expresa de forma constitutiva y que, allí donde se expresa, previene los efectos neurodegenerativos en cierto modo. Más aún, la expresión de HSP25 en el lóbulo VI es menos evidente que la del lóbulo X y, a su vez, la resistencia del lóbulo VI, aunque existe, se aprecia en pocos modelos y, de hecho, el ratón PCD no es un ejemplo de ello. De este modo, parece que también existe una relación entre los niveles de expresión de HSP25 y la menor vulnerabilidad de las regiones cerebelosas a la neurodegeneración.

### *Sobre la expresión de PKC- $\delta$ y HSP25-P en el lóbulo X*

Vista la influencia de HSP25 en la resistencia del lóbulo X, debemos hablar de su versión fosforilada. Se ha demostrado que HSP25 o su homóloga HSP27, por sí mismas, intervienen en

la estabilidad de la actina, en el plegado de distintas proteínas, median en el daño oxidativo o evitan la apoptosis (Arrigo, 2007). Sin embargo, estas dos proteínas tienen la capacidad de ser fosforiladas en sus residuos de serina, dando lugar a sus distintas versiones fosforiladas, como son HSP-P-Ser15/Ser78/Ser82/Ser86 (Rogalla et al., 1999). Se sabe además que HSP25/27-P-Ser15 y HSP25/27-P-Ser86 son, de entre todas, las dos formas fosforiladas que pueden evitar notablemente la apoptosis actuando sobre distintos puntos de la cascada de la señalización de muerte celular: uniéndose y bloqueando al citocromo C (Bruey et al., 2000) o la caspasa-3 (Pandey et al., 2000), inhibiendo la activación de BAX (Havasi et al., 2008) y la señalización DAXX (Charette y Landry, 2000). Además, estas dos formas concretamente son fruto de la fosforilación por parte de PKC- $\delta$  (Maizels et al., 1998), entre otras quinasas. Chung et al. en 2016 comprobaron la presencia de HSP25-P-Ser15 y de PKC- $\delta$  en la región nodular y posterior del ratón NPC1, precisamente los lóbulos que mostraban la mayor resistencia de todo el cerebelo de este modelo con degeneración cerebelosa. Además, indujeron e inhibieron la expresión de PKC- $\delta$  y de HSP25 en dicho modelo para comprobar que los efectos neurodegenerativos y de comportamiento mejoraban o se agravaban respectivamente. De este modo, demostraron cómo la existencia de PKC- $\delta$  aumentaba la presencia de HSP25-P-Ser que, además, tenía unos potentes efectos neuroprotectores (Chung et al., 2016). En nuestro modelo hemos comprobado que la expresión de PKC- $\delta$  es constante a lo largo del tiempo en el lóbulo X de los ratones silvestres, y que su densidad celular ronda las 50 células/mm, de forma similar a lo que sucedía con la expresión de calbindina, cuya expresión era ligeramente mayor de 50 células/mm. De este modo parece que la expresión de PKC- $\delta$  es constitutiva en las células de Purkinje del lóbulo X, como han observado otros autores (Barmack et al., 2001). Por su parte, en el lóbulo IX la expresión de PKC- $\delta$  es algo menor que en el X, y ya en las zonas más rostrales no solíamos encontrar más de 5 células de Purkinje por lóbulo. Además, en el lóbulo VI encontramos una expresión de PKC- $\delta$  mayor que en sus lóbulos contiguos. Por todo ello, al comprobar que PKC- $\delta$  muestra una mayor expresión en los lóbulos que, a su vez, son los más resistentes, sería lógico pensar que esta proteína tiene efectos neuroprotectores indirectos, como se ha comprobado anteriormente (Chung et al., 2016). Sin embargo, hay autores que afirman lo contrario: se ha visto que PKC- $\delta$  es un mediador de la apoptosis cuando se activa por la caspasa-3 mediante proteólisis (Kaul et al., 2003; Yang et al., 2004); además, la administración de un inhibidor de PKC- $\delta$  denominado *rottlerin* tiene efectos neuroprotectores *in vitro* y en modelos murinos de Parkinson (Zhang et al., 2007). Pese a ello, en el cerebelo, nuestro tejido de interés, los efectos que se le atribuyen sí son neuroprotectores cuando actúa de forma conjunta con HSP25 (Chung et al., 2016). De este modo, la diversidad de efectos que tiene PKC- $\delta$  solo pone de manifiesto las múltiples funciones que cumple en los diferentes tipos celulares, probablemente por su interacción con otras moléculas diversas, entre las que se encuentra HSP25. El hecho de que hayamos encontrado una expresión constitutiva en el lóbulo X tiene sentido, puesto que se ha comprobado que el cometido de PKC- $\delta$  no se limita a fosforilar HSP25, sino que tiene múltiples funciones en la célula, tanto generales como específicas para los distintos tipos celulares (Kikkawa et al., 2002). Además, esto último también explicaría por qué hemos encontrado marcaje de PKC- $\delta$  en las células en cesto. Por último, hemos comprobado que la expresión de PKC- $\delta$  también se comporta como la de calbindina a lo largo del tiempo: del mismo modo que la densidad celular de calbindina se reduce a medida que progresaba la degeneración neuronal del ratón PCD, la densidad de PKC- $\delta$  también desciende progresivamente. El motivo es evidente: ambos descensos son causados por la pérdida de las células de Purkinje. Como hemos dicho, a diferencia de otros tejidos, PKC- $\delta$  tiene propiedades neuroprotectoras en el cerebelo, aunque parece que no de forma directa, sino que este efecto neuroprotector puede existir mediante la fosforilación de HSP25. Con relación a la presencia de HSP25-P-Ser15, hemos comprobado que

su expresión es bastante baja en el lóbulo X de los animales PCD, y aun así nuestros resultados mostraron que su expresión era mayor que la de los ratones silvestres a P25. Si bien es cierto, a diferencia de PKC- $\delta$ , con este marcaje no encontramos expresión en el resto de los lóbulos, salvo alguna célula puntual en el lóbulo VI. En los controles tampoco encontramos marcaje apenas, lo que nos demuestra que la presencia de HSP25-P-Ser15 también está inducida por la degeneración neuronal del ratón PCD. Asimismo, pudimos encontrar un comportamiento similar entre la proteína fosforilada y sin fosforilar: inicialmente, a P15, hay una expresión relativamente baja que comienza a aumentar hasta su máximo a P25, justo antes del comienzo de la degeneración neuronal del lóbulo X; a partir de esta edad la expresión de HSP25-P vuelve a descender debido a la muerte de células de Purkinje que sufre el ratón PCD. Por lo tanto, al igual que sucedía con HSP25, la presencia de HSP25-P parece que también está inducida por la degeneración neuronal del ratón PCD, si bien, la expresión de HSP25 es constitutiva y en el caso de HSP25-P no es así. Gracias a los experimentos de Chung et al., en 2016, en los que demostraban el efecto neuroprotector de la versión fosforilada de HSP25 en el cerebelo del ratón, podemos afirmar que la resistencia del lóbulo X del cerebelo está fomentada también por HSP25-P-Ser15, y que es posible que la proteína responsable de fosforilar HSP25 en nuestro modelo sea PKC- $\delta$ .

Si comparamos los resultados de HSP25 con los de HSP25-P, podemos comprobar que hay una gran diferencia en la densidad lineal de células de Purkinje positivas a ellas. Si tomamos como referencia P25 —momento de máxima expresión de ambas proteínas— se puede observar que la media de HSP25 ronda las 40 células/mm y la de HSP25-P se encuentra en torno a las 8 células/mm. La explicación a esta diferencia es sencilla: la presencia de HSP25 fosforilada, implica necesariamente la presencia previa de HSP25 sin fosforilar, además de PKC- $\delta$ , que hemos comprobado que en este caso no es un factor limitante. Asimismo, en nuestros resultados hemos comprobado que la presencia de ambas formas de esta chaperona es en parte inducida. Por lo tanto, lo que puede ocurrir en el lóbulo X del ratón PCD es que en las edades previas a la degeneración neuronal, cuando comienzan los daños celulares previos a la muerte de células de Purkinje, ya se comienzan a expresar estos factores neuroprotectores de forma que la expresión de HSP25 aumenta rápidamente. De hecho, una característica del DNA que codifica las HSP es que no tiene intrones. Así, el mRNA de las HSP y las HSP se pueden producir rápidamente ante un estímulo estresante debido a que el mRNA no requiere ser procesado mediante el *splicing* (Rylander et al., 2005). Sin embargo, la fosforilación de esta proteína es un proceso que debe comenzar necesariamente después de la expresión de HSP25. De modo que, cuando finalmente está aumentando la expresión de HSP25-P, puede ser demasiado tarde y ya ha comenzado la muerte de las células de Purkinje provocando el descenso en el número de células de Purkinje positivas a HSP25-P. Además, alguno de los efectos de la mutación *pcd* sobre las células de Purkinje consiste en una acumulación de daños sobre el DNA. Estos daños provocan a su vez una compactación de la cromatina que impide su lectura e inhibe la expresión de determinadas proteínas (Baltanás et al., 2011); el silenciamiento génico que acaban sufriendo las células de Purkinje del lóbulo X podría afectar a la expresión de HSP25 o HSP25-P y agravar el fenotipo de este tipo celular.

Lo que podemos concluir de la expresión de HSP25 y HSP25-P-Ser15 es que **la resistencia del lóbulo X del ratón PCD puede ser debida a la expresión constitutiva y posteriormente inducida de HSP25**. Por otro lado, HSP25-P-Ser15 parece ser un factor que no se encuentra de forma constitutiva en el lóbulo X, pero cuya expresión es inducida ante el proceso de degeneración neuronal del ratón PCD y que quizás pueda retener ligeramente la muerte de las células de Purkinje, al menos en el lóbulo X.

### ¿Por qué el lóbulo X es distinto al resto de lóbulos?

Una vez visto que (1) el lóbulo X es una región más resistente a la muerte neuronal, (2) que dicha resistencia es prácticamente universal en los distintos modelos de degeneración cerebelosa, (3) que esta puede ser debida en parte a un sistema de protección general como la expresión de HSP25 o HSP25-P, y (4), concretamente en el ratón PCD, este lóbulo es menos vulnerable a la mutación gracias a una menor dependencia a la desglutamilación, surge una última pregunta: **¿Por qué el lóbulo X está más protegido ante la neurodegeneración que el resto de lóbulos?**

Responder a esta pregunta es tremendamente complicado. Hemos encontrado numerosos artículos que mencionan la menor vulnerabilidad a la neurodegeneración de esta región en distintos escenarios neurodegenerativos: el modelo *Robotics* (Isaacs et al., 2003), *Toppler* (Duchala et al., 2004), ataxia espinocerebelosa 1 en humanos (Robitaille et al., 1995), NPC1, (Sarna et al., 2003), lesiones causadas por alcohol (Torvik, 1987), etc. Hemos encontrado incluso una revisión que trata específicamente sobre los patrones de neurodegeneración del cerebelo: en esta se menciona que las células de Purkinje de la zona nodular son especialmente resistentes a la neurodegeneración en una gran diversidad de modelos animales (Sarna y Hawkes, 2003). Sin embargo, ninguno de ellos da respuesta a por qué dicho lóbulo está más protegido ante la muerte neuronal. Como es lógico, estos se limitan a resolver las hipótesis planteadas en sus trabajos, pero sobre el lóbulo X —o la región nodular— solo se hace referencia a su resistencia como una anécdota llamativa.

Además de los factores diferenciales que hemos encontrado en el lóbulo X, como la expresión de las CCP o TTLL1 y las proteínas de choque térmico, se conocen multitud de particularidades que diferencian a este lóbulo del resto: aunque no se conoce bien el impacto que tiene sobre su funcionalidad, se ha comprobado que las células de Purkinje del lóbulo X presentan una mayor regularidad en el disparo de impulsos y una menor adaptación a los estímulos repetidos que los lóbulos III-V (Kim et al., 2013). Sumado a esto, mediante un estudio de transcriptómica se comparó la expresión de RNA entre los lóbulos III, VI y X en animales silvestres y mutantes NPC1, y se comprobó que entre el lóbulo III y el VI existían en torno a 180-350 genes que se expresaban diferencialmente. Sorprendentemente, al realizar la misma comparación entre el lóbulo III o el VI frente al lóbulo X, la diferencia de expresión se incrementaba hasta 1300-1500 genes (Martin et al., 2019). Ello nos da una idea de la inmensa cantidad de posibles factores por los que sus células de Purkinje sobreviven más tiempo. Así, algunas de las potenciales razones responsables de la neuroprotección del lóbulo X fueron: un incremento en la señalización del calcio, un incremento en la señalización de *Sonic Hedgehog* o un incremento en el tamponamiento del glutamato (Martin et al., 2019). Por su parte, cuando se comparó la expresión entre los ratones NPC1 y los silvestres, se observó un aumento generalizado de genes relacionados con la respuesta inmune e inflamatoria, pero de forma independiente de los lóbulos (Martin et al., 2019). Estos datos, junto a otros estudios demuestran que la respuesta inflamatoria no subyace a los patrones de resistencia de las células de Purkinje, sino alguno de los factores expuestos anteriormente, lo que sigue reforzando la cuestión de porqué el lóbulo X es tan diferente del resto y está más protegido.

Para intentar responder al porqué de esta resistencia, podemos empezar recordando que se ha comprobado la expresión de HSP25 en el cerebelo del ratón NPC1, concretamente en las células de Purkinje supervivientes (Sarna et al., 2003), y ahora también hemos comprobado esta expresión en el cerebelo del ratón PCD. A su vez, las funciones de HSP25/27 en el cerebelo no están claras, pero se ha comprobado en líneas celulares no neuronales que estas proteínas

actúan como chaperonas durante el estrés térmico (Jakob et al., 1993) y regulan la organización de los filamentos de actina durante el estrés oxidativo (Lavoie et al., 1993; Huot et al., 1996). De este modo, las únicas funciones que se han descrito hasta el momento para HSP25/27 son de carácter protector, de forma semejante al resto de sHSP, que están involucradas en estabilizar otras proteínas bajo condiciones de estrés (Carver et al., 1994; Boelens y de Jong, 1995; Sun y MacRae, 2005). De este modo, y debido a que las únicas funciones que se han comprobado de HSP25/27 son protectoras, es lógico pensar que su expresión debería ser inducida, concretamente por un factor de estrés celular. De hecho, hemos comprobado que esto es cierto, puesto que nuestros resultados muestran una fuerte expresión de HSP25 en el lóbulo X de los ratones PCD, mientras que en los ratones silvestres su expresión no es tan intensa. Sin embargo, también hemos comprobado que la expresión en el lóbulo X de los ratones silvestres no es nula, a diferencia de otros lóbulos. Este fenómeno también lo han visto otros autores con la característica distribución en 3 bandas en el lóbulo X (Armstrong et al., 2000; Duffin et al., 2010; Marzban y Hawkes, 2011). Así, si exclusivamente la función de HSP25 fuese de chaperona ante diversos tipos de estrés celular, no tendría sentido que dicha proteína se expresase de forma constitutiva en la zona nodular o central cuando no hay ningún proceso neurodegenerativo (principalmente en los lóbulos X y VI respectivamente), a no ser que, por un lado, HSP25 posea otras funciones no descritas hasta el momento (además de la de chaperona) o, por otro lado, que sea necesario proteger más estas regiones debido a que quizás sean más esenciales.

Al comienzo de la introducción, hablamos de que el lóbulo X, junto con los flóculos cerebelosos, conformaban la zona floculonodular (Brooks y Thach, 2011). Esta zona es la región más primitiva de todo el cerebelo y, de hecho, equivale a la única *folia* de los vertebrados más primitivos (Brooks y Thach, 2011). Además, recibe aferencias vestibulares y visuales y sus eferencias proyectan a los núcleos vestibulares, lo que coincide con sus funciones: participa en el equilibrio, en los reflejos vestibulares y en los movimientos oculares (Brooks y Thach, 2011). De este modo, es lógico pensar que evolutivamente se haya priorizado más la protección de la zona floculonodular antes que la de otras regiones cerebelosas, por ser una de las regiones más primitivas y la responsable de las funciones más básicas del cerebelo. Dicho de otro modo, es posible que durante el proceso evolutivo se haya tendido a **proteger más las funciones del mantenimiento de la postura o el equilibrio** (paleocerebelo) antes que la motricidad fina (cerebrocerebelo).

Si bien es cierto, también podríamos **achacar la resistencia del lóbulo X a su simplicidad o funcionamiento distinto**, o a una combinación de ambas razones. Sabemos que las regiones del cerebelo más avanzadas filogenéticamente realizan procesamientos más complejos que permiten planificar y ejecutar movimientos finos y precisos (Brooks y Thach, 2011). Este procesamiento requiere necesariamente una complejidad neuronal mayor, y dicho requerimiento podría provocar que las células de Purkinje más especializadas de las regiones más avanzadas filogenéticamente sean más susceptibles a los factores de degeneración neuronal. Podríamos encontrar un ejemplo de ello, precisamente, con la mutación *pcd*: en los ratones PCD la falta de la desglutamilasa CCP1 provoca la muerte de las células de Purkinje a partir de P20, entre otros tipos celulares (Muñoz-Castañeda et al., 2018). Dicha degeneración neuronal progresa y a los 9 meses de edad tan solo se pueden observar unas pocas células de Purkinje aberrantes en el lóbulo X (Alcalde, 2003). Además, se sabe que la esperanza de vida de estos animales puede superar el año, puesto que se ha estudiado la degeneración de la retina de los ratones PCD de un año de edad (Blanks et al., 1982; Marchena et al., 2011). Por su parte, esta misma falta de CCP1 en humanos replica el fenotipo de los ratones PCD (Baltanás et al., 2021) pero de forma mucho más agresiva, de hecho la máxima edad a la que se ha estudiado la

patología de los pacientes con defectos en CCP1 es de 17 años (Baltanás et al., 2021), lo que equivale a unos 2 meses y medio en ratones (20 años humanos equivalen a 3 meses en ratón; Flurkey, 2007). De este modo, se sustenta la idea de que a medida que aumenta la complejidad evolutiva, la estabilidad de los tejidos se vuelve más vulnerable y un mismo defecto en una enzima genera daños más graves en los organismos más complejos. Otro ejemplo de la relación que existe entre la complejidad celular y su vulnerabilidad ante los daños lo podemos encontrar en las células mitrales del bulbo olfativo. Este tipo neuronal es muy vulnerable a los daños sobre el DNA debido a su alta actividad metabólica y bioeléctrica (Friedman y Strowbridge, 2000; Lowe, 2003; Djuricic et al., 2004). Asimismo, dicha actividad requiere necesariamente que la cromatina se encuentre activa o disponible en la disposición denominada eucromatina (Valero et al., 2006). A su vez, para que se pueda leer su información, la eucromatina está más expuesta a los daños sobre el DNA que la heterocromatina: se ha comprobado que la eucromatina es más susceptible a los daños químicos (Takata et al., 2013) o que la heterocromatina protege de los daños sobre el DNA (Cann y Dellaire, 2011). Se hipotetiza que la compactación del DNA junto a las proteínas no histonas promueve que estas actúen como un escudo ante los daños (Falk et al., 2008). Así, se sostiene la idea de que las células de Purkinje más complejas, al realizar procesamientos más elaborados tienen una mayor expresión génica. Esto provoca que la relación eucromatina/heterocromatina sea mayor y por ello, las células sean más susceptibles a los diferentes factores neurodegenerativos. De hecho, se ha comprobado que la acumulación de daños sobre el DNA de las células de Purkinje es una de las causas que su muerte y que la compactación de la cromatina es un mecanismo de defensa, si bien, este mecanismo a la larga impide también su reparación (Baltanás et al., 2011). Una futura línea de investigación podría ser el estudio de la relación entre la eucromatina y la heterocromatina en las células de Purkinje del lóbulo X frente a las del resto de lóbulos.

Como podemos ver, hemos encontrado una gran cantidad de factores diferenciales en el lóbulo X que podrían fomentar su resistencia. La vulnerabilidad selectiva de las diferentes poblaciones neuronales ha sido ampliamente estudiada, tanto en el cerebelo como en otras partes del sistema nervioso. Sin embargo, el lóbulo X abre una puerta a la investigación de la resistencia neuronal. Muchas de las estrategias para paliar los diferentes trastornos del sistema nervioso van orientadas a detener los daños actuando sobre las vías específicas que los desencadenan, otras se enfocan en revertir los perjuicios, etc. Sin embargo, muchos de los factores que subyacen a la resistencia del lóbulo X son independientes de la causa que desencadena los daños, desentrañar dichos factores puede ayudar a desarrollar nuevas estrategias en el desarrollo de terapias para las diferentes patologías nerviosas.



Conclusiones



En base a los objetivos y a la hipótesis planteados en la presente Tesis Doctoral, teniendo en cuenta los resultados obtenidos y su posterior discusión, se han elaborado las siguientes conclusiones:

- I. La citoarquitectura del lóbulo X del cerebelo es menos dependiente de la expresión de *Ccp1* que la del resto de lóbulos: ello lo hace menos vulnerable a la mutación *pcd*.
- II. Por su función desglutamilasa y su alta expresión, *Ccp6* podría compensar puntualmente el déficit de *Ccp1* en el lóbulo X cerebeloso.
- III. La expresión en paralelo de *Ttl1* y *Ccp1* (glutamilasa y desglutamilasa) también podría favorecer la resistencia del lóbulo X a la mutación *pcd*.
- IV. La resistencia del lóbulo X a la neurodegeneración puede deberse a la expresión constitutiva e inducida de HSP25 y a una de sus versiones fosforiladas.
- V. El lóbulo X del cerebelo es menos vulnerable a la mutación *pcd* gracias a un citoesqueleto menos glutamilado en sus células de Purkinje; además, la expresión de HSP25 puede protegerlas ante degeneración neuronal.



## Anexo I: Soluciones de uso común



**FIJADOR SOMOGYI:** está constituido por paraformaldehído al 4% (p/v) y ácido pícrico saturado al 15% (v/v), tamponado con PB. Un litro de este medio se realiza mezclando 40 g de paraformaldehído con 300 mL de H<sub>2</sub>O destilada a 90 °C. Para favorecer su despolimerización se añade 1 mL de NaOH 1 M. Se pudo confirmar que se había disuelto correctamente cuando la mezcla era transparente, en este momento se enfrió y se filtró. A esta solución se añaden 150 mL de la solución saturada de ácido pícrico filtrado y 500 mL de tampón fosfato 0,2 M, pH 7,4. Para finalizar la solución se enrasa hasta 1 litro con H<sub>2</sub>O destilada.

**MEDIO DE MONTAJE PARA FLUORESCENCIA “ANTIDSVANECIMIENTO”:** está compuesto por glicina 0,42 % (p/v), NaOH 0,021 % (p/v), NaCl 0,51 % (p/v), N-propil galato 5 % (p/v), glicerol 70 % (v/v) y timerosal 0,002 % (p/v). Para realizarlo, se disuelven 0,42 g de glicina, 0,021 g de NaOH, 0,51 g de NaCl y 5 g de N-propil galato en 100 mL de glicerol al 70% (v/v). Al final se añade 1 mL de una predilución de timerosal al 2 % (p/v). Se guarda protegido de la luz a 4 °C.

**MEZCLA CONGELADORA:** está compuesto por glicerol 30 % (v/v) y polietilenglicol al 30 % (v/v) tamponados con PB 0,1 M, pH 7,4. Un litro de la mezcla se realiza mezclando 200 mL de PB 0,5 M, pH 7,4 (ver más adelante), 300 mL de glicerol y 300 mL de polietilenglicol. Se enrasa hasta 1 L con H<sub>2</sub>O destilada y se guarda a 4 °C.

**SOLUCIÓN CRIOPROTECTORA DE SACAROSA:** se compone por sacarosa al 30 % (p/v) en PB 0,1 M.

**SOLUCIÓN PARA GELATINIZAR PORTAS:** se disuelven 4,5 g de gelatina en polvo en 900 mL de H<sub>2</sub>O destilada a 80 °C. Se añaden 0,44 g de sulfato de cromo III y potasio dodecahidratado. Los portaobjetos se introducen en la solución filtrada a 70 °C durante 5 min y se secan a 60 °C toda una noche. Se repite el proceso y cuando estén secos se almacenan en un lugar seco.

**SOLUCIÓN SALINA ISOTÓNICA:** está constituida por NaCl 0,9 % (p/v) en H<sub>2</sub>O destilada.

**TAMPÓN DE ELECTROFORESIS PARA WESTERN BLOT:** está compuesto por Tris-base 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0,1% v/v. Una vez que se han disuelto los componentes se ajusta a pH 8,3.

**TAMPÓN FOSFATO 0,5 M, PH 7,4:** está compuesto por una mezcla de 0,5 M de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> dodecahidratado y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dihidratado. Para realizarlo se disuelven 35,8 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> dodecahidratado en 100 mL de H<sub>2</sub>O destilada y 7,8 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dihidratado en 200 mL de H<sub>2</sub>O destilada. Se añade la segunda solución sobre la primera hasta alcanzar el pH deseado.

**TAMPÓN FOSFATO 0,2 M, PH 7,4:** está compuesto por una mezcla de 0,2 M de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> dodecahidratado y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dihidratado. Para realizar 2 L se disuelven 107,4 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> dodecahidratado en 1,5 L de H<sub>2</sub>O destilada y 15,6 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dihidratado en 0,5 L de H<sub>2</sub>O destilada. Se añade la segunda solución sobre la primera hasta alcanzar el pH deseado.

**TAMPÓN FOSFATO SALINO, PH 7,4:** para realizar 1 L se disuelven en H<sub>2</sub>O destilada 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 3,63 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> dodecahidratado y 0,21 de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Se ajusta el pH y se enrasa hasta 1 L con H<sub>2</sub>O destilada.

**TAMPÓN LAEMMLI 2X:** está compuesto por SDS 2% (v/v), glicerol 10% (v/v), β-mercaptoetanol 5% (v/v), azul de bromofenol 0,002% (v/v) y Tris HCl 62,5 mM pH 6,8.

**TAMPÓN DE LISIS PARA EXTRACCIÓN DE DNA:** está constituido por SDS al 0,2% (p/v), EDTA 5mM, NaCl 0,2 M, tampón Tris-HCl 0,1 M y proteinasa K 6 U/mL.

**TAMPÓN RIPA:** está compuesto por una mezcla de Tris 50 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, IGEPAL® 1 % (v/v; Sigma), desoxicolato de sodio 0,5 % (v/v) y SDS 0,1 % (v/v). Antes de la extracción de proteína se le añaden 7,3 µL de inhibidores de proteasas (*Protease Inhibitor Cocktail*, Sigma) por cada mL de tampón que se vaya a utilizar.

**TAMPÓN DE TRANSFERENCIA PARA WESTERN BLOT:** está constituido por Tris-base 25 mM, glicina 192 mM y ajustado a pH 8,3.

**TAMPÓN TRIS-BORATO-EDTA 10X:** para obtener 1 L se disuelven en 40 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0: 108 g de Trizma base (890 mM) y 55 g de ácido bórico (890 mM). Se usa a una concentración 0,5X disolviendo la cantidad que corresponda en H<sub>2</sub>O destilada.

**TAMPÓN TRIS-SALINO:** está constituido por Tris-HCl 400 mM pH 7,5 y NaCl 3 M.

## Bibliografía



- A**kaboshi S, Yano T, Miyawaki S, Ohno K y Takeshita K (1997) A C57BL/Ksj mouse model of Niemann-Pick disease (spm) belongs to the same complementation group as the major childhood type of Niemann-Pick Disease type C. *Hum Genet* 99: 350-353.
- Alcalde I (2003) Estudio neuroquímico del encéfalo del ratón mutante *pcd* y control. *Trabajo de Grado de la Universidad de Salamanca*.
- Allin M, Matsumoto H, Santhouse AM, Nosarti C, Alasady MH, Stewart AL, Rifkin L y Murray RM (2001) Cognitive and motor function and the size of the cerebellum in adolescents born very pre-term. *Brain* 124: 60-66.
- Andersen BB, Gundersen HJ y Pakkenberg B (2003) Aging of the human cerebellum: a stereological study. *J Comp Neurol* 466: 356-365.
- Andreasen NC y Pierson R (2008) The role of the cerebellum in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 64: 81-88.
- Ango F, Wu C, Van der Want JJ, Wu P, Schachner M y Huang ZJ (2008) Bergmann glia and the recognition molecule CHL1 organize GABAergic axons and direct innervation of Purkinje cell dendrites. *Plos Biol* 6: 739-756.
- Apps R y Hawkes R (2009) Cerebellar cortical organization: a one-map hypothesis. *Nat Rev Neurosci* 10: 670-681.
- Armstrong CL y Hawkes R (2001) Selective Purkinje cell ectopia in the cerebellum of the weaver mouse. *J Comp Neurol* 439: 151-161.
- Armstrong CL, Krueger-Naug AM, Currie RW y Hawkes R (2000) Constitutive expression of the 25-kDa heat shock protein Hsp25 reveals novel parasagittal bands of Purkinje cells in the adult mouse cerebellar cortex. *J Comp Neurol* 416: 383-397.
- Armstrong CL, Krueger-Naug AM, Currie RW y Hawkes R (2001) Constitutive expression of heat shock protein HSP25 in the central nervous system of the developing and adult mouse. *J Comp Neurol* 434: 262-274.
- Armstrong CL, Chung SH, Armstrong JN, Hochgeschwender U, Jeong YG y Hawkes R (2009) A novel somatostatin-immunoreactive mossy fiber pathway associated with HSP25-immunoreactive Purkinje cell stripes in the mouse cerebellum. *J Comp Neurol* 517: 524-538.
- Armstrong CL, Duffin CA, Mcfarland R y Vogel MW (2011) Mechanisms of compartmental Purkinje cell death and survival in the lurcher mutant mouse. *Cerebellum* 10: 504-514.
- Arrigo AP (2007) The cellular "networking" of mammalian Hsp27 and its functions in the control of protein folding, redox state and apoptosis. *Adv Exp Med Biol* 594: 14-26.
- B**altanás FC, Casafont I, Weruaga E, Alonso JR, Berciano MT y Lafarga M (2011) Nucleolar disruption and Cajal body disassembly are nuclear hallmarks of DNA damage-induced neurodegeneration in Purkinje cells. *Brain Pathol* 21: 374-388.
- Baltanás FC, Berciano MT, Valero J, Gómez C, Díaz D, Alonso JR, Lafarga M y Weruaga E (2013) Differential glial activation during the degeneration of Purkinje cells and mitral cells in the PCD mutant mice. *Glia* 61: 254-272.
- Baltanás FC, Berciano MT, Santos E y Lafarga M (2021) The Childhood-Onset Neurodegeneration with Cerebellar Atrophy (CONDA) Disease Caused by. *Biomedicines* 9.
- Barmack NH, Baughman RW y Eckenstein FP (1992-a) Cholinergic innervation of the cerebellum of rat, rabbit, cat, and monkey as revealed by choline acetyltransferase activity and immunohistochemistry. *J Comp Neurol* 317: 233-249.
- Barmack NH, Baughman RW, Eckenstein FP y Shojaku H (1992-b) Secondary vestibular cholinergic projection to the cerebellum of rabbit and rat as revealed by choline acetyltransferase immunohistochemistry, retrograde and orthograde tracers. *J Comp Neurol* 317: 250-70.
- Barmack NH, Qian ZY, Kim HJ y Yoshimura J (2001) Activity-dependent distribution of protein kinase C-delta within rat cerebellar Purkinje cells following unilateral labyrinthectomy. *Exp Brain Res* 141: 6-20.

- Bastian AJ, Martin TA, Keating JG y Thach WT (1996) Cerebellar Ataxia: abnormal control of interaction torques across multiple joints. *J Neurophysiol* 76: 492-509.
- Beckinghausen J y Sillitoe RV (2019) Insights into cerebellar development and connectivity. *Neurosci Lett* 688: 2-13.
- Berezniuk I, Vu HT, Lyons PJ, Sironi JJ, Xiao H, Burd B, Setou M, Angeletti RH, Ikegami K y Fricker LD (2012) Cytosolic carboxypeptidase 1 is involved in processing A- and B-tubulin. *J Biol Chem* 287: 6503-6517.
- Biran V, Heine VM, Verney C, Sheldon RA, Spadafora R, Vexler ZS, Rowitch DH y Ferriero DM (2011) Cerebellar abnormalities following hypoxia alone compared to hypoxic-ischemic forebrain injury in the developing rat brain. *Neurobiol Dis* 41: 138-146.
- Bitoun E y Davies KE (2009) The robotic mouse: understanding the role of Af4, a cofactor of transcriptional elongation and chromatin remodelling, in Purkinje cell function. *Cerebellum* 8: 175-183.
- Blanks JC, Mullen RJ y Lavail MM (1982) Retinal degeneration in the PCD cerebellar mutant mouse. II. Electron microscopic analysis. *J Comp Neurol* 212: 231-246.
- Boelens WC y De Jong WW (1995) Alpha-crystallins, versatile stress-proteins. *Mol Biol Rep* 21: 75-80.
- Bompard G, Van Dijk J, Cau J, Lannay Y, Marcellin G, Lawera A, Van Der Laan S y Rogowski K (2018) CSAP acts as a regulator of Ttll-mediated microtubule glutamylation. *Cell Rep* 25: 2866-2877.
- Borges JC, Fischer H, Craievich AF y Ramos CH (2005) Low resolution structural study of two human HSP40 chaperones in solution. Dja1 from subfamily A and DjB4 from subfamily B have different quaternary structures. *J Biol Chem* 280: 13671-13681.
- Brochu G, Maler L y Hawkes R (1990) Zebrin II: a polypeptide antigen expressed selectively by Purkinje cells reveals compartments in rat and fish cerebellum. *J Comp Neurol* 291: 538-552.
- Brooks VB y Thach WT (2011) Cerebellar control of posture and movement. *Comprehensive Physiology*: 877-946.
- Bruey JM, Ducasse C, Bonniaud P, Ravagnan L, Susin SA, Diaz-Latoud C, Gurbuxani S, Arrigo AP, Kroemer G, Solary E y Garrido C (2000). Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome C. *Nat Cell Biol* 2: 645-652.
- Burek MJ y Oppenheim RW (1996) Programmed cell death in the developing nervous system. *Brain Pathol* 6: 427-446.
- C**ann KL y Dellaire G (2011) Heterochromatin and the DNA damage response: the need to relax. *Biochem Cell Biol* 89: 45-60.
- Carver JA, Aquilina JA, Cooper PG, Williams GA y Truscott RJ (1994) Alpha-crystallin: molecular chaperone and protein surfactant. *Biochim Biophys Acta* 1204: 195-206.
- Cecconi F, Álvarez-Bolado G, Meyer BI, Roth KA y Gruss P (1998) Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development. *Cell* 94: 727-737.
- Celio MR (1990) Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience* 35: 375-475.
- Chakrabarti L, Neal JT, Miles M, Martinez RA, Smith AC, Sopher BL y La Spada AR (2006) The Purkinje cell degeneration 5j mutation is a single amino acid insertion that destabilizes Nna1 protein. *Mamm Genome* 17: 103-110.
- Charette SJ y Landry J (2000) The interaction of Hsp27 with Daxx identifies a potential regulatory role of Hsp27 in fas-induced apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* 926: 126-131.
- Cheng SS y Heintz N (1997) Massive loss of mid- and hindbrain neurons during embryonic development of homozygous lurcher mice. *J Neurosci* 17: 2400-2407.
- Chung SH, Sillitoe RV, Croci L, Badaloni A, Consalez G y Hawkes R (2009) Purkinje cell phenotype restricts the distribution of unipolar brush cells. *Neuroscience* 164: 1496-1508.

- Chung C, Elrick MJ, Dell'orco JM, Qin ZS, Kalyana-Sundaram S, Chinnaiyan AM, Shakkottai VG y Lieberman AP (2016) Heat Shock Protein Beta-1 modifies anterior to posterior Purkinje cell vulnerability in a mouse model of Niemann-Pick type C disease. *Plos Genetics* 12: 1-22.
- Clark HB, Burrig EN, Yunis WS, Larson S, Wilcox C, Hartman B, Matilla A, Zoghbi HY y Orr HT (1997) Purkinje cell expression of a mutant allele of Sca1 in transgenic mice leads to disparate effects on motor behaviors, followed by a progressive cerebellar dysfunction and histological alterations. *J Neurosci* 17: 7385-7395.
- D**e Maio A (1999) Heat Shock Proteins: facts, thoughts, and dreams. *Shock* 11: 1-12.
- Delgado-García JM (2001) Structure and function of the cerebellum. *Rev Neurol* 33: 635-642.
- Díaz D, Recio JS, Weruaga E y Alonso JR (2012) Mild cerebellar neurodegeneration of aged heterozygous PCD mice increases cell fusion of Purkinje and bone marrow-derived cells. *Cell Transplant* 21: 1595-1602.
- Djurisic M, Antic S, Chen WR y Zecevic D (2004) Voltage imaging from dendrites of mitral cells: epsp attenuation and spike trigger zones. *J Neurosci* 24: 6703-6714.
- Double KL, Reyes S, Werry EL y Halliday GM (2010) Selective cell death in neurodegeneration: why are some neurons spared in vulnerable regions? *Prog Neurobiol* 92: 316-329.
- Doyle J, Ren X, Lennon G y Stubbs L (1997) Mutations in the Cacnl1a4 calcium channel gene are associated with seizures, cerebellar degeneration, and ataxia in tottering and leaner mutant mice. *Mamm Genome* 8: 113-120.
- Dubey A, Prajapati KS, Swamy M y Pachauri V (2015) Heat Shock Proteins: a therapeutic target worth to consider. *Vet World* 8: 46-51.
- Duchala CS, Shick HE, Garcia J, Deweese DM, Sun X, Stewart VJ y Macklin WB (2004) The toppler mouse: a novel mutant exhibiting loss of Purkinje cells. *J Comp Neurol* 476: 113-129.
- Duffin CA, Mcfarland R, Sarna JR, Vogel MW y Armstrong CL (2010) Heat Shock Protein 25 expression and preferential Purkinje cell survival in the lurcher mutant mouse cerebellum. *J Comp Neurol* 518: 1892-1907.
- Dugger BN y Dickson DW (2017) Pathology of neurodegenerative diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 9: 1-22.
- E**dwards MA, Crandall JE, Leclerc N y Yamamoto M (1994) Effects of nervous mutation on Purkinje cell compartments defined by Zebrin II and 9-O-acetylated gangliosides expression. *Neurosci Res* 19: 167-174.
- Eghrari AO, Riazuddin SA y Gottsch JD (2015) Fuchs corneal dystrophy. *Prog Mol Biol Transl Sci* 134: 79-97.
- Ehrnsperger M, Gräber S, Gaestel M y Buchner J (1997) Binding of non-native protein to HSP25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *Embo J* 16: 221-229.
- F**aivre C, Legrand C y Rabié A (1985) The microtubular apparatus of cerebellar Purkinje cell dendrites during postnatal development of the rat: the density and cold-stability of microtubules increase with age and are sensitive to thyroid hormone deficiency. *Int J Dev Neurosci* 3: 559-565.
- Falk M, Lukášová E y Kozubek S (2008) Chromatin structure influences the sensitivity of DNA to gamma-radiation. *Biochim Biophys Acta* 1783: 2398-2414.
- Fatemi SH, Halt AR, Realmuto G, Earle J, Kist DA, Thuras P y Merz A (2002) Purkinje cell size is reduced in cerebellum of patients with autism. *Cell Mol Neurobiol* 22: 171-175.
- Faust TE, Gunner G y Schafer DP (2021) Mechanisms governing activity-dependent synaptic pruning in the developing mammalian CNS. *Nat Rev Neurosci* 22: 657-673.
- Fernández-González A, La Spada AR, Treadaway J, Higdon JC, Harris BS, Sidman RL, Morgan JI y Zuo J (2002) Purkinje cell degeneration (PCD) phenotypes caused by mutations in the axotomy-induced gene, Nna1. *Science* 295: 1904-1906.

- Fletcher CF, Lutz CM, O'Sullivan TN, Shaughnessy JD, Hawkes R, Frankel WN, Copeland NG y Jenkins NA (1996) Absence epilepsy in tottering mutant mice is associated with calcium channel defects. *Cell* 87: 607-617.
- Flurkey K, Curren JM y Harrison DE (2007) Mouse Models in Aging Research. En: Fox JG, Davisson MT, Quimby FW, Barthold SW, Newcomer CE y Smith AL, eds, *The mouse in biomedical research*, pp. 637-672.
- Friedman D y Strowbridge BW (2000) Functional role of NMDA autoreceptors in olfactory mitral cells. *J Neurophysiol* 84: 39-50.
- G**alliano E, Potters JW, Elgersma Y, Wisden W, Kushner SA, De Zeeuw CI y Hoebeek FE (2013) Synaptic transmission and plasticity at inputs to murine cerebellar Purkinje cells are largely dispensable for standard nonmotor tasks. *J Neurosci* 33: 12599-12618.
- Geden MJ, Romero SE y Deshmukh M (2019) Apoptosis versus axon pruning: molecular intersection of two distinct pathways for axon degeneration. *Neurosci Res* 139: 3-8.
- Gittes F, Mickey B, Nettleton J y Howard J (1993) Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape. *J Cell Biol* 120: 923-934.
- Greer CA y Shepherd GM (1982) Mitral cell degeneration and sensory function in the neurological mutant mouse Purkinje cell degeneration (PCD). *Brain Res* 235: 156-161.
- H**arris A, Morgan JI, Pecot M, Soumare A, Osborne A y Soares HD (2000) Regenerating motor neurons express Nna1, a novel ATP/GTP-binding protein related to zinc carboxypeptidases. *Mol Cell Neurosci* 16: 578-596.
- Havasi A, Li Z, Wang Z, Martin JL, Botla V, Ruchalski K, Schwartz JH y Borkan SC (2008) HSP27 inhibits BAX activation and apoptosis via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *J Biol Chem* 283: 12305-12313.
- Hawkes R (1997) An anatomical model of cerebellar modules. *Prog Brain Res* 114: 39-52.
- Hawkes R y Turner RW (1994) Compartmentation of NADPH-diaphorase activity in the mouse cerebellar cortex. *J Comp Neurol* 346: 499-516.
- Heckroth JA y Abbott LC (1994) Purkinje cell loss from alternating sagittal zones in the cerebellum of leaner mutant mice. *Brain Res* 658: 93-104.
- Herrup K y Wilczynski SL (1982) Cerebellar cell degeneration in the leaner mutant mouse. *Neuroscience* 7: 2185-2196.
- Hou Y, Dan X, Babbar M, Wei Y, Hasselbalch SG, Croteau DL y Bohr VA (2019) Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 15: 565-581.
- Howes SC, Geyer EA, Lafrance B, Zhang R, Kellogg EH, Westermann S, Rice LM y Nogales E (2017) Structural differences between yeast and mammalian microtubules revealed by cryo-em. *J Cell Biol* 216: 2669-2677.
- Hrabé de Angelis MH, Flaswinkel H, Fuchs H, Rathkolb B, Soewarto D, Marschall S, Heffner S, Pargent W, Wuensch K, Jung M, Reis A, Richter T, Alessandrini F, Jakob T, Fuchs E, Kolb H, Kremmer E, Schaeble K, Rollinski B, Roscher A, Peters C, Meitinger T, Strom T, Steckler T, Holsboer F, Klopstock T, Gekeler F, Schindewolf C, Jung T, Avraham K, Behrendt H, Ring J, Zimmer A, Schughart K, Pfeiffer K, Wolf E y Balling R (2000) Genome-wide, large-scale production of mutant mice by enu mutagenesis. *Nat Genet* 25: 444-447.
- Huang L, Min JN, Masters S, Mivechi NF y Moskophidis D (2007) Insights into function and regulation of small Heat Shock Protein 25 (HSPb1) in a mouse model with targeted gene disruption. *Genesis* 45: 487-501.
- Huot J, Houle F, Spitz DR y Landry J (1996) HSP27 phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress. *Cancer Res* 56: 273-279.
- I**kegami K, Sato S, Nakamura K, Ostrowski LE y Setou M (2010) Tubulin polyglutamylation is essential for airway ciliary function through the regulation of beating asymmetry. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 10490-10495.

- Isaacs AM, Oliver PL, Jones EL, Jeans A, Potter A, Hovik BH, Nolan PM, Vizor L, Glenister P, Simon AK, Gray IC, Spurr NK, Brown SD, Hunter AJ y Davies KE (2003) A mutation in Af4 is predicted to cause cerebellar ataxia and cataracts in the robotic mouse. *J Neurosci* 23: 1631-1637.
- Isnard P, Coré N, Naquet P y Djabali M (2000) Altered lymphoid development in mice deficient for the mAF4 proto-oncogene. *Blood* 96: 705-710.
- Ito M (2006) Cerebellar circuitry as a neuronal machine. *Prog Neurobiol* 78: 272-303.
- J**akob U, Gaestel M, Engel K y Buchner J (1993) Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J Biol Chem* 268: 1517-1520.
- Janke C, Rogowski K, Wloga D, Regnard C, Kajava AV, Strub JM, Temurak N, Van Dijk J, Boucher D, Van Dorselaer A, Suryavanshi S, Gaertig J y Eddé B (2005) Tubulin polyglutamylase enzymes are members of the TTL domain protein family. *Science* 308: 1758-1762.
- Janke C y Magiera MM (2020) The tubulin code and its role in controlling microtubule properties and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 21, 307-326.
- K**alinina E, Biswas R, Berezniuk I, Hermoso A, Avilés FX y Fricker LD (2007) A novel subfamily of mouse cytosolic carboxypeptidases. *Faseb J* 21: 836-850.
- Karakaya M, Paketci C, Altmueller J, Thiele H, Hoelker I, Yis U y Wirth B (2019) Biallelic variant in AGTPBP1 causes infantile lower motor neuron degeneration and cerebellar atrophy. *Am J Med Genet A* 179: 1580-1584.
- Kari G, Rodeck U y Dicker AP (2007) Zebrafish: an emerging model system for human disease and drug discovery. *Clin Pharmacol Ther* 82: 70-80.
- Kaul S, Kanthasamy A, Kitazawa M, Anantharam V y Kanthasamy AG (2003) Caspase-3 dependent proteolytic activation of protein kinase C delta mediates and regulates 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+)-induced apoptotic cell death in dopaminergic cells: relevance to oxidative stress in dopaminergic degeneration. *Eur J Neurosci* 18: 1387-1401.
- Kikkawa U, Matsuzaki H y Yamamoto T (2002) Protein kinase C delta (PKC delta): activation mechanisms and functions. *J Biochem* 132: 831-839.
- Kim CH, Shin JJ, Kim J y Kim SJ (2013) Reduced spike frequency adaptation in Purkinje cells of the vestibulocerebellum. *Neurosci Lett* 535: 45-50.
- Kimura Y, Kurabe N, Ikegami K, Tsutsumi K, Konishi Y, Kaplan OI, Kunitomo H, Iino Y, Blacque OE y Setou M (2010) Identification of tubulin deglutamylase among Caenorhabditis elegans and mammalian cytosolic carboxypeptidases (CCPs). *J Biol Chem* 285: 22936-22941.
- Kostenko S y Moens U (2009) Heat shock protein 27 phosphorylation: kinases, phosphatases, functions and pathology. *Cell Mol Life Sci* 66: 3289-3307.
- Kume A, Takahashi A, Hashizume Y y Asai J (1991) A histometrical and comparative study on Purkinje cell loss and olivary nucleus cell loss in multiple system atrophy. *J Neurol Sci* 101: 178-186.
- L**a Regina MC, Yates-Siilata K, Woods L y Tolbert D (1992) Preliminary characterization of hereditary cerebellar ataxia in rats. *Lab Anim Sci* 42: 19-26.
- Landis SC (1973) Ultrastructural changes in the mitochondria of cerebellar Purkinje cells of nervous mutant mice. *J Cell Biol* 57: 782-797.
- Landis SC y Mullen RJ (1978) The development and degeneration of Purkinje cells in PCD mutant mice. *J Comp Neurol* 177: 125-143.
- Larouche M, Che PM y Hawkes R (2006) Neurogranin expression identifies a novel array of Purkinje cell parasagittal stripes during mouse cerebellar development. *J Comp Neurol* 494: 215-27.
- Larsell O (1952) The morphogenesis and adult pattern of the lobules and fissures of the cerebellum of the white rat. *J Comp Neurol* 97: 281-356.

- Lavoie JN, Hickey E, Weber LA y Landry J (1993) Modulation of actin microfilament dynamics and fluid phase pinocytosis by phosphorylation of heat shock protein 27. *J Biol Chem* 268: 24210-24214.
- Levitt P y Rakic P (1980) Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain. *J Comp Neurol* 193: 815-840.
- Levitt JJ, Mccarley RW, Nestor PG, Petrescu C, Donnino R, Hirayasu Y, Kikinis R, Jolesz FA y Shenton ME (1999) Quantitative volumetric MRI study of the cerebellum and vermis in schizophrenia: clinical and cognitive correlates. *Am J Psychiatry* 156: 1105-1107.
- Lewis SE, Mannion RJ, White FA, Coggeshall RE, Beggs S, Costigan M, Martin JL, Dillmann WH y Woolf CJ (1999) A role for HSP27 in sensory neuron survival. *J Neurosci* 19: 8945-8953.
- Lisberger SG y Thach WT (2013) Chapter 42: The cerebellum. En: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ y Mack S, eds, *Principles of Neural Science*, pp. 960-981.
- Lorenzon NM, Lutz CM, Frankel WN y Beam KG (1998) Altered calcium channel currents in Purkinje cells of the neurological mutant mouse leaner. *J Neurosci* 18: 4482-4489.
- Lowe G (2003) Electrical signaling in the olfactory bulb. *Curr Opin Neurobiol* 13: 476-481.
- M**agiera MM, Bodakuntla S, Žiak J, Lacomme S, Marques Sousa P, Leboucher S, Hausrat TJ, Bosc C, Andrieux A, Kneussel M, Landry M, Calas A, Balastik M y Janke C (2018) Excessive tubulin polyglutamylation causes neurodegeneration and perturbs neuronal transport. *Embo J* 37: 1-14
- Maizels ET, Peters CA, Kline M, Cutler RE, Shanmugam M y Hunzicker-Dunn M (1998) Heat-Shock Protein-25/27 phosphorylation by the delta isoform of protein kinase C. *Biochem J* 332: 703-712.
- Marchena M, Lara J, Aijón J, Germain F, de la Villa P y Velasco A (2011) The retina of the pcd/pcd mouse as a model of photoreceptor degeneration. A structural and functional study. *Exp Eye Res* 93: 607-617.
- Martin KB, Williams IM, Cluzeau CV, Coughnoux A, Dale RK, Iben JR, Cawley NX, Wassif CA y Porter FD (2019) Identification of novel pathways associated with patterned cerebellar Purkinje neuron degeneration in Niemann-Pick disease, type C1. *Int J Mol Sci* 21: 1-26.
- Marzban H y Hawkes R (2011) On the architecture of the posterior zone of the cerebellum. *Cerebellum* 10: 422-434.
- Marzban H, Chung S, Watanabe M y Hawkes R (2007) Phospholipase Cbeta4 expression reveals the continuity of cerebellar topography through development. *J Comp Neurol* 502: 857-871.
- Mcfarland R, Blokhin A, Sydnor J, Mariani J y Vogel MW (2007) Oxidative stress, nitric oxide, and the mechanisms of cell death in lurcher Purkinje cells. *Dev Neurobiol* 67: 1032-1046.
- Mclysaght A, Hokamp K y Wolfe KH (2002) Extensive genomic duplication during early chordate evolution. *Nat Genet* 31: 200-204.
- Melo-Hanchuk TD y Kobarg J (2021) Polyglutamylase activity of tubulin tyrosine ligase-like 4 is negatively regulated by the never in mitosis gene a family kinase never in mitosis gene A -related kinase 5. *World J Biol Chem* 12: 38-51.
- Miall RC (2013) Cerebellum: Anatomy and Function. *Neuroscience in the 21st Century: From Basic to Clinical. Springer* 1: 1149-1167.
- Mugnaini E, Diño MR y Jaarsma D (1997) Chapter 8 The unipolar brush cells of the mammalian cerebellum and cochlear nucleus: cytology and microcircuitry. *Progress In Brain Research*. Elsevier.
- Mullen RJ y Lavail M (1975) Two types of retinal degeneration in cerebellar mutant mice. *Nature* 258: 528-530.
- Mullen RJ, Eicher EM y Sidman RL (1976) Purkinje cell degeneration, a new neurological mutation in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 73: 208-212.

Muñoz-Castañeda R, Díaz D, Peris L, Andrieux A, Bosc C, Muñoz-Castañeda JM, Janke C, Alonso JR, Moutin M-J y Weruaga E (2018) Cytoskeleton stability is essential for the integrity of the cerebellum and its motor- and affective-related behaviors. *Sci Rep* 8: 3072.

**N**ewman PP y Reza H (1979) Functional relationships between the hippocampus and the cerebellum: an electrophysiological study of the cat. *J Physiol* 287: 405-426.

**O**gorman S y Sidman RL (1985) Degeneration of thalamic neurons in "Purkinje cell degeneration" mutant mice. I. Distribution of neuron loss. *J Comp Neurol* 234: 277-297.

Ozol KO y Hawkes R (1997) Compartmentation of the granular layer of the cerebellum. *Histol Histopathol* 12: 171-184.

**P**almen SJ, Van Engeland H, Hof PR y Schmitz C (2004) Neuropathological findings in autism. *Brain* 127: 2572-2583.

Pandey P, Farber R, Nakazawa A, Kumar S, Bharti A, Nalin C, Weichselbaum R, Kufe D y Kharbanda S (2000) HSP27 functions as a negative regulator of cytochrome c-dependent activation of procaspase-3. *Oncogene* 19: 1975-1981.

Pathak N, Obara T, Mangos S, Liu Y y Drummond IA (2007) The zebrafish fleer gene encodes an essential regulator of cilia tubulin polyglutamylation. *Mol Biol Cell* 18: 4353-4364.

Pelham HR (1986) Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins. *Cell* 46: 959-961.

Pentchev PG, Comly ME, Kruth HS, Patel S, Proestel M y Weintraub H (1986) The cholesterol storage disorder of the mutant BALB/c mouse. A primary genetic lesion closely linked to defective esterification of exogenously derived cholesterol and its relationship to human type C Niemann-Pick disease. *J Biol Chem* 261: 2772-2777.

Pérez-Martín E, Muñoz-Castañeda R, Moutin M-J, Ávila-Zarza CA, Muñoz-Castañeda JM, del Pilar C, Alonso JR, Andrieux A, Díaz D y Weruaga E (2021) Oleoylethanolamide delays the dysfunction and death of Purkinje cells and ameliorates behavioral defects in a mouse model of cerebellar neurodegeneration. *Neurotherapeutics* 18: 1748-1767

Petersen SE, Fox PT, Posner MI, Mintun M y Raichle ME (1988) Positron emission tomographic studies of the cortical anatomy of single-word processing. *Nature* 331: 585-589.

Phillips RJS (1960) 'Lurcher', a new gene in linkage group XI of the house mouse. *Journal Of Genetics* 57: 35.

Picard B, Kammoun M, Gagaoua M, Barboiron C, Meunier B, Chambon C y Cassar-Malek I (2016) Calcium homeostasis and muscle energy metabolism are modified in HspB1-null mice. *Proteomes* 4: 1-21.

Picard H, Amado I, Mouchet-Mages S, Olié JP y Krebs MO (2008) The role of the cerebellum in schizophrenia: an update of clinical, cognitive, and functional evidences. *Schizophr Bull* 34: 155-172.

Praggastis M, Tortelli B, Zhang J, Fujiwara H, Sidhu R, Chacko A, Chen Z, Chung C, Lieberman AP, Sikora J, Davidson C, Walkley SU, Pipalia NH, Maxfield FR, Schaffer JE y Ory DS (2015) A murine Niemann-Pick C1 I1061T knock-in model recapitulates the pathological features of the most prevalent human disease allele. *J Neurosci* 35: 8091-8106.

**R**ecio JS (2008) Trasplante de médula ósea e identificación de sus derivados neurales en un modelo animal con neurodegeneración selectiva, el ratón mutante PCD. Aproximación a la terapia regenerativa con células madre adultas. *Tesis Doctoral de la Universidad de Salamanca*.

Robitaille Y, Schut L y Kish SJ (1995) Structural and immunocytochemical features of olivopontocerebellar atrophy caused by the spinocerebellar ataxia type 1 (Sca-1) mutation define a unique phenotype. *Acta Neuropathol* 90: 572-581.

Rodríguez de la Vega M, Sevilla RG, Hermoso A, Lorenzo J, Tanco S, Díez A, Fricker LD, Bautista JM y Avilés FX (2007) Nna1-like proteins are active metalloproteases of a new and diverse M14 subfamily. *Faseb J* 21: 851-865.

- Rogalla T, Ehrnsperger M, Preville X, Kotlyarov A, Lutsch G, Ducasse C, Paul C, Wieske M, Arrigo AP, Buchner J y Gaestel M (1999) Regulation of HSP27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor alpha by phosphorylation. *J Biol Chem* 274: 18947-18956.
- Rogowski K, Van Dijk J, Magiera MM, Bosc C, Deloulme JC, Bosson A, Peris L, Gold ND, Lacroix B, Bosch Grau M, Bec N, Larroque C, Desagher S, Holzer M, Andrieux A, Moutin M-J y Janke C (2010) A family of protein-deglutamylating enzymes associated with neurodegeneration. *Cell* 143: 564-578.
- Rylander MN, Feng Y, Bass J y Diller KR (2005) Thermally induced injury and heat-shock protein expression in cells and tissues. *Ann NY Acad Sci* 1066: 222-242.
- S**arna JR y Hawkes R (2003) Patterned Purkinje cell death in the cerebellum. *Prog Neurobiol* 70: 473-507.
- Sarna JR, Miranda SR, Schuchman EH y Hawkes R (2001) Patterned cerebellar Purkinje cell death in a transgenic mouse model of Niemann Pick type A/B disease. *Eur J Neurosci* 13: 1873-1880.
- Sarna JR, Larouche M, Marzban H, Sillitoe RV, Rancourt DE y Hawkes R (2003) Patterned Purkinje cell degeneration in mouse models of Niemann-Pick type C disease. *J Comp Neurol* 456: 279-291.
- Schlesinger MJ (1990) Heat shock proteins. *J Biol Chem* 265: 12111-12114.
- Shashi V, Magiera MM, Klein D, Zaki M, Schoch K, Rudnik-Schöneborn S, Norman A, Lopes Abath Neto O, Dusl M, Yuan X, Bartesaghi L, De Marco P, Alfares AA, Marom R, Arold ST, Guzmán-Vega FJ, Pena LD, Smith EC, Steinlin M, Babiker MO, Mohassel P, Foley AR, Donkervoort S, Kaur R, Ghosh PS, Stanley V, Musaeov D, Nava C, Mignot C, Keren B, Scala M, Tassano E, Picco P, Doneda P, Fiorillo C, Issa MY, Alassiri A, Alahmad A, Gerard A, Liu P, Yang Y, Ertl-Wagner B, Kranz PG, Wentzensen IM, Stucka R, Stong N, Allen AS, Goldstein DB, Schoser B, Rösler KM, Alfadhel M, Capra V, Chrast R, Strom TM, Kamsteeg EJ, Bönnemann CG, Gleeson JG, Martini R, Janke C, Senderek J y Network UD (2018) Loss of tubulin deglutamylase CCP1 causes infantile-onset neurodegeneration. *Embo J* 37: 1-12.
- Sheffer R, Gur M, Brooks R, Salah S, Daana M, Fraenkel N, Eisenstein E, Rabie M, Nevo Y, Jalas C, Elpeleg O, Edvardson S y Harel T (2019) Biallelic variants in AGTPBP1, involved in tubulin deglutamylation, are associated with cerebellar degeneration and motor neuropathy. *Eur J Hum Genet* 27: 1419-1426.
- Sillitoe RV y Hawkes R (2002) Whole-mount immunohistochemistry: a high-throughput screen for patterning defects in the mouse cerebellum. *J Histochem Cytochem* 50: 235-244.
- Sillitoe RV y Joyner AL (2007) Morphology, molecular codes, and circuitry produce the three-dimensional complexity of the cerebellum. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23: 549-577.
- Sillitoe RV, Chung SH, Fritschy JM, Hoy M y Hawkes R (2008) Golgi cell dendrites are restricted by Purkinje cell stripe boundaries in the adult mouse cerebellar cortex. *J Neurosci* 28: 2820-2826.
- Strzyz P (2019) Neurodegenerative polyglutamylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20: 1.
- Sun Y y Macrae TH (2005) Small heat shock proteins: molecular structure and chaperone function. *Cell Mol Life Sci* 62: 2460-2476.
- T**akata H, Hanafusa T, Mori T, Shimura M, Iida Y, Ishikawa K, Yoshikawa K, Yoshikawa Y y Maeshima K (2013) Chromatin compaction protects genomic DNA from radiation damage. *Plos One* 8: 1-11.
- Tavani F, Zimmerman RA, Berry GT, Sullivan K, Gatti R y Bingham P (2003) Ataxia-telangiectasia: the pattern of cerebellar atrophy on MRI. *Neuroradiology* 45: 315-319.
- Tolbert DL, Ewald M, Gutting J y La Regina MC (1995) Spatial and temporal pattern of Purkinje cell degeneration in shaker mutant rats with hereditary cerebellar ataxia. *J Comp Neurol* 355: 490-507.

- Tort O, Tanco S, Rocha C, Bièche I, Seixas C, Bosc C, Andrieux A, Moutin M-J, Avilés FX, Lorenzo J y Janke C (2014) The cytosolic carboxypeptidases CCP2 and CCP3 catalyze posttranslational removal of acidic amino acids. *Mol Biol Cell* 25: 3017-3027.
- Torvik A (1987) Brain lesions in alcoholics: neuropathological observations. *Acta Med Scand Suppl* 717: 47-54.
- Torvik A y Torp S (1986) The prevalence of alcoholic cerebellar atrophy. A morphometric and histological study of an autopsy material. *J Neurol Sci* 75: 43-51.
- U**dvardi MK, Czechowski T y Scheible WR (2008) Eleven golden rules of quantitative rt-PCR. *Plant Cell* 20: 1736-1737.
- V**alero J, Berciano MT, Weruaga E, Lafarga M y Alonso JR (2006) Pre-neurodegeneration of mitral cells in the PCD mutant mouse is associated with DNA damage, transcriptional repression, and reorganization of nuclear speckles and Cajal bodies. *Mol Cell Neurosci* 33: 283-295.
- van der Laan S, Dubra G y Rogowski K (2019) Tubulin glutamylation: a skeleton key for neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res* 14: 1899-1900.
- Vanier MT, Rodríguez-Lafrasse C, Rousson R, Duthel S, Harzer K, Pentchev PG, Revol A y Louisot P (1991) Type C Niemann-Pick disease: biochemical aspects and phenotypic heterogeneity. *Dev Neurosci* 13: 307-314.
- Verhey KJ y Gaertig J (2007) The tubulin code. *Cell Cycle* 6: 2152-2160.
- Vidyasagar A, Reese S, Acun Z, Hullett D y Djamali A (2008) HSP27 is involved in the pathogenesis of kidney tubulointerstitial fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 295: 707-716.
- Vogel MW, Caston J, Yuzaki M y Mariani J (2007) The lurcher mouse: fresh insights from an old mutant. *Brain Res* 1140: 4-18.
- Voogd J y Glickstein M (1998) The anatomy of the cerebellum. *Trends Neurosci* 21: 370-375.
- Voogd J, Pardoe J, Ruigrok TJ y Apps R (2003) The distribution of climbing and mossy fiber collateral branches from the copula pyramidis and the paramedian lobule: congruence of climbing fiber cortical zones and the pattern of Zebrin banding within the rat cerebellum. *J Neurosci* 23: 4645-4656.
- W**ang T y Morgan JI (2007) The Purkinje cell degeneration (PCD) mouse: an unexpected molecular link between neuronal degeneration and regeneration. *Brain Res* 1140: 26-40.
- Wassef M, Sotelo C, Cholley B, Brehier A y Thomasset M (1987) Cerebellar mutations affecting the postnatal survival of Purkinje cells in the mouse disclose a longitudinal pattern of differentially sensitive cells. *Dev Biol* 124: 379-389.
- White JJ y Sillitoe RV (2013) Development of the cerebellum: from gene expression patterns to circuit maps. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2: 149-164.
- Whitley D, Goldberg SP y Jordan WD (1999) Heat shock proteins: a review of the molecular chaperones. *J Vasc Surg* 29: 748-751.
- Wolf LW, Laregina MC y Tolbert DL (1996) A behavioral study of the development of hereditary cerebellar ataxia in the shaker rat mutant. *Behav Brain Res* 75: 67-81.
- Wu HY, Wei P y Morgan JI (2017) Role of cytosolic carboxypeptidase 5 in neuronal survival and spermatogenesis. *Sci Rep* 7: 41428.
- Y**ang Y, Kaul S, Zhang D, Anantharam V y Kanthasamy AG (2004) Suppression of caspase-3-dependent proteolytic activation of protein kinase C delta by small interfering RNA prevents MPP<sup>+</sup>-induced dopaminergic degeneration. *Mol Cell Neurosci* 25: 406-421.
- Ye B, Li C, Yang Z, Wang Y, Hao J, Wang L, Li Y, Du Y, Hao L, Liu B, Wang S, Xia P, Huang G, Sun L, Tian Y y Fan Z (2014) Cytosolic carboxypeptidase CCP6 is required for megakaryopoiesis by modulating Mad2 polyglutamylation. *J Exp Med* 211: 2439-2454.

## Bibliografia

Yoneshige A, Suzuki K y Matsuda J (2010) A mutation in the saposin C domain of the sphingolipid activator protein (prosaposin) gene causes neurodegenerative disease in mice. *J Neurosci Res* 88: 2118-2134.

**Z**hang D, Anantharam V, Kanthasamy A y Kanthasamy AG (2007) Neuroprotective effect of protein kinase C delta inhibitor rottlerin in cell culture and animal models of Parkinson's disease. *J Pharmacol Exp Ther* 322: 913-922.

Zhou L, Hossain MI, Yamazaki M, Abe M, Natsume R, Konno K, Kageyama S, Komatsu M, Watanabe M, Sakimura K y Takebayashi H (2018) Deletion of exons encoding carboxypeptidase domain of NNA1 results in Purkinje cell degeneration (PCD) phenotype. *J Neurochem* 147: 557-572.

Zuo D, Subjeck J y Wang XY (2016) Unfolding the role of large heat shock proteins: new insights and therapeutic implications. *Front Immunol* 7: 75.