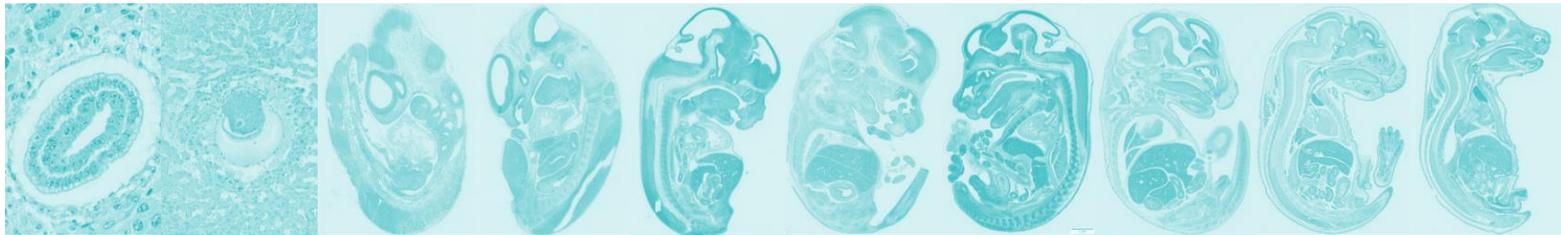


IMPLICACIÓN DE LA CASPASA 8 EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO



Imágenes de Emouseatlas



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Isabel María Alonso Bellido

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



TRABAJO FIN DE GRADO

JUNIO 2017

IMPLICACIÓN DE LA CASPASA 8 EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO

Sevilla, junio 2017

Autora: Isabel M^a Alonso Bellido

Tutora: Rocío Ruíz Laza

ÍNDICE

LISTADO DE ABREVIATURAS	p á g . 4
RESUMEN	p á g . 5
OBJETIVOS DEL TRABAJO	p á g . 6
INTRODUCCIÓN	p á g . 7
• Apoptosis	
• Función apoptótica de las caspasas	
• Caspasas: estructura	
• Caspasas: clasificación	
• Caspasa 8	
• Activación de la apoptosis	
• Estudios en “knockout”	
METODOLOGÍA	p á g . 17
• Animales experimentales	
• Toma de muestras	
• Inmunohistoquímica	
• PCR-genotipado de embriones	
• Extracción ADN-ARN-proteínas	
• Separación de fases	
• Extracción de ARN	
• Extracción de ADN	
• Extracción de proteínas	
• Retrotranscripción	

- **PCR cuantitativa**

RESULTADOS Y DISCUSIÓN **p á g . 2 8**

CONCLUSIONES **p á g . 3 5**

BIBLIOGRAFÍA **p á g . 3 6**

LISTADO DE ABREVIATURAS

B c l - 2 (Linfoma de célula B)	i N O S (Óxido nítrico sintasa inducible)
B S A (Albúmina de suero bovino)	K O (“ <i>Knock-out</i> ”, delecionado)
C D 9 5 (Cluster de diferenciación 95)	N F - k B (Factor nuclear kB)
C D 9 5 L (Ligando de CD95)	P B S (Tampón fosfato salino)
c D N A (ADN complementario)	P C R (Reacción en cadena de la polimerasa)
A D N g (ADN genómico)	q P C R (Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa)
A D N g (ADN genómico)	R I P 1 (Receptor de interacción de la proteína 1)
c F L I P (Inhibidor celular proteico de FLICE)	R I P 3 (Receptor de interacción de la proteína 3)
D C X (Doblecortina)	R I P K 1 (Quinasa de RIP1)
D D (Dominio de muerte)	R I P K 3 (Quinasa de RIP3)
D E D (Dominio efector de muerte)	T R A D D (Dominio de muerte asociado al receptor de necrosis tumoral)
D R (Receptor de muerte)	T R A F s (Factor asociado al receptor de necrosis tumoral)
D I S C (Complejo de señalización de la muerte inducida)	T N F α (Factor de necrosis tumoral α)
F A D D (Dominio de muerte asociado a Fas)	
F a s L (Ligando de Fas)	
G A P D H (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa)	

RESUMEN

Caspase8 “knock out” - Embryo development- Dual role

La apoptosis o muerte celular inducida es un proceso de muerte fisiológica implicado en numerosos eventos relacionados con el desarrollo, la homeostasis de tejidos, la educación de células, e incluso el envejecimiento.

Juega un papel tan esencial en el organismo que un desequilibrio positivo podría desencadenar cáncer o manifestarse como una enfermedad autoinmune, mientras que un desequilibrio negativo podría suponer inmunodeficiencia y degeneración.

Por ello, es de especial interés ahondar en el análisis de las moléculas implicadas en tan importante proceso, en nuestro caso estudiaremos la caspasa 8, una proteína de la familia de las cisteín-aspartato-proteasas encargada de iniciar la cascada inducida por receptores de muerte que desencadena la apoptosis.

A pesar de que primordialmente se ha asociado a la caspasa 8 con procesos pro-apoptóticos, recientes estudios de experimentación *in vivo* con ratones *knock-out* han hallado que la supresión de esta proteasa supone la inhibición de la apoptosis y la activación de la necroptosis, un proceso de muerte celular patológica relacionada con una extensa reacción inmunogénica y consecuentemente inflamatoria.

Todo ello no hace más que defender la existencia de una dualidad de funciones de la caspasa 8, la ya conocida pro-apoptótica y la pro-supervivencia.

Es por ello, que, aunque primordialmente se ha asociado con la muerte, ahora queremos demostrar que desempeña un importante papel en el desarrollo embrionario, caracterizado por un fuerte proceso de formación y destrucción celular.

En concreto, estudiaremos la implicación de dicha proteasa en el desarrollo, mediante el empleo de embriones deficientes para dicha caspasa y se compararán con controles con el fin de estudiar el impacto que tiene la delección de dicha proteasa.

OBJETIVOS DEL TRABAJO

El objetivo principal del presente estudio, no es más que analizar la implicación de la caspasa 8 en el desarrollo embrionario.

Para alcanzarlo, nos valemos de ciertos objetivos específicos tales como:

- I. Estudio de la localización mediante análisis histológico de Caspasa 8 en el embrión en desarrollo.
- II. Detección de la variabilidad de los diversos componentes celulares en ausencia de Caspasa 8.

INTRODUCCIÓN

APOPTOSIS

Bajo condiciones de estrés, las células mueren por apoptosis o necroptosis dependiendo de la vía de activación que se desencadene, lo cual, dependerá a su vez, de las moléculas implicadas en dichos procesos (*Belizário et al., 2015*).

La apoptosis es un proceso de muerte celular fisiológica, que conlleva un proceso inflamatorio moderado. Sin embargo, la necroptosis es un evento patológico, inherentemente inmunogénico y que desencadena una reacción de inflamación intensa (*Galluzzi et al., 2012*).

Apoptosis es un término que deriva de una palabra griega, la cual significa caerse y fue acuñada por primera vez por *Kerr et al., 1992* para describir una manifestación morfológica de desaparición celular. Es un evento que juega un papel esencial en diversos procesos fisiológicos asociados al desarrollo, la homeostasis de tejidos, la educación de las células inmunes, así como al envejecimiento (*Rojas et al., 2009*).

Cuando la gravedad del daño es tal que la célula es incapaz de repararse, es cuando se activa la maquinaria apoptótica siendo destacable las numerosas evidencias que indican que una apoptosis insuficiente puede desencadenar cáncer o manifestarse como una enfermedad autoinmune. Por el contrario, una muerte acelerada supondría inmunodeficiencia y degeneración (*Rojas et al., 2009*).

Es por ello que tiene especial interés en nuestro caso, el estudio de la apoptosis en la embriogénesis, caracterizado por un poderoso recambio celular, y, por consiguiente, un equilibrio entre formación y muerte.

Los elementos claves en el proceso de apoptosis son:

- La familia de proteínas Bcl-2.
- Las caspasas.
- La proteína Apaf-1, la cual se encarga de comunicar la señal de apoptosis desde las proteínas de la familia Bcl-2 a las caspasas.

La activación bioquímica de dichos componentes desencadena la muerte de la célula de forma irreversible.

FUNCIÓN APOPTÓTICA DE LAS CASPASAS

Centrándonos en las caspasas, son unas enzimas pertenecientes a la familia de las cisteín-aspartato-proteasas, implicadas, como hemos mencionado, en los procesos de muerte celular inducida o apoptosis (**Oberst y Green, 2013**).

Estas proteasas son responsables de los cambios morfológicos, incluyendo el daño mitocondrial, la ruptura de la membrana nuclear, la fragmentación del ADN, la condensación de la cromatina y la formación de los cuerpos apoptóticos. Los eventos de degradación proteolítica son irreversibles y conllevan la muerte de la célula (**Rojas et al., 2009**).

Sin embargo, aunque primordialmente se las ha relacionado con funciones de muerte, algunas de ellas desarrollan papeles relacionadas con la regulación de la inmunidad, la diferenciación celular y la determinación del destino de la célula (**Kavanagh et al., 2015**). Es por ello, que resulta interesante analizar esa dualidad funcional, si bien, comenzaremos estudiando con cierta profundidad qué son estas enzimas.

CASPASAS: ESTRUCTURA

Las caspasas son sintetizadas como zimógenos o precursores inactivos, también denominados pro-caspasas, precursores que al recibir una señal pro-apoptótica, entran en apoptosis y solo entonces es cuando el pro-enzima es convertido a enzima activa por proteólisis. Dicha catálisis puede ser mediada por otra proteasa o por autocatálisis dependiendo de la naturaleza de la caspasa en cuestión (**Kidd, 1998**).

Dichos pro-enzimas contienen tres dominios (Figura 1):

- Dominio N-terminal implicado en la regulación de la activación.
- Prodominio grande o p20 (20kDa).
- Prodominio pequeño o p10 (10kDa).

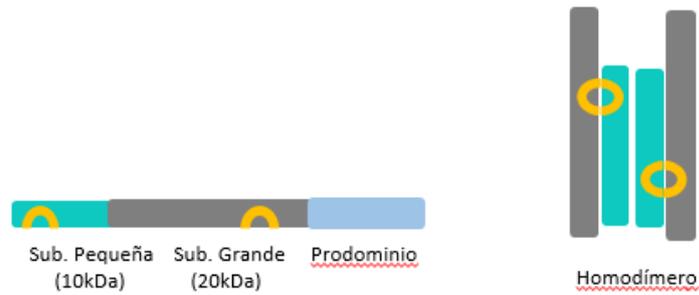


Figura 1. Estructura y dimerización de las caspasas.

La activación implica su proteólisis por residuos de aspartato existentes entre dominios. Tras la escisión, las subunidades grande y pequeña se asocian formando un heterodímero. A su vez, dos heterodímeros se unen para formar un tetrámero con dos sitios catalíticos independientes, lo que contribuye a la unión del sustrato y a su catálisis.

Presentan una especificidad absoluta para cortar exactamente tras residuos de aspartato, de ahí a su denominación. El corte de proteínas llevado a cabo por las caspasas no solo es específico, sino que es también altamente eficiente (*Elinos-Báez et al., 2001*).

CASPASAS: CLASIFICACIÓN

Actualmente se conocen más de catorce caspasas, de ellas, las caspasas 2, 3, 6, 7, 8, 9 y 10 están implicadas en la regulación y ejecución de la apoptosis.

Pueden ser clasificadas por su especificidad o semejanza en la secuencia de aminoácidos, pero la manera más útil de dividir las es desde el punto de vista funcional (*Rojas et al., 2009*).

En la apoptosis las caspasas pueden actuar como efectores, en el desensamblaje de la célula, o como iniciadores activando a los elementos efectores en respuesta a estímulos proapoptóticos. En resumidas cuentas, se dividen en dos grupos: las iniciadoras y las ejecutoras.

Las caspasas iniciadoras son capaces de realizar autoproteólisis, lo que conlleva su transformación de zimógeno a enzima activa.

Sin embargo, las caspasas efectoras deben ser activadas mediante un corte específico mediado por las caspasas iniciadoras (*Elinos-Báez et al., 2001*).

Para poder explicar la capacidad de autoproteólisis se debe tener en cuenta la estructura, la cual permite su clasificación mediante técnica cristalográfica de Rayos X. De tal manera, podemos distinguir las de Clase I, las cuales poseen un prodominio N-terminal grande; es el caso de las procaspasas 1,2,8,9 y 10. Por el contrario las procaspasas 3, 6 y 7, pertenecen a la Clase II, presentando un prodominio N-terminal pequeño **(Cryns y Yuan J, 1998)**.

La diferencia de los prodominios N-terminal, reside en que, los de Clase I contienen dominios de interacción proteína-proteína que propician la formación de complejos homodiméricos. Dichos complejos están formados por tetrámeros de dos subunidades grandes y dos pequeñas, lo que permite su autoproteólisis y con ello, su autoactivación. Sin embargo, las de Clase II no tienen capacidad autocatalítica, debiendo ser activadas por las de Clase I **(Elinos-Báez et al., 2001)**.

CASPASA 8

La caspasa 8 se ha relacionado siempre con la función pro-apoptótica, como mediadora de la vía extrínseca de activación **(Salvesen y Walsh., 2014)**. Dicha vía está mediada por la unión de un ligando de muerte (FasL) a un receptor de membrana (Fas) lo que conlleva su activación. **(Rojas et al., 2009; Fricker et al., 2013)**.

Sin embargo, la experimentación *in vivo* con ratones *knock-out*, supuso la muerte embrionaria. La explicación más razonable a este descubrimiento fue suponer que la caspasa 8 desempeña una doble función: pro-apoptótica y pro-supervivencia. Es por ello que hoy en día se relaciona no solo con la muerte celular sino también con el desarrollo embrionario y la proliferación de células inmunes.

El mecanismo por el cual se relaciona la caspasa 8 con la función pro-supervivencia es la escisión de RIPK 1 y RIPK 3, quinasas implicadas en una forma alternativa de muerte celular, la necroptosis. La escisión de dichas quinasas se produce mediante la formación del heterodímero caspasa 8 – c-FLIP, lo que se traduce en la inhibición de dicha vía de muerte **(Salvesen y Walsh., 2014)**.

El término necroptosis hace referencia a la muerte celular no regulada, no específica y que conlleva una intensa reacción de inflamación, por todo ello, es considerado como un proceso patológico **(Galluzi et al., 2015)**.

Esa supresión de la necroptosis, pone en manifiesto la función de supervivencia de la caspasa 8 anteriormente citada. En consecuencia, su inhibición, su ausencia supondría la reducción de la producción hematopoyética, lo que demuestra su relación en la promoción del crecimiento celular, así como la mayor necroptosis de la microglía activada (**Kavanagh et al., 2015**).

Es por todo ello, que se considera que la caspasa 8 puede ejercer un papel neuroprotector al fin y al cabo (**Salvesen y Walsh., 2014**).

ACTIVACIÓN DE LA APOPTOSIS

Para entender los roles de pro-apoptosis y pro-supervivencia es necesario comprender los mecanismos de activación. Todas las caspasas son homodímeros en su forma activa. Los dos monómeros son requeridos para establecer las interacciones que estabilizan el sitio catalítico, lo que significa que cada caspasa tiene dos sitios activos, una por monómero (**Salvesen y Walsh., 2014**).

Existen dos cascadas o vías de activación de la apoptosis, fundamentales en la regulación de dicho proceso (**Elinos-Báez et al., 2001**):

- Activación a través de receptores de membrana (Receptores de muerte).

Dichos factores actúan a través de los receptores de membrana celular. La unión con su ligando específico desencadena la formación de un complejo de iniciación de señalización de muerte (DISC, complejo de señalización de la muerte inducida), el cual genera una señal que provoca el reclutamiento de las caspasas iniciadoras.

- Cambios en la integridad y consecuente activación de la vía mitocondrial por daño al citosol o núcleo, mediante la integración de señales intra y extracelulares que inician la apoptosis.

A continuación, vamos a centrarnos en la vía de los receptores de muerte (DR).

Las células sufren apoptosis en respuesta a reacciones intrínsecas o extrínsecas, dependiendo de la activación de según qué proteínas implicadas, las cuales pueden ser anti-apoptóticas o pro-apoptóticas (**Wilson et al., 2009**).

En nuestro caso, el estudio de la caspasa 8 implica el análisis de la vía en la que está implicada: la vía extrínseca. Está mediada por los receptores transmembranas denominados también receptores de muerte (DR). Son una familia de proteínas transmembrana perteneciente a la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF). A ella pertenecen Fas (CD95), TNFR1, DR-3 y los receptores TRAIL (DR-4 y DR-5) (Rojas et al., 2009).

Éstos, se caracterizan por poseer en su dominio intracelular una secuencia conocida como dominio de muerte (DD), necesario para la unión a proteínas adaptadoras (FADD, dominio de muerte asociado a Fas), y como consecuencia, para la transducción de la señal de muerte celular.

La activación de los receptores de muerte (Fas) se produce como consecuencia de la unión de su ligando (FasL). La señal se transmite desde el dominio transmembranal al citoplasmático (Elinos-Báez et al., 2001).

Cuando el ligando FasL se une al receptor Fas se producen los siguientes procesos (Figura 2):

- La trimerización del receptor inducida por el ligando
- El reclutamiento de las proteínas intracelulares asociadas al receptor
- El inicio de la activación de las caspasas

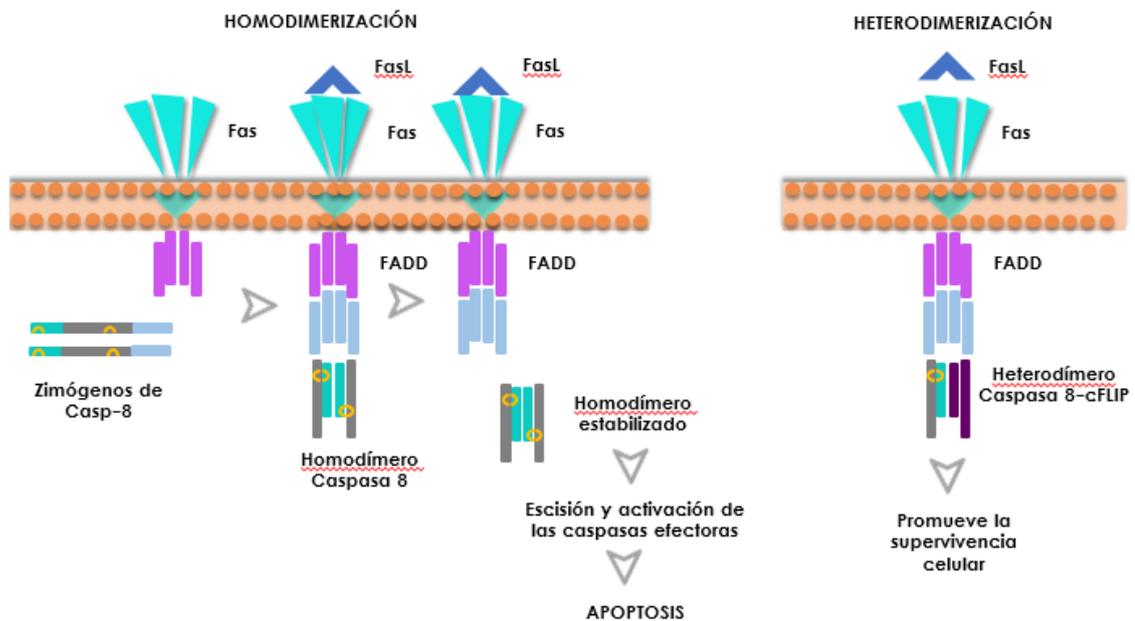


Figura 2. Proceso de homo y heterodimerización de caspasa 8.

Los ligandos de muerte (FasL) constitutivamente son homotriméricos, es decir, la unión de un FasL induce la trimerización, un solo FasL une a tres Fas (Rojas et al., 2009).

Este sufre un cambio conformacional, lo que favorece su fosforilación. A su vez, se fosforila a los adaptadores FADD, TRADD (dominio de muerte asociado al receptor del factor de necrosis tumoral, TNFR) o TRAFs (factor asociado al receptor de necrosis tumoral) (**Elinos-Báez et al., 2001**).

Seguidamente, dicha unión conlleva el reclutamiento por parte de Fas de factores citosólicos como FADD. Cada Fas se une a través del DD de la región citoplasmática a una molécula adaptadora FADD, formándose el complejo multiprotéico DISC, constituido por Fas, FADD y la pro-caspasa 8 (**Rojas et al., 2009**).

FADD es el núcleo del complejo y es responsable de detectar los estímulos de muerte hacia el receptor y reclutar la pro-caspasa 8. En su extremo N-terminal también posee DED (dominio efector de muerte), imprescindible para reclutar pro-caspasas como la 8. Dicho reclutamiento se realiza gracias a que la pro-caspasa 8 tiene dos DED en su N-terminal, a través de los cuales se une al DED de FADD. En resumidas cuentas, el DD de FADD es responsable de la unión al receptor, mientras que DED contiene el sitio responsable de la unión a caspasa 8 (**Rojas et al., 2009**).

Tras el reclutamiento de la pro-caspasa 8 se produce el procesamiento de la misma, generándose dos fragmentos catalíticos que forman la caspasa 8 activa tal y como hemos explicado con anterioridad. Todo ello genera la activación de las caspasas 8 y 10 y con ello, el inicio de la cascada (**Elinos-Báez et al., 2001**).

Las caspasas se encuentran en equilibrio entre la forma homo y la heterodimérica, aspecto en el que juega un papel esencial, c-FLIP (**Oberst y Green, 2011**). c-FLIP es una proteína celular inhibidora que, primordialmente se ha relacionado como inhibidor de la activación de la caspasa 8, y, por consiguiente, como regulador clave en la vía de muerte celular extrínseca, pudiendo cambiar las señales de vida o muerte (**Rojas et al., 2009**). Sin embargo, recientes descubrimientos sugieren que también es capaz de inducir la heterodimerización de caspasa 8 y, en consecuencia, se desencadena la supresión de la necroptosis (**Yu et al., 2009**).

De las 10 isoformas de c-FLIP descritas hasta la fecha, tan solo dos de ellas son significativas. Encontramos la isoforma larga c-FLIP larga de 55kDa y 480 aminoácidos y la c-FLIP corta de 28kDa y 221 aminoácidos.

Ambas isoformas poseen un dominio DED en el N-terminal, el cual es similar a los DED de caspasa 8.

c-FLIP posee además en su extremo C-terminal un dominio catalítico homólogo al de caspasa 8 pero desprovisto de actividad enzimática, es por ello que ambas pueden ser reclutadas para el complejo DISC uniéndose a Fas-FADD.

Cuando c-FLIP se expresa en altos niveles, compite con la caspasa 8, provocando la inhibición del reclutamiento de la misma por el complejo, evitando así, la inducción de la apoptosis mediada por receptores de muerte, lo que se traduce en supervivencia celular (**Rojas et al., 2009**) (**He y He, 2013**).

El ratio entre las isoformas de c-FLIP, largas y cortas, unidas a pro-caspasa 8, es una regulación crítica entre la dimerización y la activación, o lo que es lo mismo, entre necroptosis o apoptosis (**Dickens et al., 2012**).

Cuando los niveles de c-FLIP son bajos, se desencadena la homodimerización, y con ello, la escisión y la consecuente estabilización de los centros catalíticos.

Sin embargo, en el momento en el que los niveles son altos, caspasa 8 recluta a c-FLIP y se produce una heterodimerización (Figura 2) que tiene como fin, no la apoptosis, sino la supresión de la señalización de RIPK1 y RIPK3, y por lo tanto la muerte vía necroptosis (**Oberst y Green, 2011**).

ESTUDIOS EN *KNOCK-OUT*

Tal y como se describe con anterioridad, la caspasa 8 tiene dos funciones biológicas, promueve la muerte celular al activar la vía extrínseca de la apoptosis, pero también tiene una actividad pro-supervivencia, ya que es necesaria para el desarrollo embrionario, la activación de los linfocitos T y la resistencia a la necrosis inducida por el factor de necrosis tumoral TNF- α (**Oberst y Green, 2011**).

Para su estudio, fue necesario emplear ratones deficientes en caspasa 8, con el fin de analizar qué desenlace supondría realmente su supresión, es decir, cuán necesaria es en el desarrollo embrionario.

Caspasa 8 $-/-$ y FADD $-/-$, suponen la letalidad embrionaria (**Dillon et al., 2014**), (**Vandenabeele et al., 2012**). En consecuencia, el estudio con especies homocigóticas era impracticable, por lo que fue necesario emplear ratones heterocigóticos (**Kang et al., 2004**).

Sin embargo, sorprendentemente, la triple supresión de FADD, caspasa 8 y RIPK3 resultó ser viable (**Newton et al., 2014**).

Es digno de mención que los embriones mutantes en caspasa 8, a simple vista, y como primera aproximación a la importancia en el desarrollo embrionario, presentan un tamaño menor. Además, se puede observar *a priori*, una menor vascularización y una inferior diferenciación morfológica (**Los et al., 1999**).

Tras sucesivos experimentos, se observó que la letalidad embrionaria por delección de caspasa 8 sucede a partir del día E10.5, lo que revela un papel vital de la caspasa 8 en el desarrollo embrionario (**Kavanagh et al., 2015**) (**Zhang et al., 1998**) (**Varfolomeev et al., 1998**).

Así mismo, el deterioro del desarrollo del músculo cardíaco, la hemorragia masiva causada por la deficiencia de caspasa 8, así como fallo a nivel endotelial, proporcionan más pruebas del papel morfogenético de las caspasas, que pueden no solo estar asociadas con la apoptosis, sino que también se implican en otros procesos biológicos, incluyendo la proliferación de la diferenciación de las células (**Los et al., 1999**).

Otras acciones observadas fueron congestión severa del hígado y de los vasos de pecho y abdomen, ampliación del espacio pericárdico y adelgazamiento de la pared torácica acompañado de edema. En algunos embriones se encontró incluso la pared ventricular con ruptura asociada a necrosis extensa de los vasos aurículo y ventriculares. Se observó así mismo, disminución de la densidad vascular en el saco vitelino (**Kang et al., 2004**).

Estudios recientes han demostrado que la ausencia de FADD, cFLIP y caspasa 8 supone también la letalidad embrionaria por aumento de la vía de necroptosis por RIPK-1 y RIPK-3, debido a la necrosis masiva provocada en consecuencia a la activación de dicha vía, la cual puede ser rescatada por la delección de RIPK-1 o RIPK-3, respectivamente (**Dillon et al., 2014**) (**Vandenabeele et al., 2012**) (**Dillon et al., 2015**).

La caspasa 8 previene la necrosis dependiente de RIPK-3 sin inducir la apoptosis, funcionando en un complejo proteolíticamente activo con una proteína inhibidora (FLIP_L), complejo requerido para la función protectora (**Oberst y Green, 2011**).

Dado que la caspasa 8 suprime la expresión de RIPK1 y RIPK3, su delección supondría la muerte de los enterocitos, disrupción de la homeostasis tisular, menor capacidad de producción hematopoyética, congestión severa hígado y vasos sanguíneos de tórax y abdomen, resultando hechos mortales (**Kavanagh et al., 2015**), (**Harriman et al., 2010**), (**Varfolomeev et al., 1998**).

En cuanto a la supresión de c-FLIP, al presentar la doble función de cooperar con FADD y caspasa 8 durante el desarrollo embrionario, así como ejercer de citoprotector contra la muerte inducida por el factor de muerte, su delección supondría la letalidad del embrión por ser esencial en la supervivencia, especialmente en el desarrollo cardíaco (**Yeh et al., 2000**).

RIPK1 $-/-$ mueren al nacer por inflamación sistémica, así como por la extensa necrosis en hígado y timo (**Rickard et al., 2014**). Sin embargo, ratones RIPK3 $-/-$ no sufrieron ningún efecto en el desarrollo (**Newton et al., 2004**).

Las ya mencionadas alteraciones cardíacas, vascular y hematopoyéticas en ratones *knock-out*, son causadas por la necrosis. De todo ello se traduce que FADD, caspasa 8 y c-FLIP son esenciales para la proliferación de los linfocitos T y B, así como para el mantenimiento de la homeostasis linfocitaria (**Salvesen y Walsh., 2014**).

Caspasa 8 regula a su vez, la activación del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-KB), un complejo multi-proteico relacionado con la regulación de la respuesta inmune y con ello logra modular la inflamación (**Kang et al., 2008**).

Dicha proteasa se encarga de la activación de la microglía pro-inflamatoria, lo cual desencadena el aumento de los niveles de TNF α , IL-1 β , e INOS. Como consecuencia, se potencia la reacción inflamatoria (**Weng et al., 2014**). El estudio de embriones *knock out* en caspasa 8 y RIPK3, revelan un descenso de producción de IL-1 β (**Gurung et al., 2014**), todo ello, en consonancia al proceso anteriormente mencionado.

En consecuencia, todo ello no hace más que demostrar la existencia de funciones no apoptóticas de la caspasa 8, cumpliendo una función pro-supervivencia (**Kavanagh et al., 2015**) (**Oberst et al., 2011**).

METODOLOGÍA

ANIMALES EXPERIMENTALES

Los animales empleados en la realización del presente trabajo eran ratones heterocigóticos de caspasa 8 con un fondo genético C57.

Se procedió al cruce de dichos ratones heterocigóticos, en ellos, uno de los alelos de caspasa 8 delecionado y el otro floxeado.

Los floxeados tienen marcada la caspasa 8 para que el gen Cre la reconozca y delecione, de tal forma, si no se procede al cruce con Cre, la caspasa 8 seguiría expresándose.

La importancia de contar con ratones heterocigóticos radica en la experiencia de letalidad de los individuos homocigóticos en el estado prenatal, es por ello, que para estudiar la descendencia de los cruces se hace necesario trabajar con ratones +/- y +/+, siendo los + bien *wild type* (WT) o Floxeado.

El cruce dio lugar a una descendencia de embriones heterocigóticos (controles o WT) o deficientes de caspasa 8 (*knock-out* para caspasa 8).

Los animales se mantuvieron hasta su estudio, en el estabulario de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, en condiciones adecuadas de temperatura y humedad, respetando un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. Se garantizó también el libre acceso a agua y alimento.

Todos los experimentos llevados a cabo se realizaron respetando la normativa vigente española (*Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia*), respetado así mismo el <<*Guidelines of the European Union Council*>> (86/609/EU).

TOMA DE MUESTRAS

Tras el cruce realizado el día 21/10/2016, se llevó a cabo un registro diario del peso de las hembras, con el fin de detectar una variación significativa que revelara el embarazo.

La presencia del tampón mucoso, así como el cambio de morfología del abdomen y mamas, fueron criterios también valorados para garantizar la gestación.

Tras la obtención de las hembras grávidas, se procedió al sacrificio mediante sobredosis anestésica, con el fin de obtener los embriones, así como los sacos vitelinos, para su posterior estudio.

Los embriones que fueron destinados a la extracción del ADN, ARN y proteínas, fueron criopreservados a -40°C y posteriormente a -80°C .

Sin embargo, los destinados al estudio inmunohistoquímico se conservaron en paraformaldehído al 4% en tampón fosfato a 4°C hasta su utilización. Tras ello, se realizaron tres lavados con PBS 1X y se sumergieron, para su crioprotección, en sacarosa al 30% en PBS 1X a 4°C hasta que se hundieron completamente en torno a los 2-4 días.

Seguidamente se incluyeron en gelatina (100 ml agua destilada, 20 g sacarosa y 15 g de gelatina), en la misma posición hasta su corte en criostato.

INMUNOHISTOQUÍMICA

La inmunohistoquímica es una técnica que se basa en la capacidad que tienen los anticuerpos de unirse específicamente con los antígenos procedentes de los tejidos estudiados.

Posteriormente se permite la visualización mediante reacción de inmunofluorescencia, directa o indirecta.

Esta técnica es útil para estudiar la localización y expresión exacta de los antígenos en los respectivos tejidos.

Los embriones criopreservados a -80°C se pasaron a -40°C y posteriormente se realizaron cortes sagitales de unos $30\ \mu\text{m}$ de grosor en un criostato a -22°C .

Los cortes, realizados a la misma altura, se montaron en portaobjetos gelatinizados y se congelaron a -40°C hasta su utilización.

La técnica comienza con la incubación en PBS 1X durante 40 minutos en una placa termostática a 37°C para facilitar la eliminación de gelatina.

Pasado dicho tiempo se añadió una capa de PBS T 1%, compuesto por PBS 1X y Tritón X 100 (Sigma Aldrich) al 1%, durante 1 hora, con el objeto de permeabilizar el tejido y facilitar la penetración de los anticuerpos que vayan a ser añadidos posteriormente.

Pasada la hora de incubación, se continúa con la solución de bloqueo BSA (Sigma Aldrich) 5% en PBS T 1%, durante una hora. Este paso tiene como fin bloquear los antígenos que no nos interesan estudiar para que así la señal sea más limpia.

El anticuerpo primario (Tabla 1) preparado en BSA 1% en PBS T 1% se añade e incuba a 4°C durante toda la noche en cámara húmeda para evitar evaporación.

El segundo día se comenzó con 3 lavados de 20 minutos cada uno, con PBS 1X en agitación. Seguidamente se incubó con anticuerpos secundarios (Tabla 1) en PBS T-0,1% a temperatura ambiente durante 1 hora, con protección de la luz debido a que dichos anticuerpos están marcados con fluorocromos y podrían perder sus propiedades.

Durante los 5 últimos minutos de incubación se procede a añadir el marcador nuclear HOECHST 33258 (Sigma Aldrich) a una dilución de 1:2000, con el objetivo de facilitar la localización celular.

Se realizaron 3 lavados de 20 minutos cada uno con PBS 1X.

Finalmente se montaron los cortes en portaobjetos con medio de montaje glicerol al 50% para fluorescencia. Las muestras se mantuvieron a 4°C hasta su visualización.

ANTICUERPO PRIMARIO	MARCAJE	CASAS COMERCIALES	ANTICUERPO SECUNDARIO (ALEXA FLUOR)
Rabbit DCX (1:400)	Neurona inmadura	Santa Cruz	R-647 (1:500)
Rabbit Casp-3 (1:400)	Caspasa 3	Cell Signaling Technology	R-647 (1:500)
Goat Iba 1 (1:500)	Microglía	Santa Cruz	G-488 (1:500)
Mouse GFAP (1:400)	Astroglía	Millipore	M-647 (1:500)
Rabbit Casp-8 (1:250)	Caspasa 8	Cell Signaling Technology	R-546 (1:500)

Tabla 1. Anticuerpos empleados en las pruebas de inmunohistoquímica.

Se realizaron dos pruebas de inmunohistoquímica. Una primera mezcla se llevó a cabo con DCX, Caspasa 3 e Iba 1, y una segunda con GFAP, Caspasa 8, e Iba 1. En las proporciones citadas en la tabla.

La visualización de la marcación múltiple con marcadores inmunohistoquímicos se logra mejor utilizando la microscopía confocal de fluorescencia, ya que, además de permitir la identificación de los distintos marcadores en el plano XY, permite la generación de imágenes de capas secuenciales en el plano Z.

Es por ello que se realizó este estudio por microscopía confocal de barrido láser con doble escáner de alta resolución y alta velocidad, mediante el ZEISS LSM 7 DUO (CITIUS, Universidad de Sevilla).

Finalmente, se llevó a cabo el análisis de las imágenes generadas mediante el software Fiji ImageJ descargado directamente de la página <https://fiji.sc>. Posteriormente se procesaron las imágenes, realizando en primer lugar una proyección en Z de máxima intensidad, se separaron los colores y finalmente, se realizó una mezcla de todos los colores.

PCR- GENOTIPADO DE EMBRIONES

El genotipado de los embriones se llevó a cabo mediante la técnica de PCR. Para ello es necesaria la extracción previa del ADN de la muestra, la cual, se hizo siguiendo el protocolo de QuickExtract™ DNA Extraction Solution 1.0 de Epicentre.

Comenzamos añadiendo 50 µl de la solución de extracción (ADN extract) a cada uno de los tubos de PCR, pasándolos posteriormente por agitación de alta frecuencia y centrifugación corta durante unos 15 segundos para homogeneizarlos.

Incubamos las muestras a 65°C durante 15 minutos en el termociclador y a continuación se volvieron a pasar por agitación de alta frecuencia y centrifugación corta unos 15 segundos. Nuevamente en el termociclador fueron incubadas a 98°C durante 5 minutos.

Con cuidado se procedió a retirar las partículas sólidas para realizar a continuación la PCR usando el ADN genómico (ADNg).

Previamente a la realización de la PCR se realizó un estudio de la concentración del ADN presente en cada muestra mediante el Nanodrop.

Se diluyó 1:10 las muestras de ADN.

El genotipado se llevó a cabo mediante MyTaq™ Red DNA Polymerase de BIOLINE.

Consta de diversos reactivos con los que se prepara una mezcla (Tabla 2) que se hace reaccionar en el termociclador durante 35 ciclos a 58°C.

Reactivos		µl/tubo	
My TaqRed Reaction Buffer		5	
My taq DNA Polymerase		0,125	
ADN		1	
Agua miliQ		Cantidad suficiente para (c.s.p.) 25	
Cebadores (25 µM)	Caspasa 8 flox mutant	5'-CCCAGAAATGCCAGATTACG	1
	Caspasa 8 flox common	5'-CTTGGGCTGCCAGAATTTCTC	1
	Caspasa 8 flox wild type	5'-TTACAGTCGCCAGGCTGAC	1

Tabla 2. Mezcla de reactivos y cantidades empleadas en la realización del genotipado.

Consecutivamente se cargaron las muestras en un gel de agarosa al 1,5% (150 ml TAE 0,5X y 2,25 g de agarosa), revelándose el resultado con luz ultravioleta (Figura 3).

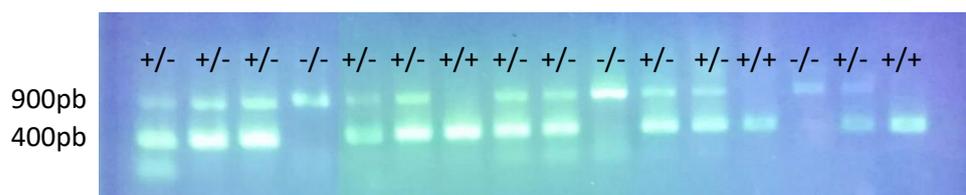


Figura 3. Gel de agarosa correspondiente al genotipado de parte de los embriones empleados para el estudio.

Tal y como podemos visualizar en la imagen, aquellos que tienen una única banda de 900 pb corresponden a aquellos embriones *knock-out*, mientras que aquellos que presentan dos bandas, una a 900 pb y otra a 400 pb, sería de los controles.

EXTRACCIÓN ADN-ARN-PROTEÍNAS

Para la realización de esta técnica se ha seguido el protocolo TRisure™ de Bioline.

Se trata de una técnica que permite aislar ADN, ARN y proteínas de una misma muestra de células o de tejidos, mediante la separación en fases.

Se comenzó lisando el tejido, en nuestro caso embriones completos, mediante el reactivo Trisure junto a esferas de vidrio, agitadas en un Politrón PCU Power Control Unit Drehzahlregler. De esta forma, logramos homogeneizar el tejido química y mecánicamente. Este proceso se realizó mediante repeticiones de corta duración con el fin de que la muestra no se calentara debido a la agitación, y, en consecuencia, pudiera deteriorarse.

SEPARACIÓN DE FASES

Tras la homogeneización del tejido, se procedió a incubarlo durante 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se añadió 0,2 ml de cloroformo por cada ml de Trisure empleado, agitando vigorosamente con el fin de favorecer la separación.

A continuación, previa incubación a temperatura ambiente 3 minutos, se centrifugaron a 12.000 g en unas condiciones de temperatura de 4°C durante 15 minutos.

En este momento se consiguió la esperada separación de fases gracias al cloroformo, que al ser un disolvente orgánico permite distinguir en la parte superior la fase acuosa que contiene el ARN, una interfase, una fase orgánica donde encontraremos el ADN y un precipitado de color verde que corresponde con las proteínas (Figura 4).

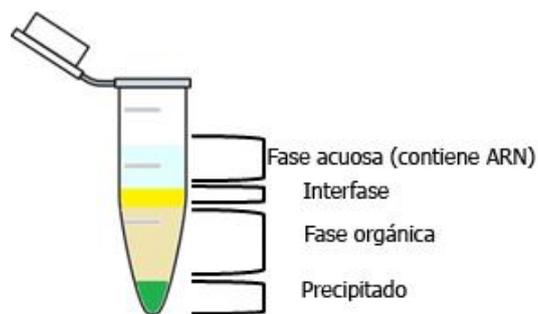


Figura 4. Esquema de separación de fases tras homogeneizado de tejido.

Tras la visualización de las distintas fases, se procedió a la separación en Ependorff de cada una de ellas, descartando, por supuesto, la interfase, y con cuidado de no llevarnos con el ARN parte de ella, pues estaríamos contaminando las muestras.

EXTRACCIÓN ARN

Transferida cuidadosamente la fase acuosa, se continua con ella para el análisis del ARN mediante precipitación con Isopropil alcohol, unos 0,5 ml por cada mililitro de Trisure empleado para la extracción.

Mientras tanto, la interfase junto al resto de fase orgánica y DE precipitado, se conservan a 4°C hasta su utilización, pudiéndose almacenar hasta 24 horas.

De nuevo, tras incubar las muestras 20 minutos a -20°C, se centrifugaron 10 min a 4°C y 12.000 g.

Una vez precipitado, descartamos el sobrenadante y se añadió al pellet 1 ml de etanol al 75% por cada mililitro de Trisure usado con el fin de lavar el precipitado. Posteriormente se hicieron pasar las muestras con etanol por agitación de alta frecuencia seguido de una centrifugación a 7.500 g durante 5 minutos a 4°C.

Se dejó secar el precipitado y a continuación se guardaron las muestras a -80°C hasta su uso, previa incorporación de 100 µl de agua de PCR.

Para la preparación del Etanol al 75%, se usó agua libre de ARNasa con el fin de evitar la degradación de nuestra muestra.

A continuación, procedimos a la extracción del ADN y proteínas, conservando las muestras de ARN a -20°C.

EXTRACCIÓN ADN

Se hizo precipitar el ADN con 300 µl de etanol al 100% por cada 1 ml de TRisure utilizado, mezclándolo por inversión levemente.

Las muestras fueron incubadas 3 minutos a temperatura ambiente y tras ello se centrifugaron 5 minutos a 4°C y 2.000 g.

A continuación, se retiró el sobrenadante, del cual, se extraerían posteriormente las proteínas, por lo que se conservaron en Ependorff a 4°C hasta su utilización.

El ADN contenido en el pellet fue lavado mediante 1 ml de citrato sódico 0,1 M en etanol 10% por cada 1 ml de TRisure empleado. De nuevo, se centrifugaron a 2.000 g, 5 minutos

a 4°C. Este paso se repitió varias veces debido a que teníamos un pellet grande y teníamos que asegurar el correcto lavado del mismo.

Se añadieron 1,5 ml de etanol al 75% por cada 1 ml de TRIsure, se mezcló a temperatura ambiente 20 minutos y a continuación, se centrifugó a 2.000 g 5 minutos a 4°C.

El pellet se dejó secar al aire durante 15 minutos. Pasado ese tiempo, se resuspendió en 8 mM de sosa (NaOH). Seguidamente se centrifugó a 12.000 g 10 minutos con el fin de precipitar y retirar todo el material insoluble, haciendo pasar el sobrenadante a otro tubo.

EXTRACCIÓN PROTEÍNAS

Partimos del sobrenadante extraído del paso de extracción del ADN. Se añadió 1,5 ml de Alcohol Isopropilo por cada 1 ml de TRIsure con el fin de hacerlo precipitar como en anteriores ocasiones. Se centrifugó a 12.000 g 10 minutos a 4°C, previa mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Seguidamente, se descartó el sobrenadante y se procedió a lavar el pellet dos veces con 2 ml de Hidrocloruro de guanidina al 0,3 M en etanol al 95%, 1 ml por cada 1 ml de TRIsure empleado. Las muestras se mezclaron bien durante 20 minutos a temperatura ambiente, seguido de una centrifugación a 7.500 g 5 minutos a 4°C.

A continuación, se añadieron 2 ml de etanol a 95%, se hicieron pasar por agitación de alta frecuencia y se centrifugaron nuevamente en las mismas condiciones que el paso anterior.

Se dejó secar el pellet con cuidado de no excedernos en tiempo ya que supondría una mayor dificultad a la hora de resuspenderlo posteriormente con SDS al 1%.

Las muestras fueron guardadas a -20°C hasta su utilización.

RETROTRANSCRIPCIÓN

Tras haber extraído las muestras de ARN, se midieron las concentraciones en el Nanodrop del CITIUS (Universidad de Sevilla). A partir de estas muestras, se obtuvo el ADN complementario con el cual se realizaría posteriormente una PCR cuantitativa.

La retrotranscripción que permite el paso de ARN a ADN complementario, fue llevada a cabo mediante la técnica de RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis kit de Thermo Scientific™.

En primer lugar, procedimos a la cuantificación del ARN presente en cada muestra tal y como hemos mencionado anteriormente. Tras ello, se llevaron a cabo diluciones hasta llegar a una concentración de 1.000 µg/µl, hasta un volumen de 11 µl.

Tras ello, se realizaron los cálculos de acuerdo al protocolo de la técnica, realizando un total de 9 µl de Mix por muestra, formado por 5x Reaction Buffer (4 µl), RiboLock RNasa Inhibitor 20 U/µl (1 µl), 10Mm dNTP Mix (1µl), RevertAid M-MuLV RT 200 U/µl (1µl) y por último, Primer Random Hexamer (1 µl).

A cada muestra de ARN al 1.000 µg/µl, se le adicionaron los 9 µl de Mix, quedando un volumen final de 20 µl. Seguidamente se pasa por agitación de alta frecuencia y centrifugación corta. Finalmente se introducen todas las muestras en el PCT-100™ Programable Thermal Controller MJ RESEARCH, en el programa Revertaid.

PCR CUANTITATIVA

También denominada, QPCR. Se trata de una PCR de alta calidad que permite no solo la amplificación si no también, la cuantificación de ARN.

Partimos del ADNc obtenido de la retrotranscripción y tal y como se ha llevado realizando en las pruebas anteriores, se procede en primer lugar a la preparación de los reactivos.

Se requiere un volumen de 5 µl de mezcla por pocillo. Para el número de pocillos debemos tener en cuenta, no solo el número de muestras, sino el número de genes a estudiar, y el número de réplicas, en nuestro caso, 3.

Se diluyen al 1:20 las muestras de ADNc, con agua pura.

A continuación, se marcan los pocillos a utilizar en la placa, para cada uno de los genes, empezando por la esquina superior izquierda. En nuestro caso, buscamos determinar la expresión de ciertos genes: Nestina, Cd11b, DCX (Doblecortina), C3XR, TNF e iNOS, usando como control el gen GADPH (Tabla 3).

Se realiza una mezcla para cada uno de los genes, añadiendo a la misma 0,4 µl de cebador Fw/0,4 µl de cebador Rv de cada gen. Teniendo en cuenta aquí también, el número de muestras a analizar.

Se añade una primera línea de agua, seguida de 5,8 µl de mezcla+cebadores en cada uno de los pocillos restantes. Finalmente se añaden 4,2 µl de ADNc diluido.

Se sella con cuidado la placa con una lámina de plástico con la ayuda de un peine para alisarlo. Se centrifuga y se analiza en el LightCycler™ de Roche, encontrado en el CITIUS.

El ARN se somete a un número de 40 ciclos siguiendo las siguientes etapas: inicialmente se provoca la desnaturalización, tras ello, ciclos de 95°C. A continuación, le sigue la etapa a 60°C y por último a 72°C, durante 5 minutos.

CEBADORES	DESCRIPCIÓN	MARCAJE	SECUENCIA SENTIDO	SECUENCIA ANTISENTIDO	TM (°C)
GADPH	Gliceraldehído -3-fosfato deshidrogenasa, enzima de la glucólisis	Expresión constitutiva	5'- TGGACTGTG GCATTGAGA CAG-3'	5'- CGACCCGTCCT TTGAATTTC-3'	60
CX3R	Receptor de quimioquina	Respuesta inflamatoria	5'- GCCTCTGGT GGAGTCTGC GTG-3'	5'- TGGGCTTCCG GCTGTTGGTG- 3'	60
Nestina	Proteína de los filamentos intermedios	Precursor neuronal	5'- GGCAGCAAC TGGCACACC TCA-3'	5'- GGCTGAGGAC AGGGAGCACA GA-3'	60
Cd11b	Integrina αM	Microglía	5'- CCTTGTCTC TTTGATGCA G-3'	5'- GTGATGACAA CTAGGATCTT- 3'	60

DCX	Proteína asociada a microtúbulos	Neurona inmadura	5'- CCAATGCGC CGCAGCAAG TC-3'	5'- TGACAGCGGC AGGTACAGGT C-3'	60
Caspasa 8	Cisteín aspartato proteasas	Caspasa inductora	5' GGA AGA TGA CTT GAG CCT GC-3'	5' GCT CTT GTT GAC CTG GTC AC-3'	60
TNF	Factor de necrosis tumoral	Respuesta inflamatoria	5'-TGC CTA TGT CTC AGC CTC T- 3'	5'-GAG GCC ATT TGG GAA CTT CT-3'	60
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible	Respuesta inflamatoria	5'-CTG GGG CAG TGG AGA GAT TT- 3'	5'-TTG TCT CTG GGT CCT CCT GT-3'	60

Tabla 3. Cebadores empleados en el análisis de PCR cuantitativa.

Finalmente, se realizó un cálculo estadístico con t de student.

La curva de desnaturalización nos sirvió para comprobar la eficacia de la qPCR y el buen funcionamiento, ya que la observación de la temperatura de desnaturalización es específica para cada gen. Esta temperatura variará según el porcentaje de citosina-guanina, siendo específico para cada amplicón, debido a que éstas presentan una unión de 3 puentes de hidrógeno frente a los 2 de adenosina y timina, necesitan una mayor temperatura, lo que implica, mayor energía, para romper los enlaces. Cuanta mayor temperatura necesite, mayor será el porcentaje G-C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

GENOTIPADO DE EMBRIONES PARA ESTUDIO DE INMUNOFLUORESCENCIA

Tal y como se mostró en la Figura 3 correspondiente al gel de agarosa del genotipado de los 16 embriones empleados para las pruebas histoquímicas, pudimos observar la presencia de tres individuos con una única banda a 900 pb, lo que se traduce en que son embriones *knock-out*, siendo los restantes, controles.

ESTUDIO HISTOLÓGICO POR INMUNOFLUORESCENCIA

Como ya se ha mencionado, la inmunohistoquímica es una técnica que se basa en la capacidad que tienen los anticuerpos de unirse específicamente con los antígenos procedentes de los tejidos estudiados.

Posteriormente permite la visualización mediante reacción de inmunofluorescencia, directa o indirecta, siendo en nuestro caso, indirecta, para la cual se emplearon anticuerpos secundarios marcados con fluorocromo.

Esta técnica es útil para estudiar la localización y expresión exacta de los antígenos en los respectivos tejidos, gracias a la amplificación de la sensibilidad que lleva intrínseca la técnica.

De tal forma, se analizó la distribución de un marcador de microglía, Iba 1 así como de HOERCHST 33258 de marcaje nuclear. A lo que se añadieron otros marcadores importantes de caspasa 3, caspasa 8, doblecortina (DXC) y GFAP.

Inicialmente realizamos un barrido general del corte completo del embrión (Figura 6), con el fin de localizar la expresión de caspasa 8 que, como se puede observar en la Figura 7 y 8, es muy amplia, debido a las diversas funciones que se han ido asociando a dicha proteasa durante el desarrollo.

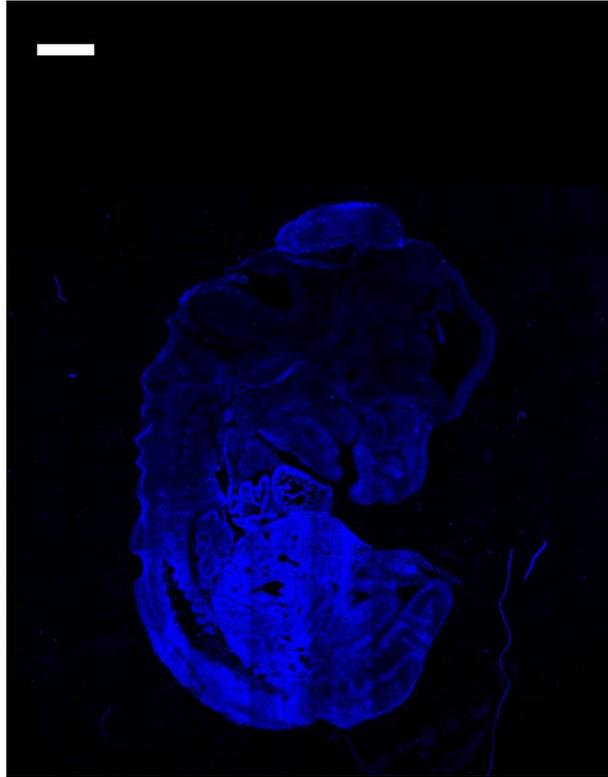


Figura 6. Inmunofluorescencia indirecta de corte sagital de un embrión control E12.5 a 10X con marcaje nuclear HOECHST 33258. Barra de calibración 800 μm .

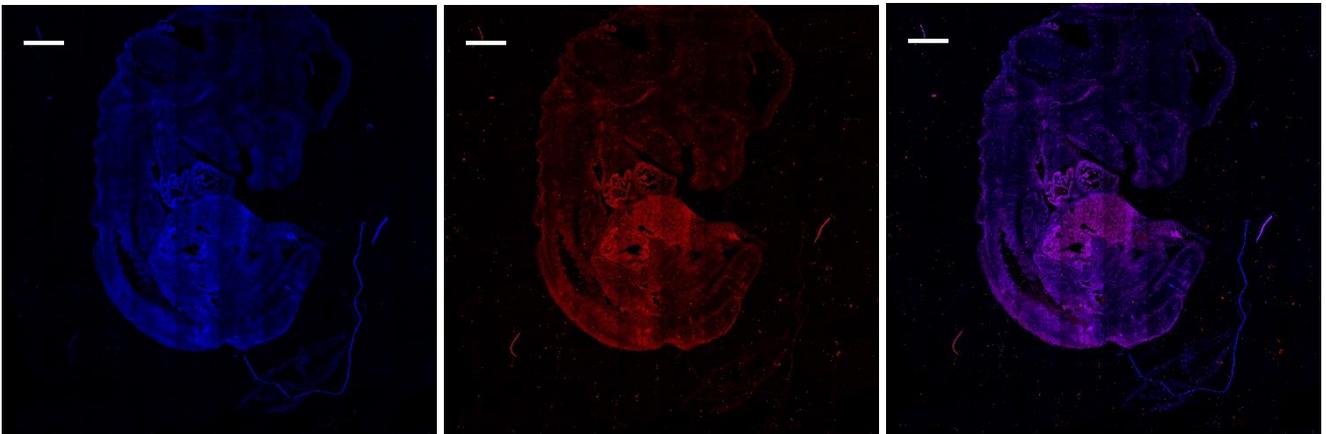


Figura 7. Inmunofluorescencia indirecta de corte sagital de un embrión control E12.5 a 10X. De izquierda a derecha podemos observar el marcaje nuclear HOECHST 33258 (en azul), caspasa 8 (en rojo) y finalmente, la superposición de las anteriores. Barra de calibración 800 μm .

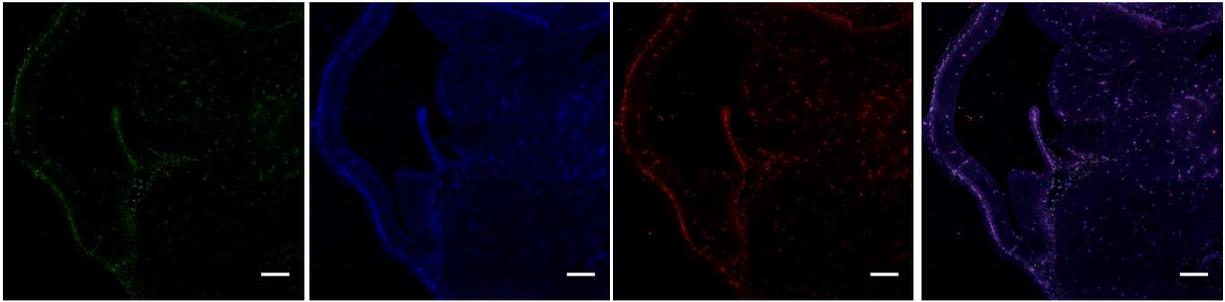


Figura 8. Inmunofluorescencia indirecta de corte sagital de un embrión control a 20X. De izquierda a derecha podemos observar el marcaje Iba 1 (verde), nuclear HOECHST 33258 (en azul), caspasa 8 (en rojo) y finalmente, la superposición de las anteriores. Barra de calibración 200 μ m.

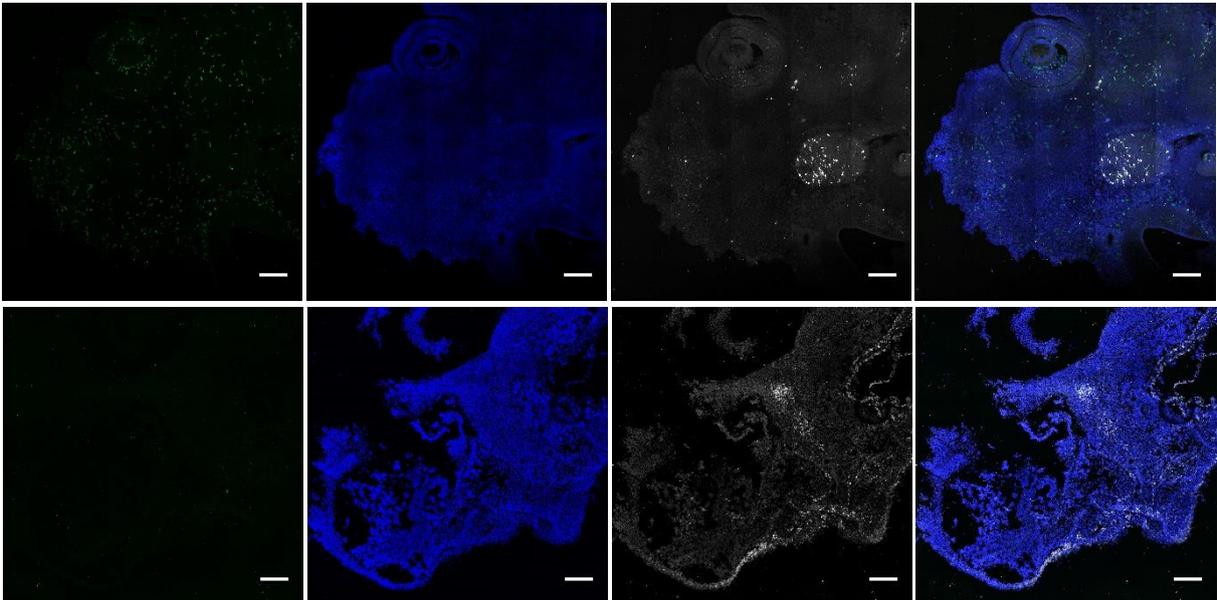


Figura 9. Inmunofluorescencia indirecta de secciones sagitales de un embrión control (arriba) enfrentado a un embrión KO (abajo) a 20X. De izquierda a derecha podemos observar el marcaje de Iba 1 (en verde), marcaje nuclear HOECHST 33258 (en azul), doble-cortina (gris) y finalmente, la superposición de las anteriores. Barra de calibración 200 μ m.

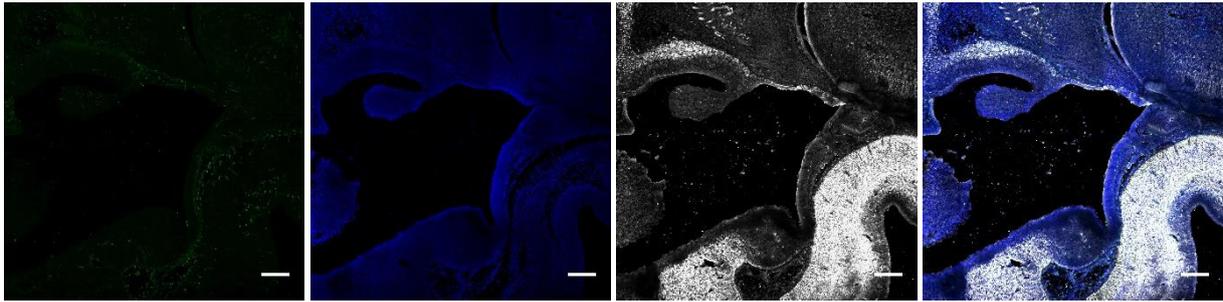


Figura 10. Inmunofluorescencia indirecta de secciones sagitales de un embrión control a 20X. De izquierda a derecha podemos observar el marcaje de Iba 1 (en verde), marcaje nuclear HOECHST 33258 (en azul), doble cortina (gris) y finalmente, la superposición de las anteriores. Barra de calibración 200 μ m.

En primer lugar, cabe destacar la dificultad a la hora de manipular los embriones KO, siendo mucho más débiles y frágiles, lo que podemos ver reflejado en la deficiente conservación histológica en comparación con los tejidos de embriones controles.

Otra referencia que podemos ver expresada en las imágenes en relación a los tejidos mutados, es que, al estar más dañados, supone la mayor penetrabilidad de los anticuerpos, es por ello que se observan unas imágenes más saturadas.

Tal y como podemos observar en la figura 9 y 10, existe una disminución de la expresión de Iba 1 en los embriones *knock-out* en caspasa 8 con respecto a los controles, lo que manifiesta la existencia de menor cantidad de microglía.

La disminución de la expresión de Iba 1 en los embriones *knock-out* resultaría esperable debido a la acción activadora de la caspasa 8, que en su ausencia supone un detrimento de la expresión de Iba 1. Cabe pensar que dicha disminución de microglía se debe a la inducción de la necroptosis en ausencia de caspasa 8, viéndose por tanto dichas células afectadas durante su desarrollo temprano. Además, recientes estudios han mostrado que lo anteriormente mencionado resulta ser un hecho, provocando, esa mutación, la muerte necroptótica de la microglía pro-inflamatoria (*Kavanagh et al., 2015*).

ESTUDIOS DE LOS NIVELES DE MARCADORES

En consonancia con los resultados obtenidos mediante técnicas inmunohistoquímicas donde ciertos marcadores están cualitativamente disminuidos, observamos que esta disminución es similar, y significativa, mediante técnicas de biología molecular en embriones deficientes en caspasa 8 con respecto a los controles. Además, pudimos estudiar otros marcadores específicos para distintos tipos celulares y marcadores de inflamación.

En primer lugar, el marcador de Caspasa 8, molécula objeto del presente estudio, presenta los valores esperados, Figura 11.A. Como es lógico, los embriones *knock-out* expresan una reducción del 98,04% ($1,96 \pm 0,51$) en comparación a los controles ($100,00 \pm 17,61$), con una diferencia significativa de ($P = 0,002$). Además, esto nos permitió corroborar que la técnica era correcta para cuantificar el resto de los componentes embrionarios estudiados.

En segundo lugar, la expresión del marcador Cd11b de células microgliales, Figura 11.B, presenta una disminución en embriones *knock-out* del 58,79% ($41,21 \pm 6,21$) respecto a los controles ($100,0 \pm 17,28$), de forma significativa ($P = 0,017$). En cuanto a CX3R, componente específico de la microglía Figura 11.C, observamos una disminución significativa de un 81,13% en ausencia de caspasa 8 ($18,87 \pm 7,70$) en comparación a los controles ($100,0 \pm 31,32$), ($P = 0,04$). Este conjunto de resultados se ven respaldados por los estudios de inmunofluorescencia en los que la escasa presencia de microglía, marcada con Iba1 en los embriones *knock-out*. Además de lo descrito por **Kavanagh et al., 2015** que muestran la muerte necroptótica de la microglía en ausencia de Caspasa 8.

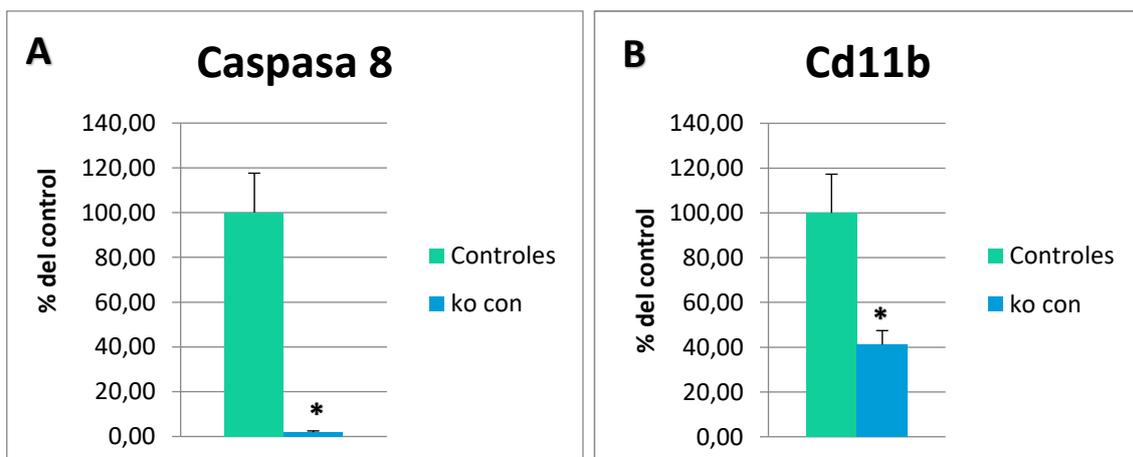
Lo siguiente fue estudiar la DCX y la Nestina, ambos marcadores de precursores neuronales. La DCX es una proteína asociada a los microtúbulos, lo cual se correlaciona con la distribución de neuronas inmaduras presentes en el tejido. Los valores obtenidos para el marcador DCX en embriones *knock-out* presentan una disminución, aunque no alcance la significación (*knock-out*: del 84,4% ($15,60 \pm 7,17$); controles ($100,0 \pm 46,5$); $P = 0,130$) (Figura 11.D). Tampoco se observó de forma cualitativa mediante inmunofluorescencia un cambio significativo (ver Figura 9). Por lo tanto, futuros experimentos con cuantificaciones más exhaustivas esclarecerán esta posible diferencia en la presencia de neuronas maduras en los embriones *knock-out*. De hecho, hemos observado una reducción de los niveles de microglía, que, posiblemente podría estar acompañada por una pérdida de neuronas.

Esta hipótesis se basaría en que la microglía tiene un papel defensor en el sistema nervioso central, proporcionando homeostasis, así como soporte trófico a las células, por lo que es lógico pensar que una disminución de la misma debería suponer un descenso significativo de neuronas. Es más, cuando cuantificamos la expresión de nestina (Figura 11.E), proteína encontrada en los filamentos intermedios de los precursores neuronales, sí encontramos diferencias significativas, observando una disminución de un 91,73% ($8,27 \pm 1,90$) respecto a los controles ($100,0 \pm 18,17$), ($P = 0,003$).

Como se mencionó con anterioridad, la Caspasa 8 está implicada en procesos inflamatorios a través de la activación de la microglía pro-inflamatoria, lo cual desencadena el aumento de los niveles de TNF α , IL-1 β , e iNOS (*Gurung et al., 2014*). Es por ello, por último, que se han analizado diversos marcadores inflamatorios con el fin de obtener información de cómo influye en su expresión la delección de Caspasa 8. No se encontraron diferencias significativas con respecto a los controles ni en el caso de TNF (Figura 11.G) ni para iNOS (Figura 11.F).

iNOS presenta un descenso 23,09% ($76,91 \pm 33,13$) respecto a los controles ($100,0 \pm 35,53$), con una diferencia no significativa ($P = 0,645$). TNF por su lado presenta un aumento de un 21,94% ($121,94 \pm 36,54$) con respecto al valor que presentan los controles ($100,0 \pm 36,54$), sin encontrarse diferencias significativas tal y como hemos mencionado ($P = 0,592$).

Atendiendo esto, podemos decir, que en ausencia de caspasa 8 la inflamación mediada por iNOS, así como por TNF, no presentan modificaciones, dado que no existe diferencia de ningún tipo de los *knock-out* con respecto a los controles.



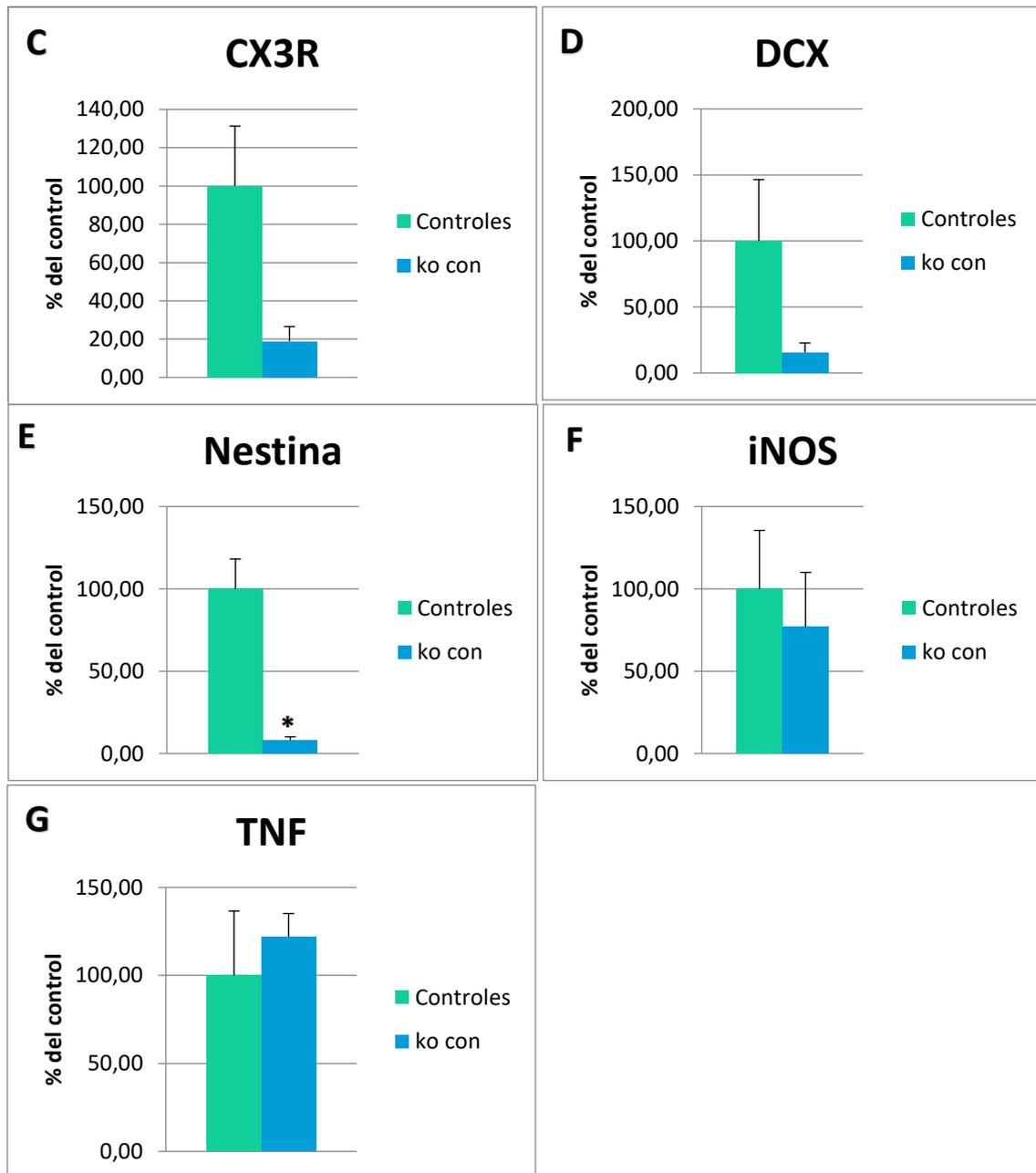


Imagen 11. Niveles de expresión de los diversos marcadores microgliales y de precursores neuronales en embriones control con respecto a embriones *knock-out* en caspasa 8. **A.** Expresión del marcador Caspasa 8. **B.** Expresión de marcador Cd11b. **C.** Expresión de marcador Doblecortina (DCX). **D.** Expresión de marcador Nestina. **E.** Expresión de marcador TNF. **F.** Expresión de marcador iNOS. **G.** Expresión de marcador CX3R. * Hace referencia a las diferencias significativas entre los dos grupos $P < 0,05$. La significación se calculó mediante la prueba *T* student de estadística, calculada mediante una *n* de 6 por cada grupo, de las cuales 3, provienen de una investigación previa.

C ONCLUSIÓN Y FUTURAS PERSPECTIVAS

En base a todos los estudios realizados en el presente trabajo podemos concluir lo siguiente:

-Se observa una disminución de Iba 1, marcador específico de la microglía, en los tejidos *knock-out* para caspasa 8 analizados mediante inmunofluorescencia, datos que se confirman seguidamente con el marcaje en qPCR de Cd11b y CX3R. Por ello, concluimos, que la microglía se ve afectada en ausencia de caspasa 8.

-Dado los hallazgos, el marcaje de DCX presumimos que tendría que ser bajo debido a que, si hay una reducción de la microglía podría haber un número menor de neuronas, ya que es la que le proporciona el soporte trófico. Datos que se aseveran así mismo en los estudios inmunohistoquímicos realizados. Así mismo, suponemos que la disminución de Nestina debería corresponder con la consecuente reducción de DCX. Sería importante, por tanto, realizar futuros experimentos de los precursores neuronales para proporcionar una mayor aproximación a dicho estudio.

- La caspasa 8 promueve la activación de la microglía pro-inflamatoria, por ello, sería lógico que exista una disminución de la actividad inflamatoria en los embriones *knock-out*, sin embargo, los estudios de los marcadores inflamatorios TNF e iNOS, no presentan diferencias significativas. En consecuencia, sería interesante enfocar los futuros pasos de la presente investigación, en analizar el papel de la caspasa 8 en dicho proceso utilizando otras técnicas y otros marcadores a estudiar, como por ejemplo IL-1 β .

Para abordar con mayor profundidad los estudios iniciados, sería interesante analizar la necrosis masiva mediante la revisión de TNF α , β y δ . Tratando previamente a la madre, con Necrostatina 1, un inhibidor de RIP 1 capaz de atravesar la barrera hematoencefálica. De esta forma, lograríamos revertir la muerte celular bloqueando la necroptosis y posteriormente podríamos valorar la supervivencia de la microglía.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Cryns VL, Yuan J. Proteases to die for. *Genes Dev* 1998; 12:1551-1570.
- [2] Belizário, J., Vieira-Cordeiro, L., Enns, S. Necroptotic cell death signaling and execution pathway: Lessons from knockout mice. *Mediators of Inflammation*, 2015. Vol. 2015, 1-15.
- [3] Dickens L. S., I. R. Powley, M. A. Hughes, and M. MacFarlane, "The 'complexities' of life and death: death receptor signalling platforms," *Experimental Cell Research*. 2012; vol. 318(11): 1269– 1277.
- [4] Dillon C. P., R.Weinlich, D. A. Rodriguez et al., "RIPK1 blocks earlypostnatal lethality mediatedby caspase-8 andRIPK3," *Cell*. 2014; vol. 157 (5): 1189–1202.
- [5] Elinos-Báez, C. M., Maldonado, V., & Meléndez-Zajgla, J. Caspasas: Moléculas Inductoras de Apoptosis. *Gaceta Medica de Mexico*. 2003; 139(5): 493–499.
- [6] Fricker M., Vilalta A., Tolkovsky A.M., Brown G.C., Caspase inhibitors protect neurons by enabling selective necroptosis of inflamed microglía. *J Biol Chem*. 2013; 288(13): 9145-52.
- [7] Galluzzi L., I. Vitale, J. M. Abrams et al., "Moleculaar definitions of cell death subroutines: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2012," *Cell Death and Differentiation*. 2012. vol. 19, (1): 107–120.
- [8] Galluzzi L., J. M. Bravo-San Pedro, I. Vitale et al., "Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015," *Cell Death & Differentiation*. 2015; 22 (1): 58– 73.
- [9] Gurung P, Anand PK, Malireddi RK, Vande Walle L, Van Opdenbosch N, Dillon CP, Weinlich R, Green DR, Lamkanfi M, Kanneganti TD: FADD and caspase-8 mediate priming and activation of the canonical and noncanonical Nlrp3 inflammasomes. *J Immunol* 2014, 192:1835-1846.

- [10] Harriman, W. D., Collarini, E. J., Sperinde, G. V, Strandh, M., M, M., Dutta, A., Kauvar, L. M. 2010. NIH Public Access. Quality, 341(2), 135–145.
- [11] He M.X., He Y.W., A role for c-FLIP(L) in the regulation of apoptosis, autophagy, and necroptosis in T lymphocytes. *Cell Death Differ.* 2013;20(2):188-97.
- [12] Kang, T.-B., Ben-Moshe, T., Varfolomeev, E. E., Pewzner-Jung, Y., Yogev, N., Jurewicz, A., ... Wallach, D. (2004). Caspase-8 Serves Both Apoptotic and Nonapoptotic Roles. *The Journal of Immunology*, 173(5), 2976–2984.
- [13] Kang, T.-B., Oh GS, Scandella E, Bolinger B, Ludewig B, Kovalenko A, Wallach D: Mutation of a self-processing site in caspase-8 compromises its apoptotic but not its nonapoptotic functions in bacterial artificial chromosome-transgenic mice. *J Immunol.* 2008, 181:2522-2532.
- [14] Kavanagh, E., Burguillos, M. A., Carrillo-Jimenez, A., Oliva-Martin, M. J., Santiago, M., Rodhe, J., ... Venero, J. L. Deletion of caspase-8 in mouse myeloid cells blocks microglia proinflammatory activation and confers protection in MPTP neurodegeneration model. *Aging.* 2015; 7(9), 673–689.
- [15] J. F. R. Kerr, A. H. Wyllie, and A. R. Currie, “Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics,” *British Journal of Cancer.* 1972 vol. 26(4): 239–257.
- [16] Kidd VJ. Proteolytic activities mediate apoptosis. *Annu Rev Physiol* 1998;60:533-73.
- [17] Los, M., Wesselborg, S., & Schulze-osthoff, K. (1997). The Role of Caspases in Development, Immunity, and Apoptotic Signal Transduction : Lessons from Knockout Mice, 1, 629–639.
- [18] K. Newton, D. L. Dugger, K. E. Wickliffe et al., “Activity of protein kinase RIPK3 determines whether cells die by necroptosis or apoptosis,” *Science.* 2014; vol. 343(6177):1357–1360.
- [19] K. Newton, X. Sun, and V. M. Dixit, “Kinase RIP3 is dispensable for normal NF-kappa B signaling by the B-cell and T cell receptors, tumor necrosis factor receptor 1, and Toll-like receptors 2 and 4,” *Molecular and Cellular Biology.* 2004; vol. 24(4):1464–1469.

[20] Oberst A., Dillon C.P., Weinlich R., McCormick L.L., Fitzgerald P., Pop C., Hakem R., Salvesen G.S., Green D.R., Catalytic activity of the caspase-8-FLIP(L) complex inhibits RIPK3-dependent necrosis. 2017;471(7338):363-7.

[21] Oberst A., C. P. Dillon, R. Weinlich et al., “Catalytic activity of the caspase-8-FLIPL complex inhibits RIPK3-dependent necrosis,” *Nature*. 2011; vol. 471(7338): 363–367.

[22] Oberst A., Green D.R., It cuts both ways: reconciling the dual roles of caspase 8 in cell death and survival. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011 Oct 21;12(11):757-63.

[23] Rickard J. A., J. A.O'Donnell, J. M. Evans et al., “RIPK1 regulates RIPK3-MLKL-driven systemic inflammation and emergency hematopoiesis,” *Cell*. 2014; vol. 157(5):1175–1188.

[24] Rojas, M., Salmen, S., & Berrueta, L. (2009). Muerte celular programada: Activación y mecanismos de regulación. *Revista Médica de La Extensión Portuguesa*, 4(3), 92–106.

[25] Salvesen, G. S., & Walsh, C. M. (2014). Functions of caspase 8: The identified and the mysterious. *Seminars in Immunology*, 26(3), 246–252.

[26] Vandenabeele P. and G. Melino, “The flick of a switch: Which death program to choose?” *Cell Death and Differentiation*. 2012; vol. 19(7): 1093–1095.

[27] Varfolomeev, E. E., Schuchmann, M., Luria, V., Chiannikulchai, N., Beckmann, J. S., Mett, I. L., ... Wallach, D. Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity*. 1998; 9(2):267–276.

[28] Weng D, Marty-Roix R, Ganesan S, Proulx MK, Vladimer GI, Kaiser WJ, Mocarski ES, Pouliot K, Chan FK, Kelliher MA, Harris PA, Bertin J, Gough PJ, Shayakhmetov DM, Goguen JD, Fitzgerald KA, Silverman N, Lien E: Caspase-8 and RIP kinases regulate bacteria-induced innate immune responses and cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014, 111:7391-7396

[29] Wilson N. S., V. Dixit, and A. Ashkenazi, “Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks,” *Nature Immunology*. 2009; vol. 10(4): 348–355.

[30] Yeh, W. C., Itie, a, Elia, a J., Ng, M., Shu, H. B., Wakeham, a, ... Mak, T. W. Requirement for Casper (c-FLIP) in regulation of death receptor-induced apoptosis and embryonic development. *Immunity*.2000; 12(6), 633–642.

[31] Yu, J. W., Jeffrey, P. D., & Shi, Y. Mechanism of procaspase-8 activation by c-FLIPL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009; 106(20): 8169–8174.

[32] Zhang J., Cado D., Chen A., Kabra N.H., Winoto A., Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. *Nature*. 1998;392:296–300.