



VNiVERSIDAD  
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



**La activación de la E3 Ubiquitina ligasa APC/C-Cdh1 es esencial para la supervivencia neuronal. Desarrollo de un modelo murino de neurodegeneración *in vivo*.**

Memoria presentada por Verónica Bobo Jiménez para optar al Título de Doctor

Directores:

Prof<sup>a</sup>. Dra. D<sup>a</sup>. Ángeles Almeida Parra

Prof. Dr. D. Juan Pedro Bolaños Hernández

2014

Ángeles Almeida Parra, Investigadora del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca y Profesora Asociada del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca y Juan Pedro Bolaños Hernández, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca.

AUTORIZAN:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "**La activación de la E3 Ubiquitina ligasa APC/C-Cdh1 es esencial para la supervivencia neuronal. Desarrollo de un modelo murino de neurodegeneración *in vivo***", que ha sido realizada bajo su dirección por la Licenciada en Biología Dña. Verónica Bobo Jiménez, en el Instituto de Biología Funcional y Genómica (IBFG) y en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca (USAL). En nuestra opinión, reúne todos los requisitos científicos y formales para ser defendida y optar al Título de Doctor.

Salamanca, a 31 de Enero de 2014



Fdo.: Ángeles Almeida Parra

Fdo.: Juan Pedro Bolaños Hernández

Parte de los resultados de esta Memoria han sido PRESENTADOS EN:

- *"23rd Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry ISN-ESN"*. Celebrado en Atenas, Grecia en Septiembre de 2011.  
Póster: Role of E3 Ubiquitin Ligase APC/C-Cdh1 in neuronal survival *in vivo*. Bobo-Jimenez, V.; García-Higuera, I.; Moreno, S.; Bolaños, J.P.; Almeida, A.
- *"XXXIII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular SEBBM"*. Celebrado en Córdoba, España en Septiembre de 2010.  
Póster: La E3 Ubiquitina Ligasa APC/C-Cdh1 es esencial para la supervivencia neuronal. Bobo-Jimenez, V.; García-Higuera, I.; Moreno, S.; Almeida, A.

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a:

- Beca del Plan de Formación de Personal Investigador (FPI). Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) asociada al proyecto SAF 2007-61492.
- Beca para Investigación de la Fundación privada Miguel Casado San José de Salamanca.
- Ayuda de la Red de Neurovascular RETIC RENEVAS RD06/0026/1008 del Instituto de Salud Carlos III.
- Ayuda Estancias Breves EEBB. Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN).
- Ayuda difusión de resultados. Agencia de Gestión de Investigación. Universidad de Salamanca (USAL).
- Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL).

# Abreviaturas

ADN:	Ácido desoxirribonucleico.
APC/C:	Complejo promotor de la anafase/ciclosoma.
ARN:	Ácido ribonucleico.
ARNi:	Ácido ribonucleico de interferencia.
ARNm:	Ácido ribonucleico mensajero.
ATP:	Adenosín <i>tri</i> -fosfato.
BCA:	Ácido bicinconínico.
BSA:	Albúmina sérica bovina.
CA:	<i>Cornu Ammonis</i> o cuerno de Amon.
CaMKII $\alpha$ :	Calcio Calmodulina kinasa II alfa.
CaMKII $\alpha$ -Cre:	Calcio Calmodulina kinasa II alfa recombinasa Cre.
Cb:	Cerebelo.
Cdks:	Kinasas dependientes de ciclinas.
CE:	Corteza entorrinal.
CGr:	Capa de las células granulares.
CKIs:	Inhibidores de kinasas dependientes de ciclinas.
CM:	Capa molecular o externa.
Cre:	Recombinasa Cre.
Cx:	Corteza cerebral.
DAPI:	<i>4',6-Diamidino-2-Phenylindole Dihydrochloride</i> .
dNTPs:	Desoxinucleótidos.
EDTA:	Ácido etileno <i>di</i> -amino <i>tetra</i> -acético.
GD:	Giro dentado.
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> :	Agua destilada.
H <sub>2</sub> O <sub>up</sub> :	Agua ultra pura MiliQ.
HRP:	Peroxidasa de rábano.
Hy:	Hipocampo.
Kb:	Kilobase.
KDa:	Kilodaltons.
KO:	<i>Knockout</i> .
LoxP:	<i>Locus of X-over P1</i> .
min:	Minutos.
nm:	Nanómetro.

P:	Días de vida postnatal.
pb:	Pares de bases.
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa.
PE:	Potencial evocado.
PES:	Potencial evocado somatosensorial.
PFA:	Paraformaldehído.
PM:	Peso molecular.
PSA:	Persulfato sódico de amonio.
RIPA:	<i>Radio immuno precipitation assay.</i>
rpm:	Revoluciones por minuto.
SAC:	<i>Spindle assembly checkpoint.</i>
SCF:	Skp1-Cul1-F-box.
SDS:	Dodecil sulfato sódico.
SN:	Sistema nervioso.
SNC:	Sistema nervioso central.
SNP:	Sistema nervioso periférico.
Sub:	Subículo.
TA:	Temperatura ambiente.
TAE:	Tampón Tris-acetato-etileno <i>di-amino tetra-acético.</i>
TBS:	Tampón Tris salino.
TEMED:	<i>Tetra-metil etileno di-amina.</i>
TF	Tampón fosfato.
TFS:	Tampón fosfato salino.
TPR:	Dominio <i>tetratrico peptide repeat.</i>
TTBS:	Tampón Tris salino con Tween-20.
UPS:	Sistema Ubiquitina Proteasoma.

# Índice

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1. Ciclo celular</b>	<b>3</b>
<b>1.1. Fases del ciclo celular</b>	<b>3</b>
<b>1.2. Regulación del ciclo celular</b>	<b>4</b>
1.2.1. Puntos de control o <i>checkpoints</i>	4
1.2.1.a. <i>Checkpoint</i> de daño al ADN	4
1) Transición G1/S	4
2) Intra S o de replicación	5
3) Transición G2/M	5
1.2.1.b. <i>Checkpoint</i> de huso mitótico	5
1.2.1.c. <i>Checkpoint</i> de antafase	5
1.2.2. Cdks	5
1.2.2.a. Reguladores positivos de las Cdks	6
1.2.2.a. Reguladores negativos de las Cdks	7
1.2.3. Sistema Ubiquitina Proteasoma	8
<b>2. APC/C</b>	<b>10</b>
<b>2.1. Estructura y composición</b>	<b>10</b>
<b>2.2. Cofactores</b>	<b>12</b>
<b>2.3. Reconocimiento de sustratos</b>	<b>14</b>
<b>2.4. APC/C y su relevancia en el ciclo celular</b>	<b>15</b>
2.4.1. Progresión de la mitosis	15
2.4.2. Mantenimiento de G0/G1	18
2.4.3. Acoplamiento con la fase S	18
2.4.4. Activación de APC/C en respuesta a daño en ADN	19
<b>2.5. Regulación de APC/C-Cdh1</b>	<b>20</b>
2.5.1. Regulación de la cantidad de proteína de Cdh1	20
2.5.2. Regulación por fosforilación de Cdh1	21
2.5.3. Principales inhibidores	22
1) Emi1	22
2) RASSF1A	22
3) Rae1-Nup98	23
<b>3. Sistema nervioso</b>	<b>23</b>
<b>3.1. Sistema nervioso central en ratón</b>	<b>23</b>
3.1.1. Médula espinal en el ratón	24
3.1.2. Encéfalo en el ratón	24
<b>3.2. Cerebelo</b>	<b>25</b>
3.2.1. Anatomía externa	26
3.2.2. Anatomía interna	26

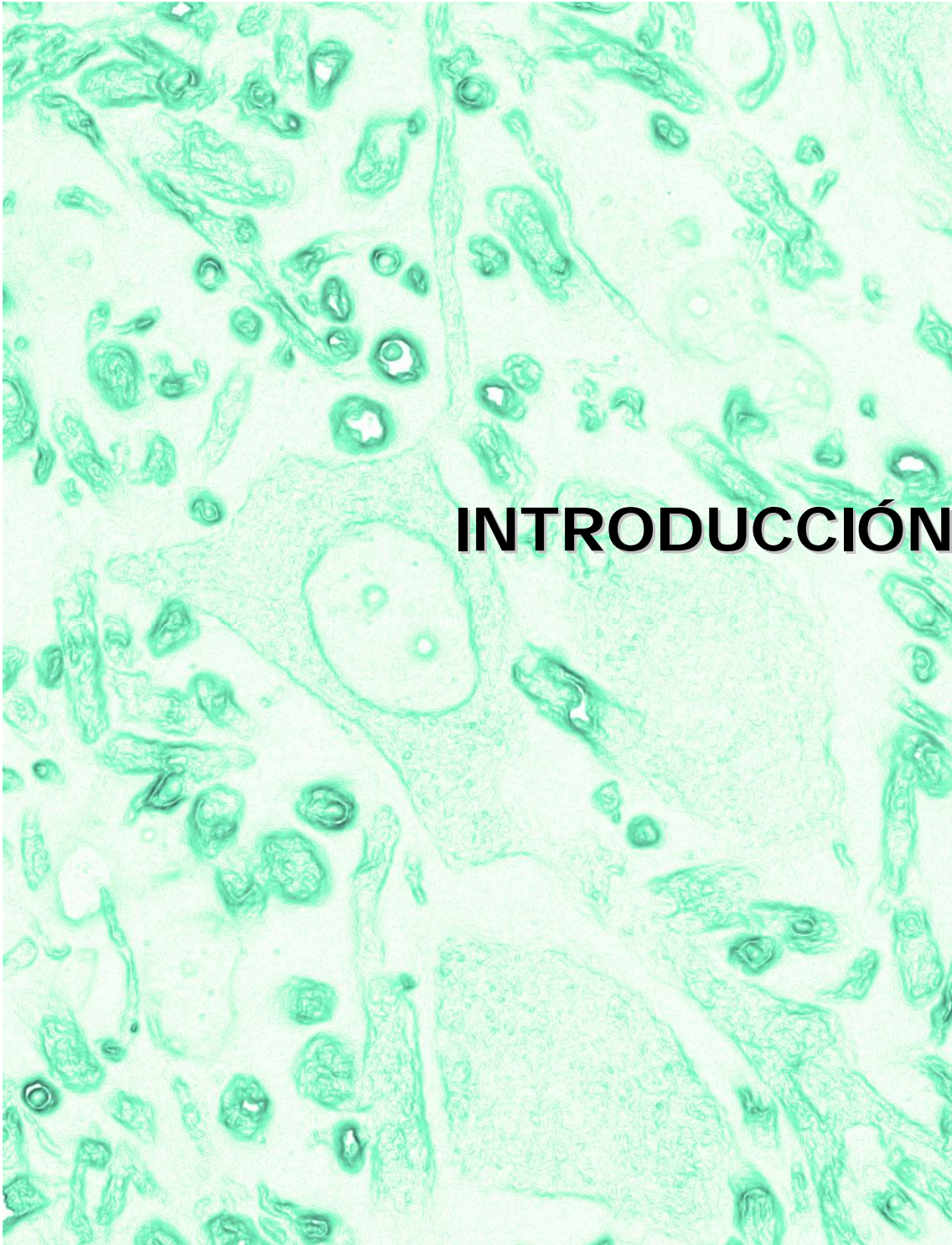
3.2.2.a. Organización estructural de la corteza cerebelosa	27
1) Capa molecular	27
2) Capa de las células de Purkinje	27
3) Capa de los granos	28
3.2.2.b. Interacciones sinápticas de la corteza cerebelosa	28
3.2.3. Función	29
<b>3.3. Hipocampo</b>	<b>29</b>
3.3.1. Anatomía externa	30
3.3.2. Anatomía interna	31
3.3.2.a. Giro dentado	31
1) Capa externa o molecular	31
2) Capa polimórfica o hilio	31
3) Capa de las células granulares	32
3.3.2.b. Subículo	32
3.3.2.c. Hipocampo	32
1) Capa de las células piramidales	33
2) Estrato <i>oriens</i>	34
3) Estrato <i>alveus</i>	34
4) Estrato lúcido	34
5) Estrato radiado o <i>radiatum</i>	34
6) Estrato molecular o <i>lacunosum</i>	34
3.3.3. Conectividad del hipocampo	34
3.3.4. Función	36
1) Inhibición de la conducta	37
2) Memoria	37
3) Percepción espacial	37
<b>3.4. Corteza cerebral</b>	<b>38</b>
3.4.1. Anatomía externa	38
3.4.2. Anatomía interna	39
3.4.2.a. Organización estructural de la corteza cerebral	39
1) Estrato plexiforme o molecular	40
2/3) Estrato subgranular piramidal	40
4) Estrato granular	41
5) Estrato piramidal profundo	41
6) Estrato polimórfico	41
7) Estrato subgriseo	42
3.4.3. Función	43
<b>4. Funciones de APC/C en el sistema nervioso</b>	<b>44</b>
<b>4.1. Diferenciación neuronal</b>	<b>44</b>
<b>4.2. Supervivencia neuronal</b>	<b>45</b>
<b>4.3. Glucolisis</b>	<b>47</b>

4.4. Sinapsis, memoria y aprendizaje	47
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>49</b>
1. Hipótesis	51
2. Objetivos	51
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>53</b>
1. Animales de experimentación	55
1.1. Extracción de ADN	56
1.2. Identificación genotípica de los animales	56
2. Obtención de tejido para Inmunohistoquímica	58
3. Secciones de tejido	59
4. Tinciones Inmunohistoquímicas	59
4.1. Inmunofluorescencia indirecta	59
4.1.1. Controles de la técnica Inmunohistoquímica	61
5. Técnica de TUNEL	61
5.1. Análisis cuantitativo de las neuronas positivas para TUNEL	62
6. Tinción de Nissl	62
7. Análisis de imágenes	62
8. Obtención de tejido para <i>Western Blot</i>	63
9. Cuantificación de la concentración de proteínas	64
10. Transferencia tipo <i>Western Blot</i>	64
10.1. Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE	64
10.2. Transferencia de proteínas	65
10.3. Inmunodetección de proteínas	65
10.4. Tinción de geles con azul de Coomassie	66
10.5. <i>Stripping</i> de membranas de nitrocelulosa	66
11. Estudio electrofisiológico	66
11.1. Potenciales evocados somatosensoriales	66
11.2. Metodología y registro	67
12. Equilibrio Motor	69
12.1. Rotarod	69
13. Pruebas de comportamiento, aprendizaje y memoria	69
13.1. Laberinto Lashley III	70
13.2. Laberinto radial de 8 brazos	72
13.3. Campo abierto	73
13.4. Tablero de agujeros	74
14. Análisis estadísticos	75
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>77</b>
1. Generación de un modelo de ratón deficiente de <i>Cdh1</i> en la corteza cerebral y el hipocampo durante el periodo adulto	79
2. La deficiencia de <i>Cdh1</i> reduce el espesor de la corteza cerebral y de la capa CA1 del hipocampo	80



3. La deficiencia de Cdh1 disminuye la longitud de las dendritas y reduce su arborización	92
4. La deficiencia de Cdh1 promueve la eliminación de sinapsis	104
5. Estudio neurofisiológico de los ratones deficientes de Cdh1 mediante potenciales evocados somatosensoriales	106
6. Cdh1 es esencial para la supervivencia neuronal <i>in vivo</i>	108
7. El silenciamiento de Cdh1 altera el comportamiento de los ratones. Efecto sobre el aprendizaje y la memoria	110
<b>7.1. Coordinación motora</b>	<b>110</b>
<b>7.2. Aprendizaje y memoria</b>	<b>111</b>
<b>7.3. Miedo y ansiedad</b>	<b>114</b>
8. El silenciamiento de Cdh1 incrementa los niveles de la subunidad GluR1 de los receptores AMPA	119
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>123</b>
1. Conclusiones	125
2. Conclusión final	125
<b>INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA</b>	<b>127</b>
1. Componentes celulares de la corteza cerebral	129
<b>1.1. Neuronas</b>	<b>129</b>
1) Neuronas Cajal-Retzius	129
2) Neuronas principales	129
3) Interneuronas	131
<b>APÉNDICES</b>	<b>133</b>
1. Productos químicos generales	135
2. Otros productos generales	138
3. Sistemas de inmunodetección en Inmunofluorescencia	138
<b>3.1. Anticuerpos primarios</b>	<b>138</b>
Anti- <i>Microtubule Associated Protein-2</i> (MAP2 2a+2b)	138
Anti-NeuN	139
Anti-Tubulina III beta o anti-Tuj1	139
Anti- <i>Vesicular Glutamate Transporter 1</i> (VGLUT1)	139
<b>3.2. Anticuerpos secundarios</b>	<b>140</b>
<b>3.3. Otros</b>	<b>140</b>
4. Sistemas de inmunodetección en <i>Western Blot</i>	140
<b>4.1. Anticuerpos primarios</b>	<b>140</b>
Anti-Calcio Calmodulina kinasas II $\alpha$	140
Anti-Caspasa 3 activa	141
Anti-Cdh1	141
Anti-Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)	141
Anti- <i>Glutamate Receptor 1</i> (GluR1)	141
Anti- <i>Glutamate Receptor 2</i> (GluR2)	142

Anti-Glutamate Receptor 3 (GluR3)	142
Anti-Glutamate Receptor ionotropic (NR2A y NR2B)	142
Anti-Microtubule Associated Protein-2 (MAP2 2a+2b)	142
Anti-NeuN	143
Anti-Post Synaptic Density (PSD-95)	143
Anti-Sinaptofisina (SYP)	143
Anti-Sinaptotagmina1 (SYT)	143
Anti-Vesicular Glutamate Transporter 1 (VGLUT1)	143
<b>4.2. Anticuerpos secundarios</b>	<b>144</b>
<b>5. Soluciones de uso común</b>	<b>145</b>
Fijador perfusión (Somogyi sin glutaraldehído)	145
Gel de acrilamida SDS-PAGE 8%	145
Mezcla congeladora para secciones	145
Mezcla de reacción para PCR	145
Solución crioprotectora para bloques de tejido	145
Solución para gelatinizar portaobjetos	146
Solución para permeabilizar TUNEL	146
Solución salina isotónica	146
Solución sobresaturada de ácido pícrico	146
Tampón de carga (6x) electroforesis en agarosa	146
Tampón de carga (2x) electroforesis <i>Western Blot</i>	146
Tampón de digestión para la extracción de ADN	146
Tampón de electroforesis (10x) <i>Western Blot</i>	146
Tampón de lisis RIPA	146
Tampón de transferencia (1x) <i>Western Blot</i>	146
Tampón fosfato (0,5 M) pH=7,4 a 25 °C	146
Tampón fosfato salino (1x) pH=7,4 a 25 °C	147
Tampón SSC (20x) pH=7 a 25 °C	147
Tampón Tris-HCl (0,5 M) pH=7,6 a 25 °C	147
Tampón Tris salino con Tween-20 pH=7,5 a 25 °C	147
Tampón TUNEL	147
<b>6. Aparataje</b>	<b>147</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>149</b>
1. Artículos científicos	151
2. Libros	168
3. Referencias electrónicas	169



# INTRODUCCIÓN

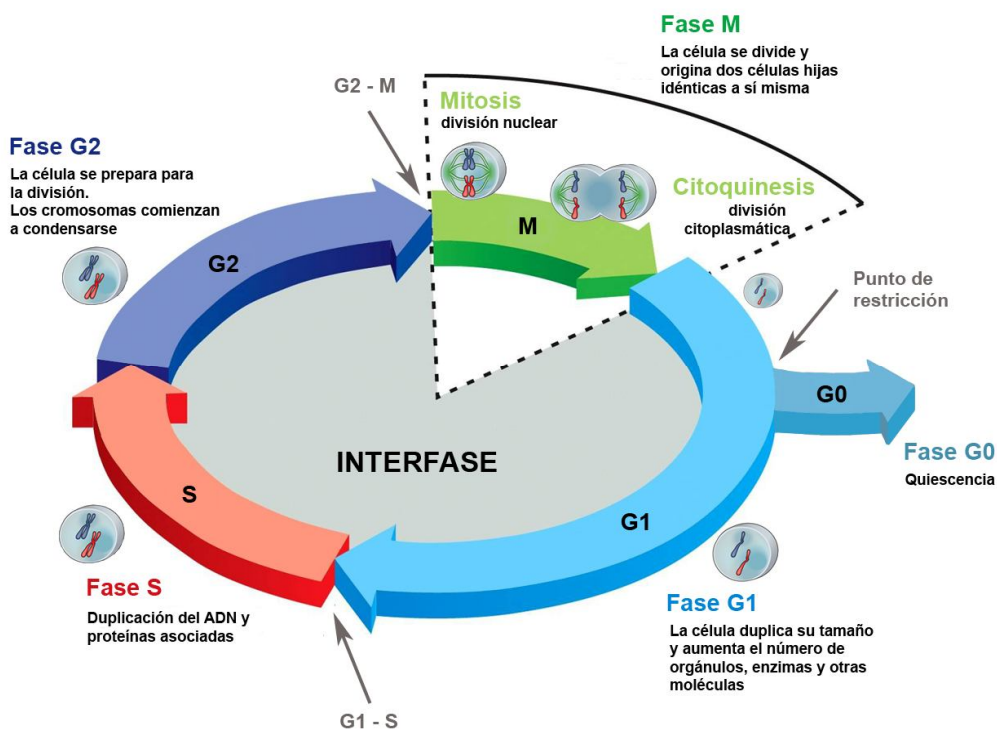
# 1. Ciclo celular

El ciclo celular es un proceso esencial para el desarrollo, la diferenciación y la proliferación de las células eucariotas, y se define como el conjunto de procesos por los que, a partir de una célula madre, se obtienen dos células hijas con la misma información genética. A lo largo del ciclo celular debe existir una coordinación entre el crecimiento de las células y su división.

La condición esencial para que ocurra la división celular es que la célula madre transmita adecuadamente su información genética a las dos células hijas. Para ello, el ácido desoxirribonucleico (ADN) ha de ser replicado de forma exacta y única en cada ciclo y las cromátidas hermanas obtenidas deben ser segregadas a cada una de las nuevas células, hecho que requiere cambios drásticos en la condensación del ADN y en la organización del citoesqueleto celular [Murray, 2004].

## 1.1. Fases del ciclo celular

Clásicamente, el ciclo celular eucariótico se divide en 4 fases:



Esquema 1. Esquema general del ciclo celular. El ciclo celular consta de 4 fases: G1, S, G2 y M. La fase S comienza al iniciarse la replicación del ADN. La entrada en fase M se caracteriza por la rotura de la envuelta nuclear y la condensación cromosómica, mientras que la segregación de cromátidas hermanas marca la transición metafase/anafase. Modificado de [Hochegger, 2008].

**Fase S:** Es la fase de replicación del ADN.

**Fase M:** Periodo en el que se produce la segregación cromosómica. Comprende: **mitosis** que es la división nuclear y **citoquinesis** que es la división celular propiamente dicha.

Fase **G1** y fase **G2**: (*gap* o intervalo), G1 conecta la fase M con el inicio de la fase S del ciclo siguiente, y G2 separa la fase S de la fase M posterior. Durante estos dos periodos la célula crece y además comprueba que los procesos ocurridos durante la fase anterior se han producido adecuadamente, en cuyo caso ocurre la transición a la siguiente fase del ciclo, de ahí la importancia de las transiciones G1/S y G2/M.

Al conjunto de las fases G1, S y G2 se le denomina **interfase** [Almeida, 2012].

La entrada de las células en un nuevo ciclo de división está determinada no sólo por la propia información interna de la célula sino por señales externas, aunque estas sólo afectan a la progresión del ciclo hasta un momento determinado de G1, conocido como **punto de restricción** o **punto R**, a partir del cual el control lo ejerce solamente la maquinaria del ciclo celular. En el punto R, las células pueden abandonar el ciclo, ya sea temporal o permanentemente, y entrar en una fase quiescente denominada **fase G0** (ver **esquema 1**) [Schneider, 1988].

## 1.2. Regulación del ciclo celular

### 1.2.1. Puntos de control o *checkpoints*

Los puntos de control del ciclo celular o *checkpoints*, son mecanismos que permiten asegurar la estabilidad, la correcta replicación y la distribución adecuada del material genético en las células. Estos *checkpoints* funcionan principalmente durante las transiciones G2/M y metafase/anafase. Su función consiste en verificar que se hayan completado correctamente y con precisión, procesos cruciales anteriores, como pueden ser la replicación y el anclaje de todos los cinetocoros al huso mitótico, antes de que se lleve a cabo la progresión a la siguiente fase del ciclo [Hartwell, 1989; Rieder, 1997; van Vugh, 2010].

Los principales checkpoints descritos en células de mamíferos son:

#### 1.2.1.a. Checkpoint de daño al ADN

Los cambios en la secuencia de ADN en la línea germinal, son esenciales para mantener la variabilidad genética y así poder asegurar la aparición de modificaciones que permiten una mejor adaptación al medio. Sin embargo, en la línea somática, los cambios genéticos son perjudiciales, y las células han desarrollado mecanismos de seguridad muy estrictos para detectar y corregir las posibles alteraciones que haya podido sufrir el ADN. Por todo ello, este *checkpoint* se pone en funcionamiento cuando se detectan alteraciones en la estructura normal de la cadena de ADN o roturas, con la finalidad de detener el ciclo celular y proceder a su reparación. De esta manera, se evita la transmisión de mutaciones a las células hijas, contribuyendo al mantenimiento de su estabilidad genómica [Cipressa, 2013; Furgason, 2013].

#### 1) Transición G1/S

Este *checkpoint* impide a la célula que se prepare para la replicación del ADN, hasta que se haya eliminado el daño detectado [Shiloh, 2003; Shiloh, 2013].

## **2) Intra S o de replicación**

En este caso, el *checkpoint* regula el programa temporal de los distintos orígenes de replicación, así como la tasa de elongación de las horquillas de replicación. Se activa en respuesta a problemas que afectan a la replicación o frente al daño sufrido el ADN durante la fase S. Normalmente este daño es producido por radiación ionizante o radiación ultravioleta [Abraham, 2001; Grallert, 2008].

## **3) Transición G2/M**

El *checkpoint* de G2/M evita que entren en mitosis células que han terminado la replicación de su ADN y, posteriormente, han sido expuestas a agentes que lo han dañado, o bien células que han traspasado el *checkpoint* Intra S con daño en el ADN sin reparar [Busby, 2000; Ciccia 2010].

### **1.2.1.b. Checkpoint de huso mitótico**

Este *checkpoint* asegura la correcta segregación cromosómica en mitosis, evitando así la aparición de aneuploidías. Controla los acontecimientos que tienen lugar desde la ruptura de la envuelta nuclear hasta la metafase tardía, asegurando que todos los cromosomas estén correctamente anclados al huso mitótico y alineados en la placa metafásica. La activación de este *checkpoint* provoca la parada del ciclo celular como consecuencia de la inhibición del Complejo Promotor de la Anafase/Ciclosoma o APC/C (*Anaphase Promoting Complex/Cyclosome*), del que hablaremos más adelante en profundidad [Musacchio, 2007; Silva, 2011].

### **1.2.1.c. Checkpoint de antefase**

Este mecanismo se pone en marcha cuando se detectan problemas en el ensamblaje del huso mitótico, frente a cambios en la topología de la cromatina, o cuando existe un estrés térmico u osmótico. Este *checkpoint* promueve la parada de las células en la denominada antefase, que se corresponde con un periodo al final de G2, que es anterior a los signos visibles de condensación cromosómica [Chin, 2010; Mikhailov, 2005].

## **1.2.2. Cdks**

Las kinasas dependientes de ciclinas o Cdks (*cyclin dependent kinases*) son moléculas heterodiméricas reguladoras cuya función es fosforilar residuos de serina y treonina de proteínas específicas. Según el modelo clásico, son las Cdks las que participan en la regulación del ciclo celular [Malumbres, 2005; Malumbres, 2009].

Las Cdks mantienen sus niveles proteicos constantes durante el ciclo celular a pesar de que su actividad fluctúa a lo largo del él. Estas proteínas están sometidas a una estricta regulación. Las Cdks por sí solas no tienen actividad kinasa, necesitan formar un complejo junto con una subunidad catalítica que es la ciclina, constituyendo lo que se conoce como **complejo Cdk-ciclina**. La actividad de los complejos Cdk-ciclina está regulada por la ubiquitinación y la posterior degradación proteolítica de las ciclinas, la presencia de inhibidores de Cdks o CKIs (*cyclin dependent kinase inhibitor*) y procesos de fosforilación y desfosforilación de las Cdks [Hochegger, 2008].

Hasta el momento hay descritas 12 Cdks: Cdk1 a Cdk12, que actúan en diferentes momentos del ciclo celular [Chen, 2006; Kimura, 2001; Kong, 2000].

En células de mamíferos se ha caracterizado que:

a) **Cdk4** y **Cdk6** forman complejos con la ciclina D y funcionan durante la transición G0/G1, fosforilando por ejemplo, a la proteína del retinoblastoma y activando así la expresión de genes necesarios para la entrada en la fase S [Hirai, 2005].

b) **Cdk2** puede unirse también a la ciclina D, pero más comúnmente se asocia con la ciclina A y la ciclina E, interviniendo en la fase S mediante el control de la síntesis de ADN [Nguyen, 2002].

c) **Cdk1** es necesaria para la entrada y la progresión por las primeras etapas de la mitosis. Cdk1 se une a las ciclinas mitóticas A y B, siendo el complejo Cdk1-ciclina B el más importante. Dicho complejo se activa rápidamente durante la mitosis y se asocia al huso mitótico en la metafase. La ciclina B se degrada en la transición de metafase/anafase [Malumbres, 2005; Malumbres, 2009].

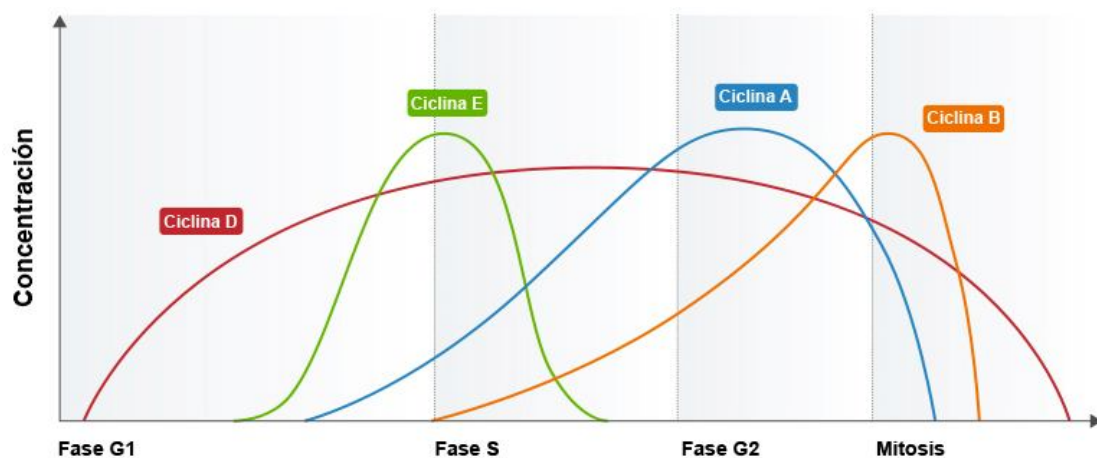
Sin embargo, no todas las ciclinas y Cdks funcionan como reguladoras del ciclo celular. Entre otras funciones, se encuentran la regulación de la transcripción, la reparación del ADN, la diferenciación y la apoptosis [Bouchoux, 2011; Enders, 2012; Wang, 2011].

### 1.2.2.a. Reguladores positivos de las Cdks

Los principales reguladores positivos de las Cdks son las **ciclinas**. Estas moléculas son proteínas sintetizadas durante la interfase y destruidas al final de la mitosis de cada ciclo [Haesslein, 2002; MacLachlan, 1995].

Se han descrito diversos tipos de ciclinas: A, B1, B2, B3, C, D1, D2, D3, E, F, G, H, I, K, L1, L2, T1 y T2. Todas ellas contienen un dominio relativamente conservado responsable de su unión a las Cdks [Malumbres, 2005].

Dependiendo de la fase del ciclo en la que aparecen y la Cdk a la que se unen, se distinguen cuatro tipos de ciclinas (ver **esquema 2**):



Esquema 2. Expresión de las diferentes ciclinas a lo largo del ciclo celular. Modificado de [Bardin, 2001].

a) **Ciclinas de G1**: Promueven el paso por el punto de restricción, lo que conlleva la entrada de la célula en un nuevo ciclo celular. Son las ciclinas D, que se asocian a Cdk4 y Cdk6 durante G1.

b) **Ciclinas G1-S**: La ciclina E asociada a Cdk2, que es requerida para el inicio de la replicación del ADN.

c) **Ciclinas de fase S**: Permiten la progresión por la fase S. Ciclina A, que se asocia a Cdk2 y Cdk1.

d) **Ciclinas mitóticas**: Son responsables de la mitosis. La ciclina A y, sobre todo, las ciclinas B cuando se asocian a Cdk1 [McCollum, 2001; Niehrs, 2012].

Las Cdks pueden ser también activadas por otras proteínas que no son las ciclinas. Estos reguladores positivos son:

a) Las proteínas de la **familia RINGO/Speedy**, que pueden unirse y activar directamente Cdk1 y Cdk2 [Chauhan, 2012; Nebreda, 2006].

b) Las denominadas **ciclinas virales**. Los virus del herpes y otro tipo de virus, contienen una proteína que comparte de manera modesta, una pequeña secuencia con las ciclinas celulares, esta secuencia se encuentra en la región *cyclin box*. Una de las ciclinas virales mejor caracterizada es la ciclina K, presente en el sarcoma de Kaposi o HSKV (*Kaposi's sarcoma herpes virus*), que comparte una similitud del 30% con la ciclina D2 y forma complejos activos con Cdk4 y Cdk6 [Laman, 2000; Mittnacht, 2000].

c) **Activadores específicos de Cdk5**. Cdk5 es estructuralmente similar al resto de Cdks, sin embargo, sus funciones y su regulación es diferente con respecto a las Cdks tradicionales. Aunque se expresa en varios tejidos, su actividad kinasa se detecta principalmente en neuronas postmitóticas, coincidiendo con el patrón de expresión de sus activadores [Liebl, 2011; Maestre, 2008]. La actividad de Cdk5 requiere la asociación de sus activadores específicos p35 y p39 [Arif, 2012; Hisanaga, 2010].

### 1.2.2.b. Reguladores negativos de las Cdks

Las proteínas CKIs están implicadas en la parada del ciclo celular producida en respuesta a señales intrínsecas y/o extrínsecas al propio ciclo, como las relacionadas con procesos de senescencia, inhibición por contacto o activación de un *checkpoint*, o como respuesta a señales antiproliferativas, como puede ser el mantenimiento en fase quiescente de los progenitores neurales, la privación de factores de crecimiento o citoquinas [Martin, 2005; Nixon, 2005].

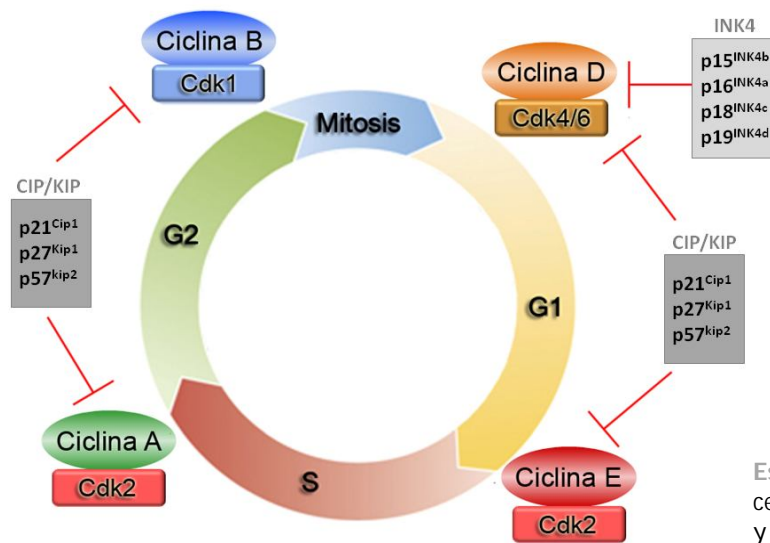
En células de mamíferos se han descrito dos familias de CKIs (ver **esquema 3**):

a) **La familia CIP/KIP** (*kinase inhibitor protein*) incluye tres proteínas estructuralmente relacionadas entre sí, p21<sup>Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> y p57<sup>Kip2</sup>. Estas proteínas presentan una especificidad más amplia, que los miembros de la otra familia de CKIs, porque interactúan con la actividad kinasa de los complejos Cdk2-ciclina E, Cdk2-ciclina A, Cdk1-ciclina A, Cdk1-ciclina B y, posiblemente, Cdk4-ciclina D y Cdk6-ciclina D inhibiéndolos [Besson, 2008; Ullah, 2009].

b) **La familia INK4** (*inhibitor of Cdk4*) incluye a p15<sup>INK4b</sup>, p16<sup>INK4a</sup>, p18<sup>INK4c</sup> y p19<sup>INK4d</sup>. Los miembros de la familia INK4 bloquean la progresión del ciclo celular ya que se unen específicamente a Cdk4 y Cdk6 cuando se encuentran en forma de monómeros y así inhiben la acción de la ciclina D. Las proteínas de esta familia comparten una estructura similar dominada por varias repeticiones de anquirina. Los



miembros de la familia INK4 se expresan de manera diferencial durante el desarrollo del ratón [Canepa, 2007].



Esquema 3. Esquema del ciclo celular. Complejos Cdk-ciclina y sus inhibidores [Lim, 2013].

### 1.2.3. Sistema Ubiquitina Proteasoma

La progresión a través del ciclo celular está controlada por la degradación de las proteínas del propio ciclo. Este control es ejecutado por el Sistema Ubiquitina Proteasoma (UPS). El UPS regula la ubiquitinación, y por lo tanto la degradación de muchos sustratos que son poliubiquitinados y reconocidos por el Proteasoma 26S. Comprende una serie secuencial de procesos enzimáticos utilizando cuatro familias de enzimas: **a) Ubiquitinas E1** o Ubiquitinas activadoras que son dependientes de energía, **b) Ubiquitinas E2** o Ubiquitinas de conjugación, **c) Ubiquitinas E3** o Ubiquitinas ligasas [Hershko, 1998] y **d) Ubiquitinas E4** o factores de ensamblaje de la cadena de Ubiquitina [Micel, 2013].

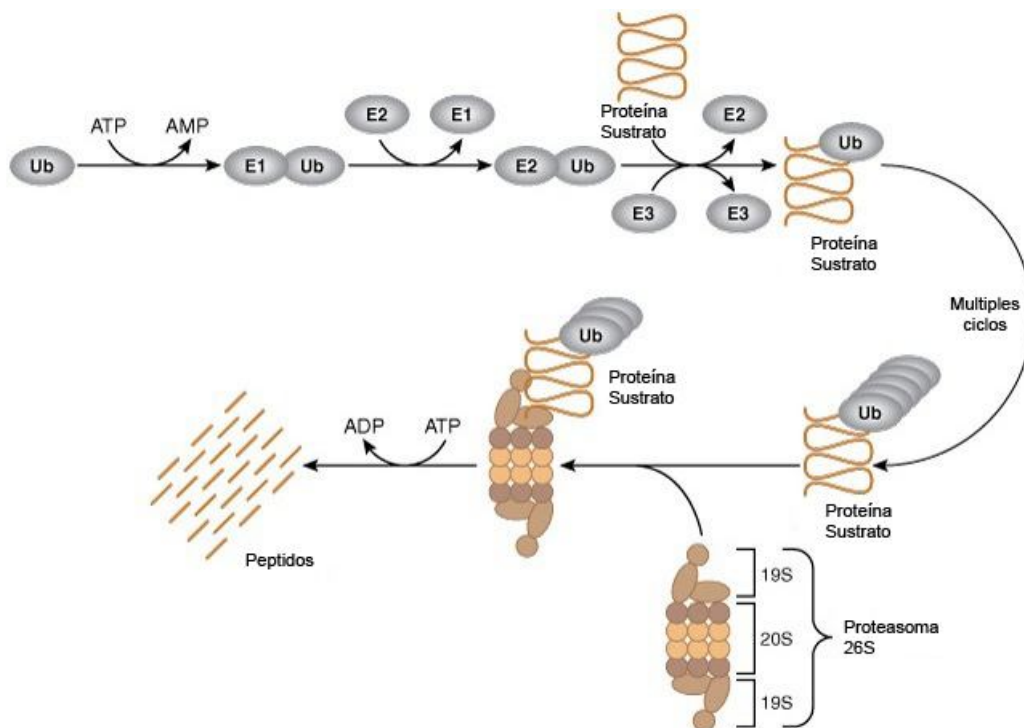
La vía del UPS está constituida por una serie de pasos, en los que intervienen las familias de Ubiquitinas anteriormente explicadas. En primer lugar, la *E1 Ubiquitina* activa a la Ubiquitina mediante la formación de un enlace tio-éster de alta energía entre un residuo de cisteína de su sitio activo y el residuo de glicina del extremo carboxilo-terminal de la Ubiquitina, que conlleva el consumo de una molécula de adenosín trifosfato (ATP). Esta reacción permite que la Ubiquitina activada se transfiera a un residuo de cisteína del sitio activo de la *Ubiquitina E2*, formándose un nuevo enlace tio-éster. A continuación, la Ubiquitina se acopla al grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de lisina de la proteína a diana, a través de un enlace isopeptídico, gracias al proceso mediado conjuntamente por la Ubiquitina E2 y la *Ubiquitina E3*, quien confiere especificidad de sustrato. Las E3 ligasas, pueden ser monoméricas o pueden estar formadas por varias subunidades. En algunos casos, los dominios de unión a Ubiquitina residen en polipéptidos que son atraídos por proteínas adaptadoras o *cullins*.

La elongación de las cadenas de Ubiquitina se consigue gracias a las E4 Ubiquitinas mediante el establecimiento de un enlace isopeptídico entre el residuo de glicina carboxilo-terminal de la Ubiquitina, con el grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de lisina de la Ubiquitina anterior. Dado que cada molécula de ubiquitina contiene siete residuos de lisina, se puede generar una gran variedad de cadenas de poliubiquitina

desde el punto de vista morfológico, con distintas funciones celulares [Corn, 2007; Hammond-Martel, 2012; Proctor, 2007].

Para que el Proteasoma pueda reconocer las cadenas de poliubiquitina, éstas deben tener una longitud mínima de cuatro moléculas, aunque algunos sustratos presentan cadenas mucho más largas [Hanna, 2007]. Esto implica que la E3 debe permanecer unida al sustrato, el tiempo suficiente para procesarlo varias veces, o bien, que necesita varios encuentros sucesivos con éste, antes de marcarlo para su destrucción. Por ello, tanto la actividad de la E3 como su capacidad para reconocer sustratos, resultan factores limitantes del proceso de poliubiquitinación, aunque no son los únicos, pues también influye la actividad de las enzimas desubiquitinantes (DUBs), las cuales revierten el efecto de las E3 [van Leuken, 2008].

El resultado final es que, la proteína que ha sido poliubiquitinada es degradada por el Proteasoma 26S (ver **esquema 4**).



**Esquema 4.** Esquema general de los pasos de la vía de funcionamiento del UPS. Modificado de [http://www.cellsignal.com].

Las E3 Ubiquitina ligasas se clasifican en cuatro clases principales, en función del motivo estructural que las caracteriza: **a) HECT**, **b) cullin RING-finger**, **c) U-box** y **d) PHD-finger** [Teixeira, 2013]. Las *cullin RING-finger* poseen un dominio formado por entre 40 y 100 aminoácidos con 8 residuos de cisteína e histidina muy conservados que coordinan dos átomos de zinc, formando una estructura en dedo de zinc [Sun, 2009].

La especificidad del UPS viene dada por la familia de E3 Ubiquitina ligasas *cullin RING-finger*, que constituye una de las mayores clases de E3 Ubiquitina ligasas y es esencial para el mantenimiento y la integridad genómica y la homeostasis celular [Chew, 2007; Lipkowitz, 2011].

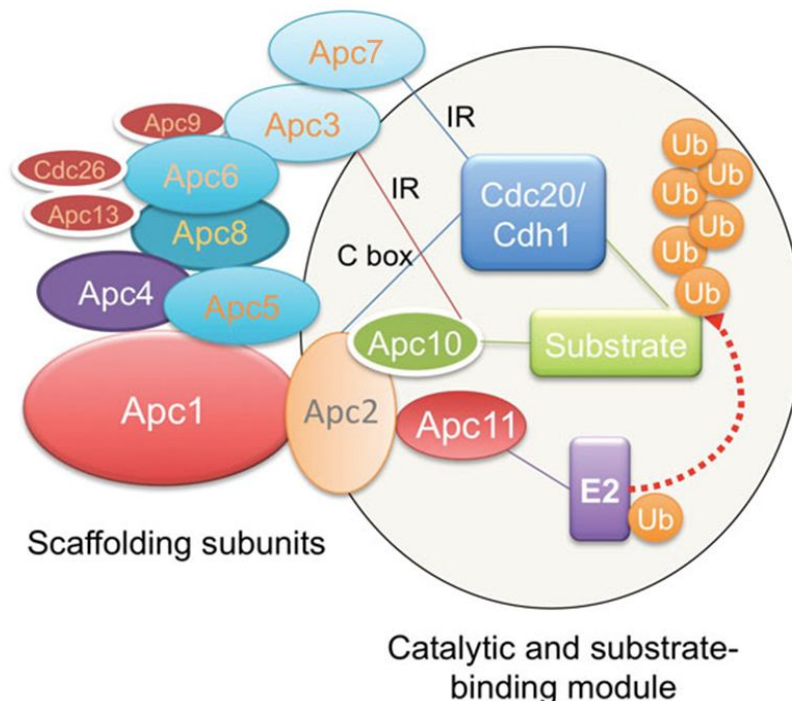
Dos de los miembros más importantes de la familia *cullin RING-finger* son la proteína **Skp1-Cul1-F-box** o **SCF** y el **Complejo Promotor de la Anafase/Ciclosoma** (*Anaphase Promoting Complex/Cyclosome*), también conocido como **APC/C**; ambos son los responsables de marcar las proteínas del ciclo celular para su posterior degradación. SCF es capaz de ubiquitinar sustratos desde el final de la fase G1 hasta el inicio de la fase M, mientras que APC/C es activo desde la mitosis hasta el final de la fase G1 del ciclo celular [Moncada, 2012; Nakayama, 2005; Nakayama, 2006; Song, 2011].

## 2. APC/C

APC/C es un complejo mutiprotéico dotado con propiedades reguladoras, catalíticas y de especificidad. Por medio de la ubiquitinación de una amplia gama de proteínas mitóticas, APC/C es capaz de controlar los procesos del ciclo celular que son responsables de la segregación de las cromátidas en la anafase, la finalización de la mitosis y el establecimiento y mantenimiento de la fase G1 [Barford, 2011; Eguren, 2011; Peters, 1999; Peters, 2006; Schreiber, 2011].

### 2.1. Estructura y composición

APC/C es un miembro de la familia *cullin RING-finger* inusualmente grande formado por 13 proteínas diferentes (ver [esquema 5](#)).



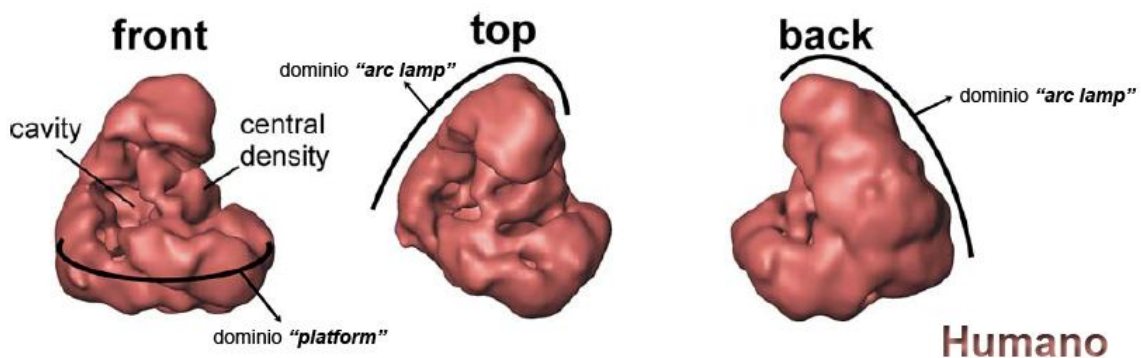
Esquema 5. Esquema estructural de las 13 subunidades diferentes que constituyen el complejo APC/C. Podemos observar que Apc2, Apc10 y Apc11 son subunidades catalíticas y el resto son subunidades de sujeción o ensamblaje. Modificado de [Acquaviva, 2006].

De entre las 13 subunidades, las mejores caracterizadas son: **Apc2** y **Apc11** que son las principales responsables de la actividad catalítica. Apc11 contiene un dominio *ring H2 finger* e interactúa directamente con la enzima E2 Ubiquitina, mientras que la subunidad Apc2 interactúa con su dominio *cullin*, formando un ensamblaje para una mejor conexión entre Apc11 y la enzima [Chang, 2004; da Fonseca, 2011; Fry, 2006; Leverson, 2000; Tang, 2001]. Algunos autores han descrito que Apc11, por sí misma, es capaz de poliubiquitar *in vitro*, aunque con menor especificidad de sustrato [Acquaviva, 2006].

**Apc3 (Cdc27), Apc6 (Cdc16), Apc7 y Apc8 (Cdc23)** poseen lo que se conoce como dominio *TetratricoPeptide Repeat* o TPR, que consiste en la repetición de una secuencia de 34 aminoácidos, que se pliega en una estructura en hélice y es capaz de mediar interacciones entre proteínas. Para que se produzca la activación de APC/C y se lleve a cabo la progresión de la mitosis, se requiere la fosforilación de estas cuatro subunidades [Baker, 2007; Blatch, 1999; Das, 1998; Kraft, 2003; Wang, 2009].

**Apc10 (Doc1)** contiene un dominio *Doc*, este dominio está también presente en otras proteínas de la vía del UPS. Apc10 no es imprescindible para la interacción con otras subunidades de APC/C, a pesar de unir directamente Apc3 (Cdc27), Apc7 y Apc11. Algunos autores han observado que mutaciones en esta subunidad previenen el reconocimiento de sustratos por parte de APC/C-Cdh1 [Carroll, 2002; Carroll, 2005; Passmore, 2003]. Tanto Apc10 como Cdh1 están implicadas en el reconocimiento de sustratos, y su proximidad a Apc2, Apc11 y a la E2 Ubiquitina es importante para que se lleve a cabo la reacción de ubiquitinación [Acquaviva, 2006; Thornton, 2006].

Algunas subunidades podrían tener un papel meramente estructural. **Apc4** y **Apc5** se unen a Apc2 y Apc11, y se piensa que median la interacción de estas proteínas con las subunidades que contienen el dominio TPR. [Vodermaier, 2003]. **Apc9** (en levaduras), **Cdc26** y **Apc13** parecen ser necesarias para la estructura y estabilidad de APC/C. Aunque Apc13 se une a Apc5 y Apc8 (Cdc23), es una subunidad inusual ya que parece proporcionar una función esencial y específica en meiosis, con lo cual, su papel meramente estructural está actualmente en controversia [Passmore, 2003; Peters, 2006].



Esquema 6. Esquema de la estructura del modelo tridimensional de APC/C en humanos. Se observan los dos dominios importantes, "platform" y "arc lamp" Modificado de [Dube, 2005].

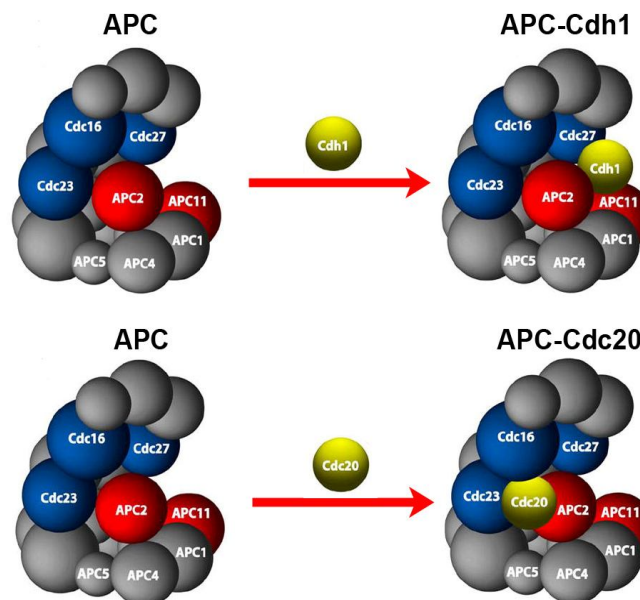
Gieffers y colaboradores describieron en 2001 que APC/C puede presentar dos o tres copias de cada subunidad, excepto de **Apc1**, que actuaría como un gran soporte

de todas las demás [Gieffers, 2001]. El grupo de investigación de Passmore, encontró dos especies con diferentes coeficientes de sedimentación (25S y 36S) que presentan formas de APC/C monoméricas y diméricas respectivamente. La forma dimérica permite la formación de cadenas de poliubiquitina con una eficacia 7 veces mayor que la forma monomérica [Passmore, 2005; Peters, 2006]. Más adelante, en 2005, Dube y colaboradores propusieron un modelo tridimensional de APC/C. En los vertebrados, según este modelo se distinguen dos grandes dominios, el dominio *platform* y el dominio *arc lamp*, ambos dominios presentan una gran flexibilidad uno respecto al otro (ver [esquema 6](#)). Estos autores observaron que, la asociación de Cdh1, provoca un cambio en las posiciones relativas de los dominios, lo que sugiere que la unión de los cofactores induce cambios conformacionales en la estructura de APC/C [Dube, 2005].

Recientemente, se ha identificado la subunidad **Apc15**. Es una APC/C humana, que es requerida para la liberación de Cdc20. Este cofactor es secuestrado por tres componentes Mad2, Mad3/BubR1, y Bub3 (MCC), estos componentes forman parte del *spindle assembly checkpoint* (SAC) que es esencial durante la segregación cromosómica cuando los cinetocoros no están unidos. Al secuestrar Cdc20, APC/C se inactiva [Mansfeld, 2011]. Esta subunidad es equivalente a la subunidad Mnd2 de las levaduras [Foster, 2012].

## 2.2. Cofactores

APC/C puede interactuar con varias E2 Ubiquitinas, sin embargo, la actividad principal de este complejo en las células depende de su unión a cofactores o coactivadores, los cuales se unen al complejo durante periodos específicos del ciclo celular. Estos cofactores son **Cdc20** (*cell division cycle 20*) y **Cdh1** (ver [esquema 7](#)) [Peters, 2006].



Esquema 7. Esquema de la unión de APC/C con cada uno de sus sustratos. Modificado de [Yang, 2010].

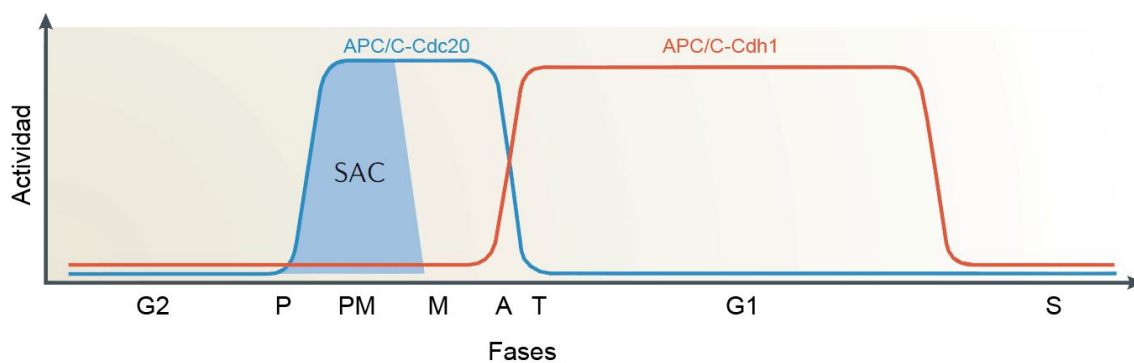
Ambas proteínas se caracterizan por presentar tres elementos en su secuencia:

a) **El motivo IR** (dipéptido isoleucina-arginina) situado en el extremo carboxilo-terminal, que media la unión con APC/C.

b) **La secuencia C-box** situada en el extremo amino-terminal. Los humanos, a diferencia de las levaduras, no necesitan la C-box para la asociación de APC/C con sus cofactores, sin embargo se piensa que interviene en el reconocimiento de sustratos.

c) **El dominio WD40** situado en el extremo carboxilo-terminal. Este dominio está compuesto por repeticiones de 40 aminoácidos que contienen residuos de triptófano y aspártico en posiciones conservadas. Generalmente, siete repeticiones WD40 se pliegan en una estructura con forma de hélice. Se piensa que este dominio es el responsable de reconocer a los sustratos de APC/C, al interactuar con unas secuencias consenso presentes en ellos, denominadas D-box y KEN-box [Peters, 2006].

Los dos cofactores de APC/C están estrictamente regulados por fosforilación. Cdc20 se transcribe y se sintetiza en la interfase, sin embargo, sólo puede interactuar con APC/C de forma eficaz en la fase M, cuando algunas subunidades de APC/C son fosforiladas por kinasas mitóticas, incluyendo Cdk1-ciclina B y Plk1 [Eckerdt, 2006]. Por el contrario, Cdh1 no puede unirse a APC/C en las fases S, G2 y M, debido a su fosforilación por los complejos Cdk-ciclina. Sólo cuando las células son capaces de salir de la fase M, y la actividad de las Cdk permite la desfosforilación, Cdh1 forma un complejo activo con APC/C y facilita las reacciones de ubiquitinación de los sustratos durante la fase G1 [Kramer, 2000; McLean, 2011]. La oscilación entre la actividad de APC/C-Cdc20 y la actividad de APC/C-Cdh1, sirve como uno de los principales mecanismos para la regulación del ciclo celular [van Leuken, 2008].



**Esquema 8.** Activación de APC/C por Cdc20 y Cdh1 durante el ciclo celular. La unión de APC/C-Cdc20 comienza en la profase. La degradación de la ciclina A se da en la prometafase. La proteólisis de la ciclina B también depende de APC/C-Cdc20 y se lleva a cabo en la metafase. Durante la anafase y la telofase, APC/C-Cdh1 se activa y contribuye a la degradación de la ciclina B y de Cdc20, de tal manera que APC/C-Cdc20 se inactiva. En la fase G1, APC/C-Cdh1 media la destrucción de la enzima UbcH10, permitiendo la acumulación de ciclina A y la posterior inactivación de APC/C-Cdh1 en la transición de G1 a la fase S. Modificado de [Peters, 2006].

La elevada actividad de Cdk1, promueve la unión APC/C-Cdc20 durante la fase M y lleva a la disminución de los niveles de ciclina B. La activación de las fosfatasa, junto con la disminución de la actividad kinasa, al final de la fase M, permite la formación del complejo APC/C-Cdh1 y, en consecuencia, se degrada Cdc20. El rápido e irreversible interruptor entre Cdc20 y Cdh1 en la salida de la fase M, no sólo se atribuye a la disminución repentina de la actividad kinasa de Cdk1-ciclina B,

sino también a la degradación de Cdc20 por parte de APC/C-Cdh1 al comienzo de la fase G1 (ver [esquema 8](#)) [Peters, 2006].

Estudios recientes han revelado que estos cofactores también promueven la actividad ligasa intrínseca de APC/C, probablemente mediante la activación de un cambio conformacional de la E3 ligasa [Dube, 2005].

UbcH5 y UbcH10, también conocidas como UbcX o E2-C en otras especies, son dos E2 Ubiquitinas que colaboran con APC/C y de forma independiente apoyan a la actividad ligasa del complejo *in vitro*. Se ha descrito que UbcH5 puede ser capaz de ubiquitinar a varias E3, mientras, que por el contrario, UbcH10 ubiquitina exclusivamente a APC/C. El extremo N-terminal de UbcH10 desempeña un papel regulador en la restricción de la APC/C, además de facilitar las reacciones de ligación. Cuando la proteína UbcH10 tiene mutado el extremo N-terminal, las reacciones de ubiquitinación son más resistentes a los inhibidores de APC/C [Aristarkhou, 1996].

### 2.3. Reconocimiento de sustratos

Ciertas secuencias de aminoácidos o motivos de degradación, están presentes en los sustratos de APC/C y desempeñan un papel muy importante para su reconocimiento.

El primer motivo que se describió fue la **D-box** (*destruction box*), compuesta por la secuencia consenso RxxLxxxxN/D/E que inicialmente se identificó en la ciclina B1. Se suele encontrar en regiones no plegadas de la proteína, en la mayoría de sustratos de APC/C [Glotzer, 1991; Pflieger, 2001]. La ubiquitinación múltiple de residuos de lisina en los sustratos de APC/C sucede al azar. Esta idea concuerda con el planteamiento de que la secuencia D-box funciona como un motivo de reconocimiento que ubiquitina cualquier residuo de lisina que se quede expuesto al sitio activo de APC/C. La flexibilidad en la región que rodea a la D-box facilita la adición de cadenas de poliubiquitina, y aunque por sí misma no es suficiente, para inactivar a una proteína ésta necesita ser degradada por el proteasoma [Yamano, 1998].

Otra secuencia de degradación es la **KEN-box**, cuya secuencia consenso se define como KENxxxD/E/S/G. Esta secuencia se caracterizó por primera vez en Cdc20, sin embargo, también está presente en muchos sustratos de APC/C, incluyendo Aurora A y PIK1 [Burton, 2001; Pflieger, 2000].

Así, ambas secuencias de degradación (D-box y KEN-box) son reconocidas por el dominio WD40 de los cofactores Cdc20 y Cdh1. De hecho, en un principio se propuso que la secuencia D-box era reconocida por APC/C-Cdc20 y que la secuencia KEN-box era reconocida por APC/C-Cdh1, sin embargo estudios recientes han demostrado que ambos motivos pueden ser utilizados eficientemente por los dos cofactores para llevar a cabo la ubiquitinación de los sustratos [Castro, 2003].

A medida que se caracterizan más sustratos de APC/C, se encuentran nuevos motivos de destrucción, normalmente localizados en los extremos amino o carboxilo de las proteínas. Además de las dos secuencias anteriormente mencionadas, se han descrito otros motivos: **A-box**, **CRY-box**, **GxEn-box**, **TEK-box** y **U-box**, pero la mayoría son relativamente poco conocidos en la actualidad [Hatakeyama, 2001; Littlepage, 2002]. Por ejemplo, podemos citar que, la destrucción de Cdc20 por parte de Cdh1, además de la KEN-box, depende de la CRY-box (CRYxPS) [Castro, 2003] o que la

proteína Aurora A posee además de D-*box* y KEN-*box*, un nuevo motivo al que da nombre, la A-*box* (RxLxPSN) [Littlepage, 2002].

## 2.4. APC/C y su relevancia en el ciclo celular

La actividad de APC/C está estrictamente regulada a lo largo del ciclo celular y ocurre, a través de la combinación de la actividad de los cofactores, proteínas y complejos inhibidores y la fosforilación reversible [Eguren, 2011; Peters, 2006; Thornton, 2006]. APC/C requiere, para ser activo, de la unión de al menos, uno de los dos dominios WD40 de los cofactores Cdc20 o Cdh1, que participan en el reconocimiento de sustratos. Además, los cofactores interactúan de manera muy dinámica con el dominio TPR de Apc3 y puede facilitar la unión con los sustratos a través de los dominios WD40 o mejorar la actividad específica de APC/C [Barford, 2011; da Fonseca, 2011]. La activación de APC/C, mediante su unión al cofactor Cdc20 o al cofactor Cdh1, se regula por mecanismos de fosforilación de manera opuesta [Almeida, 2012].

Al comienzo de la mitosis, los complejos de Cdk-ciclinas fosforilan algunas subunidades del complejo APC/C y ello promueve la unión del cofactor Cdc20 con el complejo. De esta manera, APC/C-Cdc20 inicia una secuencia de degradación de las ciclinas mitóticas que provoca una disminución de la actividad Cdk, lo que conlleva la iniciación de la anafase. Por el contrario, la fosforilación de Cdh1 por parte de las Cdk durante la fase S, la fase G2 y la mitosis, inhibe su unión a APC/C. Durante la salida de la mitosis se produce una inactivación de las Cdk y una posterior activación de las fosfatasas, permitiendo que Cdh1 se desfosforile y así se active el complejo APC/C-Cdh1. A su vez, APC/C-Cdh1 ubiquitina a Cdc20, evitando la activación simultánea de APC/C con sus dos cofactores. APC/C-Cdh1 también se encarga de destruir las ciclinas mitóticas A y B, completando la inactivación de Cdk1. Hay que tener en cuenta que la ciclina B1 se degrada en dos fases que están reguladas de forma secuencial por APC/C-Cdc20 y APC/C-Cdh1. Durante la mitosis temprana Cdc20 activa a APC/C, mientras que a finales de la mitosis APC/C-Cdh1 está activo y controla la salida de la mitosis y el mantenimiento de la fase G1, regulando así el inicio de la replicación de ADN [Almeida, 2012; Li, 2009].

En resumen, la actividad de APC/C oscila a lo largo del ciclo celular, siendo baja durante las fases S y G2 y alta durante la fase G1 y la mitosis. Estas oscilaciones van a ser en gran parte responsables de la progresión del ciclo celular.

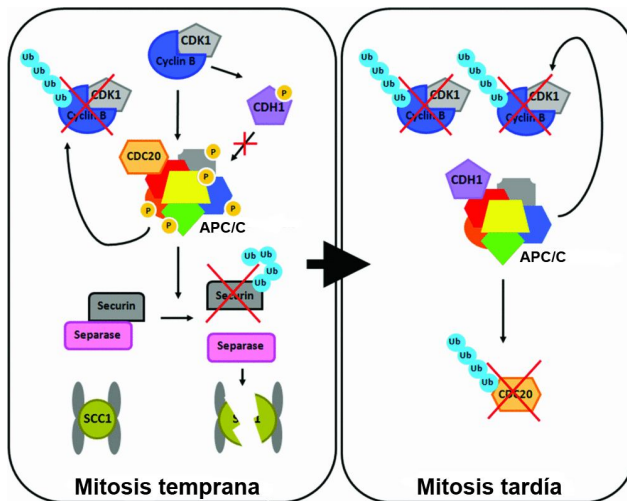
### 2.4.1. Progresión de la mitosis

La actividad Cdk es la que se encarga de dirigir el ciclo celular hasta la metafase, sin embargo, a partir de ese momento el control del ciclo celular está a cargo del complejo APC/C, que promueve la transición a la anafase y favorece la salida de mitosis. La función de APC/C es esencial en mitosis y se ha demostrado que la inactivación genética del complejo es letal en todas las especies estudiadas desde levaduras a ratones [García-Higuera, 2008].

Las principales dianas de APC/C durante la mitosis son las ciclinas mitóticas (ciclinas A y B) y la Securina. La Securina es un inhibidor de la Separasa que es una proteasa. Cuando el Proteasoma degrada a la Securina, se activa la Separasa (ver esquema 9). Debemos tener en cuenta, que la Separasa también permanece inhibida



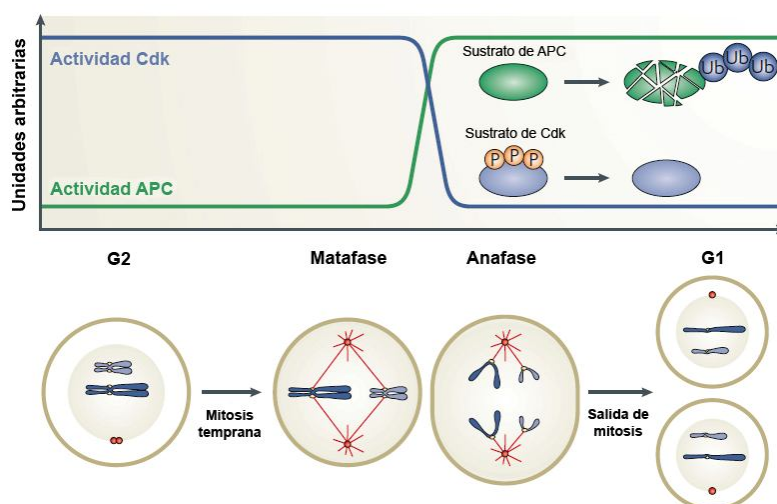
por fosforilación mediada por las Cdk1 y por la unión al complejo Cdk1-ciclina B, de tal forma que la degradación de las ciclinas mitóticas también contribuye a su activación. Una vez que está activa, la Separasa rompe la Cohesina, que es la encargada de mantener unidas las cromátidas hermanas y al romperla se inicia la segregación cromosómica en la anafase [Gorr, 2006; Stemmann, 2006].



**Esquema 9.** Durante la mitosis temprana se activa el complejo Cdk1-ciclina B que fosforila a Cdh1, previniendo su unión con APC/C. Al mismo tiempo APC/C-Cdc20 ubiquitina y degrada varios complejos, entre ellos, la Securina, un inhibidor de la Separasa. Durante la mitosis tardía se reduce la actividad del complejo Cdk1-ciclina B, favoreciendo la unión de APC/C-Cdh1. Modificado de [http://www.bioscirep.org].

La degradación de las ciclinas mitóticas provoca la inactivación de las Cdk1 y esto permite que las fosfatasas desfosforilen a los sustratos de las Cdk1, que es esencial para que se produzca el correcto movimiento del huso mitótico y de los cromosomas en la anafase, así como para que se lleven a cabo el desensamblaje del huso mitótico, la descondensación de la cromatina y el ensamblaje de la envuelta nuclear durante la telofase posterior [Li, 2009].

Principalmente existen dos mecanismos que gobiernan las últimas etapas de la mitosis (ver **esquema 10**):

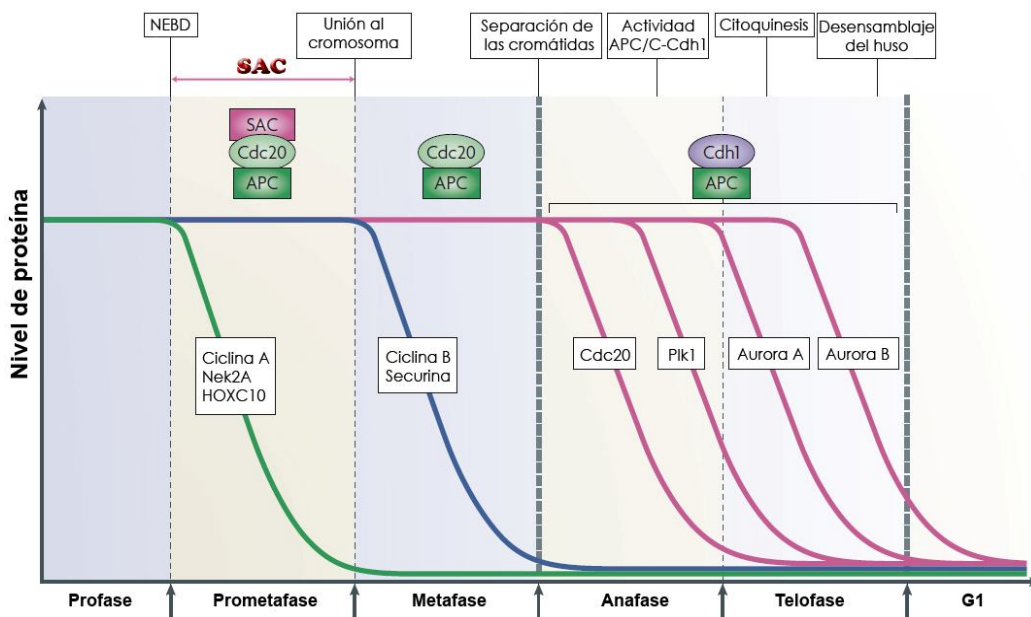


**Esquema 10.** Regulación por APC/C de la salida de la mitosis. Durante la transición metafase/anafase se produce un aumento de la actividad de APC/C, que marca a las ciclinas mitóticas para su posterior degradación, originando un descenso de la actividad Cdk, lo que permite la desfosforilación de los sustratos. Modificado de [Sullivan, 2007].

a) La ubiquitinación de proteínas por el complejo APC/C.

b) La desfosforilación ordenada de sustratos fundamentalmente por parte de Cdk1, aunque también por parte de otras kinasas mitóticas. Este proceso de desfosforilación depende indirectamente de la actividad de APC/C, ya que está marcada por la degradación de las ciclinas [Sullivan, 2007].

Durante la mitosis APC/C forma parte de tres complejos diferentes dependiendo de su asociación con otros cofactores, y cada uno de estos complejos promueve la degradación de un determinado grupo de sustratos en un momento concreto del ciclo celular (ver **esquema 11**).



**Esquema 11.** En el esquema podemos observar los tres complejos en los que participa APC/C, que promueven la destrucción ordenada de distintas proteínas durante los diferentes estadios de la mitosis. En prometafase, Cdc20 activa a APC/C, permaneciendo parcialmente inhibido por SAC. Mientras que, en metafase SAC, deja de inhibir a APC/C-Cdc20, y así podrá degradar a un nuevo grupo de proteínas. Finalmente, en la anafase es Cdh1, el responsable de la activación de APC/C. Modificado de [Pines, 2011].

Durante la prometafase, el complejo APC/C está unido al cofactor Cdc20, pero se encuentra bajo la inhibición de las proteínas del *checkpoint* del huso mitótico, al bloquear su capacidad de reclutamiento de sustratos. Sin embargo, esta forma de APC/C-Cdc20, va a mantener la capacidad de ubiquitinar alguna de sus dianas como son la ciclina A o la kinasa Nek2A [Hayes, 2006; van Zon, 2010]. Además, cuando la última pareja de cromátidas hermanas se ancla al huso mitótico y se inactiva este *checkpoint*, APC/C-Cdc20 se activa por completo, siendo capaz de ubiquitinar otro grupo de proteínas durante la metafase, dentro de este grupo se incluyen la ciclina B y la Securina [Musacchio, 2007]. Así, la destrucción de la ciclina B conlleva una inactivación progresiva de la actividad Cdk, lo que lleva a la desfosforilación del otro cofactor de APC/C la proteína Cdh1, que permanecía activa en su forma fosforilada. Cuando Cdh1 se desfosforila, activa a APC/C y le proporciona una mayor especificidad de sustrato, lo que promueve la destrucción de un nuevo grupo de proteínas diana. En este nuevo grupo de sustratos está incluido Cdc20, además de PIK1

y las kinasa Aurora A y Aurora B, que se destruyen en este orden en anafase y telofase [van Leuken, 2009].

### 2.4.2. Mantenimiento de G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>

El cofactor Cdh1 está implicado en el mantenimiento de una baja actividad por parte de las Cdks, y esta baja actividad Cdk caracteriza el estado G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. APC/C-Cdh1 realiza una degradación completa de las ciclinas mitóticas, así como de otros reguladores positivos de la proliferación celular, como pueden ser Plk1, Aurora A o Cdc25A. El complejo APC/C-Cdh1 también es responsable de la destrucción del componente SCF de Skp2, teniendo como resultado la acumulación de sus sustratos p27 y p21, quienes bloquean cualquier actividad Cdk residual [Bashir, 2004a; Bashir, 2004b].

Existen muchas evidencias que nos permiten confirmar que Cdh1 es uno de los reguladores más importantes de las fases G<sub>1</sub> y G<sub>0</sub>. Su importancia en el mantenimiento de estas fases se deduce del hecho de que las células entran en fase S más fácilmente tras su inhibición. Además, Cdh1 no se expresa durante los primeros ciclos de división embrionarios, los cuales carecen de fases G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>, coincidiendo así, el comienzo de su expresión con la adquisición de la fase G<sub>1</sub> [Peters, 2006].

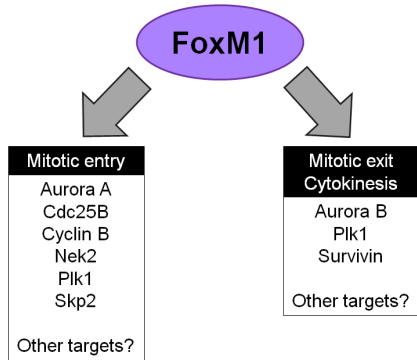
Resultados recientes han demostrado que la inactivación en ratones del gen *Fzr*, que codifica para Cdh1, resulta letal en los embriones, debido a la endorreduplicación que sufren los trofoblastos, lo que provoca insuficiencia placentaria. Sin embargo, esta letalidad embrionaria se previene cuando se realiza la delección específica de *Fzr* en el embrión, lo que posibilita el desarrollo hasta el nacimiento, aunque los animales sólo sobreviven 2 ó 3 días después del parto [García-Higuera, 2008].

Además, a nivel celular, se ha observado que los fibroblastos embrionarios de ratón (*MEFs*) deficientes en Cdh1 acumulan aberraciones cromosómicas y presentan defectos en la proliferación, por la acumulación de las proteínas diana o sustratos de Cdh1. Estas células también presentan una transición de G<sub>1</sub> a S más rápida, a pesar de que la proliferación es más lenta, del mismo modo que se ha observado que la salida de mitosis es más lenta y va acompañada de fallos en la citoquinesis. Estudios realizados en ratones heterocigóticos para *Fzr*, revelaron que estos animales presentan mayor susceptibilidad a tumores espontáneos, indicando que Cdh1 es una proteína necesaria para proteger las células de mamíferos frente a la inestabilidad genómica y que funciona como un supresor tumoral. Estos ratones heterocigóticos, a pesar de que no se detectó un aumento en el número de células madre, también presentan mayor tasa de proliferación celular en la zona subventricular del cerebro, que es una región rica en células madre que mantienen la neurogénesis [García-Higuera, 2008].

### 2.4.3. Acoplamiento con la fase S

APC/C-Cdh1 también controla la entrada en fase S a través de un nuevo mecanismo que implica al factor de transcripción FoxM1 (*Forkhead box M1 transcription factor*). FoxM1 activa la expresión de genes que son necesarios para la progresión de las fases S y M, tales como Plk1, ciclina B, Aurora B o Cdc25B (ver **esquema 12**). APC/C-Cdh1 ubiquitina a este factor para que sea degradado al final de la fase M y al inicio de la Fase G<sub>1</sub>. La ausencia de FoxM1 previene la entrada precoz en la fase S, que se observa en las células que no expresan Cdh1, indicando que FoxM1 es una de las

dianas de Cdh1 al final de la fase S y al comienzo de G1, y su proteólisis es muy importante para la entrada en la fase S. Por lo tanto, es lógico pensar que FoxM1 es una diana de Cdh1, ya que estructuralmente hablando, posee una secuencia KEN-*box* en su extremo amino-terminal [Laoukili, 2008; Sadasivam, 2013].

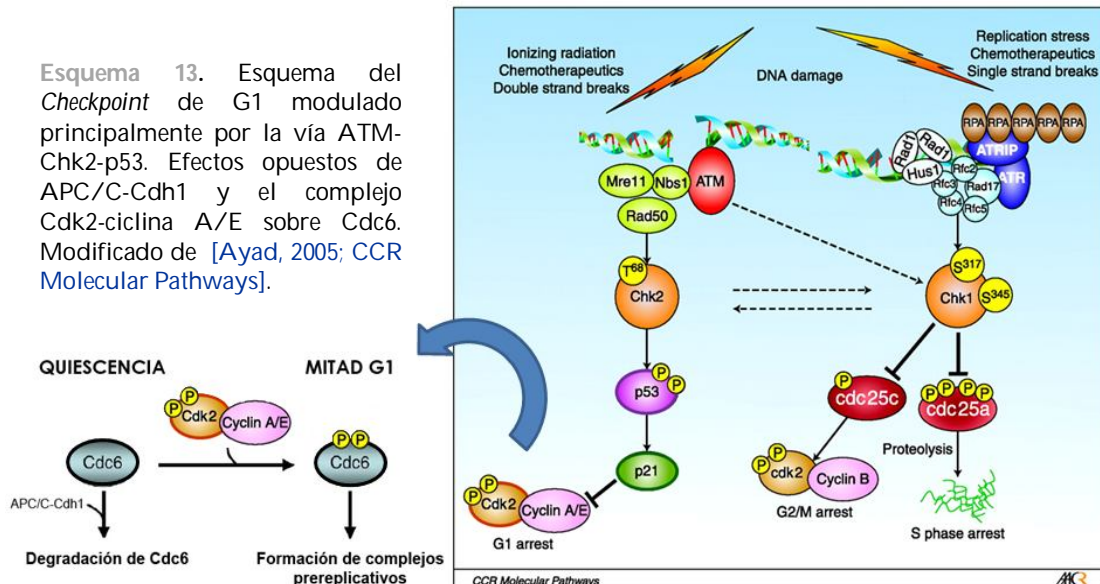


Esquema 12. Genes diana de FoxM1. En esta memoria hacemos referencia, por un lado a las que están involucradas en la entrada de mitosis, y por otro a las que están implicadas en la citoquinesis y en la salida de la mitosis como se observa en el esquema. Modificado de [Laoukili, 2007].

### 2.4.4. Activación de APC/C en respuesta a daño en ADN

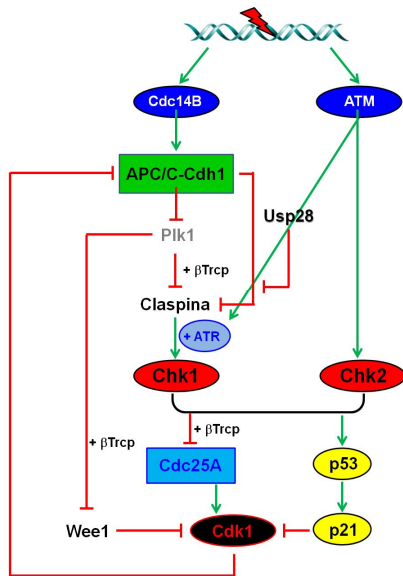
Durante las fases S y G2, APC/C permanece inactivo para mantener elevada la actividad Cdk e impedir que se formen los complejos prerreplicativos. Sin embargo, cuando se produce una replicación aberrante o un daño en el ADN, el ciclo celular se detiene para poder repararlo y ello conlleva a la activación de APC/C-Cdh1. Durante la fase G1, el daño en el ADN provoca la activación tanto de p53 como de p21; (ver **esquema 13**) al activarse p53 se provoca la degradación de la ciclina D1, mientras que cuando se activa p21, inhibidor de Cdk2, se produce la desfosforilación de Cdc6 y su subsecuente degradación vía APC/C-Cdh1 [Bartek, 2001; Mailand, 2005].

Esquema 13. Esquema del *Checkpoint* de G1 modulado principalmente por la vía ATM-Chk2-p53. Efectos opuestos de APC/C-Cdh1 y el complejo Cdk2-ciclina A/E sobre Cdc6. Modificado de [Ayad, 2005; CCR Molecular Pathways].



Durante la fase G2, la fosfatasa Cdc14 es la responsable de la activación de APC/C-Cdh1, que de forma indirecta permite la acumulación de Claspina. A su vez, la

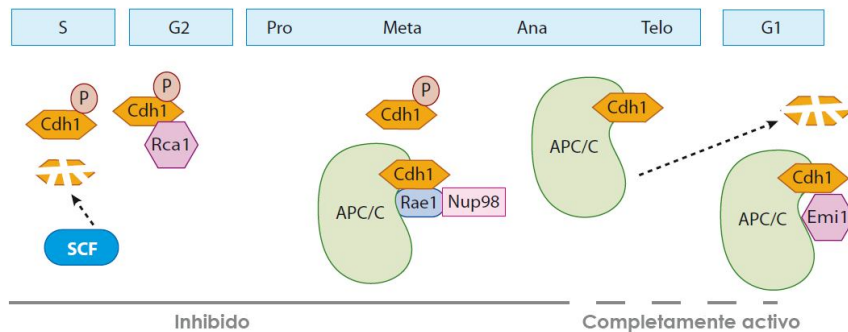
Claspina promueve la activación de p53, que lleva finalmente a la inactivación de Cdk1 y la parada del ciclo celular en la fase G2 (ver **esquema 14**) [Bassermann, 2008].



**Esquema 14.** Esquema del *Checkpoint* de G2 en respuesta al daño del ADN modulado principalmente por la vía Cdc14B-APC/C-Cdh1-PIK1. Después de la inducción de roturas de las dobles cadenas durante la fase G2, también se activa la vía ATM-Chk2-p53-p21. El resultado de ambas vías es la inhibición de Cdk1. Modificado de [Bassermann, 2008].

## 2.5. Regulación de APC/C-Cdh1

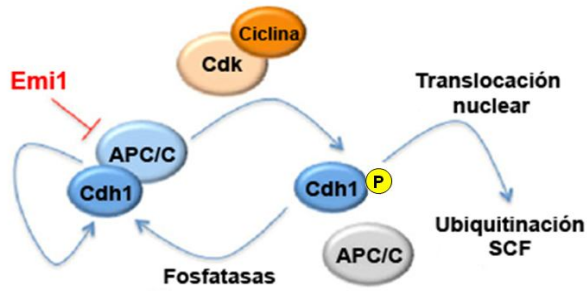
La actividad de APC/C-Cdh1 está regulada por la cantidad de proteína, el estado de fosforilación de Cdh1 y por la unión de proteínas inhibitoras o activadoras (ver **esquema 15**) [Pesin, 2008].



**Esquema 15.** La fosforilación de Cdh1 por Cdk1 impide su asociación con APC/C en las fases S, G2 y M. La desfosforilación de Cdh1 por acción de las fosfatasas Cdc14 conduce a la completa activación de APC/C-Cdh1 en la mitosis tardía y durante la fase G1. Cdh1 es degradada por su propia actividad al final de G1, y en la fase S, gracias a la actividad de SCF. Modificado de [Pesin, 2008].

### 2.5.1. Regulación de la cantidad de proteína de Cdh1

La concentración del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de Cdh1 permanece constante a lo largo del ciclo celular, sin embargo no ocurre lo mismo con la cantidad de la proteína, que es más elevada durante la mitosis. No obstante al final de la fase G1 y de la fase S disminuye su expresión, al ser degradada por SCF y por su propia actividad APC/C-Cdh1 [Fang, 1999; Kramer, 2000].

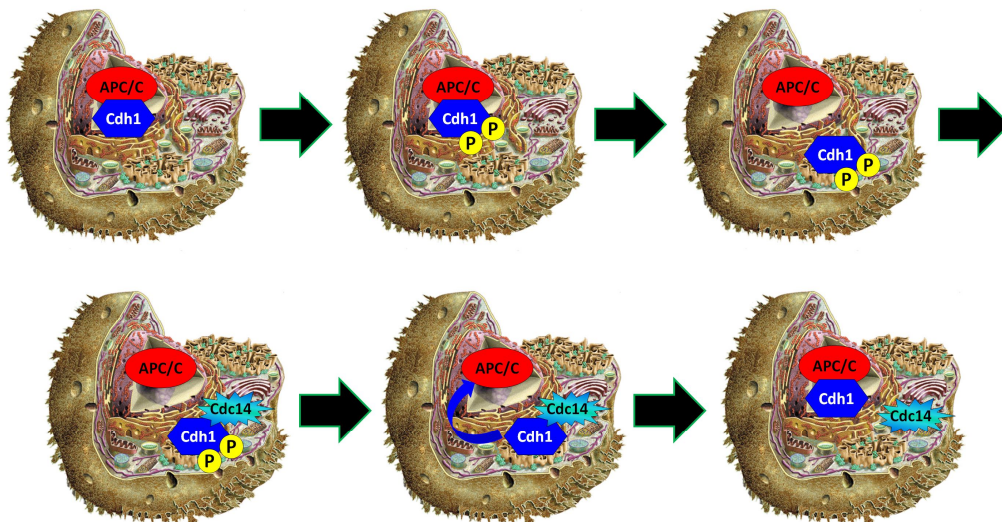


Esquema 16. La actividad de APC/C-Cdh1 está estrechamente regulada por la fosforilación de tipo reversible de Cdh1, las proteínas inhibidoras y la propia degradación de Cdh1. La fosforilación de Cdh1 la llevan a cabo los complejos Cdk-ciclina y la desfosforilación es llevada a cabo por las fosfatasas. Modificado de [Almeida, 2012].

### 2.5.2. Regulación por fosforilación de Cdh1

La actividad de APC/C-Cdh1 aumenta notablemente durante la anafase tardía, y se mantiene elevada durante la fase G1. Esta actividad está muy regulada por la fosforilación reversible de Cdh1 y de sus sustratos, por proteínas inhibidoras y por la degradación de Cdh1, tal y como se puede observar en el [esquema 16](#) [Almeida, 2012].

La fosforilación de Cdh1 inhibe su unión con APC/C. Cdh1 es fosforilado por Cdk durante las fases S, G2 y M, y sólo su desfosforilación en la mitosis tardía y durante la fase G1 le permite activar a APC/C. La desfosforilación de Cdh1 se produce cuando comienza a disminuir la actividad de las Cdk, como consecuencia de la degradación por APC/C-Cdc20 de las ciclinas mitóticas, entre otras dianas. Algunos grupos han descrito que la fosfatasa encargada de activar a Cdh1 es Cdc14, la cual se activa y sale del núcleo al citosol durante la anafase. Cdc14 se encarga de la activación del propio cofactor Cdh1 y de la proteína Sic1 que es el inhibidor de la Cdk1. Cuando Cdh1 se encuentra fosforilado se localiza en el citosol, pero se transloca al núcleo al ser desfosforilado, por lo que su activación depende de la salida de Cdc14 del núcleo (ver [esquema 17](#)) [Toda, 2012; Visitin, 1997].



Esquema 17. APC/C y Cdh1 están unidos y activos en el núcleo; para que esto ocurra, Cdh1 tiene que mantenerse desfosforilado. Por contra, durante las fases S, G2 y M, Cdh1 se fosforila por la acción de varias Cdk. Así, cuando Cdh1 se encuentra fosforilado, pierde su unión a APC/C y se transloca al citoplasma donde se une a la fosfatasa Cdc14, que es la encargada de desfosforilarlo durante la anafase.

Todo el mecanismo de Cdc14 y Cdh1, está muy caracterizado en levaduras, sin embargo, a pesar de que se han encontrado tres homólogos de la proteína en vertebrados (Cdc14A, Cdc14B y Cdc14C), su relevancia aún no está identificada. En parte debido a que no se ha visto un efecto claro de la proteína sobre la salida de mitosis, ya que el estudio está basado en las familias de fosfatasa PP1 y PP2A. De hecho, hay numerosos estudios que sugieren que las funciones de Cdc14 en vertebrados no están relacionadas con la salida de la mitosis, incluyendo funciones en el *checkpoint* de daño de ADN y su reparación y en la duplicación y funcionamiento del centrosoma. De manera particular, en respuesta al estrés genotóxico durante la fase G2, Cdc14B se transloca desde el núcleo al citoplasma, donde la fosfatasa desfosforila a Cdh1, y por lo tanto promueve la actividad de APC/C-Cdh1 [Almeida, 2012; Maestre, 2008].

La fosforilación de los sustratos de Cdh1, también contribuye a la regulación de la actividad de APC/C-Cdh1. Por ejemplo, la fosforilación de Cdk2, mediada por SCF, interrumpe su unión con APC/C-Cdh1 y hace que se acumule Skp2 al final de la fase G1. Por otro lado, la desfosforilación de Cdc14B, que es dependiente de Cdh1, promueve la degradación de Skp2 durante la transición M/G1 [Almeida, 2012].

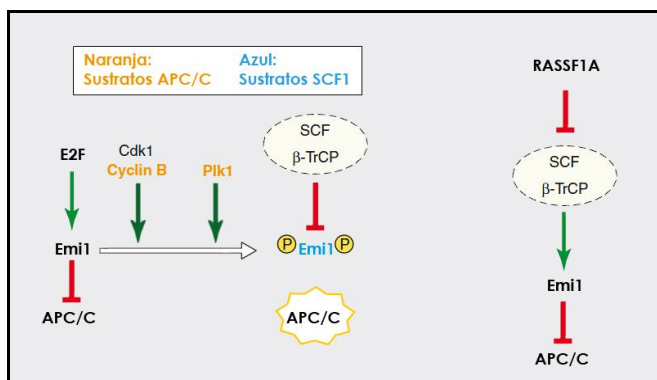
### 2.5.3. Principales inhibidores

#### 1) Emi1

En la transición de la fase G1 a la fase S, el factor E2F activa la transcripción de Emi1. De esta manera, a partir de ese momento del ciclo celular, Emi1 inhibe a APC/C-Cdh1 permitiendo la acumulación de sus sustratos [Miller, 2006]. Otros estudios han demostrado que en el caso de los humanos, Emi1 es esencial para la coordinación precisa de la síntesis de ADN y la mitosis. Así, se ha demostrado que un fragmento de 143 residuos del dominio C-terminal de Emi1 inhibe múltiples funciones de APC/C-Cdh1. La *D-box*, el *linker* y los elementos de la cola, junto con el dominio *zinc-binding* de Emi1, se unen de manera sinérgica a distintas regiones de APC/C-Cdh1, bloqueando el sitio de unión del complejo a sus sustratos e inhibiendo la elongación de la cadena de Ubiquitina [Frye, 2013; Skaar, 2008].

#### 2) RASSF1A

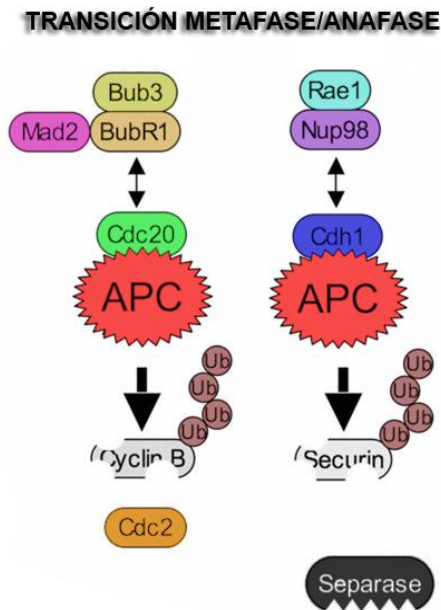
Este factor inhibe de manera indirecta a APC/C-Cdh1 durante la transición G1/S, al inhibir SCF- $\beta$ TrCP, activador de Emi1, lo que produce de nuevo la inhibición de APC/C-Cdh1 (ver *esquema 18*) [Whitehurst, 2008].



**Esquema 18.** En el esquema podemos ver la activación de Emi1 por E2F. Por otra parte vemos como RASSF1A inhibe a SCF- $\beta$ TrCP, se activa Emi1, volviendo a inhibir a APC/C. Modificado de [Vodermaier, 2004].

### 3) Rae1-Nup98

En el caso de los mamíferos durante la profase, APC/C-Cdh1 está inhibido por fosforilación y por el complejo Rae1-Nup98. Rae1 es un factor transportador de ARNm, que actúa anclando a Nup98, que es una nucleoporina, al complejo del poro nuclear. El complejo Rae1-Nup98 se encarga de inhibir la ubiquitinación de la Securina por parte de APC/C-Cdh1 (ver **esquema 19**). Rae1-Nup98 se disocia de APC/C-Cdh1 al mismo tiempo que las proteínas del checkpoint del huso mitótico lo hacen de APC/C-Cdc20, y así se produce la transición metafase/anafase [Cuende, 2008; Jeganathan, 2005].



**Esquema 19.** En prometafase, APC/C-Cdc20 es inhibido por el complejo Mad2, Bub3, BubR1. Sin embargo, los bajos niveles de BubR1 como resultado de la degradación prematura de la ciclina B, durante la transición metafase/anafase, sugieren que el complejo APC/C-Cdc20 realiza una ubiquitinación de la ciclina B, después de la liberación de Mad2, Bub3 y BubR1. En prometafase, APC/C-Cdh1 se encuentra inhibido por el complejo Rae1-Nup98, pero en la transición de metafase/anafase se produce la activación de APC/C-Cdh1 que ubiquitina la Securina, tal y como se describe en el texto. Modificado de [<http://www.biochemsoctrans.org>].

## 3. Sistema nervioso

El sistema nervioso (SN) obtiene información de tipo sensitivo del ambiente que rodea al organismo, evalúa la importancia de la información y genera las respuestas conductuales apropiadas. La consecución de estas tareas requiere un plan anatómico de complejidad considerable. El SN se divide en dos componentes fundamentales, que se diferencian anatómicamente: **a) sistema nervioso central (SNC)**: constituido por la médula espinal y por el encéfalo; **b) sistema nervioso periférico (SNP)**: compuesto por diferentes grupos especializados de neuronas, que constituyen los ganglios periféricos, y por los nervios periféricos. El SNP transmite la información al SNC y ejecuta las órdenes motoras generadas en el encéfalo y la médula espinal [Bear, 1998; Crelin, 1974; Kandel, 2001].

### 3.1. Sistema nervioso central en ratón

El SNC está constituido por un tejido muy especializado y muy sensible que realiza funciones muy complejas. Este sistema está jerarquizado, y la jerarquía se establece por el dominio regulador de una estructura sobre otra, generalmente, un centro nervioso. Cuanto más alta es la jerarquía, más compleja es la organización y las conexiones del centro nervioso del que se trate [Watson, 2011].



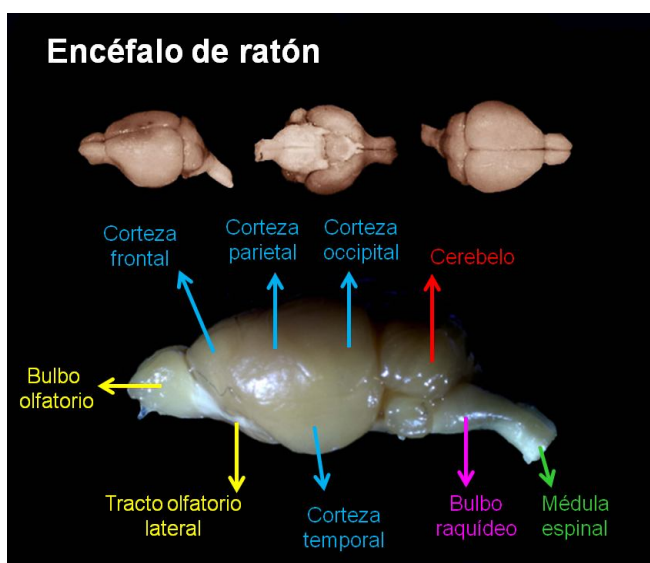
### 3.1.1. Médula espinal en el ratón

La **médula espinal** del ratón es una estructura blanca, delgada, casi cilíndrica, que está ligeramente aplanada dorsoventralmente. Se extiende desde el extremo caudal, en la parte posterior del cerebro hasta el agujero occipital, en la parte inferior de la columna vertebral. La médula espinal al igual que el cerebro no es compacta [Biscoe, 1982; Weihe, 1992].

La médula espinal es la parte del SNC del ratón, que se encarga de transmitir la información sensorial desde el SNP al cerebro y la información motora desde el cerebro a los tejidos musculares y/o glandulares. La información que se posee sobre su organización es relativa, ya que las técnicas experimentales para su estudio en un animal tan pequeño, conllevan bastantes dificultades. Por otro lado, tenemos que añadir, que gran parte de la información que tenemos de la médula espinal de ratón, se ha extrapolado de los datos obtenidos en los estudios de ratas. [Bican, 2013; Bjugn, 1988]. Esta estructura no es una simple vía de transmisión de mensajes, realmente es un centro coordinador de la actividad refleja que es fundamental cuando se precisa una respuesta inmediata. El tiempo que tarda en llegar la información al cerebro y el tiempo que el cerebro tarda en dar una respuesta y en enviarla de regreso es muy rápido, pero no inmediato. De estas respuestas inmediatas, que son imprescindibles para la supervivencia, se encarga la médula espinal [Bican, 2013].

### 3.1.2. Encéfalo en el ratón

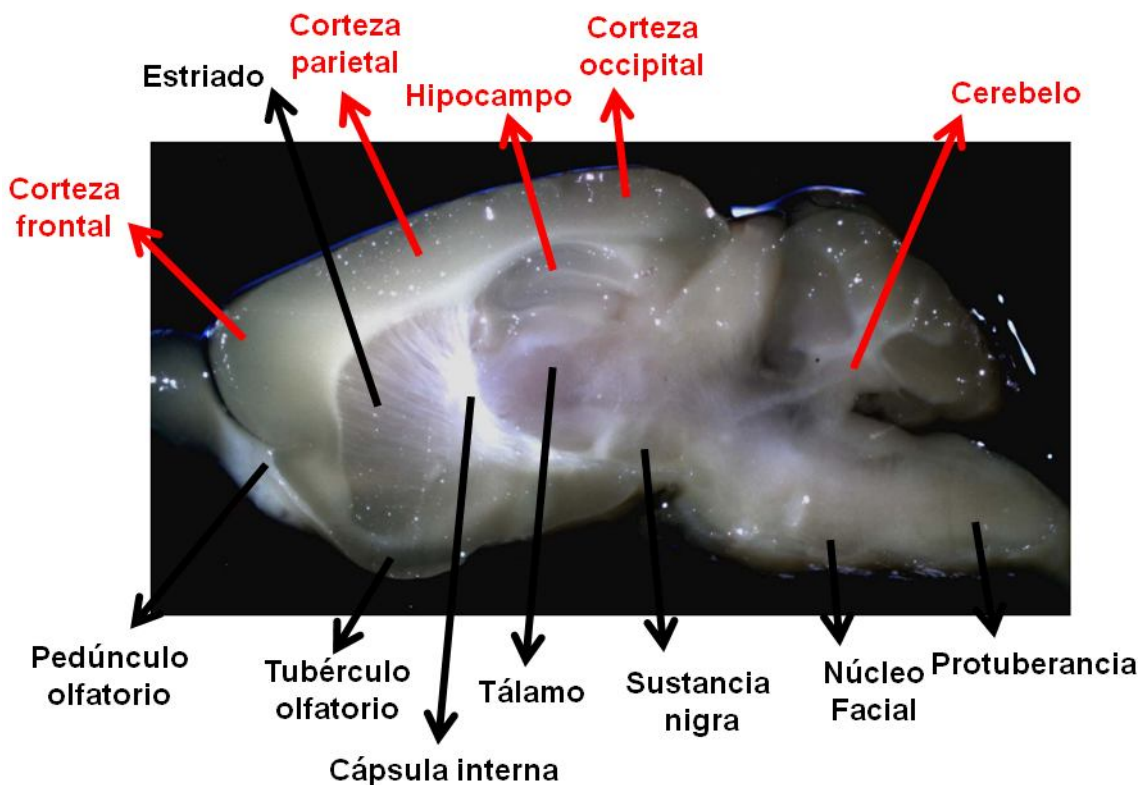
El **encéfalo** es el centro que coordina el SN. No es un órgano compacto, sino que presenta una serie de oquedades en su interior. Estas cavidades se denominan ventrículos cerebrales y son 4. En los mamíferos, el crecimiento del cerebro es tan importante que ha sufrido una serie de plegamientos que le dan un aspecto rugoso, y se denominan circunvoluciones. Las circunvoluciones permiten que la corteza cerebral crezca mucho, sin que se ocupe tanto volumen. En el encéfalo se registran y se integran todas las informaciones aferentes. A partir de estas informaciones el encéfalo toma decisiones, y envía nueva información a los efectores. El encéfalo tiene como funciones: la percepción, las funciones motoras y la cognición, donde englobamos el pensamiento, la memoria y las emociones [Bear, 1998; Kandel, 2001].



**Imagen 1.** Encéfalo de ratón. En la imagen, podemos observar una serie de fotografías con diferentes vistas de un cerebro de ratón. Se puede ver al completo el encéfalo y parte de la médula espinal.

El encéfalo está constituido por una serie de estructuras: **a) tronco del encéfalo:** formado por el bulbo raquídeo o médula oblongata, la protuberancia o puente y el mesencéfalo o cerebro medio; **b) cerebelo:** compuesto a su vez por la corteza cerebelosa y los núcleos cerebelosos; **c) diencefalo:** constituido por epitélamo, tálamo, subtálamo e hipotálamo y **d) telencefalo:** formado por el rinencefalo, los ganglios basales, la amígdala, el hipocampo y la corteza cerebral (ver **imagen 1**) [Crelin, 1974].

De todas las zonas del encéfalo que antes hemos mencionado, en el presente trabajo de Tesis Doctoral, nos hemos centrado en la corteza cerebral (Cx), en el hipocampo (Hy) y en el cerebelo (Cb) (ver **imagen 2**).



**Imagen 2.** Vista lateral parasagital de un encéfalo de ratón adulto. En la fotografía se pueden observar varias estructuras, nosotros hemos destacado la corteza cerebral, el hipocampo y el cerebelo para que se distinga su localización.

### 3.2. Cerebelo

La palabra **cerebelo** deriva del latín *cerebellum* que significa cerebro pequeño. Se encuentra situado sobre la protuberancia, y contiene el mayor número de neuronas si lo comparamos con cualquier otra subdivisión del encéfalo, incluidos los hemisferios cerebrales. El Cb es un órgano impar y medial, que se encuentra situado en la fosa craneal posterior, dorsal al tronco del encéfalo e inferior al lóbulo occipital (ver **imagen 2**) [Kandel, 2001].

### 3.2.1. Anatomía externa

El Cb del ratón constituye aproximadamente el 11% del peso total del cerebro y su anatomía externa es similar a la del resto de mamíferos. Esta estructura se encuentra unida al tronco del encéfalo por tres pares de grandes haces de fibras que se originan a partir de la protuberancia y se denominan pedúnculos cerebelosos. Estas fibras llevan las vías aferentes y eferentes del Cb. La parte visible de la estructura, es en realidad una fina capa de corteza plegada repetidas veces. La superficie dorsal presenta unas eminencias huecas con un recorrido transversal que se denomina *folia* u hojas. Además, presenta unas profundas cisuras transversas [Marani, 1979].

El Cb no está dividido de manera clara por la mitad, como ocurre con los hemisferios cerebrales, ya que en la línea media, las *folia*, se extienden ininterrumpidamente. La línea media del Cb se caracteriza porque es una protuberancia que se extiende a lo largo de la estructura. Esta región de la línea media recibe el nombre de **vermis**, y separa los dos **hemisferios cerebelosos** laterales entre sí (ver imagen 3) [Wahlsten, 1991].

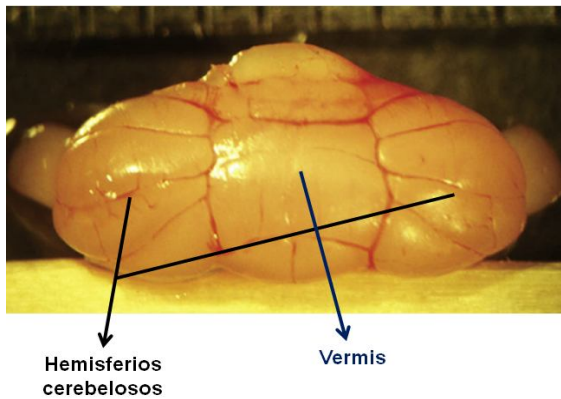


Imagen 3. Cerebelo de un ratón. Podemos observar perfectamente los dos hemisferios cerebelosos en los extremos de la estructura y el *vermis* en la parte central.

### 3.2.2. Anatomía interna

Aunque el Cb constituye sólo el 11% del peso total del encéfalo, como hemos mencionado anteriormente, contiene más de la mitad de todas sus neuronas. Estas neuronas están dispuestas de manera regular, en forma de unidades repetidas, cada una de las cuales forma un módulo de circuito básico. Pese a su regularidad estructural, el Cb está dividido en varias regiones bien distintas, de las cuales cada una recibe proyecciones de diferentes partes del encéfalo y de la médula espinal, y envía proyecciones a diferentes sistemas motores [Sotelo, 2010].

El Cb se compone de una capa externa de sustancia gris denominada **corteza cerebelosa**, una sustancia blanca interna y **tres pares de núcleos profundos**: el núcleo fastigial, el núcleo dentado y el interpuesto, que a su vez está compuesto de dos núcleos, el globoso y el emboliforme. El Cb está conectado a la cara dorsal del tronco cerebral por tres pares de tractos simétricos: el pedúnculo cerebeloso inferior o cuerpo restiforme, el pedúnculo cerebeloso medio o pontino y el pedúnculo cerebeloso superior o *braquium conjunctivum*. El pedúnculo cerebeloso superior contiene la mayoría de las proyecciones eferentes. Con una sola excepción, las eferencias cerebelosas se originan en los cuerpos celulares de los núcleos profundos [Herrup, 1987].

### 3.2.2.a. Organización estructural de la corteza cerebelosa

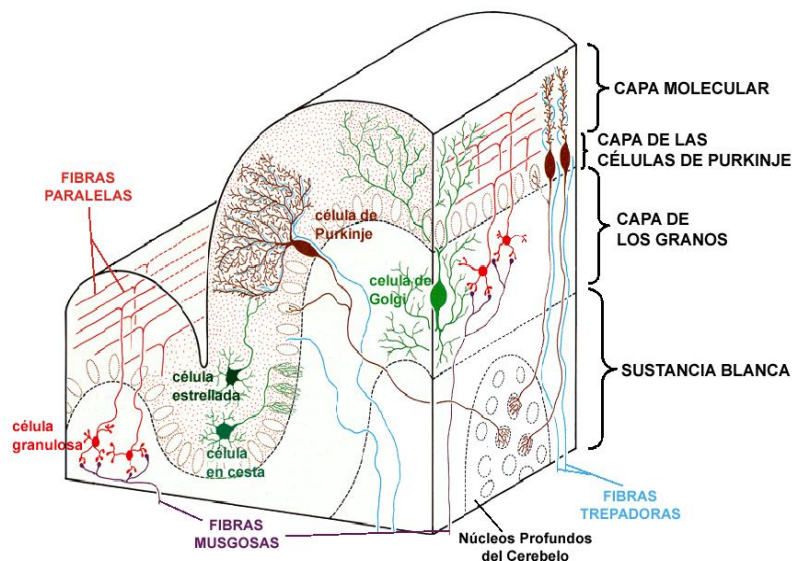
La **corteza cerebelosa** es una estructura sencilla de tres capas que consta de tan sólo cinco tipos diferentes de neuronas (ver **esquema 20**) [Sotelo, 2010].

#### 1) Capa molecular

Es la capa más externa y también la más extensa de la corteza cerebelosa. Está formada por los axones de los granos, además de las dendritas de las células de Purkinje, que se orientan perpendicularmente a la superficie del Cb. El contenido de esta capa se completa con la presencia de dos tipos de interneuronas que están dispersas entre los axones de los granos y las dendritas de las células de Purkinje:

Las células estrelladas que se disponen por todo el espesor de la capa, aunque predominan en las zonas superficiales. Son multipolares, emitiendo numerosas dendritas de forma radial. Tenemos que tener en cuenta que algunos autores las dividen en dos grupos: de axón corto y de axón largo.

Las células en cesta que se sitúan fundamentalmente en la parte inferior y media de la capa. Sus dendritas tienden a dirigirse hacia la parte más superficial de la corteza. El axón se sitúa por encima del soma de las células de Purkinje y emiten colaterales hacia éstas, envolviéndolas hasta la salida de su axón [Apps, 2005; Heck, 2002; Ramnani, 2006].



**Esquema 20.** Esquema de la organización estructural de la corteza cerebelosa. Se pueden observar las 3 capas que la constituyen: la capa molecular, la capa de las células de Purkinje y la capa de los granos. También se pueden ver los diferentes tipos de neuronas Modificado de [Apps, 2005].

#### 2) Capa de las células de Purkinje

Es una capa muy fina que contiene los somas de las células de Purkinje. Estas células poseen somas grandes (20-70  $\mu\text{m}$ ) de forma triangular, ovoide, piriforme o semilunar. Sus dendritas forman una arborización característica: emerge de la porción superior del soma y se divide solo en un plano, que es perpendicular al de las láminas

cerebelosas. Dichas divisiones suelen ser dicotómicas, pero no forman ángulos rectos. Su axón surge del polo inferior del soma celular por norma general y atraviesa oblicuamente la capa de los granos, penetrando en la sustancia blanca [Hashimoto, 2012].

### 3) Capa de los granos

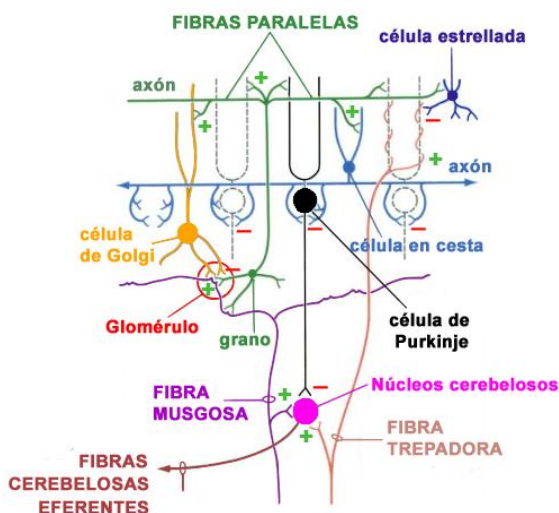
Es la capa más interna. Se calcula que posee  $10^{11}$  *granos*, que son células denominadas así por poseer unos somas pequeños (7-10  $\mu\text{m}$ ) de morfología ovoide que se agrupan densamente. Del soma parten las dendritas, generalmente entre 3 y 6, las cuales se disponen de forma radial y siguen un trayecto relativamente corto. El axón parte o bien del soma o bien de alguna de las ramificaciones dendríticas y sigue un curso ascendente atravesando la capa granular e introduciéndose en la capa molecular. En esta capa se bifurca en forma de T, siguiendo una dirección perpendicular a las ramificaciones del árbol dendrítico de las células de Purkinje, y constituyendo las fibras paralelas [Apps, 2005].

Las *células de Golgi tipo II* se disponen a diferentes alturas dentro de la capa de los granos, muestran un tamaño voluminoso y aparecen dispersas entre grupos de granos, aunque predominan en el tercio superior de esta capa. Las dendritas se dirigen principalmente hacia la superficie de la corteza cerebelosa, mientras que el axón lo hace hacia el interior de la capa [D'Angelo, 2011].

#### 3.2.2.b. Interacciones sinápticas de la corteza cerebelosa

Las *fibras musgosas*, junto con las fibras trepadoras, son las fibras aferentes, que conducen la información hacia la corteza cerebelosa. El soma de las fibras musgosas se encuentra en el tronco del encéfalo. Estas fibras excitan tanto a las dendritas de los granos, como a las células de Golgi. Aquí se forma el complejo sináptico denominado *glomérulo cerebeloso*. A su vez la célula de Golgi, hace sinapsis con los granos y los inhibe.

Las *fibras trepadoras* son los axones de las neuronas del núcleo olivar inferior contralateral, que llegan hasta el árbol dendrítico de las células de Purkinje para transmitir información excitadora (ver esquema 21) [de Schutter, 2002; Kim, 1997].



Esquema 21. Esquema de las interacciones sinápticas de la corteza cerebelosa. Se observan los tres tipos principales de fibras: las fibras paralelas, las fibras musgosas y las fibras trepadoras. Modificado de [Kim, 1997].

Las *fibras paralelas* están constituidas por los axones de los granos que se extienden a lo largo del eje mayor de la lámina cerebelosa atravesando el árbol dendrítico de las células de Purkinje [de Schutter, 2002; Kim, 1997].

### 3.2.3. Función

David Marr y James Albus a principios de los años 70 sugirieron que los circuitos corticales del Cb podían utilizarse en tareas de aprendizaje motor. De forma específica, señalaron que la información transmitida por una fibra trepadora a las neuronas de Purkinje, modifica la respuesta de éstas a la información transmitida por las fibras musgosas y además durante un periodo prolongado [Steuber, 2013].

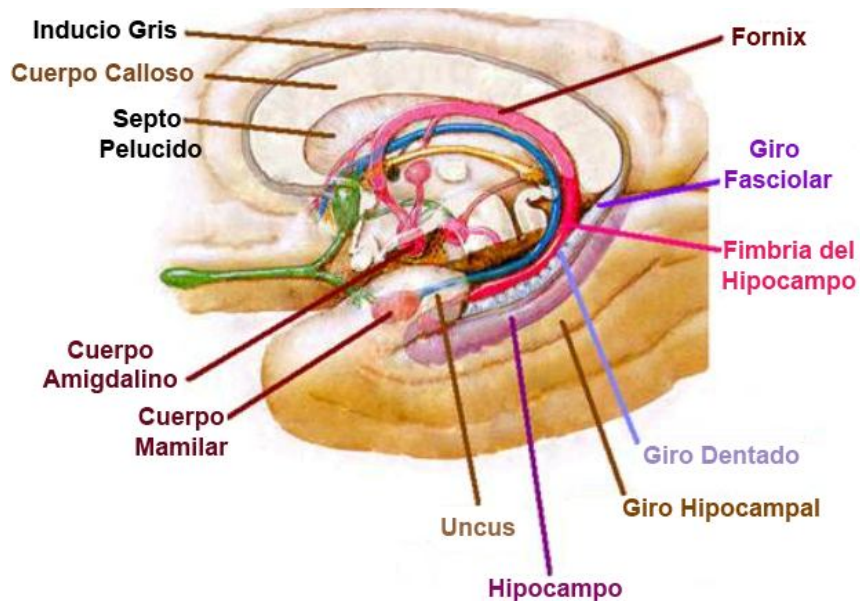
El Cb influye en los sistemas motores evaluando las disparidades existentes entre intención y acción, y ajustando las operaciones de los centros motores de la Cx y el tronco encefálico durante el desarrollo de un movimiento, así como durante las repeticiones de dicho movimiento. El Cb recibe una extensa información sobre fines, órdenes y señales de retroalimentación asociados con la programación y la ejecución del movimiento. La importancia de estas aferencias es evidente por el hecho de que el número de axones que penetran en el Cb supera en más de 40 veces al de los que salen de él. Las proyecciones eferentes del Cb están enfocadas principalmente hacia los sistemas premotores y motores de la Cx y el tronco encefálico, que son sistemas que controlan directamente interneuronas medulares y neuronas motoras. La transmisión sináptica en los módulos de circuito es modificable, aspecto crucial para la adaptación y el aprendizaje motores [Llinas, 1993; Thach, 2013].

La extirpación del Cb no altera los umbrales sensitivos ni la intensidad de la contracción muscular. Por lo tanto, se afirma que el Cb no es necesario para los elementos básicos de la percepción o el movimiento. Sin embargo, la lesión del Cb destruye la precisión espacial y la coordinación temporal del movimiento, también altera el equilibrio y reduce el tono muscular, así como trastorna notablemente el aprendizaje motor y determinadas funciones cognitivas [Allen, 1997; Fine, 2002].

## 3.3. Hipocampo

La palabra **hipocampo** deriva del griego *hippos* que significa caballo y *kampos* que significa monstruo marino. Esta zona del cerebro recibió su nombre en el siglo XVI gracias al anatomista Giulio Cesare Aranzio, que observó una gran semejanza entre un caballito de mar y la forma del área.

Es una estructura marginal del lóbulo temporal, por ello pertenece, por una parte al sistema límbico y por otra parte a la arquicorteza. El **hipocampo (Hy)**, origina la denominada **formación hipocampal** junto con el **giro dentado (GD)** y el **subículo (Sub)**. Es una estructura pareada, con dos mitades que son imágenes especulares en ambos hemisferios (ver **esquema 22**). En roedores, al igual que en otros mamíferos, se localiza en el interior de la parte medial del lóbulo temporal, bajo la superficie de la Cx (ver **imagen 2**). En la actualidad se conoce que desempeña funciones importantes en la memoria y en el manejo del espacio, y aunque los estudios sobre su función en humanos son escasos, se ha investigado ampliamente en roedores como parte del sistema responsable de la memoria espacial y la navegación [Kandel, 2001].



Esquema 22. Esquema de la localización de hipocampo, y de todas las estructuras que se encuentran en sus proximidades. Modificado de [Netter, 2007].

### 3.3.1. Anatomía externa

La formación hipocámpica del ratón, al igual que en otros mamíferos, está constituida por el **hipocampo**, el **giro dentado** y el **subículo**, y aparece como una estructura alargada que se extiende de manera rostro-dorsal desde el tabique de los núcleos basales del cerebro anterior, por encima y por detrás del diencéfalo, hasta las porciones temporales, de manera caudo-ventral (ver imagen 4) [Witter, 1989].

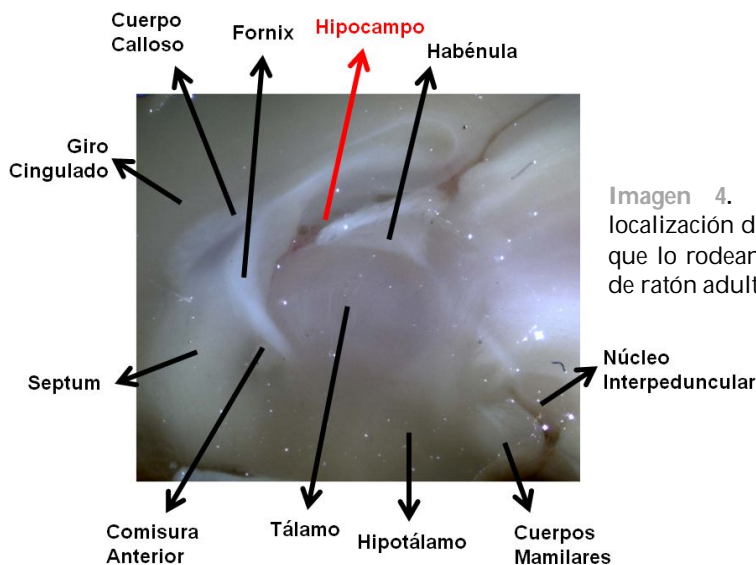


Imagen 4. Fotografía en detalle de la localización del Hy, y de todas las estructuras que lo rodean, en un corte sagital de cerebro de ratón adulto.

Tenemos que tener en cuenta, que con diferencia de la rata, la formación hipocámpica del ratón tiene una expansión en el extremo rostral-ventral que está menos pronunciada. El **Hy** constituye la porción más caudal-ventral, dentro de la formación [Watson, 2011].

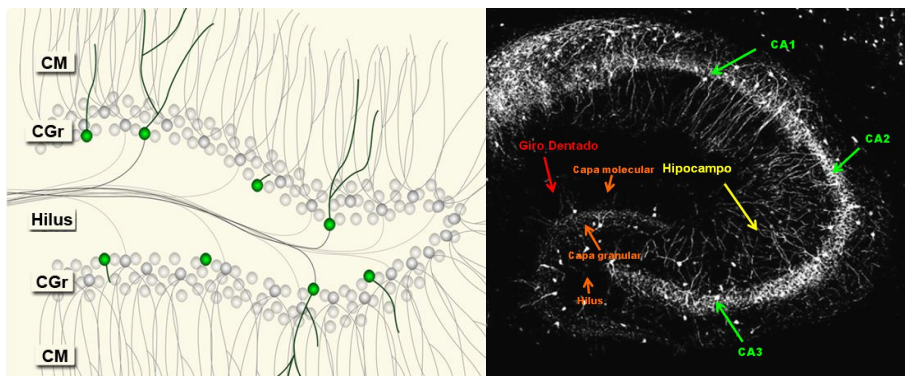
### 3.3.2. Anatomía interna

La formación hipocampal comprende tres divisiones que son citoarquitectónicamente diferentes, el **giro dentado**, el **subículo** y el **hipocampo** propiamente dicho, que se subdivide en tres zonas o capas: CA1, CA2 y CA3 (CA, *cornu Ammonis* o cuerno de Amon). Estas tres capas del Hy comparten una característica común, y es que poseen allocortex, por otra parte, la conectividad en estas tres zonas es unidireccional [Witter, 1989], a pesar de que existen estudios más recientes en ratas que indican que esto puede ser una simplificación excesiva [Watson, 2011].

#### 3.3.2.a. Giro dentado

El GD es una circunvolución del encéfalo que se corresponde con una banda de sustancia gris, que está localizada debajo del borde medial del Hy. Es una arquicorteza o corteza primordial que se desarrolla siguiendo el borde del surco del Hy. La prolongación posterior y superior de esta circunvolución recibe el nombre de giro fasciolar, el cual forma un área de transición entre el GD y el inducio gris o *indusium griseum* [Stanfield, 1984].

El GD está constituido por tres capas, bien diferenciadas de manera morfológica (ver esquema 23 e imagen 5):



**Esquema 23.** Representación de las tres capas diferentes del giro dentado. 1) CM: capa molecular o externa, 2) hilus y 3) CGr: capa de las células granulares. Modificado de [Rosenzweig, 2011].

**Imagen 5.** Inmunohistoquímica de la formación hipocampal. Se pueden observar el giro dentado, el subículo y el hipocampo, así como las diferentes capas los componen. Modificado de [Jinno, 2002].

**1)** La **capa externa** o **capa molecular** que está formada principalmente por dendritas de células granulares, *células en cesta* y *células polimórficas*, así como terminales axónicas de varias neuronas. Sin embargo, podemos afirmar que se pueden observar algunas células aisladas de diferentes tipos [Jinno, 2006].

**2)** La **capa polimórfica** o **hilio (hilus)** alberga una gran variedad de tipo *neuronas polimórficas*, incluyendo una considerable proporción de células GABAérgicas. Las células más comunes de esta capa son las denominadas *células musgosas*, que es un tipo de célula glutamatérgica [Jinno, 2006]. Poseen un cuerpo celular grande y ovalado (21-25  $\mu\text{m}$ ) y de 2-6 dendritas gruesas que se originan en el soma y después se



extienden grandes distancias por el interior de la capa. En ocasiones estas dendritas pueden llegar a extenderse hasta la capa granular o incluso a la capa molecular [Fujise, 1999].

**3)** La **capa de las células granulares** que se encuentra justo por debajo de la capa molecular y se componen de una alta densidad de células granulares. Estas células constituyen una capa que puede tener forma de "V" o forma de "U" según estemos en una posición más dorsal o más ventral [van Pelt, 1997].

Las células granulares es el principal tipo celular de la región. Se estima que el número total de estas células en los ratones es de 390000 células en cada hemisferio. En roedores, las células granulares están estrechamente relacionadas entre sí, carecen de dendritas basales y su árbol dendrítico emerge desde la superficie del soma en forma cónico-apical. Con más o menos frecuencia, se suelen originar algunas dendritas a sus lados. Estas dendritas ascienden y se ramifican en varias ocasiones dentro de la capa molecular [Stanfield, 1984].

Más profundamente encontramos células con un único proceso apical que asciende, sin ramificación alguna, entre los gránulos más superficiales, hasta la capa molecular donde comienza a ramificarse de manera similar a las células granulares que son más superficiales. Las dendritas de las células granulares que se encuentran en la capa molecular poseen numerosas espinas dendríticas, que aumentan su longitud en las posiciones más distales [van Pelt, 1997].

Al igual que en la capa polimórfica, en esta capa encontramos un elevado número de interneuronas GABAérgicas [Jinno, 2006].

Además de células granulares, en esta capa se encuentran las denominadas células en cesta, que poseen cuerpos celulares en forma piramidal, que encajan entre las células granulares. El axón de estas células forma plexos pericelulares que rodean al soma de las células granulares [van Pelt, 1997].

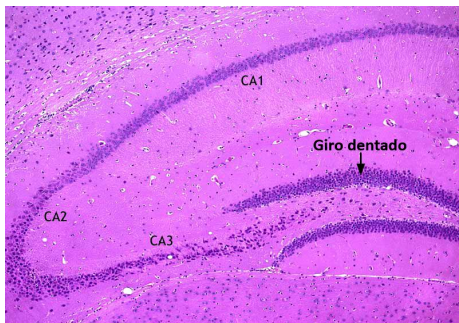
### **3.3.2.b. Subículo**

El subículo fue descrito originalmente por Ramón y Cajal en 1911, aunque sus características no permitían diferenciarlo con claridad, de la zona de transición con la capa CA1 del Hy. Posteriormente, las extensas descripciones de Rose y colaboradores en el cerebro del ratón [Rose, 1929] han permitido identificar y diferenciar a la perfección este área. El Sub comparte la estructura citoarquitectónica del Hy, con características de allocortex, es decir, se divide en tres capas claramente diferenciadas, aunque en el caso del ratón sus características citoarquitectónicas no han sido muy estudiadas. En la actualidad se delimita su frontera con la capa CA1 del Hy, gracias al ensanchamiento de la capa de las células piramidales y a la pérdida abrupta de la tinción para el anticuerpo Calbindina, que está presente en la células piramidales de la capa CA1 [Slomianka, 1991].

### **3.3.2.c. Hipocampo**

Anatómicamente, el Hy es una prolongación del extremo de la corteza cerebral. Se puede distinguir como una zona, donde el córtex se estrecha en una capa única de neuronas densamente empaquetadas, que se recurvan de forma muy apretada.

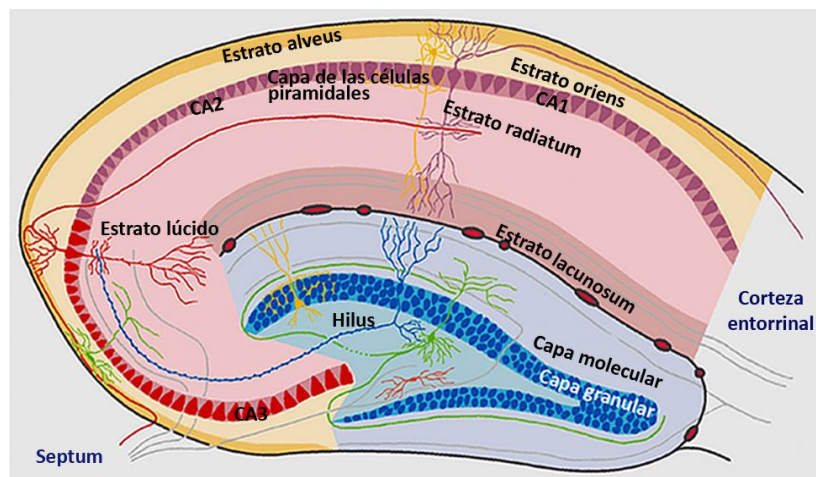
Comprende porciones ventrales y dorsales, compartiendo ambas una composición similar, pero siendo partes de diferentes circuitos neurales [Watson, 2011].



**Imagen 6.** Hematoxilina-Eosina de un corte sagital de cerebro de ratón adulto. Observamos el giro dentado y el hipocampo con las tres zonas de la capa de las células piramidales CA1, CA2 y CA3.

Al principio, Ramón y Cajal dividió esta zona en dos áreas, una pequeña región más distal que llamó regio superior y una región proximal más grande que denominó regio inferior. Posteriormente, Rose dividió al Hy en 5 regiones diferentes a las que denominó h1 - h5 [Rose, 1929]. Sin embargo, en la actualidad, se sigue la nomenclatura de Lorente de Nó, que dividió al Hy en tres capas, CA1, CA2 y CA3 (ver **imagen 6**) [Lorente de Nó, 1933; Lorente de Nó, 1934]. Las tres capas muestran diferencias intrínsecas y extrínsecas en cuanto a su conectividad, además, gracias a la información citoarquitectónica y química adicional, se establecen con gran fiabilidad las fronteras entre las tres capas [Bartesaghi, 2004; Lein, 2007].

La organización laminar es, en general, similar en las diferentes capas que constituyen el Hy (ver **esquema 24**).



**Esquema 24.** Esquema del hipocampo y del giro dentado. Observamos todas las capas que componen ambas estructuras. Se puede ver como el Hy está formado por 1) la capa de las células piramidales, 2) el estrato *oriens*, 3) el estrato *alveus*, 4) el estrato lúcido, 5) el estrato radiado y por último 6) el estrato *lacunosum*. Modificado de [<http://anatomie.vetmed.uni-leipzig.de>].

**1)** La **capa de las células piramidales** es la capa principal. Esta capa contiene el soma de las células piramidales del Hy, que son las neuronas más importantes de todo el

área. La mayoría de las células piramidales extienden un árbol dendrítico basal hacia el estrato *oriens* y un árbol dendrítico apical hacia estrato molecular y la fisura del Hy. Además, las células piramidales tienen en sus proximidades, una población heterogénea de células en cesta de varios tipos y tamaños, que tienen sus somas situados en la capas de las células piramidales. En los ratones, al igual que en otros mamíferos, el axón de las células piramidales se extienden transversalmente desde el soma celular, hasta llegar al estrato *alveus* que es por donde se extienden (ver **esquema 24**) [Jinno, 2006].

**2)** El **estrato *oriens*** es la capa que está por encima de la capa de las células piramidales (ver **esquema 24**). Contiene dendritas de varios tipos celulares incluyendo el árbol dendrítico basal de las neuronas piramidales. También se caracteriza por tener algunas **interneuronas** intrínsecas cuyos axones no salen del Hy. La mayor parte de estas interneuronas son las denominadas **células en cesta**, que se relacionan con 200 - 500 neuronas piramidales y son GABAérgicas. Los primeros estudios de Ramón y Cajal realizando técnicas de Golgi, demostraron que hay una gran variedad de tipo de células no piramidales en los estratos *oriens*, *radiatum* y *lacunosum*. La mayoría de estas células son interneuronas y además son GABA positivas, como es el caso de las células en cesta. En Hy del ratón, el número de células GABAérgicas es similar al existente en el GD y aumenta de manera dorso-ventral [Jinno, 2006].

**3)** El **estrato *alveus*** (o también llamado sustancia blanca) es la capa más superficial y el estrato más rico en fibras. Por este estrato salen los axones de las células piramidales para realizar las conexiones (ver **esquema 24**) [Jinno, 2006].

**4)** En la capa CA3 existe una zona acelular estrecha que se llama **estrato lúcido**, que se encuentra justo por debajo de la capa de las células piramidales (ver **esquema 24**), este estrato acelular es estrecho y contiene los axones de las células musgosas del GD. En el extremo distal del estrato lúcido hay un ligero engrosamiento de la capa, este engrosamiento final delimita la frontera entre las capas CA3 y CA2 [Jinno, 2006].

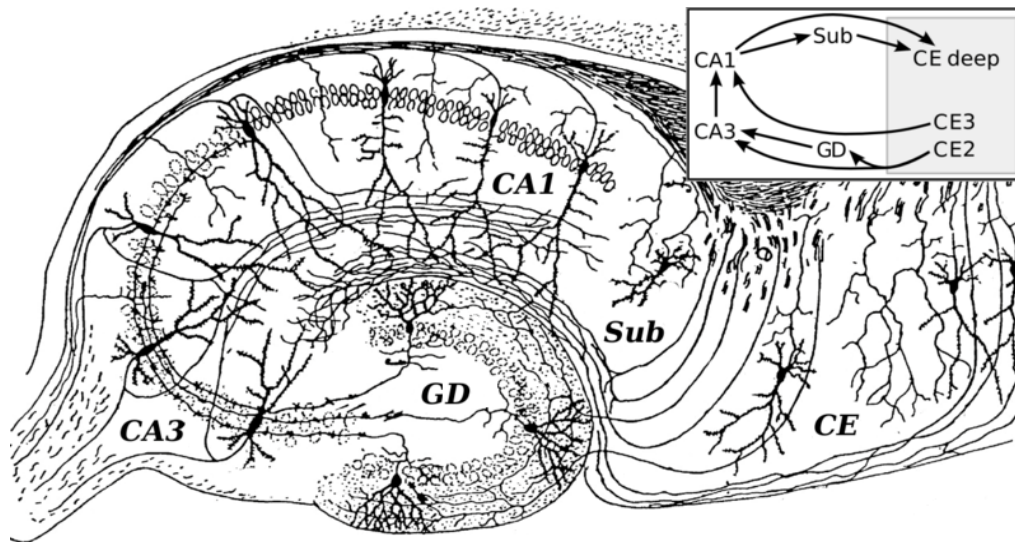
**5)** Por debajo de la capa de las células piramidales, en las zonas CA1 y CA2, se encuentra el **estrato radiado** o ***radiatum***, que es un estrato acelular y está formado por las dendritas apicales de las neuronas piramidales. Se sabe que este estrato contiene la mayoría de las conexiones de asociación. (ver **esquema 24**) [Jinno, 2006].

**6)** El **estrato** más profundo se conoce como **molecular** o ***lacunosum*** y es el estrato que está más próximo a la fisura del Hy. Este estrato está compuesto por las ramificaciones más distales de las dendritas apicales de las neuronas piramidales y contiene las fibras de la vía de la corteza entorrinal (CE) (ver **esquema 24**) [Jinno, 2006].

### 3.3.3. Conectividad del hipocampo

Las conexiones de las células piramidales de la capa CA3 llegan hasta los axones colaterales que ayudan a distribuir las fibras dentro del Hy (en las capas CA1-CA3) y en el Hy contralateral (gracias a la comisura hipocampal) (ver **esquema 25**). Un

pequeño número células de la capa CA3 y células con disposición proximal de la capa CA2, inervan hacia el hilio del GD. Las proyecciones de las capas CA3 y CA2 son normalmente llamadas conexiones de asociación, mientras que las de la capa CA1 se denominan como colaterales de Schaffer. Todas estas conexiones muestran un patrón altamente ordenado [Martinez, 2005; Otal, 2006].



**Esquema 25.** Esquema de todo el sistema de conexiones de la formación hipocámpica (hipocampo, giro dentado y subículo) con la corteza entorrinal. Tomado de <http://asus.usal.es> y modificado de Santiago Ramón y Cajal.

La densidad y la extensión de la conectividad en la zona CA3, está inversamente relacionada con la posición de los somas de las neuronas piramidales en el eje distal, de manera independiente a la posición dorso-ventral. Las fibras asociativas de la capa CA3 están restringidas tanto en el eje distal, como en el dorso-ventral [Tang, 2006].

La capa CA2 es una zona estrecha que se encuentra en la posición distal, al final de donde se localizan las proyecciones de las fibras musgosas. Aunque las células piramidales de la capa CA2 parecen similares a las de la capa CA3, carecen de *thorny excrescences* que son exclusivas de las células piramidales de la capa CA3. La conexiones de la capa CA2 se asemejan a la de las porciones más distales de la capa CA3 (ver **esquema 25**). No se conocen muchos datos de las conexiones en la capa CA2 de roedores, aunque se ha podido describir que la capa CA2 recibe una inervación muy prominente del hipotálamo posterior, en particular del núcleo tuberomamilar y de la zona supramamilar [Sakurai, 2007].

La proyección principal que surge de las neuronas piramidales de la capa CA1 tiene una disposición topográfica similar a la del Sub adyacente. Los axones descienden hasta el estrato *oriens* o al estrato *alveus*, a continuación, se curvan bruscamente hacia el Sub donde vuelven a entrar y se ramifican en la capa de las células piramidales y en la parte más profunda del estrato molecular (ver **esquema 25**). Varios estudios han mostrado que esta proyección muestra una marcada columna topológica a lo largo del eje transversal, así una célula o un grupo de células del tercio proximal de la capa CA1, proyectan al tercio distal del Sub, y de manera inversa, las células de del tercio distal de la capa CA1 proyectarán hacia el extremo proximal del

Sub. Las células de la porción medial de la capa CA1 se centrarán en la correspondiente porción del Sub. Hay que tener en cuenta que una sola célula proporcionará un conjunto de axones colaterales que abarcan alrededor de un tercio de la extensión transversal del Sub. Todo ello, en conjunto, indica que la proyección entre la capa CA1 y el Sub, se realiza en segmentos de tercios. La organización de la conectividad entra la capa CA1 y el Sub aparece con el origen y la distribución terminal de las conexiones recíprocas de la CE. La proyección de la capa CA1 al Sub, así como la de la capa CA3 a la capa CA1, parece divergir a lo largo del eje longitudinal [Witter, 2006].

La capa CA1 recibe una gran variedad de entradas corticales y subcorticales, que con algunas excepciones no se han analizado en profundidad en los ratones. La principal entrada cortical surge de la CE. Estas proyecciones terminan de forma masiva en el estrato *lacunosum* e inervan principalmente al nivel dorso-ventral, con preferencia por el nivel intermedio. Dos tercios de la parte ventral de la capa CA1, y más en particular la mitad distal adyacente al Sub, recibe una entrada importante del complejo amigdalino [Tang, 2006].

La capa CA1 tiene más proyecciones extrínsecas que las capas CA2 y CA3. La capa CA1 no recibe sólo entradas del área septal lateral, sino también recibe entradas desde la capa CA3 y desde áreas subcorticales y corticales. La capa CA1 es similar al Sub, con el que comparte la mayor parte de sus proyecciones. Sin embargo, la capa CA3 posee proyecciones con una organización similar al área septal lateral [Witter, 2007].

La CE es la mayor fuente de aferencias del Hy y también el objetivo de sus eferencias, y está conectada de forma fuerte y recíproca con otras áreas de la Cx, por ello actúa como la mayor interfaz entre el Hy y otras partes del cerebro. Las capas superficiales de la CE proporcionan el *input* más importante al Hy, y las capas profundas de esta estructura el *output* más prominente. En el interior del Hy el flujo de información es en gran medida unidireccional, como hemos visto anteriormente, con señales que se propagan a través de las capas de células, primero en dirección al GD, después a la capa C3 y posteriormente a la C1, siguiendo por el Sub y finalmente saliendo del Hy hacia la CE (ver **esquema 25**) [Tang, 2006].

Otras conexiones menos destacadas, también desempeñan papeles importantes en las funciones del hipocampo. Más allá de las eferencias hacia la CE, existen otras rutas eferentes hacia diferentes áreas corticales, como puede ser el córtex prefrontal y zonas eferentes hacia el área septal lateral. El Hy recibe entradas de información moduladoras de los sistemas serotoninérgico, dopaminérgico y de la norepinefrina, así como del nucleus *reuniens* del tálamo. Una proyección muy importante procede del área medial septal, que envía fibras colinérgicas y GABAérgicas hacia todas las partes del Hy. La región cortical adyacente al Hy se conoce como la circunvolución parahipocampal. Incluye la CE y también la corteza perirrinal, que tiene un importante papel en el reconocimiento visual de objetos [Eichenbaum, 2007].

### 3.3.4. Función

Aunque la teoría inicial radicaba en que el Hy estaba implicado en funciones olfativas, estudios posteriores demostraron que esto era falso. En la actualidad se identifica que el Hy está relacionado con funciones implicadas en tres teorías: la inhibición de la conducta, la memoria y la percepción espacial.

### **1) Inhibición de la conducta**

Esta teoría tuvo una gran popularidad en los años 60. Se basa principalmente en la observación de que a los animales que se les provoca algún tipo de lesión en el Hy, tienen problemas para inhibir respuestas que previamente se les había enseñado. Jeffrey Gray desarrollo esta teoría con un ensayo muy amplio sobre el papel del Hy en la ansiedad. Hoy en día esta teoría, es la menos aceptada de las tres propuestas [Best, 1999].

### **2) Memoria**

Esta teoría está basada en el famoso artículo de Scoville y Milner, en el que se describe la intervención quirúrgica para la eliminación del Hy, con el fin de aliviar los ataques epilépticos de un paciente, siendo el resultado de la operación una grave amnesia anterógrada y una amnesia retrógrada parcial. El paciente tras la operación era incapaz de recordar nuevos episodios, del mismo modo que era incapaz de recordar justo lo sucedido antes de la misma. Sin embargo era capaz de retener recuerdos de su infancia [Scoville, 1957]. Posterior a este trabajo, se realizaron muchos estudios a otros pacientes con niveles similares de daño en el Hy o con amnesia producida por accidente o por enfermedad [Best, 1999].

Actualmente se afirma que el Hy tiene un papel importante en la formación de nuevos recuerdos de los acontecimientos experimentados. También se conoce que las lesiones severas en el Hy producen dificultades en la formación de nuevos recuerdos (amnesia anterógrada) así como problemas en los recuerdos formados antes de las lesiones (amnesia retrógrada). Por ello se concluye que existe una transferencia de recuerdos desde el Hy a otras partes del cerebro [VanElzakker, 2008].

Hay que tener en cuenta que daños en el Hy no afectan a determinados tipos de memorias, como es la capacidad de adquirir nuevas competencias motoras [Diana, 2007].

### **3) Percepción espacial**

O'Keefe y colaboradores descubrieron en 1971, que ciertas neuronas de Hy de rata mostraban una actividad relacionada con la localización de la rata en su entorno [O'Keefe, 1971]. A pesar de que en aquella época crearon mucho escepticismo por parte de la comunidad científica, este grupo siguió trabajando en el proyecto y en 1978 escribieron un libro muy conocido en la actualidad "*The Hippocampus as a Cognitive Map*". En la actualidad se admite de manera casi universal, que el Hy desempeña un papel fundamental en la codificación espacial.

Estudio llevados a cabo en ratas y en ratones que se mueven libremente, han demostrado que algunos tipos de neuronas del Hy, desencadenan potenciales de acción cuando el animal pasa por un lugar concreto de su entorno. Estas evidencias en primates son más limitadas, debido a la dificultad de registrar la actividad cerebral, cuando los monos se mueven libremente, sin embargo, se ha registrado actividad neuronal a nivel del hipocampo, relacionada con el lugar donde los monos de experimentación transitaban dentro de la habitación cuando se les limitaba el movimiento [Matsumura, 1999].

Los estudios, que han observado los resultados en los entornos concretos de roedores, se han realizado con las respuestas de las células piramidales del Hy y con

las células granulares del GD. Las interneuronas inhibitoras muestran variaciones significativas dependientes del lugar, pero mucho más débiles de lo que mostraron previamente las neuronas piramidales o las células granulares. Las células implicadas en estos estudios, permanecen silentes cuando el animal se mueve en un entorno desconocido, pero alcanzan niveles de actividad elevados cuando el ratón se mueve dentro de un entorno que reconoce [Moser, 2008]. En algunos casos se ha comprobado que la tasa de disparo de las células del Hy dependen no sólo del lugar, sino también de la dirección en la que se mueve el animal, el destino u otras variables relacionadas con la tarea que realiza [Smith, 2006].

Todos los experimentos anteriores condujeron a la teoría de que el Hy puede actuar como un mapa cognitivo, es decir, una representación neural del esquema espacial del entorno. Hay que tener en cuenta, que un ser humano sin un Hy plenamente funcional, no recordaría donde ha estado ni como llegar al lugar donde se dirige. La sensación de extravío es uno de los síntomas más comunes tras una lesión en el Hy [Chiu, 2004]. Estudios con animales han mostrado que se requiere un Hy intacto para algunas tareas de memoria espacial, en particular aquellas que precisan encontrar un camino con un objeto oculto [Morris, 1982].

### 3.4. Corteza cerebral

Aunque muchas de las funciones que mantienen la vida están controladas por regiones de la médula espinal, el tronco del encéfalo y el diencefalo, es la **corteza cerebral** la responsable de gran parte del planteamiento y de la ejecución de las acciones de la vida cotidiana [Kandel, 2001].

La Cx del ratón está bordeada por arquicorteza medialmente y por allocorteza de manera lateral. Está dominada por una gran extensión de neocortex, aproximadamente entre 120 a 130 mm<sup>2</sup> de superficie en un promedio de 112 mm<sup>3</sup> de volumen, que deriva del palio dorsal del telencéfalo [Gaglani, 2009].

#### 3.4.1. Anatomía externa

La Cx tiene una forma muy plegada constituida por *cisuras* y *surcos*, que se encuentran separados por *circunvoluciones*. Se desconoce la razón exacta de este plegamiento, aunque se sugiere que se ha producido para acomodar al gran número de células que posee. El espesor de la corteza varía sustancialmente entre las diferentes especies, aunque suele estar en torno de 1 a 5 mm. Sin embargo, como es lógico, el área de superficie es mucho mayor en primates superiores, en especial en el cerebro humano [Kandel, 2001].

La Cx de todos los mamíferos, incluidos los roedores, se divide en cuatro lóbulos principales denominados por los huesos que los cubren: frontal, parietal, temporal y occipital (ver **imagen 7**).

**a) El lóbulo temporal** se sitúa en la parte lateral e inferior de la corteza. Interviene en el habla y el sentido del olfato. Se relaciona mucho con episodios epilépticos.

**b) El lóbulo frontal** es la porción más voluminosa de la Cx, se sitúa en la parte delantera de los hemisferios cerebrales.

**c) El lóbulo parietal** está situado en zona lateral, superior y media de la corteza.

d) El **lóbulo occipital** es la parte posterior de la Cx, por detrás de los surcos perpendiculares externo e interno y de la incisura preoccipital.

Además, existen el denominado lóbulo de la ínsula, pero está menos estudiado que los cuatro lóbulos principales [Rakic, 1988].

En el caso de los humanos, los lóbulos están definidos de forma marcada por surcos llamativos de la Cx, cuya posición es relativamente constante en los diferentes cerebros. Las muescas más conocidas son: a) la *cisura de Silvio* o *surco lateral* que separa el lóbulo temporal de los lóbulos frontal y parietal, b) la *corteza de la ínsula*, que forma el límite medial del surco lateral y c) la *cisura central* o *de Rolando*, que discurre por la parte medial y lateral sobre la superficie dorsal del hemisferio y separa los lóbulos frontal y parietal [Bear, 1998].

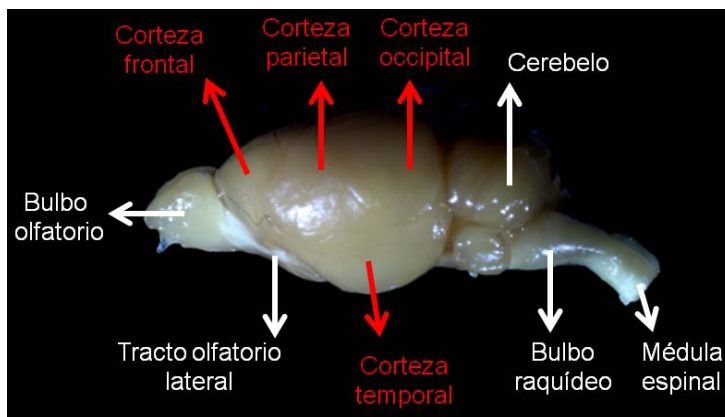


Imagen 7. Vista lateral de un encéfalo de ratón adulto. En la fotografía se pueden observar varias estructuras, nosotros hemos destacado la localización de los cuatro lóbulos que constituyen la corteza cerebral.

### 3.4.2. Anatomía interna

#### 3.4.2.a. Organización estructural de la corteza cerebral

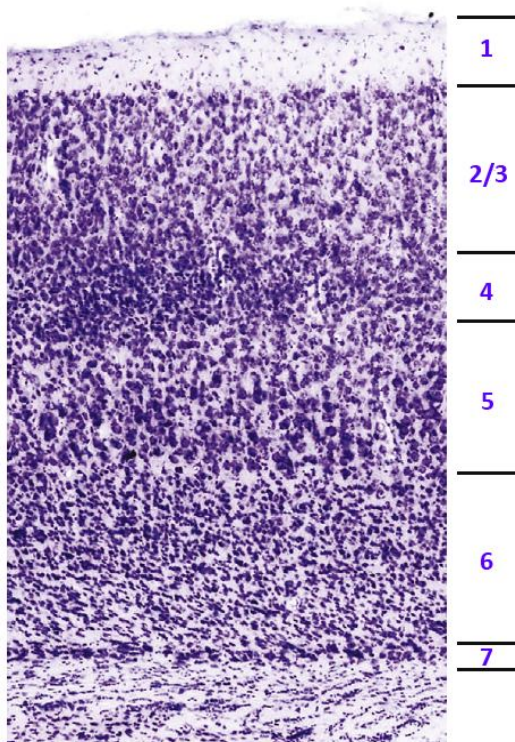
La Cx, por encima de todo, está organizada en capas celulares; este principio organizador proporciona un ensamblaje específico que limita la forma en la que conectan las neuronas, maximizando el potencial conectivo de los circuitos neuronales. Todo ello, apoya la idea de que la Cx posee una extraordinaria capacidad de adaptación. La estructura en capas es fundamental para la anatomía y la función de la Cx [Watakabe, 2007].

La posterior formación de conexiones, así como de circuitos, depende de la experiencia y de la actividad de cada individuo, sin embargo, la organización laminar de la Cx se conserva. Se ha comprobado que cuando la organización laminar se rompe o las capas se invierten, aunque las neuronas puedan realizar conexiones, la funcionalidad resultante está gravemente comprometida y el resultado no es mucho mejor que cuando se carece de Cx al completo [Zhou, 2010].

Hay muy pocas publicaciones que caractericen poblaciones de células gliales específicas para cada uno de los estratos de la Cx, por lo tanto, las descripciones particulares de cada capa se llevan a cabo teniendo en cuenta, los tipos y las características de las neuronas que se encuentran en cada una de ellas. Se considera que una neurona se encuentra en una capa, cuando en ese estrato está situado su soma o sus dendritas proximales, ya que su axón y sus dendritas distales, normalmente se extienden a través de varias capas [Takasaki, 2010].



A modo de resumen, podemos indicar que la Cx está dominada por las neuronas piramidales, que son excitatorias y tienen un gran número de espinas dendríticas para recibir todas las entradas, llevando a cabo la difusión de la información a través de los axones de manera lateral y radial. Además de estas neuronas excitatorias existe una gran variedad de interneuronas inhibitorias que coordinan la actividad cortical en complejos patrones. La forma más típica de la Cx de un ratón adulto, está organizada en 7 capas (ver **imagen 8**):



**Imagen 8.** Capas de la corteza cerebral de ratón adulto. Sección sagital en la que se ha realizado la Tinción de Nissl para distinguir las diferentes poblaciones celulares, y consecuentemente las capas.

### **1) Estrato plexiforme externo o estrato molecular**

Es una capa fina situada en el borde más exterior de la corteza. Se encuentra justo debajo de la piamadre y de la glía limitante. Está casi desprovista de neuronas. Se compone en gran parte de los somas de las células Cajal-Retzius y de sus axones, así como de las dendritas apicales de las neuronas piramidales, cuyos somas se encuentran en una capa más profunda y glía.

La capa 1 es principalmente un punto de encuentro para modular las influencias sobre las neuronas de las capas más profundas. Muchas neuronas inhibitorias, de capas más profundas (de las capas 2/3, 5 y 7) envían axones a la capa 1 para hacer sinapsis con las dendritas apicales de las neuronas piramidales. Amplias proyecciones talámicas también penetran en el estrato molecular para modular la excitación de gran parte de la corteza [Douglas, 2007].

### **2/3) Estrato supragranular piramidal**

La capa 2/3 tiene una población variada de neuronas, en su mayoría pequeñas células piramidales, que están involucradas en la actividad local y corticocortical, y algunas células esféricas de pequeño tamaño denominadas granos. En comparación con

los primates la capa supragranular de la corteza de ratón, es más delgada y está menos diferenciada. En consecuencia, la capa 2/3 se trata como una sola capa en la corteza de ratón, aunque hay signos de segregación funcional dentro de la capa [Bureau, 2006].

Las células piramidales de la capa 2/3 proyectan a las partes adyacentes de la Cx, así como al cuerpo calloso. En la corteza motora, estas células también conducen la proyección subcortical de las neuronas de la capa 5 [Fame, 2011].

Entre las interneuronas de la capa 2/3 encontramos las *células en candelabro* que regulan el disparo de la señal en los axones de las neuronas piramidales y las *células en cesta* que modulan la excitabilidad de las células piramidales. Estos dos tipos de neuronas pueden ser neurogliaformes, bipolares o empenachadas y forman extensas redes acopladas por *gap junctions* para mejorar la sincronía y la coordinación entre grandes zonas de la capa 2/3 [Miyoshi, 2010].

En las neuronas de la capa 2/3 destaca su expresión de Cux2 [Ferrere, 2006] que es un factor que controla la ramificación dendrítica y la formación de sinapsis [Cubelos, 2010].

#### **4) Estrato granular**

Aunque al principio se pensaba que los ratones carecían de este estrato, posteriormente se demostró que esa teoría era errónea. En las regiones sensoriales, la capa 4 es prominente, y es el principal destino de las fibras tálamocorticales. El estrato granular contiene mayoritariamente las denominadas *células estrelladas espinosas*, que fueron identificadas por Lorente de Nó [Lorente de Nó, 1933; Lorente de Nó, 1934]. Las aferencias talámicas es la entrada extracortical más potente de la capa 4 y pueden ser tan numerosas como para llegar a distorsionar la estructura de *barrel field* típica de la corteza somatosensorial [Sehara, 2010]. En el caso de los ratones, en la capa 4, las proyecciones de las neuronas piramidales al cuerpo calloso se intercalan con las proyecciones que reciben las células estrelladas espinosas del tálamo. Este estrato también contiene las dendritas apicales de las neuronas piramidales de la capa 6 [Ledergerber, 2010].

#### **5) Estrato piramidal profundo**

La capa 5 se caracteriza por contener las *neuronas piramidales* más grandes de la Cx, que proyectan sus axones a una gran variedad de objetivos corticales y subcorticales. También existe una menor población de neuronas con proyecciones callosas-corticocorticales que se distribuyen a través de toda la capa. [Larsen, 2008].

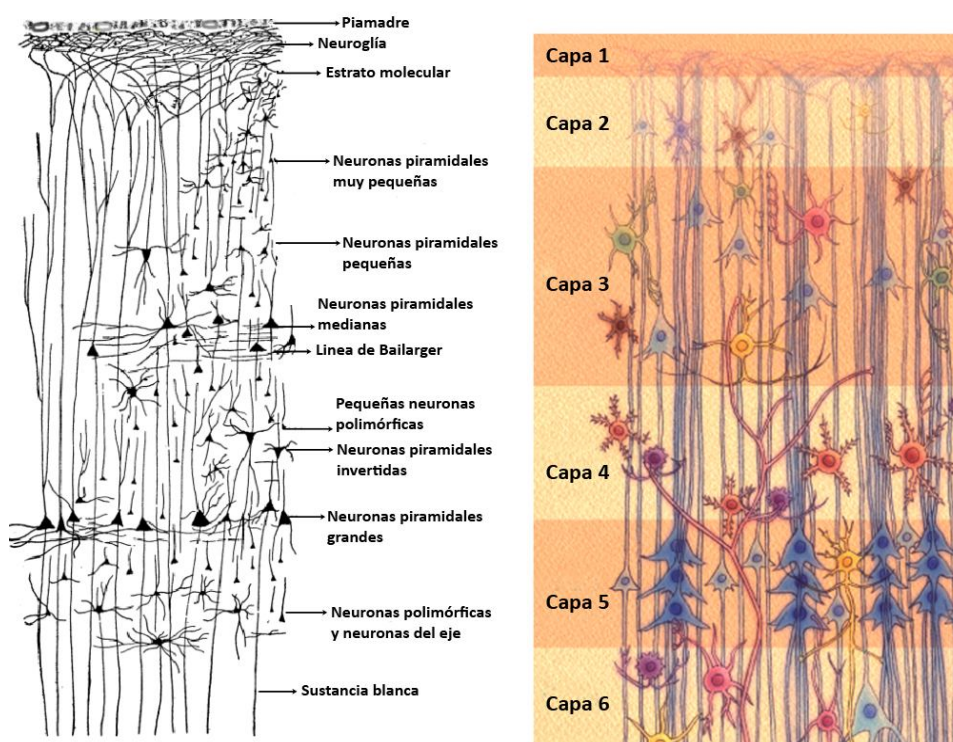
Los axones de este estrato tienen como destino diferentes estructuras subcorticales, de las cuales destacamos cuerpo estriado, mesencéfalo, tronco cerebral, núcleos del puente y médula espinal. Sobre la base de las proyecciones del estrato, la capa a menudo se divide como **5A corticoestriatal** y **5B corticoespinal** [Anderson, 2010].

#### **6) Estrato polimórfico**

La capa 6 es principalmente una capa de salida, donde se originan el mayor número de fibras corticotalámicas y donde se recibe a cambio una importante proyección talámica. Las proyecciones talámicas específicas de la capa 6 también se

dirigen a los núcleos eferentes de esa región, al contrario que la capa 5, ya que envía proyecciones talámicas no recíprocas. En este estrato también se ha encontrado proyecciones que se dirigen a regiones adyacentes ipsilaterales y distantes, así como a las células locales de otras capas que pueden modular la actividad talámica entrante [Lam, 2010].

La capa 6 suele ser bastante gruesa en el ratón adulto, a menudo ocupa una gran fracción de la profundidad cortical gracias a su amplia gama morfológica en las neuronas, ya que las células pueden ser horizontales, invertidas o fusiformes. Tenemos que tener en cuenta, que en este estrato, entre las *neuronas piramidales* encontramos una población de interneuronas que son principalmente *células en cesta* (ver *esquema 26*) [Zhang, 1997].



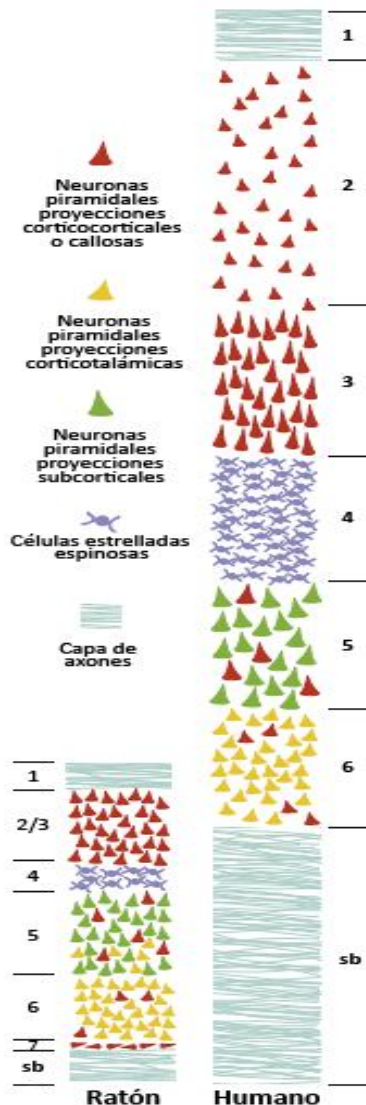
**Esquema 26.** Esquema donde se pueden ver las 6 capas de la corteza cerebral que se han identificado en el encéfalo humano: *capa 1* o *estrato molecular*, *capa 2* o *estrato granuloso externo*, *capa 3* o *estrato piramidal externo*, *capa 4* o *estrato granuloso interno*, *capa 5* o *estrato piramidal interno* y *capa 6* o *estrato polimorfo*. Destacamos la presencia de las células piramidales grandes en la capa 5. Podemos observar el detalle de que no existe la capa 7, a diferencia del ratón. Modificado de [<http://chronopause.com>].

### **7) Estrato subgriseo**

Sólo en el caso de los roedores, a continuación de la capa 6, hay un delgado estrato de células que persiste en muchas regiones corticales. En ratones, estas células han sido identificadas como una capa diferente, la capa 7 (ver *esquema 27*). Estas células poseen unas proyecciones que tienen objetivos específicos, incluyendo la capa 1 y el cuerpo calloso y sus propiedades son muy diferentes a las existentes en las otras capas.

En ratones, el borde lateral rostral del estrato subgriseo se fusiona con el *claustrum*, sin embargo, en otras especies, inclusive de roedores, estas dos estructuras

son totalmente diferentes. En los ratones, el factor de crecimiento de tejido conectivo se expresa selectivamente en un conjunto de neuronas exclusivo de la capa 7 y del núcleo endopiriforme dorsal, pero no en el claustrum [Heuer, 2003].



Esquema 27. Aunque las capas de corteza cerebral entre el ratón y el humano son homólogas al referirnos a sus componentes celulares y a sus objetivos de proyección, son muy diferentes cuando nos centramos en el espesor individual de cada una de ellas, del mismo modo que es muy diferente, el espesor total de la corteza. Tenemos que tener en cuenta que también difieren en el sentido de que en el ratón las capas 2 y 3 se consideran una única capa (capa 2/3) y además la capa 7 o sustrato subgriseo sólo está presente en el ratón. Modificado de [Fame, 2011].

### 3.4.3. Función

Como explicamos al principio de este apartado, la Cx de todos los mamíferos, se divide en cuatro lóbulos principales, y en términos generales, cada uno de ellos tiene una función diferente: **a) El lóbulo temporal** contiene neuronas que captan cualidades sonoras en la corteza auditiva primaria y se relaciona mucho con episodios epilépticos. **b) El lóbulo frontal** interviene en las características de la personalidad y en el movimiento, contiene principalmente a la corteza motora primaria en la cual se encuentran las neuronas que controlan los diferentes músculos del cuerpo. **c) El lóbulo parietal** ayuda a identificar objetos y a comprender las relaciones espaciales (dónde está situado el cuerpo en comparación con los objetos que lo rodean). Este lóbulo también interviene en la interpretación del dolor y del tacto en el cuerpo porque aloja a la corteza somatosensorial primaria, compuesta por neuronas relacionadas con el tacto y neuronas relacionadas con la comprensión del lenguaje y la integración de la

información relacionada con la memoria y el aprendizaje. **d)** El **lóbulo occipital** contiene la corteza visual primaria que está localizada en la parte posterior y procesa la información visual que llega de la retina [Rakic, 1988].

La **corteza cerebral sensitiva** recibe aferencias desde el tálamo. Hay tres tipos de áreas corticales sensitivas: **a)** receptoras a la que llegan los estímulos desde el tálamo, **b)** perceptoras en las que se relacionan los estímulos recibidos y **c)** gnósticas en las que se comparan los estímulos recibidos con los conocidos previamente. La **corteza sensitiva somatosensorial** se localiza en el lóbulo parietal. La **corteza sensitiva visual** se localiza en el lóbulo occipital. La **corteza sensitiva acústica** se localiza en el lóbulo temporal. La **corteza sensitiva estático-postural y vestibular** se localiza en el lóbulo temporal. La **corteza sensitiva gustativa** se localiza en el lóbulo de la ínsula. La **corteza olfativa** afecta al rinencéfalo, directamente al bulbo olfativo, áreas septales, corteza piriforme, hipocampo y complejo amigdalino e, indirectamente, a la circunvolución pericallosa [Kandel, 2001].

Muchas áreas de la Cx se ocupan fundamentalmente del procesamiento de la información sensitiva o de la emisión de órdenes motoras. Además, un área dedicada a una modalidad sensitiva concreta o a la función motora comprende varias áreas especializadas con diferentes funciones en el procesamiento de la información. Estas áreas se conocen como áreas sensitivas o motoras primarias, secundarias o terciarias, dependiendo de su proximidad a las vías sensitivas o motoras periféricas. La corteza motora primaria es la mediadora de los movimientos voluntarios y se denomina primaria porque contiene neuronas que proyectan directamente hacia la médula espinal para activar las neuronas motoras somáticas. Las áreas sensitivas primarias reciben gran parte de su información directamente desde el tálamo, sólo hay unas escasas escalas sinápticas interpuestas entre el tálamo y los receptores primarios. Cada área sensitiva primaria transmite información a un área vecina de orden superior o área de asociación unimodal que depura la información [Matyas, 2010; Mitchell, 2005].

El almacenamiento de la memoria explícita relaciona la Cx con el Hy. Primero se adquiere la información por procesamiento de alguna de las 3 áreas de asociación polimodal: **a)** corteza parieto-occipito-temporal, **b)** corteza prefrontal y **c)** corteza límbica. Después, las áreas de asociación polimodal o multimodal integran la información de 2 o más áreas sensitivas unimodales, y la coordinan con los planes de acción llevados a cabo por el encéfalo [DeFelipe, 2002; Theyel, 2010].

## 4. Funciones de APC/C en el sistema nervioso

### 4.1. Diferenciación neuronal

En el año 1999, Gieffers y colaboradores [Gieffers, 1999] demostraron la expresión de diferentes subunidades de APC/C, así como de Cdh1, en el cerebro de los mamíferos, concretamente en las neuronas. Posteriormente, trabajos de nuestro grupo mostraron que APC/C-Cdh1 media la diferenciación neuronal inducida por ácido retinoico en células de neuroblastoma humano SHSY5Y. En dichos trabajos se comprobó que el ácido retinoico induce la acumulación nuclear de Cdh1 y, paralelamente, produce la desestabilización de Skp2 y la acumulación de p27. Además, el ácido retinoico es capaz de disminuir los niveles del ARNm de la proteína Rae-1, que es un factor de exportación nuclear que limita la actividad de APC/C-Cdh1 en mitosis. Por ello, se facilita la degradación de Skp2, la parada del ciclo celular y la

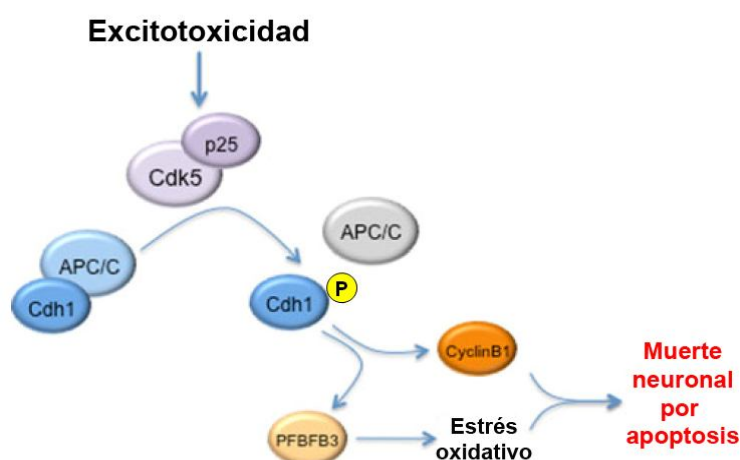
diferenciación de las células de neuroblastoma hacia células de fenotipo neuronal [Cuende, 2008].

Recientemente, hemos demostrado que APC/C-Cdh1 coordina la neurogénesis y el tamaño de la Cx. En este sentido, se sabe que la morfología del cerebro adulto es el resultado de un delicado equilibrio entre la proliferación de los progenitores neurales y la iniciación de la neurogénesis en el periodo embrionario. En estadios tempranos del desarrollo de la Cx, las células progenitoras se dividen simétricamente con objeto de mantener la población de células progenitoras y esto ocurre en las dos zonas neurogénicas de la Cx denominadas como zona ventricular y zona subventricular, sin embargo, en estadios más tardíos del desarrollo estos progenitores neurales se dividen asimétricamente, generándose neuronas diferenciadas. No obstante, la neurogénesis es un proceso complejo en el cual se desconocen los mecanismos moleculares que regulan la salida de ciclo celular con el comienzo de los procesos de diferenciación [Delgado-Esteban, 2013]. En este trabajo, hemos podido demostrar que la duración del ciclo celular es un factor clave en el control del equilibrio entre el mantenimiento de los progenitores y la diferenciación neuronal. De hecho, se ha confirmado que la actividad del complejo ubiquitina ligasa APC/C-Cdh1 es esencial no sólo para la diferenciación de las neuronas corticales *in vitro* sino también para la neurogénesis *in vivo*. En estos estudios, se utiliza un modelo de ratón *knockout* (KO) para Cdh1 específico de embrión (Sox2-Cre condicional) y se muestra la importancia del estado fosforilado de Cdh1 en la diferenciación neuronal y la supervivencia *in vitro*. Así mismo, se demuestra que la eliminación genética de Cdh1 impide la capacidad de APC/C para promover neurogénesis ya que se interrumpe la coordinación entre la salida de ciclo de las células progenitoras con la diferenciación neuronal, tanto *in vitro* como *in vivo*. La pérdida de Cdh1 disminuye la duración de la fase G1 y aumenta la fase S del ciclo celular, produciendo estrés replicativo y muerte por apoptosis dependiente de p53, es más, la ausencia de p53 aumenta el estrés replicativo en las células progenitoras neurales del cerebro del ratón KO. Como consecuencia de la pérdida de la proteína, se produce una disminución del número de neuronas corticales y del tamaño de la corteza cerebral, indicando que el silenciamiento de Cdh1 produce la progresión aberrante del ciclo celular en las células progenitoras neurales y evita su salida del ciclo celular, impidiéndose así, su transformación en neuronas postmitóticas. Estos experimentos demuestran la implicación de Cdh1 en el control del tamaño cerebral, así como en el desarrollo de enfermedades congénitas del desarrollo cerebral tales como la microcefalia [Delgado-Esteban, 2013].

## 4.2. Supervivencia neuronal

En el año 2005, Almeida y colaboradores demostraron que Cdh1 desempeña una función esencial en la supervivencia de las neuronas, ya que previene su re-entrada en el ciclo celular al mantener bajos los niveles de ciclina B1. Por otro lado, la ausencia de Cdh1 en neuronas *in vitro*, inducida mediante ARN de interferencia (ARNi), provoca rápidamente la muerte neuronal por apoptosis. Estos autores comprobaron que los niveles de Cdc20 disminuyeron drásticamente a lo largo del proceso de diferenciación de estas células, y demostraron que Cdh1 es el cofactor de APC/C que está presente en neuronas. La actividad de APC/C-Cdh1 es esencial para mantener bajos los niveles de ciclina B1, impidiendo así una entrada aberrante de las neuronas en el ciclo celular y la subsecuente neurodegeneración [Almeida, 2005].

Otros estudios han relacionado un aumento en la expresión de ciclina B1 con los procesos de excitotoxicidad en neuronas corticales [Almeida, 2001; Maestre, 2008]. En condiciones fisiológicas, la neurotransmisión excitadora que ocurre a través de receptores de glutamato, desempeña un papel crucial en el desarrollo neuronal, la diferenciación y la plasticidad sináptica. Sin embargo, la excesiva y/o prolongada activación de los receptores de glutamato induce neurotoxicidad, proceso que se ha definido como excitotoxicidad [Olney, 1969]. Se ha descrito que durante estos procesos de excitotoxicidad las neuronas mueren de forma dependiente de los receptores NMDA [Almeida, 2001]. Más recientemente nuestro laboratorio ha demostrado que, tanto el aumento en las concentraciones de glutamato como la estimulación de los receptores NMDA promueven una acumulación de ciclina B1 en el núcleo neuronal, lo que culmina en la muerte por apoptosis [Maestre, 2008].



**Esquema 28.** APC/C-Cdh1 regula la apoptosis neuronal. La excitotoxicidad activa a Cdk5 y a p25, que fosforilan a Cdh1. La inactivación de APC/C-Cdh1 provoca la estabilización de la ciclina B1 y de la Pfkfb3. La estabilización de estas proteínas, induce a las neuronas postmitóticas, a llevar a cabo una entrada aberrante en el ciclo celular que conlleva al estrés oxidativo y a la muerte de las neuronas por apoptosis. Modificado de [Almeida, 2012].

Se han descrito incrementos en las concentraciones de ciclina B1 tanto en el cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer como en casos de accidentes cerebrovasculares y en otros procesos degenerativos, y estos incrementos se han asociado a la muerte neuronal inducida por excitotoxicidad [Almeida, 2012; Aulia, 2006]. El mecanismo que produce dicha acumulación implica directamente al estado de fosforilación de Cdh1, el cual depende de la actividad kinasa de Cdk5. Así, la estimulación de los receptores de NMDA provoca la activación de Cdk5, que a su vez fosforila Cdh1, translocándolo del núcleo al citoplasma. En consecuencia, se inhibe la actividad de APC/C, lo que induce la acumulación de ciclina B1 y la muerte de las neuronas por apoptosis (ver **esquema 28**) [Maestre, 2008]. Es interesante observar que Cdk5 fosforila a la Ser-1232 de la subunidad NR2A, del receptor NMDA, facilitando la transmisión sináptica mediada por el receptor NMDA. La liberación de glutamato de manera prolongada, produce la sobreactivación del receptor NMDA, como la que se observa en las enfermedades neurodegenerativas y en los accidentes cerebrovasculares.

Todo ello, podría conducir a un ciclo continuo de activación Cdk5 - NMDA, que contribuye a la neurodegeneración [Li, 2001]. Cabe destacar que Cdk5 es muy activa cuando se encuentra unida a p25, que es el producto proteolítico de p35 el cual, a su vez, se acumula en neuronas de pacientes con la enfermedad de Alzheimer [Almeida, 2012]. Así, Cdh1 podría tener una importante función en esta neuropatología.

### 4.3. Glucolisis

Las neuronas poseen una actividad glucolítica menor que los astrocitos y en la actualidad, se sabe que la proliferación celular va acompañada de la activación de la glucolisis. Además, las neuronas son incapaces de aumentar dicha actividad en determinadas condiciones fisiopatológicas tal y como se ha demostrado en nuestro laboratorio [Almeida, 2004; Bolaños, 2008; Bolaños, 2010]. Todo ello, es consecuencia de que la enzima 6-fosfofructo-2-kinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa (Pfkfb3) es prácticamente inexistente en estas células, al contrario de lo que sucede en las células gliales, principalmente en los astrocitos [Almeida, 2004]. La enzima Pfkfb3 genera fructosa-2,6-bisfosfato, que es un potente activador alostérico de la 6-fosfofructo-1-kinasa (PFK1), que es la principal enzima reguladora de la glucolisis [Herrero-Mendez, 2009].

Se ha observado que el silenciamiento de Cdh1 incrementa tanto el proceso glucolítico como la proliferación celular, mientras que la expresión de la proteína, impide que ambos procesos puedan llevarse a cabo [Almeida, 2010]. Asimismo, se ha descrito que APC/C-Cdh1 es el complejo responsable de regular los niveles proteicos de Pfkfb3 y, por tanto, la actividad glucolítica de las neuronas. Así, APC/C mantiene baja la actividad glucolítica neuronal, posibilitando la utilización de la glucosa para otras funciones, como es el mantenimiento de los sistemas antioxidantes de las células [Herrero-Mendez, 2009]. La enzima Pfkfb3 posee una secuencia KEN-*box*, con lo cual es un sustrato del complejo APC/C-Cdh1 [Herrero-Mendez, 2009]. La inhibición de la actividad de APC/C-Cdh1 produce la estabilización y acumulación de la enzima Pfkfb3, lo que estimula la glucolisis originándose una reducción de la disponibilidad de glucosa para la vía de las pentosas fosfato y afectando la producción de NADPH (H<sup>+</sup>) con el consiguiente deterioro de los sistemas antioxidantes que dependen del glutatión celular [Rodríguez-Rodríguez, 2012].

### 4.4. Sinapsis, memoria y aprendizaje

En el año 2004 se puso en manifiesto que el complejo APC/C-Cdh1 controla el desarrollo y la transmisión de sinapsis al regular la localización de los receptores de glutamato de tipo AMPA. En estos trabajos se ha visto cómo mutaciones producidas en distintas subunidades del complejo APC/C, de *Caenorhabditis elegans*, provocan el incremento de GLR-1 en las sinapsis, sin alterar la localización de otras proteínas sinápticas [Fu, 2011; Juo, 2004].

En el mismo año, van Roessel y sus colaboradores, estudiaron los efectos sinápticos de APC/C en *Drosophila*, definiendo distintas funciones tanto presinápticas como postsinápticas para APC/C-Cdh1. Estos autores demostraron que individuos carentes de la subunidad Apc2 del complejo APC/C, presentan un mayor tamaño sináptico en la unión neuro-muscular; este fenotipo es atribuible al incremento en el número de botones sinápticos. El complejo APC/C-Cdh1 ejerce su acción mediante la ubiquitinación de la Liprina- $\alpha$ , la cual controla la cantidad de botones sinápticos. Estos



estudios explican por un lado, que APC/C-Cdh1 posee función presináptica ya que interviene en la restricción del número de botones sinápticos, y por otro lado se le atribuye una función postsináptica en la restricción de la abundancia de receptores de glutamato, siendo clave su papel en el desarrollo y funcionamiento de las sinapsis [van Roessel, 2004].

Por otra parte, se ha podido comprobar que APC/C-Cdh1 tiene una gran implicación en la plasticidad sináptica, así como en los procesos de memoria y aprendizaje. Se han encontrado defectos en la potenciación a largo plazo en cortes de hipocampo de ratones heterocigóticos para Cdh1, así como en procesos de aprendizaje y memoria de estos ratones *in vivo* [Li, 2008]. Igualmente, Kuczera y colaboradores [Kuczera, 2011] han estudiado la implicación directa del complejo APC/C-Cdh1 en procesos de memoria y aprendizaje. Para ello han generado ratones KO que carecen de la subunidad Apc2. Estos animales se desarrollan normalmente, sin presentar alteraciones en la ansiedad basal, trastornos exploratorios o depresivos o deficiencias de coordinación motora. Sin embargo, estos animales carecen de recuerdos de miedo y presentan alteraciones en la memoria espacial. Asimismo, García-Higuera y colaboradores han descrito [García-Higuera, 2008] que la ausencia de Cdh1 provoca defectos de coordinación neuromuscular y memoria. Estudios más recientes realizados en cortes de amígdala de ratones KO condicionales para Cdh1 han puesto de manifiesto que tienen deteriorada la memoria asociativa al miedo y la potenciación a largo plazo [Pick, 2012]. Todo ello pone de manifiesto la importancia de Cdh1 en los procesos de memoria y aprendizaje.



# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## 1. Hipótesis

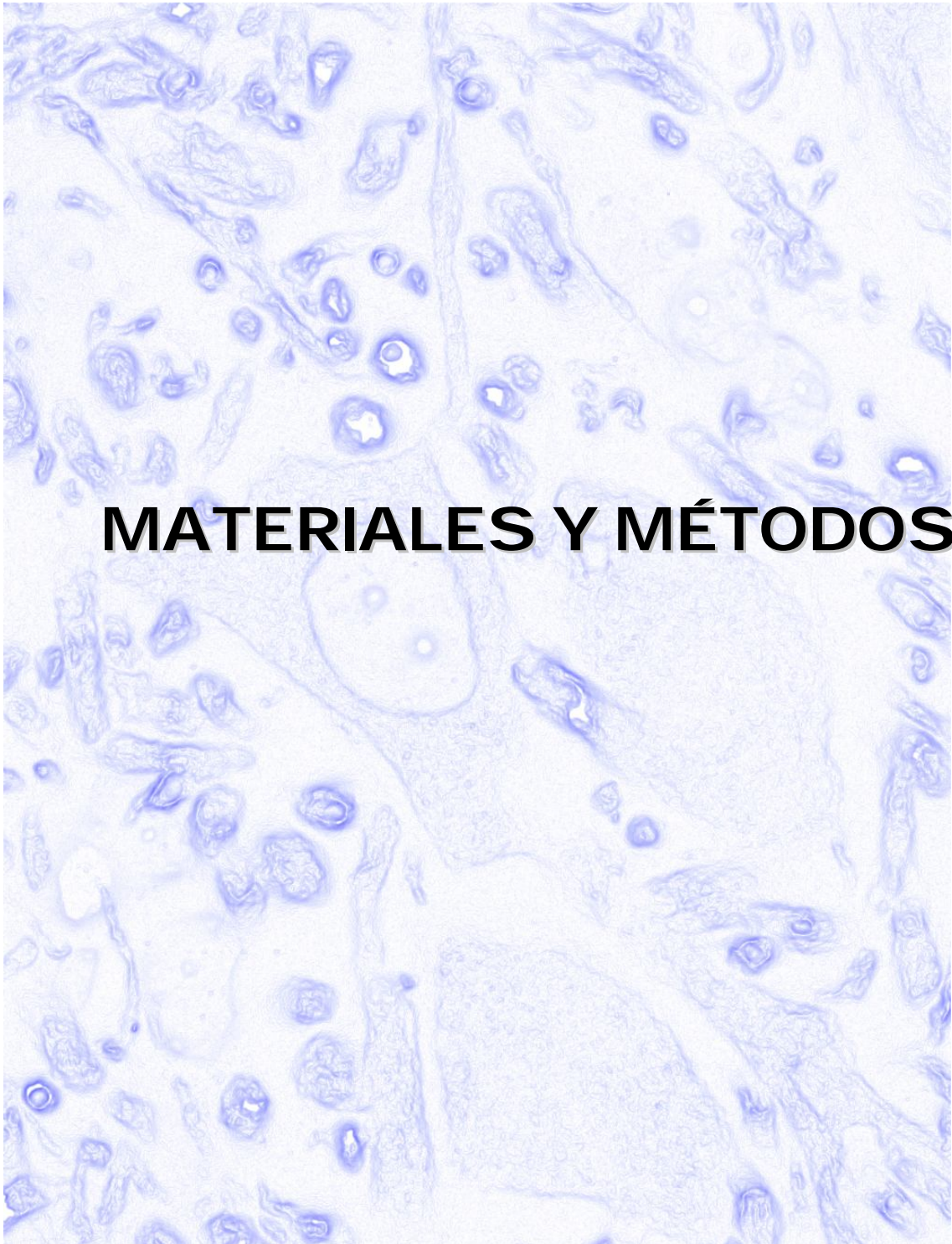
Resultados previos en nuestro laboratorio han demostrado que la actividad de APC/C-Cdh1 es esencial para la supervivencia de las neuronas corticales de rata en cultivo primario [Almeida, 2001; Almeida, 2005; Maestre, 2008; Herrero-Mendez, 2009], así como de los precursores neurales durante el desarrollo de la corteza cerebral *in vivo* [Delgado-Esteban, 2013]. Además, estudios *in vivo* evidencian la importancia de APC/C en los procesos de memoria y aprendizaje [Kuczera, 2011; Li, 2008]. Por tanto, creemos que la deficiencia de Cdh1 en áreas del encéfalo de ratón adulto implicadas en los procesos de memoria y aprendizaje, como son corteza cerebral e hipocampo, permitirá establecer un modelo murino adulto de neurodegeneración, así como investigar la relevancia de Cdh1 en la supervivencia neuronal *in vivo*.

## 2. Objetivos

A la luz de la hipótesis mencionada, los objetivos para el desarrollo de la presente Tesis Doctoral son:

1. Generar un ratón adulto deficiente de Cdh1 en áreas del encéfalo de ratón implicadas en los procesos de memoria y aprendizaje, como son corteza cerebral e hipocampo, utilizando el sistema de la recombinasa Cre.
2. Investigar la función de Cdh1 sobre la supervivencia neuronal *in vivo*.
3. Estudiar el efecto de la ausencia de Cdh1 sobre los procesos de memoria y aprendizaje.

Con los resultados esperados pretendemos establecer un modelo murino de neurodegeneración *in vivo*, así como la posible relevancia de Cdh1 en la etiopatología de las enfermedades neurodegenerativas, lo que podría ser potencialmente útil para la identificación de nuevas estrategias terapéuticas en estas neuropatologías.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## 1. Animales de experimentación

En nuestro estudio hemos utilizado ratones *Mus musculus*, L. 1758 (Muridae, Rodentia, Mammalia) modificados genéticamente [García-Higuera, 2008]. El animal se generó originalmente en un fondo mixto con contribución variable de tres cepas diferentes: C57BL/6J, 129/SV y CD1. Con objeto de homogeneizar el fondo genético, se realizaron sucesivos retrocruzamientos con animales C57BL/6J. Todos los animales se criaron, manipularon y sacrificaron según las normas establecidas en la directiva del Consejo de Comunidades Europeas (86/609/EEC) y la Legislación Española (RD 1201/2005), vigente para el uso y cuidado de animales de laboratorio. Los protocolos fueron aprobados por el comité ético para la experimentación animal y humana, del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca. Los animales se mantuvieron a temperatura y humedad relativa constantes, con un fotoperiodo artificial de 12 horas y fueron alimentados ad libitum con agua y pienso compuesto para roedores (T2014 Teklad Global 14% Protein Rodent Diet, Oxon, Reino Unido).

Para este trabajo hemos utilizado un ratón transgénico deficiente de *Cdh1*, obtenido mediante el cruce de un ratón KO que contiene los exones 2 y 3 del gen *Fzr* flanqueados por secuencias *Locus of X-over P1* (LoxP), cedido por los doctores Irene García Higuera, Marcos Malumbres y Sergio Moreno y generado en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, con una estirpe transgénica, en la cual la expresión de la enzima recombinasa Cre (Cre) está dirigida por el promotor de la Calcio Calmodulina quinasa II alfa (*CaMKII $\alpha$* ) [Mayford, 1996; Tsien, 1996]. La estirpe (B6.Cg-Tg(Camk2a-cre)T29-1Stl/J) cuyo transgén contiene una secuencia de 8,5 kilobases (Kb) se adquirió en los laboratorios Jackson (The Jackson laboratory; Bar Harbor, EEUU). Estos animales son viables, fértiles, de tamaño normal y no muestran anomalías físicas o de comportamiento [http://www.jax.org].

En estos animales, la proteína Cre se expresa a partir de 20-22 días de vida postnatal (P), en áreas concretas como son la capa CA1 del hipocampo, la corteza cerebral, tejido neocortical, estriado y amígdala. Por lo tanto el silenciamiento de *Cdh1* se produce en estas zonas descritas. Sin embargo, la expresión de Cre en el cerebelo o en el tálamo es muy escasa, por lo que en estas áreas se mantienen niveles de expresión de *Cdh1* normales [Minichiello, 1999; Tsien, 1996].

Con objeto de obtener los animales controles y los transgénicos deficientes en *Cdh1* -que hemos denominado *Cdh1* KO- empleados en el presente estudio, se realizaron cruces entre ratones con el alelo condicional de *Cdh1* y ratones portadores del transgén de la recombinasa Cre, dirigido por el promotor de la *CaMKII $\alpha$*  (*CaMKII $\alpha$ -Cre*) [Jackson, 2000].

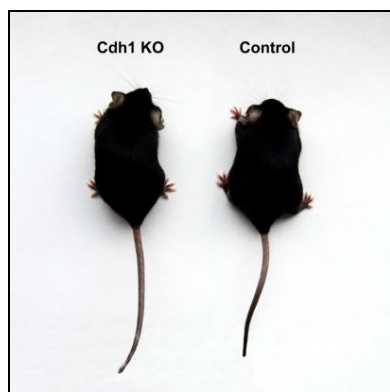
Se generaron así diferentes tipos de animales:

**1) animales transgénicos deficientes de *Cdh1* (*Cdh1* KO)** que son ratones (**Lox/Lox**) (+/T), es decir, contienen secuencias LoxP en ambos alelos (Lox/Lox) y el transgén de la enzima Cre (+/T).

**2) animales controles** que pueden ser de dos tipos: **2.a. (Lox/Lox) (+/+)** ratones con secuencias LoxP (Lox/Lox) sin transgén de Cre (+/+) y **2.b. (+/+) (+/T)** ratones sin secuencias LoxP (+/+), pero con el transgén de Cre (+/T). Ambos tipos de animales se comportaron de manera similar por lo que en el presente trabajo se eligieron como controles los animales (+/+) (+/T), con el objeto de descartar cualquier posible efecto del transgén.

Por tanto, hemos generado un modelo en el que se ha suprimido *Cdh1* de manera condicional a la expresión de la *CaMKII $\alpha$ -Cre*. Así, hemos obtenido ratones en los cuales la combinación de las dos mutaciones hace que en el día P20-22 se inicie la expresión de la proteína Cre, la cual eliminará por recombinación los exones 2 y 3 de *Fzr*, lo que provoca a partir de ese momento la inactivación de *Cdh1* en regiones concretas del cerebro.

Para la identificación genotípica de los ratones, debido a que la apariencia externa de los distintos genotipos es idéntica (ver **imagen 9**), se empleó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para amplificar secuencias específicas de los distintos alelos de *Cdh1* y del transgén de Cre, y así identificar de manera correcta los animales controles y los ratones *Cdh1* KO.



**Imagen 9.** Ejemplares de nuestro modelo de estudio. Fotografía representativa. A la izquierda observamos un ratón deficiente de *Cdh1* y a la derecha un ejemplar control.

### 1.1. Extracción de ADN

En primer lugar se extrae ADN genómico a partir de un fragmento de la cola (2-4 mm) digiriéndola durante 2-3 horas a 55 °C con proteinasa K (100  $\mu$ g/ml), en un medio tamponado a pH=8,5 que contiene KCl (50 mM),  $MgCl_2$  (1,5 mM), Tris-HCl (10 mM), gelatina al 0,01% (p/v), Nonidet P-40 al 0,45% (v/v) y Tween-20 al 0,45% (v/v) (ver apéndices "productos químicos generales" y "soluciones de uso común").

Terminada la reacción de digestión se inactiva la proteinasa K mediante calor, a 95 °C durante 15 minutos (min) y se centrifugan las muestras a 7000 xg durante 15 segundos, para separar los restos de tejido no digerido. En el sobrenadante resultante se analizó el genotipo de los animales mediante PCR como se indica en el apartado siguiente [Malumbres, 1997].

### 1.2. Identificación genotípica de los animales

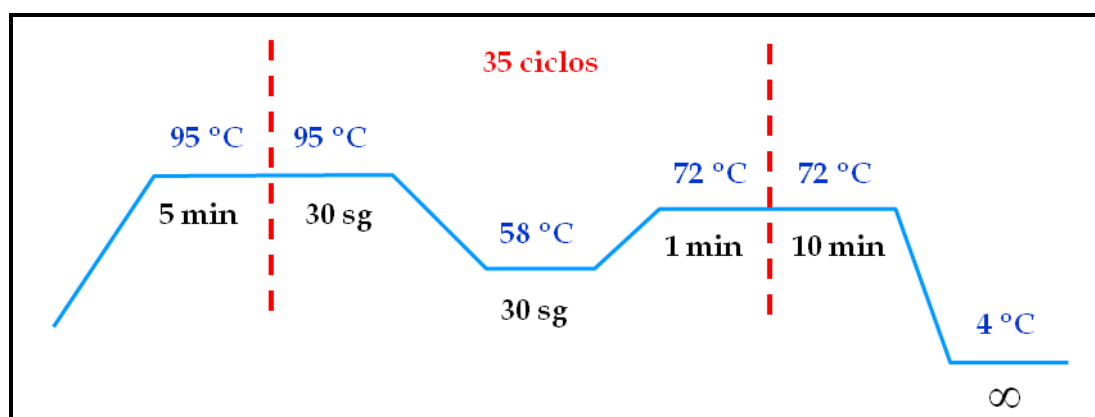
La identificación genotípica de los animales se realizó mediante la amplificación de fragmentos específicos de las secuencias LoxP y del transgén de Cre utilizando la PCR [Mullis, 1990]. Las reacciones se efectuaron en un medio tamponado a pH=8,8 de acuerdo a las instrucciones del fabricante Bioline USA Inc.; Taunton, Massachusetts, EEUU (ver apéndices "soluciones de uso común").

En la **tabla 1** aparecen detalladas las secuencias de los *primers* empleados para amplificar nuestros fragmentos específicos. Todos ellos fueron diseñados por la doctora Irene García Higuera y se adquirieron a través de Thermo Fisher Scientific Inc.; Pittsburgh, PA, EEUU.

Marcador	Secuencia
<i>Cdh1-32-Fw</i>	AGCATGGTGACCGCTTCATCC
<i>Cdh1-43-Rv</i>	TGGCTGGGGGACTTCTCATTTTCC
<i>Cre-Fw</i>	CCGGTTATTCAACTTGCACC
<i>Cre-Rv</i>	CTGCATTACCGGTCGATGCAAC

**Tabla 1.** Secuencias de los *primers* empleados para la amplificación de los fragmentos de interés.

La PCR se realiza en un termociclador Eppendorf (Mastercycler® ep, Eppendorf, Eppendorf Inc.; Enfield, EEUU), con una temperatura de anillamiento de 58 °C y 35 ciclos de amplificación, tal y como se muestra en el **esquema 29**.



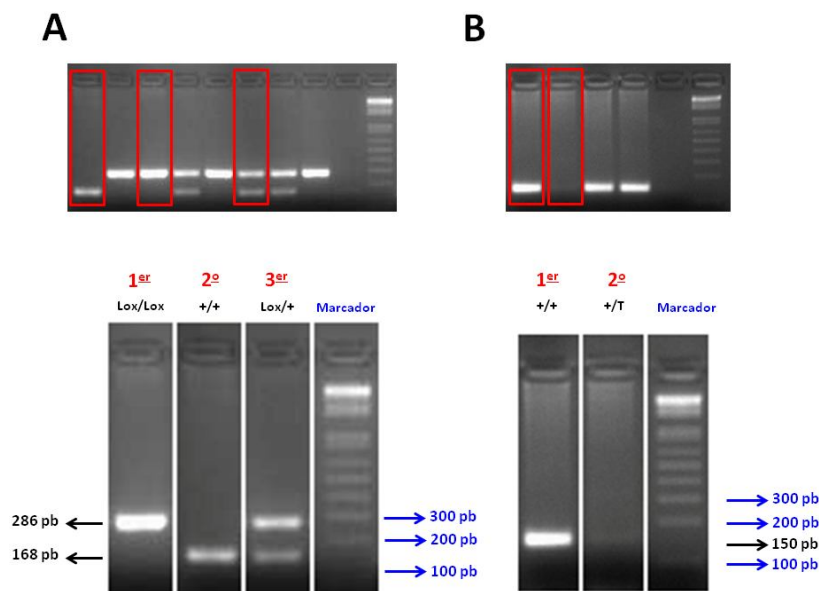
**Esquema 29.** Ciclos de temperatura. Diferentes ciclos de temperatura necesarios en el termociclador para llevar a cabo la PCR y así identificar genotípicamente los animales.

Los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 3% (p/v) en tampón Tris-acetato-EDTA (ácido etilen-*di*-amino-*tetra*-acético) (TAE) al que se le añadieron 0,4 µg/ml de bromuro de etidio, en presencia de tampón de carga (ver **apéndices "soluciones de uso común"**). Como marcador de peso molecular (PM) se utilizó Plus DNA ladder 1Kb (ver **apéndices "productos químicos generales"**).

La visualización de las distintas bandas de ADN amplificado, se realizó mediante la utilización de un transiluminador (Gel Doc XR, Bio Rad Laboratories, S.A.; Hercules, California, EEUU).

En la **imagen 10** se muestran ejemplos de amplificación de segmentos específicos de los distintos alelos. Así, en la imagen **A**, podemos observar que el **1er**

carril se corresponde con un ratón KO (Lox/Lox) que presenta sólo una banda de 286 pares de bases (pb), el 2º carril se corresponde con un animal control (+/+) que presenta sólo la banda de 168 pb y el 3º carril presenta dos bandas de diferente tamaño, una de 168 pb y otra de 286 pb, correspondiente a un animal heterocigoto (Lox/+). Por otro lado, en el 1º carril de la imagen B, podemos ver que los animales con el transgén de la enzima recombinasa Cre (+/T) presentan una banda de 150 pb, que no se observa en el animal control (+/+), que no es portador de dicho transgén.



**Imagen 10.** Ejemplo de caracterización genotípica de los animales de una camada. Imagen donde se muestran fragmentos de geles en los que se visualizan los resultados de PCR para la amplificación de los diferentes alelos de Cdh1 y del transgén de la enzima recombinasa Cre.

## 2. Obtención de tejido para Inmunohistoquímica

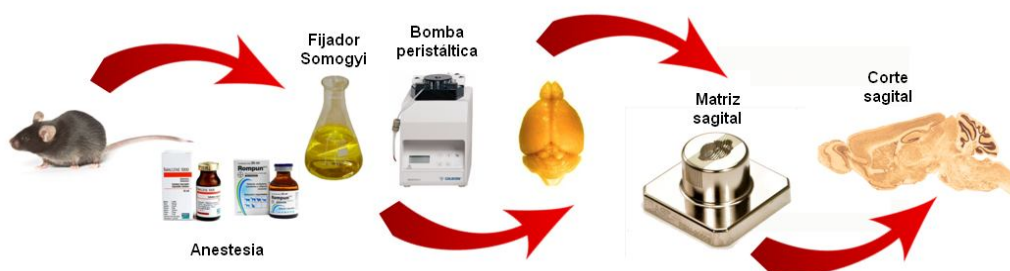
El proceso de perfusión tiene como objetivo conservar el tejido en un estado lo más parecido posible al que ofrece cuando sus células están vivas. Se trata de proteger a las células de la autólisis y el ataque de microorganismos (hongos y bacterias), evitar distorsiones y retracciones e insolubilizar los constituyentes celulares [Martoja, 1970]. El proceso consiste en la apertura de la caja torácica del animal dejando expuesto el corazón, inyectando a continuación 0,1 ml de heparina sódica en el ventrículo izquierdo para evitar que se formen coágulos en el torrente sanguíneo. A continuación, se conecta a través de una cánula, una bomba peristáltica a la aorta, y se pasa primero la solución salina para lavar y a continuación el fijador para fijar los tejidos. Todo el proceso se realiza en una campana de perfusión (ver apéndices "soluciones de uso común", "productos químicos generales" y "aparataje") [Morest, 1966].

Los animales se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal, con una mezcla compuesta por 3 partes de ketamina (Imalgène®) y 2 partes de hidrocliclorato de xilacina (Rompún®), en una proporción de 1ml/kg de peso corporal. Posteriormente, se perfundieron por vía intracardiaca primero con 17 ml de NaCl al 0,9% durante 1 min



y a continuación con 250 ml de fijador durante 15 min. El fijador utilizado fue Somogyi sin glutaraldehído (ver apéndices "soluciones de uso común") [Somogyi, 1982].

Tras la perfusión de los animales, se extrajeron los encéfalos y se separaron mediante un corte sagital por la cisura interhemisférica (0,0 mm del nivel lateral), usando una matriz sagital de cerebro de ratón (#RBM-2000S. ASI Instruments; Warren, MI, EEUU) (ver imagen 11).



**Imagen 11.** Imagen esquemática del proceso de perfusión abreviado, y obtención de los bloques de cerebro de ratón, en nuestro caso, mediante corte sagital.

A continuación, se postfijaron con el mismo fijador durante 2 horas a temperatura ambiente (TA), lavándose posteriormente durante otras 2 horas con TF (0,1 M) pH=7,4 (ver apéndices "soluciones de uso común"). Al final del proceso los cerebros se sumergieron consecutivamente en tres soluciones de sacarosa al 10% (30 min), 20% (2 horas) y 30% (12 horas) (p/v) preparadas en TF, y posteriormente se crioprotegieron (ver apéndices "soluciones de uso común" y "productos químicos generales") [Porteros, 2007].

### 3. Secciones de tejido

Después de la crioprotección, los bloques se encastraron con un medio endurecedor denominado como OCT (Tissue-Tek® O.C.T™ Compound. Sakura; Tokyo, Japón) y nitrógeno líquido (ver apéndices "productos químicos generales"), y se obtuvieron secciones sagitales de 40  $\mu\text{m}$  de grosor en un criostato (Leica CM 1950 Ag Protect. Leica Biosystems; Nussloch, Heidelberg, Alemania).

Las secciones se recogieron de forma seriada, ordenándolas en placas de 12 pocillos (#353225 BD Falcon™, BD Biosciences; New Jersey, EEUU), en cuatro series. Primero se almacenaron en TF (0,1 M) pH=7,4 con azida sódica 0,05% (p/v) a 4 °C y luego se almacenaron a -20 °C en una "mezcla congeladora específica", que permite almacenar los cortes durante más tiempo a esa temperatura (ver apéndices "soluciones de uso común") [Valero, 2006; Valero, 2007].

## 4. Tinciones Inmunohistoquímicas

### 4.1. Inmunofluorescencia indirecta

Para llevar a cabo dobles o triples marcajes, empleamos la técnica de inmunofluorescencia.

## Materiales y Métodos

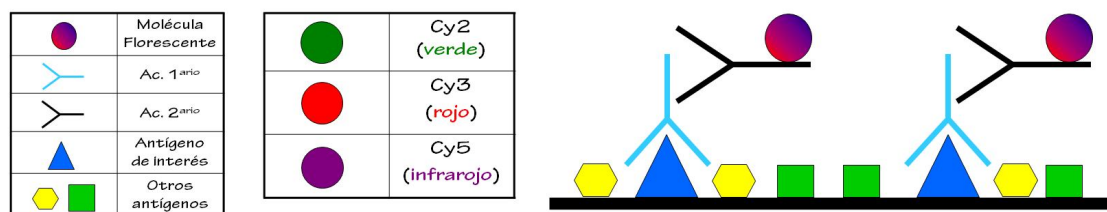
Previamente, el tejido se almacenó durante cortos periodos de tiempo en TF con azida sódica al 0,05% (p/v) a 4 °C, o en mezcla congeladora a -20 °C durante meses. Si el tejido se almacenó en mezcla congeladora, las secciones se lavaron 6 veces durante 10 min cada vez (6 x 10 min), a TA en agitación orbital constante (ver **apéndices "aparataje"**) de 100 revoluciones por minuto (rpm) con TF (0,1M) pH=7,4 para eliminar los restos. Si el tejido se almacenó en TF con azida sódica 0,05% (p/v), las secciones se lavaron 3 veces con TF durante 10 min (3 x 10 min).

Previamente a las incubaciones con los anticuerpos, y con objeto de eliminar la señal de fondo debida a la autofluorescencia de los aldehídos, las secciones se trataron con una solución de borohidruro sódico ( $\text{NaBH}_4$  - 5 mg  $\text{NaBH}_4$ /1 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ) durante 30 min (ver **apéndices "productos químicos generales"**), a TA y agitación orbital constante de 100 rpm en presencia de luz [Weruaga-Prieto, 1996].

Después de la incubación con  $\text{NaBH}_4$ , las secciones se lavaron (3 x 10 min) con TF (0,1 M) pH=7,4 y después se incubaron con la solución con el anticuerpo primario. Esta solución va dirigida específicamente hacia el antígeno que queremos detectar. La incubación de esta solución se realizó durante 72 horas, a 4 °C y en agitación orbital constante de 100 rpm. Dicha solución contiene: TF (0,1M) pH=7,4, Triton X-100 al 0,2% (v/v), suero normal al 5% (v/v) de la misma especie animal en la cual se han obtenido los anticuerpos secundarios y el anticuerpo primario dirigido contra cada uno de los antígenos que nos interesen (ver **apéndices "sistemas de inmunodetección en Inmunofluorescencia"**). Esta composición tiene como finalidad favorecer la reacción específica antígeno-anticuerpo deseada.

Transcurridas las 72 horas de incubación, las secciones se lavaron de nuevo (3 x 10 min) con TF (0,1 M) pH=7,4 y se incubaron durante 2 horas a TA, en agitación constante orbital de 100 rpm y en oscuridad, con una solución que contiene el anticuerpo secundario conjugado con Cy2, Cy3 o Cy5 a una dilución 1:500 (ver **apéndices "sistemas de inmunodetección en Inmunofluorescencia"**). En todos los casos el anticuerpo secundario fue diluido en TF (0,1 M) pH=7,4.

Posteriormente, las secciones se lavaron (3 x 10 min) con TF para eliminar el exceso de anticuerpo secundario que no se había unido a los tejidos (ver **esquema 30**).



**Esquema 30.** Fundamento teórico de la técnica de Inmunofluorescencia. Todos los componentes forman un complejo que podrá ser detectado por la fluorescencia emitida.

A continuación se realizó la tinción de los núcleos con DAPI (*4',6-Diamidino-2-Phenylindole Dihydrochloride*) (ver **apéndices "productos químicos generales"**) diluido 1:7000 en TF (0,1 M) pH=7,4 durante 10 min a TA, agitación orbital constante de 100 rpm y oscuridad.

Finalmente, se lavaron las secciones con TF (0,1 M) pH=7,4 y se montaron sobre portaobjetos previamente gelatinizados (ver **apéndices "soluciones de uso común"**).

Se cubrieron con una solución "anti-desvanecimiento" (Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium, Sigma-Aldrich, Co.; Saint Louis, Missouri, EEUU) que permite prolongar la fluorescencia de los cortes y finalmente se colocó un cubreobjetos (ver apéndices "productos químicos generales" y "otros productos generales") [Guy, 1968].

#### **4.1.1. Controles de la técnica Inmunohistoquímica**

Para poder verificar la especificidad de la reacción se realizaron los siguientes controles:

a) Omisión de los anticuerpos primarios para detectar uniones inespecíficas de los secundarios.

b) Omisión de los anticuerpos secundarios para detectar emisión de fluorescencia inespecífica.

c) Incubación con uno de los dos anticuerpos primarios y adición del anticuerpo secundario correspondiente al anticuerpo primario omitido para detectar uniones cruzadas [Guy, 1968].

En ninguno de los casos detectamos falsos positivos debidos a uniones inespecíficas.

## **5. Técnica de TUNEL**

La detección de células TUNEL positivas (TUNEL+) se realizó sobre secciones de tejido de 40 µm de grosor. Paralelamente a la técnica de TUNEL, se llevo a cabo una inmunofluorescencia para el anticuerpo NeuN marcador de neuronas (ver apéndices "sistemas de inmunodetección en Inmunofluorescencia"). Las secciones se lavaron con TF (0,1 M) pH=7,4 (3 x 10 min) y se trataron con una mezcla fría de etanol absoluto/ácido acético (2:1), durante 5 min a TA y agitación orbital constante de 100 rpm. Tras este paso, los cortes de tejido se lavaron de nuevo con TF (3 x 10 min) y se permeabilizaron a TA durante 15 min con Triton X-100 0,2% (p/v) en citrato sódico al 0,1% (p/v) (ver apéndices "soluciones de uso común"). Posteriormente, se realizó la técnica de TUNEL de acuerdo al procedimiento descrito previamente por Gascon y colaboradores [Gascon, 2005].

Los tejidos se lavaron con TF (0,1 M) pH=7,4 (2 x 5 min) y se sumergieron durante 30 min en tampón TUNEL (ver apéndices "soluciones de uso común"). A continuación, el tejido se incubó durante 2 horas a 37 °C, con la mezcla de reacción TUNEL que contenía 800 U/ml de Terminal transferasa y dUTP biotinilado (1 µM), ambos de Roche Diagnostics; Sant Cugat del Valles, Barcelona, España (ver apéndices "productos químicos generales"). La reacción de la enzima se detiene con tampón SSC (ver apéndices "soluciones de uso común") durante 20 min en RT y agitación orbital constante de 100 rpm. Para finalizar el procedimiento, las secciones se lavaron en TF (0,1 M) pH=7,4 (3 x 10 min) y a continuación se incubaron con Estreptavidina conjugada con Cy3 a una dilución 1:500 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.; Newmarket, Suffolk, Reino Unido) durante 2 horas a TA, agitación orbital constante de 100 rpm y oscuridad, tiñendo los núcleos con una dilución de DAPI 1:7000. Después de tres lavados con TF, las secciones se montaron sobre portaobjetos previamente gelatinizados y se cubrieron con medio "anti-desvanecimiento" Fluoromount™ para

mantener la fluorescencia. Para finalizar se colocó un cubreobjetos [Quintana-Cabrera, 2012].

### 5.1. Análisis cuantitativo de las neuronas positivas para TUNEL

La cuantificación de neuronas TUNEL+ se realizó mediante microscopia de epifluorescencia.

La estimación del número de neuronas TUNEL+ en la corteza y en la capa CA1 del hipocampo se realizó utilizando un procedimiento basado en el método Abercrombie [Petreanu, 2002]. Con objeto de ampliar el número de neuronas TUNEL+ los valores correspondientes a cada zona se estimaron obteniendo la densidad media de todas las secciones del encéfalo de una de las cuatro series de cortes conseguidas originalmente de cada animal.

## 6. Tinción de Nissl

Para obtener unos resultados óptimos en secciones de 40  $\mu\text{m}$  de grosor, los cortes de tejido se montaron sobre portaobjetos gelatinizados y se dejaron secar a TA durante 24 horas. Posteriormente, los portaobjetos se sumergieron en una mezcla 1:1 de etanol absoluto y cloroformo durante 12 horas para eliminar la grasa y así conseguir menor tinción de fondo. Las secciones se hidrataron haciéndolas pasar por una batería de alcoholes decreciente hasta H<sub>2</sub>Od (xileno (x2) - etanol absoluto (x2) - 96% - 90% - 80% - 70% - 60% - 50% - H<sub>2</sub>Od). A continuación, las secciones se tiñeron con una solución de Cresil Violeta (acetato *para-cresilo*) al 0,1% (p/v) y ácido acético glacial al 0,3% (v/v) en H<sub>2</sub>Od, durante 5-10 min. Después se realizó un lavado rápido en H<sub>2</sub>Od y rápidamente los portaobjetos se pasaron por una batería de alcoholes de graduación creciente para deshidratarlos (ver apéndices "productos químicos generales").

En el etanol al 96% se diferenciaba la tinción. **a)** Si la tinción era demasiado fuerte, se dejaba diferenciar más tiempo en etanol de 96°. **b)** Si la tinción era débil, se volvían a hidratar las secciones y se comenzaba otra vez. **c)** Si la tinción era adecuada, se deshidrataban las secciones sumergiéndolas 2 veces en etanol absoluto durante 10 min y se aclaraban con xileno (2 x 10 min). Por último, se montaban las preparaciones con Entellan y cubreobjetos (ver apéndices "productos químicos generales" y "otros productos generales") [Jones, 2007; Newman, 2009].

## 7. Análisis de imágenes

Tras la realización de las diversas técnicas, las secciones fueron analizadas al microscopio. Las imágenes seleccionadas para el presente trabajo se obtuvieron de los siguientes equipos:

Fotomicroscopio Nikon Eclipse® 90is (fotomicroscopio vertical) equipado con epifluorescencia, campo claro e interferencia de contraste Normaski, conectado a una cámara digital Hamamatsu ORCA- E.R. Camera Controller. Los objetivos utilizados fueron: CFI Plan Apocromático DM 40X C, A.N. 0,95, Ph2; CFI Plan Apocromático DM 60X Oil, A. N. 1,40, Ph3; CFI Plan Apocromático VC 60XH Oil, A. N. 1,4 y CFI Plan Apocromático VC 100X Oil, A. N. 1,4. Los bloques de filtros para fluorescencia son

todos de la serie ET de CHROMA y son los siguientes: ET DAPI: excitación: 350/50, dicroico: 400, emisión: 460/50; ET ECFP: excitación: 436/20, dicroico: 455, emisión: 480/40; ET EGFP (FITC/Cy2): excitación: 470/40, dicroico: 495, emisión: 525/50; ET EYFP: excitación: 500/20, dicroico: 515, emisión: 535/30 y ET DsRED (TRITC/Cy3): excitación: 545/30, dicroico: 570, emisión: 620/60.

Fotomicroscopio Nikon Eclipse® Ti (fotomicroscopio invertido) equipado con epifluorescencia, campo claro e interferencia de contraste Normaski, conectado a una cámara digital Hamamatsu ORCA- E.R. Camera Controller. Los objetivos utilizados fueron: Plan 4X/0,10  $\infty$ /- WD 30; Plan Fluor 10X/0,30 Ph1 DLL  $\infty$ /0,17; S Plan Fluor ELWD 20X/0,45  $\infty$ /0-2 WD 8,2-6,9; S Plan Fluor ELWD 40X/0,60  $\infty$ /0-2 WD 3,6-2,8; Plan 40X/0,65  $\infty$ /0,17 WD 0,56 y Plan Apocromático VC 60X/1,40 Oil  $\infty$ /0,17 WD 0,13. Los bloques de filtros para fluorescencia son todos de la serie QH de SEMROCK y son los siguientes: GFPQH: excitación: 455/485, dicroico: 495, emisión: 500/545; YFPQH: excitación: 490/500, dicroico: 510, emisión: 520/560; CY5: excitación: 625/650, dicroico: 625, emisión: 670/720; DAPI: excitación: 340/3800, dicroico: 400, emisión: 435/485 y TXRED: excitación: 540/580, dicroico: 595, emisión: 600/660.

En ambos equipos, tanto en el invertido como en el vertical, cuando fue necesario, se utilizó aceite de inmersión *Type F* de Leica (#11.513.859 Leica Biosystems; Nussloch, Heidelberg, Alemania).

Para finalizar, las imágenes fueron procesadas digitalmente con los programas: Adobe Photoshop® CS3 (Adobe Systems Software Ireland Ltd., Adobe Systems Incorporated®; San José, California, EEUU) y NIS Elements® Ar (Nikon Instruments, Inc.; Tokyo, Japón).

## 8. Obtención de tejido para *Western Blot*

Los animales se anestesiaron con sevoflurano (Sevorane®) y la ayuda de una cámara de anestesia de metacrilato fabricada por nosotros mismos. Esta cámara está conectada a un vaporizador (H-3 Hersill. Hersill, S.A.; Mostoles, Madrid, España) y a un rotámetro (Ática 3. Hersill, S.A.; Mostoles, Madrid, España) que permite suministrar una mezcla de oxígeno y protóxido de nitrógeno o de oxígeno y aire, provenientes de tres entradas de gas independientes (ver **apéndices "aparataje"**). Este sistema permite la administración simultánea de sólo dos gases, uno de ellos será siempre el oxígeno y el otro podrá ser el protóxido o el aire, dependiendo de la selección realizada mediante el mando cambiador de gas [<http://www.hersill.com>]. En nuestros experimentos, utilizamos la mezcla de oxígeno y protóxido de nitrógeno.

Según el anexo 11 del artículo 5 de la directiva del Consejo de Comunidades Europeas de 24 de Noviembre de 1986, respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (86/609/CEE), cuando los ratones estaban completamente dormidos, les dislocábamos cervicalmente, les decapitábamos y para finalizar realizábamos las extracciones de los encéfalos. La extracción se realizaba sobre una placa con tampón fosfato salino (TFS) en frío (ver **apéndices "soluciones de uso común"**) [Delgado-Esteban, 2013].

Una vez extraído el encéfalo, se diseccionaron las zonas de estudio: corteza cerebral (Cx), hipocampo (Hy) y cerebelo (Cb), asegurando que no quedaban restos de otras zonas del cerebro. Seguidamente, los tejidos se homogeneizaron en tampón de lisis RIPA (*Radio Immuno Precipitation Assay*) en un homogeneizador vinilo-vidrio con

inhibidores de proteasas y fosfatasas (ver apéndices "soluciones de uso común" y "productos químicos generales") [MacPhee, 2010; Moore, 2009].

Las muestras se mantuvieron en hielo durante al menos 30 min, se hirvieron durante 5 min, se trataron con ultrasonidos con una frecuencia de 50-60 Hz durante 10 min y se centrifugaron a 17500  $xg$  a 4 °C durante 30 min.

Finalmente, se recogieron los sobrenadantes en tubos Eppendorf® y se utilizaron para las determinaciones.

## 9. Cuantificación de la concentración de proteínas

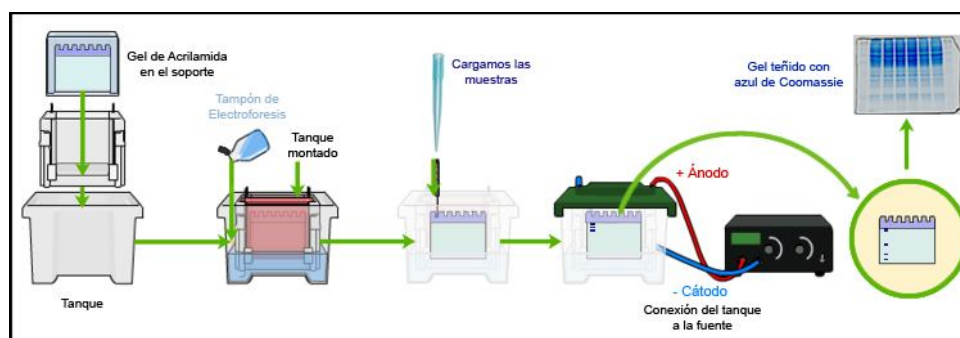
La determinación de la concentración de proteínas en las diferentes muestras se realizó espectrofotométricamente a 562 nanómetros (nm) mediante el sistema colorimétrico basado en el ácido bicinónico (BCA) (BCA Protein Assay Reagent, Pierce) utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar (ver apéndices "productos químicos generales"). La determinación resultó lineal respecto a las concentraciones de proteínas en un amplio rango de trabajo (20-2000  $\mu g/ml$ ) [Smith, 1985].

## 10. Transferencia tipo *Western Blot*

### 10.1. Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE

Los extractos proteicos (10-50  $\mu g$ , según la proteína a analizar) se suspendieron en tampón de carga (ver apéndices "soluciones de uso común"), se hirvieron durante 5 min, y se centrifugaron a 17500  $xg$  durante 10 min a 4 °C.

Las proteínas se separaron mediante electroforesis (ver esquema 31), en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE), utilizando un sistema de electroforesis vertical (Mini Protean-3, Bio Rad Laboratories, S.A.; Hercules, California, EEUU) y un tampón de electroforesis. La concentración de acrilamida en los geles varió entre el 8% al 15% y se utilizaron varios marcadores de peso molecular en función del tamaño de la proteína de estudio (ver apéndices "soluciones de uso común" y "productos químicos generales") [Burnette, 1981; Towbin, 1979].

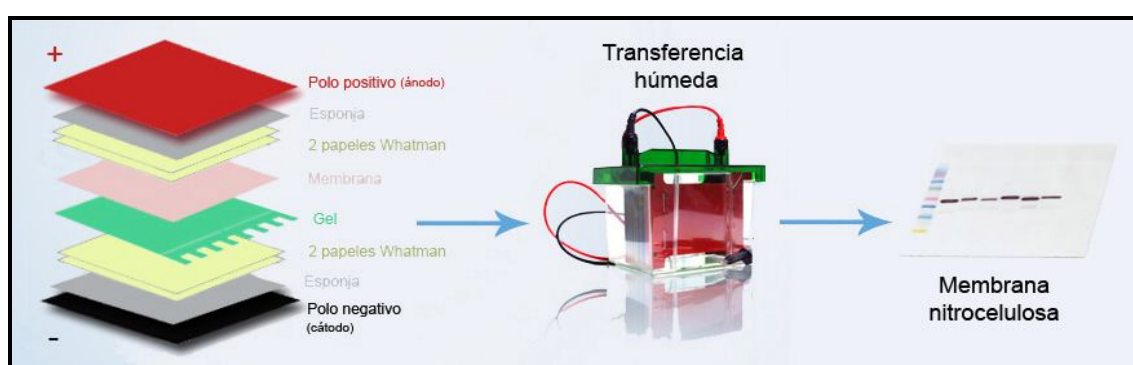


Esquema 31. Esquema del proceso abreviado de la electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida, utilizando un tampón no comercial. En el mismo esquema se puede observar un gel después de la electroforesis que ha sido teñido con azul de Coomassie Modificado de [<http://www.cdc.gov>].

Una vez terminada la electroforesis, los geles se sometieron a electrotransferencia e inmunodetección (técnica: transferencia tipo *Western Blot*).

## 10.2. Transferencia de proteínas

Las proteínas separadas en geles de SDS-PAGE se transfirieron electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa (Amersham™ Hybond™-ECL, #RPN2020D GE Healthcare UK Limited; Buckinghamshire, Reino Unido) utilizando el módulo Mini Trans-Blot, que es compatible con el sistema Mini Protean 3 y Mini Protean Tetra (Bio Rad Laboratories, S.A.; Hercules, California, EEUU) (ver **esquema 32**). Para realizar la transferencia se utilizó un tampón no comercial (ver **apéndices "soluciones de uso común"**) [Moore, 2009].



Esquema 32. Esquema de la transferencia tipo *Western Blot*. Modificado de [<http://www.western-blot.us>].

## 10.3. Inmunodetección de proteínas

Después de 2 horas de transferencia a 4 °C, las membranas se bloquearon mediante incubación en leche (Sveltesse Calcio Plus, Nestlé España, S.A.; Esplugues de Llobregat, Barcelona, España) al 5% (p/v) en tampón Tris salino con Tween-20 (TTBS) durante 1 hora a AT con movimiento constante orbital (Navigator™) (ver **apéndices "soluciones de uso común"** y **"aparataje"**). Posteriormente las membranas se lavaron (3 x 10 min) con TTBS pH=7,5 y se incubaron con la solución del anticuerpo primario. La incubación de la membrana con esta solución se realizó durante toda la noche a 4 °C y en el Navigator™. Dicha solución contiene: TTBS pH=7,5 suplementado con BSA al 2% (p/v) y el correspondiente anticuerpo primario (ver **apéndices "sistemas de inmunodetección en *Western Blot*"**). Al día siguiente, las membranas se lavaron (3 x 10 min) con TTBS, y a continuación se incubaron con la correspondiente solución de anticuerpo secundario en TTBS con leche al 2% durante 1 hora. Después, las membranas se volvieron a lavar con TTBS (3 x 10 min) y con tampón Tris salino (TBS) (1 x 10 min) [Harper, 1990; Jensen, 2012].

Para finalizar, las membranas se revelaron utilizando distintos reactivos de quimioluminiscencia, en función de la intensidad de señal: Super Signal West Dura (Pierce, Thermo Fisher Scientific), Western Blotting Luminol Reagent (Santa Cruz Biotechnology) y Immobilon Western (Millipore) siguiendo las instrucciones de los fabricantes, y se expusieron a una película Super HR-U X-Ray Film (Fujifilm Medical) (ver **apéndices "productos químicos generales"** y **"otros productos generales"**).

### 10.4. Tinción de geles con azul de Coomassie

En algunos casos, terminada la transferencia, los geles de poliacrilamida, se tiñeron con una solución de azul de Coomassie durante 15 min, en agitación de balanceo suave constante, a TA. La solución está compuesta por azul de Coomassie al 0,1% (p/v), metanol al 50% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v) en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>. A continuación, se destiñeron en una solución que contenía metanol al 20% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v) en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> con agitación de balanceo suave constante y TA, cambiando periódicamente dicha solución [Neuhoff, 1988].

### 10.5. *Stripping* de membranas de nitrocelulosa

En ocasiones, algunas membranas se reutilizaron y se incubaron de nuevo con un anticuerpo primario distinto al inicial, por lo que fue necesario eliminar los anticuerpos previos de las mismas (*stripping*). Para ello, las membranas se incubaron en un tampón a pH=6,7 compuesto por Tris-HCl (62,5 mM), SDS al 2% (p/v) y β-mercaptoetanol (100 mM) a 50 °C durante 30 min [Kaufmann, 1987]. Posteriormente, se lavaron (3 x 10 min) con TTBS a TA y se trataron con el nuevo anticuerpo primario realizándose la inmunodetección de proteínas tal y como se ha descrito anteriormente.

## 11. Estudio electrofisiológico

### 11.1. Potenciales evocados somatosensoriales

Gracias a la colaboración de los doctores Javier Yajeya Pérez y Juan Antonio Javier de la Fuente, del departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca, realizamos un estudio electrofisiológico básico a los animales.

Uno de los parámetros que utilizamos en el estudio electrofisiológico, consistió en el análisis de los potenciales evocados somatosensoriales (PES), que son manifestaciones eléctricas de la respuesta cerebral o de la vía somestésica, que se producen tras la aplicación de estímulos eléctricos, en las fibras aferentes sensitivas de los nervios periféricos [Gutiérrez Rivas, 2007].

En la conducción del estímulo eléctrico que origina el PES participan mayoritariamente las fibras nerviosas de mayor calibre, y de conducción más rápida como son las fibras tipo IA o fibras aferentes musculares y las fibras tipo II, también llamadas fibras aferentes cutáneas. La velocidad de conducción en estas vías es de aproximadamente 60-75 m/s. En el SNC el impulso es conducido ipsilateralmente por los cordones posteriores, hasta el núcleo de Goll (*nucleus gracilis*), cuando el estímulo se aplica en los miembros inferiores, y hasta el núcleo de Burdach (*nucleus cuneatus*), cuando se estimula un nervio de los miembros superiores. En estos núcleos se establece la primera sinapsis. El impulso continúa su trayecto por el lemnisco medio hacia el núcleo ventral del tálamo en donde tiene lugar la segunda sinapsis. Finalmente, la actividad evocada alcanza la área somestésica primaria del córtex donde se lleva a cabo la tercera sinapsis [Cusick, 1979].

La identificación de algunos componentes de los potenciales evocados (PE), que son de obtención obligada, y los tiempos de conducción obtenidos mediante las latencias, son los parámetros de aplicación clínica más importantes. En general, un



aumento de los tiempos de conducción indica la presencia de lesión de tipo desmielinizante. Igualmente, se ha establecido una relación entre el descenso de la amplitud y la pérdida de neuritas [Gutiérrez Rivas, 2007].

## 1 1.2. Metodología y registro

A cada animal se le realizó, bajo anestesia, un estudio electrofisiológico con la ayuda de: **a)** una cámara de Faraday, que es un espacio cubierto de metal para evitar interferencias. En esta cámara es donde se coloca el elemento a registrar, ya sea un animal entero, tejido aislado o membrana celular; **b)** un sistema informático, que controla tanto el estímulo (sonido, luz, electricidad, etc.) que se suministra al elemento que vamos a registrar, como al almacenaje y procesado del registro que se efectúa; **c)** un sistema de preamplificación y filtrado de la señal, que permite transformar las señales que provienen de la unidad de registro en datos analizables y **d)** un osciloscopio, que hace visible la señal eléctrica.

Los ratones se anestesiaron intraperitonealmente con 10  $\mu\text{l/g}$  de peso corporal de una mezcla compuesta de ketamina (Imalgène®) al 13%, de diazepam (Valium®) al 20%, de atropina al 2,5% y de NaCl al 0,9% (p/v) al 64,5% (ver **apéndices "productos químicos generales"**) [Jiménez-Díaz, 2011].

Tras comprobar la ausencia de reflejo palpebral, el animal se colocó en un aparato estereotáxico (Kopf) ajustando las barras interauriculares y dentales para el correcto posicionamiento del cráneo. Para poder visualizar completa y detalladamente todo el proceso quirúrgico (ver **imagen 12**) se utilizó un estereomicroscopio (Nikon) y una fuente de luz fría de transmisión por fibra óptica (Schott) (ver **apéndices "aparataje"**).

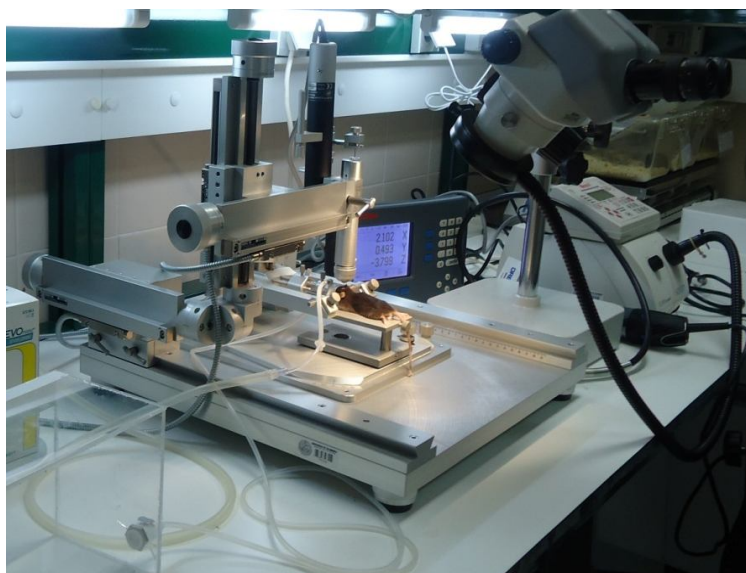
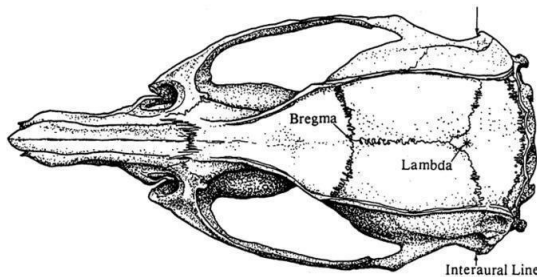


Imagen 12. Fotografía del sistema estereotáxico.

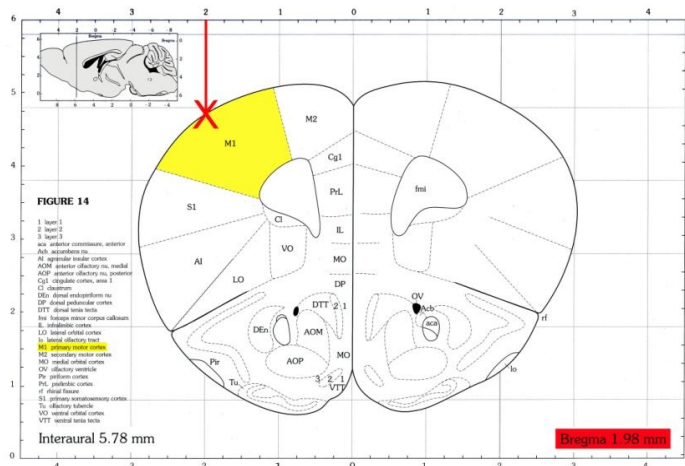
Tras realizar una incisión en la piel del dorso de la cabeza, se retiró la piel con la ayuda de unas pinzas hemostáticas y se lavó la zona con NaCl al 0,9% (p/v), de esta forma se consiguió dejar expuesto el cráneo. A continuación se determinó la posición

de **Bregma** que es el punto de intersección de las suturas coronal y sagital (ver **esquema 33**) y para finalizar se realizó, en el hemisferio izquierdo, una perforación en el cráneo con un taladro (Kopf) y una broca de 0,50 mm de diámetro (diámetro #75, Kyocera, Bangalore, India) (ver **apéndices "aparataje"**) [Quintana-Cabrera, 2012; Paxinos, 2004].



**Esquema 33.** Dibujo representativo de un cráneo de ratón, donde se muestran las suturas y los puntos de referencia Bregma y Lambda. [Paxinos, 2004].

La perforación del cráneo se realizó en la zona de la corteza motora primaria, con la referencia de las siguientes coordenadas: 1,98 mm rostralmente respecto a Bregma (coordenada X o rostrocaudal) y 2,0 mm lateral a la línea media (coordenada Y o coordenada lateromedial) siguiendo los parámetros descritos en un atlas estereotáxico, tal y como se muestra en el **esquema 34** [Paxinos, 2004]. No se perforó en la coordenada Z o dorsoventral, para no dañar el encéfalo y poder colocar el electrodo superficial en la zona de la corteza donde se realizó el registro.



**Esquema 34.** En el esquema del corte coronal del cerebro, está marcado el lugar exacto donde se perforaba el cráneo con el taladro. En el momento que se perforaba el cráneo se dejaba de taladrar para no tocar el encéfalo y evitar dañarlo Modificado de [Paxinos, 2004].

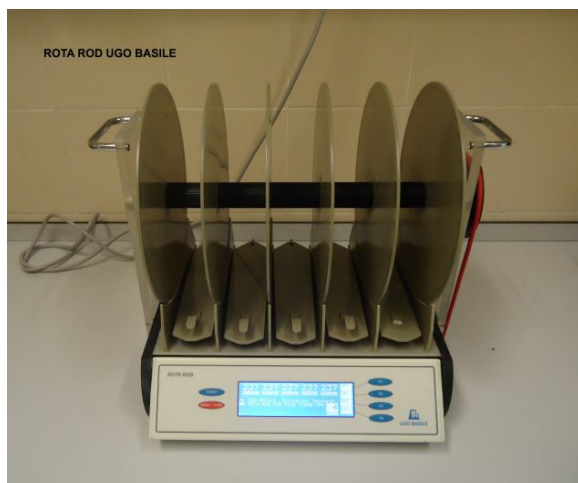
El estudio electrofisiológico se realizó en ratones de P120, localizando el electrodo del estímulo en el nervio ciático derecho de cada animal. Una vez perforado el cráneo, el animal era liberado del aparato estereotáxico y se disecaba el nervio ciático. Este procedimiento se realizó retirando la piel de la pata y separando los paquetes musculares, sin tocar en ningún momento el nervio ciático para no dañarlo. Una vez descubierto el nervio, el animal se colocó en una cámara de Faraday para hacer el estudio electrofisiológico [Cavanagh, 1968]. En todo momento el nervio ciático se mantuvo húmedo con NaCl al 0,9% (p/v). Para realizar el registro, se estimuló el nervio ciático a su salida de la pelvis, en la raíz del miembro inferior, con un electrodo monopolar de aguja. La intensidad del estímulo se fue aumentando hasta

la obtención de la respuesta de máxima amplitud. Las latencias de las respuestas se midieron desde el momento de aplicación del estímulo al inicio de la respuesta evocada. La amplitud se midió de la línea de base hasta el pico máximo. Todos los PE se realizaron estimulando de forma individualizada y secuencial el nervio ciático. Las respuestas se recogieron en el córtex utilizando electrodos superficiales [Heredia, 2013; Jiménez-Díaz, 2011; Santos-Torres, 2009].

## 1 2. Equilibrio Motor

### 1 2.1. Rotarod

El equilibrio motor de los ratones y su coordinación se analizó mediante el test de Rotarod (ver **imagen 13**) utilizando una barra giratoria de 5 carriles (aparato Rotarod, Modelo 47600, Ugo Basile Srl; Comerio, Varese, Italia). Todas las determinaciones se llevaron a cabo en el mismo periodo del día. Antes de la realización de las pruebas, los animales fueron entrenados durante 3 días consecutivos en los que se realizaron tres ensayos por día (semana 0). En cada ensayo, los animales permanecieron hasta 300 segundos en una barra giratoria con aceleración constante de 4 rpm/30s, entre 4 rpm y 40 rpm, alcanzándose la velocidad máxima a los 270 segundos. Después de cada ensayo la barra y todo el aparato se limpiaron cuidadosamente con etanol al 70% (v/v), para eliminar cualquier señal olfativa y el periodo de descanso fue de 15 min como mínimo. Las pruebas se realizaron en animales de P120 y P360, durante 4 semanas alternas siguientes al entrenamiento (semanas 2, 4, 6 y 8) y de forma similar a este. En el test se determinó el tiempo que el animal tardaba en caer de la barra giratoria, o daba tres vueltas en la barra sin caminar [Crawley, 1999; Jones, 1968; Picciotto, 1998].



**Imagen 13.** Fotografía del aparato de Rotarod. Se pueden observar los cinco carriles y la varilla de aceleración donde se colocan los ratones.

## 1 3. Pruebas de comportamiento, aprendizaje y memoria

Para el análisis del comportamiento de los animales, su aprendizaje y memoria, se realizaron las siguientes pruebas: **a)** laberinto Lashley III, **b)** laberinto radial de 8 brazos, **c)** campo abierto (*open field*) y **d)** tablero de agujeros (*hole board*).

Las pruebas se realizaron siempre en el mismo intervalo de tiempo. Los animales se dejaron aclimatar en la habitación donde se realizaban los test durante al menos 30 min antes de comenzar las pruebas. Entre los ensayos de cada prueba, los aparatos se limpiaron cuidadosamente con una solución de etanol al 70% (v/v) para eliminar cualquier señal olfativa y que los animales pudieran explorar libremente. Para las pruebas de campo abierto y tablero de agujeros, se utilizó un núcleo *ANY-box core* (Stoelting Co.; Wood Dale, Illinois, EEUU). Este núcleo contiene una plataforma de color gris claro y un soporte perpendicular con una cámara que es ajustable. También tiene un conjunto de sensores de luz infrarroja que permite rastrear el movimiento de los animales y detectar su comportamiento (ver **imagen 14**). El seguimiento de los movimientos del ratón se realiza con el software *ANY-maze* y el registro de los parámetros analizados con la interfaz *AMi-maze* (Stoelting Co.; Wood Dale, Illinois, EEUU).



**Imagen 14.** Núcleo *ANY-box core*. En la imagen podemos observar la plataforma y la varilla ajustable con la cámara. A ambos lados de la plataforma se pueden ver los sensores de luz infrarroja.

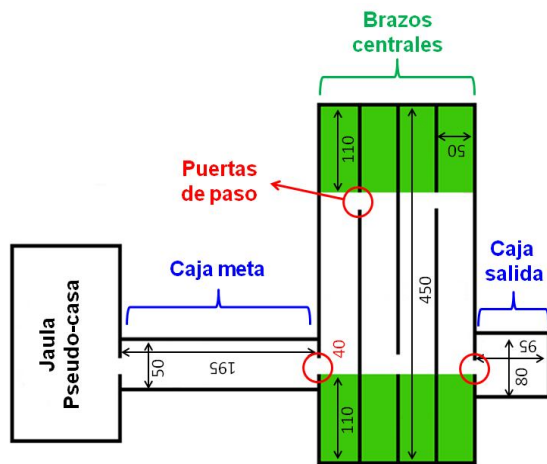
### 13.1. Laberinto Lashley III

Gracias a una estancia realizada en el grupo de la Dra. Anne Andrews en el "Neuroscience Research Building" de la Universidad de Los Angeles (UCLA), California, EEUU; tuve la oportunidad de aprender esta técnica, así como otras técnicas de comportamiento específicas de roedores.

El laberinto Lashley (*Lashley maze*) fue descrito por primera vez en 1929 por Karl Lashley. Lashley utilizó esta prueba para describir el mapa de la memoria en la corteza, utilizando técnicas de lesiones corticales [Walshe, 1958]. En la actualidad se ha modificado ligeramente el laberinto original para ampliar sus aplicaciones.

Este laberinto se basa en el aprendizaje de la ruta por parte de los ratones. Los animales aprenden a moverse por el laberinto por una exposición repetida bajo condiciones sin tensión, es decir, sin falta de agua o de alimentos [Blizard, 2006].

El laberinto consiste en una caja de salida, el cuerpo del laberinto con 4 brazos y una caja de meta. Al final de la caja meta está el objetivo, que es una "jaula pseudo-casa" que contiene el mismo tipo de serrín que hay en la jaula del animal (ver **esquema 35**). La "jaula pseudo-casa" ofrece suficiente recompensa para motivar a los ratones y que aprendan a caminar por este tipo de laberinto [Blizard, 2006; Bressler, 2010].



Esquema 35. Esquema donde se muestran los diferentes módulos del laberinto Lashley III con sus correspondientes medidas. La zonas coloreadas en verde son callejones sin salida. Si el animal penetra en una de estas áreas comete un error, al igual que si hace el recorrido a la inversa. Modificado de [Bressler, 2010].

El laberinto Lashley III (*Lashley III maze*) está construido de metacrilato tal y como se muestra en la imagen 15. La caja de salida, los brazos del cuerpo del laberinto y la caja de meta son modulares. Las paredes se construyen con metacrilato negro para eliminar señales visuales desde el exterior y el interior del laberinto [Bressler, 2010].



Imagen 15. Imagen del Lashley III. Los ratones se colocaban en la caja de salida y se contabilizaban los tiempos que empleaban en recorrer los diferentes módulos del laberinto, así como el número de errores que cometían durante el trayecto de la parte central.

La prueba se realizó en animales de 120 y 360 días de vida postnatal, durante 4 semanas consecutivas (semana 1, 2, 3 y 4). Todas las determinaciones se llevaron a cabo en el mismo periodo del día.

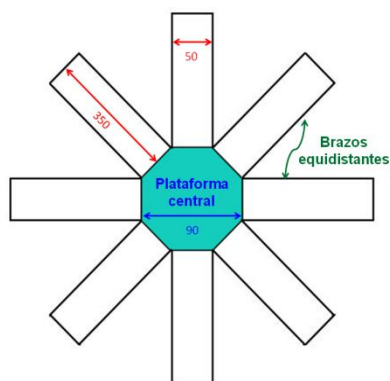
Dado que un sobreentrenamiento de algunas estirpes de ratones produce un comportamiento aberrante en el laberinto [Matzel, 2003], se limitó esta fase a una única semana (semana 0) durante 3 días consecutivos y se realizó la prueba una sola vez por día a cada ratón.

El ensayo comienza cuando se abre la puerta de la caja de inicio, empezándose la grabación y contabilización del tiempo de la prueba. Una vez que las cuatro patas del ratón han salido de la caja de salida, se cierra la puerta y se anota el tiempo transcurrido como el tiempo que tarda el ratón en salir de la caja de salida. A continuación se realiza un registro completo del camino que lleva a cabo el animal por los brazos del laberinto. Cuando el ratón entra en la caja meta, se cierra la puerta y se contabiliza el tiempo que ha empleado en recorrer el laberinto. También se contabilizan los errores que comete el ratón durante el trayecto. Cuando el ratón entra

completamente dentro de la "jaula pseudo-casa", se cierra la última puerta y se contabilizaba el tercer y último tiempo [Bressler, 2010].

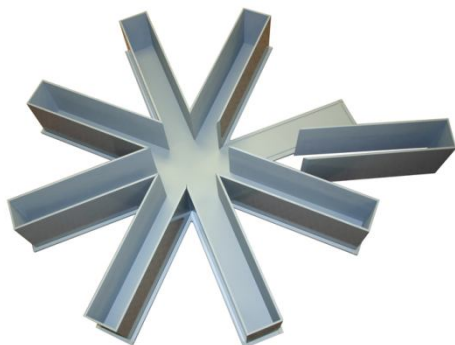
### 1 3.2. Laberinto radial de 8 brazos

El laberinto radial (*radial maze*) fue desarrollado por Olton y Samuelson en 1976 para estudiar la memoria espacial en ratas [Olton, 1976; Sharma, 2010]. El aparato para ratones, consiste en ocho brazos equidistantes de 35 cm de largo, 5 cm de ancho y 9 cm de alto, que irradian de una plataforma octogonal central de 9 cm (ver **esquema 36**).



**Esquema 36.** Esquema donde se muestran las medidas y las diferentes partes de un laberinto radial para ratones.

El laberinto radial permite por una lado la evaluación del aprendizaje y la memoria, analizando dos tipos de memoria en los animales: la denominada **memoria de referencia** y la llamada **memoria de trabajo**. La memoria de referencia se evalúa cuando los ratones sólo visitan los brazos del laberinto que contienen la recompensa (comida). Así, cuando los animales visitan los brazos que no tienen comida estarán cometiendo un error de memoria de referencia. Por otro lado, la memoria de trabajo se evalúa cuando los ratones entran en cada brazo una sola vez y, por tanto, al reingresar los animales en los brazos, cometerían un error de la memoria de trabajo. El diseño del laberinto asegura que, después de la comprobación por parte del animal de la existencia o no de comida en el extremo de cada brazo, el ratón está siempre obligado a regresar a la plataforma central antes de hacer otra elección. Como resultado, el animal siempre tiene ocho opciones posibles, y puede cometer como máximo cuatro errores de memoria de referencia (ver **imagen 16**) [Dudchenko, 2004; Hodges, 1996; Olton, 1979].



**Imagen 16.** Imagen del laberinto radial. Los ratones se colocaban en la plataforma central al comienzo de la realización de la prueba. El aparato consiste en ocho brazos equidistantes que irradian de una pequeña plataforma circular central. El diseño asegura que después de la comprobación de los alimentos al final de cada brazo, el animal se ve obligado a volver a la plataforma central antes de hacer otra elección.

Se ha descrito anteriormente que las señales olfativas pueden ser utilizadas por los animales para llevar a cabo la exploración [Wasserman, 1969], por ello entre cada ensayo se limpiaba el laberinto con etanol 70% (v/v) con el fin de conseguir una saturación aromática y eliminar cualquier señal olfativa del animal anterior y así permitir que los animales exploraran libremente el laberinto.

La prueba se realizó en animales de P120 y P360 de dos maneras diferentes:

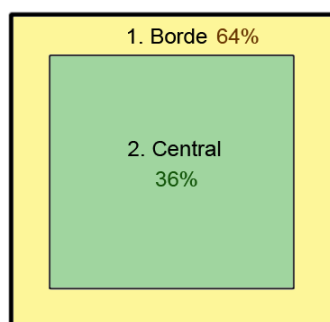
**a)** En la semana 0, se realizó la prueba sin privación de comida. En este caso, cada animal se colocó en la plataforma central y se le permitió explorar el laberinto durante un periodo máximo de 15 min. En este caso, el ratón tenía que ser capaz de explorar los 8 brazos. Cuando el animal penetraba en un brazo que había sido visitado con anterioridad, cometía un error.

**b)** Durante 4 semanas alternas (semanas 2, 4, 6 y 8) los ratones realizan los ensayos bajo condiciones de privación de comida, la cual se les retiró 14-16 horas antes de la realización de la prueba. El día del ensayo y después de 30 min de aclimatación, el animal se colocó en la plataforma central del laberinto evaluando su memoria de referencia únicamente cuando visitaba los brazos del laberinto que contenían la recompensa (comida). Si el ratón penetraba en un brazo sin comida, cometía un error de referencia. Igualmente, la memoria de trabajo se evaluaba cuando el animal entraba en el brazo una sola vez. Cuando el ratón penetraba en los brazos que había visitado anteriormente cometía un error de trabajo [Olton, 1979].

### 13.3. Campo abierto

La prueba de campo abierto (*open field*) fue desarrollada por Calvin S. Hall para poder estudiar las emociones de los roedores. Nos permite medir la capacidad exploratoria de los animales, la neofobia, la agarofobia y otros aspectos de la ansiedad o el miedo de los ratones, tanto de manera cualitativa como cuantitativa [Sharma, 2010]. Algunos autores relacionan el comportamiento de los animales durante la prueba con su actividad locomotora, sin embargo, esta correlación es muy controvertida [Careau, 2012].

La prueba de campo abierto se realiza en una caja de metacrilato de color negro, cuyas dimensiones para ratones son 40 cm de ancho x 40 cm de profundo x 35 cm de alto. Esta caja se coloca sobre la plataforma del *ANY-box core* y así, cuando el animal es introducido, los infrarrojos son capaces de detectar su movimiento [Holmes, 2002; Stanford, 2007]. En nuestro estudio la arena o fondo del campo abierto se dividió en dos zonas: **a)** la zona del borde con un 64% de la superficie y **b)** la zona central que posee un 36% de la arena total (ver esquema 37) [Prut, 2003].

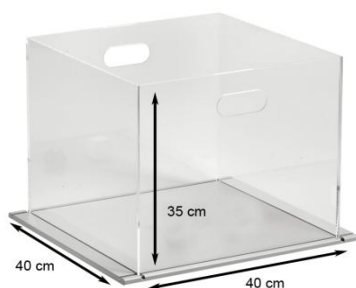


**Esquema 37.** La arena del campo abierto se divide en dos zonas diferentes: **a)** la zona del borde o zona exterior que ocupa un 64% de la superficie y **b)** la zona central que ocupa el 36% de la arena total. Durante la prueba se contabiliza la distancia recorrida por el animal, el tiempo transcurrido y la velocidad media en cada una de las zonas.

La prueba se realizó en animales de P120 y P360 sin privación de comida. Tras 30 min de aclimatación en la habitación, se depositó al ratón en la zona central de la arena del campo abierto (ver **imagen 17**). Durante 30 min se permitió al ratón explorar libremente la arena total de la caja. Gracias al software *ANY-maze* se realizó el seguimiento del animal y se registraron los siguientes parámetros: **a)** número de bolas fecales, **b)** la distancia recorrida en cada una de las dos zonas, **c)** el tiempo empleado, **d)** la velocidad media, **e)** el número de exploraciones que realizaba el animal y **f)** el tiempo que permanecía inmóvil. Todos los parámetros fueron analizados con la interfaz *AMi-maze*.

El número de bolas fecales de los animales son equivalentes al estrés y a la ansiedad que sufre el animal durante la prueba [Bressler, 2010; Jackson, 2000].

Entre test y test se limpió la caja y la arena del campo abierto con etanol 70% (v/v) con el fin de eliminar cualquier señal olfativa del animal anterior [Wasserman, 1969] y así permitir que los animales exploraran libremente.

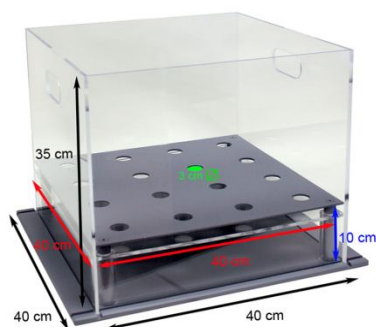


**Imagen 17.** Imagen del campo abierto. Se pueden observar las dimensiones de la caja (40 cm x 40 cm x 35 cm). En la imagen se muestra la caja transparente, pero los animales era introducidos en una caja idéntica pero de color negro opaca. Esta caja se acoplaba en el *ANY-box core* para que la cámara grabara todo el recorrido del animal y se pudieran registrar los parámetros de interés.

### 1 3.4. Tablero de agujeros

La prueba del tablero de agujeros (*hole board*) fue utilizado originalmente para estudiar el comportamiento exploratorio de los animales sin privación de comida [Belzung, 1994; Takeda, 1998]. Más tarde fue adaptado para evaluar el aprendizaje de los ratones, mediante la recuperación de un *pelet* de comida ubicado debajo de un agujero concreto, del tablero bajo condiciones de privación [Brosnan-Watters, 1997].

El tablero de agujeros consiste en una caja de color negro opaca, como la del campo abierto de 40 cm de ancho x 40 cm de profundo x 35 cm de alto, pero con una plataforma base, elevada a 10 cm del suelo, con 16 agujeros de 3 cm de diámetro cada uno, colocados en una disposición 4 x 4 (ver **imagen 18**) [Sharma, 2010].



**Imagen 18.** Imagen del tablero de agujeros. Se pueden observar las dimensiones de la caja (40 cm x 40 cm x 35 cm) y la plataforma base a 10 cm del suelo con los 16 agujeros dispuestos 4 x 4. En esta imagen se muestra la caja transparente (al igual que ocurría en la figura del campo abierto), pero los animales era introducidos en una caja idéntica pero de color negro opaca.



La prueba se realizó en animales de P120 y P360 sin deprivación de comida, para poder estudiar las tendencias exploratorias de los ratones y la ansiedad que es independiente de la actividad locomotora, es decir, la ansiedad que está relacionada con el miedo [Belzung, 1994; Takeda, 1998]. Tras 30 min de aclimatación a la habitación se depositó el ratón en la plataforma base del tablero de agujeros y durante 5 min se le permitió explorar libremente la plataforma. Gracias al software *ANY-maze* y a los sensores de infrarrojos, se realizó el seguimiento del animal y se registraron los siguientes parámetros: **a)** número de bolas fecales, **b)** la distancia recorrida, **c)** la velocidad media y **d)** el número de veces que el animal metía la cabeza en los agujeros (*nose pokes*). Todos los parámetros fueron analizados con la interfaz *AMi-maze*.

## 14. Análisis estadísticos

Las diferencias estadísticas se analizaron con el programa estadístico SPSS Statistics® 17.0 Release 17.0.0 (SPSS Inc.; Chicago, Illinois, EEUU), realizando distintos test estadísticos dependiendo del tipo de datos a analizar.

Los valores se expresaron como medias  $\pm$  error estándar de la media (SEM) de un número de determinaciones expresadas en las leyendas de las figuras. La significatividad entre dos grupos se determinó mediante el test de la t-Student para datos paramétricos. La comparación de más de dos grupos de datos se realizó mediante el análisis de la varianza de una vía (ANOVA) seguido por las correcciones *post hoc* de Bonferroni, Dunnett, LSD y Tukey. En todos los casos, un valor de  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo.



**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## 1. Generación de un modelo de ratón deficiente de Cdh1 en la corteza cerebral y el hipocampo durante el periodo adulto

Resultados previos en nuestro laboratorio han demostrado que Cdh1 es esencial para la supervivencia de las neuronas corticales de rata en cultivo primario [Almeida, 2005; Herrero-Mendez, 2009; Maestre, 2008]. Es más, la deficiencia de Cdh1 incrementa la susceptibilidad de las neuronas corticales a la excitotoxicidad causada por la estimulación de los receptores de glutamato [Maestre, 2008; Rodriguez-Rodriguez, 2012]. Con el objeto de investigar la relevancia de Cdh1 en la neurodegeneración *in vivo* nuestro primer objetivo ha sido la generación de un modelo de ratón adulto deficiente en Cdh1, específicamente en las neuronas excitatorias del encéfalo. Para ello, hemos utilizado el sistema Cre-LoxP. Así, ratones que contienen los exones 2 y 3 del gen que codifica Cdh1, *Fzr*, flanqueados por secuencias LoxP, se cruzaron con ratones que expresan la recombinasa Cre bajo el promotor de la CaMKII $\alpha$  [Mayford, 1996; Tsien, 1996]. El resultado del cruce son ratones que portan el alelo *Fzr* floxeado en homocigosidad (Lox/Lox) y el transgén de la CaMKII $\alpha$ -Cre (+/T), por lo que son ratones que carecen de Cdh1 de manera condicional a la expresión de la CaMKII $\alpha$ , que hemos denominado Cdh1 KO. Como controles, hemos utilizado ratones que carecen de secuencias LoxP (+/+) pero que portan el transgén (+/T). En todos los casos, los experimentos se realizaron con ratones macho.

Bajo el promotor de la CaMKII $\alpha$ , la expresión de la enzima Cre está temporal y regionalmente limitada en neuronas excitatorias a partir de los días 20-22 de vida postnatal. En concreto, durante la etapa postnatal, la expresión de Cre en la cepa utilizada en el presente trabajo (B6.Cg-Tg-T29-1Stl/J) se limita, fundamentalmente, a determinadas áreas cerebrales como son: la capa CA1 del hipocampo (Hy) y la corteza cerebral (Cx). En el cerebelo (Cb), por el contrario, la expresión de Cre es muy escasa [Minichiello, 1999; Tsien, 1996].

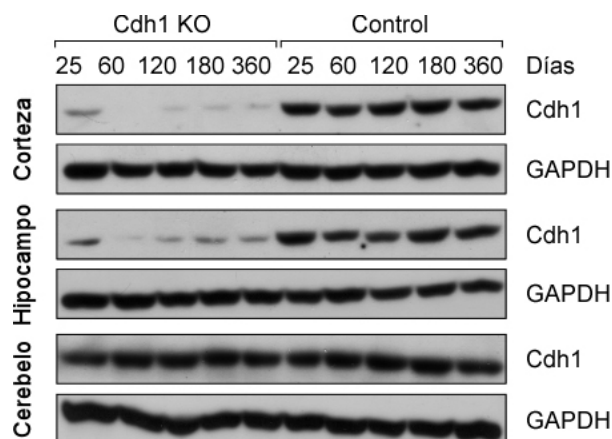
Los resultados representados en la **figura 1** están de acuerdo con el perfil de expresión de la recombinasa Cre en los animales CaMKII $\alpha$ -Cre previamente descrito [Minichiello, 1999; Tsien, 1996]. Así, mientras que la expresión de la proteína Cdh1 no se vio modificada en el Cb, a ninguno de los tiempos estudiados, dicha expresión desaparece casi totalmente en el Hy y en la Cx del ratón transgénico Cdh1 KO, a partir de los 25 días postnatales (**figura 1**). La expresión de Cdh1, sin embargo, se mantuvo alta en los ratones controles que también portaban el transgén, lo que descarta un posible efecto del mismo sobre la expresión de Cdh1.

Así mismo, tal y como se observa en las transferencias tipo *Western Blot* mostradas en la **figura 2**, comprobamos que tanto los animales controles como los Cdh1 KO presentaron altos niveles de expresión de CaMKII $\alpha$  en el Hy y la Cx a los 25 días de vida postnatal.

Es importante destacar que la reducción de los niveles Cdh1 en la Cx y en el Hy de los ratones Cdh1 KO es casi completa, mientras que la expresión de CaMKII $\alpha$  está limitada a neuronas excitatorias [Minichiello, 1999] y no a otras células nerviosas, como son las células gliales. Por tanto, la expresión de Cdh1 en estas áreas cerebrales está fundamentalmente localizada en las neuronas. Estos resultados corroboran estudios previos de nuestro grupo que demuestran que, en cultivo, los niveles de expresión de

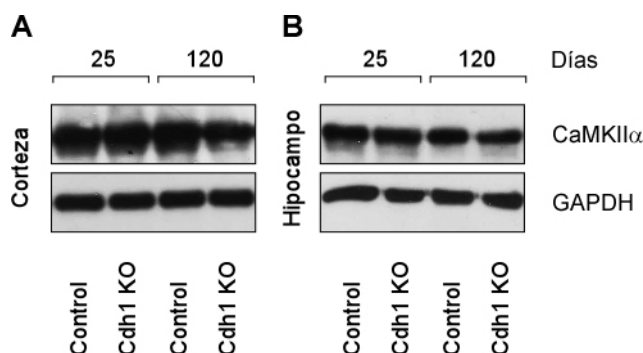
Cdh1 en neuronas corticales son muy superiores a los observados en astrocitos [Herrero-Mendez, 2009].

Por tanto, hemos generado un modelo de ratón *knockout* condicional de Cdh1 durante la etapa postnatal, lo que nos permite investigar el efecto de la deficiencia de Cdh1 sobre la viabilidad neuronal en zonas concretas del cerebro como son la capa CA1 del Hy y la Cx, zonas frecuentemente afectadas en neuropatologías de gran impacto socio-sanitario, como es la enfermedad de Alzheimer [Mann, 1985; Thompson, 2001; Thompson, 2004].



**Figura 1. Supresión de la expresión de Cdh1 en la corteza cerebral e hipocampo de ratones adultos.** Ratones que contienen los exones 2 y 3 del gen que codifica Cdh1, *Fzr*, flanqueados por secuencias LoxP, se cruzaron con ratones que expresan la recombinasa Cre bajo el promotor de la *CaMKII $\alpha$* . Transferencias de tipo *Western Blot* mostraron que la expresión de Cdh1 en la corteza cerebral e hipocampo del ratón *knockout* condicional de Cdh1 (Cdh1 KO) desaparece a partir de los 25 días postnatales. Sin embargo, la expresión de la proteína en el cerebelo no se vio modificada en el Cdh1 KO, respecto a los niveles observados en los controles.

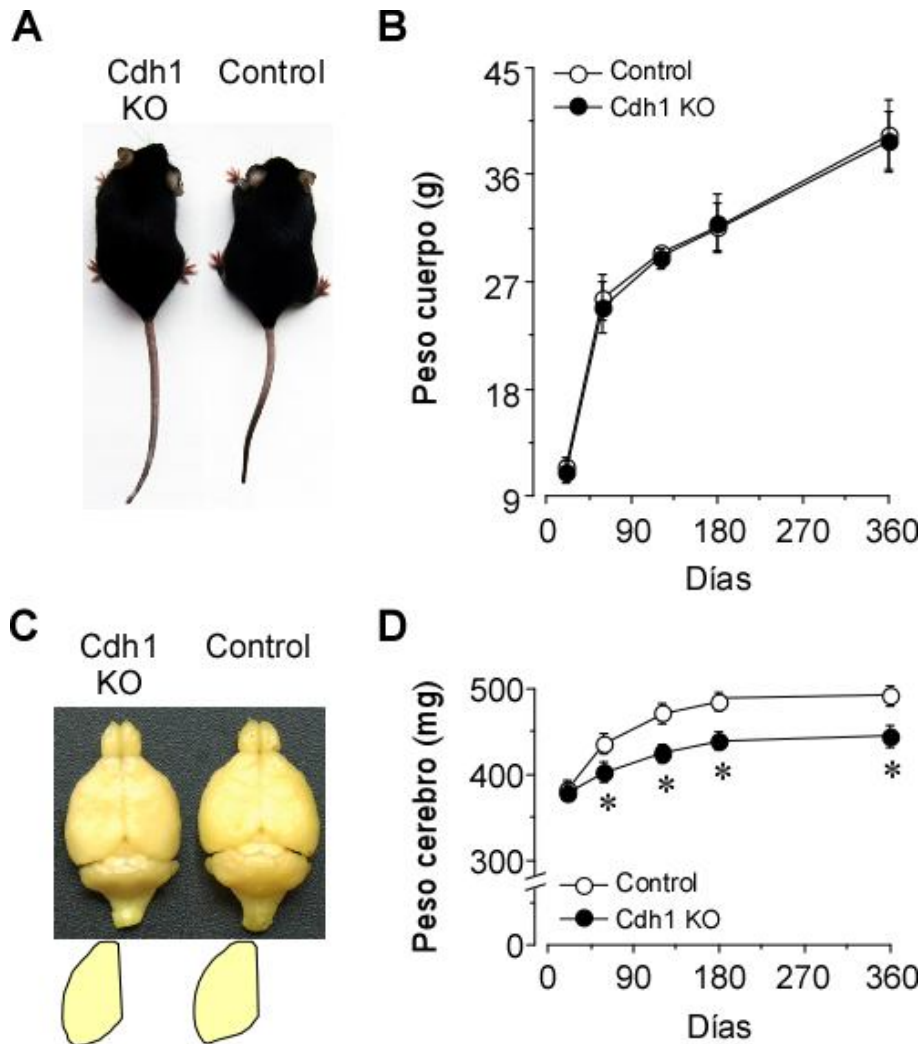
**Figura 2. Expresión de la proteína CaMKII $\alpha$  en ratones adultos.** Transferencias de tipo *Western Blot* de muestras de corteza cerebral (A) e hipocampo (B) mostraron la expresión de CaMKII $\alpha$  en animales de P25 y P120, tanto en los controles como en los Cdh1 KO.



## 2. La deficiencia de Cdh1 reduce el espesor de la corteza cerebral y de la capa CA1 del hipocampo

Recientemente, Eguren y colaboradores [Eguren, 2013] han descrito que la supresión de Cdh1 en los precursores neurales incrementa considerablemente la letalidad y reduce el peso corporal del animal durante la etapa adulta. Sin embargo, la supresión de Cdh1 en la Cx y el Hy durante la etapa adulta no provocó cambios significativos ni en la supervivencia (resultados no mostrados) ni en el peso corporal de los ratones transgénicos (figuras 3A y 3B), que fue similar a la de los animales control.

No obstante, nuestros resultados mostraron que el peso del encéfalo de los ratones Cdh1 KO resultó ser significativamente menor que el de los controles de la misma edad (**figuras 3C y 3D**), lo que sugiere que la deficiencia de Cdh1 podría estar provocando alteraciones estructurales e, incluso, pérdida celular.



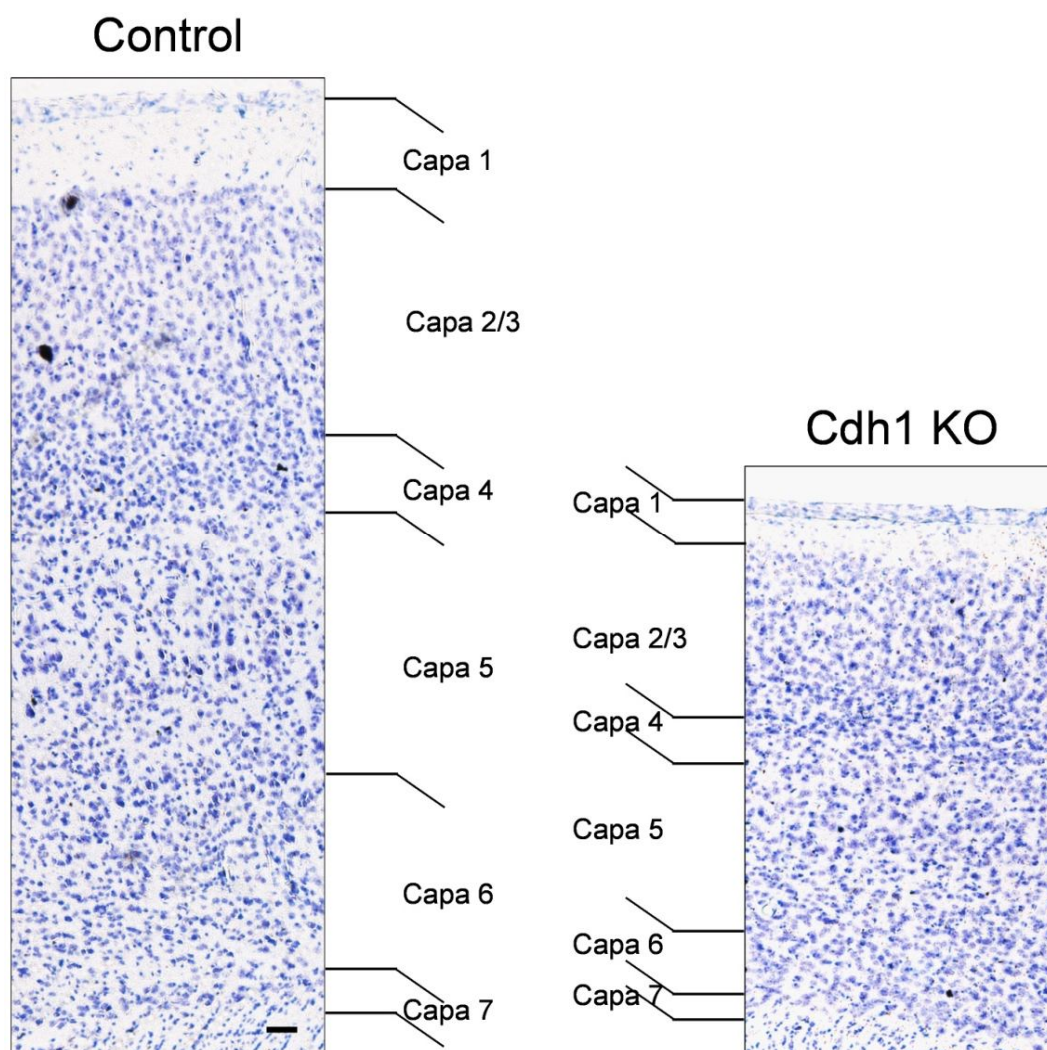
**Figura 3. La ausencia de Cdh1 no modifica el peso corporal de los animales, pero disminuye el peso del encéfalo.** **A.** Ejemplares machos de ratones Cdh1 KO y controles. **B.** Evolución temporal del peso de los animales Cdh1 KO (n=12) y controles (n=10). **C.** Imagen representativa de cerebros de ratones Cdh1 KO y controles de 120 días tras la perfusión. En la parte inferior: contornos de corteza cerebral de los hemisferios izquierdos. **D.** A partir de los 60 días de vida, el peso del cerebro de ratones Cdh1 KO (n=10) resultó ser menor que el de los animales control (n=10).

\* $p \leq 0,05$  respecto al control de la misma edad.

Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que Cdh1 tiene un papel esencial en el desarrollo de la corteza cerebral durante el desarrollo embrionario. Así, la deficiencia de Cdh1 provoca el acortamiento de la Cx lo que se traduce en una disminución del tamaño cerebral y desarrollo de microcefalia [Delgado-Esteban, 2013]. La Cx está organizada en capas celulares; este principio organizador proporciona un ensamblaje perfecto y específico que limita la forma en la que conectan las neuronas,

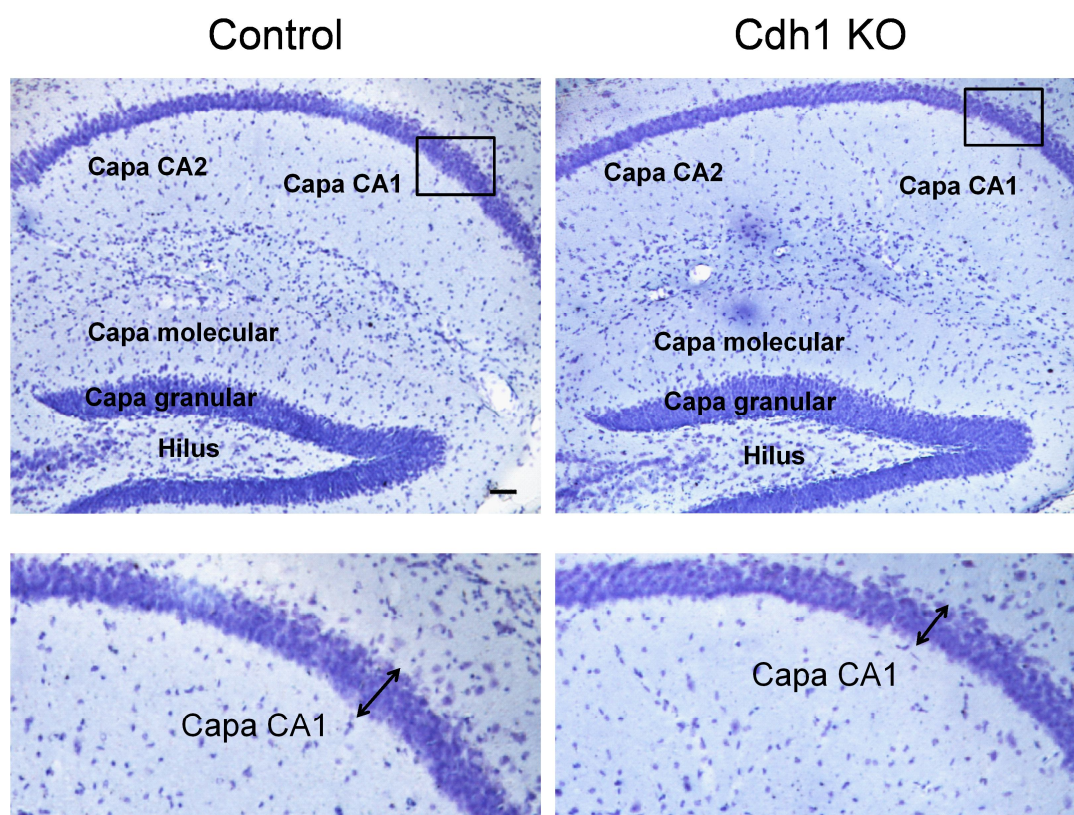
maximizando el potencial conectivo de los circuitos neuronales. Así, esta estructura en capas es fundamental para la anatomía y función de la corteza [Watakabe, 2007]. En el caso del cerebro en desarrollo, la deficiencia de Cdh1 provoca un ligero alargamiento de las capas ventricular y subventricular de la Cx, mientras que se acortan considerablemente las capas intermedia y cortical, lo que resulta en la reducción del espesor de toda la Cx en el momento del nacimiento [Delgado-Esteban, 2013].

En general, en la Cx del ratón adulto suelen distinguirse siete capas diferentes [Watakabe, 2007]. Con objeto de investigar el efecto de la deficiencia de Cdh1 sobre el espesor de la Cx en el cerebro adulto, en primer lugar realizamos tinciones de Nissl en secciones sagitales de animales control y Cdh1 KO de 180 días de vida. La tinción de Nissl reveló una reducción de un 20% en el espesor de las capas de la Cx, en los ratones carentes de Cdh1 (Cdh1 KO) respecto a los animales control de la misma edad (figura 4).



**Figura 4. La deficiencia de Cdh1 provoca el acortamiento de la corteza cerebral en ratones de 180 días.** Fotografías de campo claro de la corteza cerebral de ratones macho de 180 días de vida postnatal, tras una tinción de Nissl. Los animales Cdh1 KO presentan una disminución del espesor de cada una de las capas de la corteza parietal, respecto a los controles. Barra de escala: 50 micras.

Como se muestra en la **figura 5**, no se observaron diferencias importantes en la anatomía global del Hy entre los animales control y los Cdh1 KO. Sin embargo, el análisis detallado de la capa CA1 del Hy puso de manifiesto, igualmente, una reducción de un 30% en el espesor de la misma en los ratones carentes de Cdh1, respecto al animal control (**figura 5**). Es importante destacar que en la línea de ratón transgénico CaMKII $\alpha$ -Cre utilizada para la generación del ratón Cdh1 KO (B6.Cg-Tg-T29-1Stl/J), la eficacia del sistema de recombinación Cre-LoxP en el Hy está limitada específicamente a la capa CA1, probablemente debido a que la actividad de la recombinasa en las neuronas piramidales (excitatorias) de esta capa es mayor que en el resto de capas que forman el Hy [Tsien, 1996]. Además, la capa CA1 del Hy es la que posee mayor actividad de CaMKII $\alpha$  [Minichiello, 1999]. Todo ello hace que las neuronas de la capa CA1 del Hy presenten una mayor eficacia de supresión de Cdh1 y, en consecuencia, que sea ésta la zona más afectada por la deficiencia de la proteína.

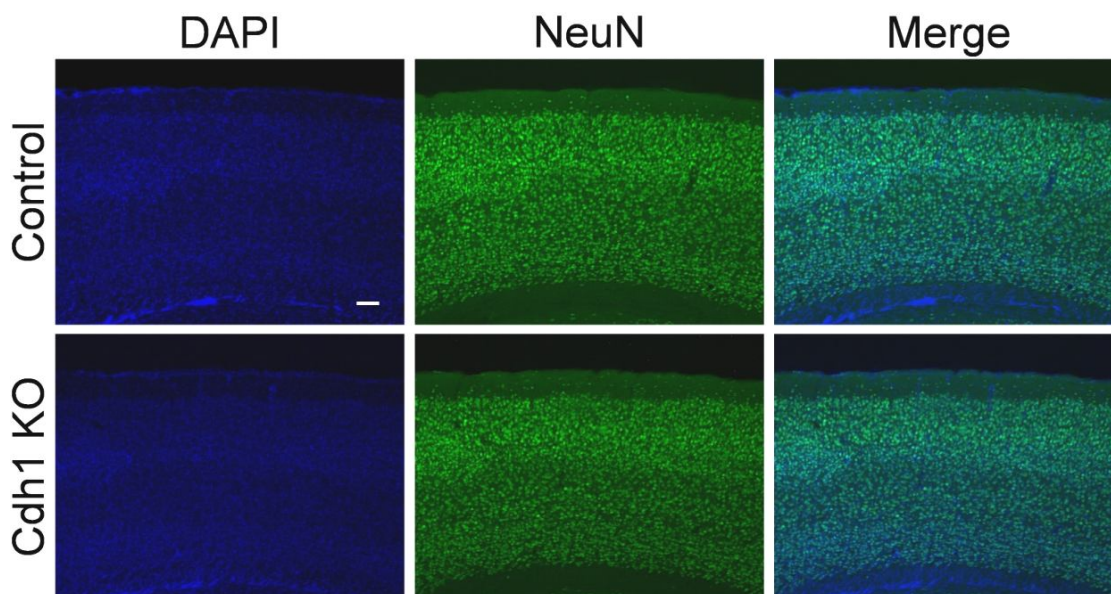


**Figura 5. La deficiencia de Cdh1 provoca el acortamiento de la capa CA1 del hipocampo en ratones de 180 días.** Fotografías de campo claro de la región hipocámpal de ratones macho de 180 días de vida postnatal, tras una tinción de Nissl. Detalle de la capa CA1 del hipocampo. Los animales Cdh1 KO presentan una disminución del espesor de la capa CA1, respecto a los controles. Barra de escala: 50 micras.

Por tanto, el modelo murino que hemos generado permite la supresión de la expresión de Cdh1 en zonas que expresan la CaMKII $\alpha$ , como son la Cx y la capa CA1 del Hy [<http://www.jax.org>], lo que provoca la disminución en el espesor de dichas áreas cerebrales en el cerebro adulto, como hemos descrito que ocurre en el cerebro en desarrollo [Delgado-Esteban, 2013].

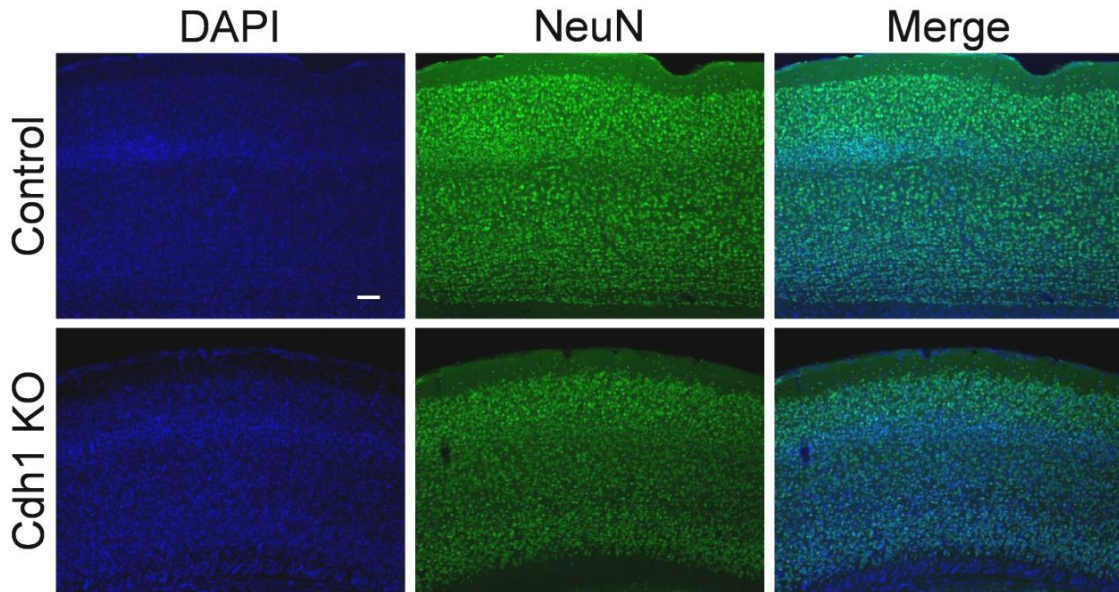
Posteriormente, y con objeto de estudiar si el efecto de la ausencia de Cdh1 sobre el acortamiento de las zonas cerebrales arriba descritas, era debido a alteraciones en la integridad de las neuronas, se realizaron inmunohistoquímicas en secciones de Cx e Hy de ratones control y Cdh1 KO de 25 (P25), 120 (P120) y 360 (P360) días de vida postnatal, utilizando un anticuerpo contra el conocido marcador neuronal NeuN. Este anticuerpo reacciona con la mayoría de tipos de neuronas del SN de ratones, incluyendo las que se encuentran en la Cx, el Hy, el tálamo y la médula espinal, así como algunas neuronas del SNP. En tinciones inmunohistoquímicas, la proteína se localiza principalmente en el núcleo de las neuronas [Mullen, 1992; Wolf, 1996].

Como se observa en las **figuras 6 y 10**, en los animales P25, que aún expresan Cdh1 (ver **figura 1**), no se observaron diferencias anatómicas significativas en las estructuras cerebrales estudiadas, corteza cerebral e hipocampo. Sin embargo, la detección inmunohistoquímica de NeuN, sí puso de manifiesto que la carencia de Cdh1 provoca el acortamiento de la Cx y de la capa CA1 del Hy en los ratones P120 (**figuras 7 y 11**) y P360 (**figuras 8 y 12**). Para facilitar la comparación entre ambos genotipos, en las **figuras 9 y 13** se muestran inmunohistoquímicas fluorescentes de NeuN realizadas en secciones de Cx e Hy procedentes de ratones control y Cdh1 KO P25, P120 y P360.

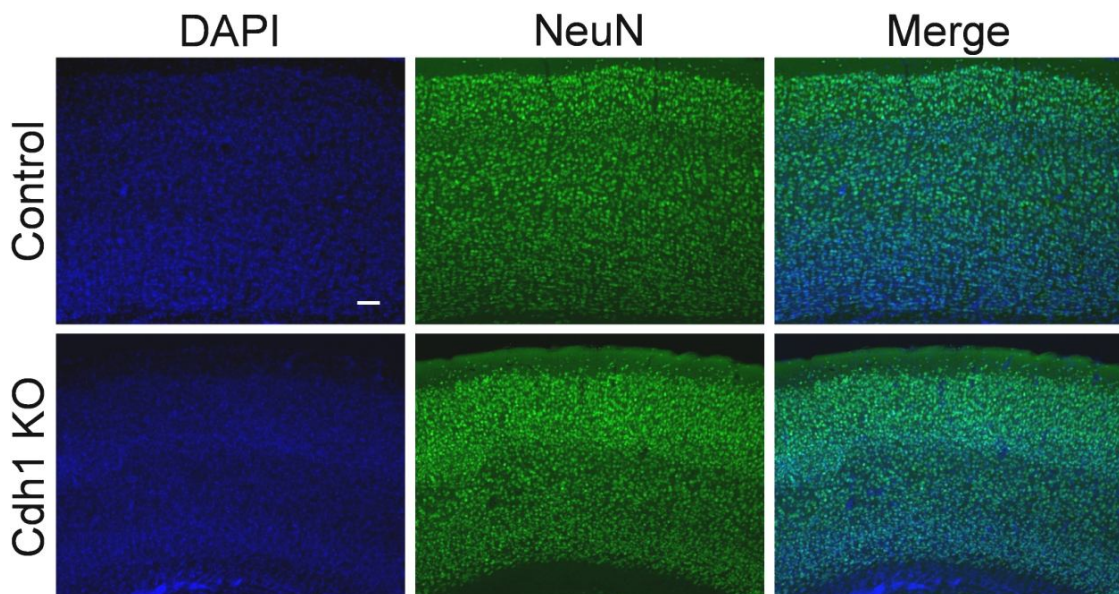


**Figura 6. Detección inmunohistoquímica del marcador neuronal NeuN en corteza cerebral de ratones de 25 días.** Imágenes representativas de inmunohistoquímicas realizadas en secciones de corteza parietal de ratones macho control y Cdh1 KO de 25 días, utilizando el anticuerpo contra el marcador neuronal **NeuN**. La tinción nuclear se realizó con el marcador nuclear **DAPI**. No se observaron diferencias significativas entre ambos genotipos. Barra de escala: 100 micras.

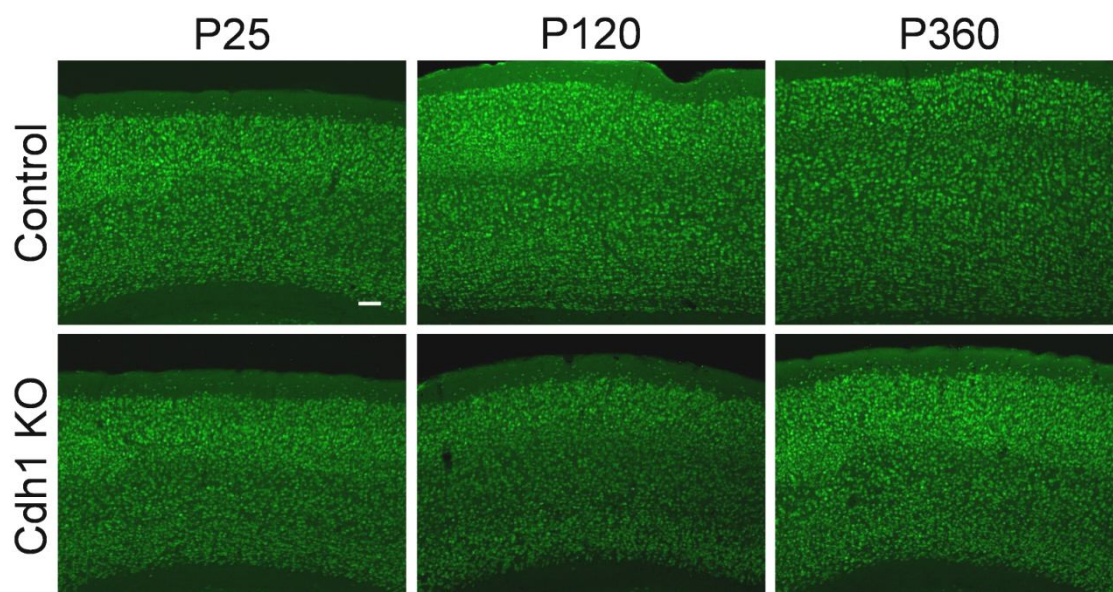




**Figura 7. Detección inmunohistoquímica del marcador neuronal NeuN en corteza cerebral de ratones de 120 días.** Imágenes representativas de inmunohistoquímicas realizadas en secciones de corteza parietal de ratones macho control y Cdh1 KO de 120 días, utilizando el anticuerpo contra el marcador neuronal **NeuN**. La tinción nuclear se realizó con el marcador nuclear **DAPI**. La deficiencia de Cdh1 provoca el acortamiento de la corteza cerebral en ratones de P120, respecto al control. Barra de escala: 100 micras.

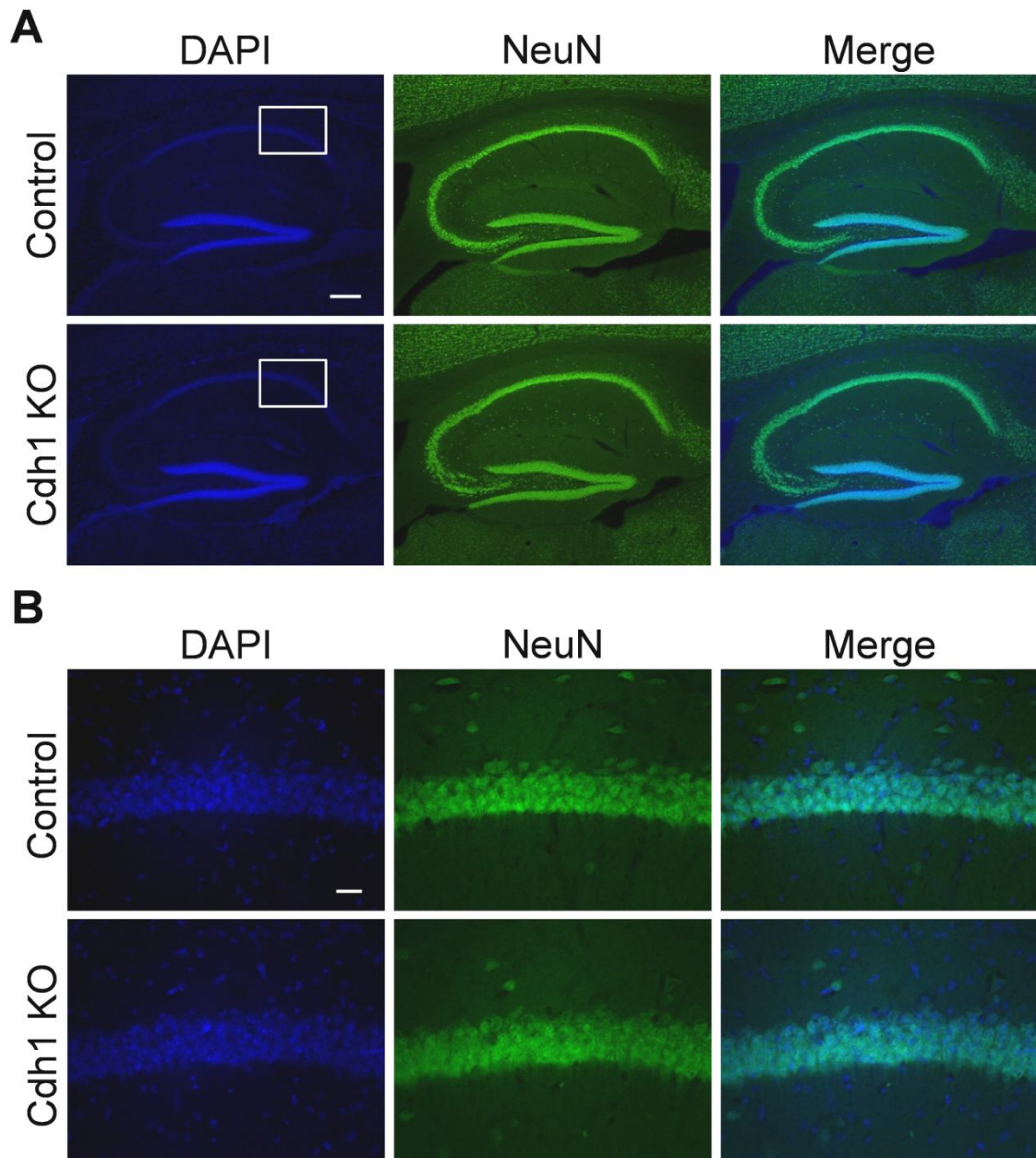


**Figura 8. Detección inmunohistoquímica del marcador neuronal NeuN en corteza cerebral de ratones de 360 días.** Imágenes representativas de inmunohistoquímicas realizadas en secciones de corteza parietal de ratones macho control y Cdh1 KO de 1 año, utilizando el anticuerpo contra el marcador neuronal **NeuN**. La tinción nuclear se realizó con el marcador nuclear **DAPI**. La deficiencia de Cdh1 provoca el acortamiento de la corteza cerebral en ratones de P360, respecto al control. Barra de escala: 100 micras.



**Figura 9. La deficiencia de Cdh1 provoca el acortamiento de la corteza cerebral.** Imágenes representativas de inmunohistoquímicas realizadas en secciones de corteza parietal de ratones macho control y Cdh1 KO de 25, 120 y 360 días, utilizando el anticuerpo contra el marcador neuronal **NeuN**. Mientras que no hay diferencias en los animales de P25, la deficiencia de Cdh1 provoca el acortamiento de la corteza cerebral en los ratones de P120 y P360, respecto a los correspondientes controles.

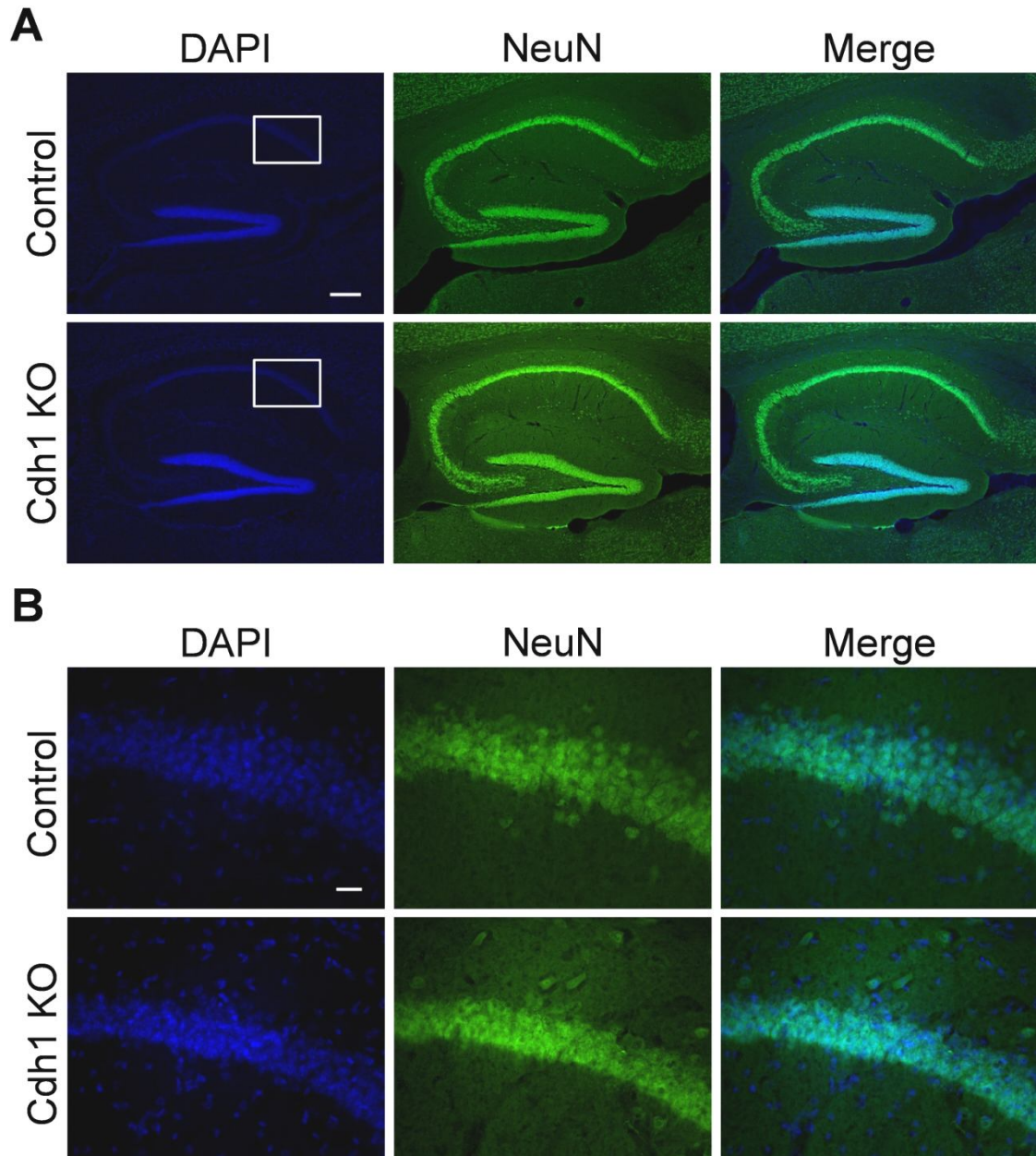
Barra de escala: 100 micras.



**Figura 10. Detección inmunohistoquímica del marcador neuronal NeuN en hipocampo de ratones de 25 días.** Imágenes representativas de inmunohistoquímicas realizadas en secciones de hipocampo de ratones macho control y Cdh1 KO de 25 días, utilizando el anticuerpo contra el marcador neuronal NeuN. La tinción nuclear se realizó con el marcador nuclear DAPI. No se observaron diferencias significativas entre ambos genotipos.

**A.** Formación hipocampal. Barra de escala: 200 micras.

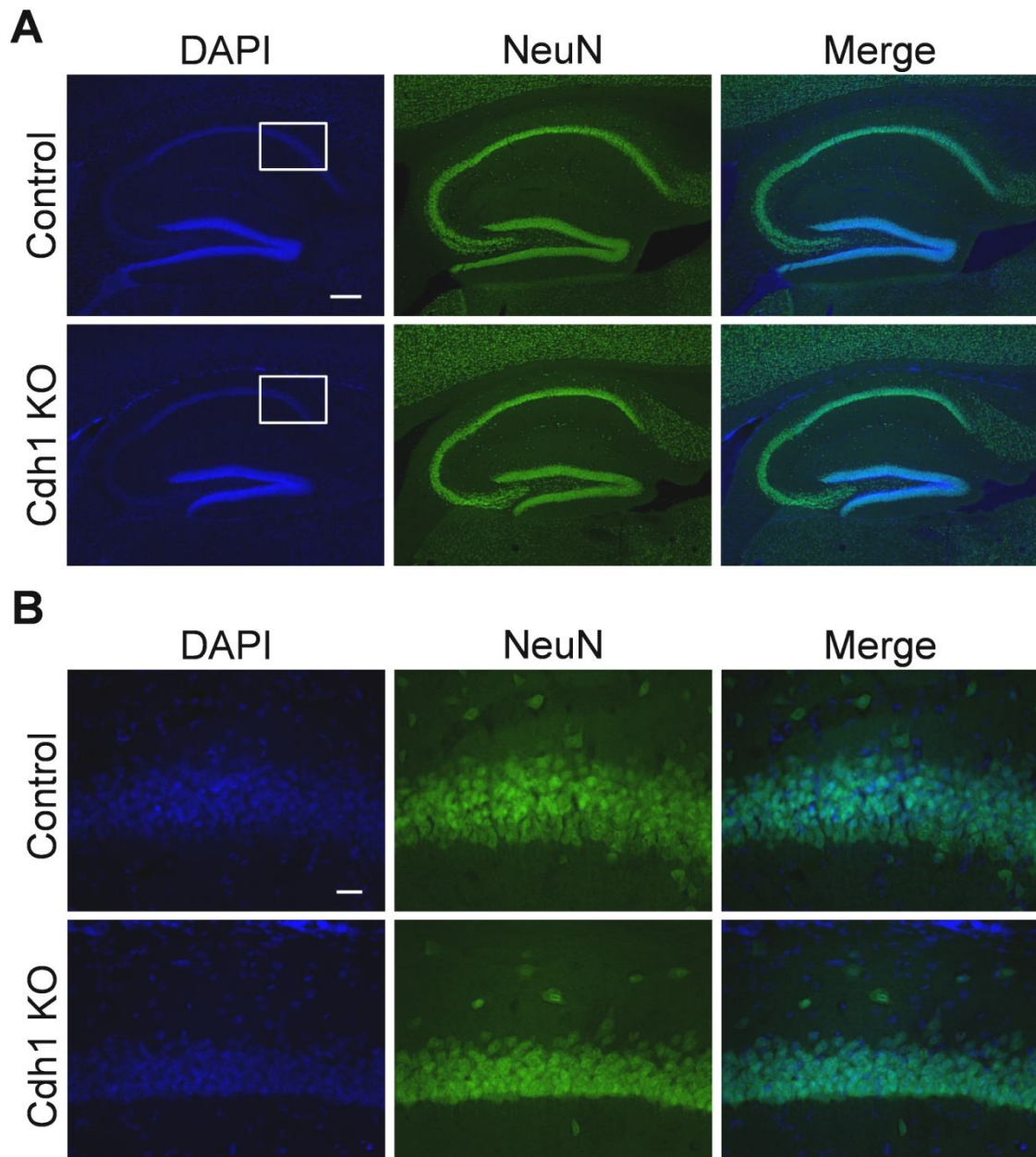
**B.** Detalle capa CA1. Barra de escala: 25 micras.



**Figura 11. Detección inmunohistoquímica del marcador neuronal NeuN en hipocampo de ratones de 120 días.** Imágenes representativas de inmunohistoquímicas realizadas en secciones de hipocampo de ratones macho control y Cdh1 KO de 120 días, utilizando el anticuerpo contra el marcador neuronal NeuN. La tinción nuclear se realizó con el marcador nuclear DAPI. La deficiencia de Cdh1 provoca el acortamiento de la capa CA1 del hipocampo en ratones de P120, respecto al control.

**A.** Formación hipocampal. Barra de escala: 200 micras.

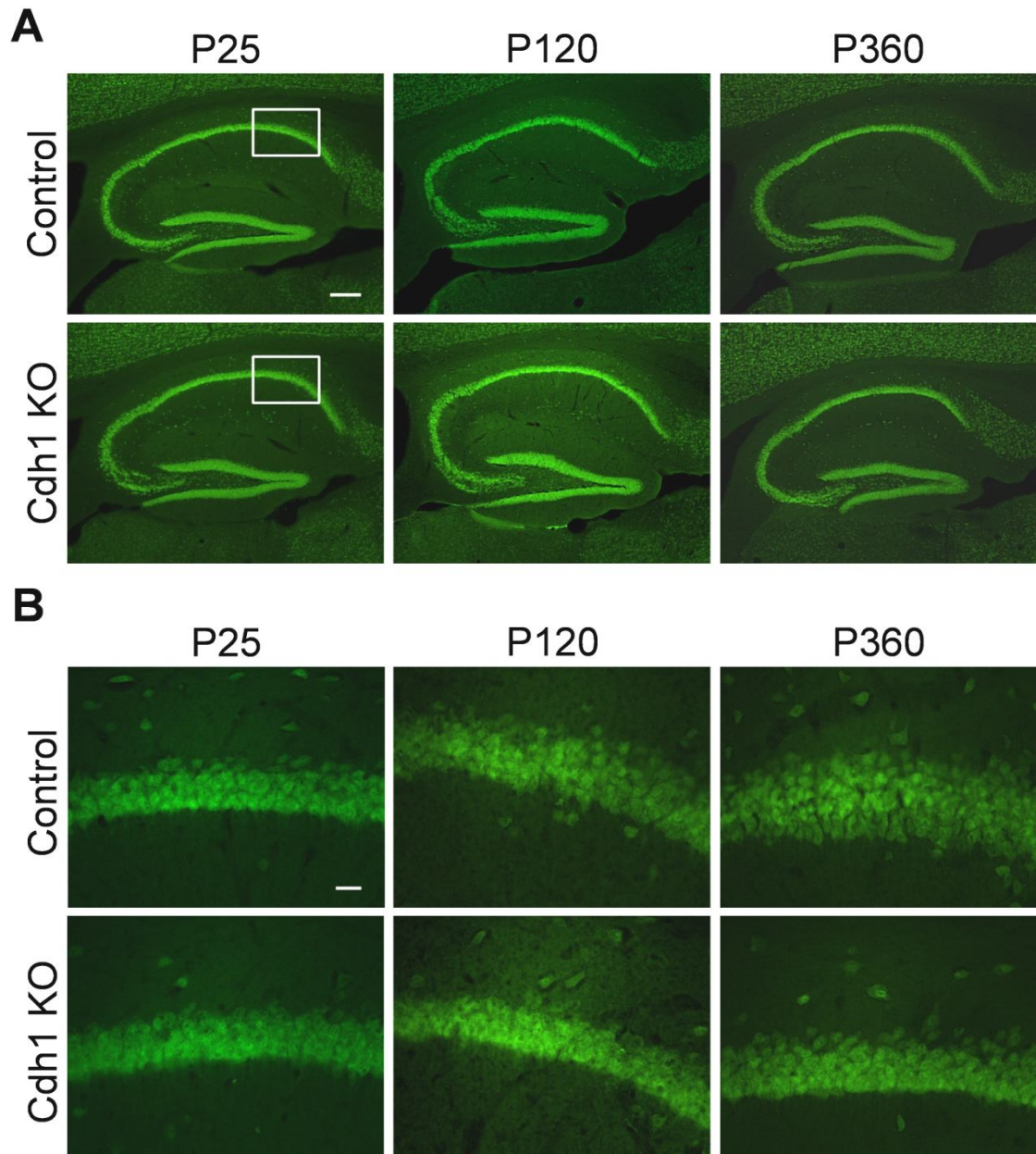
**B.** Detalle capa CA1. Barra de escala: 25 micras.



**Figura 12. Detección inmunohistoquímica del marcador neuronal NeuN en hipocampo de ratones de 360 días.** Imágenes representativas de inmunohistoquímicas realizadas en secciones de hipocampo de ratones macho control y Cdh1 KO de 1 año, utilizando el anticuerpo contra el marcador neuronal NeuN. La tinción nuclear se realizó con el marcador nuclear DAPI. La deficiencia de Cdh1 provoca el acortamiento de la capa CA1 del hipocampo en ratones de P360, respecto al control.

**A.** Formación hipocampal. Barra de escala: 200 micras.

**B.** Detalle capa CA1. Barra de escala: 25 micras.

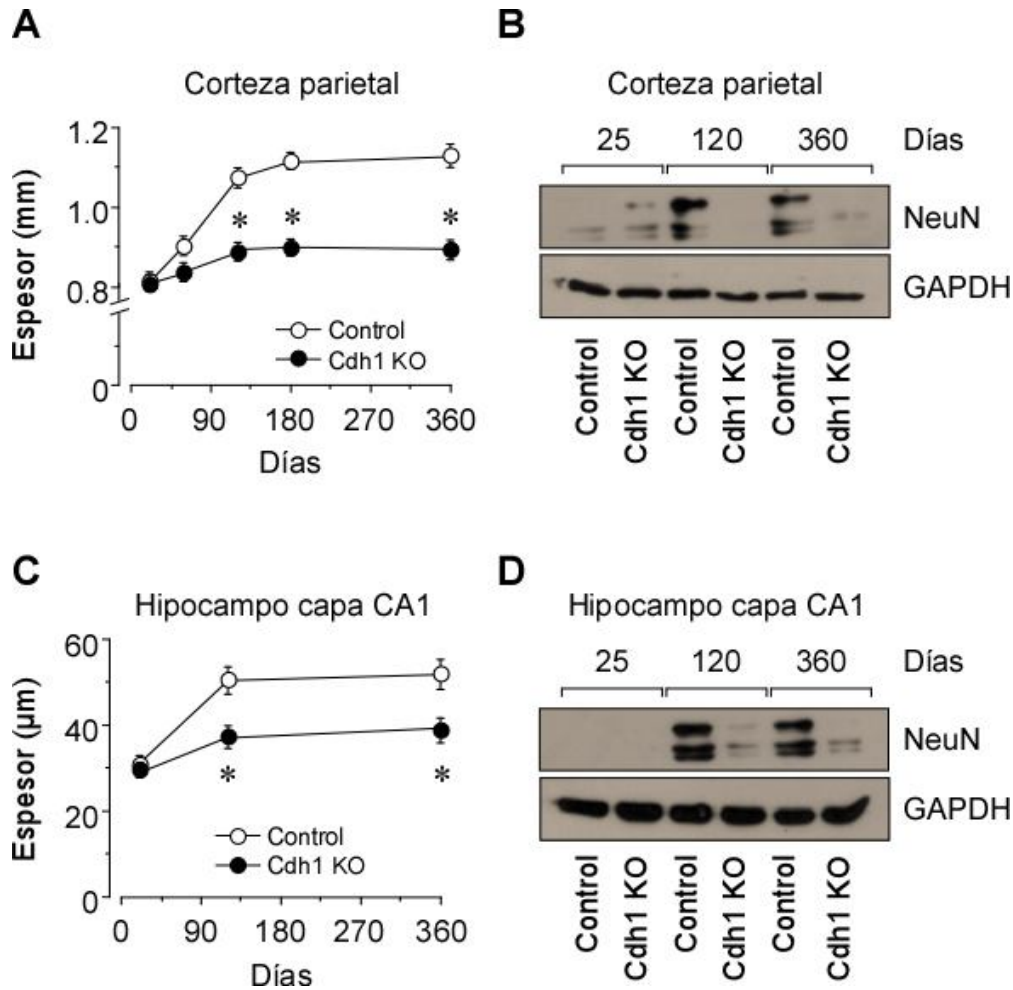


**Figura 13. La deficiencia de Cdh1 provoca el acortamiento de la capa CA1 del hipocampo.** Imágenes representativas de inmunohistoquímicas realizadas en secciones de hipocampo de ratones macho control y Cdh1 KO de 25, 120 y 360 días, utilizando el anticuerpo contra el marcador neuronal **NeuN**. Mientras que no hay diferencias en los animales de P25, la deficiencia de Cdh1 provoca el acortamiento de la capa CA1 del hipocampo en los ratones de P120 y P360, respecto a los correspondientes controles.

**A.** Formación hipocampal. Barra de escala: 200 micras.

**B.** Detalle capa CA1. Barra de escala: 25 micras.

Además, se realizó la cuantificación del espesor de la Cx y de la capa CA1 del Hy en ratones control y Cdh1 KO a los diferentes tiempos de vida estudiados (**figuras 14A y 14C**). Para ello, se realizaron 20 medidas del espesor de nuestras áreas de interés, en cada uno de los tres cortes más parasagittales de la serie que estaba constituida por 3 pocillos. Es decir, realizamos 180 mediciones por cada individuo.



**Figura 14. La deficiencia de Cdh1 provoca el acortamiento significativo del espesor de la corteza cerebral y de la capa CA1 del hipocampo y la pérdida de neuronas.** La cuantificación del espesor de la corteza cerebral (**A**) y de la capa CA1 del hipocampo (**C**) revela que la deficiencia de Cdh1 disminuye significativamente el incremento en el espesor de ambas zonas, que se produce en los ratones control a partir de los 25 días de vida postnatal (n=6 para cada edad y genotipo). **B** y **D**. Imágenes representativas de transferencias tipo *Western Blot* (baja exposición) revelan que la deficiencia de Cdh1 provoca la pérdida de detección de NeuN en ambas áreas.

\*p<0,05 respecto al control de la misma edad.

Como se muestra en las **figuras 14A y 14C**, los espesores de la Cx y de la capa CA1 del Hy aumentaron progresivamente en los animales control desde los 25 hasta los 120 días de vida postnatal, momento en el que se estabilizaron dichos valores. Aunque en los animales de P25 y P60 deficientes en Cdh1 se observaron perfiles similares, el incremento en los espesores de ambas zonas en los ratones Cdh1 KO a partir de P120 resultó ser significativamente menor a los observados en los animales

control. En concreto, la ausencia de Cdh1 provocó una disminución del espesor de la Cx de un 17% en los animales P120 y de un 21% en los ratones P360, respecto a los controles correspondientes (**figura 14A**). Dicho efecto fue incluso más marcado en la capa CA1 del Hy, que resultó ser un 30 y 33% más fina en los ratones Cdh1 KO que en los control a los 120 y 360 días de vida, respectivamente (**figura 14C**).

Igualmente, la detección de NeuN mediante transferencia tipo *Western Blot* (baja exposición) reveló que la carencia de Cdh1 disminuyó la expresión de NeuN, respecto a la observada en los animales control, tanto a 120 como a 360 días de vida (**figuras 14B y 14D**).

Todos estos resultados demuestran que la ausencia de Cdh1 provoca la pérdida del número de neuronas, a juzgar por la disminución en la detección del marcador neuronal NeuN. Por tanto, Cdh1 parece ser esencial para la supervivencia neuronal *in vivo*, como demostramos previamente en las neuronas en cultivo primario [Almeida, 2005; Maestre, 2008].

### 3. La deficiencia de Cdh1 disminuye la longitud de las dendritas y reduce su arborización

El citoesqueleto neuronal es la estructura interna principal que define la forma y polaridad de las neuronas, por lo que es esencial en la conservación de la integridad neuronal y, en consecuencia, en el mantenimiento de todo el SN. El citoesqueleto neuronal está formado principalmente por microtúbulos, neurofilamentos y filamentos de Actina, de manera que las proteínas que forman estas estructuras son utilizadas como marcadores de la integridad neuronal [Kandel, 2001].

Los microtúbulos son estructuras tubulares, presentes tanto en axones como en dendritas, formados por la polimerización de un dímero de dos proteínas globulares, las alfa y las beta Tubulinas. De entre los diferentes tipos de Tubulinas, la Tubulina III beta o Tuj1 se localiza exclusivamente en los microtúbulos neuronales por lo que se utiliza como marcador específico de la integridad de las prolongaciones neuronales [Tay, 2008; van de Pavert, 2009].

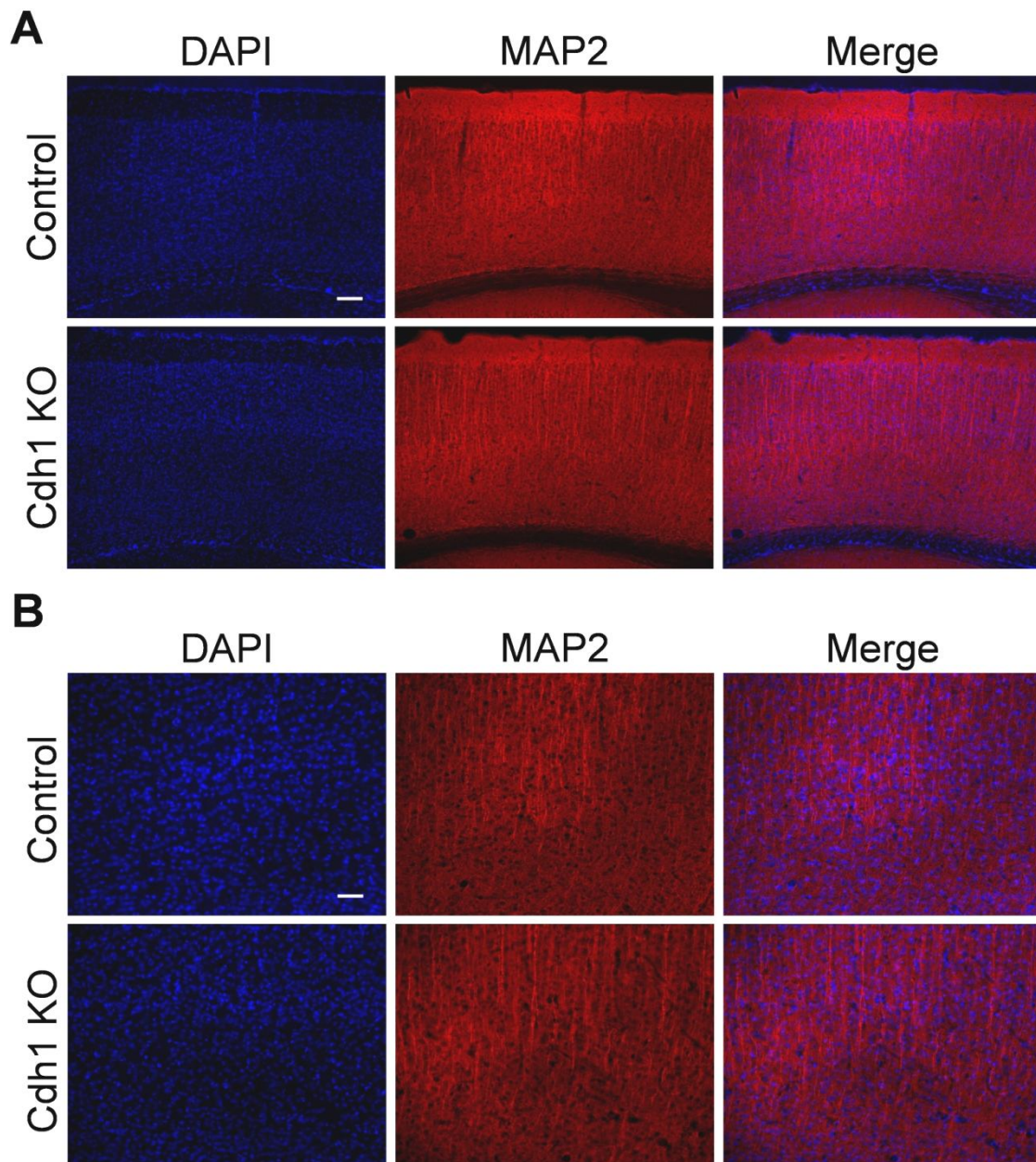
Al mismo tiempo, los microtúbulos son estructuras dinámicas, estabilizadas por un grupo de proteínas denominadas proteínas asociadas a microtúbulos o MAP [Binder, 1986; Chen, 1992]. En concreto, la proteína MAP2 se localiza casi exclusivamente en las dendritas, por lo que se considera un buen marcador dendrítico [Chen, 1992].

Con objeto de profundizar en el efecto de la supresión de Cdh1 sobre la integridad de la estructura neuronal, nuestro siguiente objetivo se centró en el estudio de la longitud y ramificación de las prolongaciones neuronales, particularmente en las dendritas. Para ello, se realizaron tinciones inmunohistoquímicas en secciones de Cx, Hy y Cb de ratones macho de P25, P120 y P360, tanto control como Cdh1 KO, utilizando anticuerpo contra las proteínas MAP2 y Tuj1.

Como se observa en las **figuras 15 y 19**, la ausencia de Cdh1 no modificó la longitud de las dendritas de la Cx y del Hy en los ratones P25, a juzgar por la detección de MAP2, que fue similar en ambos genotipos. Estos resultados coinciden con la falta de efecto sobre el espesor de estas áreas observada en los ratones Cdh1 KO de 25 días (ver **figura 14**). Sin embargo, la longitud de las dendritas de la Cx y del Hy en los ratones P120 y P360 deficientes de Cdh1 (Cdh1 KO) resultó ser menor que la de



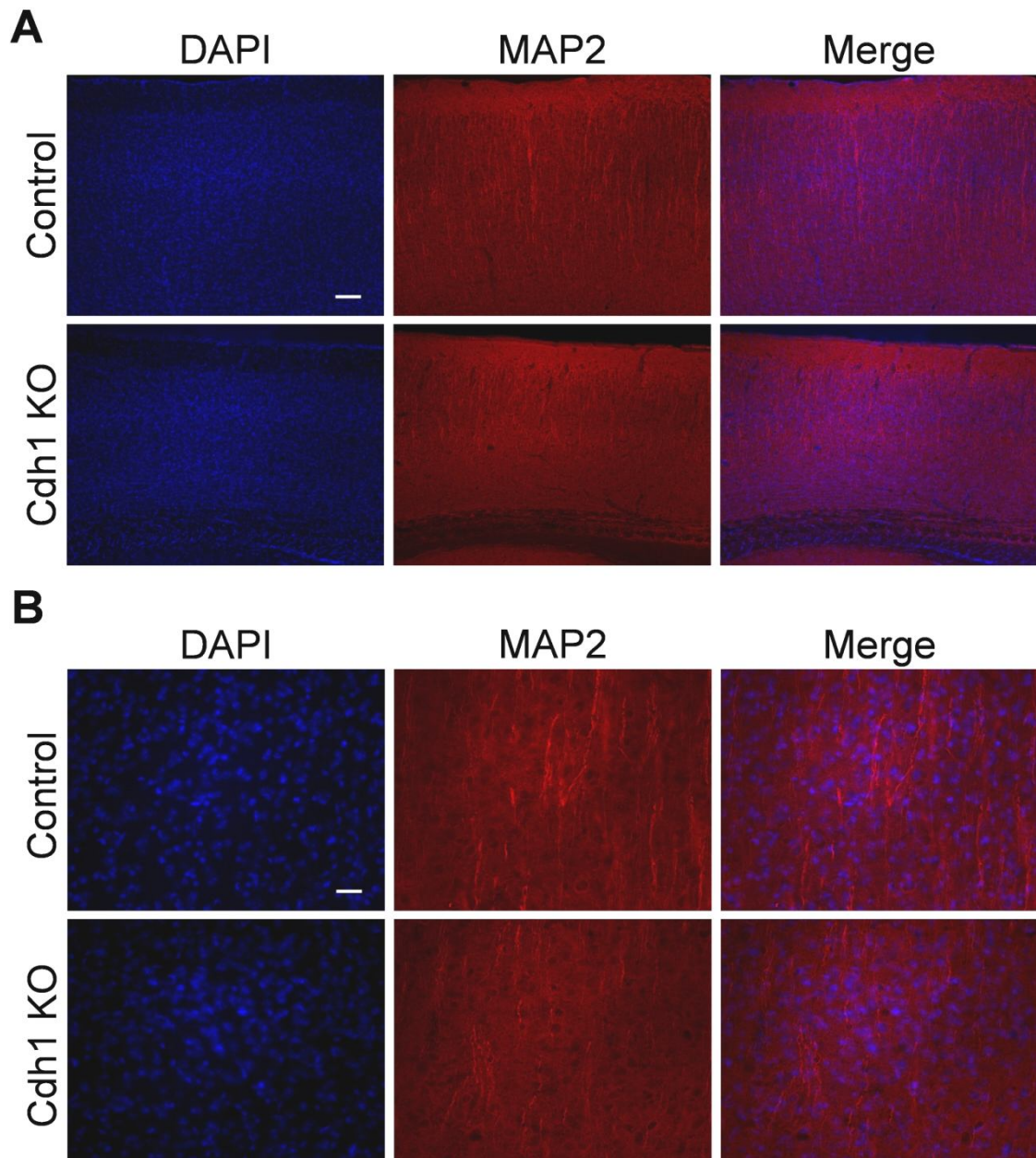
animales control de la misma edad (figuras 16 - 18 y 20 - 22). Dicho efecto se observó tanto en las inmunohistoquímicas realizadas para la detección de MAP2, como para la detección de Tuj1 (figuras 17 y 21).



**Figura 15. Detección inmunohistoquímica del marcador de neuritas MAP2 en corteza cerebral de ratones de 25 días.** Imágenes representativas de inmunohistoquímicas realizadas en secciones de corteza parietal de ratones macho control y Cdh1 KO de 25 días, utilizando el anticuerpo contra el marcador dendrítico **MAP2**. La tinción nuclear se realizó con el marcador nuclear **DAPI**. No se observaron diferencias significativas entre ambos genotipos.

**A.** Barra de escala: 200 micras.

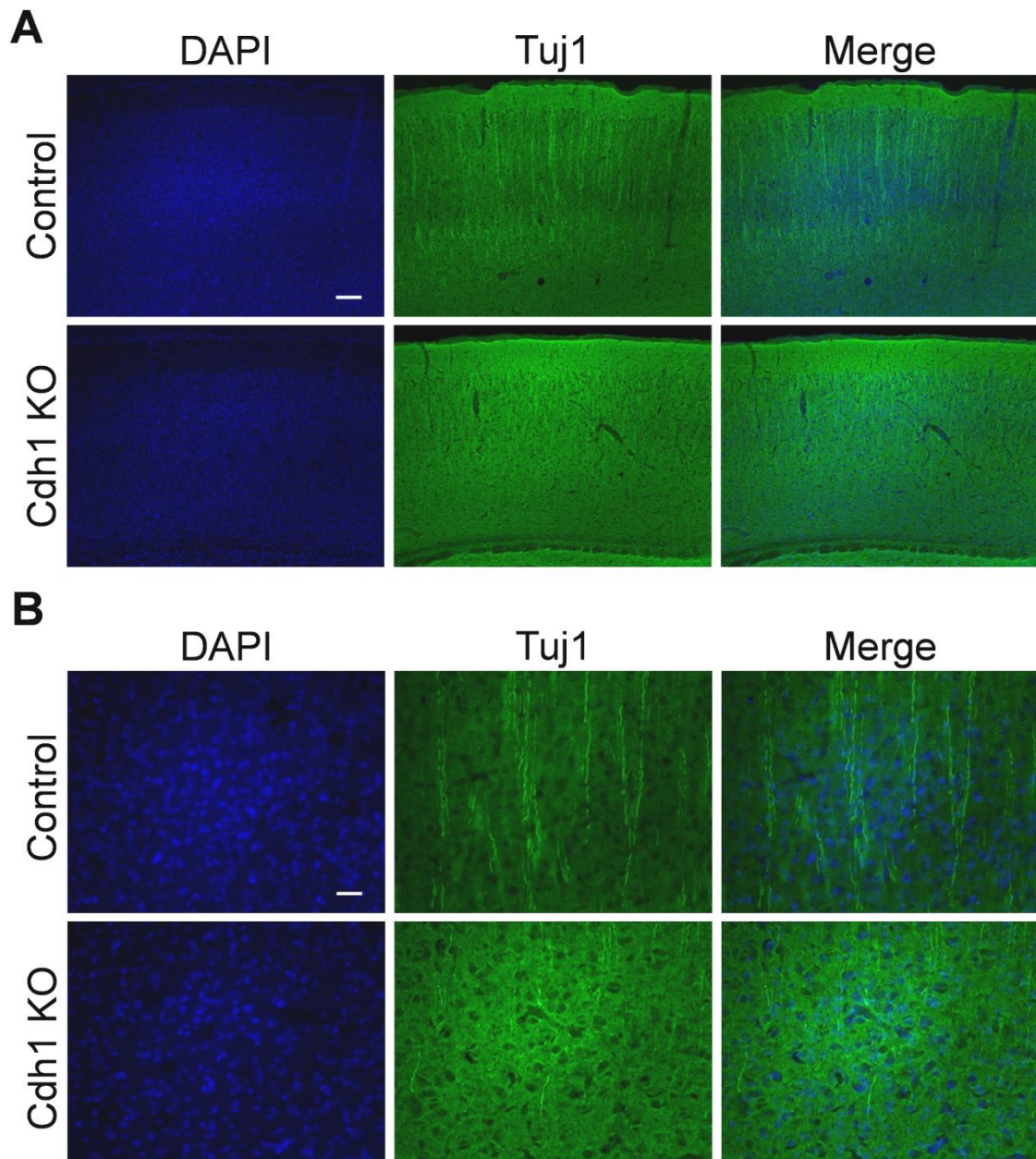
**B.** Barra de escala: 50 micras.



**Figura 16. Detección inmunohistoquímica del marcador de neuritas MAP2 en corteza cerebral de ratones de 120 días.** Imágenes representativas de inmunohistoquímicas realizadas en secciones de corteza parietal de ratones macho control y Cdh1 KO de 120 días, utilizando el anticuerpo contra el marcador dendrítico **MAP2**. La tinción nuclear se realizó con el marcador nuclear **DAPI**. La deficiencia de Cdh1 provoca el acortamiento de la longitud de las neuritas en corteza cerebral de ratones de P120, respecto al control.

**A.** Barra de escala: 200 micras.

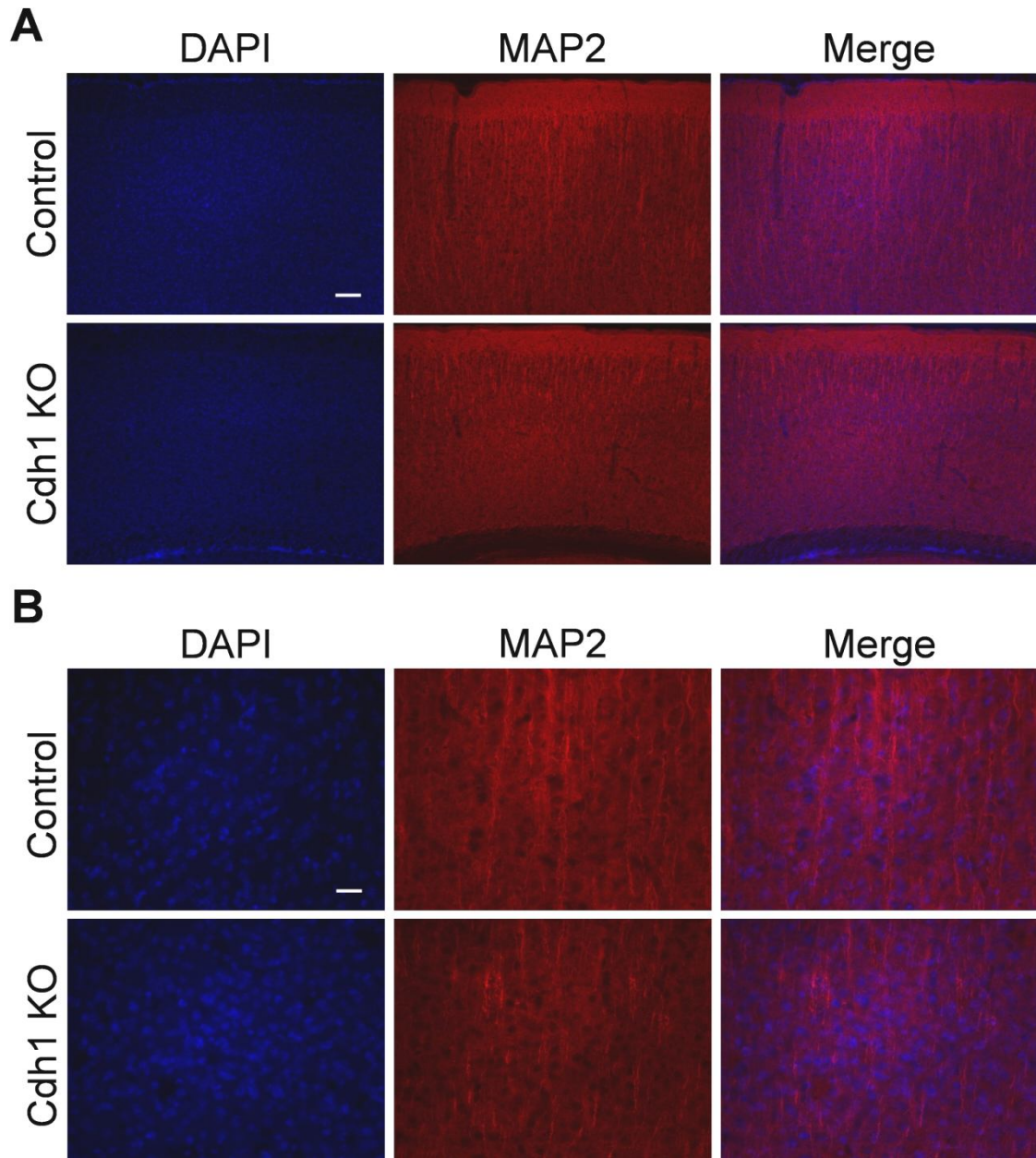
**B.** Barra de escala: 50 micras.



**Figura 17. Detección inmunohistoquímica del marcador de neuritas Tuj1 en corteza cerebral de ratones de 120 días.** Imágenes representativas de inmunohistoquímicas realizadas en secciones de corteza parietal de ratones macho control y Cdh1 KO de 120 días, utilizando el anticuerpo contra el marcador dendrítico Tuj1. La tinción nuclear se realizó con el marcador nuclear DAPI. La deficiencia de Cdh1 provoca el acortamiento de la longitud de las neuritas en corteza cerebral de ratones de P120, respecto al control.

**A.** Barra de escala: 200 micras.

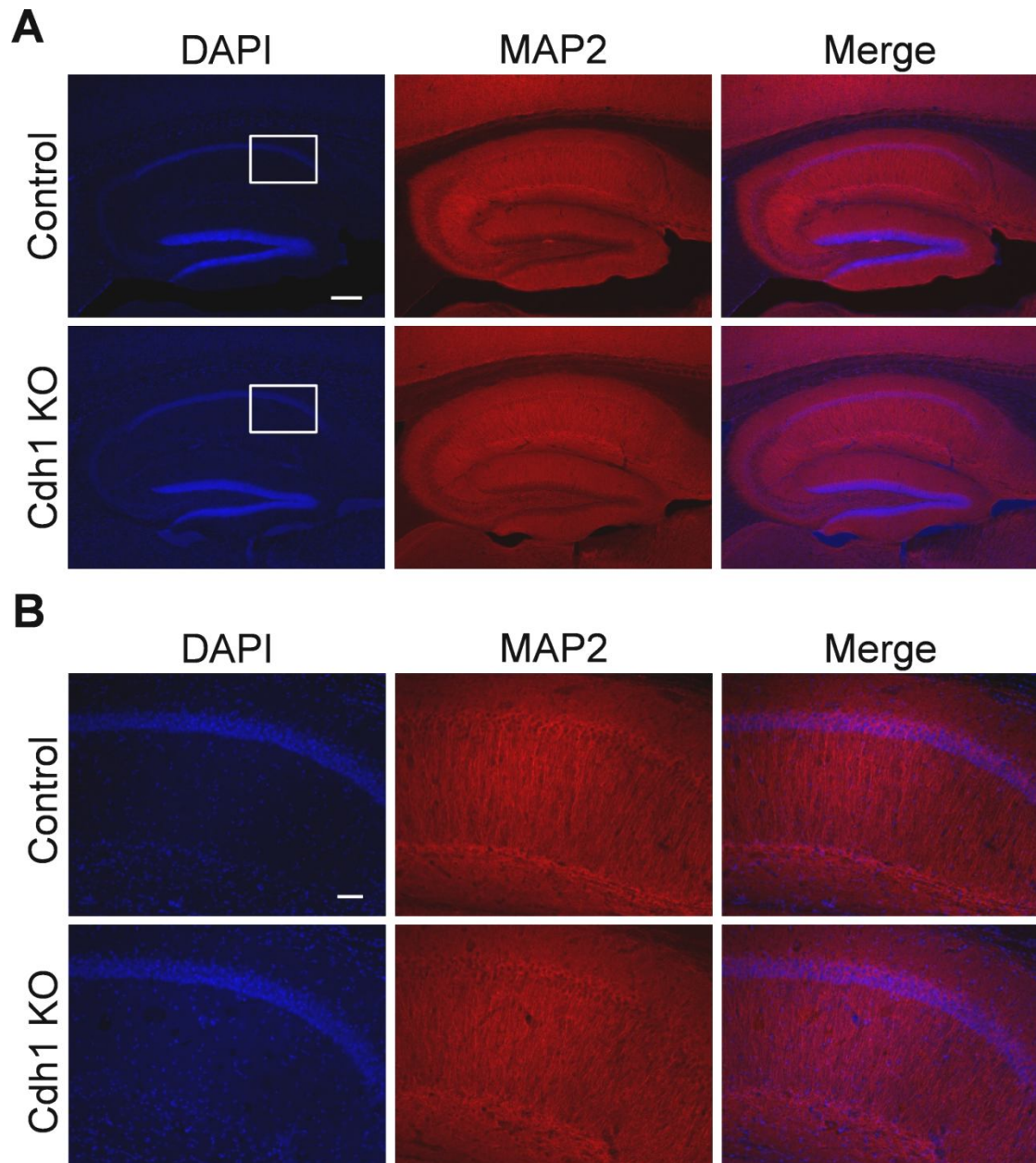
**B.** Barra de escala: 50 micras.



**Figura 18. Detección inmunohistoquímica del marcador de neuritas MAP2 en corteza cerebral de ratones de 360 días.** Imágenes representativas de inmunohistoquímicas realizadas en secciones de corteza parietal de ratones macho control y Cdh1 KO de 360 días, utilizando el anticuerpo contra el marcador dendrítico **MAP2**. La tinción nuclear se realizó con el marcador nuclear **DAPI**. La deficiencia de Cdh1 provoca el acortamiento de la longitud de las neuritas en corteza cerebral de ratones de P360, respecto al control.

**A.** Barra de escala: 200 micras.

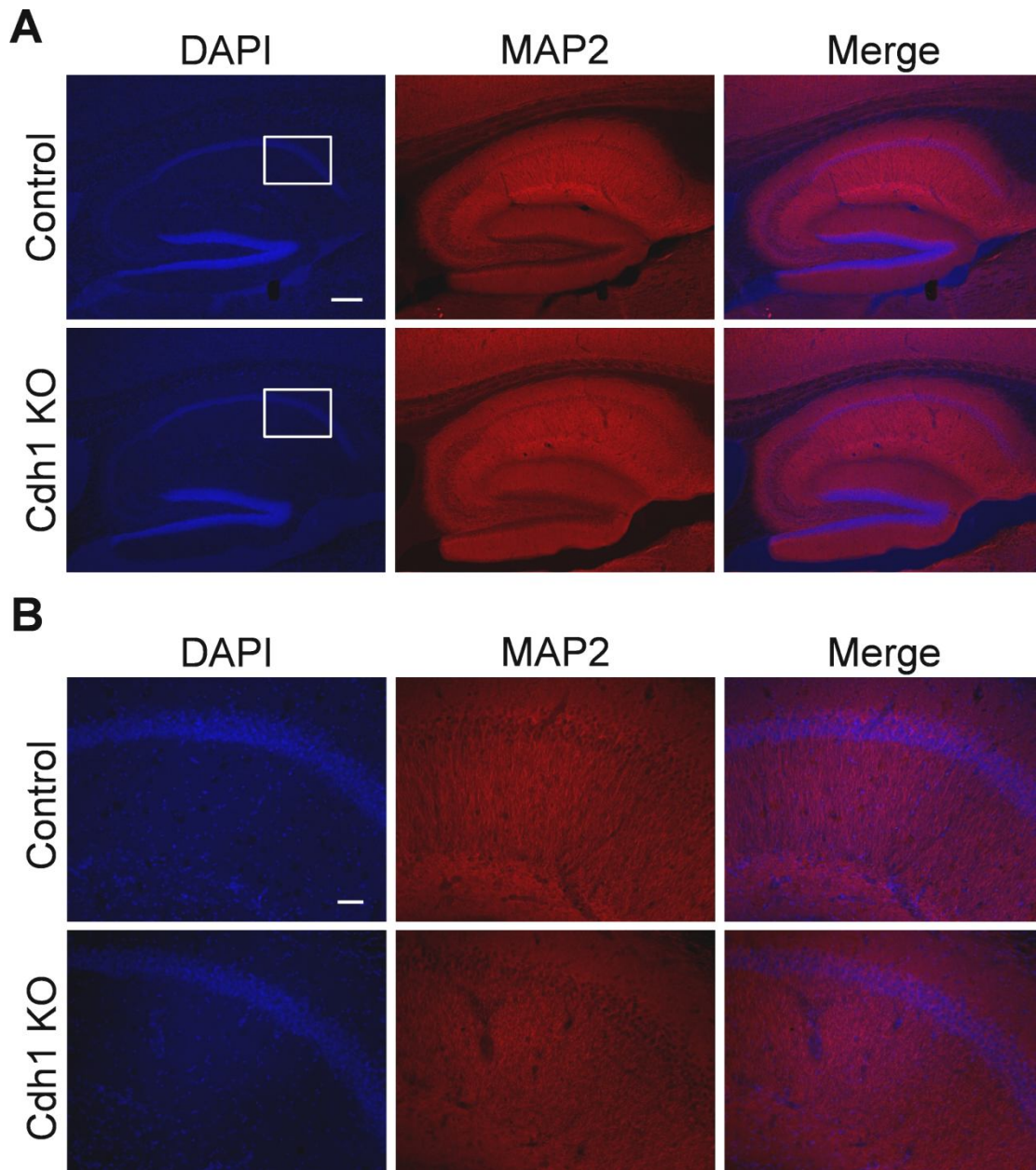
**B.** Barra de escala: 50 micras.



**Figura 19. Detección inmunohistoquímica del marcador de neuritas MAP2 en hipocampo de ratones de 25 días.** Imágenes representativas de inmunohistoquímicas realizadas en secciones de hipocampo de ratones macho control y Cdh1 KO de 25 días, utilizando el anticuerpo contra el marcador dendrítico **MAP2**. La tinción nuclear se realizó con el marcador nuclear **DAPI**. No se observaron diferencias significativas entre ambos genotipos.

**A.** Barra de escala: 200 micras.

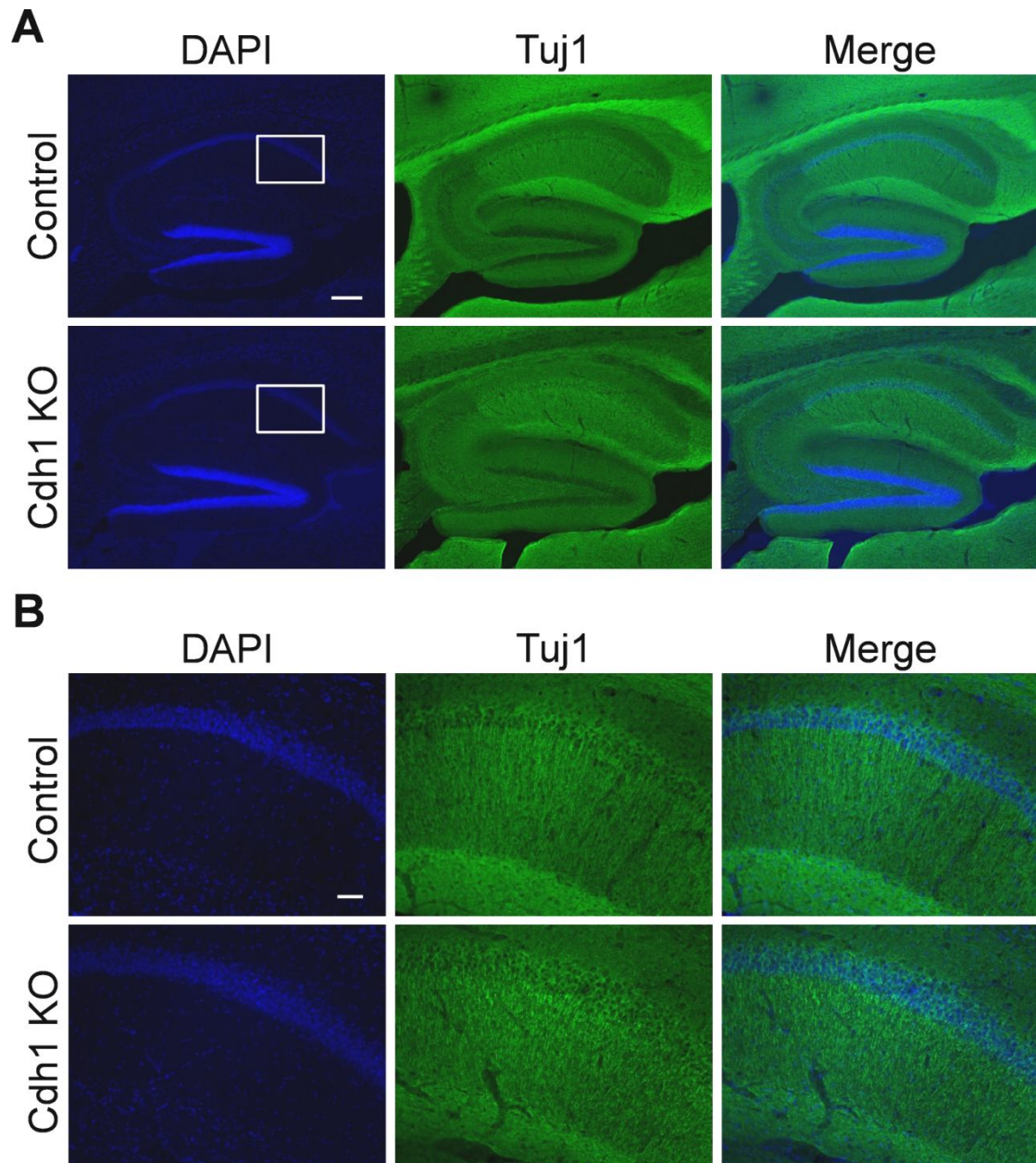
**B.** Barra de escala: 50 micras.



**Figura 20. Detección inmunohistoquímica del marcador de neuritas MAP2 en hipocampo de ratones de 120 días.** Imágenes representativas de inmunohistoquímicas realizadas en secciones de hipocampo de ratones macho control y Cdh1 KO de 120 días, utilizando el anticuerpo contra el marcador dendrítico **MAP2**. La tinción nuclear se realizó con el marcador nuclear **DAPI**. La deficiencia de Cdh1 provoca el acortamiento de la longitud de las neuritas en la capa CA1 de ratones de P120, respecto al control.

**A.** Barra de escala: 200 micras.

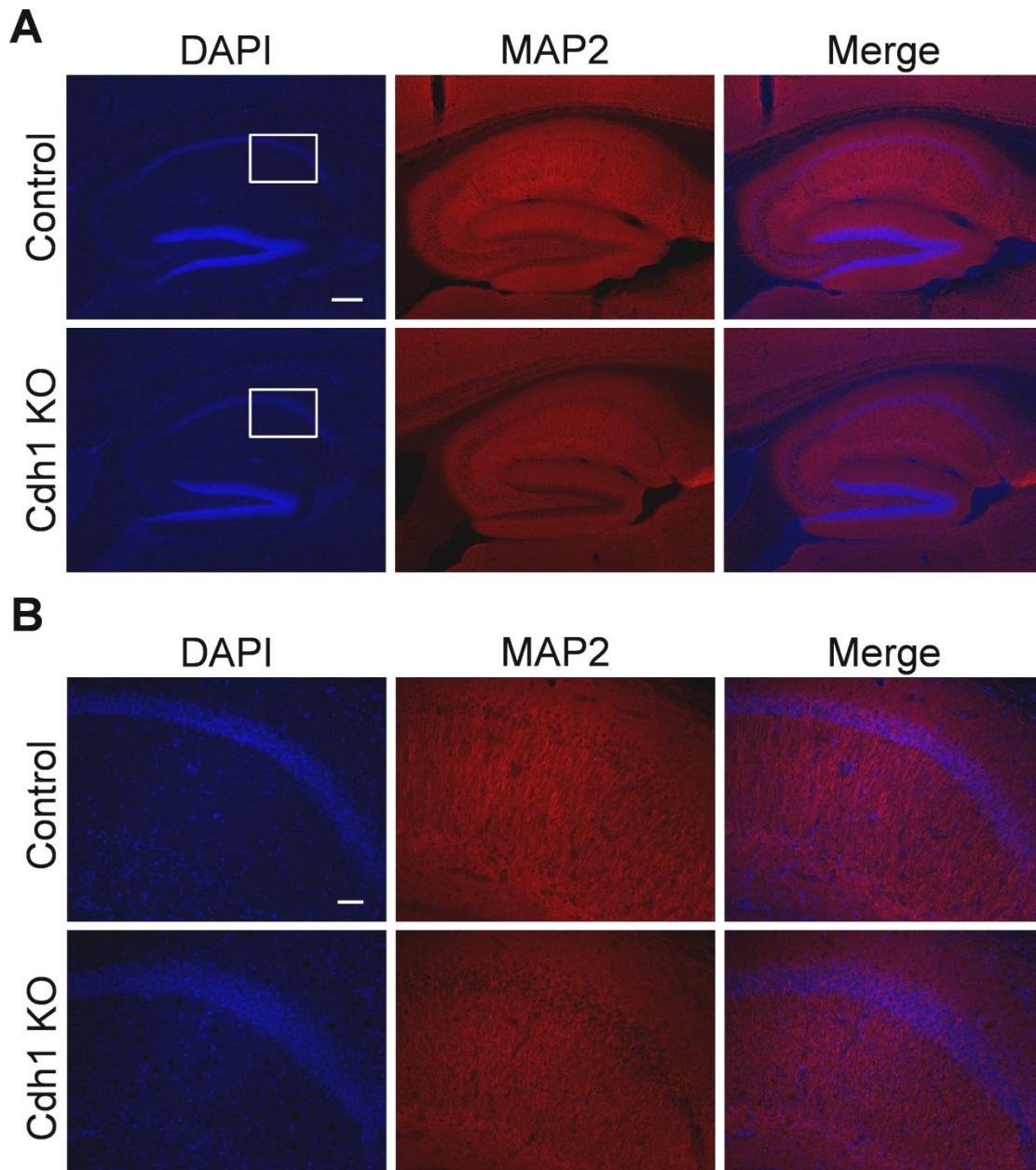
**B.** Barra de escala: 50 micras.



**Figura 21. Detección inmunohistoquímica del marcador de neuritas Tuj1 en hipocampo de ratones de 120 días.** Imágenes representativas de inmunohistoquímicas realizadas en secciones de hipocampo de ratones macho control y Cdh1 KO de 120 días, utilizando el anticuerpo contra el marcador dendrítico **Tuj1**. La tinción nuclear se realizó con el marcador nuclear **DAPI**. La deficiencia de Cdh1 provoca el acortamiento de la longitud de las neuritas en la capa CA1 de ratones de P120, respecto al control.

**A.** Barra de escala: 200 micras.

**B.** Barra de escala: 50 micras.



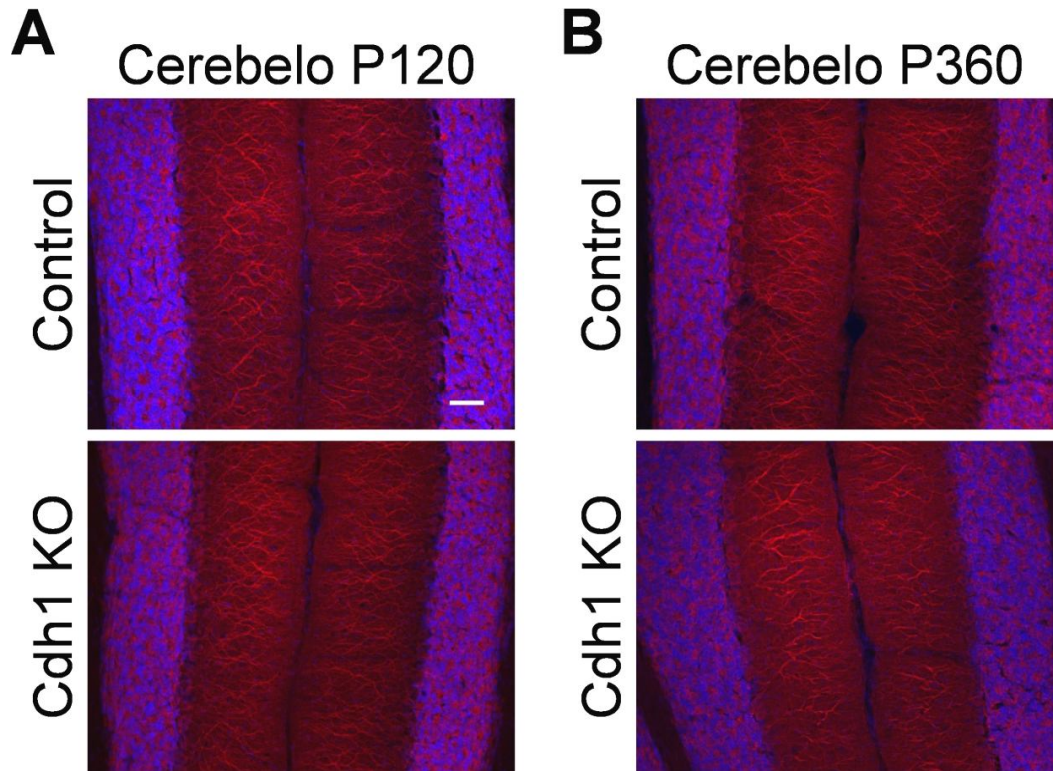
**Figura 22. Detección inmunohistoquímica del marcador de neuritas MAP2 en hipocampo de ratones de 360 días.** Imágenes representativas de inmunohistoquímicas realizadas en secciones de hipocampo de ratones macho control y Cdh1 KO de 360 días, utilizando el anticuerpo contra el marcador dendrítico **MAP2**. La tinción nuclear se realizó con el marcador nuclear **DAPI**. La deficiencia de Cdh1 provoca el acortamiento de la longitud de las neuritas en la capa CA1 de ratones de P360, respecto al control.

**A.** Barra de escala: 200 micras.

**B.** Barra de escala: 50 micras.



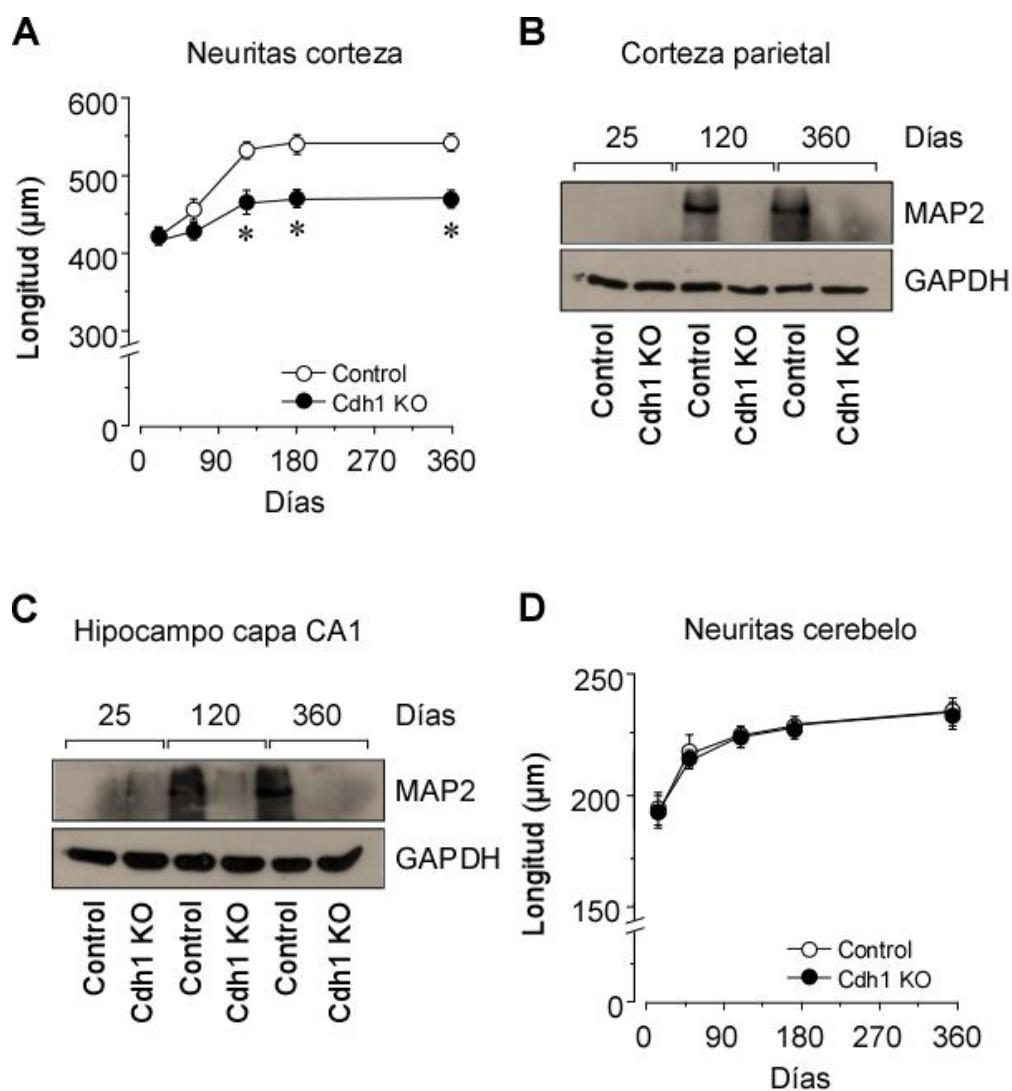
Es importante destacar que el efecto de la deficiencia de Cdh1 sobre la longitud de las dendritas no se observó en el Cb (figuras 23 y 24D), área que posee altos niveles de expresión de Cdh1 (ver figura 1), lo que pone de manifiesto que el efecto observado en Cx y en Hy es específico, y debido a la ausencia de la proteína.



**Figura 23. Detección inmunohistoquímica del marcador de neuritas MAP2 en cerebelo de ratones de 120 y 360 días.** Imágenes representativas de inmunohistoquímicas realizadas en secciones de cerebelo de ratones macho control y Cdh1 KO de 120 y 360 días, utilizando el anticuerpo contra el marcador dendrítico **MAP2**. La tinción nuclear se realizó con el marcador nuclear **DAPI**. No se observaron diferencias significativas entre ambos genotipos. Barra de escala: 200 micras.

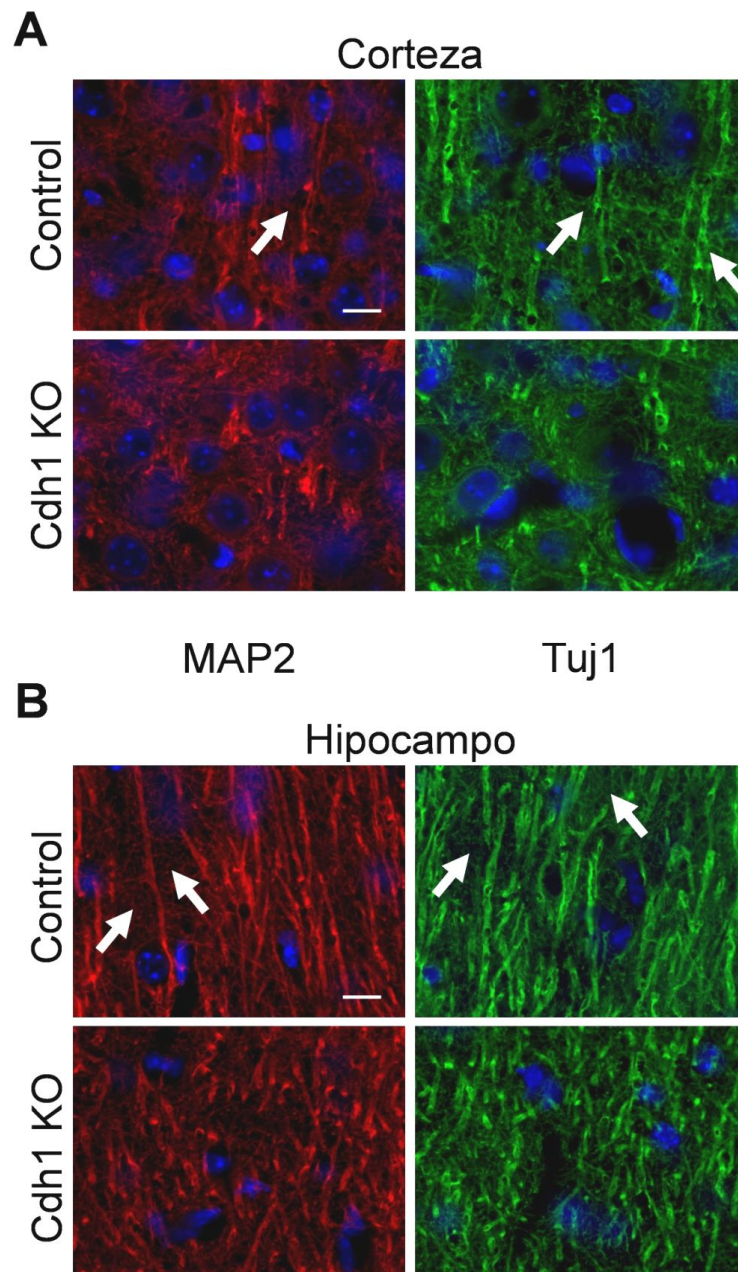
En la **figura 24A** se representa la cuantificación de la longitud de las dendritas en la Cx de ratones *Cdh1* KO de diferentes edades. La determinación de la longitud de las neuritas del Hy no se pudo realizar debido a su desorganización y escasa longitud.

Finalmente, la detección de MAP2 en extractos de Cx y de la capa CA1 del Hy mediante transferencia tipo *Western Blot* (baja exposición) reveló que la carencia de *Cdh1* disminuyó la expresión de la proteína en esas áreas, respecto a la observada en los animales control, tanto a 120 como a 360 días de vida (**figuras 24B** y **24C**).



**Figura 24. La deficiencia de *Cdh1* produce una disminución significativa de la longitud de las neuritas a partir de 120 días.** Se realizaron inmunohistoquímicas en secciones de corteza cerebral y cerebelo de ratones macho control y *Cdh1* KO de diferentes días de vida, utilizando el anticuerpo contra el marcador dendrítico MAP2. **(A)** La cuantificación de la longitud de las dendritas revela que la deficiencia de *Cdh1* disminuye significativamente el incremento en la longitud de las dendritas que se produce en los ratones control a partir de los 25 días de vida postnatal (n=6 para cada edad y genotipo). **(D)** No se observó ningún efecto en secciones de cerebelo (n=6 para cada edad y genotipo). **B** y **C**. Imágenes representativas de transferencias tipo *Western Blot* (baja exposición) revelan que la deficiencia de *Cdh1* provoca la pérdida de detección de MAP2 en corteza cerebral y en la capa CA1 del hipocampo. \*p<0,05 respecto al control de la misma edad.

Para analizar con detalle la estructura de las dendritas, se tomaron microfotografías de fluorescencia de las inmunohistoquímicas de MAP2 y Tuj1 con un objetivo 100X. Las microfotografías revelaron que las dendritas en los ratones Cdh1 KO aparecen rotas y presentan menos ramificaciones que las observadas en los animales control, tanto en la Cx como en el Hy (**figura 25**).



**Figura 25. La deficiencia de Cdh1 reduce la arborización dendrítica en la corteza cerebral y en el hipocampo.** Imágenes representativas de inmunohistoquímicas realizadas en secciones de corteza cerebral e hipocampo de ratones macho control y Cdh1 KO de 120 días, utilizando anticuerpos contra los marcadores dendríticos **MAP2** y **Tuj1**. La tinción nuclear se realizó con el marcador nuclear **DAPI**. La deficiencia de Cdh1 provoca la reducción de la arborización dendrítica en la corteza cerebral y en el hipocampo de los ratones de P120, respecto al control. Barra de escala: 10 micras.

Por tanto, la deficiencia de Cdh1 provoca el acortamiento y/o rotura de las dendritas y reduce su arborización, lo que puede ser responsable de la desintegración neuronal y, en consecuencia, de la reducción del espesor de la Cx y capa CA1 del Hy observada en los ratones Cdh1 KO.

### 4. La deficiencia de Cdh1 promueve la eliminación de sinapsis

La formación adecuada y el mantenimiento de las conexiones sinápticas que forman los circuitos o redes neuronales son fundamentales para el correcto funcionamiento del cerebro. En este sentido, el tamaño y forma de la arborización dendrítica de una neurona determina el número y distribución de los contactos sinápticos receptores que puede establecer con contactos aferentes [Koleske, 2013].

Durante el desarrollo, las dendritas se someten a continuos cambios dinámicos en su forma para facilitar su arborización, la formación de sinapsis y el establecimiento de los circuitos neuronales. Durante este periodo, la formación de ramificaciones para establecer sinapsis y la estabilización de la dendrita están íntimamente relacionados. Así, la formación de sinapsis a partir de una rama dendrítica promueve su estabilización mientras que la pérdida o reducción de estimulación sináptica desestabiliza la dendrita diana [Cline, 2008; Koleske, 2013].

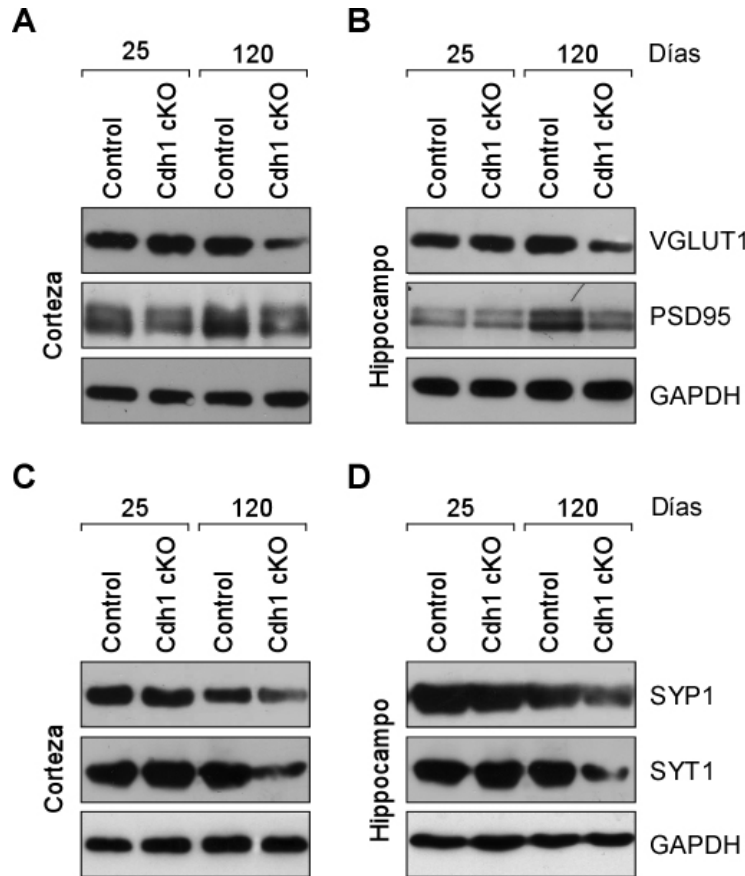
En el adulto, la forma y tamaño de las dendritas permanece estable durante meses e incluso años, de manera que esta estabilidad es esencial para el correcto funcionamiento del cerebro adulto. Así, la alteración de la longitud y forma de las dendritas se asocia a desórdenes psiquiátricos y enfermedades neurodegenerativas, como es la enfermedad de Alzheimer [Kulkarni, 2012].

Teniendo en cuenta estos antecedentes y el efecto de la supresión de Cdh1 sobre la longitud y arborización dendríticas (figura 24A y 25), decidimos investigar la expresión de diferentes proteínas sinápticas: VGLUT1, PSD-95, SYP1 y SYT1 en el ratón Cdh1 KO, con objeto de estudiar el efecto de nuestra proteína (Cdh1) sobre la integridad sináptica. Para ello, se obtuvieron extractos proteicos de Cx y de la capa CA1 del Hy de ratones control y Cdh1 KO de 25 y 120 días y se realizaron transferencias de tipo *Western Blot*.

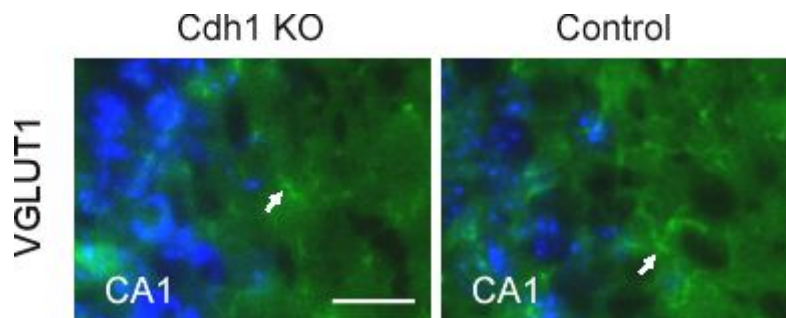
En primer lugar, y dado que en nuestro modelo murino la supresión de Cdh1 se realizó en neuronas excitatorias, se analizaron las sinapsis glutamatérgicas mediante la expresión del transportador vesicular de glutamato, VGLUT1 [Takamori, 2000]. Como se muestra en las figuras 26A y 26B, la expresión de VGLU1 disminuyó significativamente en la Cx y capa CA1 del Hy en los ratones Cdh1 KO, respecto a los controles. Esta disminución se corroboró mediante inmunohistoquímica (figura 27). Estos resultados son compatibles con una reducción del número de sinapsis glutamatérgicas en los animales Cdh1 KO.

Posteriormente, determinamos los niveles del marcador postsináptico PSD-95. PSD-95 es una proteína de densidad postsináptica que desempeña importantes funciones en la membrana postsináptica, que incluyen el anclaje y movimiento tanto de receptores de glutamato (receptores NMDA) como de proteínas reguladoras de la actividad de estos receptores. Por ello, PSD-95 es un conocido marcador postsináptico, concretamente de sinapsis excitadoras [Kornau, 1995; Li, 2010]. Como se muestra en las figuras 26A y 26B, la supresión de Cdh1 previno el incremento en los niveles de

expresión de PSD-95 en la Cx y capa CA1 del Hy que se produce a los 120 días en los controles, respecto a los niveles observados en los animales P25. Así, la expresión de PSD-95 resultó ser menor en los ratones Cdh1 KO de 120 días que en su correspondiente control.



**Figura 26. La deficiencia de Cdh1 reduce la expresión de proteínas sinápticas.** Los niveles de las proteínas sinápticas VGLUT1, PSD95, SYP1 y SYT1 se detectaron mediante transferencias de *Western Blot* en extractos de corteza cerebral e hipocampo (CA1) de ratones macho control y Cdh1 KO de 25 y 120 días de vida. La deficiencia de Cdh1 induce la pérdida de sinapsis, a juzgar por la reducción en los niveles de los marcadores sinápticos estudiados, tanto en corteza cerebral (A y C) como en la capa CA1 del hipocampo (B y D), de ratones Cdh1 KO de 120 días, respecto a los controles. A los 25 días, la expresión de proteínas sinápticas fue similar en ambos genotipos.



**Figura 27. La deficiencia de Cdh1 reduce los niveles de expresión del marcador de neuronas glutamatérgicas, VGLUT1.** Imágenes representativas de inmunohistoquímicas realizadas en secciones de hipocampo de ratones macho control y Cdh1 KO de 120 días, utilizando anticuerpo contra **VGLUT1**. La tinción nuclear se realizó con el marcador nuclear **DAPI**. La deficiencia de Cdh1 redujo la expresión de VGLUT1 en la capa CA1 del hipocampo de ratones de 120 días, respecto a los niveles detectados en el control. Barra de escala: 20 micras.

Finalmente, se analizaron las proteínas presinápticas, Sinaptofisina1 (SYP1) y Sinaptotagmina1 (SYT1). La SYP1 es una proteína N-glicosilada integral de vesículas sinápticas que se encuentra en las neuronas asociándose en forma de hexámeros para constituir un canal de gran conductancia. Se expresa fundamentalmente en vesículas presinápticas y desempeña una importante función en la exocitosis de las vesículas sinápticas [Provoda, 2000]. La SYT1 es también una glicoproteína integral de la membrana de las vesículas presinápticas neuronales. Tiene un dominio N-terminal, que es variable y está expuesto al lumen de la vesícula, y una cola citoplasmática muy bien conservada que contiene dos dominios  $Ca^{2+}$  que desencadenan la exocitosis de vesículas presinápticas [Geppert, 1998]. El análisis de expresión de las proteínas presinápticas reveló que la supresión de Cdh1 redujo sensiblemente la expresión de SYP y SYT, tanto en Cx como en la capa CA1 del Hy, en los ratones P120, respecto a los niveles observados en los correspondientes controles (figuras 26C y 26D).

Sin embargo, y en concordancia con los resultados antes descritos, en los ratones de 25 días no se observaron diferencias significativas en los niveles de proteínas sinápticas. Cabe recordar que la expresión de la recombinasa Cre, y en consecuencia la supresión de Cdh1, está temporal y regionalmente limitada a la expresión de la CaMKII $\alpha$ , que ocurre en neuronas excitatorias a partir de los días 20-22 de vida postnatal [Minichiello, 1999; Tsien, 1996]. Así, a los 25 días, aunque los niveles de Cdh1 han comenzado a disminuir (ver figura 1), los efectos de la supresión de la proteína no son aún visibles.

Por tanto, nuestros resultados demuestran que Cdh1 es esencial para el mantenimiento de la arborización dendrítica y las conexiones sinápticas en el cerebro adulto, y que su falta provoca la pérdida de sinapsis y, en consecuencia, la pérdida de la integridad dendrítica, lo que sin duda va a afectar al correcto funcionamiento del cerebro.

## 5. Estudio neurofisiológico de los ratones deficientes de Cdh1 mediante potenciales evocados somatosensoriales

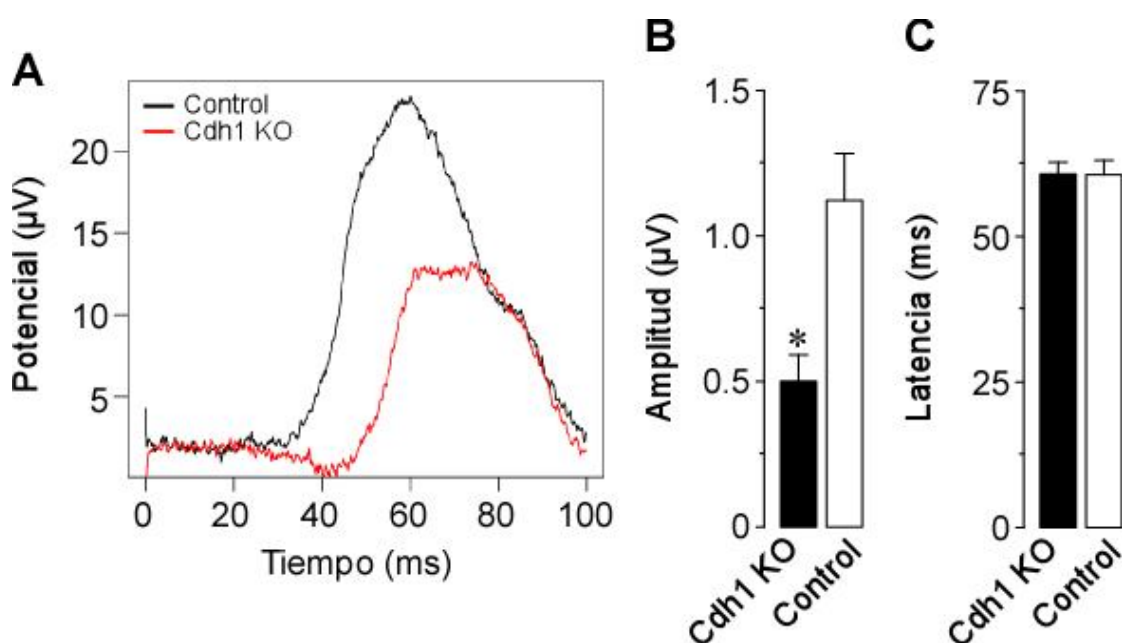
Se ha descrito que los PES son manifestaciones eléctricas de la respuesta cerebral o de la vía somestésica, que se producen tras la aplicación de estímulos eléctricos en las fibras aferentes sensitivas de los nervios periféricos. La identificación de los componentes de los PES, como amplitud y latencia, son importantes parámetros de diagnóstico en la clínica [Gutiérrez Rivas, 2007].

En general, un aumento de la latencia (tiempo de respuesta) indica la presencia de lesión de tipo desmielinizante y, por lo tanto, defectos en las vías de conducción. De la misma manera, se ha establecido una relación directa entre el descenso de la amplitud (intensidad de la respuesta) y la pérdida de proyecciones neuronales. Es decir, alteraciones de las latencias representan trastornos de la conducción de los potenciales de acción a través de los axones y sinapsis de las vías exploradas. Sin embargo, alteraciones de la amplitud de cada onda representan alteraciones en el número de neuritas y/o neuronas de las vías exploradas [Gutiérrez Rivas, 2007].

Una vez establecido el papel de Cdh1 sobre la arborización dendrítica y el mantenimiento de las sinapsis neuronales, nos planteamos llevar a cabo un estudio electrofisiológico en los ratones deficientes de Cdh1. Utilizamos ratones de 120 días en

los que localizamos el electrodo del estímulo en el nervio ciático derecho [Heredia, 2013; Jiménez-Díaz, 2011]. Una vez perforado el cráneo, el ratón era liberado del estereotáxico y se disecaba el nervio ciático [Santos-Torres, 2009]. A continuación, se estimuló el nervio ciático y se fue incrementando la intensidad hasta la obtención de la respuesta de máxima amplitud. Las latencias de las respuestas se midieron desde el momento de aplicación del estímulo al inicio de la respuesta evocada y las amplitudes se midieron desde la línea de base hasta el pico máximo, tal y como han descrito Cavanagh y colaboradores [Cavanagh, 1968]. Todos los PES se realizaron estimulando de forma individualizada y secuencial el nervio ciático.

En la **figura 28A** se muestra un registro representativo de PES de animales macho, controles y Cdh1 KO, en el que se observa una disminución importante de la amplitud de la onda registrada. Así, mientras que la latencia media fue muy similar en ambos tipos de animales (**figura 28C**), la supresión de Cdh1 redujo significativamente la amplitud media (**figura 28B**) de la onda generada, que llegó a ser un 56% menor que en los animales control.



**Figura 28. La deficiencia de Cdh1 altera la respuesta del generador del potencial evocado. A.** Registro representativo de potenciales evocados somatosensoriales de animales macho control, en color negro, y Cdh1 KO, en color rojo, de 120 días. **B y C.** Representaciones de los valores de la media  $\pm$  SEM de amplitudes ( $\mu$ V) y latencias (ms) de los potenciales del nervio ciático en animales macho control ( $n=7$ ) y Cdh1 KO ( $n=8$ ). Mientras que la amplitud desciende en los ratones KO un 56%, respecto a los controles, no se observan diferencias significativas en la latencia entre ambos genotipos. \* $p \leq 0,05$  respecto al control de la misma edad.

En conjunto, estos resultados nos permiten afirmar, que al no encontrar diferencias en la latencia y puesto que existen unos tiempos de conducción similares entre ambos individuos, no hay desordenes ni lesiones de tipo desmielinizante. Por tanto, los animales no parecen tener defectos en las vías de conducción [Gutiérrez Rivas, 2007]. El impulso es conducido ipsilateralmente por los cordones posteriores, hasta el núcleo de Goll (*nucleus gracilis*). En este núcleo se establece la primera sinapsis. El impulso continúa su trayecto por el lemnisco medio hacia el núcleo ventral del

tálamo en donde tiene lugar la segunda sinapsis. Finalmente, la actividad evocada alcanza el área somestésica primaria del córtex donde se lleva a cabo la tercera sinapsis [Cusick, 1979]. Esto concuerda, con que ninguna de las zonas por las que tiene que pasar el impulso se encuentra alterada, ya que en ellas no se produce la supresión de Cdh1 [Minichiello, 1999; Tsien, 1996].

Por el contrario, los resultados revelan diferencias significativas en los valores obtenidos al analizar las amplitudes, siendo inferiores y con tendencia a formar mesetas en los individuos Cdh1 KO. Esto indica que hay una pérdida de neuritas que conlleva a una respuesta anómala del generador, que, en nuestro caso, es la corteza cerebral [Gutiérrez Rivas, 2007], en la que la expresión de Cdh1 se ha suprimido (ver figura 1). Estos resultados coinciden con los descritos anteriormente, de manera que Cdh1 parece ser esencial para la formación y mantenimiento de las redes o conexiones neuronales. Así, la supresión de la proteína promueve la desintegración de las proyecciones neuronales, concretamente de las dendritas, lo que se traduce en una respuesta electrofisiológica anómala, es decir, en una disfunción de la corteza cerebral.

## 6. Cdh1 es esencial para la supervivencia neuronal *in vivo*

Resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado que Cdh1 es esencial para la supervivencia de las neuronas corticales en cultivo primario. Así, la disminución experimental de los niveles de Cdh1, bien mediante ARNi o bien mediante el uso de inhibidores específicos en neuronas *in vitro*, provoca rápidamente la muerte neuronal por apoptosis [Almeida, 2005]. Es más, la disminución de los niveles de Cdh1 incrementa la susceptibilidad de las neuronas corticales a la excitotoxicidad producida por la estimulación de los receptores de glutamato [Maestre, 2008; Rodríguez-Rodríguez, 2012].

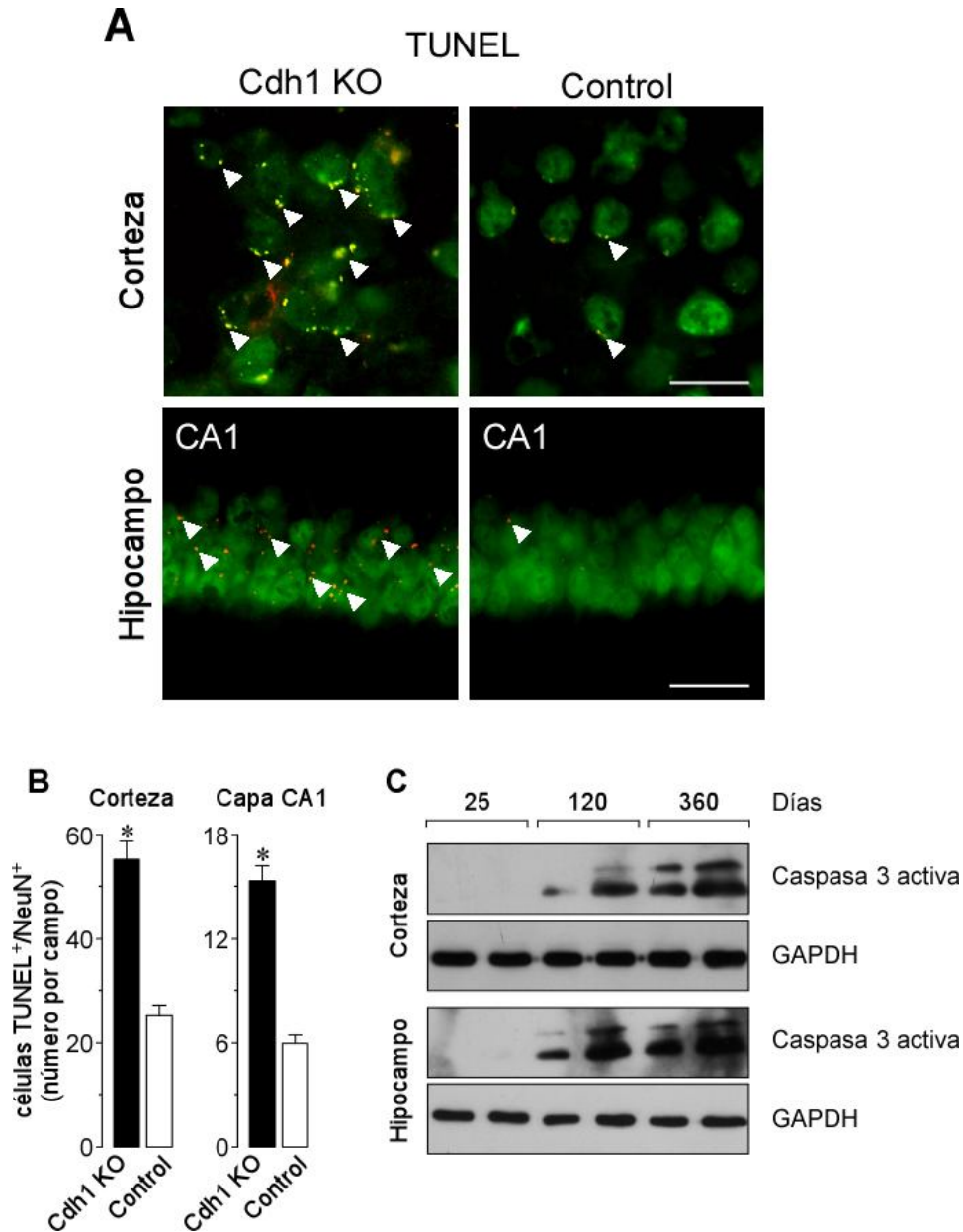
Como ya hemos comentado, la estabilidad de la forma y tamaño de las dendritas es esencial para el correcto funcionamiento del cerebro adulto. Alteraciones en la morfología de las dendritas o defectos en el desarrollo neuronal, que incluyen cambios en los patrones de ramificación, fragmentación, retracción o pérdida de la arborización dendrítica, contribuyen al progreso de numerosos trastornos neurológicos y del neurodesarrollo, como son: autismo, trastornos del espectro autista, enfermedad de Alzheimer, esquizofrenia, síndrome de Down, síndrome del cromosoma X frágil, el síndrome de Rett, ansiedad y depresión [Koleske, 2013; Kulkarni, 2012]. De la misma manera, la pérdida de estabilidad y eficiencia de sinapsis glutamatérgicas y, en consecuencia, la falta de comunicación entre las neuronas es también una importante causa subyacente de deterioro neurológico y cognitivo asociado a trastornos neurodegenerativos, tales como la enfermedad de Alzheimer [Kulkarni, 2012].

A partir de estos antecedentes y considerando los resultados descritos, quisimos investigar si la supresión de Cdh1 provoca neurodegeneración *in vivo*. Para ello, realizamos la técnica de TUNEL en secciones de Cx e Hy de ratones Cdh1 KO de 120 días, según el procedimiento descrito previamente por Gascon y colaboradores [Gascon, 2005]. Con objeto de identificar si la muerte ocurría específicamente en las neuronas, paralelamente a la técnica de TUNEL, se llevo a cabo una inmunofluorescencia con el anticuerpo que detecta el marcador neuronal NeuN.

En la figura 29A podemos observar que el marcaje característico de la técnica de TUNEL (marcaje de extremos mellados con dUTP mediado por la desoxinucleotidil



terminal transferasa), que señalamos con flechas blancas, resultó ser mayor en los ratones Cdh1 KO que en los animales control, tanto en Cx como en la capa CA1 del Hy.



**Figura 29. La deficiencia de Cdh1 causa neurodegeneración *in vivo*.** **A.** La muerte neuronal se detectó mediante la técnica de TUNEL en secciones de corteza cerebral e hipocampo de ratones macho control y Cdh1 KO de 120 días de vida. Las neuronas se detectaron mediante inmunomarcaje con el anticuerpo contra el marcador neuronal NeuN. **B.** La cuantificación de células TUNEL<sup>+</sup> y NeuN<sup>+</sup> (neuronas apoptóticas) reveló que la deficiencia de Cdh1 aumenta significativamente la apoptosis neuronal, respecto al control. **C.** Imágenes representativas de transferencias tipo Western Blot muestran que la ausencia de Cdh1 induce apoptosis, a juzgar por el incremento de expresión del marcador de apoptosis, Caspasa 3 activa.  
\*p<0,05 respecto al control de la misma edad.

La cuantificación de neuronas TUNEL<sup>+</sup>, mediante un procedimiento basado en el método Abercrombie [Petreanu, 2002], permitió concluir que la supresión de

expresión de Cdh1 *in vivo* provoca neurodegeneración, a juzgar por el incremento en el número de neuronas apoptóticas (células TUNEL<sup>+</sup> y NeuN<sup>+</sup>) en la Cx y capa CA1 del Hy de ratones Cdh1 KO, respecto a los correspondientes controles (**figura 29B**).

Es más, mediante el análisis por transferencia de tipo *Western Blot* de la activación de la Caspasa 3, ejecutor fundamental del proceso apoptótico [Garnier, 2003], comprobamos que la deficiencia de Cdh1 provocó el incremento en la expresión de la Caspasa 3 activa en los ratones de 120 y 365 días, respecto a los correspondientes ratones control (**figura 29C**).

Por tanto, nuestros resultados indican que Cdh1 es un importante factor de supervivencia neuronal *in vivo*, corroborando así resultados previos *in vitro* de nuestro grupo [Almeida, 2005; Maestre, 2008]. Así, la deficiencia de Cdh1 provoca rotura de dendritas, alteración de la arborización dendrítica y pérdida de sinapsis glutamatérgicas, lo que conduce a la muerte neuronal por apoptosis en la Cx y capa CA1 del Hy. Es importante destacar que estos procesos ocurren en determinadas enfermedades neurodegenerativas, como es la enfermedad de Alzheimer [Knobloch, 2008; Koleske, 2013; Kulkarni, 2012], por lo que hemos generado un modelo de neurodegeneración *in vivo* que permitirá investigar mecanismos moleculares asociados a la neurodegeneración, particularmente a la enfermedad de Alzheimer, hasta ahora desconocidos.

## 7. El silenciamiento de Cdh1 altera el comportamiento de los ratones. Efecto sobre el aprendizaje y la memoria

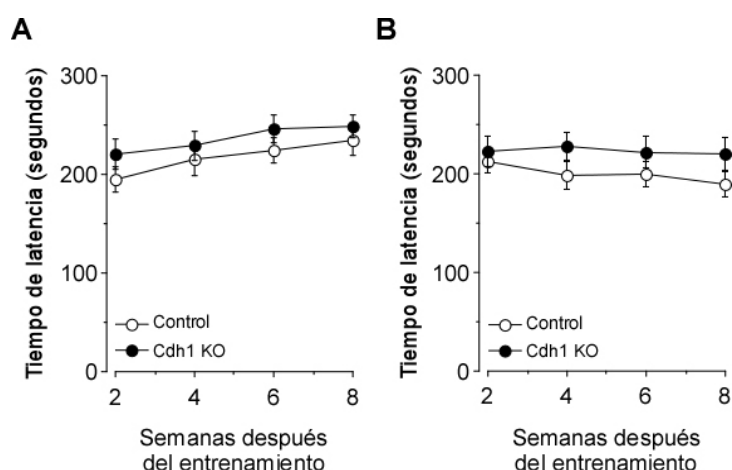
La pérdida de conexiones sinápticas como consecuencia de la rotura y desestabilización dendrítica, contribuye a la alteración de la percepción, aprendizaje, memoria, estado de ánimo y la toma de decisiones que caracterizan a ciertas condiciones neuropatológicas, como esquizofrenia, depresión y enfermedades neurodegenerativas, concretamente la enfermedad de Alzheimer [Knobloch, 2008; Kulkarni, 2012; Koleske, 2013]. Es más, la reducción en el número de sinapsis está directamente relacionada con la magnitud del daño cognitivo y de memoria que se asocia a los pacientes de la enfermedad de Alzheimer [Anderton, 1998; Terry, 1991].

Con objeto de analizar el comportamiento cognitivo, sensorial y motor de los ratones deficientes de Cdh1 (Cdh1 KO), se realizaron una serie de pruebas de comportamiento, que se describen a continuación.

### 7.1. Coordinación motora

El estudio del equilibrio y coordinación motora de los animales Cdh1 KO se realizó mediante el test del Rotarod. Las pruebas se realizaron en animales de P120 y P360 durante 4 semanas alternas siguientes al entrenamiento. En el test se determinó el tiempo que el animal tardaba en caer de la barra giratoria o daba tres vueltas en la barra sin caminar, que denominamos tiempo de latencia (ver **materiales y métodos**).

Como se muestra en la **figura 30**, la supresión de Cdh1 en Cx y capa CA1 del Hy no alteró significativamente la coordinación motora de los animales, que resultó ser similar en ambos genotipos.



**Figura 30. Prueba del Rotarod.** El equilibrio y coordinación motora de los ratones se analizó mediante el test de Rotarod. La supresión de Cdh1 en corteza cerebral y capa CA1 del hipocampo (Cdh1 KO) no alteró significativamente el tiempo de latencia o resistencia a caer de ratones machos de 120 (A) y 360 (B) días de vida, respecto a los correspondientes controles. n=6-8 para cada genotipo y edad.

El Cb coordina los sistemas motores evaluando las disparidades existentes entre intención y acción, y ajustando las operaciones de los centros motores de la corteza y el tronco encefálico, tanto durante el desarrollo de un movimiento como durante las repeticiones de dicho movimiento [Delgado-García, 2001; Thach, 1998]. Por tanto, la falta de efecto sobre la coordinación motora concuerda con el hecho de que en el Cb los niveles de Cdh1 no están modificados en los ratones Cdh1 KO generados en el presente estudio (ver figura 1). Es más, el Cb de los animales de ambos genotipos (Cdh1 KO y control) no mostraron diferencias estructurales significativas (figura 23), lo que se traduce en una correcta coordinación motora de los animales KO (figura 30).

## 7.2. Aprendizaje y memoria

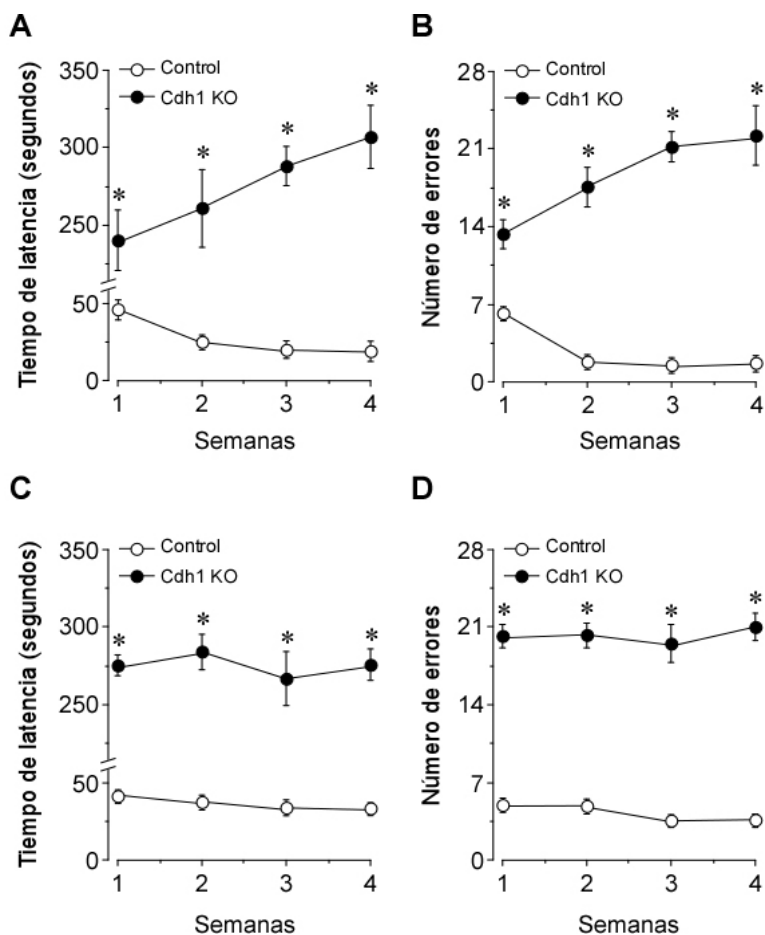
Aprendizaje y memoria son dos procesos psicológicos íntimamente relacionados, que constituyen dos momentos en la serie de procesos a través de los cuales los organismos manejan y elaboran la información proporcionada por los sentidos. En general, el aprendizaje implica siempre alguna forma de adquisición de conocimientos y destrezas y la memoria la retención de esa información. Por tanto, aprendizaje y memoria son fenómenos interdependientes, de manera que la capacidad del cerebro para aprender implica la capacidad del cerebro para recordar y ambas pueden resumirse en la capacidad del cerebro para adquirir información [Lieberman, 2011].

El estudio de la capacidad de aprendizaje y memoria se realizó mediante diferentes pruebas de comportamiento, como son el laberinto Lashley III y el laberinto radial de 8 brazos (radial maze) (ver materiales y métodos).

El laberinto Lashley III es un test ampliamente utilizado para estudiar la capacidad de aprendizaje de los ratones. Los animales aprenden a moverse por el laberinto tras una exposición repetida en ausencia de estrés, es decir, se basa en el aprendizaje de la ruta [Blizard, 2006].

Los resultados del laberinto Lashley III revelaron que, en los animales control, la realización de la prueba durante sesiones sucesivas disminuyó progresivamente el tiempo de latencia en llegar a la jaula y el número de errores cometidos durante cada prueba, lo que indica un aprendizaje adecuado en estos animales. Sin embargo, este efecto no se observó en los ratones Cdh1 KO, que mostraron un incremento significativo en el tiempo de latencia y número de errores, respecto a los

correspondientes controles, llegando incluso a incrementarse estos parámetros durante las sucesivas sesiones (ratones de 120 días; **figuras 31A y 31B**). Estos resultados indican que la deficiencia de Cdh1 en Cx y capa CA1 del Hy provoca una deficiencia importante en la capacidad de aprendizaje de los animales.



**Figura 31. Prueba del laberinto Lashley III.** Se utilizaron ratones macho de 120 (A y B) y 360 (C y D) días y se cuantificó el tiempo utilizado en recorrer el laberinto y llegar a la "jaula pseudo-caja" o tiempo de latencia y el número de errores cometidos en cada sesión. La supresión de Cdh1 en corteza cerebral y capa CA1 del hipocampo (Cdh1 KO) incrementó significativamente el tiempo de latencia y número de errores, respecto a los correspondientes controles. n=6-8 para cada genotipo y edad. \*p<0,05 respecto al control de la misma edad.

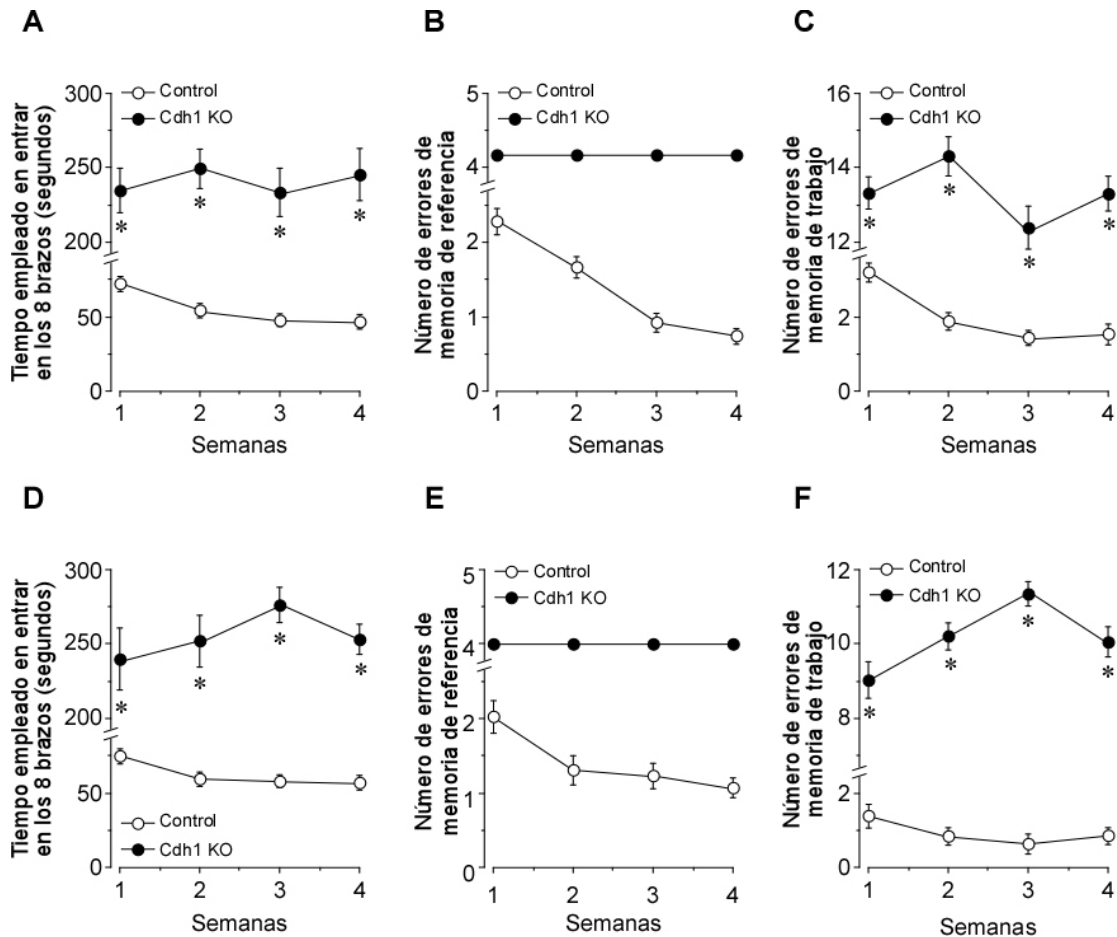
El laberinto radial de 8 brazos es una prueba que se utiliza para estudiar la memoria espacial de roedores [Olton, 1976; Sharma, 2010]. Esta prueba permite la evaluación del aprendizaje y la memoria, analizando dos tipos de memoria en los animales: la memoria de referencia y la memoria de trabajo.

La memoria de referencia corresponde a aquellos aspectos del ambiente que son permanentes a través de los ensayos y que el sujeto tiene que recordar para ejecutar correctamente su tarea, en nuestro caso la comida. La memoria de trabajo corresponde a los aspectos cambiantes en cada ensayo y que el sujeto debe recordar para minimizar errores en cada ensayo [Zhang, 2005]. La prueba evalúa la memoria de referencia cuando los ratones visitan únicamente los brazos del laberinto que contiene la recompensa (comida). El no hacerlo resulta en un error de memoria de referencia.

Por otro lado, se evalúa la memoria de trabajo cuando los animales entran en cada brazo una sola vez, independientemente de la recompensa. El reingreso en los brazos daría lugar a un error de la memoria de trabajo [Olton, 1979; Zhang, 2005].

Los resultados obtenidos con el laberinto radial (**figura 32**) fueron similares a los obtenidos con el laberinto Lashley III (**figura 31**). Así, a lo largo de las semanas se

observa que los ratones control necesitan menos tiempo para recorrer todos los brazos del laberinto y cometen menos errores de referencia y menos errores de trabajo. Por tanto, aprenden el sistema y ejecutan el recorrido de un modo más rápido y preciso. Sin embargo, los ratones Cdh1 KO tienen un comportamiento arbitrario y recorren el laberinto sin haber aprendido el camino. Así, la supresión de Cdh1 en corteza cerebral y capa CA1 del hipocampo incrementó significativamente el tiempo utilizado en visitar los 8 brazos y los errores de memoria de referencia y de memoria de trabajo, respecto a los correspondientes controles.



**Figura 32. Prueba del laberinto radial de 8 brazos.** Se utilizaron ratones macho de 120 (A, B y C) y de 360 (D, E y F) días y se cuantificó el tiempo utilizado en entrar en los 8 brazos y el número de errores de memoria, tanto de memoria de referencia como de memoria de trabajo. La supresión de Cdh1 en corteza cerebral y capa CA1 del hipocampo (Cdh1 KO) incrementó significativamente el tiempo utilizado en visitar los 8 brazos y los errores de memoria de referencia y de memoria de trabajo, respecto a los correspondientes controles.

n=6-8 para cada genotipo y edad.

\*p<0,05 respecto al control de la misma edad.

Todos estos resultados ponen de manifiesto que las funciones de aprendizaje y memoria se encuentran alteradas en los ratones deficientes de Cdh1. Estos resultados concuerdan con previos estudios que demuestran que la actividad de APC/C-Cdh1 regula la plasticidad sináptica en el Hy [Fu, 2011; Juo, 2004; Konishi, 2004; van Roessel, 2004] y la memoria [García-Higuera, 2008; Li, 2008; Kuczera, 2011].

Se ha descrito que el Hy tiene 2 funciones principales: a) memoria y b) percepción espacial. Además, el Hy tiene un papel importante en la formación de nuevos recuerdos de los acontecimientos experimentados, lo que le implica en el aprendizaje. Las lesiones en el Hy producen dificultades en la formación de nuevos recuerdos, así como problemas en los recuerdos formados antes de las lesiones [VanElzakker, 2008]. Hay que recordar que daños en el Hy no afectan a la memoria de adquirir nuevas competencias motoras [Diana, 2007].

El Hy puede actuar como un mapa cognitivo, es decir, una representación neural del esquema espacial del entorno. La sensación de extravío es uno de los síntomas más comunes tras una lesión en el Hy [Chiu, 2004]. Estudios con animales han mostrado que se requiere un Hy intacto para algunas tareas de memoria espacial, en particular aquellas que precisan encontrar un camino [Morris, 1982].

Por otro lado, la corteza parietal, también dañada en nuestro modelo experimental, ayuda a identificar objetos y a comprender las relaciones espaciales, es decir, la situación del cuerpo en comparación con los objetos que lo rodean. Además, interviene en la integración de la información relacionada con la memoria y el aprendizaje. Así, la memoria a largo plazo se almacena en diferentes áreas de la Cx, de manera que en general la Cx actúa como un depósito permanente de información [Rakic, 1988]. Recientemente, un estudio realizado por Hasan y colaboradores [Hasan, 2013] han demostrado que determinadas formas de memoria asociativa relacionadas con este tipo de aprendizaje se forman y almacenan directamente en la corteza y no en el hipocampo como creía hasta ahora.

Por tanto, las alteraciones en los procesos de aprendizaje y memoria que hemos descrito en los ratones deficientes de Cdh1 parecen ser consecuencia de la degeneración dendrítica y pérdida de sinapsis que se produce en la Cx y capa CA1 del Hy causada por la supresión de Cdh1 en esta zona. Así, Cdh1 es esencial para el mantenimiento de la integridad neuronal y, en consecuencia, de la función cognitiva, por lo que alteraciones en la actividad de APC/C puede desempeñar una importante función en el deterioro cognitivo asociado a enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer.

### 7.3. Miedo y ansiedad

En los trastornos de ansiedad participan algunas de las estructuras cerebrales que conforman el sistema límbico, que incluyen el hipotálamo y amígdala entre otras. Además, este sistema es el responsable de las emociones y de las estrategias asociadas a la sobrevivencia. Entre estas emociones se encuentran: el miedo, la furia, las sensaciones ligadas al sexo o al placer, al dolor y a la angustia [Bear, 1998].

La corteza también desempeña un papel importante en el control de la ansiedad y el miedo. La corteza recibe información desde el hipotálamo, el sistema límbico y el núcleo amigdalino, que es el que se encarga de coordinar la actividad que va del hipotálamo a las áreas corticales. La corteza inhibe y regula la actividad del hipotálamo y de la amígdala y de esta manera controla las emociones [Kandel, 2001].

Recientemente, Kuczera y colaboradores [Kuczera, 2011] han descrito que la supresión de la subunidad Apc2 del complejo APC/C de manera condicional a la expresión de la CaMKII $\alpha$ -Cre (como hemos utilizado en el presente trabajo) provoca alteraciones de la memoria espacial de los ratones, así como ansiedad y miedo. Una vez demostrado el déficit de memoria en los ratones Cdh1 KO, nos propusimos investigar

el efecto de la supresión de Cdh1 en las neuronas excitatorias sobre las emociones de miedo y ansiedad.

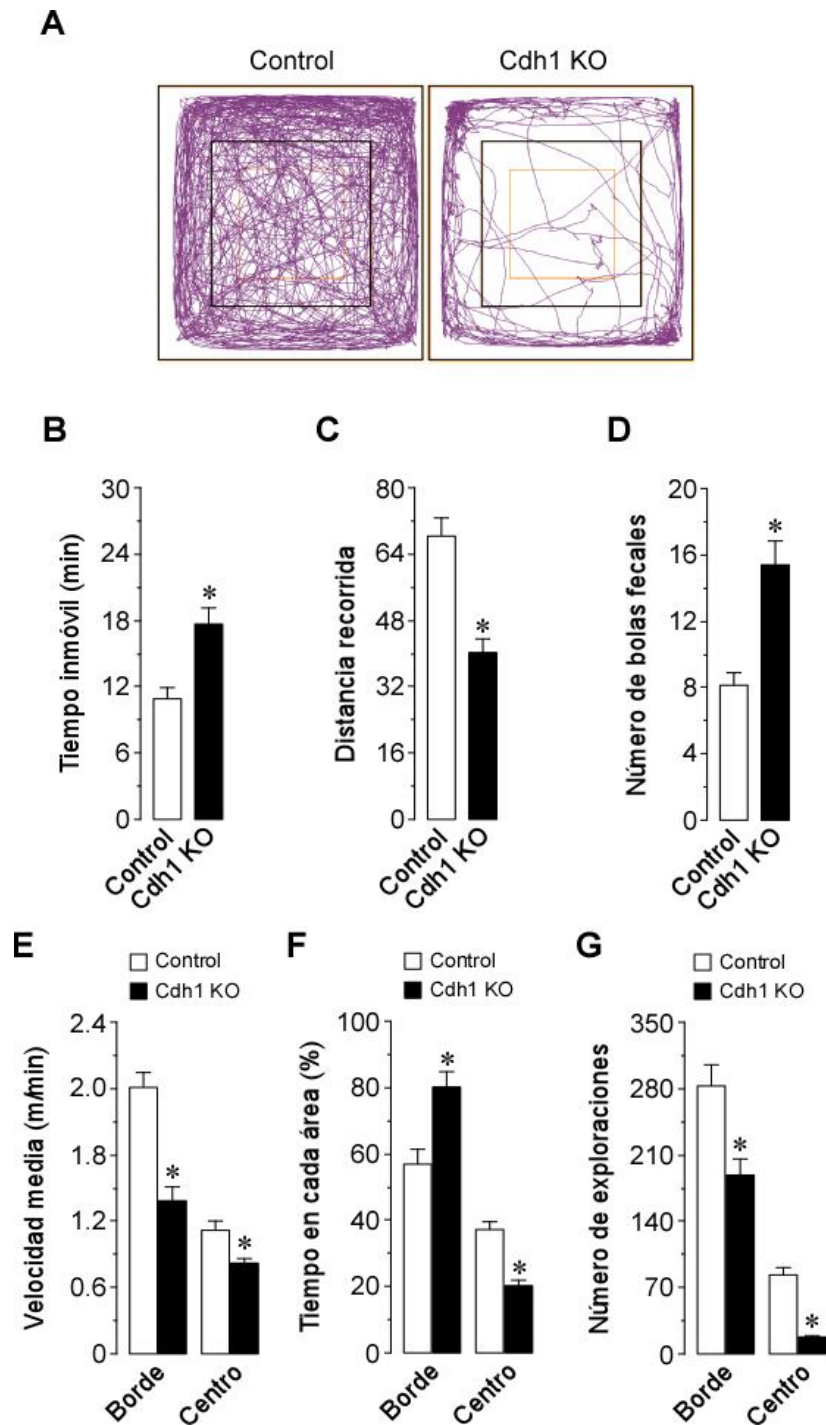
Para estudiar en los ratones las emociones de miedo y de ansiedad, utilizamos la prueba de campo abierto (*open field*) y el tablero de agujeros (*hole board*) (ver **materiales y métodos**).

La prueba de campo abierto nos permite medir la capacidad exploratoria de los animales, la neofobia, la agarofobia y otros aspectos de la ansiedad o el miedo de los ratones, tanto de manera cualitativa como cuantitativa [Denenberg, 2004; Sharma, 2010].

La prueba se realizó en animales machos de P120 y P360 sin privación de comida. Se registraron los siguientes parámetros: número de bolas fecales, ya que el número de excrementos es equivalente al estrés y a la ansiedad que sufre el animal durante la prueba [Jackson, 2000], la distancia recorrida en cada una de las dos zonas, el tiempo empleado, la velocidad media, el número de exploraciones que realizaba el animal y el tiempo que permanecía inmóvil.

Los resultados muestran que, a ambas edades (**figuras 33 y 34**), los animales deficientes de Cdh1 (Cdh1 KO) recorrieron una distancia menor dentro de la arena del campo abierto y permanecieron durante más tiempo inmóviles que los animales control, lo que es compatible con una mayor sensación de miedo. Es más, el número de bolas fecales fue superior en los ratones Cdh1 KO que en los correspondientes controles. Además, observamos que la velocidad media y el número de exploraciones que realizaron los animales en ambas áreas, fue menor en los ratones transgénicos deficientes de Cdh1 que en los controles. Todo ello nos permite corroborar que los ratones Cdh1 KO sufren miedo.

La cuantificación del tiempo de permanencia en cada área de la arena reveló que mientras que los ratones control se movían libremente por la arena, los ratones Cdh1 KO lo hacían fundamentalmente por el borde, de manera que pasan más tiempo en el área del borde y menos en el área central, que los controles (**figuras 33F y 34E**).

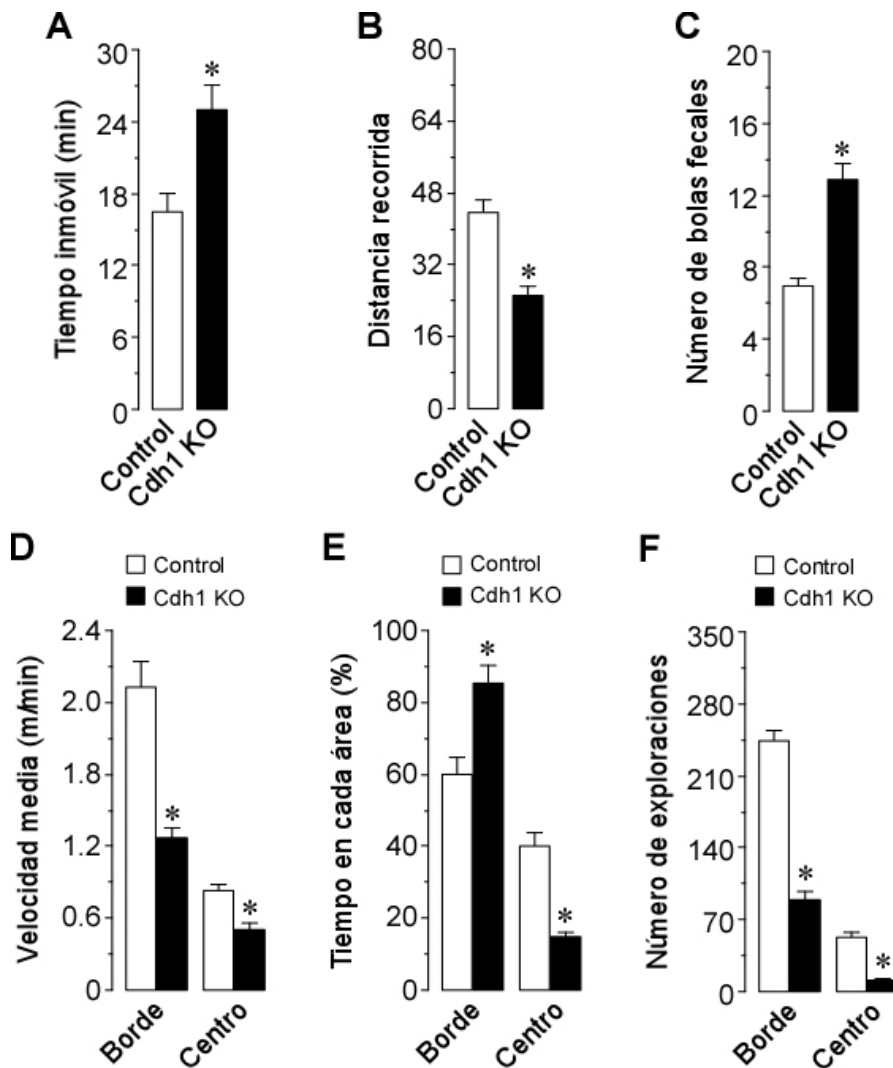


**Figura 33. Prueba del campo abierto en ratones de 120 días.** **A.** Registro representativo del movimiento de los ratones en la arena del campo abierto. **B** y **C.** Los ratones Cdh1 KO recorren una menor distancia dentro de la caja y permanecen inmóviles durante un tiempo mayor, que los controles. **D.** El número de bolas fecales es significativamente mayor en los ratones Cdh1 KO que en los controles. Además, la velocidad media y el número de exploraciones que realizan los animales en las áreas del borde y central, es menor en los ratones Cdh1 KO que en los controles (**E** y **G**). **F.** Los animales Cdh1 KO pasan más tiempo en el área del borde y menos en el área central, que los controles.

n=6-8 para cada genotipo y edad.

\*p<0,05 respecto al control de la misma edad.





**Figura 34. Prueba del campo abierto en ratones de 360 días.** **A** y **B**. Los ratones Cdh1 KO recorren una menor distancia dentro de la caja y permanecen inmóviles durante un tiempo mayor, que los controles. **C**. El número de bolas fecales es significativamente mayor en los ratones Cdh1 KO que en los controles. Además, la velocidad media y el número de exploraciones que realizan los animales en las áreas del borde y central, es menor en los ratones Cdh1 KO que en los controles (**D** y **F**). **E**. Los animales Cdh1 KO pasan más tiempo en el área del borde y menos en el área central, que los controles.  
n=6-8 para cada genotipo y edad.

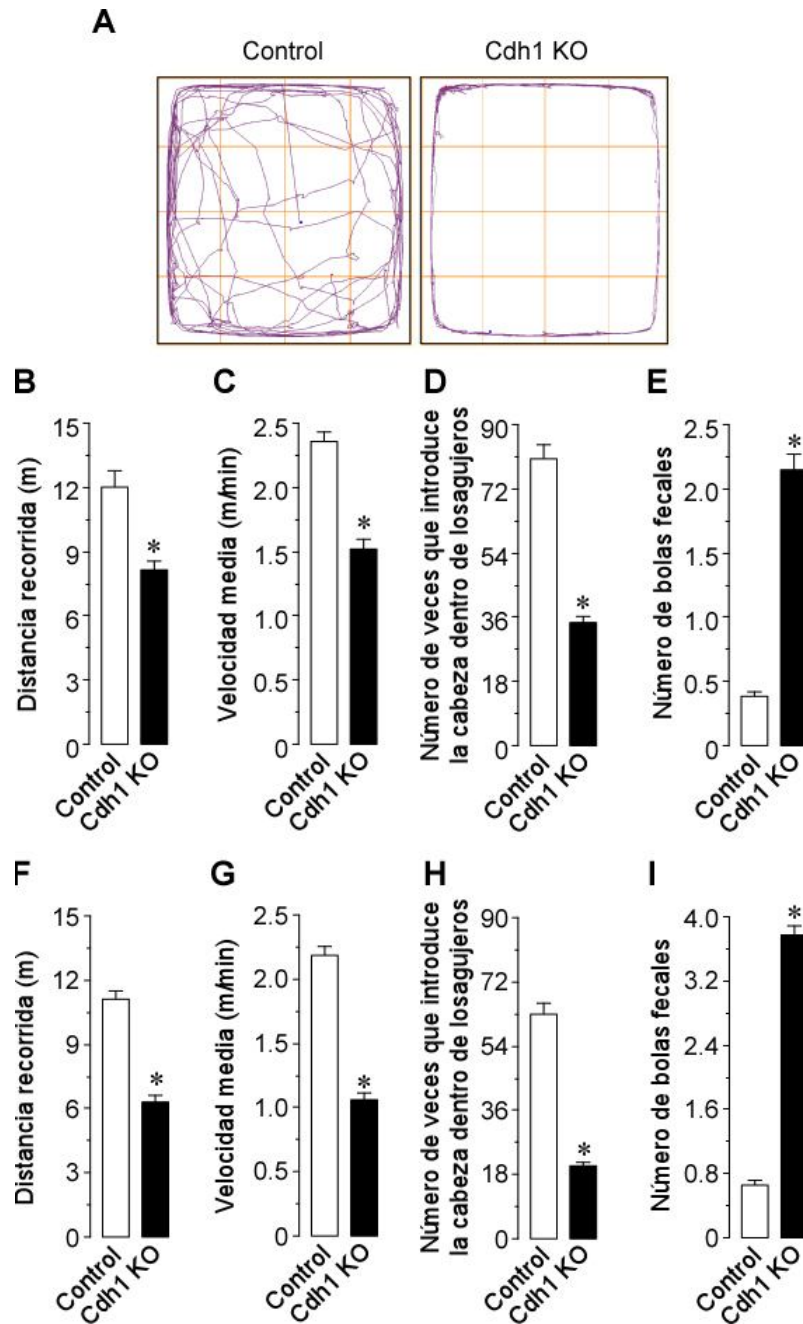
\*p<0,05 respecto al control de la misma edad.

La prueba del tablero de agujeros se utiliza para estudiar las tendencias exploratorias de los ratones y la ansiedad que es independiente de la actividad locomotora, es decir, la ansiedad que está relacionada con el miedo [Belzung, 1994; Bilkei-Gorzó, 1996; Takeda, 1998].

La prueba se realizó en ejemplares machos de P120 y P360 sin privación de comida. Tras la realización del test, se registraron los siguientes parámetros: número de bolas fecales, la distancia recorrida, la velocidad media y el número de veces que el animal introducía la cabeza en los agujeros.

De la misma manera que con la prueba del campo abierto, la prueba del tablero de agujeros reveló que los ratones Cdh1 KO recorrieron una distancia menor dentro

del tablero, lo hicieron a menor velocidad e introdujeron la cabeza en un número menor de agujeros que los controles. Por tanto, mientras que los animales Cdh1 KO mantienen su precaución sin explorar áreas centrales y se mantienen durante más tiempo inmóviles, los animales control son más rápidos e introducen la cabeza en un mayor número de los agujeros. Además, el número de bolas fecales es superior en los ratones deficientes de Cdh1 que en los controles (figura 35).



**Figura 35. Prueba del prueba del tablero de agujeros.** **A.** Registro representativo del movimiento de los ratones en el tablero de agujeros. Los ratones Cdh1 KO recorren una menor distancia dentro del tablero (**B** y **F**), a menor velocidad (**C** y **G**) e introducen la cabeza en un número menor de agujeros (**D** y **H**) que los controles, tanto a 120 (**B** - **E**) como a 360 (**F** - **I**) días de vida.

\* $p \leq 0,05$  respecto al control de la misma edad.

Todo ello pone de manifiesto el miedo y ansiedad que sufren los ratones Cdh1 KO, lo que nos permiten concluir que la actividad de APC/C-Cdh1 en el cerebro adulto desempeña un importante papel en la patogénesis de numerosos trastornos médicos que se asocian con ansiedad. En este sentido, nuestro modelo experimental podría ser de gran utilidad en el estudio de los mecanismos moleculares que median los trastornos de ansiedad.

## 8. El silenciamiento de Cdh1 incrementa los niveles de la subunidad GluR1 de los receptores AMPA

Los receptores de glutamato (GluRs) son moléculas receptoras del principal neurotransmisor excitatorio del cerebro, el glutamato. Estas proteínas se clasifican en dos familias: a) *receptores ionotrópicos* y b) *receptores metabotrópicos* [Farb, 1995; Puchalski, 1994]. Los receptores metabotrópicos, están acoplados a proteínas G y modifican la respuesta de los canales de membrana y las concentraciones de segundos mensajeros. Los receptores ionotrópicos están asociados a canales iónicos que permiten el paso de iones, que cesa cuando el neurotransmisor se disocia del receptor.

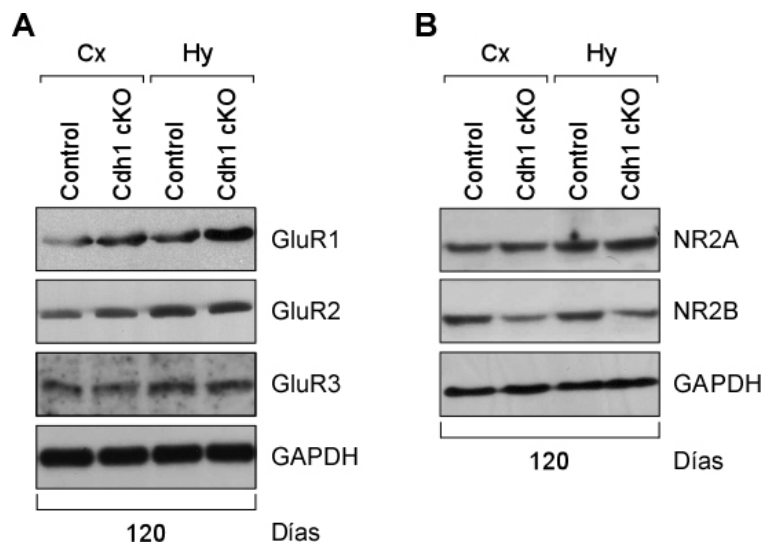
Existen tres tipos de receptores ionotrópicos de glutamato: los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), los receptores de ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y los receptores de kainato. A su vez, el receptor AMPA está compuesto de cuatro subunidades: GluR1, GluR2, GluR3 y GluR4. Las diferentes combinaciones tetraméricas o pentaméricas de las subunidades va a contribuir a la diversidad funcional de los receptores AMPA. Cada receptor puede existir como un receptor homomérico, es decir con cada subunidad del mismo tipo, o como un heterómero [Farb, 1995; Puchalski, 1994].

A nivel subcelular, los receptores AMPA se concentran en la densidad postsináptica de las sinapsis glutamatérgicas y median la transmisión excitatoria rápida en el SNC. Desempeñan un papel clave en la potenciación a largo plazo (LTP) y en la depresión (LTD), que son dos de los mecanismos celulares principales implicados en aprendizaje y memoria. En particular, GluR1 tiene una función vital en la plasticidad sináptica relacionada con el aprendizaje [Wentfold, 1992; Wentfold, 1996] y es permeable al calcio por lo que interviene en los procesos excitotóxicos [Moroni, 1997; Wang, 2010].

Por otro lado, los receptores NMDA se localizan fundamentalmente en la membrana postsináptica de las sinapsis glutamatérgicas, aunque también presentan localización presináptica. Se requiere la acción simultánea de dos agonistas diferentes para su activación: glutamato y glicina. La subunidad NR1 se une a glicina, mientras que la subunidad NR2 se une a glutamina para la posterior activación por glutamato. Como resultado de la activación de los receptores NMDA, se produce una apertura de un canal iónico que es no selectivo a los cationes, esto permite un flujo de Na<sup>+</sup>, una pequeña acumulación de Ca<sup>2+</sup> en el interior de la célula y de K<sup>+</sup> en el exterior de la célula. Se ha demostrado que el flujo de los iones calcio de los receptores NMDA (NR2B) está relacionado con los procesos de plasticidad sináptica y con los mecanismos de aprendizaje y memoria [Flores-Soto, 2012; Seeburg, 1993].

Por todo ello, decidimos estudiar finalmente el posible efecto de la supresión de Cdh1 sobre la expresión de los receptores de glutamato. En la **figura 36** se muestran los

niveles de expresión de las diferentes subunidades que forman los receptores de glutamato, tanto AMPA (GluR1, GluR2 y GluR3) como NMDA (NR2A y NR2B) en extractos de corteza cerebral e hipocampo (CA1) de ratones macho control y Cdk1 KO de 120 días de vida. Mientras que los niveles de GluR2, GluR3 y NR2A no se alteraron con la supresión de Cdh1, observamos un incremento en los niveles de GluR1 y un descenso en NR2B en los ratones Cdh1 KO de 120 días, respecto a los correspondientes controles.

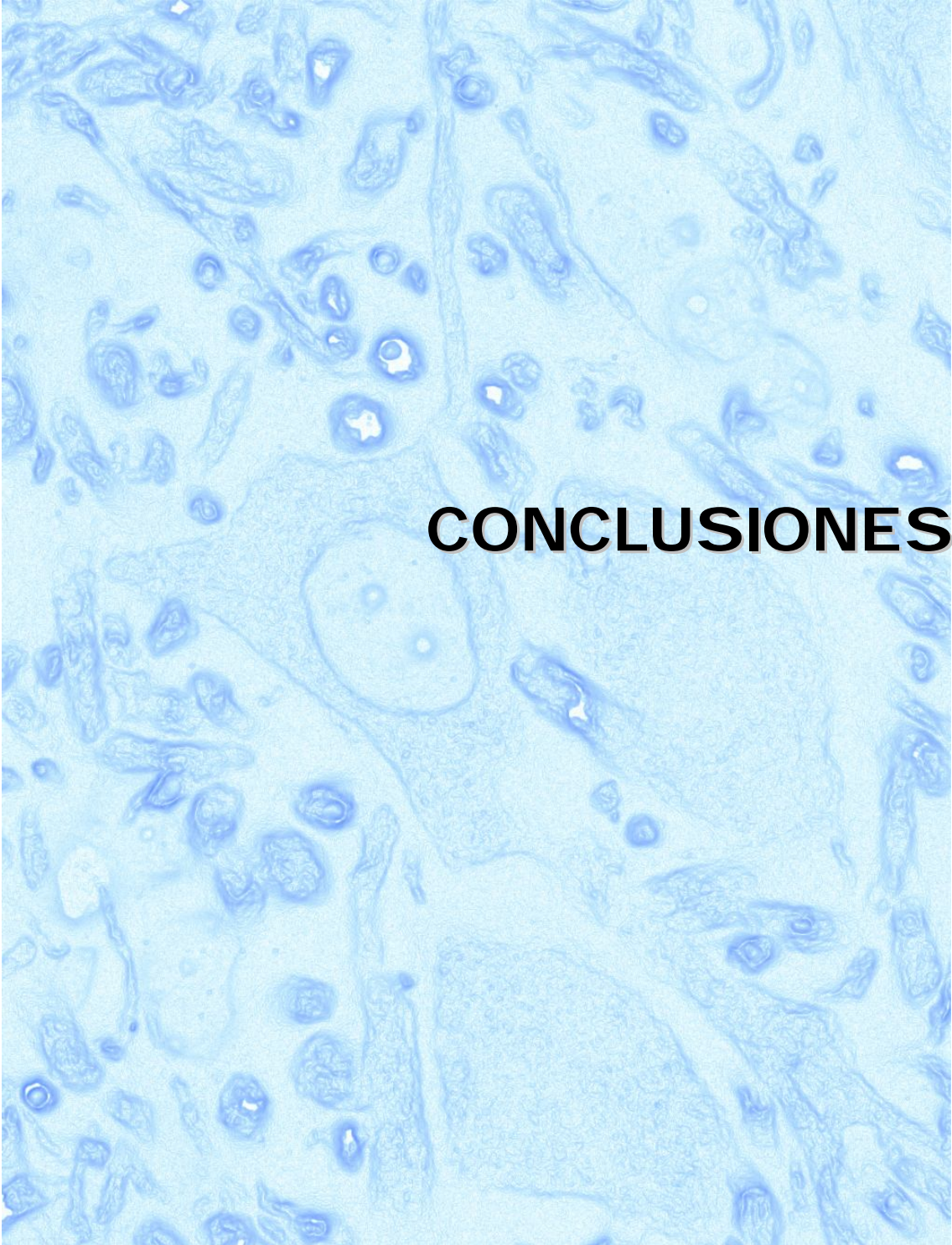


**Figura 36. El silenciamiento de Cdh1 incrementa los niveles de receptores de glutamato GluR1.** Imágenes representativas de transferencias tipo *Western Blot* que muestran los niveles de receptores de glutamato: A. GluR1, GluR2 y GluR3 y B. NR2A y NR2B en extractos de corteza cerebral e hipocampo (CA1) de ratones macho control y Cdk1 KO de 120 días de vida. La deficiencia de Cdh1 incrementa los niveles de expresión de GluR1, mientras que disminuye los de NR2B, respecto a los controles.

Nuestros resultados sugieren que Cdh1 regula los niveles de GluR1, ya que la supresión de la proteína provoca la acumulación del receptor, tanto en Cx como en Hy (figura 36). Estos resultados concuerdan con estudios previos que demuestran que GluR1 es un sustrato de la E3 ubiquitina ligasa APC/C [Juo, 2004; Fu, 2011]. Es más, APC/C-Cdh1 regula la abundancia de receptores GluR1 en la terminal postsináptica, siendo clave su papel en plasticidad sináptica y procesos de memoria y aprendizaje [van Roessel, 2004; García-Higuera, 2008; Li, 2008].

La permeabilidad de los receptores AMPA al calcio depende de la composición de las subunidades que forman los heterotetrámeros, lo que, además, condiciona la intensidad y forma de la respuesta postsináptica. A nivel postsináptico, un aumento en los niveles de proteína GluR1 se traduce en un incremento en la incorporación de homómeros de GluR1 en la sinapsis [Thiagarajan, 2005]. Estas modificaciones moleculares causan alteraciones en la transmisión glutamatérgica y plasticidad sináptica. Es más, la abundancia de GluR1, permeable al calcio, se ha relacionado con degeneración dendrítica y déficit de memoria y aprendizaje [D'Amelio, 2011] e incluso con procesos de excitotoxicidad y neurodegeneración [Moroni, 1997; Wang, 2010]. Así, las neuronas que expresan fundamentalmente GluR1 son particularmente vulnerables a la muerte excitotóxica [Moroni, 1997]. En este sentido, hemos demostrado que la deficiencia de Cdh1 incrementa la vulnerabilidad de neuronas en cultivo primario a la muerte causada por la estimulación de los receptores de glutamato [Maestre, 2008]. Recientemente, Keihan Falsafi [Keihan Falsafi, 2014] y colaboradores han descrito que el incremento en los niveles de GluR1 en el cerebro de pacientes de enfermedad de Alzheimer podría ser responsable del fallo sináptico y déficit cognitivo asociado a esta enfermedad.

Por tanto, podemos concluir que Cdh1 regula la estabilidad de receptores de glutamato, particularmente de GluR1, en la terminal postsináptica y, en consecuencia, desempeña una función clave en la plasticidad sináptica y arborización dendrítica, lo que es fundamental para los procesos de memoria y aprendizaje. Es más, Cdh1 es un importante factor de supervivencia neuronal *in vivo*. Así, la supresión de Cdh1 en neuronas glutamatérgicas provoca la acumulación postsináptica de receptores GluR1, lo que incrementa la vulnerabilidad de las neuronas a la muerte excitotóxica. Cdh1 es por tanto una importante diana molecular a tener en cuenta en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas, especialmente en la enfermedad de Alzheimer.



## CONCLUSIONES

A la vista de los resultados descritos en la presente Tesis Doctoral, podemos concluir:

1. Mediante el cruce de ratones transgénicos que contienen los exones 2 y 3 del gen que codifica Cdh1 flanqueados por secuencias LoxP, con ratones CaMKII $\alpha$ -Cre, que expresan la recombinasa Cre gobernada bajo el control del promotor neuronal de la proteína Ca<sup>2+</sup>-Calmodulina kinasa-II $\alpha$  (CaMKII $\alpha$ ), hemos generado un modelo de ratón *knockout* condicional de Cdh1, específicamente en las neuronas excitatorias del encéfalo durante la etapa adulta. Este modelo permite suprimir Cdh1 en áreas concretas del cerebro como son la capa CA1 del hipocampo y la corteza cerebral, zonas frecuentemente afectadas en neuropatologías de gran impacto socio-sanitario, como es la enfermedad de Alzheimer.
2. Cdh1 es esencial para la integridad y supervivencia neuronales *in vivo*. Así, la supresión de Cdh1 induce la pérdida de sinapsis glutamatérgicas, lo que provoca la retracción de la longitud y arborización dendríticas de las neuronas corticales e hipocampales (capa CA1) y, en consecuencia, la desestructuración y neurodegeneración en las áreas afectadas. Por tanto, hemos generado un modelo de neurodegeneración *in vivo* que permitirá investigar mecanismos moleculares responsables de la muerte neuronal en los procesos neurodegenerativos, hasta ahora desconocidos.
3. Los ratones *knockout* condicionales de Cdh1 presentan severas deficiencias en los procesos de aprendizaje y memoria y sufren miedo y ansiedad, probablemente como consecuencia de la desestabilización dendrítica y pérdida de sinapsis. Cdh1 es por tanto una importante diana molecular a tener en cuenta en la fisiopatología del deterioro cognitivo y de memoria que se asocia a ciertas enfermedades neurodegenerativas, como ocurre en la enfermedad de Alzheimer. Además, nuestro modelo experimental podría ser de gran utilidad en el estudio de los mecanismos moleculares que median los trastornos de ansiedad.
4. Cdh1 regula los niveles de la subunidad GluR1 de los receptores de glutamato tipo AMPA. Así, la deficiencia de Cdh1 provoca la acumulación de GluR1, permeable al calcio, lo que se ha relacionado con degeneración dendrítica, déficit de memoria y aprendizaje e, incluso, neurodegeneración.

### **Conclusión final**

Cdh1 regula la estabilidad de los receptores de glutamato, particularmente de GluR1, en la terminal postsináptica y, en consecuencia, desempeña una función clave en la plasticidad sináptica y arborización dendrítica, lo que es fundamental para los procesos de memoria y aprendizaje. Es más, Cdh1 es un importante factor de supervivencia neuronal *in vivo*. Así, la supresión de Cdh1 en neuronas glutamatérgicas provoca la acumulación postsináptica de receptores GluR1, lo que incrementa la vulnerabilidad de las neuronas a la muerte excitotóxica. Cdh1 es por tanto una importante diana molecular a tener en cuenta en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas, particularmente en la enfermedad de Alzheimer.



**INFORMACIÓN  
SUPLEMENTARIA**



# 1. Componentes celulares de la corteza cerebral

La Cx madura de ratón consta aproximadamente de 14 millones de neuronas y 12 millones de células gliales. Estos contajes directos son una contradicción con la teoría que afirma que el número de células gliales supera al número de neuronas, sin embargo, si tenemos en cuenta las observaciones de, que los astrocitos de manera individual ocupan dominios corticales que abarcan decenas de neuronas, todo concuerda a la perfección [[Herculano-Houzel, 2006](#)].

Normalmente la distinción entre excitación o inhibición, por lo general, se refiere únicamente al uso de neurotransmisores específicos. *Excitación*: glutamato mayoritariamente y aspartato. *Inhibición*: GABA. La Cx necesita un equilibrio entre la excitación y la inhibición, sin embargo, el número de neuronas es mayor con respecto al de interneuronas [[DeFelipe, 1992](#)].

La diversidad de fenotipos de neuronas existentes en la Cx de mamíferos, es mucho mayor que cualquiera otra región del SN [[Fame, 2011](#)].

## 1.1. Neuronas

En la Cx de los mamíferos, las neuronas tienen una gran variedad de formas y disposiciones espaciales. El objetivo directo de la clasificación de las neuronas ha sido poder entender mejor la complejidad de la Cx y poder permitir el uso de neuronas individuales en poblaciones enteras. Clásicamente las neuronas de la Cx se ha caracterizado mediante la técnica de impregnación argéntica de Golgi y su morfología [[Lorente de Nó, 1992](#)].

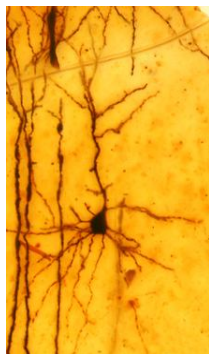
En la Cx las neuronas se dividen en tres grupos según su morfología [[Lorente de Nó, 1992](#)]:

**1)** Las **neuronas Cajal-Retzius** son las primeras en desarrollarse. En un ratón inmaduro, su disposición se limita prácticamente a la capa 1, donde sus axones descienden hacia el límite con la capa 2 y crean extensas ramificaciones tangenciales con numerosos procesos ascendentes. Estas neuronas están principalmente involucradas en los procesos de desarrollo, secretando Reelina para estructural el crecimiento de la Cx. En el desarrollo posterior muere el 97% de la población. Su distribución en un organismo adulto es irregular, tendiendo a concentrarse en las regiones sensoriales [[Soriano, 2005](#)].

**2)** Las **neuronas principales** que son células excitadoras. Envían sus axones y colaterales a través de la corteza y a otras áreas del SNC. Constituyen entre un 62% y un 85% de todas las neuronas de la Cx. Son abundantes en todas las capas, excepto en el estrato molecular. Estas células envían sus axones atravesando todas las capas de la Cx, incluso llegando a la sustancia blanca cortical profunda. Estos axones realizan sinapsis excitatorias o bien con glutamato o con aspartato. Su árbol dendrítico, es como 90-95% de superficie receptiva, y recibe aportaciones de una amplia variedad de fuentes locales, corticocorticales y subcorticales. Concentran un gran número de espinas dendríticas, estas espinas se desarrollan es respuesta a una estimulación sináptica repetida [[DeFelipe, 1992](#)].

Podemos afirmar que las neuronas principales tienen una amplia variedad de formas que varía desde las células más desarrolladas que son las *piramidales*, pasando por un gran número de variaciones, como pueden ser las neuronas *piramidales invertidas*, las células *polimórficas* y las *células estrelladas espinosas*. El resultado es una población diversa de neuronas excitatorias [DeFelipe, 1992].

### a) Neuronas piramidales



**Imagen 19.** Neurona piramidal de corteza cerebral de ratón impregnada con el método de Golgi. La preparación original es de Santiago Ramón y Cajal y se conserva en el Instituto Cajal. La imagen está sacada de la web del Instituto.

La forma y el tamaño de las neuronas piramidales varía a lo largo de las diferentes regiones y capas de la Cx. Este tipo de células se identifican por tener un soma ovoide/piramidal (desde la capa 2/3 a la capa 6), así como una gran dendrita apical ascendente y varias dendritas basales. Por lo general tienen un axón que surge de la base del soma y desciende hacia fuera a través de la Cx. En su extremo la dendrita apical puede ramificarse en una mata densa (ver **imagen 19**) [DeFelipe, 1992].

Los axones normalmente descienden fuera de la superficie pial con objetivos de regiones subcorticales. Por todo ello, las neuronas piramidales pueden clasificarse en función de su morfología o tamaño, pero también según sus objetivos de proyección, que pueden ser comisural (cuerpo calloso), frontal ipsilateral, subcortical, corticofugal, o talámico, incluso ser estructuras que están por debajo del neuroeje (corticotectal o corticoespinal) [DeFelipe, 1992].

### b) Células estrelladas espinosas

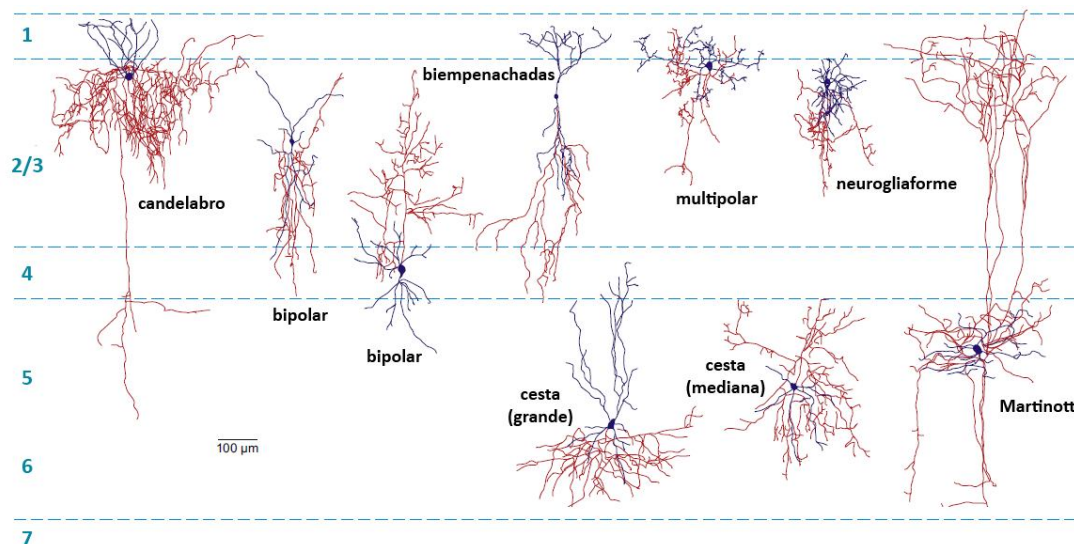
Morfológicamente estas células se asemejan a las neuronas piramidales pero pierden su dendrita apical a medida que maduran. Se estudio electrofisiológico también demuestra semejanzas con las neuronas piramidales de la capa 2/3. Normalmente su distribución se limita a la capa 4 de las regiones sensoriales primarias, corteza visual, auditiva y somatosensorial. Los núcleos de estas células se suelen disponer de manera junta para empaquetarse y formar una *pseudo capa granular*, que en ocasiones se puede observar con la tinción de Nissl. Poseen proyecciones corticotálamicas, predominantemente en la capa 4. El patrón de distribución sináptico observado en estas células, se asemeja al de las neuronas piramidales, excepto en el caso de que las sinapsis excitadoras raramente se ven en los ejes dendríticos. Los árboles dendríticos de estas células también varían, pueden ser tangenciales o radiales, y sus axones suelen emerger del lado descendente del soma [Okhotin, 2006].

### c) Otras células principales

En la Cx del ratón se han descrito otros tipos celulares como las denominadas *neuronas piramidales estrelladas*, *neuronas piramidales invertidas*, gran variedad de *células espinosas* en la capa 4 y las llamadas *neuronas espinosas verticales fusiformes*.

Normalmente se encuentran en capas más profundas de la Cx y se tienen pocos datos sobre ellas [DeFelipe, 1992].

### 3) Interneuronas



**Esquema 38.** Esquema representativo de la morfología de los distintos tipos de neuronas de ratón. En color azul está representado el árbol dendrítico y en color rojo el axón. Se muestran dos variantes de células bipolares y dos variantes de células en cesta. Modificado de [Watson, 2011].

Normalmente son inhibitorias y participan generalmente en los circuitos locales, sin embargo, a veces sirven de complemento de la actividad excitatoria de las neuronas principales. Se distribuyen a través de todas las capas de la Cx del ratón, dando lugar a terminaciones que inervan con neuronas principales o con otras interneuronas (ver **esquema 38**) [Lorente de Nó, 1992]. En términos funcionales las interneuronas se activan y se inhiben por muchos de los mismos tipos de inervación que reciben las neuronas piramidales [DeFelipe, 1992].

#### a) Células en cesta

Son el tipo de interneurona más común. Por lo general, presentan somas grandes y se encuentran desde la capa 2/3 al estrato 6. Estas células poseen un árbol dendrítico que se ramifica de forma radial y tangencial y se puede extender a través de todas las capas corticales. Se conoce que los axones de estas células están menos mielinizados en los adultos. Desde el lado pial del soma estos axones pueden ascender o descender y emitir colaterales horizontales. También pueden formar plexos en las capas superficiales [White, 1984].

#### b) Células en candelabro

Son células de axón corto, y en el caso de la Cx de ratón se encuentran en la capa 2/3. Su soma es pequeño y redondo y su árbol dendrítico varía entre multipolar y en penacho. Estas dendritas a penas poseen espinas y pueden extenderse para abarcar las capas de la 1 a la 4. Sus axones se originan en la parte inferior de su soma, y pueden ascender o descender, también tienen colaterales que pueden formar un plexo con formar variable, típicamente ubicado en la capa 2/3. Las células en candelabro hacen

sinapsis con los segmentos iniciales de los axones de las neuronas piramidales de la capa 2/3 [Kawaguchi, 1995].

### c) Células de Martinotti

Son células que se encuentran en las capas de la 2/3 a la 6 y envían sus largos axones hasta la capa 1. Tiene un árbol dendrítico de modelo multipolar que normalmente es descendente para recibir las entradas de las neuronas que están situadas en las capas 2/3 y 4. Las células de Martinotti están unidas entre sí por *gap junctions*, del mismo modo que ocurre con las células en cesta o en candelabro. Sus axones suben sin ramificaciones, y cuando llegan a la capa 1 forman un plexo en forma de abanico o con ramificaciones horizontales [Lorente de Nó, 1992].

### d) Células neurogliaformes

Están situadas en todas las capas, pero predominan en las capas más superficiales. Sus árboles dendríticos y sus axones reciben las conexiones de las capas 2/3 - 5. Sus axones están finamente ramificados. En el neocortex e Hy de ratón estas células se caracterizan por la expresión de Actinina2 $\alpha$  [Lorente de Nó, 1992].

### e) Células bipolares

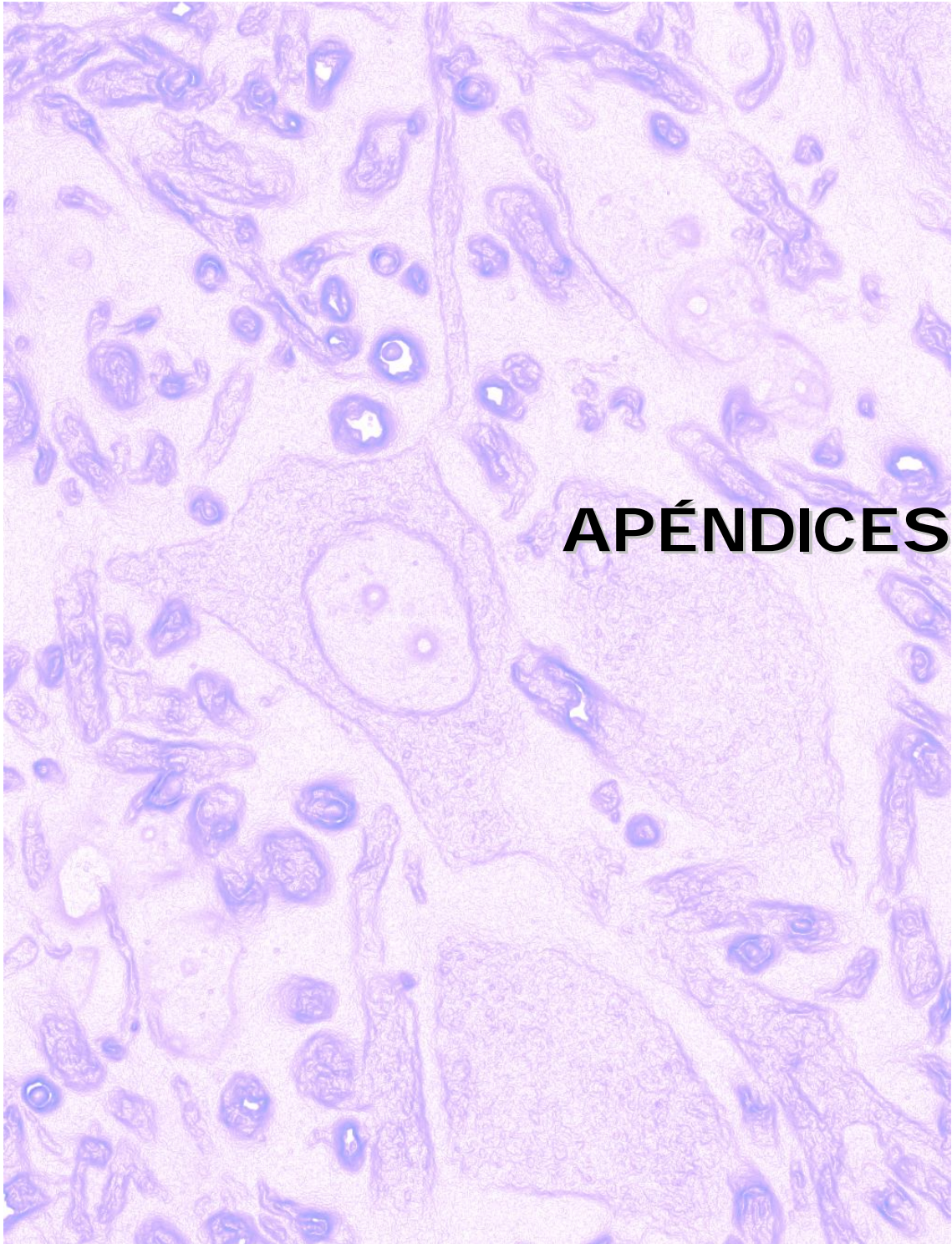
Muchas interneuronas son denominadas en función de la orientación que posee su árbol dendrítico. Cuando las dendritas se ramifican radialmente por encima y por debajo del soma, la célula puede denominarse bipolar, empenachada o incluso de doble ramo. Sin embargo, estos términos originan descripciones libres y pueden llevar a confusiones. La característica distintiva de las células bipolares es que tienen dos árboles dendríticos principales, uno ascendente y otro descendente desde su soma. Este tipo de interneuronas es muy abundante en el cerebro de los roedores y están distribuidas uniformemente por la Cx. Sus cuerpos celulares, de forma ovoide, se encuentran desde la capa 2/3 a la capa 6. Se distinguen de las células empenachadas porque las porciones proximales de las principales dendritas no están ramificadas, además de por la simplicidad de su plexo axonal. Los axones de las células bipolares realizan sinapsis con varios tipos de neuronas principales [DeFelipe, 1992].

### f) Células empenachadas

Este tipo de interneuronas también están muy extendidas por toda la Cx y su soma ovoide está situado en las capas 2/3 y 4. Se caracterizan por tener dos árboles dendríticos que se extienden desde los dos polos opuestos del soma y reciben sinapsis corticocorticales y corticotalámicas. Sus axones forman un plexo que se extiende ampliamente, que por norma general es descendente. Los datos que tenemos de estas células en ratones son escasos [Lorente de Nó, 1992].

### g) Otras interneuronas

Aunque la literatura se centra en los fenotipos de interneuronas más estudiados, hay una pequeña proporción de células que permanece sin clasificar o su clasificación y descripción está incompleta [DeFelipe, 1992].



**APÉNDICES**

## 1. Productos químicos generales

**Ácido acético glacial.**  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . #141008 Panreac Química SAU; Castellar del Valles, Barcelona, España.

**Ácido clorhídrico.**  $\text{HCl}$ . 37% QP. #211020 Panreac Química SAU; Castellar del Valles, Barcelona, España.

**Acetato para-cresilo.** Cresil Violeta. #C5042 Sigma-Aldrich, Co.; Saint Louis, Missouri, EEUU.

**Ácido etilen di-amino tetra-acético.** EDTA.  $(\text{HO}_2\text{CCH}_2)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2$ . #E6758 Sigma-Aldrich, Co.; Saint Louis, Missouri, EEUU.

**Ácido pícrico.** Trinitrofenol.  $(\text{NO}_2)_3\text{-C}_6\text{H}_2\text{-OH}$ . #141048 Panreac Química SAU; Castellar del Valles, Barcelona, España.

**Acrilamida 29:1.** (30% Acrilamida/Bis solution 29:1; 3,3 %C). #161-0156 Bio Rad Laboratories, S.A.; Hercules, California, EEUU.

**Agarosa.** Agarose Seaken® LE. #50004 Lonza; Rockland, Maine, EEUU.

**Albúmina sérica bovina.** BSA. #A4503 Sigma-Aldrich, Co.; Saint Louis, Missouri, EEUU.

**4',6-di-amino-2-fenilindol.** DAPI. #D9542 Sigma-Aldrich, Co.; Saint Louis, Missouri, EEUU.

**Aprotinina.**  $\text{C}_{284}\text{H}_{432}\text{N}_{84}\text{O}_{79}\text{S}_7$ . #A1153 Sigma-Aldrich, Co.; Saint Louis, Missouri, EEUU.

**Azida sódica.**  $\text{NaN}_3$ . #S2002 Sigma-Aldrich, Co.; Saint Louis, Missouri, EEUU.

**Azul de bromofenol.** #B5525 Sigma-Aldrich, Co.; Saint Louis, Missouri, EEUU.

**Azul de Coomassie.** Brilliant Blue R.  $\text{C}_{45}\text{H}_{44}\text{N}_3\text{NaO}_7\text{S}_2$  #B0149 Sigma-Aldrich, Co.; Saint Louis, Missouri, EEUU.

**BCA Protein Assay Kit Pierce®.** #23225 Pierce Biotechnology, Thermo Scientific; Rockford, Illinois, EEUU.

**BenchMark® Pre-Stained.** #10748-010 Invitrogen, Life Technologies Corporation; Carlsbad, California, EEUU.

**Betaina.** #B2629 Sigma-Aldrich, Co.; Saint Louis, Missouri, EEUU.

**Biotina-16-2'-desoxiuridina-5'-tri-fosfato.** *dUTP biotinilado*. #11093070910 Roche Diagnostics; Sant Cugat del Valles, Barcelona, España.

**Borohidruro sódico.**  $\text{NaBH}_4$ . #452882 Sigma-Aldrich, Co.; Saint Louis, Missouri, EEUU.

**Bromuro de etidio.**  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{BrN}_3$ . #E7637 Sigma-Aldrich, Co.; Saint Louis, Missouri, EEUU.

**Buffer EcoTaq.** BIOTAQ™. #BIO-21060 Biotline USA Inc.; Taunton, Massachusetts, EEUU.

**Cacodilato de sodio tri-hidrato.**  $\text{C}_2\text{H}_6\text{AsO}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ . #20840 Sigma-Aldrich, Co.; Saint Louis, Missouri, EEUU.

**Citrato tri-sódico.**  $\text{Na}_3\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3$ . #1.06448.0500 Merck Millipore; Billerica, Massachusetts, EEUU.

**Cloroformo.**  $\text{CHCl}_3$ . #1.02445.1000 Merck Millipore; Billerica, Massachusetts, EEUU.

**Cloruro de cobalto.**  $\text{CoCl}_2$ . #60818 Sigma-Aldrich, Co.; Saint Louis, Missouri, EEUU.

**Cloruro de magnesio.**  $\text{MgCl}_2$ . #M8266 Sigma-Aldrich, Co.; Saint Louis, Missouri, EEUU.

**Cloruro de magnesio.**  $MgCl_2$ . BIOTAQ™. #BIO-21060 Bioline USA Inc.; Taunton, Massachusetts, EEUU.

**Cloruro de potasio.** KCl. #P9333 Sigma-Aldrich, Co.; Saint Louis, Missouri, EEUU.

**Cloruro de sodio.** NaCl. #27800 Prolabo; Fontenay, Saint Bois, Francia.

**Desoxinucleótidos.** *dNTPs*. #11277049001 Roche Diagnostics; Sant Cugat del Valles, Barcelona, España.

**Diazepam.** *Valium*®. Roche Diagnostics; Sant Cugat del Valles, Barcelona, España.

**Dodecil sulfato sódico.** *SDS*.  $CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$ . #L4390 Sigma-Aldrich, Co.; Saint Louis, Missouri, EEUU.

**Dual Colors Standars® Precision Plus Protein™.** #161-0374 Bio Rad Laboratories, S.A.; Hercules, California, EEUU.

**Entellan®.** #1.07961.0100 Merck Millipore; Billerica, Massachusetts, EEUU.

**Etanol.**  $C_2H_6O$ . 96%. #141085 Panreac Química SAU; Castellar del Valles, Barcelona, España.

**Etanol absoluto.**  $C_2H_6O$ . #1.00983.2500 Merck Millipore; Billerica, Massachusetts, EEUU.

**Fenantrolina.**  $C_{12}H_8N_2$ . #P9375 Sigma-Aldrich, Co.; Saint Louis, Missouri, EEUU.

**Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium.** #F4680 Sigma-Aldrich, Co.; Saint Louis, Missouri, EEUU.

**Fluoruro de fenil metil sulfonilo.** *PMSF*.  $C_7H_7FO_2S$ . #P7626 Sigma-Aldrich, Co.; Saint Louis, Missouri, EEUU.

**Fluoruro sódico.** NaF. #1.06449.1000 Merck Millipore; Billerica, Massachusetts, EEUU.

**Fosfato de potasio mono-básico.**  $KH_2PO_4$ . #1.04873.1000 Merck Millipore; Billerica, Massachusetts, EEUU.

**Gelatina.** #G2500 Sigma-Aldrich, Co.; Saint Louis, Missouri, EEUU.

**Gelatina en polvo.** #1.04078.1000 Merck Millipore; Billerica, Massachusetts, EEUU.

**Glicerol.**  $C_3H_8O_3$ . #G9012 Sigma-Aldrich, Co.; Saint Louis, Missouri, EEUU.

**Glicerol.**  $C_3H_8O_3$ . 98%. #141339 Panreac Química SAU; Castellar del Valles, Barcelona, España.

**Glicina.**  $NH_2CH_2COOH$ . #G7126 Sigma-Aldrich, Co.; Saint Louis, Missouri, EEUU.

**Hemisulfato de leupeptina.**  $C_{20}H_{38}N_6O_4 \cdot 1/2H_2SO_4$ . #L2884 Sigma-Aldrich, Co.; Saint Louis, Missouri, EEUU.

**Heparina sódica.** 25000 U.I. #H9399 Sigma-Aldrich, Co.; Saint Louis, Missouri, EEUU.

**Hidroclorato de xilacina.** *Rompún*®. Bayer; Leverkusen, Alemania.

**Hidróxido de sodio.** NaOH. #1.06498.1000 Merck Millipore; Billerica, Massachusetts, EEUU.

**Immobilon™ Western® Chemiluminescent HRP Substrate.** #WBKLS0500 P36599A Merck Millipore; Billerica, Massachusetts, EEUU.

**Ketamina.** *Imalgène*®. Merial, S.A.; Lyon, Francia.

**Marcador de peso molecular de ADN 1 Kb.** DNA Ladder Plus. #10787-018 Invitrogen, Life Technologies Corporation; Carlsbad, California, EEUU.

**β-Mercaptoetanol.**  $HSCH_2CH_2OH$ . #M6250 Sigma-Aldrich, Co.; Saint Louis, Missouri, EEUU.

**Metanol.** CH<sub>3</sub>OH. #MTOL-00T-5K0 Labkem, Labbox Labware, S.L.; Mataró, Barcelona, España.

**Tetra-metil etileno di-amina.** TEMED. (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. #161-0800 Bio Rad Laboratories, S.A.; Hercules, California, EEUU.

**Nitrógeno líquido.** N<sub>2</sub>. Air Liquide Medicinal; Madrid, España.

**Nonidet P-40.** #N6507 Sigma-Aldrich, Co.; Saint Louis, Missouri, EEUU.

**O.C.T™ Tissue-Tek® Compound.** Sakura Finetechnical Co., Ltd.; Tokyo, Japón.

**Ortovanadato sódico.** Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>. #S6508 Sigma-Aldrich, Co.; Saint Louis, Missouri, EEUU.

**Oxígeno.** O<sub>2</sub>. Air Liquide Medicinal; Madrid, España.

**PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder®.** #26619 Thermo Scientific; Rockford, Illinois, EEUU.

**Paraformaldehído.** (CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>. #1.04005.1000 Merck Millipore; Billerica, Massachusetts, EEUU.

**Persulfato sódico de amonio.** PSA. (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>. #161-0700 Bio Rad Laboratories, S.A.; Hercules, California, EEUU.

**Pestatina A.** C<sub>34</sub>H<sub>63</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub>. #P4265 Sigma-Aldrich, Co.; Saint Louis, Missouri, EEUU.

**Polietilenglicol 400.** CH<sub>2</sub>OH(CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>2</sub>OH. #26602 Prolabo; Fontenay, Saint Bois, Francia.

**Proteinasa K.** #03115879001 Roche Diagnostics; Sant Cugat del Valles, Barcelona, España.

**Protóxido de nitrógeno.** N<sub>2</sub>O. Air Liquide Medicinal; Madrid, España.

**Sacarosa.** C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>. #141621 Panreac Química SAU; Castellar del Valles, Barcelona, España.

**Sevoflurano.** Sevofrane®. #673186.4 Abbott Laboratories, S.A.; Madrid, España.

**Sodio di-hidrógenofosfato 2-hidrato.** NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O. #28011 Prolabo; Fontenay, Saint Bois, Francia.

**Sodio di-hidrógenofosfato anhidro.** NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. #28013 Prolabo; Fontenay, Saint Bois, Francia.

**di-Sodio hidrógenofosfato 12-hidrato.** Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O. #28028 Prolabo; Fontenay, Saint Bois, Francia.

**di-Sodio hidrógenofosfato anhidro.** Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. #28026 Prolabo; Fontenay, Saint Bois, Francia.

**Soybean.** #T9128 Sigma-Aldrich, Co.; Saint Louis, Missouri, EEUU.

**Sulfato de atropina.** 1mg/1ml. #896829 Braun Medical, S.A.; Rubí, Barcelona, España.

**Sulfato de cromo-III y potasio 12-hidrato.** KCr(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·12H<sub>2</sub>O. #141284 Panreac Química SAU; Castellar del Valles, Barcelona, España.

**Super Signal West Dura®.** #34075 Pierce; Thermo Fisher Scientific Inc.; Pittsburgh, Pensilvania, EEUU.

**Taq polimerasa EcoTaq.** BIOTAQ™. #BIO-21060 Bionline USA Inc.; Taunton, Massachusetts, EEUU.

**Terminal transferasa.** #3333566 Roche Diagnostics; Sant Cugat del Valles, Barcelona, España.



**Tosil fenilalanila clorometil cetona.** TPCK.  $C_{17}H_{18}ClNO_3S$ . #T4376 Sigma-Aldrich, Co.; Saint Louis, Missouri, EEUU.

**Tosil lisina clorometil cetona.** TLCK.  $C_{14}H_{21}ClN_2O_3S \cdot HCl$ . #T7254 Sigma-Aldrich, Co.; Saint Louis, Missouri, EEUU.

**Triton® X-100.** #A4975 AppliChem GmbH, BioChemica Chemica Synthesis Services; Darmstadt, Alemania.

**Trizma® base.** Tris-(hidroximetil) aminometano.  $C_4H_{11}NO_3$ . #T6791 Sigma-Aldrich, Co.; Saint Louis, Missouri, EEUU.

**Trizma® HCl.** Clorhidrato de Tris-(hidroximetil) aminometano.  $C_4H_{11}NO_3 \cdot HCl$ . #T6666 Sigma-Aldrich, Co.; Saint Louis, Missouri, EEUU.

**Tween-20.** #P1379 Sigma-Aldrich, Co.; Saint Louis, Missouri, EEUU.

**Western Blotting Luminol Reagent®.** #sc-2048 Santa Cruz Biotechnology, Inc.; Dallas, Texas, EEUU.

**Xileno.**  $C_6H_4(CH_3)_2$ . #141769 Panreac Química SAU; Castellar del Valles, Barcelona, España.

## 2. Otros productos generales

**Aceite de inmersión Type F.** #11.513.859 Leica Biosystems; Nussloch, Heidelberger, Alemania.

**Cubreobjetos.** 24x24 mm, 24x30 mm, 24x40 mm, 24x50 mm, 24x60 mm Menzel-Gläser. Thermo Fisher Scientific Inc.; Pittsburgh, Pensilvania, EEUU.

**Leche en polvo.** Sveltesse Calcio Plus, Nestlé España, S.A.; Esplugues de Llobregat, Barcelona, España.

**Membranas de nitrocelulosa** Amersham™ Hybond™-ECL. #RPN2020D (10 sheets 20 x 20 cm) GE Healthcare UK Limited; Buckinghamshire, Reino Unido.

**Películas Super HR-U X-Ray Film.** #47410 12901 Fujifilm Medical; Fujifilm Corporation, Tokyo, Japón.

**Portaobjetos para adhesión esmerilados.** Caja 50 unidades. LíneaLAB, S.L.; Badalona, Barcelona, España.

**Portaobjetos para adhesión Superfrost® Plus.** Menzel-Gläser. #631-9483 Thermo Fisher Scientific Inc.; Pittsburgh, Pensilvania, EEUU.

## 3. Sistemas de inmunodetección en Inmunofluorescencia

### 3.1. Anticuerpos primarios

#### **Anti-Microtubule Associated Protein-2 (MAP2 2a+2b)**

Anticuerpo monoclonal anti MAP2 (2a+2b); Clon AP-20. #M1406 Sigma-Aldrich, Co.; Saint Louis, Missouri, EEUU.

Se deriva a partir del hibridoma producido por la fusión de células de mieloma de ratón y esplenocitos de un ratón inmunizado. MAP2 es la principal proteína que está asociada a los microtúbulos de tejido encefálico. Hay tres formas de MAP2, dos de ellas, MAP2a y MAP2b

tienen un tamaño similar, en torno a 280 kilodaltons (KDa), la tercera, MAP2c tiene un PM de 70 KDa. En el encéfalo de un ratón recién nacido MAP2b y MAP2c están presentes, sin embargo, MAP2a está ausente. Entre P10 y P20 MAP2a aparece en el encéfalo, mientras que la expresión de MAP2c disminuye. Este cambio ocurre durante el periodo en el que se completa el crecimiento de las dendritas y las neuronas han llegado a una morfología madura [Binder, 1986].

### Anti-NeuN

Anticuerpo monoclonal anti NeuN; Clon A-60. #MAB377 Merck Millipore; Billerica, Massachusetts, EEUU.

Este anticuerpo es exclusivo de Millipore y marca la proteína nuclear específica de neuronas de vertebrados llamada NeuN. Reacciona con la mayoría de tipos de células neuronales del SN de ratones, incluyendo las que se encuentran en la corteza cerebral, el hipocampo, el tálamo, la médula espinal, así como neuronas del SNP. En una tinción inmunohistoquímica, la proteína se localiza principalmente en el núcleo de las neuronas, con una tinción más ligera en el citoplasma. Hay células que no son reactivas con MAB377, las células de Purkinje, las células mitrales y los fotorreceptores [Mullen, 1992; Wolf, 1996].

### Anti-Tubulina III beta o anti-Tuj1

Anticuerpo policlonal anti Tuj1. #ab18207 Abcam®; Milton, Cambridge, Reino Unido.

Tubulina III beta o Tuj1 tiene un PM de 50 KDa y es una proteína abundante en el SNC y SNP, donde se expresa principalmente durante el desarrollo fetal y postnatal. La distribución de Tuj1 está asociada a las neuronas y exhibe distintos gradientes espaciotemporales. Sin embargo, la expresión transitoria de la proteína también está presente en la zona subventricular del SNC, relacionándose con los precursores de las células gliales, así como en las células neuroendocrinas del epitelio respiratorio fetal [Tay, 2008; van de Pavert, 2009].

### Anti-Vesicular Glutamate Transporter 1 (VGLUT1)

Anticuerpo monoclonal anti VGLUT 1; Clon 317G6. #135 511 Synaptic Systems (SY SY); Göttingen, Alemania.

El transportador vesicular de glutamato VGLUT1, también conocido como BNPI y SLC17A7, se identificó originalmente como un transportador de fosfato específico de cerebro y pesa 60 KDa. Es el más abundante de los dos que se han identificado como transportadores vesiculares de glutamato (VGLUT1 y VGLUT2). Tanto VGLUT1 como VGLUT2 son necesarios para la absorción y el almacenamiento de glutamato y comprenden el factor determinante para el fenotipo glutamatérgico. Ambos VGLUT, son diferentes a los transportadores de membrana de plasma que están impulsados por un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana [Bellocchio, 2000; Takamori, 2000].

Anticuerpos	Dilución
MAP2 (2a+2b)	1:500
NeuN	1:1000
Tuj1	1:500
VGLUT	1:500

Tabla 2. Tabla de anticuerpos primarios y diluciones utilizadas.

## 3.2. Anticuerpos secundarios

**Cabra anti-conejo conjugado con Cy2.** IgG de cabra anti-IgG de conejo. #111.225.003 Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.; Newmarket, Suffolk, Reino Unido.

**Cabra anti-conejo conjugado con Cy3.** IgG de cabra anti-IgG de conejo. # 111.175.003 Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.; Newmarket, Suffolk, Reino Unido.

**Cabra anti-ratón conjugado con Cy2.** IgG de cabra anti-IgG de ratón. #115.225.003 Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.; Newmarket, Suffolk, Reino Unido.

**Cabra anti-ratón conjugado con Cy3.** IgG de cabra anti-IgG de ratón. #111.165.003 Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.; Newmarket, Suffolk, Reino Unido.

Todos los anticuerpos secundarios se usaron a una dilución 1:500.

## 3.3. Otros

**Biotina-16-2'-desoxiuridina-5'-tri-fosfato.** *dUTP biotinilado.* #11093070910 Roche Diagnostics; Sant Cugat del Valles, Barcelona, España (ver **materiales y métodos "apartado 5. Técnica de TUNEL"**).

**DAPI.** #D9542 Sigma-Aldrich, Co.; Saint Louis, Missouri, EEUU.

**Estreptavidina conjugada con Cy3.** #016.160.084 Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.; Newmarket, Suffolk, Reino Unido. Se utilizó a una dilución 1:500 (ver **materiales y métodos "apartado 5. Técnica de TUNEL"**).

**Suero normal de cabra.** #005.000.121 Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.; Newmarket, Suffolk, Reino Unido.

**Terminal transferasa.** #3333566 Roche Diagnostics; Sant Cugat del Valles, Barcelona, España (ver **materiales y métodos "apartado 5. Técnica de TUNEL"**).

## 4. Sistemas de inmunodetección en *Western Blot*

### 4.1. Anticuerpos primarios

#### **Anti-Calcio Calmodulina kinasa II $\alpha$**

Anticuerpo monoclonal anti-Calcio Calmodulina kinasa II $\alpha$ ; Clon 6G9. #SA-162-0100 Enzo Life Science, Inc; Farmingdale, Nueva York, EEUU. En la transferencia tipo *Western Blot* el anticuerpo reconoce una banda de aproximadamente 55 KDa.

La CaMKII $\alpha$  forma parte de la familia de proteínas quinasas multifuncionales, las cuales juegan un papel importante en la transducción de señales mediadas por Ca<sup>2+</sup>. La CaMKII $\alpha$  se expresa en muchos tejidos diferentes, pero se encuentra específicamente en las neuronas del cerebro anterior y su ARNm se encuentra dentro de las dendritas, así como en el soma de la neurona.

La CaMKII $\alpha$  neuronal se compone de dos subunidades principales que son codificadas por los genes A y B CaMKII, respectivamente. La activación y la autofosforilación de CaMKII puede regular numerosos procesos neuronales tales como, varias formas de plasticidad sináptica, la potenciación a largo plazo y la depresión a largo plazo [Erondu, 1985; McKee, 1990; Molloy, 1991].

### Anti-Caspasa 3 activa

Anticuerpo policlonal anti-Caspasa 3 activa (Asp175). #9661 Cell Signaling Technology, Inc; Danvers, Massachusetts, EEUU. En la transferencia tipo *Western Blot* el anticuerpo reconoce dos bandas de 17 y 19 KDa.

El anticuerpo anti-Caspasa 3 activa (Asp175) detecta niveles endógenos de la Caspasa 3 activa, resultante de la escisión adyacente del Asp175 [Nicholson, 1995]. La Caspasa 3 es un ejecutor crítico de la apoptosis, ya que es parcial o totalmente responsable de la escisión proteolítica de muchas proteínas clave, tales como la PARP [Garnier, 2003; Iden, 2012].

### Anti-Cdh1

Anticuerpo monoclonal anti-Cdh1; Clone AR38. Amablemente cedido por el Dr. J. Gannon, Clare Hall Laboratories, Cancer Research, South Mimms, Reino Unido. En la transferencia tipo *Western Blot* el anticuerpo reconoce una banda de 50 KDa.

Cdh1 es cofactor esencial de la E3 Ubiquitina Ligasa APC/C. El complejo APC/C-Cdh1 se activa durante la anafase y se mantiene activo para degradar sustratos hasta el inicio de la siguiente fase S [Acquaviva, 2006; Kramer, 2000].

### Anti-Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)

Anticuerpo monoclonal anti-GAPDH; Clone 6C5. #AM4300 Ambion, Inc; Naugatuck, Connecticut, EEUU. En la transferencia tipo *Western Blot* el anticuerpo reconoce una banda de aproximadamente 37 KDa.

El anticuerpo contra la GAPDH se utiliza para analizar la expresión de esta proteína en líneas celulares experimentales mediante transferencia de tipo *Western Blot* e inmunofluorescencia. Applied Biosystems en combinación con Ambion Inc han utilizado este anticuerpo como control de ARNi [Bae, 2006; Burke, 1996; Zheng, 2003]. Nosotros la hemos utilizado como control de carga dado que su expresión no varía en nuestras condiciones experimentales.

### Anti-Glutamate Receptor 1 (GluR1)

Anticuerpo policlonal anti-GluR1. #AB1504 Chemicon® International, Inc.; Merck Millipore; Billerica, Massachusetts, EEUU. En la transferencia tipo *Western Blot* el anticuerpo reconoce una banda de 106 KDa.

Los receptores de glutamato (GluRs) son un tipo de moléculas receptoras del principal neurotransmisor excitatorio del cerebro, el glutamato. Estas proteínas se clasifican en dos familias: a) *receptores ionotrópicos* y b) *receptores metabotrópicos* [Farb, 1995; Puchalski, 1994].

Los receptores metabotrópicos, están acoplados a proteínas G, y modifican la respuesta de los canales de membrana y las concentraciones de segundos mensajeros. Existen tres tipos de receptores ionotrópicos de glutamato, que actúan como canales de cationes: los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), los de ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA); y los de kainato. A su vez, hay cuatro tipos de receptores AMPA: GluR1, GluR2, GluR3 y GluR4. Las diferentes combinaciones tetraméricas o pentaméricas de las subunidades va a contribuir a la diversidad funcional de los receptores de AMPA [Farb, 1995; Puchalski, 1994]. En general, los receptores AMPA median la transmisión sináptica excitatoria rápida en el SNC y juegan un papel clave en la potenciación a largo plazo (LTP) y en la depresión (LTD), que son dos modelos celulares bien establecidos de aprendizaje y memoria. GluR1 tiene una función vital en la plasticidad sináptica relacionada con el aprendizaje y se cree que media el flujo de calcio [Wentfold, 1992; Wentfold, 1996].

### **Anti-Glutamate Receptor 2 (GluR2)**

Anticuerpo policlonal anti-GluR2. #AB1768 Chemicon® International, Inc.; Merck Millipore; Billerica, Massachusetts, EEUU. En la transferencia tipo *Western Blot* el anticuerpo reconoce una banda de aproximadamente 100 KDa.

Como se ha explicado anteriormente hay cuatro tipos de receptores AMPA: GluR1, GluR2, GluR3 y GluR4. Aunque la composición de las subunidades de los receptores AMPA varíe, deben contener al menos una subunidad GluR2 que deberá ser impermeable al calcio. La permeabilidad relativa al calcio en los canales de los receptores AMPA puede estar relacionada con el daño neurotóxico patológico y cambios a largo plazo en las respuestas del sistema nervioso [Okada, 2003; Petralia, 1997].

El análisis de transferencia tipo *Western Blot* demuestra que este anticuerpo es selectivo para GluR2 y que no muestra reacción cruzada con GluR1, GluR3 o GluR4.

### **Anti-Glutamate Receptor 3 (GluR3)**

Anticuerpo monoclonal anti-GluR3; Clon 3B3. #MAB5416 Chemicon® International, Inc.; Merck Millipore; Billerica, Massachusetts, EEUU. En la transferencia tipo *Western Blot* el anticuerpo reconoce una banda de aproximadamente 110 KDa.

Los receptores de glutamato de tipo AMPA pueden modular la transmisión sináptica excitatoria mediante la liberación de neurotransmisores, influir en la actividad de los canales de iones y en la plasticidad sináptica. Ambos receptores, ionotrópicos y metabotrópicos, influyen en la expresión de genes y pueden estar involucrados en los procesos de diferenciación y proliferación celular.

Aunque las distribuciones de GluR1, GluR2 y GluR4 se conocen en detalle, la distribución celular de GluR3 en el cerebro de los mamíferos aún no se ha descrito, sin embargo, se ha detectado inmunoreactividad en todas las neuronas piramidales, astrocitos y en la mayoría de las interneuronas [Moga, 2003].

### **Anti-Glutamate Receptor ionotropic (NR2A y NR2B)**

Anticuerpo policlonal anti-NR2A y anticuerpo policlonal anti-NR2B. Cedidos amablemente por el Dr. Arsenio Fernández López, Catedrático de Biología Celular, Departamento de Biología Molecular, Instituto de Biomedicina, Universidad de León, España. En la transferencia tipo *Western Blot* el anticuerpo reconoce una banda de 180 KDa.

El receptor de glutamato ionotrópico o NR2, junto con la subunidad NR1, forma un heterodímero que componen el receptor de NMDA. Por medio del *splicing* alternativo, hay varias isoformas de NR2 clasificados desde NR2A a NR2D. El receptor de NMDA es un agonista. La subunidad NR1 se une a glicina, mientras que la subunidad NR2 se une a glutamina para la posterior activación. Como resultado de la activación de los receptores NMDA, se produce una apertura de un canal iónico que es no selectivo a los cationes, esto permite un flujo de Na<sup>+</sup>, una pequeña acumulación de Ca<sup>2+</sup> en el interior de la célula y de K<sup>+</sup> en el exterior de la célula. Se ha demostrado que el flujo de los iones calcio de los receptores NMDA (NR2A y NR2B) está relacionado con los procesos de plasticidad sináptica y con los mecanismos de aprendizaje y memoria de la célula [Flores-Soto, 2012; Seeburg, 1993].

### **Anti-Microtubule Associated Protein-2 (MAP2 2a+2b)**

Anticuerpo monoclonal anti MAP2 (2a+2b); Clon AP-20. #M1406 Sigma-Aldrich, Co.; Saint Louis, Missouri, EEUU. En la transferencia tipo *Western Blot* el anticuerpo reconoce una banda de aproximadamente 280 KDa [Binder, 1986].

Ver apéndices "sistemas de inmunodetección en Inmunofluorescencia".

## Anti-NeuN

Anticuerpo monoclonal anti NeuN; Clone A-60. #MAB377 Merck Millipore; Billerica, Massachusetts, EEUU. En la transferencia tipo *Western Blot* el anticuerpo reconoce dos bandas, una de ella de aproximadamente 47 KDa y la otra de 66 KDa [Mullen, 1992; Wolf, 1996].

Ver apéndices "sistemas de inmunodetección en Inmunofluorescencia".

## Anti-Post Synaptic Density (PSD-95)

Anticuerpo monoclonal anti-PSD-95; Clone 6G6-1C9. #MA1-045 Affinity Bioreagents™; Golden, Colorado, EEUU. En la transferencia tipo *Western Blot* el anticuerpo reconoce una banda de 95 KDa.

PSD-95 pertenece a una familia de proteínas asociadas a la membrana que se encuentran en la densidad postsináptica de las neuronas de cerebro anterior y de ciertas estructuras presinápticas del cerebelo. Al igual que otros miembros de la familia, PSD-95 tiene tres repeticiones de 90 aminoácidos llamados dominios PDZ seguidos por un dominio SH3 y un dominio Guanilato kinasa [Kornau, 1995; Li, 2010].

Se cree que PSD-95 participa en la agrupación de ciertas proteínas, entre las que se incluyen los receptores NMDA, los canales de potasio de tipo *Shaker* de las membranas sinápticas de las neuronas del SNC [Joseph, 2011].

## Anti-Sinaptofisina (SYP)

Anticuerpo monoclonal anti-Sinaptofisina; Clone D-4. #sc-17751 Santa Cruz Biotechnology, Inc.; Dallas, Texas, EEUU. En la transferencia tipo *Western Blot* el anticuerpo reconoce una banda de aproximadamente 38 KDa.

Las vesículas presinápticas participan en un ciclo de fusión con la membrana plasmática y reforma por endocitosis. La Sinaptofisina de las vesículas presinápticas está dirigida a los endosomas tempranos en fibroblastos transfectados y en células neuroendocrinas [Provoda, 2000].

SYP es una proteína N-glicosilada integral de membrana que se encuentra en las neuronas y las células endocrinas asociándose en forma de hexámeros para constituir un canal de gran conductancia. La SYP se une a la Sinaptobrevina (VAMP) originando un complejo durante el desarrollo neuronal [Wiedenmann, 1985].

## Anti-Sinaptotagmina 1 (SYT)

Anticuerpo policlonal anti-Sinaptotagmina1. #105 002 Synaptic Systems (SY SY); Göttingen, Alemania. En la transferencia tipo *Western Blot* el anticuerpo reconoce una banda de 65 KDa.

Sinaptotagmina1, también conocida como p65, es una glicoproteína integral de la membrana de las vesículas presinápticas neuronales y de los gránulos secretores de las células neuroendocrinas. Pertenece a una pequeña familia de proteínas donde están incluidas las Sinaptotagminas 1-6. Se expresa ampliamente en el SNC y en el SNP. Tiene un dominio N-terminal que es variable y que está expuesto al lumen de la vesícula, también posee una cola citoplasmática muy bien conservada que contiene dos dominios Ca<sup>2+</sup> que desencadenan la exocitosis de vesículas presinápticas [Brose, 1992; Geppert, 1994; Geppert, 1998].

## Anti-Vesicular Glutamate Transporter 1 (VGLUT 1)

Anticuerpo monoclonal anti VGLUT 1; Clone 317G6. #135 511 Synaptic Systems (SY SY); Göttingen, Alemania. En la transferencia tipo *Western Blot* el anticuerpo reconoce una banda de 60 KDa [Bellocchio, 2000; Takamori, 2000].

Ver apéndices "sistemas de inmunodetección en Inmunofluorescencia".

Anticuerpos	Dilución
CaMKII $\alpha$	1:500
Caspasa 3 activa	1:1000
Cdh1	1:20
GAPDH	1:40000
GluR1	1:500
GluR2	1:500
GluR3	1:500
MAP2 (2a+2b)	1:500
NR2A	1:500
NR2B	1:500
NeuN	1:1000
PSD-95	1:500
SYP	1:5000
SYT	1:1000
VGLUT1	1:1000

Tabla 3. Tabla de anticuerpos primarios utilizados en la técnica de transferencia por *Western Blot* y las correspondientes diluciones.

## 4.2. Anticuerpos secundarios

**Cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano (HRP).** IgG de cabra anti-IgG de conejo. #170-6515 Bio Rad Laboratories, S.A.; Hercules, California, EEUU.

**Cabra anti-conejo conjugado con HRP.** IgG de cabra anti-IgG de conejo. #sc-2030 Santa Cruz Biotechnology, Inc.; Dallas, Texas, EEUU.

**Cabra anti-ratón conjugado con HRP.** IgG de cabra anti-IgG de ratón. #170-6516 Bio Rad Laboratories, S.A.; Hercules, California, EEUU.

Anticuerpo 2 <sup>ario</sup>	Dilución
Cabra anti-conejo conjugado con HRP	1:1000
Cabra anti-conejo conjugado con HRP	1:10000
Cabra anti-ratón conjugado con HRP	1:1000

Tabla 4. Tabla de anticuerpos secundarios y diluciones utilizadas

## 5. Soluciones de uso común

### Fijador perfusión (Somogyi sin glutaraldehído)

Está compuesto por paraformaldehído (PFA) despolimerizado al 4% (p/v) y ácido pícrico al 0,2% (v/v) en 0,1 M tampón fosfato (TF) pH=7,4 a 25 °C.

Para evitar precipitados se utilizan inicialmente soluciones de PFA y ácido pícrico más concentradas preparadas en agua destilada (H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>). Para evitar polimerizaciones de PFA se utiliza NaOH.

### Gel de acrilamida SDS-PAGE 8%

#### RESOLVING GEL

Está compuesto por acrilamida 29:1 al 8% (v/v), *resolving-gel buffer* (0,375 M) pH=8,8, SDS al 0,1% (v/v), persulfato sódico de amonio (PSA) al 0,085% (v/v) y *tetra*-metil etileno diamina (TEMED) al 0,05% (v/v).

#### STACKING GEL

Está compuesto por acrilamida 29:1 al 3% (v/v), *stacking-gel buffer* (0,125 M) pH=6,8, SDS al 0,1% (v/v), PSA al 0,14% (v/v) y TEMED al 0,05% (v/v).

### Mezcla congeladora para secciones

Contiene un 30% (v/v) de glicerol 98% y un 30% (v/v) de polietilenglicol en TF (0,1 M) pH=7,4.

Para evitar precipitados se utilizan inicialmente soluciones de glicerol y polietilenglicol más concentradas preparadas en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>.

### Mezcla de reacción para PCR

Está compuesta por buffer EcoTaq BIOTAQ™ (1x), betaina (1 M), Cl<sub>2</sub>Mg BIOTAQ™ (1,5 mM), dNTPs (0,2 mM), primer1 (1 mM), primer2 (1 mM) y Taq polimerasa EcoTaq BIOTAQ™ (0,060 unidades/μl) en agua ultra pura MiliQ (H<sub>2</sub>O<sub>up</sub>).

*Buffer EcoTaq BIOTAQ™: compuesto por Tris-HCl (670 mM) pH=8,8, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (160 mM) y estabilizador al 0,1% (p/v).*

### Solución crioprotectora para bloques de tejido

Contiene sacarosa al 10% (p/v), 20% (p/v) y 30% (p/v) respectivamente, en TF (0,1 M) pH=7,4.



### **Solución para gelatinizar portaobjetos**

Compuesta por gelatina en polvo al 0,45% (p/v) y sulfato de cromo-III y potasio (0,88 mM).

### **Solución para permeabilizar TUNEL**

Contiene citrato *tri*-sódico (34 mM) y de Triton X-100 al 2% (v/v).

### **Solución salina isotónica**

Contiene 0,9% (p/v) de NaCl en H<sub>2</sub>Od.

### **Solución sobresaturada de ácido pícrico**

Se prepara mezclando ácido pícrico en H<sub>2</sub>Od a 70 °C, hasta que se llega a la saturación.

Esta solución se filtra siempre antes de mezclarse con la solución del PFA para preparar el Somogyi.

### **Tampón de carga (6x) electroforesis en agarosa**

Se prepara mezclando Trizma-base (125 mM) pH=6,8, glicerol al 20% (v/v), dodecil sulfato sódico (SDS) al 4% (p/v), β-mercaptoetanol al 10% (v/v) y azul de bromofenol al 0,01% (p/v).

### **Tampón de carga (2x) electroforesis *Western Blot***

Se prepara mezclando glicerol al 30% (v/v) y azul de bromofenol al 0,25% (p/v) en H<sub>2</sub>Od.

### **Tampón de digestión para la extracción de ADN**

Está compuesto por gelatina al 0,01% (p/v), Nonidet P-40 al 0,45% (v/v) y Tween-20 al 0,45% (v/v), KCl (50 mM), MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM), Tris-HCl (10 mM), y proteinasa K (100 µg/ml), todo disuelto en un medio tamponado a pH=8,5.

### **Tampón de electroforesis (10x) *Western Blot***

Está compuesto por Trizma-base (0,25M), SDS al 1% (p/v) y glicina (2,05 M).

### **Tampón de lisis RIPA**

Contiene Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (10 mM), Triton X-100 al 1% (v/v), SDS al 0,1 % (p/v), EDTA (12,5 mM) y NaCl (150 mM).

*Inhibidores de proteasas: aprotinina, hemisulfato de leupeptina, TLCK: tosil lisina clorometil cetona, trypsin inhibitor from glycine max (Soybean) y etanólicos (PMSF: fluoruro de fenil metil sulfonilo, TPCK: tosil fenilalanina clorometil cetona, pestatina A y fenantrolina).*

*Inhibidores de fosfatasas: ortovanadato sódico y fluoruro sódico.*

### **Tampón de transferencia (1x) *Western Blot***

Está compuesto por Tris (25 mM), glicina (192 mM) y metanol al 20% (v/v).

### **Tampón fosfato (0,5 M) pH=7,4 a 25 °C**

Se prepara mezclando soluciones de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,5 M) y de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,5 M). Se vierte la solución básica sobre la ácida hasta alcanzar el pH adecuado.

### Tampón fosfato salino (1x) pH=7,4 a 25 °C

El TFS está formado por NaCl (136 mM), KCl (2,7 mM), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (7,8 mM) y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,7 mM).

### Tampón SSC (20x) pH=7 a 25 °C

Está formado por NaCl (3 M) y citrato *tri*-sódico (300 mM).

### Tampón Tris-HCl (0,5 M) pH=7,6 a 25 °C:

Se obtiene mezclando Trizma-HCl (38,45 mM) y Trizma-base (11,47 mM).

### Tampón Tris salino con Tween-20 pH=7,5 a 25 °C

El TTBS está compuesto por Tris (20 mM), NaCl (500 mM) y Tween-20 al 0,1% (v/v).

### Tampón TUNEL

Para preparar tampón TUNEL mezclamos de cacodilato de sodio *tri*-hidrato (140 mM), cloruro de cobalto (1,83 M), Tris-HCl (0,2 M) pH=7,2 y Triton X-100 al 0,3% (v/v).

## 6. Aparataje

**Agitador a vibración** Vórtex Top Mix FB 15024. Fisher Scientific. Thermo Fisher Scientific Inc.; Pittsburgh, PA, EEUU.

**Agitador de balanceo** Rocker table MBP-30. SBS. Science Basic Solutions. Instrumentación científica, S.L.; Barcelona España.

**Agitador magnético con calefacción** FB 15001. Fisher Scientific. Thermo Fisher Scientific Inc.; Pittsburgh, PA, EEUU.

**Agitador orbital** Rotamax 120. Heidolph®; Schwabach, Nuremberg, Alemania.

**Arcón de congelación** Forma -86 ULT Freezer. Temperatura controlada entre -70 °C y -86 °C. Fisher Scientific. Thermo Fisher Scientific Inc.; Pittsburgh, PA, EEUU.

**Balanza de precisión** Ada/L Series. Adam Equipment Co. Ltd.; Milton Keynes, Reino Unido.

**Balanza de precisión** SNUG-1500. Jadever Weightech, Inc.; Vaughan, Ontario, Canada.

**Baño seco** Dry Bath FB 15101. Fisher Scientific. Thermo Fisher Scientific Inc.; Pittsburgh, PA, EEUU.

**Baño termostático** analógico serie BA. Bunsen, S.A.; Humanes de Madrid, Madrid, España.

**Bomba peristáltica de perfusión** Miniplus 3 M312. Gilson; Villiers-le-Bel, Francia.

**Campana de Perfusión** Euro Aire Tecnología para Diagnóstico e Investigación, S.A.; Alcobendas, Madrid, España.

**Centrífuga** 5415D Eppendorf. Eppendorf Inc.; Enfield, EEUU.

**Centrífuga** 5415R Eppendorf. Eppendorf Inc.; Enfield, EEUU.

**Centrífuga** 5702R Eppendorf. Eppendorf Inc.; Enfield, EEUU.

**Congelador pequeño** SN-T A++ UIG 1323 Comfort. Liebherr-International, AG; Bulle, Suiza.

**Congelador pequeño** A++ Liebherr Premium. Liebherr-International, AG; Bulle, Suiza.

**Congelador vertical** KF 7562 S Miele. Miele, S.A.; Alcobendas, Madrid, España.

**Congelador vertical** SN-T A++ G 3513 Comfort. Liebherr-International, AG; Bulle, Suiza.

**Criostato Leica** CM 1950 Ag Protect. Leica Biosystems; Nussloch, Heidelberg, Alemania.

**Cubeta horizontal para electroforesis** Microgel 2. Apelex; Lisses, Evry Cedex, Francia.

**Cubeta horizontal para electroforesis** Minigel 2. Apelex; Lisses, Evry Cedex, Francia.

**Cubeta horizontal para electroforesis** Midigel 2. Apelex; Lisses, Evry Cedex, Francia.

**Estereomicroscopio** SMZ 645 Nikon®. Nikon Instruments, Inc.; Tokyo, Japón.

**Estufa secado** UNE 400 (53 litros) UNB de Convección Natural y Control "Basic". Memmert GmbH & Co; Schwabach, Alemania.

**Frigorífico** SN-T A++ KP 3620 Comfort. Liebherr-International, AG; Bulle, Suiza.

**Frigorífico pequeño** A++ Liebherr Economy. Liebherr-International, AG; Bulle, Suiza.

**Fuente de electroforesis** Power Pac 300 Bio Rad. Bio Rad Laboratories, S.A.; Hercules, California, EEUU.

**Fuente de luz fría** de transmisión por fibra óptica KL1500 compact Schott, Schott AG; Mainz, Alemania.

**Incubador agitador orbital termostatzado** Forma modelo 420. Fisher Scientific. Thermo Fisher Scientific Inc.; Pittsburgh, PA, EEUU.

**Incubador compacto termostatzado** Heraeus B15. Fisher Scientific. Thermo Fisher Scientific Inc.; Pittsburgh, PA, EEUU.

**Lámpara de luz ultravioleta.** Transiluminador Quantity OneGel. Doc XR Bio Rad. Bio Rad Laboratories, S.A.; Hercules, California, EEUU.

**Matriz cerebro de ratón adulto** Planos coronales #RBM-2000C. ASI Instruments; Warren, MI, EEUU.

**Matriz cerebro de ratón adulto** Planos sagitales #RBM-2000S. ASI Instruments; Warren, MI, EEUU.

**Navigator™.** # 128-10T2. Biocomp Scientific Instruments for Biomedical Research; Fredericton, NB, Canada.

**pH metro basic 2.0.** Crison Instruments, S.A.; Barcelona, España.

**Pipetas de precisión** volumen variable Pipetman P (Juego de pipetas: P2, P10, P20, P100, P200 Y P1000). Gilson; Villiers-le-Bel, Francia.

**Rotámetro** Ática 3 Hersill. Hersill, S.A.; Mostoles, Madrid, España.

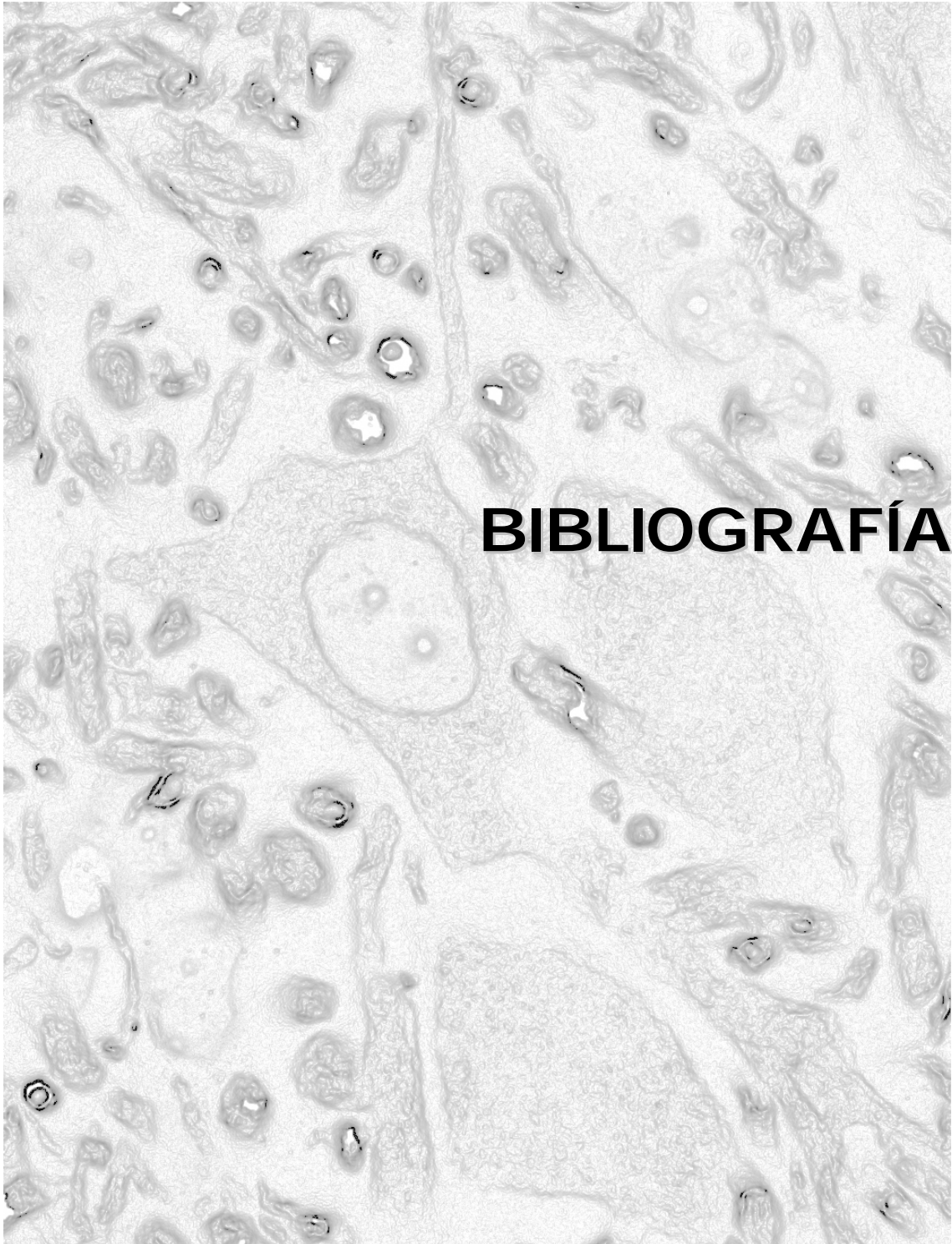
**Sistema de estereotaxia** para pequeños roedores de Kopf® Modelo 1900 Stereotaxiz Alignment System digitalizado con el sistema Wizard 550 Readouts. Kopf®. David Kopf Instruments; Tujunga, CA, EEUU.

**Taladro** Modelo 1911. Kopf®. David Kopf Instruments; Tujunga, CA, EEUU.  
**Termociclador.** Mastercycler® ep, Eppendorf. Eppendorf Inc.; Enfield, EEUU.

**Termomezclador** Thermomixer Comfort Eppendorf. Eppendorf Inc.; Enfield, EEUU.

**Ultrasonidos** FB 15050. Fisher Scientific. Thermo Fisher Scientific Inc.; Pittsburgh, PA, EEUU.

**Vaporizador** H-3 Hersill. Hersill, S.A.; Mostoles, Madrid, España.



# BIBLIOGRAFÍA

## 1. Artículos científicos

**Abraham RT.** Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev* **15**, 2177-2196 (2001).

**Acquaviva C., Pines J.** The anaphase promoting complex/cyclosome: APC/C. *J Cell Sci* **119**, 2401-2404 (2006).

**Allen G., Buxton RB., Wong EC., Courchesne E.** Attentional activation of the cerebellum independent of motor involvement. *Science* **275**, 1940-1943 (1997).

**Almeida A.** Regulation of APC/C-Cdh1 and its function in neuronal survival. *Mol Neurobiol* **46**, 547-554 (2012).

**Almeida A., Bolaños JP.** A transient inhibition of mitochondrial ATP synthesis by nitric oxide synthase activation triggered apoptosis in primary cortical neurons. *J Neurochem* **77**, 676-690 (2001).

**Almeida A., Bolaños JP., Moncada S.** E3 ubiquitin ligase APC/C-Cdh1 accounts for the Warburg effect by linking glycolysis to cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 738-741 (2010).

**Almeida A., Bolaños JP., Moreno S.** Cdh1-Hct1-APC is essential for the survival of postmitotic neurons. *J Neurosci* **25**, 8115-8121 (2005).

**Almeida A., Moncada S., Bolaños JP.** Nitric oxide switches on glycolysis through the AMP protein kinase and 6-phosphofructo-2-kinase pathway. *Nat Cell Biol* **6**, 45-51 (2004).

**Anderson CT., Sheets PL., Kiritani T., Shepherd GM.** Sublayer specific microcircuits of corticospinal and corticostriatal neurons in motor cortex. *Nat Neurosci* **13**, 739-744 (2010).

**Anderton BH., Callahan L., Coleman P., Davies P., Flood D., Jicha GA., Ohm T., Weaver C.** Dendritic changes in Alzheimer's disease and factors that may underlie these changes. *Prog Neurobiol* **55**, 595-609 (1998).

**Apps R., Garwicz M.** Anatomical and physiological foundations of cerebellar information processing. *Nat Rev Neurosci* **6**, 297-311 (2005).

**Arif A.** Extraneuronal activities and regulatory mechanisms of the atypical cyclin dependent kinase Cdk5. *Biochem Pharmacol* **84**, 985-993 (2012).

**Aristarkhov A., Eytan E., Moghe A., Admon A., Hershko A., Ruderman JV.** E2-C, a cyclin selective ubiquitin carrier protein required for the destruction of mitotic cyclins. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 4294-4299 (1996).

**Aulia S., Tang BL.** Cdh1-APC/C, cyclin B-Cdc2 and Alzheimer's disease pathology. *Biochem Biophys Res Commun* **339**, 1-6 (2006).

**Ayad NG.** Cdks give Cdc6 a license to drive into S phase. *Cell* **122**, 825-827 (2005).

**Bae BI., Hara MR., Cascio MB., Wellington CL., Hayden MR., Ross CA., Ha HC., Li XJ., Snyder SH., Sawa A.** Mutant Huntingtin: nuclear translocation and cytotoxicity mediated by GAPDH. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 3405-3409 (2006).

**Baker DJ., Dawlaty MM., Galardy P., van Deursen JM.** Mitotic regulation of the anaphase promoting complex. *Cell Mol Life Sci* **64**, 589-600 (2007).

**Bardin AJ., Amon A.** Men and sin: what's the difference? *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 815-826 (2001).

**Barford D.** Structural insights into anaphase promoting complex function and mechanism. *Phil Trans R Soc B* **366**, 3605-3624 (2011).

**Bartek J., Lukas J.** Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. *FEBS Lett* **490**, 117-122 (2001).

**Bartesaghi R., Gessi T.** Parallel activation of field CA2 and dentate gyrus by synaptically elicited perforant path volleys. *Hippocampus* **14**, 948-963 (2004).

**Bashir T., Dorrello NV., Amador V., Guardavaccaro D., Pagano M.** Control of the SCF-Skp2-Cks1 ubiquitin ligase by the APC/C-Cdh1 ubiquitin ligase. *Nature* **428**, 190-193 (2004a).

**Bashir T., Pagano M.** Don't skip the G1 phase: how APC/C-Cdh1 keeps SCF-Skp2 in check. *Cell Cycle* **3**, 850-852 (2004b).

**Bassermann F., Frescas D., Guardavaccaro D., Busino L., Peschiaroli A., Pagano M.** The Cdc14B-Cdh1-Plk1 axis controls the G2 DNA damage response checkpoint. *Cell* **134**, 256-267 (2008).

**Bellocchio EE., Reimer RJ., Fremeau RT Jr., Edwards RH.** Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter. *Science* **289**, 957-960 (2000).

**Belzung C., Le Pape G.** Comparison of different behavioral test situations used in psychopharmacology for measurement of anxiety. *Physiol Behav* **56**, 623-628 (1994).

**Besson A., Dowdy SF., Roberts JM.** Cdk inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell* **14**, 159-169 (2008).

**Best PJ., White AM.** Placing hippocampal single unit studies in a historical context. *Hippocampus* **9**, 346-351 (1999).

**Bican O., Minagar A., Pruitt AA.** The spinal cord a review of functional neuroanatomy. *Neurol Clin* **31**, 1-18 (2013).

**Bilkei-Gorzó A., Gyertyán I.** Some doubts about the basic concept of hole board test. *Neurobiology* **4**, 405-415 (1996).

**Binder LI., Frankfurter A., Rebhun LI.** Differential localization of MAP2 and tau in mammalian neurons in situ. *Ann N Y Acad Sci* **466**, 145-166 (1986).

**Biscoe TJ., Nickels SM., Stirling CA.** Numbers and sizes of nerve fibres in mouse spinal roots. *Q J Exp Physiol* **67**, 473-494 (1982).

**Bjugn R., Haugland HK., Flood PR.** Ultrastructure of the mouse spinal cord ependyma. *J Anat* **160**, 117-125 (1988).

**Blatch GL., Lässle M.** The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays* **21**, 932-939 (1999).

**Blizard DA., Weinheimer VK., Klein LC., Petri SA., Cohen R., McClearn GE.** Return to home cage as a reward for maze learning in young and old genetically heterogeneous mice. *Comp Med* **56**, 196-201 (2006).

**Bolaños JP., Almeida A., Moncada S.** Glycolysis: a bioenergetic or a survival pathway? *Trends Biochem Sci* **35**, 145-149 (2010).

**Bolaños JP., Delgado-Esteban M., Herrero-Mendez A., Fernandez-Fernandez S., Almeida A.** Regulation of glycolysis and pentose phosphate pathway by nitric oxide: impact on neuronal survival. *Biochim Biophys Acta* **1777**, 789-793 (2008).

**Bouchoux C., Uhlmann F.** A quantitative model for ordered Cdk substrate dephosphorylation during mitotic exit. *Cell* **147**, 803-814 (2011).

**Bressler A., Blizard D., Andrews A.** Low stress route learning using the Lashley III maze in mice. *J Vis Exp* **39**, 1-6 (2010).

**Brose N., Petrenko AG., Südhof TC., Jahn R.** Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science* **256**, 1021-1025 (1992).

**Brosnan-Watters G., Wozniak DF.** A rotating hole board procedure for testing drug effects on spatial learning and memory in mice. *Brain Res Protoc* **1**, 331-338 (1997).

- Bureau I., von Saint Paul F., Svoboda K.** Interdigitated paralemniscal and lemniscal pathways in the mouse barrel cortex. *PLoS Biol* **4**, 2361-2371 (2006).
- Burke JR., Enghild JJ., Martin ME., Jou YS., Myers RM., Roses AD., Vance JM., Strittmatter WJ.** Huntingtin and DRPLA proteins selectively interact with the enzyme GAPDH. *Nat Med* **2**, 347-350 (1996).
- Burnette WN.** Western Blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* **112**, 195-203 (1981).
- Burton JL., Solomon MJ.** D-box and KEN-box motifs in budding yeast Hsl1p are required for APC mediated degradation and direct binding to Cdc20p and Cdh1p. *Genes Dev* **15**, 2381-2395 (2001).
- Busby EC., Leistriz DF., Abraham RT., Karnitz LM., Sarkaria JN.** The radiosensitizing agent 7-hydroxystaurosporine (UCN-01) inhibits the DNA damage checkpoint kinase hChk1. *Cancer Res* **60**, 2108-2112 (2000).
- Canepa ET., Scassa ME., Ceruti JM., Marazita MC., Carcagno AL., Sirkin PF., Ogara MF.** INK4 proteins, a family of mammalian Cdk inhibitors with novel biological functions. *IUBMB Life* **59**, 419-426 (2007).
- Careau V., Bininda-Emonds OR., Ordonez G., Garland T Jr.** Are voluntary wheel running and open field behavior correlated in mice? Different answers from comparative and artificial selection approaches. *Behav Genet* **42**, 830-844 (2012).
- Carroll CW., Enquist-Newman M., Morgan DO.** The APC subunit Doc1 promotes recognition of the substrate destruction box. *Curr Biol* **15**, 11-18 (2005).
- Carroll CW., Morgan DO.** The Doc1 subunit is a processivity factor for the anaphase promoting complex. *Nat Cell Biol* **4**, 880-887 (2002).
- Castro A., Vigneron S., Bernis C., Labbé JC., Lorca T.** Xkid is degraded in a D-box, KEN-box, and A-box independent pathway. *Mol Cell Biol* **23**, 4126-4138 (2003).
- Cavanagh JB.** Effects of previous x-irradiation on the cellular response of nervous tissue to injury. *Nature* **219**, 626-627 (1968).
- Chang TS., Jeong W., Lee DY., Cho CS., Rhee SG.** The RING-H2-finger protein Apc11 as a target of hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med* **37**, 521-530 (2004).
- Chauhan S., Zheng X., Tan YY., Tay BH., Lim S., Venkatesh B., Kaldis P.** Evolution of the Cdk-activator Speedy/RINGO in vertebrates. *Cell Mol Life Sci* **69**, 3835-3850 (2012).
- Chen HH., Wang YC., Fann MJ.** Identification and characterization of the Cdk12-cyclin L1 complex involved in alternative splicing regulation. *Mol Cell Biol* **26**, 2736-2745 (2006).
- Chen J., Kanai Y., Cowan NJ., Hirokawa N.** Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature* **360**, 674-677 (1992).
- Chew EH., Hagen T.** Substrate mediated regulation of cullin neddylation. *J Biol Chem* **282**, 17032-17040 (2007).
- Chin CF., Yeong FM.** Safeguarding entry into mitosis: the antephasal checkpoint. *Mol Cell Biol* **30**, 22-32 (2010).
- Chiu YC., Algase D., Whall A., Liang J., Liu HC., Lin KN., Wang PN.** Getting lost: directed attention and executive functions in early Alzheimer's disease patients. *Dement Geriatr Cogn Disord* **17**, 174-180 (2004).
- Ciccio A., Elledge SJ.** The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell* **40**, 179-204 (2010).
- Cipressa F., Cenci G.** DNA damage response, checkpoint activation and dysfunctional telomeres: face to face between mammalian cells and *Drosophila*. *Tsitologia* **55**, 211-217 (2013).

**Cline H., Haas K.** The regulation of dendritic arbor development and plasticity by glutamatergic synaptic input: a review of the synaptotrophic hypothesis. *J Physiol* **586**, 1509-1517 (2008).

**Corn PG.** Role of the ubiquitin proteasome system in renal cell carcinoma. *BMC Biochem* **8**, 1-10 (2007).

**Crawley JN.** Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: experimental design and evaluation of general health, sensory functions, motor abilities and specific behavioral tests. *Brain Res* **835**, 18-26 (1999).

**Crelin ES.** Development of the nervous system. A logical approach to neuroanatomy. *Clin Symp* **26**, 1-32 (1974).

**Cubelos B., Sebastián-Serrano A., Beccari L., Calcagnotto ME., Cisneros E., Kim S., Dopazo A., Alvarez-Dolado M., Redondo JM., Bovolenta P., Walsh CA., Nieto M.** Cux-1 and Cux-2 regulate dendritic branching, spine morphology and synapses of the upper layer neurons of the cortex. *Neuron* **66**, 523-535 (2010).

**Cuende J., Moreno S., Bolaños JP., Almeida A.** Retinoic acid downregulates Rae1 leading to APC/C-Cdh1 activation and neuroblastoma SH-SY5Y differentiation. *Oncogene* **27**, 3339-3344 (2008).

**Cusick JF., Myklebust JB., Larson SJ., Sances A Jr.** Spinal cord evaluation by cortical evoked responses. *Arch Neurol* **36**, 140-143 (1979).

**da Fonseca PC., Kong EH., Zhang Z., Schreiber A., Williams MA., Morris EP., Barford D.** Structures of APC/C-Cdh1 with substrates identify Cdh1 and Apc10 as the D-box co-receptor. *Nature* **470**, 274-278 (2011).

**D'Amelio M., Cavallucci V., Middei S., Marchetti C., Pacioni S., Ferri A., Diamantini A., De Zio D., Carrara P., Battistini L., Moreno S., Bacci A., Ammassari-Teule M., Marie H., Cecconi F.** Caspase-3 triggers early synaptic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* **14**, 69-76 (2011).

**D'Angelo E., Mazzarello P., Prestori F., Mapelli J., Solinas S., Lombardo P., Cesana E., Gandolfi D., Congi L.** The cerebellar network: from structure to function and dynamics. *Brain Res Rev* **66**, 5-15 (2011).

**Das AK., Cohen PW., Barford D.** The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. *EMBO J* **17**, 1192-1199 (1998).

**de Schutter E.** Cerebellar cortex: computation by extrasynaptic inhibition? *Curr Biol* **12**, R363-R365 (2002).

**DeFelipe J., Alonso-Nanclares L., Arellano JI.** Microstructure of the neocortex: comparative aspects. *J Neurocytol* **31**, 299-316 (2002).

**DeFelipe J., Fariñas I.** The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Prog Neurobiol* **39**, 563-607 (1992).

**Delgado-Esteban M., Garcia-Higuera I., Maestre C., Moreno S., Almeida A.** APC/C-Cdh1 coordinates neurogenesis and cortical size during development. *Nat Commun* **4**, 1-12 (2013).

**Delgado-Garcia JM.** Structure and function of the cerebellum. *Rev Neurol* **33**, 635-642 (2001).

**Diana RA., Yonelinas AP., Ranganath C.** Imaging recollection and familiarity in the medial temporal lobe: a three component model. *Trends Cogn Sci* **11**, 379-386 (2007).

**Douglas RJ., Martin KA.** Mapping the matrix: the ways of neocortex. *Neuron* **56**, 226-238 (2007).



**Dube P., Herzog F., Gieffers C., Sander B., Riedel D., Müller SA., Engel A., Peters JM., Stark H.** Localization of the coactivator Cdh1 and the cullin subunit Apc2 in a cryo-electron microscopy model of vertebrate APC/C. *Mol Cell* **20**, 867-879 (2005).

**Dudchenko PA.** An overview of the tasks used to test working memory in rodents. *Neurosci Biobehav Rev* **28**, 699-709 (2004).

**Eckerdt F., Strebhardt K.** Polo-like kinase 1: target and regulator of anaphase promoting complex/cyclosome dependent proteolysis. *Cancer Res* **66**, 6895-6898 (2006).

**Eguren M., Manchado E., Malumbres M.** Non-mitotic functions of the anaphase promoting complex. *Semin Cell Dev Biol* **22**, 572-578 (2011).

**Eguren M., Porlan E., Manchado E., Garcia-Higuera I., Cañamero M., Fariñas I., Malumbres M.** The APC/C cofactor Cdh1 prevents replicative stress and p53 dependent cell death in neural progenitors. *Nat Commun* **4**, 1-10 (2013).

**Eichenbaum H., Yonelinas AR., Ranganath C.** The medial temporal lobe and recognition memory. *Annu Rev Neurosci* **30**, 123-152 (2007).

**Enders GH.** Mammalian interphase Cdks: dispensable master regulators of the cell cycle. *Genes Cancer* **3**, 614-618 (2012).

**Erondu NE., Kennedy MB.** Regional distribution of type II Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent protein kinase in rat brain. *J Neurosci* **5**, 3270-3277 (1985).

**Fame RM., MacDonald JL., Macklis JD.** Development, specification and diversity of callosal projection neurons. *Trends Neurosci* **34**, 41-50 (2011).

**Fang G., Yu H., Kirschner MW.** Control of mitotic transitions by the anaphase promoting complex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **354**, 1583-1590 (1999).

**Farb CR., Aoki C., Ledoux JE.** Differential localization of NMDA and AMPA receptor subunits in the lateral and basal nuclei of the amygdala: a light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* **362**, 86-108 (1995).

**Ferrere A., Vitalis T., Gingras H., Gaspar P., Cases O.** Expression of Cux-1 and Cux-2 in the developing somatosensory cortex of normal and barrel defective mice. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* **288**, 158-165 (2006).

**Fine EJ., Ionita CC., Lohr L.** The history of the development of the cerebellar examination. *Semin Neurol* **22**, 375-384 (2002).

**Flores-Soto ME., Chaparro-Huerta V., Escoto-Delgadillo M., Vazquez-Valls E., González-Castañeda RE., Beas-Zarate C.** Structure and function of NMDA type glutamate receptor subunits. *Neurologia* **27**, 301-310 (2012).

**Foster SA., Morgan DO.** The APC/C subunit Mnd2/Apc15 promotes Cdc20 autoubiquitination and spindle assembly checkpoint inactivation. *Mol Cell* **47**, 921-932 (2012).

**Fry AM., Yamano H.** APC/C mediated degradation in early mitosis: how to avoid spindle assembly checkpoint inhibition. *Cell Cycle* **5**, 1487-1491 (2006).

**Frye JJ., Brown NG., Petzold G., Watson ER., Grace CR., Nourse A., Jarvis MA., Kriwacki RW., Peters JM., Stark H., Schulman BA.** Electron microscopy structure of human APC/C -Cdh1-Emi1 reveals multimodal mechanism of E3 ligase shutdown. *Nat Struct Mol Biol* **20**, 827-835 (2013).

**Fu AK., Hung KW., Fu WY., Shen C., Chen Y., Xia J., Lai KO., Ip NY.** APC-Cdh1 mediates Eph A4 dependent downregulation of AMPA receptors in homeostatic plasticity. *Nat Neurosci* **2**, 181-189 (2011).

**Fujise N., Kosaka T.** Mossy cells in the mouse dentate gyrus: identification in the dorsal hilus and their distribution along the dorsoventral axis. *Brain Res* **816**, 500-511 (1999).

- Furgason JM., Bahassi el M.** Targeting DNA repair mechanisms in cancer. *Pharmacol Ther* **137**, 298-308 (2013).
- Gaglani SM., Lu L., Williams RW., Rosen GD.** The genetic control of neocortex volume and covariation with neocortical gene expression in mice. *BMC Neurosci* **10**, 1-11 (2009).
- Garcia-Higuera I., Manchado E., Dubus P., Cañamero M., Mendez J., Moreno S., Malumbres M.** Genomic stability and tumour suppression by the APC/C cofactor Cdh1. *Nat Cell Biol* **10**, 802-811 (2008).
- Garnier P., Ying W., Swanson RA.** Ischemic preconditioning by caspase cleavage of poly(ADP-Ribose) polymerase-1. *J Neurosci* **23**, 7967-7973 (2003).
- Gascon E., Vutskits L., Zhang H., Barral-Moran MJ., Kiss PJ., Mas C., Kiss JZ.** Sequential activation of p75 and TrkB is involved in dendritic development of subventricular zone derived neuronal progenitors in vitro. *Eur J Neurosci* **21**, 69-80 (2005).
- Geppert M., Goda Y., Hammer RE., Li C., Rosahl TW., Stevens CF., Südhof TC.** Synaptotagmin I: a major Ca<sup>2+</sup> sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell* **79**, 717-727 (1994).
- Geppert M., Südhof TC.** RAB3 and Synaptotagmin: the yin and yang of synaptic membrane fusion. *Annu Rev Neurosci* **21**, 75-95 (1998).
- Gieffers C., Dube P., Harris JR., Stark H., Peters JM.** Three dimensional structure of the anaphase promoting complex. *Mol Cell* **7**, 907-913 (2001).
- Gieffers C., Peters BH., Kramer ER., Dotti CG., Peters JM.** Expression of the Cdh1 associated form of the anaphase promoting complex in postmitotic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 11317-11322 (1999).
- Glotzer M., Murray AW., Kirschner MW.** Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* **349**, 132-138 (1991).
- Gorr IH., Reis A., Boos D., Wühr M, Madgwick S., Jones KT., Stemmann O.** Essential Cdk1 inhibitory role for separase during meiosis I in vertebrate oocytes. *Nat Cell Biol* **8**, 1035-1037 (2006).
- Grallert B., Boye E.** The multiple facets of the intra-S checkpoint. *Cell Cycle* **7**, 2315-2320 (2008).
- Haesslein JL., Jullian N.** Recent advances in cyclin dependent kinase inhibition. Purine based derivatives as anti-cancer agents. Roles and perspectives for the future. *Curr Top Med Chem* **2**, 1037-1050 (2002).
- Hammond-Martel I., Yu H., Affar EI B.** Roles of ubiquitin signaling in transcription regulation. *Cell Signal* **24**, 410-421 (2012).
- Hanna J., Finley D.** A proteasome for all occasions. *FEBS Lett* **581**, 2854-2861 (2007).
- Harper DR., Ming-Liu K., Kangro HO.** Protein blotting: ten years on. *J Virol Methods* **30**, 25-40 (1990).
- Hartwell LH., Weinert TA.** Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* **246**, 629-634 (1989).
- Hasan MT., Hernandez-Gonzalez S., Dogbevia G., Treviño M. Bertocchi I., Gruart A., Delgado-Garcia JM.** Role of motor cortex NMDA receptors in learning dependent synaptic plasticity of behaving mice. *Nat Commun* **4**, 1-9 (2013).
- Hashimoto M., Hibi M.** Development and evolution of cerebellar neural circuits. *Dev Growth Differ* **54**, 373-389 (2012).
- Hatakeyama S., Yada M., Matsumoto M., Ishida N., Nakayama KI.** U-box proteins as a new family of ubiquitin protein ligases. *J Biol Chem* **276**, 33111-33120 (2001).

**Hayes MJ., Kimata Y., Wattam SL., Lindon C., Mao G., Yamano H., Fry AM.** Early mitotic degradation of Nek2A depends on Cdc20 independent interaction with the APC/C. *Nat Cell Biol* **8**, 607-614 (2006).

**Heck D., Kümmell F., Thach WT., Aertsena A.** Dynamic correlation of neuronal activity in rat cerebellar cortex modulated by behavior. *Ann N Y Acad Sci* **978**, 156-163 (2002).

**Herculano-Houzel S., Mota B., Lent R.** Cellular scaling rules for rodent brains. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 12138-12143 (2006).

**Heredia M., Fuente A., Criado J., Yajeya J., Devesa J., A.S. Riolobos AS.** Early growth hormone (GH) treatment promotes relevant motor functional improvement after severe frontal cortex lesion in adult rats. *Behav Brain Res* **247**, 48-58 (2013).

**Herrero-Mendez A., Almeida A., Fernandez E., Maestre C., Moncada S., Bolaños JP.** The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1. *Nat Cell Biol* **11**, 747-752 (2009).

**Herrup K., Trenkner E.** Regional differences in cytoarchitecture of the weaver cerebellum suggest a new model for weaver gene action. *Neuroscience* **23**, 871-885 (1987).

**Hershko A., Ciechanover A.** The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* **67**, 425-479 (1998).

**Heuer H., Christ S., Friedrichsen S., Brauer D., Winckler M., Bauer K., Raivich G.** Connective tissue growth factor: a novel marker of layer 7 neurons in the rat cerebral cortex. *Neuroscience* **119**, 43-52 (2003).

**Hirai H., Kawanishi N., Iwasawa Y.** Recent advances in the development of selective small molecule inhibitors for cyclin dependent kinases. *Curr Top Med Chem* **5**, 167-179 (2005).

**Hisanaga S., Endo R.** Regulation and role of cyclin dependent kinase activity in neuronal survival and death. *J Neurochem* **115**, 1309-1321 (2010).

**Hochegger H., Takeda S., Hunt T.** Cyclin dependent kinases and cell cycle transitions: does one fit all? *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 910-916 (2008).

**Hodges H.** Maze procedures: the radial arm and water maze compared. *Brain Res Cogn Brain Res* **3**, 167-181 (1996).

**Holmes A., Wrenn CC., Harris AP., Thayer KE., Crawley JN.** Behavioral profiles of inbred strains on novel olfactory, spatial and emotional tests for reference memory in mice. *Genes Brain Behav* **1**, 55-69 (2002).

**Iden S., van Riel WE., Schäfer R., Song JY., Hirose T., Ohno S., Collard JG.** Tumor type dependent function of the par3 polarity protein in skin tumorigenesis. *Cancer Cell* **22**, 389-403 (2012).

**Jeganathan KB., Malureanu L., van Deursen JM.** The Rae1-Nup98 complex prevents aneuploidy by inhibiting securin degradation. *Nature* **438**, 1036-1039 (2005).

**Jensen EC.** The basics of Western Blotting. *Anat Rec (Hoboken)* **295**, 369-371 (2012).

**Jiménez-Díaz L., Nava-Mesa MO., Heredia M., Riolobos AS., Gómez-Álvarez M., Criado JM., de la Fuente A., Yajeya J., Navarro-López JD.** Embryonic amygdalar transplants in adult rats with motor cortex lesions: a molecular and electrophysiological analysis. *Front Neurol* **2**, 1-9 (2011).

**Jinno S., Kosaka T.** Cellular architecture of the mouse hippocampus: a quantitative aspect of chemically defined GABAergic neurons with stereology. *Neurosci Res* **56**, 229-245 (2006).

**Jinno S., Kosaka T.** Patterns of expression of calcium binding proteins and neuronal nitric oxide synthase in different populations of hippocampal GABAergic neurons in mice. *J Comp Neurol* **449**, 1-25 (2002).

**Jones BJ., Roberts DJ.** A rotarod suitable for quantitative measurements of motor incoordination in naive mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol* **259**, 211 (1968).

**Jones EG.** Neuroanatomy: Cajal and after Cajal. *Brain Res Rev* **55**, 248-255 (2007).

**Joseph BK., Thakali KM., Pathan AR., Kang E., Rusch NJ., Rhee SW.** Postsynaptic density 95 scaffolding of shaker type K<sup>+</sup> channels in smooth muscle cells regulates the diameter of cerebral arteries. *J Physiol* **589**, 5143-5152 (2011).

**Juo P., Kaplan JM.** The anaphase promoting complex regulates the abundance of GLR1 glutamate receptors in the ventral nerve cord of *C. elegans*. *Curr Biol* **14**, 2057-2062 (2004).

**Kaufmann SH., Ewing CM., ShapeR AH.** The erasable Western Blot. *Anal Biochem* **161**, 89-95 (1987).

**Kawaguchi Y.** Physiological subgroups of non-pyramidal cells with specific morphological characteristics in layer II/III of rat frontal cortex. *J Neurosci* **15**, 2638-2655 (1995).

**Keihan Falsafi S., Roßner S., Ghafari M., Groessl M., Morawski M., Gerner C., Lubec G.** Changes of several brain receptor complexes in the cerebral cortex of patients with Alzheimer disease: probable new potential pharmaceutical targets. *Amino Acids* **46**, 223-233 (2014).

**Kim JJ., Thompson RF.** Cerebellar circuits and synaptic mechanisms involved in classical eyeblink conditioning. *Trends Neurosci* **20**, 177-181 (1997).

**Kimura SH., Ikawa M., Ito A., Okabe M., Nojima H.** Cyclin G1 is involved in G2/M arrest in response to DNA damage and in growth control after damage recovery. *Oncogene* **20**, 3290-3300 (2001).

**Knobloch M., Mansuy IM.** Dendritic spine loss and synaptic alterations in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* **37**, 73-82 (2008).

**Koleske AJ.** Molecular mechanisms of dendrite stability. *Nat Rev Neurosci* **14**, 536-550 (2013).

**Kong M., Barnes EA., Ollendorff V., Donoghue DJ.** Cyclin F regulates de nuclear localization of cyclin B1 through a cyclin-cyclin interaction. *EMBO J* **19**, 1378-1388 (2000).

**Konishi Y., Stegmüller J., Matsuda T., Bonni S., Bonni A.** Cdh1-APC controls axonal growth and patterning in the mammalian brain. *Science* **303**, 1026-1030 (2004).

**Kornau HC., Schenker LT., Kennedy MB., Seeburg PH.** Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* **269**, 1737-1740 (1995).

**Kraft C., Herzog F., Gieffers C., Mechtler K., Hagting A., Pines J., Peters JM.** Mitotic regulation of the human anaphase promoting complex by phosphorylation. *EMBO J* **22**, 6598-6609 (2003).

**Kramer ER., Scheuringer N., Podtelejnikov AV., Mann M., Peters JM.** Mitotic regulation of the APC activator proteins Cdc20 and Cdh1. *Mol Biol Cell* **11**, 1555-1569 (2000).

**Kuczera T., Stilling RM., Hsia HE., Bahari-Javan S., Irniger S., Nasmyth K., Sananbenesi F., Fischer A.** The anaphase promoting complex is required for memory function in mice. *Learn Mem* **18**, 49-57 (2011).

**Kulkarni VA., Firestein BL.** The dendritic tree and brain disorders. *Mol Cell Neurosci* **50**, 10-20 (2012).

**Lam YW., Sherman SM.** Functional organization of the somatosensory cortical layer 6 feedback to the thalamus. *Cereb Cortex* **20**, 13-24 (2010).

**Laman H., Mann DJ., Jones NC.** Viral encoded cyclins. *Curr Opin Genet Dev* **10**, 70-74 (2000).

**Laoukili J., Alvarez-Fernandez M., Stahl M., Medema RH.** FoxM1 is degraded at mitotic exit in a Cdh1 dependent manner. *Cell Cycle* **7**, 2720-2726 (2008).

**Laoukili J., Stahl M., Medema RH.** FoxM1: At the crossroads of ageing and cancer. *Biochim Biophys Acta* **1775**, 92-102 (2007).

**Larsen DD., Wickersham IR., Callaway EM.** Retrograde tracing with recombinant rabies virus reveals correlations between projection targets and dendritic architecture in layer 5 of mouse barrel cortex. *Front Neural Circuits* **28**, 1-5 (2008).

**Ledergerber D., Larkum ME.** Properties of layer 6 pyramidal neuron apical dendrites. *J Neurosci* **30**, 13031-13044 (2010).

**Lein ES., Hawrylycz MJ., Ao N., Ayres M., Bensinger A., Bernard A., Boe AF., Boguski MS., Brockway KS., Byrnes EJ., Chen L., Chen L., Chen TM., Chin MC., Chong J., Crook BE., Czaplinska A., Dang CN., Datta S., Dee NR., Desaki AL., Desta T., Diep E., Dolbeare TA., Donelan MJ., Dong HW., Dougherty JG., Duncan BJ., Ebbert AJ., Eichele G., Estin LK., Faber C., Facer BA., Fields R., Fischer SR., Fliss TP., Frensley C., Gates SN., Glattfelder KJ., Halverson KR., Hart MR., Hohmann JG., Howell MP., Jeung DP., Johnson RA., Karr PT., Kawal R., Kidney JM., Knapik RH., Kuan CL., Lake JH., Laramée AR., Larsen KD., Lau C., Lemon TA., Liang AJ., Liu Y., Luong LT., Michaels J., Morgan JJ., Morgan RJ., Mortrud MT., Mosqueda NF., Ng LL., Ng R., Orta GJ., Overly CC., Pak TH., Parry SE., Pathak SD., Pearson OC., Puchalski RB., Riley ZL., Rockett HR., Rowland SA., Royall JJ., Ruiz MJ., Sarno NR., Schaffnit K., Shapovalova NV., Svisay T., Slaughterbeck CR., Smith SC., Smith KA., Smith BI., Sodt AJ., Stewart NN., Stumpf KR., Sunkin SM., Sutram M., Tam A., Teemer CD., Thaller C., Thompson CL., Varnam LR., Visel A., Whitlock RM., Wohnoutka PE., Wolkey CK., Wong VY., Wood M., Yaylaoglu MB., Young RC., Youngstrom BL., Yuan XF., Zhang B., Zwingman TA., Jones AR.** Genome wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* **445**, 168-176 (2007).

**Leverson JD., Joazeiro CA., Page AM., Huang H., Hieter P., Hunter T.** The Apc11 RING-H2 finger mediates E2-dependent ubiquitination. *Mol Biol Cell* **11**, 2315-2325 (2000).

**Li BS., Sun MK., Zhang L., Takahashi S., Ma W., Vinade L., Kulkarni AB., Brady RO., Pant HC.** Regulation of NMDA receptors by cyclin dependent kinase 5. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 12742-12747 (2001).

**Li M., Shin YH., Hou L., Huang X., Wei Z., Klann E., Zhang P.** The adaptor protein of the anaphase promoting complex Cdh1 is essential in maintaining replicative lifespan and in learning and memory. *Nat Cell Biol* **10**, 1083-1089 (2008).

**Li M., Zhang P.** The function of APC/C-Cdh1 in cell cycle and beyond. *Cell Div* **4**, 1-7 (2009).

**Li Y., Hu J., Höfer K., Wong AM., Cooper JD., Birnbaum SG., Hammer RE., Hofmann SL.** DHHC5 interacts with PDZ domain 3 of post synaptic density 95 (PSD-95) protein and plays a role in learning and memory. *J Biol Chem* **285**, 13022-13031 (2010).

**Liebl J., Fürst R., Vollmar AM., Zahler S.** Twice switched at birth: cell cycle independent roles of the neuron-specific cyclin dependent kinase 5 (Cdk5) in non-neuronal cells. *Cell Signal* **23**, 1698-1707 (2011).

**Lim S., Kaldis P.** Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development* **140**, 3079-3093 (2013).

**Lipkowitz S., Weissman AM.** RINGs of good and evil: RING finger ubiquitin ligases at the crossroads of tumour suppression and oncogenesis. *Nat Rev Cancer* **11**, 629-643 (2011).

**Littlepage LE., Ruderman JV.** Identification of a new APC/C recognition domain, the A-box, which is required for the Cdh1 dependent destruction of the kinase Aurora A during mitotic exit. *Genes Dev* **16**, 2274-2285 (2002).

**Llinas R., Welsh JP.** On the cerebellum and motor learning. *Curr Opin Neurobiol* **3**, 958-965 (1993).

**Lorente de Nó R.** Studies on the structure of the cerebral cortex II continuation of the study of the ammonic system. *J Psychol Neurol* **46**, 113-177 (1934).

**Lorente de Nó R.** Studies on the structure of the cerebral cortex. *J Psychol Neurol* **45**, 26-438 (1933).

**Lorente de Nó R.** The cerebral cortex of the mouse (a first contribution the "acoustic" cortex). *Somatosens Mot Res* **9**, 3-36 (1992).

**MacLachlan TK., Sang N., Giordano A.** Cyclins, cyclin dependent kinases and Cdk inhibitors: implications in cell cycle control and cancer. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **5**, 127-156 (1995).

**MacPhee DJ.** Methodological considerations for improving Western Blot analysis. *J Pharmacol Toxicol Methods* **61**, 171-177 (2010).

**Maestre C., Delgado-Esteban M., Gomez-Sanchez JC., Bolaños JP., Almeida A.** Cdk5 phosphorylates Cdh1 and modulates cyclin B1 stability in excitotoxicity. *EMBO J* **27**, 2736-2745 (2008).

**Mailand N., Diffley JF.** Cdks promote DNA replication origin licensing in human cells by protecting Cdc6 from APC/C dependent proteolysis. *Cell* **122**, 915-926 (2005).

**Malumbres M., Barbacid M.** Cell cycle, Cdks and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* **9**, 153-166 (2009).

**Malumbres M., Barbacid M.** Mammalian cyclin dependent kinases. *Trends Biochem Sci* **30**, 630-641 (2005).

**Malumbres M., Manges R., Ferrer N., Lu S., Pellicer A.** Isolation of high molecular weight DNA for reliable genotyping of transgenic mice. *Biotechniques* **22**, 1114-1119 (1997).

**Mann DM., Yates PO., Marcyniuk B.** Some morphometric observations on the cerebral cortex and hippocampus in presenile Alzheimer's disease, senile dementia of Alzheimer type and Down's syndrome in middle age. *J Neurol Sci* **69**, 139-159 (1985).

**Mansfeld J., Collin P., Collins MO., Choudhary JS., Pines J.** Apc15 drives the turnover of MCC-Cdc20 to make the spindle assembly checkpoint responsive to kinetochore attachment. *Nat Cell Biol* **13**, 1234-1243 (2011).

**Marani E., Voogd J.** The morphology of the mouse cerebellum. *Acta Morphol Neerl Scand* **17**, 33-52 (1979).

**Martin A., Odajima J., Hunt SL., Dubus P., Ortega S., Malumbres M., Barbacid M.** Cdk2 is dispensable for cell cycle inhibition and tumor suppression mediated by p27Kip1 and p21Cip1. *Cancer Cell* **7**, 591-598 (2005).

**Martinez A., Soriano E.** Functions of ephrin/Eph interactions in the development of the nervous system: emphasis on the hippocampal system. *Brain Res Rev* **49**, 211-226 (2005).

**Matsumura N., Nishijo H., Tamura R., Eifuku S., Endo S., Ono T.** Spatial and task dependent neuronal responses during real and virtual translocation in the monkey hippocampal formation. *J Neurosci* **19**, 2381-2393 (1999).

**Matyas F., Sreenivasan V., Marbach F., Wacogne C., Barsy B., Mateo C., Aronoff R., Petersen CC.** Motor control by sensory cortex. *Science* **330**, 1240-1243 (2010).

**Matzel LD., Han YR., Grossman H., Karnik MS., Patel D., Scott N., Specht SM., Gandhi CC.** Individual differences in the expression of a general learning ability in mice. *J Neurosci* **23**, 6423-6433 (2003).

**Mayford M., Bach ME., Huang YY., Wang L., Hawkins RD., Kandel ER.** Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene. *Science* **274**, 1678-1683 (1996).

- McCollum D., Gould KL.** Timing is everything: regulation of mitotic exit and cytokinesis by the men and sin. *Trends Cell Biol* **11**, 89-95 (2001).
- McKee AC., Kosik KS., Kennedy MB., Kowall NW.** Hippocampal neurons predisposed to neurofibrillary tangle formation are enriched in type II calcium-calmodulin-dependent protein kinase. *J Neuropathol Exp Neurol* **49**, 49-63 (1990).
- McLean JR., Chaix D., Ohi MD., Gould K.** State of the APC/C: organization, function and structure. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **46**, 118-136 (2011).
- Micel LN., Tentler JJ., Smith PG., Eckhardt GS.** Role of ubiquitin ligases and the proteasome in oncogenesis: novel targets for anticancer therapies. *J Clin Oncol* **31**, 1231-1238 (2013).
- Mikhailov A., Shinohara M., Rieder CL.** The p38 mediated stress activated checkpoint. A rapid response system for delaying progression through antephasis and entry into mitosis. *Cell Cycle* **4**, 57-62 (2005).
- Miller JJ., Summers MK., Hansen DV., Nachury MV., Lehman NL., Loktev A., Jackson PK.** Emi1 stably binds and inhibits the anaphase promoting complex/cyclosome as a pseudosubstrate inhibitor. *Genes Dev* **20**, 2410-2420 (2006).
- Minichiello L., Korte M., Wolfer D., Kühn R., Unsicker K., Cestari V., Rossi-Arnaud C., Lipp HP., Bonhoeffer T., Klein R.** Essential role for TrkB receptors in hippocampus mediated learning. *Neuron* **24**, 401-414 (1999).
- Mitchell BD., Macklis JD.** Large scale maintenance of dual projections by callosal and frontal cortical projection neurons in adult mice. *J Comp Neurol* **482**, 17-32 (2005).
- Mittnacht S., Boshoff C.** Viral cyclins. *Rev Med Virol* **10**, 175-184 (2000).
- Miyoshi G., Hjerling-Leffler J., Karayannis T., Sousa VH., Butt SJ., Battiste J., Johnson JE., Machold RP., Fishell G.** Genetic fate mapping reveals that the caudal ganglionic eminence produces a large and diverse population of superficial cortical interneurons. *J Neurosci* **30**, 1582-1594 (2010).
- Moga DE., Janseen W., Vissavajhala P., Czelusniak SM., Moran TM., Hof PR., Morrison JH.** Glutamate receptor subunit 3 (GluR3) immunoreactivity delineates a subpopulation of Parvalbumin containing interneurons in the rat hippocampus. *J Comp Neurol* **462**, 15-28 (2003).
- Molloy SS., Kennedy MB.** Autophosphorylation of type II Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent protein kinase in cultures of postnatal rat hippocampal slices. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 4756-4760 (1991).
- Moncada S., Higgs EA., Colombo SL.** Fulfilling the metabolic requirements for cell proliferation. *Biochem* **446**, 1-7 (2012).
- Morest DK., Morest RR.** Perfusion fixation of the brain with chrome osmium solutions for the rapid Golgi method. *Ann J Anat* **118**, 811-831 (1966).
- Moroni F., Lombardi G., Thomsen C., Leonardi P., Attucci S., Peruginelli F., Torregrossa SA., Pellegrini-Giampietro DE., Luneia R., Pellicciari R.** Pharmacological characterization of 1-aminoindan-1,5-dicarboxylic acid, a potent mGluR1 antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* **281**, 721-729 (1997).
- Morris RG., Garrud P., Rawlins JN., O'Keefe J.** Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* **297**, 681-683 (1982).
- Moser EI., Kropff E., Moser MB.** Place cells, grid cells, and the brain's spatial representation system. *Annu Rev Neurosci* **31**, 69-89 (2008).
- Mullen RJ., Buck CR., Smith AM.** NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* **116**, 201-211 (1992).

- Mullis KB.** Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin* **48**, 579-582 (1990).
- Murray A.** Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* **116**, 221-234 (2004).
- Musacchio A., Salmon ED.** The spindle assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 379-393 (2007).
- Nakayama KI., Nakayama K.** Regulation of the cell cycle by SCF type ubiquitin ligases. *Semin Cell Dev Biol* **16**, 323-333 (2005).
- Nakayama KI., Nakayama K.** Ubiquitin ligases: cell cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer* **6**, 369-381 (2006).
- Nebreda AR.** Cdk activation by non-cyclin proteins. *Curr Opin Cell Biol* **18**, 192-198 (2006).
- Neuhoff V., Arold N., Taube D., Ehrhardt W.** Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**, 255-262 (1988).
- Newman JD., Kenkel WM., Aronoff EC., Bock NA., Zametkin MR., Silva AC.** A combined histological and MRI brain atlas of the common marmoset monkey, *Callithrix jacchus*. *Brain Res Rev* **62**, 1-18 (2009).
- Nguyen TB., Manova K., Capodici P., Lindon C., Bottega S., Wang XY., Refik-Rogers J., Pines J., Wolgemuth DJ., Koff A.** Characterization and expression of mammalian cyclin B3, a prepachytene meiotic cyclin. *J Biol Chem* **277**, 41960-41969 (2002).
- Nicholson DW., Ali A., Thornberry NA., Vaillancourt JP., Ding CK., Gallant M., Gareau Y., Griffin PR., Labelle M., Lazebnik YA.** Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* **376**, 37-43 (1995).
- Niehrs C., Acebron SP.** Mitotic and mitogenic Wnt signalling. *EMBO J* **31**, 2705-2713 (2012).
- Nixon C., Chambers G., Ellsmore V., Campo MS., Burr P., Argyle DJ., Reid SW., Nasir L.** Expression of cell cycle associated proteins cyclin A, Cdk2, p27Kip1 and p53 in equine sarcoids. *Cancer Lett* **221**, 237-245 (2005).
- Okada T., Yamada N., Tsuzuki K., Horikawa HP., Tanaka K., Ozawa S.** Long term potentiation in the hippocampal CA1 area and dentate gyrus plays different roles in spatial learning. *Eur J Neurosci* **17**, 341-349 (2003).
- O'Keefe J., Dostrovsky J.** The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely moving rat. *Brain Res* **34**, 171-175 (1971).
- Okhotin VE.** Cytophysiology of spiny stellate cells in the striate cortex and their role in the excitatory mechanisms of intracortical synaptic circulation. *Neurosci Behav Physiol* **36**, 825-836 (2006).
- Olney JW.** Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* **164**, 719-721 (1969).
- Olton DS., Papas BC.** Spatial memory and hippocampal function. *Neuropsychologia* **17**, 669-682 (1979).
- Olton DS., Samuelson RJ.** Remembrance of places passed: spatial memory in rats. *J Exp Psychol Anim Behav Process* **2**, 97-116 (1976).
- Otal R., Burgaya F., Frisén J., Soriano E., Martínez A.** Ephrin A5 modulates the topographic mapping and connectivity of commissural axons in murine hippocampus. *Neuroscience* **141**, 109-121 (2006).



- Passmore LA., Booth CR., Vénien-Bryan C., Ludtke SJ., Fioretto C., Johnson LN., Chiu W., Barford D.** Structural analysis of the anaphase promoting complex reveals multiple active sites and insights into polyubiquitylation. *Mol Cell* **20**, 855-866 (2005).
- Passmore LA., McCormack EA., Au SW., Paul A., Willison KR., Harper JW., Barford D.** Doc1 mediates the activity of the anaphase promoting complex by contributing to substrate recognition. *EMBO J* **22**, 786-796 (2003).
- Pesin JA., Orr-Weaver TL.** Regulation of APC/C activators in mitosis and meiosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **24**, 475-499 (2008).
- Peters JM.** Subunits and substrates of the anaphase promoting complex. *Exp Cell Res* **248**, 339-349 (1999).
- Peters JM.** The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 644-656 (2006).
- Petralia RS., Wang YX., Mayat E., Wenthold RJ.** Glutamate receptor subunit 2 selective antibody shows a differential distribution of calcium impermeable AMPA receptors among populations of neurons. *J Comp Neurol* **385**, 456-476 (1997).
- Petreaanu L., Alvarez-Buylla A.** Maturation and death of adult born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *J Neurosci* **22**, 6106-6113 (2002).
- Pfleger CM., Kirschner MW.** The KEN-box: an APC recognition signal distinct from the D-box targeted by Cdh1. *Genes Dev* **14**, 655-665 (2000).
- Pfleger CM., Lee E., Kirschner MW.** Substrate recognition by the Cdc20 and Cdh1 components of the anaphase promoting complex. *Genes Dev* **15**, 2396-2407 (2001).
- Picciotto MR., Wickman K.** Using knockout and transgenic mice to study neurophysiology and behavior. *Physiol Rev* **78**, 1131-1163 (1998).
- Pick JE., Malumbres M., Klann E.** The E3 ligase APC/C-Cdh1 is required for associative fear memory and long-term potentiation in the amygdala of adult mice. *Learn Mem* **20**, 11-20 (2012).
- Pines J.** Cubism and the cell cycle: the many faces of the APC/C. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 427-438 (2011).
- Porteros A., Gómez C., Valero J., Calvo-Baltanás F., Alonso JR.** Chemical organization of the macaque monkey olfactory bulb III. Distribution of cholinergic markers. *J Comp Neurol* **501**, 854-865 (2007).
- Proctor CJ., Tsigotis M., Gray DA.** An in silico model of the ubiquitin proteasome system that incorporates normal homeostasis and age related decline. *BMC Syst Biol* **1**, 1-18 (2007).
- Provoda CJ., Waring MT., Buckley KM.** Evidence for a primary endocytic vesicle involved in synaptic vesicle biogenesis. *J Biol Chem* **275**, 7004-7012 (2000).
- Prut L., Belzung C.** The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* **463**, 3-33 (2003).
- Puchalski RB., Louis JC., Brose N., Traynelis SF., Egebjerg J., Kukekov V., Wenthold RJ., Rogers SW., Lin F., Moran T.** Selective RNA editing and subunit assembly of native glutamate receptors. *Neuron* **13**, 131-147 (1994).
- Quintana-Cabrera R., Fernandez-Fernandez S., Bobo-Jimenez V., Escobar J., Sastre J., Almeida A., Bolaños JP.**  $\gamma$ -Glutamylcysteine detoxifies reactive oxygen species by acting as glutathione peroxidase-1 cofactor. *Nat Commun* **3**, 1-8 (2012).
- Rakic P.** Specification of cerebral cortical areas. *Science* **241**, 170-176 (1988).
- Ramnani N.** The primate cortico-cerebellar system: anatomy and function. *Nat Rev Neurosci* **7**, 511-522 (2006).

**Rieder CL., Khodjakov A.** Mitosis and checkpoints that control progression through mitosis in vertebrate somatic cells. *Prog Cell Cycle Res* **3**, 301-312 (1997).

**Rodriguez-Rodriguez P., Fernandez E., Almeida A., Bolaños JP.** Excitotoxic stimulus stabilizes PFKFB3 causing pentose phosphate pathway to glycolysis switch and neurodegeneration. *Cell Death Differ* **19**, 1582-1589 (2012).

**Rose M.** Cytoarchitektonischer atlas der groszhirnrinde der maus. *J Psychol Neurol* **40**, 1-51 (1929).

**Rosenzweig S., Wojtowicz JM.** Analyzing dendritic growth in a population of immature neurons in the adult dentate gyrus using laminar quantification of disjointed dendrites. *Front Neurosci* **5**, 1-8 (2011).

**Sadasivam S., DeCaprio JA.** The DREAM complex: master coordinator of cell cycle dependent gene expression. *Nat Rev Cancer* **13**, 585-595 (2013).

**Sakurai O., Kosaka T.** Non-principal neurons and CA2 pyramidal cells, but not mossy cells are immunoreactive for calcitonin gene related peptide in the mouse hippocampus. *Brain Res* **1186**, 129-143 (2007).

**Santos-Torres J., Heredia M., Riobobos AS., Jiménez-Díaz L., Gómez-Bautista V., de la Fuente A., Criado JM., Navarro-López J., Yajeya J.** Electrophysiological and synaptic characterization of transplanted neurons in adult rat motor cortex. *J Neurotrauma* **26**, 1593-1607 (2009).

**Schneider C., King RM., Philipson L.** Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells. *Cell* **54**, 787-793 (1988).

**Schreiber A., Stengel F., Zhang Z., Enchev RI., Kong EH., Morris EP., Robinson CV., da Fonseca PC., Barford D.** Structural basis for the subunit assembly of the anaphase promoting complex. *Nature* **470**, 227-232 (2011).

**Scoville WB., Milner B.** Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **20**, 11-21 (1957).

**Seeburg PH.** The TINS/TIPS Lecture. The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Neurosci* **16**, 359-365 (1993).

**Sehara K., Toda T., Iwai L., Wakimoto M., Tanno K., Matsubayashi Y., Kawasaki H.** Whisker related axonal patterns and plasticity of layer 2/3 neurons in the mouse barrel cortex. *J Neurosci* **30**, 3082-3092 (2010).

**Sharma S., Rakoczy S., Brown-Borg H.** Assessment of spatial memory in mice. *Life Sci* **87**, 521-536 (2010).

**Shiloh Y.** ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* **3**, 155-168 (2003).

**Shiloh Y., Ziv Y.** The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**, 197-210 (2013).

**Silva P., Barbosa J., Nascimento AV., Faria J., Reis R., Bousbaa H.** Monitoring the fidelity of mitotic chromosome segregation by the spindle assembly checkpoint. *Cell Prolif* **44**, 391-400 (2011).

**Skaar JR., Pagano M.** Cdh1: a master G0/G1 regulator. *Nat Cell Biol* **10**, 755-757 (2008).

**Slomianka L., Geneser FA.** Distribution of acetylcholinesterase in the hippocampal region of the mouse: II. Subiculum and hippocampus. *J Comp Neurol* **312**, 525-536 (1991).

**Smith DM., Mizumori SJ.** Hippocampal place cells, context, and episodic memory. *Hippocampus* **16**, 716-729 (2006).

- Smith PK., Krohn RI., Hermanson GT., Mallia AK., Gartner FH., Provenzano MD., Fujimoto EK., Goeke NM., Olson BJ., Klenk DC.** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**, 76-85 (1985).
- Somogyi P., Takagi H.** A note on the use of picric acid paraformaldehyde glutaraldehyde fixative for correlated light and electron microscopic immunocytochemistry. *Neuroscience* **7**, 1779-1783 (1982).
- Song L., Rape M.** Substrate specific regulation of ubiquitination by the anaphase promoting complex. *Cell Cycle* **10**, 52-56 (2011).
- Soriano E., del Río JA.** The cells of Cajal-Retzius: still a mystery one century after. *Neuron* **46**, 389-394 (2005).
- Sotelo C.** Camillo Golgi and Santiago Ramon y Cajal: the anatomical organization of the cortex of the cerebellum. Can the neuron doctrine still support our actual knowledge on the cerebellar structural arrangement? *Brain Res Rev* **66**, 16-34 (2010).
- Stanfield BB., Cowan WM.** An EM autoradiographic study of the hypothalamo-hippocampal projection. *Brain Res* **309**, 299-307 (1984).
- Stanford SC.** The open field test: reinventing the wheel. *J Psychopharmacol* **21**, 134-135 (2007).
- Stemmann O., Gorr IH., Boos D.** Anaphase topsy-turvy: Cdk1 a securin, separase a CKI. *Cell Cycle* **5**, 11-13 (2006).
- Steuber V., Jaeger D.** Modeling the generation of output by the cerebellar nuclei. *Neural Netw* **47**, 112-119 (2013).
- Sullivan M., Morgan DO.** Finishing mitosis, one step at a time. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 894-903 (2007).
- Sun L., Shi L., Li W., Yu W., Liang J., Zhang H., Yang X., Wang Y., Li R., Yao X., Yi X., Shang Y.** JFK, a Kelch domain containing F-box protein, links the SCF complex to p53 regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 10195-10200 (2009).
- Takamori S., Rhee JS., Rosenmund C., Jahn R.** Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature* **407**, 189-194 (2000).
- Takasaki C., Yamasaki M., Uchigashima M., Konno K., Yanagawa Y., Watanabe M.** Cytochemical and cytological properties of perineuronal oligodendrocytes in the mouse cortex. *Eur J Neurosci* **32**, 1326-1336 (2010).
- Takeda H., Tsuji M., Matsumiya T.** Changes in head dipping behavior in the hole board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. *Eur J Pharmacol* **350**, 21-29 (1998).
- Tang FR., Chia SC., Jiang FL., Ma DL., Chen PM., Tang YC.** Calcium binding protein containing neurons in the gliotic mouse hippocampus with special reference to their afferents from the medial septum and the entorhinal cortex. *Neuroscience* **140**, 1467-1479 (2006).
- Tang Z., Li B., Bharadwaj R., Zhu H., Ozkan E., Hakala K., Deisenhofer J., Yu H.** Apc2 cullin protein and Apc11 RING protein comprise the minimal ubiquitin ligase module of the anaphase promoting complex. *Mol Biol Cell* **12**, 3839-3851 (2001).
- Tay YM., Tam WL., Ang YS., Gaughwin PM., Yang H., Wang W., Liu R., George J., Ng HH., Perera RJ., Lufkin T., Rigoutsos I., Thomson AM., Lim B.** MicroRNA-134 modulates the differentiation of mouse embryonic stem cells, where it causes posttranscriptional attenuation of Nanog and LRH1. *Stem Cells* **26**, 17-29 (2008).
- Teixeira LK., Reed SI.** Ubiquitin ligases and cell cycle control. *Annu Rev Biochem* **82**, 14.1-14.28 (2013).

**Terry RD., Masliah E., Salmon DP., Butters N., DeTeresa R., Hill R., Hansen LA., Katzman R.** Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* **30**, 572-580 (1991).

**Thach WT.** A role for the cerebellum in learning movement coordination. *Neurobiol Learn Mem* **70**, 177-188 (1998).

**Thach WT.** Does the cerebellum initiate movement?. *Cerebellum* **12**, 1-9 (2013).

**Theyel BB., Llano DA., Sherman SM.** The corticothalamocortical circuit drives higher-order cortex in the mouse. *Nat Neurosci* **13**, 84-88 (2010).

**Thiagarajan TC, Lindskog M, Tsien RW.** Adaptation to synaptic inactivity in hippocampal neurons. *Neuron* **47**, 725-737 (2005).

**Thompson PM., Hayashi KM., De Zubicaray GI., Janke AL., Rose SE., Semple J., Hong MS., Herman DH., Gravano D., Doddrell DM., Toga AW.** Mapping hippocampal and ventricular change in Alzheimer disease. *Neuroimage* **22**, 1754-1766 (2004).

**Thompson PM., Mega MS., Woods RP., Zoumalan CI., Lindshield CJ., Blanton RE., Moussai J., Holmes CJ., Cummings JL., Toga AW.** Cortical change in Alzheimer's disease detected with a disease specific population based brain atlas. *Cereb Cortex* **11**, 1-16 (2001).

**Thornton BR., Toczyski DP.** Precise destruction: an emerging picture of the APC. *Genes Dev* **20**, 3069-3078 (2006).

**Toda K., Naito K., Mase S., Ueno M., Uritani M., Yamamoto A., Ushimaru T.** APC/Cdh1 dependent anaphase and telophase progression during mitotic slippage. *Cell Div* **7**, 1-15 (2012).

**Towbin H., Staehelin T., Gordon J.** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**, 4350-4354 (1979).

**Tsien JZ., Chen DF., Gerber D., Tom C., Mercer EH., Anderson DJ., Mayford M., Kandel ER., Tonegawa S.** Subregion and cell type restricted gene knockout in mouse brain. *Cell* **87**, 1317-1326 (1996).

**Ullah Z., Lee CY., DePamphilis ML.** Cip/Kip cyclin dependent protein kinase inhibitors and the road to polyploidy. *Cell Div* **4**, 1-15 (2009).

**Valero J., Berciano MT., Weruaga E., Lafarga M., Alonso JR.** 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 (2006).

**Valero J., Weruaga E., Murias AR., Recio JS., Curto GG., Gómez C., Alonso JR.** Changes in cell migration and survival in the olfactory bulb of the pcd/pcd mouse. *Dev Neurobiol* **67**, 839-859 (2007).

**van de Pavert SA., Olivier BJ., Goverse G., Vondenhoff MF., Greuter M., Beke P., Kusser K., Höpken UE., Lipp M., Niederreither K., Blomhoff R., Sitnik K., Agace WW., Randall TD., de Jonge WJ., Mebius RE.** Chemokine CXCL13 is essential for lymph node initiation and is induced by retinoic acid and neuronal stimulation. *Nat Immunol* **10**, 1193-1199 (2009).

**van Leuken R., Clijsters L., van Zon W., Lim D., Yao X., Wolthuis RM., Yaffe MB., Medema RH., van Vugt MA.** Polo-like kinase 1 controls Aurora A destruction by activating APC/C-Cdh1. *PLoS One* **4**, 1-12 (2009).

**van Leuken R., Clijsters L., Wolthuis R.** To cell cycle, swing the APC/C. *Biochim Biophys Acta* **1786**, 49-59 (2008).

**van Pelt J., Dityatev AE., Uylings HB.** Natural variability in the number of dendritic segments: model based inferences about branching during neurite outgrowth. *J Comp Neurol* **387**, 325-340 (1997).

- van Roessel P., Elliott DA., Robinson IM., Prokop A., Brand AH.** Independent regulation of synaptic size and activity by the anaphase promoting complex. *Cell* **119**, 707-718 (2004).
- van Vugt MA., Yaffe MB.** Cell cycle re-entry mechanisms after DNA damage checkpoints: giving it some gas to shut off the breaks! *Cell Cycle* **9**, 2097-2101 (2010).
- van Zon W., Wolthuis RM.** Cyclin A and Nek2A: APC/C–Cdc20 substrates invisible to the mitotic spindle checkpoint. *Biochem Soc Trans* **38**, 72-77 (2010).
- VanElzakker M., Fevurly RD., Breindel T., Spencer RL.** Environmental novelty is associated with a selective increase in Fos expression in the output elements of the hippocampal formation and the perirhinal cortex. *Learn Mem* **15**, 899-908 (2008).
- Visintin R., Prinz S., Amon A.** Cdc20 and Cdh1: a family of substrate specific activators of APC dependent proteolysis. *Science* **278**, 460-463 (1997).
- Vodermaier HC.** APC/C and SCF: controlling each other and the cell cycle. *Curr Biol* **14**, R787-R796 (2004).
- Vodermaier HC., Gieffers C., Maurer-Stroh S., Eisenhaber F., Peters JM.** TPR subunits of the anaphase promoting complex mediate binding to the activator protein Cdh1. *Curr Biol* **13**, 1459-1468 (2003).
- Wahlsten D., Andison M.** Patterns of cerebellar foliation in recombinant inbred mice. *Brain Res* **557**, 184-189 (1991).
- Walshe FM.** Karl S. Lashley. *Neurology* **8**, 870-879 (1958).
- Wang J., Dye BT., Rajashankar KR., Kurinov I., Schulman BA.** Insights into anaphase promoting complex TPR subdomain assembly from a Cdc26-Apc6 structure. *Nat Struct Mol Biol* **16**, 987-989 (2009).
- Wang Q., Su L., Liu N., Zhang L., Xu W., Fang H.** Cyclin dependent kinase 1 inhibitors: a review of recent progress. *Curr Med Chem* **18**, 2025-2043 (2011).
- Wang Y., Qin ZH.** Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. *Apoptosis* **15**, 1382-1402 (2010).
- Wasserman EA., Jensen DD.** Olfactory stimuli and the pseudo-extinction effect. *Science* **166**, 1307-1309 (1969).
- Watakabe A., Ichinohe N., Ohsawa S., Hashikawa T., Komatsu Y., Rockland KS., Yamamori T.** Comparative analysis of layer specific genes in mammalian neocortex. *Cereb Cortex* **17**, 1918-1933 (2007).
- Weihe E.** Neurochemical anatomy of the mammalian spinal cord: functional implications. *Ann Anat* **174**, 89-118 (1992).
- Wenthold RJ., Petralia RS., Blahos J., Niedzielski AS.** Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons. *J Neurosci* **16**, 1982-1989 (1996).
- Wenthold RJ., Yokotani N., Doi K., Wada K.** Immunochemical characterization of the non-NMDA glutamate receptor using subunit specific antibodies. Evidence for a heterooligomeric structure in rat brain. *J Biol Chem* **267**, 501-507 (1992).
- Weruaga-Prieto E., Egli P., Celio MR.** Topographic variations in rat brain oligodendrocyte morphology elucidated by injection of Lucifer Yellow in fixed tissue slices. *J Neurocytol* **25**, 19-31 (1996).
- White EL., Benshalom G., Hersch SM.** Thalamocortical and other synapses involving non-spiny multipolar cells of mouse Sml cortex. *J Comp Neurol* **229**, 311-320 (1984).
- Whitehurst AW., Ram R., Shivakumar L., Gao B., Minna JD., White MA.** The RASSF1A tumor suppressor restrains anaphase promoting complex/cyclosome activity during

the G1/S phase transition to promote cell cycle progression in human epithelial cells. *Mol Cell Biol* **28**, 3190-3197 (2008).

**Wiedenmann B., Franke WW.** Identification and localization of Synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell* **41**, 1017-1028 (1985).

**Witter MP.** Connections of the subiculum of the rat: topography in relation to columnar and laminar organization. *Behav Brain Res* **174**, 251-264 (2006).

**Witter MP.** Intrinsic and extrinsic wiring of CA3: indications for connectional heterogeneity. *Learn Mem* **14**, 705-713 (2007).

**Witter MP., Groenewegen HJ., Lopes da Silva FH., Lohman AH.** Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal region. *Prog Neurobiol* **33**, 161-253 (1989).

**Wolf HK., Buslei R., Schmidt-Kastner R., Schmidt-Kastner PK., Pietsch T., Wiestler OD., Blümcke I.** NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology. *J Histochem Cytochem* **44**, 1167-1171 (1996).

**Yamano H., Tsurumi C., Gannon J., Hunt T.** The role of the destruction box and its neighbouring lysine residues in cyclin B for anaphase ubiquitindependent proteolysis in fission yeast: defining the D-box receptor. *EMBO J* **17**, 5670-5678 (1998).

**Yang Y., Kim AH., Bonni A.** The dynamic ubiquitin ligase duo: Cdh1-APC and Cdc20-APC regulate neuronal morphogenesis and connectivity. *Curr Opin Neurobiol* **20**, 92-99 (2010).

**Zhang JX., Chen XQ., Du JZ., Chen QM., Zhu CY.** Neonatal exposure to intermittent hypoxia enhances mice performance in water maze and 8 arm radial maze tasks. *J Neurobiol* **65**, 72-84 (2005).

**Zhang ZW., Deschênes M.** Intracortical axonal projections of lamina VI cells of the primary somatosensory cortex in the rat: a single cell labeling study. *J Neurosci* **17**, 6365-6379 (1997).

**Zheng L., Roeder RG., Luo Y.** S phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key component. *Cell* **114**, 255-266 (2003).

**Zhou L., Gall D., Qu Y., Prigogine C., Cheron G., Tissir F., Schiffmann SN., Goffinet AM.** Maturation of neocortex isole in vivo in mice. *J Neurosci* **30**, 7928-7939 (2010).

## 2. Libros

**Bear M., Connors B., Paradiso M.** Neurociencia: Explorando el cerebro. *Masson* **1ª edición**, 662 páginas (1998).

**Gutierrez Rivas E.** Manual de electromiografía clínica. *Ergon* **2ª edición**, 467 páginas (2007).

**Guy A., Pearse E.** Histochemistry, theoretical and applied, Volumen 1. *Little Brown* **1ª edición**, 1518 páginas (1968).

**Jackson IJ., Abbott CM.** Mouse genetics and transgenics: a practical approach. *Oxford University Press* **1ª edición**, 299 páginas (2000).

**Kandel E., Schwartz J., Jessell T.** Principios de Neurociencia. *McGraw-Hill Interamericana* **4ª edición**, 1400 páginas (2001).

**Lieberman DA.** Human learning and memory. *Cambridge University Press* **1ª edición**, 604 páginas (2011).

**Martoja R., Martoja-Pierson M., Grumbles LC.** Técnicas de histología animal. *Toray-Masson* **1ª edición**, 350 páginas (1970).

**Moore C.** Introduction to Western Blotting. *AbD Serotec* **1ª edición**, 50 páginas (2009).

**Netter FH.** Atlas de anatomía humana. *Masson* **4ª edición**, 640 páginas (2007).

**Paxinos G., Franklin K.** The mouse brain in stereotaxic coordinates. *Gulf Professional Publishing* **2ª edición**, 100 páginas (2004).

**Watson C., Paxinos G., Puelles L.** The mouse nervous system. *Academic Press* **1ª edición**, 814 páginas (2011).

### **3. Referencias electrónicas**

<http://anatomie.vetmed.ini-leipzig.de>

<http://asus.usal.es>

<http://chronopause.com>

<http://m.clincancerres.aacrjournals.org> - CCR molecular pathways

<http://www.biochemsoctrans.org>

<http://www.bioscirep.org>

<http://www.cdc.gov>

<http://www.cellsignal.com>

<http://www.hersill.com>

<http://www.jax.org>

<http://www.western-blot.us>