

**CARACTERIZACIÓN DEL MODELO
CONDICIONAL NEURONAL DE CASPASA 3 EN
CONDICIONES FISIOLÓGICAS Y PATOLÓGICAS**

Memoria presentada por la Graduada M^a Angustias Roca Ceballos para optar al título de doctora por la Universidad de Sevilla.

A mi abuelo, José Ceballos Villegas

***Lo que eres es lo que has sido, lo que serás
es lo que haces a partir de ahora.***

Siddhārtha Gautama.

ABREVIATURAS

A β : Beta-amiloide

ABP: Placas beta-amiloides

AD: enfermedad de Alzheimer

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

AIFs: Factores inductores de apoptosis

AIM2: *Absent in melanoma 2*

Akt: Proteína quinasa B

AMPA: Ácido α -amino-3 hidroxil-5 metil-4 isoxazol propiónico

AMPA: Receptor de ácido α -amino-3 hidroxil-5 metil-4 isoxazol propiónico

APAF1: *Apoptosis protease-activating factor-1*

APP: Proteína Precursora Amiloide

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ASC: *Apoptosis-associated speck-like protein*

BAD: *BCL2 associated agonist of cell death*

BAK: *Bcl-2 homologous antagonist/killer*

BAX: *BCL2 associated X protein*

BCL-2: *B cell CLL/lymphoma-2*

BCL-B: *Bcl-2-like protein 10*

BCL-W: *Bcl-2-like protein 2*

BCL-XL: *B-cell lymphoma-extra large*

BH: *Dominios de homología de BCL-2*

Bid: *BH3 interacting-domain death agonist*

Bik: *Bcl-2-interacting killer*

BimL: *Bcl-2-like protein 11*

Blk: *B lymphocyte kinase*

BMF: *Bcl-2-modifying factor*

BOE: *Boletín oficial del estado*

BOK: *Bcl-2 related ovarian killer*

BSA: *Albúmina sérica bovina*

C3: *Caspasa-3*

CA1: *Cornu Ammonis área 1*

CA3: *Cornu Ammonis área 3*

CAD: DNAsa activada por Caspasa

CAMK: Calcio/calmodulina proteína quinasa II

CARD: Dominio de reclutamiento de caspasas

Casp3: Caspasa 3

ciAP: Inhibidores celulares de la apoptosis

CRE-LoxP: Sistema específico de la recombinasa

DAMP: Señales moleculares asociadas a daños

dATP: *Deoxyadenosine triphosphate*

DD: *Death domain*

DED: *Death-effector domain*

Diablo: *Direct Inhibitor of Apoptosis-Binding protein with LOw pI*

DIAP1: Drosophila IAP

DISC: Complejo señalizador de inducción de muerte

DLP: Depresión a largo plazo

DR: Receptores de muerte

DR2: receptor de muerte 2

DR4: receptor de muerte 4

DR5: receptor de muerte 5

DR6: receptor de muerte 6

Dronc: *Death regulator Nedd2-like caspase*

EA: Enfermedad de Alzheimer

ED: Espinas dendríticas

EDAR: *Ectodysplasin A receptor*

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EEM: Error Estándar de la Media

ELA: Esclerosis lateral amiotrófica

ER: Retículo endoplasmático

FADD: Dominio de muerte asociado a Fas

Fas: Fas Cell Surface Death Receptor

Fas L: Ligando de FAS

FasR: Fas Receptor

fEPSP: Potenciales post-sinápticos excitatorios de campo

FLIPL: *FLICE-Like inhibitory protein long*

Flox/Del: Floxeado/Delecionado Cre- (Hemidelecionado)

Flox/Flox: Doble floxeados en caspasa

GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

Glua1: Glutamate A1

GSDMD: Gasdermina D

GSK3 β : Glucógeno sintetasa quinasa 3

GZM: Granzimas

h: Horas

HAMP: Procesos moleculares que alteran la homeostasis

HD: Enfermedad de Huntington

HFS: Estimulación a alta frecuencia

HRK: *Bcl-2-modifying factor*

IAP: Inhibidor de apoptosis

Iba1: Molécula adaptadora de unión a calcio

ICE: *Interleukin-1 β -Converting Enzyme*

IL-1 β : Interleuquina 1

IL-18: Interleuquina 18

KO: *Knock-out*

LPS: Lipopolisacárido

LSD: Diferencia mínima significativa

LoxP: Fragmento de ADN reconocido por CREr

LTD: depresión a largo plazo

LTM: Memoria a largo plazo

LTP: Potenciación a largo plazo

MCL1: *Induced myeloid leukemia cell differentiation protein*

Min: Minutos

MOMP: Membrana mitocondrial externa

NAIP: *Neuronal apoptosis inhibitory protein*

NeuN: Proteína nuclear neuronal

NGF: Factor de crecimiento nervioso

NF-KB: *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NK: *Natural killer*

NLR: *Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors*

NLRP1: *Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors*

NLRP3: *Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors*

NLRC4: *Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors*

NMDA: N-metil_d-aspartato

NMDAR: Ácido N-metil-D-aspártico

NOXA: *Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1*

PAMP: Patrones moleculares asociados a patógenos

Pb: Pares de base

PBS: *Phosphate Buffered Saline*

PBS-T: Tritón X-100 diluido en PBS

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PD: Enfermedad de Parkinson

PPR: Ratio de pulsos pareados

PRF1: Perforina

PRRs: Receptores de reconocimiento de patógenos

PSD95: Proteína de densidad postsináptica

PSEN1/2: 1 y 2 del gen de la Presenilina

PUMA: *p53 upregulated modulator of apoptosis*

RD: Real decreto

RIP: *Receptor-interacting protein*

RIP1 o RIPK1: *Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1*

RIPK3: *Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3*

Rpm: Revoluciones por minuto

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

S: Segundos

SCN: Sistema nervioso central

Smac: *Second mitochondria-derived activator of caspase*

SNC: Sistema nervioso central

STM: Memoria a corto plazo

STP: Potenciación a corto plazo

TAE: Tris base/ácido acético/EDTA

tBID: *Truncated Bid*

TBS: *Tris-buffered saline*

T CD8: *Cytotoxic T lymphocytes*

TEM: Microscopía electrónica de transmisión

TNF: *Tumor necrosis factor*

TNFR1: *Tumor necrosis factor receptor*

TRADD: *Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain*

TRAF2: *TNF receptor-associated factor 2*

TRAF5: *TNF receptor-associated factor 5*

TRAIL: *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand.*

TRAILR1: *TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1*

TRAILR2: *TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 2*

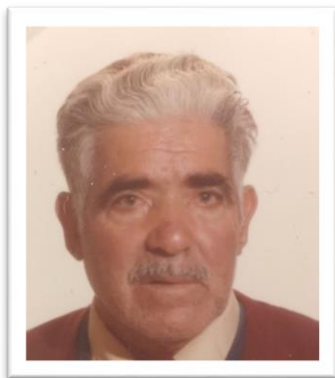
TRAMP: Receptor TNFR1, DR1

WT: *Wild type*

XIAP: *X-linked inhibitor of apoptosis protein*

AGRADECIMIENTOS

Puedo decir, que este apartado es el que, para mí, tiene más sentido de toda la tesis, y es que nada de esto podría haber sido posible sin la motivación, la ayuda y el apoyo de las personas han estado conmigo siempre.



El primero y más importante, eres tú, a quien dedico esta tesis y todos estos años de trabajo en investigación: José Ceballos Villegas, mi abuelo. Todo esto empezó por ti, desde que siendo pequeña me propuse dar todo lo que pudiera por contribuir en la medida que fuera posible en la investigación de esas enfermedades que, en algún momento, te hubiesen arrebatado la sonrisa o los recuerdos. Para mejorar la vida de las personas que padezcan estas enfermedades y de las familias que los acompañan. Porque tantos sueños y una vida tan querida y bonita como la tuya no merecían ser enturbiados. He tenido la suerte de poder llevarlo a cabo, dando igual las horas, el trabajo o el dinero, lo único importante ha sido contribuir lo máximo posible. ¡Por eso siempre he querido estar metida en todo! Ahora que esta etapa se acaba y escribo esto no sé cómo sentirme ni que decir, solo agradecerte haber impulsado este propósito y haberme estado ayudando y queriendo tanto, en los momentos más complicados y también en los felices, aunque haya sido desde lejos, yo te siento siempre a mi lado y sé que siempre lo vas a estar. Te quiero.

En segundo lugar, agradecérselo a mis padres. A ti mamá por todos los días y noches de estudio que te has pasado a mi lado desde pequeña, por quitarle importancia y hacer que me olvidara de todos los agobios, que no han sido pocos siendo como soy. Gracias por enseñarme desde

pequeña que es lo verdaderamente importante dentro del trabajo y de la vida. Gracias por haber vivido esta etapa sintiéndolo como si fuera tuyo y ayudándome tanto. Gracias por ser un modelo de mujer a la que admirar. A ti papá gracias por tantísimas risas como las que nos hemos pegado estudiando, por estar siempre orgulloso de mí independientemente de cómo saliera todo. Gracias por acabar sacándome siempre una risa ante cualquier problema que me preocupara, así se hacían pequeños. Gracias por demostrarme lo que es la tenacidad y la constancia y como gracias a eso se acaba consiguiendo todo lo que te propongas.

A mi hermana gracias por ayudarme a querer ser mejor cada día, por haber celebrado conmigo cada paso hasta aquí como si fuera tuyo y por preocuparte siempre por mí a pesar de todo. A mi hermano porque he crecido siendo tu sombra y me has ayudado a ser la mujer que soy hoy en día, gracias por haberme regalado al mejor sobrino que podría haber imaginado.

Gracias a Fran, porque no haga falta escribirle nada.

Agradecer a mis directores de tesis, José Luis y Rocío. A José Luis gracias ante todo por la oportunidad de desarrollar este trabajo y por siempre tener una sonrisa y ganas de ayudar ante cualquier cosa que necesitémos, eres el mayor ejemplo que conozco de lo que es ser un gran profesional, jefe y científico. A Rocío, gracias a nivel profesional por haberme ayudado a crecer tanto, porque en estos años a tu lado he adquirido seguridad, he aprendido a ser independiente y a creer en mi trabajo. A nivel personal, gracias por haber formado un grupo con los cuatro que éramos en un inicio que acabó dándome muchos de los mejores momentos del doctorado, gracias por tu apoyo en el inicio de esta etapa, por siempre estar disponible para hablar y por alegrarte tanto de lo bueno que fue llegando.

Como no, agradecer a Javier Vitorica y a Marisa Vizuete, por darme la primera oportunidad dentro de la investigación, gracias por todo lo aprendido y lo vivido en ese laboratorio y gracias por abrirme la puerta a conocer el laboratorio donde he podido terminar lo que siempre he

querido. Gracias a todos con los que compartí tantos buenos momentos y risas y de los que aprendí tanto, gracias por ayudarme y motivarme, gracias a Viky, Sebastián, Virtú, Elena y Luisa.

Gracias al personal del CITIUS I y II (Juan Luis Rivas, Modesto Caraballo, Laura Navarro y Cristina Reyes) por facilitarnos tanto el trabajo y por acudir en cada momento de incompreensión o crisis ante cualquier problema que surgiera. Gracias especialmente a Asunción Fernández Estefane, no solo por las horas en el confocal, sino por siempre tener una sonrisa y esa voluntad por ayudar y animar, gracias por enseñarme que sea cual sea la edad, la ilusión por la ciencia y por seguir aprendiendo y superándose nunca se pierden, por tener esa vitalidad y alegría y por hacer bonita cada mañana o tarde trabajando allí.

Gracias a Vicente por toda la ayuda y los ánimos cada vez que salía con cara de loca de comportamiento, solo él y mi salud mental, saben todas las horas que he echado en esa sala.

Me quedaría sin páginas para agradecer todo lo que me gustaría, a todo el grupo con el que he compartido estos años y de los que me llevo tanto cariño y recuerdos.

Rocío Martínez, Ana, Antonio J y Marti, son con los que más tiempo he podido compartir. No solo sois grandísimos profesionales, sino que transmitís alegría, estáis pendientes y os preocupáis por cómo nos sentimos todos los que estamos allí, estáis dispuestos a ayudar siempre, hacéis del laboratorio algo todavía más bonito. Muchas gracias por todas las risas, las bromas, las charlas, el apoyo y los consejos.

Miguel, Manolo y José Antonio, aunque con ellos haya podido compartir menos momentos, estoy agradecida de todo lo que me han enseñado y de todas las risas y anécdotas compartidas.

Como no agradecer a Carmen, que cada vez que entrabas al laboratorio con mala cara tenía algo que decirte que acababa alegrándote, por todas las charlas y risas apoyada en su puerta y por tener la seguridad que no iba a haber problemas en un tema tan temido como es la burocracia, eso sí, sus regañinas eran lo más temido del laboratorio.

Gracias a todas las personas que han pasado por el laboratorio para completar el máster o la carrera, llenos de ilusión y que me han permitido enseñar y aprender a partes iguales, gracias a Marta, Miguel, Estefanía, Lidia y Maite.

A ti Emilio no puedo incluirte en el grupo anterior, aunque te tenga aún en el móvil como Emilio TFM, y es que, aunque pasaste por el laboratorio te has terminado quedando y ayudándome hasta el último momento, siendo incluso salvador en estos últimos meses. Gracias por todas las quedadas y por tantísima risa, por mantener la fe en la ciencia y por todo lo que queda.

A Rafa, gracias por millones de cosas, desde enseñarme el mindfulness, a cómo cuidar nuestra planta absorbe-energías. Gracias por ser tan buena persona a pesar de las circunstancias que te rodeen, por ser auténtico y buen amigo.

Gracias a ti, Juan Carlos, porque conseguiste que los comportamientos fueran divertidos (una auténtica proeza) por ser un ejemplo de persona trabajadora y profesional sin perder la alegría y las ganas de hacer el tonto, gracias por tu sinceridad, tu naturalidad y por tantos momentos buenos que espero seguir compartiendo.

Toca agradecer a una persona que tuvo una llegada a este laboratorio un poco abrupta y se convirtió en alguien fundamental para el grupo y para mí. Gracias a Paco por ayudarme tanto en el laboratorio, por ser tan gran profesional y aún mejor persona y amigo, como muchas veces te he dicho eres mi persona bonita, la mayoría de los agradecimientos que querría hacerte no corresponden a esta tesis, y eso dice mucho. Gracias por estar a mi lado y por toda la felicidad que me das.

Isa, tú fuiste la primera TFG a la que ayudé. Te he visto crecer y llegar paso a paso a donde estás ahora, alguien fundamental en el laboratorio. He visto como tu tesón, tu sinceridad y tu trabajo te han llevado a ser una auténtica investigadora. Gracias por todas las risas y las locuras de una cabra loca que has compartido conmigo y por toda la ayuda que siempre me has dado.

Y después de tantos años en el laboratorio y sin esperármelo, tuve una sorpresa y a la vez regalo, que fue que acabaras allí. Gracias a ti, Luis, por haber llegado siempre dispuesto a ayudar, por tener un fondo tan bonito, porque hemos sido el uno la sombra del otro durante este último trecho y porque lo más bonito lo hemos vivido y lo vamos a seguir viviendo fuera.

Imposible, aunque no sea de este laboratorio, no agradecer a Manu los millones de risas, la de karma negativo acumulado a tu lado y la ayuda que siempre estás dispuesto a dar, te mereces todas las cosas buenas que lleguen a tu vida.

A las personas que habéis llegado cuando yo ya terminaba, Jesús, Jennifer, Paco, Alicia, sois el presente del laboratorio. Además de trabajar y aprender todo lo que podáis, disfrutad y atesorad todos los momentos que podáis, reiros con vuestros compañeros hasta que sean amigos, que, al final, eso es lo más importante que os llevareis de estos años.

Como no, tenía que acabar con el grupo original, aquellos que compartíamos días y prácticamente noches en el laboratorio. Nada hubiese sido igual sin vosotros. A ti Alex, que cuando entré te temía de lo serio que parecías, y al final resultaste ser todo lo contrario, el mejor cortijero que voy a conocer (puede que el único). Gracias por todo lo que he aprendido de ti, por las partidas al dixit y por las risas y los brindis en el Pecata con todos los demás. Irene, a pesar de haber estado tantos años en la carrera juntas, nos conocimos de verdad cuando el mismo día comenzamos el doctorado. Hemos coincidido justo en el momento que debía ser, nos hemos acompañado y ayudado en este camino donde hemos estado pegadas tanto dentro como fuera del laboratorio. Gracias por esos años y por tantos recuerdos bonitos. Juan a ti muchas gracias por haber sido mi hermano mayor en el laboratorio, por haberme roto muchos estereotipos, porque gracias a ti, no solo he aprendido de ciencia, sino de mi misma, gracias por preocuparte siempre por mí y por ayudarme, y gracias por los momentos que quedan, eres un amigo de verdad.

El grupo que formamos es algo que creo todos recordaremos. Gracias por todos estos años.

Gracias por último a todos mis amigos que, aunque algunos no sepan ni como se llama esta tesis han estado durante estos años a mi lado, dándole color a los días. Gracias en especial a ti, Rocío Romero, por ser el significado de la palabra amistad hecha persona.

ÍNDICE

RESUMEN	1
1.INTRODUCCIÓN	5
1.1 CASPASAS	7
1.2 CASPASAS INFLAMATORIAS	10
1.3 CASPASAS APOPTÓTICAS	11
1.3.1 Vía intrínseca	12
1.3.2 Vía extrínseca	15
1.3.3 Vía perforina/granzima	17
1.3.4 Vía común	19
1.4 FUNCIONES NO APOPTÓTICAS DE LAS CASPASAS	20
1.5 CASPASA 3 FUNCIONES FISIOLÓGICAS Y NO APOPTÓTICAS	23
1.5.1 Desarrollo y diferenciación	23
1.5.2 Guía axonal	24
1.5.3 Poda axonal	26
1.5.4 Plasticidad sináptica	27
1.6 CASPASA 3 EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	31
2. OBJETIVOS	38
3. MATERIALES Y MÉTODOS	42
3.1 EXPERIMENTACIÓN ANIMAL	44
3.2 GENERACIÓN DE LAS LÍNEAS ANIMALES	45
3.3 IDENTIFICACIÓN Y GENOTIPADO	48
3.3.1 Marcaje	48
3.3.2 Extracción de ADN	49

3.3.3 PCR convencional y análisis de los productos de PCR	49
3.4 PRUEBAS CONDUCTUALES	52
3.4.1 Caracterización	52
3.4.2 Reconocimiento de objetos	53
3.4.3 Test en campo abierto	54
3.4.4 Laberinto en Y	54
3.4.5 Enterramiento de canicas	55
3.4.6 Formación de nido	55
3.4.7 Rotarod	55
3.5 OBTENCIÓN DE MUESTRA Y PERFUSIÓN INTRACARDIACA	56
3.6 ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE ARNm	57
3.6.1 Extracción de ARN	57
3.6.2 Retrotranscripción de ARN	58
3.6.3 PCR a tiempo real	59
3.7 ANÁLISIS HISTOLÓGICO	60
3.7.1 Inmunofluorescencia	60
3.8 TINCIÓN DE GOLGI-COX	62
3.9 ELECTROFISIOLOGÍA	63
3.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	65
4. RESULTADOS	67
4.1 ESTUDIO DE LA CASPASA 3 A NIVEL FISIOLÓGICO	69
4.1.1 DEMOSTRACIÓN DE LA DELECIÓN SELECTIVA DE CASPASA 3	69
4.1.2 ANÁLISIS FUNCIONAL. PROTOCOLO SHIRPA	72
4.1.3 CARACTERIZACIÓN CONDUCTUAL	76

4.1.3.1 Evaluación del comportamiento motor	76
4.1.3.2 Evaluación de la ansiedad y conducta social	78
4.1.3.2 Evaluación del aprendizaje y la memoria	79
4.1.4 ESTUDIO DE LAS ESPINAS DENDRÍTICAS	81
4.1.5 ELECTROFISIOLOGÍA	84
4.2 ESTUDIO DE LA CASPASA 3 A NIVEL FISIOPATOLÓGICO	87
4.2.1 CARACTERIZACIÓN CONDUCTUAL	87
4.2.1.1 Evaluación del comportamiento motor	87
4.2.1.2 Evaluación de la ansiedad	89
4.2.2 ANÁLISIS DE PLACAS A β	90
5. DISCUSIÓN	94
5.1 GENERACIÓN DEL MODELO CASPASA 3 ^{f/f} CAMK2 ^{CRE/WT} Y ESTUDIO DE LA PLASTICIDAD SINÁPTICA	97
5.2 GENERACIÓN DEL MODELO CASPASA 3 ^{f/f} CAMK2 ^{CRE/WT} APPXPS1 Y ESTUDIO DE LAS PLACAS DE A β	103
6. CONCLUSIONES	107
7. BIBLIOGRAFÍA	111
8. ANEXO I	136

RESUMEN

RESUMEN

La caspasa 3 (casp 3) es una proteasa ampliamente conocida por su papel clave como mediadora en la apoptosis neuronal. En la actualidad, se han puesto de manifiesto funciones de la casp 3 en el Sistema Nervioso Central (SNC) no relacionadas con la apoptosis, destacando su papel regulador en la neurogénesis y en la actividad sináptica. De esta manera, la función de la casp 3 no se reduciría al proceso de apoptosis, sino que la activación limitada de la casp 3 sería crítica para la función sináptica en el cerebro adulto sano, participando en la regulación de la plasticidad sináptica y en los mecanismos moleculares del aprendizaje y la memoria.

Las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (EA) están caracterizadas por la pérdida selectiva de poblaciones neuronales específicas, lo que a su vez desencadena la aparición de déficits cognitivos y/o motores. Además, varias proteínas relacionadas con la EA (APP, presenilinas) son procesadas por la casp 3 y por ello, en la actualidad, se postula que el procesamiento de estas proteínas por parte de la casp 3 podría estar directamente relacionado tanto con el inicio de la enfermedad, como con la ejecución final de la apoptosis neuronal (D'Amelio y cols. 2010). La casp 3 también ha sido relacionada con el incremento de la producción del péptido A β (Beta-amiloide), contribuyendo así a la patogénesis asociada a la EA (Tesco y cols. 2007).

El objetivo principal de esta tesis ha sido la generación de un modelo murino condicional neuronal de casp 3 que nos permitiese estudiar la implicación de esta caspasa en la plasticidad sináptica en el SNC y con él, que pudiésemos generar una línea de ratones en la que poder estudiar la implicación de la casp 3 en la EA. Para ello, una vez que conseguimos desarrollar nuestro modelo KO condicional de casp 3, se comprobó a través de un análisis funcional y una caracterización conductual, que estos ratones no presentaban ninguna anomalía excepto en la memoria a largo plazo. Tras estos resultados, mediante la realización de la tinción de Golgi-Cox de las espinas dendríticas, se observó que nuestro modelo murino presentaba diferencias en la densidad de las espinas dendríticas y en el porcentaje de cada tipo de espina, presentando menor

porcentaje de espinas cortas (maduras) y mayor porcentaje de espinas largas y delgadas (inmaduras). Finalmente, se estudió a través de técnicas electrofisiológicas, cómo la potenciación a largo plazo (LTP) se encontraba inhibida en esta línea de ratones. Estos resultados sugieren que la casp 3 tendría un papel fundamental en los procesos de aprendizaje y memoria, afectando a la LTP y a la plasticidad de las espinas dendríticas. Además, habríamos conseguido un modelo murino condicional neuronal de casp 3 que alcanza la edad adulta y no presenta cambios neuropatológicos, pudiendo ser la base de estudios futuros sobre la influencia de la casp 3 en la plasticidad sináptica y sobre los mecanismos moleculares que provocan dichas alteraciones.

En el ratón KO condicional de casp 3 APP/PS1, se comenzó comprobando, al igual que en el primer modelo, a través de una pequeña batería de comportamiento, que no existían anomalías que tuvieramos que tener en cuenta a lo largo del estudio. En este caso nos centramos en el análisis de la implicación de casp 3 en la generación de las placas de A β y en el estudio de la microglía presente en ratones de 6 meses. Para ello, analizamos a través de una inmunofluorescencia de triple marcaje, distintos parámetros morfológicos de las placas de A β además del porcentaje de microglía por área de A β , sin obtener resultados significativos en estos casos. Estudios a edades más avanzadas serían necesarios para completar el análisis de la influencia de casp 3 en la EA.

INTRODUCCIÓN

1.1 CASPASAS

Las caspasas constituyen una familia altamente conservada de cisteín proteasas cuya función principal está ligada a la regulación de la muerte celular programada (Hyman and Yuan, 2012). El nombre 'Caspasa', Cisteín- **ASP**ártico prote **ASAS** hace referencia a su actividad como proteasa, presentando una cisteína en su sitio catalítico, que ataca residuos que se encuentran después de un aspártico (en su extremo C- terminal), aunque en algunas ocasiones sucede tras un glutamato y, raramente seguido de residuos de fosfoserina (González Ramírez and Salvesen, 2018; Seaman et al., 2016).

La primera caspasa caracterizada fue la enzima convertidora de interleuquina-1 β o ICE (*Interleukin-1 β -Converting Enzyme*), relacionada con la maduración de la IL-1 β (Interleuquina-1 β) y posteriormente denominada caspasa 1 (Yuan et al. 1993). Fue en 1993 cuando se describió por primera vez el papel de las caspasas en la muerte celular al demostrarse que el gen *ced-3*, esencial en la apoptosis de *Caenorhabditis elegans*, codificaba una proteína cisteín proteasa homóloga a la enzima convertidora de interleuquina-1 β en humanos. A partir de entonces se han descritos numerosos miembros de esta familia en especies de mamíferos y no mamíferos (Yuan et al., 1993; Miura et al., 1993; Kumar et al., 1992).

Las caspasas se expresan en las células como precursores inactivos, denominados zimógenos o pro-caspasas cuyo procesamiento proteolítico (dimerización o autoproteolisis), iniciado por señales apoptóticas, da lugar a la conformación activa, un heterotetrámero compuesto por dos heterodímeros (Figura 1) (Kumar, 2006; Earnshaw et al., 1999). Su estructura primaria consta de un prodominio N-terminal, una subunidad grande (p20) y una subunidad pequeña (p10).

1. INTRODUCCIÓN

El centro catalítico se localiza en la subunidad p20 y contiene un residuo de cisteína que forma parte de una secuencia de aminoácidos muy conservada (Fuentes-Prior and Salvesen, 2004).

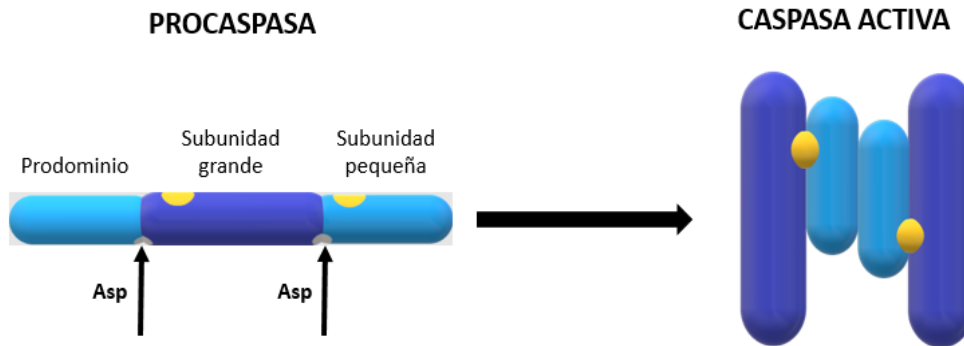


Figura 1. Estructura y procesamiento proteolítico de las caspasas.

El prodominio N-terminal contiene un Aspartato para la (auto) proteólisis y varía en longitud dependiendo del tipo de caspasa. Las caspasas efectoras tienen prodominios cortos (aproximadamente 25 residuos), mientras que tanto las caspasas inflamatorias como las iniciadoras tienen prodominios largos (aproximadamente 100 a 200 residuos). Estos prodominios contienen dominios efectores de muerte, DED (*death effector domain*) o dominios de reclutamiento de caspasas, CARD (*caspase recruitment domain*), los cuales median la dimerización y/o reclutamiento de las caspasas en complejos más grandes para facilitar su activación (Mackenzie and Clark, 2012; Kumar, 2006). Actualmente se conocen 18 caspasas en mamíferos, 13 de las cuales se expresan en humanos (Eckhart et al., 2008; Shalini et al., 2014).

La familia de caspasas presentes en humanos se dividen en tres grupos fundamentales, esta división está basada en la similitud de sus secuencias y en sus funciones biológicas (Salvesen and Ashkenazi, 2011). El primer grupo está constituido por las caspasas inflamatorias, CASPASA 1, 4,

5, 11, 12. Estas caspasas poseen un prodominio largo con un dominio de reclutamiento de caspasas (CARD). El segundo grupo lo constituyen las caspasas efectoras de la apoptosis, CASPASAS 3, 6 y 7, que contienen prodominios cortos y son consideradas las ejecutoras de la apoptosis. Por último, el tercer grupo está formado por las caspasas iniciadoras, CASPASAS 2, 8, 9, 10, caracterizadas por un prodominio largo que contienen dominios efectores de muerte, (DED) o dominios de reclutamiento de caspasas (CARD) (Figura 2) (Shalini et al., 2014).

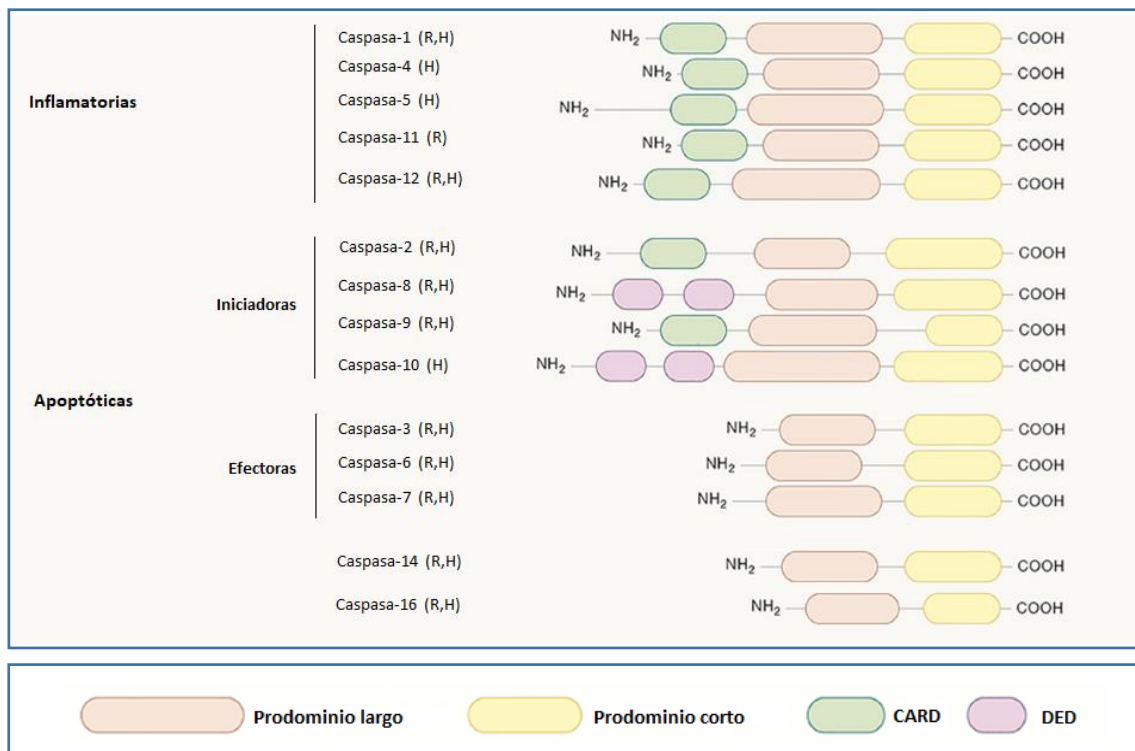


Figura 2. Clasificación de las caspasas codificadas por el genoma de mamíferos según sus funciones biológicas y la similitud de sus secuencias. Adaptado de (Opdenbosch and Lamkanfi, 2019)

1. INTRODUCCIÓN

1.2 CASPASAS INFLAMATORIAS

El primer indicio de la implicación de las caspasas en los procesos inflamatorios vino con el descubrimiento del papel de la caspasa 1 en el procesamiento y maduración de miembros de la familia de citoquinas como IL-1 β (Interleuquina 1 beta) e IL-18 (Interleuquina 18), mediadores críticos de procesos inflamatorios (Thornberry et al. 1992; Ghayur et al. 1997). En humanos, las caspasas inflamatorias incluyen las CASPASAS 1, 4, 5 y 12, siendo la caspasa 1 el miembro prototipo de esta familia. La activación de las caspasas inflamatorias tiene lugar a través de la formación de complejos de proteínas multimoleculares ensamblados en el citosol, denominados inflamasomas. La estimulación de los receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs) por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), señales moleculares asociadas a daños (DAMP) o procesos moleculares que alteran la homeostasis (HAMP), activan la conformación de estos complejos (Agostini et al. 2004; Martinon et al. 2002).

En los inflamasomas canónicos (mediados por caspasa 1), la proteína adaptadora ASC (*apoptosis-associated speck-like protein*) es la pieza central del complejo, conectando los sensores del inflamasoma con la caspasa 1 (Yi, 2017). Los sensores de inflamasoma incluyen miembros de la familia NLR (*Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors*) (NLRP1, NLRP3, NAIP y su adaptador NLRC4), AIM2 y pirina. La naturaleza del sensor define el nombre del complejo inflamasoma (por ejemplo, el inflamasoma NLRP3) (Shalini et al., 2014).

En los inflamasomas no canónicos (mediados por caspasa 4/caspasa 5), la caspasa 4 podría participar en un proceso de activación que no requiere los componentes propios del inflamasoma, ya que actuaría directamente como sensor de lipopolisacárido citosólico (LPS) y como caspasa efectora (Martinon et al., 2002; Kayagaki et al., 2011; Hagar et al., 2013).

Tras la activación, la caspasa 1 desencadena dos eventos principales: una muerte celular inflamatoria rápida, denominada piroptosis, y la activación de la IL-1 β e IL-18. La piroptosis se debe a la escisión mediada por caspasa 1 de una proteína denominada gasdermina D (GSDMD). El fragmento N-terminal escindido se oligomeriza en la membrana plasmática dando lugar a la formación de un poro. En inflamasomas no canónicos, la caspasa 4 escinde el GSDMD, desencadenando directamente la piroptosis (Cornut et al., 2020).

El papel fisiológico de la caspasa 5 sigue sin estar claro, aunque se conoce que esta caspasa detecta el LPS citosólico y las vesículas de la membrana externa de *Pseudomonas aeruginosa* (Bitto et al., 2018). La Caspasa-11, se ha sugerido como activador de caspasa-1 (Wang et al., 1998).

1.3 CASPASAS APOPTÓTICAS

Desde su descubrimiento, el conocimiento de la muerte celular programada o apoptosis, y, por tanto, de las caspasas como sus principales mediadores, ha sido centro de numerosas investigaciones. La apoptosis se define como una forma de muerte celular programada que elimina células individuales dañadas de un organismo preservando la estructura del tejido circundante (Parrish et al., 2013).

El término de muerte celular programada fue expuesto por primera vez en 1964, al descubrir que la muerte celular que tiene lugar en el desarrollo embrionario, no ocurre de forma accidental, sino que es fruto de una secuencia de etapas controladas que concluyen en la eliminación de la célula de una forma local y temporalmente definida (Lockshin et al., 1964). Años más tarde, en un artículo de Kerr y colaboradores de 1972, fue introducido el término apoptosis, así como la descripción de muchas de las características morfológicas propias de este proceso (Kerr et al. 1972). Sin embargo, no fue hasta mediados de la década de 1990 cuando la apoptosis se vinculó con la activación de las caspasas al descubrir que actuaban sobre sustratos

1. INTRODUCCIÓN

intracelulares claves para promover la muerte celular (Cerretti et al. 1992; Nicholson et al. 1995; Alnemri et al. 1996; Liu et al. 1996; Thornberry and Lazebnik 1998). Debido al papel fundamental que desempeñan las caspasas durante la apoptosis, tanto su activación como sus funciones están altamente reguladas (Parrish et al., 2013).

Las investigaciones describieron dos vías apoptóticas principales: la vía extrínseca o del receptor de muerte y la vía intrínseca o mitocondrial. Con los años, se demostró que ambas vías se encontraban vinculadas y que las moléculas de una vía podían influir en la otra (Igney y Krammer, 2002). Existe también una vía adicional que se relaciona con la citotoxicidad mediada por células T y con la muerte celular dependiente de perforina-granzima. Finalmente, todas estas vías convergen en una vía común de ejecución (Elmore, 2007).

1.3.1 Vía intrínseca

La apoptosis por vía intrínseca, puede activarse por diversos estímulos, entre los que se encuentran, daño genotóxico (radiación ionizante o quimioterapias citotóxicas dirigidas al ADN), daño a orgánulos celulares o plataformas de señalización (estrés del retículo endoplasmático [ER], daño mitocondrial, inhibición de vías de señalización intracelular), estimulación mitogénica excesiva o muerte celular inducida por un oncogén (oncogén c-Myc). Incluso es posible que las células lleguen a la apoptosis por la falta de un estímulo adecuado, como por ejemplo la ausencia de factores de crecimiento o la privación de nutrientes (Singh et al., 2019).

Esta diversidad de estímulos se refleja en la variedad de niveles y tipos de efectores que inician el proceso de apoptosis por vía intrínseca. Independientemente del estímulo o el efector que comience el proceso, todos convergen en la activación de diferentes proteínas pro-apoptóticas pertenecientes a la familia BCL2, principales reguladoras de esta vía (Hollville et al., 2019).

La familia de proteínas BCL-2 (*B cell CLL/lymphoma-2*), denominada así, por ser éste el primer miembro descrito, se compone de una variedad de proteínas antiapoptóticas y proapoptóticas. La regulación entre estos dos grupos de proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas dicta la supervivencia o la estimulación del proceso apoptótico (Chipuk et al., 2010). Cada miembro de esta familia contiene uno o más dominios de homología de BCL-2 (BH) (Singh et al., 2019).

Las proteínas antiapoptóticas (BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL1, BCL-B) contienen cuatro dominios de homología BCL-2 (BH1-4). Por otra parte, las proteínas proapoptóticas, se dividen en proteínas efectoras (BAX, BAK y BOK) y proteínas BH3 (Bad, Bid, Bik, Blk, BimL, PUMA, NOXA, BMF, HRK) (Chipuk et al., 2010). Originalmente se describió que las proteínas efectoras contenían solo los dominios BH1-3, sin embargo, estudios posteriores revelaron un motivo BH4 conservado (Kvansakul et al., 2008). Las proteínas BH3 contienen un único dominio BH (BH3).

La presencia de alguno de los estímulos apoptóticos anteriormente mencionados da lugar a la activación de las proteínas solo BH3 a través de diferentes mecanismos, que incluyen, inducción transcripcional, escisión o desfosforilación. Estas proteínas tienen como función principal activar a las proteínas BCL2 proapoptóticas e inactivar las proteínas BCL2 antiapoptóticas. De esta forma, algunas proteínas BH3 conocidas como activadores directos (Bim, Bid, Puma) interactúan con Bax promoviendo su cambio conformacional y su inserción en las membranas mitocondriales, o con Bak, constitutivamente localizada en la membrana, provocando su activación (Chipuk et al., 2010; Hapko et al., 2012; Shamas-Din et al., 2011).

1. INTRODUCCIÓN

Esta activación provoca la formación de poros que dan como resultado la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP), lo que resulta, en la liberación de factores proapoptóticos (citocromo C, Smac / Diablo / AIFs) del espacio intermembrana mitocondrial hacia el citosol (Batandier et al., 2004). El citocromo C liberado se une al dominio WD de los monómeros de APAF1 (*Apoptosis protease-activating factor-1*), provocando un cambio conformacional de APAF1 en el que queda expuesto un dominio de oligomerización y unión de nucleótidos que es capaz de unirse a dATP. Esta unión induce un cambio conformacional adicional en APAF1, exponiendo tanto su dominio CARD, que se encontraba bloqueado por su conformación original, así como, sus dominios de oligomerización, los cuales permiten que varias proteínas APAF1 se ensamblen formando un complejo conocido como apoptosoma (Figura 3) (Acehan et al., 2002). La activación de la caspasa 9 se produce mediante la unión de procaspasa 9 al dominio de reclutamiento de caspasa (CARD) de la proteína adaptadora Apaf-1. La caspasa 9 activa es capaz de activar la procasp 3, la cual da comienzo al proceso de apoptosis (Figura 4) (Bratton and Salvesen, 2010). El resto de proteínas liberadas al citosol, junto con el citocromo C, se encargan de favorecer el proceso de apoptosis de diferentes formas. Las proteínas SMAC/DIABLO se unen a las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP) inhibiéndolas, permitiendo que el proceso continúe.

Otro grupo de proteínas conocido como factores inductores de la apoptosis (AIF) se trasladan al núcleo para inducir la fragmentación del ADN y la condensación de la cromatina (Xuebo et al., 2019).

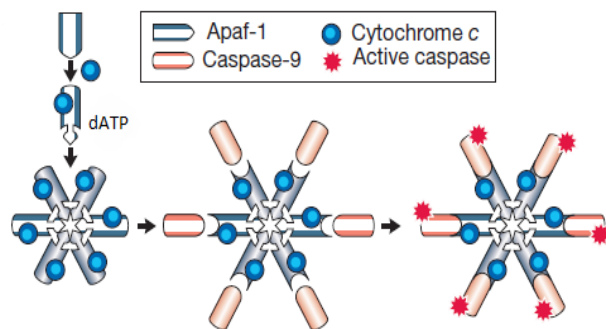


Figura 3. Representación esquemática de la formación del apoptosoma. Adaptado de (Hengartner, 2000).

1.3.2 Vía extrínseca

La vía de señalización extrínseca que induce la apoptosis está mediada por receptores de muerte (DR) transmembrana que transmiten la señal apoptótica al interior de la célula tras su interacción con ligandos específicos provenientes del exterior celular (Irmiler et al., 1997). Estos receptores de muerte pertenecen a la familia TNF (*Tumor necrosis factor*) (Gaur and Aggarwal, 2003) y contienen dominios extracelulares ricos en cisteína, además de un dominio citoplasmático de aproximadamente 80 aminoácidos denominado “dominio de muerte” (DD, *Death domain*) (Ashkenazi y Dixit, 1998). Existen ocho tipos de receptores de muerte (DR1-DR8), que se pueden dividir en dos grupos, en función de su proteína adaptadora.

El primer grupo incluye los receptores Fas (DR2), TRAILR1 (DR4) y TRAILR2 (DR5) (*TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 y 2*), que pueden ser activados por el ligando Fas (*Fas ligand*) y TRAIL (*Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*). Tras la interacción con sus respectivos ligandos, se produce la formación y activación del complejo denominado DISC (*Death-inducing signaling complexes*), que constituye la plataforma que regula la activación de la caspasa 8 (Kretz et al., 2019). Este complejo se establece cuando los receptores reclutan la molécula adaptadora FADD (*Fas-associated death domain*) mediante la interacción entre sus dominios de muerte (DD) (C-terminal). Esta molécula constituye la conexión entre los receptores de muerte y la activación de las caspasas iniciadoras (Thornberry et al., 1998; Hofmann et al., 1997). Una vez producida la unión con el receptor, la molécula adaptadora FADD, interacciona a través de su dominio efector de muerte (DED, del inglés *Death-effector domain*) (N-terminal) con la procaspasa 8, dando lugar a su activación catalítica y al comienzo del proceso apoptótico (Cavalcante et al., 2019).

1. INTRODUCCIÓN

El segundo grupo incluye los receptores TNFR1 (DR1), TRAMP (DR), DR6 y EDAR. Estos receptores reclutan a la proteína adaptadora TRADD (*Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain*) y se unen a los factores asociados al receptor TNF-2,5 (TRAF2,5), la proteína RIP1 o RIPK1 (*Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1*) y a los inhibidores celulares de la apoptosis (cIAP), formando un complejo de señalización denominado complejo I (Cavalcante et al., 2019). De la formación del complejo I pueden derivar dos vías de señalización distintas. La primera de ellas promueve la supervivencia celular induciendo la transcripción de proteínas antiapoptóticas vía NF-KB (*nuclear factor-kappa B*).

En la segunda vía, el complejo I se interna en la célula por endocitosis y durante este proceso el receptor se disocia del resto de la proteína. De esta forma, el dominio de muerte de la proteína RIP puede interactuar con el dominio de muerte de FADD, dando lugar al reclutamiento y activación de la caspasa 8 (Figura 4) (Micheau and Tschopp, 2003).

Los procesos descritos anteriormente son suficientes para inducir la muerte celular apoptótica en ciertos tipos de células, denominadas células de tipo I. Sin embargo, en las células conocidas como células de tipo II, los niveles relativamente bajos del complejo DISC, así como la inhibición ejercida por los IAP sobre la casp 3, hacen que estos procesos sean insuficientes (Scaffidi et al., 1998; Barnhart et al., 2003; Yin et al., 1999; Ozoren and El-Deiry, 2002). De esta forma, las células de tipo II requieren una vía dependiente de mitocondria para amplificar su señal apoptótica, confluyendo así, las vías intrínseca y extrínseca de apoptosis. En estas células, la caspasa 8 actúa sobre la proteína BID citosólica, dando lugar a una forma truncada C-terminal de la misma (tBID) que se transloca a la mitocondria activando la vía intrínseca (Figura 4) (Youle and Strasser, 2008; Tait and Green, 2010).

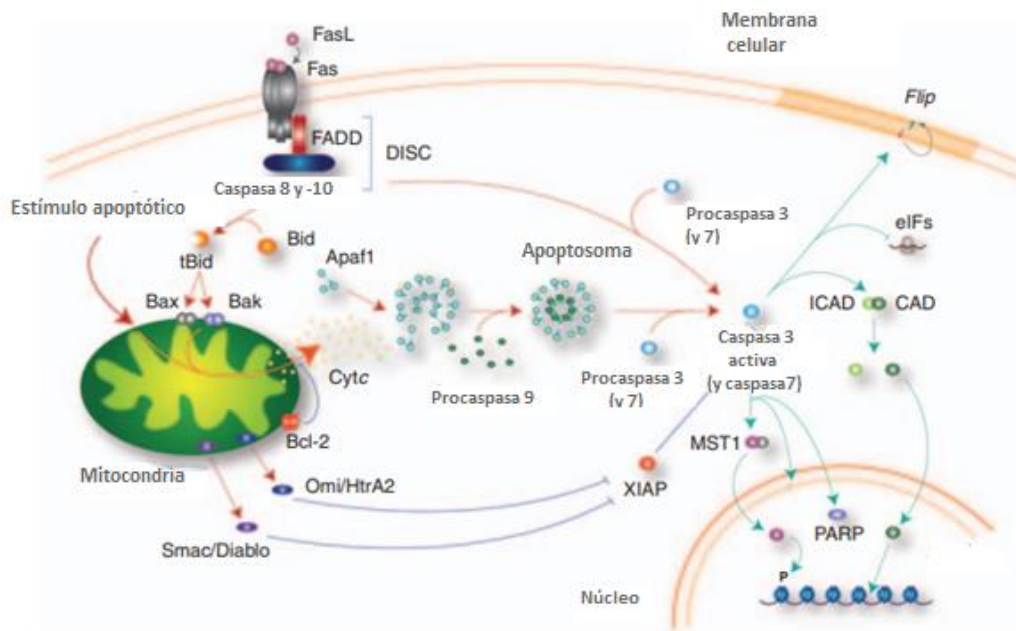


Figura 4. Rutas de apoptosis. Aparecen representadas la vía intrínseca, activada por diversos estímulos y regulada por la familia de proteínas BCL y la vía extrínseca mediada por los receptores de muerte transmembrana (modificado de D'amelio et al., 2010).

1.3.3 Vía perforina/ granzima

Además de la activación de la vía del receptor de muerte por la interacción Fas/FasL, la exocitosis de gránulos citotóxicos con perforina (PRF1) y granzimas (GZM) es un mecanismo principal de muerte de algunas células del sistema inmunitario como son las células T CD8+ o las NK (*natural killer*). Estas células liberan su carga de gránulos citotóxicos al espacio intercelular, formado tras el proceso de reconocimiento (Sordo-Bahamonde et al., 2020).

1. INTRODUCCIÓN

Las perforinas, al ser liberadas, se agregan y forman un poro en la membrana de la célula diana, permitiendo la entrada de las granzimas. Si la alteración de la membrana no puede ser neutralizada por la célula diana, se produce la muerte celular por inflamación rápida y lisis (necrosis). Sin embargo, si se puede restaurar la integridad de la membrana, las granzimas que han penetrado en la célula inducen la muerte celular, impulsando la activación de la vía intrínseca a través de la activación de Bid o la inducción del citocromo C, aunque también puede activar de forma directa a la casp 3 (Figura 5) (Voskoboinik et al., 2006; Backes et al., 2018; Elmore, 2007).

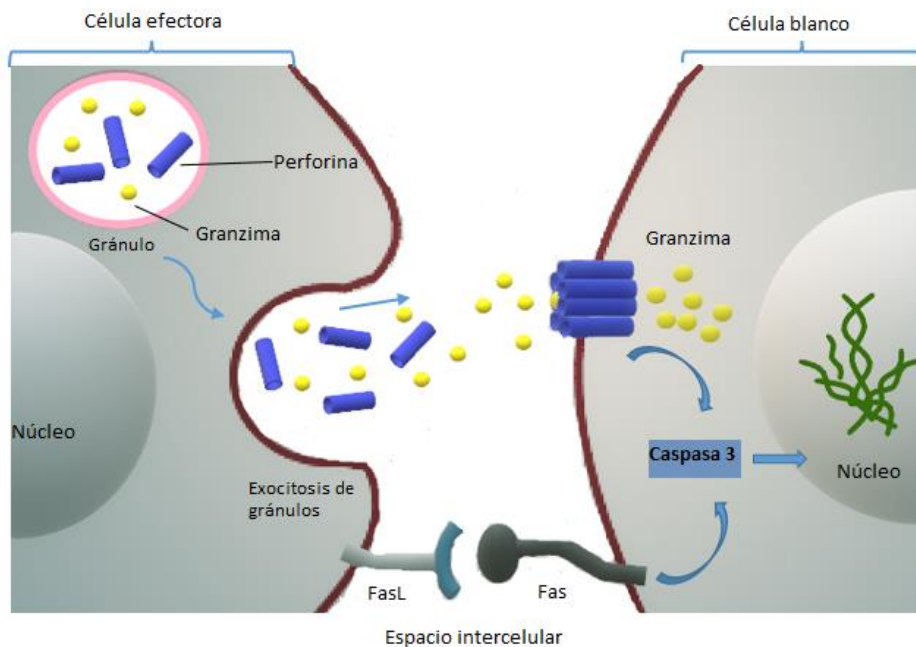


Figura 5. Representación esquemática de la vía perforina /granzima.

1.3.4 Vía común

Las vías anteriormente descritas confluyen en una vía común, que comienza con la activación de las caspasas efectoras. Estas caspasas actúan sobre proteasas, que degradan las proteínas del núcleo y del citoesqueleto y sobre endonucleasas citoplasmáticas que fragmentan el ADN y provocan la destrucción del núcleo (Bratton and Salvesen, 2010). Ejemplo de estos sustratos serían la endonucleasa CAD, la cual una vez activada induce la rotura del ADN dentro de los núcleos a través de la señalización de la proteína p53 y la gelsolina, proteína que actúa como núcleo de unión de los filamentos de actina, que al escindir-se por la actividad de la casp 3, desestructura dichos filamentos colapsando así el citoesqueleto y con él sus funciones (Cavalcante et al., 2019).

Todo esto da como resultado cambios citomorfológicos que incluyen reducción del tamaño celular, formación de ampollas citoplasmáticas, fragmentación nuclear, condensación y fragmentación de materiales genéticos (cromatina, ADN) y la formación de pequeñas vesículas conocidas como ApoBD que contienen restos de las células apoptóticas y que finalmente son fagocitados por neutrófilos, macrófagos o células dendríticas (Cavalcante et al., 2019; Xu et al., 2019). La apoptosis tiene lugar durante todas las etapas de la vida como un mecanismo homeostático para preservar una población celular adecuada en los tejidos, sin embargo, se encuentra intensificada durante el desarrollo y el envejecimiento (Kerr et al., 1972; Jacobson et al., 1997). Por ejemplo, durante el desarrollo, la apoptosis es fundamental para el sistema nervioso y el sistema inmune, ya que surgen de una sobreproducción de células que más tarde deben someterse a un proceso de muerte celular, para controlar el número de células mitóticamente activas o eliminar las células inmaduras que no hayan entablado conexiones neuronales o especificidades antigénicas productivas (Nijhawan et al., 2000; Opferman and Korsmeyer, 2003).

1. INTRODUCCIÓN

No obstante, la apoptosis también ocurre como mecanismo de defensa a través de la eliminación de las células invadidas por patógenos ante una reacción inmunitaria, o como componente fundamental de un daño celular provocado por una lesión, enfermedad o agentes nocivos, ayudando a eliminar células inflamatorias o regulando la cicatrización entre otras funciones (Norbury and Hickson, 2001; Greenhalgh, 1998).

1.4 FUNCIONES NO APOPTÓTICAS DE CASPASAS

Desde que las caspasas fueron relacionadas con el proceso de apoptosis, la mayoría de las investigaciones se han enfocado en el estudio de su activación y funciones durante el proceso de muerte celular (Baena-López et al, 2018; Venero et al, 2011). Sin embargo, en los últimos años se han descubierto numerosas evidencias que relacionan las caspasas con otros modelos de muerte celular como la necroptosis, la autofagia o la piroptosis (Shalini et al., 2014) e incluso con funciones no apoptóticas en considerables procesos celulares como en la inflamación, la diferenciación celular y proliferación entre otros (Yi and Yuan, 2009).

Los avances en las investigaciones acerca de los mecanismos apoptóticos se desarrollaron durante varios años en *C. elegans*, sin embargo, la generación de mutantes de *Drosophila* y el desarrollo posterior de estudios *in vivo* mostraron importantes funciones no apoptóticas de las caspasas (Mukherjee and Williams, 2017). El primer papel no apoptótico de las caspasas descrito fue en la individualización de espermátidas en *Drosophila* (Arama et al., 2003). La individualización es el proceso por el cual se eliminan las conexiones citoplasmáticas entre las espermátidas de cada quiste para dar lugar a los espermatozoides individuales. Durante este proceso, los autores encontraron la presencia de caspasas efectoras en el complejo de individualización, un complejo de membrana citoesquelética que se mueve a lo largo del quiste hacia la cola del esperma.

De la misma forma, los mutantes de Dronc, homólogo de caspasa 9 en mamíferos, no realizaron la individualización completa (Arama et al., 2003; Arama et al., 2005). Con respecto al papel de las caspasas en los distintos tipos de muerte celular, destaca el papel de la caspasa 8 en la necroptosis o necrosis programada (Vandenabeele et al, 2010).

El término necroptosis apareció por primera vez en 2005 describiendo un caso de muerte celular necrótica regulada (Degterev et al, 2005). Este tipo de muerte se induce normalmente cuando se ha bloqueado la actividad caspasa y se caracteriza morfológicamente por un aumento del volumen celular, inflamación de los orgánulos y ruptura de la membrana plasmática (Vandenabeele et al, 2010). Para entender el papel de la caspasa 8 en la necroptosis es necesario recordar la vía extrínseca de la apoptosis. En dicha vía, la interacción de TNF con su receptor daba lugar a la formación del complejo I que posteriormente se interna en la célula de forma que RIP1 se disocia de la membrana plasmática e interactúa con TRADD, FADD, procaspasa 8 y cFLIPL formando el complejo IIa. Llegados a este punto, la caspasa 8 escindiría RIP1 y RIP3 activando posteriormente la vía normal de apoptosis, sin embargo, una inhibición farmacológica o genética de la caspasa 8 evita la escisión de RIP1 y RIP3 que son fosforiladas, produciéndose la formación de otra plataforma denominada ripoptosoma y la activación de los mecanismos de la necroptosis (Zhao et al., 2015; Vanden Berghe et al., 2014; Vandenabeele et al, 2010). De esta forma se podría decir que la caspasa 8 tiene un papel inhibitorio de la necroptosis durante el desarrollo al actuar sobre RIP1 y RIP3 (Kaiser et al., 2011; Oberst et al., 2011; Zhang et al., 2011).

Otros tipos de muerte celular relacionados con caspasas son la piroptosis, dependiente de la caspasa 1 y la caspasa 11 o la autofagia (Shalini et al., 2014).

1. INTRODUCCIÓN

Además de participar en los tipos de muerte celular anteriormente mencionados, las caspasas asesinas desarrollan funciones no apoptóticas en otros procesos celulares como la diferenciación celular, la activación microglial, procesos inflamatorios, el desarrollo neural y embrionario o la regeneración de tejidos (Baena-López et al, 2018; Venero et al, 2011; Connolly et al., 2014; Julien and Wells, 2017). Dentro de la diferenciación celular existen numerosos estudios que relacionan las caspasas con la diferenciación de distintos tipos celulares. En 2008 el trabajo de Fujita y colaboradores mostró la incapacidad de células madre embrionarias de ratones mutantes en casp 3 y caspasa 9 para diferenciarse (Fujita et al., 2008). Además, la activación de caspasa se ha observado en la diferenciación eritroide, o en la diferenciación de monocitos de sangre periférica humana (Sordet et al., 2002). En el estudio de Rebe y colaboradores se muestra como la escisión de RIP1 mediada por caspasa 8 es necesaria para la regulación de NF- κ B durante la diferenciación de macrófagos (Rebe et al., 2007). También es destacable el descubrimiento del papel clave de las caspasas 3/7 y 8 en el proceso de la activación proinflamatoria de la microglía (Burguillos et al., 2011).

La caspasa 8 también se ha relacionado en la regulación de la activación del inflammasoma y en la maduración y regulación de las citoquinas (Miwa et al., 1998; Vince et al., 2012; Maelfait et al., 2008).

Respecto a la reparación y regeneración de tejidos, la función de las caspasas ha sido demostrada en numerosos modelos experimentales (Cikalaetal., 1999; Cheraetal., 2009; Tseng et al., 2007; Fuchs and Steller, 2011; Vlaskalin et al., 2004). En el caso de los mamíferos, algunos tejidos como el hígado pueden experimentar una regeneración considerable después de una lesión (Taub, 2004). Estudios como el de Li y colaboradores en 2010, demuestran como en ratones deficientes en casp 3 y 7 la regeneración del hígado, así como la cicatrización de heridas se encuentran alteradas (Li et al., 2010).

Estas solo son una pequeña parte de las funciones no apoptóticas de las caspasas, otras funciones no apoptóticas a nivel neuronal serán abarcadas más adelante.

Es necesario destacar la importancia del estudio de los papeles no apoptóticos de las caspasas, ya que una mejor comprensión de estos, puede tener implicaciones mucho más importantes de lo que se pensaba, proporcionando estrategias mejoradas para terapias efectivas en el área de la inflamación, las enfermedades neurodegenerativas, autoinmunes y el cáncer (Shalini et al., 2014).

1.5 CASPASA 3. FUNCIONES FISIOLÓGICAS Y NO APOPTÓTICAS

La casp 3 es la caspasa efectora mejor caracterizada. Los estudios acerca de la cascada de caspasas y la caracterización de sustratos, indican que la casp 3 tiene funciones diferentes y superpuestas con las caspasas 6 y 7.

Esta caspasa interviene en multitud de procesos no apoptóticos, algunos de ellos descritos anteriormente. Dentro del SNC, la casp 3 también ha demostrado jugar un importante papel en gran cantidad de eventos, entre los que destacan su participación en el control de la ramificación y guía de crecimiento axonal, el desarrollo y la diferenciación neural (D'Amelio et al., 2010), la poda dendrítica (Williams et al., 2006) o la plasticidad sináptica (Li et al., 2010).

1.5.1 Desarrollo y diferenciación

Como se ha mencionado anteriormente, el papel de las caspasas en el neurodesarrollo es fundamental en el control de la población neuronal y en la eliminación de las células inmaduras que no hayan entablado conexiones neuronales óptimas.

1. INTRODUCCIÓN

En el estudio de Kuida y colaboradores de 1996, la mayor parte de ratones deficientes en casp 3 morían durante el desarrollo embrionario o durante las primeras tres semanas postnatales, presentando una reducción en la apoptosis temprana, un aumento en el espesor de la superficie cerebral y una acumulación inadecuada de progenitores neurales, poniendo de manifiesto el papel fundamental de la casp 3 en el desarrollo del sistema nervioso (Leonard et al., 2002; Kuida et al., 1996; Pompeiano et al., 2000). Estudios posteriores realizados en ratones deficientes en caspasa 9 y Apaf 1, componentes fundamentales de la vía intrínseca, demostraron que ésta es la vía principal empleada durante el desarrollo neuronal. Los ratones deficientes en caspasa 9 presentan letalidad perinatal además de importantes malformaciones del cerebro como hiperplasia prominente del prosencéfalo u obstrucciones de los ventrículos laterales, así como del tercer ventrículo (Hakem et al., 1998; Kuida et al., 1998).

Los ratones deficientes en Apaf 1 también mostraron alteraciones morfológicas durante su etapa embrionaria, presentando un crecimiento excesivo del diencéfalo y mesencéfalo, plegamiento anormal y tamaño reducido de las vesículas telencefálicas (Cecconi et al., 1998).

Los ratones deficientes en caspasa 9 y Apaf 1 no presentaron activación de casp 3, manteniendo un fenotipo neural similar al de ratones deficientes en esta caspasa, lo que indica una activación lineal de casp 3 a través del apoptosoma (que contiene Apaf 1 y caspasa 9) durante el neurodesarrollo y pone de manifiesto su importancia en este proceso (D'Amelio et al., 2010).

1.5.2 Guía axonal

Durante el desarrollo, el crecimiento y la guía axonal resultan esenciales para conseguir una organización celular ordenada y una red de conexiones neuronales funcional. Irregularidades en esta estructura axonal pueden causar cambios en el comportamiento (Smear et al., 2007) y trastornos en el desarrollo neuronal (Wong, 2008).

En este proceso, los axones son guiados hacia su destino por moléculas que son secretadas o se encuentran unidas a la membrana y que funcionan como atrayentes o repelentes con el fin de guiar a los axones en crecimiento a regiones específicas (Tessier-Lavigne and Goodman, 1996; Battum et al., 2015). Dentro de las moléculas de guía axonal destacan las proteínas netrinas, slits, semaforinas y efrinas.

En 2003 un estudio de Campbell y Holt demostró por primera vez una relación entre la casp 3 y el proceso de guía axonal mediado por Netrina-1. En experimentos *in vitro* se observó una activación de casp 3 en los conos de crecimiento de las neuronas de la retina estimuladas con Netrina-1, además de la participación de esta caspasa en el efecto quimiotrófico atractivo mediado por este factor guía (Figura 6) (Campbell and Holt, 2003).

Estudios posteriores *in vivo*, pusieron de manifiesto una estimulación de la actividad de casp 3 por el factor guía Slit1a y su receptor Robo 2, en células ganglionares retinianas embrionarias de pez cebra, donde esta caspasa actuaba promoviendo tanto la formación como la retracción de ramificaciones de forma local (Figura 6) (Campbell and Okamoto, 2013). También se ha relacionado la casp 3 a través de la vía Bax/Bak con el control de la ramificación axonal en etapas postnatales.

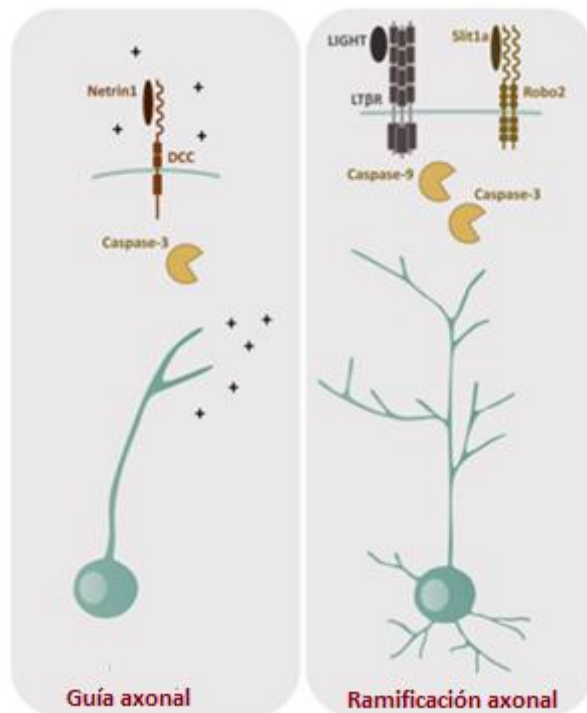


Figura 6. Procesos de guía axonal y ramificación axonal mediados por caspasa 3. Adaptado de (Hollville and Deshmukh, 2018).

1. INTRODUCCIÓN

Los ratones que presentaban una inactivación postnatal temprana de Bax/Bak en la corteza motora, no lograban desarrollar movimientos voluntarios finos a causa de una pérdida de refinamiento de la conectividad (Gu et al., 2017).

1.5.3 Poda axonal

La poda axonal permite la eliminación selectiva de la sinapsis, axones o dendritas sin que se produzca la muerte del cuerpo celular (Yaron and Schuldiner, 2016). Este proceso, que tiene lugar durante el desarrollo postnatal temprano, es fundamental para el refinamiento de la conectividad neuronal y el establecimiento de una red madura y funcional (Riccomagno and Kolodkin, 2015; Schuldiner and Yaron, 2014), relacionándose su desregulación con trastornos como la esquizofrenia (Penzes et al., 2011) o el autismo (Hutsler and Zhang, 2010). Los primeros estudios descartaron un papel de la caspasa en la degeneración axonal (Finn et al., 2000; Raff et al., 2002; Watts et al., 2003; Sagot et al., 1995), sin embargo, estudios posteriores en *Drosophila melanogaster* revelaron la existencia de caspasas activas de forma localizada dentro de los axones en degeneración, además de una implicación de la caspasa iniciadora Dronc, Dark (dApaf1) o la DIAP1 (*Drosophila* IAP) en la poda axonal (Williams et al., 2006; Kuo et al., 2006). Con el fin de identificar la participación de las caspasas en este proceso, se realizaron investigaciones en vertebrados con neuronas dependientes del factor de crecimiento nervioso (NGF), además de estudios sobre la función de varios componentes de la maquinaria apoptótica a través de enfoques farmacológicos y de eliminación (Ernsberger, 2009; Nikolaev et al., 2009). Otros estudios han utilizado eliminaciones genéticas para confirmar que la caspasa 9 y la casp 3 son esenciales para la poda axonal y encuentran que la caspasa 6, BAX y XIAP también están involucrados (Figura 7) (Simon et al., 2012; Cusack et al., 2013; Unsain et al., 2013; Simon et al., 2016).

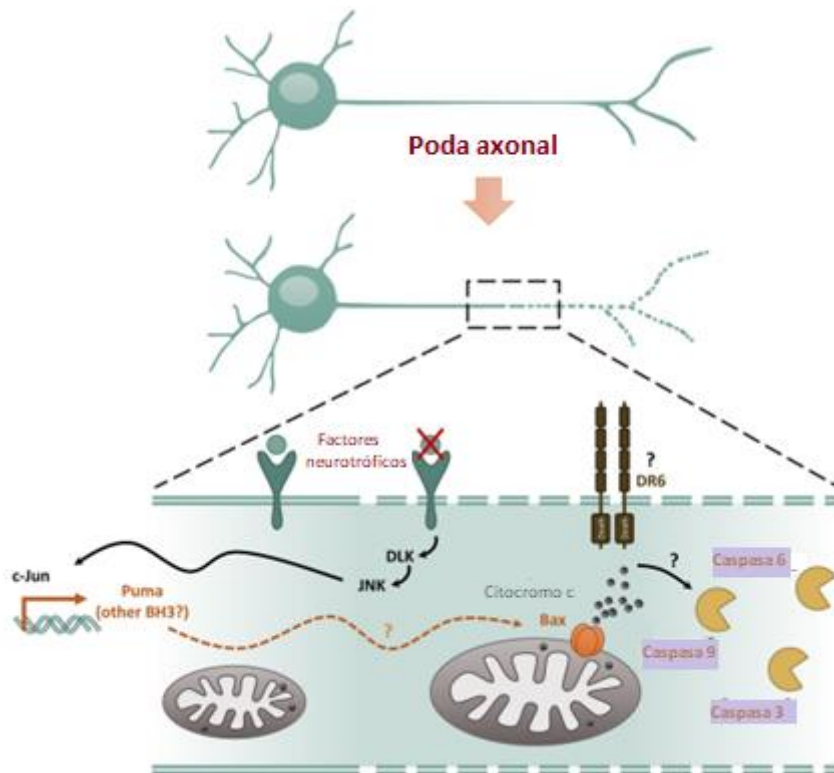


Figura 7. Representación esquemática del mecanismo de poda axonal y de la implicación de casp 3 en el mismo. En ausencia de factores neurotróficos (NGF), la activación de la vía JNK promueve la regulación positiva transcripcional de Puma lo que da como resultado la activación de Bax, la despolarización mitocondrial y la activación de las caspasas, lo que lleva a la degeneración local del axón. Además, el receptor de muerte DR6 podría desempeñar un papel en la activación local de la cascada de caspasas. Adaptado de (Hollville and Deshmukh, 2018).

1.5.4 Plasticidad sináptica

La plasticidad sináptica consiste en la modificación de las conexiones neuronales establecidas durante el desarrollo como respuesta a la experiencia previa y adaptación a los cambios ambientales (Mukherjee and Williams, 2017; Li and Sheng, 2012; Hollville and Deshmukh, 2017). Esta modificación de las conexiones puede dar lugar a una intensificación duradera de la transmisión sináptica, lo que se conoce como potenciación a largo plazo (LTP) o a una reducción de la transmisión, conocida como depresión a largo plazo (LTD) (Artola et al., 1990).

1. INTRODUCCIÓN

Este mecanismo se ha asociado con el aprendizaje, la memoria espacial y la memoria en el hipocampo, la memoria del miedo en la amígdala, la memoria de tareas en la corteza y el aprendizaje motor en el cerebelo (Collingridge et al., 2010), considerándose como el mecanismo principal del aprendizaje y la memoria (Mukherjee and Williams, 2017).

La forma mejor caracterizada de LTP y LTD se observa en las sinapsis excitatorias en respuesta al L-glutamato y está mediado por dos receptores postsinápticos ionotrópicos, el receptor del N-metil-D-aspartato (NMDA) y el receptor del ácido α -amino-3 hidroxil-5 metil-4 isoxazol propiónico (AMPA) (Esteban et al., 2003; Bliss and Collingridge, 1993).

Una característica interesante de la plasticidad sináptica es el cambio morfológico que acompaña a la modificación funcional de la sinapsis. Mientras que la LTP se asocia con la formación y el crecimiento de las espinas dendríticas (Engert and Bonhoeffer, 1999; Kopec et al., 2006; Matsuzaki et al., 2004; Nagerl et al., 2004), la LTD se asocia con su contracción y pérdida (Nagerl et al., 2004; Okamoto et al., 2004; Zhou et al., 2004; Oh et al., 2013).

La hipótesis de que las caspasas podrían estar implicadas en la LTD fue propuesta por primera vez por Mattson y colaboradores (Mattson et al., 1998; Mattson et al., 1999). Esta idea fue reforzada por investigaciones que demostraban que las subunidades AMPAR eran sustratos de estas proteínas (Chan et al., 1999; Lu et al., 2002). Estudios posteriores emplearon inhibidores de caspasa en experimentos *in vivo* demostrando un papel funcional de éstas en la formación de la memoria espacial, de evitación y auditiva, localizándose activa en el hipocampo y la corteza (Dash et al., 2000; Stepanichev et al., 2005; Huesmann and Clayton, 2006).

Años más tarde, Li y colaboradores demostraron como la casp 3 activa desempeñaba una función esencial en la depresión a largo plazo en el hipocampo, acelerando la internalización de los receptores AMPA. En este estudio, en los ratones carentes de casp 3, la LTD dependiente del receptor NMDA se encontraba inhibida mientras que la LTP podía inducirse con normalidad.

El bloqueo del proceso de LTD también se podía impulsar a través de la inhibición farmacológica de la casp 3 y -9, sin embargo, no se veía afectada por la inhibición de la caspasa 1 (Li et al., 2010). En 2011, Jiao y colaboradores demostraron que la activación de la casp 3 y 9 en la LTD dependía de la activación de la vía intrínseca. En esta investigación se comprobó cómo en los ratones deficientes de BAD o BAX, la depresión a largo plazo se encontraba alterada. También se observó como en las neuronas sometidas a LTD, BAD se encontraba activada a niveles menores que en la apoptosis y de forma transitoria, lo que conducía a una activación moderada de la casp 3, suficiente como para promover la internalización de los receptores AMPA sin llegar a inducir la muerte celular (Jiao and Li, 2011).

Existen al menos dos formas en las que la casp 3 puede influir en la LTD. En la primera se encuentran involucradas la casp 3, Akt (proteína quinasa B) y GSK3 β (glucógeno sintasa quinasa 3). La activación de casp 3 provoca la escisión de Akt y, por tanto, la supresión de su actividad quinasa, terminando con la inhibición que ejercía sobre GSK3 β . De esta forma PSD95 (proteína de densidad postsináptica) es fosforilada directamente por GSK3 β , dando lugar a la desestabilización de PSD95 dentro de las densidades postsinápticas (Figura 8) (Asselin et al., 2001; Li et al., 2010c; Nelson et al., 2013; Peineau et al., 2008).

La segunda forma implica la activación de la calcineurina a través de la escisión de casp 3 (Mukerjee et al., 2000). La calcineurina es una proteína fosfatasa regulada por el flujo de calcio dependiente del receptor NMDA (NMDAR) y cuya activación provoca la desfosforilación de la subunidad GluA1, desencadenando la internalización de los receptores AMPA (Beattie et al., 2000; Esteban et al., 2003). Esta proteína también actúa a través de la vía mitocondrial, desfosforilando BAD para así promover la activación no apoptótica de la casp 3 (Figura 8) (Wang et al., 1999).

1. INTRODUCCIÓN

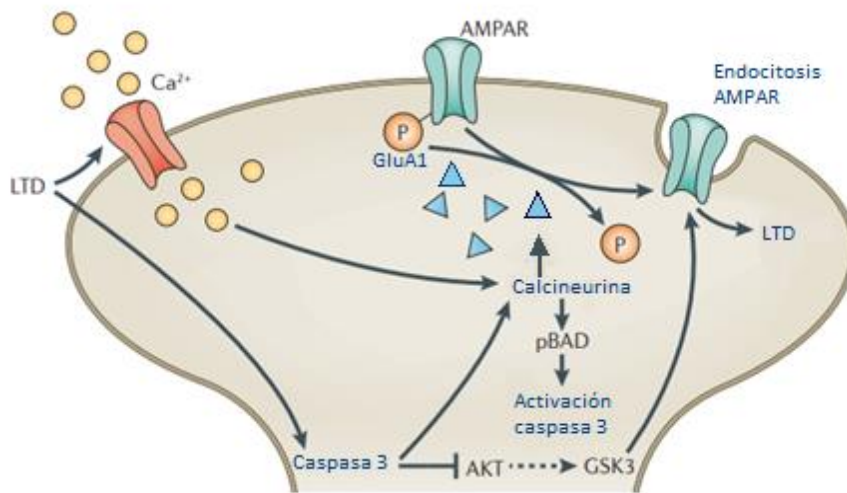


Figura 8. Internalización de los receptores AMPA en el proceso de LTD. Adaptado de (Hyman and Yuan, 2012).

Existe cierta controversia respecto al papel de la casp 3 en la LTP, ya que a pesar de que el estudio de Li y colaboradores no relacionan a la casp 3 con la LTP, son varios estudios *in vitro* e *in vivo* los que sí relacionan a esta caspasa con la potenciación a largo plazo (Mattson et al., 1998; Chan et al., 1999; Chan and Mattson, 1999; Glazner et al., 2000; Mattson, 2000; Kudryashov et al., 2001, 2002; Shimohama et al., 2001a, b; Yan et al., 2001; Gilman and Mattson, 2002). Uno de los más destacados es el de Gulyaeva y colaboradores, donde a través de registros electrofisiológicos de rodajas de cerebro de rata, demuestran que la actividad de casp 3 es esencial para la LTP en la región CA1 del hipocampo (Gulyaeva et al., 2003).

1.6 CASPASA 3 EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La demencia puede definirse como una pérdida de la función cerebral causada por diferentes patologías que afecta al menos a dos de los distintos dominios cognitivos, como la memoria, el lenguaje o el comportamiento (Ferri et al., 2005; McKhann et al., 2011). La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa principal de demencia en personas mayores de 60 años, representando del 50 al 75% de los casos. Según datos estadísticos, las mujeres son más propensas a la EA que los hombres y este riesgo aumenta aún más con la edad (Torromino et al., 2020). Diversas patologías como enfermedades cardiovasculares, hipertensión y diabetes, al igual que los hábitos de vida nocivos aumentan el riesgo de esta afección (Galle et al., 2020).

En 1906, Alois Alzheimer describió por primera vez esta patología observada desde 1901 en Auguste Deter, una mujer de 51 años que presentaba trastornos cognitivos, desorientación, delirios, además de otros cambios en el comportamiento y que finalmente falleció a los cuatro años y medio del diagnóstico (Alzheimer A, 1907).

A pesar de que las dos principales características fisiopatológicas de la enfermedad, las placas del péptido beta amiloide y los ovillos neurofibrilares de la proteína tau hiperfosforilada, fueron descritas de manera cualitativa en 1906, no se identificaron hasta mediados de la década de 1980 (Glennner and Wong, 1984; Brion et al., 1985; Grundke-Iqbal et al., 1986; Kosik et al., 1986; Pollock et al., 1986). Las técnicas de diagnóstico se modernizaron en 1984 y se perfeccionaron en 2011 y 2018 con el uso de biomarcadores y la caracterización de las etapas clínicas de la enfermedad (McKhann et al., 1984, 2011; Sperling et al., 2011; Jack et al., 2018).

La mayoría de casos de esta patología cursan como una enfermedad esporádica a partir de los 65 años, denominándose EA de inicio tardío. Sin embargo, también puede cursar de manera hereditaria o familiar desarrollándose antes de los 65 años, en este caso se le conoce como EA

1. INTRODUCCIÓN

de inicio temprano o familiar. La forma hereditaria constituye menos del 5% de los casos diagnosticados (Alzheimer's Association, 2019) y solo entre el 1% y 2% se hereda de forma autosómica dominante, caracterizándose por presentar una edad de inicio muy temprana, una progresión más rápida y por asociarse con síntomas neurológicos que se observan con menor frecuencia en la EA esporádica (Bateman et al., 2012). Los casos de Alzheimer familiar suelen estar relacionados con las mutaciones en los genes de la Proteína Precursora Amiloide (APP) y las subunidades 1 y 2 del gen de la Presenilina (PSEN1/2) (Armstrong, 2019; Gatz et al., 2006).

La EA se caracteriza por un deterioro cognitivo progresivo acompañado de un impacto funcional. Los signos clínicos se pueden dividir en dos grupos: síndrome amnésico, relacionado con lesiones del hipocampo y los signos focales, causados por lesiones en la neocorteza, responsables, por ejemplo, de la agnosia visual o la afasia progresiva (Calderon-Garcidueñas and Duyckaerts, 2018).

El inicio de la enfermedad se caracteriza por un deterioro temprano del aprendizaje y la memoria, desorientación progresiva espaciotemporal, seguido de un deterioro de la atención compleja, las funciones ejecutivas, el lenguaje, la función visuoespacial, la conducta y el comportamiento social (McKhann et al., 2011).

Desde el punto de vista neuropatológico, la EA se caracteriza fundamentalmente por la acumulación de placas del péptido beta amiloide (Selkoe, 2000 a,b) y los ovillos neurofibrilares de la proteína tau hiperfosforilada (Mandelkow, and Mandelkow, 2012), relacionándose también con la astrogliosis, el daño oxidativo, la muerte celular y con alteraciones de la neurotransmisión que deterioran la plasticidad sináptica y la cognición.

La hipótesis más estudiada hasta la fecha acerca de la formación de las placas de A β es la hipótesis de la cascada amiloide, expuesta por primera vez en 1992 por Hardy y Higgins (Hardy and Higgins, 1992). La APP es una proteína transmembrana relacionada con la formación de la sinapsis (Priller et al., 2006) y la plasticidad neuronal (Turner et al., 2003). En su estado

fisiológico, esta proteína es procesada por las enzimas α y γ secretasa, produciendo algunos polipéptidos solubles que pueden ser descompuestos y reciclados en la célula. Si por el contrario, APP es escindido por las secretasas β y γ de manera secuencial, se produce un péptido insoluble conocido como beta amiloide ($A\beta$). Estos péptidos se agrupan y forman placas beta-amiloides (ABP) (Pearson and Peers, 2004), las cuales, al ubicarse entre neuronas pueden afectar el proceso de señalización entre ellas (Salehi et al., 2004). También pueden dar lugar a respuestas inmunes que provocan procesos inflamatorios que dañan las neuronas circundantes (Sigurdsson et al., 2004) o pueden depositarse en el lado externo de los vasos sanguíneos conllevando una angiopatía (Hung et al., 2016).

En las enfermedades neurodegenerativas, la casp 3 puede contribuir al proceso de neurodegeneración crónica a través de la apoptosis, eliminando las neuronas que han acumulado agregados tóxicos o generando fragmentos tóxicos de varias proteínas específicas vinculadas a dichas patologías. Sin embargo, también se les puede atribuir papeles no tan obvios como iniciadoras del proceso degenerativo afectando a la sinapsis. El estudio de la activación no apoptótica de la casp 3 y su modulación es fundamental para la comprensión de los trastornos neurodegenerativos, así como para la aplicación de nuevas vías farmacológicas (D'Amelio et al., 2012; D'Amelio et al., 2010; Mukherjee and Williams, 2017).

Numerosos estudios han investigado el papel de las caspasas, y en concreto de la casp 3, en la EA. El procesamiento de proteínas como la APP o la presenilina por casp 3, su presencia de forma activa antes de la aparición de los ovillos neurofibrilares en modelos de ratón con sobreexpresión de tau (de Calignon et al., 2009; de Calignon et al., 2010) o un aumento de su actividad proporcional a la disminución de la memoria en un ratón con EA Tg2576 antes de la detección de placas (D'Amelio et al., 2011), sugiere la existencia de funciones no apoptóticas de la casp 3 en esta patología.

1. INTRODUCCIÓN

APP es una proteína clave en la EA. Varios estudios han demostrado como la escisión de APP mediada por casp 3 altera su procesamiento proteolítico normal favoreciendo la vía amiloidogénica (Gervais et al., 1999). Lo anterior sugiere un posible modelo de amplificación de fragmentos tóxicos de APP mediado por la casp 3. Este modelo fue propuesto por primera vez por Wellington y Hayden para la enfermedad de Huntington (Wellington and Hayden, 1997) y se basa en que la acumulación de fragmentos tóxicos generados por la escisión de casp 3 conduciría a una mayor disfunción mitocondrial y, por tanto, a una mayor activación de las caspasas, teniendo como última consecuencia la muerte neuronal. A la misma vez, la casp 3 podría deshabilitar funciones antiapoptóticas como la actividad de la presenilina que contribuiría a la amplificación de su propia función de muerte (Walter, J. et al., 1999; Tesco, G. et al., 2007).

Existen numerosos estudios acerca de la influencia de los fragmentos de A β en la inhibición hipocampal de la LTP y en la potenciación de la LTD (Cheng et al., 2009; Kim et al., 2001; Rowan et al., 2005; Shankar et al., 2008) a través de la activación de casp 3 vía BAX (Chen et al., 2013; Olsen and Sheng, 2012). Estudios *in vitro* en los que se aplicaron A β 1-42 durante dos horas en secciones de hipocampo, demostraron que existía una inhibición de la LTP. Esta inhibición mediada por A β dependía de la vía mitocondrial de apoptosis y de caspasa 3 (Olsen and Sheng, 2012; Jo et al., 2011).

Estudios *in vivo* con inhibidores intra-hipocampales de γ secretasa demostraron que los fragmentos de A β son importantes en la internalización de los receptores AMPA y en la estructura de las espinas dendríticas, potenciando la LTD e inhibiendo la LTP hipocampal a través de la activación de la casp 3 vía BAX. Esta caspasa escindiría Akt liberando la inhibición de la quinasa GSK3 β (Figura 9) (D'Amelio et al., 2011; Jo et al., 2011). Cuando estos mismos ratones se establecieron en un fondo genético nulo en Apaf 1 no mostraron niveles elevados de casp 3 activa, lo que demostró una participación de la vía mitocondrial (D'Amelio et al., 2011).

A pesar de la controversia que existe en la relación de la casp 3 en la modulación de LTP, la inhibición de LTP inducida por A β -42 no ocurre en ratones sin casp 3 (Jo et al., 2011).

También es destacable que los fragmentos de A β están implicados en la endocitosis de los receptores NMDA sinápticos, alterando su equilibrio y dando lugar a una reducción posterior de la señal de supervivencia (Parsons and Raymond, 2014).

Por otra parte, varios estudios han demostrado cómo la eliminación sináptica de los receptores AMPA inducida por A β puede producirse por la activación de la calcineurina (Hsieh et al., 2006; Wu et al., 2010, 2012; Zhao et al., 2010). La activación de la casp 3 o el aumento de los niveles de calcio, como consecuencia de la acumulación de A β (Kuchibhotla et al., 2008), activa la desfosforilación mediada por calcineurina y la internalización de los receptores AMPA de las zonas sinápticas. La eliminación de los receptores AMPA da lugar a la contracción de las espinas dendríticas y finalmente a su pérdida. (Figura 9) De esta forma, la activación de la casp 3 dependiente del apoptosoma en las espinas dendríticas del hipocampo se correlaciona con el inicio del deterioro de la memoria y la pérdida de las espinas dendríticas (D'Amelio et al., 2011).

En investigaciones con ratones transgénicos Tg4510 Tau que desarrollan ovillos neurofibrilares, se detectaron caspasas efectoras activas en neuronas antes de la aparición de los ovillos (de Calignon et al., 2010). La escisión, antes mencionada de Akt dependiente de casp 3 que elimina la inhibición de la GSK3 β , conlleva, además de una alteración en la plasticidad sináptica, la estimulación de la fosforilación de tau y por tanto la formación de ovillos neurofibrilares (Figura 9) (Hernández et al., 2010).

1. INTRODUCCIÓN

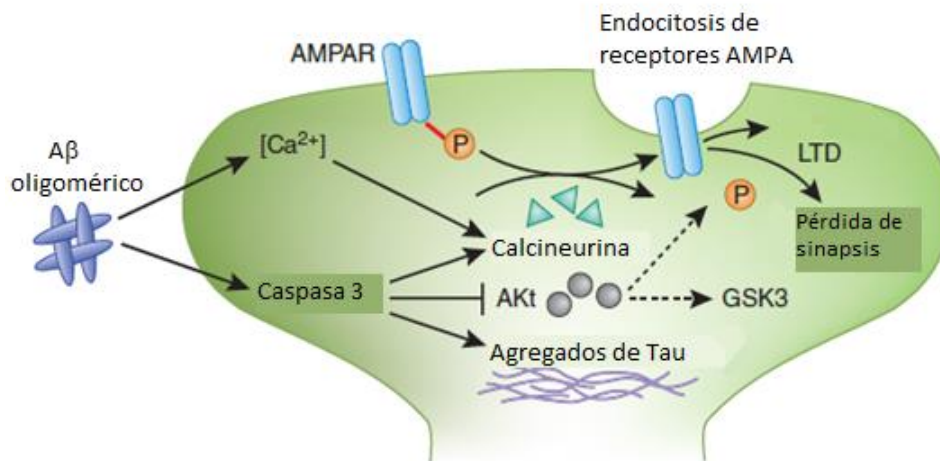


Figura 9. Representación esquemática de la influencia de Caspasa 3 en la enfermedad de Alzheimer. Adaptado de (Hyman, 2011).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

La casp 3 es una proteasa ampliamente conocida por ser clave actuando como mediadora en la apoptosis neuronal. En la actualidad, se han puesto de manifiesto funciones de la casp 3 en el SNC no relacionadas con la apoptosis, destacando su papel regulador en la neurogénesis y en la actividad sináptica. La finalidad de esta tesis doctoral es determinar el papel de la casp 3 en la plasticidad sináptica del SNC adulto en las áreas implicadas en memoria y aprendizaje (hipocampo) utilizando para ello un modelo murino condicional neuronal. Además, este modelo va a permitir estudiar la implicación de esta proteína en el progreso de enfermedades neurodegenerativas, centrándonos en la EA.

Para ello se establecieron objetivos más concretos. Se comenzó con la generación de un ratón condicional neuronal de casp 3 para el estudio de las posibles implicaciones funcionales de la ausencia de esta caspasa en la sinapsis en condiciones fisiológicas. Por otro lado, se generó un modelo experimental para el estudio de la función de la caspasa-3 y su papel como posible diana terapéutica en la EA.

El siguiente objetivo fue el análisis comportamental de ambos grupos de ratones experimentales y de sus correspondientes grupos controles, para evaluar el efecto de la ausencia de casp 3 sobre las funciones cognitivas, psicofisiológicas y motoras en el ratón condicional y en el modelo de EA casp 3 KO.

Como tercer objetivo se estableció el estudio morfológico de las espinas dendríticas de la región CA1 del hipocampo, principales estructuras implicadas en los procesos cognitivos, así como la caracterización electrofisiológica del hipocampo para estudiar la plasticidad sináptica en rodajas de cerebros de ratones condicionales de casp 3.

El último objetivo fue realizar un análisis morfológico de las placas amiloides en el modelo de EA casp 3 KO, con el fin de estudiar la implicación de la casp 3 en los procesos relacionados con las placas de A β .

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Todas las pruebas realizadas durante el desarrollo de este proyecto de tesis se llevaron a cabo de acuerdo con el documento “Guidelines of the European Union Council” (86/609/EU), siguiendo la normativa española (BOE 34/11370-421, 2013) en materia de obtención, transporte, cría, cuidado y manipulación de animales de experimentación y con la aprobación del comité ético científico de la Universidad de Sevilla.

Los ratones se mantuvieron en jaulas conjuntas, en grupos de 4-6 animales. Con condiciones controladas en todo momento a temperatura constante de $22\pm 1^{\circ}\text{C}$, una humedad relativa del 60%, con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas y acceso libre a comida y agua.

Para este proyecto se emplearon seis grupos de ratones de distinto genotipo. Los animales se subdividieron en dos grupos en función del objetivo de estudio. Como se muestra en la figura 10, se emplearon los ratones dobles transgénicos para el estudio de la implicación en condiciones fisiológicas de nuestra proteína de interés y los triples transgénicos para el estudio en condiciones fisiopatológicas de dicha proteína.

- 1.1. Doble floxado en Casp 3 (flox/ flox) CAMK2 cre + (C3KO)
- 1.2. Doble floxado en Casp 3 (flox/ flox) CAMK2 cre – (control)
- 1.3. Doble floxado en Casp 3 (flox/ flox) CAMK2 cre + APP + (C3KO APP+)
- 1.4. Doble floxado en Casp 3 (flox/ flox) CAMK2 cre + APP - (C3KO)
- 1.5. Doble floxado en Casp 3 (flox/ flox) CAMK2 cre – APP + (control APP+)
- 1.6. Doble floxado en Casp 3 (flox/ flox) CAMK2 cre – APP – (control)

CONDICIONES FISIOLÓGICAS	CONDICIONES FISIOPATOLÓGICAS
Casp 3 (flox/ flox) CAMK2 cre + (Experimental)	Casp 3 (flox/ flox) CAMK2 cre + APP +(Experimental)
Casp 3 (flox/ flox) CAMK2 cre – (Control)	Casp 3 (flox/ flox) CAMK2 cre + APP – (Control)
	Casp 3 (flox/ flox) CAMK2 cre – APP + (Control)
	Casp 3 (flox/ flox) CAMK2 cre – APP – (Control)

Figura 10. Subdivisión de los grupos de animales en función de las condiciones de estudio.

El grupo de dobles transgénicos fue estudiado a dos meses de edad, y el grupo de triples transgénicos fue estudiado a seis meses de edad. Los ratones Camk2 fueron cedidos amablemente por el Dr. Juan Pedro Bolaños de la Universidad de Salamanca, los ratones casp 3 por el Prof. Richard Flavell de la Universidad de Yale y los PS1xAPP por el Dr. Javier Vitorica.

3.2 GENERACIÓN DE LAS LÍNEAS ANIMALES

En la obtención de los modelos animales, se empleó el sistema de recombinación Cre/loxP. Para el desarrollo de este sistema es preciso el uso de dos líneas de ratones transgénicos. El ratón floxeado porta el gen de interés con un fragmento a delecionar flanqueado por dos secuencias loxP, y el ratón transgénico Cre con un promotor tejido-específico, cuenta con la expresión condicionada de la recombinasa Cre en determinados tipos celulares dependiendo del promotor empleado.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

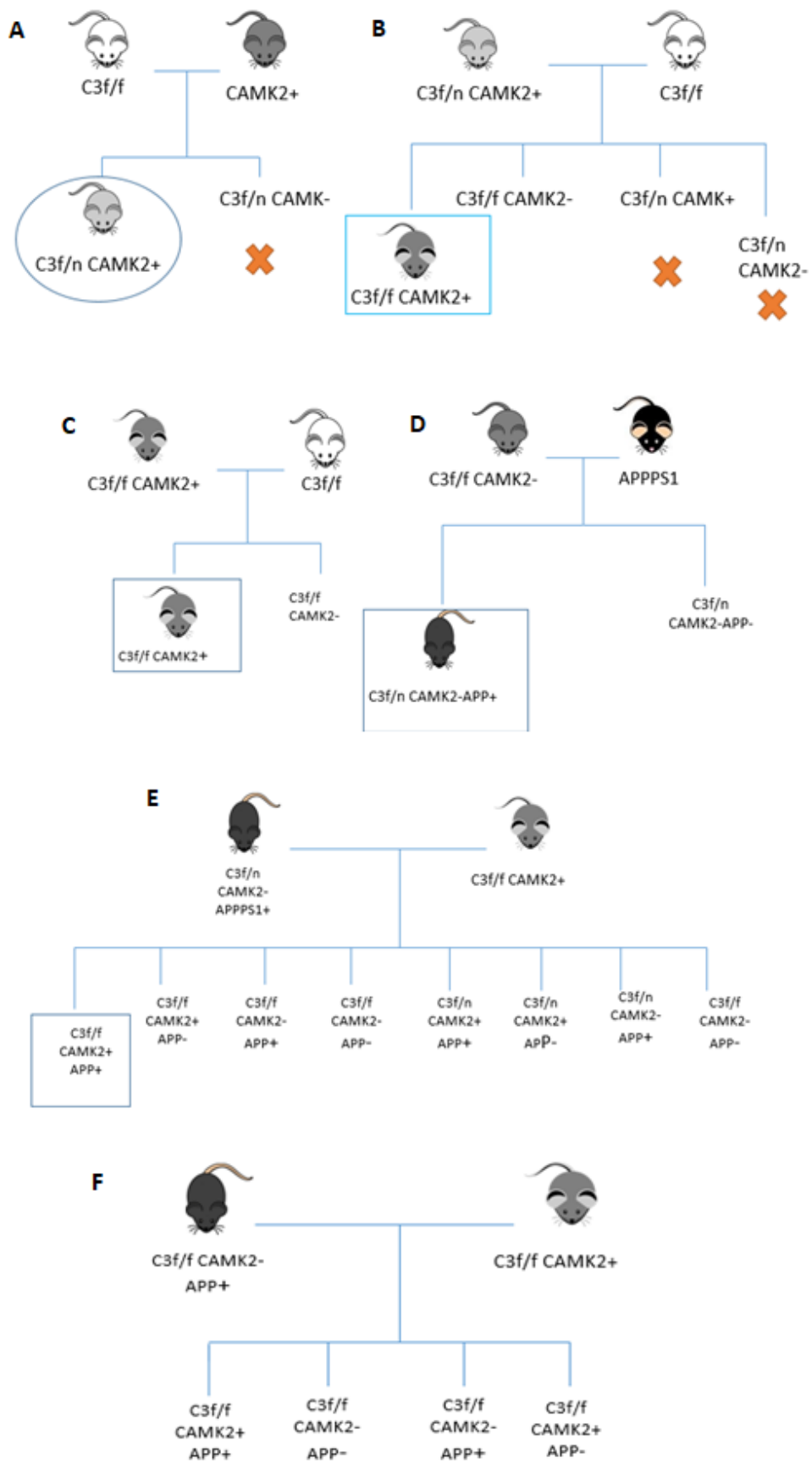
La secuencia genómica a escindir viene determinada por la colocación y orientación de los sitios loxP, mientras que el momento y lugar de la recombinación viene dado por la disponibilidad en tiempo y espacio de la recombinasa Cre.

El cruce de las dos líneas de ratones mencionadas anteriormente origina un animal cuyo genoma es portador tanto del transgen Cre como del gen floxeado. Cuando cre se expresa en el tejido específico determinado por el promotor, la recombinasa Cre se une a los sitios loxP, los corta por la mitad y después une las dos mitades restantes tras haber eliminado el ADN situado entre ambos. Se han desarrollado varios sistemas basados en promotores inducibles para el gen de la recombinasa Cre, de esta forma, la expresión del gen puede regularse mediante la administración de un compuesto químico, como por ejemplo la tetraciclina o el tamoxifeno.

En los ratones Casp3Camk2 y C3Camk2APP, Cre se encuentra asociado al promotor del gen de CAMK2 (calcio/calmodulina proteína quinasa II). CAMK2 es una Serina/treonina proteína quinasa regulada por el complejo calcio-calmodulina. Existen diferentes tipos de CAMK2-CRE, todas ellas con diferentes localizaciones, en el caso de nuestro modelo, la expresión de CRE se encuentra asociada a la formación hipocámpal, siendo mayor en la región CA1 del giro dentado (Tsien et al., 1996). En estos animales, la expresión de Cre comienza, sin necesidad de inducción mediante ningún compuesto químico, a los 18 días de nacimiento (Tsien et al., 1996).

La estrategia de cruce seguida se muestra a continuación en las siguientes imágenes (Figura 11).

3. MATERIALES Y MÉTODOS



3. MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 11. Estrategia de cruce. Las figuras A, B y C corresponden a la generación del primer grupo de estudio de dobles transgénicos. En las imágenes D, E y F se representa la estrategia de cruce para obtener el segundo grupo de estudio de triples transgénicos. En el panel A se muestra el primer cruce que se realizó, entre un ratón doble floxeado en caspasa 3 y un ratón positivo en Camk2, con la finalidad de obtener un ratón caspasa 3 flox/normal y camk2 positivo. Este ratón se emplearía en el cruce que se muestra en el panel B, con un ratón doble floxeado en caspasa 3, obteniendo así, las primeras crías de los grupos experimental y control. En el panel C se muestra el cruce que se empleó para el mantenimiento de la línea. Para obtener el segundo grupo de ratones de estudio, se realizó el cruce representado en el panel D, entre un ratón doble floxeado y camk2 negativo y un ratón APP positivo. De este cruce se originó un ratón caspasa 3 flox/normal camk2 negativo y APP positivo, que sería cruzado como muestra en el panel E con un ratón doble floxeado en caspasa 3 y camk2 positivo, dando lugar a los primeros ratones experimentales y controles de este grupo. En el panel F se muestra el mantenimiento de esta línea.

3.3 IDENTIFICACIÓN Y GENOTIPADO

3.3.1 MARCAJE

Los ratones de aproximadamente 2 semanas de edad fueron marcados a través de un código que se basa en el corte realizado con tijera de la primera falange de sus dedos (Figura 12). Las tijeras se esterilizaron con etanol antes de usarlas con cada una de las crías para evitar la contaminación de ADN. Las falanges de cada ratón se almacenaron en microtubos de 0,2ml a -20°C para su posterior extracción.

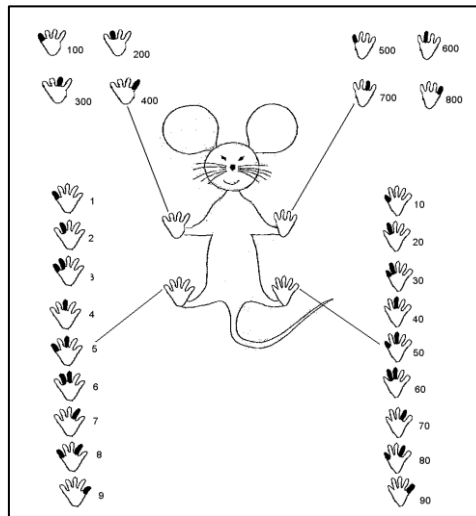


Figura 12. Sistema de enumeración e identificación de ratones.

3.3.2 EXTRACCIÓN DE ADN

Para la extracción de ADN se siguió el protocolo establecido por el fabricante de la solución de extracción empleada. Este protocolo consiste en la adición de 50 μ l de solución de extracción QuickExtract™ DNA Extraction Solution 1.0 (Lucigen) a cada microtubo, seguido por una agitación durante 15 s, una incubación a 65°C durante 15 min, una agitación durante 15 s y una última incubación a 98°C durante 5 min. Terminado el proceso, se extrajeron las partículas sólidas y el ADN genómico fue usado directamente para la realización de la PCR convencional o fue congelado a -80°C para su posterior uso. Las incubaciones se realizaron en un termociclador PTC-100 Thermal Cycler (MJ Research).

3.3.3 PCR CONVENCIONAL Y ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS DE PCR

El genotipado de los animales de experimentación se realizó mediante PCR convencional del ADN previamente extraído de las falanges. Se utilizó para ello el Kit de PCR MyTaq™ Red DNA Polymerase (Bioline) y unos cebadores (tabla 1) específicos a una concentración de 10 μ M (solución madre a 100 μ M en agua para biología molecular).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 1. Cebadores para PCR

NOMBRE	Secuencia 5´-3´
Casp 3 FLOX A	GAGCCTTCATAGGGGTGCAA
Casp 3 FLOX B	GGGGAGCAGAGGGAATAAAG
Casp 3 FLOX C	CATAGAATCCCAAGCCAGGA
Cre general Sentido	CGTTGATGCCGGTGAACGTG
Cre general Antisentido	AGCTGGCTGGTGGCAGATGG
APP Sentido	CTTGTAAGTTGGATTCTCTATATCCG
APP Antisentido	GACTGACCACTCGACCAGGTTCTG

El protocolo seguido fue el definido por el fabricante. Por cada muestra se preparó la siguiente mezcla (tabla 2):

Tabla 2: Volúmenes y reactivos de la mezcla de PCR por muestra

5x MyTaq Red Reaction Buffer	10 µl
MyTaq Red ADN polymerase	0,5 µl
Muestra de ADN extraído	1 µl
Cebadores a 10 µM (2 µl/cebadores)	2 µl
Agua para biología molecular	32,5 µl (para completar el volumen total de 50 µl)

La PCR se realizó utilizando un termociclador PTC-100 Thermal Cycler (MJ Research), siguiendo los siguientes ciclos de temperatura: un ciclo único de 1 min a 94º C seguido de 35 ciclos que consistieron en una primera fase de desnaturalización de 15 s a 95ºC, una segunda fase de hibridación de los cebadores de 15 s a 58 ºC y una tercera fase de extensión, donde la ADN polimerasa polimeriza, de 10 s a 72 ºC. El programa finalizó con un paso final de 10 min a 72ºC.

Finalizada la PCR, las muestras se cargaron en los pocillos de un gel de agarosa al 2% en tampón TAE, compuesto por tris base/ácido acético/EDTA (ácido etilendiaminotetraacético). A este gel se le añadió el intercalante de ADN RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (iNtRON

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Biotechnology), con el fin de visualizar por fluorescencia las distintas bandas de ADN correspondientes a los productos de la PCR, separadas según el peso molecular o pares de bases (pb). El gel se situó en una cubeta de electroforesis que contenía solución TAE 1X y fue conectada a una fuente de corriente de baja tensión (Fuente de baja tensión P25. Biometra).

En uno de los pocillos del gel se cargó un marcador de peso molecular DNA gTP-Ladder (gTPbio), que permitió identificar las diferentes bandas de ADN según su tamaño en pares de bases. Para visualizar las bandas de ADN se empleó un lector de geles Lector FLA5100 (Fujifilm). Se pudieron identificar las siguientes bandas (Figura 13):

- La presencia o ausencia de banda a 400 pb correspondiente a los cebadores de Cre general. La presencia de banda indica la existencia de Cre en el genoma.
- La presencia de banda a 220 pb (floreado) y a 150 pb (wt) para caspasa-3. La presencia de una banda a 220 pb indica que el animal sería flox/flox, mientras que la presencia de dos bandas una a 220 pb y otra a 150 pb indicaría que el animal sería flox/wt.
- La presencia o ausencia de banda a 300 pb correspondiente a los cebadores de APP. La presencia de banda significaría que ese ratón sería positivo en APP.

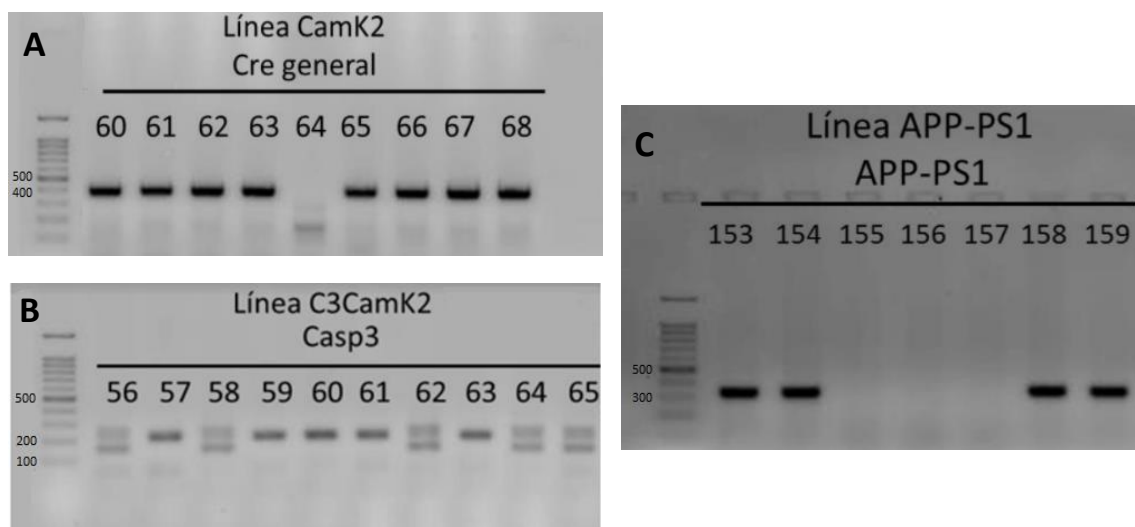


Figura 13. Geles de agarosa al 2% donde el panel A muestra las bandas para cre general. El panel B muestra el gel de agarosa para caspasa 3. El panel C corresponde al gel de agarosa para APP.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.4 PRUEBAS CONDUCTUALES

Como consideraciones previas, la habitación en la que se realizaron las pruebas conductuales se mantuvo aislada de ruidos y con una iluminación homogénea y tenue. Desde dos días previos al inicio las pruebas conductuales, así como durante el transcurso de las mismas, el serrín de las jaulas de los ratones no se cambió. Los ratones fueron trasladados al cuarto de comportamiento una hora antes del comienzo de las pruebas para que se habituaran al entorno y reducir el estrés. Todo el equipo, así como los objetos empleados en las pruebas conductuales se limpiaron con etanol (70% en agua) previamente a la realización de los experimentos, además de entre sesiones y animales para evitar que los olores extraños afectaran a los patrones de comportamiento. Las pruebas conductuales se desarrollaron durante la fase de luz estándar, entre las 9:00 y las 15:00h. Las pruebas conductuales fueron realizadas en un orden concreto para que los animales estuvieran expuestos al menor estrés posible.

3.4.1 CARACTERIZACIÓN

Se aplicó una versión simplificada del protocolo de examen primario SHIRPA (SmithKline Beecham, Harwell, Imperial College, Royal London Hospital, phenotype assessment) a animales de 1 mes, semanalmente y durante 4 semanas. Se trata de un exhaustivo protocolo de examen del comportamiento y la morfología, desarrollado originalmente por Rogers y colaboradores en el Consorcio de la Mutagénesis ENU (ENU Mutagenesis Consortium) (Rogers et al., 1997).

Con este examen primario SHIRPA simplificado, se pretendió estudiar la función muscular, (actividad espontánea, capacidad motriz, forma de andar, posición y tono corporal y de las extremidades, elevación de la cola, posición visual, equilibrio y coordinación, micción y defecación), función sensorial (agitación por traslado, forma de andar, posición visual, posición de las extremidades, respuesta al sonido), así como algunas funciones neuropsiquiátricas (agitación por traslado, miedo, actividad espontánea, agresividad) y funciones autónomas

3. MATERIALES Y MÉTODOS

(elevación de la cola, micción y defecación). Las pruebas realizadas, así como su puntuación aparecen recogidas en la siguiente (tabla.3).

Tabla 3: Parámetros evaluados en el protocolo SHIRPA

Parámetro	Puntuación	Observaciones
Sexo		
Peso		
Estado del pelaje	0-3	Limpio o sucio y revuelto
Color del pelaje	0-3	Presencia de parches de canas
Parches de calvicie	0-3	ausente o presente
Posición corporal	0-2	Sin tono muscular o saltos repetitivos
Actividad espontánea	0-4	Ninguna o movimientos enérgicos continuos (sujeto por cola)
Ritmo respiratorio	0-3	Lenta e irregular o hiperventilación
Tembler	0-2	Ninguno o temblor evidente
Micción		-
Defecación		-
Pasos	0-3	Normal o incapacidad motriz
evasión de contacto	0-3	Ninguna reacción o escape enérgico
Piloerección	0-2	ausente o presente
Comportamiento anómalo	0-1	ausente o presente
Clasping	0-1	ausente o presente
Fuerza en rejilla	0-4	Ninguna fuerza o fuerte agarre
Reflejo ocular	0-2	Respuesta palpebral a luces y estímulos táctiles.
Agresividad (provocada)	0-1	ausente o presente
Lagrimo	0-1	ausente o presente
Reacción al sonido	0-3	Ninguna respuesta o fuerte respuesta a estímulo
Equilibrio	0-10	segundos que permanezca en la varilla
Fuerza en barra	0-10	segundos que permanezca en la varilla

3.4.2 RECONOCIMIENTO DE OBJETOS NUEVOS

Esta prueba está basada en el instinto innato de los ratones de explorar lo novedoso frente a lo familiar. Para realizar esta prueba, los ratones se colocaron en un campo abierto rectangular (25x40x40cm). Inicialmente se llevó a cabo un periodo de 5 min de habituación al campo abierto, seguido de una sesión de entrenamiento donde los ratones se expusieron a dos objetos iguales, colocados separados y equidistantes, durante 15 min. Finalizado este entrenamiento y transcurrida una hora, se expuso durante 10 min a los ratones a un objeto familiar (uno de los utilizados anteriormente) y a un objeto novedoso (que se diferencia en forma y color del objeto familiar) colocados en la misma posición que los anteriores. Pasadas 24 h los ratones fueron expuestos durante 10 min al objeto familiar (utilizado el primer día y colocado en la misma posición) y un objeto novedoso diferente, en color y forma, al usado el día anterior. La prueba

3. MATERIALES Y MÉTODOS

que se realizó después de una hora del ensayo sirvió para evaluar la adquisición de la información (memoria a corto plazo), mientras que la que tuvo lugar 24 horas después del ensayo se empleó para evaluar el almacenamiento de ésta (la memoria a largo plazo).

Todas las sesiones fueron grabadas para su posterior análisis. El análisis se basa en la diferencia entre el número de veces que el ratón se acerca a los diferentes objetos generando un índice de discriminación (I.D.) que se corresponde a:

$$\frac{(\% \text{ aproximación a objeto novedoso} - \% \text{ de aproximación a objeto familiar})}{(\% \text{ aproximación a objeto novedoso} + \% \text{ de aproximación a objeto})}$$

3.4.3 TEST EN CAMPO ABIERTO

El animal se colocó en una superficie rectangular blanca de (55x40x40cm) y fue grabado durante 5 min. Con este protocolo se estudió la ansiedad y la capacidad de habituación de los animales a entornos novedosos. Este estudio se basa en el tiempo que pasa cada animal en la zona central frente al tiempo que pasa en la zona periférica. El centro de la superficie se consideró como un cuadrado que ocupó el 50% del área total. Para el análisis se utilizó el programa SMART 3.0 video tracking system (Panlab).

3.4.4 LABERINTO EN Y

El laberinto en Y consiste en tres brazos idénticos (18x8x15 cm). Los ratones fueron colocados en el centro del laberinto, permitiendo la libre exploración durante 9 min. Todas las sesiones fueron grabadas para su posterior análisis. Con este test se pretende estudiar la memoria de trabajo y su análisis consistió en la cuantificación del número total de entradas en cada uno de los brazos y de las veces que el ratón entro dos veces consecutivas al mismo brazo, lo que se consideró como un error. La alternancia se calculó atendiendo a la fórmula:

$$\% \text{ Alternancia} = (\text{Número de alternancias} / [\text{Entradas totales}-2]) * 100$$

3.4.5 ENTERRAMIENTO DE CANICAS

En una jaula mediana (22 cm de anchura x 22 cm de largo x 14,5 cm de profundidad) con 2 cm de serrín en su base, se colocaron doce canicas dispuestas en tres columnas de cuatro filas. El ratón fue colocado en la caja y se le permitió la exploración libre durante 10 min.

Se tomó una foto al inicio del experimento y otra al final. Con el fin de medir la ansiedad de los animales se compararon ambas fotos y se cuantificó el número de canicas enterradas, considerándose como tal, cuando quedaba menos de un 25% observables en la superficie.

3.4.6 FORMACIÓN DE NIDO

En esta prueba se emplearon cajas de estabulación pequeñas, donde los ratones se encontraban individualizados desde el día anterior. En estas cajas, se introdujo una pieza de algodón de aproximadamente un gramo de peso. Se realizaron medidas de la cantidad de algodón que los animales no habían utilizado en la formación del nido a 1, 2, 4, 6 y 24 h después de comenzar la prueba.

La finalidad de esta prueba es medir la capacidad natural de los ratones de formar un nido como protección del entorno y así medir sus capacidades sociales.

3.4.7 ROTAROD

Este aparato, 47650 Rota-Rod NG (Ugo Basile) está formado por un cilindro giratorio horizontal (3 cm de diámetro y 30 cm de longitud) que posee una superficie rugosa. El cilindro se encuentra dividido en cinco calles de ejercicio de 5,7 cm por unos círculos perpendiculares. La velocidad de giro, la aceleración y el tiempo de ejercicio pueden ser controlados.

La prueba comienza con una fase de habituación de 5 min de duración a una velocidad constante de 5 revoluciones por minuto (rpm). Finalizada esta etapa se realizó una tanda de cuatro ensayos de 5 min de duración cada uno a velocidad acelerada (5-50 rpm en 5 min).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Pasadas 24 h del entrenamiento, se evaluó la memoria motora realizando una sesión de 5 min igual a una de las sesiones de entrenamiento. Todas las sesiones se grabaron para su posterior análisis. Se analizó el número de caídas de los ratones y el tiempo de latencia de la primera caída.

3.5 OBTENCIÓN DE MUESTRA Y PERFUSIÓN INTRACARDIACA

Los ratones se anestesiaron profundamente con una mezcla de Ketamina (Ketamidor®50 mg/Kg) y medetomidina (Domtor® 10mg/kg) por vía intraperitoneal. Después de confirmar que se encontraban anestesiados correctamente, los animales se fijaron a una superficie y se procedió a la realización de la perfusión.

La perfusión se realizó con tampón fosfato salino frío (PBS, del inglés Phosphate buffered saline). Con unas tijeras de cirugía y con ayuda de unas pinzas hemostáticas, se abrió la caja torácica y se dejó expuesto el corazón. Posteriormente se introdujo en el ventrículo izquierdo una aguja que se encontraba conectada a una bomba de perfusión (Peristaltic Pump FH100M. Thermo Fisher Scientific) fuentea una velocidad de 90ml/h durante 5 min. Se realizó un corte en la aurícula derecha para permitir la salida del líquido de perfusión.

Para la extracción del cerebro, se hizo un corte longitudinal en el cráneo, separando ambos hemisferios, con ayuda de las pinzas se extrajo el cráneo, quedando finalmente expuesto el cerebro. Una vez extraído, el cerebro se dividió en dos hemisferios. Un hemisferio se destinó para pruebas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia. En primer lugar, para fijar el tejido, la muestra se introdujo en un tubo de 15 ml que contenía 6 ml de paraformaldehído (PFA), frío al 4% (PanReac-AppliChem) estas muestras se almacenaron a 4°C durante 1 día como mínimo para asegurar su fijación. Posteriormente se transfirieron a un tubo de 15 ml que contenía una solución de sacarosa al 30% en PBS con el fin de crioprotoger el tejido. Los tejidos se mantuvieron en la solución crioprotectora hasta su hundimiento. Finalmente fueron congelados por inmersión en isopentano a -40°C (PanReac-AppliChem) y se conservaron a -80°C.

El otro hemisferio se destinó a distintas pruebas de biología molecular. Con unas pinzas de disección se separaron hipocampo, corteza y cerebelo. Se almacenaron en microtubos de 2 ml, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y finalmente se mantuvieron a -80°C para su posterior análisis.

3.6 ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE ARN MENSAJERO

(ARNm)

3.6.1 EXTRACCIÓN DE ARN

La extracción de ARN se realizó con muestras de hipocampo y corteza que se encontraban conservadas a -80°C en microtubos de 2 ml. La extracción se realizó siguiendo el protocolo definido por el fabricante del reactivo empleado, TRIsure (Bioline). Todo el proceso se llevó a cabo en campana de gases Ductless Fume Hood CRUMA 870.

En primer lugar, se añadió 1 ml de TRIsure y 10 perlas de vidrio a cada una de las muestras. Los microtubos se introdujeron en aparato lisador de tejido TissueLyser II (Qiagen), donde la agitación del aparato y el choque que provocaba entre las perlas y el tejido, dio lugar a la disgregación del tejido y a la liberación del contenido intracelular.

Finalizada la disgregación, se trasladó el contenido a microtubos de 1,5 ml, que se dejaron a temperatura ambiente durante 5 min, se añadió 0,2 ml de cloroformo (PanReac-AppliChem) a cada microtubo, se agitaron durante 15 s y se centrifugaron a 12.000g durante 15 min a 4°C, después de haberlos dejado incubar durante 3 min. Finalizada la centrifugación, se podían distinguir tres fases en cada una de las muestras, (primera, fase acuosa con ARN; segunda, interfase con ADN; y última, fase con las proteínas). La fase acuosa se transfirió cuidadosamente a un nuevo microtubo de 1,5 ml. Las otras fases se almacenaron durante una noche a 4°C y se utilizarán en la extracción de ADN y proteínas la cual se desarrollará más adelante. A la fase acuosa transferida se añadió 0,5 ml de isopropanol (PanReac-AppliChem) con el fin de precipitar

3. MATERIALES Y MÉTODOS

el ARN. Se agitaron durante 15 s, se dejaron a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12.000g durante 10 min a 4°C. Finalizada la centrifugación las muestras quedaron separadas en un sobrenadante y en un precipitado de ARN. Se eliminó el sobrenadante, y para lavar el precipitado se añadió 1 ml de etanol frío al 75% (PanReac-AppliChem) en agua específica para Biología Molecular (Nzytech) a cada una de las muestras. Después de una agitación en vortex (Labotaq), las muestras se centrifugaron a 7.500g durante 5 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante de nuevo tras la centrifugación y se dejó secar el precipitado al aire durante 10 min para eliminar los restos de etanol. Cuando se observó que el precipitado estaba seco, se resuspendió en 50 µl de agua para biología molecular (Nzytech).

La muestra de ARN aislado se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 Spectrophotometers (Thermo Fischer).

3.6.2 RETROTRANSCRIPCIÓN DE ARN

Para realizar la retrotranscripción del ARN a ADN complementario (ADNc) se empleó el kit de retrotranscripción RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Fischer). El protocolo empleado fue el facilitado por el fabricante.

Para la retrotranscripción, se empleó 1 µg de ARN de cada muestra, que se transfirió a un microtubo de 0,2 ml, diluyendo en agua para biología molecular en caso que fuera necesario. A este microtubo se le añadió la mezcla de reactivos del kit (Tabla 4). El resto del protocolo se realizó en un termociclador PTC-100 Thermal Cycler (MJ Research) siguiendo el programa establecido que consta de una primera incubación de 5 min a 25°C, otra de 60 min a 42°C, y una última de 5 min a 70°C. El ADNc obtenido en los 20 µl totales de la reacción se utilizó directamente para el estudio de expresión génica o se congeló a -80°C.

Tabla 4. Reactivos y volúmenes empleados en la retrotranscripción.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Random hexamer primer	1 μ l
5x Reaction Buffer	4 μ l
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/ μ L)	1 μ l
RevertAid M-MuLV RT (200 U/ μ L).	1 μ l
10 mM dNTP Mix	2 μ l

3.6.3 PCR A TIEMPO REAL

La estimación de los niveles de ARNm se realizó a través de una PCR a tiempo real (RT-PCR). Se utilizó un kit de PCR SensiFAST™ SYBR No-ROX kit (Bioline) siguiendo el protocolo definido por el fabricante en todo momento.

Se utilizaron 42 ng de ADNc por 4,2 μ l de muestra. Para lo cual las muestras de ADNc se diluyeron en agua para biología molecular (Nzytech) hasta alcanzar una concentración de 5ng/ μ l. La mezcla de reacción se preparó añadiendo por muestra, según el protocolo seguido: 5 μ l de 2x SensiFAST SYBR No-ROX Mix y 0,4 μ l de cada cebador (Tabla 5). El ADNc y la mezcla de reacción preparados se transfirieron a una placa de 384 pocillos LightCycler 480 (Roche) con la pipeta automática E1-ClipTip™ Bluetooth™ Electronic Multichannel Pipettes (Thermo Fischer). Cada una de las muestras se estudió por triplicado. La RT-PCR se llevó a cabo en un termociclador LightCycler® 480 (Roche). El programa utilizado empezó con un primer ciclo de 2 min a 95°C seguido de 40 ciclos constituidos por una fase de desnaturalización de 5 s a 95°C, una segunda fase de hibridación de 10 s a 65°C y una tercera y última fase de extensión de 20 s a 72°C. El programa finalizó con un paso final de 7 min a 72°C.

Tabla 5. Cebadores para RT-PCR

Nombre	Secuencia en sentido (S)	Secuencia en antisentido (A)	Casa comercial
GAPDH	S:5' - GTGTTTCCTCGTCCCGTAGA	A:5' - AATCTCCACTTTGCCACTG	Sigma-Aldrich
CRE	GTCGAGCGATGGATTTCCG	GTTGATAGCTGGCTGGTGG	Sigma-Aldrich

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.7 ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Los tejidos, que se encontraban crioprottegidos, congelados y almacenados a -80°C fueron cortados utilizando un criostato Leica CM 1850 UV a -22°C. Se realizaron cortes coronales a 30 µm de grosor y se almacenaron en placas de 24 pocillos que contenían una solución anticongelante (20% agua destilada, 20% PBS 2x, 30% etilenglicol, 30% glicerina). Las placas se mantuvieron a -40°C.

3.7.1 INMUNOFLUORESCENCIA

En este caso, el acoplamiento del anticuerpo secundario con fluorocromos hace visible la reacción del antígeno-anticuerpo. De esta forma, usando la combinación adecuada de anticuerpos secundarios y fluoroforos se puede detectar múltiples antígenos en una sola prueba. También permite realizar estudios de colocalización. El protocolo seguido se describe a continuación.

En primer lugar, los tejidos se introdujeron en placas de 12 pocillos y se realizaron tres lavados de 10 min con PBS (Nzytech) para eliminar los restos de solución anticongelante. En caso de que fuese necesario, en base a los anticuerpos utilizados, los tejidos se introdujeron en tubos de ensayo de 15 ml con citrato (Nzytech) al 0,024% para aumentar su antigenicidad y se incubaron a 80°C durante 30 min. Posteriormente los tejidos se lavaron en PBS y se incubaron durante 1 h en PBS con tritón (PBS-T) al 1% para aumentar la permeabilidad. Después, con el fin de prevenir las uniones inespecíficas del anticuerpo se realizó un bloqueo de 2 h en PBS-T 1% con 5% de albumina bovina sérica (BSA) (Sigma Aldrich). Finalmente se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes (tabla 6) disueltos en PBS-T1% y BSA1% a temperatura ambiente durante 30 min y a 4°C durante toda la noche.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 6. Anticuerpos primarios

ANTÍGENO	CONCENTRACIÓN	HUÉSPED	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
NeuN	1:500.	Ratón	Millipore	MAB377
Caspase-3	1:250.	Conejo	Cell Signaling	9662S
A β	1:1000	ratón	Synaptic Systems	218.721
Iba 1	1:500	conejo	Wako	019-19741

En el segundo día, se incubaron los tejidos a temperatura ambiente durante 30 min. Posteriormente para eliminar el exceso de anticuerpos, se hicieron seis lavados de 10 min en PBS-T 0,1% y se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes (tabla7) disueltos en PBS-T 0,1% y BSA 1% durante 1 h. Finalizada la incubación, solo en el caso de las inmunofluorescencias con tioflavina, los tejidos se incubaron durante 4 min con tioflavina (Sigma) a una concentración 1:3000. Posteriormente, se realizaron seis lavados de 10 min en PBS-T0,1% y se procedió al montaje de los cortes. Para ello los cortes se colocaron en portaobjetos sin gelatinizar, se añadió medio de montaje Glicerol 50% para fluorescencia, se colocaron los cubreobjetos y se sellaron con laca de uñas. Las preparaciones fueron conservadas a 4°C y en oscuridad para evitar la pérdida de fluorescencia de las secciones. Todo el proceso se hizo en agitación. Las imágenes de las preparaciones de inmunofluorescencia fueron tomadas con un microscopio confocal de fluorescencia ZEISS LSM 7 DUO (Citius, Universidad de Sevilla). Todas las imágenes fueron tomadas en las mismas condiciones, para su posterior análisis y comparación.

Tabla 7. Anticuerpos secundarios

ANTÍGENO	CONCENTRACIÓN	HUÉSPED	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
Anti-Rabbit Alexa-488	1:500.	Burro	Thermo Fisher Scientific	A-21206
Anti-Mouse Alexa-647	1:500.	Burro	Life technologies	A31571
Anti-Rabbit Alexa-546	1:500.	Burro	Life technologies	A10040

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Para el análisis estructural de las placas beta amiloides se empleó el programa de análisis de imagen Fiji (<http://fiji.sc/Fiji>). Se analizó la circularidad de las placas, en número de placas por área y el porcentaje de Iba 1 por área de A β . Los análisis se realizaron en 3 animales de cada genotipo.

3.8 TINCIÓN DE GOLGI-COX

Esta técnica, desarrollada por Golgi en 1873, se fundamenta en la formación de depósitos opacos intracelulares de cromato argéntico, producidos por la reacción entre el bicromato de potasio y el nitrato de plata. La pigmentación producida revela la morfología neuronal en tres dimensiones. En 1891, Cox modificó la técnica original reemplazando el nitrato de plata, responsable de la impregnación de las neuronas, con cloruro de mercurio y denominándola Golgi-Cox (Cox, 1891; Stean, 1974).

Se emplearon 3 ratones por cada grupo de estudio (grupo control y grupo experimental) de aproximadamente 2 meses de edad. Los ratones fueron profundamente anestesiados con pentobarbital (80 mg/kg i.p.) y perfundidos durante 5 min por vía intracardiaca con PFA frío al 4% en tampón fosfato 0,1M (pH 7,4). Después de esto se extrajo el cerebro completo y se introdujo en un tubo de 15 ml con PFA al 4% durante 24 h para su correcta fijación, tras lo cual, se introdujo el cerebro en un tubo de 15 ml que contenía la solución de Golgi-Cox. Esta solución estaba compuesta por: Dicromato de potasio al 1,78%, cloruro de mercurio al 1,78% y cromato de potasio al 1,78% en agua destilada.

Los cerebros se mantuvieron en oscuridad, sumergidos en la solución a temperatura ambiente durante dos semanas. Después de este periodo, los cerebros se sumergieron en sacarosa al 25% en solución salina tamponada con Tris 0,1M pH de 7,4 (TBS) hasta que se hundieron. Posteriormente, en un micrótopo de congelación Leitz se cortaron secciones coronales de 90 μ m de grosor y se almacenaron en TBS. Se trataron las secciones con tritón X-100 al 0,1% en TBS durante 5 min y posteriormente se montaron en portaobjetos gelatinizados

y se dejaron secar al aire durante 3 días a temperatura ambiente. A continuación, las secciones se enjuagaron con agua destilada durante 1 min y se incubaron durante 30 min en hidróxido de amonio al 25%, se eliminaron los restos de solución con agua destilada durante 1 min y se transfirieron a la solución de fijado Kodak Professional rapid fixer solution A (Mychasiuk et al., 2013) durante 20 min. Después de lavar con agua destilada durante 1 min, las secciones se deshidrataron con grados ascendentes de etanol de la siguiente forma: etanol 70% 1 min, etanol 90% 1 min, etanol 100% 5 minutos (2 veces) y xileno 10 minutos (2 veces). Para finalizar se dejó secar los restos de xileno, se añadió el medio de montaje DPX (Flores et al., 2005).

Las imágenes se adquirieron con un microscopio Zeiss Axioimager M1 y las láminas de las figuras se realizaron con el software Photoshop 7.0 (Adobe®) sin ninguna corrección adicional.

Se realizó un Z-stacks (grosor de sección de 0,5 μm) de dendritas secundarias teñidas, pertenecientes a neuronas piramidales de la región CA1. Las series de imágenes se convirtieron a RGB con el programa FijiImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>) y se analizaron por E.M. P-V con el programa Reconstruct (<http://synapses.clm.utexas.edu>)

3.9 ELECTROFISIOLOGÍA

En esta técnica se emplearon ratones de 2 a 3 meses de edad. Para comenzar, los ratones se anestesiaron con isoflurano al 2%, cuando se encontraron profundamente anestesiados, se extrajo el cerebro completo, el cual fue introducido rápidamente en una solución (solución I) *ice cold extracellular Ringer's Solution* compuesta por (mM): 126 Cloruro de sodio (NaCl), 3 cloruro de potasio (KCl), 1.25 fosfato monopotásico (KH_2PO_4), 2 sulfato de magnesio (MgSO_4), 2 cloruro de calcio (CaCl_2), 26 Bicarbonato de sodio (NaHCO_3) y 10 de glucosa (pH 7.2, 300 mOsmL^{-1}). Posteriormente, los cerebros (sumergidos en la solución extracelular) se colocaron en la platina de un vibratomo (Leica) y se cortaron obteniendo cortes transversales de hipocampo de 350 μm de espesor. Los cortes se mantuvieron oxigenados (95% O_2 /5% CO_2) continuamente durante al menos 1 h antes de su uso. En todos los experimentos realizados, los cortes se perfundieron

3. MATERIALES Y MÉTODOS

continuamente con la solución descrita anteriormente, además, todas las pruebas se realizaron a temperatura fisiológica (30-32 °C).

Los potenciales postsinápticos excitatorios de campo (field excitatory postsynaptic potentials, fEPSP) se registraron en la región CA1 del hipocampo y se evocaron a través de un electrodo de estimulación colocado en las colaterales de Schaffer (0,2 Hz). Los electrodos de registro extracelulares se llenaron con la solución I. La estimulación se ajustó para obtener una amplitud fEPSP de aproximadamente 0,2 mV en las condiciones control. En las pruebas de pulsos pareados, se aplicaron dos estímulos consecutivos separados por 40 ms. Finalmente, los datos se filtraron a 3 kHz y se adquirieron a 10 kHz. Se compiló una curva de estímulo-respuesta (0,1–0,6 mA, media de cinco fEPSP en cada estimulación) para los diferentes ratones utilizados.

En las pruebas de plasticidad sináptica, después de un período de referencia estable de fEPSP de 10 min, se indujo la potenciación a largo plazo (LTP) mediante un protocolo de estimulación a alta frecuencia (*high frequency stimulation*, HFS) que constaba de 1 tren de estímulos a 100 Hz de 1 s de duración.

La potenciación a corto plazo (STP) se calculó como la pendiente máxima (pico) justo después de la aplicación del protocolo de estimulación a alta frecuencia. No se llevaron a cabo estudios de LTD en estos ratones, debido a que la edad con la que concluían las pruebas conductuales no era adecuada para este protocolo en concreto. En ratones adultos, los protocolos son considerablemente más complejos y no ofrecen la misma garantía de inducción que en ratones jóvenes. La edad máxima para realizar este protocolo de manera adecuada sería aproximadamente 15 días postnatales (Kemp et al., 2000)

Los datos se analizaron utilizando el software Clampfit 10.2 (Molecular Devices). Los últimos 10 min de registro se utilizaron para estimar los cambios en la eficacia sináptica en comparación con la línea de base. El ratio de pulsos pareados (PPR) se expresó como la pendiente del segundo fEPSP dividida por la pendiente del primer fEPSP.

3.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de los diferentes experimentos se representaron con sus correspondientes unidades o como porcentaje (%) respecto al control. Los datos se expresaron como media \pm Error Estándar de la Media (EEM). Las medias se compararon mediante ANOVA de una vía seguido de una prueba de múltiples rangos utilizando el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD, *Least significant difference*) de Fisher, para la comparación entre más de 2 grupos. Un valor $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS

4.1 ESTUDIO DE LA CASPASA 3 A NIVEL FISIOLÓGICO. MODELO DE RATÓN

CASP3^{ff} CAMKII^{cre/wt}

4.1.1 DEMOSTRACIÓN DE LA DELECCIÓN SELECTIVA DE CASPASA-3

Tras la realización de las pruebas conductuales, se comenzó por estudiar en los tejidos extraídos (Figura 14), la efectividad de la delección de casp 3 en la región hipocampal de los sujetos experimentales. Para ello, se realizó una inmunofluorescencia en secciones coronales de hipocampo en el grupo experimental y control. Se utilizó un anticuerpo primario para marcar la expresión de casp 3 junto con el anticuerpo específico para NeuN, marcador de neuronas maduras. El uso de los anticuerpos de NeuN, permite conseguir un marcaje control de las neuronas.

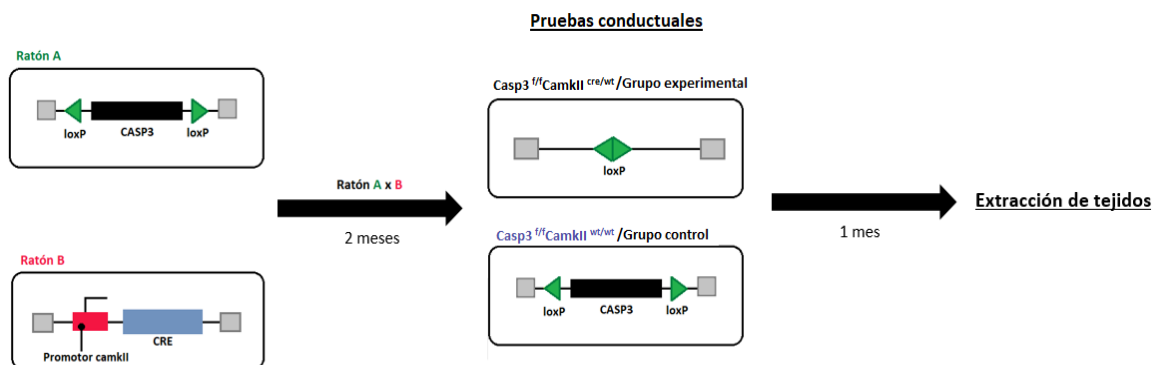


Figura 14. Esquema de generación de los dos grupos de ratones de estudio y línea temporal seguida durante la investigación. De izquierda a derecha se observa de manera esquemática la estrategia de cruce en el sistema cre-LoxP para la generación de los dos grupos de estudio. A los dos meses se realizaron las pruebas conductuales de dichos grupos y aproximadamente al mes del comienzo de las pruebas se extrajeron los tejidos para el estudio a nivel molecular.

4. RESULTADOS

Como puede observarse en la figura 15, existe una clara disminución del marcaje de casp 3 en el grupo experimental, siendo esta disminución mayor en la región CA1, mientras que en NeuN no se observa ningún cambio entre ambos grupos.

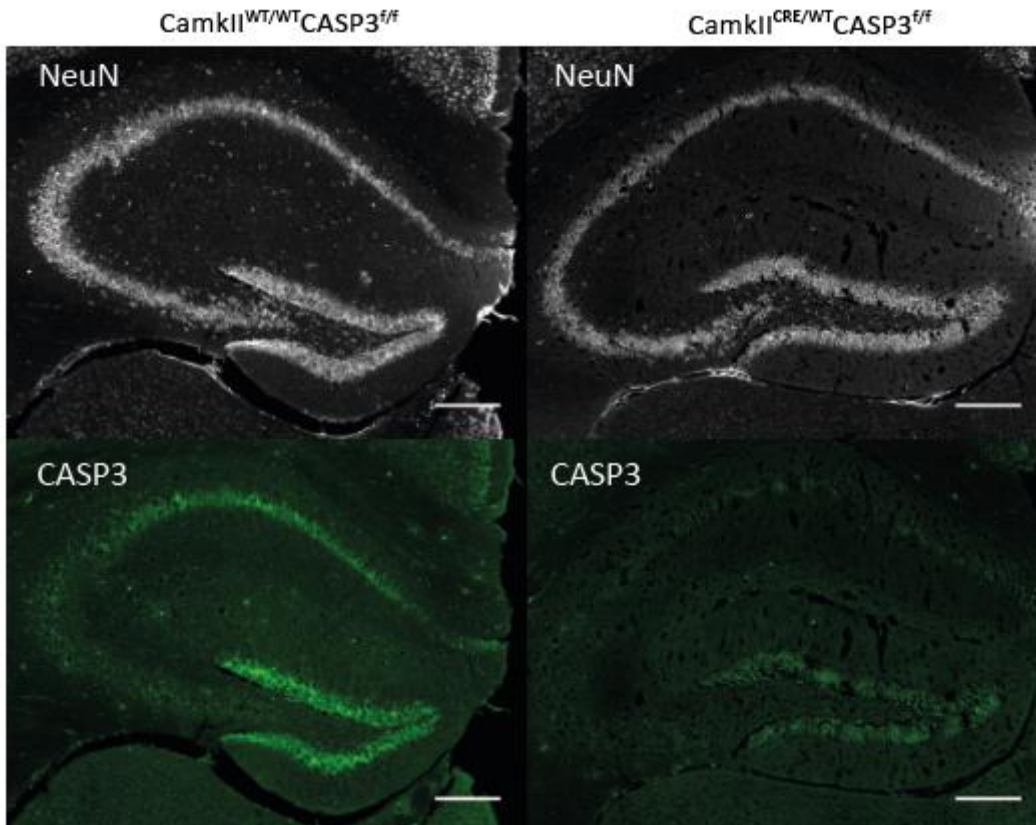


Figura 15. Inmunoreactividad frente a caspasa 3 y NeuN en secciones coronales de hipocampo de ratones Caspasa 3^{f/f} Camk II^{cre/wt} y Caspasa 3^{f/f} Camk II^{wt/wt}. Se muestra, de forma cualitativa, la disminución de inmunoreactividad positiva para caspasa 3 en el grupo experimental (columna de la derecha), siendo más acentuada en la región CA1. La barra de calibración es de 200 μ m

Con el fin de comprobar la eficiencia del sistema cre-LoxP se realizó un análisis de expresión génica de CRE general por medio de la técnica de RT-PCR de ARNm en hipocampo de ratones del grupo control y experimental. Como control interno se midió la expresión del marcador GAPDH. Los resultados obtenidos revelaron un aumento significativo de la expresión de CRE en los animales Casp 3^{f/f} Camk II^{cre/wt}, siendo prácticamente inexistente la expresión de CRE en el grupo control Casp 3^{f/f} Camk II^{wt/wt} con un valor de $p=0,003$ (Figura 16).

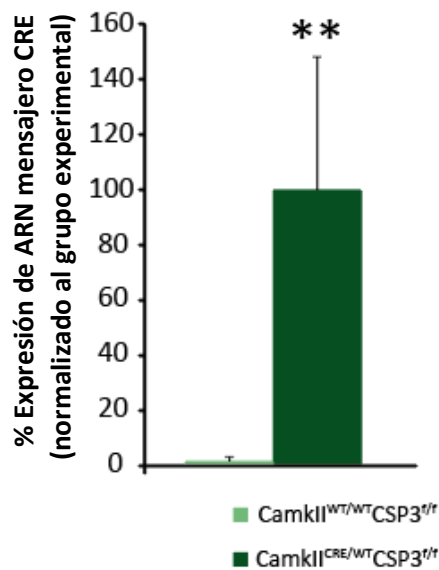


Figura 16. Niveles de expresión de recombinasa CRE en la región hipocampal. En esta figura se observan los niveles de expresión de ARN mensajero de la recombinasa CRE en los distintos grupos de estudio, obtenidos mediante RT-PCR. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al grupo experimental y se representan como media \pm EEM. ** $p<0.02$.

4. RESULTADOS

4.1.2 ANÁLISIS FUNCIONAL. PROTOCOLO SHIRPA

Una vez comprobada la eficiencia del sistema cre-LoxP, se realizó un análisis funcional completo. Se comenzó evaluando el fenotipo general de los ratones, comprobando así la posible existencia de alguna anomalía en el grupo experimental. Se realizó una versión simplificada del protocolo de examen primario SHIRPA estudiando la apariencia general de ratón y evaluando la presencia de alteraciones en la marcha, la postura, el peso, en el control motor o la coordinación. Este análisis se realizó en una pequeña muestra de ratones a una edad postnatal de 30 días (P30), después de que se estableciera el patrón adulto de recombinación (Tsien et al.,1996) y tuvo una duración de cuatro semanas.

Respecto a los pesos (Figura 17) no existe diferencia significativa entre el grupo control y experimental.

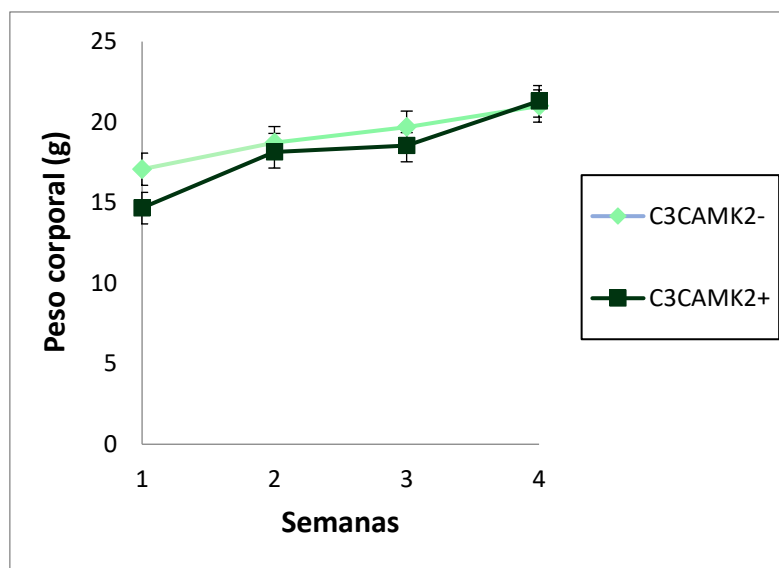
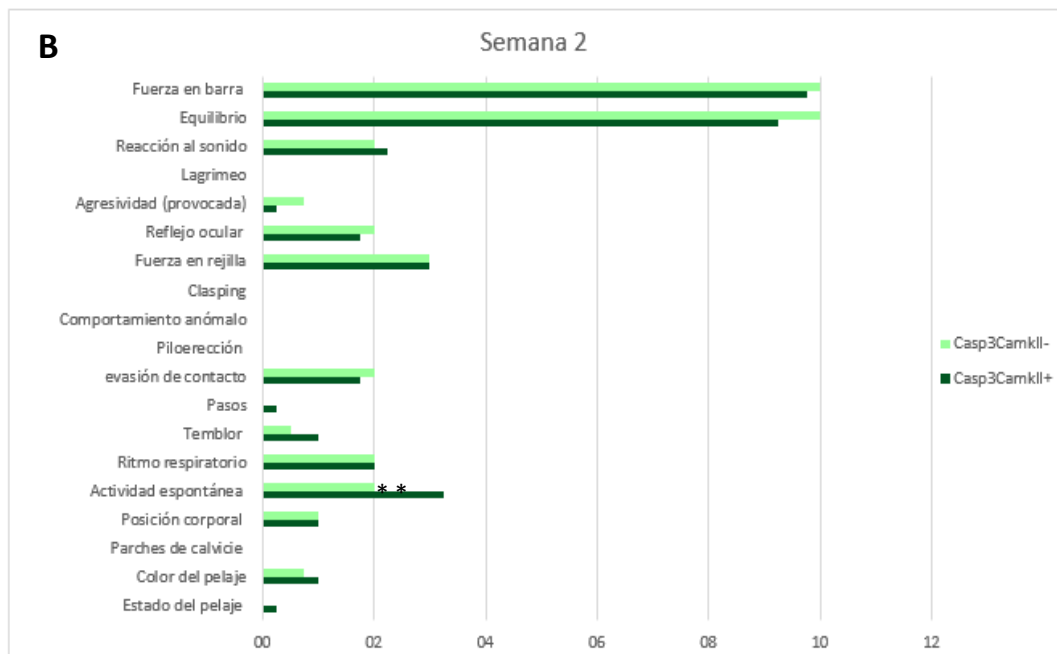
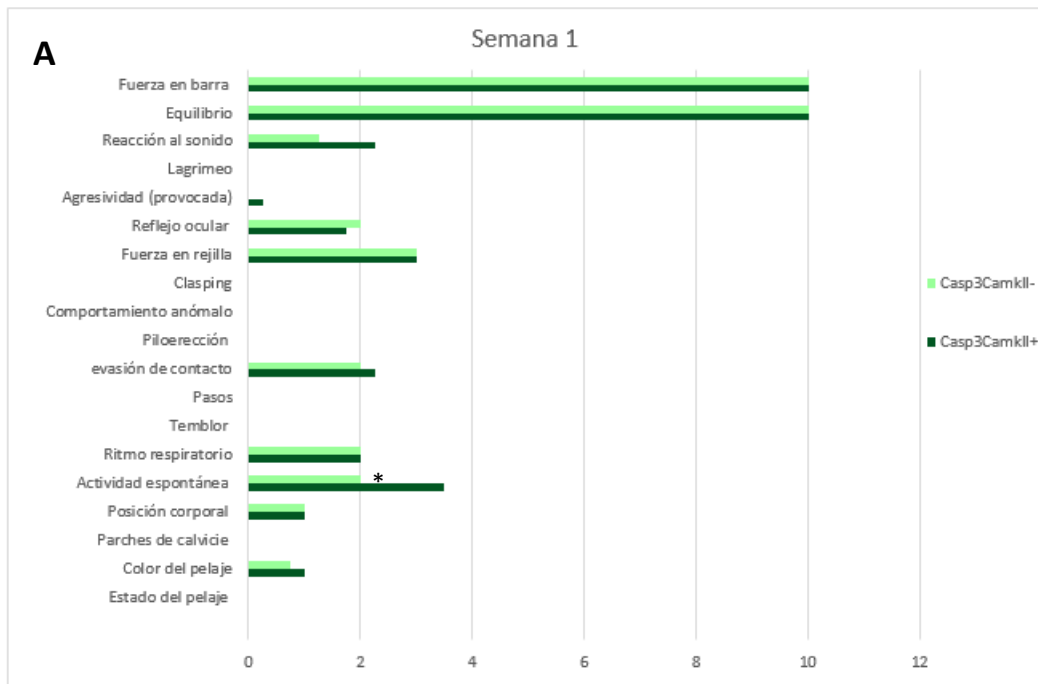


Figura 17. Peso corporal de los grupos de ensayo. Peso corporal medio por semana de los ratones controles Caspasa 3 CamkII- y de los ratones experimentales Caspasa 3 CamkII+, desde p30 hasta p60.

Los resultados de la batería de ensayos SHIRPA (Figura 18) evidenciaron diferencias significativas durante las dos primeras semanas en la actividad espontánea, prueba que consistía en evaluar la actividad de los ratones mientras se encontraban sujetos por la cola. El grupo experimental presentó mayor agitación y movimientos más enérgicos y continuos que el grupo control (semana 1 $p = 0,035$; semana 2 $p = 0,014$). El grupo Casp 3 Camk II+ aunque presentó una mayor de reacción al sonido en casi todas las semanas, la diferencia entre grupos no fue significativa (semana 1 $p = 0,092$; semana 3 $p = 0,058$; semana 4 $p = 0,092$). Con el paso de las semanas apareció un ligero temblor en los ratones experimentales, sin embargo, los datos referentes a este parámetro no resultaron significativos. Destacar por último que en la semana 3 existe una diferencia significativa en la prueba de fuerza en rejilla ($p = 0,014$), presentando una menor fuerza de agarre en sus extremidades superiores los ratones pertenecientes al grupo experimental. Sin embargo, a la siguiente semana este parámetro se igualó a los valores del grupo control. Respecto al resto de parámetros no hubo prácticamente diferencias entre los dos grupos de estudio. Por lo tanto, se observa que excepto los parámetros de actividad espontánea y de reacción al sonido, los ratones experimentales no presentaron diferencias que se mantuvieran en las semanas respecto a los controles, demostrando así que, en principio, la delección de la casp 3 no habría afectado de manera crítica al fenotipo del ratón.

4. RESULTADOS



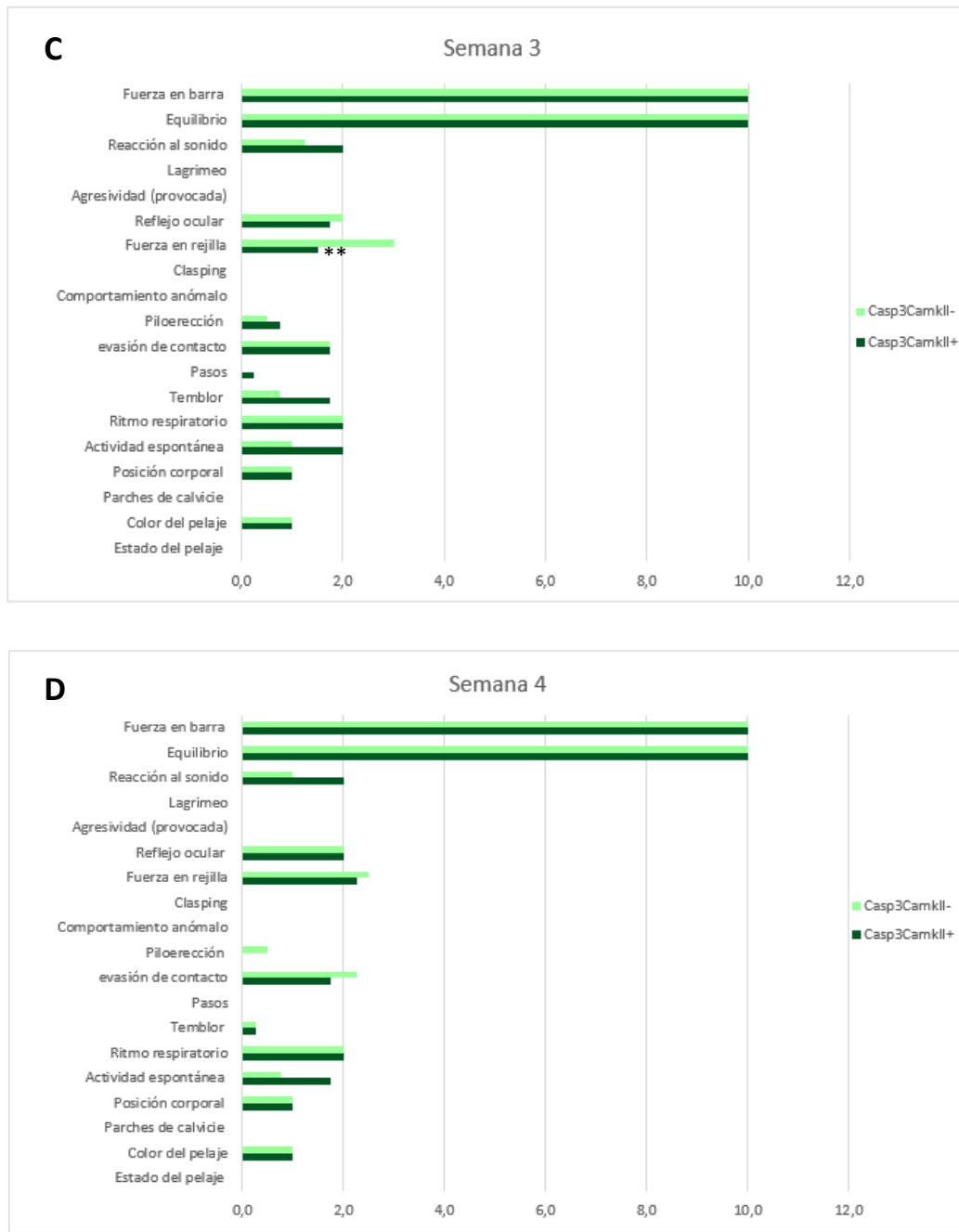


Figura 18. Medias de los parámetros estudiados durante la monitorización ordenados por semanas. Los apartados de los paneles (A, B, C y D) corresponden a las semanas de monitorización de la 1 a la 4 respectivamente. Los parámetros fueron analizados en grupos compuestos por una n=4. Los valores de las medias y el error estándar se adjuntan a modo de tablas en el anexo I.

4. RESULTADOS

4.1.3 CARACTERIZACIÓN CONDUCTUAL

Después de llevar a cabo una primera evaluación funcional y observar alguna posible diferencia entre el grupo control y experimental, se quiso profundizar realizando un análisis conductual con el fin de estudiar las modificaciones en las capacidades motoras, psicofisiológicas, sociales y cognitivas de los ratones experimentales.

4.1.3.1 EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO MOTOR

El estudio del comportamiento motor de los ratones Casp 3^{f/f} Camk II^{cre/wt} se llevó a cabo a través de dos pruebas. La prueba en campo abierto, con la que se pretendía evaluar la actividad espontánea y la prueba de rotarod para evaluar el equilibrio y la coordinación.

La actividad espontánea se evaluó en una sesión de 5 min. Los ratones experimentales y controles mostraron datos similares en la actividad locomotora, pudiendo observarse únicamente un menor número de entradas a la zona centro por parte del grupo experimental, sin llegar a ser significativo (Figura 19A). Respecto a la prueba de equilibrio y coordinación a pesar de apreciarse en las gráficas (Figura 19B) una ligera diferencia en el número de caídas, siendo mayor en el grupo experimental frente al control, esta diferencia no resultó significativa.

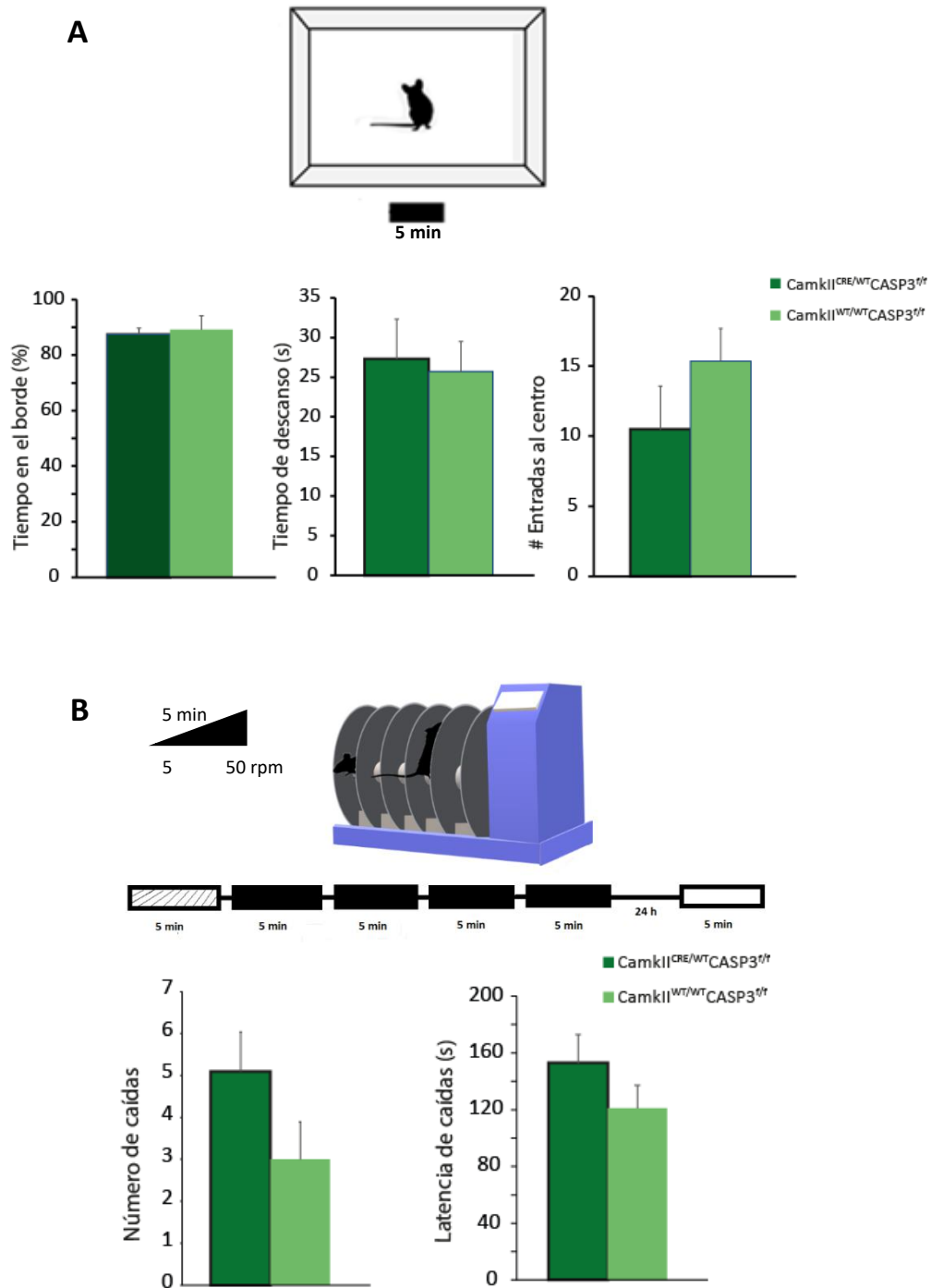


Figura 19. Efecto de la delección de caspasa 3 en el comportamiento motor. (A) Esquema de la prueba de campo abierto de 5 min de duración. Debajo se representan (de izquierda a derecha) la media del tiempo que los ratones de cada grupo se encuentran en el borde, expresado en porcentaje. La media de tiempo que los ratones permanecen en reposo, expresada en s y, por último, la media del número de veces que cada ratón entra en la zona establecida como centro.

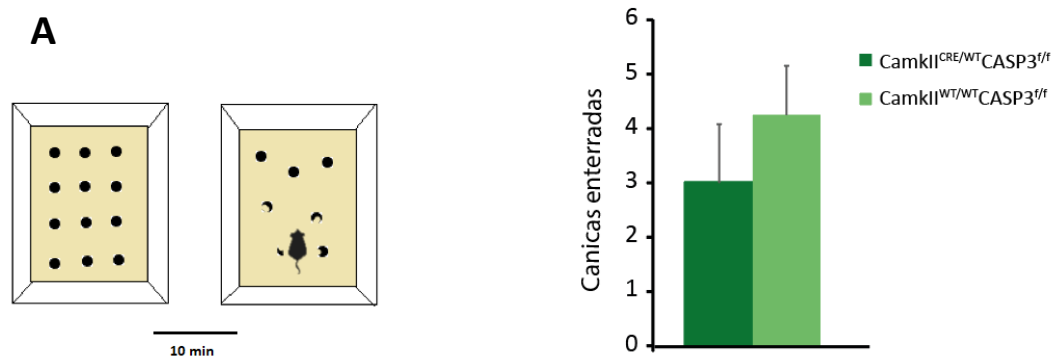
4. RESULTADOS

(B) Esquema representativo de un rotarod y del protocolo seguido. Arriba a la izquierda se detalla que cada prueba tiene una duración de 5 min y una velocidad creciente que parte de 5 rpm a 50. La prueba se divide en dos días, en el primero se realiza un ensayo a velocidad constante y cuatro entrenamientos con las condiciones descritas, y a las 24 h se evalúa el aprendizaje motor. Debajo se representa la media de caídas en la prueba final y la media de la latencia de caídas expresada en s.

4.1.3.2 EVALUACIÓN DE ANSIEDAD Y CONDUCTA SOCIAL

El estado de ansiedad de los ratones se estudió en la prueba de enterramiento de canicas de 10 min de duración. Los resultados obtenidos para esta prueba no mostraron diferencias significativas entre el grupo experimental y control (Figura 20 A).

Con el fin de estudiar la existencia de alguna posible anomalía en la conducta se realizó la prueba de formación de nido, en la que se cuantificó los gramos de algodón utilizados por los ratones. Podemos observar en la figura 20B que los ratones experimentales no llegan utilizar la totalidad del algodón para la formación del nido, aunque las diferencia entre ambos grupos no es significativa.



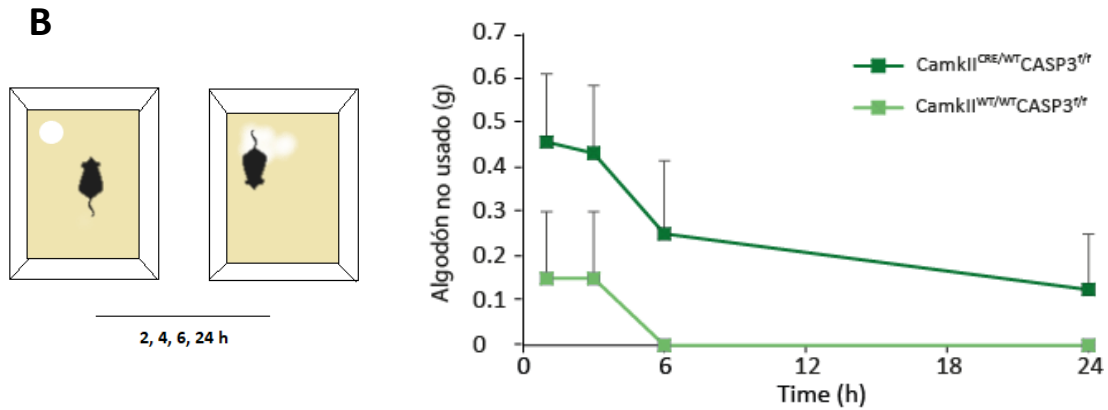


Figura 20. Efecto de la delección de caspasa 3 en la ansiedad y la conducta social. (A) Esquema de la prueba de enterramiento de canicas de 10 min de duración, a su derecha se representa la media de las canicas enterradas por cada grupo de estudio. (B) Esquema de la prueba de formación de nido y a su derecha la representación de la media de la cantidad (g) de algodón no usado en la formación del nido a lo largo de las horas (2, 4, 6, 24 h)

4.1.3.3 EVALUACIÓN DEL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA

Finalmente se evaluó la memoria de trabajo o memoria inmediata a través de la prueba de laberinto en Y, y la capacidad de aprendizaje y memoria con la realización de la prueba de reconocimiento de objetos.

En la primera prueba no se observaron diferencias significativas ni en el número de entradas ni en el porcentaje de alternancia espontánea entre los ratones del grupo control y experimental (Figura 21).

4. RESULTADOS

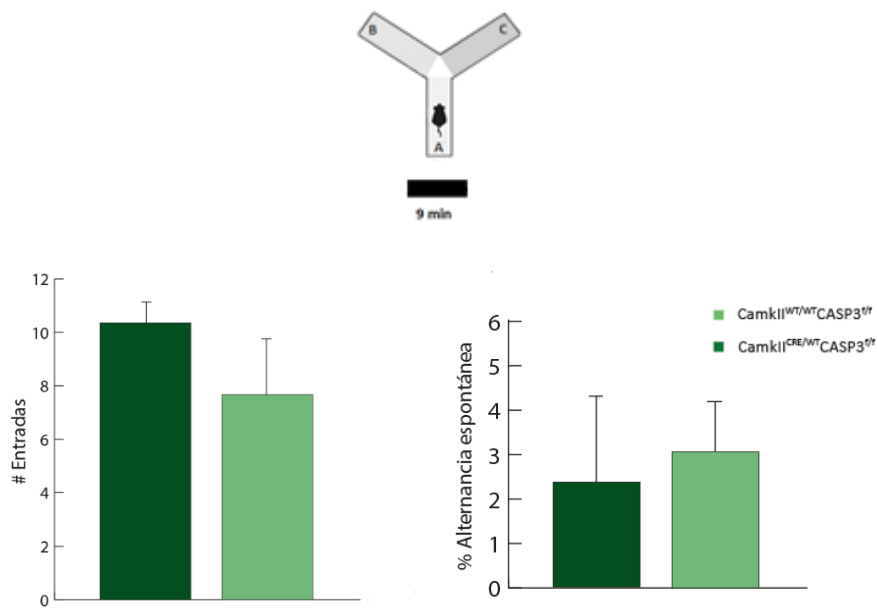


Figura 21. Efecto de la delección de caspasa 3 en la memoria de trabajo. Esquema representativo de la prueba de laberinto en Y. Debajo se representa la media del número de entradas totales de cada grupo y a su derecha, el porcentaje de la media de alternancias espontáneas.

La prueba de reconocimiento de objetos comenzó con un periodo de entrenamiento donde los ratones fueron expuestos a dos objetos idénticos. Después, se evaluó la memoria a corto plazo presentando un objeto conocido y otro novedoso 1 h después del entrenamiento y finalmente, a las 24 h se evaluó la memoria a largo plazo de la misma manera.

En la memoria a corto plazo el índice de discriminación se muestra menor en los ratones experimentales, sin embargo, esta diferencia no fue significativa (Figura 22). Por el contrario, en la evaluación de la memoria a largo plazo si encontramos una diferencia significativa, siendo el índice de discriminación (93,02%) menor en los ratones casp 3 camkII^{cre/wt} $p=0,003$ (Figura 22).

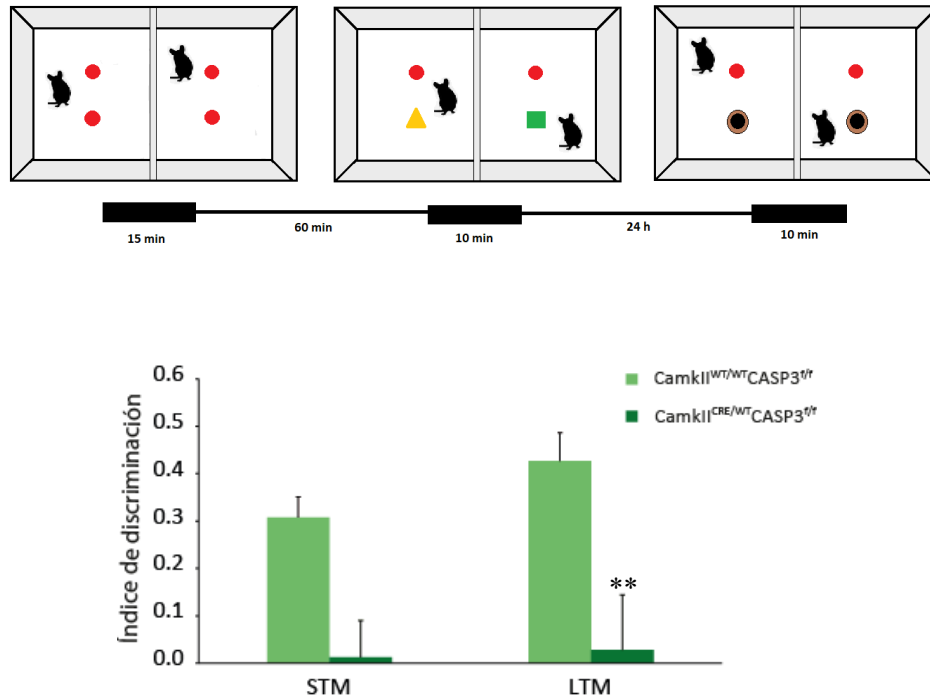


Figura 22. Efecto de la delección de caspasa 3 en la memoria a corto y largo plazo.

Esquema del protocolo de la prueba de reconocimiento de objetos, compuesta por un entrenamiento de 15 min, seguido a los 60 min de la evaluación de la memoria a corto plazo y finalmente tras 24 h la evaluación de la memoria a largo plazo. Debajo se representa el índice de discriminación de ambos grupos para cada una de las sesiones. ** $p < 0,02$.

4.1.4 ESTUDIO DE LAS ESPINAS DENDRÍTICAS

Después de haber observado en las pruebas conductuales realizadas alteraciones en la memoria a largo plazo, se quiso profundizar en el estudio de las estructuras relacionadas con dicho proceso, comenzando por el análisis de las espinas dendríticas, principales receptores de la entrada sináptica en el cerebro (Harris and Kater, 1993). Estas pruebas se realizaron en colaboración con con José Ángel Armengol.

4. RESULTADOS

Las neuronas piramidales CA1 se distinguen fácilmente por su soma triangular o piramidal de donde surgen varias dendritas basales y una o dos primarias. A través de la técnica de Golgi-Cox se analizaron segmentos de dendritas secundarias de neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo (Figura 23).

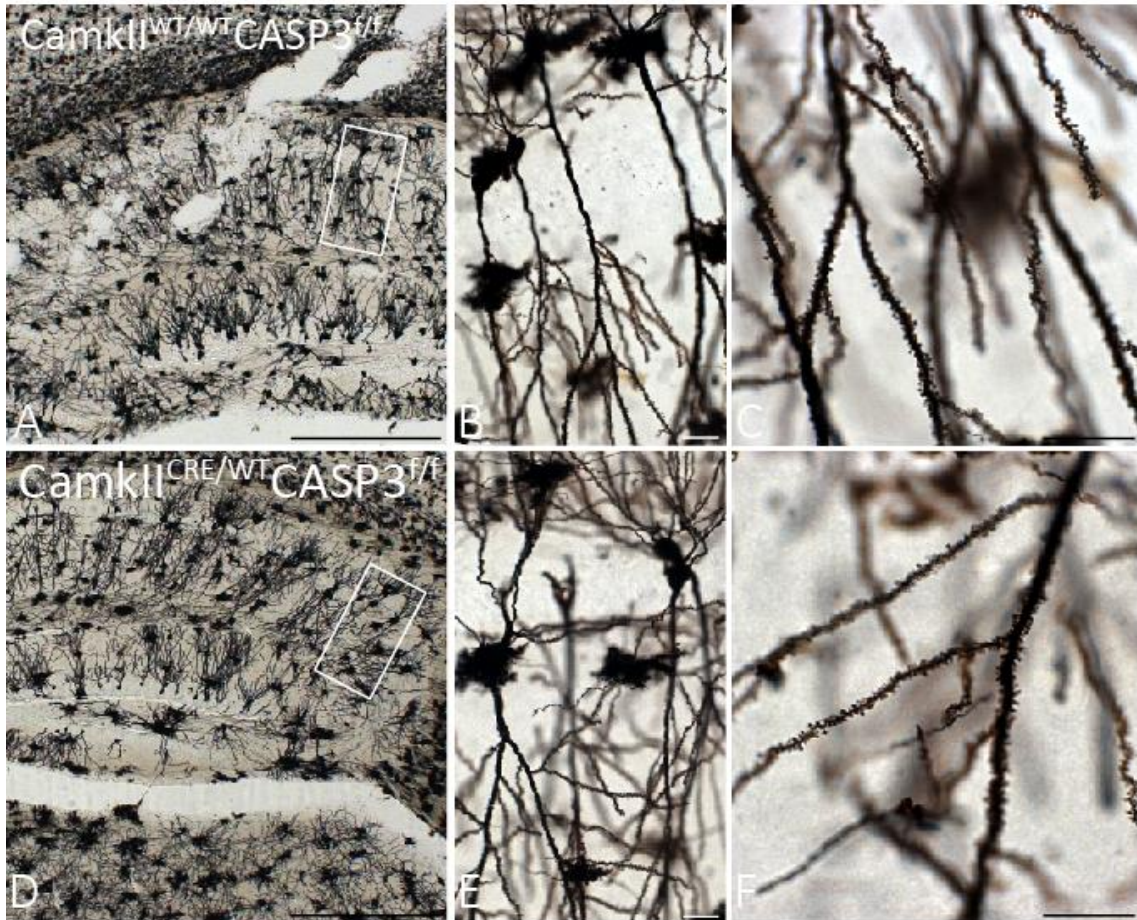


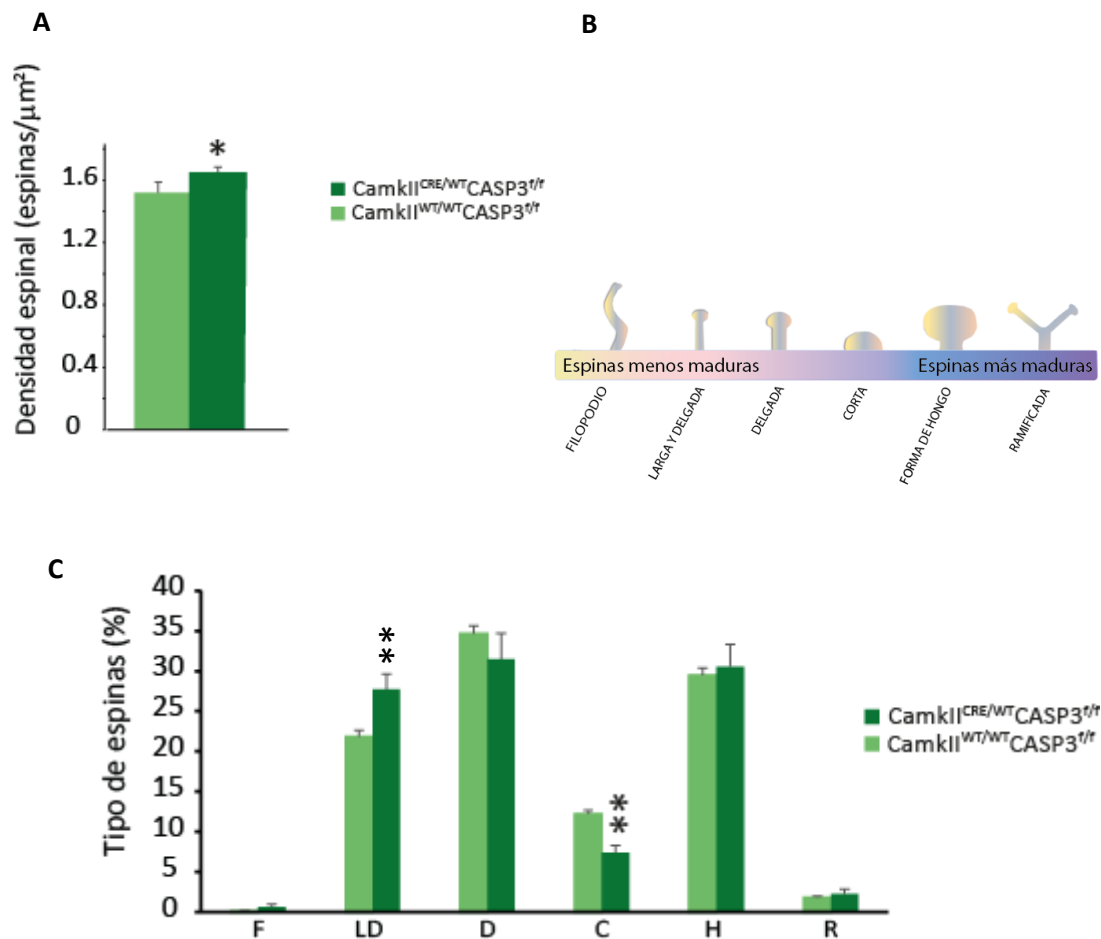
Figura 23. Microfotografías de cortes coronales de la región hipocámpal, teñidas mediante Golgi-Cox. (A, D) representación del área empleada para contar y categorizar las espinas. (B, C, E y F) representación de los segmentos dendríticos empleados para realizar el conteo y la caracterización de las espinas dendríticas en el grupo experimental (E, F) y en el grupo control (B, C).

4. RESULTADOS

Se realizó un estudio comparativo de la densidad de espinas dendríticas por μm^2 y del porcentaje de cada tipo de espinas dendríticas, estos estudios se llevaron a cabo en una longitud dendrítica total de 483,29 μm en el grupo control y de 507,79 μm en el grupo experimental.

Los análisis estadísticos evidenciaron un aumento significativo en la densidad de las espinas en los ratones Casp 3^{f/f} CamkII^{cre/wt} frente a los ratones control (p=0,032) (Figura 24 A).

Este aumento de la densidad coincide con una disminución significativa (p=0,02) de las espinas maduras cortas en el grupo experimental, acompañado con un aumento significativo (p= 0,012) de las espinas dendríticas inmaduras largas y delgadas (Figura 24 C).



4. RESULTADOS

Figura 24. Representación gráfica de los análisis de densidad y categorización de las espinas dendríticas. (A) Densidad espinal (espinas por μm^2) de ambos grupos de estudio. (B) Representación esquemática de los distintos tipos de espinas dendríticas, organizadas en una escala en función de su madurez. (C) Porcentajes de los distintos tipos de espinas dendríticas encontradas en los segmentos dendríticos de estudio. * $p < 0,05$; $p < 0,02$.

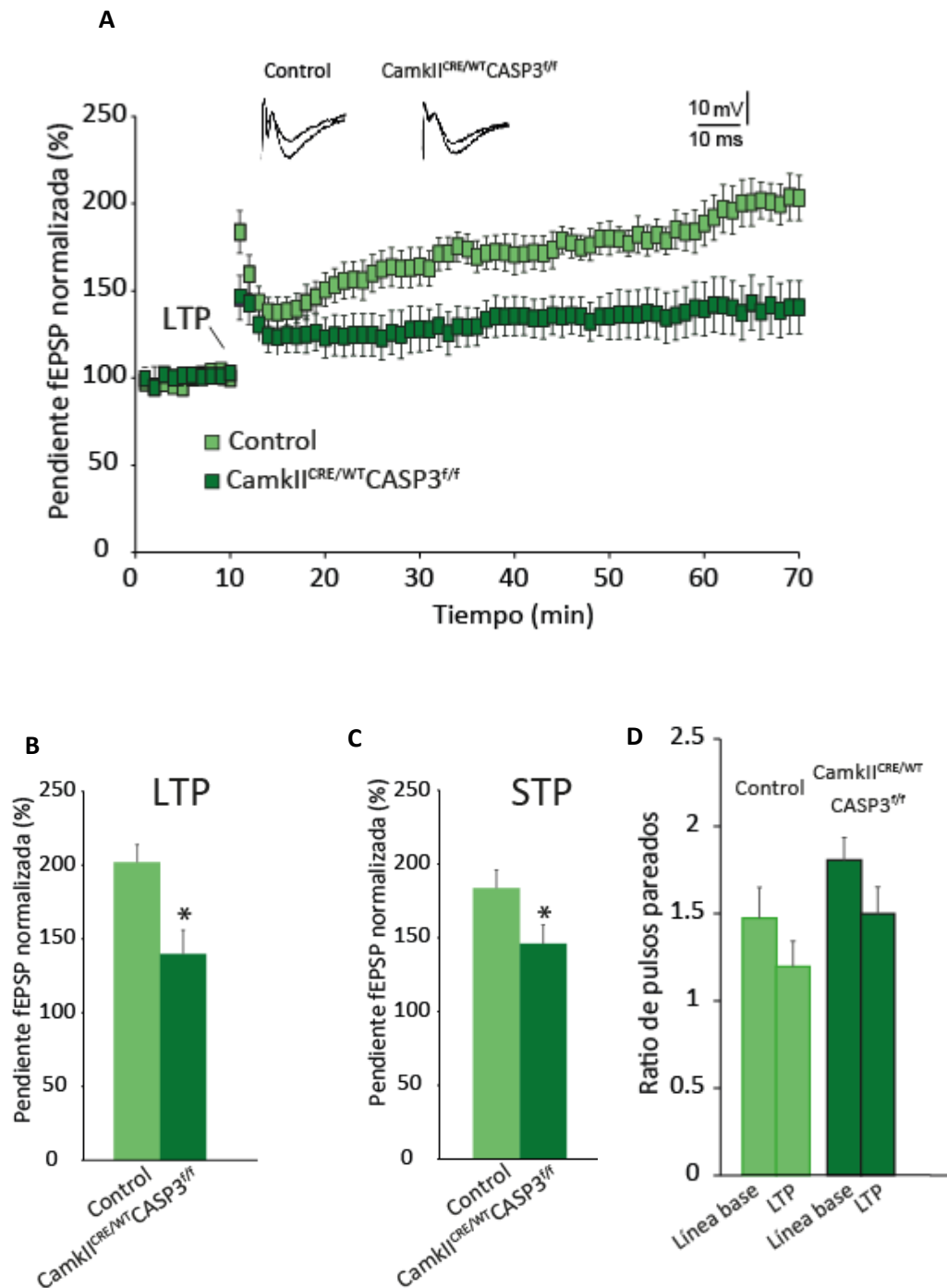
4.1.5 ELECTROFISIOLOGÍA

Los estudios de plasticidad sináptica realizados en ratones *Casp 3^{f/f} CamkII^{cre/wt}* y en ratones control se llevaron a cabo a través del registro de los fEPSPs (Potenciales post-sinápticos excitatorios de campo) inducidos en las neuronas de la región CA1 del hipocampo mediante la estimulación de las colaterales de Schaffer en el *estrato radiatum* de los cortes de cerebro. Los estudios se realizaron en colaboración con Antonio Rodríguez, en ratones de 2 a 3 meses de edad.

La LTP se representó como la pendiente fEPSP normalizada respecto a la línea base, la cual se fijó en el 100%. Como puede observarse en la figura 25A, a los 50-60 min de grabación después de aplicar el protocolo de HFS (Estimulación a alta frecuencia), en el grupo control se alcanzó aproximadamente el 200% de la línea base mientras que en el grupo experimental se alcanzó únicamente un 135% de la línea base, dando lugar a una diferencia significativa entre ambos grupos ($p < 0,05$) (Figura 25B). También se puede apreciar una diferencia significativa en la STP ($p < 0,05$), la cual se calculó como la pendiente máxima (pico) justo después de la aplicación del protocolo de estimulación a alta frecuencia. En el caso del grupo control fue de un 175% mientras que en grupo experimental fue de menos del 150% (Figura 25C).

4. RESULTADOS

Además, se realizó un estudio de pulsos pareados tras la inducción de la LTP para evaluar los posibles efectos de estimulación. El ratio de pulsos pareados (PPR) se expresó como la pendiente del segundo fEPSP dividida por la pendiente del primer fEPSP. En este caso los grupos control y experimental no mostraron diferencias significativas, lo que indicaría que no existirían cambios en los efectos de estimulación debido a la inducción de LTP (imagen 25D).



4. RESULTADOS

Figura 25. Registro y análisis del estudio de la potenciación a largo plazo. (A) Representación de la pendiente de fEPSP en el curso temporal del protocolo de LTP inducido en la región hipocámpal. Se muestra la fEPSP antes y 60 min después de la aplicación del protocolo de LTP. Los símbolos representan las respuestas promedio presentadas cada 60 s para cada genotipo. Después de 10 min de registro control se aplica el protocolo de LTP como viene señalado en la gráfica. (B, C) representación comparativa entre el grupo control y experimental de la pendiente fEPSP normalizada en la LTP y STP. (D) representación del ratio de pulsos pareados del grupo control y experimental durante la estimulación basal y 60 min después de la aplicación del protocolo de LTP. * $p < 0,05$.

Por último, se llevó a cabo una curva de estímulo-respuesta (0,1–0,6 μA , media de cinco fEPSP en cada estimulación) para los diferentes ratones utilizados. En la figura 27 se puede apreciar como a una intensidad de 350 μA existe una clara diferencia significativa ($p < 0,02$.) entre el grupo *cas3 camkII^{cre/wt}* y el grupo control. Mientras que el grupo control presenta una fEPSP de aproximadamente 100% el grupo experimental presenta 75%. Estos datos podrían indicar que las diferencias observadas en los análisis de LTP entre los diferentes grupos de estudio, podría deberse a un defecto en la transmisión sináptica basal.

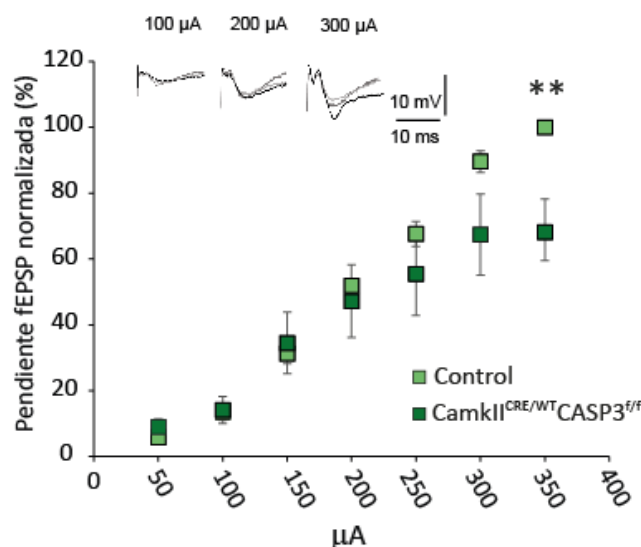


Figura 27. Curva estímulo-respuesta. Representación de la pendiente de fEPSP de ambos grupos de estudio, en función de la intensidad del estímulo recibido. ** $p < 0,02$.

4.2 ESTUDIO DE LA CASPASA 3 A NIVEL FISIOPATOLÓGICO. MODELO

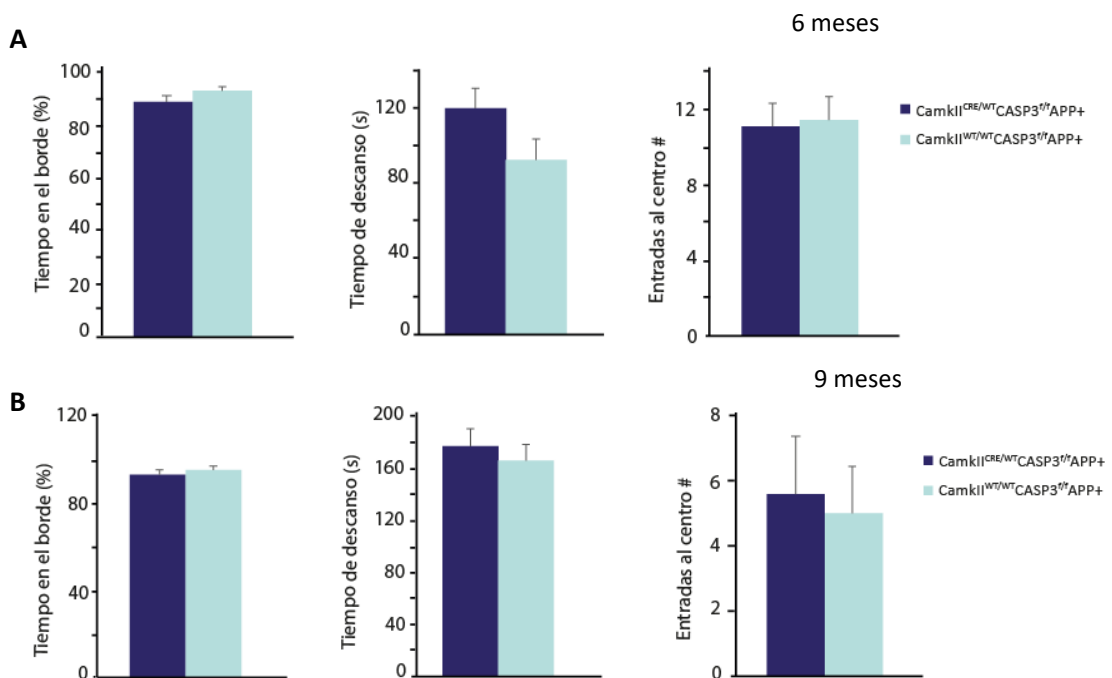
DE RATÓN CASP3^{f/f} CAMKII^{cre/wt} APP⁺

4.2.1 CARACTERIZACIÓN CONDUCTUAL

Antes de comenzar con el objetivo principal de este apartado, que es el estudio de las placas amiloides y de la posible implicación de la casp 3 en los procesos relacionados con éstas, se realizó una pequeña batería de pruebas conductuales para confirmar que no existía ninguna anomalía en cuanto a coordinación, comportamiento motor o ansiedad en el grupo experimental. Estas pruebas se realizaron a los 6 y 9 meses de edad.

4.2.1.1 EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO MOTOR

Al igual que con los ratones Casp 3^{f/f} Camk II^{cre/wt}, el comportamiento motor se realizó a través de dos pruebas. La prueba en campo abierto sirvió para evaluar la actividad espontánea y la prueba de rotarod para evaluar el equilibrio y la coordinación.



4. RESULTADOS

Figura 28. Efecto de la delección de caspasa 3 en el comportamiento motor de ratones PS1xAPP. (A, B) Se representan (de izquierda a derecha) La media del tiempo que los ratones de cada grupo se encuentran en el borde, expresado en porcentaje. La media de tiempo que los ratones permanecen en reposo, expresada en segundos y, por último, la media del número de veces que cada ratón entra en la zona establecida como centro. (A) Grupos experimental y control de 6 meses de edad. (B) Grupos experimental y control de 9 meses de edad.

En la prueba de campo abierto, se evaluó el tiempo que los ratones pasaban en el borde, el tiempo de descanso y el número de entradas al centro. Como puede observarse en la figura 28, en ninguno de estos parámetros se evidenciaron diferencias significativas entre los grupos control y experimental para las dos edades evaluadas.

Tampoco se encontraron resultados significativos en la prueba de rotarod a ninguna de las edades (Figura 29).

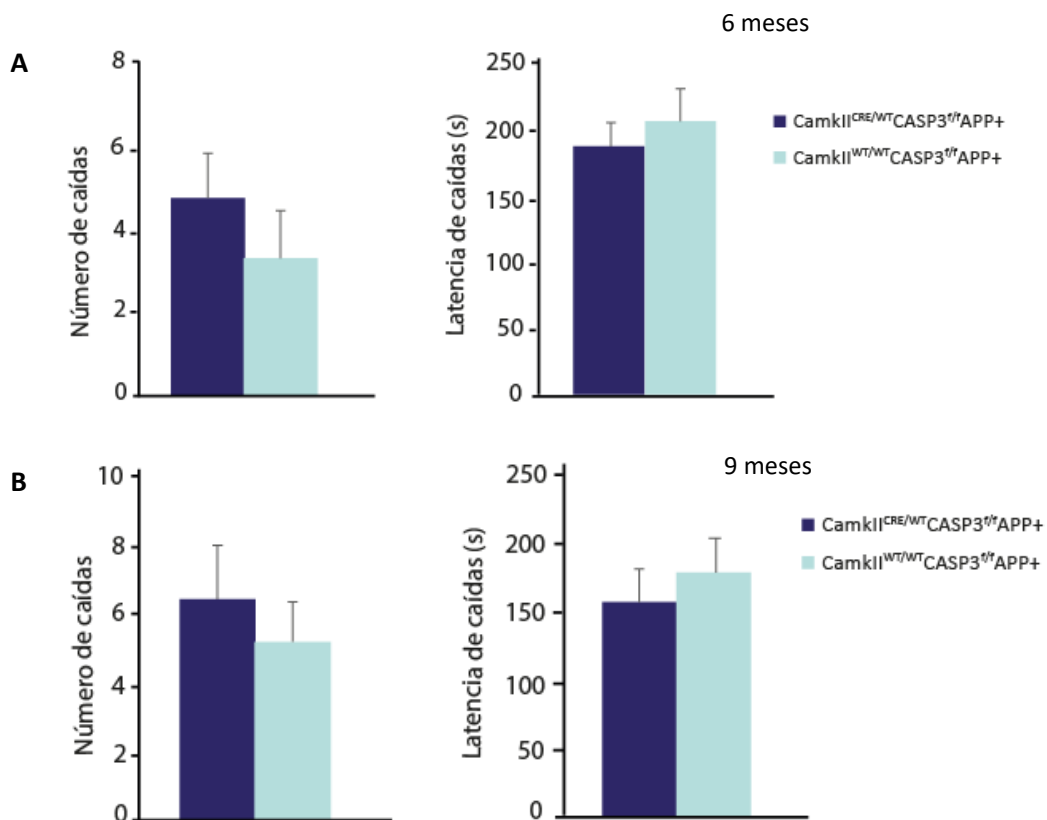


Figura 29. Efecto de la delección de caspasa 3 en el comportamiento motor (rotarod) de ratones PS1xAPP. (A, B) se representa la media de caídas en la prueba final y la media de la latencia de caídas expresada en segundos. (A) Grupos experimental y control de 6 meses de edad. (B) Mismos parámetro medido en el panel A pero en ratones de 9 meses de edad.

4.2.1.2 EVALUACIÓN DE LA ANSIEDAD

Para evaluar el estado de ansiedad de los ratones, se llevó a cabo la prueba de enterramiento de canicas de 10 min de duración. Esta prueba solo fue realizada a los seis meses de edad.

El número de canicas enterradas por el grupo de ratones experimentales fue significativamente menor a las enterradas por el grupo control ($p=0,028$) lo que sugiere que los ratones $Casp3^{f/f} CamkII^{cre/wt} APP^+$ experimentan una conducta más ansiosa que los controles (Figura 30).

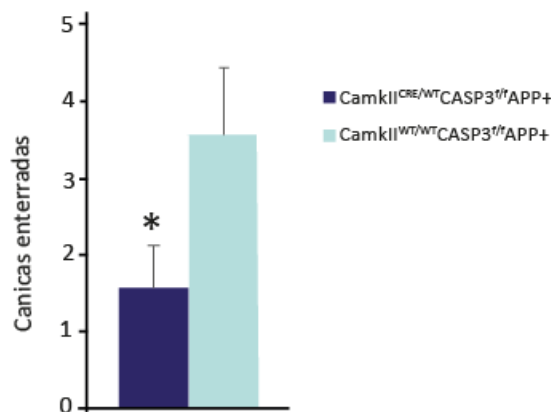


Figura 30. Efecto de la delección de caspasa 3 en la ansiedad de ratones PS1xAPP. Se representa la media de las canicas enterradas por cada grupo de estudio. * $p<0,05$.

4. RESULTADOS

4.2.2 ANÁLISIS DE PLACAS A β

Después de comprobar que los ratones experimentales no presentaban ninguna anomalía inesperada, excepto la presencia de un mayor nivel de ansiedad en el grupo experimental, se procedió al análisis de las placas de A β en ratones de 6 meses. Para ello, se realizó una inmunofluorescencia de triple marcaje en secciones coronales de hipocampo del grupo experimental y control, contra el péptido A β , la proteína Iba 1 (altamente expresada en microglía) y contra las fibras amiloides fibrilares a través de la tinción con tioflavina (Figura 31).

En el estudio morfológico de las placas, se llevó a cabo un análisis comparativo entre los grupos experimental y control, del área y perímetro de las placas y de la intensidad de fluorescencia media de A β . Con estos datos se calculó la circularidad de las placas para comprobar si éstas presentaban un fenotipo compacto o difuso. Finalmente se calculó el número de placas por área y el porcentaje de Iba 1 por área de A β , con el fin de encontrar alguna diferencia en la distribución de la microglía en los ratones casp 3 KO APP+.

En este grupo de edad, no se encontraron diferencias significativas entre los ratones control y experimental para ninguno de los parámetros estudiados (Figura 32).

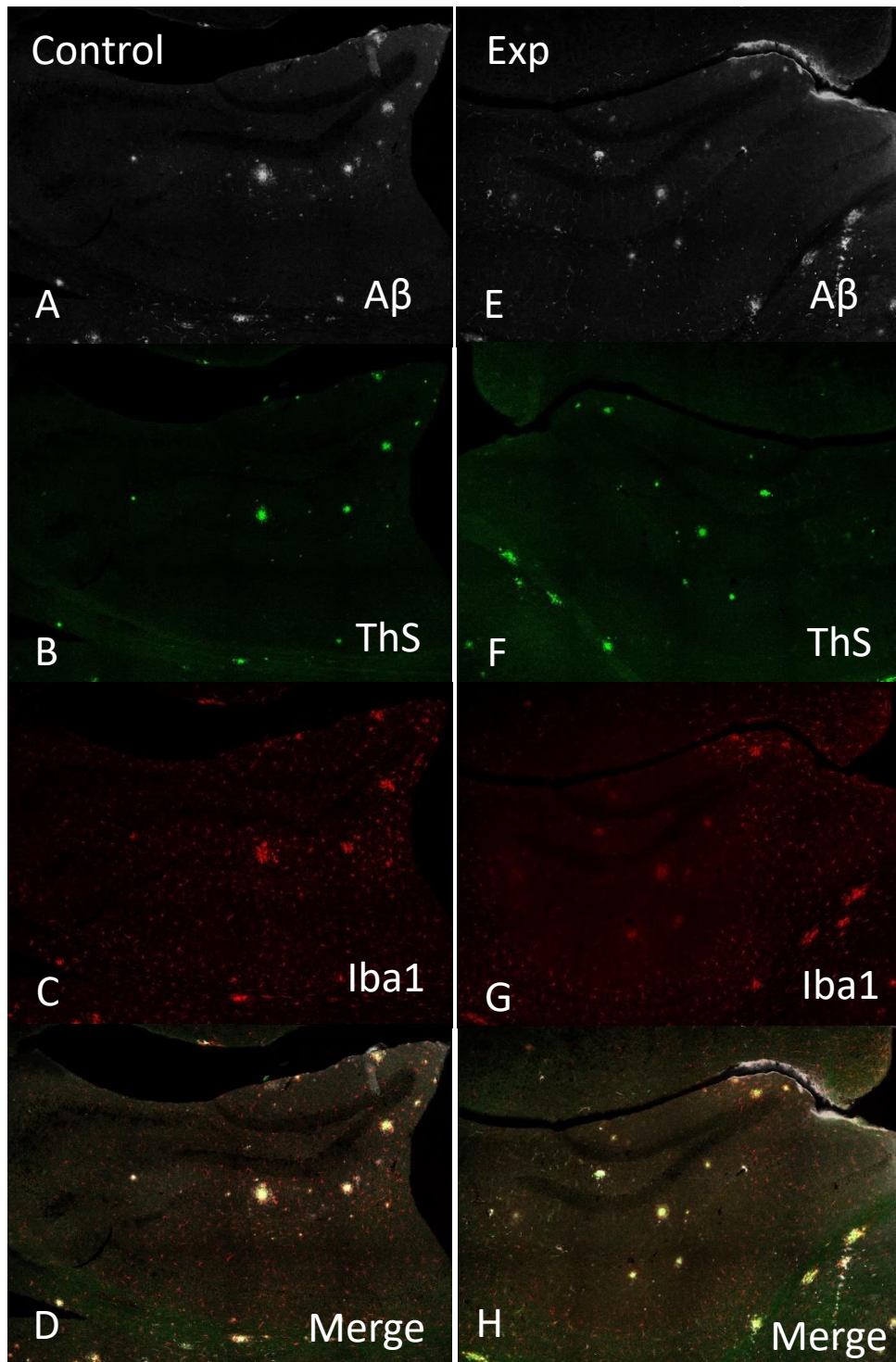


Figura 31. Estudio morfológico de las placas de A β . Inmunoreactividad frente a A β (blanco) (A, E), Iba 1 (rojo) (C, G) y marcaje con tioflavina (verde) (B, F) en secciones coronales de hipocampo de ratones Caspasa 3^{f/f} Camk II^{cre/wt} APP+ y Caspasa 3^{f/f} Camk II^{wt/wt} APP+. La barra de calibración es de 272 μ m.

4. RESULTADOS

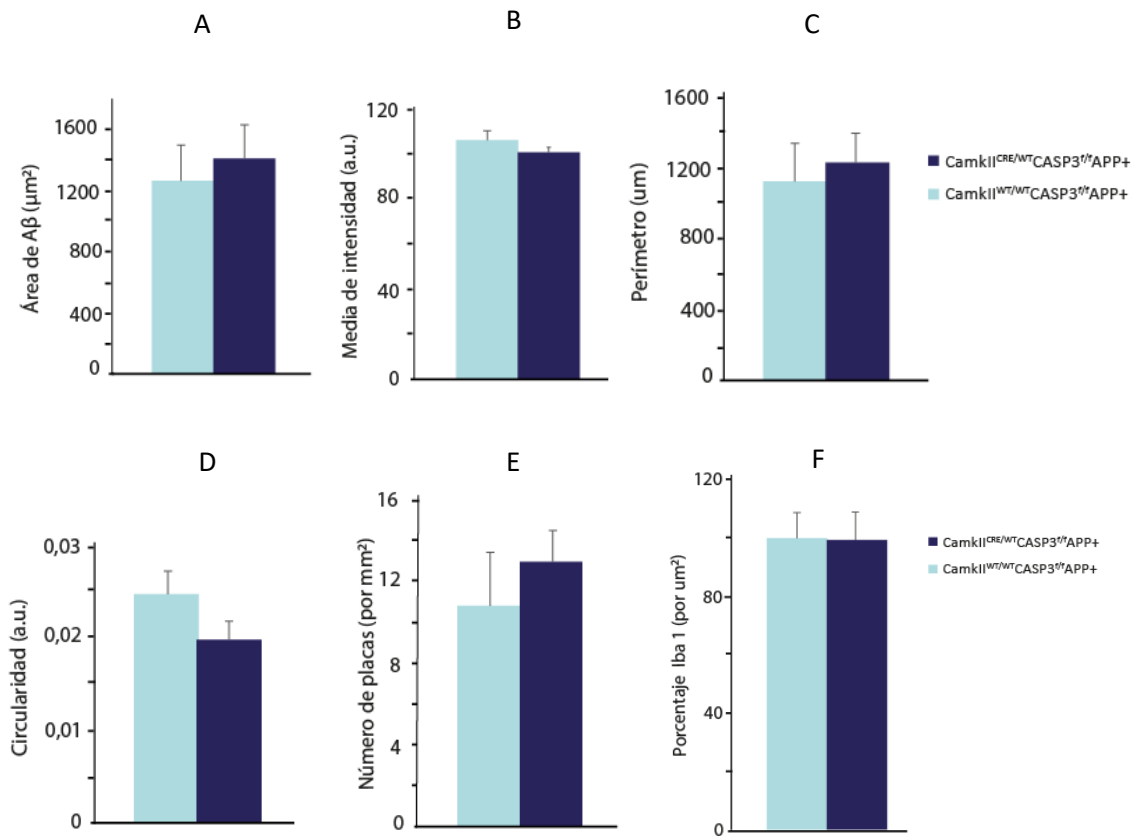


Figura 32. Estudio morfológico de las placas Aβ en ratones KO condicional de caspasa 3 APP+ y en ratones control. Representación gráfica del área de Aβ (A), de la intensidad de fluorescencia media (B) del perímetro de las placas de Aβ (C), de su circularidad (D), del número de placas por mm² (E) y del porcentaje de Iba1 por área de Aβ (F). Los valores se representan como media ± EEM.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

La casp 3 ha sido ampliamente estudiada por su papel clave como caspasa efectora en el proceso de apoptosis. Sin embargo, en la actualidad, diversos estudios han puesto de manifiesto la importancia de las funciones no apoptóticas de esta caspasa. Se ha relacionado a la casp 3 con diversos procesos, desde la diferenciación celular, facilitando la neurogénesis (Fernando and Kelly, 2002) a procesos de activación proinflamatoria de la microglía (Burguillos et al., 2011). Centrándonos en el SNC, participan en el desarrollo y la diferenciación neural, (D'Amelio et al., 2010) en el control de la ramificación y guía de crecimiento axonal, en la poda dendrítica (Williams et al., 2006) y en la plasticidad sináptica (Li et al., 2010), ámbito en el que se centró este estudio.

Por otra parte, la casp 3 también ha sido relacionada con algunas enfermedades neurodegenerativas como pueden ser la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), la enfermedad de Huntington's (HD), la enfermedad de Parkinson (EP) o el Alzheimer (EA) (D'Amelio et al., 2010). La enfermedad de Alzheimer (EA) tiene una evolución lenta y se caracteriza por una pérdida progresiva de la memoria, la orientación, y el lenguaje (Scheltens et al., 2021). El origen de la EA es desconocido, pero se considera que su riesgo de aparición está influido por factores tanto genéticos como ambientales. Entre los factores de riesgo genéticos destacan las mutaciones en los genes que codifican la proteína precursora amiloide (APP) y las presenilinas 1 y 2 (PSEN-1 y PSEN-2). La EA se caracteriza por una neurodegeneración progresiva, sobre todo en córtex e hipocampo, zonas relacionadas con la memoria e integración. Además, la muerte selectiva de estas neuronas va acompañada de la formación de placas de proteína β -amiloide y de ovillos neurofibrilares de proteína tau (Glennner y Wong, 1984). Estas proteínas son procesadas por casp 3 y por ello, en la actualidad, se postula que su procesamiento por parte de esta caspasa podría estar directamente relacionado tanto con el inicio de la enfermedad como con la ejecución final de la apoptosis neuronal (D'Amelio et al., 2010).

La Casp 3 también ha sido relacionada con el incremento de la producción del péptido A β , contribuyendo así a la patogénesis asociada a la EA (Tesco et al., 2007). Por último, otro estudio ha propuesto el papel de casp 3 en la degeneración de la sinapsis, hallándose un incremento de la expresión de procaspasa-3 y de casp 3 activa en las sinapsis de pacientes con EA (Louneva et al., 2008).

En este trabajo se han estudiado dos modelos de animales. El primero es un modelo de casp 3 condicional neuronal, que nos ha permitido investigar la implicación de casp 3 en procesos de plasticidad sináptica y el segundo, fruto del cruce del primero con ratones APPxPS1 nos permitió estudiar el papel de la casp 3 en la EA.

5.1 GENERACIÓN DEL MODELO CASPASA 3^{f/f} CAMK2^{CRE/WT} Y ESTUDIO DE LA PLASTICIDAD SINÁPTICA.

La cepa experimental empleada en este estudio es un KO en casp 3 de manera específica en la formación hipocampal, siendo mayor en la región CA1 (Tsien et al., 1996). Estos ratones se obtuvieron gracias al sistema de recombinación Cre/loxP y se empleó como promotor CAMK2, una Serina/treonina proteína quinasa regulada por el complejo calcio-calmodulina.

El valor de este modelo tan preciso reside en la dificultad existente para el estudio de los animales *knock-out* en caspasas, ya que los modelos actuales no son viables en la mayoría de los fondos genéticos y cuando lo son, presentan comportamientos anormales relacionados con graves déficit en el desarrollo embrionario. Por ejemplo, los ratones KO en casp 3 con un fondo genético 129/SvJ se ven afectados por un fenotipo de desarrollo neurológico grave y presentan muerte perinatal caracterizada por una expansión masiva de células progenitoras neuronales en el prosencéfalo unido a una apoptosis fallida (Kuida et al., 1996; Hyman et al., 2012). Si bien es cierto, que los ratones KO en casp 3 con fondo genético C57BL/6J alcanzan la edad adulta,

5. DISCUSIÓN

presentan una fertilidad reducida y algunos cambios neuropatológicos (Kumar, 2007; Jeffrey et al., 2002).

Una vez conseguimos consolidar la línea de ratones de estudio, se verificó la efectividad del sistema cre-loxP a través de una inmunofluorescencia de casp 3 y una PCR cuantitativa de CRE general. Después de comprobar que la delección en los ratones experimentales había tenido lugar de manera óptima y teniendo en cuenta los diversos defectos neurológicos descritos en la biografía sobre los modelos KO de casp 3, se realizó una evaluación del fenotipo general de los ratones, comprobando que no existían diferencias significativas estables entre el grupo control y experimental, viéndose afectado únicamente de manera puntual la actividad espontánea y la reacción al sonido. Con el fin de profundizar en el estudio de los ratones KO condicional de casp 3, corroborar que en este modelo únicamente debería verse afectada las capacidades cognitivas y teniendo en cuenta que cuando se comenzó esta tesis no existían estudios de comportamiento en ratones casp 3 KO (Li and Sheng, 2012), decidimos realizar una caracterización conductual de dichos ratones. Se evaluó el comportamiento motor, la ansiedad, la conducta social, el aprendizaje y la memoria. Como se esperaba, no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las pruebas de comportamiento realizadas excepto en la prueba de reconocimiento de objetos, donde se evaluaba la memoria a corto y largo plazo. Concretamente se encontraron diferencias con una importante significación en el índice de discriminación de la LTM ($P=0,003$). De esta manera, se confirmaría que el modelo de casp 3^{f/f} camk2^{CRE/WT}, de acuerdo a su genotipo, alcanzan la edad adulta sin presentar comportamientos anómalos ni más diferencias respecto al grupo control que las relacionadas con la memoria.

Es por ello que nuestro siguiente paso fue el estudio de las estructuras implicadas en los procesos de aprendizaje y memoria.

Las espinas dendríticas (ED) son las principales estructuras relacionadas con la entrada de sinapsis excitatorias en el SNC (Harris and Kater, 1993). Su denominación fue impuesta por

Ramón y Cajal en un artículo breve titulado “Estructura de los centros nerviosos de las aves” publicado en 1888 (Ramón y Cajal, 1888). Desde entonces, se las relacionó con la comunicación neuronal. Con el paso de los años, gracias al desarrollo de nuevas técnicas como la microscopía electrónica de transmisión (TEM), las espinas se relacionaron con la transmisión sináptica excitatoria (Gray, 1959) y finalmente, gracias a los métodos experimentales *in vitro*, se descubrió su fuerte relación con los procesos de aprendizaje y memoria debido a los cambios plásticos asociados a la LTP y LTD (Bailey et al., 2015; Segal, 2017; Yuste and Bonhoeffer, 2001). Una característica de las espinas dendríticas es la diversidad morfológica que presentan, especialmente en las neuronas piramidales. Estas estructuras no son estáticas, sino que cambian de morfología continuamente, incluso durante la edad adulta, lo que refleja la naturaleza plástica de las conexiones sinápticas (Grutzendler et al., 2002; Trachtenberg et al., 2002).

Se han identificado diversas formas de espinas dendríticas: a) las espinas tipo filopodio, de apariencia delgada y sin cabeza visible son las más inmaduras, mientras que las b) espinas en forma de hongo y las c) ramificadas se consideran las más maduras. Por último, se encontrarían las espinas d) delgadas, e) largas y delgadas y f) cortas (Berry and Nedivi, 2017; Gipson and Olive, 2017). Estudios recientes demostraron que las espinas dendríticas cortas son espinas en forma de hongo cuyo cuello no es tan fácil de visualizar en los análisis convencionales (Tønnesen et al., 2014), considerándose de esta forma las espinas cortas como espinas maduras. La ED delgadas y largas poseen mayor motilidad y suelen ser transitorias estableciendo sinapsis débiles; mientras que las espinas grandes y en forma de hongo son más estables y forman sinapsis más fuertes, ya que su densidad postináptica proporciona mayor superficie de contacto. Este grupo de espinas se encuentra relacionado con los procesos de memoria (Kasai et al., 2003; Gipson and Olive, 2017).

Los defectos en el desarrollo de las espinas dendríticas se han relacionado con varios trastornos neurológicos, como la esquizofrenia o el autismo (Huttenlocher, 1974; Glantz and

5. DISCUSIÓN

Lewis, 2000; Hutsler and Zhang, 2010; Martin et al., 2012). Además, se han encontrado alteraciones en el número de espinas dendríticas y cambios en su morfología en los trastornos de déficit cognitivo (Levenga and Willemsen, 2012).

Nuestro modelo de ratón presenta una disminución significativa de las espinas cortas o también denominadas gordas, espinas estables y maduras relacionadas con la memoria, a la vez que presenta un aumento de las espinas largas y delgadas. Esta situación se registró de manera similar en el estudio de Perez-Villegas y colaboradores en 2020 en el que sus ratones denominados *tambaleantes*, presentaron una disminución de las espinas cortas y ramificadas a la vez que un aumento de las espinas inmaduras largas y delgadas (Pérez-Villegas et al., 2020). Sin embargo, los ratones *tambaleantes* no presentaron diferencias en la densidad espinal. El aumento en las espinas dendríticas inmaduras se ha podido observar en varios trastornos de déficit cognitivo como en el síndrome de Rett (Levenga and Willemsen, 2012) o el síndrome del cromosoma X frágil. Este último se asocia con una mayor densidad espinal (Levenga and Willemsen, 2012), además de un aumento de las formas inmaduras, situación similar a la estudiada en los ratones *caspa3^{f/f} Camk2^{CRE/Wt}*, que presentan un aumento significativo de la densidad espinal, acompañado, como se ha comentado anteriormente, por un aumento de las formas inmaduras. Estos resultados correlacionan con los obtenidos en la caracterización conductual donde los ratones experimentales presentaban un déficit en la memoria a largo plazo.

Por último, los estudios de electrofisiología realizados mostraron, como se había hipotetizado según los datos obtenidos previamente, que los ratones *caspa3^{f/f} Camk2^{CRE/Wt}* mostraban una LTP inhibida, además los datos obtenidos en la curva de estímulo-respuesta indicarían que las diferencias observadas podrían deberse a un defecto en la transmisión sináptica basal. La hipótesis de que las caspasas podrían estar implicadas en los procesos de plasticidad sináptica surgió al descubrirse que las subunidades de los receptores AMPA eran sustratos de

escisión de caspasas (Chan et al., 1999; Lu et al., 2002). Numerosos estudios que emplean inhibidores farmacológicos, apoyan que la casp 3 podría estar implicada en la potenciación a largo plazo (Mattson et al., 1998; Chan et al., 1999; Chan and Mattson, 1999; Mattson and Duan, 1999; Glazner et al., 2000; Mattson, 2000; Kudryashov et al., 2001, 2002; Shimohama et al., 2001a, b; Yan et al., 2001; Gilman and Mattson, 2002; Lu et al., 2002). Entre las investigaciones *in vivo* destaca el estudio realizado por Huesmann y Clayton en 2006, donde se demostró que los niveles de casp 3 activa aumentaron postsinápticamente en la corteza auditiva de las aves durante la habituación al canto, y que el bloqueo de dicha caspasa impedía la adquisición de la memoria asociada a una canción específica (Huesmann and Clayton, 2006). En nuestro estudio, el análisis de la prueba de pulsos pareados podría señalar que la diferencia observada en la LTP no se debería, en principio, a un fallo presináptico, estos datos, por tanto, se verían apoyados por el estudio de Huesmann y Clayton, donde el aumento de casp 3 activa se produjo de manera postsináptica. Sin embargo, serían necesarios estudios complementarios para poder afirmar esta conclusión.

Investigaciones realizadas en ratas empleando inhibidores de casp 3, también muestran su implicación en los procesos de memoria y aprendizaje a nivel conductual (Stepanichev et al., 2005) y a nivel electrofisiológico (Gulyaeva et al., 2003). Este último estudio es de especial interés al ser la primera evidencia de que la actividad de casp 3 es esencial para la LTP en la región CA1 del hipocampo.

Si bien es cierto que Li y colaboradores publicaron en 2010 un estudio en el que sostenían que la casp 3 no tenía un papel crucial en la LTP, los ratones empleados en ese estudio no fueron KO condicionales, presentando, aunque mínimos, algunos cambios neuropatológicos (Kumar, 2007; Jeffrey et al., 2002). Por otra parte, el protocolo que se llevó a cabo para la inducción de la LTP fue distinto al presentado en este trabajo, así como la edad de los ratones empleados.

5. DISCUSIÓN

Aún no se ha descrito el mecanismo molecular que explica el posible papel de la casp 3 en la LTP, aunque si se ha especulado acerca de la posibilidad de que actúe a nivel pre o postsináptico, sobre alguno de los sustratos con los que se ha relacionado a esta caspasa, implicados en la LTP. Algunos ejemplos encontrados a través de una extensa búsqueda bibliográfica aparecen recogidos en las tablas 8 A y B.

Tabla 8 A y B. Sustratos sinápticos de caspasa 3

Casp3 como proteasa		
Proteína sinápticas	Seq corte	PMID:
Syntaxin-7	DIVDSIEA	18722006
Tau	DMVD	15755671
Vimentin	Caspase-3,-7: DSVD (85), Caspase-6: IDVD (259), TNLD (429)	11423904
EAAT2	DTID	16567804
GRASP1	DTVD	12207967
DISC1 (SAP 97)	QSVD	16207092
IP3receptor1	DEVD	10567423
APP	VEDV	12124429
Syntaxin-12	DLID	16179924
Syntaxin-5	DEQD	14970262
AP1 beta 1	DLFD	16170319
AP1 gamma	N/D	16170319
AP2 alpha2	VFSD	18724940
PICALM	N/D	11795487
Dynamin 1	DFADACGL	18722006
Dynamin 2	DQVD	16179924
Rab5	DESD	9321397

Caspasas		
Proteínas sinápticas	Seq corte	PMID:
Liprin	TLTDGVLD	18722006
Mint	STTDSIQE	18722006
Piccolo	GNQD (4834)	16179924
CAMKII	N/D	9685336
Integrin beta4	DELD	17178732
N-Cadherin	N/D	11277264
alpha-tubulin	N/D	10978337
beta-actin	N/D	8912861
Cortactin	N/D	11689006
Zyxin	LEIDSLSS	18722006
Dynactin-1	N/D	11425872
AMPA1-4	N/D	10412022
VAPA	SKQDGPMP	18722006
Syntaxin-10	N/D	18722006
Clathrin light chain A	GPTDSYAA	18722006
Proton ATPase	N/D	18722006
Sorting nexin	DN/D	18722006

5.2 GENERACIÓN DEL MODELO CASPASA 3^{f/f} CAMK2^{CRE/WT} APPxPS1 Y ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LAS PLACAS DE A β

Para llevar a cabo el estudio de la delección de casp 3 en la EA, se generó una nueva línea de ratones a partir de ratones Casp 3^{f/f} CamkII^{cre/wt} y modelos murinos de la EA PS1xAPP, que presentan depósitos de A β , fosforilación de Tau, inflamación en el cerebro y déficit cognitivo. Este modelo de la EA presenta una ventaja con respecto a los demás modelos ya que es un doble transgénico PS1delta9 x APPSwe, que sobreexpresa una forma mutada de las proteínas PS1 y Mo/HuAPP695swe, asociadas ambas con la EA de inicio temprano.

Gracias a este modelo murino se pretende analizar la implicación de la casp 3 en el desarrollo de la EA desde su etapa más temprana, a través del estudio de los grupos control y experimental a diferentes edades (6, 9 y 12 meses). En el presente trabajo se han mostrado los datos correspondientes al grupo de 6 meses de edad.

En primer lugar, se realizó una pequeña batería de pruebas conductuales para asegurarnos de que no existía ninguna anomalía en el grupo experimental que se debiera tener en cuenta a lo largo del estudio. Se hizo una evaluación del comportamiento motor a los 6 y 9 meses y de la ansiedad únicamente a los 6 meses. Los análisis de las pruebas motoras no mostraron diferencias significativas entre el grupo experimental (Casp 3^{f/f} CamkII^{cre/wt} APP+) y el grupo control (Casp 3^{f/f} CamkII^{wt/wt} APP+), sin embargo, sí se encontraron diferencias significativas en la prueba de enterramiento de canicas entre ambos grupos. Esta prueba, que permite evaluar el estado de ansiedad de los ratones, mostró como el grupo experimental presentaba una conducta más ansiosa que el grupo control. En 2013, Webster y colaboradores demostraron que, además de las alteraciones características en aprendizaje y memoria, los ratones APP/PS1 no presentaban otras alteraciones de comportamiento, como la ansiedad (Webster et al., 2013). Por lo tanto, esta conducta estaría relacionada con la delección de casp 3 en el modelo.

5. DISCUSIÓN

En este trabajo no se incluyeron pruebas conductuales de aprendizaje y memoria ya que nuestro objetivo se centró en el estudio de la influencia de casp 3 en el desarrollo de las placas de A β y en el papel de la microglía en la EA.

Las evidencias de los modelos de animales que estudian las funciones de APP en la patogénesis de EA, sugieren que la actividad de las caspasas juega un papel clave que impulsa los defectos sinápticos inducidos por esta proteína (Unsain et al., 2013). Se ha demostrado que los fragmentos de A β de APP son capaces de inhibir la LTP y facilitar la LTD en la región hipocampal (Cheng et al., 2009; Kim et al., 2001; Rowan et al., 2005; Shankar et al., 2008) a través de la activación de una vía dependiente de casp 3, la cual escindiría Akt, liberando la inhibición de la quinasa GSK3 β (Jo et al., 2011). Esta quinasa también es capaz de hiperfosforilar Tau, otro conocido sustrato de la casp 3 (Fasulo et al., 2002). Por otro lado, varios estudios han demostrado que la eliminación sináptica de los AMPAR inducida por A β 42 se basa en la activación de la calcineurina (Wu et al., 2010, 2012; Zhao et al., 2010), la cual, a su vez, puede ser activada por escisión de la caspasa 3 (Mukerjee et al., 2000). De esta forma, sería posible que los productos de APP activen a la casp 3, que escindiría a la calcineurina. Por último, destacar el estudio de Tesco y colaboradores, donde se demuestra que GGA3, una proteína adaptadora sustrato de casp 3, regularía los niveles de BACE y la actividad de la β -secretasa. Esta proteína se encontraría disminuida en la EA, mientras que los niveles de BACE se encontrarían aumentados. De esta manera, el estudio sugiere que la casp 3 al escindir GGA3, afectaría a la degradación y estabilización de BACE y esto conduciría a una mayor producción del péptido de A β , contribuyendo a la patogénesis de la EA (Tesco et al., 2007).

A pesar de estos estudios que apoyan nuestro objetivo de analizar como afecta la delección de casp 3 a la morfología (área, perímetro, intensidad media) y número de las placas A β , para el grupo experimental de 6 meses de edad no se obtuvieron resultados significativos de los

parámetros analizados respecto a los ratones control APP/PS1 sin casp 3 delecionada. Tampoco se obtuvieron resultados significativos en la medida del grado de compactación de las placas.

Por otra parte, teniendo en cuenta que en la EA una característica llamativa es la agrupación de la microglía alrededor de los depósitos de A β , así como los estudios que relacionan esta microglía tanto de manera beneficiosa como perjudicial con la patogénesis de la enfermedad (Lee y Landreth, 2010; Condello et al., 2011; Block et al., 2007), se decidió hacer un análisis del porcentaje de microglia por área de A β en nuestro modelo murino. En estos resultados tampoco hubo una diferencia significativa entre ambos grupos.

Estos resultados pueden deberse a la edad tan temprana a la que se ha comenzado el estudio de este modelo de ratón, ya que el desarrollo de las placas en los ratones transgénicos de APP/PS1 comienza entre los 6 y 7 meses de edad (<https://www.jax.org/>), por tanto, futuros experimentos con ratones de 9 y 12 meses de edad serán necesarios para analizar la evolución del papel de la casp 3 en la EA. Este modelo de ratón permitiría el estudio a diferentes edades de la implicación de la casp 3 en diferentes aspectos de la enfermedad, a nivel comportamental, de sinapsis o de estudios de LTP, además de los estudios de placas A β y de microglía comenzados en este trabajo.

CONCLUSIONES

1. El modelo condicional neuronal de casp 3 generado alcanza la edad adulta sin presentar cambios neuropatológicos.
2. La ausencia de casp 3 en neuronas de la región hipocampal provoca alteraciones en la memoria a largo plazo.
3. La delección de casp 3 en neuronas del hipocampo provoca una modificación en la densidad espinal y una disminución de las espinas dendríticas maduras (cortas) acompañada de un aumento de las espinas dendríticas inmaduras (largas y delgadas).
4. La ausencia de casp 3 neuronal en la región hipocampal provoca una inhibición de la LTP.
5. El modelo APP/PS1 condicional neuronal de casp 3 no presenta alteraciones en la morfología de las placas de A β respecto al modelo APP/PS1 a los 6 meses de edad. Tampoco presenta diferencias en la activación o distribución de la microglía que rodea las placas de A β .

BIBLIOGRAFÍA

- Aartsma-Rus, A., & van Putten, M. (2014). Assessing functional performance in the mdx mouse model. *Journal of visualized experiments*, 85, 51303.
- Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D.G., Heuser, J.E., Wang, X., & Akey, C.W. (2002) Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Molecular cell*, 9(2), 423–432.
- Agostini, L., Martinon, F., Burns, K., McDermott, M.F., Hawkins, P.N., & Tschopp, J. (2004). NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity*, 20, 319–325.
- Ahmed, B.Y., Yamaguchi, F., Tsumura, T., Gotoh, T., Sugimoto, K., Tai, Y., ... & Tokuda, M. (2000). Expression and subcellular localization of multifunctional calmodulin-dependent protein kinases-I, -II and -IV are altered in rat hippocampal CA1 neurons after induction of long-term potentiation. *Neuroscience Letters*, 290, 149 –153.
- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., & Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, 87, 171.
- Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-gerichtliche Medizin*, 64(), 146-148.
- Alzheimer's Association. (2019). Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers & dementia*, 15, 321-387.
- Arama, E., Agapite, J., & Steller, H. (2003). Caspase activity and a specific cytochrome C are required for sperm differentiation in *Drosophila*. *Developmental Cell*, 4(5), 687-697.
- Arama, E., Bader, M., Srivastava, M., Bergmann, A., & Steller, H. (2006). The two *Drosophila* cytochrome C proteins can function in both respiration and caspase activation. *The EMBO journal*, 25(1), 232-243.
- Armstrong, R. (2019). Risk factors for Alzheimer's disease. *Folia Neuropathologica*, 57(2), 87-105.
- Artola, A., Brocher, S., & Singer, W. (1990). Different voltage-dependent thresholds for inducing long-term depression and long-term potentiation in slices of rat visual cortex. *Nature*, 347(6288), 69–72.
- Ashkenazi, A., & Dixit, V.M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281, 1305–1308.
- Asselin, E., Mills, G.B., & Tsang, B.K. (2001). XIAP regulates Akt activity and caspase-3-dependent cleavage during cisplatin-induced apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells. *Cancer Research*, 61, 1862–1868.
- Backes, C.S., Friedmann, K.S., Mang., S., Knörck, A., Hoth, M., & Kummerow, C. (2018). Natural killer cells induce distinct modes of cancer cell death: Discrimination,

7. BIBLIOGRAFÍA

- quantification, and modulation of apoptosis, necrosis, and mixed forms. *Journal of Biological Chemistry*, 293(42).
- Baena-Lopez, L.A., Arthurton, L., Xu, D.C., & Galasso, A. (2018). Non-apoptotic Caspase regulation of stem cell properties. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 82, 118-126.
 - Bailey, C.H, Kandel, E.R., & Harris, K.M. (2015). Structural Components of Synaptic Plasticity and Memory Consolidation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(7), a021758.
 - Barnhart, B.C., Alappat, E.C. & Peter, M.E. (2003). The CD95 type I/type II model. *Seminars in immunology*, 15, 185-193.
 - Batandier, C., Leverage, X., & Fontaine, E. (2004). Opening of the mitochondrial permeability transition pore induces reactive oxygen species production at the level of the respiratory chain complex I. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 17197–17204.
 - Bateman, R.J., Xiong, C., Benzinger, T.L., Fagan, A.M., Goate, A., Fox, N.C., ... & Morris, J.C. (2012). Dominantly Inherited Alzheimer Network. Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease. *The new england journal of medicine*, 367(9), 795-804.
 - Beattie, E.C., Carroll, R.C., Yu, X., Morishita, W., Yasuda, H., von Zastrow, M., and Malenka, R.C. (2000). Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signaling mechanism shared with LTD. *Nature Neuroscience*, 3, 1291–1300
 - Berry, K.P., & Nedivi, E. Spine Dynamics: Are They All the Same? *Neuron*, 96, 43-55.
 - Bitto, N.J., Baker, P.J., Dowling, J.K., Wray-McCann, G., De Paoli, A., Tran, L.S., ... & Ferrero RL (2018). Membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* activate the noncanonical inflammasome through caspase-5 in human monocytes. *Immunology and Cell Biology*, 96, 1120–1130.
 - Bliss, T.V., Collingridge, G.L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361, 31–39.
 - Block, M.L., Zecca, L., & Hong, J.S. (2007). Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(1):57-69.
 - Bratton, S.B., & Salvesen, G.S. (2010). Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome. *Journal of cell science*, 123, 3209–3214.
 - Brion, J.P., Couck, A.M., Passareiro, E., & Flament-Durand, J. (1985). Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: an immunohistochemical study. *Journal of Submicroscopy Cytology*, 17(1), 89-96.

- Burguillos, M.A., Deierborg, T., Kavanagh, E., Persson, A., Hajji, N., Garcia-Quintanilla, A., ... & Joseph, B. (2011). Caspase signalling controls microglia activation and neurotoxicity. *Nature*, 472(7343), 319-324.
- Calderon-Garcidueñas, A.L., & Duyckaerts, C. (2018). Chapter 23 Alzheimer disease. *Handbook of Clinical Neurology*, 145, 325-337. Edited by Kovacs, G.G., & Alafuzoff, I.
- Campbell, D.S., & Holt, C.E. (2003). Apoptotic pathway and MAPKs differentially regulate chemotropic responses of retinal growth cones. *Neuron*, 37(6), 939–952.
- Campbell, D. S., & Okamoto, H. (2013). Local caspase activation interacts with Slit-Robo signaling to restrict axonal arborization. *The Journal of cell biology*, 203(4), 657–672.
- Cavalcante, G.C., Schaan, A.P., Cabral, G.F., Santana-da-Silva, M.N., Pinto, P., Vidal, A.F., & Ribeiro-Dos-Santos, Â. (2019). A Cell's Fate: An Overview of the Molecular Biology and Genetics of Apoptosis. *International journal of molecular sciences*, 20(17), 4133.
- Cecconi, F., Alvarez-Bolado, G., Meyer, B.I., Roth, K.A. & Gruss, P. (1998). Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development. *Cell*, 94, 727–737.
- Cerretti, D.P., Kozlosky, C.J., Mosley, B., Nelson, N., Van Ness, K., Greenstreet, T.A., ... & Black, R.A. (1992). Molecular cloning of the interleukin- 1 b converting enzyme. *Science*, 256, 97–100.
- Chan, S.L., Griffin, W.S., & Mattson, M.P. (1999). Evidence for caspase mediated cleavage of AMPA receptor subunits in neuronal apoptosis and Alzheimer's disease. *Journal of neuroscience research*, 57, 315–323.
- Cheng, L., Yin, W.J., Zhang, J.F., & Qi, J.S. (2009). Amyloid beta-protein fragments 25-35 and 31-35 potentiate long-term depression in hippocampal CA1 region of rats in vivo. *Synapse*, 63, 206–214.
- Chen, X., Lin, R., Chang, L., Xu, S., Wei, X., Zhang, J., ... & Wang, Q. (2013). Enhancement of long-term depression by soluble amyloid b protein in rat hippocampus is mediated by metabotropic glutamate receptor and involves activation of p38MAPK, STEP and caspase-3. *Neuroscience*, 253, 435–443.
- Chipuk, J.E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M.J., & Green, D.R. (2010). The BCL-2 family reunion. *Molecular cell*, 37(3), 299-310.
- Collingridge, G.L., Peineau, S., Howland, J.G., & Wang, Y.T. (2010). Long-term depression in the CNS. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(7), 459–473.
- Condello, C., Schain, A., & Grutzendler, J. (2011). Multicolor time-stamp reveals the dynamics and toxicity of amyloid deposition. *Scientific Reports*, 19.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Connolly, P.F., Jäger, R., & Fearnhead, H.O. (2014). New roles for old enzymes: killer caspases as the engine of cell behavior changes. *Frontiers in physiology*, 16, 5,149.
- Cornut, M., Bourdonnay, E., & Henry, T. (2020). Transcriptional Regulation of Inflammasomes. *International journal of molecular sciences*, 21(21), 8087.
- Cox, W.H. (1891). Impragnation des centralen nervensystems mit Quecksilbersalzen. *Archiv für mikroskopische Anatomie*, 37, 16-21.
- Cusack, C.L., Swahari, V., Hampton Henley, W., Michael Ramsey, J., & Deshmukh, M. (2013). Distinct pathways mediate axon degeneration during apoptosis and axon-specific pruning. *Nature Communications*, 4, 1876.
- Dash, P.K., Blum, S., & Moore, A.N. (2000). Caspase activity plays an essential role in long-term memory. *Neuroreport*, 11(12), 2811–2816.
- D'Amelio, M., Cavallucci, V., & Cecconi, F. (2010). Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death. *Cell Death Differentiation*, 17(7), 1104-1114.
- D'Amelio, M., Cavallucci, V., Middei, S., Marchetti, C., Pacioni, S., Ferri, A., ... & Cecconi, F. (2011). Caspase-3 triggers early synaptic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature neuroscience*, 14(1), 69-76.
- D'Amelio, M., Sheng, M., & Cecconi, F. (2012). Caspase-3 in the central nervous system: beyond apoptosis. *Trends in neuroscience*, 35(11), 700-9.
- de Calignon, A., Spires-Jones, T.L., Pitstick, R., Carlson, G.A., & Hyman, B.T. (2009). Tangle-bearing neurons survive despite disruption of membrane integrity in a mouse model of tauopathy. *Journal of neuropathology & experimental neurology*, 68, 757–761.
- de Calignon, A., Fox, L.M., Pitstick, R., Carlson, G.A., Bacskai, B.J., Spires-Jones, T.L., & Hyman, B.T. (2010). Caspase activation precedes and leads to tangles. *Nature*, 464, 1201–1204.
- Degtarev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., ... & Yuan, J. (2005). Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature Chemical Biology*, 1(2), 112-119.
- Dewachter, I., van Dorpe, J., Spittaels, K., Teseur, I., Van Den Haute, C., Moechars, D., & Van Leuven, F. (2000). Modeling Alzheimer's disease in transgenic mice: effect of age and of presenilin1 on amyloid biochemistry and pathology in APP/London mice. *Experimental Gerontology*, 35, 831– 841.
- Eckhart, L., Ballaun, C., Hermann, M., VandeBerg, J.L., Sipos, W., Uthman, A., Fischer, H., & Tschachler, E. (2008). Identification of Novel Mammalian Caspases Reveals an

- Important Role of Gene Loss in Shaping the Human Caspase Repertoire. *Molecular Biology and Evolution*, 25 (5), 831–841.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495-516.
 - Engert, F., & Bonhoeffer, T. (1999). Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature*, 399, 66-70.
 - Esteban, J.A., Shi, S.H., Wilson, C., Nuriya, M., Huganir, R.L., & Malinow, R. (2003). PKA phosphorylation of AMPA receptor subunits controls synaptic trafficking underlying plasticity. *Nature Neuroscience*, 6(2), 136–143.
 - Ernsberger, U. (2009). Role of neurotrophin signalling in the differentiation of neurons from dorsal root ganglia and sympathetic ganglia. *Cell and Tissue Research*, 336, 349–384.
 - Esteban, J.A., Shi, S.H., Wilson, C., Nuriya, M., Huganir, R.L., & Malinow, R. (2003). PKA phosphorylation of AMPA receptor subunits controls synaptic trafficking underlying plasticity. *Nature Neuroscience*. 6, 136–143.
 - Fasulo, L., Ugolini, G., Visintin, M., Bradbury, A., Brancolini, C., Verzillo, V., & Cattaneo, A. (2002). The Neuronal Microtubule-Associated Protein Tau Is a Substrate for Caspase-3 and an Effector of Apoptosis. *Journal of Neurochemistry*, 75(2), 624-633.
 - Ferri, C.P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., ... & Scazufca, M. (2005). Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*, 366(9503), 2112-2117.
 - Finn, J.T., Weil, M., Archer, F., Siman, R., Srinivasan, A., & Raff, M.C. (2000). Evidence That Wallerian Degeneration and Localized Axon Degeneration Induced by Local Neurotrophin Deprivation Do Not Involve Caspases. *The Journal of Neuroscience*, 20(4), 1333-1341.
 - Flores, G., Alquicer, G., Silva-Gómez, A.B., Zaldívar, G., Stewart, J., Quirion, R., & Srivastava, L.K. (2005). Alterations in dendritic morphology of prefrontal cortical and nucleus accumbens neurons in post-pubertal rats after neonatal excitotoxic lesions of the ventral hippocampus. *Neuroscience*, 133, 463-470.
 - Fuentes-Prior, P., & Salvesen, G. S. (2004). The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *The Biochemical journal*, 384(Pt 2), 201–232.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Fujii, S., Matsumoto, M., Igarashi, K., Kato, H., & Mikoshiba, K. (2000). Synaptic plasticity in hippocampal CA1 neurons of mice lacking type 1 inositol- 1,4,5-trisphosphate receptors. *Learning & Memory*, 7, 312–320.
- Fujita, S., Ikegaya, Y., Nishikawa, M., Nishiyama, N., Matsuki, N. (2001). Docosahexaenoic acid improves long-term potentiation attenuated by phospholipase A(2) inhibitor in rat hippocampal slices. *British Journal of Pharmacology*, 132, 1417–1422.
- Fujita, J., Crane, A.M., Souza, M.K., Dejosez, M., Kyba, M., Flavell, R.A., Thomson, J.A., & Zwaka, T.P. (2008). Caspase activity mediates the differentiation of embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2(6), 595-601.
- Fukunaga, K., Muller, D., Ohmitsu, M., Bako, E., DePaoli-Roach, A.A., & Miyamoto, E. (2000). Decreased protein phosphatase 2A activity in hippocampal long-term potentiation. *Journal of Neurochemistry*, 74, 807– 817.
- Galle, S.A., Geraedts, I.K., Deijen, J.B., Milders, M.V., & Drent, M.L. (2020). The interrelationship between insulin-like growth factor 1, apolipoprotein E ε4, lifestyle factors, and the aging body and brain. *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease*, 7, 265e273.
- Gatz, M., Reynolds, C.A., Fratiglioni, L., Johansson, B., Mortimer, J.A., Berg, S., Fiske, A., & Pedersen, N.L. (2006). Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. *Archives Of General Psychiatry*, 63(2), 168-174.
- Gaur, U., & Aggarwal, B.B. (2003). Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochemical pharmacology*, 66, 1403–1408.
- Gervais, F.G., Xu, D., Robertson, G.S., Vaillancourt, J.P., Zhu, Y., Huang, J., ... & Nicholson, D.W. (1999). Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's amyloid-beta precursor protein and amyloidogenic A beta peptide formation. *Cell*, 97(3), 395-406.
- Ghayur, T., Banerjee, S., Hugunin, M., Butler, D., Herzog, L., Carter, A., ... & Allen, H. (1997). Caspase-1 processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production. *Nature*, 386, 619–623.
- Gilman, C.P., & Mattson, M.P. (2002). Do apoptotic mechanisms regulate synaptic plasticity and growth-cone motility? *Neuromolecular Medicine*, 2, 197– 214.
- Gipson, C.D., & Olive, M.F. (2017). Structural and functional plasticity of dendritic spines— root or result of behavior?. *Genes, Brain and Behavior*, 16(1), 101-117.
- Glantz, L.A., & Lewis, D.A. (2000) Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *The Archives of General Psychiatry*, 57, 65–73

- Glazner, G.W., Chan, S.L., Lu, C., & Mattson, M.P. (2000). Caspase-mediated degradation of AMPA receptor subunits: a mechanism for preventing excitotoxic necrosis and ensuring apoptosis. *Journal of Neuroscience*, 20, 3641–3649.
- Glenner, G.G., & Wong, C.W. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 120, 885–890.
- Gogliotti, R.G., Senter, R.K., Rook, J.M., Ghoshal, A., Zamorano, R., Malosh, C., ... & Niswender, C.M. (2016). mGlu5 positive allosteric modulation normalizes synaptic plasticity defects and motor phenotypes in a mouse model of Rett syndrome. *Human Molecular Genetics*, 25(10), 1990-2004.
- Goosens, K.A., & Maren, S. (2002). Long-term potentiation as a substrate for memory: evidence from studies of amygdaloid plasticity and Pavlovian fear conditioning. *Hippocampus*, 12, 592–599.
- Grant, S.G., O'Dell, T.J., Karl, K.A., Stein, P.L., Soriano, P., & Kandel, E.R. (1992). Impaired long-term potentiation, spatial learning, and hippocampal development in fyn mutant mice. *Science*, 258, 1903–1910.
- Gray, E.G. (1959). Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study. *Journal of Anatomy*, 93(Pt 4),420-33.
- Greenhalgh, D.G. (1998). The role of apoptosis in wound healing. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 30, 1019–30.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y.C., Quinlan, M., Wisniewski, H.M., & Binder, L.I. (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(13), 4913-4917.
- Grutzendler, J., Kasthuri, N., & Gan, W.B. (2002). Long-term dendritic spine stability in the adult cortex. *Nature*, 420(6917), 812-816.
- Gu, Z., Serradj, N., Ueno, M., Liang, M., Li, J., Baccei, M.L., Martin, J.H., Yoshida, Y. (2017). Skilled Movements Require Non-apoptotic Bax/Bak Pathway-Mediated Corticospinal Circuit Reorganization. *Neuron*, 94(3), 626–641.
- Gulyaeva, N.V., Kudryashov, I.E., & Kudryashova, I.V. Caspase Activity Is Essential for Long-Term Potentiation. *Journal of Neuroscience Research*, 73(6), 853-864.
- Hagar, J.A., Powell, D.A., Aachoui, Y., Ernst, R.K., & Miao, E.A. (2013). Cytoplasmic LPS activates caspase-11: implications in TLR4-independent endotoxic shock. *Science*, 341, 1250–1253.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Hakem, R., Hakem, A., Duncan, G.S., Henderson, J.T., Woo, M., Soengas, M.S., & Mak, T.W. (1998). Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell*, 94(3), 339-52.
- Hapko, L., Strasser, A. & Cory, S. (2012). BH3-only proteins in apoptosis at a glance. *Journal of cell science*, 125, 1081–1087.
- Hardy, J.A., & Higgins, G.A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, 256(5054), 184-185.
- Harris, K.M., & Kater, S.B. (1994). Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annual Review of Neuroscience*, 17, 341– 371.
- Hengartner, M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407, 770–776.
- Hernández, F., Gómez de Barreda, E., Fuster-Matanzo, A., Lucas, J.J., & Avila, J. (2010). GSK3: a possible link between beta amyloid peptide and tau protein. *Experimental neurology*, 223(2), 322–325.
- Hofmann, K., Bucher, P., & Tschopp, J. (1997). The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends in biochemical sciences*, 22(5), 155-156.
- Hollville, E., & Deshmukh, M. (2018). Physiological functions of non-apoptotic caspase activity in the nervous system. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 82, 127-136.
- Hollville, E., Romero, S.E., & Deshmukh, M. (2019). Apoptotic cell death regulation in neurons. *The FEBS journal*, 286(17), 3276-3298.
- Hsieh, H., Boehm, J., Sato, C., Iwatsubo, T., Tomita, T., Sisodia, S., & Malinow, R. (2006). AMPAR removal underlies Abeta-induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron*, 52, 831–843.
- Huesmann, G.R., & Clayton, D.F. (2006). Dynamic role of postsynaptic caspase-3 and BIRC4 in zebra finch song-response habituation. *Neuron*, 52(6), 1061–1072.
- Hugh, A. (2006). Pearson and Chris Peers Physiological roles for amyloid β peptides. *The journal of physiology*, 575(1), 5–10.
- Hung, A.S., Liang, Y., Chow, T.C., Tang, H.C., Wu, S.L., Wai, M.S., & Yew, D.T. (2016). Mutated tau, amyloid and neuroinflammation in Alzheimer disease-A brief review. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 51(1), 1-8.
- Hutsler, J.J., & Zhang, H. (2010). Increased dendritic spine densities on cortical projection neurons in autism spectrum disorders. *Brain Research*, 130, 83–94.
- Huttenlocher, P.R. (1974). Dendritic development in neocortex of children with mental defect and infantile spasms. *Neurology*, 24. 203–210.

- Hyman, B.T. (2011). Caspase activation without apoptosis: insight into Ab initiation of neurodegeneration. *Nature*, 14, 5-6.
- Hyman, B.T., & Yuan, J. (2012). Apoptotic and non-apoptotic roles of caspases in neuronal physiology and pathophysiology. *Nature Reviews Neuroscience*, 13, 395–406
- Igney, F.H., & Krammer, P.H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews: Cancer*, 2, 277–288.
- Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., ... & Tschopp, J. (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*, 388(6638), 190-195.
- Itoh, S., Ito, K., Fujii, S., Kaneko, K., Kato, K., Mikoshiba, K., & Kato, H. (2001). Neuronal plasticity in hippocampal mossy fiber-CA3 synapses of mice lacking the inositol-1,4,5-trisphosphate type 1 receptor. *Brain Research*, 901, 237–246.
- Jacobson, M.D., Weil, M., & Raff, M.C. (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell*, 88, 347-354.
- Jack, C.R., Bennett, D.A., Blennow, K., Carrillo, M.C., Dunn, B., Haeberlein, S.B., ... & Sperling, R. (2018). NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimers & Dementia*, 14(4), 535-562.
- Jiao, S., & Li, Z. (2011). Nonapoptotic function of BAD and BAX in long-term depression of synaptic transmission. *Neuron*, 70, 758–772.
- Jo, J., Whitcomb, D.J., Olsen, K.M., Kerrigan, T.L., Lo, S.C., Bru-Mercier, G., ... & Cho, K. (2011). Abeta (1-42) inhibition of LTP is mediated by a signaling pathway involving caspase3, Akt1 and GSK-3beta. *Nature neuroscience*, 14, 545-547.
- Julien, O., & Wells, J.A. (2017). Caspases and their substrates. *Cell Death & Differentiation*, 24(8), 1380-1389.
- Kaiser, W.J., Upton, J.W., Long, A.B., Livingston-Rosanoff, D., Daley-Bauer, L.P., Hakem, R., Caspary, T., Mocarski, E.S. (2011). RIP3 mediates the embryonic lethality of caspase-8-deficient mice. *Nature*, 471, 368–372.
- Kasahara, J., Fukunaga, K., & Miyamoto, E. (2001). Activation of calcium/ calmodulin-dependent protein kinase IV in long-term potentiation in the rat hippocampal CA1 region. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 24044 –24050.
- Kasai, H., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Yasumatsu, N., & Nakahara, H. (2003). Structure–stability–function relationships of dendritic spines. *Trends in neurosciences*, 26(7), 360-368

7. BIBLIOGRAFÍA

- Kayagaki, N., Warming, S., Lamkanfi, M., Vande Walle, L., Louie, S., Dong, J., ... & Dixit, V.M. (2011). Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature*, 479, 117–121.
- Kemp, N., McQueen, J., Faulkes, S., & Bashir, Z.I. (2000). Different forms of LTD in the CA1 region of the hippocampus: role of age and stimulus protocol. *European Journal of Neuroscience*, 12(1), 360-366.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., & Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26,239.
- Kim, C.H., Lisman, J.E. (1999). A role of actin filament in synaptic transmission and long-term potentiation. *Journal of Neuroscience*, 19, 4314–4324.
- Kim, J.H., Anwyl, R., Suh, Y.H., Djamgoz, M.B., & Rowan, M.J. (2001). Use-dependent effects of amyloidogenic fragments of (beta)-amyloid precursor protein on synaptic plasticity in rat hippocampus in vivo. *The journal of neuroscience*, 21, 1327–1333.
- Kopec, C.D., Li, B., Wei, W., Boehm, J., & Malinow, R. (2006). Glutamate receptor exocytosis and spine enlargement during chemically induced long-term potentiation. *Journal of neuroscience*, 26, 2000-2009.
- Kosik, K.S., Joachim, C.L., & Selkoe, D.J. (1986). Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83, 4044–4048.
- Kretz, A.-L., Trauzold, A., Hillenbrand, A., Knippschild, U., Henne-Bruns, D., von Karstedt, S., & Lemke, J. (2019). TRAILblazing Strategies for Cancer Treatment. *Cancer*, 11, 456.
- Krucker, T., Siggins, G.R., Halpain, S. (2000). Dynamic actin filaments are required for stable long-term potentiation (LTP) in area CA1 of the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 6856–6861.
- Kuchibhotla, K.V., Goldman, S.T., Lattarulo, C.R., Wu, H.Y., Hyman, B.T., & Bacskai, B.J. (2008). Abeta plaques lead to aberrant regulation of calcium homeostasis in vivo resulting in structural and functional disruption of neuronal networks. *Neuron*, 59, 214–225.
- Kudryashov, I.E., Onufriev, M.V., Kudryashova, I.V., & Gulyaeva, N.V. (2001). Periods of postnatal maturation of hippocampus: synaptic modifications and neuronal disconnection. *Developmental Brain Research*, 132, 113–120
- Kudryashov, I.E., Yakovlev, A.A., Kudryashova, I., & Gulyaeva, N.V. (2002). Footshock stress alters early postnatal development of electrophysiological responses and caspase-3 activity in rat hippocampus. *Neuroscience Letters*, 332, 95–98.

- Kuida, K., Zheng, T.S., Na, S., Kuan, C., Yang, D., Karasuyama, H., Rakic, P., & Flavell, R.A. (1996). Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature*, 384(6607), 368-372.
- Kuida, K., Haydar, T.F., Kuan, C.Y., Gu, Y., Taya, C., Karasuyama, H., ... & Flavell, R.A. (1998). Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell*, 94, 325–337.
- Kumar, S., Tomooka, Y., & Noda, M. (1992). Identification of a set of genes with developmentally down-regulated expression in the mouse brain. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 185(3), 1155-1161.
- Kumar, S. (2007). Caspase function in programmed cell death. *Cell Death and Differentiation*, 14(1), 32-43.
- Kuo, C.T., Zhu, S., Younger, S., Jan, L.Y., & Jan, Y.N. (2006). Identification of E2/E3 ubiquitinating enzymes and caspase activity regulating Drosophila sensory neuron dendrite pruning. *Neuron*, 51, 283–290.
- Kvensakul, M., Yang, H., Fairlie, W.D., Czabotar, P.E., Fischer, S.F., Perugini, M.A., Huang, D.C., & Colman, P.M. (2008). Vaccinia virus anti-apoptotic F1L is a novel Bcl-2-like domain-swapped dimer that binds a highly selective subset of BH3-containing death ligands. *Cell death and differentiation*, 15, 1564–1571.
- Lauri, S.E., Taira, T., & Rauvala, H. (2000). High-frequency synaptic stimulation induces association of fyn and c-src to distinct phosphorylated components. *Neuroreport*, 11, 997–1000.
- Lee, C.Y.D. & Landreth, G.E. The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain. (2010). *The Journal of Neural Transmission*, 117, 949–60
- Leonard, J.R., Klocke, B.J., D'sa, C., Flavell, R.A., & Roth, K.A. (2002). Strain-Dependent Neurodevelopmental Abnormalities in Caspase-3-Deficient Mice. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 61(8), 673–677.
- Levenga, J., & Willemsen, R. (2012) Perturbation of dendritic protrusions in intellectual disability. *Progress in Brain Research*, 197:153–158.
- Li, Z., Jo, J., Jia, J.M., Lo, S.C., Whitcomb, D.J., Jiao, S., Cho, K., & Sheng, M. (2010). Caspase-3 activation via mitochondria is required for long-term depression and AMPA receptor internalization. *Cell*, 141, 859-871.
- Li, Z., & Sheng, M. (2012). Caspases in synaptic plasticity. *Molecular Brain*, 5, 15.
- Ling, D.S.F, Benardo, L.S., Serrano, P.A., Blace, N., Kelly, M.T., Crary, J.F., & Sacktor, T.C. (2002). Protein kinase Mzeta is necessary and sufficient for LTP maintenance. *Nature Neuroscience*, 5, 295–296.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., & Wang, X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: Requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 86, 147–157.
- Locci, A., Orellana, H., Rodriguez, G., Gottliebson, M., McClarty, B., Dominguez, S., Keszycki, R., & Dong, H. (2021). Comparison of memory, affective behavior, and neuropathology in APPNLGF knock-in mice to 5xFAD and APP/PS1 mice. *Behavioural Brain Research*, 404, 113192.
- Lockshin, R.A., & Williams, C.M. (1965). Programmed cell death. V. Cytolytic enzymes in relation to the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *Journal of insect physiology*, 11(7), 831-844.
- Louneva, N., Cohen, J.W., Han, L.Y., Talbot, K., Wilson, R.S., Bennett, D.A., Trojanowski, J.Q., & Arnold, S.E. (2008). Caspase-3 is enriched in postsynaptic densities and increased in Alzheimer's disease. *The American Journal of Pathology*, 173(5), 1488-1495.
- Lu, Y.F., Kojima, N., Tomizawa, K., Moriwaki, A., Matsushita, M., Obata, K., & Matsui, H. (1999). Enhanced synaptic transmission and reduced threshold for LTP induction in fyn-transgenic mice. *European Journal of Neuroscience*, 11, 75– 82.
- Lu, C., Fu, W., Salvesen, G.S., & Mattson, M.P. (2002). Direct cleavage of AMPA receptor subunit GluR1 and suppression of AMPA currents by caspase-3: implications for synaptic plasticity and excitotoxic neuronal death. *Neuromolecular Medicine*, 1, 69–79.
- Lynch, G., & Baudry, M. (1987). Brain spectrin, calpain and long-term changes in synaptic efficacy. *Brain Research Bulletin*, 18, 809–815.
- Lynch, G., Muller, D., Seubert, P., & Larson, J. (1988). Long-term potentiation: persisting problems and recent results. *Brain Research Bulletin*, 21, 363–372.
- MacKenzie, S.H., & Clark A.C. (2012). Death by caspase dimerization. *Advances in experimental medicine and biology*, 747, 55-73.
- Maelfait, J., Vercammen, E., Janssens, S., Schotte, P., Haegman, M., Magez, S., & Beyaert, R. (2008). Stimulation of Toll-like receptor 3 and 4 induces interleukin-1beta maturation by caspase-8. *The Journal of experimental medicine*, 205(9), 1967–1973.
- Mandelkow, E.M., & Mandelkow, E. (2012). Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2, 26.
- Martin, K.R., Corlett, A., Dubach, D., Mustafa, T., Coleman, H.A., Parkinton, H.C., ... & Pritchard, M.A. (2012) Over-expression of RCAN1 causes down syndrome-like hippocampal deficits that alter learning and memory. *Human Molecular Genetics*, 21, 3025–3041

- Martinon, F., Burns, K., & Tschopp, J. (2002). The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Molecular Cell*, 10, 417–426.
- Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G.C., & Kasai, H. (2004). Structural basis of longterm potentiation in single dendritic spines. *Nature*, 429, 761-766.
- Mattson, M.P., Keller, J.N., & Begley, J.G. (1998). Evidence for synaptic apoptosis. *Experimental Neurology*, 153, 35–48.
- Mattson, M.P., & Duan, W. (1999). 'Apoptotic' biochemical cascades in synaptic compartments: roles in adaptive plasticity and neurodegenerative disorders. *Journal of Neuroscience Research*, 58, 152–166.
- McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D., & Stadlan, E.M. (1984). Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*, 34(7), 939-944.
- McKhann, G.M., Knopman, D.S., Chertkow, H., Hyman, B.T., Jack, C.R., Kawas, C.H., ... & Phelps, C.H. (2011). The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 7(3), 263-269.
- Micheau, O., & Tschopp, J. (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*, 114(2), 181-90.
- Miura, M., Zhu, H., Rotello, R., Hartwig, E.A., & Yuan, J. (1993). Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 β -converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell*, 75, 4, 653-660.
- Miwa, K., Asano, M., Horai, R., Iwakura, Y., Nagata, S., & Suda, T. (1998). Caspase 1-independent IL-1 β release and inflammation induced by the apoptosis inducer Fas ligand. *Nature Medicine*, 4, 1287–1292.
- Morton, R.A., Kuenzi, F.M., Fitzjohn, S.M., Rosahl, T.W., Smith, D., Zheng, H., ... & Seabrook, G.R. (2002). Impairment in hippocampal long-term potentiation in mice under-expressing the Alzheimer's disease related gene presenilin-1. *Neuroscience Letters*, 319, 37– 40.
- Mukherjee, A., & Williams, D.W. (2017). More alive than dead: non-apoptotic roles for caspases in neuronal development, plasticity and disease. *Cell Death and Differentiation*, 24(8), 1411-1421.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Mukerjee, N., McGinnis, K.M., Park, Y.H., Gnegy, M.E., & Wang, K.K. (2000). Caspase-mediated proteolytic activation of calcineurin in thapsigargin-mediated apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 379, 337–343.
- Muller, D., Molinari, I., Soldati, L., & Bianchi, G. (1995). A genetic deficiency in calpastatin and isovalerylcarnitine treatment is associated with enhanced hippocampal long-term potentiation. *Synapse*, 19, 37–45.
- Mychasiuk, R., Gibb, R., & Kolb, B. (2013). Visualizing the effects of a positive early experience, tactile stimulation, on dendritic morphology and synaptic connectivity with Golgi-Cox staining. *Journal of Visualized Experiments*, (79).
- Nagerl, U.V., Eberhorn, N., Cambridge, S.B., & Bonhoeffer, T. (2004). Bidirectional activitydependent morphological plasticity in hippocampal neurons. *Neuron*, 44, 759-767.
- Nelson, C.D., Kim, M.J., Hsin, H., Chen, Y., & Sheng, M. (2013). Phosphorylation of threonine-19 of PSD-95 by GSK-3b is required for PSD-95 mobilization and long-term depression. *Journal of neuroscience*, 33, 12122–12135.
- Nicholson, D.W., Ali, A., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., Ding, C.K., Gallant, M., ... & Lazebnik, Y.A. (1995). Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*, 376, 37–43.
- Nijhawan, D., Honarpour, N., & Wang, X. (2000). Apoptosis in neural development and disease. *The Annual Review of Neuroscience*, 23, 73–87.
- Nikolaev, A., McLaughlin, T., O’Leary, D.D., & Tessier-Lavigne, M. (2009). APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature*, 457, 981–989.
- Norbury, C.J., & Hickson, I.D. (2001). Cellular responses to DNA damage. *The Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 41, 367–401.
- Oberst, A., Dillon, C.P., Weinlich, R., McCormick, L.L., Fitzgerald, P., Pop, C., ... & Green, D.R. (2011). Catalytic activity of the caspase-8-FLIP(L) complex inhibits RIPK3-dependent necrosis. *Nature*, 471(7338), 363-7.
- Oh, W.C., Hill, T.C., & Zito, K. (2013). Synapse-specific and size-dependent mechanisms of spine structural plasticity accompanying synaptic weakening. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(4), E305-12.
- Okamoto, K., Nagai, T., Miyawaki, A., & Hayashi, Y. (2004). Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity. *Nature neuroscience*, 7, 1104-1112.
- Olsen, K.M., & Sheng, M. (2012). NMDA receptors and BAX are essential for Abeta impairment of LTP. *Scientific Reports*, 2, 225

- Opferman, J.T., & Korsmeyer, S.J. (2003). Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nature Immunology*, 4, 410–5.
- Ozoren, N. & El-Deiry, W.S. (2002) Defining characteristics of Types I and II apoptotic cells in response to TRAIL. *Neoplasia*, 4, 551-557.
- Parrish, A.B., Freel, C.D., & Kornbluth, S. (2013). Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(6), a008672.
- Parsons, M.P., & Raymond, L.A. (2014). Extrasynaptic NMDA receptor involvement in central nervous system disorders. *Neuron*, 82, 279–293.
- Peineau, S., Bradley, C., Taghibiglou, C., Doherty, A., Bortolotto, Z.A., Wang, Y.T., & Collingridge, G.L. (2008). The role of GSK-3 in synaptic plasticity. *British Journal of Pharmacology*. 153 (Suppl 1), S428–S437.
- Penzes, P., Cahill, M.E., Jones, K.A., Van Leeuwen, J.E., & Woolfrey, K.M. (2011). Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nature Neuroscience*, 14: 285–293.
- Pérez-Villegas, E.M., Pérez-Rodríguez, M., Negrete-Díaz, J.V., Ruiz, R., Rosa, J.L., Alvarez de Toledo, G., Rodríguez-Moreno, A., & Armengol, J.A. (2020). HERC1 Ubiquitin Ligase Is Required for Hippocampal Learning and Memory. *Frontiers in Neuroanatomy*, 19.
- Pollock, N.J., Mirra, S.S., Binder, L.I., Hansen, L.A., & Wood, J.G. (1986). Filamentous aggregates in Pick's disease, progressive supranuclear palsy, and Alzheimer's disease share antigenic determinants with microtubule-associated protein, tau. *Lancet*, 2(8517), 1211.
- Pompeiano, M., Blaschke, A.J., Flavell, R.A., Srinivasan, A. & Chun, J. (2000). Decreased apoptosis in proliferative and postmitotic regions of the caspase 3-deficient embryonic central nervous system. *Journal of Comparative Neurology*, 423, 1–12.
- Priller, C., Bauer, T., Mitteregger, G., Krebs, B., Kretzschmar, H.A., & Herms, J. (2006). Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *Journal of neuroscience*, 26(27), 7212-7221.
- Raff, M.C., Whitmore, A.V., & Finn, J.T. (2002). Axonal self-destruction and neurodegeneration. *Science*, 296, 868–871.
- Ramirez, M.L.G., & Salvesen, G.S. (2018). A primer on caspase mechanisms. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 82, 79-85.
- Ramón y Cajal, S. (1888). Estructura de los centros nerviosos de las aves. *Revista trimestral de Histología normal y patológica*, 1, 1-10.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Rébé, C., Cathelin, S., Launay, S., Filomenko, R., Prévotat, L., L'Ollivier, C., ... & Solary, E. (2007). Caspase-8 prevents sustained activation of NF-kappaB in monocytes undergoing macrophagic differentiation. *Blood*, 109(4), 1442-1450.
- Riccomagno, M.M., & Kolodkin, A.L. (2015). Sculpting neural circuits by axon and dendrite pruning. *Annual review of cell and developmental biology*, 31, 779–805.
- Rogers, D.C., Fisher, E.M., Brown, S.D., Peters, J., Hunter, A.J., & Martin, J.E. (1997). Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment. *Mammalian Genome*, 8(10), 711–713.
- Rowan, M.J., Klyubin, I., Wang, Q., & Anwyl, R. (2005). Synaptic plasticity disruption by amyloid beta protein: modulation by potential Alzheimer's disease modifying therapies. *Biochemical society transactions*, 33, 563–567.
- Sagot, Y., Dubois-Dauphin, M., Tan, S.A., de Bilbao, F., Aebischer, P., Martinou, J.C., & Kato, A.C. (1995). Bcl-2 overexpression prevents motoneuron cell body loss but not axonal degeneration in a mouse model of a neurodegenerative disease. *Journal of Neuroscience*, (11) 7727-7733.
- Salehi, A., Delcroix, J.D., & Swaab, D.F. (2004). Alzheimer's disease and NGF signaling. *Journal of Neural Transmission*, 111, 323–345.
- Salvesen, G.S., & Ashkenazi, A. (2011). Snapshot: caspases. *Cell*, 147(2), 476-476.
- Scheltens, P., De Strooper, B., Kivipelto, M., Holstege, H., Chételat, G., Teunissen, C.E., Cummings, J., & van der Flier, W.M. (2021). Alzheimer's disease. *Lancet*, 397(10284), 1577-1590.
- Shankar, G.M., Li, S., Mehta, T.H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N.E., Smith, I., ... & Selkoe, D.J. (2008). Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nature medicine*, 14(8), 837–842.
- Sigurdsson, E.M., Knudsen, E., Asuni, A., Fitzer-Attas, C., Sage, D., Quartermain, D., & Wisniewski, T. (2004). An attenuated immune response is sufficient to enhance cognition in an Alzheimer's disease mouse model immunized with amyloid-beta derivatives. *The journal of neuroscience*, 24(28), 6277-6282.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., ... & Peter, M. E. (1998) Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 17, 1675-1687.
- Seaman, J.E., Julien, O., Lee, P.S., Rettenmaier, T.J., Thomsen, N.D., & Wells, J.A. (2016). Caspases: caspases can cleave after aspartate, glutamate and phosphoserine residues. *Cell Death and Differentiation*, 23(10), 1717-26.
- Segal, M. (2017). Dendritic spines: morphological building blocks of memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 138, 3–9.

- Selkoe, D.J. (2000a). Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 924, 17-25.
- Selkoe, D.J. (2000b). The genetics and molecular pathology of Alzheimer's disease: Roles of amyloid and the presenilins. *Neurologic Clinics*, 18, 903-922.
- Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S., & Kumar, S. (2015). Old, new and emerging functions of caspases. *Cell death and differentiation*, 22(4), 526-539.
- Shankar, G.M., Li, S., Mehta, T.H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N.E., Smith, I., ... & Selkoe, D.J. (2008). Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nature Medicine*, 14(8), 837-842.
- Schuldiner, O., & Yaron, A. (2015). Mechanisms of developmental neurite pruning. *Cellular and molecular life sciences*, 72(1), 101-119.
- Shamas-Din, A., Brahmabhatt, H., Leber, B., & Andrews, D.W. (2011). BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis. *Biochimica et biophysica acta*, 1813, 508-520.
- Shimohama, S., Tanino, H., & Fujimoto, S. (2001a). Differential expression of rat brain caspase family proteins during development and aging. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 89, 1063-1066.
- Shimohama, S., Tanino, H., & Fujimoto S. (2001b). Differential subcellular localization of caspase family proteins in the adult rat brain. *Neuroscience Letters*, 315, 125-128.
- Schneider, I., Reverse, D., Dewachter, I., Ris, L., Caluwaerts, N., Kuiperi, C., ... & Herms, J. (2001). Mutant presenilins disturb neuronal calcium homeostasis in the brain of transgenic mice, decreasing the threshold for excitotoxicity and facilitating long-term potentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 11539- 11544.
- Singh, R., Letai, A., & Sarosiek, K. (2019). Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*, 20(3), 175-193.
- Simon, D.J., Weimer, R.M., McLaughlin, T., Kallop, D., Stanger, K., Yang, J., ... & Tessier-Lavigne, M.A. (2012). Caspase Cascade Regulating Developmental Axon Degeneration. *Journal of Neuroscience*, 32(49). 17540-17553.
- Simon, D.J., Pitts, J., Hertz, N.T., Yang, J., Yamagishi, Y., Olsen, O., ... & Tessier-Lavigne, M. (2016). Axon Degeneration Gated by Retrograde Activation of Somatic Pro-apoptotic Signaling. *Cell*, 164(5), 1031-1045.
- Smear, M.C., Tao, H.W., Staub, W., Orger, M.B., Gosse, N.J., Liu, Y., ... & Baier, H. (2007). Vesicular glutamate transport at a central synapse limits the acuity of visual perception in zebrafish. *Neuron*, 53, 65- 77.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Sordo-Bahamonde, C., Lorenzo-Herrero, S., Payer, Á.R., Gonzalez, S., & López-Soto, A. (2020). Mechanisms of Apoptosis Resistance to NK Cell-Mediated Cytotoxicity in Cancer. *International journal of molecular sciences*, 21(10), 3726.
- Sordet, O., Rébé, C., Plenchette, S., Zermati, Y., Hermine, O., Vainchenker, W., ... & Dubrez-Daloz, L. (2002). Specific involvement of caspases in the differentiation of monocytes into macrophages. *Blood*, 100(13), 4446-4453.
- Sperling, R.A., Aisen, P.S., Beckett, L.A., Bennett, D.A., Craft, S., Fagan, A.M., & Phelps, C.H. (2011). Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers & Dementia*, 7(3), 280-292.
- Stean, J.P. (1974). Some evidence of the nature of the Golgi-Cox deposit and its biochemical origin. *Histochemistry*, 40, 377-83.
- Stepanichev, M.Y., Kudryashova, I.V., Yakovlev, A.A., Onufriev, M.V., Khaspekov, L.G., Lyzhin, A.A., Lazareva, N.A., & Gulyaeva, N.V. (2005). Central administration of a caspase inhibitor impairs shuttle-box performance in rats. *Neuroscience*. 136(2), 579–591.
- Tait, S.W., & Green, D.R. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11(9), 621-32.
- Tesco, G., Koh, Y.H., Kang, E.L., Cameron, A.N., Das, S., Sena-Esteves, M., ... & Tanzi, R.E. (2007). Depletion of GGA3 stabilizes BACE and enhances beta-secretase activity. *Neuron*, 54(5), 721–737.
- Tessier-Lavigne, M., & Goodman, C.S. 1996. The molecular biology of axon guidance. *Science*, 274(5290), 1123-1133.
- Thornberry, N.A., Bull, H.G., Calaycay, J.R., Chapman, K.T., Howard, A.D., Kostura, M.J., Miller, D.K., Molineaux, S.M., Weidner, J.R., Aunins, J. (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature*. 356(6372), 768-774.
- Thornberry, N.A., & Lazebnik, Y. (1998). Caspases: Enemies within. *Science*, 281, 1312–1316.
- Tokuda, M., Ahmed, B.Y., Lu, Y.F., Matsui, H., Miyamoto, O., Yamaguchi, F., Konishi, R., & Hatase, O. (1997). Involvement of calmodulin-dependent protein kinases-I and -IV in long-term potentiation. *Brain Research*, 755, 162–166.
- Tønnesen, J., Katona, G., Rózsa, B., & Nägerl, U.V. (2014). Spine neck plasticity regulates compartmentalization of synapses. *Nature Neuroscience*, 17, 678–685.

- Torromino, G., Maggi, A., & De Leonibus, E. (2021). Estrogen-dependent hippocampal wiring as a risk factor for age-related dementia in women. *Progress in neurobiology*, 197, 101895.
- Trachtenberg, J.T., Chen, B.E., Knott, G.W., Feng, G., Sanes, J.R., Welker, E., & Svoboda, K. (2002). Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature*, 420(6917), 788-794.
- Tsien, J.Z., Chen, D.F., Gerber, D., Tom, C., Mercer, E.H., Anderson, D.J., ... & Tonegawa, S. (1996). Subregion- and Cell Type–Restricted Gene Knockout in Mouse Brain. *Cell*, 87, 1317–1326.
- Turner, P.R., O'Connor, K., Tate, W.P., & Abraham, W.C. (2003). Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Progress in neurobiology*, 70(1), 1-32.
- Unsain, N., Higgins, J.M., Parker, K.N., Johnstone, A.D., & Barker, P.A. (2013). XIAP regulates caspase activity in degenerating axons. *Cell Reports*, 4, 751–763.
- Usdin, M.T., Shelbourne, P.F., Myers, R.M., & Madison, D.V. (1999). Impaired synaptic plasticity in mice carrying the Huntington's disease mutation. *Human Molecular Genetics*, 8, 839–846. of Sciences, Moscow, Russia
- Van Battum, E.Y., Brignani, S., & Pasterkamp, R.J. (2015). Axon guidance proteins in neurological disorders. *The lancet neurology*, 14(5), 532–546.
- Van Opdenbosch, N., & Lamkanfi, M. (2019). Caspases in Cell Death, Inflammation, and Disease. *Immunity*, 50(6), 1352-1364.
- Vanden Berghe, T., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H., & Vandenabeele, P. (2014). Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature reviews molecular cell biology*, 15(2), 135-47.
- Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T., & Kroemer, G. (2010). Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(10), 700-14.
- Venero, J.L., Burguillos, M.A., Brundin, P., & Joseph, B. (2011). The executioners sing a new song: killer caspases activate microglia. *Cell Death and Differentiation*, 18(11), 1679-91.
- Vince, J.E., Wong, W.W., Gentle, I., Lawlor, K., Allam, R., O'Reilly, L., & Tschopp, J. (2012). Inhibitor of apoptosis proteins limit RIP3 kinase-dependent interleukin-1 activation. *Immunity*, 36(2), 215-227.
- Voskoboinik, I., Smyth, M.J., & Trapani, J.A. (2006). Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. *Nature reviews immunology*, 6, 940–952.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Walter, J., Schindzielorz, A., Grünberg, J., & Haass, C. (1999) Phosphorylation of presenilin-2 regulates its cleavage by caspases and retard progression of apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(4), 1391–1396.
- Wang, H.G., Pathan, N., Ethell, I.M., Krajewski, S., Yamaguchi, Y., Shibasaki, F., ... & Reed, J.C. (1999). Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science*, 284, 339–343.
- Wang, S., Miura, M., Jung, Y. K., Zhu, H., Li, E., & Yuan, J. (1998). Murine caspase-11, an ICE-interacting protease, is essential for the activation of ICE. *Cell*, 92(4), 501-509.
- Watts, R.J., Hoopfer, E.D., & Luo, L. (2003). Axon pruning during Drosophila metamorphosis: evidence for local degeneration and requirement of the ubiquitin-proteasome system. *Neuron*, 38, 871–885.
- Webster, S.J., Bachstetter, A.F., & Van Eldik, L.J. (2013). Comprehensive behavioral characterization of an APP/PS-1 double knock-in mouse model of Alzheimer's disease *Alzheimer's Research & Therapy*, 5(3), 28.
- Wellington, C.L. & Hayden, M.R. (1997). Of molecular interactions, mice and mechanisms: new insights into Huntington's disease. *Current Opinion in Neurology*, 10, 291–298.
- Williams, D.W., Kondo, S., Krzyzanowska, A., Hiromi, Y., & Truman, J.W. (2006). Local caspase activity directs engulfment of dendrites during pruning. *Nature neuroscience*, 9, 1234–1236.
- Wolf, M.J., Izumi, Y., Zorumski, C.F., & Gross, R.W. (1995). Long-term potentiation requires activation of calcium-independent phospholipase A2. *FEBS Letters*, 377, 358 – 362.
- Wong, M. (2008). Stabilizing dendritic structure as a novel therapeutic approach for epilepsy. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 8, 907–915.
- Wu, H.Y., Hudry, E., Hashimoto, T., Kuchibhotla, K., Rozkalne, A., Fan, Z., ... & Hyman, B.T. (2010). Amyloid beta induces the morphological neurodegenerative triad of spine loss, dendritic simplification, and neuritic dystrophies through calcineurin activation. *The journal of neuroscience*, 30, 2636–2649.
- Wu, H.Y., Hudry, E., Hashimoto, T., Uemura, K., Fan, Z.Y., Berezovska, O., ... & Hyman, B.T. (2012). Distinct dendritic spine and nuclear phases of calcineurin activation after exposure to amyloid-b revealed by a novel fluorescence resonance energy transfer assay. *The journal of neuroscience*, 32, 5298–5309.

- Xu, X., Lai, Y., & Hua, Z.C. (2019). Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Bioscience reports*, 39(1).
- Yan, X.X., Najbauer, J., Woo, C.C., Dashtipour, K., Ribak, C.E., & Leon, M. (2001). Expression of active caspase-3 in mitotic and postmitotic cells of the rat forebrain. *Journal of Comparative Neurology*, 433, 4–22.
- Yaron, A., & Schuldiner, O. (2016). Common and Divergent Mechanisms in Developmental Neuronal Remodeling and Dying Back Neurodegeneration. *Current Biology*, 26(13), R628-R639.
- Yi, C.H., & Yuan, J. (2009). The Jekyll and Hyde functions of caspases. *Developmental Cell*, 16(1), 21-34
- Yi, Y.S. (2017). Caspase-11 non-canonical inflammasome: a critical sensor of intracellular lipopolysaccharide in macrophage-mediated inflammatory responses. *Immunology*, 152, 207–217.
- Yin, X. M., Wang, K., Gross, A., Zhao, Y., Zinkel, S., Klocke, B., Roth, K. A. & Korsmeyer, S. J. (1999) Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature*, 400, 886-891.
- Youle, R.J., & Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature reviews molecular cell biology*, 9(1), 47-59.
- Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H.M., & Horvitz, H.R. (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell*, 75(4), 641-652.
- Yuste, R., & Bonhoeffer, T. (2001). Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annual Review of Neuroscience*, 24, 1071– 1089.
- Zhang, H, Zhou, X., McQuade, T., Li, J., Chan, F.K., & Zhang, J. (2011). Functional complementation between FADD and RIP1 in embryos and lymphocytes. *Nature*, 471, 373–376.
- Zhao, W., Santini, F., Breese, R., Ross, D.A., Zhang, X.D., Stone, D., ... & W. Ray. (2010). Inhibition of calcineurin-mediated endocytosis and alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors prevents amyloid beta oligomer-induced synaptic disruption. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(10), 7619-7632.
- Zhao, H., Jaffer, T., Eguchi, S., Wang, Z., Linkermann, A., & Ma, D. (2015) Role of necroptosis in the pathogenesis of solid organ injury. *Cell death & disease*, 6(11), e1975.
- Zhong, F.L., Robinson, K., Teo, D.E.T., Tan, K.-Y., Lim, C., Harapas, C.R., ... & Reversade, B. (2018). Human DPP9 represses NLRP1 inflammasome and protects against

7. BIBLIOGRAFÍA

- autoinflammatory diseases via both peptidase activity and FIIND domain binding. *The journal of biological chemistry*, 293(49), 18864–18878.
- Zhou, Q., Homma, K.J., & Poo, M.M. (2004). Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron*, 44, 749-757.

ANEXO 1

Tabla anexo 1b. Valores estadísticos obtenidos durante las distintas semanas de monitorización. En la tabla se muestran el valor promedio y el error estándar de todos los parámetros evaluados en el grupo control, organizados por semanas.

		GRUPO CONTROL							
		semana 1		semana 2		semana 3		semana 4	
Parámetro	Puntuación	Media	EEM	Media	EEM	Media	EEM	Media	EEM
Estado del pelaje	0-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Color del pelaje	0-3	0,75	0,25	0,75	0,25	1,00	0,00	1,00	0,00
Parches de calvicie	0-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Posición corporal	0-2	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
Actividad espontánea	0-4	2,00	0,50	2,00	0,50	1,00	0,50	1,75	0,25
Ritmo respiratorio	0-3	2,00	0,00	2,00	0,00	2,00	0,00	2,00	0,00
Temblor	0-2	0,00	0,00	0,50	0,29	0,75	0,25	0,25	0,25
Pasos	0-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
evasión de contacto	0-3	2,00	0,00	2,00	0,00	1,75	0,48	2,25	0,25
Piloerección	0-2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	0,29	0,50	0,29
Comportamiento anómalo	0-1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Clasping	0-1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Fuerza en rejilla	0-4	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	2,50	0,29
Reflejo ocular	0-2	2,00	0,00	2,00	0,00	2,00	0,00	2,00	0,00
Agresividad (provocada)	0-1	0,00	0,00	0,75	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00
Lagrimo	0-1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Reacción al sonido	0-3	1,25	0,25	2,00	0,58	1,25	0,25	1,00	0,00
Equilibrio	0-10	10,00	0,00	10,00	0,00	10,00	0,00	10,00	0,00
Fuerza en barra	0-10	10,00	0,00	10,00	0,00	10,00	0,00	10,00	0,00

Tabla anexo 1a. Valores estadísticos obtenidos durante las distintas semanas de monitorización. En la tabla se muestran el valor promedio y el error estándar de todos los parámetros evaluados en el grupo experimental, organizados por semanas.

		GRUPO EXPERIMENTAL							
		semana 1		semana 2		semana 3		semana 4	
Parámetro	Puntuación	Media	EEM	Media	EEM	Media	EEM	Media	EEM
Estado del pelaje	0-3	0,00	0,00	0,25	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00
Color del pelaje	0-3	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
Parches de calvicie	0-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Posición corporal	0-2	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
Actividad espontánea	0-4	3,50	0,29	3,25	0,25	2,00	0,00	0,75	0,25
Ritmo respiratorio	0-3	2,00	0,00	2,00	0,00	2,00	0,00	2,00	0,00
Temblor	0-2	0,00	0,00	1,00	0,41	1,75	0,25	0,25	0,25
Pasos	0-3	0,00	0,00	0,25	0,25	0,25	0,25	0,00	0,00
evasión de contacto	0-3	2,25	0,25	1,75	0,48	1,75	0,48	1,75	0,48
Piloerección	0-2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,75	0,25	0,00	0,00
Comportamiento anómalo	0-1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Clasping	0-1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Fuerza en rejilla	0-4	3,00	0,41	3,00	0,71	1,50	0,29	2,25	0,48
Reflejo ocular	0-2	1,75	0,25	1,75	0,25	1,75	0,25	2,00	0,00
Agresividad (provocada)	0-1	0,25	0,25	0,25	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00
Lagrimo	0-1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Reacción al sonido	0-3	2,25	0,25	2,25	0,48	2,00	0,41	2,00	0,41
Equilibrio	0-10	10,00	0,00	9,25	0,75	10,00	0,00	10,00	0,00
Fuerza en barra	0-10	10,00	0,00	9,75	0,25	10,00	0,00	10,00	0,00

